



Plaquettes et neutrophiles : acteurs clés dans le choc allergique dépendant des IgG

Héloïse Beutier

► To cite this version:

Héloïse Beutier. Plaquettes et neutrophiles : acteurs clés dans le choc allergique dépendant des IgG. Immunologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066519 . tel-01536345

HAL Id: tel-01536345

<https://theses.hal.science/tel-01536345>

Submitted on 11 Jun 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 DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Ecole doctorale Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique
Spécialité : Immunologie

Plaquettes et neutrophiles : acteurs clés
dans le choc allergique dépendant des IgG

Présentée par **Héloïse Beutier**

Soutenue le 9 décembre 2016 devant un jury composé de :

Professeur Pierre Aucouturier	Président
Professeur Delphine Borgel	Rapporteur
Professeur Renato Monteiro	Rapporteur
Professeur Sylvie Chollet-Martin	Examineur
Docteur Benoît Ho-Tin-Noé	Examineur
Docteur Friederike Jönsson	Directeur de thèse
Docteur Pierre Bruhns	Directeur de thèse

Remerciements

Je remercie **Pierre Bruhns** qui m'a permis de réaliser dans son laboratoire devenu maintenant unité d'abord mes stages de 5^{ème} année de Pharmacie et de Master 2 (2011-2012), ma thèse de Pharmacie et ma thèse de doctorat (2013-2016). Je te remercie pour m'avoir toujours poussée à plus de rigueur scientifique et de réflexion critique sur mon travail et aussi ceux publiés par d'autres équipes (notamment lors du travail de *reviewing* que j'ai beaucoup apprécié). Je te suis très reconnaissante de tout ce que j'ai appris au fil de ces années. Je remercie également **Friederike Jönsson** qui m'a confié une partie de son projet de recherche sur les plaquettes, projet que j'ai particulièrement apprécié étudier ! Merci de m'avoir guidée puis fait progressivement confiance au fur et à mesure de ces trois années, merci pour tes conseils/suggestions et tes éclaircissements au cours de nos réunions hebdomadaires qui me permettaient d'avancer. J'espère que les plaquettes vont continuer à nous surprendre et dans le bon sens.

Je vous remercie tous les deux chaleureusement pour ces années de recherche passées à vos côtés au cours desquelles j'ai beaucoup appris et toujours dans une atmosphère très agréable ! Merci pour votre aide et pour m'avoir permis de mener à bien la rédaction de ce manuscrit.

Je remercie le Professeur **Pierre Aucouturier**, le Professeur **Delphine Borgel**, le Professeur **Renato Monteiro**, le Professeur **Sylvie Chollet-Martin** et le Docteur **Benoît Ho-Tin-Noé** de m'avoir fait l'honneur d'être membres de mon jury de thèse. Un remerciement supplémentaire et très chaleureux envers le Professeur Sylvie Chollet-Martin qui m'a fait découvrir le monde de l'immunologie au cours de mes premières années de Pharmacie et m'a ensuite ouvert une porte d'accès à la recherche qui a commencé dans son équipe lors de mon stage de Master 1.

Je remercie vivement **Béatrice Hechler** et toutes les personnes de son laboratoire à l'EFS-Alsace (Strasbourg) qui m'ont appris le lavage rigoureux des plaquettes et tous leurs petits secrets : le moirage des plaquettes, le souffle dans le tube, le petit coup de seringue avant injection etc. Autant de petits détails sans lesquels je ne serai pas parvenue à faire mes expériences sur les plaquettes. Merci Béatrice, pour ta

disponibilité et nos échanges aussi bien sur les questions pratiques que théoriques, et ton aide constante pour m'aider à débloquer le lavage des plaquettes humaines.

Je souhaiterais ensuite remercier chaleureusement l'ensemble de **mon laboratoire** :

Caitlin, thank you so much for beeing here as a friend and as a co-worker in the lab. I won't forget your enthousiasm, your support and of course your precious help in the lab. I won't forget neither all the good moments we spent together outside of the lab ! ☺

Ophélie, un grand grand merci pour tous les bébés FcγRIIA^{tg} que tu as bichonnés pour moi et pour qu'ils soient fin prêts pour mes manipes, merci également pour ton aide côté expérimental surtout dans le rush final de ces dernières semaines, merci aussi pour les nombreuses soirées du labo que tu nous proposes régulièrement (pétanque, théâtre etc.).

Bruno, merci pour ton aide et conseils lors de la purification des anticorps, merci pour tes tablettes de chocolat (noir-noisettes !) et leurs exploits du mardi et du vendredi dont on ne perd pas une miette ☺

Odile, je te remercie vivement pour avoir donné toi aussi de ta personne sur ce projet, je t'en suis très reconnaissante. Très heureuse d'avoir partagé avec toi les séances de pilates, les sorties à Roland Garros (même si la dernière s'est avérée un peu foireuse ☺) et à Bercy, les conversations en tout genre couture, sacs, syndic etc.

Aurélie, ma partenaire de carrels (!), je te remercie pour tes encouragements lors de la rédaction à toute heure du jour et de la nuit, nos pauses thé/café/déjeuners lors du rush final. Merci aussi pour ton aide précieuse pour faire le lien entre l'hôpital et nous lorsque cela était nécessaire et pour tes conseils côté médical.

Merci à vous pour tous les bons moments partagés ensemble au labo : **Bianca**, merci à toi pour m'avoir appris les injections en sous-cutanée, merci pour ton soutien et ta bonne humeur ; **Biliana**, merci pour tes encouragements et tes conseils, bientôt mon retour à tes côtés à la paillasse ☺, **Laurent**, merci pour tes conseils et ton appui sur le premier papier, **Guillaume**, merci pour toutes les discussions échangées aussi bien scientifiques que ludiques lors de mes passages au deuxième étage, **Carlos**, le Pérou ne sera pas pour cette fois, mais je garde précieusement tous les conseils que tu

m'as donné ;-)
Joy (tu fais quasiment partie de notre labo ☺), merci beaucoup pour ton soutien, tous les moments passés ensemble entre nos deux labo, pour les petites pauses musicales en fin de journée et nos sorties à l'extérieur du labo (verres, diners, solidays...). **Danielle**, un grand merci pour le support administratif et ton aide pour accélérer certaines réponses lorsque cela était nécessaire.

Bienvenue/Welcome to **Yu, Pablo, Julien et Pauline !**

Je n'oublie pas **Florence** qui m'a aidée dans l'optimisation et la préparation du prélèvement des souris à l'aorte abdominale, merci pour ta présence lors des essais d'agrégation plaquettaire où nous étions toutes deux pleines d'espoir avec nos IVIg et 6A6. Je n'oublie pas non plus **David, Léoni, Célia, Priscilla, Corentin** qui ne sont plus au laboratoire mais ont contribué à me former scientifiquement (**David**) et à la bonne ambiance du laboratoire.

Je souhaiterais aussi remercier la plate-forme ICAREB et particulièrement **Marie-Noelle Ungeheuer, Gloria Morizot et Jonay Perera Gil** qui gardent espoir (comme moi !) sur la mise au point du lavage des plaquettes humaines à Pasteur malgré l'absence de succès pour le moment.

Je souhaiterais remercier tout particulièrement **Arnaud Boissière** ainsi que **Héloïse Boulet** et **Barbara Van Doosselaere** qui m'ont fait découvrir la valorisation de la recherche pendant ces trois années au cours de mes missions doctorales. Merci de m'avoir impliquée dans vos différents projets et d'avoir pris le temps pour m'expliquer les différents enjeux.

Enfin, je remercie ma famille, mes parents, mes frères et ma cousine Eléonore pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de ces trois années de thèse. Je remercie aussi particulièrement Sara, Afsaneh, Natalya. Enfin Jérémy, merci à toi pour ton soutien, tes encouragements et toutes les petites attentions qui, chaque jour, m'ont rendu la rédaction de la thèse un peu plus facile.

Sommaire

Introduction.....	6
I. L'anaphylaxie ou le choc anaphylactique	6
A. Définition	6
B. Epidémiologie	6
C. Etiologie.....	7
D. Prise en charge médicale.....	8
II. La découverte de l'anaphylaxie	9
III. Les récepteurs pour la portion Fc des IgG chez la souris et chez l'homme.....	11
A. Structure	11
B. Ligands et affinité.....	12
C. Expression cellulaire	15
IV. Les plaquettes	17
A. Homéostasie des plaquettes.....	17
B. Structure des plaquettes.....	17
C. Rôle des plaquettes dans l'organisme.....	19
V. Les neutrophiles	26
A. Granulopoïèse et structure des neutrophiles	26
B. Rôle des neutrophiles dans l'organisme	27
Objectifs de thèse	32
<i>IgG subclasses determine pathways of anaphylaxis in mice</i>.....	34
I. Introduction.....	34
II. Article 1.....	35
<i>Drug-induced anaphylaxis relies on platelets</i>	36
I. Introduction	36
II. Article 2.....	37
Discussion générale	38
I. Le rôle prédominant du FcγRIII chez la souris est-il transposable au FcγRIIA chez l'homme ?	38
A. Modèle simplifié : une sous-classe d'IgG engage un seul FcγR.....	38
B. Plusieurs sous-classes d'IgG engagent un seul FcγR activateur.....	44
C. Plusieurs sous-classes d'IgG engagent plusieurs FcγRs activateurs	45

II. Mécanismes de régulation de l'interaction IgG-FcγRs activateurs	49
A. Les rôles régulateurs du Fc γ RIB et du Fc γ RIIB.....	49
B. La conformation ITAMi du Fc γ RIIA.....	53
C. La glycosylation des IgG	54
III. Des plaquettes humanisées aux plaquettes humaines	56
IV. Les neutrophiles et les plaquettes : deux populations interdépendantes.....	62
A. Nature de l'interaction plaquettes-neutrophiles	62
B. Activation séquentielle ou simultanée ?	65
C. La fonction biologique des complexes plaquettes-neutrophiles circulants.	67
V. Critiques/améliorations du modèle d'étude du choc allergique	72
A. Les paramètres de suivi du choc allergique	72
B. La nature des ligands aux Fc γ Rs (allergènes et anticorps)	73
C. Un modèle de choc allergique plus représentatif de la situation chez l'homme.....	75
D. Modèle d'étude des récepteurs Fc aux IgG.....	76
E. Modèle d'étude des cellules myéloïdes et des plaquettes	80
VI. Enseignements tirés des modèles murins : « mieux » traiter l'anaphylaxie chez l'homme	86
A. Bloquer l'interaction IgG-Fc γ RIIA.....	86
B. Les plaquettes comme cible thérapeutique	91
C. Bloquer l'action des médiateurs PAF et histamine	96
Bibliographie.....	99
Annexe	122
<i>Mechanisms of anaphylaxis in human low-affinity IgG receptor locus knock-in mice</i>	122
Table des illustrations	123

Introduction

I. L'anaphylaxie ou le choc anaphylactique

A. Définition

L'anaphylaxie est la forme la plus sévère d'une réaction allergique. Elle se traduit par des signes cutanéomuqueux (urticaire généralisé, érythème, angioœdème), des signes respiratoires (dyspnée, sifflement, bronchospasme), des signes cardiovasculaires (hypotension, tachycardie, arrêt cardiaque) parfois accompagnés de signes neurologiques (confusion, convulsions, coma), et éventuellement par le décès du patient (1). Il existe quatre grades de sévérité des réactions anaphylactiques décrits dans la Figure 1 ci-dessous.

Grades	Symptômes
I	Signes cutanés généraux : érythème, urticaire/angioœdème
II	Atteinte multiviscérale modérée avec signes cutanéomuqueux, hypotension et tachycardie inhabituelle, hyperréactivité bronchique (toux, difficulté ventilatoire), troubles digestifs (nausées, vomissements, diarrhée)
III	Atteinte multiviscérale sévère menaçant la vie et imposant une thérapeutique spécifique : collapsus, tachycardie ou bradycardie, troubles du rythme cardiaque, bronchospasme, troubles digestifs sévères
IV	Arrêt cardiaque et/ou respiratoire, décès

Figure 1 : Grades de sévérité des réactions anaphylactiques (adapté de (2))

B. Epidémiologie

Les données épidémiologiques de l'anaphylaxie sont difficiles à quantifier et le nombre de cas avérés certainement sous-estimé pour deux raisons principales. La

première raison est que de nombreuses réactions ne sont pas reconnues comme étant des réactions anaphylactiques car les symptômes sont multiples et non caractéristiques. La deuxième est que, bien qu'elle soit obligatoire suite à une anaphylaxie d'origine médicamenteuse, les services hospitaliers ne font pas de déclaration systématique au service de pharmacovigilance. Cependant, plusieurs études épidémiologiques ont été menées et ont permis d'avoir une estimation de l'incidence, de la prévalence et du taux de mortalité.

Récemment, une revue a analysé un ensemble d'études épidémiologiques sur l'anaphylaxie paru de 2000 à 2013 dans les populations européennes. On y apprend qu'en Europe, l'incidence toutes causes confondues est comprise entre 1.5 et 7.9 par 100 000 personnes-années, et qu'elle serait en constante augmentation. Néanmoins, la définition clinique de l'anaphylaxie étant complexe et sa reconnaissance dépendante de chaque praticien, le nombre de personnes admises aux urgences sous la rubrique « anaphylaxie » varie d'un hôpital, et même d'un service à l'autre. Par ailleurs, ces données statistiques indiquent que 0.3% de la population européenne a déjà développé une anaphylaxie (3). Dans le monde, la prévalence augmente rapidement, de 0.05 à 2 % (4) et particulièrement chez les enfants. Le taux de mortalité est de 0.3% aux Etats-Unis (5).

C. Etiologie

Les anaphylaxies diffèrent suivant les âges et suivant les pays. Les plus fréquentes sont dues à des allergies alimentaires, médicamenteuses ou aux venins d'hyménoptères (4).

Chez les enfants, la cause alimentaire est la plus fréquente (6) alors que chez les adultes ce sont les médicaments (4). Aux Etats-Unis et en Australie, les cacahuètes sont en tête des aliments responsables alors qu'en Europe ce sont plutôt le lait de vache et les œufs. On retrouve également certains fruits à coque (les noix et les noisettes), le poisson, les crustacés ou le soja pouvant être responsables d'anaphylaxies (6). Des médicaments sont également en cause ; notamment les pénicillines et autres antibiotiques, les anesthésiants myorelaxants (curares), les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les médicaments cytotoxiques utilisés en chimiothérapie et les anticorps monoclonaux thérapeutiques (4,7). Enfin, les piqûres

d'hyménoptères tels que les abeilles, guêpes, bourdons ou frelons peuvent être à l'origine d'anaphylaxies. Le venin présent dans leur dard contient des enzymes (phospholipases, phosphatases, hyaluronidases) à fort pouvoir allergénique (6).

D. Prise en charge médicale

L'anaphylaxie est une réaction systémique aiguë qui survient en quelques minutes et pouvant être fatale. L'Organisation Mondiale de l'Allergie (8) a émis des recommandations quant à l'utilisation de certains médicaments qui sont pour la plupart des traitements symptomatiques secondaires, inefficaces pour contrer le choc allergique.

Les effets pharmacologiques de l'adrénaline par l'intermédiaire des récepteurs α - et β -adrénergiques permettent de lutter activement contre le développement de la réaction et ce très rapidement. L'adrénaline a pour objectif de rétablir la tension artérielle par un effet vasoconstricteur, elle induit également une bronchodilatation ainsi que des effets inotrope et chronotrope positifs sur le cœur.

Les antihistaminiques, antagonistes des récepteurs de l'histamine H1 et H2 (anti-H1 ou anti-H2), n'ont aucun effet sur les symptômes cardiovasculaires et respiratoires. Les antihistaminiques ne sont pas recommandés mais permettent de soulager l'urticaire et les démangeaisons (dans le cas d'une anaphylaxie de grade I).

En raison de leur délai d'action très long (quelques heures), les glucocorticoïdes (hydrocortisone, prednisone) à propriétés anti-inflammatoires sont recommandés uniquement en deuxième intention pour éviter la survenue d'une anaphylaxie biphasique.

D'autres traitements symptomatiques sont utilisés en association tels que les bronchodilatateurs (β 2-mimétiques) ou un agent vasopresseur (dopamine ou noradrénaline) si l'hypotension persiste. Dans certains cas, il est recommandé d'associer à ces traitements une assistance respiratoire (pompe à oxygène) ainsi que l'injection d'un soluté de remplissage (cristalloïdes ou colloïdes) pour traiter l'hypovolémie (6).

Cette prise en charge médicale repose principalement sur l'éviction de l'allergène (lorsque cela est possible), sur l'injection d'adrénaline et de solutés de remplissage.

II. La découverte de l'anaphylaxie

L'anaphylaxie est un terme d'étymologie grecque signifiant *ana* (ανα) « sens contraire », et *phulaxis* (φύλαξις) « protection ». Ce terme a été créé par Charles Richet et Paul Portier suite à leurs travaux sur la protection immunitaire de l'animal ou prophylaxie. Les deux chercheurs ont constaté qu'une sensibilisation à certaines substances n'entraînait pas une protection mais un certain nombre de signes cliniques aboutissant au décès extrêmement rapide des animaux ; ils ont créé en 1902 le terme « anaphylaxie » par opposition à celui de « prophylaxie ». Cette propriété a été montrée sur des chiens sensibilisés par des injections répétées d'un poison extrait d'une anémone de mer (*anemonia sulcata*) ; puis une dernière injection à une dose plus faible quelques semaines plus tard conduisant à leur mort en quelques minutes. En 1907, « une substance » est dite « toxique » dans le sérum à l'origine d'un choc anaphylactique chez des chiens non traités après transfert de sérum d'un chien ayant développé préalablement un choc anaphylactique : c'est la découverte de l'anaphylaxie passive. L'ensemble de ces travaux leur valurent le Prix Nobel en 1913 (9).

Les deux modèles d'étude développés par Richet et Portier sont toujours utilisés aujourd'hui pour étudier le choc allergique (principalement chez la souris) : l'anaphylaxie systémique active (ASA) et l'anaphylaxie systémique passive (PSA). L'ASA consiste à sensibiliser (ou immuniser) l'animal avec l'antigène (ou allergène) afin de provoquer une réponse anticorps spécifique polyclonale et composée des différentes classes d'immunoglobulines. Quelques semaines plus tard, l'injection de ce même antigène déclenche la réaction anaphylactique. La PSA est un modèle dans lequel la phase de sensibilisation est remplacée par l'injection d'anticorps spécifiques de l'antigène sous forme monomérique ; ou bien des complexes immuns antigène-anticorps ou des agrégats préformés. Dans le cas des anticorps monomériques, une phase de *challenge* (ou injection de l'antigène) est ensuite nécessaire pour déclencher la réaction.

Soixante ans après les travaux de Portier et Richet, en 1966, Teruko et Kimishige Ishizaka découvrent les immunoglobulines de type E qui sont mises en cause dans les réactions d'hypersensibilité immédiate chez les mammifères (10). Progressivement,

l'anaphylaxie est décrite comme étant dépendante des IgE et leurs récepteurs de forte affinité FcεRI (11–14), présents à la surface des mastocytes (13) qui, après activation cellulaire, conduit à la libération d'histamine (11,12). Les basophiles exprimant aussi les FcεRI (15) et produisant d'autres médiateurs comme la tryptase (15), la sérotonine et le PAF (*platelet-activating factor*) (13) seront également mis en cause dans l'anaphylaxie induite par des IgE.

Dans les années 90, l'utilisation des modèles d'ASA révèle que ce modèle d'anaphylaxie n'est pas dépendant de la voie IgE/FcεRI/mastocytes, dite voie « classique », grâce à l'utilisation de souris IgE-, mastocytes- ou FcεRI-déficientes. Il est proposé que les IgG sont elles aussi capables d'induire des réactions anaphylactiques, et que l'anaphylaxie induite par des IgG présente les mêmes symptômes que l'anaphylaxie induite par des IgE (16–18). Par opposition à « la voie classique » (IgE-dépendante), ce mécanisme reposant sur les IgG et leurs récepteurs (FcγRs) est appelé « voie alternative ».

III. Les récepteurs pour la portion Fc des IgG chez la souris et chez l'homme

A. Structure

Les récepteurs qui lient les IgG se nomment les récepteurs Fc aux IgG (ou Fc γ Rs). Chez la souris sauvage, il existe trois Fc γ Rs activateurs Fc γ RI, Fc γ RIII, Fc γ RIV et le Fc γ RIIB inhibiteur qui sont exprimés à la surface cellulaire. Chez l'homme, on distingue quatre Fc γ Rs activateurs Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIC, Fc γ RIIIA, un récepteur inhibiteur Fc γ RIIB, le Fc γ RIIIB (dont la fonction est discutée) (19). Il est important de noter que les Fc γ RIIA et Fc γ RIIIA peuvent également être inhibiteurs lorsqu'ils sont sous une conformation dite ITAMi (mécanisme d'inhibition du motif ITAM détaillé plus loin) (20). Il ne faut pas oublier deux récepteurs aux IgG intracellulaires présents chez la souris et chez l'homme, FcRn et TRIM21 (*tripartite motif containing 21*), dont la fonction est le transport/recyclage des IgG et l'activation du protéasome (21) et qui ne seront pas abordés plus en détail.

Les Fc γ Rs appartiennent à la superfamille des récepteurs des immunoglobulines et sont principalement exprimés à la surface des cellules myéloïdes, des lymphocytes B, des cellules NK et des plaquettes humaines (voir partie C). A l'exception du Fc γ RIIIB humain, ces récepteurs sont caractérisés par une chaîne α permettant la liaison à une immunoglobuline, une région transmembranaire et une queue cytoplasmique rattachée ou non à un dimère de chaînes FcR γ (gamma)(22). Le Fc γ RIIIB a une structure particulière, il est constitué d'une ancre GPI (*glycosyl phosphatidylinositol*) dépourvue de domaine cytoplasmique mais néanmoins décrit d'être capable d'induire une activation cellulaire en s'associant à des intégrines pour sa signalisation (23).

L'expression cellulaire ainsi que la fonctionnalité des Fc γ RI et Fc γ RIIIA humains et des trois récepteurs activateurs chez la souris requièrent leur association à la chaîne FcR γ . Celle-ci est constituée d'un domaine intracellulaire ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) nécessaire à l'activation cellulaire après agrégation des Fc γ Rs à la surface cellulaire. En revanche, les Fc γ RIIA et Fc γ RIIC possèdent leur propre motif ITAM et ne s'associent pas à la chaîne FcR γ . Le signal est optimal

lorsque le récepteur se regroupe et dimérise sur la membrane. L'agrégation des Fc γ Rs par leurs ligands conduit à une phosphorylation des résidus tyrosine dans le motif ITAM par des kinases de la famille Src (telles que Fyn et Lyn), puis le recrutement stable et l'activation de la tyrosine kinase Syk conduisant, après mobilisation de calcium, à l'activation cellulaire des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), l'activation de la voie NF κ B et finalement à une réponse cellulaire pro-inflammatoire (24). Le récepteur inhibiteur Fc γ RIIB possède un motif ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) qui, par le recrutement de SHIP (*SH2-domain-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase*), diminue entre autres l'influx de calcium, lui permettant de réguler l'activation intracellulaire engendrée par l'agrégation des récepteurs activateurs (25).

B. Ligands et affinité

Les récepteurs pour la portion Fc des IgG (Fc γ Rs) sont, comme leur nom l'indique, capables de fixer des IgG. Chez l'homme et chez la souris, les IgG ont une structure de base identique composée de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères. Les chaînes lourdes et légères assemblées forment des domaines fonctionnels : deux régions Fab (*fragment-antigen binding*) et une région Fc (*fragment-crystallizable region*). La reconnaissance de haute spécificité de l'immunoglobuline à l'antigène se situe dans la région Fab (région variable) alors que la transmission des signaux activateurs/inhibiteurs à la cellule via le récepteur Fc se fait par la région Fc (région constante).

La glycosylation des IgG permet de maintenir leur structure quaternaire ainsi que la stabilité thermodynamique de la portion Fc (26). L'IgG est constituée d'un polypeptide portant des oligosaccharides fixés de manière covalente à une asparagine en position 297. L'oligosaccharide comprend un corps central composé de résidus mannose et résidus N-acetylglucosamine (GlcNac) sur lesquels sont accrochés des résidus galactose, acide sialique et fucose avec une fréquence variable (27).

On distingue des récepteurs de forte affinité (empiriquement définis par un $K_A > 10^7 \text{ M}^{-1}$ environ) et les récepteurs de faible affinité (empiriquement définis par un K_A

< 10^7 M^{-1} environ). Les récepteurs de forte affinité fixent les immunoglobulines monomériques et les anticorps complexés à un antigène multivalent (nommé complexe immun), alors que les récepteurs de faible affinité ne fixent que les complexes immuns (22). Il est donc plutôt attendu *in vivo* que les récepteurs de forte affinité soient occupés par des IgG monomériques à la différence des récepteurs de faible affinité qui restent inoccupés.

Chez la souris, il existe quatre sous-classes d'IgG : IgG1, IgG2a, IgG2b et IgG3. Les IgG1 lient un seul récepteur activateur, le FcγRIII ainsi que le FcγRIIB inhibiteur ; les IgG2a et les IgG2b lient l'ensemble des récepteurs activateurs et le récepteur inhibiteur ; les IgG3 ne lient pas de FcγRs, ou si elles en sont capables, très faiblement le FcγRI (21). Ces sous-classes ont des affinités différentes pour chacun des FcγRs comme résumés dans la Figure 2.

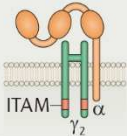
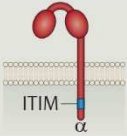
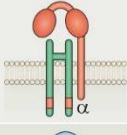
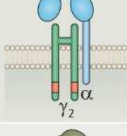
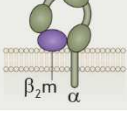
Structure	Name	Gene	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	Major function
	FcγRI	<i>Fcgr1</i>	NB	$1 \times 10^{8 \text{¶}}$	1×10^5	+ [‡]	Activation
	FcγRIIB	<i>Fcgr2b</i>	3×10^6	4×10^5	2×10^6	No binding	Inhibition
	FcγRIII	<i>Fcgr3</i>	3×10^5	7×10^5	6×10^5	No binding	Activation
	FcγRIV	<i>Fcgr4</i>	NB	$3 \times 10^{7 \text{¶}}$	$2 \times 10^{7 \text{¶}}$	No binding	Activation
	FcRn [§]	<i>Fcgrt</i>	8×10^6	+	+	+	IgG recycling and transport

Figure 2 : Structure et affinité des FcγRs de souris pour les sous-classes IgG1, IgG2a, IgG2b et IgG3 (adapté de (28))

¶ (haute affinité), + (affin mais valeur inconnue), NB (non affin), les constantes d'affinité sont exprimées en M^{-1}

Chez l'homme, il existe également quatre sous-classes d'IgG. On retrouve dans le sérum 63% d'IgG1, 29% d'IgG2, 5% d'IgG3 et 3% d'IgG4. Les IgG1 et IgG3 lient l'ensemble des Fc γ Rs. Les IgG2 lient le Fc γ RIIA et le Fc γ RIIIA. Les IgG4 lient les Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, Fc γ RIIC et le Fc γ RIIIA. Des polymorphismes génétiques des Fc γ Rs influencent la liaison des IgG à un Fc γ R donné, ce qui crée des variations interindividuelles chez l'homme. C'est le cas du polymorphisme génétique H/R131 du Fc γ RIIA résultant de la substitution d'une histidine en une arginine à la position 131 dans le deuxième domaine *Ig-like* à l'origine d'individus 131HH (28% de la population), 131HR (47.5% de la population) et 131RR (24.5% de la population) (29). L'allèle H131 a une affinité modérée pour les IgG2 alors que l'allèle R131 a une faible affinité pour les IgG2. D'autres polymorphismes génétiques ont également été décrits pour les Fc γ RIIB, Fc γ RIIC, Fc γ RIIIA et Fc γ RIIIB dont certains influencent leur capacité à lier les IgG. Les constantes d'affinités de chaque Fc γ R pour chaque sous-classe d'IgG sont répertoriées dans la Figure 3 ci-dessous.

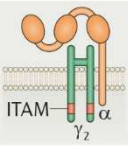
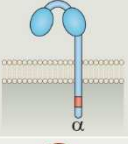
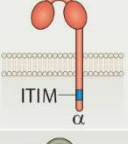
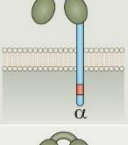
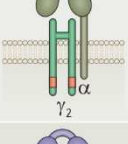
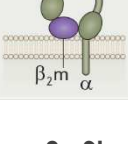
Structure	Name	CD	Gene	Alleles*	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	Major function
	FcγRI	CD64	FCGR1A	–	6x10 ⁷ ¶	No binding	6x10 ⁷ ¶	3x10 ⁷ ¶	Activation
	FcγRIIA	CD32A	FCGR2A	His131 Arg131	5x10 ⁶ 3x10 ⁶	4x10 ⁵ 1x10 ⁵	9x10 ⁵ 9x10 ⁵	2x10 ⁵ 2x10 ⁵	Activation
	FcγRIIB	CD32B	FCGR2B	Ile232 Thr232	1x10 ⁵ 1x10 ⁵	2x10 ⁴ 2x10 ⁴	2x10 ⁵ 2x10 ⁵	2x10 ⁵ 2x10 ⁵	Inhibition
	FcγRIIC	CD32C	FCGR2C	Gln13 Stop13	1x10 ⁵	2x10 ⁴	2x10 ⁵	2x10 ⁵	Activation
	FcγRIIIA	CD16A	FCGR3A	Val158 Phe158	2x10 ⁵ 1x10 ⁵	7x10 ⁴ 3x10 ⁴	10x10 ⁶ ¶ 8x10 ⁶ ¶	2x10 ⁵ 2x10 ⁵	Activation
	FcγRIIIB ⁺	CD16B	FCGR3B	NA1, NA2 or SH	2x10 ⁵	No binding	1x10 ⁶	No binding	Decoy; activation?
	FcRn ^s	None assigned	FCGR7	ND¶	8x10 ⁷ ¶	5x10 ⁷ ¶	3x10 ⁷ ¶	2x10 ⁷ ¶	IgG recycling and transport

Figure 3 : Structure et affinité des FcγR et du FcRn humains pour les différentes sous-classes d'IgG

¶ (haute affinité), les constantes d'affinité sont exprimées en M⁻¹ (adapté de (28)).

C. Expression cellulaire

Chez la souris, le FcγRI est exprimé principalement à la surface des cellules dendritiques, des monocytes Ly6C^{hi/lo}, des monocytes de la moelle osseuse et des macrophages tissulaires (rate, foie, alvéolaires) ((30), Gillis et al., *Journal of Autoimmunity*) ; le FcγRIII est exprimé par l'ensemble des cellules myéloïdes et par les cellules NK (30) ; le FcγRIV est exprimé par les monocytes Ly6C^{lo} (31), les macrophages et également les neutrophiles (32) ; le FcγRIIB est exprimé par l'ensemble des cellules myéloïdes et des lymphocytes B (30).

Chez l'homme, le Fc γ RI est exprimé à la surface des monocytes/macrophages et des cellules dendritiques ; il a été montré que son expression pouvait être induite à la surface des neutrophiles (30) et des mastocytes (33) dans des conditions inflammatoires. Le Fc γ RIIA est présent à la surface de toutes les cellules myéloïdes et des plaquettes chez l'homme ; mais pas des lymphocytes. Les plaquettes humaines portent 1000 à 4000 copies de ce récepteur, ce qui par leur nombre important en circulation en fait la plus grande source de Fc γ RIIA dans le corps (34). Le Fc γ RIIB est exprimé principalement sur les lymphocytes B (35), les basophiles (36), 20% des monocytes, 4% des neutrophiles, les macrophages tissulaires, les cellules dendritiques (35) ; mais pas les mastocytes. Le Fc γ RIIC est présent à la surface des cellules NK (37), des monocytes et des neutrophiles (38) mais en raison d'un polymorphisme allélique qui introduit un codon STOP sur l'exon 3, seul 20% de la population exprime ce récepteur. Le Fc γ RIIIA est exprimé à la surface des cellules NK et des monocytes/macrophages, et le Fc γ RIIIB très densément à la surface des neutrophiles et plus faiblement à la surface de certains basophiles (39).

Chaque cellule exprimant un Fc γ R activateur à sa surface peut être activée après engagement et agrégation de leurs récepteurs, ce qui signifie que toutes les cellules myéloïdes (neutrophiles, monocytes, basophiles...) ainsi que les plaquettes humaines pourraient être activées en présence de complexes immuns contenant des IgG, comme cela pourrait être le cas lors d'un choc anaphylactique.

IV. Les plaquettes

A. Homéostasie des plaquettes

Les plaquettes sont des fragments cytoplasmiques anucléés présents dans la circulation sanguine. De forme discoïde, d'un diamètre de 2 μm et d'un volume moyen de 5-6 μm^3 environ, ces fragments sont issus de la lignée mégacaryocytaire située dans la moelle osseuse. En réponse à la thrombopoïétine, la réplication de l'ADN sans division de la cellule elle-même (processus d'endomitose (40)) conduit progressivement à la formation d'extensions cytoplasmiques à la surface des mégacaryocytes pour constituer des « pro-plaquettes ». Ces « pro-plaquettes » s'insèrent entre les jonctions des cellules endothéliales sinusoïdales des vaisseaux sanguins et, après fragmentation, forment une multitude de plaquettes individuelles déversées directement dans la circulation sanguine (41). Les plaquettes nouvellement synthétisées sont dites « réticulées » et se distinguent des autres plaquettes déjà en circulation par leur volume plaquettaire moyen (MPV) plus important et une plus forte quantité d'ARN (pouvant être révélé par un marquage au thiazole orange par exemple) (42). Récemment, la découverte de réservoirs de mégacaryocytes dans les poumons suggère un autre lieu de production des plaquettes (43).

Chez l'homme, 100 milliards de nouvelles plaquettes sont produites tous les jours par les mégacaryocytes afin de maintenir une numération plaquettaire comprise entre 150 et 400 $\times 10^9$ plaquettes par litre de sang (44). Leur durée de vie est comprise entre 5 et 10 jours (45). Chez la souris, la numération plaquettaire est plus élevée que chez l'homme, elle se situe entre 900 et 1600 $\times 10^9$ plaquettes par litre de sang et leur durée de vie est de 3 à 5 jours. Les plaquettes « âgées » ou en apoptose sont éliminées de la circulation par les macrophages de la rate et du foie ainsi que par les hépatocytes après reconnaissance de leurs glycoprotéines membranaires modifiées (46).

B. Structure des plaquettes

Les plaquettes sont des dérivés cellulaires anucléés qui sont composés d'une membrane plasmique et d'un cytoplasme contenant principalement des microtubules, des granules et des mitochondries.

La membrane plasmique est constituée d'une couche de phospholipides et de nombreux récepteurs transmembranaires (Figure 4). Les plaquettes humaines peuvent être activées par des stimuli mécaniques ou biologiques grâce à la liaison d'agonistes à ces récepteurs membranaires spécifiques. On retrouve notamment des intégrines, des sélectines, des récepteurs à la thrombine *protease-activated receptors* (PAR) (47), à l'ADP (récepteurs P2Y (48)), au collagène (49), au PAF (50) et à l'histamine (51), le Fc γ RIIA (52), le Fc ϵ RI (53,54). Les plaquettes peuvent détecter la présence de pathogènes dans la circulation grâce à l'expression de *Toll-Like receptors* (TLR) à leur surface (55). Les TLR appartenant à la famille des *Pattern recognition receptors* (PRR) reconnaissent des motifs moléculaires conservés à la surface des pathogènes, appelés *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP). Grâce au système canaliculaire ouvert, qui est un ensemble d'invaginations de membranes cellulaires, la surface d'échange des plaquettes avec l'environnement extérieur est nettement augmentée (56).

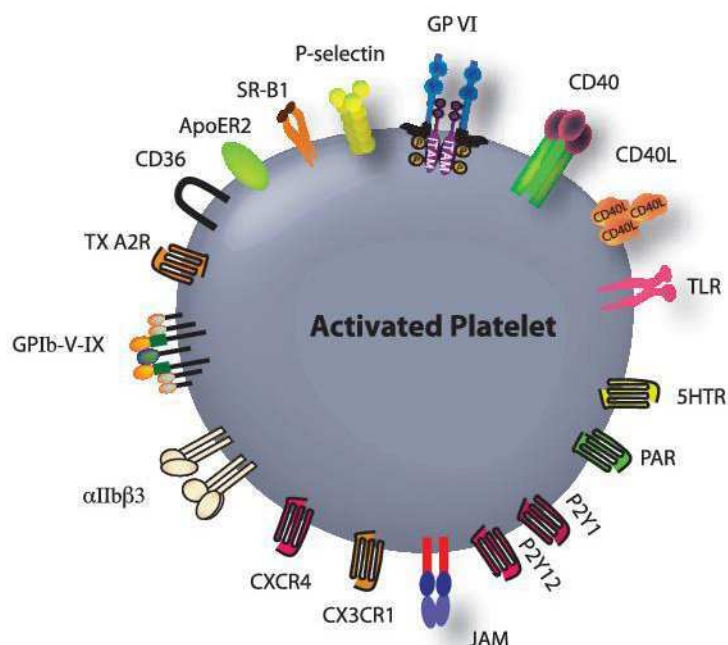


Figure 4 : Les récepteurs des plaquettes activées (57). A noter que le Fc γ RIIA/CD32A n'est pas indiqué dans cette figure.

Dans le cytoplasme, un réseau de microtubules et un cytosquelette d'actine permettent aux plaquettes, après activation, de passer d'une forme discoïde à une forme sphérique et de libérer le contenu de leurs granules dans le milieu extracellulaire (58).

Trois types de granules sont présents au sein de leur cytoplasme : les granules α , les granules denses et les lysosomes. Les plus abondants sont les granules α (ils constituent 10% du volume de la plaquette) qui contiennent une grande variété de protéines dont les principales sont le *Platelet Factor 4*, le *Platelet-derived growth factor*, la β -thromboglobuline, le fibrinogène, le facteur Von Willebrand, la fibronectine, la P-sélectine (ou CD62P), des facteurs de la coagulation, des chimiokines et des protéines d'adhésion (59). Les granules denses contiennent du calcium, de la sérotonine et des nucléotides tels que l'ADP alors que les lysosomes sont constitués d'enzymes hydrolytiques et de peroxysomes (60). Les plaquettes activées sont caractérisées par l'expression à leur surface de la P-sélectine et la conformation active de certaines intégrines (notamment GPIIb/IIIa) (61). Par ailleurs, elles libèrent dans le milieu extracellulaire de nombreuses chimiokines, cytokines et lipides pro-inflammatoires tel que le PAF (62), et même de l'histamine (63). Les plaquettes pourraient également générer des microparticules qui peuvent délivrer des signaux à d'autres populations cellulaires telles que les neutrophiles (64,65).

Des quantités d'ARNm présentes dans le cytoplasme des mégacaryocytes sont empactées au cours de la thrombogénèse permettant aux plaquettes de générer de nombreuses protéines malgré l'absence de noyau, par exemple en cas d'inflammation (66).

C. Rôle des plaquettes dans l'organisme

1. Les plaquettes dans l'hémostase

Les plaquettes sont connues pour leur fonction majeure dans l'hémostase, processus physiologique qui permet l'arrêt d'un saignement et la prévention de thromboses.

Lors de la rupture de l'endothélium vasculaire suite à une blessure, la couche sous-endothéliale constituée de plusieurs protéines, dont le collagène et le facteur von Willebrand (vWF), est exposée aux plaquettes présentes dans la circulation sanguine. La formation progressive d'un clou plaquettaire résultant d'une adhésion stable entre les plaquettes et la matrice sous-endothéliale suit un processus coordonné qui s'effectue en plusieurs étapes : attachement, roulement, activation et adhésion stable (67). Tout d'abord, le facteur Von Willebrand (wWF), molécule thrombogène, permet la liaison entre le collagène de la matrice sous-endothéliale et les plaquettes circulantes ; et également la liaison inter-plaquettes. Le vWF se lie aux plaquettes via la glycoprotéine GPIb α (appartenant au complexe GPIb-V-IX). C'est le seul récepteur à la surface des plaquettes non activées capable de lier avec une affinité suffisante le vWF sous conformation active (68). Le GPIb α permet le roulement des plaquettes à la surface de la matrice sous-endothéliale en direction du flux sanguin et donc leur ralentissement conduisant à l'engagement d'autres récepteurs à l'origine d'une adhésion stable. L'adhésion est donc ensuite renforcée grâce à l'action synergique de deux récepteurs majeurs du collagène, GPVI et $\alpha 2\beta 1$, exprimés à la surface des plaquettes et dont l'engagement conduit à l'activation plaquettaire. Enfin, la dernière étape est l'arrêt définitif des plaquettes activées à la surface de la matrice extracellulaire suite au changement de conformation de plusieurs intégrines notamment la glycoprotéine GPIIb/IIIa liant le fibrinogène, la fibronectine et le vWF. Ces différentes interactions entraînent l'agrégation des plaquettes, leur changement de forme ainsi que leur dégranulation. Tout au long de ce processus, de nouvelles plaquettes sont recrutées progressivement pour consolider le clou plaquettaire ou thrombus blanc (67).

Après activation plaquettaire, des récepteurs d'adhésion contenus préalablement dans les granules α des plaquettes sont exprimés à leur surface (la P-sélectine par exemple) ; également de nombreux facteurs et cofacteurs de la coagulation sont libérés dans le milieu extracellulaire et contribuent à l'initiation de la coagulation (59). En outre, l'exposition de phospholipides anioniques à la surface des plaquettes activées permet le recrutement de protéines de la coagulation afin d'initier la formation d'un thrombus (69). La cascade de la coagulation, initiée par le facteur tissulaire (protéine membranaire exprimée de manière constitutive et importante à la surface des fibroblastes de la couche sous-endothéliale) et par le

facteur VIIa circulant, est une succession de réactions enzymatiques qui aboutit à une concentration élevée de thrombine capable de catalyser la polymérisation du fibrinogène soluble en fibrine insoluble. A la fin de ce processus, des hématies, leucocytes et plaquettes sont incorporés à cette structure pour constituer peu à peu un thrombus (69). Il est important de noter que le système de la coagulation est contrôlé par plusieurs inhibiteurs physiologiques pour éviter un emballement de la réaction : l'antithrombine qui inhibe principalement la thrombine et le facteur Xa ; la protéine C (activée par la thrombine), associée à son cofacteur la protéine S, ralentit la génération de thrombine par inactivation des facteurs Va et VIIIa ; et l'inhibiteur du facteur tissulaire TFPI (*tissue factor pathway inhibitor*) qui bloque la phase d'initiation de la coagulation en formant un complexe quaternaire avec le facteur tissulaire et les facteurs VIIa et Xa. En leur absence ou anomalies génétiques, un excès de coagulation peut être responsable de la formation de thromboses (70).

2. Les plaquettes dans l'immunité

Il y a plus de 100 millions d'années, les plaquettes n'existaient pas chez les invertébrés. En revanche, les amœbocytes, uniques cellules immunitaires chez la limule (arthropode marin âgé de plus de 100 millions d'années), sont décrits comme des cellules pouvant s'agréger et libérer des facteurs de la coagulation afin d'immobiliser et d'emprisonner les bactéries (71). Il est donc probable que les plaquettes (présentes chez les mammifères), et donc dérivées de ces cellules immunitaires primitives, aient conservées un rôle dans l'immunité qui est d'ailleurs aujourd'hui de plus en plus reconnu.

Les plaquettes dans l'inflammation.

Dans la phase précoce de la réponse inflammatoire, les plaquettes recrutées à la surface de l'endothélium vasculaire activé peuvent augmenter la perméabilité vasculaire en sécrétant de la sérotonine (72,73), du *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (74) ou du PAF (75). Par ailleurs, elles peuvent également favoriser le recrutement et la migration transendothéliale des neutrophiles et des monocytes en sécrétant des chimiokines (CXCL1, PF4, RANTES) en augmentant l'expression et/ou

l'activation de molécules d'adhésion à la surface des leucocytes et des cellules endothéliales (76). Plusieurs cytokines peuvent être également libérées par les plaquettes comme PDGF et TGF- β contribuant à la résolution de l'inflammation (77). Les plaquettes peuvent aussi moduler les fonctions effectrices des leucocytes. Par exemple dans le sepsis, la reconnaissance du LPS via le TLR-4 à leur surface plaquettaire favorise le recrutement des neutrophiles, leur activation, leur dégranulation et la formation de *neutrophil extracellular traps* (NETs) (voir chapitre V « Les neutrophiles ») capables de piéger et de tuer les bactéries responsables (78). Dans ce même contexte, une autre équipe montre que cette élévation de la concentration plasmatique de NETs est dépendante de PSGL-1 et Mac-1 (79), deux récepteurs permettant aux neutrophiles d'interagir avec les plaquettes (80). Suivant le contexte inflammatoire et par conséquent du stimulus plaquettaire rentrant en jeu (par exemple thrombine, ADP, levures opsonisées par des IgG), les plaquettes peuvent aussi augmenter ou inhiber la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), et/ou la production de cytokines, d'enzymes cytotoxiques (MPO par exemple) par les neutrophiles et les macrophages ; et aussi stimuler la phagocytose des monocytes/macrophages (76). Une étude récente issue du laboratoire de Benoît Ho-Tin-Noé a montré que les plaquettes peuvent exercer à la fois un rôle proinflammatoire et un rôle antihémorragique. En effet, dans un modèle d'inflammation cutanée induit par des complexes immuns, elles favorisent l'infiltration des neutrophiles ainsi que leur activité cytotoxique tout en contrôlant le risque hémorragique au niveau de l'endothélium vasculaire (81).

Les plaquettes font le lien entre immunité innée et immunité acquise.

Les plaquettes activées exprimant le CD40L (ou CD154) peuvent interagir directement avec des cellules du système immunitaire exprimant le récepteur CD40 : les lymphocytes et les cellules présentatrices d'antigène. En effet, l'interaction entre plaquettes et lymphocytes B via l'axe CD40L-CD40 peut induire leur différenciation puis leur prolifération conduisant à la production d'anticorps (82). Ce même axe peut augmenter la réponse des lymphocytes T CD8⁺ au cours d'une infection virale (83) ou d'une infection bactérienne à *Listeria monocytogenes* (84). Par ailleurs, les plaquettes activées peuvent libérer dans la circulation du CD40L sous forme soluble

ou exprimées à la surface de microparticules dérivées des plaquettes (85). Ceci leur permet d'interagir davantage à distance avec d'autres cellules.

Par ailleurs, de nombreuses cytokines pro- et anti-inflammatoires et chimiokines sont stockées dans les granules α des plaquettes. Par exemple, la quantité de *transforming growth factor* (TGF β) présente dans l'organisme provient principalement du pool plaquettaire (86). La différenciation des lymphocytes T régulateurs étant dépendante du TGF β , il est possible que les plaquettes contrôlent leur différenciation notamment suite à une interaction entre les ectosomes (particules entre 0.1–1 μ m de diamètre) dérivés des plaquettes et les lymphocytes T CD4+ (87).

3. L'implication plaquettes dans différentes pathologies

Note : A travers quelques exemples, cette partie a pour objectif de montrer brièvement l'implication des plaquettes dans différentes pathologies et leur possibilité d'interagir avec d'autres cellules du système immunitaire.

L'athérosclérose. Les plaquettes contribuent à l'installation et à la progression de l'athérosclérose par l'établissement et le maintien d'une réponse pro-inflammatoire (57,88). En effet, la formation de plaques d'athérome correspond au dépôt de lipides à la surface de l'endothélium associé à un environnement pro-inflammatoire. L'endothélium activé recrute des plaquettes circulantes qui, après activation, sécrètent de nombreux médiateurs pro-inflammatoires (CD154, RANTES, PF4, IL1 α) amplifiant l'activation de l'endothélium. Ceci conduit au recrutement de nombreux monocytes circulants (notamment par la présence du PF4 chimioattractant) et au dépôt d'autres lipides contribuant à développer l'athérosclérose. Cette boucle d'activation amplificatrice de l'endothélium, des plaquettes et des monocytes, associés au dépôt d'autres lipides, contribue à la progression de la maladie.

L'arthrite rhumatoïde est une Inflammation chronique et auto-immune affectant les articulations conduisant à l'érosion du cartilage. En comparaison des individus sains, il a été mis en évidence une augmentation de l'expression de la P-sélectine à la surface des plaquettes dans le sang de patients atteints d'arthrite (89). En outre,

des microparticules dérivées de plaquettes ainsi que du CD40L soluble sont détectés dans la circulation chez les patients arthritiques comparés aux individus sains (90,91). Ces microparticules plaquettaires exacerbent l'inflammation des articulations par la production d'IL-1 (92). Les microparticules dérivées des plaquettes semblent donc jouer un rôle important dans cette pathologie.

Le lupus est une maladie auto-immune caractérisée par la présence d'auto-anticorps principalement dirigés contre des antigènes nucléaires, en particulier l'ADN double brin et différentes protéines du noyau. Dans le sang de patients lupiques, une élévation du taux de thromboxane et de CD40L soluble, de la P-sélectine à la surface des plaquettes ainsi que des agrégats inter-plaquettes et plaquettes-leucocytes sont mis en évidence (92). Par ailleurs, des complexes immuns (ADN-anti-ADN ; ribonucléoprotéine RNP/anti-RNP) sont capables d'activer les plaquettes via le Fc γ RIIA qui s'associent ensuite aux cellules dendritiques myéloïdes et plasmacytoïdes (via l'interaction CD40L-CD40) favorisant ainsi la sécrétion d'IFN γ (93). Cette pathologie semble impliquer le Fc γ RIIA à la surface des plaquettes conduisant à une activation plaquettaire.

Le TRALI (*transfusion-related acute lung injury*) est une complication survenant dans les six heures après la transfusion de produits dérivés du sang (94). Le TRALI se caractérise par un syndrome de détresse respiratoire, la formation d'un œdème pulmonaire non cardiogénique et une hypoxémie (95). Des études chez la souris montrent que les plaquettes contribuent au développement du TRALI. En effet, la déplétion de plaquettes améliore la fonction pulmonaire et diminue l'infiltrat de leucocytes (96). La présence de CD40L soluble dans les concentrés plaquettaires stockés pour une future transfusion suggère une activation possible des neutrophiles pulmonaire après engagement de l'axe CD40L-CD40 (97). En outre, une étude suggère que les plaquettes activées favoriseraient la formation de NETs par les neutrophiles dans les poumons (98). L'interaction plaquette-neutrophile contribuerait à l'installation d'un TRALI.

Le sepsis est une réaction systémique de l'organisme suite à une infection. La présence de pathogènes et certains composants de la membrane bactérienne (par exemple le LPS) sont à l'origine d'une forte réponse inflammatoire ainsi que de l'activation de la coagulation et l'inhibition de la fibrinolyse (dissolution du thrombus). La coagulation intense développée lors du sepsis peut entraîner la

consommation des protéines C et S, anticoagulants physiologiques qui sont alors incapables d'inhiber cette coagulation (99). Par ailleurs, chez les patients développant un sepsis, l'activation plaquettaire (expression augmentée de P-sélectine) ainsi que la formation de microparticules plaquettaires permet notamment aux plaquettes d'interagir avec les neutrophiles et l'endothélium vasculaire (100). Dans un modèle murin, l'interaction plaquettes-neutrophiles favorise le recrutement des neutrophiles, leur activation, leur dégranulation et la formation de NETs (78). A l'inverse, une équipe a également reporté un rôle protecteur des plaquettes dans le sepsis (101), suggérant que l'étude du rôle des plaquettes dans la physiopathologie de cette pathologie doit être approfondie.

V. Les neutrophiles

A. Granulopoïèse et structure des neutrophiles

Chez l'homme, 50 à 70% des leucocytes sont des polynucléaires neutrophiles (appelés neutrophiles). Le nombre de neutrophiles produit par jour est de environ 10^{11} et peut augmenter jusqu'à 10^{12} en cas d'infection bactérienne (102). Les neutrophiles sont formés dans la moelle osseuse (processus de granulopoïèse) en réponse à plusieurs cytokines, principalement le *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF) (103). Au cours de la granulopoïèse, le neutrophile passe par différents stades : myéloblaste, promyélocyte, métamyélocyte et finalement polynucléaire neutrophile (104). Cette dernière étape nécessite notamment l'action d'un facteur de répression de la transcription appelé *growth factor independent 1* (Gfi1). Les neutrophiles matures circulants ont un temps de demi-vie relativement court estimé entre 8 et 12 heures dans la circulation et jusqu'à un ou deux jours dans les tissus (105). L'estimation de leur temps de demi-vie est un sujet débattu (106,107) ; mais il semble s'allonger dans des conditions inflammatoires (108,109). Leur nombre présent en circulation dépend d'un équilibre entre le taux de production par la moelle osseuse et de leur survie dans la circulation sanguine.

Dans la circulation sanguine, les neutrophiles matures ont un diamètre compris entre 7 et 10 μm et leur cytoplasme est riche en granules et vésicules sécrétoires. Trois types de granulations contenant des protéines pro-inflammatoires sont retrouvés au sein des neutrophiles. On distingue les granulations azurophiles contenant notamment la myéloperoxydase (MPO), les granulations secondaires contenant de la lactoferrine et les granulations tertiaires ou gélatinases contenant des métalloprotéinases. Les neutrophiles peuvent mobiliser rapidement leurs vésicules sécrétoires dont les protéines sont incorporées à la membrane plasmique du neutrophile activé. En effet, après activation des neutrophiles, les vésicules transportent d'abord à la surface cellulaire des molécules nécessaires à l'adhésion du neutrophile (par exemple, CD18 ou $\beta 2$ intégrine) (110) ; puis, les granulations tertiaires libèrent les protéases à l'origine de la digestion de la membrane basale ou

matrice extracellulaire, probablement pour permettre la transmigration du neutrophile (111).

B. Rôle des neutrophiles dans l'organisme

Les neutrophiles constituent la première ligne de défense contre les pathogènes (bactéries, champignons, protozoaires). Alors que les neutrophiles représentent 50% à 70% des leucocytes dans la circulation sanguine chez l'homme, il représentent seulement 10 à 25% chez la souris (112).

Après leur différenciation dans la moelle osseuse, les neutrophiles sont libérés et « patrouillent » dans la circulation sanguine à la recherche d'une infection ou d'une inflammation (104). La détection d'un pathogène présent dans un tissu induit une réponse proinflammatoire émanant des macrophages tissulaires résidents et des mastocytes qui sécrètent des cytokines (TNF α et IL-1) ainsi que des médiateurs (histamine et leucotriènes) afin d'activer l'endothélium vasculaire et permettre le recrutement de neutrophiles circulants (113).

1. La diapédèse

Pour atteindre le lieu de l'inflammation, les neutrophiles circulants doivent traverser l'endothélium vasculaire. Ce processus s'appelle diapédèse et se fait suivant une succession d'étapes au cours desquelles les neutrophiles et les cellules endothéliales activées interagissent via différents récepteurs (114). Les principales étapes de la diapédèse sont les suivantes : attachement du neutrophile à la surface de l'endothélium ; roulement du neutrophile le long de l'endothélium, adhésion puis arrêt du neutrophile, passage du neutrophile au travers de l'endothélium suivant une voie paracellulaire (entre deux cellules endothéliales) ou parfois suivant une voie transcellulaire (au travers de la cellule endothéliale) (114). Tout au long de ce processus, les neutrophiles doivent résister à la pression exercée par le flux sanguin. Pour cela, des récepteurs de la famille des sélectines (PSGL-1 par exemple) exprimés à leur surface sont à l'origine du roulement ; des intégrines (LFA-1 par exemple) sont à l'origine de leur adhésion puis de l'arrêt à la surface de l'endothélium. Il a été aussi

rapporté la formation d'extensions membranaires (ou élingues, « *slings* ») qui permettent aux neutrophiles d'établir des interactions fortes avec l'endothélium (115).

2. Activation des neutrophiles

Les neutrophiles sont activés en réponse à des signaux proinflammatoires qui leur permettent de libérer le contenu de leurs granules et de phagocyter les pathogènes.

Les neutrophiles répondent en général à un ensemble de stimuli mais l'exposition à seul stimulus particulier (LPS, $\text{TNF}\alpha$, chimiokines, facteurs de croissance) les sensibilise et leur permet de répondre de manière amplifiée suite à un second stimulus (116–118). Par exemple, une étude montre que l'injection d'un anticorps anti-Ly6G chez des souris préalablement sensibilisées au LPS développent un choc allergique (dépendant de la libération de PAF et des neutrophiles) plus sévère que des souris non sensibilisées (116). Cet effet permet donc aux neutrophiles de répondre de manière optimale et le plus rapidement possible en cas d'infection ou d'inflammation. De même, les récepteurs aux leucotriènes et aux chimiokines présents à leur surface peuvent aussi les sensibiliser après liaison à leur ligand.

Les neutrophiles reconnaissent les pathogènes par leur *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) (102). Parmi eux, on distingue notamment le LPS, l'ARN double brin caractéristique de certains virus, l'ADN bactérien ou encore des peptidoglycanes. Ces PAMP sont reconnus par des récepteurs intracellulaires ou exprimés à la surface des neutrophiles de la famille des pattern recognition receptors (PRR) (102). Parmi les PRR, on distingue notamment les TLR reconnaissant des lipides, carbohydrates, ADN, peptides, ARN simple et double brin(119) ; et les C-Type Lectin Receptors (CLR) dont le plus important est la dectine-1 reconnaissant les β -glucanes d'origine fongique. En effet, la dectine-1 exprimée à la surface des neutrophiles internalise puis élimine les pathogènes d'origine fongique (120).

3. Les fonctions clés des neutrophiles

En présence de plusieurs stimuli, les neutrophiles éliminent le pathogène par phagocytose, explosion oxydative, dégranulation, synthèse de cytokines et formation de NETs (ou NETose) (121) (Figure 5).

Comme mentionné précédemment, les neutrophiles humains expriment l'ensemble des Fc γ Rs à leur surface (22). La phagocytose du neutrophile repose sur l'engagement des Fc γ Rs, des récepteurs au complément (CR-1 et CR-3 exprimés à leur surface (122)) et la dectine-1 (123) qui permettent la reconnaissance du pathogène opsonisé par des IgG ou des composés de type β -glycanes, et conduit à son internalisation dans une vacuole appelée phagosome (124). Après internalisation, l'augmentation du calcium cytosolique au sein du neutrophile permet à la vacuole contenant le pathogène de fusionner avec les granules contenant des enzymes hydrolytiques (125) pour former un phagosome ainsi que d'activer la NADPH oxydase (126), essentielles à l'activité bactéricide (127).

L'acidité à l'intérieur du phagosome permet au neutrophile de déclencher l'explosion oxydative qui consiste en la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS ; *reactive oxygen species*) par la NADPH oxydase (128). Ces ROS jouent un rôle majeur pour détruire les bactéries ou les champignons pathogènes internalisés. L'ensemble du processus de phagocytose conduit à la destruction et à la digestion du pathogène.

Au cours de leur maturation, les neutrophiles développent de nombreux compartiments intracellulaires, les vésicules et les granules sécrétoires, qui contiennent des protéines à activité bactéricide et proinflammatoires (129). Les neutrophiles contiennent des protéinases et des peptides antimicrobiens stockés dans leurs granules qui fusionnent avec le phagosome pour détruire le pathogène internalisé. En outre, la fusion de ces granules avec la membrane plasmique permet également une libération extracellulaire du contenu de ces granules.

Les neutrophiles activés sont également capables de produire différentes cytokines pro-inflammatoires comme IL-1 β , IL-6, TNF α et IL-8 qui aident au recrutement d'autres neutrophiles et d'autres leucocytes (130).

La NETose est un mécanisme par lequel les neutrophiles libèrent dans le milieu extracellulaire des filaments de chromatine décondensée (molécules d'ADN et histones) associés à des protéines granulaires (par exemple l'élastase et la

myéloperoxydase) (131). Les NETs permettent aux neutrophiles d'« attraper » et de tuer directement le pathogène par projection dans le milieu extracellulaire d'un mélange collant de chromatine, de peptides et d'enzymes antimicrobiens en forte concentration. En outre, il est important de noter que la NETose n'est pas seulement utilisée à des fins bactéricides par les neutrophiles. Par exemple, l'équipe de Sylvie Chollet-Martin a montré que les NETs des neutrophiles humains sont capables de réguler la maturation des cellules dendritiques humaines préalablement sensibilisées par du LPS (132). A l'inverse, il est important de mentionner que les NETs peuvent aussi avoir un effet délétère sur l'organisme et sont mis en cause dans plusieurs pathologies. Plusieurs molécules composant la structure des NETs sont des autoantigènes (MPO, ADN double-brin, histones) dans des maladies auto-immunes, par exemple le lupus érythémateux systémique ou la vascularite à ANCA (*Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies*). Par ailleurs, les NETs, peuvent contribuer à la formation de thrombi en favorisant l'adhésion entre plaquettes, hématies, protéines effectrices et facteurs de la coagulation (133,134).

Alors que la NETose « classique », comme son nom l'indique, a été initialement décrite comme un processus de mort cellulaire, il a aussi été montré que les neutrophiles en pleine activité de phagocytose peuvent parallèlement à cela libérer de l'ADN tout en conservant leur intégrité cellulaire ainsi que leur capacité de migration (mais néanmoins diminuée), ce processus est appelée NETose « vitale » (135,136).

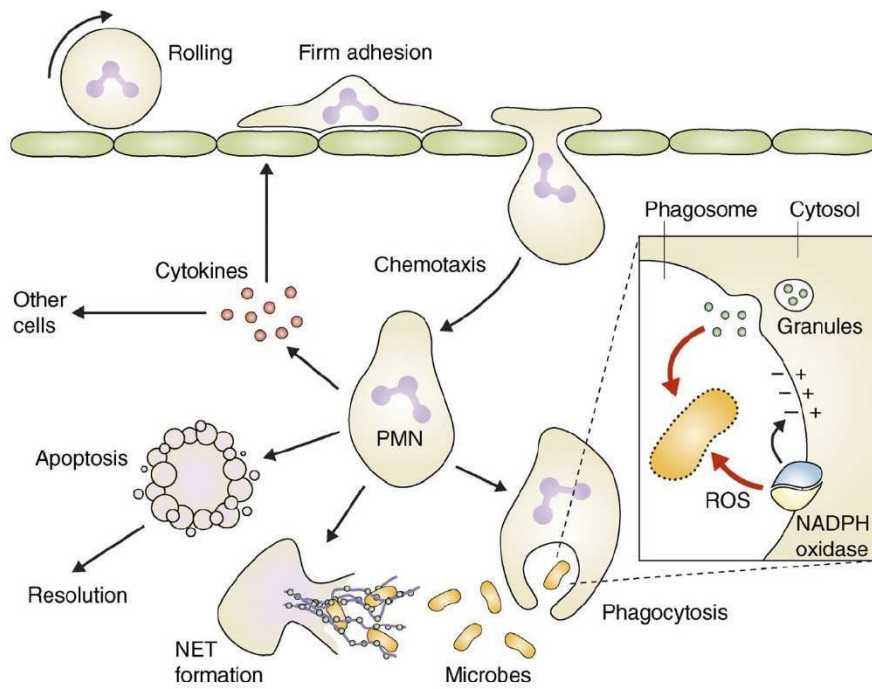


Figure 5 : Les différentes fonctions du neutrophile (PMN) (137)

Les neutrophiles « âgés » meurent par apoptose (ou par NETose). Les neutrophiles « morts » ou les corps apoptotiques sont ensuite éliminés de la circulation par un mécanisme de phagocytose qui est effectué par les macrophages (138).

Objectifs de thèse

Mon travail de thèse s'articule autour de deux projets dont la finalité est de mieux comprendre le mécanisme physiopathologique du choc anaphylactique. Les principales interrogations soulevées par ces deux projets sont les suivantes :

- Quels sont les acteurs clés du choc allergique ?
- Quels sont leurs rôles au cours de cette réaction ?
- Existe-t-il des interactions entre ces différents acteurs et à quoi servent-elles ?
- Finalement, comment mieux soigner le choc allergique ?

Dans un premier temps, mon travail a eu pour objectifs d'étudier *in vivo* chez la souris les récepteurs FcγRs activateurs et inhibiteurs, les cellules effectrices et les médiateurs susceptibles de contribuer au choc anaphylactique dans des modèles de PSA induits soit par des IgG1, soit des IgG2a ou soit des IgG2b dirigés contre un même antigène. Cette étude a permis de mettre en évidence des FcγRs, des cellules effectrices et des médiateurs contribuant de manière plus importante que d'autres selon la sous-classe d'IgG responsable de l'induction du choc. Cette analyse comparative a fait l'objet d'une publication en 1^{er} auteur en 2016 dans *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (Article 1) (139). La contribution des différents FcγRs humains, cellules effectrices et médiateurs a ensuite été étudiée dans un nouveau modèle de souris *knock-in* pour l'ensemble des FcγRs humains (excepté le hFcγRI) et dont les résultats ont fait l'objet d'une publication en 2016 dans *Journal of Autoimmunity* (en annexe de ce manuscrit).

Dans un deuxième temps, à l'aide d'un modèle humanisé, je me suis intéressée à la population plaquettaire particulièrement peu étudiée dans le choc allergique induit par des IgG. Contrairement à la souris sauvage, les plaquettes humaines expriment le FcγRIIA et le récepteur au PAF (PAF-R) à leur surface. Le FcγRIIA à la surface d'autres populations cellulaires et le PAF ont déjà été identifiés comme acteurs clés de l'anaphylaxie dans des études précédentes menées par

mon laboratoire (140,141). Dans ce deuxième projet, nous avons fait l'hypothèse que les plaquettes participent à l'initiation et/ou à la propagation de la réaction anaphylactique via le Fc γ RIIA. Nous avons donc examiné le nombre de plaquettes circulantes, la présence de complexes plaquettes-leucocytes circulants, l'état d'activation plaquettaire ainsi que l'effet d'une déplétion ou d'un excès de plaquettes au cours d'un modèle passif de choc allergique induit par des IgG humaines chez des souris transgéniques pour le Fc γ RIIA humain. En outre, les résultats de l'étude clinique « NASA » (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01637220>) ont pu conforter ceux obtenus chez la souris. Les résultats obtenus au cours de ce projet font l'objet d'un manuscrit sous forme préliminaire qui sera soumis d'ici la fin 2016 (Article 2).

Article 1

IgG subclasses determine pathways of anaphylaxis in mice

I. Introduction

Dans un premier temps, l'objectif de ce projet a été d'étudier *in vivo* chez la souris la contribution respective des Fc γ Rs activateurs et inhibiteurs dans l'induction d'un choc anaphylactique dépendant d'une sous-classe particulière d'IgG. Diverses études reposant sur un modèle passif de l'anaphylaxie analysent l'implication des Fc γ Rs suite à l'injection d'une seule sous-classe d'IgG mais aucune étude n'a encore comparé les effets de chaque sous-classe d'IgG dirigé contre un même antigène dans les mêmes conditions expérimentales.

Pour étudier la contribution de chacun des Fc γ Rs, j'ai utilisé des souris déficientes pour chacun de ces récepteurs et induit trois types d'anaphylaxie systémique passive : PSA induite par des IgG1, des IgG2a ou des IgG2b spécifique pour un même antigène (TNP). Après avoir déterminé la contribution d'un Fc γ R clé, j'ai également fait varier la dose d'IgG2a et d'IgG2b afin de révéler la contribution potentielle d'autres Fc γ Rs.

Dans un deuxième temps, ces récepteurs étant exprimés à la surface des cellules myéloïdes, j'ai cherché à déterminer la contribution des neutrophiles, des monocytes/macrophages, des basophiles et des mastocytes. Pour cela, j'ai utilisé des anticorps, des agents (liposomes) déplétants ou des modèles de souris déficientes pour une population cellulaire particulière. J'ai également étudié l'expression du Fc γ RIII, du Fc γ RIV et du Fc γ RIIB inhibiteur à la surface de ces cellules avant/après le choc allergique.

Enfin, les cellules mises en cause dans ces trois modèles de PSA étant capables de libérer de l'histamine et du PAF, principaux médiateurs mis en cause auparavant dans d'autres modèles, je me suis intéressée à la contribution relative de ces deux médiateurs en utilisant des antagonistes de leurs récepteurs.

II. Article 1

IgG subclasses determine pathways of anaphylaxis in mice

Héloïse Beutier, PharmD,^{a,b,c} Caitlin M. Gillis, BScI,^{a,b,c} Bruno Iannascoli, BTS,^{a,b} Ophélie Godon, MSc,^{a,b} Patrick England, PhD,^d Riccardo Sibilano, PhD,^{e,f} Laurent L. Reber, PhD,^{a,b} Stephen J. Galli, MD,^{e,f} Mark S. Cragg, PhD,^g Nico Van Rooijen, PhD,^h David A. Mancardi, PhD,^{a,b} Pierre Bruhns, PhD,^{a,b,*} and Friederike Jönsson, PhD^{a,b,*} *Paris, France, Stanford, Calif, Southampton, United Kingdom, and Amsterdam, The Netherlands*

Background: Animal models have demonstrated that allergen-specific IgG confers sensitivity to systemic anaphylaxis that relies on IgG Fc receptors (FcγRs). Mouse IgG_{2a} and IgG_{2b} bind activating FcγRI, FcγRIII, and FcγRIV and inhibitory FcγRIIB; mouse IgG₁ binds only FcγRIII and FcγRIIB. Although these interactions are of strikingly different affinities, these 3 IgG subclasses have been shown to enable induction of systemic anaphylaxis.

Objective: We sought to determine which pathways control the induction of IgG₁-, IgG_{2a}-, and IgG_{2b}-dependent passive systemic anaphylaxis.

Methods: Mice were sensitized with IgG₁, IgG_{2a}, or IgG_{2b} anti-trinitrophenyl mAbs and challenged with trinitrophenyl-BSA intravenously to induce systemic anaphylaxis that was monitored by using rectal temperature. Anaphylaxis was evaluated in mice deficient for FcγRs injected with mediator antagonists or in which basophils, monocytes/macrophages, or neutrophils had been depleted. FcγR expression was evaluated on these cells before and after anaphylaxis.

Results: Activating FcγRIII is the receptor primarily responsible for all 3 models of anaphylaxis, and subsequent downregulation of this receptor was observed. These models differentially relied on histamine release and the contribution of mast cells, basophils, macrophages, and neutrophils. Strikingly, basophil contribution and histamine predominance in mice with IgG₁- and IgG_{2b}-induced anaphylaxis correlated with the ability of inhibitory FcγRIIB to negatively regulate these models of anaphylaxis.

Conclusion: We propose that the differential expression of inhibitory FcγRIIB on myeloid cells and its differential binding of IgG subclasses controls the contributions of mast cells, basophils, neutrophils, and macrophages to IgG subclass-dependent anaphylaxis. Collectively, our results unravel novel complexities in the involvement and regulation of cell populations in IgG-dependent reactions *in vivo*. (J Allergy Clin Immunol 2016;■■■■:■■■-■■■.)

Key words: Anaphylaxis, IgG, mouse model, basophil, neutrophil, monocyte, macrophage, IgG Fc receptor, platelet-activating factor, histamine

From ^athe Department of Immunology, Unit of Antibodies in Therapy and Pathology, Institut Pasteur, Paris; ^bINSERM, U1222, Paris; ^cUniversité Pierre et Marie Curie, Paris; ^dInstitut Pasteur, Plate-Forme de Biophysique Moléculaire, Centre d'Innovation et Recherche Technologique (CiTech), CNRS-UMR3528, Paris; ^ethe Department of Pathology and ^fthe Sean N. Parker Center for Allergy and Asthma Research, Stanford University School of Medicine; ^gthe Antibody and Vaccine Group, Cancer Sciences Unit, University of Southampton Faculty of Medicine, Southampton General Hospital; and ^hthe Department of Molecular Cell Biology, VU Medical Center, Amsterdam.

*These authors contributed equally to this work.

Supported by Institut Pasteur, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the European Research Council (ERC)–Seventh Frame-work Program (ERC-2013-CoG 616050), Société Française d'Allergologie (SFA; Soutien de la Recherche en Allergologie), and the Balsan company. H.B. is supported by a fellowship from the University Pierre et Marie Curie. C.M.G. is a scholar of the Pasteur Paris University International Doctoral Program and supported by a stipend from the Institut Carnot Pasteur Maladies Infectieuses. F.J. is an employee of the Centre National de La Recherche Scientifique (CNRS). R.S. and S.J.G. are supported by NIH/NIAMS grant R01 AR067145 and the Department of Pathology at Stanford University.

Disclosure of potential conflict of interest: C. M. Gillis declares a grant from Institut Carnot Pasteur Maladies Infectieuses and travel assistance from Societe Francaise d'Immunologie. R. Sibilano declares a grant from Stanford Lucile Packard Fellowship. S. J. Galli declares a grant from the National Institutes of Health. M. S. Cragg declares providing consultancy to Bioinvent International. P. Bruhns declares grants from ERC and Balsan Company. F. Jönsson declares a grant from Société Française d'Allergologie. The rest of the authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

Received for publication June 19, 2015; revised January 29, 2016; accepted for publication March 3, 2016.

Corresponding author: Friederike Jönsson, PhD, and Pierre Bruhns, PhD, Unit of Antibodies in Therapy and Pathology, Department of Immunology, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France. E-mail: joensson@pasteur.fr. Or: bruhs@pasteur.fr.

0091-6749/\$36.00

© 2016 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2016.03.028>

Anaphylaxis is a hyperacute allergic reaction that occurs with increasing incidence in the population and can be of fatal consequence. Symptoms include skin rash, hypotension, hypothermia, abdominal pain, bronchospasm, and heart and lung failure, which can lead to asphyxia and sometimes death.¹ The main treatment remains epinephrine (adrenaline) injection to restore heart and lung function. Because anaphylaxis represents an emergency situation, few clinical studies have been possible to address the mechanisms leading to anaphylaxis in patients. Experimental models of anaphylaxis identified mechanisms involving allergen-specific antibodies that trigger activating antibody receptors on myeloid cells, leading to mediator release. These mediators can, by themselves, recapitulate the symptoms of anaphylaxis observed in human subjects.^{2,3}

The “classical” mechanism of anaphylaxis states that allergen-specific IgE binds the activating IgE receptor FcεRI on mast cells, which, on allergen encounter, become activated and release histamine, among other mediators. Notably, histamine injection suffices to induce signs of anaphylaxis in animal models.⁴ In many cases detectable allergen-specific IgE and increased histamine levels do not accompany anaphylaxis in human subjects (discussed in Khodoun et al⁵), leading to the notion that “atypical” or “alternate” mechanisms of induction could explain these cases. One of these atypical/alternate models proposes a similar cascade of events but instead based on allergen-specific IgG binding to allergen, forming IgG-allergen immune complexes that trigger activating IgG Fc receptors (FcγRs) expressed on myeloid cells (ie, macrophages,

Abbreviations used

FcγR:	IgG Fc receptor
FcRn:	Neonatal IgG receptor
FITC:	Fluorescein isothiocyanate
Gfi1:	Growth factor independence 1
K _A :	Affinity constant
K _D :	Dissociation equilibrium constant
K _{off} :	Dissociation rate
K _{on} :	Association rate
mMCP-1:	Mast cell protease 1
PAF:	Platelet-activating factor
PSA:	Passive systemic anaphylaxis
RU:	Resonance units
TNP:	Trinitrophenyl
TRIM21:	Tripartite motif-containing protein 21
WT:	C57Bl/6 wild-type

basophils, and/or neutrophils), which in turn release platelet-activating factor (PAF).^{2,3} Importantly, PAF injection suffices to induce signs of anaphylaxis in animal models.⁶ IgG-induced anaphylaxis can be elicited by intravenous injection of allergen-specific IgG followed by allergen administration and is termed IgG-induced passive systemic anaphylaxis (PSA).

IgG receptors in the mouse comprise 4 “classical” IgG receptors termed FcγRs but also the neonatal IgG receptor (FcRn) and the intracellular FcR tripartite motif-containing protein 21 (TRIM21).^{7,8} Although FcRn and TRIM21 both participate in the intracellular routing of IgG and FcRn in protection from catabolism and distribution to tissues,⁹ FcγRs control cell activation in the presence of immune complexes. FcγRs in mice are subdivided into (1) activating FcγRs (ie, FcγRI, FcγRIII, and FcγRIV), which lead to cell activation on immune complex binding, and (2) an inhibitory FcγR (ie, FcγRIIB), which inhibits cell activation when coengaged by an immune complex with an activating FcγR coexpressed on the same cell.¹⁰ Thus inhibition of cell activation by FcγRIIB requires that the immune complex contains IgG bound by both the activating and inhibitory FcγR.

Four IgG subclasses exist in mice: IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, and IgG₃. Among those, only IgG_{2a} and IgG_{2b} bind to all FcγRs, whereas IgG₁ binds only to FcγRIIB and FcγRIII. It remains under debate whether IgG₃ binds to FcγRs, particularly FcγRI.^{11,12} The affinities of these FcγRs toward IgG subclasses are strikingly different (Table I),¹¹⁻¹⁴ leading to the notion of high-affinity receptors that retain monomeric IgG and low-affinity receptors that do not.⁸ However, the avidity of IgG-immune complexes enables both types of receptors to retain IgG-immune complexes, leading to receptor clustering, intracellular signaling events, and, eventually, cell activation. FcγRI is a high-affinity receptor for IgG_{2a},¹⁵ and FcγRIV is a high-affinity receptor for IgG_{2a} and IgG_{2b}.¹⁶ All other FcγR-IgG interactions are of low affinity (reviewed in Bruhns⁷).

Three of the 4 IgG subclasses in the mouse, IgG₁, IgG_{2a}, and IgG_{2b}, have been reported to enable the induction of systemic anaphylaxis, inducing mild-to-severe hypothermia.^{5,17,18} This is rather surprising for IgG₁, considering that inhibitory FcγRIIB binds IgG₁ with a 10-fold higher affinity (affinity constant [K_A], $3.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) than activating FcγRIII (K_A, $3.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$; Table I),¹³ implying that inhibition should dominate over activation. C57Bl/6 wild-type (WT) mice experience a very mild anaphylactic reaction during IgG₁-induced PSA compared to FcγRIIB^{-/-} mice,¹⁹ indicating that inhibition

TABLE I. Affinities of mouse FcγR-IgG subclass interactions (K_A values in M⁻¹)

	IgG ₁	IgG _{2a}	IgG _{2b}	IgG ₃
FcγRI	—	1×10^8	1×10^5	(+)
FcγRIIB	3.3×10^6	4.2×10^5	2.2×10^6	—
FcγRIII	3.1×10^5	6.8×10^5	6.4×10^5	—
FcγRIV	—	2.9×10^7	1.7×10^7	—

Data were compiled from Nimmerjahn and Ravetch¹³ and Nimmerjahn et al.¹⁴

—, No detectable affinity; (+), under debate.^{11,12}

by FcγRIIB occurs in WT mice during IgG₁-induced PSA, reducing but not protecting against anaphylaxis. IgG₁-dependent PSA has been reported to rely on basophils²⁰ that coexpress FcγRIIB and FcγRIII.²¹ In this apparently simple situation, only 1 activating receptor and 1 inhibitory receptor are engaged on a single cell type that, once activated, produces an anaphylactogenic mediator, such as PAF.²⁰

However, IgG_{2a} and IgG_{2b} bind 3 activating FcγRs and inhibitory FcγRIIB with different affinities, ranging over 2 logs. In particular, the affinity of FcγRIIB for IgG_{2a} is significantly lower than that for IgG_{2b}, whereas the activating IgG receptors FcγRIII and FcγRIV bind IgG_{2a} and IgG_{2b} with similar affinities, respectively (Table I). Notably, FcγRIV is not expressed on basophils but on monocytes/macrophages and neutrophils,¹⁴ which have both been reported to contribute to experimental anaphylaxis.^{18,22-24} In addition, mice expressing only FcγRIV can develop IgG-dependent PSA.¹⁶ Therefore, together with expression and binding data, one would hypothesize that FcγRIV contributes predominantly to IgG_{2a}- and IgG_{2b}-induced PSA.

In this work we present evidence contrary to this hypothesis and reveal which activating FcγR on which cell types releasing which mediators are responsible for IgG_{2a}-dependent PSA and IgG_{2b}-dependent PSA and the differential regulation of these models of anaphylaxis by FcγRIIB. Our results unravel a complex balance determined by FcγR expression patterns, inhibition potential by FcγRIIB, and respective affinities of activating and inhibitory FcγRs for IgG subclasses that, together, regulate the contribution of cells and anaphylactogenic mediators to a given model of IgG-induced anaphylaxis.

METHODS

Mice

Female C57Bl/6J mice (herein referred to as WT mice) were purchased from Charles River (Wilmington, Mass), female BALB/cJrj mice were from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France), and FcγRIIB^{-/-} (MGI:1857166), FcγRIII^{-/-} (MGI: 3620982) and Rosa26-YFP mice were from Jackson Laboratories (Bar Harbor, Me). FcγRI^{-/-} mice (MGI: 3664782) were provided by J. Leusen (University Medical Center, Utrecht, The Netherlands), FcγRIV^{-/-} mice (MGI: 5428684) were provided by J. V. Ravetch (Rockefeller University, New York, NY), growth factor independence 1 (Gfi1)^{-/-} mice were provided by T. Moroy (Montreal University, Montreal, Quebec, Canada), and MRP8-cre mice were provided by Clifford Lowell (University of California at San Francisco, San Francisco, Calif). MRP8-cre and Rosa26-YFP mice were intercrossed to generate MRP8-cre; Rosa26-YFP mice. Cpa3-Cre; Mcl-1^{fl/fl} mice²⁵ (backcrossed for at least 9 generations on a C57Bl/6J background) were kept in the Stanford University animal facility. All mouse protocols were approved by the Animal Ethics committee CETEA (Institut Pasteur, Paris, France) registered under #C2EA-89 and/or the Institutional Animal Care and Use Committee of Stanford University.

Antibodies and reagents

PBS and clodronate liposomes were prepared as previously described.²⁶ Trinitrophenyl (TNP)_[21-31]-BSA was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Tex), ABT-491 was obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, Mo), cetirizine diHCl was obtained from Selleck Chemicals (Houston, Tex), anti-mouse FcγRIII (275003) was obtained from R&D Systems (Minneapolis, Minn), and rat IgG_{2b} isotype control (LTF-2) was obtained from Bio X Cell (West Lebanon, NH). Purified anti-CD200R3 (Ba103) was provided by H. Karasuyama (Tokyo Medical and Dental University Graduate School, Tokyo, Japan). The hybridoma producing mAb anti-mouse FcγRIV (9E9) was provided by J. V. Ravetch (Rockefeller University), anti-Ly6G (NIMP-R14) was provided by C. Leclerc (Institut Pasteur), IgG₁ anti-TNP (TIB-191) was provided by D. Voehringer (Universitätsklinikum, Erlangen, Germany), IgG_{2a} anti-TNP (Hy1.2) was provided by Shozo Izui (University of Geneva, Geneva, Switzerland), and IgG_{2b} anti-TNP (GORK) was provided by B. Heyman (Uppsala Universitet, Uppsala, Sweden); corresponding antibodies were purified, as previously described.¹⁸ Purified mouse IgE anti-TNP was purchased from BD PharMingen (San Jose, Calif). The mAb 9E9 was coupled to fluorescein isothiocyanate (FITC) by using the Pierce FITC Antibody labeling kit (Life Technologies, Grand Island, NY). Antibodies used for flow cytometry staining of c-Kit (clone 2B8), CD49b (clone DX5), IgE (clone R35-72), CD11b (clone M1/70), F4/80 (clone 6F12), CD115 (clone T38-320), Ly6G (clone 1A8), and Ly6C (clone AL-21) were purchased from BD PharMingen; CD45 (clone 30F11) and Gr1 (clone RB6-8C5) were purchased from Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany). FcγRIIB was detected by using the FITC-coupled mAb AT130-2 mIgG1 N297A.²⁷

PSA

IgG-induced PSA. IgG₁, IgG_{2a}, or IgG_{2b} anti-TNP antibodies were administered intravenously at a dose of 500 μg, if not otherwise indicated, in 200 μL of physiologic saline, followed by an intravenous challenge with 200 μg of the antigen (TNP-BSA) in physiologic saline 16 hours later.

IgE-induced PSA. IgE anti-TNP antibodies were administered intravenously at a dose of 50 μg in 200 μL of physiologic saline, followed by an intravenous challenge with 500 μg of TNP-BSA in physiologic saline 24 hours later. The body temperature of mice was monitored with a digital thermometer with a rectal probe (YSI, Yellow Springs, Ohio).

In vivo blocking and cellular depletion

Three hundred microlitres per mouse of PBS or clodronate liposomes, 300 μg/mouse of rat IgG_{2b} isotype control or anti-Ly6G, and 30 μg/mouse of anti-CD200R3 mAbs were injected intravenously 24 hours before challenge. The specificity of cell depletion was evaluated by using flow cytometry on blood, bone marrow, and splenic and peritoneal cells taken from naive WT mice 24 hours after injection of the depleting antibody or clodronate-liposomes (examples are shown in Figs E1 and E2 in this article's Online Repository at www.jacionline.org). Twenty-five micrograms per mouse of ABT-491 or 300 μg/mouse of cetirizine was injected intravenously 20 minutes or intraperitoneally 30 minutes before challenge, respectively. Two hundred micrograms per mouse of anti-FcγRIV mAb was injected intravenously 30 minutes before challenge.

Flow cytometric analysis

Freshly isolated cells were stained with indicated fluorescently labeled mAbs for 30 minutes at 4°C. Cell populations were defined as follows: neutrophils (CD45⁺/CD11b⁺/Ly6G^{hi}/Ly6C^{int}), monocytes (CD45⁺/CD11b⁺/Ly6G^{lo}/Ly6C^{lo/hi}), basophils (CD45^{int}/CD49b⁺/IgE⁺), spleen macrophages (CD45⁺/CD11b⁺/Gr-1^{lo}/CD115⁺/F4/80^{hi}), peritoneal macrophages (CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁺), and peritoneal mast cells (CD45⁺/c-Kit⁺/IgE⁺). FcγR expression on the indicated cell population is represented as Δ geometric mean between specific and isotype control staining.

Surface plasmon resonance analysis

Experiments were performed at 25°C with a ProteOn XPR36 real-time SPR biosensor (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif). Anti-TNP antibodies were immobilized covalently through amine coupling on the surface of a GLC chip. TNP-BSA was then injected on the chip at a flow rate of 25 μL · min⁻¹, with contact and dissociation times of 8 minutes each. Binding responses were recorded in real time as resonance units (RU; 1 RU ≈ 1 pg/mm²). Background signals were subtracted, and binding rates (k_{on} [association rate] and k_{off} [dissociation rate]) and equilibrium constants (K_d [dissociation equilibrium constant]) were determined with BIAevaluation software (GE Healthcare, Fairfield, Conn).

ELISAs

After induction of IgG₁-, IgG_{2a}-, IgG_{2b}-, or IgE-induced PSA, plasma and sera were collected at 5 minutes and 3 hours later to determine the histamine and mast cell protease 1 (mMCP-1) content, respectively. Histamine and mMCP-1 concentrations were determined with commercially available ELISA kits (Beckman Coulter, Fullerton, Calif, and eBioscience, San Diego, Calif), according to the manufacturer's instructions. The relative binding affinity of IgG₁, IgG_{2a}, and IgG_{2b} anti-TNP antibodies to TNP-BSA was determined by using ELISA. Briefly, TNP-BSA-coated plates were incubated with dilutions of IgG₁, IgG_{2a}, or IgG_{2b} anti-TNP antibodies. After washing, bound anti-TNP IgG was revealed by using the same horseradish peroxidase-coupled anti-mouse IgG and SIGMAFAST OPD Sigma-Aldrich (St Louis, Mo) solution.

Mast cell histology

Mouse back skin biopsy specimens were collected 24 hours after induction of specific cell depletion, and mouse ear skin biopsy specimens were collected 30 minutes after IgE-, IgG₁-, IgG_{2a}-, or IgG_{2b}-induced PSA and embedded in paraffin before sectioning. Mast cells in toluidine blue-stained biopsy specimens were counted visually in at least 15 fields of view per mouse and more than 6 mice per treatment (see Fig E1, J).

Statistics

Data were analyzed by using 1-way or 2-way ANOVA with the Tukey posttest. A *P* value of less than .05 was considered significant. If not stated otherwise, data are represented as means ± SEMs.

RESULTS

FcγRIII dominates anaphylaxis induced by IgG subclasses

PSA was induced by means of an intravenous injection of one of the different anti-TNP IgG isotypes (IgG₁, IgG_{2a}, and IgG_{2b}), followed by an intravenous challenge with TNP-BSA 16 hours later. This protocol induces a transient decrease in body temperature that is most pronounced between 30 and 40 minutes. As reported previously,^{3,18,20,22,28} all 3 IgG isotypes were capable of inducing anaphylaxis in WT mice (Fig 1). In these experimental conditions IgG₁-induced PSA triggered a maximum temperature loss of approximately 2°C, IgG_{2a}-induced PSA triggered a maximum temperature loss of approximately 4°C, and IgG_{2b}-induced PSA triggered a maximum temperature loss of approximately 3°C in WT mice. Using single FcγR knockout mice we evaluated the contribution of each of the 4 mouse FcγRs to these anaphylaxis models. The absence of either FcγRIV (with the exception of a single time point in IgG_{2b}-induced PSA) or FcγRI had no significant effect on IgG- PSA-induced hypothermia, regardless of the subclass of IgG antibodies used to induce anaphylaxis (Fig 1). However, the lack of FcγRIII protected mice from anaphylaxis in all models.

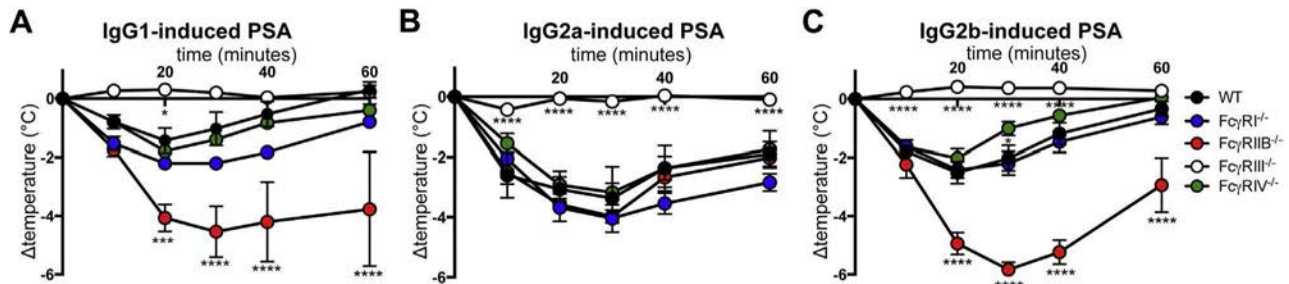


FIG 1. Fc γ RIII dominates in IgG-induced PSA models. Mice injected with anti-TNP mAbs were challenged with TNP-BSA, and body temperatures were monitored: IgG₁-induced PSA (A), IgG_{2a}-induced PSA (B), or IgG_{2b}-induced PSA (C) in indicated mice ($n \geq 3$ per group). Data are representative of at least 2 independent experiments (Fig 1, A: $n = 2$; Fig 1, B: $n = 3$; Fig 1, C: $n = 2$). Significant differences compared with the WT group are indicated. * $P < .05$, *** $P < .001$, and **** $P < .0001$.

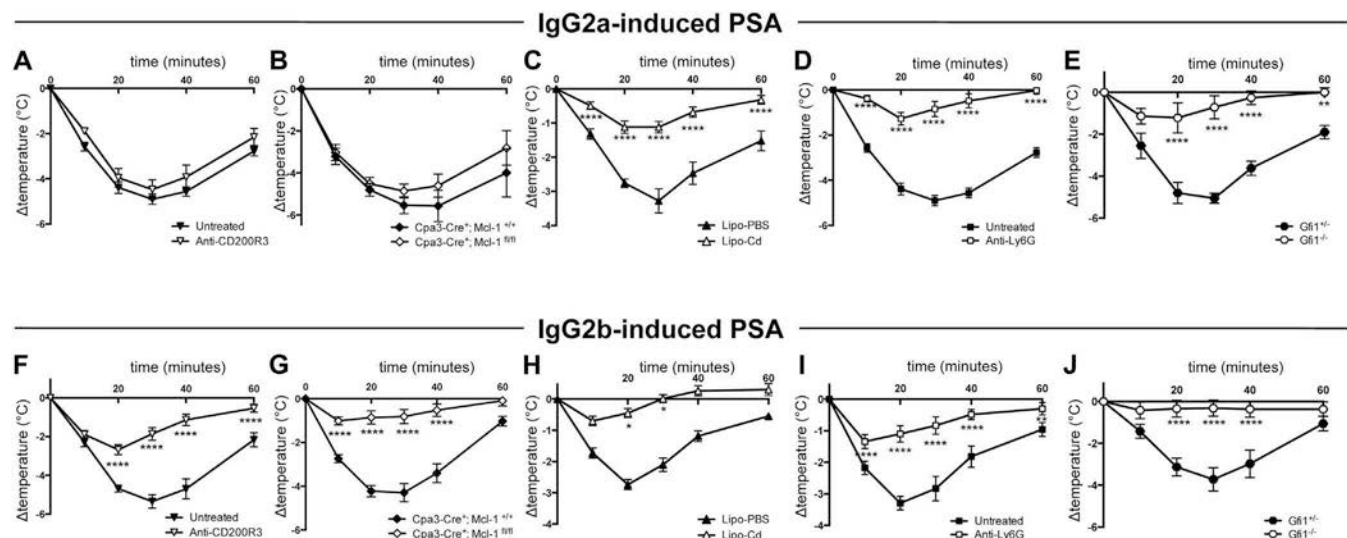


FIG 2. Basophils, mast cells, monocytes/macrophages, and neutrophils contribute differentially to IgG-induced PSA models. Indicated mice ($n \geq 8$ per group) were injected with IgG_{2a} (A-E) or IgG_{2b} (F-J) anti-TNP mAbs and challenged with TNP-BSA, and body temperatures were monitored. WT mice ($n = 8$ per group) were pretreated, as indicated (Fig 2, A, C, D, F, H, and J). *Lipo-PBS*, PBS liposomes; *Lipo-Cd*, clodronate liposomes. Data are pooled from at least 2 independent experiments. * $P < .05$, ** $P < .01$, and **** $P < .0001$.

Mice lacking the inhibitory receptor Fc γ RIIB had a significantly more severe temperature decrease than seen in WT mice with IgG₁- or IgG_{2b}-induced PSA but showed no significant difference in the severity of IgG_{2a}-induced PSA (Fig 1). Even though the 3 anti-TNP IgG mAbs used are not switch variants of a unique anti-TNP antibody, they show comparable binding to TNP-BSA, as determined by using ELISA, and similar affinity (nanomolar range) and dissociation rates (k_{off}), as determined by using surface plasmon resonance analysis, particularly the IgG_{2a} and IgG_{2b} anti-TNP antibodies (see Fig E3, A-C, in this article's Online Repository at www.jacionline.org).

Of note, untreated Fc γ R-deficient mice presented modest variations in Fc γ R expression levels (see Fig E4 in this article's Online Repository at www.jacionline.org) and leukocyte representation among blood cells compared with WT mice (see Fig E5 in this article's Online Repository at www.jacionline.org). In particular, a mild lymphopenia in Fc γ RIV^{-/-} and Fc γ RIIB^{-/-} mice (the latter also have a tendency to express higher levels of Fc γ RIII and Fc γ RIV) and a mild eosinophilia in Fc γ RIII^{-/-} mice, which also express significantly more

Fc γ RIIB on neutrophils and Ly6C^{hi} monocytes, were seen. Together, we think that these variations do not explain the drastic phenotypes observed for PSA in Fc γ RIIB^{-/-} and Fc γ RIII^{-/-} mice compared with WT mice. Thus these data indicate that Fc γ RIII predominates in the induction of IgG₁-, IgG_{2a}-, and IgG_{2b}-induced PSA and that Fc γ RIIB specifically dampens anaphylaxis severity in mice with IgG₁- and IgG_{2b}-induced PSA.

Basophils, mast cells, monocytes/macrophages and neutrophils contribute differentially to IgG isotype-dependent anaphylaxis models

Fc γ RIII is expressed by all myeloid cells^{7,21} and, to a lesser extent, by natural killer (NK) cells.²⁹ Therefore one might anticipate that IgG immune complexes formed *in vivo* as a consequence of TNP-BSA injection in anti-TNP-sensitized mice would engage Fc γ RIII on these cells, leading to cell activation and possibly contributing to anaphylaxis. Basophils, mast cells, neutrophils, and monocyte/macrophages have indeed been reported to contribute to IgG-induced PSA,^{17,18,20,22}; however, the

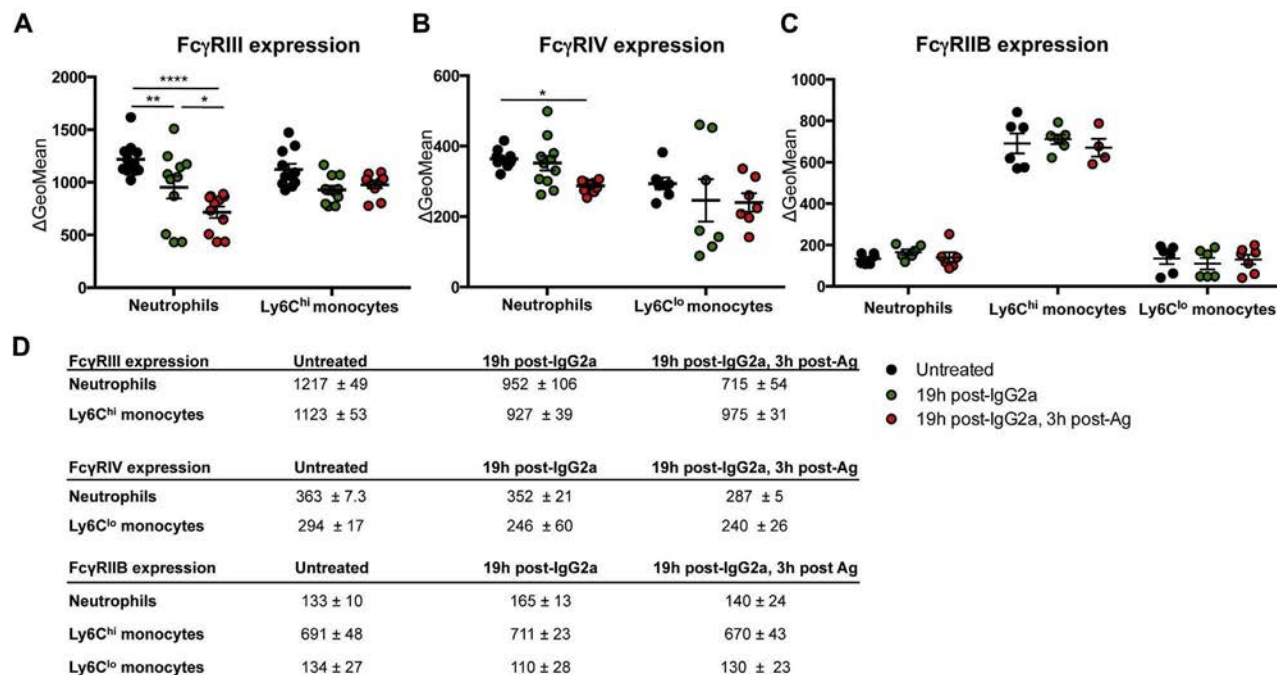


FIG 3. Reduced expression of FcγRIII and FcγRIV, but not FcγRIIB, on neutrophils after IgG_{2a}-induced PSA. **A-C**, FcγRIII (Fig 3, A), FcγRIV (Fig 3, B), and FcγRIIB (Fig 3, C) expression on blood cells from WT mice (Fig 3, A and B: n = 11 per group; Fig 3, C: n ≥ 6 per group) left untreated, injected with IgG_{2a} anti-TNP mAbs, or injected with IgG_{2a} anti-TNP mAbs and challenged with TNP-BSA is shown. **D**, Compilation of Δ geometric mean (GeoMean) ± SEM data from Fig 3, A-C. Ag, Antigen. *P < .05, **P < .01, and ****P < .0001.

respective contribution of each of these different cell types remains debated.^{2,28} To investigate which cell types contribute to PSA induced by different IgG subclasses, we depleted basophils (anti-CD200R3 mAb), monocytes/macrophages (clodronate-filled liposomes), or neutrophils (anti-Ly6G) before anaphylaxis induction or evaluated anaphylaxis induction in transgenic mice deficient in certain cell populations.

Of note, the relatively mild temperature loss in WT mice with IgG₁-induced PSA (see Fig E6, A, in this article's Online Repository at www.jacionline.org) did not allow us to address reliably the contribution of either basophils or neutrophils to this model of anaphylaxis. Therefore we restricted our analysis of the contribution of myeloid cell populations to IgG_{2a}- and IgG_{2b}-induced PSA. Antibody-induced basophil depletion or genetically induced mast cell and basophil deficiency (see Fig E2, H: Cpa3-Cre; Mcl-1^{fl/fl} mice²⁵) did not affect IgG_{2a}-induced PSA (Fig 2, A and B) but significantly inhibited IgG_{2b}-induced PSA (Fig 2, F and G). Monocyte/macrophage depletion (Fig 2, C and H) significantly inhibited both IgG_{2a}- and IgG_{2b}-induced PSA. The absence of neutrophils, either after antibody-mediated depletion (Fig 2, D and I) or with neutropenic Gfi1^{-/-} mice (Fig 2, E and J),³⁰ significantly inhibited both IgG_{2a}- and IgG_{2b}-induced PSA. Although monocytes/macrophages and neutrophils appear to contribute to both models of anaphylaxis, basophils and possibly mast cells contribute specifically to IgG_{2b}- but not IgG_{2a}-induced PSA.

FcγRIII is downregulated specifically on neutrophils after IgG_{2a}-induced PSA

Khodoun et al³¹ proposed to use the reduced expression of FcγRIII on mouse neutrophils as a marker to distinguish

IgE- from IgG₁-induced PSA, both of which required priming with an antigen-specific antibody and challenge with the recognized antigen. Therefore we wondered whether FcγRIII expression on neutrophils might also be a marker for IgG_{2a}- and IgG_{2b}-induced PSA. In addition, reduced expression of FcγRs after IgG-induced PSA might document that a particular cell population is activated after engagement of its FcγRs by IgG-immune complexes during anaphylaxis. Thus this parameter can be used to discriminate cell populations contributing to anaphylaxis after direct activation by IgG-immune complexes from those contributing after activation by mediators liberated by IgG-immune complex-activated cells (eg, histamine, PAF, leukotrienes, and prostaglandins).

Among mouse IgG receptors, only FcγRIIB, FcγRIII, and FcγRIV are significantly expressed on circulating myeloid cells but not FcγRI.^{7,32,33} Of circulating monocyte populations, "classical" Ly6C^{hi} monocytes are FcγRIIB^{med}FcγRIII^{med}FcγRIV⁻, whereas "nonclassical" Ly6C^{lo} monocytes are FcγRIIB^{lo}FcγRIII^{lo}FcγRIV^{hi}.³⁴ Therefore we determined the expression of FcγRIIB, FcγRIII, and FcγRIV before and after IgG_{2a}-induced PSA induction on neutrophils and monocyte subsets. Expression of FcγRIII was downregulated on neutrophils, but not on Ly6C^{hi} monocytes, during IgG_{2a}-induced PSA (Fig 3, A and D). Expression of FcγRIV was also downregulated on neutrophils, but not on Ly6C^{lo} monocytes, during IgG_{2a}-induced PSA (Fig 3, B and D). This was unexpected considering that FcγRIV does not significantly contribute to this PSA model (Fig 1, B). However, FcγRIIB expression remained unchanged on Ly6C^{hi} and Ly6C^{lo} monocytes and neutrophils (Fig 3, C and D), which is in agreement with the lack of contribution of this receptor to IgG_{2a}-induced PSA (Fig 1, B).

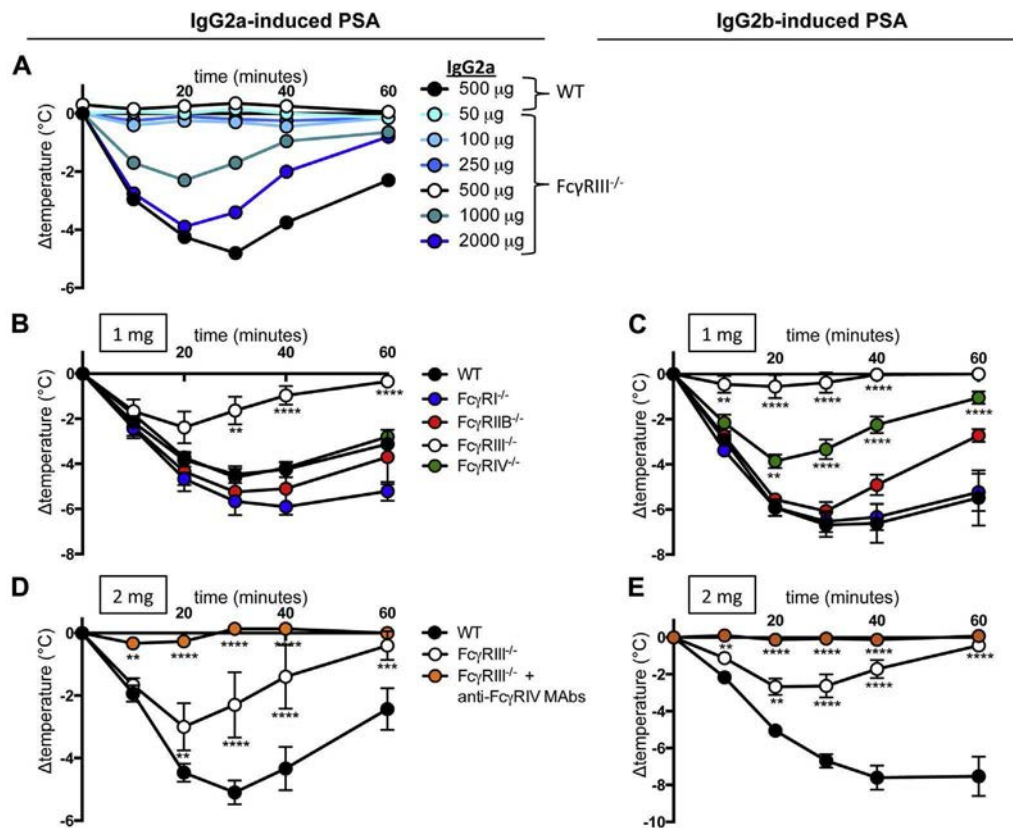


FIG 4. High doses of IgG₂ antibodies reveal FcγRIV contribution to IgG₂-induced PSA. **A**, PSA in indicated mice injected with various doses of IgG_{2a} anti-TNP mAbs (n = 2 per group). **B–E**, PSA in indicated mice (Fig 4, B and C: n = 8 per group; Fig 4, D and E: n ≥ 3 per group) injected with indicated doses of anti-TNP mAbs. Data are pooled from 2 independent experiments. Significant differences compared with the untreated WT group are indicated. **P < .01, ***P < .001, and ****P < .0001.

Together, these data suggest that neutrophils might be activated directly through FcγRIII by immune complexes formed during IgG_{2a}-induced PSA. They also suggest that neutrophils, but not Ly6C^{lo} monocytes, can be similarly activated through FcγRIV, even if no contribution of this receptor was identified in this model using FcγRIV^{-/-} mice (Fig 1, B).

Increased IgG₂ antibody doses reveal the contribution of FcγRIV to IgG_{2a} and IgG_{2b}-induced PSA

In mice FcγRIV binds monomeric IgG_{2a} and IgG_{2b}. Therefore at physiologic concentrations of IgG_{2a} (approximately 2.5 mg/mL) and IgG_{2b} (approximately 1.5 mg/mL) in serum, FcγRIV might be occupied *in vivo*, particularly on circulating neutrophils and monocytes. Nevertheless, the short binding half-lives of monomeric IgG_{2a} (half-life, approximately 3 minutes) and monomeric IgG_{2b} (half-life, approximately 10 minutes) by FcγRIV and their ability to be displaced from this receptor by immune complexes¹⁶ might enable IgG₂-immune complexes to interact with FcγRIV during anaphylaxis and therefore contribute to its induction, severity, or both.

To explore this possibility, we primed FcγRIII^{-/-} mice with various doses of anti-TNP IgG_{2a} before challenge with TNP-BSA to induce a range of *in vivo* concentrations of immune complexes. As expected, the low doses did not trigger FcγRIII^{-/-}

mice to have anaphylaxis after challenge. However, increased doses (1 or 2 mg) enabled significant temperature decreases in FcγRIII^{-/-} mice comparable with those observed in WT mice primed with 500 μg of IgG₂, particularly at the highest dose of IgG_{2a} (2 mg; Fig 4, A). Already at a dose of 1 mg of IgG₂, FcγRIII^{-/-} mice had mild hypothermia with IgG_{2a}- but not IgG_{2b}-induced PSA (Fig 4, B and C). Unexpectedly, in the same conditions FcγRIV contributed to IgG_{2b}-induced PSA, which was no longer dampened by inhibitory FcγRIIB (Fig 4, C). At a dose of 2 mg of IgG, FcγRIII^{-/-} mice had hypothermia with both IgG_{2a}- and IgG_{2b}-induced PSA, which was abolished when FcγRIII^{-/-} mice were pretreated with a blocking antibody against FcγRIV (Fig 4, D and E). FcγRI did not contribute to either model of IgG₂-induced PSA at an increased dose (Fig 4, B and C). Furthermore, FcγRIII expression was downregulated on neutrophils and basophils, but not on Ly6C^{hi} monocytes, after IgG_{2b}-induced PSA (Fig 5, A and D). FcγRIV expression was also downregulated on neutrophils, but not on Ly6C^{lo} monocytes (Fig 5, B and D). However, FcγRIIB expression did not change on either neutrophils or Ly6C^{hi} and Ly6C^{lo} monocytes, even though this inhibitory receptor regulates IgG_{2b}-induced PSA (Figs 1, C, and 5, C and D). This observation is in agreement with the study by Khodoun et al,³¹ which reported that FcγRIIB expression did not change on neutrophils after IgG₁-induced PSA. Altogether, high doses of antigen-specific IgG₂ reveal the contribution of FcγRIV to IgG_{2a}-induced PSA and IgG_{2b}-induced PSA and

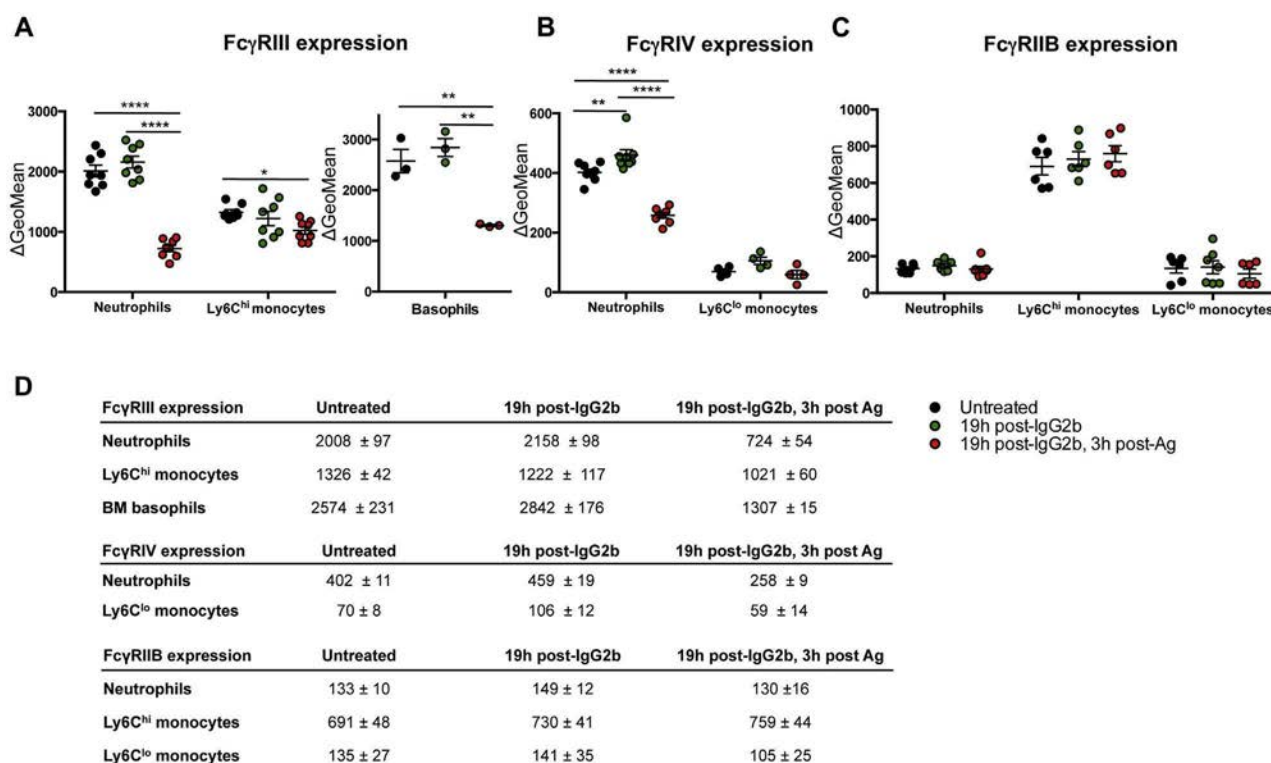


FIG 5. Expression of FcγRs on myeloid cells after IgG_{2b}-induced PSA. **A-C**, FcγRIII (left: *n* = 8 per group, right: *n* = 3 per group; Fig 5, A), FcγRIV (*n* = 8 per group; Fig 5, B), and FcγRIIB expression (*n* ≥ 6 per group; Fig 5, C) on cells from WT mice (*n* = 8 per group) left untreated, injected with IgG_{2b} anti-TNP mAbs, or injected with IgG_{2b} anti-TNP mAbs and challenged with TNP-BSA. **D**, Compilation of Δ geometric mean (GeoMean) ± SEM data from Fig 5, A-C. Ag, Antigen. In this figure 1 or 0.5 mg of IgG_{2b} was injected to assess expression on neutrophils/monocytes or basophils, respectively. **P* < .05, ***P* < .01, and *****P* < .0001.

suggest the direct activation of neutrophils and basophils by IgG_{2b}-immune complexes.

IgG₁-induced PSA in the absence of inhibitory FcγRIIB

The unexpected differences observed between IgG_{2a}- and IgG_{2b}-induced PSA induction pathways prompted us to find a mouse model more sensitive to IgG₁-induced PSA than WT mice to be able to evaluate the contribution of cell types and mediators in this model. Indeed, as mentioned earlier, WT mice respond poorly in a model of IgG₁-induced PSA (Fig 1, A, and see Fig E6, A).¹⁹ However, FcγRIIB^{-/-} mice experience a temperature decrease of approximately 4°C during IgG₁-induced PSA, which is comparable with temperature losses observed in WT mice during IgG_{2a}- or IgG_{2b}-induced PSA (Fig 1, B and C). Therefore we analyzed the contribution of cell types to IgG₁-induced PSA in FcγRIIB^{-/-} mice. Basophil depletion mildly but significantly inhibited IgG₁-induced PSA (Fig 6, A), which is in agreement with previous data.²⁰ The depletion of neutrophils had the same effect, although not consistently as strongly as basophil depletion (Fig 6, B, and data not shown). Monocyte/macrophage depletion had a tendency to ameliorate anaphylaxis that was reproducible but not significant (Fig 6, C). These results suggest that IgG₁-induced PSA relies on basophils and neutrophils and possibly also monocytes.

PAF and histamine contribute differentially to IgG_{2a}- and IgG_{2b}-induced PSA

Because cell types contribute differently to IgG₂-induced PSA models (ie, IgG_{2a}-induced PSA for neutrophils and monocytes and IgG_{2b}-induced PSA for basophils, neutrophils, and monocytes), one can expect that the mediators responsible for clinical signs also might differ between them. PAF has been shown to be responsible for anaphylactic reactions that required basophil,²⁰ neutrophil,^{18,24} and/or monocyte/macrophage²² activation, whereas histamine has been shown to be responsible for mast cell- and basophil-dependent anaphylaxis.^{35,36} Neutrophils are the main producers of PAF,³⁷ whereas mast cells and basophils are the main producers of histamine.^{38,39} Therefore we analyzed the relative contribution of these 2 mediators to the 3 models of PSA by using the histamine receptor 1 antagonist cetirizine and the PAF receptor antagonist ABT-491. Surprisingly, the histamine receptor 1 antagonist cetirizine significantly inhibited IgG₁-induced PSA, whereas the PAF receptor antagonist ABT-491 had no significant effect, which is in opposition to previous data.²⁰ The combination of both antagonists had an additive effect and almost abolished IgG₁-induced PSA (Fig 7, A). The results obtained in FcγRIIB^{-/-} mice were confirmed in WT mice (Fig 7, A). Whereas cetirizine mildly reduced hypothermia in IgG_{2a}-induced PSA, it significantly inhibited IgG_{2b}-induced PSA. ABT-491 mildly reduced hypothermia in mice with IgG_{2a}-induced PSA but had no significant effect on mice with IgG_{2b}-induced PSA (Fig 7, B and C). However, the combination

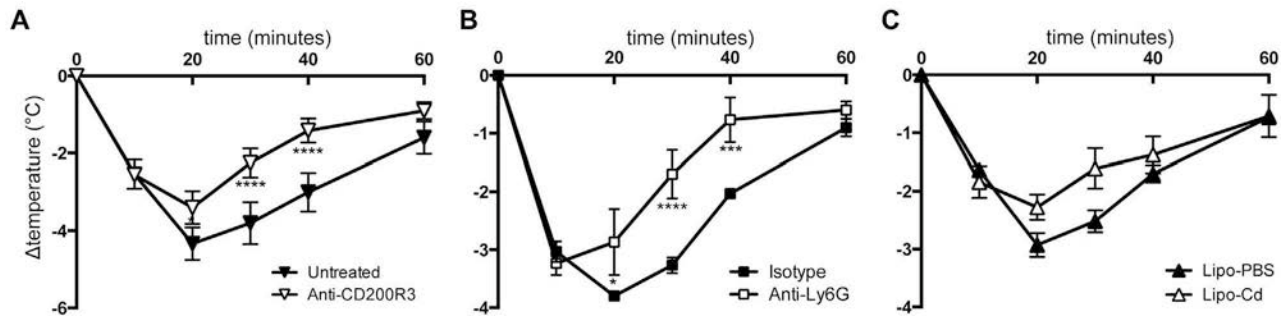


FIG 6. Cell contributions to IgG₁-induced PSA in the absence of inhibitory FcγRIIB. FcγRIIB^{-/-} mice were pretreated as indicated, injected with IgG₁ anti-TNP mAbs, and challenged with TNP-BSA, and central temperatures were monitored (**A**: n = 8 per group; **B**: n = 7 per group; **C**: n = 10 per group). Data are represented as means ± SEMs. Data are pooled from 2 independent experiments. **P* < .05, ****P* < .001, and *****P* < .0001.

of cetirizine and ABT-491 almost abolished both IgG_{2a}- and IgG_{2b}-induced PSA. Increased plasma histamine levels were detected 5 minutes after challenge in all 3 IgG-induced PSA models, and particularly high levels were observed in mice undergoing IgE-induced PSA (as a positive control) or IgG_{2a}-induced PSA (Fig 7, D and E). This latter finding is surprising because IgG_{2a}-induced PSA is unaffected by the absence of both mast cells and basophils, which are considered major sources of histamine. mMCP-1, which is released on activation of mucosal mast cells, could be detected in the sera of mice undergoing IgE-induced PSA but not in those undergoing any one of the 3 models of IgG-induced PSA 3 hours after PSA induction (Fig 7, F). Collectively, these results suggest that histamine predominantly contributes to IgG₁- and IgG_{2b}-induced PSA, whereas histamine and PAF together are necessary for IgG_{2a}-induced PSA.

DISCUSSION

Our work suggests that the activating IgG receptor FcγRIII predominantly contributes to IgG-dependent PSA, irrespective of whether induced by IgG₁, IgG_{2a}, or IgG_{2b} antibodies. A contribution of the activating IgG receptor FcγRIV was only identified when using very high amounts of IgG₂ antibodies, whereas the activating IgG receptor FcγRI played no detectable role. Remarkably, the inhibitory IgG receptor FcγRIIB controlled the severity of IgG₁- and IgG_{2b}- but not IgG_{2a}-induced anaphylaxis. The ability of FcγRIIB to inhibit a given model of IgG-induced anaphylaxis correlated with the contribution of basophils and histamine to that model. Indeed, basophils, and possibly mast cells, contributed with neutrophils to IgG₁-induced PSA and with neutrophils and monocytes to IgG_{2b}-induced PSA but not to IgG_{2a}-induced PSA, which appeared to depend entirely on neutrophils and monocytes/macrophages. Altogether, our data propose that the 3 IgG subclasses, IgG₁, IgG_{2a}, and IgG_{2b}, induce 3 qualitatively different pathways of anaphylaxis that are nevertheless triggered primarily by a single IgG receptor, FcγRIII.

FcγRIII is a low-affinity receptor for IgG₁, IgG_{2a}, and IgG_{2b}, whereas FcγRI is a high-affinity receptor for IgG_{2a}, and FcγRIV is a high-affinity receptor for IgG_{2a} and IgG_{2b}. Therefore one would assume that FcγRIII predominates in IgG₁-induced PSA, FcγRI and FcγRIV predominate in IgG_{2a}-induced PSA, and FcγRIV predominates in IgG_{2b}-induced PSA. However, our data from FcγRIII^{-/-} mice indicate that this receptor

predominates in all 3 models. Notably, we found increased expression of FcγRIIB on neutrophils and Ly6C^{hi} monocytes in FcγRIII^{-/-} mice, which could mask a potential contribution of FcγRIV in these conditions.

In support of the notion that FcγRIII predominates in IgG-induced PSA induction, an alternative model of PSA induced by sensitization and challenge with goat antibodies was found to be driven by FcγRIII,²² and blocking antibodies against FcγRIII were protective in a model of PSA induced by IgG immune complexes.¹⁸ In addition, IgG_{2a}-induced PSA in FcγRIIB^{-/-} mice was abolished after injection of anti-FcγRIIB/III blocking mAbs.⁵ FcγRIII is the only activating IgG receptor in the mouse that does not bind an IgG subclass with high affinity, and thus it remains unoccupied by monomeric IgG and accessible for binding of immune complexes. This is theoretically not the case for FcγRI and FcγRIV, which at physiologic serum concentrations of IgG_{2a} (approximately 2.5 mg/mL) and IgG_{2b} (approximately 1.5 mg/mL), are likely occupied *in vivo*, particularly on circulating cells. Of note, C57Bl/6 mice produce IgG_{2c} but not IgG_{2a} antibodies, the amino acid sequence of which varies by about 15%. Experiments performed in BALB/c mice that express endogenous IgG_{2a} (but no IgG_{2c}) produced similar results regarding the contribution of basophils, neutrophils, and monocytes to IgG_{2a} (see Fig E6, B), indicating that IgG_{2a} and IgG_{2c} sequence variations probably do not affect the mechanisms of anaphylaxis induction that we describe herein.

Adult female mice of 20 g, as used in this study, possess a circulating blood volume of 1.4 to 1.5 mL. Injection of 500 μg of antibody thus corresponds to approximately 330 μg/mL of circulating antibody, injection of 1 mg corresponds to approximately 660 μg/mL, and injection of 2 mg corresponds to approximately 1.3 mg/mL. In cases of anaphylaxis, the circulating concentration of allergen-specific IgG has not been evaluated because of a lack of testing and appropriate controls (ie, anti-allergen mAbs), although we have reported high circulating antigen-specific IgG levels in an autoimmune model of arthritis.³³ It seems rather unlikely that patients with anaphylaxis possess such increased circulating levels of IgG anti-allergen as mice receiving the high doses we used in this study. Nevertheless, our results in high-dose IgG_{2a}- and IgG_{2b}-induced PSA demonstrate that FcγRIV can trigger anaphylaxis by itself (ie, in the absence of FcγRIII). Similar results have been obtained in mice expressing only FcγRIV: “FcγRIV-only” mice had IgG_{2b}-induced PSA after injection of preformed IgG_{2b} immune complexes and also on

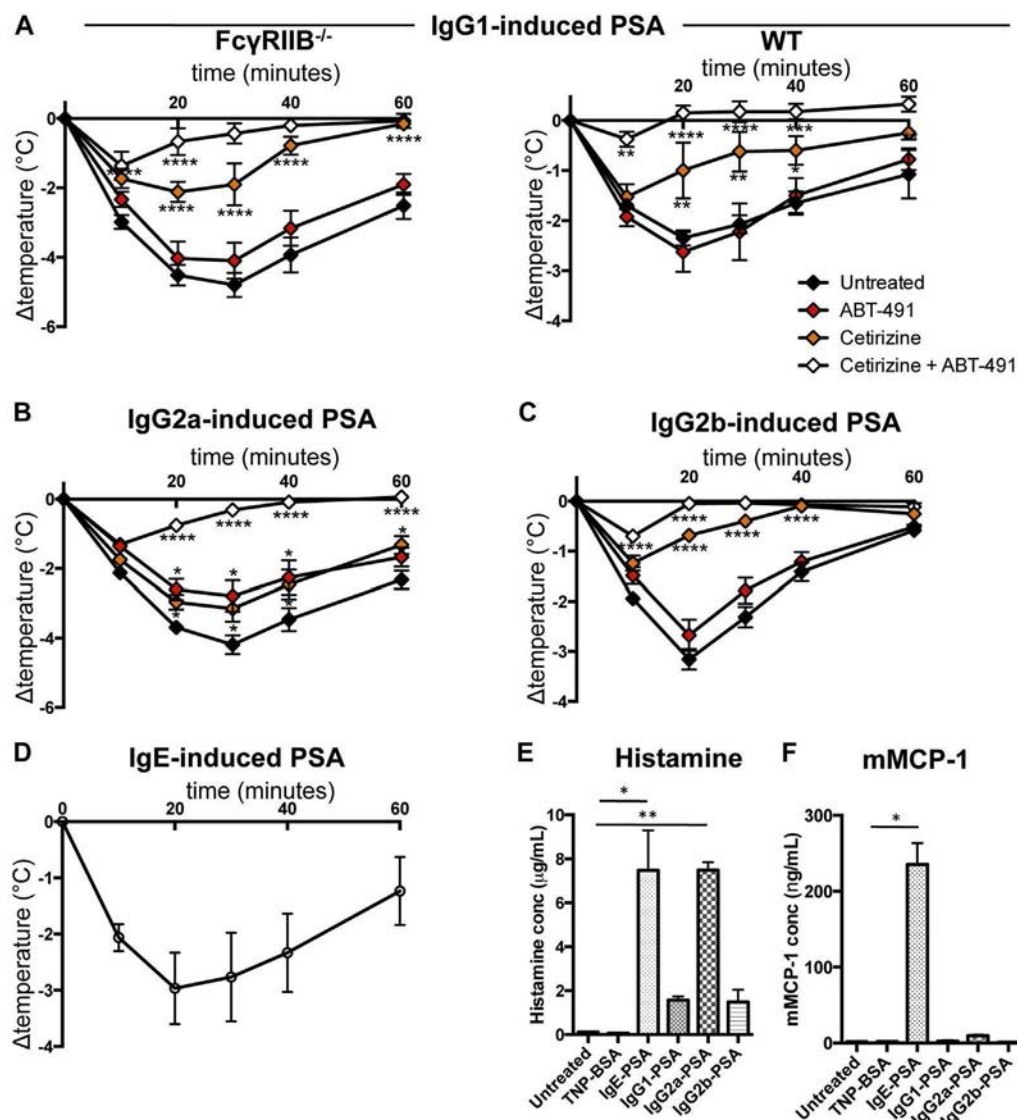


FIG 7. Contributions of histamine and PAF to IgG-induced PSA. **A-D**, Body temperatures of pretreated mice during IgG₁-induced PSA in FcγRIIB^{-/-} (n = 6 per group) or WT (n = 4 per group) mice (Fig 7, A), IgG_{2a}-induced PSA (Fig 7, B), IgG_{2b}-induced PSA (Fig 7, C) or IgE-induced PSA (Fig 7, D) in WT mice (n ≥ 7 per group). **E** and **F**, Histamine (Fig 7, E) and mMCP-1 (Fig 7, F) concentrations after PSA (n = 3 per group). Data are representative of at least 2 independent experiments, except for Fig 7, A and C (pooled from 2 independent experiments). *P < .05, **P < .01, ***P < .001, and ****P < .0001.

injection of polyclonal anti-sera, followed by antigen challenge.¹⁸ We reported previously that IgG_{2b}-induced PSA triggered by injection of preformed IgG_{2b}-immune complexes in WT mice was abolished after injection of anti-FcγRIV blocking mAb 9E9.¹⁸

This contrasts with the findings of the current study, in which we show that FcγRIII is the major activating receptor in all models of IgG-induced PSA and FcγRIV contributes only at high antibody concentrations. Two hypotheses might explain these discrepant results: (1) the injection of preformed IgG_{2b}-immune complexes leads to an immediate circulating bolus of immune complexes, which are similarly formed only after injection of high amounts of IgG_{2b} and antigen, thus triggering FcγRIV, and (2) as recently reported,⁴⁰ mAb 9E9 might not only block FcγRIV through its Fab portions but also FcγRIII through its Fc portion once 9E9 is bound to FcγRIV. In our view it is likely that a

combination of these mechanisms reconciles our previous and herein described results and suggest that IgG_{2b} PSA induced after injection of preformed IgG_{2b}-immune complexes relies on both FcγRIII and FcγRIV rather than on FcγRIV alone, as we reported previously.¹⁸ Together, this body of evidence supports the notion that FcγRIV is capable of triggering cell activation leading to anaphylaxis, although in restricted conditions (ie, in the absence/blockade of FcγRIII or presence of large amounts of IgG_{2a} and/or IgG_{2b} antibodies).

The differential contribution of FcγRs to IgG-induced PSA might rely on their respective expression patterns on myeloid cells. Indeed, FcγRI is not^{32,33} or is only barely³⁴ expressed on circulating monocytes, and its expression is largely restricted to tissue-resident macrophages. Therefore the level of its expression on cells reported to contribute to anaphylaxis (ie, monocytes in

this case) might not suffice to induce their activation. This notion is supported by the absence of any detectable effect of Fc γ R1 deficiency in the mice with IgG₂-induced PSA on which we report in this study, even at high doses of IgG₂ antibodies. However, Fc γ R1 is expressed on all myeloid cells⁷ and, moreover, at comparably high levels on all those cell types that have been reported to contribute to anaphylaxis: basophils, monocytes, and neutrophils.²¹ This pattern of cellular expression might explain its predominant contribution to all models of IgG-induced anaphylaxis. Fc γ R4 is expressed on neutrophils and Ly6C^{lo} monocytes. However, it remains unclear whether Ly6C^{lo}, Ly6C^{hi}, or both monocyte subsets contribute to anaphylaxis. Fc γ R4 could contribute to PSA induction in exceptional conditions (Fc γ R1 deficiency or high IgG₂ antibody doses). The lack of Fc γ R4 contribution in classical conditions of PSA might suggest that its expression level is not sufficient in WT mice. Notably, it has been reported previously that particular Fc γ R deficiencies modify the expression levels of other Fc γ Rs. In particular, Fc γ R1^{-/-} mice, but not Fc γ R1^{-/-} mice, presented a significant increase in Fc γ R4 expression levels on neutrophils^{18,41,42} and a tendency for increased expression on Ly6C^{lo} monocytes (see Fig E4, B). This could explain why the contribution of Fc γ R4 to IgG₂-induced PSA becomes apparent in Fc γ R1^{-/-} mice. Conversely, Fc γ R4^{-/-} mice did not present alterations of Fc γ R1 expression on neutrophils or Ly6C^{hi} monocytes compared with WT littermates (see Fig E4, A). Fc γ R2^{-/-} mice expressed significantly higher levels of Fc γ R1 and Fc γ R4 on neutrophils and increased Fc γ R1 levels on Ly6C^{hi} monocytes that might, altogether, contribute to their higher susceptibility to anaphylaxis induction (see Fig E4, A and B).

The contribution of a rather restricted subset of myeloid cells to these (and other) models of anaphylaxis^{2,3} appears to be determined by at least 2 factors: their capacity to release anaphylactogenic mediators (eg, histamine or PAF) and their expression of sufficient levels of activating IgG receptors. Mast cells and basophils release histamine, and neutrophils monocytes/macrophages, and basophils release PAF on Fc γ R triggering. Other mediators might induce anaphylaxis or contribute to its severity, among them lipid mediators, such as prostaglandins, thromboxanes, and leukotrienes. Indeed, some of these have been reported to trigger bronchoconstriction and an increase in vascular permeability.⁴³ The release of such mediators is sufficiently rapid to coincide with the celerity of hypothermia, which is detectable within minutes after allergen challenge. Therefore it is surprising that eosinophils do not contribute to IgG-induced PSA because they express high levels of activating Fc γ R1 and Fc γ R2²¹ (but no Fc γ R1 or Fc γ R4) and are capable of releasing leukotriene C₄, prostaglandin E₂, thromboxane, and PAF on activation.⁴³ Although eosinophils appear in relatively low numbers among blood cells (approximately 2×10^5 /mL), this is an unlikely explanation because basophils are significantly less numerous (approximately 5×10^4 /mL) but do contribute to anaphylaxis models. Most revealingly, it has been reported that eosinophils do not release PAF after IgG-dependent activation.⁴⁴ Whether eosinophils produce other potentially anaphylactogenic mediators after IgG-immune complex activation has not been investigated, but the lack of such an effect appears the most reasonable hypothesis to explain why eosinophils have not been found to contribute to IgG-induced anaphylaxis.

We investigated the contribution of neutrophils and monocytes to IgG-induced PSA models by using depletion approaches.

Ly6G⁺ cell depletion with NIMP-R14 resulted in an efficient depletion of neutrophils in the blood and spleen (see Figs E1, B, and E2, B). The same treatment resulted only in partial depletion in the bone marrow, in which a proportion of Ly6G⁺ cells are masked from fluorescent anti-Ly6G staining but not depleted by NIMP-R14 treatment (refer to bone marrow panels in Figs E1, C and D, and E2, C, D, and I). Importantly, we found that NIMP-R14 depletion has a significant effect on monocyte populations in the blood and, to some extent, in the spleen. This should be taken into consideration when interpreting the results of NIMP-R14 depletion experiments. All IgG-induced PSA models were ameliorated after NIMP-R14 depletion but also when monocytes/macrophages were targeted by using clodronate liposomes. Intravenous injection of clodronate liposomes resulted in a significant depletion of monocytes from the blood and monocytes/macrophages from the spleen and bone marrow but not from the skin (data not shown) and peritoneum (see Figs E1 and E2, as previously reported²⁶) and to a significant increase in blood leukocyte counts, particularly neutrophils (see Figs E1 and E2). Thus the anti-Ly6G and clodronate liposome treatments alter also monocytes and the neutrophil compartment, respectively, but reduce hypothermia in the 3 models of IgG-induced PSA studied. Constitutive deficiency in neutrophils, as studied with Gfi1^{-/-} mice, confirmed the role of neutrophils in IgG_{2a}- and IgG_{2b}-induced PSA models. Therefore both neutrophils and monocytes can be considered to contribute to IgG-induced anaphylaxis in mice, whether dependent on IgG₁, IgG_{2a}, or IgG_{2b}. The role of macrophages in the different IgG-induced PSA models remains to be investigated more deeply because clodronate liposomes injected intravenously efficiently targeted macrophages in the spleen but not in other tissues, such as the peritoneum or skin, and this does not allow conclusions on their contribution.

The contribution of basophils to models of anaphylaxis has been a recent matter of debate. Tsujimura et al²⁰ reported that depletion of basophils with anti-CD200R3 (clone Ba103) mAbs strongly inhibited IgG₁-induced PSA and rescued mast cell-deficient mice from active anaphylaxis. However, Ohnmacht et al⁴⁵ found that basophil-deficient Mcpt8^{cre} mice demonstrated slightly decreased but significant hypothermia in response to IgG₁-induced PSA (induced with the same antibody clone) when compared with WT mice. More recently, Reber et al³⁶ reported that peanut-induced anaphylaxis was reduced after diphtheria toxin injection in Mcpt8^{DTR} mice, which selectively depletes basophils, and confirmed that basophil depletion with anti-CD200R3 mAbs inhibited anaphylaxis. Moreover, Khodoun et al⁵ found a contribution of basophils to anaphylaxis-related mortality but not to hypothermia in a model of IgG_{2a}-induced PSA after anti-CD200R3 mAb injection. Therefore it appears that differences between inducible basophil depletion with specific antibodies or toxin administration and a constitutive lack of basophils, possibly leading to compensatory mechanisms during development of these mice, might account for the divergent results observed. However, intriguingly, basophils have been reported to be resistant to IgG-immune complex triggering *ex vivo* because of dominant inhibition by Fc γ R2 over activation by Fc γ R1.²¹

In this study we report that both basophil depletion after anti-CD200R3 mAb (Ba103) injection or constitutive deficiency of basophils and mast cells in Cpa3-Cre; Mcl-1^{fl/fl} mice inhibits IgG_{2b}-induced PSA but not IgG_{2a}-induced PSA, confirming a role for basophils (and potentially mast cells) to specific IgG-induced PSA models. Of note, Ba103 efficiently depleted

basophils from the blood and partially from the spleen and the bone marrow but had no significant effect on mast cells in the peritoneum or skin (see Figs E1, A and E, and E2, A and E). The difference in the ability of basophils to respond to IgG-immune complex triggering *in vitro* and the various *in vivo* models might be explained by functional alterations during basophil purification or a requirement for costimulation by other cells or their products that are present *in vivo*, but not *ex vivo*, for basophils to respond to IgG-immune complexes.

Our results with Cpa3-Cre; Mcl-1^{fl/fl} mice indicate that mast cells were not necessary for IgG_{2a}-induced PSA. We could not formally define their role in IgG_{2b}-induced PSA because basophil depletion and deficiency in basophils and mast cells lead to similar reduction in IgG_{2b}-induced PSA. Notably, increased plasma histamine levels, but no increase in mMCP-1 levels, could be detected, suggesting that mucosal mast cells were not activated during IgG-induced PSA. Intriguingly, however, some dermal mast cells displayed a degranulated morphology 30 minutes after challenge in all IgG-induced PSA models tested (for examples see Fig E7 in this article's Online Repository at www.jacionline.org). However, whether their degranulation is a cause or a consequence of anaphylaxis remains elusive.¹⁷

The ability of cells expressing activating FcγRs to respond to IgG-immune complexes has been proposed to be regulated by coexpression of FcγRIIB.⁴⁶ FcγRIIB^{-/-} mice experience increased hypersensitivity and anaphylactic reactions to IgG₁-induced PSA (as seen in this report).^{18,19} Our results further demonstrate that FcγRIIB inhibits IgG_{2b}-induced PSA but not IgG_{2a}-induced PSA. This latter finding is supported by results from Khodoun et al,⁵ who proposed that the lack of this inhibitory receptor can lead to increased spontaneous formation of immune complexes in FcγRIIB^{-/-} mice, which could compete with IgG_{2a}-immune complexes. In light of our results comparing IgG₁-, IgG_{2a}-, and IgG_{2b}-induced PSA, we propose that the significantly lower affinity of inhibitory FcγRIIB for IgG_{2a} (K_A , $4.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) than for IgG₁ (K_A , $3.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) and IgG_{2b} (K_A , $2.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) is the determining factor (Table I). Another factor might be the variance in expression of FcγRIIB on circulating myeloid cells as follows: basophils > monocytes > eosinophils >> neutrophils.²¹ Although the exact numbers of expressed activating FcγRIII and inhibitory FcγRIIB per cell remain unknown, flow cytometric analysis allowed the estimation of their relative expression: indeed, the FcγRIII/FcγRIIB ratio is higher on neutrophils than on monocytes and basophils. Thus these differential expression levels might explain why neutrophils contribute to anaphylaxis because the receptor balance is in favor of the activating receptor. Strikingly, FcγRIIB is coexpressed only with FcγRIII on basophils and Ly6C^{hi} monocytes, whereas it is coexpressed with FcγRIII and FcγRIV on neutrophils and Ly6C^{lo} monocytes.³⁴ Therefore contribution of a given cell type to anaphylaxis might be favored when inhibitory FcγRIIB is required to dampen the stimulatory potential of 2 activating IgG receptors instead of 1. This concept extends to IgG₁-immune complexes that only engage one activating receptor, FcγRIII.

Our results on the contribution of mouse IgG receptors, cells, and mediators in the setting of IgG-induced anaphylaxis can potentially be translated to human IgG-dependent anaphylaxis (eg, after intravenous IgG or therapeutic IgG antibody administration). Indeed, even though IgG receptors are different in the 2 species, we have already reported that human FcγRI and human

FcγRIIA can induce anaphylaxis when expressed under the control of their own promoter in transgenic mice.^{23,24} Human FcγRI (CD64) is the equivalent of mouse FcγRI, whereas human FcγRIIA (CD32A) can be regarded as the equivalent of mouse FcγRIII, and human FcγRIIA (CD16A) is the equivalent of mouse FcγRIV.⁷ Human FcγRIIA, like mouse FcγRIII, is expressed on all myeloid cells and could therefore act as the principal IgG receptor responsible for anaphylaxis in human subjects. Human FcγRIIB, the equivalent of mouse FcγRIIB, is scarcely expressed on most circulating myeloid cells,⁴⁷ except for its high expression on basophils,²¹ suggesting that among myeloid cells, only human basophils are highly sensitive to human FcγRIIB-mediated inhibition. In contrast to mouse FcγRI, human FcγRI is constitutively expressed on circulating monocytes and inducibly on neutrophils, allowing this receptor to induce anaphylaxis.²⁴ The binding of human IgG subclasses to human FcγRs differs strikingly from the binding of mouse IgG subclasses to mouse FcγRs. Noticeably, the affinity of human FcγRIIB for any human IgG subclass is the lowest among human IgG-human FcγR interactions. For example, human IgG₁, the equivalent of mouse IgG_{2a}, is bound by all activating human FcγRs (K_A , $>10^6 \text{ M}^{-1}$) with at least a 10-fold higher affinity than by inhibitory human FcγRIIB (K_A , 10^5 M^{-1}).⁴⁸ If we consider the translation of our results obtained in the mouse to human IgG-induced anaphylaxis, one could anticipate that human FcγRIIB-mediated inhibition of IgG-induced anaphylaxis is inefficient in human neutrophils and monocytes and efficient only in human basophils for which increased human FcγRIIB expression might compensate for the low-affinity version of this receptor for human IgG subclasses. Certainly, FcγR engagement by IgG immune complexes on human basophils could not trigger any detectable basophil activation *in vitro*,²¹ which is similar to the results we reported for mouse basophil activation. Altogether, our data propose that the differential expression of inhibitory FcγRIIB on myeloid cells and its differential binding of IgG subclasses control the contribution of basophils, neutrophils, and monocytes to IgG-dependent anaphylaxis, thus revealing novel complexities in the mechanism of regulation of cell populations and therefore their contribution to IgG-induced reactions *in vivo*.

We thank our colleagues at Institut Pasteur, Paris: D. Sinnaya for administrative help, Stéphane Petres for help with antibody purifications, and Laurence Fiette for help with histological analyses. We thank our colleagues for their generous gifts: T. Moroy (Montreal University, Montreal, Quebec, Canada), C. Lowell (University of California at San Francisco, San Francisco, Calif), J. V. Ravetch (Rockefeller University, New York, NY, USA), and J. Leusen (University Medical Center, Utrecht, The Netherlands) for mice and R. Coffman (DNAX, Palo Alto, Calif), R. Good (USFCM, Tampa, Fla), B. Heyman (Uppsala Universitet, Uppsala, Sweden), H. Karasuyama (Tokyo Medical and Dental University Graduate School, Tokyo, Japan), and D. Voehringer (Universitätsklinikum, Erlangen, Germany) for antibodies. Cl₂MDP was a gift of Roche Diagnostics GmbH.

Clinical implications: Anaphylactic pathways induced by different IgG subclasses in mice vary in terms of contributions by different cell types, mediators, and antibody receptors. These results might help in the design of efforts to understand and treat IgG-induced anaphylaxis in human subjects, such as those seen after intravenous IgG or administration of therapeutic IgG antibodies.

REFERENCES

- Brown SG, Stone SF, Fatovich DM, Burrows SA, Holdgate A, Celenza A, et al. Anaphylaxis: clinical patterns, mediator release, and severity. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:1141-9.e5.
- Finkelman FD, Rothenberg ME, Brandt EB, Morris SC, Strait RT. Molecular mechanisms of anaphylaxis: lessons from studies with murine models. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:449-58.
- Jonsson F, Mancardi DA, Albanesi M, Bruhns P. Neutrophils in local and systemic antibody-dependent inflammatory and anaphylactic reactions. *J Leukoc Biol* 2013;94:643-56.
- Iff ET, Vaz NM. Mechanisms of anaphylaxis in the mouse. Similarity of shock induced by anaphylaxis and by mixtures of histamine and serotonin. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1966;30:313-22.
- Khodoun MV, Kucuk ZY, Strait RT, Krishnamurthy D, Janek K, Clay CD, et al. Rapid desensitization of mice with anti-Fcγ3R/Fcγ3RIIb mAb safely prevents IgG-mediated anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:1375-87.
- Million M, Fioramonti J, Zajac JM, Bueno L. Effects of neuropeptide FF on intestinal motility and temperature changes induced by endotoxin and platelet-activating factor. *Eur J Pharmacol* 1997;334:67-73.
- Bruhns P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood* 2012;119:5640-9.
- Guilliams M, Bruhns P, Saeys Y, Hamad H, Lambrecht BN. The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages. *Nat Rev Immunol* 2014;14:94-108.
- Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol* 2007;7:715-25.
- Bruhns P, Fremont S, Daéron M. Regulation of allergy by Fc receptors. *Curr Opin Immunol* 2005;17:662-9.
- Gavin AL, Barnes N, Dijkstra bloem HM, Hogarth PM. Identification of the mouse IgG3 receptor: implications for antibody effector function at the interface between innate and adaptive immunity. *J Immunol* 1998;160:20-3.
- Saylor CA, Dadachova E, Casadevall A. Murine IgG1 and IgG3 isotype switch variants promote phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* through different receptors. *J Immunol* 2010;184:336-43.
- Nimmerjahn F, Ravetch JV. Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science* 2005;310:1510-2.
- Nimmerjahn F, Bruhns P, Horiuchi K, Ravetch JV. Fcγ4R: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity. *Immunity* 2005;23:41-51.
- Unkeless JC, Eisen HN. Binding of monomeric immunoglobulins to Fc receptors of mouse macrophages. *J Exp Med* 1975;142:1520-33.
- Mancardi DA, Iannascoli B, Hoos S, England P, Daeron M, Bruhns P. Fcγ4R is a mouse IgE receptor that resembles macrophage FcεRI in humans and promotes IgE-induced lung inflammation. *J Clin Invest* 2008;118:3738-50.
- Miyajima I, Dombrowicz D, Martin TR, Ravetch JV, Kinet JP, Galli SJ. Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG1 and Fcγ3RII. Assessment of the cardiopulmonary changes, mast cell degranulation, and death associated with active or IgE- or IgG1-dependent passive anaphylaxis. *J Clin Invest* 1997;99:901-14.
- Jönsson 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.
- Ujike A, Ishikawa Y, Ono M, Yuasa T, Yoshino T, Fukumoto M, et al. Modulation of immunoglobulin (Ig)E-mediated systemic anaphylaxis by low-affinity Fc receptors for IgG. *J Exp Med* 1999;189:1573-9.
- 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.
- Cassard L, Jonsson F, Arnaud S, Daeron M. Fcγ receptors inhibit mouse and human basophil activation. *J Immunol* 2012;189:2995-3006.
- Strait RT, Morris SC, Yang M, Qu XW, Finkelman FD. Pathways of anaphylaxis in the mouse. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:658-68.
- Jonsson F, Mancardi DA, Zhao W, Kita Y, Iannascoli B, Khun H, et al. Human Fcγ3RII induces anaphylactic and allergic reactions. *Blood* 2012;119:2533-44.
- Mancardi DA, Albanesi M, Jonsson F, Iannascoli B, Van Rooijen N, Kang X, et al. The high-affinity human IgG receptor Fcγ3RI (CD64) promotes IgG-mediated inflammation, anaphylaxis, and antitumor immunotherapy. *Blood* 2013;121:1563-73.
- Lilla JN, Chen CC, Mukai K, BenBarak MJ, Franco CB, Kalesnikoff J, et al. Reduced mast cell and basophil numbers and function in Cpa3-Cre; Mcl-1fl/fl mice. *Blood* 2011;118:6930-8.
- Van Rooijen N, Sanders A. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J Immunol Methods* 1994;174:83-93.
- Williams EL, Tutt AL, French RR, Chan HT, Lau B, Penfold CA, et al. Development and characterisation of monoclonal antibodies specific for the murine inhibitory Fcγ3RII (CD32B). *Eur J Immunol* 2012;42:2109-20.
- Jiao D, Liu Y, Lu X, Liu B, Pan Q, Liu Y, et al. Macrophages are the dominant effector cells responsible for IgG-mediated passive systemic anaphylaxis challenged by natural protein antigen in BALB/c and C57BL/6 mice. *Cell Immunol* 2014;289:97-105.
- Biburger M, Nimmerjahn F. Low level of Fcγ3RII expression on murine natural killer cells. *Immunol Lett* 2012;143:53-9.
- Yucel R, Kosan C, Heyd F, Moroy T. Gfi1:green fluorescent protein knock-in mutant reveals differential expression and autoregulation of the growth factor independence 1 (Gfi1) gene during lymphocyte development. *J Biol Chem* 2004;279:40906-17.
- Khodoun MV, Strait R, Armstrong L, Yanase N, Finkelman FD. Identification of markers that distinguish IgE- from IgG-mediated anaphylaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:12413-8.
- Tan PS, Gavin AL, Barnes N, Sears DW, Vremec D, Shortman K, et al. Unique monoclonal antibodies define expression of Fcγ3RI on macrophages and mast cell lines and demonstrate heterogeneity among subcutaneous and other dendritic cells. *J Immunol* 2003;170:2549-56.
- Mancardi DA, Jonsson F, Iannascoli B, Khun H, Van Rooijen N, Huerre M, et al. The murine high-affinity IgG receptor Fcγ3RI is sufficient for autoantibody-induced arthritis. *J Immunol* 2011;186:1899-903.
- Biburger M, Aschermann S, Schwab I, Lux A, Albert H, Danzer H, et al. Monocyte subsets responsible for immunoglobulin G-dependent effector functions in vivo. *Immunity* 2011;35:932-44.
- Makabe-Kobayashi Y, Hori Y, Adachi T, Ishigaki-Suzuki S, Kikuchi Y, Kagaya Y, et al. The control effect of histamine on body temperature and respiratory function in IgE-dependent systemic anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:298-303.
- Reber LL, Marichal T, Mukai K, Kita Y, Tokuoka SM, Roers A, et al. Selective ablation of mast cells or basophils reduces peanut-induced anaphylaxis in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:881-8.e11.
- Camussi G, Aglietta M, Coda R, Bussolino F, Piacibello W, Tetta C. Release of platelet-activating factor (PAF) and histamine. II. The cellular origin of human PAF: monocytes, polymorphonuclear neutrophils and basophils. *Immunology* 1981;42:191-9.
- Wedemeyer J, Tsai M, Galli SJ. Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. *Curr Opin Immunol* 2000;12:624-31.
- Jonsson F, Daeron M. Mast cells and company. *Front Immunol* 2012;3:16.
- Tipton TR, Mockridge CI, French RR, Tutt AL, Cragg MS, Beers SA. Anti-mouse Fcγ4R antibody 9E9 also blocks Fcγ3RII in vivo. *Blood* 2015;126:2643-5.
- Syed SN, Konrad S, Wiege K, Nieswandt B, Nimmerjahn F, Schmidt RE, et al. Both Fcγ4R and Fcγ3RII are essential receptors mediating type II and type III autoimmune responses via Fcγ3R-LAT-dependent generation of C5a. *Eur J Immunol* 2009;39:3343-56.
- Nimmerjahn F, Lux A, Albert H, Woigk M, Lehmann C, Dudziak D, et al. Fcγ4R deletion reveals its central role for IgG2a and IgG2b activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:19396-401.
- Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:S73-80.
- Capron M. Eosinophils: receptors and mediators in hypersensitivity. *Clin Exp Allergy* 1989;19(suppl 1):3-8.
- Stone KD, Schwartz C, Panzer M, Schiedewitz I, Naumann R, Voehringer D. Basophils orchestrate chronic allergic dermatitis and protective immunity against helminths. *Immunity* 2010;33:364-74.
- Smith KG, Clatworthy MR. Fcγ3RII in autoimmunity and infection: evolutionary and therapeutic implications. *Nat Rev Immunol* 2010;10:328-43.
- Veri MC, Gorlatov S, Li H, Burke S, Johnson S, Stavenhagen J, et al. Monoclonal antibodies capable of discriminating the human inhibitory Fcγ3RII (CD32B) from the activating Fcγ3R (CD32A): biochemical, biological and functional characterization. *Immunology* 2007;121:392-404.
- 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.

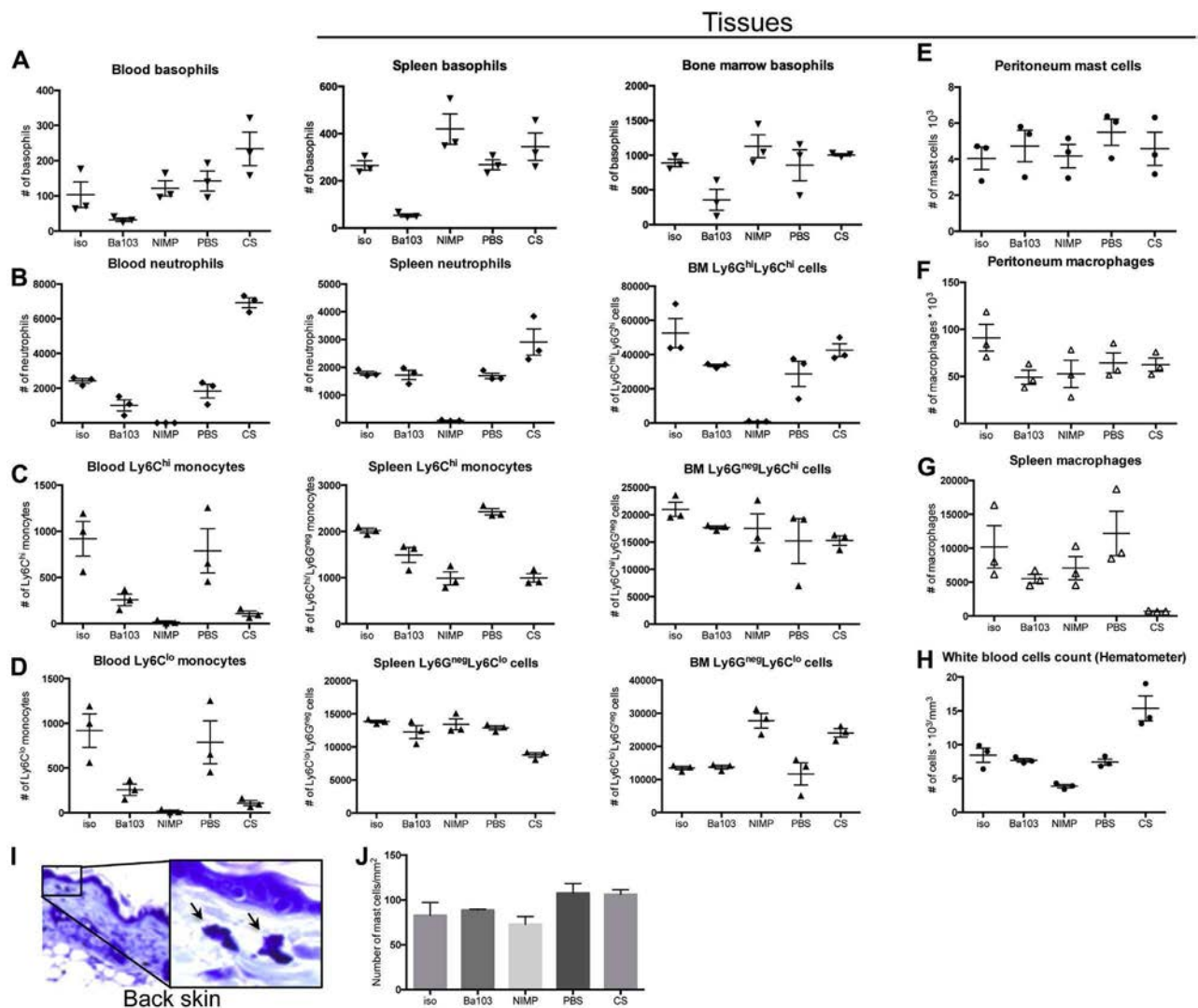


FIG E1. Effects of depletion strategies on myeloid cell populations: cell counts. WT mice were treated with indicated reagents. Twenty-four hours after injection, counts of specific cell populations were determined by means of flow cytometry (**A-G**) or histology (**I** and **J**), and leukocyte counts in total blood were measured with an automatic blood analyzer (**H**): counts of basophils (Fig E1, **A**), neutrophils (Fig E1, **B**), Ly6C^{hi} monocytes (Fig E1, **C**), and Ly6C^{lo} monocytes (Fig E1, **D**) in blood, spleen, and bone marrow; peritoneal mast cells (Fig E1, **E**); peritoneal macrophages (Fig E1, **F**); and splenic macrophages (Fig E1, **G**). **I**, Representation of a toluidine blue-stained back skin section with 2 mast cells (arrows). **J**, Counts of mast cells per square millimeter in the dermis of WT mice. Fig E1, **A-H**, show 1 of 3 independent experiments. Individual measurements and means $\pm$ SEMs are represented. *Ba103*, Anti-CD200R3 mAb; *CS*, clodronate liposomes; *Iso*, isotype rat IgG_{2b}; *NIMP*, anti-Ly6G mAb; *PBS*, PBS liposomes.

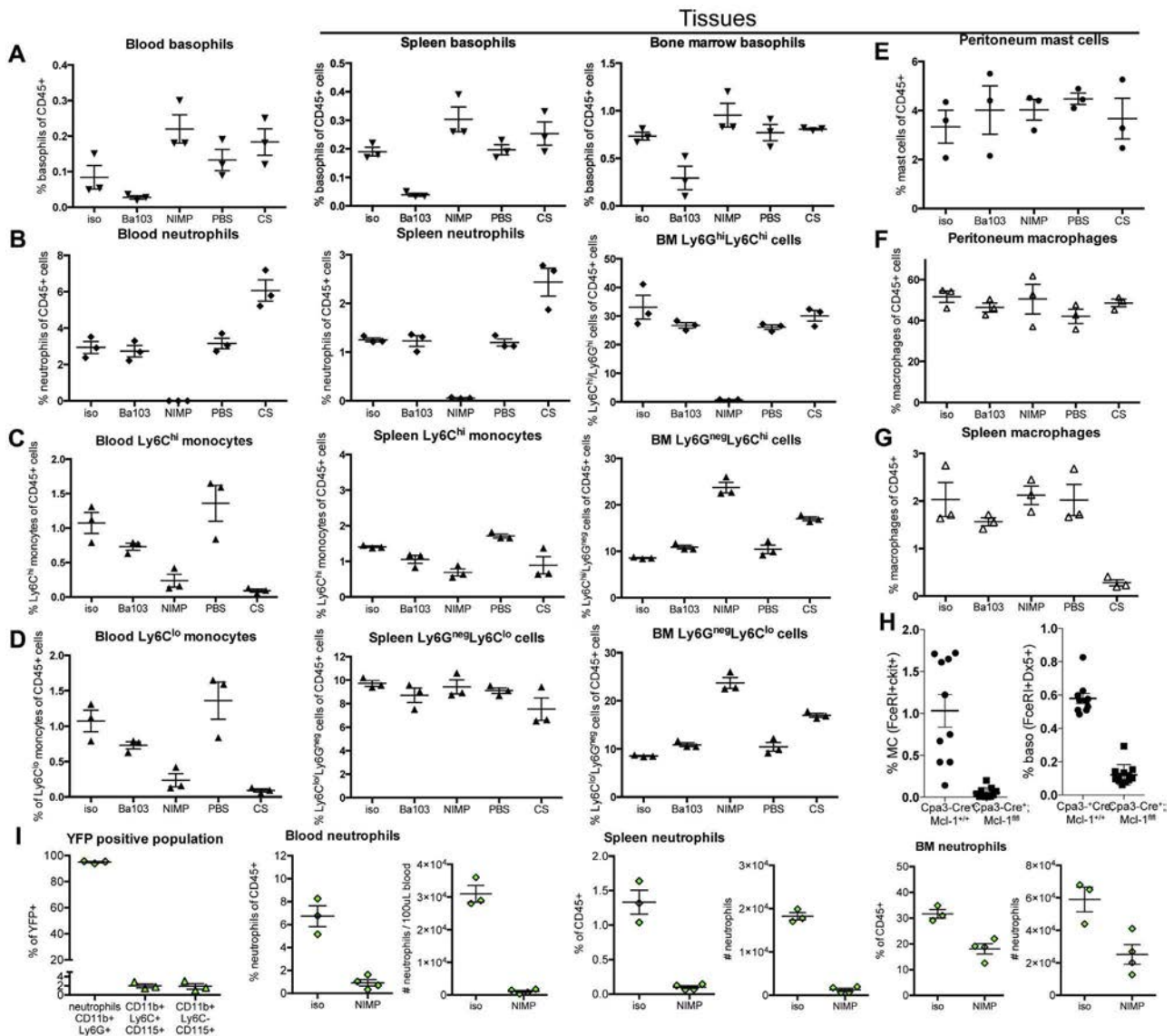


FIG E2. Effects of depletion strategies on myeloid cell populations: frequencies. WT mice were treated with indicated reagents. **A-G**, Twenty-four hours after injection, percentages of specific cell populations among CD45⁺ cells were determined by means of flow cytometry: basophils (Fig E2, A), neutrophils (Fig E2, B), Ly6C^{hi} monocytes (Fig E2, C), and Ly6C^{lo} monocytes (Fig E2, D) in blood, spleen, and bone marrow; peritoneal mast cells (Fig E2, E); peritoneal macrophages (Fig E2, F); and splenic macrophages (Fig E2, G). Fig E2, H, Percentages of peritoneal mast cells (pMC FcεRI⁺/c-Kit⁺) and blood basophils (FcεRI⁺/CD49b⁺) in Cpa3-Cre; Mcl-1^{fl/fl} and Cpa3-Cre; Mcl-1^{+/+} mice. **I**, *Left*, Percentages of YFP-positive cells in MRP8-Cre; Rosa26-YFP mice. *Right*, Effect of NIMP-R14 injection on neutrophils (percentages and counts of CD45⁺/YFP⁺/Ly6C^{neg}/CD115^{neg} cells) in blood, spleen, and bone marrow of MRP8-Cre; Rosa26-YFP mice. Fig E2, A-H, show corresponding percentages to cell counts shown in Fig E1 and display values for individually measured mice with means and SEMs. Ba103, Anti-CD200R3 mAb; CS, Clodronate liposomes; Iso, isotype rat IgG_{2b}; NIMP, anti-Ly6G mAb; PBS, PBS liposomes.

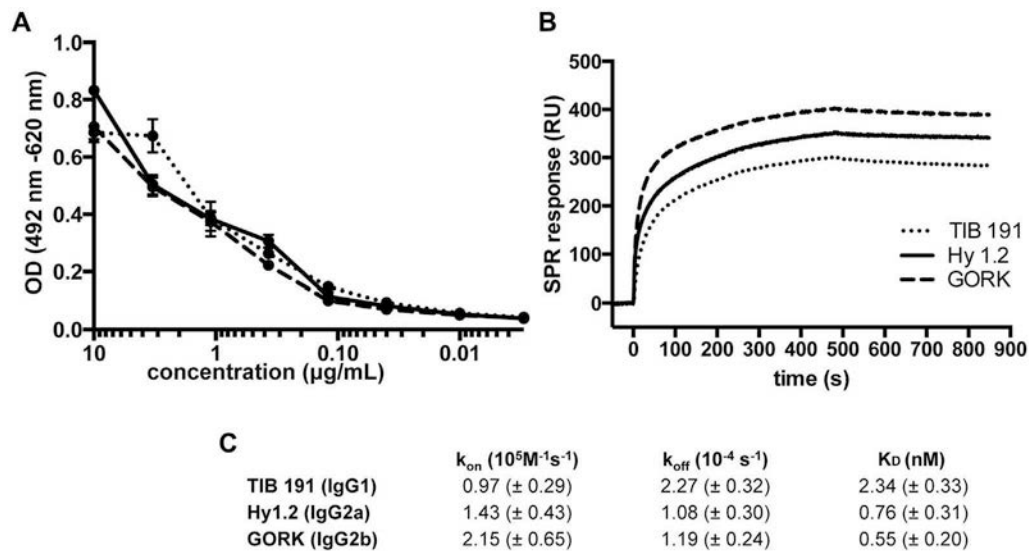


FIG E3. Relative affinity of IgG₁ (TIB191), IgG_{2a} (Hy1.2), and IgG_{2b} (GORK) anti-TNP to TNP-BSA. **A**, ELISA anti-TNP. Comparison of binding capacity of TIB191, Hy1.2, or GORK to immobilized TNP-BSA. Data are presented as means $\pm$ SEMs and representative of results from 5 independent experiments. **B**, Surface plasmon resonance analysis. Comparison of binding affinity TNP-BSA to immobilized TIB191, Hy1.2 or GORK clones. **C**, The table shows the k_{on} , k_{off} , and K_D values for each condition.

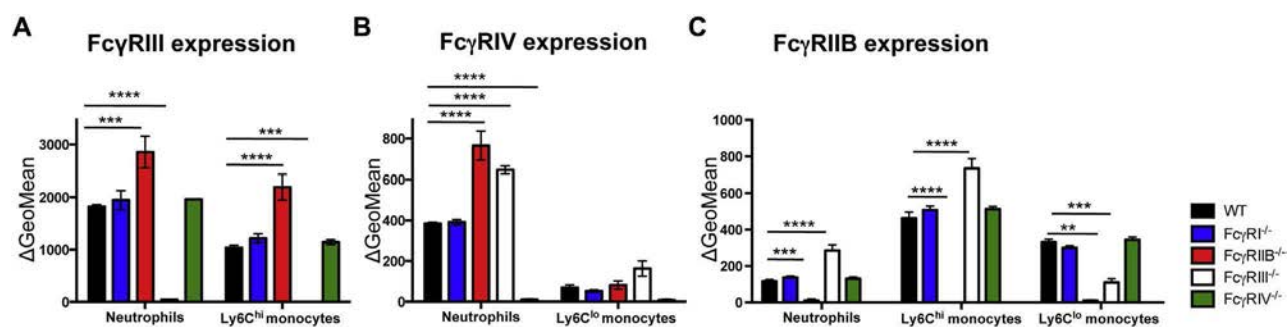


FIG E4. FcγR expression in FcγR-deficient mice. Expression of FcγRIII (A), FcγRIV (B), and FcγRIIB (C) is represented as the Δ geometric mean (*GeoMean*) of FcγR-specific staining compared with isotype control staining from blood leukocytes collected from untreated WT, FcγRI^{-/-}, FcγRIIB^{-/-}, FcγRIII^{-/-}, and FcγRIV^{-/-} mice (n = 4 per group). Data are represented as means $\pm$ SEMs. ** $P < .01$, *** $P < .001$, and **** $P < .0001$.

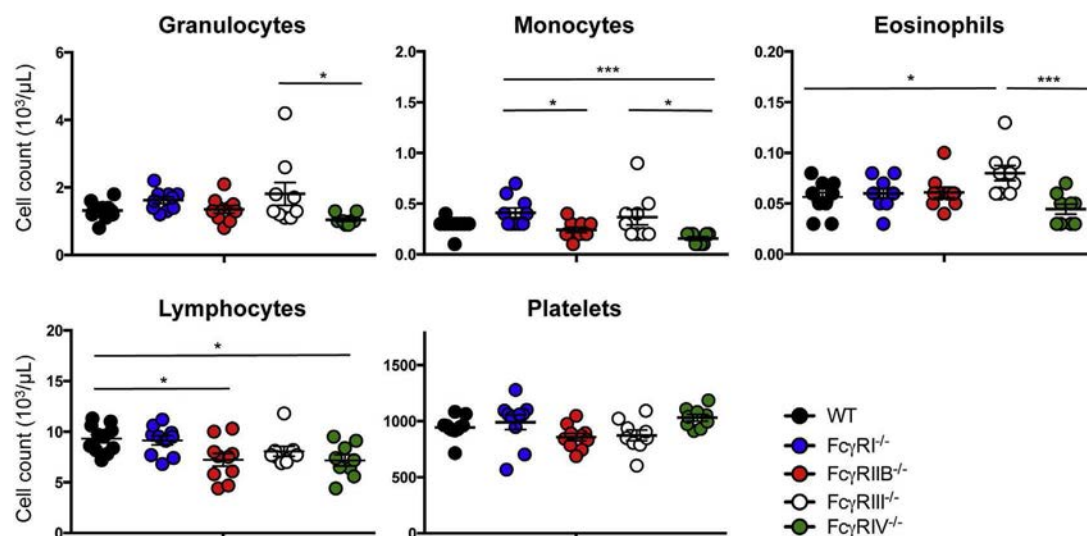


FIG E5. Blood leukocyte numbers in $\text{Fc}\gamma\text{R}$ -deficient mice. Leukocyte populations were assessed by using an ABC Vet automatic blood analyzer (Horiba ABX, Irvine, Calif) from blood collected from untreated WT, $\text{Fc}\gamma\text{RI}^{-/-}$, $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}^{-/-}$, $\text{Fc}\gamma\text{RIII}^{-/-}$, and $\text{Fc}\gamma\text{RIV}^{-/-}$ mice ($n = 4$ per group). Granulocytes represent mainly neutrophils (as judged by their size and granularity). Data are represented as means $\pm$ SEMs, and each point represents 1 mouse. *GeoMean*, Geometric mean. * $P < .05$ and *** $P < .001$.

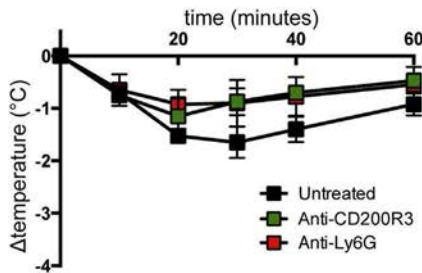
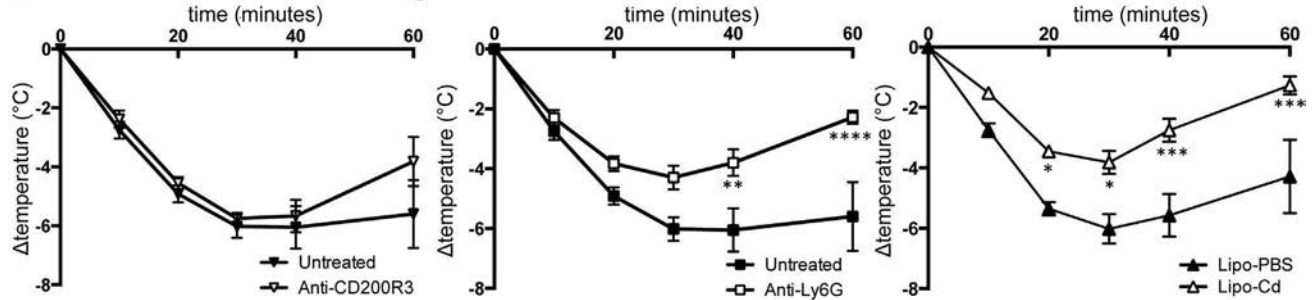
A IgG1-induced PSA in wt mice**B IgG2a-induced PSA in wt Balb/c mice**

FIG E6. IgG₁-induced PSA induces mild hypothermia in WT mice, and monocytes/macrophages and neutrophils contribute to IgG_{2a}-induced PSA in BALB/c mice. **A**, WT mice were injected with IgG₁ anti-TNP mAbs and challenged with TNP-BSA, and body temperatures were monitored. PSA in mice left untreated or injected with anti-Ly6G or anti-CD200R3 ($n = 4$ per group) is shown. **B**, BALB/c mice were left untreated or injected with anti-Ly6G, anti-CD200R3 ($n = 6$ per group), lipo-PBS ($n = 6$ per group), or lipo-Cd ($n = 6$ per group) before IgG_{2a}-induced PSA induction. Body temperatures were monitored. Data are represented as means $\pm$ SEMs. Data are pooled from 2 independent experiments. Significant differences compared with the untreated group are indicated. * $P < .05$, ** $P < .01$, *** $P < .001$, and **** $P < .0001$.

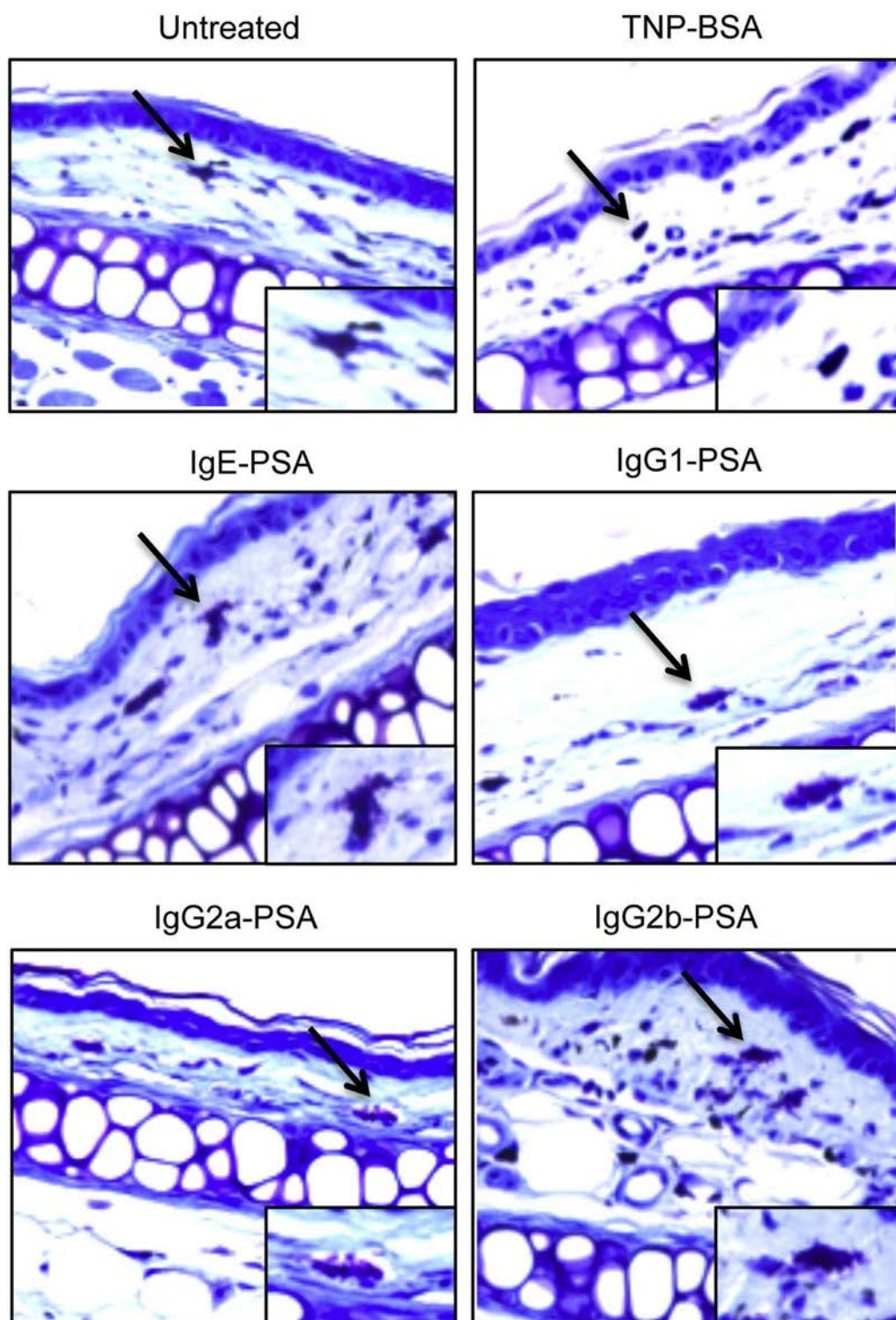


FIG E7. Examples of mast cell degranulation after IgG₁-, IgG_{2a}-, and IgG_{2b}-induced PSA. WT mice were injected with IgE, IgG₁, IgG_{2a}, and IgG_{2b} anti-TNP mAbs or left untreated (n = 3 for all groups) and challenged with TNP-BSA. Mouse ear skin biopsy specimens were collected 30 minutes after TNP-BSA injection. A representation of a toluidine blue-stained ear skin section with 1 mast cell (indicated by an arrow) for 1 mouse of each group of mice is shown.

Article 2

Drug-induced anaphylaxis relies on platelets

I. Introduction

Alors que le rôle des cellules myéloïdes a été bien caractérisé dans l'anaphylaxie, peu d'études se sont portées sur les plaquettes. Ceci peut s'expliquer par l'absence de récepteurs Fc aux IgG à la surface des plaquettes chez la souris. Au contraire, les plaquettes humaines expriment le Fc γ RIIA (seul récepteur Fc aux IgG exprimé à leur surface) et, en raison de leur nombre important dans la circulation sanguine (150 000 à 400 000/ μ L), constituent la source la plus importante de Fc γ RIIA de l'organisme.

Afin de mieux caractériser les acteurs potentiels du choc anaphylactique dans un modèle se rapprochant de l'homme, mon laboratoire a effectué des études à l'aide de souris transgéniques pour le récepteur Fc γ RIIA humain. En plus des plaquettes, ce récepteur de faible affinité aux IgG est exprimé à la surface de l'ensemble des cellules myéloïdes. Dans un modèle de PSA, mon équipe a montré que ce récepteur est suffisant à induire un choc et que ce choc est dépendant des neutrophiles et des monocytes/macrophages (140). La contribution des plaquettes après engagement du Fc γ RIIA n'a pour l'instant pas été étudiée dans le choc allergique.

Pour réaliser cette étude, des souris transgéniques pour le Fc γ RIIA humain (souris Fc γ RIIA^{tg}) ou non transgéniques (souris Fc γ R^{null}), et déficientes pour l'ensemble des Fc γ Rs de souris sont utilisées. Le modèle de PSA utilisé consiste à injecter à la souris des immunoglobulines intraveineuses humaines agrégées par la chaleur (PSA IVIg). Ces IgG humaines agrégées miment l'action d'un ligand humain du Fc γ RIIA humain et sont capables d'induire la réaction anaphylactique chez la souris.

La deuxième partie de mon projet consiste donc à évaluer le rôle des plaquettes dans un modèle de choc allergique induit par des IgG et dépendant du Fc γ RIIA humain. Pour cela, différentes expériences ont été réalisées, j'ai suivi le nombre de plaquettes circulantes, évalué leur profil d'activation, déterminé quels étaient leurs partenaires cellulaires éventuels et j'ai cherché à savoir si leur contribution était nécessaire et/ou suffisante.

II. Article 2

Drug-induced anaphylaxis relies on platelets

Héloïse Beutier^{1,2,3} et al.

Authors' affiliations

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;

Correspondence to: Friederike Jönsson and Pierre Bruhns, Unit of Antibodies in Therapy and Pathology, Department of Immunology, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France. Phone: +33144389144 or +33145688629. E-mail: joensson@pasteur.fr; bruhns@pasteur.fr

Introductory Paragraph

Anaphylaxis is an acute, severe, life-threatening multisystem allergic reaction. It results from inappropriate cellular responses triggered by antibodies to inoffensive determinants predominantly of foods in children and drugs in adults. It is characterized by a massive release of mediators upon systemic distribution of allergen¹, and by rapidly occurring clinical signs. Platelet-activating factor (PAF) has been proposed to be responsible for anaphylaxis induction in humans² and animal models³. The effector phase of anaphylaxis relies on the activation of myeloid cells, which express antibody receptors (FcR)⁴⁻⁶. The contribution of platelets that express both FcRs and PAF receptor in humans remains unknown. Here, we investigated whether platelets contribute to drug-induced anaphylaxis in a cohort of patients and in human FcR-expressing mouse models. We found that numbers of circulating platelets dramatically drop during anaphylaxis, specifically when these express the human FcR FcγRIIA/CD32A. Platelet depletion ameliorated anaphylaxis whereas enhanced thrombocythemia drastically worsened anaphylaxis. Platelet activation correlated with anaphylaxis severity, and platelet-myeloid cell aggregates rapidly formed in circulation. Finally, platelet transfer restored anaphylaxis in resistant mice. This study identifies platelets as novel players in the effector phase of human anaphylaxis and may pave the way for the design of platelet-targeting strategies to prevent anaphylactic reactions.

TEXT

Assessing platelet contribution to anaphylaxis requires a cohort of patients with defined clinical parameters, similar timing between anaphylaxis induction and enumerations, and preferentially exposed to allergens of equivalent chemical nature and dose. This is the case in drug-induced anaphylaxis arising in clinical settings. We therefore analyzed circulating platelet numbers in a cohort of 86 patients suffering from perioperative neuromuscular blocking agents (NMBA)-induced anaphylaxis included in the case-control “NASA” study and their matched controls (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01637220>). Platelet counts at 30 minutes post-anaphylaxis induction (*i.e.* NMBA injection) were lower in patients suffering from severe ($16.12 \pm 1.6 \times 10^3$) versus moderate ($18.5 \pm 1.3 \times 10^3$) anaphylaxis, or versus matched control patients undergoing anesthesia but no anaphylaxis ($20.17 \pm 0.84 \times 10^3$). 6-8 weeks post anaphylaxis platelet counts had returned to baseline level in the patients that had suffered an anaphylactic reaction (“follow-up”: $21 \pm 0.92 \times 10^3$) (Fig.1A). We only found one report in the literature in which platelet numbers had been studied during human anaphylaxis, and the two cases of human anaphylaxis examined were also accompanied by >60% reduction in circulating platelet counts⁷. Results from the NASA study [NASA Study group, unpublished] support the contribution of an anti-NMBA IgG antibody-mediated pathway to anaphylaxis, by activating IgG receptor (FcγR)-expressing myeloid cells, and among them particularly neutrophils. This pathway can be replicated in preclinical models by injecting heat-aggregated human IgG (HA-hIgG) into mice expressing human FcγRs⁸⁻¹⁰. Here we used a novel mouse model knocked-in for all human FcγRs (hFcγR^{KI}) (Fig.S1) that demonstrated rapid hypothermia as readout for anaphylaxis, concomitant of profound thrombocytopenia, whereas mice expressing no FcγR (FcγR^{null}) did not show any of these signs (Fig.1B). Similar to humans, hFcγR^{KI} mice express four activating IgG receptors -

hFcγRI, hFcγRIIA, hFcγRIIIA, hFcγRIIIB - and an inhibitory IgG receptor hFcγRIIB. Blocking hFcγRIIA *in vivo*, however, was sufficient to abolish hypothermia and thrombocytopenia in HA-hIgG injected hFcγR^{KI} mice (Fig.1C). Supporting this finding, mice expressing only hFcγRIIA and no mouse FcγR (hFcγRIIA^{tg} FcγR^{null} mice; termed “hFcγRIIA^{tg} mice”) also demonstrated profound thrombocytopenia and hypothermia (Fig.1D). Notably, thrombocytopenia preceded temperature loss and was observed as early as 5 minutes following anaphylaxis induction and persisted for 24h (Fig 1D). The latter transgenic model recapitulates hFcγRIIA density on platelets as reported in humans, whereas hFcγR^{KI} mice demonstrate lower expression (Fig.S2). During anaphylaxis, the few remaining platelets displayed an increase in mean platelet volume and higher DNA/RNA content (revealed by thiazole orange staining¹¹), indicative of freshly exited platelets from the bone marrow and of active thrombopoiesis (Fig.1D and Fig.S3). Therefore, both clinical data and pre-clinical models demonstrate that anaphylaxis induction is accompanied by platelet consumption.

We next determined if thrombocytopenic events during anaphylaxis induction were merely a marker of systemic cell activation or if platelets were critical for anaphylaxis induction. Antibody-mediated platelet depletion, performed 72h before anaphylaxis induction, abolished hypothermia in hFcγRIIA^{tg} mice (Fig.2A) and significantly reduced hypothermia in hFcγR^{KI} mice (Fig.2B). Efficient platelet clearance could be obtained even in control FcγR^{null} mice (resistant to anaphylaxis) demonstrating that this platelet depletion method is FcγR-independent and does not interfere with the ability of HA-hIgG to trigger FcγR-dependent cell activation (Fig.2A,B). As the presence of platelets appears necessary for anaphylaxis induction, we wondered if increased platelet numbers would lead to an increase in anaphylaxis severity. Compared to untreated mice, mice treated with a thrombopoietin receptor agonist demonstrated a 3-fold increase in circulating platelet numbers (thrombocythemia; Fig.2C)¹². Thrombocythemic

hFcγRIIA^{tg} mice succumbed to anaphylaxis, whereas untreated mice all survived anaphylaxis induction (Fig.2D). Furthermore thrombocythemic compared to untreated hFcγRIIA^{tg} mice showed significantly higher susceptibility to anaphylaxis-induced hypothermia in a dose response to HA-hIgG injection (Fig.S4). Importantly, thrombocythemic FcγR^{null} mice remained resistant to anaphylaxis demonstrating that thrombocythemia alone is not sufficient for anaphylaxis induction in this model if platelets do not express IgG receptors.

The low number of circulating platelets monitored during anaphylaxis may be a consequence of platelet adherence to endothelia¹³ and/or to circulating myeloid cells, and among the latter, particularly neutrophils and monocytes that have been implicated in pre-clinical models of anaphylaxis^{3,9,14} and in the NASA study [NASA Study group, unpublished]. Almost 80% of circulating neutrophils and 40% of Ly6C^{hi} monocytes were detected in complex with platelets 30 minutes post-anaphylaxis induction in hFcγRIIA^{tg} mice, but not in FcγR^{null} mice (Fig.3A, top panels). The number of platelets in complex per neutrophil was significantly higher than in complex per Ly6C^{hi} monocyte, suggesting a predominant role of neutrophils in heterologous platelet aggregation in this model (Fig.3A, bottom panels). These platelet/myeloid cell associations were no longer or barely detectable at 5 hours post-anaphylaxis induction in hFcγRIIA^{tg} mice, and not at any time point in FcγR^{null}, supporting the notion that FcγR expression on platelets is required to induce platelet-myeloid cell aggregates during anaphylaxis. Notably, platelets in complexes showed upregulated levels of the activation marker CD62P (Fig.3B). In addition, CD62L expression on circulating neutrophils was significantly reduced following anaphylaxis induction in hFcγRIIA^{tg} mice, but not in FcγR^{null} mice, demonstrating neutrophil activation whether in complex or not with platelets (Fig.3C). Importantly, platelet CD62P expression and the percentage of CD62P-positive platelets at 30 minutes post-anaphylaxis induction in the blood of patients undergoing NMBA-induced anaphylaxis (NASA

study) were significantly higher in patients suffering from severe versus moderate anaphylaxis, or versus control groups (Fig.3D). Therefore both clinical data and pre-clinical data demonstrate platelet activation accompanying anaphylaxis induction.

We next determined if platelet aggregation and activation during anaphylaxis induction was the result of indirect activation or if direct platelet activation was contributing - or may be even responsible for - anaphylaxis induction. *In vitro* aggregation of washed platelets (>95% purity) from hFcγRIIA^{tg} mice could be dose-dependently induced in the presence of HA-hIgG, to the extent reached by classical inducers of platelet aggregation, *i.e.* thrombin or adenosine diphosphate (ADP) (Fig.4A). Purified platelets from FcγR^{null} mice aggregated only in the presence of the latter, but not in the presence of HA-hIgG (Fig.4A). Importantly, blocking hFcγRIIA-specific Fab fragments prevented platelet aggregation by HA-hIgG, and incubation with monomeric human IgG had no effect, demonstrating the requirement for hFcγRIIA triggering by multivalent ligands to mediate platelet aggregation. Similarly, purified platelets from hFcγRIIA^{tg} mice, but not from FcγR^{null} mice, incubated with HA-hIgG demonstrated significant increase in expression of CD62P and activated GPIIbIIIa (Fig.4B). We next determined if the supernatant of *in vitro* stimulated hFcγRIIA^{tg} platelets was sufficient to induce anaphylaxis symptoms (*e.g.* immediate hypothermia) when injected into mice expressing no FcγRs. Platelet-rich plasma from hFcγRIIA^{tg} mice stimulated with HA-hIgG, but neither unstimulated platelet rich plasma from the same mice, nor HA-hIgG alone at the same dose, induced hypothermia in FcγR^{null} mice (Fig.4C). Thus platelet activation may be sufficient to induce anaphylactic symptoms, but a formal demonstration requires an *in vivo* model in which the anaphylactic inducer, *i.e.* HA-hIgG, may trigger only platelets. We devised such a model by transferring washed platelets (>95% purity) from hFcγRIIA^{tg} mice into FcγR^{null} mice prior to injection with HA-hIgG: purified platelets from hFcγRIIA^{tg} mice, but not from FcγR^{null} mice,

transferred into FcγR^{null} mice restored hypothermia in response to HA-hIgG injection (Fig.4D). Therefore, *in vivo* FcγR-mediated platelet activation is sufficient for anaphylaxis induction in this pre-clinical model, in the absence of FcγR-mediated myeloid cells activation.

In conclusion, we have shown using clinical data from a drug-induced anaphylaxis study on >80 patients[NASA Study group, unpublished] that platelet activation correlates with anaphylaxis severity grade, and that there a less circulating platelets during anaphylaxis. We confirmed these clinical observations using two different pre-clinical mouse models sharing the particularity of expressing an activating human IgG receptor (hFcγRIIA/CD32A) on platelets, as it is the case in humans. Severe thrombocytopenia and platelet activation required platelets to express hFcγRIIA, whereas anaphylaxis severity increased drastically with augmented circulating platelet numbers and was significantly reduced in the absence of platelets. The deficiency in circulating platelets during anaphylaxis is likely due to adherence of activated platelet to, at least, neutrophil and monocyte populations, and most likely also to the vascular endothelium¹³. It remains to be determined whether these interactions are the result of expression of adherence molecules on platelets (*e.g.* GPIIb/IIIa) and neutrophils (*e.g.* CD11b/CD18) for example, or of “bridging” of cell populations by the same immune complexes binding IgG receptors expressed on both cell populations in *trans*, or of both mechanisms together. The platelet transfer experiment in which only platelets expressed IgG receptors suggests nevertheless that “bridging” is not required for anaphylaxis induction. This notion is supported by our results that supernatant from activated platelets was sufficient to induce clinical signs of anaphylaxis. Importantly, anaphylaxis-induced thrombocytopenia occurred within minutes and preceded hypothermia in our models, suggesting direct platelet activation *in vivo*, and thrombocytopenia as an early marker of anaphylaxis. Our work may provide a rationale for new studies assessing the role of platelets

in more complex clinical and pre-clinical settings in which both IgE and IgG anti-allergens concur to anaphylaxis induction. This report gives new insights into the mechanisms underlying anaphylaxis as it may occur in humans and determines platelets and their mediators as critical players in this process.

ONLINE METHODS

Clinical study design.

Detailed description of the NASA clinical study design and cohort can be found in [Gouel A, *et al*, submitted]. In brief, the multi-centre NASA (“*Neutrophil Activation in Systemic Anaphylaxis*”) study involved 11 hospital 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 anaphylactic reactions to NMBA in humans through a case/control study design, with a 6-8 weeks follow-up in cases, with clinical signs consistent with intra-anesthetic anaphylaxis to NMBA whatever the grade of the reaction. Patients were retrospectively classified in severity grade according to the Ring and Messmer¹⁵ 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 a local ethic comity (comity 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, and registered within the French Ministry of Research and ARH (“Agences Régionales de l'Hospitalisation”).

As recommended by International/National Guidelines¹⁶⁻¹⁸ 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. It should be noted that platelets analysis was not an original objective of the NASA study and that blood samples were taken using heparin as anti-coagulant. Platelet enumerations were performed and flow cytometric analyses on diluted total human blood using anti-CD61 and anti-CD62P antibodies.

All patients that suffered an AHR were treated following the French and international practice guidelines^{16,17,19,20}.

Mice

hFcγR^{KI} mice were generated by intercrossing of VG1543 mice¹⁰ with VG6074 mice (Fig.S1) designed and generated by Regeneron Pharmaceuticals, Inc. on a mixed 62.5% C57BL/6N, 37.5% 129S6/SvEv genetic background, and backcrossed one generation to C57BL/6N. FcγR^{null} mice were described previously¹⁰. Mice expressing the fcgr2a transgene²¹ were bred to FcγR^{null} mice to generate FcγRIIA^{tg} FcγR^{null} mice (termed hFcγRIIA^{tg} herein). All mice were bred at Institut Pasteur and used for experiments at 7-11 weeks of age. hFcγR^{KI}, FcγR^{null} or hFcγRIIA^{tg} mice demonstrate normal development and breeding patterns. Experiments using mice were validated by the CETEA ethics committee number 89 (Institut Pasteur, Paris, France) under #2013-0103, and by the French Ministry of Research under agreement #00513.02.

Antibodies and reagents

ADP (Adénosine 5'-diphosphate sodium), prostacycline PGI₂, apyrase, PAF, PAF receptor antagonist (ABT-491), ACD (anticoagulant citrate-dextrose), thiazole orange were obtained from Sigma Aldrich, TNP₍₂₁₋₃₁₎-BSA from Santa Cruz, thrombin from Roche, albumine and fibrinogen provided by LFB Biomédicaments (2014-01029) heparin from Tocris. Anti-GPIIbα (polyclonal rat IgG) and isotype control were purchased from Emfret Analytics; anti-FcγRIIA (mouse IgG2b, clone IV.3) and isotype control IgG2b anti-TNP (clone Gork hybridoma from B. Heyman (Uppsala Universitet, Uppsala, Sweden)) were purified as described²². The antibodies used for flow cytometry staining of human CD61 (clone VI-PL2) and CD62P (clone AK-4), mouse CD62P (clone KO2.3), CD41 (clone MWReg30), Ly6G (clone 1A8), Ly6C (clone AL-21),

CD11b (clone M1/70) and CD45 (clone 30-F11), were purchased from BD Pharmingen; CD62L (clone MEL14-H2.100) were purchased from Miltenyi Biotec; α IIB β 3 (JON/A clone) antibody from Emfret Analytics; anti-human CD32A (clone IV.3) from STEMCELL Technologies; and isotype controls mIgG1 (clone : P3.6.2.8.1) from eBioscience and mIgG2b (clone MPC-11) from BioLegend.

Passive Systemic Anaphylaxis

Human Intravenous Immunoglobulin (IVIG; Gamunex®, Grifols) was heat-aggregated by incubation at 25mg/mL in BBS (0.17M H₃BO₃, 0.12M NaCl, pH8) for 1 hour at 63°C, then diluted in 0.9% NaCl for iv injection at 100 μ L per mouse (HA-hIgG). Central temperature was monitored using a digital thermometer (YSI) with rectal probe. Control non-aggregated hIgG (NA-hIgG) was similarly diluted without heating.

Platelet enumeration

5-10 μ L of blood was collected at the tail vein directly in EDTA (20 mM), and platelet numbers assessed using a hematometer (SCIL Vet Abc Plus, Horiba Medical).

In vivo blocking, depletion, romiplostim treatment

For platelet depletion, mice were injected iv with 50 μ g/mouse of anti-GPIb α (anti-CD42) or isotype control (rat IgG) 72h before challenge. Blocking of Fc γ RIIA was achieved by iv injection of 40 μ g/mouse blocking anti-Fc γ RIIA mAb (clone IV.3) or isotype control (mIgG2b) 24h and 12h before challenge. To induce neo-production of platelets, mice received subcutaneous

injections of romiplostim (50 µg/kg of body weight; NPLATE® Amgen) on day 0 and 3 and were used for experiments on day 6, adapted from¹².

Platelet purification, in vitro stimulation and transfer

Preparation of washed mouse platelets. Washed platelets were obtained by sequential centrifugation of blood drawn from the abdominal aorta of 4 anesthetized mice using ACD as anti-coagulant (V/V 1:6) as described²³.

In vitro stimulation. (200 000 platelets/µL) were stimulated with indicated stimulants. Platelet aggregation was monitored using an aggregometer (APACT 4004, ELITechgroup). 270 µL washed platelets (200 000 platelets/µL) were stirred at 1,100 rpm and 37°C in the presence of different agonists (10x concentrated) and human fibrinogen (0.8 mg/mL), in a final volume of 300 µL. The extent of aggregation was quantified by measuring the maximum curve height above baseline level. For flow cytometric analysis platelets were stimulated for 10 minutes at 37°C.

Platelet transfer. 1.7×10^9 washed mouse platelets in 300 µL Tyrodes buffer (or buffer alone) were transfused iv into recipient mice 20 minutes before anaphylaxis induction.

Platelet supernatant transfer. Platelet-rich plasma was incubated with HA-hIgG (2.5 mg/mL) or Tyrodes buffer for 30 minutes, then centrifuged 15 000 g for 10 minutes and supernatant was collected for i.v injection in recipient mice (in a volume of 200 µL/mouse).

Flow cytometric analysis of platelets, leukocytes and their aggregates

Blood cells or stimulated platelets were stained with indicated fluorescently labeled mAbs for 15 minutes at room temperature. Aggregates were defined as follows: platelet-neutrophil aggregates

(CD45⁺/CD11b⁺/Ly6G^{hi}/Ly6C^{int}/CD41⁺), platelet-monocytes (CD45⁺/CD11b⁺/ Ly6G^{lo}/ Ly6C^{lo} or ^{hi} /CD41⁺). Platelet activation on aggregates was assessed by CD62P expression and leukocyte activation by CD62L shedding. For thiazole orange staining, whole blood cells were incubated for 15 min at room temperature with 1 µg/mL thiazole orange as previously described²⁴.

Statistical analysis

Data were analyzed using one-way or two-way ANOVA with Tukey's post-test. A *p*-value less than .05 was considered significant: (**p* < .05; ***p* < .01; ****p* < .001; *****p* < .0001). If not stated otherwise, data are represented as mean +/- SEM.

REFERENCES

1. Strait, R.T., *et al.* Ingested allergens must be absorbed systemically to induce systemic anaphylaxis. *The Journal of allergy and clinical immunology* **127**, 982-989 e981 (2011).
2. Vadas, P., *et al.* Platelet-activating factor, PAF acetylhydrolase, and severe anaphylaxis. *N Engl J Med* **358**, 28-35 (2008).
3. Strait, R.T., Morris, S.C., Yang, M., Qu, X.W. & Finkelman, F.D. Pathways of anaphylaxis in the mouse. *The Journal of allergy and clinical immunology* **109**, 658-668 (2002).
4. Finkelman, F.D., Rothenberg, M.E., Brandt, E.B., Morris, S.C. & Strait, R.T. Molecular mechanisms of anaphylaxis: lessons from studies with murine models. *The Journal of allergy and clinical immunology* **115**, 449-457; quiz 458 (2005).
5. Jonsson, F., Mancardi, D.A., Albanesi, M. & Bruhns, P. Neutrophils in local and systemic antibody-dependent inflammatory and anaphylactic reactions. *J Leukoc Biol* **94**, 643-656 (2013).
6. Gillis, C., Gouel-Cheron, A., Jonsson, F. & Bruhns, P. Contribution of Human FcgammaRs to Disease with Evidence from Human Polymorphisms and Transgenic Animal Studies. *Frontiers in immunology* **5**, 254 (2014).
7. Choi, I.H., *et al.* Occurrence of disseminated intravascular coagulation (DIC) in active systemic anaphylaxis: role of platelet-activating factor. *Clinical and experimental immunology* **100**, 390-394 (1995).
8. Smith, P., DiLillo, D.J., Bournazos, S., Li, F. & Ravetch, J.V. Mouse model recapitulating human Fcgamma receptor structural and functional diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 6181-6186 (2012).
9. Jonsson, F., *et al.* Human FcgammaRIIA induces anaphylactic and allergic reactions. *Blood* **119**, 2533-2544 (2012).
10. Gillis, C.M., *et al.* Mechanisms of anaphylaxis in human low-affinity IgG receptor locus knock-in mice. *The Journal of allergy and clinical immunology* (2016).
11. Angenieux, C., *et al.* Time-Dependent Decay of mRNA and Ribosomal RNA during Platelet Aging and Its Correlation with Translation Activity. *PloS one* **11**, e0148064 (2016).
12. Leon, C., *et al.* Romiplostim administration shows reduced megakaryocyte response-capacity and increased myelofibrosis in a mouse model of MYH9-RD. *Blood* **119**, 3333-3341 (2012).
13. Chen, J. & Lopez, J.A. Interactions of platelets with subendothelium and endothelium. *Microcirculation* **12**, 235-246 (2005).
14. Jönsson, F., *et al.* Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis. *The Journal of clinical investigation* **121**, 1484-1496 (2011).
15. Ring, J. & Messmer, K. Incidence and severity of anaphylactoid reactions to colloid volume substitutes. *Lancet* **1**, 466-469 (1977).
16. Mertes, P.M., *et al.* Reducing the risk of anaphylaxis during anesthesia: 2011 updated guidelines for clinical practice. *J Investig Allergol Clin Immunol* **21**, 442-453 (2011).
17. Gouel-Chéron, A., Harpan, A., Mertes, P.-M. & Longrois, D. Management of anaphylactic shock in the operating room. *Presse Med* **45**, 774-783 (2016).
18. Simons, F.E.R., *et al.* World Allergy Organization Anaphylaxis Guidelines: 2013 Update of the Evidence Base. *Int Arch Allergy Immunol* **162**, 193-204 (2013).
19. Simons, F.E.R., *et al.* 2015 update of the evidence base: World Allergy Organization anaphylaxis guidelines. *World Allergy Organ J* **8**, 32 (2015).
20. Longrois, D., Lejus, C., Constant, I., Bruyère, M. & Mertes, P.M. Traitement des réactions anaphylactiques survenant en cours d'anesthésie et en particulier du choc anaphylactique. *Ann Fr Anesth Reanim* **30**, 312-322 (2011).
21. McKenzie, S.E., *et al.* The role of the human Fc receptor Fc gamma RIIA in the immune clearance of platelets: a transgenic mouse model. *J Immunol* **162**, 4311-4318 (1999).
22. Jonsson, F., Mancardi, D.A., Albanesi, M. & Bruhns, P. Neutrophils in local and systemic antibody-dependent inflammatory and anaphylactic reactions. *Journal of leukocyte biology* (2013).

23. Cazenave, J.P., *et al.* Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood. *Methods Mol Biol* **272**, 13-28 (2004).
24. Matic, G.B., Chapman, E.S., Zaiss, M., Rothe, G. & Schmitz, G. Whole blood analysis of reticulated platelets: improvements of detection and assay stability. *Cytometry* **34**, 229-234 (1998).

ACKNOWLEDGMENTS

We are thankful to our colleagues F. Abdallah, B. Iannascoli and O. Richard-Le Goff at Institut Pasteur, Paris for technical help. We are thankful to our colleagues for their generous gifts: M.P. Reilly and S. McKenzie (Jefferson Medical College, Philadelphia, PA) for FCGR2A-transgenic mice and LFB Biomédicaments for human albumin and fibrinogen. This work was supported by the European Research Council (ERC)–Seventh Frame-work Program (ERC-2013-CoG 616050), the Institut Pasteur, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Société Française d’Allergologie (SFA; *Soutien de la Recherche en Allergologie*). H.B. is supported by a fellowship from the *University Pierre et Marie Curie*. C.G. was supported partly by a stipend from the Pasteur - Paris University (PPU) International PhD program and by the Institut Carnot Pasteur Maladies Infectieuses, and partly by the Balsan company. F.J. is an employee of the Centre National de La Recherche Scientifique (CNRS).

AUTHORSHIP AND CONFLICT OF INTEREST STATEMENTS

H.B., F.J., B.H., C.G., O.G. performed and analyzed experiments; A.M. and L.E.M. designed mouse targeting and generated mouse strains; F.J. supervised and designed the research with help from P.B.; P.B. and F.J. provided funding; all authors were given the opportunity to discuss results and manuscript content.

LM and AM are employees of Regeneron Pharmaceuticals, Inc. and hold stocks in the company. All other authors declare no competing financial interests.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Thrombocytopenia during anaphylaxis. (A) Platelet counts in diluted blood of patients from the NASA study; presenting no (n=72), mild (n=35) or severe (n=30) anesthesia-induced anaphylaxis or during follow-up visit (n=67). The boxes extend from the 25th to 75th percentiles; the whiskers indicate 5-95% range. Statistical differences between platelet counts in the same patients during anaphylaxis and after 6-8 weeks were assessed using a two-tailed paired t-test. (B-D) Change in body temperature (left) and platelet count (right) during HA-hIgG-anaphylaxis in (B) hFcγR^{KI} mice (open triangles, n=4) and FcγR^{null} mice (open squares, n=4), (C) hFcγR^{KI} mice pretreated with anti-FcγRIIA (IV.3) (red triangles, n=4) or isotype control (black triangles, n=4), and untreated FcγR^{null} mice (open squares, n=4). (B-D) Temperature data are represented as mean ± SEM, platelet counts represent individual mice with mean values indicated as lines. Data are representative of at least 1 independent experiment (B: n=1; C: n=2; D: n=2). Significant differences between experimental groups are indicated.

Figure 2. Anaphylaxis severity relies on platelet numbers. (A,B) HA-hIgG-anaphylaxis induced changes in body temperature (top) and platelet counts (bottom) in (A) FcγRIIA^{tg} (circles) and FcγR^{null} mice (squares) pretreated with platelet depleting anti-GPIbα (red symbols) or isotype control (black symbols), n=4 and (B) hFcγR^{KI} (triangles) and FcγR^{null} (squares) mice pretreated with platelet depleting anti-GPIbα (red symbols) or isotype control (black symbols), n=4. (C) Platelet counts in FcγRIIA^{tg} (circles) and FcγR^{null} (squares) mice, pretreated (green symbols) or not (black symbols) with romiplostim, n=3. (D) Change in body temperature and survival (inlet)

during HA-hIgG-anaphylaxis in FcγRIIA^{tg} (circles) and FcγR^{null} (squares) mice pretreated (green symbols) or not (black symbols) with romiplostim, n=3. (A-D) Temperature data are represented as mean ± SEM, platelet counts represent individual mice with mean values indicated as lines. Data are representative of at least 1 independent experiment (A: n=2; B: n=1; C: n=2; D: n=2). Significant differences between experimental groups are indicated

Figure 3. Platelets form aggregates with neutrophils during anaphylaxis. (A-B) FcγRIIA^{tg} (open circles, n=3) and FcγR^{null} mice (open squares, n=3) were challenged with HA-hIgG. (A) Frequency of neutrophils (left) and Ly6C^{hi} monocytes (right) in aggregates with platelets within the neutrophil and Ly6C^{hi}-monocyte population, respectively (top). Bottom panels illustrate CD41 expression associated with neutrophil and Ly6C^{hi}-monocytes populations (B) Platelet CD62P expression within aggregates. (C) CD62L expression on total neutrophils, platelet-neutrophil aggregates (Neutro-CD41+) and single non-aggregated neutrophils (Neutro-non CD41+) in untreated FcγRIIA^{tg} (full circles, n=3), FcγRIIA^{tg} (open circles, n=3) and FcγR^{null} mice (open squares, n=3) 30 minutes after HA-hIgG-anaphylaxis (A-C). Data are representative of two independent experiments. Significant differences between experimental groups are indicated. (D) CD62P expression (geometric mean CD62P – isotype staining) on platelets (left and % CD62P-expressing platelets from the NASA study patients; presenting no (n=78), mild (n=37) or severe (n=34) anaesthesia-induced anaphylaxis or during follow-up visit (n=63). The boxes indicate 25 to 75 percentiles, the whiskers the 5-95% range. Statistical differences between patient groups were assessed using Kruskal-Wallis test with Dunn correction for multiple testing (★), differences in patients during anaphylaxis and follow-up were assessed using Wilcoxon test (#).

Figure 4. Transfer of platelets or supernatant from activated platelets restores anaphylaxis.

(A) Maximal aggregation (%) of stimulated platelets compared to baseline and (B) expression of platelet activation markers CD62P (left) and activated GPIIb/IIIa (right) following in vitro incubation of washed mouse platelets from FcγRIIA^{tg} mice (left) and FcγR^{null} mice (right) with indicated stimuli. (C) Change in body temperature in FcγR^{null} mice following iv transfer of supernatant from FcγRIIA^{tg} platelet-rich plasma (PRP) stimulated (red squares, n=6) or not (orange squares, n=6) with HA-hIgG in Tyrodes buffer or HA-hIgG in Tyrodes buffer (black squares, n=6). Data are pooled from two independent experiments. (D) Change in body temperature in FcγR^{null} mice following iv transfer of washed platelets (wPLA, n=3) from FcγRIIA^{tg} mice (red squares, left panel) or from FcγR^{null} mice (grey squares, right panel). Injection of Tyrodes albumine buffer (TyAlb) alone (black squares, n=3) or transfer of TyAlb in FcγRIIA^{tg} mice (black circles, n=5) followed by challenge with HA-hIgG served as controls. (A,B,D) Data are representative of at least 1 independent experiment (A&B: n=3, D: left n=2, right n=1). Significant differences between experimental groups are indicated.

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Figure supplementary 1. hFcγR^{KI} mice generated by intercrossing of VG1543 mice with VG6074 mice. ...

Figure supplementary 2. Expression of hFcγRIIA in mice and human. FcγRIIA expression (red) compared to isotype control (blue) in myeloid and lymphoid compartments in **(A)** human and **(B)** hFcγR^{KI} mice (Audrey mice). **(C)** Relative expression of hFcγRIIA on platelets from FcγR^{null} (grey), hFcγR^{KI} (orange) and FcγRIIA^{tg} mice (red).

Figure supplementary 3. Changes in platelet phenotype during HA-hIgG anaphylaxis. **(A)** Changes in mean platelet volume (MPV) in FcγRIIA^{tg} (open circles, n=3) and FcγR^{null} mice (open squares, n=3) during HA-hIgG-anaphylaxis. **(B)** FcγRIIA^{tg} (n=3), and FcγR^{null} (n=3) mice were challenged with HA-hIgG or not (untreated FcγRIIA^{tg} (n=3)). **(A)** Frequency of thiazole (TO)^{dim} (yellow) and TO^{bright} (orange) platelets among all CD41⁺ cells 30 min (left) and 5 hours (right) after HA-hIgG-anaphylaxis. Data are representative of at least 1 independent experiment (A: n=2, B: n=1). Significant differences between experimental groups are indicated

Figure supplementary 4. Dose-response to HA-hIgG injection in FcγRIIA^{tg} mice pretreated with or not romiplostim. ...

Figure 1: Thrombocytopenia during anaphylaxis

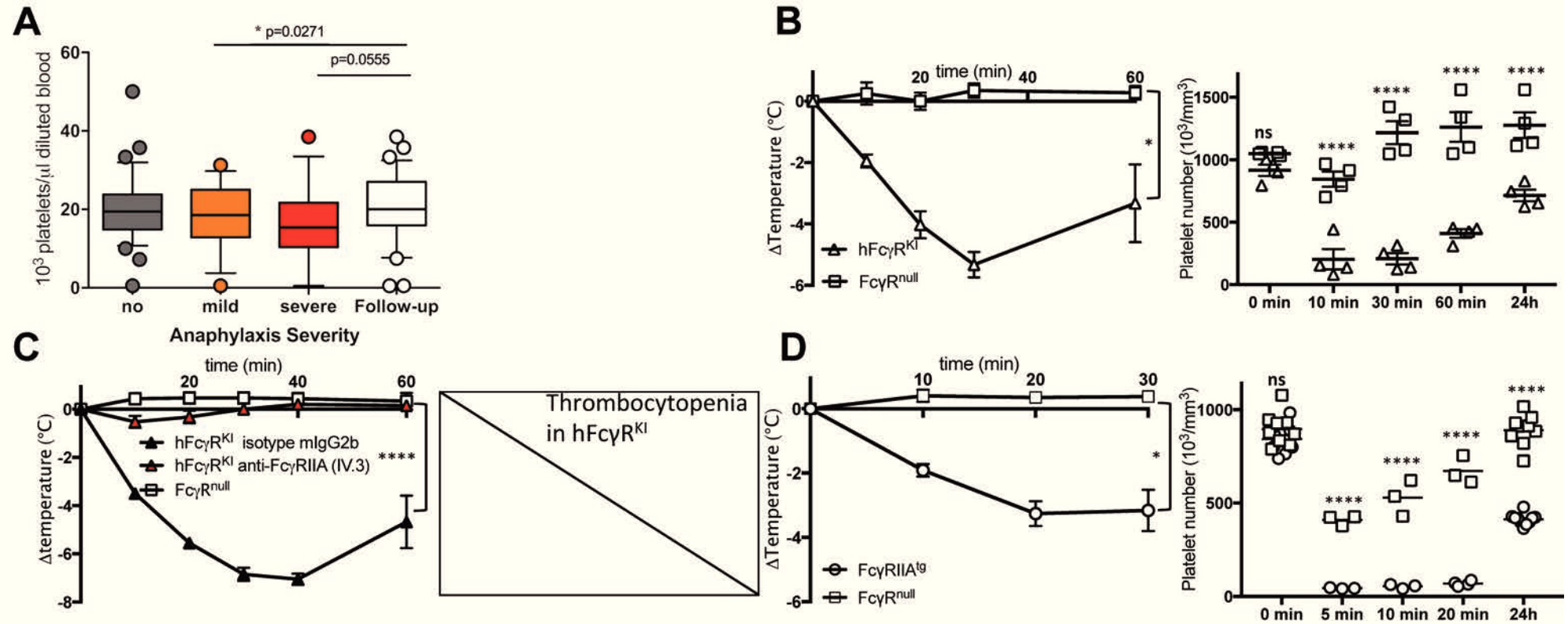


Figure 2: Anaphylaxis severity relies on platelet numbers

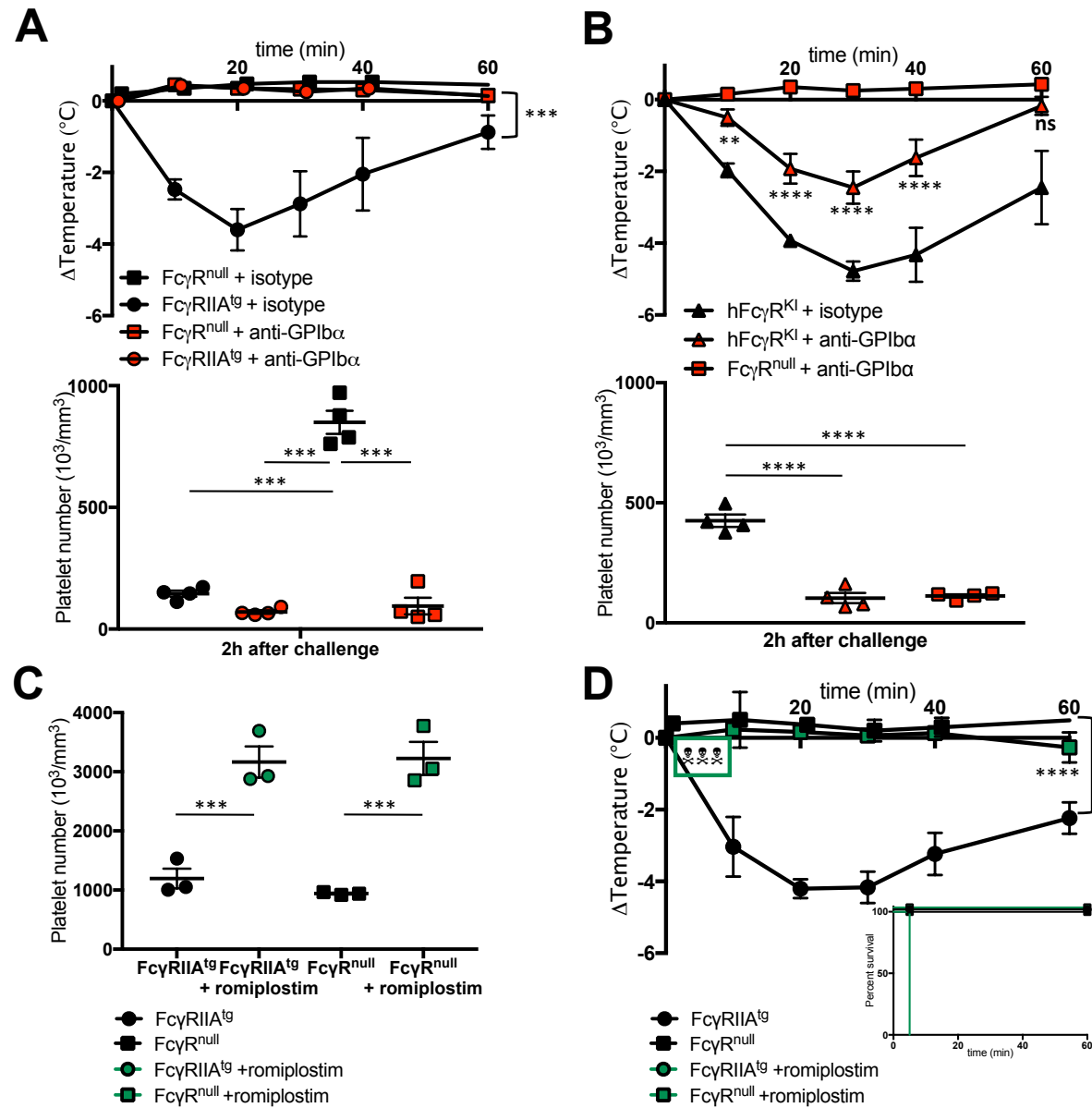


Figure 3: Platelets form aggregates with neutrophils during anaphylaxis

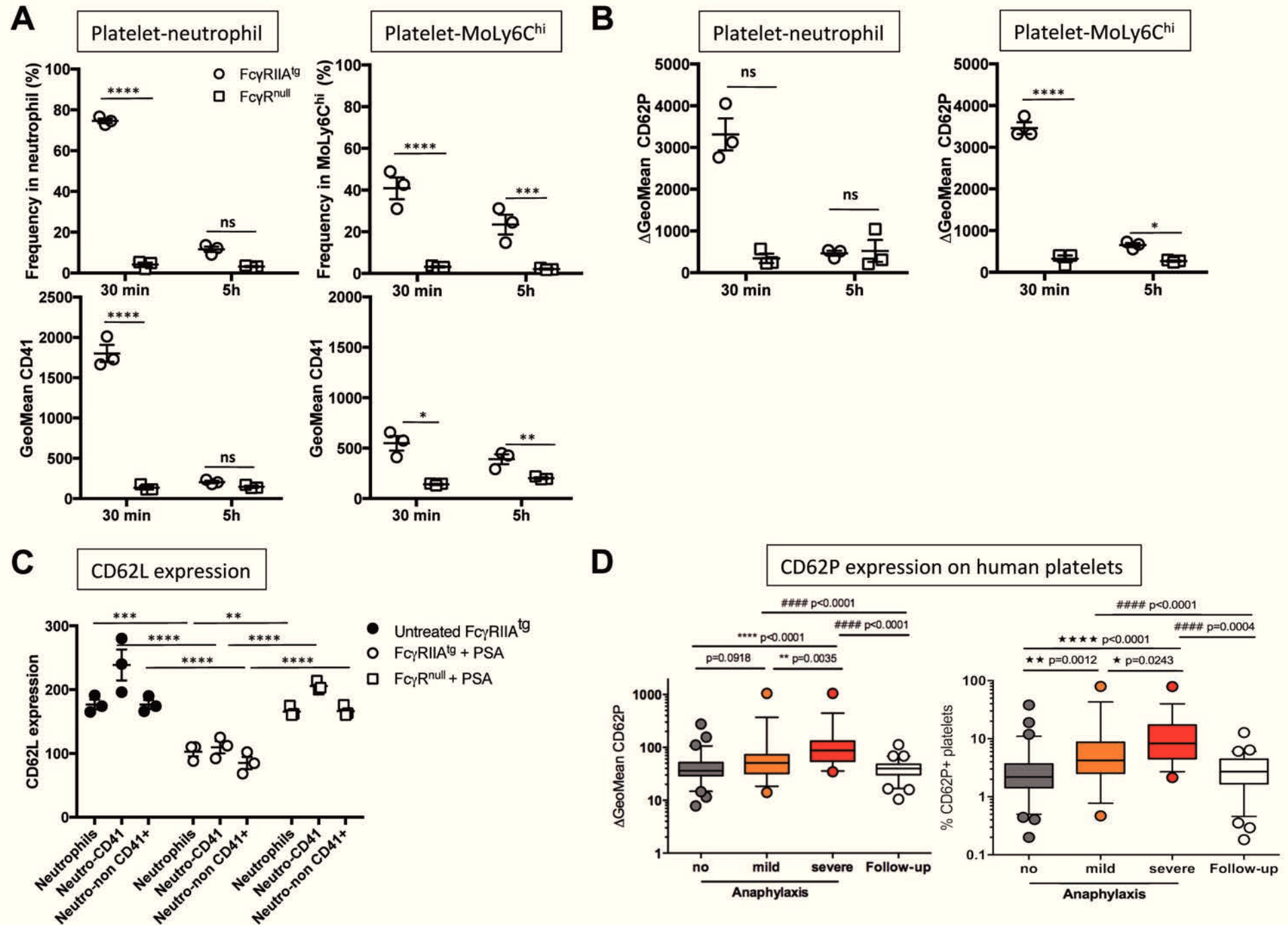
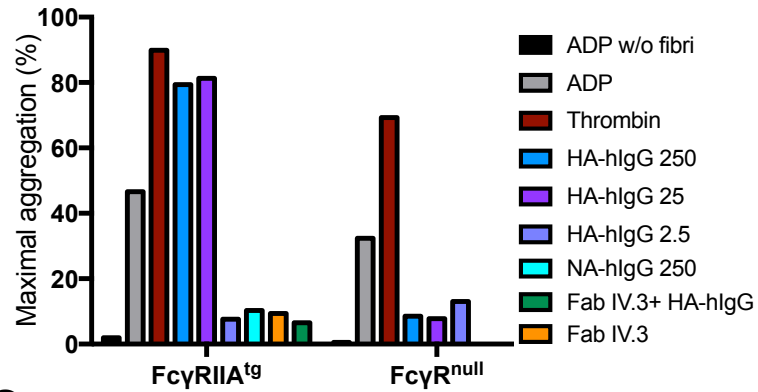
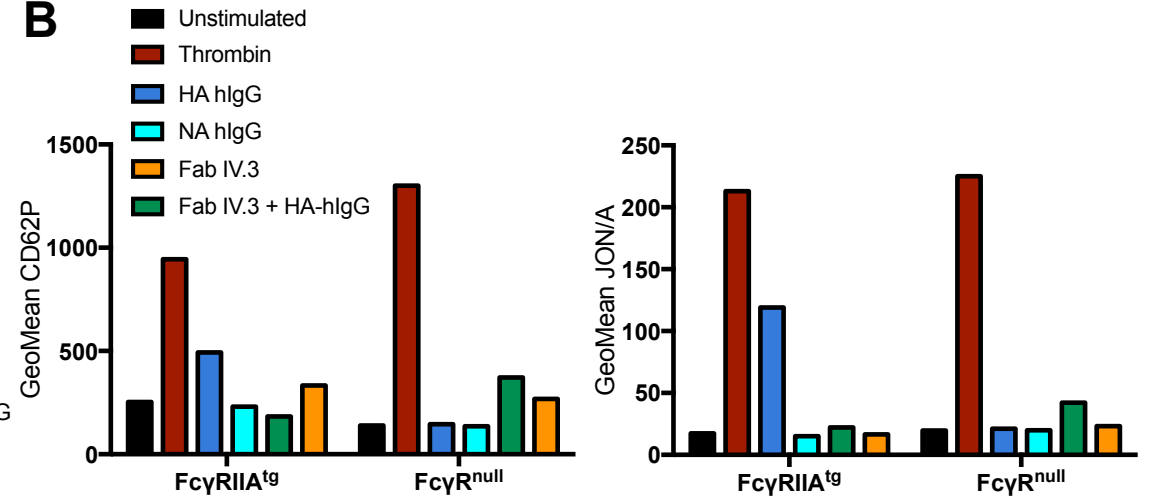


Figure 4: Transfer of platelets or supernatant from activated platelets restores anaphylaxis

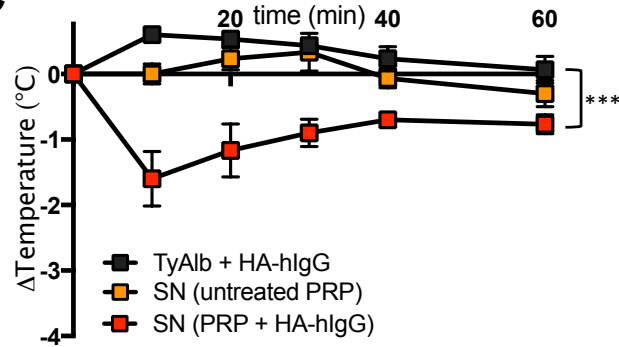
A



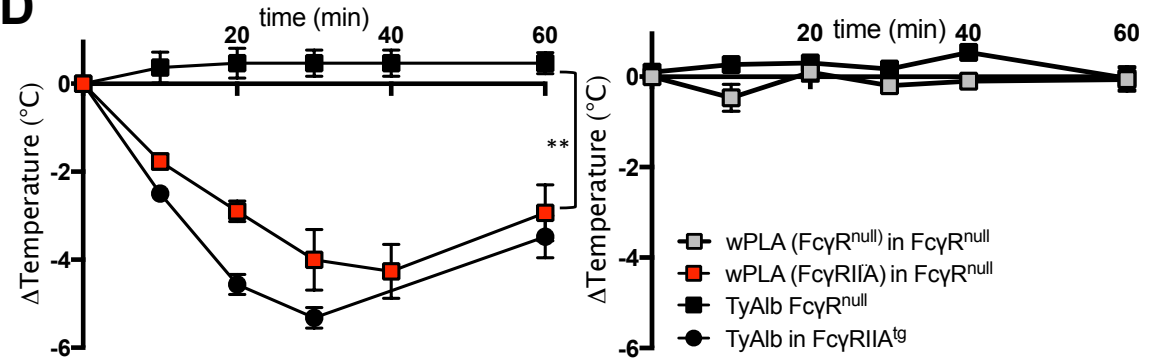
B



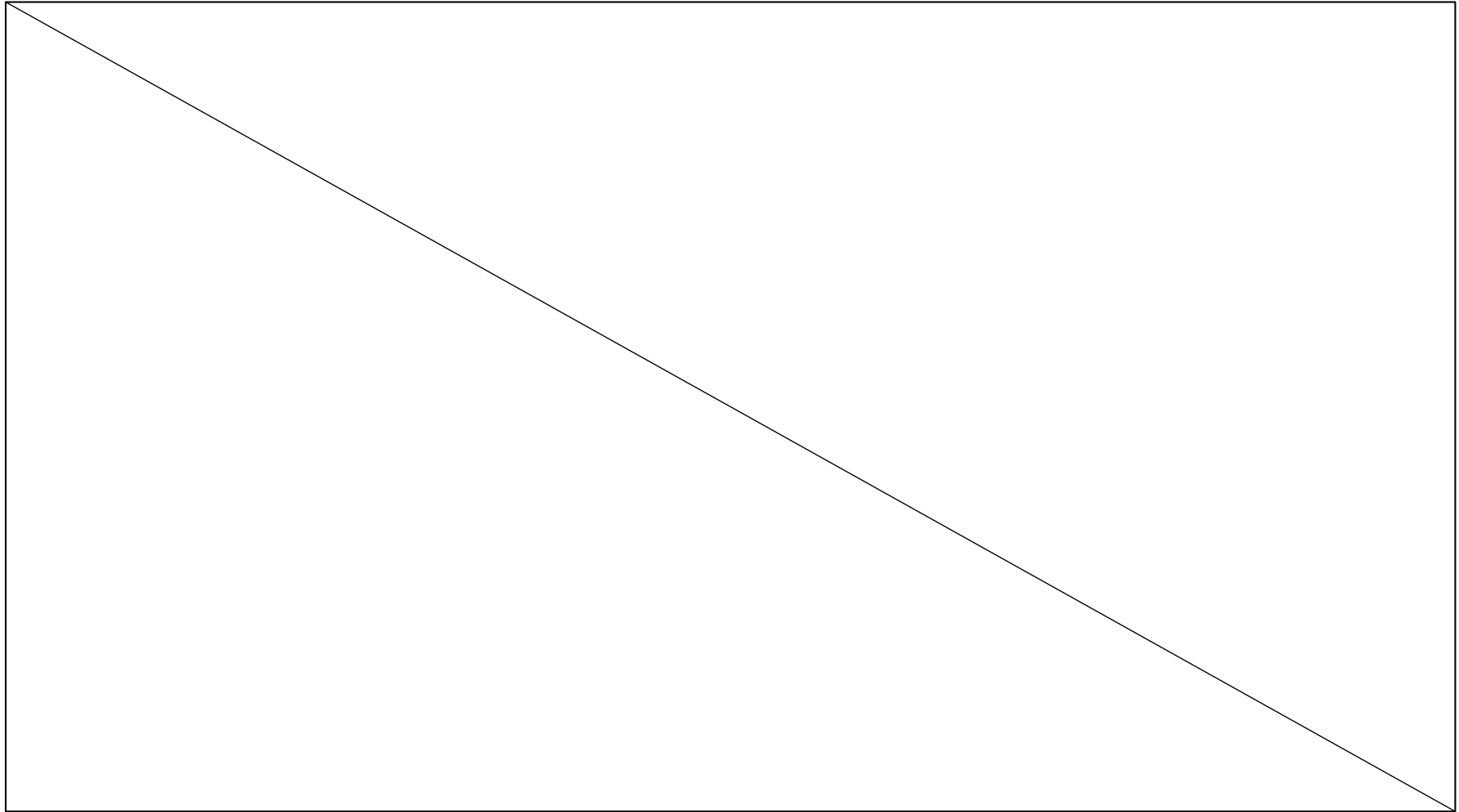
C



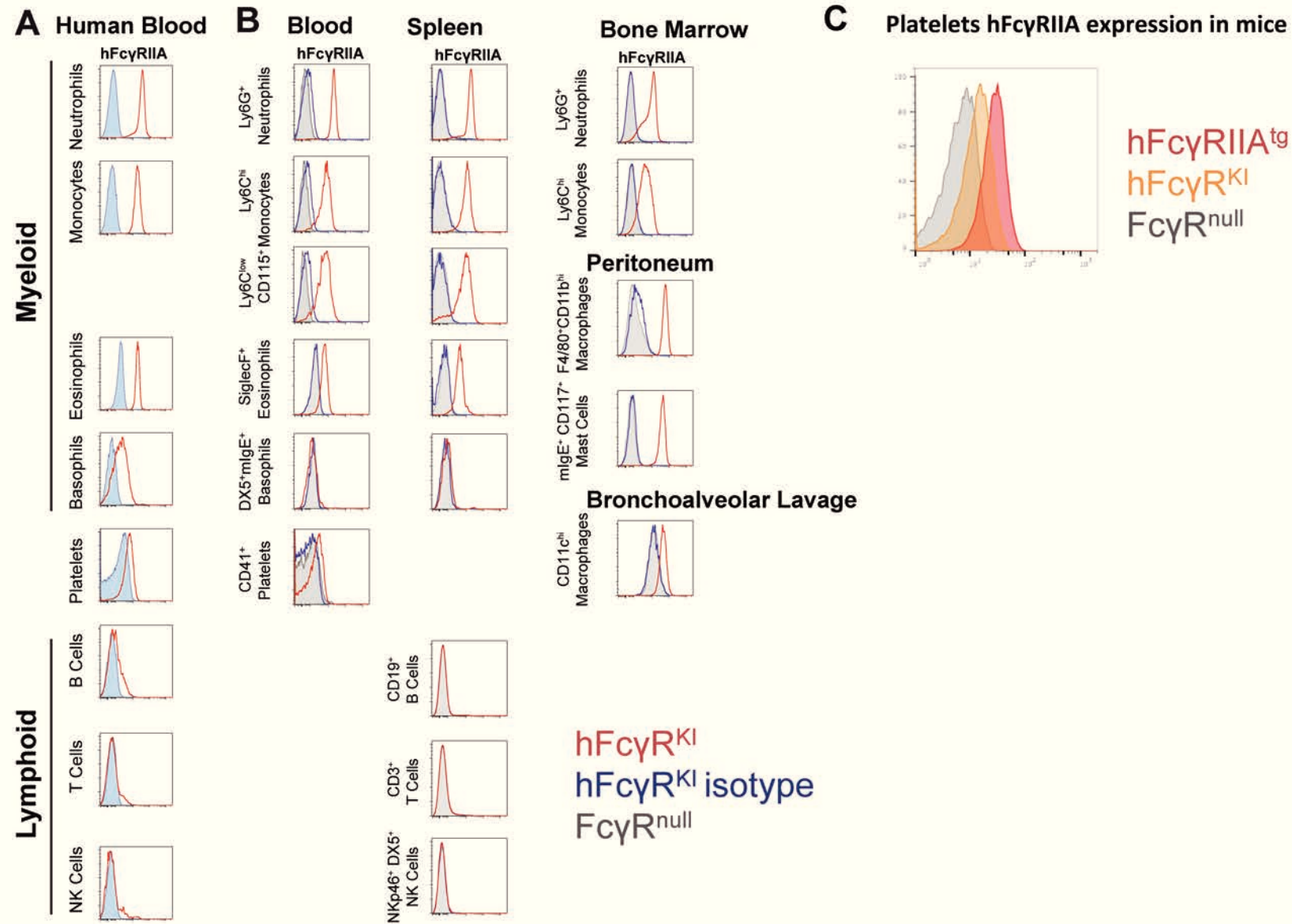
D



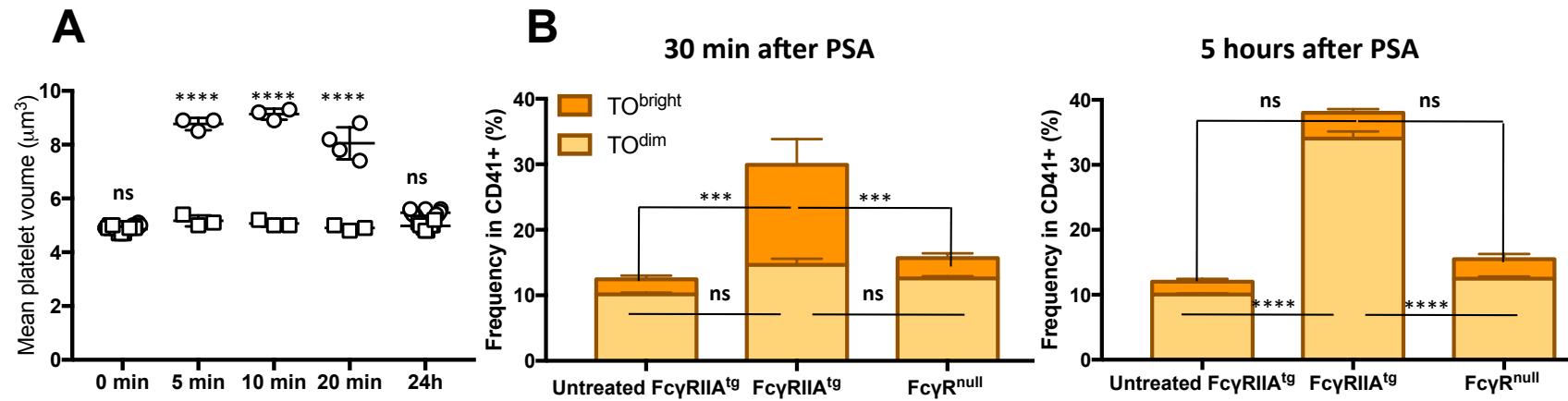
Supplementary fig. 1 : hFcγRKI mice generated by intercrossing of VG1543 mice with VG6074 mice



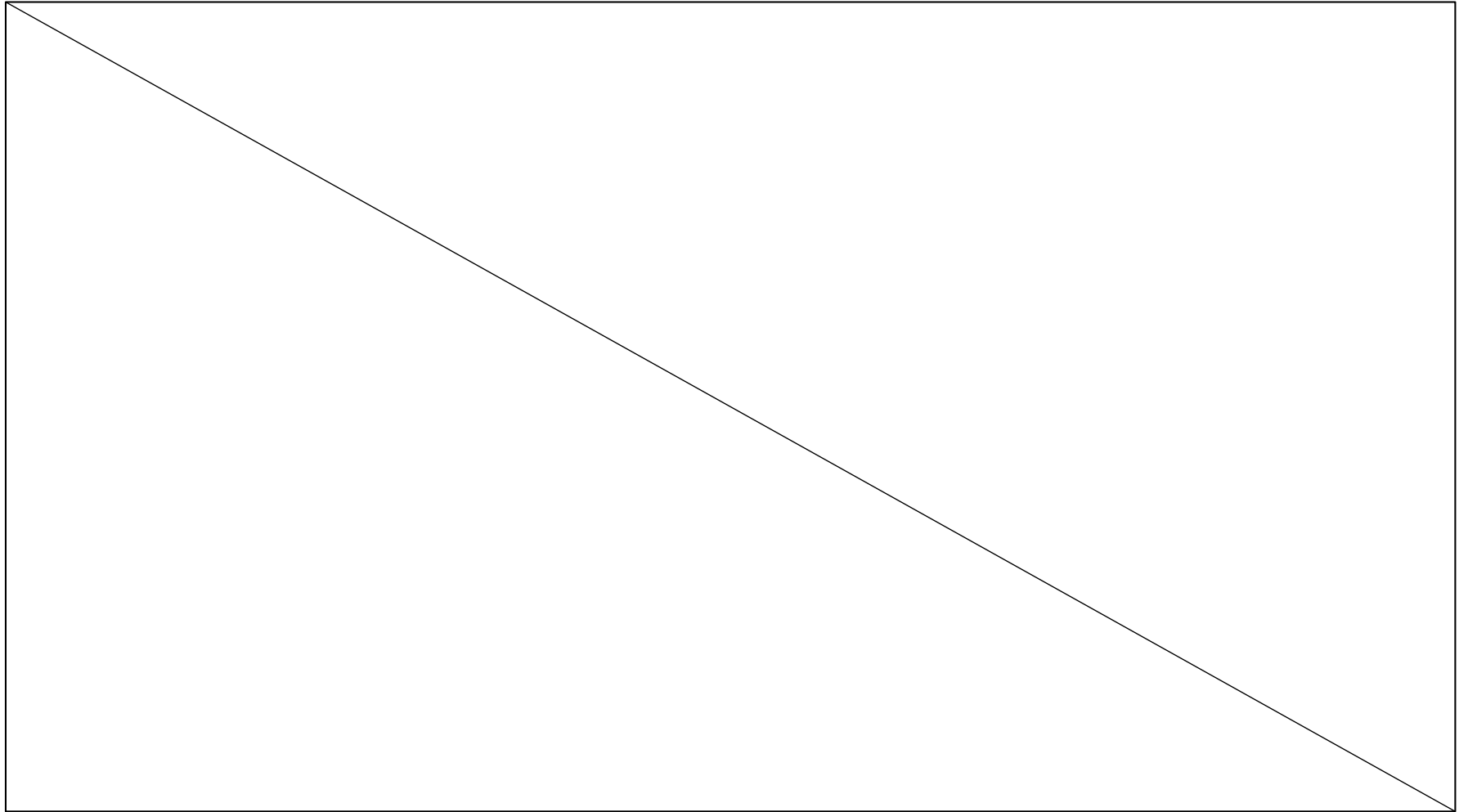
Supplementary fig. 2 : Expression of hFcγRIIA in mice and human



Supplementary fig. 3 : Changes in platelet phenotype during HA-hIgG anaphylaxis



Supplementary fig. 4 : Dose-response to HA-hlgG injection in FcγRIIA^{tg} mice pretreated with or not romiplostim



Discussion générale

Mon projet de thèse a permis de mettre en évidence les rôles prédominants du Fc γ RIII murin et du Fc γ RIIA humain à induire un choc allergique dépendant des IgG. Chez la souris, les neutrophiles et les monocytes jouent un rôle majeur alors que les basophiles contribuent selon la sous-classe d'IgG impliquée. Par ailleurs, la contribution de ces cellules implique une libération de PAF et d'histamine conduisant aux manifestations cliniques du choc allergique. Chez les souris Fc γ RIIA^{tg}, les plaquettes et les neutrophiles sont deux populations clés activées et qui s'associent sous forme de complexes dans la circulation et/ou de thrombi dans les petits capillaires des poumons (observations non publiées) lors du choc allergique.

I. Le rôle prédominant du Fc γ RIII chez la souris est-il transposable au Fc γ RIIA chez l'homme ?

Au cours de mon projet de thèse, j'ai montré chez la souris que le Fc γ RIII est nécessaire au développement du choc allergique et ce, quel que soit la sous-classe d'IgG de souris ; et dans un modèle dépendant de l'ensemble des sous-classes d'IgG humaines que le Fc γ RIIA humain est suffisant pour induire le choc allergique. Ces résultats font ressortir deux Fc γ Rs activateurs de faible affinité prédominants dans le mécanisme du choc allergique, et soulèvent plusieurs interrogations. Le Fc γ RIII et le Fc γ RIIA activateurs conservent-ils respectivement, leur rôle majeur si l'on considère un mélange des trois sous-classes d'IgG chez la souris, ou si l'on considère une sous-classe d'IgG particulière chez l'homme ? Ces deux Fc γ Rs agissent-ils seuls ou de concert avec d'autres Fc γ Rs activateurs ? Pourquoi existe-t-il des Fc γ Rs de forte et de faible affinité ? Ces deux Fc γ Rs ont-ils déjà été mis en évidence de manière prédominante dans d'autres pathologies dépendantes des IgG ?

A. Modèle simplifié : une sous-classe d'IgG engage un seul Fc γ R

Dans un premier temps, nous allons nous intéresser aux IgG1 murines et humaines, puis dans un deuxième temps aux IgG2 murines et humaines en interaction avec un

seul Fc γ R. Chez la souris sauvage, aucun rôle n'a été trouvé pour les IgG3 qui ne lient que le Fc γ RI (34,142) ; et les IgG3 et IgG4 humaines en interaction avec les Fc γ Rs humains n'ont pas encore été étudiées chacune séparément dans le choc anaphylactique.

1. L'axe IgG1-Fc γ R

Chez la souris et chez l'homme, l'IgG1 est la sous-classe d'IgG qui prédomine en concentration dans la circulation. Suite à une immunisation par un antigène de nature protéique, l'IgG1 demeure la sous-classe majoritairement présente en circulation (27). Mon équipe a d'ailleurs montré qu'une immunisation de souris par de l'albumine de sérum bovin (BSA) (en présence d'un adjuvant) induit une production prédominante d'IgG1 spécifiques (141). Chez l'homme, les allergènes sont aussi de bons inducteurs d'IgG1 (27) ; nous pouvons alors supposer que l'IgG1 est la sous-classe qui contribue majoritairement à l'induction du choc allergique suite à une phase de sensibilisation. Dans un premier temps, afin de simplifier le système, nous allons donc faire l'hypothèse d'un choc allergique exclusivement dépendant des IgG1.

Chez la souris, le Fc γ RIII est le seul Fc γ R activateur capable de lier les IgG1 de souris uniquement sous forme de complexes immuns (22). Par ailleurs, le Fc γ RIII est exprimé à la surface de toutes cellules myéloïdes et représente le Fc γ R le plus répandu chez la souris (22). Ces caractéristiques impliquent que, si l'ensemble de ces cellules sont activées par des complexes immuns d'IgG1 et libère dans la circulation leurs médiateurs, alors le Fc γ RIII serait à lui seul capable de déclencher un choc allergique. Le caractère suffisant du Fc γ RIII n'a pour l'instant pas été démontré ; en revanche, je montre qu'en son absence, la PSA induite par des IgG1 est abolie (139). Le Fc γ RIII est donc indispensable et apparaît comme la voie d'activation principale de la réaction anaphylactique induite par des IgG1 de souris. Auparavant, le rôle majeur du Fc γ RIII avait été affirmé à l'aide de souris déficientes pour la chaîne γ dans un autre modèle passif dépendant des IgG1 de souris (17). Cependant, cette affirmation était prématurée puisque la chaîne γ est nécessaire à l'expression du Fc γ RIII mais aussi des autres Fc γ Rs (discuté dans le chapitre IV). Mon

étude en PSA induite par des IgG1 a donc permis de confirmer leur conclusion dans un modèle plus spécifique du Fc γ RIII. Par ailleurs, le Fc γ RIII a déjà été décrit *in vitro* comme étant nécessaire aux macrophages pour la phagocytose de particules recouvertes avec des IgG1 de souris (143) ; et *in vivo* dans un modèle d'anémie hémolytique auto-immune (pathologie dans laquelle des auto-anticorps détruisent les hématies conduisant à une anémie) induit par des IgG1 de souris (144). L'ensemble de ces données laisse supposer que l'axe IgG1-Fc γ RIII chez la souris est un axe majeur dans les pathologies dépendantes des IgG.

Le Fc γ RIIA humain est un orthologue du Fc γ RIII murin (résultats non publiés, Drs Julien Lejeune et Hervé Watier, Université de Tours). Le Fc γ RIIA est un récepteur de faible affinité pour les IgG capable de lier les quatre sous-classes d'IgG humaines (22) et il est exprimé à la surface de l'ensemble des cellules myéloïdes et des plaquettes (22). Par conséquent, il est probable que ce récepteur ait au moins la même importance dans le choc allergique chez l'homme que celle démontrée pour le Fc γ RIII chez la souris. Dans un modèle dépendant des IgG1 de souris (le Fc γ RIIA étant capable de lier les IgG1/2a/2b de souris (21)), mon équipe a démontré que le Fc γ RIIA est suffisant à induire un choc anaphylactique ou une anaphylaxie passive cutanée (140). Ce résultat est confirmé dans un modèle de PSA induit par des IgG1 humaines (Figure 6).

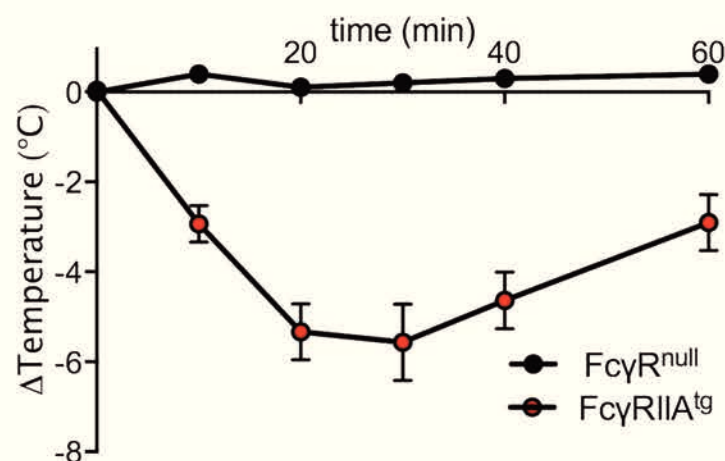


Figure 6 : PSA induite par des IgG1 humaines dans des souris Fc γ RIIA^{tg} et Fc γ R^{null}
Evolution de la température au cours d'une PSA induite par des IgG1 humaines. Des souris Fc γ RIIA^{tg} (n=3) et une souris Fc γ R^{null} sont injectées avec une IgG1 humaine anti-TNP. Seize heures plus tard, le choc est déclenché par l'injection de TNP-BSA. Expérience préliminaire.

Ce modèle simplifié dans lequel des IgG1 de souris ou humaines engagent un seul Fc γ R montre que le Fc γ RIIA humain, comme son orthologue murin, est un acteur clé de la réaction et pourrait donc jouer un rôle majeur dans le choc anaphylactique chez l'homme.

2. L'axe IgG2- Fc γ R

Les IgG2 chez la souris et chez l'homme sont de structure différente et elles ne sont à priori pas les homologues les unes des autres, même si leur dénomination est identique. Dans cette partie néanmoins nous proposons de les comparer afin d'extraire des concepts sur leur contribution respective aux chocs allergiques dans les deux espèces. Chez la souris, les IgG2a et les IgG2b ont été décrites comme pouvant être à l'origine d'un choc allergique (34,141,145). Chez l'homme, une production prédominante d'IgG2 (au sein des IgG spécifiques de l'allergène) est observée suite à la reconnaissance d'un antigène d'origine bactérienne composé notamment de polysaccharides (146–148). Cette réponse pourrait être également observée lors d'un choc allergique induit par un allergène de même nature. Par exemple, le galactose-alpha-1,3-galactose, résidu polysaccharidique exprimé par les cellules musculaires bovines et aussi dans la partie Fab de la chaîne lourde du cetuximab (anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur EGFR ou *epidermal growth factor receptor* et utilisé dans le traitement du cancer colorectal (149)) est soupçonné d'être à l'origine de certains cas de chocs anaphylactiques (150,151). Des IgE spécifiques du galactose-alpha-1,3-galactose étant retrouvées chez ces patients, nous pouvons avancer l'hypothèse que des IgG2 spécifiques auraient également été retrouvées si un dosage IgG avait été effectué.

Chez la souris, les IgG2a et les IgG2b sont capables de lier l'ensemble des Fc γ Rs activateurs (22) et pourraient donc déclencher un choc allergique après agrégation de chacun de ces Fc γ Rs activateurs. Comme montré dans la PSA induite par des IgG1, le Fc γ RIII est nécessaire à la PSA induite par des IgG2a ou par des IgG2b (139). Ceci confirme le rôle central du Fc γ RIII quel que soit la sous-classe d'IgG impliquée. Le Fc γ RIV étant un récepteur de forte affinité pour les IgG2a et les IgG2b (22), il

pourrait donc aussi contribuer dans le choc allergique. En effet, dans mon étude comparative, je montre une contribution du Fc γ RIV et d'autant plus à forte dose d'IgG2a ou d'IgG2b (139). Cette contribution dépendante de la dose d'IgG2 de souris peut être expliquée de la façon suivante. Le Fc γ RIV est un récepteur de forte affinité pour les IgG2a et les IgG2b (22), ce qui suggère une occupation permanente de ce récepteur par des IgG2 monomériques endogènes. A la différence du Fc γ RIII, récepteur de faible affinité et donc « libre d'accès » à l'état physiologique, le Fc γ RIV est inaccessible aux IgG2 circulantes spécifiques d'un allergène (sous forme monomériques ou de complexes immuns). Lors d'un choc allergique chez la souris, les complexes immuns d'IgG2 circulants se lient d'abord au Fc γ RIII qui est « disponible ». Cependant, en présence d'une forte concentration de complexes immuns circulants, la majorité des Fc γ RIII exprimés est probablement impliqué dans des interactions avec des complexes immuns, et une fraction internalisée du fait de l'agrégation de ces récepteurs en surface (139). Les complexes immuns d'IgG2 circulants en excès, ne pouvant plus interagir directement avec le Fc γ RIII, déplacent l'équilibre entre la liaison des monomères d'IgG2 et la liaison à ces complexes au Fc γ RIV, favorisant l'agrégation du Fc γ RIV et ainsi l'activation cellulaire. Ce mécanisme recrutant un ou plusieurs Fc γ Rs selon la quantité d'IgG circulants a notamment été décrit dans un modèle d'anémie hémolytique auto-immune (152). En effet, cette étude montre qu'une faible dose d'IgG2a à l'origine d'une anémie modérée dépend uniquement du Fc γ RIII alors qu'une plus forte dose, à l'origine d'une anémie sévère, requiert la contribution additionnelle du Fc γ RIV et du Fc γ RI.

Le recrutement d'un ou plusieurs Fc γ Rs permettrait donc au système d'adapter sa réponse (modérée à sévère) selon les conditions (par exemple, forte concentration de complexes immuns circulants).

Le Fc γ RI murin est aussi un Fc γ R activateur capable de lier les IgG2a et les IgG2b (22). Son expression cellulaire restreinte aux monocytes Ly6C^{hi/lo} (Gillis *et al.*, 2016 manuscrit accepté dans *Journal of Autoimmunity*), du moins en circulation, limite probablement la contribution du Fc γ RI dans le choc allergique. D'ailleurs dans mon étude, ni les IgG2a ni les IgG2b ne semble révéler une contribution du Fc γ RI en PSA (139). De même, le Fc γ RI n'est pas suffisant à induire un choc allergique dépendant des IgG2a chez des souris n'exprimant que ce récepteur (Gillis *et al.*, 2016 *J*

Autoimmunity). Une autre équipe trouve cependant une contribution du Fc γ RI en utilisant des souris Fc γ RI^{-/-} (qui expriment encore les Fc γ RIIB, Fc γ RIII et Fc γ RIV) dans un modèle de PSA dépendant des IgG2a similaire au mien après suivi de la pression artérielle sur des souris anesthésiées au cours du choc (153). Bien que le suivi de la pression artérielle sur souris anesthésiées lors d'un choc allergique soit discutable (l'anesthésie seule est connue pour induire une hypotension (154)), la fonction du Fc γ RI n'est peut-être pas à négliger. Le Fc γ RI pourrait contribuer à promouvoir l'activation induite par d'autres Fc γ Rs sans être capable à lui seul d'activer les cellules pour libérer des médiateurs pro-anaphylactiques. En effet, en-dehors du choc allergique, mon équipe et d'autres ont montré que le Fc γ RI peut jouer un rôle dans un autre contexte pathologique, il est suffisant à induire une thrombocytopénie auto-immune, il contribue à la destruction du cartilage dans l'arthrite mais protège dans une infection bactérienne à *Bordetella pertussis* ; et dans un contexte thérapeutique, il contribue à l'immunothérapie anti-tumorale ciblant les lymphocytes B ou les tumeurs sous-cutanées (Gillis *et al.*, 2016 *J Autoimmunity* ; et (153)).

Le Fc γ RI semble jouer un rôle dans ces contextes dépendant majoritairement des monocytes/macrophages et lorsqu'il est exprimé en l'absence des autres Fc γ Rs. En effet, mon modèle de choc allergique dépendant aussi des neutrophiles (139), les Fc γ RIII et Fc γ RIV (exprimés à leur surface (22)) occultent peut-être également le rôle du Fc γ RI.

Les rôles des Fc γ Rs humains notamment le Fc γ RIIA dans le choc allergique ont principalement été étudiés dans un modèle murin passif dépendant d'un mélange de sous-classe d'IgG ou dans un modèle murin actif après immunisation que nous discuterons dans le paragraphe suivant. Néanmoins, dans un autre contexte pathologique dépendant de la sous-classe IgG2 de souris, le rôle du Fc γ RIIA s'est révélé tout aussi important. En effet, dans un modèle de thrombocytopénie induite à l'héparine/thrombose, le *platelet factor-4* (PF4) humain, l'héparine et une IgG2b de souris forment un complexe capable d'activer le Fc γ RIIA chez des souris humanisées pour ce récepteur (et pour le PF4) sur un fond génétique C57BL/6 (155). Cette étude montre que le Fc γ RIIA est nécessaire et suffisant à induire une thrombocytopénie. De même, dans un modèle d'arthrite dépendant des IgG2a et/ou des IgG2b de souris, ces mêmes souris humanisées pour le Fc γ RIIA développent une réaction plus sévère

à l'arthrite que les souris sauvages (156,157). Ces deux exemples laissent anticiper que le Fc γ RIIA est un acteur clé dans le choc allergique dépendant de plusieurs sous-classes d'IgG chez l'homme.

B. Plusieurs sous-classes d'IgG engagent un seul Fc γ R activateur

Un système d'étude se rapprochant davantage du mécanisme du choc allergique en clinique consiste à prendre en compte l'action d'un ensemble de sous-classes d'IgG sur un seul Fc γ R. Pour cela, soit un mélange polyclonal d'IgG est transféré à la souris (modèle passif), soit l'immunisation de la souris permet d'induire une réponse spécifique polyclonale contenant une majorité des classes et sous-classes d'immunoglobulines (modèle actif).

Dans cette configuration, dans un modèle actif d'anaphylaxie, mon équipe a montré à l'aide d'anticorps bloquants que le Fc γ RIII et le Fc γ RIV sont deux Fc γ Rs contribuant à la réaction chez la souris sauvage (141). Ce résultat est en accord avec la contribution de ces deux Fc γ Rs révélée précédemment dans un système dépendant d'une seule sous-classe d'IgG (139). En plus du choc anaphylactique, l'utilisation d'un mélange polyclonal d'IgG anti-GPI (glucose-6-phosphate isomérase) montre que le Fc γ RIII joue un rôle majeur dans l'arthrite (158) ainsi qu'un rôle nécessaire dans un modèle d'anaphylaxie passive cutanée (143). Dans ce système d'étude dépendant de plusieurs sous-classes d'IgG, le Fc γ RIII reste le Fc γ R prédominant. La prédominance des IgG1 dans le mélange polyclonal anti-GPI (159) ou après immunisation des souris avec de la BSA (141) pourrait expliquer que le Fc γ RIII reste prédominant. Le fait que le Fc γ RIV soit un récepteur de forte affinité et le Fc γ RIII de faible affinité pourrait être l'autre explication (voir plus haut).

Comme dans le système dépendant d'une seule sous-classe d'IgG, son orthologue humain le Fc γ RIIA demeure suffisant à induire un choc allergique après injection d'IgG humaines agrégées dans les souris Fc γ RIIA^{tg} (Article 2 : Beutier *et al.*, Nat Med). Ce résultat confirme ceux obtenus précédemment par mon équipe dans deux autres modèles de choc allergique (après injection d'un mélange polyclonal

d'IgG de souris ou après immunisation à la BSA (140)). Dans ces trois situations, nous pouvons estimer que les IgG1 prédominent, ce qui explique que le Fc γ RIIA demeure suffisant. D'autres études réalisées dans un autre contexte pathologique dépendant des IgG appuient la thèse du Fc γ RIIA comme acteur central. En effet, en plus de son rôle proposé dans le choc anaphylactique, le Fc γ RIIA est suffisant à induire une thrombocytopénie auto-immune induite par un anticorps monoclonal de rat anti-plaquettes de souris (160). Par ailleurs, l'expression simultanée du Fc γ RIIA et du Fc γ RIIIB (Fc γ R humain associé à une ancre glycosyl-phosphatidyl inositol (GPI) et dont la principale fonction mise en évidence est d'endocyter des complexes immuns à IgG (161)) à la surface des neutrophiles est suffisante pour induire une réaction passive d'Arthus (réaction inflammatoire locale après injection de complexes immuns) et une glomérulonéphrite progressive (maladie rénale liée au dépôt de complexes immuns au niveau des glomérules) (162).

Le Fc γ RI humain est un récepteur de forte affinité pour les IgG1/3/4 et son expression constitutive à la surface des monocytes Ly6C^{hi/lo} peut être induite à la surface des neutrophiles (163,164) chez l'homme. On peut donc anticiper que ce récepteur pourrait participer au choc allergique chez l'homme. En utilisant des souris transgéniques pour le Fc γ RI humain (et exprimant encore le Fc γ RIV murin), dans un modèle passif dépendant d'un mélange polyclonal d'IgG et dans un modèle actif après immunisation à la BSA, mon équipe a montré que le Fc γ RI est suffisant à induire le choc allergique (165). Bien que ce résultat reste à être confirmé dans un modèle de souris exprimant uniquement ce Fc γ R humain, cela montre que le Fc γ RI humain, en plus du Fc γ RIIA, pourrait jouer un rôle important dans le choc anaphylactique chez l'homme. A l'aide de ce même modèle de souris, il est montré que le Fc γ RI contribue aussi dans d'autres pathologies dépendantes des IgG (arthrite, thrombocytopénie et inflammation des voies aériennes supérieures)(165). Chez l'homme, le Fc γ RIIA et le Fc γ RI seraient donc les deux récepteurs impliqués dans des chocs allergiques induits (partiellement ou totalement) par les IgG.

C. Plusieurs sous-classes d'IgG engagent plusieurs Fc γ Rs activateurs

Le mécanisme du choc allergique est probablement encore plus complexe. Comme nous l'avons vu précédemment, il implique plusieurs sous-classes d'IgG circulantes qui ont des affinités différentes pour chacun des Fc γ Rs.

Le Fc γ RI et le Fc γ RIIA humains sont les deux Fc γ Rs activateurs qui ont été mis en évidence à l'aide de systèmes d'étude simplifiés. L'expression cellulaire de ces Fc γ Rs étant différente, ils engagent probablement en parallèle des voies d'induction différentes du choc allergique. Une équipe a créé pour la première fois un modèle de souris humanisées pour l'ensemble des Fc γ Rs humains (Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, Fc γ RIIIA, Fc γ RIIIB) et déficientes pour l'ensemble des Fc γ Rs murins, et dont l'expression cellulaire récapitule dans les grandes lignes celle décrite chez l'homme (166). Chez ces souris, l'injection d'IgG humaines agrégées est suffisante pour développer un choc anaphylactique. Dans notre laboratoire, les résultats obtenus après injection d'IgG humaines agrégées chez des souris *knock-in* pour tous les Fc γ Rs humains exceptés le Fc γ RI humain (et exprimant encore le Fc γ RI murin) montrent que, malgré la présence d'autres Fc γ Rs humanisés, le Fc γ RIIA est nécessaire au choc allergique (167). Le même résultat a été obtenu avec des souris *knock-in* pour l'ensemble des Fc γ Rs humains (Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, Fc γ RIIIA, Fc γ RIIIB) en remplacement de l'ensemble des Fc γ Rs de souris (Fc γ RI, Fc γ RIIB, Fc γ RIII, Fc γ RIV) (Gillis C., communication personnelle). Dans ces études, une diminution de l'expression du Fc γ RIIA à la surface des neutrophiles et des monocytes Ly6C^{hi/lo} est observée lors du choc anaphylactique, soutenant la thèse que le Fc γ RIIA participe à la réaction. Il est également observé une diminution de l'expression du Fc γ RIII humain (isoformes A+B ; l'anticorps de marquage ne permettant pas de discriminer les deux) à la surface de ces mêmes populations cellulaires (167). La diminution de l'expression du Fc γ RIIIA/B à la surface des neutrophiles pourrait correspondre au Fc γ RIIIB puisque le Fc γ RIIIA n'est pas exprimé à leur surface (22) ; de même, la diminution de l'expression du Fc γ RIIIA/B à la surface des monocytes correspondrait au Fc γ RIIIA (22). Même si cela n'a pas été formellement démontré, cette étude suggère que le Fc γ RIIIA activateur et le Fc γ RIIIB (sa fonction sera discutée dans le chapitre II) pourraient participer au choc allergique, en plus des rôles déjà mis en évidence du Fc γ RIIA et du Fc γ RI. Néanmoins, le blocage du Fc γ RIIA étant suffisant pour abolir le choc dans des souris *knock-in* pour l'ensemble des Fc γ Rs humains, le rôle du Fc γ RI, du Fc γ RIIIA et du

Fc γ RIIB semble minoritaire et est probablement restreint à amplifier l'activation induite par le Fc γ RIIA.

Finalement, les différents Fc γ Rs activateurs exprimés à la surface de cellules circulantes peuvent lier selon leur affinité une ou plusieurs sous-classes d'IgG pour initier un signal intracellulaire. Néanmoins, la signalisation intracellulaire diffère entre les Fc γ Rs murins et les Fc γ Rs humains.

En effet, chez la souris chacun des trois Fc γ Rs activateurs (Fc γ RI, Fc γ RIII, Fc γ RIV) est associé au dimère de la chaîne γ portant le motif ITAM (*immunotyrosine-based activation motif*) à l'origine de la transmission du signal (168). Le motif ITAM en interaction avec les kinases Src et Syk permet l'activation d'une cascade de signalisation qui se traduit par l'activation cellulaire, la production de cytokines/chimiokines et la migration cellulaire (168). La chaîne γ est donc responsable de la transmission du signal d'activation intracellulaire qui est amplifié si il y a co-engagement de plusieurs Fc γ Rs activateurs (Fc γ RIII et Fc γ RIV) lors du choc allergique.

La situation est plus complexe pour les Fc γ Rs humains car seuls deux Fc γ Rs activateurs sont associés au dimère de la chaîne γ (Fc γ RI et Fc γ RIIIA), le Fc γ RIIA et le Fc γ RIIC (isoforme exprimé chez seulement 20% des individus (37)) portent leur propre motif ITAM et le Fc γ RIIB, un peu différent car plutôt décrit comme un Fc γ R d'endocytose (161), est associé à une ancre GPI qui requiert son association à des intégrines pour transmettre son signal intracellulaire (23). Le Fc γ RIIA étant l'orthologue du Fc γ RIII (résultats non publiés, Drs Julien Lejeune et Hervé Watier, Université de Tours), la présence du motif ITAM directement associé au Fc γ R et non liée à la présence de la chaîne γ pourrait être un avantage évolutif.

Prenons l'exemple du GPVI (récepteur au collagène (169)) et du Fc γ RIIA, deux récepteurs co-exprimés à la surface des plaquettes humaines. Comme le Fc γ RIIA, le GPVI appartient à la famille des récepteurs des immunoglobulines, il est composé de deux domaines extracellulaires, un domaine transmembranaire et une queue intracytoplasmique (170). A la différence du Fc γ RIIA mais de manière apparentée aux Fc γ Rs activateurs murins, l'expression du GPVI à la surface des plaquettes et la transmission d'un signal intracellulaire requièrent son association à la chaîne γ

contenant le motif ITAM (171). Une étude a montré que, suite à la liaison de leur ligand respectif, ces deux récepteurs ITAM-dépendant sont inactivés de manière irréversible à la surface des plaquettes mais de deux façons différentes (172). Alors que le GPVI est clivé dans sa partie extracellulaire par un mécanisme dépendant de métalloprotéinases, le Fc γ RIIA est clivé au niveau intracytoplasmique par un mécanisme dépendant de la calpaïne. Par conséquent, suite à une activation des récepteurs via le motif ITAM, l'ectodomaine du GPVI n'est plus présent à la surface des plaquettes alors que le Fc γ RIIA est toujours présent mais dans un état non fonctionnel. Cet exemple montre que la présence du motif ITAM associé au Fc γ R par la chaîne γ ou au sein même du complexe du Fc γ R permet à une même cellule de répondre différemment suite à la stimulation de deux récepteurs à sa surface. Dans le cas du choc allergique chez l'homme, on pourrait donc émettre l'hypothèse que selon l'engagement de tel Fc γ R activateur, associés (Fc γ RI) ou non (Fc γ RIIA) à la chaîne γ , la réponse cellulaire est différente (augmentation de l'expression d'intégrines, dégranulation, etc.). Ainsi contrairement au mécanisme d'activation chez la souris - confiné à une réponse « simple » - le mécanisme chez l'homme pourrait être multiple - donc « complexe » - et ainsi présenter des tableaux cliniques plus variés.

Malgré la complexité de la réaction dépendante de la multiplicité des sous-classes d'IgG en circulation, de l'affinité des Fc γ Rs activateurs pour chacune de ces sous-classes ou encore de la voie de signalisation impliquée, il semblerait que, comme montré pour son analogue murin le Fc γ RIII, le Fc γ RIIA soit le Fc γ R activateur clé dans l'induction du choc anaphylactique chez les souris humanisées pour les Fc γ Rs. Reste à le démontrer chez l'homme.

II. Mécanismes de régulation de l'interaction IgG-Fc γ Rs activateurs

En parallèle de l'interaction IgG-Fc γ Rs activateurs, le système immunitaire dispose de mécanismes de régulation dans les interactions IgG-Fc γ R et dans l'activation de ces récepteurs, afin d'éviter une réponse trop précoce ou un emballement du système.

A. Les rôles régulateurs du Fc γ RIIB et du Fc γ RIIB

Les Fc γ RIIB murin et humain ont un rôle inhibiteur par la présence de leur motif *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif* (ITIM) localisé dans la partie intracytoplasmique du récepteur (173). Le motif ITIM permet au Fc γ RIIB, après coagrégation à la surface cellulaire avec les Fc γ Rs activateurs (exprimant le motif ITAM), de contrebalancer le signal positif exercé par les Fc γ Rs activateurs en empêchant la mobilisation du calcium intracellulaire (174).

Dans le choc allergique chez la souris sauvage, bien que le Fc γ RIIB soit affiné pour les IgG1/2a/2b (22), la régulation par le Fc γ RIIB n'est pas équivalente quelle que soit la sous-classe d'IgG qui induit la PSA. En effet, j'ai pu mettre en évidence la participation du Fc γ RIIB dans les PSA induites par des IgG1 ou par des IgG2b, mais pas dans la PSA induite par des IgG2a (139). Dans les PSA induites par des IgG1/2b, la sévérité du choc est plus importante en l'absence de ce signal inhibiteur. Le rôle inhibiteur du Fc γ RIIB empêche donc le développement d'une réponse excessive pouvant être fatale dans certains cas. Ces résultats sont en accord avec deux études (175,176) qui montrent une aggravation de l'anaphylaxie passive cutanée induite par des IgG1 de souris dans des souris Fc γ RIIB^{-/-}.

L'absence de contribution du Fc γ RIIB dans la PSA induite par des IgG2a, également observée par l'équipe du Pr Finkelman (145), suggère que le signal initié par les Fc γ Rs activateurs (majoritairement par le Fc γ RIII comme discuté précédemment) ne peut être contrebalancé par le signal inhibiteur du Fc γ RIIB. L'affinité plus faible d'un facteur 10 du Fc γ RIIB pour les IgG2a (K_A de $4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) en comparaison des IgG1 (K_A de $3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) et des IgG2b (K_A de $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) (22) pourrait

expliquer l'absence de contribution du Fc γ RIIB dans la PSA induite par des IgG2a. Nous pouvons alors supposer que le Fc γ RIII (Fc γ R activateur prédominant) plus affin pour les IgG2a (K_A de $7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) que le Fc γ RIIB (K_A de $4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) (22), est davantage activé par les complexes immuns par rapport au Fc γ RIIB. De même, les IgG2a fixant avec une meilleure affinité les trois Fc γ Rs activateurs (Fc γ RI, Fc γ RIII Fc γ RIV) en comparaison du Fc γ RIIB, il est possible que les IgG2a se fixent préférentiellement à ces premiers. Cependant, bien que la différence d'affinité puisse contribuer, il semble improbable que les complexes immuns d'IgG2a ne se fixent pas du tout aux Fc γ RIIB d'une cellule exprimant ces deux Fc γ Rs, activateurs et inhibiteurs.

Une autre hypothèse possible est que l'absence de contribution des basophiles dans la PSA induite par des IgG2a (à la différence des PSA induites par des IgG1/2b) ne permette pas de contrebalancer les signaux activateurs émis par les neutrophiles et les monocytes/macrophages participant dans les trois modèles de PSA (Article 1) : l'idée étant que les basophiles auraient un rôle négatif dans ce modèle. En effet, le ratio entre le taux d'expression du Fc γ RIIB et du Fc γ RIII est inversé entre les basophiles et les neutrophiles de souris, suggérant un ratio d'expression en faveur du récepteur inhibiteur à la surface des basophiles (36). Le ratio [signal activateur/signal inhibiteur] est donc différent selon la population cellulaire concernée et permettrait de réguler la réaction. Ainsi, dans la PSA induite par des IgG2a, nous pourrions supposer que le signal inhibiteur résultant du ratio [activateur/inhibiteur] émanant des basophiles n'apparaît pas ; à la différence des PSA induites par des IgG1/2b dans lesquelles les basophiles contribuent. Cependant, après déplétion des basophiles dans les PSA induite par des IgG1/2b, la sévérité du choc allergique est diminuée et non pas augmentée. Cette hypothèse n'étant pas valide, il convient donc d'expliquer autrement l'absence de contribution du Fc γ RIIB en PSA induite par des IgG2a.

En plus des Fc γ Rs, les IgG de souris peuvent se lier au système du complément, et particulièrement les IgG2a (177). Le système du complément peut être activé selon trois voies : la voie classique, la voie des lectines et la voie alternative (178). Seule la voie classique est initiée par la liaison de la portion Fc d'une IgG au C1q (appartenant au complexe C1 du complément) (179). Après liaison au C1q, la cascade d'activation du système du complément conduit à trois activités biologiques principales dans le cas d'une réponse immune anti-pathogène: l'opsonisation du pathogène, l'attraction et l'activation des leucocytes, puis

l'élimination du pathogène (178). Deux études mettent en évidence une contribution du complément dans un modèle de choc allergique déclenché par un extrait de cacahuètes administré à des souris prétraitées avec de l'IL-4 (180,181). Cette équipe montre que les souris déficientes pour le C4 (180) ou déficientes pour le récepteur au C3a (181) développent un choc moins sévère que les souris sauvages (C4 et C3a étant des composants de la voie classique du système du complément (178)). Bien qu'aucune étude n'ait évalué le rôle du complément dans un choc allergique dépendant exclusivement des IgG2a de souris, l'activation du complément pourrait expliquer non seulement la sévérité du choc observée chez les souris sauvages dans ce modèle de PSA comparée à la sévérité dans les PSA induites par des IgG1/2b (139), mais expliquer également l'incapacité du FcγRIIB à contrebalancer des signaux activateurs émis simultanément par les FcγRs activateurs et par le système du complément.

A la différence de la souris pour laquelle l'expression du FcγRIIB est étendue à l'ensemble des cellules myéloïdes, chez l'homme le FcγRIIB est exprimé principalement à la surface des lymphocytes B et des basophiles (22). D'ailleurs, le ratio entre le taux d'expression du FcγRIIA et du FcγRIIB est inversé entre les basophiles humains et les neutrophiles humains, suggérant un ratio d'expression en faveur du récepteur inhibiteur à la surface des basophiles humains. Par ailleurs, les signaux inhibiteurs du FcγRIIB dominent sur les signaux activateurs émis par le FcγRIIA (36), suggérant un rôle majeur du FcγRIIB à la surface de cette population cellulaire chez l'homme. En outre, il semble que plus le FcγRIIA est sollicité, plus le FcγRIIB exerce son rôle inhibiteur pour contrer les signaux activateurs. En effet, il a été montré que la taille des complexes immuns influence leur liaison aux FcγRs : plus les complexes immuns d'IgG1/3 sont de taille importante, mieux ils fixent *in vitro* le FcγRIIA (R131) et le FcγRIIB sur des transfectants exprimant ces récepteurs (182). Le couple FcγRIIA-FcγRIIB est donc largement dominé par le récepteur inhibiteur, limitant la capacité des basophiles à s'activer en présence de complexes immuns, comme cela pourrait être le cas lors d'un choc allergique chez l'homme.

Cependant, à la surface des neutrophiles et des plaquettes chez l'homme, le FcγRIIB est respectivement très peu et non exprimé (22). L'expression cellulaire restreinte du FcγRIIB humain interroge sur le mécanisme de régulation des signaux

activateurs initiés par le Fc γ RIIA à la surface de ces deux populations clés dans le choc allergique (Article 2 + (167)). Il est donc probable que d'autres mécanismes de régulation entrent en jeu et notamment une régulation par clivage intracellulaire du récepteur, limitant ses propriétés de transduction du signal, comme il a été montré pour le Fc γ RIIA (172) (discuté dans le chapitre 1).

A la surface des neutrophiles humains, le Fc γ RIIIB est très fortement exprimé, et on en estime entre 200 et 300,000 molécules par cellule. Ce Fc γ R, clairement ni activateur ni inhibiteur (22), a été décrit comme pouvant endocyter à lui seul des complexes immuns solubles chez des souris transgéniques pour le Fc γ RIIIB et déficientes pour la chaîne γ nécessaire à l'expression des FcR activateurs endogènes (161). Au cours de la PSA dans les souris VG1543, une diminution des expressions du Fc γ RIIA et du Fc γ RIIIB est observée à la surface des neutrophiles (167). Premièrement, l'affinité pour les IgG1 du Fc γ RIIA ($3 \text{ à } 5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ selon l'isoforme (22)) étant supérieure à celle du Fc γ RIIIB ($2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (22)), cela pourrait suggérer que le Fc γ RIIA exprimé à la surface des neutrophiles lie d'abord les complexes immuns circulants, puis l'ensemble internalisé est à l'origine d'une activation cellulaire. Une fois la majorité des Fc γ RIIA internalisés, le Fc γ RIIIB serait en mesure d'exercer sa fonction d'endocytose envers les autres complexes immuns circulants. Par conséquent, l'endocytose par le Fc γ RIIIB à la surface des neutrophiles serait un moyen de limiter la propagation de la réaction anaphylactique en retirant de la circulation les complexes immuns qui pourraient continuer d'activer en cascade d'autres populations cellulaires. Deuxièmement, on pourrait imaginer que le Fc γ RIIA ne soit « réceptif » qu'en présence d'une forte quantité de complexes immuns circulants. En cas de faible quantité de complexes immuns circulants, le Fc γ RIIIB serait le principal Fc γ R à la surface cellulaire capable de lier et endocyter des complexes immuns si ceux-ci contiennent des IgG1/3. En revanche, en cas de forte quantité de complexes immuns, le Fc γ RIIIB de plus en plus endocyté, le Fc γ RIIA deviendrait accessible et l'activation cellulaire s'en trouverait augmentée. Cette deuxième hypothèse pourrait s'avérer correcte en raison de la découverte d'une conformation « non réceptive » ou ITAMi du Fc γ RIIA que nous allons aborder dans la partie suivante.

B. La conformation ITAMi du Fc γ RIIA

En l'absence d'un mécanisme régulateur à la surface des plaquettes, il est facile d'imaginer qu'une activation incontrôlée du récepteur activateur de faible affinité (Fc γ RIIA) pour toutes les sous-classes d'IgG pourrait avoir des conséquences désastreuses pour l'organisme chez l'homme. L'expression du seul Fc γ RIIA à leur surface suggère la présence probable d'un mécanisme régulateur autre que le Fc γ RIIB inhibiteur, inhérent au récepteur lui-même afin de juguler une activation permanente des plaquettes par des dimères, multimères ou complexes immuns à IgG.

Comme discuté dans le chapitre I, le Fc γ RIIA est capable de s'inactiver par autoclivage après liaison à son ligand (172). Néanmoins, ce mécanisme ne permet pas de prévenir le déclenchement d'une activation inappropriée de ce récepteur. Le Fc γ RIIA est activateur par la présence du motif ITAM localisé dans sa partie intracytoplasmique. Récemment, une étude menée par l'équipe de Renato Monteiro (Hôpital Bichat, Paris), en collaboration avec notre équipe, a mis en évidence un mécanisme d'inhibition de l'ITAM pour le Fc γ RIIA appelé ITAMi (183). Cette notion d'autoinhibition d'un motif considéré comme un motif d'activation a d'abord été proposée pour le récepteur humain aux IgA (Fc α RI). Alors que les complexes immuns d'IgA sont capables d'agréger les Fc α RI afin de déclencher une réponse cellulaire pro-inflammatoire, les IgA monomériques induisent un signal inhibiteur interférant dans plusieurs fonctions cellulaires (la phagocytose dépendante des IgG, la dégranulation dépendante des IgE ou les signaux induits par les TLRs et cytokines) (184). Au niveau intracellulaire, cette interférence ou signal inhibiteur résulte d'un faible degré de phosphorylation du motif ITAM entraînant le recrutement transitoire de la kinase Syk puis le recrutement stable de la phosphatase SHP-1 (*Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1*) ; à la différence d'un signal activateur qui entraîne un degré élevé de phosphorylation du motif ITAM permettant le recrutement stable de Syk. De manière équivalente au Fc α RI, la conformation ITAMi a ensuite été proposée pour le Fc γ RIIIA (185), puis pour le Fc γ RIIA (183). Cette dernière étude propose que les individus sains expriment le Fc γ RIIA sous une conformation majoritairement ITAMi. Cette conformation serait induite par un engagement sous-optimal du récepteur par des IgG monomériques ou dimériques

présentes en circulation et conduirait à un rétrocontrôle négatif d'une activation cellulaire inappropriée. En revanche, la présence de complexes immuns en concentration élevée ayant une forte avidité pour le FcγRIIA changerait la conformation de ce récepteur en ITAM « classique » phosphorylé de manière optimale afin de pouvoir déclencher une activation cellulaire. Cette étude montre non seulement *in vitro* que la conformation ITAMi du FcγRIIA obtenue par des F(ab')₂ anti-FcγRIIA requiert le recrutement de Syk puis de SHP-1; mais aussi dans un modèle d'arthrite *in vivo*, que le FcγRIIA, déjà dans une conformation active en raison de la présence de complexes immuns, peut revenir à une conformation ITAMi après traitement avec des IVIg ou des (Fab')₂ anti- FcγRIIA (183).

Par conséquent, il est tentant de spéculer que, à l'état physiologique, le FcγRIIA exprimé à la surface des plaquettes et des neutrophiles est sous une conformation ITAMi pour éviter une activation cellulaire inappropriée. Suite à la détection d'un bolus d'IgG sous forme de complexes immuns, comme cela est le cas dans le choc anaphylactique, le FcγRIIA change de conformation (c'est à dire d'état de phosphorylation de son ITAM) afin de pouvoir déclencher une activation cellulaire.

C. La glycosylation des IgG

Selon la situation physiologique ou pathologique d'un individu, il existe des différences dans le profil de glycosylation des IgG. Par exemple, il a été montré que les patients atteints de l'arthrite, de la maladie de Crohn, de la colite ulcéreuse ou de la tuberculose ont des IgG dont le profil est pauvre en acides sialiques et en galactose comparé à des IgG chez des individus sains (186–188). Par ailleurs, les IgG partiellement désialylées sont à l'origine d'une réponse pro-inflammatoire (189), ce qui confirme le lien entre pathologie et IgG pauvres en acides sialiques. En outre, l'absence de fucose est connue pour augmenter l'affinité des IgG1 au FcγRIIIA humain, ce qui se traduit par une augmentation de l'ADCC (cytotoxicité dépendante des anticorps) et de la phagocytose (190). Ceci est d'ailleurs observé dans la thrombocytopénie néonatale alloimmune, pathologie dans laquelle les IgG1 humaines dirigées contre des antigènes plaquettaires ne sont pas fucosylées (191,192), ce qui conduit à une meilleure affinité des IgG1 pour le FcγRIIIA et donc à une augmentation de l'ADCC (191) et probablement de la phagocytose. Le profil

des anticorps thérapeutiques utilisés dans le domaine du cancer est d'ailleurs inspiré de ce mécanisme pour augmenter l'ADCC des cellules tumorales par les cellules NK exprimant le FcγRIIIA (193). Par exemple, la version défucosylée du trastuzumab, un anticorps monoclonal anti-HER2 (*anti-human epidermal growth factor receptor 2*) utilisé dans le cancer du sein, posséderait une efficacité thérapeutique plus élevée *in vitro* en comparaison de la version fucosylée (194).

A partir de l'ensemble de ces études, nous pouvons proposer l'hypothèse suivant laquelle après sensibilisation par un allergène, les IgG spécifiques nouvellement synthétisées ont un profil hypoglycosylé (peu de résidus mannose, galactose, acide sialique, fucose). Ces IgG spécifiques hypoglycosylées auraient une meilleure affinité au moins pour le FcγRIIIA contrairement aux IgG non spécifiques dont la glycosylation n'aurait pas été modifiée. Suite à la deuxième rencontre avec l'antigène puis la formation de complexes immuns d'IgG circulants, cette hypoglycosylation permettrait une liaison préférentielle des IgG spécifiques (en minorité dans la totalité des IgG circulantes) aux FcγRs (FcγRIIIA et nous pouvons spéculer que le FcγRIIA aussi) afin de déclencher une réponse cellulaire rapide.

III. Des plaquettes humanisées aux plaquettes humaines

Mon deuxième projet de thèse, plus particulièrement centré sur le rôle des plaquettes, a montré que les plaquettes sont nécessaires au choc allergique chez les souris $Fc\gamma RIIA^{tg}$ et que le transfert de ces plaquettes suffit à induire un choc allergique chez des souris résistantes (souris $Fc\gamma R^{null}$). Par ailleurs, je montre que les IgG humaines agrégées, à l'origine de ce modèle de choc allergique chez la souris, sont capables d'activer et d'agréger via le $Fc\gamma RIIA$ humain les plaquettes purifiées (« lavées ») issues de souris $Fc\gamma RIIA^{tg}$. Une question primordiale reste à savoir si les plaquettes humaines sont également capables d'être activées et agrégées directement via le $Fc\gamma RIIA$.

Les plaquettes de souris diffèrent des plaquettes humaines par plusieurs aspects. Elles sont deux fois plus petites mais plus nombreuses (195). Elles n'expriment pas certains récepteurs à leur surface à la différence des plaquettes humaines ($Fc\gamma RIIA$, récepteur au PAF) ; ou encore, elles expriment des isoformes différents d'un même récepteur. Par exemple, le récepteur à la thrombine, *protease-activated receptor* (PAR), est exprimé sous forme de deux isoformes qui diffèrent entre l'homme et la souris : les isoformes PAR-3 et PAR-4 sont clivés par la thrombine chez la souris, alors que ce sont les isoformes PAR-1 et PAR-4 chez l'homme (196). Il est donc primordial de ne pas oublier que des « plaquettes humanisées » pour le $Fc\gamma RIIA$ utilisées pour les essais de stimulation *in vitro* ne possèdent que cette caractéristique des plaquettes humaines, et que bien des caractéristiques propres aux plaquettes de souris défissent bien davantage ces cellules.

Afin de confirmer les résultats obtenus *in vitro* avec les plaquettes humanisées, une collaboration avec la plateforme ICAREB de l'Institut Pasteur a été mise en place pour obtenir du sang provenant de volontaires sains et préparer des plaquettes humaines lavées. Cette étude n'a malheureusement pas pu aboutir à l'Institut Pasteur pour le moment en raison d'un problème d'activation plaquettaire non spécifique durant le protocole de lavage. Néanmoins, grâce à une collaboration déjà établie avec l'équipe de Christian Gachet à l'EFS-Alsace à Strasbourg, j'ai pu préparer dans leur laboratoire des plaquettes humaines lavées et

réaliser des essais d'agrégation plaquettaire. A la différence des résultats obtenus sur les plaquettes humanisées lavées, les plaquettes humaines ne s'agrègent pas en présence d'IgG humaines agrégées (HA IVIg) (Figure 7).

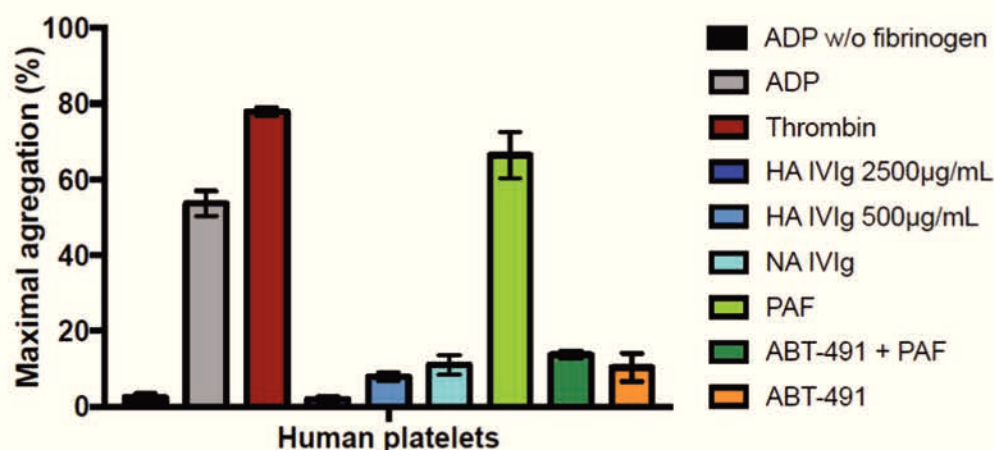


Figure 7 : Essais d'agrégation plaquettaire sur plaquettes humaines lavées après mise en présence de différents stimulants.

Représentation du pourcentage maximal d'agrégation après stimulation par l'ADP 5 µM avec ou sans (w/o) fibrinogène, la thrombine (0.1 U/mL), les HA IVIg (500 et 2500 µg/mL), les NA IVIg (500 µg/mL), le PAF (50 µM) prétraité ou non par l'antagoniste du récepteur au PAF (ABT-491) (20 µg/mL). Pool de 5 expériences indépendantes.

Comme les plaquettes humaines, les plaquettes de souris $Fc\gamma RIIA^{tg}$ expriment le $Fc\gamma RIIA$, seul $Fc\gamma R$ présent à leur surface. Pour expliquer la différence de résultats obtenus entre les plaquettes humanisées et les plaquettes humaines, plusieurs hypothèses sont proposées.

La première hypothèse concerne la densité d'expression du $Fc\gamma RIIA$ à la surface des plaquettes humanisées et des plaquettes humaines. En effet, si la densité de $Fc\gamma RIIA$ à la surface des plaquettes humaines est trop faible, les IgG humaines agrégées auront plus de difficultés à agréger les récepteurs entre eux pour aboutir à une activation plaquettaire. Cette hypothèse semble peu probable car la densité du $Fc\gamma RIIA$ à la surface des plaquettes chez les souris $Fc\gamma R^{-/-} Fc\gamma RIIA^{tg}$ semble récapituler celle chez l'homme (160). L'expression du $Fc\gamma RIIA$ à la surface des plaquettes des souris « Audrey » exprimant l'ensemble des $Fc\gamma R$ s humains en remplacement des $Fc\gamma R$ s endogènes est plus faible que celle observée à la surface des plaquettes humaines (167). Or, comme pour les plaquettes issues des souris

Fc γ RIIA^{tg}, les plaquettes issues des souris Audrey sont capables d'être agrégées via le Fc γ RIIA. Il n'en reste pas moins que les plaquettes de souris étant deux fois plus petites que les plaquettes humaines, la densité de Fc γ RIIA pourrait être bien plus importante chez la souris transgénique.

La deuxième hypothèse repose sur le polymorphisme génétique du Fc γ RIIA. Chez l'homme, le Fc γ RIIA est exprimé sous forme de deux allèles différents, H131 ou R131. Les souris Fc γ RIIA^{tg} expriment l'allèle R131 alors que les souris Audrey expriment l'allèle H131. Il est possible qu'un des deux allèles du Fc γ RIIA soit préférentiellement capable d'interagir avec les IgG humaines et induire une agrégation plaquettaire. L'allèle H131 est plus affiné pour les IgG2 que l'allèle R131 (22). Par conséquent, il est envisageable que l'allèle H131 soit plus apte à reconnaître les IgG humaines agrégées constituées de 63% d'IgG1 et 29% d'IgG2 comme dans le plasma. J'ai donc réalisé un essai d'agrégation plaquettaire (expérience préliminaire) sur des plaquettes lavées issues des souris Audrey. Après mise en présence des plaquettes issues des souris Audrey et des IgG humaines agrégées, j'obtiens une agrégation plaquettaire semblable à celle obtenue à partir des plaquettes issues des souris Fc γ RIIA^{tg} (Figure 8). Cette expérience préliminaire semble montrer que l'hypothèse du polymorphisme génétique n'explique pas la différence de comportement entre les plaquettes humaines et les plaquettes humanisées.

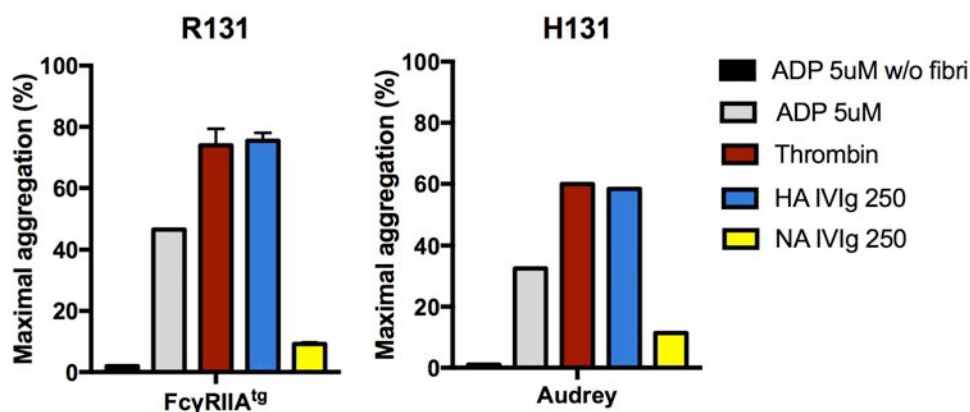


Figure 8 : Essai d'agrégation plaquettaire sur plaquettes lavées issues des souris Fc γ RIIA^{tg} (à gauche) et des souris Audrey (à droite) après mise en présence de différents stimulants. Représentation du pourcentage maximal d'agrégation après stimulation par l'ADP 5 μ M avec ou sans (w/o) fibrinogène, la thrombine (0.1 U/mL), les HA IVIg (250 μ g/mL) et les NA IVIg (250 μ g/mL). Expérience préliminaire pour les souris Audrey.

Néanmoins, l'implication du Fc γ RIIA dans l'activation plaquettaire induite par des IgG a été mise en évidence dans d'autres modèles. Dans la thrombocytopénie induite à l'héparine (TIH), la thrombocytopénie résulte d'une activation plaquettaire via le Fc γ RIIA par un complexe constitué de PF4, d'héparine et d'IgG anti-PF4/héparine (197). Il a été montré que la substitution de l'héparine par des polysaccharides d'un poids moléculaire similaire et présentant des groupements sulfates comme l'héparine constitue également un complexe fonctionnel (avec les IgG de patients atteints de TIH) d'activation plaquettaire via le Fc γ RIIA (197). Une autre étude s'intéressant aux événements thrombotiques des patients traités par le bevacizumab (anticorps monoclonal anti-VEGF *vascular endothelial growth factor*, utilisé chez l'homme dans le traitement du cancer colorectal) a montré que ces événements étaient à l'origine d'une activation plaquettaire via le Fc γ RIIA (198). En effet, cette équipe montre que, de manière similaire au PF4 dans la TIH, la présence du site de liaison à l'héparine au sein de la protéine VEGF est indispensable, après formation d'un complexe avec les IgG anti-VEGF, pour activer le Fc γ RIIA. Ce complexe induit ensuite une agrégation plaquettaire *in vitro* et une thrombocytopénie/thrombose chez des souris transgéniques pour le Fc γ RIIA (198). L'héparine semblant être un acteur indispensable dans l'activation plaquettaire par le Fc γ RIIA, nous pourrions donc expérimenter l'ajout d'héparine ou d'un polysaccharide sulfaté similaire à notre solution d'IgG humaines agrégées afin d'aider à l'activation des plaquettes humaines via le Fc γ RIIA.

Dans cette même étude sur le bevacizumab, cette équipe montre que des doses suboptimales d'ADP (adénosine diphosphate) ou de thrombine (respectivement 50 fois et 100 fois inférieures à celles utilisées dans mes expériences d'agrégation plaquettaire) permettent d'augmenter le potentiel d'activation des plaquettes via le Fc γ RIIA (198). En effet, ce traitement a pour effet d'augmenter la libération de granules denses et de diminuer les concentrations d'héparine nécessaires. Par ailleurs, une autre étude effectuée dans le contexte d'une infection par des bactéries Gram positives montre que la libération d'ADP, de thromboxane A2 et de PF4 par les plaquettes opère comme une boucle de rétrocontrôle positif lors de l'activation du Fc γ RIIA (199). Ces études suggèrent qu'une sensibilisation

préalable des plaquettes par des doses suboptimales d'ADP ou de thrombine pourrait favoriser l'agrégation plaquettaire via le FcγRIIA. Ceci renforce l'idée que, en plus des IgG, la présence de cofacteurs est requise pour l'activation plaquettaire via ce récepteur.

Dans le contexte d'une infection sévère à *streptococcus*, la protéine soluble M1 (libérée par le *streptococcus pyogenes*) s'associe au fibrinogène qui se lie ensuite à son récepteur GPIIbIIIa, mais aucune activation plaquettaire n'est observée (200). En revanche, en présence d'IgG spécifiques dirigées contre la protéine bactérienne M1, une activation plaquettaire via le FcγRIIA est observée. De manière analogue, il a été montré que des protéines exprimées à la surface du *staphylococcus aureus*, *clumping factors A* et *B* et *fibronectin-binding protein A*, se lient au fibrinogène et à des IgG conduisant respectivement à une activation plaquettaire via le GPIIbIIIa et le FcγRIIA (201). De même dans le cas d'une infection virale, une autre étude montre que l'activation plaquettaire (augmentation des marqueurs d'activation P-sélectine et GPIIbIIIa activée) par *l'influenza virus H1N1* nécessite la présence de facteurs solubles présents dans le plasma/sérum mais non identifiés (202). Dans le but de favoriser l'agrégation des plaquettes humaines par des IgG humaines agrégées, une suggestion pourrait être d'ajouter dans la solution de plaquettes lavées les facteurs solubles manquants (par l'ajout de 2% de sérum humain comme réalisé dans (202)).

Une équipe s'intéresse plus précisément à la dépendance du FcγRIIA et du GPIIbIIIa évoquée précédemment et montre que la phosphorylation intracellulaire du FcγRIIA est dépendante de l'engagement du GPIIbIIIa (199). En l'absence de cet engagement, il y a peu ou pas de phosphorylation des résidus tyrosine contenus dans l'ITAM du FcγRIIA et le signal ne peut être transduit à la plaquette. Deux autres études, s'intéressant plus particulièrement à la voie de signalisation intracellulaire pouvant être à l'origine de cette dépendance, montrent que le FcγRIIA fonctionne comme un adaptateur de l'intégrine GPIIbIIIa qui amplifie l'activation des kinases Src/Syk et ce, de manière indépendante des IgG (203,204). De plus, le recrutement de Syk sur le motif ITAM permet un couplage de la signalisation intracellulaire de ces

deux récepteurs (203). Il en découle une coopération fonctionnelle au niveau intracellulaire entre le motif ITAM du Fc γ RIIA et la voie de signalisation de l'intégrine GPIIbIIIa. Si ce mécanisme peut être répliqué dans mes expériences de stimulation de plaquettes humaines *in vitro*, une alternative tentante serait d'augmenter la concentration de fibrinogène soluble dans la solution de plaquettes humaines lavées afin de stimuler la coopération mutuelle de ces deux récepteurs.

Une dernière hypothèse est que l'activation du Fc γ RIIA requiert une matrice ou surface cellulaire sur laquelle seraient fixés les agrégats d'IgG humaines. Telle une activation mutuelle entre deux cellules, seuls des agrégats d'IgG orientés et fixés à la matrice seraient capables d'activer le Fc γ RIIA afin de déclencher une agrégation plaquettaire. Comme discuté précédemment (202), il a été montré qu'une opsonisation du virus *influenza* H1N1 par des IgG permet d'activer le Fc γ RIIA à la surface des plaquettes. Peut-être que cette activation, en plus des facteurs solubles, est dépendante de la présence du virus comme matrice/surface portant les IgG. Par ailleurs, une autre étude montre que l'injection d'un anticorps anti-GPIIbIIIa (MWReg30) induit une hypothermie dépendante des plaquettes chez les souris sauvages ; en revanche *in vitro*, cet anticorps induit uniquement une phosphorylation de la sous-unité GPIIIa mais pas d'agrégation plaquettaire (205). Pour expliquer cela, ils montrent que la présence du Fc γ RIII est nécessaire à la thrombocytopénie observée chez ces souris (la contribution cellulaire n'est pas étudiée). Cette publication suggère donc que la présence d'autres cellules, fixant probablement l'anticorps anti-GPIIbIIIa via le Fc γ RIII en trans, est requise pour finaliser l'activation des plaquettes préalablement « armées » par la phosphorylation de la sous-unité GPIIIa. Cette hypothèse nécessite d'être testée dans le cas du Fc γ RIIA en utilisant par exemple *in vitro* des billes sur lesquelles seraient fixées les IgG humaines. De la même manière, on pourrait imaginer que la formation des complexes plaquettes-neutrophiles observés lors du choc allergique est nécessaire aux plaquettes pour s'activer. Dans le chapitre suivant, nous allons maintenant nous intéresser à ces complexes et notamment à leur conséquence dans le choc allergique.

IV. Les neutrophiles et les plaquettes : deux populations interdépendantes

La formation de complexes circulants plaquettes-neutrophiles au cours du choc allergique interroge sur la fonction de cette association. Quelle est la nature de cette interaction ? Fait-elle suite à une activation séquentielle ou simultanée des plaquettes et des neutrophiles ? A quoi sert cette interaction ? Amplifie-t-elle ou limite-t-elle la réaction anaphylactique ?

A. Nature de l'interaction plaquettes-neutrophiles

Lors d'un choc anaphylactique, il est observé une augmentation de la perméabilité vasculaire qui conduit à une chute de la pression artérielle. L'un entraîne la diminution de la vitesse du flux sanguin ; l'autre conduit à une fuite du liquide plasmatique vers le milieu interstitiel et notamment à une augmentation de l'hématocrite (article 2). Ces deux facteurs favorisent probablement le rapprochement entre les cellules circulantes dont les plaquettes et les neutrophiles. En plus de ce rapprochement physique, un rapprochement chimique pourrait contribuer à rapprocher mutuellement les plaquettes et les neutrophiles. En effet, plusieurs molécules à fort pouvoir chimioattractant sont libérées par les plaquettes et/ou les neutrophiles activés : les métabolites de la voie de l'acide arachidonique (leucotriène, prostaglandines, thromboxane A₂), PF₄, PDGF ou encore le PAF (206,207). Ces molécules libérées localement en circulation par l'une et/ou l'autre de ces deux populations cellulaires activées attirent progressivement d'autres plaquettes et d'autres neutrophiles activés aussi à leur tour.

L'interaction physique entre plaquettes et neutrophiles est rendue possible grâce à l'expression de molécules d'adhésion présentes à la surface de ces deux populations. La P-sélectine, présente au sein des granules α , est exprimée à la surface des plaquettes après dégranulation plaquettaire (208). Un ligand important est *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1) exprimé à la surface de tous les leucocytes dont les neutrophiles (209). Mes résultats *in vivo* (Article 2) montrent que

les plaquettes «complexées» aux neutrophiles expriment à leur surface le marqueur de dégranulation plaquettaire P-sélectine, ce qui suggère la possibilité d'une interaction entre ces deux molécules d'adhésion lors du choc allergique. Outre le ligand PSGL-1, les autres ligands de la P-sélectine sont l'E-sélectine principalement à la surface des cellules endothéliales activées (210) et la L-sélectine (CD62L) notamment à la surface des lymphocytes T naïfs, des neutrophiles et des monocytes (211) suggérant que les plaquettes pourraient interagir avec d'autres acteurs lors du choc anaphylactique. Il est d'ailleurs intéressant de noter que l'activation des neutrophiles se traduit notamment par une perte de l'expression du CD62L à leur surface. Il a également été montré un renforcement de l'interaction plaquette-neutrophile par la liaison de LFA-1 (CD11a/CD18) à la surface des neutrophiles à ICAM-2 à la surface des plaquettes (212); ainsi qu'entre CD40 à la surface des neutrophiles et CD40L à la surface des plaquettes (213).

Ces interactions ne sont pas sans conséquence sur l'état d'activation des cellules impliquées. Effectivement, à la suite de la liaison entre plaquettes et neutrophiles via la P-sélectine, il a notamment été démontré la production d'espèces réactives de l'oxygène et une augmentation de l'expression de Mac-1 (CD11b/CD18), signes d'une activation des neutrophiles (214). J'observe également une activation des neutrophiles au sein des complexes plaquettes-neutrophiles par la perte d'expression de CD62L à leur surface (Article 2). Le récepteur Mac-1 joue un rôle majeur dans la stabilisation des interactions plaquettes-neutrophiles grâce à sa liaison à trois molécules exprimées à la surface des plaquettes: GPIb/V/IX, GPIIbIIIa via l'intermédiaire d'une molécule de fibrinogène et ICAM-2 (80). Il est intéressant de noter que le récepteur au fibrinogène GPIIbIIIa (215) exprimé à la surface des plaquettes peut interagir, par l'intermédiaire d'une molécule de fibrinogène, avec un neutrophile ou avec une autre plaquette. En bloquant cette intégrine, à la fois les interactions plaquette-plaquette et les interactions plaquette-neutrophile seraient partiellement ou totalement inhibées. Lors d'essais d'agrégation plaquettaire *in vitro* sur plaquettes lavées de souris $Fc\gamma RIIA^{tg}$, je montre d'ailleurs que l'agrégation plaquettaire induite par des IgG humaines agrégées (utilisées lors du choc allergique *in vivo*) est inhibée en présence d'anti-GPIIbIIIa bloquant (Figure 9).

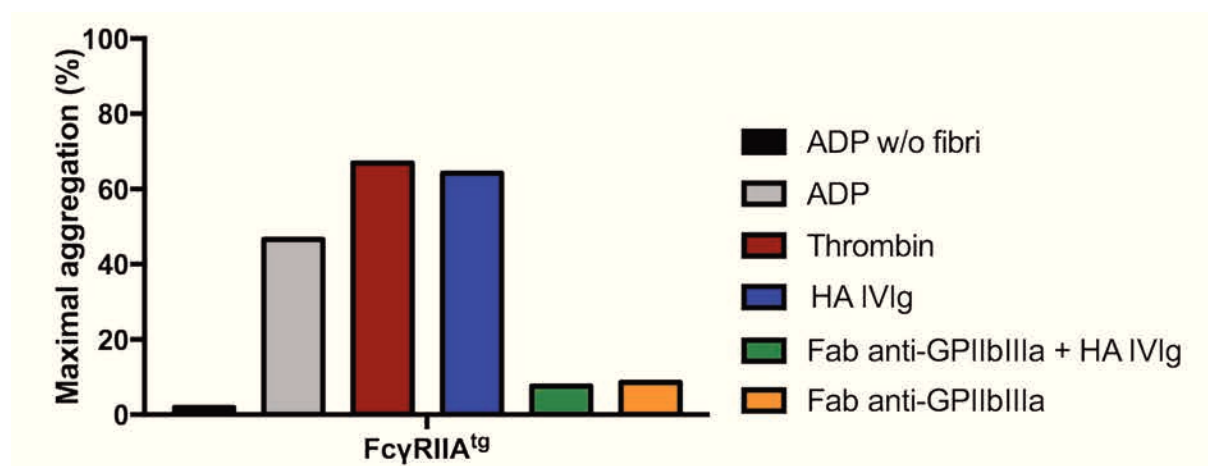


Figure 9 : Essai d'agrégation plaquettaire sur plaquettes lavées issues de souris Fc γ RIIA^{tg} après mise en présence de différents stimulants.

Représentation du pourcentage maximal d'agrégation après stimulation par l'ADP 5 μ M avec ou sans (w/o) fibrinogène, la thrombine (0.1 U/mL, les HA IVIg (250 μ g/mL) prétraitées ou non par l'anti-GPIIb/IIIa (10 μ g/mL). Expérience préliminaire.

Le blocage de l'intégrine GPIIb/IIIa suffit à empêcher l'interaction plaquette-plaquette *in vitro*, ce qui suggère un effet encore plus prononcé *in vivo* avec le blocage additionnel de l'interaction plaquette-neutrophile. L'intégrine GPIIb/IIIa pourrait donc être un acteur clé de l'interaction entre les plaquettes et les neutrophiles.

En plus de l'activation cellulaire, une autre conséquence de cette interaction à envisager est la phagocytose des plaquettes par les neutrophiles. En effet, les neutrophiles pourraient phagocyter via leurs Fc γ Rs des plaquettes opsonisées par des complexes immuns d'IgG ou des agrégats d'IgG. Une étude récente a mis en évidence *in vitro* des plaquettes internalisées par des neutrophiles chez des patients ayant développés un infarctus du myocarde aigu (216). Dans cette étude, l'interaction plaquette-neutrophile est dépendante de PSGL-1 et de Mac-1, et l'internalisation des plaquettes par les neutrophiles est possible grâce à l'expression de la phosphatidylsérine à la surface des plaquettes activées. Il semble donc que cette internalisation soit indépendante des Fc γ Rs. On pourrait spéculer qu'un tel mécanisme permettrait d'éviter la formation trop importante de thrombi lors du choc allergique. Néanmoins, ce phénomène très peu décrit chez l'homme est controversé car il est uniquement observé à partir d'échantillons de sang prélevés

en EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid*), mais ni en ACD (*acid citrate dextrose*) ni en héparine (217). Il semblerait donc que ce phénomène soit observé uniquement *in vitro* en présence d'EDTA qui démasquerait des déterminants cryptiques sur les glycoprotéines des plaquettes (217).

Au cours d'un choc allergique, les plaquettes et les neutrophiles pourraient donc interagir physiquement après activation par l'expression de nombreuses molécules d'adhésion (conduisant potentiellement à une internalisation des plaquettes par les neutrophiles ?). Une interrogation demeure sur l'enchaînement de ces différents événements et en particulier sur la séquence d'activation.

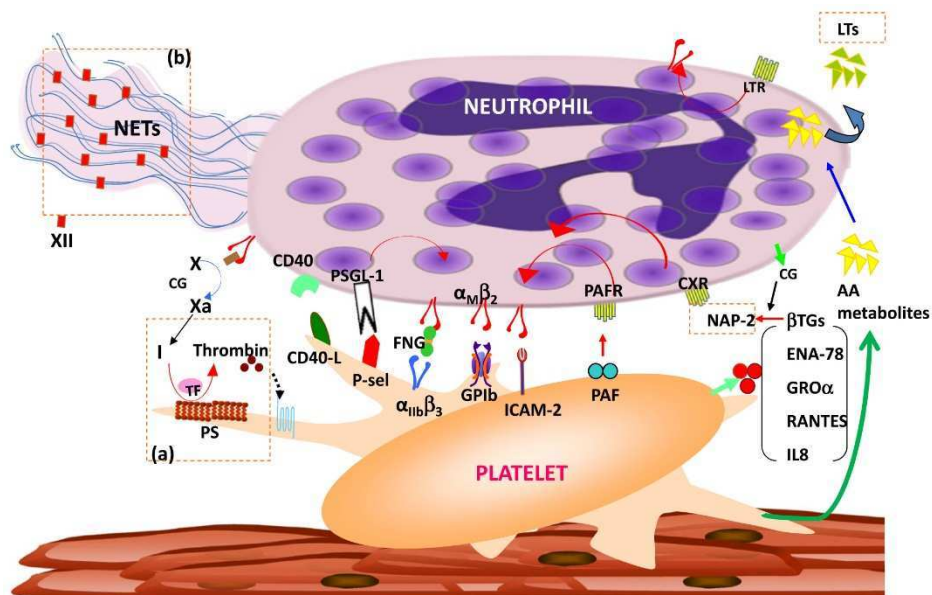


Figure 10 : Résumé des interactions et communications entre une plaquette et un neutrophile (80). GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) et Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$) sur ce schéma.

B. Activation séquentielle ou simultanée ?

Dans la circulation sanguine chez l'homme, on estime qu'il y a environ 300×10^9 de plaquettes circulantes et 5×10^9 de neutrophiles circulants par litre de sang (en extrapolant les données chez la souris aux mêmes unités, on obtient environ 1000×10^9 de plaquettes et 0.5×10^9 de neutrophiles circulants environ par litre de sang chez la souris). On peut donc estimer qu'il y a 60 fois plus de plaquettes que de

neutrophiles chez l'homme et 2000 fois plus de plaquettes que de neutrophiles chez la souris dans la circulation. Aussi bien chez l'homme que chez la souris, ce facteur est déterminant dans la probabilité de rencontre entre plaquettes, neutrophiles et complexes immuns circulants. Chez l'homme, et d'autant plus chez la souris, le nombre de plaquettes étant supérieur à celui des neutrophiles, la probabilité que possède un complexe immunitaire d'interagir avec une plaquette est plus élevée que celle de rencontrer un neutrophile. Nous pouvons faire l'hypothèse que les complexes immunitaires interagissent d'abord avec les plaquettes, ces dernières s'activent via le Fc γ RIIA (expression à leur surface de molécules d'adhésion dont la P-sélectine), puis interagissent/adhèrent à des neutrophiles qui, à leur tour activés par d'autres complexes immunitaires, forment les premiers complexes stables plaquettes-neutrophiles. La réaction s'amplifie grâce à la libération de médiateurs issus des premiers complexes plaquettes-neutrophiles et grâce aux interactions entre des complexes immunitaires et d'autres cellules circulantes.

A l'inverse, les neutrophiles pourraient initier la réaction anaphylactique. Comme supposé dans le chapitre III de la discussion, dans le cas des plaquettes humaines, ces dernières ont possiblement besoin d'une « matrice de présentation » des complexes immunitaires (ou des IgG humaines agrégées dans le cas des essais *in vitro*) pour être activées. Par conséquent, on peut supposer que les neutrophiles sont activés en premier par les complexes immunitaires circulants via le Fc γ RIIA ; puis, les neutrophiles « présentent » les complexes immunitaires aux plaquettes ; ce qui aboutirait finalement à la formation de complexes plaquettes-neutrophiles. Cette deuxième hypothèse pourrait être régulée par la diminution de l'expression du Fc γ RIIA observée à la surface des neutrophiles une heure après induction du choc allergique (167), suggérant une internalisation des complexes immunitaires liés au Fc γ RIIA.

Dans le cas d'une injection d'un bolus de complexes immunitaires (ou un bolus d'IgG humaines agrégées comme dans notre modèle), il semble plus probable que les complexes immunitaires circulants se lient aux Fc γ RIIA et activent de manière simultanée plaquettes et neutrophiles. Cette activation simultanée conduirait à la libération de nombreux médiateurs, dont le PAF, commun aux plaquettes et aux neutrophiles. Chez l'homme, les neutrophiles et les plaquettes exprimant le récepteur au PAF à leur surface, d'autres neutrophiles et d'autres plaquettes pourraient être recrutés à

leur tour simultanément par cette voie parallèle, sans avoir été au préalable stimulés par des complexes immuns. En effet, l'augmentation du volume plaquettaire moyen et la présence d'une population plaquettaire marquant fortement le thiazole orange au cours du choc allergique (article 2) suggèrent une augmentation de la thrombopoïèse qui contribue certainement à l'amplification de la réaction. Il est probable que la formation des complexes plaquettes-neutrophiles soit le produit d'une réaction exponentielle et multifactorielle, par une stimulation directe de cellules par les complexes immuns, ou bien par une stimulation indirecte par le biais de médiateurs libérés par des cellules ayant interagi avec des complexes immuns. Cette activation simultanée expliquerait la sévérité et aussi la rapidité à laquelle se développe la réaction anaphylactique.

C. La fonction biologique des complexes plaquettes-neutrophiles circulants

Nous allons maintenant nous intéresser aux conséquences biologiques d'une telle association. Est-ce une association favorisant l'amplification de la réaction ou au contraire, est-ce un moyen de contenir la réaction qui pourrait être fatale à l'individu en train de développer un choc anaphylactique ?

1. Les complexes plaquettes-neutrophiles amplifient la réaction anaphylactique

Suite à la détection de complexes immuns en circulation, une réponse immunitaire est enclenchée de manière analogue à la reconnaissance d'un agent pathogène dans la circulation. Des complexes plaquettes-neutrophiles circulants sont d'ailleurs aussi mis en évidence chez des patients atteints de sepsis (100,218). Une première hypothèse consiste donc à considérer l'association de ces deux populations comme un mécanisme permettant d'amplifier la réponse immunitaire de manière synergique et prolongée suite à la détection de complexes immuns.

Les médiateurs libérés par les plaquettes activées (dont PF4, sérotonine, thromboxane, et/ou nucléotides (219)) contribuent à l'hypothermie et donc probablement au développement du choc allergique. En effet, dans notre modèle,

une hypothermie est constatée dès les premières minutes après le transfert de surnageant de plaquettes activées (Article 2). Par ailleurs, le rôle majeur des plaquettes dans le choc allergique (Article 2) suggère la libération de médiateurs plaquettaires parmi les conséquences de l'activation plaquettaire. Nous pouvons donc supposer que les plaquettes activées directement par les complexes immuns circulants libèrent leurs médiateurs préformés dans la circulation conduisant à l'augmentation de la perméabilité vasculaire et donc à une hypothermie chez la souris.

Plusieurs observations indiquent que les plaquettes et les neutrophiles libèrent chacun des médiateurs dans le milieu extracellulaire dont la somme a un effet synergique. Comme discuté précédemment, en parallèle de l'activation par les complexes immuns, le PAF est une voie d'activation identifiée qui contribue à amplifier la réaction anaphylactique. Une étude montre que la co-incubation de plaquettes humaines et de neutrophiles humains augmente de manière synergique la production de PAF, comparée à l'activation de chaque cellule isolée l'une de l'autre (220). Par ailleurs, les leucotriènes, médiateurs impliqués dans le choc allergique chez l'homme (221), permettent aussi d'amplifier la réaction grâce à cette association. Plusieurs groupes ont montré que la production d'acide arachidonique par des plaquettes activées amplifie la production de leucotriène B4 par des neutrophiles activés (222,223). A l'inverse, il a été montré que les neutrophiles peuvent fournir aux plaquettes des précurseurs de médiateurs, comme les leucotriènes A4 à partir desquels ces dernières synthétisent les leucotriène C4 (224). La libération de O_2^- (espèce réactive de l'oxygène), PAF, élastase par les leucocytes induit une agrégation et une dégranulation plaquettaire (207). En outre, il est intéressant de noter que l'interaction P-sélectine/PSGL-1 est requise pour la libération de thromboxane B2 (TXB2) et de leucotriènes C4 (discuté dans (80)).

L'ensemble de ces données suggère une communication étroite au sein des complexes plaquettes-neutrophiles qui met en jeu de nombreux médiateurs identifiés comme acteurs du choc allergique et qui amplifient la réaction.

La réaction anaphylactique pourrait être également amplifiée par la formation de *neutrophil extracellular traps* (NETs) par les neutrophiles activés grâce à

l'interaction plaquette-neutrophile. Un rôle bien décrit des NETs est d'« attraper » et d'éliminer les pathogènes extracellulaires dans le sang ou les tissus à l'origine d'une infection (225). Dans le cas du sepsis sévère, il a été montré que les plaquettes amplifient la formation de NETs par les neutrophiles (78). Le sepsis se déclare suite à la présence d'une infection bactérienne et notamment d'une endotoxine bactérienne constituée de lipopolysaccharides (ou LPS) à l'origine de fortes réponses pro-inflammatoires (226). L'étude de Clark *et al.* montre que la présence d'une quantité importante de LPS (cas des patients atteints de sepsis sévère) et la présence de TLR-4 à la surface des plaquettes conduit à une interaction plaquette-neutrophile qui facilite de manière importante la libération de NETs par les neutrophiles (78). En revanche, en l'absence de plaquettes, le LPS n'est pas capable d'induire une libération significative de NETs par les neutrophiles. Toujours dans le sepsis, cette amplification de la NETose par les plaquettes serait dépendante de l'interaction entre GPIb à la surface des plaquettes et CD18 à la surface des neutrophiles (227). La NETose est également observée au cours de pathologies inflammatoires non infectieuses comme le TRALI (ou atteinte pulmonaire aigüe suite à une transfusion) (98), le lupus érythémateux disséminé (228) ou la thrombose (133). Dans le cas de la thrombose, il a été montré que les histones (229,230) sont capables d'induire une adhésion, une activation et une agrégation plaquettaire ; ainsi que la libération de médiateurs plaquettaires qui en retour accentuerait la NETose (133). L'ensemble de ces résultats suggère une participation possible des NETs dans la formation d'un thrombus qui, comme nous allons le voir peut être observé au cours d'un choc allergique.

2. Les complexes plaquettes-neutrophiles limitent la réaction anaphylactique

L'association des plaquettes aux neutrophiles pourrait être un mécanisme « protecteur » en limitant la formation de thrombi pouvant être fatal à l'individu. En effet, nous pourrions supposer que plus un nombre important de plaquettes activées se lie aux neutrophiles, moins elles peuvent interagir entre elles pour s'agréger et former des thrombi dans les petits capillaires de certains organes. Notamment, comme discuté auparavant, la phagocytose par les neutrophiles de plaquettes

activées pourraient également contribuer à limiter les conséquences d'une activation plaquettaire excessive.

Lors d'un choc allergique chez les souris Fc γ RIIA^{tg}, des coupes histologiques révèlent la présence de thrombi et d'œdèmes dans les petits capillaires des poumons (observations non publiées). Cette accumulation de plaquettes dans les poumons est également observée par Yoshida *et al.* dans un modèle actif du choc allergique (231). Un tel phénomène chez l'homme pourrait expliquer les symptômes respiratoires observés en clinique au cours du choc allergique. Par ailleurs, mes expériences sur les souris traitées au romiplostim (utilisé pour augmenter la numération plaquettaire) développent un choc anaphylactique plus sévère que le groupe non traité, qui se caractérise par un choc fatal suite à des convulsions (observation personnelle) (article 2). L'ensemble de ces observations au cours d'un choc allergique chez la souris suggère que les plaquettes forment des thrombi qui pourraient être à l'origine de la sévérité de la réaction. Une étude suggère d'ailleurs qu'une coagulation intravasculaire disséminée (activation de la cascade de coagulation et de la fibrinolyse) serait induite suite à la libération de PAF dans un modèle actif du choc anaphylactique (232).

Ainsi, en l'absence de formation de complexes plaquettes-neutrophiles circulants, nous pourrions anticiper que les plaquettes activées formant davantage de thrombi (notamment dans les poumons) pourraient être à l'origine d'un choc anaphylactique fatal chez l'homme. Le blocage préalable de cette interaction (par exemple un anticorps bloquant anti-P-sélectine) avant le déclenchement du choc allergique chez la souris pourrait nous apporter des éléments de réponses. En effet, si l'interaction plaquettes-neutrophiles est « protectrice », le blocage de cette interaction devrait aggraver la réaction et une accumulation de thrombi dans les poumons plus importante devrait être observée. A l'inverse, le blocage de cette interaction devrait améliorer les symptômes du choc allergique si l'interaction permet d'amplifier la réaction. Néanmoins, comme montré dans la Figure 11, la déplétion des neutrophiles réduit la sévérité de la PSA induite chez des souris Fc γ RIIA^{tg}. Dans cette situation, les plaquettes ne formant plus de complexes avec les neutrophiles ne semblent pas rendre la réaction plus sévère mais au contraire semblent ne plus pouvoir exercer leur rôle nocif dans le choc allergique. L'hypothèse des complexes neutrophiles-plaquettes « protecteurs » doit donc être réfutée.

Néanmoins, l'hypothèse d'une conséquence importante des thrombi pulmonaires et bronchiques dû aux plaquettes dans les symptômes cliniques du choc reste une des hypothèses les plus attrayantes.

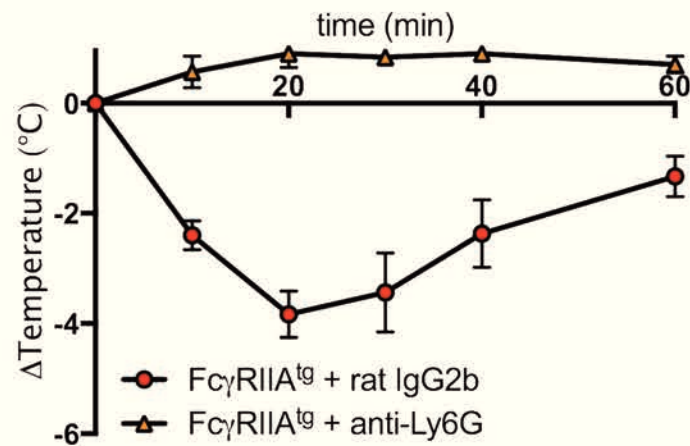


Figure 11 : Rôle des neutrophiles dans la PSA induite par des IgG humaines agrégées dans les souris Fc γ RIIA^{tg}

Evolution de la température au cours d'une PSA induite par des IVlg HA. Des souris Fc γ RIIA^{tg} sont injectées iv avec l'anticorps déplétant anti-Ly6G (n=4) ou avec son isotype contrôle (IgG2b de rat) (n=4) 24 heures avant l'induction du choc allergique. Expérience réalisée deux fois de manière indépendante.

V. Critiques/améliorations du modèle d'étude du choc allergique

Chez l'homme, le choc anaphylactique étant une réaction systémique rapide et sévère (voire mortelle dans certains cas), la priorité est bien évidemment de contrer le choc le plus rapidement possible. Si cela est possible ensuite, prélever des échantillons de sang en vue d'une analyse apporte des réponses d'une grande valeur ; cependant, cela ne permet pas de faire des études mécanistiques. Les modèles d'étude chez la souris permettent dans une certaine mesure de pallier à ce manque de données chez l'homme même s'il ne faut pas oublier que ces modèles ont leurs limites et peuvent parfois mener à des conclusions erronées. Dans ce chapitre partie, je souhaiterais donc confronter plusieurs résultats obtenus chez la souris aux limites des différentes approches/techniques utilisées et, si cela est possible, proposer des alternatives ou des compléments d'étude.

A. Les paramètres de suivi du choc allergique

Les manifestations cliniques du choc allergique diffèrent entre l'homme et la souris. En effet, chez l'homme, les signes cutanéomuqueux (urticaire généralisé, érythème, angioedème), les signes respiratoires (dyspnée, sifflement, bronchospasme) et les signes cardiovasculaires (hypotension, tachycardie, arrêt cardiaque) sont les plus couramment observés et peuvent parfois conduire au décès du patient (1). En outre, dans le choc peranesthésique chez l'homme, l'hypocapnie est corrélée à la sévérité du choc anaphylactique (Gouel-Chéron *et al*, manuscrit en cours de préparation). Chez la souris, quelques signes sont similaires comme la chute de la pression artérielle, certains paramètres respiratoires (la conductance et la compliance pulmonaires (17)) et parfois la mortalité ; et d'autres leur sont propres comme l'hypothermie, la diminution de l'activité physique ou encore la diarrhée. Même si l'hypothermie n'est ni une manifestation clinique avérée chez l'homme, ni un paramètre spécifique de l'anaphylaxie chez la souris, ce paramètre présente l'avantage d'être facilement mesurable et très sensible pour affirmer ou non le développement d'un choc allergique chez la souris. L'activité des souris ou le changement de comportement représenté sous forme d'un score

clinique est un paramètre de suivi subjectif qui est également utilisé (16,233–235). Dans nos expériences, nous avons d'ailleurs constaté que l'activité physique et la température sont corrélées positivement. La diarrhée peut être également quantifiée chez la souris mais ce paramètre est plutôt spécifique d'un choc allergique d'origine alimentaire (236). La mesure de la pression artérielle et des paramètres respiratoires pourraient être une bonne alternative mais nécessitent l'anesthésie des souris, ce qui aggrave le développement de la réaction anaphylactique (observation personnelle). Enfin, la mortalité étant observée principalement dans les modèles actifs, pour lesquels les souris développent un choc très sévère, ne constitue pas un bon paramètre de suivi dans les modèles passifs d'anaphylaxie.

Ainsi, le paramètre de suivi de la température centrale a été choisi dans nos expériences même si ce n'est pas un symptôme représentatif du choc allergique chez l'homme.

B. La nature des ligands aux FcγRs (allergènes et anticorps)

Dans mon étude comparative présentée dans l'article 1 (Beutier, *et al.*, J Aller Clin Imm) (139), la molécule de TNP-BSA représente le ligand « allergène » responsable du choc allergique chez la souris sauvage. La TNP-BSA est constituée d'une molécule de BSA portant 26-36 haptènes de TNP. La substitution du nombre de molécules de TNP ainsi que la dose de TNP-BSA utilisées pour déclencher un choc allergique ont été préalablement optimisées afin de garantir une réponse suffisante pour permettre une comparaison entre les groupes de souris après différents traitements. Comme attendu, le remplacement de la BSA par une autre molécule porteuse des haptènes TNP, l'ovalbumine, induit aussi un choc allergique (237). Par ailleurs, la structure de la molécule de TNP présente un élément caractéristique commun aux curares (anesthésiant parfois à l'origine de réactions anaphylactiques chez l'homme (1)) : ces deux molécules portent au moins deux ammonium quaternaires qui sont suspectés d'être à l'origine du choc allergique après anesthésie aux curares (238). Dans notre modèle d'étude, la molécule de TNP-BSA par sa structure et son administration intraveineuse pourrait donc être assimilée à un curare. Continuons sur l'exemple d'un curare, si l'on compare la dose de bromure

de rocuronium utilisée pour induire l'anesthésie chez l'homme (0.6 à 2 mg/kg (239)) à celle utilisée pour la TNP-BSA (200 µg pour une souris de 20 g soit 10 mg/kg), il existe approximativement un facteur 5 à 20 entre l'homme et la souris. La dose de TNP-BSA chez la souris un peu augmentée comparée au bromure de rocuronium chez l'homme reste réaliste contrairement à un autre modèle de choc allergique induit par des cacahuètes dans lequel la dose utilisée pour déclencher le choc allergique est de 350 mg de beurre de cacahuètes pour une souris de 20 g (240), correspondant à 1.4 kg de cacahuètes pour un homme de 80 kg !

L'autre modèle de ligand que nous avons utilisé pour induire un choc anaphylactique chez la souris (Article 2 + (167)) sont les IVIg agrégées constituées d'un mélange d'IgG humaines. Ce modèle, « artificiel » au premier abord, est représentatif de la capacité des complexes immuns à agréger les FcγRs et également de la présence relative des différentes sous-classes d'IgG humaines circulantes avec la prédominance des IgG1 (63% d'IgG1, 29% IgG2, 5% IgG3, 3% IgG4). Comme discuté précédemment, les IgG1 humaines anti-TNP sont d'ailleurs suffisantes pour déclencher le choc anaphylactique (dans les souris FcγRIIA^{tg}) après injection de la TNP-BSA (chapitre I de la discussion, Figure 6). Par ailleurs, la sous-classe IgG1 d'un anticorps monoclonal administré en immunothérapie chez l'homme peut être à l'origine de chocs anaphylactiques (par exemple le cetuximab (150)). Les IVIg agrégées utilisées dans notre modèle d'étude pourraient donc être représentative d'une immunothérapie à l'origine d'un choc anaphylactique chez l'homme.

Ces deux ligands, les complexes immuns formés *in vivo* ou les IVIg agrégées par la chaleur, présentent l'avantage d'agréger les FcγRs conduisant à une activation cellulaire dont la libération de médiateurs aboutit à une hypothermie reproductible et suffisamment importante pour observer une différence de température entre les différents groupes de souris. Dans l'objectif d'améliorer ce modèle d'étude, il serait peut-être plus représentatif d'utiliser un allergène qui par nature est capable d'induire un choc allergique chez l'homme, par exemple un curare pour mimer l'anaphylaxie médicamenteuse ou un venin d'hyménoptère pour mimer une anaphylaxie suite à une pique de guêpe. Ces travaux sur la nature de l'allergène, actuellement en cours de développement dans notre laboratoire, permettront

d'approcher davantage les conditions « réelles » d'un choc allergique chez l'homme.

C. Un modèle de choc allergique plus représentatif de la situation chez l'homme

Comme nous l'avons vu, dans le cas de mon étude comparative sur les différentes sous-classes d'IgG (article 1 ; (139)), le modèle passif peut s'avérer être très informatif. En effet, l'avantage de ce modèle est qu'il permet de décomposer le système en étudiant séparément la voie engagée par chaque sous-classe d'IgG. Les études sur le choc allergique se concentrent sur les IgE et les IgG mais d'autres classes d'immunoglobulines telles que les IgA pourraient contribuer. Les IgA (2-3 mg/mL) constituent la deuxième classe d'immunoglobuline dominante en circulation après les IgG (12 mg/mL) (241). En outre, le FcαRI (récepteur aux IgA) est exprimé notamment à la surface des neutrophiles, des monocytes et quelques macrophages tissulaires (242). Plusieurs études montrent d'ailleurs une activation des neutrophiles après engagement du FcαRI à leur surface : dégranulation, explosion oxydative, libération de cytokines, médiateurs inflammatoires et NETs (243,244). Dans le contexte de l'asthme allergique, une étude montre la présence d'IgA spécifiques dans les expectorations de patients asthmatiques sensibilisés à un acarien (*Dermatophagoides farinae*)(245). L'ensemble de ces données suggère une possible participation de la voie des IgA dans le choc anaphylactique qui n'a pour le moment pas été étudiée.

Bien que les modèles passifs permettent d'évaluer l'importance d'une sous-classe ou d'une classe d'immunoglobuline, ils ne reflètent qu'une partie de la complexité du système. Pour étudier le mécanisme du choc allergique dans son ensemble chez la souris, il serait intéressant de compléter les résultats obtenus à l'aide d'un modèle d'anaphylaxie systémique active. Comme chez l'homme, le modèle actif comprend une phase de sensibilisation qui aboutit à une réponse polyclonale et à la production des différentes classes d'immunoglobulines circulantes dirigées contre l'allergène en cause. La présence simultanée de plusieurs classes d'immunoglobulines polyclonales spécifiques n'est pas prise en compte dans

le modèle passif. En effet, si nous prenons l'exemple des mastocytes humains exprimant le Fc γ RIIA, le Fc ϵ RI et le Fc γ RI (après induction *in vitro* par de l'IFN- γ) à leur surface, la stimulation simultanée de ces récepteurs conduit à une dégranulation augmentée des mastocytes (246). Nous pouvons donc supposer que la présence simultanée de plusieurs classes d'immunoglobulines amplifie ou même régule négativement (après co-engagement avec le Fc γ RIIB) la réaction anaphylactique. L'observation d'un taux important de mortalité dans les modèles actifs en comparaison des modèles passifs pourrait notamment être expliquée par l'action simultanée de différentes classes d'immunoglobulines. Par ailleurs, il existe probablement aussi une compétition au sein des classes d'immunoglobulines pour fixer l'allergène.

D. Modèle d'étude des récepteurs Fc aux IgG

1. Les souris *knock-out*

L'approche consistant à utiliser des souris déficientes pour un Fc γ R spécifique permet d'étudier l'impact du manque de ce récepteur dans le choc allergique mais présente certaines limites dans l'interprétation de son rôle exact dans la pathologie.

Comme montré dans l'article 1, les souris déficientes pour un Fc γ R spécifique peuvent avoir des expressions altérées des autres Fc γ Rs (139). Par exemple, les souris déficientes pour le Fc γ RIII expriment davantage de Fc γ RIIB inhibiteur à la surface des neutrophiles et des monocytes Ly6C^{lo}. Ainsi, dans les souris Fc γ RIII^{-/-}, la contribution potentielle des autres Fc γ Rs activateurs (Fc γ RI et Fc γ RIV) pourrait être amoindrie/masquée par l'inhibition induite par le Fc γ RIIB surexprimé à la surface des neutrophiles et des monocytes Ly6C^{lo}. Le rôle nécessaire que mon travail attribue au Fc γ RIII dans les trois modèles d'anaphylaxie passive pourrait donc être surévalué. A l'inverse, les souris déficientes pour le Fc γ RIIB ont une expression augmentée du Fc γ RIII et du Fc γ RIV. Cette augmentation pourrait accentuer la sévérité du choc allergique dans les souris Fc γ RIIB^{-/-} et pourrait surévaluer le rôle inhibiteur du Fc γ RIIB dans les PSA induite par des IgG1 et des IgG2b (139). En revanche, les souris déficientes pour le Fc γ RIV ne semblent pas avoir d'expression altérée des autres Fc γ Rs et constituent un bon modèle pour étudier la contribution de ce Fc γ R. Par

ailleurs, les souris déficientes pour la sous-unité γ (Fc γ R) initialement créées pour évaluer la contribution du Fc γ RIII et du Fc ϵ RI chez la souris ont certainement abouti à des conclusions un peu hâtives (247). En effet, les trois Fc γ Rs activateurs murins (Fc γ RI (248), Fc γ RIII et Fc γ RIV) requièrent la présence de Fc γ pour être exprimés à la surface de la cellule et être fonctionnels. Par ailleurs, en plus des Fc γ Rs, d'autres récepteurs utilisent Fc γ comme unité de signalisation intracellulaire, par exemple le complexe du TCR (*T-cell receptor*) à la surface des cellules NK (249), le récepteur au collagène GPVI à la surface des plaquettes (171), OSCAR, Mincle, etc (250,251). Ainsi, les souris déficientes pour Fc γ présentent de nombreux dysfonctionnements en raison de l'absence de plusieurs récepteurs et glycoprotéines de surface, leur utilisation a très probablement surestimé le rôle attribué aux Fc γ RIII et aux Fc ϵ RI.

Avant de conclure sur le rôle d'un Fc γ R en particulier, il est donc nécessaire de garder à l'esprit que les souris déficientes pour un Fc γ R particulier ou pour Fc γ présentent des inconvénients qui sont inhérents au modèle d'étude.

2. Les anticorps bloquants

Une autre approche pour étudier la contribution de chacun des Fc γ Rs consiste à utiliser des anticorps bloquants « spécifiquement » un Fc γ R. Cependant, ces anticorps bloquants ont le plus souvent été testés dans le contexte d'un seul Fc γ R exprimé à la surface d'une cellule et non pas de plusieurs Fc γ Rs coexprimés à la surface d'une même cellule. En effet, une fois la portion Fab de l'anticorps bloquant liée à son Fc γ R cible, la portion Fc libre est potentiellement capable de lier d'autres Fc γ Rs adjacents, même si ceux-là sont de faible affinité et ne devraient donc pas se lier à des anticorps sous forme monomérique. Le blocage dit « spécifique » est donc parfois remis en cause pour certains anticorps utilisés par le passé : c'est le cas du Fc γ RIV. Une étude récente a montré que l'anticorps bloquant le Fc γ RIV par sa portion Fab, bloque aussi le Fc γ RIII présent à la surface d'une même cellule par sa portion Fc (252). Cette cellule aurait alors une capacité moindre à interagir avec les complexes immuns IgG/antigène en circulation via le Fc γ RIII et cela induirait un choc moins sévère voire une abolition du choc, conduisant finalement à une erreur d'interprétation sur le rôle nécessaire attribué au Fc γ RIV. Il est probable que le rôle de ce récepteur évalué chez les souris sauvages ait donc été surévalué par cette

approche; néanmoins, l'utilisation de souris exprimant uniquement le Fc γ RIV dans cette même publication a montré que ce récepteur reste suffisant à induire un choc allergique (141).

Le rôle nécessaire du Fc γ RIIA dans les souris VG1543 (167) ainsi que son rôle suffisant dans les souris Fc γ RIIA^{tg} (article 2 + (140)) ont été déterminés suite à l'utilisation d'un anticorps bloquant le Fc γ RIIA. Comme décrit ci-dessus avec l'anti-Fc γ RIV bloquant, il faut rester prudent quant à l'utilisation des anticorps bloquants. Néanmoins, le rôle suffisant du Fc γ RIIA repose sur deux approches différentes qui aboutissent à la même conclusion : l'utilisation des souris Fc γ RIIA^{tg}Fc γ R^{null} en comparaison des souris Fc γ R^{null} et l'utilisation de l'anticorps bloquant le Fc γ RIIA dans les souris Fc γ RIIA^{tg}Fc γ R^{null} (Article 2). Nous pouvons donc proposer l'hypothèse que chez l'homme le Fc γ RIIA serait suffisant à induire un choc allergique.

Pour remédier au problème de la liaison non spécifique de certains anticorps bloquants par leur portion Fc d'autres Fc γ Rs, l'utilisation de Fab pourrait être une bonne alternative. Néanmoins, leur principal inconvénient étant leur temps de demi-vie très court, une utilisation des Fab *in vivo* nécessite une adaptation du protocole d'administration (augmentation de la dose, répétitions des injections). La solution que nous avons choisie consiste à cloner ces anticorps dans une matrice d'IgG1 humaine mutée afin de ne plus pouvoir se lier aux Fc γ Rs.

3. Les souris transgéniques

Les souris transgéniques permettent une étude mécanistique du choc allergique avec un ou plusieurs Fc γ Rs humains. Cependant, deux désavantages majeurs du transgène sont que l'emplacement du transgène dans le génome est inconnu et que, même s'il est sous le contrôle de son propre promoteur, son expression n'est pas toujours fidèle à l'expression humaine. Ceci est par exemple le cas des souris Fc γ RI^{tg} qui expriment de manière constitutive le Fc γ RI à la surface des neutrophiles alors que son expression est uniquement induite à la surface des neutrophiles humains activés (253). Cependant avec cette approche, l'expression cellulaire du Fc γ RIIA dans les souris Fc γ RIIA^{tg} semble correspondre à celle observée chez l'homme (160). Un autre inconvénient du transgène est l'intégration dans le génome de multiples copies qui,

dans un premier temps, peuvent augmenter ou diminuer l'expression d'autres gènes non ciblés et, dans un deuxième temps, peuvent se perdre progressivement au cours des générations de souris. Par exemple, dans les souris Fc γ RIIA^{tg}, l'expression du Fc γ RIIA évaluée par cytométrie en flux sur plusieurs générations de souris a permis de garantir que son expression était bien stable au cours du temps.

4. Les souris *knock-in*

La contribution des Fc γ Rs humains a également été évaluée à l'aide des souris VG1543 (167) dans lesquelles le locus murin de chaque Fc γ R a été remplacé par le locus du Fc γ R humain équivalent. Il s'agit donc d'un *knock-in* d'une seule copie de chacun des Fc γ Rs humains (excepté le gène codant le Fc γ RI humain qui n'est pas contenu dans ce locus) sous le contrôle de son propre promoteur et dans le contexte de son environnement génomique. Cela laisse anticiper que l'expression cellulaire de chacun de ces Fc γ Rs humains est bien représentative de celle observée chez l'homme. Effectivement, l'expression cellulaire de ces souris semble correspondre malgré quelques différences mineures (167). Il est important de noter que les souris VG1543 expriment encore le Fc γ RI de souris. D'après deux études, ce récepteur ne semble pas participer à la réaction anaphylactique (article 1 ;(139) ; Gillis, *et al. J Autoimmunity*), à la différence du Fc γ RI humain exprimé sous forme de transgène dont la contribution a été rapportée (165). En effet, dans un modèle de souris Fc γ RI^{tg} exprimant encore le Fc γ RIV murin, le Fc γ RI est suffisant à induire un choc allergique après blocage préalable du Fc γ RIV à l'aide d'un anticorps bloquant. Ce résultat reste néanmoins à être confirmé dans un modèle de souris n'exprimant plus aucun Fc γ R murin.

L'utilisation des souris Audrey (*knock-in* de l'ensemble des Fc γ Rs humains en remplacement de l'ensemble des Fc γ Rs murins) est un outil qui comble les lacunes des souris VG1543 et permettrait de confirmer ou infirmer certains résultats obtenus par le passé avec d'autres modèles. La contribution des Fc γ Rs humains dans ces souris est en cours d'analyse, et semble confirmer les résultats obtenus avec les souris VG1543.

E. Modèle d'étude des cellules myéloïdes et des plaquettes

A l'aide de deux approches différentes, la première reposant sur l'utilisation d'un anticorps déplétant les neutrophiles, la deuxième reposant sur l'utilisation de souris neutropéniques, plusieurs études de mon équipe, dont la mienne, montrent que les neutrophiles sont nécessaires au développement du choc allergique (139,167,140,141).

Les souris Gfi1-GFP, dans lesquelles le facteur de répression de transcription Gfi1 a été remplacé par un gène codant pour la GFP (*green fluorescent protein*), sont incapables de développer des neutrophiles matures et fonctionnels ; en revanche elles peuvent différencier des macrophages matures capables d'avoir des réponses proinflammatoires augmentées comparées aux souris sauvages (254). Néanmoins, l'uniformité des résultats sur le rôle des neutrophiles dans mon étude (139) montrent que les macrophages ne semblent pas affectés lors du choc allergique dans ces souris.

L'utilisation d'un anticorps déplétant les neutrophiles est l'approche la plus couramment utilisée pour étudier l'effet de l'absence de neutrophiles. On peut différencier les anticorps qui reconnaissent les molécules Ly6G et Ly6C (anti-Gr1) ; et les anticorps qui reconnaissent uniquement la molécule Ly6G (anti-Ly6G). Comme indique sa double spécificité, des monocytes Ly6C^{hi} peuvent être déplétés en plus des neutrophiles (décrit dans la revue (255)). A l'aide d'un anti-Ly6G (clone NIMPR-14), je montre que les neutrophiles sont nécessaires en PSA induites par des IgG2a/2b (139) ; néanmoins, je note aussi une diminution du nombre de monocytes, ce qui suggère que cet anticorps n'est pas non plus spécifique des neutrophiles. Cette donnée est donc à prendre en considération en analysant les résultats obtenus et pourrait surestimer le rôle des neutrophiles. Un autre désavantage de cette approche est que la déplétion par anticorps pourrait « occuper » les macrophages qui ne seraient alors plus en mesure de répondre à l'induction du choc allergique. En effet, les macrophages « occupés » à phagocyter les neutrophiles via leurs FcγRs seraient dans l'incapacité d'interagir avec les complexes immuns circulants. Une autre hypothèse à envisager est une éventuelle consommation du complément après injection de l'anticorps déplétant qui pourrait activer et désensibiliser certaines cellules avant l'induction du choc ; mais cette hypothèse est peu probable car la

déplétion du complément avant injection d'anti-Ly6G ne semble pas affecter le nombre de neutrophiles circulants comparé au groupe ayant uniquement reçu l'anti-Ly6G (256). Ainsi, la simple déplétion des neutrophiles pourrait affecter d'autres populations cellulaires, par la non spécificité de l'anticorps ou par l'occupation de leurs FcγRs, ce qui pourrait conduire à une surévaluation de leur rôle dans les différents modèles du choc allergique.

Auparavant, seules quelques équipes ont étudié superficiellement le rôle des plaquettes chez des souris sauvages dans un modèle actif du choc allergique. Une équipe observe une thrombocytopénie et une neutropénie quarante minutes après induction d'un choc anaphylactique (235) mais aucune analyse plus approfondie pour expliquer le phénomène n'est mentionnée. Dans un modèle dépendant des IgG, des monocytes/macrophages et du FcγRIII, à l'aide d'un sérum de lapin anti-plaquettes, l'équipe de Finkelman observe une diminution de la sévérité du choc dans les souris sauvages Balb/c ; cependant, d'après eux, cette contribution ne serait pas réelle et serait la conséquence d'une désensibilisation des macrophages suite à l'injection du sérum anti-plaquettes. La déplétion des plaquettes obtenue ensuite par une autre approche indépendante des FcγRs (injection de neuraminidase, mécanisme de désialylation des plaquettes) ne révèle d'ailleurs aucune contribution de cette population (16). Ainsi, les plaquettes ne contribueraient pas à la réaction anaphylactique dans des souris sauvages.

L'anticorps de déplétion plaquettaire utilisé dans l'article 2 (anticorps anti-GPIbα) est un anticorps qui déplete efficacement et spécifiquement les plaquettes indépendamment des FcγRs. En effet, nous avons observé une déplétion plaquettaire dans les souris FcγR^{null} qui est similaire aux souris FcγRIIA^{tg} (alors que la déplétion des plaquettes induite par l'anticorps 6A6 est FcγR-dépendant). Ce mécanisme de déplétion plaquettaire repose sur une thrombocytopénie qui fait suite à une activation des plaquettes induisant la translocation cellulaire d'une enzyme à l'origine de la désialylation du GPIbα (de manière similaire à la neuraminidase exogène utilisée par l'équipe de Finkelman) (257). En effet, les plaquettes dont le GPIbα est désialylé sont reconnues par le récepteur d'Ashwell-Morel présents à la surface des hépatocytes et sont ensuite éliminées de la circulation par ce mécanisme (257). Par ailleurs, comme mentionnée

précédemment, les anticorps anti-GPIIb α induisent une activation des plaquettes (permettant la translocation cellulaire de l'enzyme) indépendante du Fc γ RIIA qui pourrait être corrélée à une hypothermie survenant quelques minutes après l'injection de cet anticorps chez les souris (observations non publiées). Par conséquent, on ne peut exclure une activation indirecte des cellules circulantes (neutrophiles, monocytes etc.) via les médiateurs libérés par les plaquettes activées. Suite à l'injection de cet anticorps déplétant, ces populations cellulaires désensibilisées ne seraient alors plus en mesure de répondre au choc allergique. Dans notre modèle d'étude, nous limitons ce phénomène en induisant la thrombocytopénie trois jours avant le déclenchement du choc allergique. Néanmoins, cette approche a donc aussi ses limites et pourrait surévaluer le rôle nécessaire attribué aux plaquettes dans les souris Fc γ RIIA^{tg}. Un autre anticorps nommé 6A6 (IgG2a de souris) dont la cible plaquettaire reste inconnue à ce jour, permet aussi une déplétion efficace des plaquettes ; mais il présente le désavantage d'être Fc γ R-dépendant, ce qui ne constitue pas un outil adapté à notre modèle d'étude de choc allergique qui est dépendant des Fc γ Rs. Néanmoins, nous avons pu reproduire un effet bénéfique de la déplétion plaquettaire dans le choc allergique en utilisant cette approche (observations non publiées).

En plus des anticorps déplétants, les expériences de transfert de plaquettes ou de surnageant de plaquettes activées dans des souris résistantes au choc allergique ont également permis de mettre en évidence une contribution des plaquettes (Article 2).

Enfin, une dernière approche possible pourrait être d'utiliser des souris transgéniques pour le récepteur à la toxine diphtérique. Ces souris expriment le récepteur à la toxine diphtérique uniquement à la surface des cellules positives pour le PF4 (plaquettes et mégacaryocytes). Après injection de la toxine diphtérique, plus de 99% des plaquettes circulantes exprimant le récepteur à la toxine sont déplétées (258). Cette approche pourrait s'avérer utile dans l'étude du rôle des plaquettes dans le choc allergique car elle induit une thrombocytopénie indépendante des Fc γ Rs. Néanmoins, cela requiert le croisement de ces souris transgéniques avec nos souris humanisées pour les Fc γ Rs humains.

D'autres agents utilisés dans notre étude, le romiplostim pour stimuler la thrombopoïèse ou le clodronate pour inactiver les monocytes/macrophages ne sont pas sans effet secondaire non plus. En effet, le romiplostim, un analogue de la thrombopoïétine (TPO), pourrait stimuler non seulement la production de plaquettes mais aussi la production d'autres cellules. Une analyse effectuée à l'hémathomètre après le protocole de traitement des souris $Fc\gamma RIIA^{tg}$ au romiplostim montre effectivement une augmentation en nombre d'autres cellules circulantes (granulocytes, monocytes, éosinophiles, lymphocytes) (Figure 12). L'augmentation du nombre de granulocytes et de monocytes, contribuant aussi au choc allergique, pourrait expliquer en partie la sévérité augmentée et la mortalité des souris $Fc\gamma RIIA^{tg}$ traitées préalablement au romiplostim. Il faut donc rester prudent quant à la corrélation entre le nombre de plaquettes et la sévérité du choc allergique.

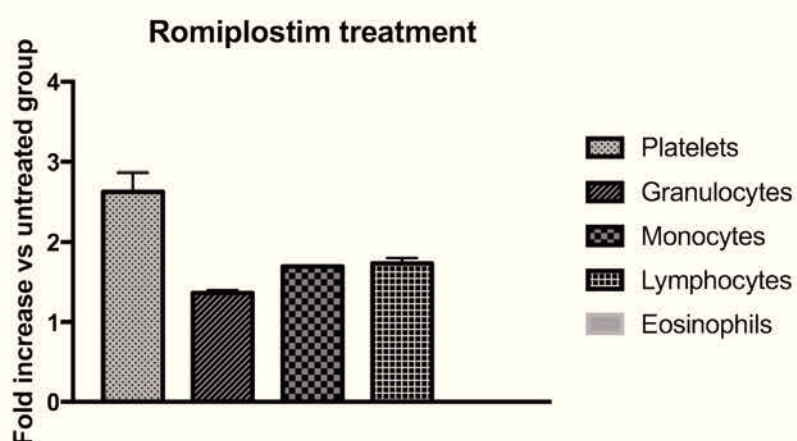


Figure 12 : Effet du romiplostim sur les autres populations circulantes dans les souris $Fc\gamma RIIA^{tg}$
Représentation du nombre de monocytes, granulocytes, éosinophiles et lymphocytes circulants dans les souris $Fc\gamma RIIA^{tg}$ non traitées (n=3) ou traitées (n=3) avec du romiplostim à 50 mg/kg à J0 et J3. Mesure effectuée à J6 à l'aide d'un hémathomètre.

De même, l'administration de liposomes contenant du clodronate n'est pas un traitement anodin. Comme montré dans mon étude, en plus de la déplétion des monocytes/macrophages, les liposomes-clodronate (mais pas les liposomes-PBS) induisent une augmentation du nombre de neutrophiles circulants (139). Cette observation pourrait suggérer que les neutrophiles circulants sont activés, soit directement par le clodronate soit par les monocytes/macrophages rentrant en apoptose après ingestion du clodronate, et cela conduit à un recrutement massif de neutrophiles en circulation. Nous pouvons faire une première hypothèse suivant

laquelle les monocytes/macrophages en apoptose sont éliminés de la circulation par les neutrophiles par le mécanisme de phagocytose. Dans un modèle d'inflammation pulmonaire induit par du LPS, une équipe s'est intéressée à la phagocytose effectuée par des neutrophiles quand celle effectuée par les macrophages est insuffisante. Dans ce modèle d'inflammation, les macrophages inférieurs en nombre comparé aux neutrophiles, les neutrophiles contribuent par phagocytose à l'élimination des neutrophiles en apoptose (soit un phénomène de « cannibalisme ») (259). Nous pourrions alors spéculer que le nombre augmenté de neutrophiles circulants observé après administration du clodronate permet d'aider à éliminer de la circulation les monocytes/macrophages en apoptose. Ainsi, il est probable que les neutrophiles « occupés » à phagocyter les monocytes/macrophages ne soient plus disponibles lors de l'induction du choc allergique, ce qui pourrait expliquer aussi l'abolition presque totale du choc allergique après traitement des souris sauvages avec des liposomes-clodronate (139). Néanmoins, cette hypothèse est peu probable en raison de la taille des neutrophiles nettement inférieure à celle des macrophages. Une deuxième hypothèse possible de la neutrophilie observée après traitement par le clodronate est que les neutrophiles « âgés », ne pouvant plus être éliminés de la circulation par les macrophages déplétés, s'accumulent progressivement dans la circulation. En effet, en plus de la neutrophilie, une augmentation du nombre de basophiles circulants est observée (139), dont l'accumulation pourrait aussi être expliquée par ce phénomène. Cette deuxième hypothèse est, à mon avis, la plus plausible.

De la même manière que pour le rôle attribué aux neutrophiles et aux plaquettes, le rôle attribué aux monocytes/macrophages dans le choc allergique doit donc être affirmé avec précaution en raison de la perturbation de l'homéostasie induite par l'ensemble de ces différents traitements.

La souris diffère de l'homme par de nombreux aspects, c'est pourquoi le modèle murin est perpétuellement modelé et amélioré au fur et à mesure des données acquises sur l'homme. Il est possible non seulement de transférer des cellules humaines aux souris (par exemple, des neutrophiles humains (141)), mais aussi d'utiliser des modèles de souris de plus en plus « humanisés » en y faisant exprimer

des gènes humains. En effet, en plus de l'expression des Fc γ Rs humains, des modèles de souris sont maintenant capables de produire des IgE et/ou des IgG humaines (des souris capables de produire des IgG1 humaines sont présentes dans notre laboratoire mais leur utilisation est pour l'instant limitée en raison de problèmes liés à la commutation de classes et notamment une coproduction d'IgG1 humaines et d'IgG murines après immunisation), de différentier des neutrophiles humains (260) ou des plaquettes humaines (à la condition de dépléter préalablement les macrophages murins)(261). Ces modèles se veulent toujours un peu plus proche de la situation chez l'homme.

Pourtant, une souris la plus humanisée qui soit ne sera jamais l'équivalent de l'homme. C'est pourquoi, malgré les conditions d'urgence dans lesquelles survient le choc allergique, l'analyse d'échantillons de sang de patients ayant développé un choc allergique est primordiale pour confronter les résultats obtenus chez la souris aux données cliniques de l'homme. L'étude clinique NASA (*Neutrophil activation during systemic anaphylaxis*) menée par différents hôpitaux et deux équipes de recherche en collaboration dont la nôtre, montre une corrélation entre l'augmentation de l'expression du marqueur d'activation plaquettaire P-sélectine et la sévérité du choc (grades de sévérité 1 à 4) chez des patients ayant développé un choc anaphylactique aux curares (résultat préliminaire en cours d'analyse, article 2). Par ailleurs, une autre étude mentionne une thrombocytopénie de 60% observée chez deux patients ayant développé un choc anaphylactique à des antibiotiques (observations non publiées dans (232)). Ces données cliniques pourraient confirmer mes observations chez la souris et, à plus grande échelle, renforcerait l'idée que chez l'homme les plaquettes jouent un rôle majeur dans le choc allergique, ce qui ouvrirait l'accès à de nouvelles pistes thérapeutiques (voir article 2).

VI. Enseignements tirés des modèles murins : « mieux » traiter l'anaphylaxie chez l'homme

A l'heure actuelle, le choc allergique peut être mortel dans certains cas et il existe uniquement un traitement symptomatique qui consiste principalement en l'administration d'adrénaline. Au vue du mécanisme physiopathologique mis en évidence au cours de mon projet de thèse, différentes stratégies thérapeutiques sont proposées pour contrer le développement du choc anaphylactique chez l'homme.

A. Bloquer l'interaction IgG-Fc γ RIIA

L'interaction entre les complexes immuns (IgG spécifiques associées à l'allergène) et les Fc γ Rs activateurs est une première étape dans l'activation cellulaire. Nous allons donc examiner différentes options pour empêcher cette interaction, et en particulier l'interaction majeure IgG-Fc γ RIIA.

1. Entrer en compétition avec les complexes immuns circulants

Suite à la deuxième rencontre avec l'allergène, les IgG spécifiques synthétisées lors de la phase de sensibilisation forment avec l'allergène des complexes immuns ayant une forte avidité pour les Fc γ Rs dont le Fc γ RIIA. Une première stratégie thérapeutique serait d'administrer des IgG non spécifiques, qui ne reconnaissent pas l'antigène, en quantité suffisante pour entrer en compétition avec les complexes immuns circulants interagissant avec le Fc γ RIIA.

L'administration d'immunoglobulines intraveineuses (IVIg) dans le cas d'un choc allergique est une option intéressante à examiner (à différencier des IVIg agrégées, donc non monomériques, utilisées dans notre modèle de choc allergique chez la souris). Les IVIg sont un mélange polyclonal d'IgG (l'IgG est l'isotype dominant mais il y a aussi présence d'IgA et d'IgM en très faibles quantités) issu de plasmas de plusieurs milliers de donneurs différents. Le contrôle qualité consiste notamment à éliminer les éventuels agrégats d'IgG circulants dans le mélange qui pourraient

activer les Fc γ Rs. La première utilisation des IVIg date de 1951 ; administré par Ogden Bruton chez un patient présentant une agammaglobulinémie pour pallier au manque d'immunoglobulines. Puis, leur utilisation en clinique s'est progressivement étendue à d'autres maladies auto-immunes et inflammatoires telles que les thrombocytopénies auto-immune et néonatale alloimmune, les neutropénies auto-immunes ou encore l'uvéite (262–267).

L'activité thérapeutique des IVIg semble dépendante de plusieurs mécanismes (268). Un premier mécanisme pour expliquer leur propriété anti-inflammatoire serait leur entrée en compétition avec les IgG mises en cause dans la pathologie. En effet, la forte quantité d'IVIg présentes en circulation pourrait empêcher l'accès des IgG monomériques anti-allergène aux Fc γ Rs activateurs de forte affinité et au FcRn (les Fc γ Rs de faible affinité ne liant que les complexes immuns). L'action par le FcRn, occupé à recycler les IgG de type IVIg et donc moins les IgG monomériques de type « pathogène » (ici anti-allergène), permettrait de diminuer la demi-vie de ces dernières, et par conséquent de réguler à la baisse une activation cellulaire par les Fc γ Rs activateurs de forte affinité. L'efficacité thérapeutique des IVIg via le FcRn a d'ailleurs été montrée dans un modèle de pemphigoïde bulleuse (maladie auto-immune caractérisée par l'apparition de bulles sous la peau, liée au dépôt d'anticorps dirigés contre des desmosomes/hémidesmosomes)(269). Un autre mécanisme possible serait que, suite à l'administration des IVIg, une conformation ITAMi des Fc γ Rs activateurs soit induite, rendant impossible l'activation par ces Fc γ Rs (comme discuté précédemment). En prenant en considération ces mécanismes d'action dans le choc allergique, nous pourrions donc anticiper que l'administration d'IVIg bloque non seulement l'accès des IgG monomériques et des complexes immuns circulants au Fc γ RI, mais aussi que le Fc γ RIIA sous conformation inhibitrice ne puisse plus interagir avec les complexes immuns circulants. En outre, le temps de demi-vie diminué des IgG « pathogènes » pourrait contribuer à éliminer plus rapidement ces IgG « pathogènes » avant de former davantage de complexes immuns circulants.

En plus de l'administration des IVIg classiques, une modification préalable de leur profil de glycosylation permettrait d'augmenter leur efficacité. Plusieurs études ont évalué l'importance de la glycosylation des IVIg utilisées dans différents modèles chez la souris. Dans un modèle de thrombocytopénie auto-immune, il est montré

que la glycosylation est nécessaire à l'activité anti-inflammatoire des IVIg pour limiter la phagocytose des plaquettes (270). En particulier, la présence des acides sialiques sur la portion Fc des IgG est essentielle à cette activité dans un modèle d'arthrite induit par des complexes immuns ; et à l'inverse, l'enrichissement en acides sialiques multiplie par dix les propriétés anti-inflammatoires des IVIg (189). Une autre étude montre qu'en plus des résidus d'acide sialique, des IgG1 enrichies en galactose bloquent la voie de signalisation pro-inflammatoire grâce à une coopération entre le FcγRIIB inhibiteur et dectine-1 (récepteur reconnaissant les polysaccharides de type β-glucanes) (271). Un mécanisme dans lequel l'activité anti-inflammatoire des IVIg implique le FcγRIIB avait d'ailleurs déjà été mentionné dans un modèle d'arthrite montrant une augmentation de l'expression du FcγRIIB à la surface des macrophages après traitement (272). Dans le cas du choc allergique, nous pourrions imaginer que l'administration d'IVIg enrichies en acide sialique et en galactose induirait une augmentation de l'expression du FcγRIIB à la surface des neutrophiles (faiblement exprimé à l'état basal) qui modulerait les signaux activateurs émis par le FcγRIIA à leur surface.

L'administration d'IVIg en cas de choc allergique induit par des IgG chez l'homme est donc une stratégie thérapeutique qui pourrait être envisagée pour empêcher à la fois l'interaction des complexes immuns allergène-IgG au FcγRIIA et, après modification du profil de glycosylation, favoriser une réponse anti-inflammatoire induite par la coopération entre le FcγRIIB et les lectines (par exemple dectine-1). En outre, cette stratégie thérapeutique ne prend pas en compte la voie dépendante des IgE qui, selon les cas, contribue exclusivement ou en complément de la voie dépendante des IgG.

2. Diminuer la concentration circulante de complexes immuns

A l'état basal, les plaquettes et les neutrophiles n'expriment pas ou peu de FcγRIIB à leur surface pouvant capter les complexes immuns circulants. Les signaux activateurs, principalement émis par le FcγRIIA de ces deux populations, ne peuvent donc pas être modulés directement par le FcγR inhibiteur membranaire. Une option thérapeutique potentielle pourrait être de pallier à ce manque d'expression membranaire en administrant des molécules capables de capter les complexes

immuns circulants afin d'empêcher leur interaction avec les Fc γ Rs activateurs membranaires, et particulièrement le Fc γ RIIA.

Cette option thérapeutique s'est concrétisée par le développement de Fc γ RIIB solubles actuellement en cours d'évaluation clinique (essai de phase II) dans la thrombocytopénie auto-immune et le lupus érythémateux disséminé (273). Le Fc γ RIIB soluble (protéine recombinante nommée SM101) améliore les symptômes de 75% chez les patients thrombocytopéniques par augmentation de la numération plaquettaire et de 40% chez les patients lupiques. Le mécanisme repose sur la liaison du Fc γ RIIB soluble aux complexes immuns circulants, puis l'ensemble internalisé par les cellules endothéliales exprimant le FcRn conduirait à une dégradation par la voie lysosomale ; à la différence des IgG monomériques toujours recyclées via le FcRn en parallèle de l'autre voie (discuté dans (273)).

L'administration de Fc γ RIIB soluble dans le cas d'un choc anaphylactique dépendant des IgG permettrait d'éliminer de la circulation les complexes immuns afin de limiter l'activation des plaquettes et des neutrophiles. Au vue de la faible affinité du Fc γ RIIB pour toutes les sous-classes d'IgG chez l'homme, il serait intéressant de développer une molécule soluble similaire, mais correspondant au Fc γ RIIA (H131) ou au Fc γ RIIIA (V176) qui sont parmi les affinités les plus fortes pour les sous-classes d'IgG chez l'homme.

3. Bloquer l'activation du Fc γ RIIA

Une autre option consiste à bloquer le Fc γ RIIA activateur, soit en bloquant sa liaison aux complexes immuns, soit en bloquant sa voie de signalisation intracellulaire.

La première stratégie thérapeutique envisagée est le blocage du Fc γ RIIA dans sa partie extracellulaire où se lient les complexes immuns. J'ai d'ailleurs montré chez la souris Fc γ RIIA^{tg} que l'administration préalable d'un anticorps monoclonal bloquant le Fc γ RIIA abolit le choc allergique (Article 2). Un effet indésirable majeur observé dans les souris Fc γ RIIA^{tg} est que l'injection seule de l'anticorps bloquant anti-Fc γ RIIA induit une hypothermie chez les souris. Cette observation suggère que la portion Fc de

l'anticorps induit probablement un choc ; il serait donc préférable d'utiliser des Fab de cet anticorps afin de limiter cet effet. Cette stratégie thérapeutique reposant sur l'anticorps entier a été évaluée en développement préclinique dans le cas du lupus érythémateux disséminé, de l'arthrite, et de la thrombocytopénie auto-immune avec l'anticorps monoclonal TTI-314 mais le programme a été suspendu en 2013 sans précision supplémentaire, probablement en raison de d'une réaction indésirable liée à la portion Fc de l'anticorps.

La deuxième stratégie serait de bloquer Fc γ RIIA dans sa partie intracellulaire pour bloquer la cascade de signalisation intracellulaire. En effet, la signalisation intracellulaire du Fc γ RIIA (comme les autres Fc γ Rs) repose sur le motif ITAM et différentes enzymes comme la kinase Syk pouvant constituer une bonne cible potentielle. En outre, la kinase Syk est commune à la signalisation des Fc γ Rs mais aussi des Fc ϵ Rs (274), ce qui permettrait d'inhiber simultanément les voies dépendantes des IgE et des IgG dans le choc allergique. Deux inhibiteurs de la kinase Syk ont été évalués dans le contexte de l'allergie, la molécule R112 dans le cas de la rhinite allergique (275) dont le développement a été suspendu en phase II car aucune différence avec le placebo n'a été observée ; et la molécule PRT2761 qui semble être prometteuse dans la conjonctivite allergique (276). Egalement évaluées dans d'autres contextes pathologiques, un autre inhibiteur de Syk (molécule R406) a permis de diminuer l'inflammation et la destruction des articulations dans des modèles d'arthrite chez la souris ; ainsi que l'inhibiteur R788 (ou fostamatinib) actuellement évaluée en phase III d'un essai clinique pour la thrombocytopénie auto-immune et en phase II pour l'anémie hémolytique auto-immune et pour la néphropathie à IgA (277).

L'inconvénient de cette approche est que les inhibiteurs de Syk ne sont pas spécifiques des Fc γ Rs et des Fc ϵ Rs (ils inhiberaient aussi les kinases kit, JAK1, JAK3) ; et l'inhibition de la kinase Syk, contrôlant de multiples fonctions biologiques (adhésion cellulaire, activation plaquettaire, maturation des ostéoclastes, développement vasculaire etc.), pourrait perturber fortement l'homéostasie (discuté dans (278)). Par conséquent, cette stratégie thérapeutique permettrait, certes, de cibler à la fois la voie dépendante des IgG et la voie dépendante des IgE dans le choc

anaphylactique, mais aussi d'autres fonctions biologiques dont les effets suppressifs pourraient être à l'origine de nombreux effets indésirables.

B. Les plaquettes comme cible thérapeutique

Mes résultats sur l'étude des plaquettes dans le choc allergique ont permis de mettre en évidence une activation plaquettaire pouvant conduire à la formation de thrombi et de complexes circulants plaquettes-neutrophiles, probablement à l'origine d'une amplification de la réaction. Différentes options thérapeutiques peuvent donc être envisagées pour contrer ces deux phénomènes observés.

1. Empêcher l'agrégation plaquettaire

Afin de limiter l'agrégation plaquettaire et donc la formation de thrombi, des antiagrégants plaquettaires utilisés en clinique pourraient être proposés dans le cas d'un choc allergique. L'aspirine (ou acide acétylsalicylique) est une molécule qui inhibe par acétylation irréversible l'action des cyclooxygénases intracellulaires (COX-1 et COX-2) (Figure 13) (279). Une faible dose d'aspirine, utilisée comme antiagrégant plaquettaire chez l'homme, inhibe sélectivement la COX-1 bloquant notamment la production par les plaquettes de thromboxane A₂ (TXA₂) et de prostacycline (PGI₂) à partir de la voie de l'acide arachidonique (279). Alors que la prostacycline a des effets antiagrégant, le TXA₂ libéré après agrégation plaquettaire amplifie l'activation plaquettaire (280).

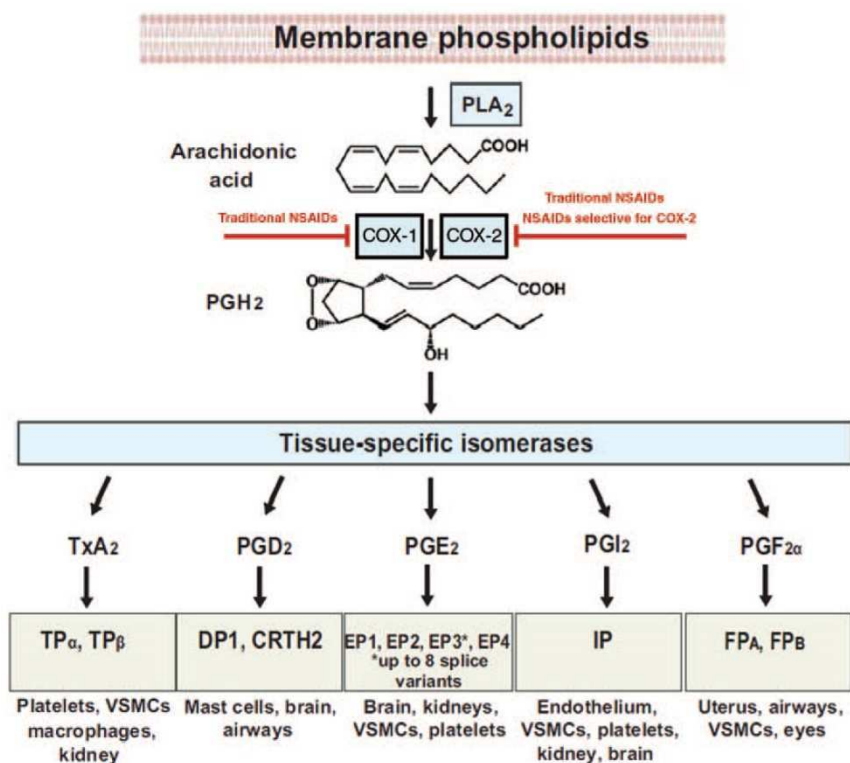


Figure 13 : Mécanisme d'action d'un anti-inflammatoire non stéroïdien (NSAID) : l'aspirine (279)

L'aspirine est indiquée en cas de risque prothrombotique chez l'homme (281). Au cours du choc allergique, la formation de thrombi dans les petits capillaires des poumons pourraient donc être prévenue par l'utilisation d'aspirine. Dans le modèle de souris *FcγRIIA^{tg}*, je montre d'ailleurs que le traitement préalable de ces souris avec de l'aspirine diminue la sévérité du choc anaphylactique comparé au groupe non traité (Figure 14). Par ailleurs, une étude montre dans un modèle de sepsis que le prétraitement des plaquettes humaines avec de l'aspirine limite la production de NETs par les neutrophiles (227), ce qui suggère un autre mécanisme par lequel agirait l'aspirine dans le choc allergique.

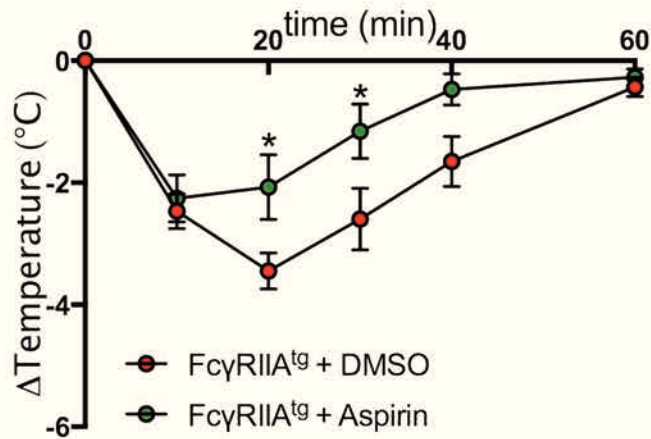


Figure 14 : Souris FcγRIIA^{tg} prétraitées ou non avec de l'aspirine puis induction de la HA IVIg
Evolution de la température au cours d'une PSA induite par des HA IVIg chez des souris FcγRIIA^{tg} prétraitées (n=4) ou non (n=4) avec de l'aspirine à 10 mg/kg. Pool de deux expériences réalisées indépendamment.

L'inconvénient de l'aspirine est qu'elle a été décrite comme pouvant être un facteur aggravant du choc allergique (282). En effet, l'acétylation des COX inhibant la voie des prostaglandines favoriserait la voie des leucotriènes, médiateurs impliqués dans le choc allergique (282). Par ailleurs, une étude issue du laboratoire de Benoît Ho-Tin-Noé montre que l'aspirine, en inhibant la libération de S1P (sphingosine-1 phosphate) par les plaquettes, augmente la sévérité du choc allergique (283). En effet, cette équipe montre que la production de S1P, à la fois par les érythrocytes et par les plaquettes, est nécessaire en cas de profonde déplétion de S1P comme cela est observé dans le cas d'un choc anaphylactique induit par injection de PAF (283). Le pool de S1P circulant agit notamment sur le récepteur S1P2 afin de garantir une contraction basale des cellules musculaires lisses (soit une tension vasculaire normale) et donc permettre une bonne circulation sanguine (284). L'aspirine ne semble donc pas être une option envisageable dans le traitement de l'anaphylaxie en raison de son action sur la libération de leucotriènes et celle du pool de S1P plaquettaire.

D'autres antiagrégants plaquettaires utilisés en clinique sont les antagonistes de l'intégrine GPIIb/IIIa (eptifibatide, abciximab, tirofiban). Ces antiagrégants plaquettaires permettent de bloquer la liaison de l'intégrine GPIIb/IIIa à ses ligands, le fibrinogène (interagissant avec une autre intégrine GPIIb/IIIa) et Mac-1 exprimé à la

surface des leucocytes dont les neutrophiles (discuté dans le chapitre IV). Leur mécanisme d'action inhibe donc l'agrégation plaquettaire ainsi que la formation de complexes plaquettes-neutrophiles circulants dépendant de la GPIIbIIIa, deux effets thérapeutiques ayant leur importance dans le choc allergique. Cependant, il a été montré dans de rares cas que l'utilisation d'anti-GPIIbIIIa pouvait conduire à une thrombocytopénie et à une thrombose : une étude montre que l'eptifibatide (heptapeptide cyclique issu du venin du crocodile pygmée) serait à l'origine d'une activation plaquettaire par le FcγRIIA et par la sous-unité β3 de la GPIIbIIIa (285), correspondant à la coopération du FcγRIIA et du GPIIbIIIa discuté dans le chapitre IV. Dans mon modèle de choc allergique, j'ai souhaité tester cette stratégie thérapeutique à partir de Fab de l'anti-GPIIbIIIa. Alors que les Fab anti-GPIIbIIIa inhibent l'agrégation plaquettaire induite par les IVIg agrégées *in vitro* (Figure 9) suggérant une inhibition de la formation des thrombi *in vivo*, les résultats préliminaires obtenus dans notre modèle de choc allergique ne permettent pas de conclure de manière formelle sur le rôle bénéfique ou non des Fab anti-GPIIbIIIa ; le problème majeur de l'utilisation des Fab *in vitro* étant leur courte durée de vie et leur biodisponibilité, plus faibles que celles d'une IgG entière.

Les antiagrégants plaquettaires semblent être une stratégie séduisante dans le choc allergique mais leurs effets indésirables (risque d'anaphylaxie, thrombose) constituent un vrai risque d'aggravation de la réaction qui pourrait freiner leur utilisation dans cette indication thérapeutique, même après des résultats pré-cliniques probants.

2. Empêcher l'interaction plaquettes-neutrophiles

Comme discuté précédemment, la formation de complexes plaquettes-neutrophiles permettrait une amplification de la réaction anaphylactique. Par ailleurs, le contact physique entre ces deux cellules semble contribuer à leur communication (notamment la liaison de PSGL-1 à la P-sélectine). Ainsi, bloquer l'interaction entre les plaquettes et les neutrophiles pourrait constituer une stratégie thérapeutique prometteuse pour diminuer la sévérité du choc allergique.

Tout d'abord, nous pourrions envisager de contrer la formation de complexes neutrophiles-plaquettes pendant le choc en bloquant l'interaction P-sélectine-PSGL1. Deux anticorps anti-P-sélectine sont actuellement testés. Dans un premier essai clinique, l'anticorps monoclonal anti-P-sélectine inclacumab (IgG4 humaine mutée pour réduire la fixation au complément et l'ADCC) est évalué pour le traitement et la prévention des maladies cardiovasculaires et athérosclérotiques (286). Dans un second essai clinique, l'efficacité de l'anti-P-sélectine SelG1 est actuellement évaluée dans le cadre de la drépanocytose (anomalie de l'hémoglobine à l'origine d'hématies en forme de faucille) pour traiter les crises vasoocclusives résultant d'un agglomérat d'hématies falciformes, de leucocytes et de plaquettes (287). Peu d'informations sont communiquées au sujet de l'efficacité de ces deux anti-P-sélectine mais si leur mode d'action s'avère protecteur, ils pourraient être utilisés dans le cas d'un choc allergique. Il en est de même pour l'anticorps anti-PSGL1 bloquant cette même interaction, actuellement testé en phase II d'un essai clinique pour inhiber le recrutement des leucocytes dans la maladie de Crohn (288).

Pour bloquer l'interaction plaquettes-neutrophiles, on pourrait également proposer de bloquer l'interaction CD40-CD40L. Des anticorps monoclonaux anti-CD40L ont d'ailleurs été testés dans le cadre du lupus érythémateux disséminé. Malheureusement, en évaluant leur efficacité sur les patients au cours d'un essai clinique en phase II, des événements thrombotiques seraient apparus suite à son administration et l'essai a été suspendu (discuté dans (289)). *In vitro*, il a été montré que des anticorps anti-CD40L induisent une agrégation des plaquettes des souris FcγRIIa^{tg}, suggérant une activation directe via le FcγRIIa à leur surface (290). Une étude récente chez le singe montre que l'utilisation de Fab anti-CD40L permet d'éviter ces complications thrombotiques tout en conservant une efficacité, il est d'ailleurs maintenant testé chez l'homme dans un essai de phase I dans le traitement du lupus érythémateux disséminé (289,291). Si les résultats s'avèrent concluants et que les effets prothrombotiques ne sont effectivement pas observés chez l'homme, cette cible thérapeutique pourrait constituer une bonne option dans le choc allergique.

Au vue des effets indésirables observés avec ces différentes molécules au cours des essais cliniques, l'utilisation de Fab ou d'IgG mutées semble plus prometteuse que l'anticorps monoclonal entier capable d'interagir par sa portion Fc avec des Fc γ Rs, et ainsi induire des fonctions effectrices indésirables. En outre, la combinaison de différentes approches pour bloquer l'interaction entre plaquettes et neutrophiles pourrait augmenter l'efficacité thérapeutique de ces molécules.

C. Bloquer l'action des médiateurs PAF et histamine

Plusieurs études sur choc allergique dépendant des IgG montrent que l'administration préalable d'antagonistes du récepteur au PAF (PAF-R) protège en partie ou complètement du choc, aussi bien chez la souris ayant conservé ses Fc γ Rs (16,139,141,292) que chez la souris humanisée pour un ou plusieurs Fc γ Rs humains (140,165,293). Par ailleurs, une autre étude montre que des souris déficientes pour le PAF-R sont protégées du choc allergique (294). De même, le blocage des récepteurs H1 de l'histamine par des antagonistes protège en partie d'un choc allergique dépendant des IgG (139,141,167,292). Dans mon étude (139), je montre plus précisément une contribution équivalente du PAF et de l'histamine dans la PSA induite par des IgG2a ; alors que l'histamine prédomine dans les PSA induites par des IgG1 ou par des IgG2b. Cette divergence de résultats entre les différentes sous-classes d'IgG pourrait s'expliquer par l'absence de contribution des basophiles en PSA IgG2a (139) qui ne libèrent alors pas d'histamine contrairement aux PSA induites par des IgG1/2b. Chez l'homme, contrairement à la concentration d'histamine, la concentration de PAF a été corrélée à la sévérité du choc allergique (295). Ces résultats suggèrent que le blocage respectif (dans un premier temps) des récepteurs du PAF et de l'histamine pourrait limiter considérablement le développement du choc allergique chez l'homme.

Les antagonistes du PAF-R ont été évalués chez l'homme dans le cas de l'asthme allergique. Après inhalation de PAF, la molécule UK74505 prévient l'apparition de la bronchoconstriction, de la neutropénie observée à 5 minutes et de la neutrophilie à deux heures (296) ; cependant, le développement de cette antagoniste du PAF a

été suspendu en phase II sans précision supplémentaire. Deux autres antagonistes du PAF (molécules WEB2086 et SR27417A) dans le traitement de l'allergie ont été testés mais sans succès en comparaison du placebo (297,298). Dans le sepsis, un autre antagoniste du PAF ne présente pas non plus d'efficacité comparé au groupe placebo (299). Malgré l'efficacité des antagonistes du PAF-R chez la souris, il semblerait qu'il soit inefficace chez l'homme aux doses administrées et pour ces indications thérapeutiques. Reste à développer une étude clinique sur l'anaphylaxie et y tester l'efficacité de ces antagonistes du PAF-R.

Une autre façon de limiter les puissants effets du PAF dans l'organisme serait de favoriser la dégradation de ce médiateur par ses enzymes d'inactivation. La demi-vie du PAF est de l'ordre de 3 à 13 minutes en raison de son inactivation rapide par une famille d'enzymes appelée les PAF acétylhydrolases (300). Lorsque le PAF est injecté aux souris, il reproduit les signes caractéristiques du choc allergique (301). Chez l'homme, plus l'inactivation par les PAF acétylhydrolases est lente, plus les manifestations cliniques de l'anaphylaxie peuvent être sévères (295). En effet, il existe une corrélation inverse entre l'activité de ces enzymes et la concentration de PAF circulante. Cette corrélation inverse laisse anticiper qu'une inactivation rapide du PAF protège de la sévérité de la réaction et contribue à limiter l'emballement du système. Chez la souris, il a été montré que l'injection préalable de ces enzymes recombinantes réduisait considérablement la mortalité après induction d'un modèle actif du choc allergique (302). L'injection de PAF acétylhydrolases recombinantes semble donc être une stratégie thérapeutique potentiellement prometteuse chez l'homme.

Concernant l'histamine, les antagonistes des récepteurs à l'histamine, communément appelés antihistaminiques, sont déjà utilisés chez l'homme en pratique courante notamment pour contrer les réactions induites par des IgE. Néanmoins, aucune amélioration des manifestations cliniques du choc anaphylactique n'est observée malgré leur administration presque systématique suggérant un autre mécanisme supplémentaire indépendant des IgE (303). L'enzyme responsable de la dégradation extracellulaire de l'histamine est la diamine oxydase (304). Contrairement aux PAF acétylhydrolases qui ont suscité un vif intérêt d'un point de vue thérapeutique, l'administration de cette enzyme à l'origine de

l'inactivation de l'histamine (sous forme recombinante) n'a pour le moment pas été étudiée.

Dans un deuxième temps, le blocage simultané des deux médiateurs PAF et histamine pourrait être très efficace. En effet, j'ai montré dans mon étude chez la souris sauvage que l'histamine et le PAF sont des médiateurs qui contribuent en synergie au développement du choc anaphylactique (139). Mon équipe montre également une contribution synergique de ces deux médiateurs chez les souris humanisées pour les Fc γ Rs (167). Le blocage simultané de ces deux médiateurs pourrait donc être une stratégie thérapeutique efficace dans le choc allergique chez l'homme. Tout récemment, un antagoniste des récepteurs au PAF et à l'histamine, appelé rupatadine (305), a été mis sur le marché en Europe et aux Etats-Unis pour traiter les cas de rhinite allergique et d'urticaire généralisé. Cette molécule, si elle s'avérait efficace (notamment dans nos modèles d'étude du choc allergique), ouvrirait de nouvelles perspectives dans le traitement du choc allergique chez l'homme.

En conclusion, il est possible d'agir à différents niveaux pour contrer le choc anaphylactique. Une première possibilité est tout d'abord d'empêcher le déclenchement de la réaction en inhibant l'interaction entre les complexes immuns et les Fc γ Rs (IVIg) ; il est ensuite possible de bloquer les voies de signalisation intracellulaire de ces Fc γ Rs (inhibiteurs de Syk ou autres) ; ainsi que les interactions cellule/cellule amplifiant la réaction (anti-P-sélectine, anti-GPIIb/IIIa) ; et enfin, limiter les symptômes du choc en utilisant des molécules capables d'empêcher les médiateurs de s'associer à leur récepteur. Plus la réaction est contrée en amont, meilleure sera l'efficacité pour lutter contre l'induction puis l'amplification du choc en systémique. En effet, les multiples voies d'activation après engagement des Fc γ Rs par les complexes immuns aboutissent finalement à la contribution de plusieurs populations cellulaires capables à leur tour de libérer de nombreux médiateurs chacun interagissant avec leur propre récepteur. La combinaison de plusieurs approches thérapeutiques pour agir simultanément à différent niveau, serait un moyen de limiter au mieux le développement du choc allergique.

Bibliographie

1. Mertes PM, Alla F, Trécho P, Auroy Y, Jouglu E, Groupe d'Etudes des Réactions Anaphylactoïdes Peranesthésiques. Anaphylaxis during anesthesia in France: an 8-year national survey. *J Allergy Clin Immunol.* août 2011;128(2):366-73.
2. Ring J, Messmer K. Incidence and severity of anaphylactoid reactions to colloid volume substitutes. *Lancet Lond Engl.* 26 févr 1977;1(8009):466-9.
3. Panesar SS, Javad S, de Silva D, Nwaru BI, Hickstein L, Muraro A, et al. The epidemiology of anaphylaxis in Europe: a systematic review. *Allergy.* nov 2013;68(11):1353-61.
4. Lee JK, Vadas P. Anaphylaxis: mechanisms and management. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* juill 2011;41(7):923-38.
5. Ma L, Danoff TM, Borish L. Case fatality and population mortality associated with anaphylaxis in the United States. *J Allergy Clin Immunol.* avr 2014;133(4):1075-83.
6. 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.
7. Moneret-Vautrin DA, Morisset M, Flabbee J, Beaudouin E, Kanny G. Epidemiology of life-threatening and lethal anaphylaxis: a review. *Allergy.* avr 2005;60(4):443-51.
8. WAO White Book on Allergy [Internet]. [cité 9 sept 2016]. Disponible sur: http://www.worldallergy.org/definingthespecialty/white_book.php
9. Charles Richet - Nobel Lecture: Anaphylaxis [Internet]. [cité 20 août 2016]. Disponible sur: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1913/richet-lecture.html
10. Takai T, Karasuyama H. The study of allergy by Japanese researchers: a historical perspective. *Int Immunol.* 1 déc 2009;21(12):1311-6.
11. Ishizaka T, Ishizaka K, Tomioka H. Release of Histamine and Slow Reacting Substance of Anaphylaxis (SRS-A) by IgE-Anti-IgE Reactions on Monkey Mast Cells. *J Immunol.* 2 janv 1972;108(2):513-20.
12. Makabe-Kobayashi Y, Hori Y, Adachi T, Ishigaki-Suzuki S, Kikuchi Y, Kagaya Y, et al. The control effect of histamine on body temperature and respiratory function in IgE-dependent systemic anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* août 2002;110(2):298-303.
13. Brandt EB, Strait RT, Hershko D, Wang Q, Muntel EE, Scribner TA, et al. Mast cells are required for experimental oral allergen-induced diarrhea. *J Clin Invest.* déc 2003;112(11):1666-77.

14. Dombrowicz D, Flamand V, Brigman KK, Koller BH, Kinet JP. Abolition of anaphylaxis by targeted disruption of the high affinity immunoglobulin E receptor alpha chain gene. *Cell*. 3 déc 1993;75(5):969-76.
15. Schwartz LB. Effector cells of anaphylaxis: mast cells and basophils. *Novartis Found Symp*. 2004;257:65-74-79, 98-100, 276-85.
16. Strait RT, Morris SC, Yang M, Qu X-W, Finkelman FD. Pathways of anaphylaxis in the mouse. *J Allergy Clin Immunol*. avr 2002;109(4):658-68.
17. Miyajima I, Dombrowicz D, Martin TR, Ravetch JV, Kinet JP, Galli SJ. 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*. 1 mars 1997;99(5):901-14.
18. Takeishi T, Martin TR, Katona IM, Finkelman FD, Galli SJ. Differences in the expression of the cardiopulmonary alterations associated with anti-immunoglobulin E-induced or active anaphylaxis in mast cell-deficient and normal mice. Mast cells are not required for the cardiopulmonary changes associated with certain fatal anaphylactic responses. *J Clin Invest*. 1 août 1991;88(2):598-608.
19. Tsuboi N, Asano K, Lauterbach M, Mayadas TN. Human neutrophil Fc γ receptors initiate and play specialized nonredundant roles in antibody-mediated inflammatory diseases. *Immunity*. juin 2008;28(6):833-46.
20. Getahun A, Cambier JC. Of ITIMs, ITAMs, and ITAMis: revisiting immunoglobulin Fc receptor signaling. *Immunol Rev*. nov 2015;268(1):66-73.
21. Bruhns P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood*. 14 juin 2012;119(24):5640-9.
22. Bruhns P, Jönsson F. Mouse and human FcR effector functions. *Immunol Rev*. nov 2015;268(1):25-51.
23. Todd RF, Petty HR. Beta 2 (CD11/CD18) integrins can serve as signaling partners for other leukocyte receptors. *J Lab Clin Med*. mai 1997;129(5):492-8.
24. García-García E, Nieto-Castañeda G, Ruiz-Saldaña M, Mora N, Rosales C. Fc gammaRIIA and Fc gammaRIIIB mediate nuclear factor activation through separate signaling pathways in human neutrophils. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 avr 2009;182(8):4547-56.
25. 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(gamma)RIIB. *Nature*. 19 sept 1996;383(6597):263-6.
26. Mimura Y, Sonderrmann P, Ghirlando R, Lund J, Young SP, Goodall M, et al. Role of oligosaccharide residues of IgG1-Fc in Fc gamma RIIb binding. *J Biol Chem*. 7 déc 2001;276(49):45539-47.

27. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Immunother Vaccines*. 2014;5:520.
28. Guillemins M, Bruhns P, Saeys Y, Hammad H, Lambrecht BN. The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages. *Nat Rev Immunol*. févr 2014;14(2):94–108.
29. Qiao J, Al-Tamimi M, Baker RI, Andrews RK, Gardiner EE. The platelet Fc receptor, FcγRIIa. *Immunol Rev*. nov 2015;268(1):241–52.
30. J V Ravetch, Kinet and JP. Fc Receptors. *Annu Rev Immunol*. 1991;9(1):457–92.
31. Biburger M, Aschermann S, Schwab I, Lux A, Albert H, Danzer H, et al. Monocyte subsets responsible for immunoglobulin G-dependent effector functions in vivo. *Immunity*. 23 déc 2011;35(6):932–44.
32. Mancardi DA, Iannascoli B, Hoos S, England P, Daëron M, Bruhns P. FcγRIV is a mouse IgE receptor that resembles macrophage FcεRI in humans and promotes IgE-induced lung inflammation. *J Clin Invest*. 3 nov 2008;118(11):3738–50.
33. 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 Baltim Md 1950*. 15 avr 2000;164(8):4332–9.
34. Nimmerjahn F, Bruhns P, Horiuchi K, Ravetch JV. FcγRIV: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity. *Immunity*. juill 2005;23(1):41–51.
35. Veri M-C, Gorlatov S, Li H, Burke S, Johnson S, Stavenhagen J, et al. Monoclonal antibodies capable of discriminating the human inhibitory Fcγ-receptor IIB (CD32B) from the activating Fcγ-receptor IIA (CD32A): biochemical, biological and functional characterization. *Immunology*. juill 2007;121(3):392–404.
36. Cassard L, Jönsson F, Arnaud S, Daëron M. Fcγ receptors inhibit mouse and human basophil activation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 sept 2012;189(6):2995–3006.
37. 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 FcγRIIC gene. *Blood*. 1 avr 1998;91(7):2369–80.
38. 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 Baltim Md 1950*. 1 févr 2012;188(3):1318–24.
39. Meknache N, Jönsson F, Laurent J, Guinépain M-T, Daëron M. Human basophils express the glycosylphosphatidylinositol-anchored low-affinity IgG receptor FcγRIIIB (CD16B). *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 févr 2009;182(4):2542–50.
40. Schulze H, Shivdasani RA. Mechanisms of thrombopoiesis. *J Thromb Haemost JTH*. août 2005;3(8):1717–24.

41. Thon JN, Montalvo A, Patel-Hett S, Devine MT, Richardson JL, Ehrlicher A, et al. Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release. *J Cell Biol.* 15 nov 2010;191(4):861–74.
42. Angénieux C, Maître B, Eckly A, Lanza F, Gachet C, Salle H de la. Time-Dependent Decay of mRNA and Ribosomal RNA during Platelet Aging and Its Correlation with Translation Activity. *PLOS ONE.* 25 janv 2016;11(1):e0148064.
43. Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets in lung biology. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:569–91.
44. Kaushansky K. Lineage-specific hematopoietic growth factors. *N Engl J Med.* 11 mai 2006;354(19):2034–45.
45. Grozovsky R, Hoffmeister KM, Falet H. Novel clearance mechanisms of platelets. *Curr Opin Hematol.* nov 2010;17(6):585–9.
46. Grozovsky R, Giannini S, Falet H, Hoffmeister K m. Molecular mechanisms regulating platelet clearance and thrombopoietin production. *ISBT Sci Ser.* 1 avr 2015;10(S1):309–16.
47. Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature.* 14 sept 2000;407(6801):258–64.
48. Gachet C, Hechler B. The P2Y receptors and thrombosis. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal.* 1 nov 2013;2(6):241–53.
49. Wilner GD, Nossel HL, LeRoy EC. Aggregation of platelets by collagen. *J Clin Invest.* 1 déc 1968;47(12):2616–21.
50. Benveniste J, Le Couedic JP, Kamoun P. AGGREGATION OF HUMAN PLATELETS BY PLATELET-ACTIVATING FACTOR. *The Lancet.* 8 févr 1975;305(7902):344–5.
51. Hallberg T, Dohlsten M, Baldetorp B. Demonstration of Histamine Receptors on Human Platelets by Flow Cytometry. *Scand J Haematol.* 1 févr 1984;32(2):113–8.
52. Karas SP, Rosse WF, Kurlander RJ. Characterization of the IgG-Fc receptor on human platelets. *Blood.* déc 1982;60(6):1277–82.
53. Joseph M, Gounni AS, Kusnierz JP, Vorng H, Sarfati M, Kinet JP, et al. Expression and functions of the high-affinity IgE receptor on human platelets and megakaryocyte precursors. *Eur J Immunol.* sept 1997;27(9):2212–8.
54. Hasegawa S, Pawankar R, Suzuki K, Nakahata T, Furukawa S, Okumura K, et al. Functional expression of the high affinity receptor for IgE (FcεRI) in human platelets and its' intracellular expression in human megakaryocytes. *Blood.* 15 avr 1999;93(8):2543–51.
55. Semple JW, Italiano JE, Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol.* avr 2011;11(4):264–74.
56. White JG, Clawson CC. The surface-connected canalicular system of blood platelets—a fenestrated membrane system. *Am J Pathol.* nov 1980;101(2):353–64.

57. Lievens D, Hundelshausen P von. Platelets in atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 2011;106(5):827-38.
58. White JG, Krivit W. An ultrastructural basis for the shape changes induced in platelets by chilling. *Blood.* nov 1967;30(5):625-35.
59. Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev.* juill 2009;23(4):177-89.
60. Golebiewska EM, Poole AW. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev.* mai 2015;29(3):153-62.
61. Kamath S, Blann AD, Lip GY. Platelet activation: assessment and quantification. *Eur Heart J.* sept 2001;22(17):1561-71.
62. Chignard M, Le Couedic JP, Tence M, Vargaftig BB, Benveniste J. The role of platelet-activating factor in platelet aggregation. *Nature.* 28 juin 1979;279(5716):799-800.
63. Mannaioni PF, Bello MGD, Raspanti S, Gambassi F, Mugnai L, Masini E. Histamine release by human platelets. *Agents Actions.* Mars 1993 38(3-4):C203-5.
64. Italiano JE, Mairuhu ATA, Flaumenhaft R. Clinical Relevance of Microparticles from Platelets and Megakaryocytes. *Curr Opin Hematol.* nov 2010;17(6):578-84.
65. Duchez A-C, Boudreau LH, Naika GS, Bollinger J, Belleannée C, Cloutier N, et al. Platelet microparticles are internalized in neutrophils via the concerted activity of 12-lipoxygenase and secreted phospholipase A2-IIA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 7 juill 2015;112(27):E3564-73.
66. Zimmerman GA, Weyrich AS. Signal-Dependent Protein Synthesis by Activated Platelets New Pathways to Altered Phenotype and Function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* mars 2008;28(3):s17-24.
67. Broos K, Feys HB, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Rev.* juill 2011;25(4):155-67.
68. Martin C, Morales LD, Cruz MA. Purified A2 domain of von Willebrand factor binds to the active conformation of von Willebrand factor and blocks the interaction with platelet glycoprotein Ibalpha. *J Thromb Haemost JTH.* juill 2007;5(7):1363-70.
69. Chapin JC, Hajjar KA. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev.* janv 2015;29(1):17-24.
70. Aiach M, Alhenc-Gelas M, Borgel D, Emmerich J, Gandrille S, Picard V. Mutations des protéines de la coagulation et thromboses. *médecine/sciences.* 1 nov 2006;22(11):985-9.
71. Weyrich AS, Lindemann S, Zimmerman GA. The evolving role of platelets in inflammation. *J Thromb Haemost.* 1 sept 2003;1(9):1897-905.
72. Cloutier N, Paré A, Farndale RW, Schumacher HR, Nigrovic PA, Lacroix S, et al. Platelets can enhance vascular permeability. *Blood.* 9 août 2012;120(6):1334-43.

73. Duerschmied D, Suidan GL, Demers M, Herr N, Carbo C, Brill A, et al. Platelet serotonin promotes the recruitment of neutrophils to sites of acute inflammation in mice. *Blood*. 7 févr 2013;121(6):1008–15.
74. Nachman RL, Rafii S. Platelets, Petechiae, and Preservation of the Vascular Wall. *N Engl J Med*. 18 sept 2008;359(12):1261–70.
75. Knezevic II, Predescu SA, Neamu RF, Gorovoy MS, Knezevic NM, Easington C, et al. Tiam1 and Rac1 are required for platelet-activating factor-induced endothelial junctional disassembly and increase in vascular permeability. *J Biol Chem*. 20 févr 2009;284(8):5381–94.
76. Gros A, Ollivier V, Ho-Tin-Noé B. Platelets in Inflammation: Regulation of Leukocyte Activities and Vascular Repair. *Front Immunol* [Internet]. 6 janv 2015 [cité 13 oct 2016];5. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4285099/>
77. Semple JW. The immune system as seen through the eyes of a platelet. *ISBT Sci Ser*. 1 juill 2014;9(1):198–203.
78. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med*. avr 2007;13(4):463–9.
79. Sreeramkumar V, Adrover JM, Ballesteros I, Cuartero MI, Rossaint J, Bilbao I, et al. Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science*. 5 déc 2014;346(6214):1234–8.
80. Ghasemzadeh M, Hosseini E. Platelet-leukocyte crosstalk: Linking proinflammatory responses to procoagulant state. *Thromb Res*. mars 2013;131(3):191–7.
81. Gros A, Syvannarath V, Lamrani L, Ollivier V, Loyau S, Goerge T, et al. Single platelets seal neutrophil-induced vascular breaches via GPVI during immune-complex-mediated inflammation in mice. *Blood*. 20 août 2015;126(8):1017–26.
82. Elzey BD, Grant JF, Sinn HW, Nieswandt B, Waldschmidt TJ, Ratliff TL. Cooperation between platelet-derived CD154 and CD4⁺ T cells for enhanced germinal center formation. *J Leukoc Biol*. juill 2005;78(1):80–4.
83. Elzey BD, Tian J, Jensen RJ, Swanson AK, Lees JR, Lentz SR, et al. Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments. *Immunity*. juill 2003;19(1):9–19.
84. Verschoor A, Neuenhahn M, Navarini AA, Graef P, Plaumann A, Seidlmeier A, et al. A platelet-mediated system for shuttling blood-borne bacteria to CD8 α ⁺ dendritic cells depends on glycoprotein GPIb and complement C3. *Nat Immunol*. déc 2011;12(12):1194–201.
85. Sprague DL, Elzey BD, Crist SA, Waldschmidt TJ, Jensen RJ, Ratliff TL. Platelet-mediated modulation of adaptive immunity: unique delivery of CD154 signal by platelet-derived membrane vesicles. *Blood*. 15 mai 2008;111(10):5028–36.

86. Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem*. 10 juin 1983;258(11):7155-60.
87. Sadallah S, Amicarella F, Eken C, Iezzi G, Schifferli JA. Ectosomes released by platelets induce differentiation of CD4+T cells into T regulatory cells. *Thromb Haemost*. déc 2014;112(6):1219-29.
88. Langer HF, Gawaz M. Platelet-vessel wall interactions in atherosclerotic disease. *Thromb Haemost*. mars 2008;99(3):480-6.
89. Wang F, Wang N-S, Yan C-G, Li J-H, Tang L-Q. The significance of platelet activation in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. mai 2007;26(5):768-71.
90. Goules A, Tzioufas AG, Manousakis MN, Kirou KA, Crow MK, Routsias JG. Elevated levels of soluble CD40 ligand (sCD40L) in serum of patients with systemic autoimmune diseases. *J Autoimmun*. mai 2006;26(3):165-71.
91. Sellam J, Proulle V, Jüngel A, Ittah M, Miceli Richard C, Gottenberg J-E, et al. Increased levels of circulating microparticles in primary Sjögren's syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis and relation with disease activity. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(5):R156.
92. Boilard E, Blanco P, Nigrovic PA. Platelets: active players in the pathogenesis of arthritis and SLE. *Nat Rev Rheumatol*. sept 2012;8(9):534-42.
93. Duffau P, Seneschal J, Nicco C, Richez C, Lazaro E, Douchet I, et al. Platelet CD154 potentiates interferon-alpha secretion by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med*. 1 sept 2010;2(47):47ra63.
94. Looney MR, Gropper MA, Matthay MA. Transfusion-related acute lung injury: a review. *Chest*. juill 2004;126(1):249-58.
95. Bux J, Sachs UJH. The pathogenesis of transfusion-related acute lung injury (TRALI). *Br J Haematol*. mars 2007;136(6):788-99.
96. Zarbock A, Singbartl K, Ley K. Complete reversal of acid-induced acute lung injury by blocking of platelet-neutrophil aggregation. *J Clin Invest*. déc 2006;116(12):3211-9.
97. Khan SY, Kelher MR, Heal JM, Blumberg N, Boshkov LK, Phipps R, et al. Soluble CD40 ligand accumulates in stored blood components, primes neutrophils through CD40, and is a potential cofactor in the development of transfusion-related acute lung injury. *Blood*. 1 oct 2006;108(7):2455-62.
98. Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, Nguyen JX, Marques MB, Monestier M, et al. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest*. juill 2012;122(7):2661-71.
99. Borgel D, Vieillard-Baron A. La protéine C activée - Une protéine à l'interface de l'inflammation et de la coagulation. *médecine/sciences*. 1 mai 2011;27(5):501-7.

100. Gawaz M, Dickfeld T, Bogner C, Fateh-Moghadam S, Neumann FJ. Platelet function in septic multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med.* avr 1997;23(4):379–85.
101. Xiang B, Zhang G, Guo L, Li X-A, Morris AJ, Daugherty A, et al. Platelets protect from septic shock by inhibiting macrophage-dependent inflammation via the cyclooxygenase 1 signalling pathway. *Nat Commun.* 2013;4:2657.
102. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The Multifaceted Functions of Neutrophils. *Annu Rev Pathol.* 2014;9:181–218.
103. Basu S, Hodgson G, Katz M, Dunn AR. Evaluation of role of G-CSF in the production, survival, and release of neutrophils from bone marrow into circulation. *Blood.* 1 août 2002;100(3):854–61.
104. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity.* 24 nov 2010;33(5):657–70.
105. Dancey JT, Deubelbeiss KA, Harker LA, Finch CA. Neutrophil kinetics in man. *J Clin Invest.* sept 1976;58(3):705–15.
106. Tofts PS, Chevassut T, Cutajar M, Dowell NG, Peters AM. Doubts concerning the recently reported human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood.* 2 juin 2011;117(22):6050-6052-6054.
107. Li KW, Turner SM, Emson CL, Hellerstein MK, Dale DC. Deuterium and neutrophil kinetics. *Blood.* 2 juin 2011;117(22):6052-6053-6054.
108. Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood.* 15 oct 1992;80(8):2012–20.
109. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* août 2010;31(8):318–24.
110. Borregaard N, Christensen L, Bejerrum OW, Birgens HS, Clemmensen I. Identification of a highly mobilizable subset of human neutrophil intracellular vesicles that contains tetranectin and latent alkaline phosphatase. *J Clin Invest.* févr 1990;85(2):408–16.
111. Häger M, Cowland JB, Borregaard N. Neutrophil granules in health and disease. *J Intern Med.* juill 2010;268(1):25–34.
112. Mestas J, Hughes CCW. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *J Immunol.* 3 janv 2004;172(5):2731–8.
113. Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* mars 2013;13(3):159–75.
114. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* sept 2007;7(9):678–89.

115. Sundd P, Gutierrez E, Koltsova EK, Kuwano Y, Fukuda S, Pospieszalska MK, et al. 'Slings' enable neutrophil rolling at high shear. *Nature*. 16 août 2012;488(7411):399–403.
116. Tanaka Y, Nagai Y, Kuroishi T, Endo Y, Sugawara S. Stimulation of Ly-6G on neutrophils in LPS-primed mice induces platelet-activating factor (PAF)-mediated anaphylaxis-like shock. *J Leukoc Biol*. mars 2012;91(3):485–94.
117. Doerfler ME, Danner RL, Shelhamer JH, Parrillo JE. Bacterial lipopolysaccharides prime human neutrophils for enhanced production of leukotriene B₄. *J Clin Invest*. mars 1989;83(3):970–7.
118. Swain SD, Rohn TT, Quinn MT. Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents. *Antioxid Redox Signal*. févr 2002;4(1):69–83.
119. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*. 1 janv 2005;17(1):1–14.
120. Kennedy AD, Willment JA, Dorward DW, Williams DL, Brown GD, DeLeo FR. Dectin-1 promotes fungicidal activity of human neutrophils. *Eur J Immunol*. févr 2007;37(2):467–78.
121. Parker LC, Whyte MKB, Dower SK, Sabroe I. The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. *J Leukoc Biol*. juin 2005;77(6):886–92.
122. Holers VM. Complement and its receptors: new insights into human disease. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:433–59.
123. Goodridge HS, Underhill DM, Touret N. Mechanisms of Fc Receptor and Dectin-1 Activation for Phagocytosis. *Traffic*. 1 août 2012;13(8):1062–71.
124. Nordenfelt P, Tapper H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J Leukoc Biol*. août 2011;90(2):271–84.
125. Jaconi ME, Lew DP, Carpentier JL, Magnusson KE, Sjögren M, Stendahl O. Cytosolic free calcium elevation mediates the phagosome-lysosome fusion during phagocytosis in human neutrophils. *J Cell Biol*. mai 1990;110(5):1555–64.
126. Dewitt S, Laffafian I, Hallett MB. Phagosomal oxidative activity during β 2 integrin (CR3)-mediated phagocytosis by neutrophils is triggered by a non-restricted Ca²⁺ signal: Ca²⁺ controls time not space. *J Cell Sci*. 15 juill 2003;116(14):2857–65.
127. Nauseef WM. Biological Roles for the NOX Family NADPH Oxidases. *J Biol Chem*. 20 juin 2008;283(25):16961–5.
128. Leto TL, Geiszt M. Role of Nox family NADPH oxidases in host defense. *Antioxid Redox Signal*. oct 2006;8(9–10):1549–61.
129. Borregaard N, Sørensen OE, Theilgaard-Mönch K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol*. août 2007;28(8):340–5.

130. Altstaedt J, Kirchner H, Rink L. Cytokine production of neutrophils is limited to interleukin-8. *Immunology*. déc 1996;89(4):563-8.
131. Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol*. 3 sept 2012;198(5):773-83.
132. Barrientos L, Bignon A, Gueguen C, de Chaisemartin L, Gorges R, Sandré C, et al. Neutrophil extracellular traps downregulate lipopolysaccharide-induced activation of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 déc 2014;193(11):5689-98.
133. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 7 sept 2010;107(36):15880-5.
134. Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, Thomas GM, Martinod K, De Meyer SF, et al. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost JTH*. janv 2012;10(1):136-44.
135. Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BNV, Zbytnuik LD, et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med*. sept 2012;18(9):1386-93.
136. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 15 janv 2007;176(2):231-41.
137. Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med*. 1 juill 2013;210(7):1283-99.
138. Bratton DL, Henson PM. Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins. *Trends Immunol*. août 2011;32(8):350-7.
139. 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*. 26 avr 2016;
140. Jönsson F, Mancardi DA, Zhao W, Kita Y, Iannascoli B, Khun H, et al. Human FcγRIIA induces anaphylactic and allergic reactions. *Blood*. 15 mars 2012;119(11):2533-44.
141. Jönsson F, Mancardi DA, Kita Y, Karasuyama H, Iannascoli B, Van Rooijen N, et al. Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis. *J Clin Invest*. avr 2011;121(4):1484-96.
142. Grey HM, Hirst JW, Cohn M. A New Mouse Immunoglobulin: IgG3. *J Exp Med*. 2 janv 1971;133(2):289-304.
143. 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*. 1 août 1996;5(2):181-8.

144. Meyer D, Schiller C, Westermann J, Izui S, Hazenbos WL, Verbeek JS, et al. FcγRIII (CD16)-deficient mice show IgG isotype-dependent protection to experimental autoimmune hemolytic anemia. *Blood*. 1 déc 1998;92(11):3997-4002.
145. Khodoun MV, Kucuk ZY, Strait RT, Krishnamurthy D, Janek K, Clay CD, et al. Rapid desensitization of mice with anti-FcγRIIIb/FcγRIII mAb safely prevents IgG-mediated anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*. 1 déc 2013;132(6):1375-87.
146. Barrett DJ, Ayoub EM. IgG2 subclass restriction of antibody to pneumococcal polysaccharides. *Clin Exp Immunol*. janv 1986;63(1):127-34.
147. Siber GR, Schur PH, Aisenberg AC, Weitzman SA, Schiffman G. Correlation between serum IgG-2 concentrations and the antibody response to bacterial polysaccharide antigens. *N Engl J Med*. 24 juill 1980;303(4):178-82.
148. Schauer U, Stemberg F, Rieger CHL, Büttner W, Borte M, Schubert S, et al. Levels of antibodies specific to tetanus toxoid, Haemophilus influenzae type b, and pneumococcal capsular polysaccharide in healthy children and adults. *Clin Diagn Lab Immunol*. mars 2003;10(2):202-7.
149. Wong S-F. Cetuximab: an epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of colorectal cancer. *Clin Ther*. juin 2005;27(6):684-94.
150. Chung CH, Mirakhur B, Chan E, Le Q-T, Berlin J, Morse M, et al. Cetuximab-Induced Anaphylaxis and IgE Specific for Galactose-α-1,3-Galactose. *N Engl J Med*. 13 mars 2008;358(11):1109-17.
151. Commins SP, Platts-Mills TAE. Delayed Anaphylaxis to Red Meat in Patients with IgE Specific for Galactose α-1,3-Galactose (α-gal). *Curr Allergy Asthma Rep*. févr 2013;13(1):72-7.
152. Baudino L, Nimmerjahn F, Silveira SA da, Martinez-Soria E, Saito T, Carroll M, et al. Differential Contribution of Three Activating IgG Fc Receptors (FcγRI, FcγRIII, and FcγRIV) to IgG2a- and IgG2b-Induced Autoimmune Hemolytic Anemia in Mice. *J Immunol*. 2 janv 2008;180(3):1948-53.
153. Ioan-Facsinay A, de Kimpe SJ, Hellwig SMM, van Lent PL, Hofhuis FMA, van Ojik HH, et al. FcγRI (CD64) Contributes Substantially to Severity of Arthritis, Hypersensitivity Responses, and Protection from Bacterial Infection. *Immunity*. mars 2002;16(3):391-402.
154. Morris R, Watterson L, Westhorpe R, Webb R. Crisis management during anaesthesia: hypotension. *Qual Saf Health Care*. juin 2005;14(3):e11.
155. 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 FcγRIIA. *Blood*. 15 oct 2001;98(8):2442-7.
156. Sardjono CT, Mottram PL, Velde NC van de, Powell MS, Power D, Slocombe RF, et al. Development of spontaneous multisystem autoimmune disease and

hypersensitivity to antibody-induced inflammation in Fc γ receptor IIa-transgenic mice. *Arthritis Rheum.* 1 oct 2005;52(10):3220-9.

157. Van de Velde NC, Mottram PL, Powell MS, Lim B, Holmdahl R, Hogarth PM. Transgenic mice expressing human Fc γ RIIa have enhanced sensitivity to induced autoimmune arthritis as well as elevated Th17 cells. *Immunol Lett.* 4 mai 2010;130(1-2):82-8.

158. Ji H, Ohmura K, Mahmood U, Lee DM, Hofhuis FMA, Boackle SA, et al. Arthritis Critically Dependent on Innate Immune System Players. *Immunity.* févr 2002;16(2):157-68.

159. Kouskoff V, Korganow A-S, Duchatelle V, Degott C, Benoist C, Mathis D. Organ-Specific Disease Provoked by Systemic Autoimmunity. *Cell.* 29 nov 1996;87(5):811-22.

160. McKenzie SE, Taylor SM, Malladi P, Yuhan H, Cassel DL, Chien P, et al. The role of the human Fc receptor Fc γ RIIa in the immune clearance of platelets: a transgenic mouse model. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 avr 1999;162(7):4311-8.

161. Chen K, Nishi H, Travers R, Tsuboi N, Martinod K, Wagner DD, et al. Endocytosis of soluble immune complexes leads to their clearance by Fc γ RIIb but induces neutrophil extracellular traps via Fc γ RIIa in vivo. *Blood.* 22 nov 2012;120(22):4421-31.

162. Tsuboi N, Asano K, Lauterbach M, Mayadas TN. Human neutrophil Fc γ receptors initiate and play specialized nonredundant roles in antibody-mediated inflammatory diseases. *Immunity.* juin 2008;28(6):833-46.

163. Ohsaka A, Saionji K, Takagi S, Igari J. Increased expression of the high-affinity receptor for IgG (FcRI, CD64) on neutrophils in multiple myeloma. *Hematopathol Mol Hematol.* 1996;10(3):151-60.

164. Quayle JA, Watson F, Bucknall RC, Edwards SW. Neutrophils from the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis express the high affinity immunoglobulin G receptor, Fc γ RI (CD64): role of immune complexes and cytokines in induction of receptor expression. *Immunology.* juin 1997;91(2):266-73.

165. Mancardi DA, Albanesi M, Jönsson F, Iannascoli B, Van Rooijen N, Kang X, et al. The high-affinity human IgG receptor Fc γ RI (CD64) promotes IgG-mediated inflammation, anaphylaxis, and antitumor immunotherapy. *Blood.* 28 févr 2013;121(9):1563-73.

166. Smith P, DiLillo DJ, Bournazos S, Li F, Ravetch JV. Mouse model recapitulating human Fc γ receptor structural and functional diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 17 avr 2012;109(16):6181-6.

167. 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 [Internet].* août 2016 [cité 9 sept 2016]; Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674916308521>

168. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fc γ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol.* janv 2008;8(1):34–47.
169. Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood.* 15 juill 2003;102(2):449–61.
170. Jandrot-Perrus M, Busfield S, Lagrue A-H, Xiong X, Debili N, Chickering T, et al. Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily. *Blood.* 1 sept 2000;96(5):1798–807.
171. Tsuji M, Ezumi Y, Arai M, Takayama H. A novel association of Fc receptor gamma-chain with glycoprotein VI and their co-expression as a collagen receptor in human platelets. *J Biol Chem.* 19 sept 1997;272(38):23528–31.
172. Gardiner EE, Karunakaran D, Arthur JF, Mu F-T, Powell MS, Baker RI, et al. Dual ITAM-mediated proteolytic pathways for irreversible inactivation of platelet receptors: de-ITAM-izing Fc γ RIIa. *Blood.* 1 janv 2008;111(1):165–74.
173. Daëron M, Bruhns P, Lesourne R, Malbec O, Fridman WH. SHIP1-mediated negative regulation of cell activation and proliferation by Fc γ RIIB. 2001;141–52.
174. Hogarth PM, Pietersz GA. Fc receptor-targeted therapies for the treatment of inflammation, cancer and beyond. *Nat Rev Drug Discov.* avr 2012;11(4):311–31.
175. Boross P, Arandhara VL, Martin-Ramirez J, Santiago-Raber M-L, Carlucci F, Flierman R, et al. The Inhibiting Fc Receptor for IgG, Fc γ RIIB, Is a Modifier of Autoimmune Susceptibility. *J Immunol.* 8 janv 2011;187(3):1304–13.
176. Takai T, Ono M, Hikida M, Ohmori H, Ravetch JV. Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc gamma RII-deficient mice. *Nature.* 25 janv 1996;379(6563):346–9.
177. Leatherbarrow RJ, Dwek RA. Binding of complement subcomponent C1q to mouse IgG1, IgG2a and IgG2b: a novel C1q binding assay. *Mol Immunol.* avr 1984;21(4):321–7.
178. Fujita T. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nat Rev Immunol.* mai 2002;2(5):346–53.
179. Duncan AR, Winter G. The binding site for C1q on IgG. *Nature.* 21 avr 1988;332(6166):738–40.
180. Kodama T, Sekine H, Takahashi M, Iwaki D, Machida T, Kanno K, et al. Role of complement in a murine model of peanut-induced anaphylaxis. *Immunobiology.* juin 2013;218(6):844–50.
181. Khodoun M, Strait R, Orekov T, Hogan S, Karasuyama H, Herbert DR, et al. Peanuts can contribute to anaphylactic shock by activating complement. *J Allergy Clin Immunol.* 1 févr 2009;123(2):342–51.

182. Lux A, Yu X, Scanlan CN, Nimmerjahn F. Impact of immune complex size and glycosylation on IgG binding to human Fc γ Rs. *J Immunol Baltim Md* 1950. 15 avr 2013;190(8):4315–23.
183. Mkaddem SB, Hayem G, Jönsson F, Rossato E, Boedec E, Boussetta T, et al. Shifting Fc γ RIIA-ITAM from activation to inhibitory configuration ameliorates arthritis. *J Clin Invest*. 2 sept 2014;124(9):3945–59.
184. Kanamaru Y, Pfirsch S, Aloulou M, Vrtovsnik F, Essig M, Loirat C, et al. Inhibitory ITAM Signaling by Fc α RI-FcR γ Chain Controls Multiple Activating Responses and Prevents Renal Inflammation. *J Immunol*. 15 févr 2008;180(4):2669–78.
185. Aloulou M, Ben Mkaddem S, Biarnes-Pelicot M, Boussetta T, Souchet H, Rossato E, et al. IgG1 and IVIg induce inhibitory ITAM signaling through Fc γ RIII controlling inflammatory responses. *Blood*. 29 mars 2012;119(13):3084–96.
186. Dubé R, Rook GA, Steele J, Brealey R, Dwek R, Rademacher T, et al. Agalactosyl IgG in inflammatory bowel disease: correlation with C-reactive protein. *Gut*. avr 1990;31(4):431–4.
187. Nakajima S, Iijima H, Shinzaki S, Egawa S, Inoue T, Mukai A, et al. Functional analysis of agalactosyl IgG in inflammatory bowel disease patients. *Inflamm Bowel Dis*. avr 2011;17(4):927–36.
188. Parekh RB, Dwek RA, Sutton BJ, Fernandes DL, Leung A, Stanworth D, et al. Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature*. 1 août 1985;316(6027):452–7.
189. Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science*. 4 août 2006;313(5787):670–3.
190. Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, et al. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc γ RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem*. 26 juill 2002;277(30):26733–40.
191. Kapur R, Kustiawan I, Vestrheim A, Koeleman CAM, Visser R, Einarsdottir HK, et al. A prominent lack of IgG1-Fc fucosylation of platelet alloantibodies in pregnancy. *Blood*. 23 janv 2014;123(4):471–80.
192. Wührer M, Porcelijn L, Kapur R, Koeleman CAM, Deelder A, de Haas M, et al. Regulated glycosylation patterns of IgG during alloimmune responses against human platelet antigens. *J Proteome Res*. févr 2009;8(2):450–6.
193. Yamane-Ohnuki N, Satoh M. Production of therapeutic antibodies with controlled fucosylation. *mAbs*. 2009;1(3):230–6.
194. Suzuki E, Niwa R, Saji S, Muta M, Hirose M, Iida S, et al. A nonfucosylated anti-HER2 antibody augments antibody-dependent cellular cytotoxicity in breast cancer patients. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 mars 2007;13(6):1875–82.

195. Schmitt A, Guichard J, Massé J-M, Debili N, Cramer EM. Of mice and men: Comparison of the ultrastructure of megakaryocytes and platelets. *Exp Hematol.* nov 2001;29(11):1295-302.
196. Ware J. Dysfunctional platelet membrane receptors: from humans to mice. *Thromb Haemost.* sept 2004;92(3):478-85.
197. Kelton JG, Smith JW, Warkentin TE, Hayward CP, Denomme GA, Horsewood P. Immunoglobulin G from patients with heparin-induced thrombocytopenia binds to a complex of heparin and platelet factor 4. *Blood.* 1 juin 1994;83(11):3232-9.
198. 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 JTH.* janv 2009;7(1):171-81.
199. Arman M, Krauel K, Tilley DO, Weber C, Cox D, Greinacher A, et al. Amplification of bacteria-induced platelet activation is triggered by FcγRIIA, integrin αIIbβ3, and platelet factor 4. *Blood.* 15 mai 2014;123(20):3166-74.
200. Shannon O, Hertzén E, Norrby-Teglund A, Mörgelin M, Sjöbring U, Björck L. Severe streptococcal infection is associated with M protein-induced platelet activation and thrombus formation. *Mol Microbiol.* sept 2007;65(5):1147-57.
201. Cox D, Kerrigan SW, Watson SP. Platelets and the innate immune system: mechanisms of bacterial-induced platelet activation. *J Thromb Haemost JTH.* juin 2011;9(6):1097-107.
202. Boilard E, Paré G, Rousseau M, Cloutier N, Dubuc I, Lévesque T, et al. Influenza virus H1N1 activates platelets through FcγRIIA signaling and thrombin generation. *Blood.* 1 mai 2014;123(18):2854-63.
203. Boylan B, Gao C, Rathore V, Gill JC, Newman DK, Newman PJ. Identification of FcγRIIA as the ITAM-bearing receptor mediating αIIbβ3 outside-in integrin signaling in human platelets. *Blood.* 1 oct 2008;112(7):2780-6.
204. 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.* 7 mars 2013;121(10):1858-67.
205. Nieswandt B, Echtenacher B, Wachs FP, Schröder J, Gessner JE, Schmidt RE, et al. Acute systemic reaction and lung alterations induced by an antiplatelet integrin gpIIb/IIIa antibody in mice. *Blood.* 15 juill 1999;94(2):684-93.
206. Kulkarni S, Woollard KJ, Thomas S, Oxley D, Jackson SP. Conversion of platelets from a proaggregatory to a proinflammatory adhesive phenotype: role of PAF in spatially regulating neutrophil adhesion and spreading. *Blood.* 15 sept 2007;110(6):1879-86.
207. Bazzoni G, Dejana E, Del Maschio A. Platelet-neutrophil interactions. Possible relevance in the pathogenesis of thrombosis and inflammation. *Haematologica.* déc 1991;76(6):491-9.

208. Jirouskova M, Shet AS, Johnson GJ. A guide to murine platelet structure, function, assays, and genetic alterations. *J Thromb Haemost.* 1 avr 2007;5(4):661–9.
209. Moore KL, Stults NL, Diaz S, Smith DF, Cummings RD, Varki A, et al. Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells. *J Cell Biol.* juill 1992;118(2):445–56.
210. Keelan ET, Licence ST, Peters AM, Binns RM, Haskard DO. Characterization of E-selectin expression in vivo with use of a radiolabeled monoclonal antibody. *Am J Physiol.* janv 1994;266(1 Pt 2):H278–290.
211. Tedder TF, Luscinskas W, Kansas GS. Regulation of leukocyte migration by L-selectin: mechanisms, domains and ligands. *Behring Inst Mitt.* août 1993;(92):165–77.
212. Weber C, Springer TA. Neutrophil accumulation on activated, surface-adherent platelets in flow is mediated by interaction of Mac-1 with fibrinogen bound to α IIb β 3 and stimulated by platelet-activating factor. *J Clin Invest.* 15 oct 1997;100(8):2085–93.
213. Vanichakarn P, Blair P, Wu C, Freedman JE, Chakrabarti S. Neutrophil CD40 enhances platelet-mediated inflammation. *Thromb Res.* 2008;122(3):346–58.
214. Blanks JE, Moll T, Eytner R, Vestweber D. Stimulation of P-selectin glycoprotein ligand-1 on mouse neutrophils activates β 2-integrin mediated cell attachment to ICAM-1. *Eur J Immunol.* févr 1998;28(2):433–43.
215. Floyd CN, Ferro A. The platelet fibrinogen receptor: from megakaryocyte to the mortuary. *JRSM Cardiovasc Dis* [Internet]. 31 mai 2012 [cité 3 oct 2016];1(2). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3738324/>
216. Maugeri N, Rovere-Querini P, Evangelista V, Covino C, Capobianco A, Bertilaccio MTS, et al. Neutrophils phagocytose activated platelets in vivo: a phosphatidylserine, P-selectin, and β 2 integrin–dependent cell clearance program. *Blood.* 21 mai 2009;113(21):5254–65.
217. Criswell KA, Breider MA, Bleavins MR. EDTA-dependent platelet phagocytosis. A cytochemical, ultrastructural, and functional characterization. *Am J Clin Pathol.* mars 2001;115(3):376–84.
218. Russwurm S, Vickers J, Meier-Hellmann A, Spangenberg P, Bredle D, Reinhart K, et al. Platelet and leukocyte activation correlate with the severity of septic organ dysfunction. *Shock Augusta Ga.* avr 2002;17(4):263–8.
219. Shi G, Morrell CN. Platelets As Initiators and Mediators of Inflammation at the Vessel Wall. *Thromb Res.* mai 2011;127(5):387–90.
220. Coëffier E, Delautier D, Le Couedic JP, Chignard M, Denizot Y, Benveniste J. Cooperation between platelets and neutrophils for paf-acether (platelet-activating factor) formation. *J Leukoc Biol.* mars 1990;47(3):234–43.
221. Denzlinger C, Haberl C, Wilmanns W. Cysteinyl leukotriene production in anaphylactic reactions. *Int Arch Allergy Immunol.* oct 1995;108(2):158–64.

222. Fiore S, Serhan CN. Formation of lipoxins and leukotrienes during receptor-mediated interactions of human platelets and recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-primed neutrophils. *J Exp Med.* 1 nov 1990;172(5):1451-7.
223. Palmantier R, Borgeat P. Thrombin-activated platelets promote leukotriene B₄ synthesis in polymorphonuclear leucocytes stimulated by physiological agonists. *Br J Pharmacol.* 1991;103(4):1909-16.
224. Maclouf JA, Murphy RC. Transcellular metabolism of neutrophil-derived leukotriene A₄ by human platelets. A potential cellular source of leukotriene C₄. *J Biol Chem.* 5 janv 1988;263(1):174-81.
225. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 5 mars 2004;303(5663):1532-5.
226. Welbourn CR, Young Y. Endotoxin, septic shock and acute lung injury: neutrophils, macrophages and inflammatory mediators. *Br J Surg.* oct 1992;79(10):998-1003.
227. Carestia A, Kaufman T, Rivadeneyra L, Landoni VI, Pozner RG, Negrotto S, et al. Mediators and molecular pathways involved in the regulation of neutrophil extracellular trap formation mediated by activated platelets. *J Leukoc Biol.* janv 2016;99(1):153-62.
228. Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, Frasca L, Conrad C, Gregorio J, et al. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med.* 9 mars 2011;3(73):73ra19.
229. Carestia A, Rivadeneyra L, Romaniuk MA, Fondevila C, Negrotto S, Schattner M. Functional responses and molecular mechanisms involved in histone-mediated platelet activation. *Thromb Haemost.* nov 2013;110(5):1035-45.
230. Fuchs TA, Bhandari AA, Wagner DD. Histones induce rapid and profound thrombocytopenia in mice. *Blood.* 29 sept 2011;118(13):3708-14.
231. Yoshida A, Ohba M, Wu X, Sasano T, Nakamura M, Endo Y. Accumulation of platelets in the lung and liver and their degranulation following antigen-challenge in sensitized mice. *Br J Pharmacol.* sept 2002;137(2):146-52.
232. Choi IH, Ha TY, Lee DG, Park JS, Lee JH, Park YM, et al. Occurrence of disseminated intravascular coagulation (DIC) in active systemic anaphylaxis: role of platelet-activating factor. *Clin Exp Immunol.* juin 1995;100(3):390-4.
233. Sun J, Arias K, Alvarez D, Fattouh R, Walker T, Goncharova S, et al. Impact of CD40 Ligand, B Cells, and Mast Cells in Peanut-Induced Anaphylactic Responses. *J Immunol.* 15 nov 2007;179(10):6696-703.
234. Smit JJ, Willemsen K, Hassing I, Fiechter D, Storm G, van Bloois L, et al. Contribution of classic and alternative effector pathways in peanut-induced anaphylactic responses. *PloS One.* 2011;6(12):e28917.

235. Krishnamurthy D, Starkl P, Szalai K, Roth-Walter F, Diesner SC, Mittlboeck M, et al. Monitoring neutrophils and platelets during casein-induced anaphylaxis in an experimental BALB/c mouse model. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. juill 2012;42(7):1119-28.
236. Kucuk ZY, Strait R, Khodoun MV, Mahler A, Hogan S, Finkelman FD. Induction and suppression of allergic diarrhea and systemic anaphylaxis in a murine model of food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. mai 2012;129(5):1343-8.
237. Khodoun MV, Strait R, Armstrong L, Yanase N, Finkelman FD. Identification of markers that distinguish IgE- from IgG-mediated anaphylaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26 juill 2011;108(30):12413-8.
238. Bruschi AM, Clarke RC, Platt PR, Phillips EJ. Exploring the link between pholcodine exposure and neuromuscular blocking agent anaphylaxis. *Br J Clin Pharmacol*. juill 2014;78(1):14-23.
239. Résumé des Caractéristiques du Produit [Internet]. [cité 6 oct 2016]. Disponible sur: <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0235800.htm>
240. Burton OT, Stranks AJ, Tamayo JM, Koleoglou KJ, Schwartz LB, Oettgen HC. A humanized mouse model of anaphylactic peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. [cité 6 oct 2016]; Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674916304262>
241. Woof JM, Kerr MA. The function of immunoglobulin A in immunity. *J Pathol*. 1 janv 2006;208(2):270-82.
242. Cellular distribution, regulation, and biochemical nature of an Fc alpha receptor in humans. *J Exp Med*. 1 mars 1990;171(3):597-613.
243. Bakema JE, van Egmond M. The human immunoglobulin A Fc receptor Fc α RI: a multifaceted regulator of mucosal immunity. *Mucosal Immunol*. nov 2011;4(6):612-24.
244. Aleyd E, Hout MWM van, Ganzvles SH, Hoebe KA, Everts V, Bakema JE, et al. IgA Enhances NETosis and Release of Neutrophil Extracellular Traps by Polymorphonuclear Cells via Fc α Receptor I. *J Immunol*. 3 févr 2014;1300261.
245. Nahm DH, Kim HY, Park HS. Elevation of specific immunoglobulin A antibodies to both allergen and bacterial antigen in induced sputum from asthmatics. *Eur Respir J*. 1 sept 1998;12(3):540-5.
246. Woolhiser MR, Okayama Y, Gilfillan AM, Metcalfe DD. IgG-dependent activation of human mast cells following up-regulation of Fc γ RI by IFN- γ . *Eur J Immunol*. nov 2001;31(11):3298-307.
247. Takai T, Li M, Sylvestre D, Clynes R, Ravetch JV. FcR gamma chain deletion results in pleiotropic effector cell defects. *Cell*. 11 févr 1994;76(3):519-29.
248. A novel role for the Fc receptor gamma subunit: enhancement of Fc gamma R ligand affinity. *J Exp Med*. 1 mai 1996;183(5):2227-33.

249. Takai T, Li M, Sylvestre D, Clynes R, Ravetch JV. FcR γ chain deletion results in pleiotrophic effector cell defects. *Cell*. 11 févr 1994;76(3):519–29.
250. Merck E, Gaillard C, Gorman DM, Montero-Julian F, Durand I, Zurawski SM, et al. OSCAR is an FcRgamma-associated receptor that is expressed by myeloid cells and is involved in antigen presentation and activation of human dendritic cells. *Blood*. 1 sept 2004;104(5):1386–95.
251. Yamasaki S, Ishikawa E, Sakuma M, Hara H, Ogata K, Saito T. Mincle is an ITAM-coupled activating receptor that senses damaged cells. *Nat Immunol*. oct 2008;9(10):1179–88.
252. Tipton TR, Mockridge CI, French RR, Tutt AL, Cragg MS, Beers SA. Anti-mouse Fc γ RIV antibody 9E9 also blocks Fc γ RIII in-vivo. *Blood*. 1 janv 2015;blood-2015-09-671339.
253. 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*. 15 janv 1996;97(2):331–8.
254. Karsunky H, Zeng H, Schmidt T, Zevnik B, Kluge R, Schmid KW, et al. Inflammatory reactions and severe neutropenia in mice lacking the transcriptional repressor Gfi1. *Nat Genet*. mars 2002;30(3):295–300.
255. Lee PY, Wang J-X, Parisini E, Dascher CC, Nigrovic PA. Ly6 family proteins in neutrophil biology. *J Leukoc Biol*. 10 janv 2013;94(4):585–94.
256. Bruhn KW, Dekitani K, Nielsen TB, Pantapalangkoor P, Spellberg B. Ly6G-mediated depletion of neutrophils is dependent on macrophages. *Results Immunol*. 21 déc 2015;6:5–7.
257. Li J, van der Wal DE, Zhu G, Xu M, Yougbare I, Ma L, et al. Desialylation is a mechanism of Fc-independent platelet clearance and a therapeutic target in immune thrombocytopenia. *Nat Commun*. 17 juill 2015;6:7737.
258. Tiedt R, Schomber T, Hao-Shen H, Skoda RC. Pf4-Cre transgenic mice allow the generation of lineage-restricted gene knockouts for studying megakaryocyte and platelet function in vivo. *Blood*. 15 févr 2007;109(4):1503–6.
259. Rydell-Törmänen K, Uller L, Erjefält JS. Neutrophil cannibalism – a back up when the macrophage clearance system is insufficient. *Respir Res*. 2006;7(1):143.
260. Coughlan AM, Freeley SJ, Robson MG. Humanised mice have functional human neutrophils. *J Immunol Methods*. 30 nov 2012;385(1–2):96–104.
261. Hu Z, Yang Y-G. Full reconstitution of human platelets in humanized mice after macrophage depletion. *Blood*. 23 août 2012;120(8):1713–6.
262. Imbach P. Treatment of immune thrombocytopenia with intravenous immunoglobulin and insights for other diseases. A historical review. *Swiss Med Wkly*. 2012;142:w13593.

263. Imbach P, Barandun S, d'Apuzzo V, Baumgartner C, Hirt A, Morell A, et al. High-dose intravenous gammaglobulin for idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood. *Lancet Lond Engl*. 6 juin 1981;1(8232):1228-31.
264. Fehr J, Hofmann V, Rappeler U. Transient Reversal of Thrombocytopenia in Idiopathic Thrombocytopenic Purpura by High-Dose Intravenous Gamma Globulin. *N Engl J Med*. 27 mai 1982;306(21):1254-8.
265. Rosenbaum JT, George RK, Gordon C. The treatment of refractory uveitis with intravenous immunoglobulin. *Am J Ophthalmol*. mai 1999;127(5):545-9.
266. Newland AC, Treleaven JG, Minchinton RM, Waters AH. High-dose intravenous IgG in adults with autoimmune thrombocytopenia. *Lancet Lond Engl*. 15 janv 1983;1(8316):84-7.
267. Hilgartner MW, Bussel J. Use of intravenous gamma globulin for the treatment of autoimmune neutropenia of childhood and autoimmune hemolytic anemia. *Am J Med*. 23 oct 1987;83(4A):25-9.
268. Schwab I, Nimmerjahn F. Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system? *Nat Rev Immunol*. mars 2013;13(3):176-89.
269. Li N, Zhao M, Hilario-Vargas J, Prisayanh P, Warren S, Diaz LA, et al. Complete FcRn dependence for intravenous Ig therapy in autoimmune skin blistering diseases. *J Clin Invest*. déc 2005;115(12):3440-50.
270. Schwab I, Biburger M, Krönke G, Schett G, Nimmerjahn F. IVIg-mediated amelioration of ITP in mice is dependent on sialic acid and SIGNR1. *Eur J Immunol*. avr 2012;42(4):826-30.
271. Karsten CM, Pandey MK, Figge J, Kilchenstein R, Taylor PR, Rosas M, et al. Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of FcγRIIB and dectin-1. *Nat Med*. sept 2012;18(9):1401-6.
272. Bruhns P, Samuelsson A, Pollard JW, Ravetch JV. Colony-stimulating factor-1-dependent macrophages are responsible for IVIG protection in antibody-induced autoimmune disease. *Immunity*. avr 2003;18(4):573-81.
273. Sondermann P. The FcγR/IgG Interaction as Target for the Treatment of Autoimmune Diseases. *J Clin Immunol*. 2 avr 2016;36(1):95-9.
274. Jakus Z, Fodor S, Abram CL, Lowell CA, Mócsai A. Immunoreceptor-like signaling by beta 2 and beta 3 integrins. *Trends Cell Biol*. oct 2007;17(10):493-501.
275. Meltzer EO, Berkowitz RB, Grossbard EB. An intranasal Syk-kinase inhibitor (R112) improves the symptoms of seasonal allergic rhinitis in a park environment. *J Allergy Clin Immunol*. avr 2005;115(4):791-6.
276. Portola inks deal with Ora for PRT2761 in ophthalmic diseases [Internet]. [cité 4 oct 2016]. Disponible sur: <http://www.thepharmaletter.com/article/portola-inks-deal-with-ora-for-prt2761-in-ophthalmic-diseases>

277. rigel fostamatinib ITP [Internet]. [cité 4 oct 2016]. Disponible sur: <http://www.rigel.com/index.php/fostamatinib-ityp/>
278. Mócsai A, Ruland J, Tybulewicz VLJ. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol*. juin 2010;10(6):387–402.
279. Fitzgerald DJ, Fitzgerald GA. Historical lessons in translational medicine: cyclooxygenase inhibition and P2Y₁₂ antagonism. *Circ Res*. 4 janv 2013;112(1):174–94.
280. Smith JB, Araki H, Lefer AM. Thromboxane A₂, prostacyclin and aspirin: effects on vascular tone and platelet aggregation. *Circulation*. déc 1980;62(6 Pt 2):V19-25.
281. Recommandations - Bon usage des agents plaquettaires - 194fcef638d42481f19a2cd0f91f4fe1.pdf [Internet]. [cité 5 oct 2016]. Disponible sur: http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/194fcef638d42481f19a2cd0f91f4fe1.pdf
282. Berkes EA. Anaphylactic and anaphylactoid reactions to aspirin and other NSAIDs. *Clin Rev Allergy Immunol*. avr 2003;24(2):137–48.
283. Gazit SL, Mariko B, Thérond P, Decouture B, Xiong Y, Couty L, et al. Platelet and Erythrocyte Sources of S1P Are Redundant for Vascular Development and Homeostasis, but both Rendered Essential After Plasma S1P Depletion in Anaphylactic Shock. *Circ Res*. 31 août 2016;CIRCRESAHA.116.308929.
284. Igarashi J, Michel T. Sphingosine-1-phosphate and modulation of vascular tone. *Cardiovasc Res*. 1 mai 2009;82(2):212–20.
285. Gao C, Boylan B, Bougie D, Gill JC, Birenbaum J, Newman DK, et al. Eptifibatide-induced thrombocytopenia and thrombosis in humans require FcγRIIIa and the integrin β₃ cytoplasmic domain. *J Clin Invest*. 2 mars 2009;119(3):504–11.
286. Schmitt C, Abt M, Ciorciaro C, Kling D, Jamois C, Schick E, et al. First-in-man Study With Inclacumab, a Human Monoclonal Antibody Against P-selectin. *J Cardiovasc Pharmacol*. juin 2015;65(6):611–9.
287. Mandarino D, Kavar Z, Alvarez R, Falconer D, Rollins SA, Rother RP. Placebo-Controlled, Double-Blind, First-In-Human, Ascending Single Dose and Multiple Dose, Healthy Subject Study Of Intravenous-Administered SelG1, a Humanized Anti-P-Selectin Antibody In Development For Sickle Cell Disease. *Blood*. 15 nov 2013;122(21):970–970.
288. Development of an Anti-PSGL-1 Antibody to Treat Crohn's Disease | SBIR.gov [Internet]. [cité 5 oct 2016]. Disponible sur: <https://www.sbir.gov/sbirsearch/detail/370525>
289. Shock A, Burkly L, Wakefield I, Peters C, Garber E, Ferrant J, et al. CDP7657, an anti-CD40L antibody lacking an Fc domain, inhibits CD40L-dependent immune responses without thrombotic complications: an in vivo study. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2015 [cité 5 oct 2016];17(1). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4558773/>

290. Robles-Carrillo L, Meyer T, Hatfield M, Desai H, Dávila M, Langer F, et al. Anti-CD40L immune complexes potentially activate platelets in vitro and cause thrombosis in FCGR2A transgenic mice. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 août 2010;185(3):1577–83.
291. Tocoian A, Buchan P, Kirby H, Soranson J, Zamacona M, Walley R, et al. First-in-human trial of the safety, pharmacokinetics and immunogenicity of a PEGylated anti-CD40L antibody fragment (CDP7657) in healthy individuals and patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. sept 2015;24(10):1045–56.
292. 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*. avr 2008;28(4):581–9.
293. Gillis C, Gouel-Chéron A, Jönsson F, Bruhns P. Contribution of Human Fc γ Rs to Disease with Evidence from Human Polymorphisms and Transgenic Animal Studies. *Front Immunol [Internet]*. 30 mai 2014 [cité 23 sept 2016];5. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4038777/>
294. Ishii S, Kuwaki T, Nagase T, Maki K, Tashiro F, Sunaga S, et al. Impaired anaphylactic responses with intact sensitivity to endotoxin in mice lacking a platelet-activating factor receptor. *J Exp Med*. 1 juin 1998;187(11):1779–88.
295. 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*. 3 janv 2008;358(1):28–35.
296. O'Connor BJ, Uden S, Carty TJ, Eskra JD, Barnes PJ, Chung KF. Inhibitory effect of UK,74505, a potent and specific oral platelet activating factor (PAF) receptor antagonist, on airway and systemic responses to inhaled PAF in humans. *Am J Respir Crit Care Med*. juill 1994;150(1):35–40.
297. Evans DJ, Barnes PJ, Cluzel M, O'Connor BJ. Effects of a potent platelet-activating factor antagonist, SR27417A, on allergen-induced asthmatic responses. *Am J Respir Crit Care Med*. juill 1997;156(1):11–6.
298. Freitag A, Watson RM, Matsos G, Eastwood C, O'Byrne PM. Effect of a platelet activating factor antagonist, WEB 2086, on allergen induced asthmatic responses. *Thorax*. juin 1993;48(6):594–8.
299. Vincent JL, Spapen H, Bakker J, Webster NR, Curtis L. Phase II multicenter clinical study of the platelet-activating factor receptor antagonist BB-882 in the treatment of sepsis. *Crit Care Med*. mars 2000;28(3):638–42.
300. Prescott SM, Zimmerman GA, Stafforini DM, McIntyre TM. Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu Rev Biochem*. 2000;69:419–45.
301. Million M, Fioramonti J, Zajac JM, Buéno L. Effects of neuropeptide FF on intestinal motility and temperature changes induced by endotoxin and platelet-activating factor. *Eur J Pharmacol*. 3 sept 1997;334(1):67–73.

302. Fukuda Y, Kawashima H, Saito K, Inomata N, Matsui M, Nakanishi T. Effect of human plasma-type platelet-activating factor acetylhydrolase in two anaphylactic shock models. *Eur J Pharmacol.* 25 févr 2000;390(1-2):203-7.
303. Fineman SM. Optimal treatment of anaphylaxis: antihistamines versus epinephrine. *Postgrad Med.* juill 2014;126(4):73-81.
304. Elmore BO, Bollinger JA, Dooley DM. Human kidney diamine oxidase: heterologous expression, purification, and characterization. *J Biol Inorg Chem JBIC Publ Soc Biol Inorg Chem.* juin 2002;7(6):565-79.
305. Merlos M, Giral M, Balsa D, Ferrando R, Queralt M, Puigdemont A, et al. Rupatadine, a new potent, orally active dual antagonist of histamine and platelet-activating factor (PAF). *J Pharmacol Exp Ther.* janv 1997;280(1):114-21.

Annexe

Mechanisms of anaphylaxis in human low-affinity IgG receptor locus knock-in mice

Mechanisms of anaphylaxis in human low-affinity IgG receptor locus knock-in mice

Caitlin M. Gillis, BSci,^{a,b,c} Friederike Jönsson, PhD,^{a,b} David A. Mancardi, PhD,^{a,b} Naxin Tu, PhD,^e Héloïse Beutier, PharmD,^{a,b,c} Nico Van Rooijen, PhD,^d Lynn E. Macdonald, PhD,^e Andrew J. Murphy, PhD,^e and Pierre Bruhns, PhD^{a,b}
Paris, France, Amsterdam, The Netherlands, and Tarrytown, NY

Background: Anaphylaxis can proceed through distinct IgE- or IgG-dependent pathways, which have been investigated in various mouse models. We developed a novel mouse strain in which the human low-affinity IgG receptor locus, comprising both activating (hFcγRIIA, hFcγRIIA, and hFcγRIIB) and inhibitory (hFcγRIIB) hFcγR genes, has been inserted into the equivalent murine locus, corresponding to a locus swap.

Objective: We sought to determine the capabilities of hFcγRs to induce systemic anaphylaxis and identify the cell types and mediators involved.

Methods: hFcγR expression on mouse and human cells was compared to validate the model. Passive systemic anaphylaxis was induced by injection of heat-aggregated human intravenous immunoglobulin and active systemic anaphylaxis after immunization and challenge. Anaphylaxis severity was evaluated based on hypothermia and mortality. The contribution of receptors, mediators, or cell types was assessed based on receptor blockade or depletion.

Results: The human-to-mouse low-affinity FcγR locus swap engendered hFcγRIIA/IIB/IIIA/IIB expression in mice comparable with that seen in human subjects. Knock-in mice were susceptible to passive and active anaphylaxis, accompanied by downregulation of both activating and inhibitory hFcγR expression on specific myeloid cells. The contribution of hFcγRIIA was predominant. Depletion of neutrophils protected against hypothermia and mortality. Basophils contributed to a

lesser extent. Anaphylaxis was inhibited by platelet-activating factor receptor or histamine receptor 1 blockade.

Conclusion: Low-affinity FcγR locus-switched mice represent an unprecedented model of cognate hFcγR expression.

Importantly, IgG-related anaphylaxis proceeds within a native context of activating and inhibitory hFcγRs, indicating that, despite robust hFcγRIIB expression, activating signals can dominate to initiate a severe anaphylactic reaction. (*J Allergy Clin Immunol* 2016;■■■■:■■■■-■■■■.)

Key words: Anaphylaxis, IgG, knock-in mouse model, basophil, neutrophil, monocyte, macrophage, human FcγR, platelet-activating factor, histamine

Anaphylaxis is a severe systemic allergic reaction, the reported incidence of which is increasing worldwide.¹⁻³ Reactions are clinically heterogeneous yet characterized by rapid symptom progression and risk of death: intense vasodilation and bronchoconstriction can lead to hypotension, hypothermia, tachycardia, and respiratory distress, which can result in heart and lung failure. In children the most common causative agent is food, whereas in adults drug-induced anaphylaxis accounts for the majority of cases and the majority of fatal reactions. Anaphylaxis is classically attributed to an IgE-mediated reaction driven by mast cell activation and release of histamine and tryptase.⁴

Many cases of human anaphylaxis, in particular anaphylaxis to drugs, are not accompanied by increased serum tryptase or detectable antigen-specific IgE levels.⁵⁻⁸ Alternative IgE-independent pathways might actually underlie a significant fraction of these anaphylactic events: indeed, non-IgE reactions have been reported to account for up to 30% of cases of drug-induced anaphylaxis.⁹ Furthermore, measures of histamine and mast cell tryptase in patients' sera do not reflect the severity of reactions,^{7,10} whereas serum platelet-activating factor (PAF) levels were found to directly correlate with anaphylaxis severity.^{11,12} Supporting these notions, experimental animal models have demonstrated that fatal systemic anaphylaxis after intravenous challenge proceeds through PAF release triggered by non-IgE-dependent pathways and in particular by IgG-dependent pathways.^{13,14} However, the respective contribution of IgE- and IgG-mediated pathways in human anaphylaxis remains to be determined.

Passive systemic anaphylaxis (PSA) can be induced in mice through the transfer of specific IgE or IgG antibodies before challenge with a specific antigen or through the transfer of preformed IgG immune complexes. Active systemic anaphylaxis (ASA) is elicited by immunization with an antigen before challenge with the same antigen; a polyclonal IgE and IgG antibody response is generated, and death can result from antigen challenge. In both models use of the intravenous route for allergen challenge mimics drug-induced anaphylaxis in patients. ASA

From ^aInstitut Pasteur, Department of Immunology, Unit of Antibodies in Therapy and Pathology, Paris; ^bINSERM, U1222, Paris; ^cUniversité Pierre et Marie Curie, Paris; ^dthe Department of Molecular Cell Biology, VU Medical Center, Amsterdam; and ^eRegeneron Pharmaceuticals, Tarrytown.

This work was supported by the European Research Council (ERC)–Seventh Framework Program (ERC-2013-CoG 616050). Additional support was provided by the Institut Pasteur and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). C.M.G. was supported partly by a stipend from the Pasteur–Paris University (PPU) International PhD program and by the Institut Carnot Pasteur Maladies Infectieuses and partly by the Balsan company. F.J. is an employee of the Centre National de La Recherche Scientifique (CNRS). H.B. is supported by a fellowship from the University Pierre et Marie Curie.

Disclosure of potential conflict of interest: N. Tu is an employee of Regeneron Pharmaceuticals. L. E. Macdonald is an employee of Regeneron Pharmaceuticals. A. J. Murphy is an employee of Regeneron Pharmaceuticals. P. Bruhns receives grant support from the European Research Committee. The rest of the authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

Received for publication December 5, 2015; revised May 13, 2016; accepted for publication June 13, 2016.

Corresponding authors: Pierre Bruhns, PhD, and Caitlin M. Gillis, BSci, Unit of Antibodies in Therapy and Pathology, Department of Immunology, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France. E-mail: bruhsn@pasteur.fr. Or: caitlin.gillis@pasteur.fr.

0091-6749/\$36.00

© 2016 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2016.06.058>

Abbreviations used

ASA:	Active systemic anaphylaxis
BAC:	Bacterial artificial chromosome
BAL:	Bronchoalveolar lavage
ES:	Embryonic stem
HA:	Heat aggregated
IVIG:	Intravenous immunoglobulin
NK:	Natural killer
PAF:	Platelet-activating factor
PAF-R:	Platelet-activating factor receptor
PSA:	Passive systemic anaphylaxis
SSC:	Side scatter

does not depend on IgE antibodies, activating IgE receptors, or mast cells^{15,16} but rather requires activating IgG receptors (FcγR) and the contribution of other myeloid cells: neutrophils, basophils, or monocyte/macrophages.¹⁷⁻¹⁹ PAF was identified as the dominant downstream mediator of IgG-induced anaphylaxis, and PAF alone, like histamine, can reproduce the signs and symptoms of anaphylaxis.^{20,21} Thus mouse models suggest a pathway of anaphylaxis driven by IgG-mediated activation of myeloid cells and relying on PAF release.

Allergic patients who possess detectable allergen-specific IgE also possess detectable allergen-specific IgG. These anti-allergen IgG antibodies are mainly of the IgG₁ isotype, whereas anti-allergen IgG₄ antibodies increase after allergen immunotherapy.²²⁻²⁵ Allergen-specific IgG₄ levels are considered a good correlate to successful allergen immunotherapy; however, it remains unknown whether allergen-specific IgG₁ participates in or is even responsible for non-IgE-mediated human anaphylaxis. Human subjects express a family of IgG receptors (FcγR) comprised of activating IgG receptors (hFcγRI/CD64, hFcγRIIA/CD32A, hFcγRIIC/CD32C, hFcγRIIIA/CD16A, and hFcγRIIIB/CD16B) and a single inhibitory receptor (hFcγRIIB/CD32B), which all bind human IgG₁ and mediate most of the biological functions of IgG.²⁶ Although mice also express both activating and inhibitory FcγRs, murine FcγRs do not structurally or functionally mirror those of human subjects: differential antibody binding affinities and variable expression on immune cell subsets prevent extrapolation from one species to another.²⁶ We reported previously the induction of anaphylaxis (PSA and fatal ASA) in mice transgenic either for hFcγRI/CD64 or hFcγRIIA/CD32A on a background deficient in endogenous mFcγR.^{19,27} PSA mediated by hFcγRIIA was independent of mast cells and basophils and relied on neutrophils and monocytes/macrophages,²⁸ and hFcγRI-dependent ASA required neutrophils and PAF release.²⁷ An important caveat of these results is that they were obtained in mice expressing only 1 hFcγR in the absence of potential regulatory or cooperative effects of other hFcγRs. In a model generated by intercrossing of 5 different hFcγR-transgenic mice, incorporating activating and inhibitory hFcγRs, administration of aggregated human IgG to (hFcγRI^{tg} hFcγRIIA^{tg} hFcγRIIIB^{tg} hFcγRIIIA^{tg} hFcγRIIIB^{tg}) mice on a mFcγR^{null} background was sufficient to trigger anaphylaxis, although the mechanisms were not addressed.²⁹ However, this model reproduces aberrant expressions seen in mice carrying the individual transgenes, including extremely high expression of hFcγRIIB on mouse monocytes and granulocytes.²⁶

Here we present a novel mouse model in which we used highly efficient knock-in technology to insert the entire low-affinity hFcγR locus into the corresponding mouse locus on chromosome 1. This approach engendered expression of activating hFcγRIIA/CD32A, hFcγRIIIA/CD16A, and hFcγRIIIB/CD16B and inhibitory hFcγRIIB/CD32B in mice in a manner resembling expression patterns seen in human subjects. This unprecedented model permits analyses of the role of hFcγRs and the cell types that express them in IgG-mediated anaphylaxis within a cognate context of activating and inhibitory hFcγRs.

METHODS**Mice**

VG1505 and VG1543 mice were designed and generated by Regeneron Pharmaceuticals (Tarrytown, NY) on a mixed 62.5% C57BL/6N and 37.5% 129S6/SvEv genetic background (Fig 1; see also the **Methods** section in this article's Online Repository at www.jacionline.org) and backcrossed 1 generation to C57BL/6N. Mice were bred at Institut Pasteur (Paris, France) and used for experiments at 7 to 11 weeks of age. VG1505 and VG1543 mice demonstrate normal development and breeding patterns. Experiments using mice were validated by the CETEA ethics committee number 89 (Institut Pasteur, Paris, France) under #2013-0103, and by the French Ministry of Research under agreement #00513.02.

ASA

Mice were injected intraperitoneally on day 0 with 200 μg of BSA in complete Freund adjuvant and boosted intraperitoneally on day 14 with 200 μg of BSA in incomplete Freund adjuvant. BSA-specific IgG₁, IgG_{2a/b/c}, and IgE antibodies in serum were titered by using ELISA on day 21, as previously described.¹⁹ Mice with comparable antibody titers were challenged intravenously with 500 μg of BSA 10 to 14 days after the last immunization. Central temperature was monitored by using a digital thermometer (YSI, Yellow Springs, Ohio) with a rectal probe.

PSA

Human intravenous immunoglobulin (IVIG; Gamunex; Grifols, Los Angeles, Calif) was heat aggregated (HA) by means of incubation at 25 mg/mL in borate-buffered saline (0.17 mol/L H₃BO₃ and 0.12 mol/L NaCl, pH 8) for 1 hour at 63°C and then diluted in 0.9% NaCl for intravenous injection at 100 μL per mouse. Central temperature was monitored with a digital thermometer with a rectal probe. Control nonaggregated IVIG was similarly diluted without heating. For hFcγR expression analysis after IVIG-PSA, heparinized blood was sampled 1 hour after IVIG injection. IgE-dependent PSA was induced by means of challenge with 500 μg of TNP-BSA 16 hours after passive transfer of IgE anti-TNP (50 μg of clone C48.2). PSA was induced also by means of PAF injection at 0.3 μg per mouse intravenously, and hypothermia was monitored immediately afterward.

In vivo blocking and depletion

Anti-FcγRIIA mAbs (clone IV.3, 60 μg per mouse) were injected twice intravenously (24 and 4 hours) before challenge. Note that, unlike in FcγRIIA^{tg} mice,³⁰ IV.3 administration did not induce hypothermia or symptoms of anaphylaxis or platelet depletion. Three hundred micrograms per mouse of anti-Gr-1 (RB6-8C5), 300 μg per mouse anti-Ly-6G (NIMP-R14), 30 μg or 60 μg per mouse anti-CD200R3 (Ba103), mAbs, or corresponding rat IgG_{2b} isotype control mAbs were injected intravenously 24 hours before challenge. Note that the NIMP-R14 antibody clone is specific to the Ly-6G antigen (see Fig E1, A-C, in this article's Online Repository at www.jacionline.org). Three hundred microliters per mouse of PBS or clodronate liposomes was injected intravenously either 24 hours before challenge or both 24 and 48 hours before challenge. The specificity of cell depletion was

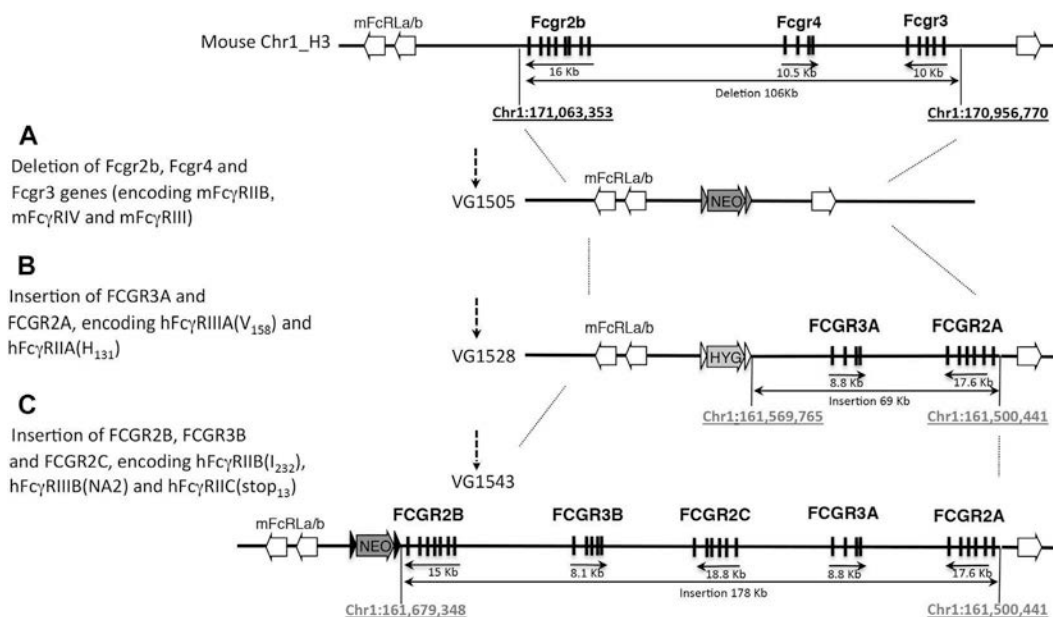


FIG 1. Humanization of the mouse low-affinity receptor locus. Representations are not drawn to scale. **A**, Deletion of mouse *Fcgr2b*, *Fcgr4*, and *Fcgr3* genes in a single targeting step, deleting mouse sequences from 1:170,956,770 to 1:171,063,353 on mouse Chr1_H3 (based on mouse GRCh38). **B** and **C**, Insertion of human *FCGR3A* and *FCGR2A* genes (Fig 1, B) and insertion of *FCGR2B*, *FCGR3B*, and *FCGR2C* genes (Fig 1, C). The total human sequence inserted in VG1543 mice ranges from 1:161,500,441 to 1:161,679,348 on human Chr1_q23.3 based on human GRCh38. Mouse genomic coordinates are in black, human genomic coordinates are in gray, the light gray block arrow indicates hygromycin selection cassettes, dark gray block arrows indicate neomycin selection cassettes, black arrowheads represent Loxp sites, open arrowheads represent Frt sites, and gray arrowheads represent Lox2372 sites.

evaluated in the blood, spleen, and peritoneal lavage fluid of naive VG1543 mice 24 hours after NIMP-R14 (see Fig E1, C-E). See “Specificity and efficiency of cell depletion strategies” in the **Methods** section in this article’s Online Repository for more information.

The platelet-activating factor receptor (PAF-R) antagonists ABT-491 (25 µg per mouse) or CV-6209 (66 µg per mouse) in 0.9% NaCl were injected intravenously 15 or 10 minutes before challenge, respectively. The H₁-receptor antagonists cetirizine DiHCl, pyrilamine maleate, or triprolidine HCl at 300 µg per mouse in 0.9% NaCl were injected intraperitoneally 30 minutes before challenge.

See the **Methods** section in this article’s Online Repository for details on generation of knock-in mice, antibodies and reagents, flow cytometry, specificity and efficiency of cell depletion strategies, and statistics.

RESULTS

Creation of VG1505 (mFcγRIIB^{-/-}mFcγRIII^{-/-}mFcγRIV^{-/-}) and VG1543 (mFcγRIIB^{-/-}mFcγRIII^{-/-}mFcγRIV^{-/-}hFcγRIIA^{KI}hFcγRIIB^{KI}hFcγRIIIA^{KI}hFcγRIIB^{KI}) mice

To delete the mouse low-affinity Fc receptors, a large targeting vector (BACvec)^{31,32} was constructed to delete 106 kb of mouse genomic sequence encompassing the mouse *Fcgr2b*, *Fcgr3*, and *Fcgr4* genes and used to target VGF1 embryonic stem (ES) cells (as described in the **Methods** section in this article’s Online Repository, see Tables E1-E3).³³ The low-affinity FcγR deleted allele (deletion of 1:170,956,770–171,063,353 from Chr1_H3 based on the mouse GRCh38 assembly) was given the designation VG1505 (Fig 1, A).

To insert human *FCGR3A* and *FCGR2A* genes, a BACvec containing 69 kb of the corresponding human sequence flanked by

long mouse homology arms was generated (see the **Methods** section in this article’s Online Repository) and used to retarget VG1505 ES cells.³¹ The subsequent allele in which the 3 mouse low-affinity Fc receptors were replaced with hFCGR3A and hFCGR2A was given the designation VG1528 (Fig 1, B). A BACvec was constructed containing an additional 142 kb of human sequence between a human homology arm homologous to the end of the human insert in VG1528 and a mouse homology arm to insert human *FCGR2B*, *FCGR2C*, and *FCGR3B* genes next to the human *FCGR3A* and *FCGR2A* genes. This BACvec was used to retarget VG1528 ES cells and resulted in an allele designated VG1543 (insertion of human sequence from 1:161,500,441–161,679,348 on Chr1_q23.3 based on the human GRCh38 assembly)^{31,32} in which all 5 human low-affinity FcγR receptor genes replace the 3 mouse low-affinity FcγR genes (Fig 1, C). The inserted human low-affinity FcγRs are in the same order as in the human genome, and the human intergenic sequences are retained intact. The bacterial artificial chromosome (BAC) sequences used encode for the human polymorphic variants hFcγRIIA(H₁₃₁), hFcγRIIB(I₂₃₂), hFcγRIIC(Stop₁₃), hFcγRIIIA(V₁₅₈), and hFcγRIIB(NA2); therefore no expression of hFcγRIIC is expected in VG1543 mice.

VG1543 mice exhibit hFcγR expression patterns on immune cells comparable with those in human subjects

First, we determined that VG1505 and VG1543 mice exhibit normal immune cell composition (see Fig E2 and Table E4 in this article’s Online Repository at www.jacionline.org). VG1505

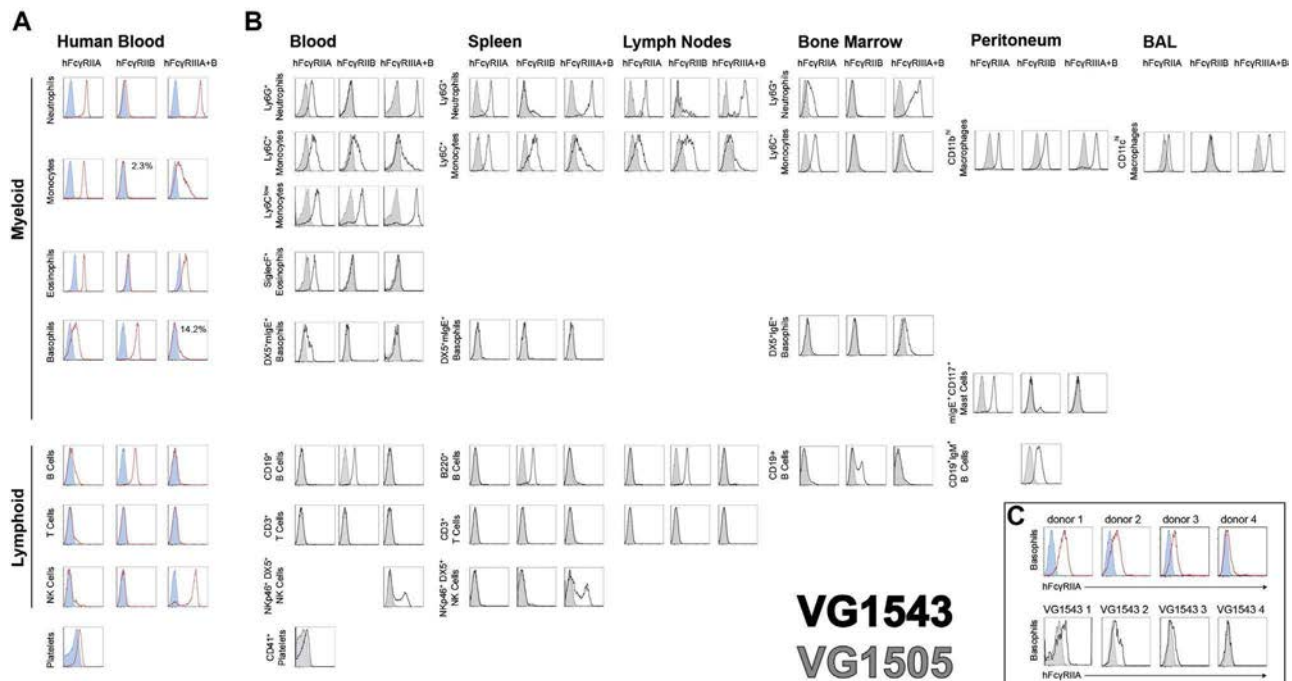


FIG 2. Human Fc γ R expression on immune cell populations from VG1543 mice recapitulates expression patterns in human subjects. **A**, hFc γ RIIA, hFc γ RIIB, hFc γ RIIA, and hFc γ RIIB staining on immune cells from human peripheral blood, as assessed by means of fluorescent antibody labeling and flow cytometric analysis. *Shaded histograms* indicate staining with an isotype control antibody, with the exception of hFc γ RIIB, in which shaded histograms indicate a fluorescence-minus-one control. **B**, hFc γ R staining on immune cells isolated from different tissues of VG1543 mice, as indicated. *Shaded histograms* indicate background staining from VG1505 mice. Data are representative of at least 2 independent experiments (total $n > 3$). Numbers indicate the frequency of cells positive for Fc γ R staining. **C**, Individual variation in hFc γ RIIA expression on basophils isolated from 4 different blood donors (*upper panels*) or from 4 different VG1543 mice (*lower panels*).

mice demonstrate slightly increased frequencies of granulocytes and monocytes in the blood and spleen and macrophages in the peritoneum compared with VG1543 (see Fig E2, A-C, in this article's Online Repository at www.jacionline.org). Furthermore, VG1505 and VG1543 mice exhibit comparable mFc ϵ RI and mFc γ RI expression (see Fig E2, D-F).

To compare the expression pattern of hFc γ Rs in VG1543 mice with that of human subjects, specific antibody staining and flow cytometric analysis were performed on cells isolated either from the blood of healthy human donors or from the blood, spleen, lymph nodes, bone marrow, peritoneum, and bronchoalveolar lavage (BAL) fluid of VG1543 mice. All myeloid cells examined, including monocytes, macrophages, eosinophils, basophils, and mast cells, and among lymphocytes B and natural killer (NK) cells, but not T cells, expressed at least 1 hFc γ R (Fig 2, A and B).

We detected hFc γ RIIA (CD32A) staining on neutrophils, monocytes, eosinophils, and platelets from the blood of healthy human donors (Fig 2, A), as expected,²⁶ and from the blood, spleen, lymph nodes, bone marrow, peritoneum, and BAL fluid of VG1543 mice (Fig 2, B). VG1543 peritoneal mast cells also expressed hFc γ RIIA. Like human blood basophils, VG1543 blood basophils expressed variably hFc γ RIIA (Fig 2, A and B) but not basophils from the spleen or bone marrow; the low level of expression of hFc γ RIIA on VG1543 blood basophils is in the range of expression found on basophils from human donors (Fig 2, C). As expected, lymphocytes, including B, T, and NK

cells, did not express hFc γ RIIA in human subjects and VG1543 mice (Fig 2, A and B); notably, we observed some background staining for hFc γ RIIA on human B cells, as published previously.²⁸ Thus the hFc γ RIIA expression pattern and level are comparable between VG1543 mice and blood from healthy human donors.

In human blood hFc γ RIIB was detected at high levels on all B cells and basophils and at lower levels variably on a proportion of monocytes (2% to 38% positive, $n = 4$ donors), whereas other cells were mostly negative (ie, neutrophils, eosinophils, NK cells, T cells, and platelets; Fig 2, A, and see Fig E3, A), as expected.^{34,35} Similarly, VG1543 mice expressed high levels of hFc γ RIIB on B cells from blood, spleen, lymph nodes, and peritoneum (Fig 2, B). Furthermore, we observed variation in hFc γ RIIB staining among B-cell subpopulations isolated from the bone marrow and peritoneum in VG1543 mice (see Fig E3, B and C, in this article's Online Repository at www.jacionline.org). VG1543 mice demonstrated robust hFc γ RIIB expression on monocyte populations in the blood and lymphoid organs, yet no staining was observed on Ly-6C^{hi} monocytes from the bone marrow. Only a fraction of donors we analyzed demonstrated hFc γ RIIB expression on blood monocytes (see Fig E3, A, in this article's Online Repository at www.jacionline.org), which is consistent with its previously reported variable expression on CD14^{lo} monocytes and absence of expression on CD14^{hi} monocytes.³⁶ Thus VG1543 mice exhibit overexpression of hFc γ RIIB on blood monocytes compared with that seen on human blood

TABLE I. Binding and cross-binding of human and mouse IgG subclasses to human and mouse FcγRs

	Human				Mouse			
	IgG ₁	IgG ₂	IgG ₃	IgG ₄	IgG ₁	IgG _{2a/c}	IgG _{2b}	IgG ₃
Human								
hFcγRI	+++	—	+++	+++	—	+++	+++	+/-
hFcγRIIA(H131)	++	+	+	+	+	+	+	—
hFcγRIIA(R131)	++	+	+	+	++	+	+	—
hFcγRIIB	+	+/-	+	+	—	—	+/-	—
hFcγRIIC	+	+/-	+	+	—	—	+/-	—
hFcγRIIIA(V158)	+	+/-	+++	+	—	+/-	—	—
hFcγRIIIA(F158)	+	+/-	++	+	—	—	—	—
hFcγRIIIB(NA1)	+	—	++	—	—	—	—	—
hFcγRIIIB(NA2)	+	—	++	—	—	—	—	—
hFcγRIIIB(SH)	+	—	++	—	—	—	—	—
Mouse								
mFcγRI	+++	—	++	++	—	+++	+	+/-
mFcγRIIB	—	+/-	—	—	++	+	++	—
mFcγRIII	++	++	+/-	—	+	+	+	—
mFcγRIV	++	+	++	+/-	—	+++	+++	—

Adapted from data reported in Jönsson et al,¹⁹ Bruhns et al,³⁸ Nimmerjahn et al,³⁹ and Mancardi et al⁴⁰ and unpublished data.

—, No binding; +/-, very low binding; +, low binding; ++, medium binding; +++, high binding.

monocytes. Interestingly, hFcγRIIB staining was higher on Ly-6C^{low} “patrolling” monocytes than on Ly-6C^{hi} “classical” monocytes from VG1543 mice (see Fig E3, D), as it is on the analogous populations in human blood, CD14^{low}CD16^{hi} “patrolling” monocytes, and CD14^{hi} “classical” monocytes (see Fig E3, E). Furthermore, spleen monocytes in human subjects³⁶ and VG1543 mice express significant levels of hFcγRIIB, reconciling hFcγRIIB expression on monocytes in this compartment between human donors and VG1543 mice. Macrophages from the peritoneum, but not from BAL fluid, of VG1543 mice were found to be positive for hFcγRIIB (Fig 2, B). Although human basophils express high levels of hFcγRIIB,³⁷ basophils from VG1543 mice were negative (Fig 2, A and B). Overall, VG1543 mice appear to express hFcγRIIB at similar levels on B cells, at the high end of the range on monocytes, but not on basophils, compared with human subjects.

Human neutrophils, monocytes, eosinophils, NK cells, and a small proportion of basophils were labeled positive with an anti-CD16 antibody recognizing both hFcγRIIIA and hFcγRIIIB (Fig 2, A) in accordance with known hFcγRIIIA (NK cells, monocytes/macrophages, and eosinophils) and hFcγRIIIB expression (neutrophils and some basophils).³⁵ Similarly, in the blood and organs from VG1543 mice, neutrophils stained at high levels and monocyte/macrophages, NK cells, and basophils stained at variable levels with anti-CD16 (Fig 2, B, and see Fig E3, D). Eosinophils from VG1543 mice did not show detectable CD16 labeling, which is in accordance with 25% of human donors (see Fig E3, F). Interestingly, CD16 was apparent on only 30% to 45% of NKp46⁺ NK cells from the spleens of VG1543 mice compared with 85% to 98% of CD56⁺ NK cells from human blood. Overall, VG1543 mice appear to express hFcγRIIIA and hFcγRIIIB at similar levels on neutrophils and NK cells and at higher levels on blood monocytes, but not on eosinophils nor on blood basophils, respectively, compared with human subjects.

Induction and mechanism of ASA in VG1543 mice

Among human low-affinity hFcγRs, the activating IgG receptors hFcγRIIA and hFcγRIIIA and the inhibitory IgG

receptor hFcγRIIB can bind mouse IgG isotypes (Table I)^{19,26,28,35,38-40}; therefore we explored the capacity of these receptors to mediate ASA triggered by intravenous BSA challenge in VG1505 and VG1543 mice immunized with BSA (see Fig E4 in this article's Online Repository at www.jacionline.org). After challenge, VG1543, but not VG1505, mice experienced a severe decrease in body temperature and 50% to 100% mortality within 30 minutes (Fig 3, A). Pretreatment of VG1543 mice with blocking antibodies against activating hFcγRIIA (mAb IV.3)²⁸ abolished hypothermia and mortality (Fig 3, B). hFcγRIIA is expressed by neutrophils, monocyte/macrophages, eosinophils, basophils, and mast cells in VG1543 mice. Of these, neutrophils, monocyte/macrophages, and basophils have been reported to contribute to IgG-PSA in mice.¹⁷⁻¹⁹ Neutrophil depletion with either anti-Ly-6G or anti-Gr-1 mAbs protected VG1543 mice from ASA but neither monocyte/macrophage nor basophil depletion affected anaphylaxis induction (Fig 3, C, and see Fig E5, B-E). Finally, PAF-R blockade protected from ASA-associated death and hypothermia, whereas H₁-receptor antagonist cetirizine had no effect (Fig 3, D, and see Fig E5, F and G). Altogether, the data obtained in this model of ASA, contingent on hFcγR binding of mouse IgGs, demonstrate that VG1543 mice present with anaphylactic symptoms and a fatal reaction dependent on hFcγRIIA, neutrophils, and PAF. They also demonstrate that mouse FcγRI, which is still expressed in both VG1505 mice and VG1543 mice, cannot induce anaphylaxis.

Aggregated human IVIG triggers PSA in VG1543 mice

Although interactions between mouse IgG isotypes and some human FcγRs can result in induction of anaphylactic reactions (Fig 3 and Table I),^{19,27,28} such models are far from recapitulating the variety of human IgG interactions with both activating and inhibitory hFcγRs.³⁸ Therefore we investigated whether anaphylaxis could be initiated by triggering human FcγRs in VG1543 mice using aggregated human IVIG as a surrogate for human IgG-immune complexes. Intravenous injection of 1 mg of

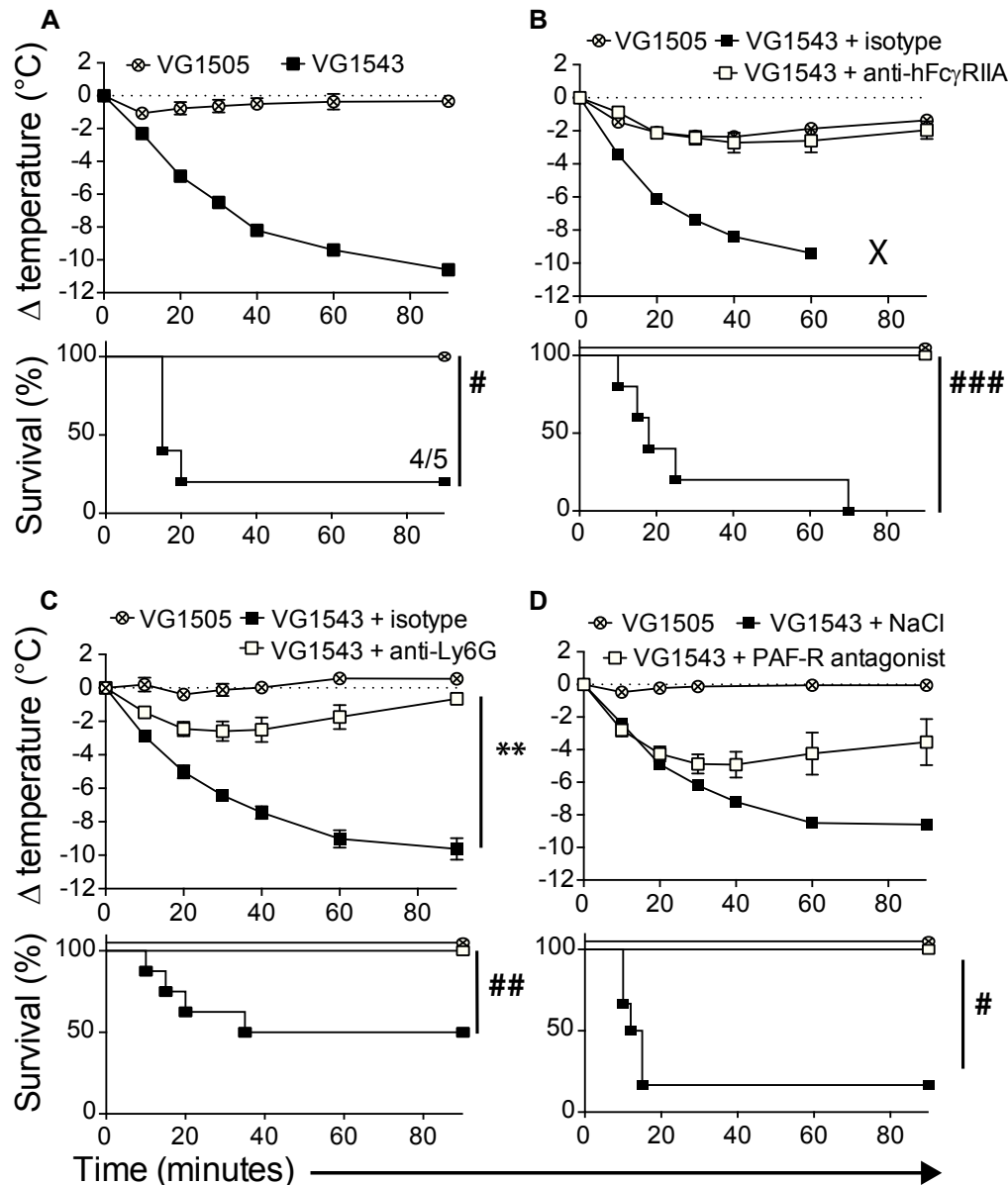


FIG 3. VG1543 mice are susceptible to ASA dominantly mediated by hFcγRIIA, neutrophils, and PAF. Indicated mice were immunized and challenged with BSA, and central temperatures and survival rates were monitored. **A**, Change in body temperature (upper panel) and survival (lower panel) during BSA-ASA in VG1505 (crossed circles) and VG1543 (squares) mice. **B–D**, BSA-ASA in VG1505 and VG1543 mice and VG1543 mice treated with anti-hFcγRIIA blocking mAbs or isotype control (Fig 3, **B**), anti-Ly-6G mAbs or isotype control (Fig 3, **C**), and vehicle (NaCl) or PAF-R antagonist ABT-491 (Fig 3, **D**). Data are represented as means $\pm$ SEMs and representative of at least 2 independent experiments. Numbers indicate mortality per experimental group; X represents 100% mortality. # $P < .05$, ## $P < .01$, and ### $P < .001$, Log-rank (Mantel-Cox) test for survival. ** $P < .01$, Student *t* test of individual time points from 10 to 40 minutes.

HA-IVIG induced PSA (IVIG-PSA) in VG1543 mice, which was manifested by visual signs and severe hypothermia, with a maximum temperature loss of 6°C to 8°C 30 to 40 minutes after injection. This reaction was dependent on hFcγR expression because VG1505 mice were resistant (Fig 4, **A**). The dose response to HA-IVIG demonstrated that hypothermia reaches a maximum at 1 mg, was lower at 500 or 300 μ g, and was not observed at 30 μ g (Fig 4, **B**, and see Fig E6). Therefore a dose of 1 mg was chosen for all subsequent episodes of IVIG-PSA

because it consistently induced in VG1543 mice a shock at sufficient magnitude to assess the effect of receptor, cell, and mediator blockade.

hFcγRIIA and neutrophils contribute to IVIG-PSA in VG1543 mice

hFcγRIIA blockade protected against both anaphylactic symptoms and hypothermia during IVIG-PSA in VG1543 mice

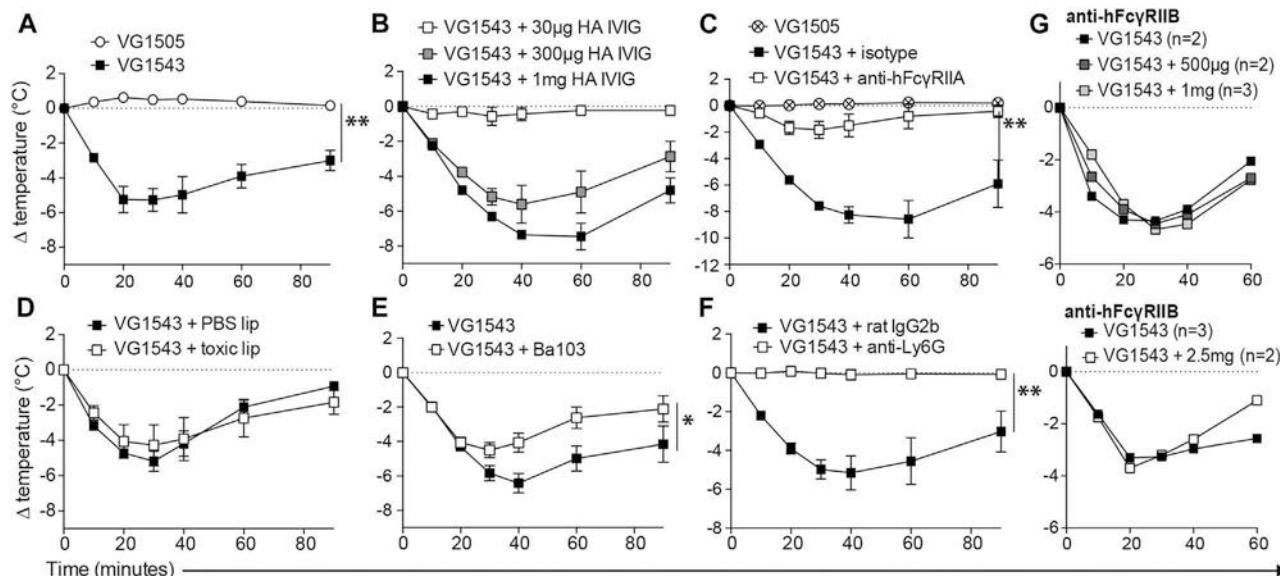


FIG 4. Aggregated human IVIG triggers PSA in VG1543 mice mediated by hFc γ RIIA and neutrophils. **A** and **B**, VG1505 (circles) and VG1543 (squares) mice were injected with 1 mg (Fig 4, A) or indicated amounts (Fig 4, B) of HA-IVIG, and central temperatures were monitored. **C-F**, IVIG-PSA (1 mg) in VG1543 mice injected with anti-hFc γ RIIA blocking mAbs (Fig 4, C), toxin-containing liposomes (Fig 4, D), anti-CD200R3 mAbs (30 μg , Fig 4, E), anti-Ly-6G mAbs (Fig 4, F), or corresponding isotype or PBS controls before anaphylaxis induction. **G**, IVIG-PSA (250 μg) in VG1543 mice injected with indicated amounts of anti-hFc γ RIIB blocking mAbs. White or gray squares indicate treated mice; black squares indicate isotype or vehicle controls. In Fig 4, A-F, data are represented as means $\pm$ SEMs and representative of at least 2 independent experiments. In Fig 4, G, data are represented as mean values of independent experiments. * $P < .05$ and ** $P < .01$, 2-way repeated-measures ANOVA.

(Fig 4, C), even though VG1543 mice express also hFc γ RIIA and hFc γ RIIB, which might induce cell activation.^{26,35,41} Monocyte/macrophage depletion caused by toxic liposome administration had no effect (Fig 4, D), whereas basophil depletion modestly reduced IVIG-PSA in VG1543 mice (Fig 4, E). However, neutrophil depletion was protective (Fig 4, F). Appropriate antibody-mediated cell depletion was confirmed by means of flow cytometric analysis (see Fig E1 and Fig E5, A), and we have previously demonstrated efficient monocyte/macrophage depletion in the blood and spleen after liposome injection.⁴² hFc γ RIIB blockade, even with high doses of blocking mAbs, did not modulate anaphylactic symptoms in VG1543 mice, whether induced by optimal (1 mg, data not shown) or suboptimal (250 μg ; Fig 4, G) doses of HA-IVIG. VG1543 mice are susceptible to PSA induced by human IgG, and the reaction proceeds primarily through neutrophils and the activating receptor hFc γ RIIA, with a minor contribution of basophils, but does not require monocytes/macrophages and is not negatively regulated by inhibitory hFc γ RIIB.

Changes in hFc γ R expression on myeloid cells after anaphylaxis

It has been proposed that changes in Fc receptor expression can be used as a biological marker for anaphylaxis or an indicator of different pathways of activation.⁴³ Therefore we investigated changes in hFc γ R expression on circulating myeloid cell populations after IVIG-PSA in VG1543 mice. One hour after anaphylaxis induction, staining for activating hFc γ R receptors was substantially reduced on neutrophils (Fig 5, A) and Ly-6C^{hi} (Fig 5, B) and Ly-6C^{low} (Fig 5, C) monocytes in the blood of VG1543 mice, entailing almost complete loss of hFc γ RIIA on

neutrophils and monocytes and significant downregulation of hFc γ RIII on neutrophils and Ly-6C^{low} monocytes (exemplified in Fig 5, D). Levels of the inhibitory receptor hFc γ RIIB were also significantly reduced on Ly-6C^{hi} monocytes yet unchanged on Ly-6C^{low} monocytes and neutrophils. These changes in receptor staining were not merely due to increased quantities of circulating IgG because the injection of nonaggregated IVIG did not affect receptor expression (Fig 5, A-D). Receptor detection by anti-hFc γ R mAbs might be influenced by prebound human IgG-immune complexes; however, we confirmed that this was not the case using a panel of different antibodies with different recognition sites, both within and outside the ligand-binding region (see the Methods section and Fig E7 in this article's Online Repository at www.jacionline.org). Furthermore, hIgG could be detected at low amounts on the surfaces of VG1543 neutrophils and monocytes isolated after IVIG-PSA, yet the limited amount of bound hIgG that we observe after PSA, particularly on neutrophils, certainly does not account for the several logs of reduction in receptor staining intensity (Fig E7). These data indicate active engagement of hFc γ R on neutrophils and monocytes during IVIG-PSA and suggest that these cells are each involved in responding to IgG-immune complexes, even though, in the case of monocytes, they might not be required for the induction of anaphylactic symptoms in VG1543 mice.

PAF and histamine contribute to IVIG-PSA in VG1543 mice

We assessed the contribution of the mediators PAF and histamine to IVIG-PSA in VG1543 mice using receptor antagonists administered before PSA induction. PAF-R blockade with 2

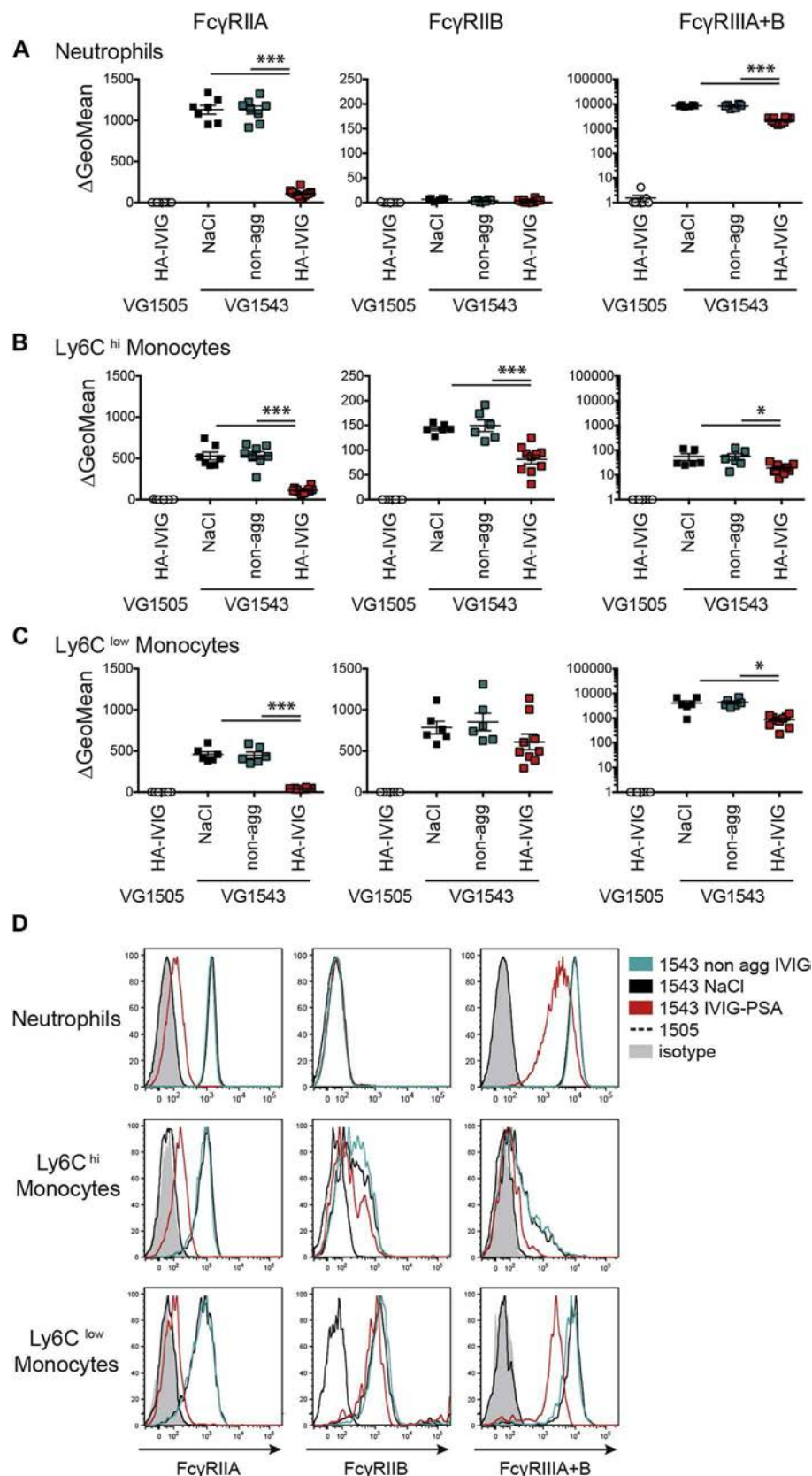


FIG 5. Reduction in hFcγR expression on circulating myeloid cell populations after IVIG-PSA. **A-C**, hFcγRIIA, hFcγRIIB, and hFcγRIII expression on blood neutrophils (Fig 5, A) and Ly-6C^{hi} (Fig 5, B) and Ly-6C^{low} (Fig 5, C) monocytes from VG1543 mice 1 hour after injection of vehicle (NaCl), nonaggregated IVIG (non-agg) or HA-IVIG and PSA induction (HA-IVIG). Background staining on cells from VG1505 mice is shown 1 hour after injection of HA-IVIG. Values represent Δ geometric mean between specific staining and corresponding isotype or fluorescence-minus-one control pooled from 3 independent experiments. **D**, Representative histograms. Background staining of isotype control is indicated by shaded histograms, and VG1505 mice are indicated by gray histograms. * $P < .05$ and *** $P < .001$, unpaired t test with Welch correction.

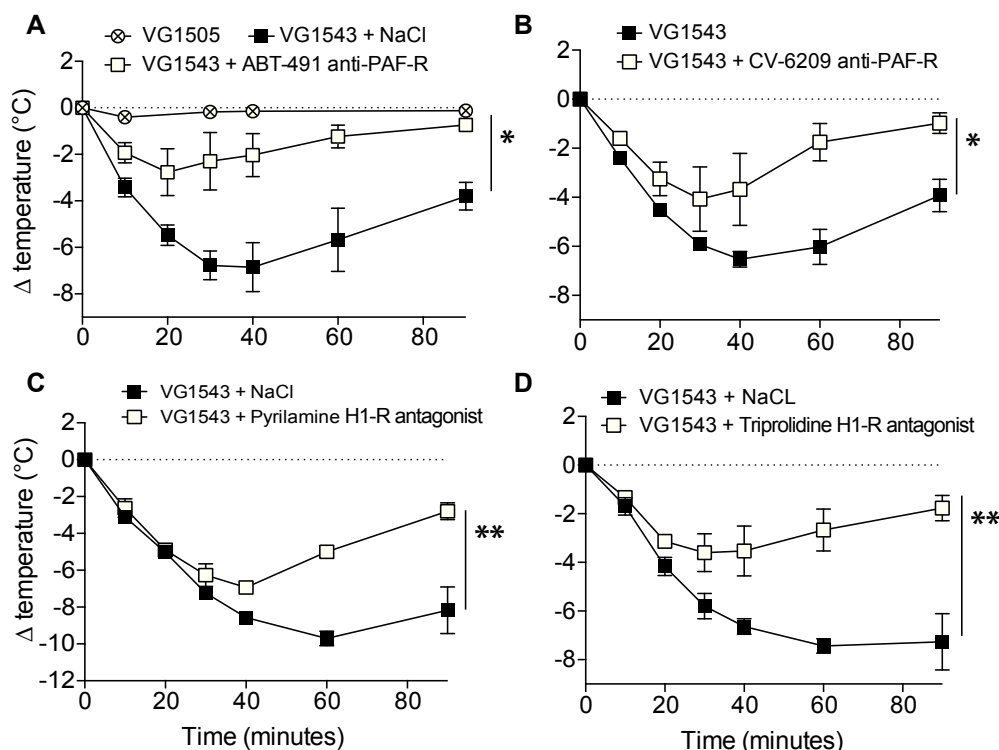


FIG 6. The anaphylactic mediators PAF and histamine are responsible for IVIG-PSA in VG1543 mice. PSA was induced by 1 mg of HA-IVIG, and central temperatures were monitored: indicated mice were pretreated with the PAF-R antagonists ABT-491 (**A**) or CV-6209 (**B**), the H₁-receptor antagonists pyrilamine maleate (**C**) or triprolidine hydrochloride (**D**), or vehicle (*NaCl*). Data are represented as means $\pm$ SEMs and representative of at least 2 independent experiments. * $P < .05$ and ** $P < .01$, VG1543-treated vs control mice, 2-way repeated-measures ANOVA.

different antagonists (ABT-491 and CV-6209) significantly reduced the hypothermia associated with IVIG-PSA in VG1543 mice (Fig 6, A and B). Cetirizine, pyrilamine, and triprolidine are different histamine receptor 1 antagonists that inhibit IgE-induced PSA to various extents (see Fig E8, A-C, in this article's Online Repository at www.jacionline.org). Cetirizine had no effect on IVIG-PSA in VG1543 mice, unless combined with the PAF-R antagonist ABT-491 (see Fig E8, D and E). However, pyrilamine and triprolidine significantly reduced the hypothermia associated with IVIG-PSA in VG1543 mice (Fig 6, C and D). Of note, the PAF-R antagonist ABT-491 injected at higher doses did not confer greater protection (see Fig E8, F). Therefore both PAF and histamine contribute to IVIG-PSA, which is in agreement with the contribution of neutrophils and basophils, in knock-in mice expressing human low-affinity IgG receptors.

DISCUSSION

We demonstrate here that VG1543 mice, which exhibit genuine expression of all human low-affinity Fc γ R, are susceptible to IgG-dependent anaphylaxis. VG1543, but not VG1505, mice experienced severe hypothermia after transfer of aggregated human IgG or after immunization and challenge with the same antigen. For the first time, these data show that in a cognate context of activating and inhibitory human Fc γ R signaling, immune complexes formed by either mouse or human IgG can trigger cell activation, mediator release, and severe anaphylaxis.

Several transgenic mouse models have been developed previously to investigate the *in vivo* functions of human Fc γ Rs.^{14,35} Transgenic approaches have their inherent flaws, however, in terms of reproducibility of human Fc γ R expression, heterogeneity of transgene expression between subjects of the same genotype, and instability between generations, as a result of random transgene integration into the genome. hFc γ RIIA(R₁₃₁)^{tg},⁴⁴ hFc γ RIIB(I₂₃₂)^{tg},⁴⁵ hFc γ RIIIA(F₁₅₈)^{tg}, and hFc γ RIIB^{tg} (unknown polymorphic variant)⁴⁶ mice each use their respective genuine human promoter to drive transgene expression. Of these, it appears that only hFc γ RIIA(R₁₃₁)^{tg} mice recapitulate the corresponding human expression patterns,^{28,44} whereas hFc γ RIIB(I₂₃₂)^{tg} mice exhibit abnormally high expression on circulating monocytes and granulocytes, and hFc γ RIIIA(F₁₅₈)^{tg} hFc γ RIIB^{tg} mice have aberrant expression on dendritic cells and eosinophils.^{29,45} Furthermore, the study of hFc γ R transgenic strains necessitates genetic backgrounds lacking endogenous mFc γ Rs because mouse and human Fc γ Rs cross-bind human and mouse IgG, respectively (Table I). hFc γ R-transgenic mice have been studied on a background deficient in the Fc γ R chain signaling subunit (Fc γ R^{KO}), which lacks functional expression of mFc γ RI, mFc γ RIII, mFc γ RIV, and mFc γ RI.⁴⁷ Unfortunately Fc γ R^{KO} mice have deficiencies in signaling through several non-FcR molecules, including integrin, cytokine, and growth factor receptors, affecting leukocyte recruitment and vascular hemostasis, and these mice maintain inhibitory mFc γ RIIB expression that can modulate hFc γ R-induced signaling.^{35,48-50}

A mFcγR^{null} background, lacking all mouse IgG receptor expression but maintaining Fcγ chain expression, is a preferable approach, as exemplified in the generation of hFcγRI^{tg}IIA^{tg}IIB^{tg}IIIA^{tg}IIIB^{tg} mFcγR^{null} mice by intercrossing of the 5 single hFcγR-transgenic strains described above.²⁹

To circumvent the inherent issues of randomly integrated transgenes, we used gene knock-in technology to generate a mouse model deficient for the low-affinity mouse IgG receptor locus (mFcγRIIB/III/IV^{KO}; VG1505) and to insert the human low-affinity IgG receptor locus in its stead (hFcγRIIA [H₁₃₁]-hFcγRIIB[I₂₃₂]-hFcγRIIC[Stop₁₃]-hFcγRIIIA[V₁₅₈]-hFcγRIIIB[NA2]^{KI}; VG1543). Consequently, VG1543 mice demonstrate hFcγR expression consistent with that observed in human subjects,^{26,35} with some minor differences: eosinophils lack hFcγRIIIA expression, and basophils lack hFcγRIIB expression. In addition, hFcγRIIIA and hFcγRIIB expression is higher on blood monocytes compared with values in human subjects; nevertheless, hFcγRIIB on these cells in VG1543 mice remains very much closer to that observed in human subjects when compared with the expression reported in hFcγRI^{tg}IIA^{tg}IIB^{tg}IIIA^{tg}IIIB^{tg} mFcγR^{null} mice.²⁹ Of note, VG1543 represents the first mouse model of hFcγRIIA(H₁₃₁) and hFcγRIIIA(V₁₅₈) expression, which is particularly advantageous for the study of human IgG₂. Indeed, hFcγRIIA(H₁₃₁) binds significantly better human IgG₂ than the polymorphic variant hFcγRIIA(R₁₃₁), which is expressed in hFcγRIIA transgenic animals,^{38,51} and hFcγRIIIA(V₁₅₈) binds human IgG₂, whereas the polymorphic variant hFcγRIIIA(F₁₅₈), which is expressed in hFcγRIIIA^{tg} mice, does not.^{38,46,51}

Here, for the first time, we identify that within the context of native coexpression with other activating and inhibitory hFcγRs, hFcγRIIA drives IgG-related anaphylaxis induction. Indeed, hFcγRIIA blockade protected VG1543 mice against systemic anaphylaxis induced by aggregated human IVIG. The transfer of IVIG aggregated *ex vivo* mimics the formation of polyclonal hIgG immune complexes *in vivo* because the subclass composition reflects that of human serum: 63% IgG₁, 29% IgG₂, 5% IgG₃, and 3% IgG₄. All human FcγRs expressed in VG1543 mice bind human IgG₁ and IgG₃, only hFcγRIIA(H₁₃₁) and hFcγRIIIA(V₁₅₈) bind human IgG₂, and all except hFcγRIIIB(NA2) bind human IgG₄. Yet hFcγRIIA(H₁₃₁) binds IgG₂ with greater than 7-fold higher affinity than hFcγRIIIA(V₁₅₈),³⁸ and therefore the IgG₂ component of aggregated IVIG might bias toward hFcγRIIA(H₁₃₁) engagement over the other hFcγRs expressed in VG1543 mice. hFcγRIIA blockade also protected VG1543 mice from systemic anaphylaxis and death after immunization and challenge with the same antigen. This is a less physiologic model because it relies on human hFcγR cross-binding mouse IgGs. Among the activating receptors expressed in VG1543 mice, only hFcγRIIA binds mouse IgG₁ (Table I), the predominant IgG isotype produced during ASA immunization, and therefore logically predominantly contributes to anaphylaxis induction.

Although the protective effect of hFcγRIIA blockade in the setting of IVIG-PSA suggests that hFcγRIIIA and hFcγRIIIB are not individually capable of triggering systemic anaphylaxis, we cannot formally exclude a cooperative role of these receptors in anaphylaxis induction through hFcγRIIA in VG1543 mice. Indeed, we could not efficiently block hFcγRIIIA, hFcγRIIIB, or both *in vivo* by using available anti-hFcγRIII antibodies (data not shown). We observed significant hFcγRIIIA/B

downregulation on circulating neutrophils and monocytes after IVIG-PSA but not after injection of nonaggregated IVIG (Fig 6), supporting the notion that these receptors are actively engaging with IgG immune complexes, despite not triggering a systemic reaction. Indeed, in models of autoantibody-induced inflammation, hFcγRIIA and hFcγRIIIB expressed on neutrophils were found to individually and cooperatively promote immune complex-induced reactions; however, hFcγRIIA alone promoted associated injury and inflammation, whereas hFcγRIIIB rather mediated homeostatic clearance of immune complexes,^{41,52} suggesting that hFcγRIIA, but not hFcγRIIIB, is able to induce detrimental reactions *in vivo*. Anaphylaxis induced by aggregated IVIG was also demonstrated in the hFcγRI^{tg}IIA^{tg}IIB^{tg}IIIA^{tg}IIIB^{tg} mFcγR^{null} mouse model,²⁹ but the contributing hFcγRs were not identified.

Importantly, VG1505 and VG1543 mice still express the high-affinity mouse receptor mFcγRI, which is expressed on monocytes, tissue-resident monocyte-derived cells, and specific macrophage populations (see Fig E4, F).^{26,53,54} Even so, VG1505 mice were resistant to IVIG-PSA (and active anaphylaxis) induction, demonstrating that mFcγRI alone cannot trigger anaphylaxis and that anaphylactic reactions in VG1543 mice rely exclusively on hFcγR triggering. We previously reported that the human counterpart of mFcγRI, hFcγRI (CD64), was sufficient to induce systemic anaphylaxis in transgenic mice lacking 3 FcγRs and 2 FcεRs (but still expressing mouse FcγRIV).²⁷ For this former study, we used the only reported hFcγRI transgenic mouse: it expresses this receptor on monocytes and macrophages as in human subjects but also constitutively on neutrophils, contrary to human subjects.^{35,55} Anaphylaxis in these mice relied on both neutrophils and monocytes/macrophages.²⁷ hFcγRI is not expressed in the VG1543 background, and the question remains open whether hFcγRI can participate in IgG-induced anaphylaxis in the context of native hFcγR expression. We have developed a novel hFcγRI knock-in mouse strain that does not present the discrepant expression of existing hFcγRI-transgenic models^{29,55}: hFcγRI is expressed on monocytes, macrophages, and dendritic cells but not constitutively on neutrophils (data not shown). We are currently crossing this mouse strain to VG1543 mice to create a fully hFcγR-humanized knock-in mouse model, which should enable us in the future to address the relative contribution of hFcγRI in a model recapitulating all hFcγR expression.

Anaphylaxis is driven by the release of anaphylactogenic mediators from myeloid cells.^{4,56} Therefore the contribution of any given cell population is determined by the requisite expression of activating FcγR, the capacity of the cells to release active mediators, and a cell's potential for negative inhibition of FcγR signaling by expression of inhibitory FcγRIIB.⁵⁷ In wild-type mice, pathways of ASA and passive IgG anaphylaxis rely predominantly on monocyte and/or neutrophil activation through mFcγRIII, with a minor contribution of mFcγRIV and subsequent PAF release.^{18,19,58} Considering genetic evolution, the functional homolog of mFcγRIII is hFcγRIIA and that of mFcγRIV is hFcγRIIIA (H. Watier, personal communication).³⁵ Therefore it is consistent that hFcγRIIA, which exhibits prominent expression on all circulating myeloid cells, like mFcγRIII, might be the predominant IgG receptor contributing to anaphylaxis in VG1543 mice. We previously demonstrated that transgenic expression of hFcγRIIA(R₁₃₁) was sufficient to induce PSA and ASA

and that IgG-induced PSA in hFcγRIIA(R₁₃₁)^{tg} mFcγRIIIB/III^{KO} mice required monocytes and neutrophils.²⁸

Here we identify that neutrophils are mandatory for anaphylaxis in VG1543 mice, whereas we could not identify a contribution for monocytes/macrophages, although they express hFcγRIIA. This discrepancy between mouse models might be due to expression of inhibitory hFcγRIIB, which is absent in hFcγRIIA(R₁₃₁)^{tg} mFcγRIIIB/III^{KO} mice but increased on VG1543 blood monocytes compared with that seen in human subjects. Blood monocytes express hFcγRIIB consistently in VG1543 mice, but we and others have identified variable hFcγRIIB on monocytes, particularly CD14^{lo} blood monocytes, and prominent expression on only a fraction of human donors (see Fig E5, A-E).³⁶ However, spleen monocytes significantly express hFcγRIIB in human subjects³⁶ and VG1543 mice. Indeed, hFcγRIIB binds to all subclasses of human IgG³⁸ and therefore might inhibit monocyte activation after engagement by IVIG aggregates in VG1543 mice. On the one hand, we observed downregulation of inhibitory hFcγRIIB on circulating Ly-6C^{hi} and Ly-6C^{low} monocytes after IVIG-PSA, suggesting its engagement by IVIG-immune complexes and potential inhibitory signaling by this receptor; on the other hand, hFcγRIIB blockade did not modulate anaphylactic symptoms in VG1543 mice. hFcγRIIB and the inhibitory signals it can induce do not appear to regulate this model of anaphylaxis. These data do not favor a contribution of monocytes to anaphylaxis in VG1543 mice. However, we cannot exclude a potential contribution of blood monocytes (mostly hFcγRIIB negative) to human anaphylaxis.

The contribution of basophils to anaphylaxis models in mice remains controversial: mIgG₁-induced PSA¹⁷ and mIgG_{2a}-induced PSA⁵⁸ were inhibited after antibody-mediated basophil depletion, but mIgG₁-induced PSA was unaffected in Mcpt8-cre mice, which exhibit greater than 90% basophil deficiency.⁵⁹ In an active model of peanut-induced anaphylaxis involving both IgE and IgG, both antibody- and diphtheria toxin-mediated basophil depletion significantly reduced hypothermia.⁶⁰ Human basophils express variable levels of hFcγRIIA and high levels of hFcγRIIB, yet could not be activated by hIgG immune complexes *in vitro*, suggesting that hFcγRIIB-dependent negative regulation is dominant over hFcγRIIA-dependent basophil activation.³⁷ VG1543 mice express hFcγRIIA at low levels on circulating basophils but within the range of that observed on peripheral blood cells from healthy donors (Fig 2). Unlike human basophils, however, VG1543 basophils do not express hFcγRIIB: that we do not identify a major contribution of basophils to anaphylaxis in VG1543 mice cannot be due to hFcγRIIB inhibition of hFcγRIIA-mediated signaling.

We reported previously that neutrophils predominantly contribute to ASA in wild-type mice and that the transfer of human neutrophils can restore anaphylaxis in resistant mice.^{13,19} Neutrophils were mandatory for IVIG-PSA (and ASA) in VG1543 mice because neutrophil depletion abolished hypothermia and protected from death. Both of these anaphylaxis models were dependent on hFcγRIIA, which is expressed at very high levels on both human and VG1543 mouse neutrophils, whereas inhibitory hFcγRIIB expression is found only on a small subset of neutrophils. This low or absent hFcγRIIB expression implies that, unlike monocytes, neutrophil activation is not or marginally regulated by inhibitory hFcγRIIB. Neutrophils also contributed to hFcγRIIA-dependent PSA in hFcγRIIA(R₁₃₁)^{tg} mFcγRIIIB/III^{KO} mice²⁸ in the absence of other hFcγR expression. We

demonstrate now that the contribution of neutrophils to IgG-induced anaphylaxis is also predominant in the context of native hFcγR expression in VG1543 mice. Such an observation is of crucial consideration when we acknowledge that neutrophils comprise more than 60% of circulating blood cells in human subjects.

Finally, we identified that the soluble mediator PAF was responsible for a significant proportion of IVIG-PSA-induced hypothermia (and ASA-associated death), a finding concurrent with a dominant pathway initiated by hFcγRIIA on neutrophils. Neutrophils are indeed the major producers of PAF in human subjects.⁶¹ Among the 3 histamine receptor antagonists tested, 2 (pyrilamine and triprolidine) significantly inhibited IVIG-induced anaphylaxis by themselves, and 1 (cetirizine) only had an effect when combined with PAF-R antagonists. These findings suggest that both PAF and histamine contribute to hypothermia and mortality in the VG1543 model. These results are in agreement with the inefficacy of H₁-antihistamine treatment alone on systemic anaphylactic symptoms in patients. Reports by Vadas and colleagues indicate a correlation between levels of circulating PAF, rather than histamine, with anaphylaxis severity¹² and identified PAF as a central mediator of human anaphylaxis pathogenesis,⁶² which aligns with our findings reported herein using locus-swapped human low-affinity hFcγR^{K1} mice.

Our data indicate that IgG-dependent anaphylaxis in VG1543 mice proceeds through an activating pathway dependent on hFcγRIIA and neutrophils, with a contribution of basophils and driven by the mediators PAF and histamine. Although expressed in this novel knock-in mouse model, hFcγRIIA and hFcγRIIB were not sufficient to trigger anaphylaxis. That such drastic anaphylaxis induction is possible in the context of native inhibitory and activating hFcγR expression suggests a similar pathway can occur in human subjects. VG1543 mice represent an attractive knock-in model for the study of human low-affinity IgG receptors, in which the encoding genes remain expressed in their cognate genetic environment, including intergenic sequences, and consequently, cell-surface expression largely reflects that of human subjects. Although the polymorphisms expressed in the VG1543 mouse represent a section of subjects within the population, other subjects express alternate and/or heterozygous polymorphisms, some of which have been demonstrated to predispose to immunologic susceptibility or resistance.¹⁴ It would be clinically relevant to extend studies in hFcγR knock-in mice to understand the effect of hFcγR polymorphisms on cell activation and subsequent biological responses and therefore on sensitivity to anaphylaxis or other allergic diseases involving IgG antibodies.

We thank O. Godon, B. Iannascoli, and O. Richard-LeGoff for technical help; P. Vieira and L. Reber for scientific advice; and D. Sinnaya for administrative help (Institut Pasteur, Paris). We thank our colleagues for their generous gifts: R. Coffman (DNAX, Palo Alto, Calif), R. Good (USFCM, Tampa, Fla), H. Karasuyama (Tokyo Medical and Dental University Graduate School, Tokyo, Japan), and D. Voehringer (Universitätsklinikum, Erlangen, Germany) for antibodies. Cl2MDP was a gift of Roche Diagnostics GmbH.

Clinical implications: In a mouse model of cognate human IgG receptors expression, hFcγR engagement with IgG immune complexes induced severe anaphylaxis. These findings benefit the understanding of human IgG-dependent anaphylaxis, whether nonclassical (IgE independent) or after IgG-based therapies.

REFERENCES

- Mullins RJ, Dear KB, Tang ML. Time trends in Australian hospital anaphylaxis admissions in 1998-1999 to 2011-2012. *J Allergy Clin Immunol* 2015;136:367-75.
- Nocerino R, Leone L, Cosenza L, Berni Canani R. Increasing rate of hospitalizations for food-induced anaphylaxis in Italian children: an analysis of the Italian Ministry of Health database. *J Allergy Clin Immunol* 2015;135:833-5.e3.
- Turner PJ, Gowland MH, Sharma V, Ierodiakonou D, Harper N, Garcez T, et al. Increase in anaphylaxis-related hospitalizations but no increase in fatalities: an analysis of United Kingdom national anaphylaxis data, 1992-2012. *J Allergy Clin Immunol* 2015;135:956-63.e1.
- Lee JK, Vadas P. Anaphylaxis: mechanisms and management. *Clin Exp Allergy* 2011;41:923-38.
- Fisher MM, Baldo BA. Mast cell tryptase in anaesthetic anaphylactoid reactions. *Br J Anaesth* 1998;80:26-9.
- Cheifetz A, Smedley M, Martin S, Reiter M, Leone G, Mayer L, et al. The incidence and management of infusion reactions to infliximab: a large center experience. *Am J Gastroenterol* 2003;98:1315-24.
- Dybendal T, Guttormsen AB, Elsayed S, Askeland B, Harboe T, Florvaag E. Screening for mast cell tryptase and serum IgE antibodies in 18 patients with anaphylactic shock during general anaesthesia. *Acta Anaesthesiol Scand* 2003;47:1211-8.
- Golden DB. Patterns of anaphylaxis: acute and late phase features of allergic reactions. *Novartis Found Symp* 2004;257:101-10.
- Mertes PM, Alla F, Trechot P, Auroy Y, Jouglu E. Anaphylaxis during anesthesia in France: an 8-year national survey. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128:366-73.
- Laroche D, Gomis P, Gallimidi E, Malinovsky JM, Mertes PM. Diagnostic value of histamine and tryptase concentrations in severe anaphylaxis with shock or cardiac arrest during anesthesia. *Anesthesiology* 2014;121:272-9.
- 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.
- Vadas P, Perelman B, Liss G. Platelet-activating factor, histamine, and tryptase levels in human anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:144-9.
- Jonsson F, Mancardi DA, Albanesi M, Bruhns P. Neutrophils in local and systemic antibody-dependent inflammatory and anaphylactic reactions. *J Leukoc Biol* 2013;94:643-56.
- Gillis C, Gouel-Cheron A, Jonsson F, Bruhns P. Contribution of human FcgammaRs to disease with evidence from human polymorphisms and transgenic animal studies. *Front Immunol* 2014;5:254.
- Oettgen HC, Martin TR, Wynshaw-Boris A, Deng C, Drazen JM, Leder P. Active anaphylaxis in IgE-deficient mice. *Nature* 1994;370:367-70.
- Miyajima I, Dombrowicz D, Martin TR, Ravetch JV, Kinet JP, Galli SJ. Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG1 and Fc gammaR-III. Assessment of the cardiopulmonary changes, mast cell degranulation, and death associated with active or IgE- or IgG1-dependent passive anaphylaxis. *J Clin Invest* 1997;99:901-14.
- 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.
- Strait RT, Morris SC, Yang M, Qu XW, Finkelman FD. Pathways of anaphylaxis in the mouse. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:658-68.
- Jönsson 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.
- Iff ET, Vaz NM. Mechanisms of anaphylaxis in the mouse. Similarity of shock induced by anaphylaxis and by mixtures of histamine and serotonin. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1966;30:313-22.
- Million M, Fioramonti J, Zajac JM, Bueno L. Effects of neuropeptide FF on intestinal motility and temperature changes induced by endotoxin and platelet-activating factor. *Eur J Pharmacol* 1997;334:67-73.
- van de Veen W, Stanic B, Yaman G, Wawrzyniak M, Sollner S, Akdis DG, et al. IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:1204-12.
- Rispens T, Derksen NI, Commis SP, Platts-Mills TA, Aalberse RC. IgE production to alpha-gal is accompanied by elevated levels of specific IgG1 antibodies and low amounts of IgE to blood group B. *PLoS One* 2013;8:e55566.
- Patil SU, Ogguniyo AO, Calatroni A, Tadigotla VR, Ruiter B, Ma A, et al. Peanut oral immunotherapy transiently expands circulating Ara h 2-specific B cells with a homologous repertoire in unrelated subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2015;136:125-34.e12.
- Hoh RA, Joshi SA, Liu Y, Wang C, Roskin KM, Lee JY, et al. Single B-cell deconvolution of peanut-specific antibody responses in allergic patients. *J Allergy Clin Immunol* 2016;137:157-67.
- Bruhns P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood* 2012;119:5640-9.
- 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.
- Jönsson F, Mancardi DA, Zhao W, Kita Y, Iannascoli B, Khun H, et al. Human FcgammaRIIA induces anaphylactic and allergic reactions. *Blood* 2012;119:2533-44.
- Smith P, DiLillo DJ, Bournazos S, Li F, Ravetch JV. Mouse model recapitulating human Fcgamma receptor structural and functional diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:6181-6.
- Meyer T, Robles-Carrillo L, Davila M, Brodie M, Desai H, Rivera-Amaya M, et al. CD32a antibodies induce thrombocytopenia and type II hypersensitivity reactions in FCGR2A mice. *Blood* 2015;126:2230-8.
- Valenzuela DM, Murphy AJ, Friendewey D, Gale NW, Economides AN, Auerbach W, et al. High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis. *Nat Biotechnol* 2003;21:652-9.
- Macdonald LE, Karow M, Stevens S, Auerbach W, Poueymirou WT, Yasenchak J, et al. Precise and in situ genetic humanization of 6 Mb of mouse immunoglobulin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:5147-52.
- Auerbach W, Dunmore JH, Fairchild-Huntress V, Fang Q, Auerbach AB, Huszar D, et al. Establishment and chimera analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-derived mouse embryonic stem cell lines. *Biotechniques* 2000;29:1024-8.
- 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.
- Bruhns P, Jonsson F. Mouse and human FcR effector functions. *Immunol Rev* 2015;268:25-51.
- Tutt AL, James S, Laversin SA, Tipton TR, Ashton-Key M, French RR, et al. Development and characterization of monoclonal antibodies specific for mouse and human Fcgamma receptors. *J Immunol* 2015;195:5503-16.
- Cassard L, Jonsson F, Arnaud S, Daeron M. Fcgamma receptors inhibit mouse and human basophil activation. *J Immunol* 2012;189:2995-3006.
- 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.
- Nimmerjahn F, Bruhns P, Horiuchi K, Ravetch JV. Fc gamma RIV: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity. *Immunity* 2005;23:41-51.
- Mancardi DA, Iannascoli B, Hoos S, England P, Daeron M, Bruhns P. FcgammaRIV is a mouse IgE receptor that resembles macrophage FcepsilonRI in humans and promotes IgE-induced lung inflammation. *J Clin Invest* 2008;118:3738-50.
- Tsuboi N, Asano K, Lauterbach M, Mayadas TN. Human neutrophil Fcgamma receptors initiate and play specialized nonredundant roles in antibody-mediated inflammatory diseases. *Immunity* 2008;28:833-46.
- 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 [E-pub ahead of print]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2016.03.028>.
- Khodoun MV, Strait R, Armstrong L, Yanase N, Finkelman FD. Identification of markers that distinguish IgE- from IgG-mediated anaphylaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:12413-8.
- McKenzie SE, Taylor SM, Malladi P, Yuhan 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.
- Li F, Ravetch JV. Inhibitory Fcgamma receptor engagement drives adjuvant and anti-tumor activities of agonistic CD40 antibodies. *Science* 2011;333:1030-4.
- 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.
- Takai T, Li M, Sylvestre D, Clynes R, Ravetch JV. FcR gamma chain deletion results in pleiotropic effector cell defects. *Cell* 1994;76:519-29.
- Borges L, Cosman D. LIRs/ILTs/MIRs, inhibitory and stimulatory Ig-superfamily receptors expressed in myeloid and lymphoid cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000;11:209-17.
- Zarbock A, Abram CL, Hundt M, Altman A, Lowell CA, Ley K. PSGL-1 engagement by E-selectin signals through Src kinase Fgr and ITAM adapters DAP12 and FcR gamma to induce slow leukocyte rolling. *J Exp Med* 2008;205:2339-47.
- Boulaftali Y, Hess PR, Kahn ML, Bergmeier W. Platelet immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) signaling and vascular integrity. *Circ Res* 2014;114:1174-84.

51. 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.
52. Chen K, Nishi H, Travers R, Tsuboi N, Martinod K, Wagner DD, et al. Endocytosis of soluble immune complexes leads to their clearance by FcgammaRIIb but induces neutrophil extracellular traps via FcgammaRIIA in vivo. *Blood* 2012;120:4421-31.
53. Mancardi DA, Jonsson F, Iannascoli B, Khun H, Van Rooijen N, Huerre M, et al. The murine high-affinity IgG receptor Fc(gamma)RIV is sufficient for autoantibody-induced arthritis. *J Immunol* 2011;186:1899-903.
54. Langlet C, Tamoutounour S, Henri S, Luche H, Ardouin L, Gregoire C, et al. CD64 expression distinguishes monocyte-derived and conventional dendritic cells and reveals their distinct role during intramuscular immunization. *J Immunol* 2012;188:1751-60.
55. 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.
56. Brown SG, Stone SF, Fatovich DM, Burrows SA, Holdgate A, Celenza A, et al. Anaphylaxis: clinical patterns, mediator release, and severity. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:1141-9.e5.
57. Smith KG, Clatworthy MR. FcgammaRIIb in autoimmunity and infection: evolutionary and therapeutic implications. *Nat Rev Immunol* 2010;10:328-43.
58. Khodoun MV, Kucuk ZY, Strait RT, Krishnamurthy D, Janek K, Clay CD, et al. Rapid desensitization of mice with anti-FcgammaRIIb/FcgammaRIII mAb safely prevents IgG-mediated anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:1375-87.
59. Ohnmacht C, Schwartz C, Panzer M, Schiedewitz I, Naumann R, Voehringer D. Basophils orchestrate chronic allergic dermatitis and protective immunity against helminths. *Immunity* 2010;33:364-74.
60. Reber LL, Marichal T, Mukai K, Kita Y, Tokuoka SM, Roers A, et al. Selective ablation of mast cells or basophils reduces peanut-induced anaphylaxis in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:881-8.
61. 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.
62. Gill P, Jindal NL, Jagdis A, Vadas P. Platelets in the immune response: revisiting platelet-activating factor in anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2015;135:1424-32.

METHODS

Generation of mFcγRIIB, mFcγRIII, and mFcγRIV knockout mice

A targeting construct (Fig 1, A) for deleting mouse *Fcgr2b*, *Fcgr3*, and *Fcgr4* genes (encoding mFcγRIIB, mFcγRIII, and mFcγRIV, respectively) in a single targeting step was constructed by using VelociGene technology.^{E1} Mouse sequences were obtained from BAC clone RP23-395F6. A donor fragment was constructed by cloning a neomycin cassette flanked by one lox66 and one lox71 site specific recombination site (lox'd). More specifically, the 5' mouse homology arm, corresponding to 270 bp of mouse sequence located 3796 bp downstream of *Fcgr2b*, underwent PCR with oligos (see Tables E1 and E2) and cloned upstream of a mutant lox'd neomycin selection cassette followed by a mouse 3' homology arm corresponding to 342 bp of mouse sequence (PCR with the oligos noted in Tables E1 and E2) located 4001 bp upstream of the ATG of *Fcgr3*. This donor fragment was inserted into *Escherichia coli* strain DH10B containing the mouse BAC clone RP23-395F6 and a recombination enzyme vector. Cells were grown in drug selection medium.

Upon bacterial homologous recombination (BHR) at the locus, a drug selection cassette replaces the *Fcgr2b*, *Fcgr3*, and *Fcgr4* genes. Individual clones were grown, and the targeted BAC DNA that contains a lox'd drug cassette in place of the *Fcgr2b*, *Fcgr3*, and *Fcgr4* genes was extracted. Targeted cells were identified by means of PCR with the up detect primer set and down detect primer set (see Tables E1 and E2). Part of the vector was sequenced to confirm proper mouse-cassette junctions, and pulsed field gel electrophoresis was used to establish insert size and expected restriction fragment length.

The targeting vector (LTVEC) VG1505 was linearized and used to electroporate VGF1 mouse ES cells. Upon BHR at the locus 106 kb of the endogenous *Fcgr2b*, the *Fcgr3* and *Fcgr4* locus is thereby deleted and replaced by a lox'd neomycin cassette, resulting in an ES cell that does not express endogenous *Fcgr2b*, *Fcgr3*, and *Fcgr4* genes. Correctly targeted ES cells were introduced into an 8-cell stage mouse embryo by using the VelociMouse method.^{E2} VelociMice (F0 mice fully derived from the donor ES cell) bearing the deleted *Fcgr2b*, *Fcgr3*, and *Fcgr4* genes were identified by means of genotyping for loss-of-mouse allele by using a modification-of-allele assay (see Table E3).

Generation of knock-in hFcγRIIA(H₁₃₁)-hFcγRIIB(I₂₃₂)-hFcγRIIC(Stop₁₃)-hFcγRIIIA(V₁₅₈)-hFcγRIIB(NA2) mice

Targeting constructs (Fig 2, B and C) for subsequent humanization of mouse mFcγRs by using 2 sequential targeting steps were constructed with VelociGene technology.^{E1} For the first targeting construct, VG1528, human sequences were obtained from BAC clone CTD-2514J12. BACvec VG1528 was constructed in 4 steps, as described in Tables E1 and E2. In step 1 a donor fragment was constructed by cloning a hygromycin cassette flanked by site specific frt recombination sites (frt'd). More specifically, the 5' BAC backbone homology arm, corresponding to 384 bp of pBeloBAC11, underwent PCR by using oligos (see Table E1) and cloned upstream of a frt'd hygromycin selection cassette followed by a human 3' homology arm corresponding to 342bp of human sequence (undergoing PCR with oligos in Tables E1 and E2) located 19 kb upstream of the human *FCGR3A* gene (encoding hFcγRIIIA). BHR with this donor fragment deleted 41 kb from the 5' end of CTD-2514J12, replacing it with an I-CeuI site and the frt'd hygromycin cassette to make VI209.

In step 2 VI209 was modified by using BHR to replace a PI-SceI site and spec cassette at the 3' end to make VI212 (see Tables E1 and E2).

In step 3 RP23-395F6 was modified by using BHR to delete the entire 106-kb mouse low-affinity mFcγR locus (*Fcgr2b*, *Fcgr3*, and *Fcgr4* genes), replacing it with a lox'd neomycin cassette flanked by a 5' I-CeuI site and a 3' PI-SceI site. The extra PI-SceI site in the backbone was then deleted by means of AscI digestion and ligation to make VI208.

In step 4 the 69-kb human hFcγR-encoding fragment from VI212 was ligated into the I-CeuI and PI-SceI sites of VI208, replacing the lox'd neomycin cassette to make the final LTVEC VG1528.

For the second targeting construct, VG1543, human sequences were obtained from BAC clone RP11-697E5. BACvec VG1543 was constructed

in 3 steps, as described in Tables E1 and E2. In step 1 a donor fragment was constructed by cloning a spectinomycin cassette flanked by site-specific recombination sites. More specifically, the 5' homology arm, corresponding to 59 bp of human sequence and BAC backbone sequence that is 4558 bp downstream of *FCGR3A*, was ligated to a spectinomycin selection cassette followed by a 3' homology arm corresponding to 333 bp of the backbone sequence in pBACe3.6. BHR with this donor fragment trimmed the human hFcγR locus on the proximal end of RP11-697E5, deleting the PI-SceI site to make VI217.

In step 2 VI217 was modified by using BHR with a donor fragment consisting of 5' homology arm corresponding to 258 bp of BAC backbone sequence in pBACe3.6, a frt'd hygromycin cassette flanked by a 5' *NotI* site and a 3' PI-SceI site, and a 3' homology arm corresponding to 274 bp of human sequence 1188 bp upstream of *FCGR2B* to make VI222.

In step 3 the 47-kb mouse distal homology arm with lox'd neomycin cassette from VI208 was ligated into the *NotI* and PI-SceI sites of VI222, replacing the frt'd hygromycin cassette to make the final LTVEC VG1543.

The targeting vectors were linearized and used to electroporate mouse ES cells.^{E3} Upon BHR at the locus, 106 kb of the endogenous mouse low-affinity FcγR locus (*Fcgr2b*, *Fcgr3*, and *Fcgr4* genes) is thereby deleted and replaced by human *FCGR2B*, *FCGR3B*, *FCGR2C*, *FCGR3A*, and *FCGR2A* genes (encoding hFcγRIIB variant I₂₃₂, hFcγRIIB variant NA2, hFcγRIIC variant stop₁₃, hFcγRIIIA variant V₁₅₈, and hFcγRIIA variant H₁₃₁) by sequential targeting of VG1528 and VG1543, resulting in an ES cell that expresses low-affinity human hFcγR genes instead of endogenous low-affinity mouse mFcγR genes. Correctly targeted ES cells were introduced into an 8-cell stage mouse embryo by using the VelociMouse method.^{E2} VelociMice (F0 mice fully derived from the donor ES cell) bearing the human *FCGR2B*, *FCGR3B*, *FCGR2C*, *FCGR3A*, and *FCGR2A* genes were identified by means of genotyping for loss-of-mouse allele and gain-of-human allele by using a modification-of-allele assay (see Table E3).

Antibodies and reagents

BSA, complete Freund adjuvant and incomplete Freund adjuvant, and ABT-491 were from Sigma-Aldrich (St Louis, Mo); Cetirizine DiHCl was from Selleck Chemicals (Houston, Tex); and TNP-BSA was from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Tex). Fluorescently labeled anti-mouse CD11b, CD43, CD49b, CD115, CD335 (NKp46), Ly-6C, Ly-6G, Gr-1, B220, IgD, and Siglec-F were from BD Biosciences (San Jose, Calif); anti-mouse CD19 and IgM were from BioLegend (San Diego, Calif); and anti-mouse IgE was from eBioscience (San Diego, Calif). Fluorescently labeled anti-human CD3, CD11b, CD14, CD15, CD19, and CD56 were from Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany); anti-human CD61 and CD16 (3G8) were from BD Biosciences; and anti-hFcγRIIA (IV.3) from STEMCELL Technologies (Vancouver, British Columbia, Canada). Fluorescently labeled anti-hFcγRIIB (2B6) in a chimeric mouse-human IgG1 N₂₉₇A form was prepared in house.

PBS and clodronate liposomes were prepared, as previously published.^{E4} The hybridoma-producing mAb anti-hFcγRIIA (IV.3) was provided by C. L. Anderson (Heart & Lung Research Institute, Columbus, Ohio), anti-Gr-1 (RB6-8C4) was provided by R. Coffman (DNAX Research Institute, Palo Alto, Calif), and anti-Ly-6G (NIMP-R14) was provided by C. Leclerc (Institut Pasteur, Paris, France). mAbs were purified from hybridoma supernatants by means of protein G affinity purification. Purified anti-Ba103 mAbs were provided by H. Karasuyama (Tokyo Medical and Dental University Graduate School, Tokyo, Japan).

Tissue processing

Cells were isolated from the blood and organs of VG1505 and VG1543 mice as follows. Spleens were dissociated through a 70-μm cell strainer into MACS buffer (PBS/0.5% BSA/2 mmol/L EDTA), and RBC lysis was performed with an ammonium chloride-based buffer. For isolation of skin cells, ears were split into dorsal and ventral halves and roughly chopped before digestion with 0.25 mg/mL Liberase TL ResearchGrade (Roche, Mannheim, Germany) plus 0.1 mg/mL DNase (Sigma) for 1 hour at 37°C (800 rpm; Eppendorf Thermomixer), washed with 10× volume of PBS/10% FBS/2 mmol/L EDTA and processed through a 100-μm cell strainer. Livers were

perfused with cold PBS before dissection and processed with the Gentle-MACS liver dissociation kit and the Octo Dissociator (Miltenyi Biotec). Cells were isolated from the peritoneum by means of lavage with 6 mL of cold PBS; BAL was performed 3 times with 1 mL of PBS. For blood leukocyte analysis, a precise volume of heparinized blood was subjected to RBC lysis and washed with MACS buffer.

Flow cytometry

Human EDTA-collected blood was obtained from the blood bank Établissement Français du Sang. After red blood cell lysis, leukocytes were stained with fluorescently labeled mAbs for 30 minutes at 4°C. Human cell populations were distinguished as CD15⁺CD193[−] neutrophils, CD193⁺CD15^{low} eosinophils, CD3⁺ T cells, CD19⁺ B cells, CD56⁺ NK cells, CD123⁺CD203c^{low}FcεRI^{hi} basophils, CD14⁺ monocytes, CD14^{hi}CD16^{low} classical monocytes and CD14^{low}CD16^{hi} patrolling monocytes, and CD61⁺ platelets.

Isolated single-cell suspensions from mouse blood and organs were stained with fluorescently labeled mAbs for 30 to 40 minutes at 4°C. Mouse cell populations were distinguished based on forward scatter/side scatter (SSC) characteristics and by surface markers as follows: neutrophils (CD11b⁺Ly-6C^{low}Ly-6G⁺), monocytes (classical CD11b⁺Ly-6G[−]Ly-6C^{hi} or patrolling CD11b⁺Ly-6G[−]CD115⁺Ly-6C^{low}), peritoneal macrophages (CD11b^{hi}Gr-1^{low}), alveolar macrophages (CD11c^{hi}), liver and bone marrow macrophages (CD11b^{hi}Gr-1^{low}F4/80⁺), eosinophils (CD11b⁺Siglec-F⁺SSC^{hi}), basophils (CD45^{low}mIgE⁺CD49b⁺), mast cells (mIgE⁺CD49b⁺CD117⁺), platelets (CD41⁺), T cells (CD3⁺; CD4⁺/CD8⁺), B cells (CD19⁺/B220⁺, subpopulations as in Fig E4), and NK cells (NKp46⁺CD49b⁺).

hFcγRIIA was identified by the specific mAb clone IV.3. hFcγRIIB was identified by the clone 2B6^{E5} expressed as a chimeric mouse-human IgG₁ N297A variant to inhibit unspecific binding through the Fc portion of the antibody. We used an anti-CD16 antibody (clone 3G8) to characterize jointly hFcγRIIA and hFcγRIIB expression because we could not identify, by using a series of commercially available anti-CD16 antibodies, an antibody able to distinguish surface expression of hFcγRIIA (V₁₅₈) from hFcγRIIB (NA2). In Fig E7 the anti-CD32 clone FL18.26 defines hFcγRIIA+B expression, the anti-CD32(R131) clone 3D3 defines hFcγRIIB expression only because VG1543 mice express the H131 variant of hFcγRIIA, and the anti-CD16 clone MEM-154 defines hFcγRIIA+B expression. mFcγRI was identified by using the specific clone X54-5/7.1 (BD Biosciences).

For *ex vivo* binding of cells with human IgG, blood cell suspensions were incubated first with aggregated IVIG (20 μg/mL) for 1 hour on ice and then stained with a fluorescently labeled antibody cocktail, including anti-human IgG Fab-specific goat F(ab')₂ fragment (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pa). Cells isolated from VG1543 mice after IVIG-PSA were stained with the secondary antibody alone.

Samples were run on a MACSQuant flow cytometer (Miltenyi Biotec), and data were analyzed with FlowJo Software (TreeStar, Ashland, Ore).

Specificity and efficiency of cell depletion strategies

Appropriate antibody-mediated cell depletion with anti-Ly-6G (NIMP-R14) and anti-CD200R3 (Ba103) was examined by means of flow cytometric analysis. NIMP-R14 treatment (300 μg) efficiently depleted neutrophils in the blood, spleen, and peritoneum (Fig E1). Percentages of total CD11b⁺CD115⁺ monocytes in the blood and CD11b⁺Gr-1^{int} monocytes in the spleen were unaffected, whereas percentages of CD11b⁺F4/80⁺ macrophages in the peritoneum increased slightly. The percentage of blood basophils was slightly increased, but total numbers were unaffected, and spleen basophils and peritoneal mast cells were not affected. However, we observed that the frequency of Ly-6C^{hi} monocytes decreased and the frequency of Ly-6C^{low} monocytes

increased after NIMP-R14 treatment, a phenomenon that might reflect epitope masking by NIMP-R14 because of low-level cross-recognition. Therefore NIMP-R14 efficiently depletes neutrophils, with some effects on other cell populations. Ba103 administration at 30 μg per mouse induced basophil depletion in the blood and spleen without affecting circulating neutrophils and monocytes or peritoneal mast cells (Fig E3 and data not shown). Yet basophil depletion was incomplete (up to 70%) and not uniformly efficient across subjects (see Fig E3, A). Therefore we administered Ba103 at a 2-fold greater dose (60 μg per mouse). Although we could not detect a significant increase in depletion compared to the 30 μg dose (data not shown), this increased dose indicated a minor contribution of basophils to anaphylaxis severity (Fig 4, E).

We have previously demonstrated efficient monocyte/macrophage depletion in the blood and spleen after intravenous liposome injection,^{E6} whereas peritoneal macrophages remained intact. In an effort to achieve complete monocyte/macrophage depletion, we combined multiple injections of clodronate liposomes with different routes of administration, resulting in higher total liposome load; however, these approaches were inconclusive, and although we were efficiently able to deplete resident macrophages, we observed increases in numbers of circulating inflammatory monocytes and wildly inconsistent responses during IVIG-PSA. Indeed, toxic liposomes can affect all phagocytic cell populations, and approaches to increase their efficacy also augment nonspecific effects. For this study, we confirmed that the ability of macrophages to mediate thrombocytopenia (reflecting capacity to engage and engulf antibody-bound cells and, by logical extension, immune complexes) remains intact after antibody-mediated depletion strategies (eg, NIMP-R14 or Ba103) but is blocked after intravenous clodronate liposome injection at the doses used herein.

Statistics

Statistical analyses were performed with Prism software (GraphPad Software, La Jolla, Calif). Survival was analyzed by using a log-rank (Mantel-Cox) test to compare test subjects and control subjects. Temperature loss during ASA was compared with a Student *t* test of individual time points, excepting Fig E5, G, in which groups were compared using a 2-way repeated measures ANOVA. Temperature loss during PSA was compared by using 2-way repeated-measures ANOVA, except in Fig E8, E, in which groups were compared by using a Student *t* test at 30 minutes. hFcγR expression in Fig 5 and Fig E7 was compared by using an unpaired *t* test with the Welch correction for unequal variances. Percentages of immune cell populations in Table E4 were compared using an unpaired *t* test.

REFERENCES

- E1. Valenzuela DM, Murphy AJ, Frendewey D, Gale NW, Economides AN, Auerbach W, et al. High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis. *Nat Biotechnol* 2003;21:652-9.
- E2. Poueymirou WT, Auerbach W, Frendewey D, Hickey JF, Escaravage JM, Esau L, et al. F0 generation mice fully derived from gene-targeted embryonic stem cells allowing immediate phenotypic analyses. *Nat Biotechnol* 2007;25:91-9.
- E3. Auerbach W, Dunmore JH, Fairchild-Huntress V, Fang Q, Auerbach AB, Huszar D, et al. Establishment and chimera analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-derived mouse embryonic stem cell lines. *Biotechniques* 2000;29:1024-8.
- E4. Van Rooijen N, Sanders A. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J Immunol Methods* 1994;174:83-93.
- E5. Veri MC, Gorlatov S, Li H, Burke S, Johnson S, Stavenhagen J, et al. Monoclonal antibodies capable of discriminating the human inhibitory Fcγγ-receptor IIB (CD32B) from the activating Fcγγ-receptor IIA (CD32A): biochemical, biological and functional characterization. *Immunology* 2007;121:392-404.
- E6. 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 [E-pub ahead of print]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2016.03.028>.

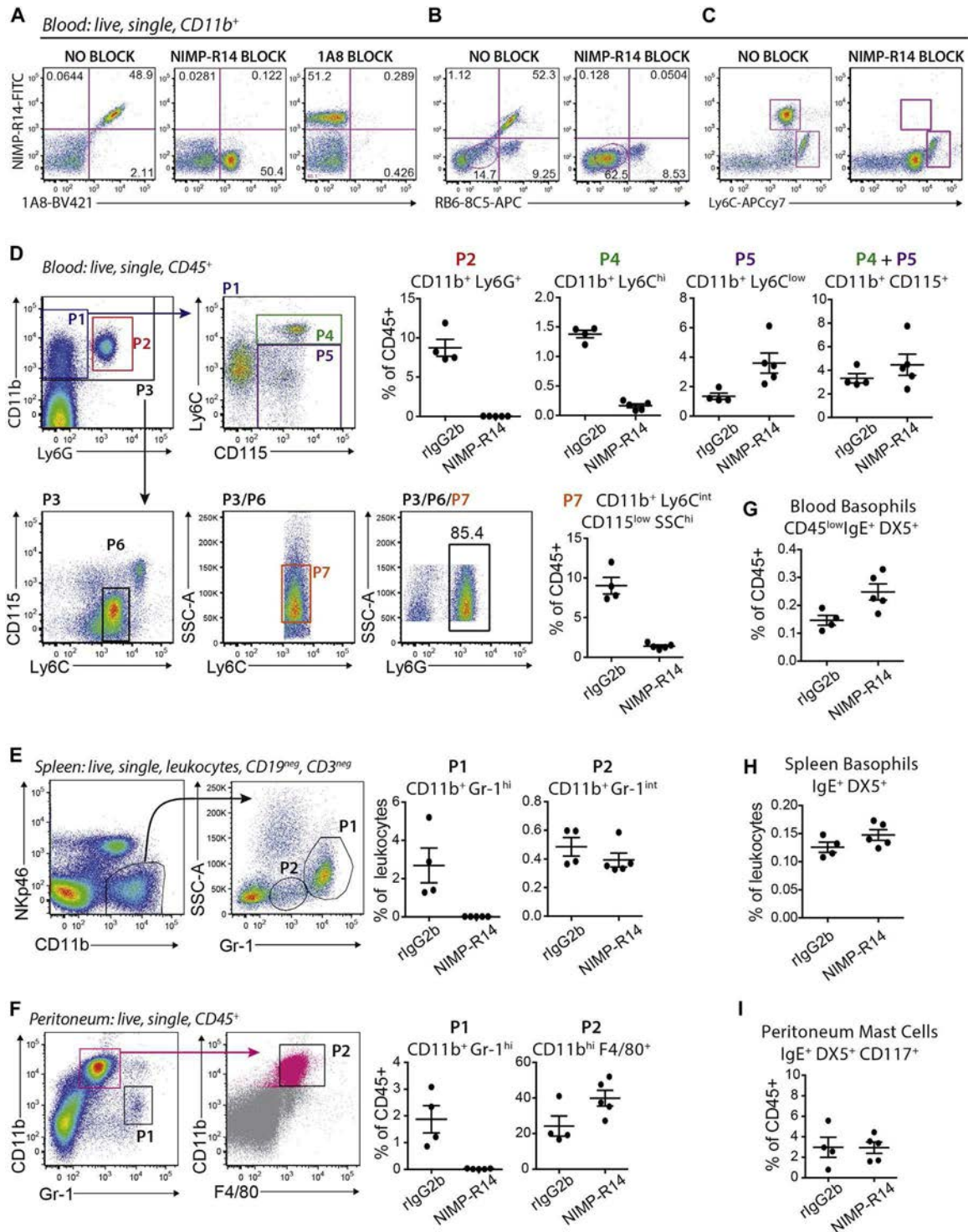


FIG E1. Antibody clone NIMP-R14 specifically targets Ly-6G antigen and efficiently depletes neutrophils *in vivo*. **A-C**, Blood sampled from naive mice (pool of $n = 4$) was stained with fluorescein isothiocyanate-conjugated NIMP-R14 in combination with fluorescent antibody clones 1A8 (anti-Ly-6G; Fig E1, A), RB6-8C5 (anti-Gr-1, binds Ly-6C and Ly-6G; Fig E1, B), or anti-Ly-6C (Monts 1; Fig E1, C) with or without preblocking with an excess of unconjugated NIMP-R14 or 1A8. Staining was assessed by using flow cytometry, and representative plots are shown pregated on single live CD11b⁺ cells. **D-F**, VG1543 mice were treated with 300 μ g of NIMP-R14 or rat isotype control antibody (rlgG_{2b}), blood and tissues were sampled 24 hours later, and frequencies of specific cell populations were determined by using flow cytometry: gating strategies are shown, as are frequencies of neutrophils and monocyte/macrophages in the blood (Fig E1, D), spleen (Fig E1, E), and peritoneum (Fig E1, F). **G-I**, Percentage of basophils in the blood (Fig E1, G) and spleen (Fig E1, H) and mast cells in the peritoneum (Fig E1, I). Fig E1, D-F, Data are pooled from 2 independent experiments.

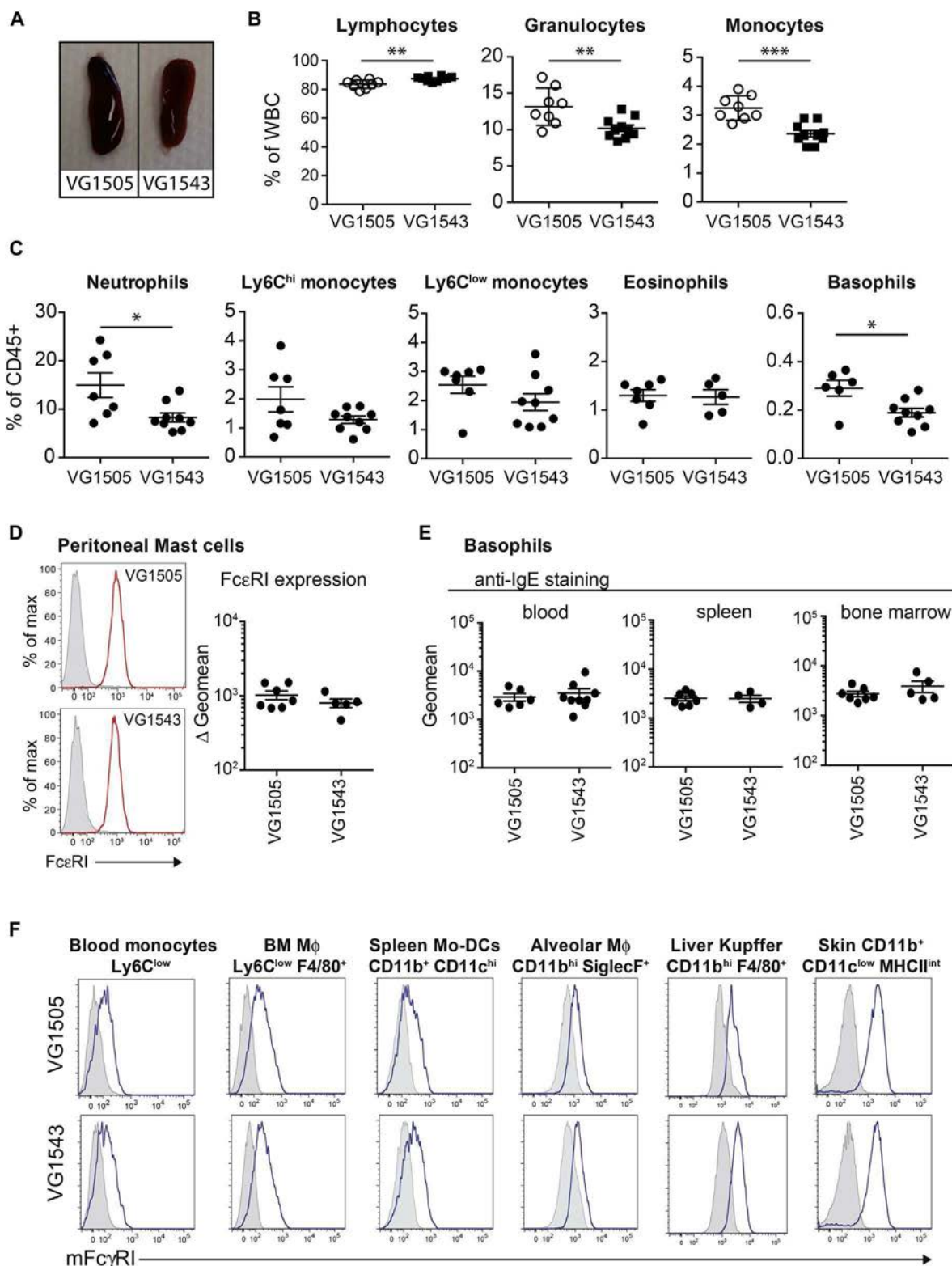


FIG E2. VG1505 and VG1543 mice demonstrate normal immune cell composition of major compartments and comparable expression of mFcεRI and mFcγRI. **A**, Spleens taken from VG1505 and VG1543 mice were comparable in size. **B** and **C**, Leukocyte counts in total blood were enumerated by using an automatic blood cell analyzer (Fig E2, B), and frequencies of blood immune cell populations (Fig E2, C; see also Table E4) were determined by using flow cytometry. **D**, mFcεRI expression on peritoneal mast cells from VG1505 and VG1543 mice: representative histograms are shown, and values represent Δ geometric mean between specific staining and isotype control. **E**, Anti-IgE staining on basophils in the blood, spleen, and bone marrow as a surrogate measure of mFcεRI expression. **F**, Representative histograms showing mFcγRI expression on various monocyte and macrophage populations isolated from VG1505 and VG1543 mice. **P* < .05, ***P* < .01, ****P* < .001, Student *t*-test.

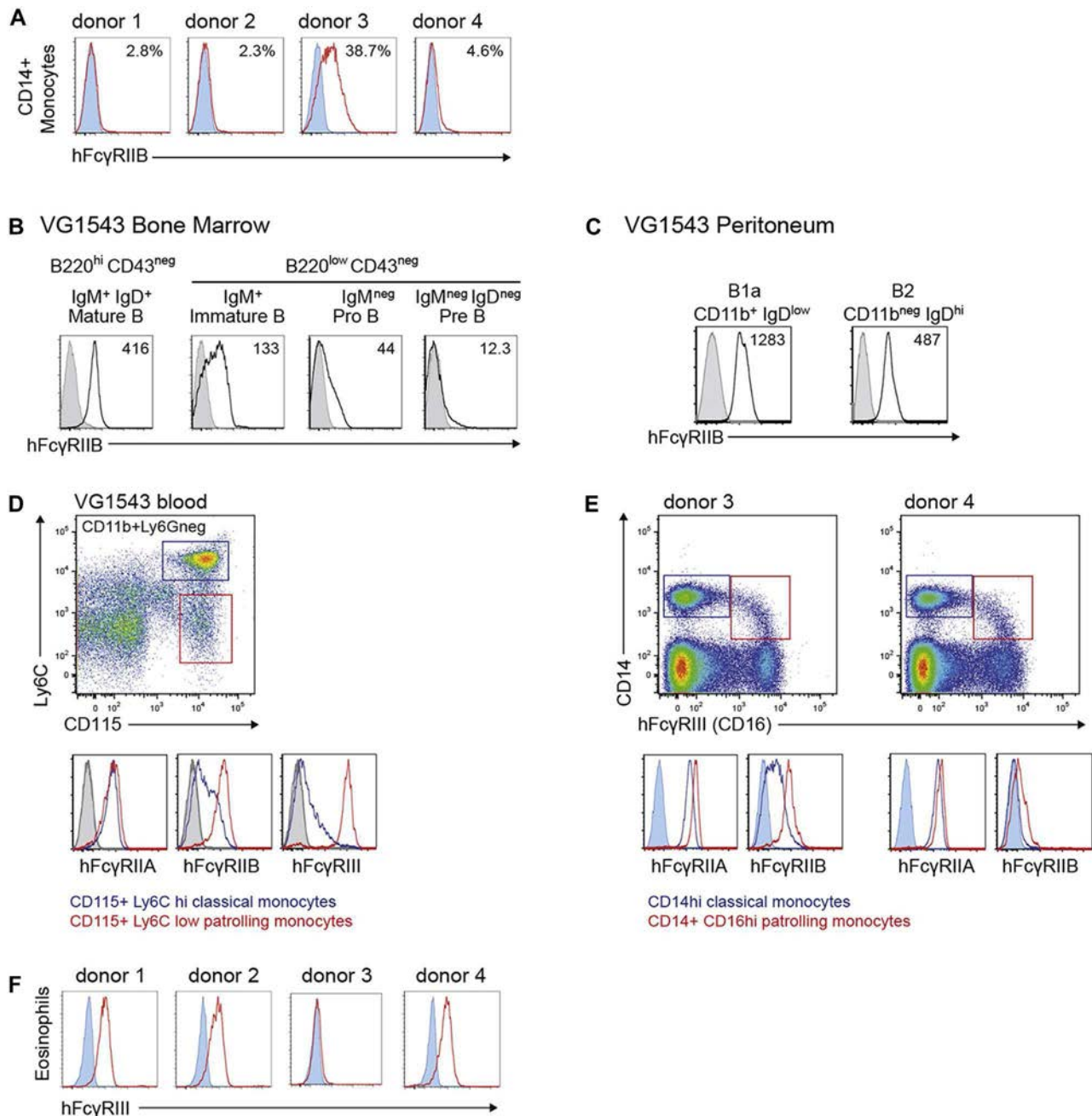


FIG E3. Variability in hFcγR expression on monocytes and eosinophils from different human blood donors. B cells and monocytes exhibit subpopulation-distinct variation in hFcγR expression. Cells were isolated from the blood of healthy human donors (**A**, **E**, and **F**) or bone marrow (**B**), peritoneum (**C**), or blood (**D**) of VG1543 mice for flow cytometric analysis. Fig E3, **A**, Variable expression of hFcγRIIB on monocytes from the blood of 4 different human donors. Numbers indicate frequencies of cells positive for FcγR staining. Fig E3, **B** and **C**, Representative histograms showing hFcγRIIB expression on VG1543 B-cell subpopulations: mature B cells (B220^{hi}CD43^{neg} IgM⁺ IgD⁺) and (B220^{low}CD43^{neg}) immature (IgM⁺), pro (IgM^{neg}) and pre (IgM^{neg} IgD^{neg}) B cells from the bone marrow (Fig E3, **B**) and peritoneal B1a (IgM⁺CD11b⁺IgD^{low}) and B2 (IgM⁺CD11b^{neg}IgD^{hi}) cells (Fig E3, **C**). Numbers indicate Δ geometric mean between specific staining and fluorescence-minus-one controls. Data are representative of at least 2 independent experiments (n > 3). Fig E3, **D** and **E**, Discrimination of classical versus patrolling monocyte subsets in the blood of VG1543 mice (Fig E3, **D**) or human donors (Fig E3, **E**). Differential hFcγRIIA, hFcγRIIB, and hFcγRIII expression on monocyte subsets is shown by representative histograms. Shaded gray histograms indicate background staining from VG1505 mice; shaded blue histograms indicate background staining with an isotype control antibody (hFcγRIIA and hFcγRIII) or a fluorescence-minus-one control (hFcγRIIB). Fig E3, **F**, Variable expression of hFcγRIII on eosinophils from the blood of 4 different human donors.

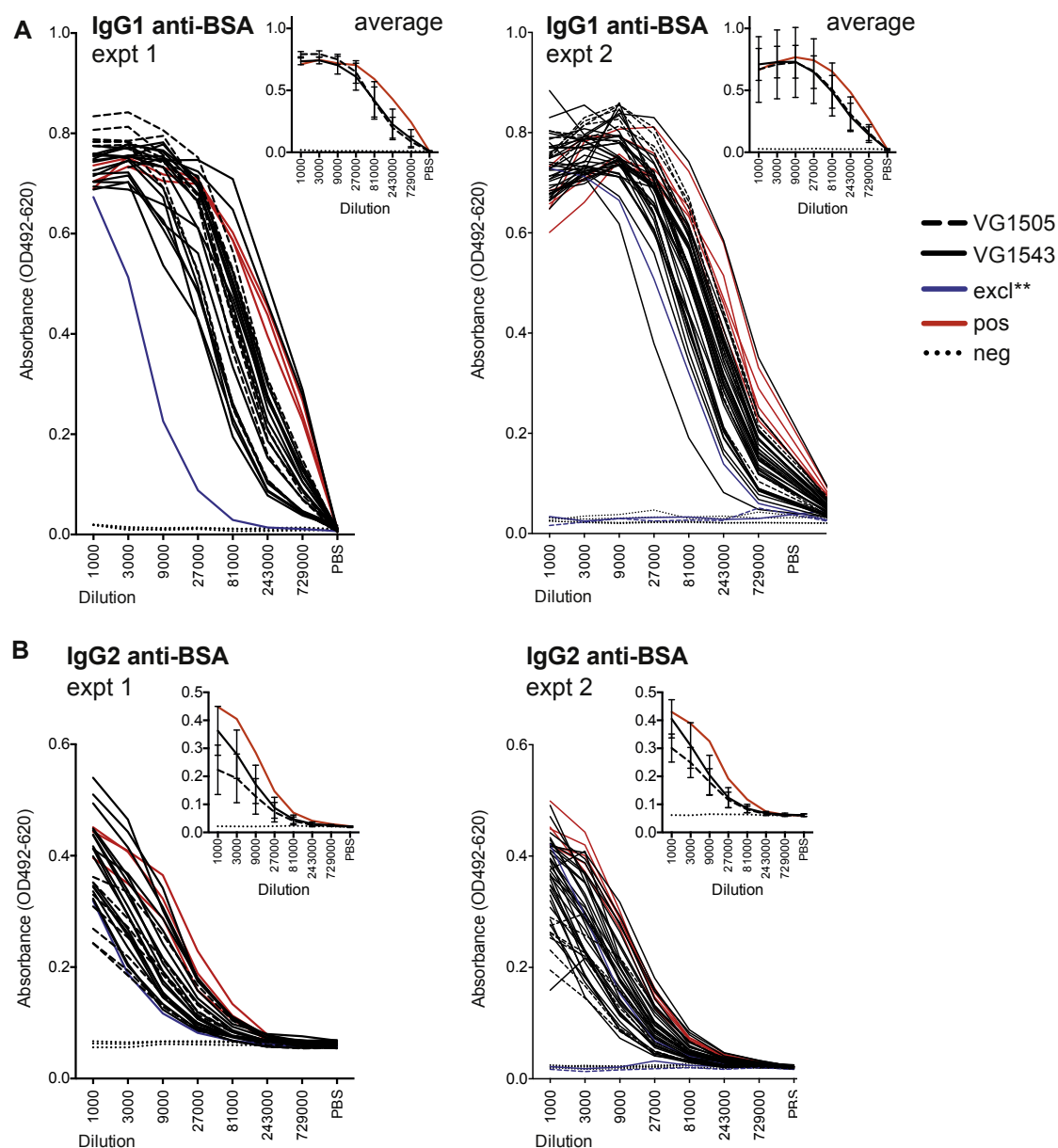


FIG E4. Immunization with BSA in complete Freund adjuvant/incomplete Freund adjuvant induces BSA-specific IgG₁ and IgG₂ in VG1505 and VG1543 mice. Anti-IgG₁ (**A**) and anti-IgG_{2a/b/c} (**B**) BSA-specific ELISA results from 2 independent experiments are represented as serial dilution curves of individual mouse sera and as average curve (insets). VG1505 (dashed black line) and VG1543 (solid black line) mice exhibit comparable antibody titers. excl** (blue line), Mice that were excluded from challenge because of low antibody titers. Positive (pos [red line]) and negative (neg [dotted black line]) ELISA controls are indicated.

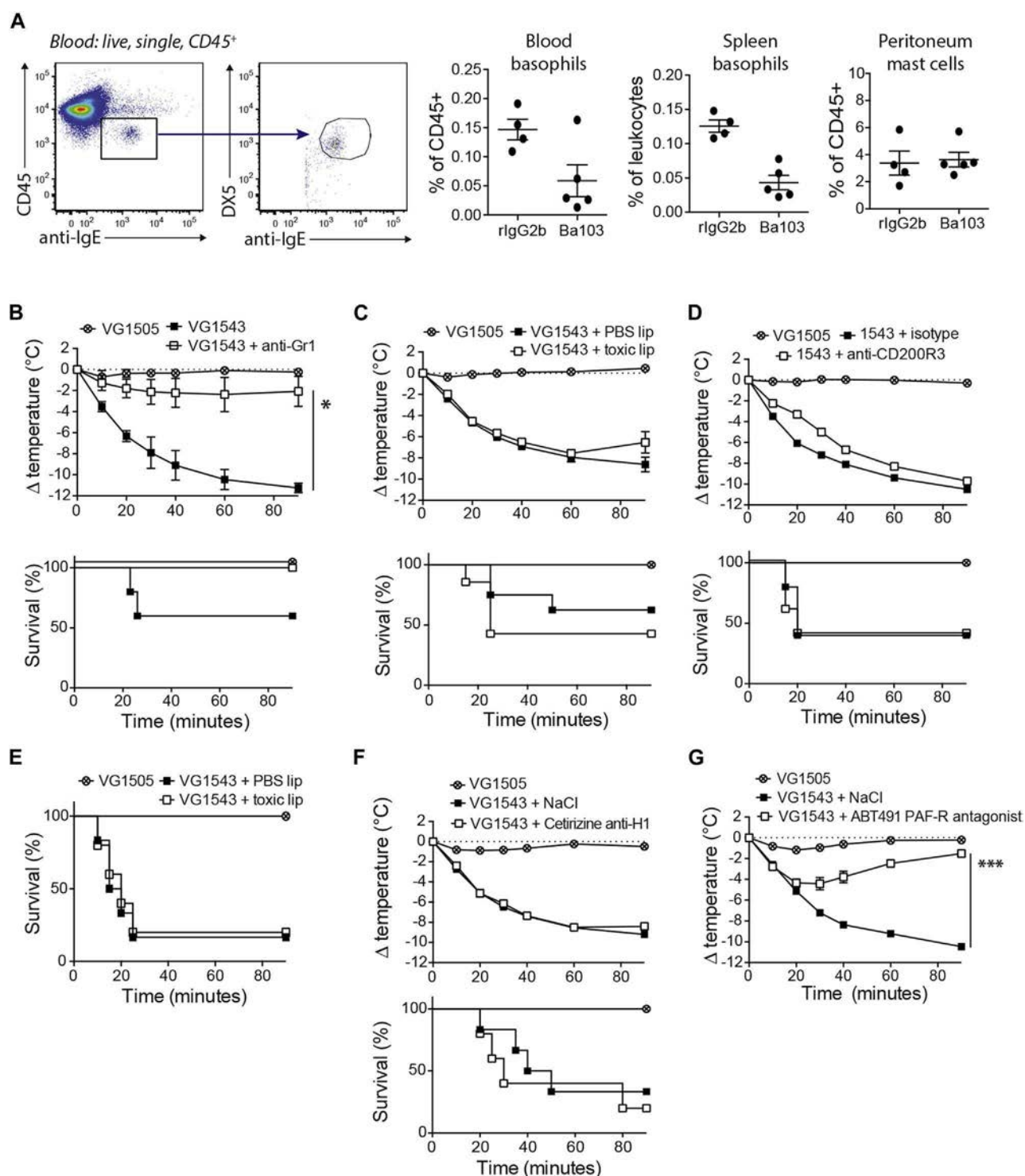


FIG E5. Basophils, monocyte/macrophages, and histamine were not found to contribute to BSA-ASA in VG1543 mice. **A**, VG1543 mice were treated with 30 μ g of anti-CD200R3 (Ba103) or rat isotype control antibody (rlgG_{2b}), and blood and tissues were sampled 24 hours later: representative gating strategy and percentage of basophils in the blood and spleen and percentage of mast cells in the peritoneum. **B–G**, Change in body temperature and survival during BSA-ASA in VG1505 and VG1543 mice and VG1543 mice treated with anti-Gr-1 mAbs (Fig E5, B), toxic liposomes (Fig E5, C and E), anti-CD200R3 mAbs (Fig E5, D), the H₁-receptor antagonist cetirizine (Fig E5, F), the PAF-R antagonist ABT-491 (Fig E5, G), or respective controls. Data are represented as means $\pm$ SEMs and are representative of at least 2 independent experiments. Fig E5, E, BSA-ASA with high mortality in VG1543 mice treated with PBS or toxin-containing liposomes before challenge (repeat of Fig E5, C). Fig E5, G, BSA-ASA with no mortality in VG1543 mice treated or not with PAF-R antagonist before challenge (repeat of Fig 3, D). * P < .05, Student t -test of individual time points from 10 min; *** P < .001 2-way repeated measures ANOVA.

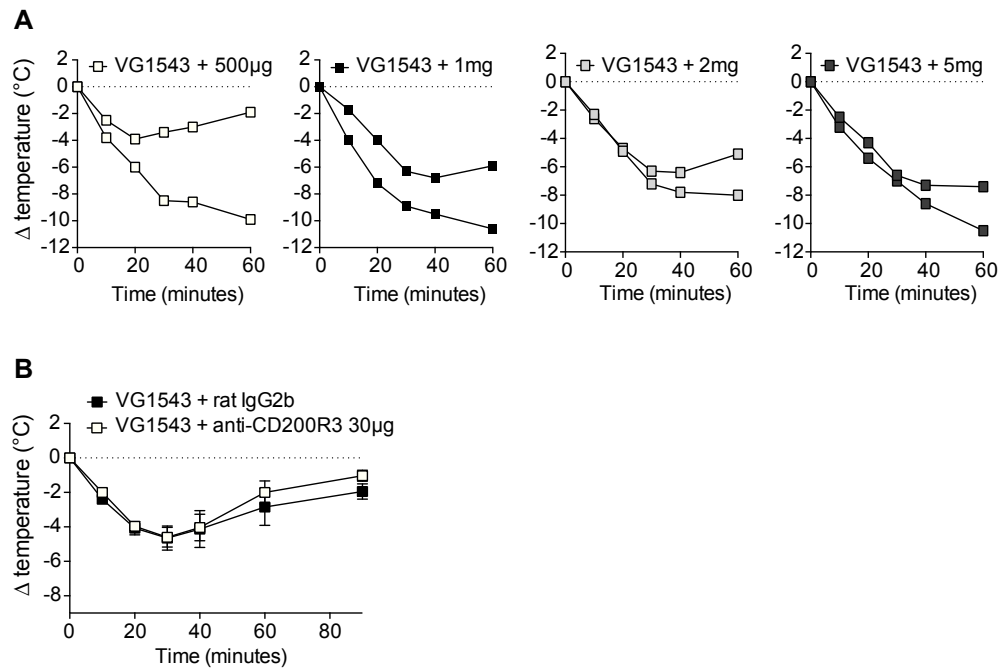


FIG E6. PSA-induced hypothermia of VG1543 mice after injection of high-dose HA-IVIG or basophil depletion. **A**, VG1543 mice were injected with indicated amounts of HA-IVIG, and central temperatures were monitored. Data are represented as individual replicates of each dose. **B**, VG1543 mice treated with 30 μg of anti-CD200R3 (Ba103) or isotype control 24 hours before injection of 1 mg of HA-IVIG and PSA induction.

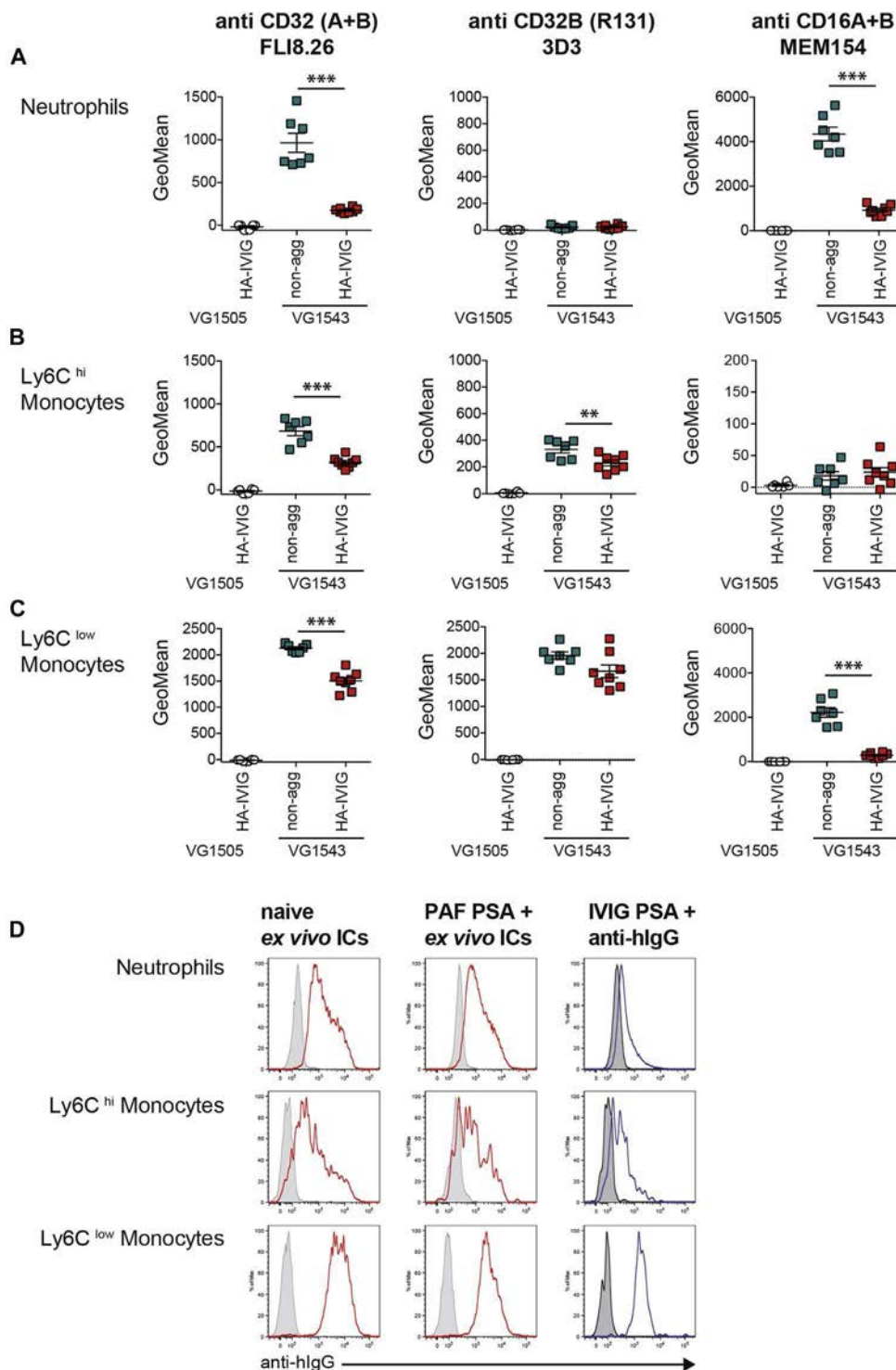


FIG E7. Observed reduction in hFcγR expression on circulating myeloid cell populations after IVIG-PSA is not due to binding inhibition by surface-bound hlgG. **A-C**, hFcγR expression on blood neutrophils (Fig E7, **A**), Ly6C^{hi} (Fig E7, **B**), and Ly6C^{low} (Fig E7, **C**) monocytes from VG1543 mice 1 hour after injection of nonaggregated IVIG (*non-agg*) or HA-IVIG (leading to PSA). Only nonblocking antibodies were used for detecting hFcγR expression to avoid competition with ligand (ie, IVIG) binding: anti-CD32 clone FLI8.26 defines hFcγRIIA+B expression, anti-CD32(R131) clone 3D3 defines hFcγRIIB expression, and anti-CD16 clone MEM-154 defines hFcγRIIIA+B expression. Background staining on cells from VG1505 mice is shown 1 hour after injection of HA-IVIG. Values represent geometric mean of specific staining pooled from 3 independent experiments. ***P* < .01 and ****P* < .001, unpaired *t* test with Welch correction. **D**, Staining of surface hlgG-bound *ex vivo* by incubating blood neutrophils and monocytes isolated from naive VG1543 mice (*left histograms*) or PAF-injected VG1543 mice (*central histograms*; 0.3 μg of PAF injected intravenously to induce PAF-dependent anaphylaxis) with HA-IVIG (20 μg/mL). These histograms were compared with histograms (*right*) representing staining of surface hlgG bound *in vivo* to blood cell populations isolated 1 hour after IVIG-PSA. Representative histograms are shown from 2 to 3 independent experiments (*n* ≥ 3). *Shaded histograms* represent labeling with secondary antibody alone (*left and central panels*) or fluorescence-minus-one control (*right panels*).

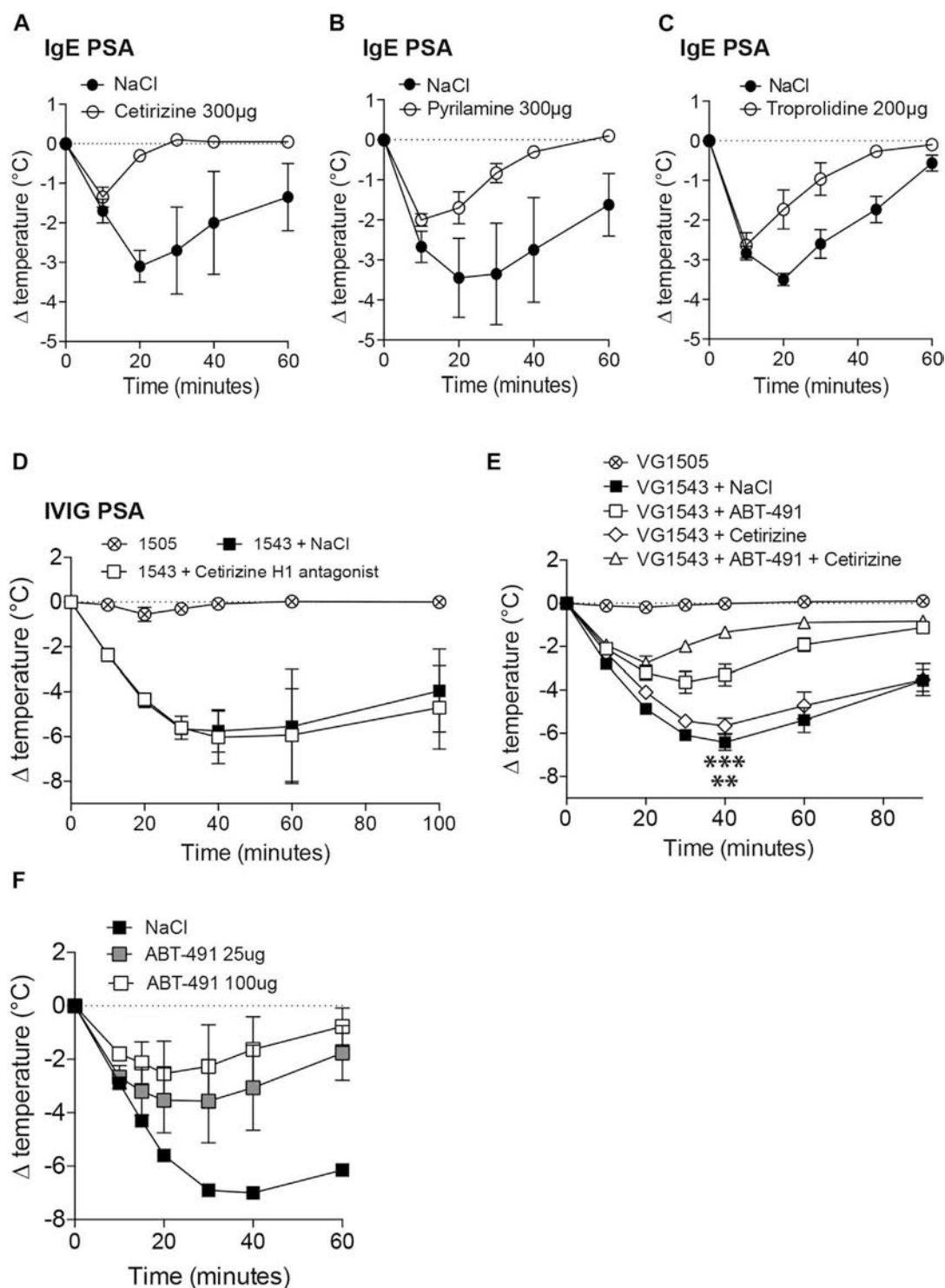


FIG E8. Role of mediators in PSA. **A-C,** Antihistamine treatment inhibits IgE-PSA: VG1505 mice were sensitized by means of transfer of anti-TNP-specific IgE and challenged with TNP-BSA. **A-C,** Indicated mice were injected intraperitoneally with the H₁-receptor antagonists cetirizine (300 μg; Fig E8, A), pyrilamine (300 μg) 30 minutes before challenge (Fig E8, B), or tripolidine (200 μg) 20 minutes before challenge (Fig E8, C). *NB* tripolidine was injected at 200 μg per mouse in Fig E8, C: this dose was increased to 300 μg for IVIG-PSA pretreatment (Fig 6, D). **D and E,** VG1543 were treated with cetirizine alone (Fig E8, D) or in combination with the PAF-R antagonist ABT-491 (Fig E8, E) before IVIG-PSA. Data are representative (Fig E8, D) or collated from 6 independent experiments (Fig E8, E). ***P* < .05, VG1543 + PAF-R antagonist vs VG1543 + PAF-R antagonist + antihistamine, Student *t* test at 30 minutes. ****P* < .001, VG1543 controls versus VG1543 + PAF-R antagonist and VG1543 controls versus VG1543 + PAF-R antagonist + antihistamine. **F,** Administration of the PAF-R antagonist ABT-491 at an increased dose does not confer increased protection from IVIG-PSA: VG1543 was injected intravenously with 25 or 100 μg of the PAF-R antagonist ABT-491 15 minutes before induction of IVIG-PSA.

TABLE E1. BACvec description

BACvec	Step	Description	BHR donor and cassette	Recipient BAC	Process	Product name	Drug selection	Primers for detection
1505	1	Deletion of the mouse low FCGRs, deleting 106 kb (Fig 1)	(mFcR 5' up [1]/mFcR 3' up <i>Xba</i> I [1a])-I- <i>Ceul</i> -PGKp-em7-neoR-pA-lox2372-(5' down <i>Sac</i> I/mFcR 3' down)	RP23-395f6	BHR	1505	kan cm	mFcR 5' up detect (3), mFcR 3' down detect
1528	1	Trim human FCGR locus on the distal end of human BAC CTD2514j12, insert an I- <i>Ceul</i> site at the distal end, deleting 41 kb	(5' down loxp pbelo/3' del loxp [<i>Kpn</i> I])-I- <i>Ceul</i> -frit-UbCp-em7-hyg-pA-(5' down primer- <i>Sac</i> I [h14]/3' down primer [h15])	CTD2514j12	BHR	VI-209	hyg cm	5'pbelo loxp detect, 3' down detect (h16)
	2	Insert PI- <i>Sce</i> I site into the proximal end human BAC construct VI-209	(5' up primer [h4]/3' up primer <i>Xho</i> I [h5])-PI- <i>Sce</i> I-Spec-(del cm [<i>Avr</i> II]/3' up homology CM pbelo)	VI-209	BHR	VI-212	hyg spec	5' up detect (h6), 3' pbelo-cm detect
	3	Deletion of the mouse low FCGRs (106 kb) and inserted I- <i>Ceul</i> and PI- <i>Sec</i> I sites flanking neoR (VI207) and then removed the extra PI- <i>Sce</i> I site by <i>Asc</i> I, digestion and ligation, to make VI208	(mFcR 5' up [1]/3' up mFcRg-2b <i>Nhe</i> I primer [2; Rev])-I- <i>Ceul</i> -loxp-PGKp-em7-neoR-pA-loxp-PI- <i>Sce</i> I(mFcR 5' down <i>Apa</i> I[7; Rev]/mFcR 3' down)	RP23-395f6 and VI207	BHR, Digestion/ligation	VI207 and VI208	kan cm	mFcR 5' up detect (3), mFcR 3' down detect
	4	Ligate human FCGR fragment 72.3 kb from VI212 into VI208 replacing neoR	VI212: I- <i>Ceul</i> -hygR-72.3 kb of human FCGRs-PI- <i>Sce</i> I	VI208	Ligation	1528	cm hyg	mFcR 5' up detect (3), mFcR 3' down detect (9)
1543	1	Trim human FCGR locus on the proximal end of human BAC RP11-697e5, deleting PI- <i>Sce</i> I site (Fig 1)	(5' up-[h40]/3' up- <i>Avr</i> II [h42])-specR-(5' kpn del loxp bac3.6 [B10a]; Rev]/5' down loxp pbelo [Rev])	RP11-697e5	BHR	VI-217	spec cm	5' up detect (h41), 5' del loxp detect (b14 [Rev])
	2	Insert <i>Not</i> I and PI- <i>Sec</i> I sites flanking hygR at the distal end of VI217	(3' up homology CM pbelo [Rev]/5' pbelo del cm <i>Nsi</i> I w/ <i>Not</i> I [Rev])- <i>Not</i> I-Pgk-hygR-PI <i>Sce</i> I (5' down <i>Sal</i> I (h10 [Rev])/3' down (h11 [Rev])	VI-217	BHR	VI-222	hyg spec	3' pbelo del cm detect (Rev), 3' down detect (h12 [Rev])
	3	Ligate mouse distal homology arm 47 kb from VI-208 into VI222 replacing hygR	<i>Not</i> I-PGKp-em7-neoR-pA-lox2372-47 kb of human FCGRs-PI- <i>Sce</i> I	VI-222	Ligation	1543	neo spec	3' pbelo del cm detect, 3' down detect (h12)

TABLE E2. List of primers

Primer name	Sequence (5'-3')
mFcR 5' up (1)	ACCAGGATATGACCTGTAGAG
mFcR 3' up <i>Xba</i> I (1a)	TGTTTCTACTTACCCATGGAC
mFcR 5' up detect(3)	ATCCTGAGTATACTATGACAAGA
5' down Sac PI Sce	CATGCATCTATGTCGGGTGCGGAGAAAGAGGTAATGCATTCTTGCCCAATACTTAC
mFcR 3' down	CCCTCTAGCTAGGTTATTAGG
mFcR 3' down detect	GGAGCCTCAACAGGACTCCAT
5' down loxp pbelo	ATCCGATGCAAGTGTGTCGCT
3' del loxp (<i>Kpn</i> I)	CTCGCTTTTCAGCACCTGTCGT
5' pbelo loxp detect	CTGTAGAACGGAGTAACCTCG
3' down detect (h16)	CCCAGGTAAGTCGTGATGAAACAG
5' down primer- <i>Sac</i> I (h14)	GCCAGCCACAAAGGAGATAATC
3' down primer (h15)	GCAACATTTAGGACAACTCGGG
5' up detect (h6)	CACACATCTCCTGGTGACTTG
3' pbelo-cm detect	ACAGCATGTGCATCGCATAGG
5' up primer (h4)	GATTTCTTAACCACCTACCCC
3' up primer <i>Xho</i> I (h5)	CAACTGCCATTGGAAAAGA
5' up-(h40)	GAATGAATTCCGCGGATCCTTCTATAGTGTACCTAAATGTCGACGGCCAGGCAGCCGC
5' up detect (h41)	GAGCAGCCATCTATAGACCTAC
5' kpn del loxp bac3.6 (B10a [Rev])	CTTATCGATGATAAGCTGTCA
5' down loxp pbelo (Rev)	ATCCGATGCAAGTGTGTCGCT
5' del loxp detect (b14 [Rev])	TCGTGTTGTGCGGTCTGATTAT
3' up homology CM pbelo (Rev)	CAATCCAGGTCCTGACCGTTC
5' pbelo del cm nsi w/notii (Rev)	GCCCGGTAGTGATCTTATTTC
3' pbelo del cm detect (Rev)	ACAGCATGTGCATCGCATAGG
5' down <i>Sal</i> I (h10 [Rev])	AAATACACACTGCCACAGACAG
3' down (h11 [Rev])	CACAGGAAACTCACAAAAGAGG
3' down detect (h12 [Rev])	CTTTTATGGTCCCACAATCAG
mFcR 3' down detect(9)	ACTCATGGAGCCTCAACAGGA
mFcR 5' down <i>Apal</i> (7 [Rev])	GCATTCTTGCCCAATACTTAC
3' up mFcgR-2b <i>Nhe</i> I primer (2 [Rev])	GTTTCTACTTACCCATGGAC

TABLE E3. List of TaqMan probes

TaqMan probe	Description	Forward primer (5'-3')	TaqMan probe (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Probe copy nos.	
					Mod	WT
Fcgr4	Fcgr2b	CCAGGGTCTCCATCCATGTT	CCACCGTGGCATCA	TCCTATCAGCAGGCAGAATGTG	0	1
Fcgr2b-U	Fcgr2b	AGCAGTGCTGCCTCCTTCC	TGACCATCGTGGAAGCCAGCCT	GGTTTGTTCCTTTGCCAGTATG	0	1
Neo	Neo gene	GGTGGAGAGGCTATTCGGC	TGGGCACAACAGACAATCGGCTG	GAACACGGCGGCATCAG	0	1
1528 hT1	Fcgr2b	TCATCACGACTTACCTGGGTTC	CCCTCCTGGTGTCCCTCTGATGAC	GGACAGGTGAAGACAGAGGAG	1	0
1528 hT1	Fcgr2b	TCCTTCCTGGTCCTGTTCTATG	TCCCTTGCCAGACTTCAGACTGAGA	CTCTGTCACCCACCAATTTCC	0	0
Hyg	Hyg	TGCGGCCGATCTTAGCC	ACGAGCGGGTTCGGCCATTCC	TTGACCGATTCCCTTGCGG	0	0
1543hD	Fcgr2b	GTTCTGGTAATTGGGCTCTTTGTTC	TCTGGAGCTTCCGACTGCATAAGCAG	ACTGCTGGTTTCTGCCTTCTC	0	0
1543hU	Fcgr2b	GGGAGAATAGCAGAGCAGGAC	TCAGCAATCTCCACTCAGGGGTCA	ACACAAGTTCACGGGAAGTCAAAC	0	0
1543 AS 129	Fcgr2b	TTTCTTGCCCCAAATTGAAGA	CTCCCAAATGAATG	TCAGGCAGTCGATCTCTGTTTC	0	0
1543 AS B6	Fcgr2b	TTTCTTGCCCCAAATTGAAGA	CTCCCAAATGAGTGGAG	TCAGGCAGTCGATCTCTGTTTC	1	0
1543 AS2 129	Fcgr4	TTCTTGTTGTCTCCTTTGCCTCTAA	ATCCACTTAGACTGCAC	TTGAAGCTCTGCACAGTGAGATC	1	0
1543 AS2 B6	Fcgr4	TTCTTGTTGTCTCCTTTGCCTCTAA	TATCCACCTAGACTGC	TTGAAGCTCTGCACAGTGAGATC	1	0
1543 AS3 129	Fcgr4	GGCAGGACAGTGATAAATTCTGAGA	TGGCCCTTGCTGTGA	GGCCAAGAATGGAACATGACTT	1	0
1543 AS3 B6	Fcgr4	GGCAGGACAGTGATAAATTCTGAGA	TGGCCCTTGCTATGA	GGCCAAGAATGGAACATGACTT	1	0
					1	0

Mod, Modified allele; *WT*, wild-type.

TABLE E4. Immune cell composition in VG1505 and VG1543 mice using flow cytometric analysis

	VG1505	VG1543	
Blood			
CD19 ⁺	31.09 ± 2.012, n = 7	36.48 ± 3.342, n = 5	NS
CD4 ⁺	23.47 ± 2.489, n = 7	28.24 ± 1.620, n = 5	NS
CD8 ⁺	14.89 ± 0.9485, n = 7	14.46 ± 1.006, n = 5	NS
Neutrophils: CD11b ⁺ Ly-6G ⁺	14.97 ± 2.550, n = 7	8.306 ± 0.9350, n = 9	<i>P</i> = .0412*
Monocytes: CD11b ⁺ (Ly-6G ⁻)CD115 ⁺ Ly-6C ^{low-int}	2.544 ± 0.2942, n = 7	1.947 ± 0.2914, n = 9	NS*
Monocytes: CD11b ⁺ (Ly-6G ⁻)CD115 ⁺ Ly-6C ^{hi}	1.981 ± 0.4293, n = 7	1.284 ± 0.1263, n = 9	
Eosinophils: CD11b ⁺ SSC ^{hi} Siglec-F ⁺	1.299 ± 0.1207, n = 7	1.266 ± 0.1527, n = 5	NS
Basophils: CD45 ^{low} IgE ⁺ DX5 ⁺	0.2900 ± 0.03281, n = 6	0.1894 ± 0.01816, n = 9	<i>P</i> = .0123*
Bone marrow			
Neutrophils: CD11b ⁺ Ly-6G ^{int-hi}	56.21 ± 3.956, n = 7	45.80 ± 1.382, n = 5	NS
Monocytes: CD11b ⁺ (Ly-6G ⁻)Ly-6C ^{hi}	8.803 ± 1.020, n = 7	9.512 ± 0.6939, n = 5	NS
Monocytes: CD11b ⁺ (Ly-6G ⁻)Ly-6C ^{int}	1.419 ± 0.2171, n = 7	1.696 ± 0.1661, n = 5	NS
Macrophages: CD11b ⁺ (Ly-6G ⁻)Ly-6C ^{low} F4/80 ⁺	1.494 ± 0.3950, n = 7	1.706 ± 0.1856, n = 5	NS
Basophils: CD45 ^{low} IgE ⁺ DX5 ⁺	0.5009 ± 0.03961, n = 7	0.6222 ± 0.05160, n = 5	NS
Spleen			
CD19 ⁺	37.57 ± 1.717, n = 7	39.50 ± 3.019, n = 5	NS
CD4 ⁺	15.60 ± 1.780, n = 7	27.88 ± 1.423, n = 5	<i>P</i> = .0005†
CD8 ⁺	9.691 ± 1.060, n = 7	11.18 ± 0.6511, n = 5	NS
Neutrophils: CD11b ⁺ Ly-6G ^{int-hi}	7.900 ± 2.492, n = 7	1.466 ± 0.1149, n = 5	NS
Monocytes: CD11b ⁺ (Ly-6G ⁻)CD115 ⁺ Ly-6C ^{low-int}	1.028 ± 0.1689, n = 7	0.7142 ± 0.07172, n = 5	NS
Monocytes: CD11b ⁺ (Ly-6G ⁻)CD115 ⁺ Ly-6C ^{hi}	1.662 ± 0.5531, n = 7	0.6308 ± 0.1815, n = 5	NS
Eosinophils: CD11b ⁺ SSC ^{hi} Siglec-F ⁺	1.146 ± 0.1922, n = 7	0.4212 ± 0.05560, n = 5	<i>P</i> = .0116*
Basophils: CD45 ^{low} IgE ⁺ DX5 ⁺	0.2484 ± 0.02648, n = 7	0.1325 ± 0.005172, n = 4	<i>P</i> = .0106*
Peritoneum			
CD117 ⁺ IgE ⁺ mast cells	3.751 ± 0.3780, n = 7	3.958 ± 1.133, n = 5	NS
CD11b ^{hi} F480 ⁺ macrophages	45.57 ± 3.675, n = 7	20.18 ± 2.848, n = 5	<i>P</i> = .0005†

NS, Not significant.

**P* < .05, unpaired *t*-test†*P* < .001, unpaired Student *t*-test

Table des illustrations

Figure 1 : Grades de sévérité des réactions anaphylactiques (adapté de (2))	6
Figure 2 : Structure et affinité des FcγRs de souris pour les sous-classes IgG1, IgG2a, IgG2b et IgG3 (adapté de (28))	13
Figure 3 : Structure et affinité des FcγR et du FcRn humains pour les différentes sous-classes d'IgG	15
Figure 4 : Les récepteurs des plaquettes activées (57). A noter que le FcγRIIA/CD32A n'est pas indiqué dans cette figure.	18
Figure 5 : Les différentes fonctions du neutrophile (PMN) (137)	31
Figure 6 : PSA induite par des IgG1 humaines dans des souris FcγRIIA ^{tg} et FcγR ^{null}	40
Figure 7 : Essais d'agrégation plaquettaire sur plaquettes humaines lavées après mise en présence de différents stimulants.	57
Figure 8 : Essai d'agrégation plaquettaire sur plaquettes lavées issues des souris FcγRIIA ^{tg} (à gauche) et des souris Audrey (à droite) après mise en présence de différents stimulants.	58
Figure 9 : Essai d'agrégation plaquettaire sur plaquettes lavées issues de souris FcγRIIA ^{tg} après mise en présence de différents stimulants.	64
Figure 10 : Résumé des interaction et communications entre une plaquette et un neutrophile (80). GPIIb/IIIa (α _{IIb} β ₃) et Mac-1 (α _M β ₂) sur ce schéma.....	65
Figure 11 : Rôle des neutrophiles dans la PSA induite par des IgG humaines agrégées dans les souris FcγRIIA ^{tg}	71
Figure 12 : Effet du romiplostim sur les autres populations circulantes dans les souris FcγRIIA ^{tg}	83
Figure 13 : Mécanisme d'action d'un anti-inflammatoire non stéroïdien (NSAID) : l'aspirine (279)	92
Figure 14 : Souris FcγRIIA ^{tg} prétraitées ou non avec de l'aspirine puis induction de la HA IVIg	93