



FACULTE DE SANTE

DEPARTEMENT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE : 2022-2023

THESE 2023/TOU3/2002

# THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Par

PAULET VIRGINIE

Étude de l'activation des cellules dendritiques par la pholcodine dans la réaction  
d'hypersensibilité de type 1

Date de soutenance le 18 janvier 2023

Directeur de thèse : Dr DE CHAISEMARTIN Luc

## JURY

Présidente : Dr COLACIOS Céline

1<sup>er</sup> assesseur : Pr BOUTET-ROBINET Élisabeth

2<sup>ème</sup> assesseur : Dr APOIL Pol André

3<sup>ème</sup> assesseur : Dr LAFFONT-PRADINES Sophie

**PERSONNEL ENSEIGNANT  
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier  
au 1er octobre 2020**

**Professeurs Emérites**

Mme BARRE A.	Biologie Cellulaire
M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J.	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. GAIRIN J.E.	Pharmacologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie

**Professeurs des Universités**

**Hospita-Universitaires**

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme DE MAS MANSAT V.	Hématologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C. (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

**Universitaires**

Mme BERNARDES-GÉNISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie - Sémiologie
Mme COUDERG B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
M. GUIARD B.	Pharmacologie
M. LETISSE F.	Chimie pharmaceutique
Mme MULLER-STAU MONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme REYBIER-VUATToux K.	Chimie analytique
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. SOUCHARD J.P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P.	Chimie Thérapeutique

**Maîtres de Conférences des Universités**

**Hospita-Universitaires**

M. DELCOURT N.	Biochimie
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique
Mme ROUCH L.	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C.	Pharmacie Clinique
Mme SERONIE-VIVIEN S (*)	Biochimie
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie

**Universitaires**

Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme BON C. (*)	Biophysique
M. BOUJILA J. (*)	Chimie analytique
M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme CABOU C.	Physiologie
Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
Mme CHAPLY-REGAUD S.	Bactériologie - Virologie
Mme COLACIOS C.	Immunologie
Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
Mme DERAËVE C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme ECHINARD-DOUIN V.	Physiologie
Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
Mme FALLONE F.	Toxicologie
Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
Mme GADEA A.	Pharmacognosie
Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
Mme LEFEVRE L.	Physiologie
Mme LE LAMER A.-C.	Pharmacognosie
M. LE NAOUR A.	Toxicologie
M. LEMARIE A.	Biochimie
M. MARTI G.	Pharmacognosie
Mme MONFERRAN S.	Biochimie
M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
M. STIGLIANI J.L.	Chimie Pharmaceutique
M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
Mme TERRISSE A.-D.	Hématologie
Mme TOURRETTE-DIALLO A. (*)	Pharmacie Galénique
Mme VANSTELANDT M.	Pharmacognosie
Mme WHITE-KONING M. (*)	Mathématiques

(\*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

**Enseignants non titulaires**

**Assistants Hospita-Universitaires**

Mme LARGEAUD L.	Immunologie
M. LE LOUËDEC F.	Pharmacologie
M. MOUMENI A.	Biochimie
M. PAGES A.	Pharmacie Clinique
Mme SALABERT A.S.	Biophysique
Mme TRIBAUDEAU L.	Droit Pharmaceutique

**Attaché Temporaire d'Enseignement et de  
Recherche (ATER)**

M. François-Xavier TOUBLET	Chimie Thérapeutique
----------------------------	----------------------

# Remerciements

*Au membre du jury,*

Je remercie le docteur Céline Colacios de me faire l'honneur de présider le jury de cette soutenance, cela me tenait à cœur ce soit vous.

Je remercie le docteur Laffont-Pradines, le professeur Boutet-Robinet et le docteur Apoil d'avoir accepté de juger ce travail.

*A l'équipe 2 de l'unité UMR 996,*

Je tiens tout d'abord à remercier le Doyen Marc Pallardy pour m'avoir permis de réaliser mon stage de Master 2 au sein de son équipe de toxicologie.

J'adresse mes plus sincères remerciements au Dr. Luc de Chaisemartin et au Pr. Saadia Kerdine-Römer pour avoir donné une suite positive à ma demande de stage ainsi que pour leur sollicitude, leur soutien et leur intérêt aussi bien au cours de mon stage que pendant la réalisation de mon mémoire de master.

Luc, mes plus sincères remerciements d'avoir accepté d'être mon directeur de mémoire puis ensuite mon directeur de thèse et de m'avoir donné la chance de faire partie de cette équipe de recherche il y a un an déjà.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude à Marine Peyneau pour m'avoir intégrée à ses recherches et à ses manipulations. Je tiens également à la remercier de m'avoir fait partager sa passion et ses connaissances dans son domaine de recherche ainsi que pour sa gentillesse, sa pédagogie, sa bienveillance et sa positivité qui ont été pour moi une source d'inspiration tout au long de mon stage.

Je ne saurais oublier ici, de remercier la totalité des membres de l'équipe 2, particulièrement Éléonore et Maria pour leur aide, leur gentillesse et leur disponibilité tout au long de mon master 2.

*A mes professeurs,*

Merci à Pierre Verhaeghe de nous avoir demandé un jour en TP, un par un, ce que l'on aimait étudier et dans quel domaine était-il possible de mettre en application cette discipline. Il ne le sait sans doute pas, mais ses mots m'ont orienté vers l'univers de la recherche, parce que j'étais tombée (follement) amoureuse de l'immunologie.

Merci à Éliisa Boutet pour sa bienveillance et son soutien tout au long de ces 6 années de pharmacie et notamment parce qu'elle a toujours veillé au bien être des étudiants.

Merci à Céline Colacios pour sa bonne humeur, sa positivité et de m'avoir permis de réaliser mes premiers pas dans le monde de la recherche.

Merci à Rosette, ma professeure d'anglais, de m'avoir toujours poussée à : « Think outside the box ! ».

*A ma famille et à mes amis,*

Je remercie ma maman, mon papa et mes grand-mères d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir donné les armes pour réussir, mais surtout pour leur soutien sans faille durant toutes mes années d'étude. Mille mercis maman d'avoir veillé à mon bien être en coulisse, ma supportrice n°1 !

Merci à toi, mon chéri, d'avoir été là, à écouter mes états d'âmes et de toujours m'avoir ramené sur terre.

Merci à Nina de m'avoir empêché de douter de moi, de ma passion et de toujours pousser à voir le bon côté des choses.

Merci à mes ami.e.s de pharmacie Justine, Morgane, Carla, Sophie, Lorenzo et Caroline pour tous ces moments partagés que ce soit de stress, mais aussi d'entraide et de rire, *ça y est, on l'a fait !*

# Table des matières

<b>Remerciements</b> .....	<b>4</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>7</b>
<b>Listes des abréviations</b> .....	<b>9</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>10</b>
<b>1. L'anaphylaxie</b> .....	<b>10</b>
1.1. Définition .....	10
1.2. Mécanismes des réactions anaphylactiques .....	10
1.2.1. Classification des hypersensibilités .....	10
1.2.2. Hypersensibilité immunologique IgE médiée .....	12
1.2.3. Hypersensibilité immunologique non IgE.....	16
1.2.4. Hypersensibilité non immunologique. ....	18
1.2.5. Hypersensibilité idiopathique. ....	19
1.3. Diagnostic de l'anaphylaxie .....	20
1.3.1. Symptômes et signes cliniques de l'anaphylaxie.....	20
1.3.2. Tests de détection des allergies : .....	21
1.4. Étiologies .....	27
1.4.1. Médicamenteuse.....	27
1.4.2. Alimentaire.....	28
1.4.3. Les venins .....	28
1.5. Prise en charge .....	29
1.6. Facteurs de risques et comorbidités.....	31
<b>2. Anaphylaxie peropératoire</b> .....	<b>32</b>
2.1. Réactions anaphylactiques peropératoires : l'anaphylaxie aux curares.....	32
2.2. Origine de l'anaphylaxie aux curares : la pholcodine comme agent sensibilisant.....	34
2.2.1. Pholcodine et anaphylaxie : études épidémiologiques .....	34
2.2.2 Structure chimique – pharmacocinétique - pharmacodynamie.....	35
<b>3. Modèle d'études du potentiel sensibilisant des produits chimiques</b> .....	<b>36</b>
3.1. Test DPRA (direct peptide reactivity assay) .....	36
3.2. Le test h-CLAT .....	37
3.3. Modèle de cellule dendritiques différenciées à partir de monocytes de donneurs sains : les MoDC...37	
<b>Hypothèse et Objectifs</b> : .....	<b>38</b>
<b>Matériels et méthodes</b> .....	<b>39</b>
<b>Résultats</b> .....	<b>43</b>
<b>Discussion</b> .....	<b>51</b>
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	<b>55</b>
<b>Références</b> .....	<b>56</b>

# Liste des figures

## Introduction

- Figure 1 : Mécanismes d'activation directe ou indirecte des cellules dendritiques par les molécules allergisantes
- Figure 2 : Mécanisme générale de l'hypersensibilité de type I.
- Figure 3 : Les différentes voies immunologiques pouvant conduire à une anaphylaxie
- Figure 4 : Les différents mécanismes pouvant entrainer la dégranulation des mastocytes
- Figure 5 : Exemple de manifestations cliniques de l'anaphylaxie.
- Figure 6 : Résumé des 3 tests cutanés possibles et leur mode d'action : patch-test, IDR, rick-test.
- Figure 7 : Technique ImmunoCAP (ThermoFisher ®) pour la détection d'IgE spécifiques dans les sérums de patients allergiques
- Figure 8 : Test d'activation des mastocytes dans le diagnostic des maladies allergiques et de l'anaphylaxie
- Figure 9 : Résumé des effets de l'immunothérapie (ITA) sur les réponses des cellules T.
- Figure 10 : Représentation de la structure chimique de la pholcodine

## Matériels et méthodes

- Figure 11 : Schéma de la récupération des MoDC à partir de donneurs sains et mise en culture
- Figure 12 : Schéma du modèle de coculture autologue DC-LT CD4+ et de l'étude de la sécrétion des LT CD4+ d'interféron  $\gamma$  en réponse à la stimulation des DC matures chargées avec la pholcodine, la KLH étant le contrôle positif.

## Résultats

- Figure 1 : Morphine (gauche) et codéine (droite)
- Figure 2 : Mesure de l'expression du CD80, CD86, CD86 sur les MoDC après exposition à la codéine, la morphine et la pholcodine.
- Figure 3 : Mesure de l'expression du CD80, CD86, CD86 sur les MoDC après exposition à la codéine, la morphine, la pholcodine et au LPS

- Figure 4 : Mesure de la viabilité après exposition à la naloxone
- Figure 5 : Expression des marqueurs membranaire CD80, CD86, CD83 d'activation des MoDC traitées par la pholcodine avec ou sans naloxone.

# Listes des abréviations

AQ : Ammonium quaternaires

DC : cellules dendritiques

CPA : cellules professionnelles présentatrices d'antigène

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

PRR : pattern recognition receptors

PAMP: pathogen-associated molecular pattern

DAMP: damage-associated molecular pattern

BCR : récepteur des cellules B

TCR : récepteur des cellules T

LT : Lymphocytes T

LB : Lymphocytes B

MoDc : cellules dendritiques issue de la différenciation des monocytes IP : Iodure de propidium

SVF : Sérum de veau foetal

IFN- $\gamma$  : interféron gamma

IgE : Immunoglobuline E

IgG : immunoglobuline G

# Introduction

## 1. L'anaphylaxie

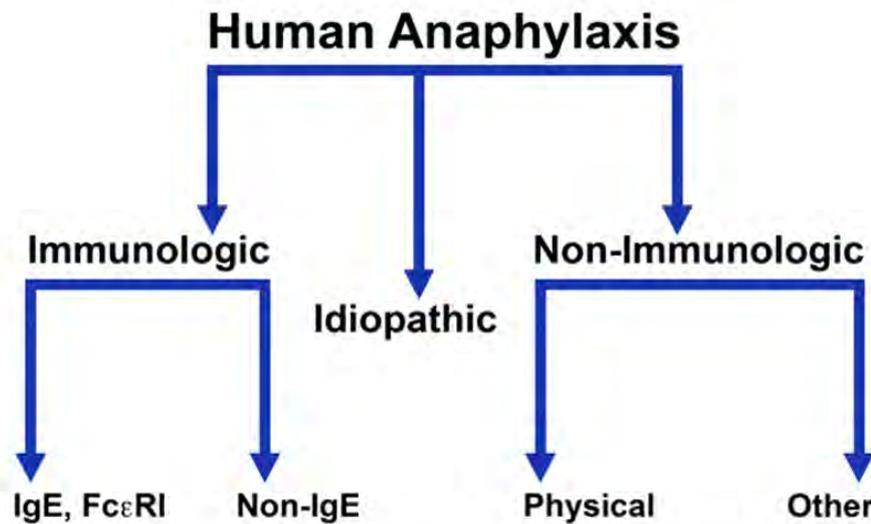
### 1.1. Définition

Le terme anaphylaxie vient des mots grecs *ana-* qui signifie "contre" et *phylaxis* qui signifie "protection". Ce mot a été créé par Charles Robert Richet et par Paul Portier en 1902, qui ont reçu le prix Nobel de médecine et de physiologie, en décrivant un ensemble de symptômes à l'opposé de l'immunité. En 2014 le Consensus International (ICON) définit l'anaphylaxie comme une réaction allergique ou d'hypersensibilité grave, généralisée ou systémique, et pouvant engager le pronostic vital du patient. La définition de la réaction d'hypersensibilité est essentiellement clinique, elle est déterminée par la survenue de symptômes importants suite à l'ingestion d'une substance à une dose normalement acceptée, tolérée par les sujets sains. Cependant, en pratique, il est souvent difficile de déterminer les manifestations essentielles de cette réaction d'hypersensibilité systémique car ces réactions ont des mécanismes et des présentations cliniques variés. L'allergie est synonyme d'une activation anormale du système immunitaire vis-à-vis d'un antigène, appelé alors « allergène ». Malgré un suivi épidémiologique étroit et une bonne connaissance des caractéristiques cliniques, les mécanismes immunologiques sous-jacents à ces réactions demeurent partiellement incompris et méritent d'être mieux documentés. (1)(2)(3)

### 1.2. Mécanismes des réactions anaphylactiques

#### 1.2.1. Classification des hypersensibilités

Les réactions d'hypersensibilité sont classées selon le mécanisme sous-jacent : immunologique, non immunologique et idiopathique. La pathogenèse de l'anaphylaxie implique le plus souvent un mécanisme immunologique dans lequel les immunoglobulines de type E (IgE) sont centrales. Plus rarement, elle peut aussi être de nature non immunologique ou être déclenchée sans cause connue, on parle alors d'anaphylaxie idiopathique. Les différentes causes qui seront abordées sont récapitulées dans le schéma ci-dessous(1) :



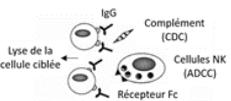
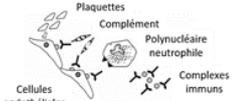
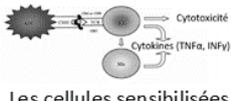
### Classification des différents mécanismes des réactions allergiques possibles

(Anaphylaxis, F. Estelle)

Dans les années 1960 Gell et Coombs ont divisé les réactions immunologiques en quatre catégories (4) (tableau 1) :

- L'hypersensibilité de type I (apparition immédiate) est médiée par les IgE et les mastocytes et/ou les basophiles.
- L'hypersensibilité de type II (apparition retardée) est causée par la destruction cellulaire induite par les anticorps, généralement d'isotype IgG.
- L'hypersensibilité de type III (apparition retardée) est dû au dépôt de complexes immuns à IgG pouvant induire l'activation du complément.
- L'hypersensibilité de type IV (apparition retardée) est médiée par les lymphocytes T.

**Tableau 1. Classification des réactions d'hypersensibilité selon Gell et Coombs (4)**

	Type I	Type II	Type III	Type IV
<b>Nature de l'antigène</b>	Antigène soluble	Antigène cellulaire	Antigène soluble	Antigène soluble/cellulaire
<b>Effecteurs</b>	IgE	Anticorps cytotoxiques (IgG, IgM)	Complexes immuns	Cellules
<b>Délai d'apparition des signes cliniques</b>	Immédiat : quelques minutes à quelques heures	Intermédiaire : quelques heures	Intermédiaire : quelques heures	Retardée : quelques jours (48 heures à 3 semaines)
<b>Cellules impliquées</b>	Mastocytes et basophiles	Cellules phagocytaires, cellules NK	Cellules phagocytaires	Lymphocytes Th1, Th2, macrophages
<b>Médiateurs</b>	Histamine, leucotriènes...	Anticorps et complément	Complément	Cytokines
<b>Mécanisme</b>	 <p>Liaison des IgE par le FcεRI des mastocytes. Liaison de l'allergène par deux IgE induisant l'agrégation des IgE provoquant la libération des médiateurs.</p>	 <p>Anticorps dirigés contre un auto-antigène de surface cellulaire. Lyse des cellules ciblées par les cellules NK (ADCC) et l'activation du complément (CDC).</p>	 <p>Dépôts de complexes immuns sur les tissus. Dommages tissulaires liés à l'activation du complément et au recrutement de cellules phagocytaires.</p>	 <p>Les cellules sensibilisées par l'antigène relarguent des cytokines pro-inflammatoire qui recrutent et activent les macrophages (Mo). Cytotoxicité directe des LT CD8+ activés.</p>
<b>Exemples</b>	Rhinite allergique, asthme allergique, dermatite atopique	Cytopénies auto-immunes, réactions transfusionnelles	Maladie sérique, vascularites nécrosantes, glomérulonéphrites immunoallergiques et post-infectieuses, lupus	Eczéma allergique de contact, diabète de type 1, rejet de greffe

### 1.2.2. Hypersensibilité immunologique IgE médiée

Les réactions d'hypersensibilité qui sont dépendantes des IgE se déroulent en deux phases. Une première phase dite initiale est cliniquement silencieuse. Elle conduira à la sensibilisation par l'allergène puis par la formation des IgE qui lui sont spécifiques. La seconde phase se déclenche lorsqu'il y a une réexposition ou réintroduction de l'allergène.

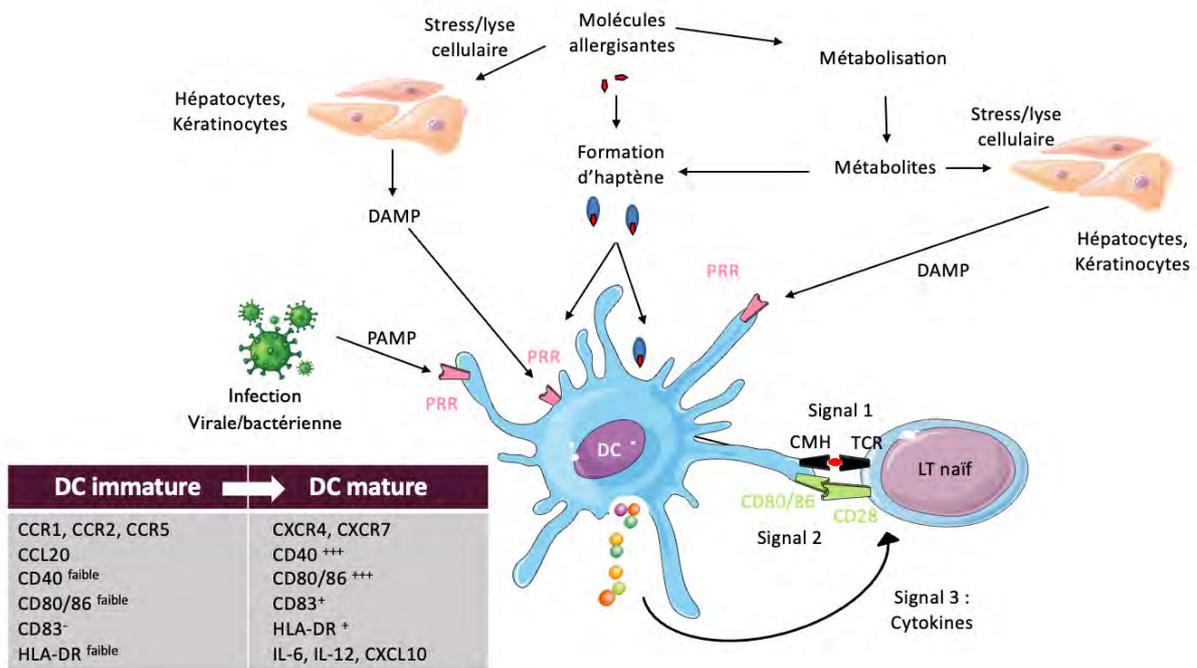
Dans la phase de sensibilisation, l'allergène est internalisé par les cellules professionnelles présentatrices d'antigène (CPA), notamment les cellules dendritiques (DC) situées au site d'exposition. Ces cellules ont un rôle essentiel au cours de cette phase de sensibilisation en permettant le relais entre l'immunité innée et l'immunité adaptative, et leur implication a déjà été mise en évidence au cours de l'allergie immédiate. (5) Leur fonction principale est la présentation des antigènes. Par un processus d'internalisation qu'est la phagocytose, elles dégradent et digèrent l'antigène puis le présente via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) aux lymphocytes T (LT) naïfs afin de les stimuler et de les orienter vers une réponse spécifique. Les DC existent sous deux états ; d'abord immatures puis matures.

Elles assurent la surveillance des tissus périphériques vis-à-vis des substances étrangères grâce à leur grande capacité d'internalisation des antigènes sous un état immature. A l'état mature, les DC acquièrent des capacités de migration vers les organes lymphoïdes secondaires où se déroulent la présentation antigénique.

Lors de la première exposition à un allergène, celui-ci peut être reconnu et internalisé par les DC via des mécanismes d'endocytose, de phagocytose ou de macropinocytose. Les DC ont besoin d'être exposées à un signal de danger, tel qu'un médiateur pro-inflammatoire ou un ligand des *Pattern Recognition Receptors* (PRR) pour atteindre un stade mature complet. Les PRR permettent la reconnaissance des composés produits par les agents infectieux, on parle alors de *pathogen-associated molecular pattern* (PAMP), ou des molécules issues de dommages cellulaires appelées *damage-associated molecular pattern* (DAMP). Une fois actives et matures, les DCs produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12, l'IL-6 et le TNF- $\alpha$ . A l'état mature elles perdent leur capacité à répondre à la chimiokine CCL20 qui leur permettait de les retenir sur le site inflammatoire et expriment alors à leur surface des récepteurs de chimiokines différents tels que CCR7 et CXCR4 leur permettant de répondre respectivement au gradient de chimiokines CCL19/21 et CXCL12 pour migrer vers la zone T des organes lymphoïdes secondaires (6)(7). Elles digèrent alors les antigènes internalisés en multiples peptides qui s'associent aux molécules du CMH II (dans le cas d'un allergène) et sont présentés à la surface de la cellule formant ainsi le complexe CMH-II-peptide, on parle alors d'apprêtement de l'antigène.

Une fois que les DC ont migré dans les organes lymphoïdes secondaires drainant le site d'exposition, il se passe deux phénomènes concomitants.

Le premier consiste au fait que les LT CD4<sup>+</sup> naïfs spécifiques présents dans l'organe lymphoïde secondaire reconnaissent par leur récepteur TCR et par la molécule CD4 le complexe CMH-II-peptide présenté à la membrane des DC, cette étape consiste en un premier signal de stimulation (signal 1). Les DC matures vont exprimer des molécules de costimulation CD80/86 et le CD40, qui interagissent respectivement avec le CD28 et le CD40L sur les LT, ce second signal est essentiel pour activer les LT (signal 2). Suite à cette coopération DC-LT, les DC secrètent des cytokines constituant un troisième signal (signal 3) permettant la prolifération et la polarisation des LT CD4<sup>+</sup> naïfs. La production de l'IL-4 est la cytokine essentielle pour orienter la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> en LT auxiliaires Th2 dans l'allergie (IgE-dépendante).



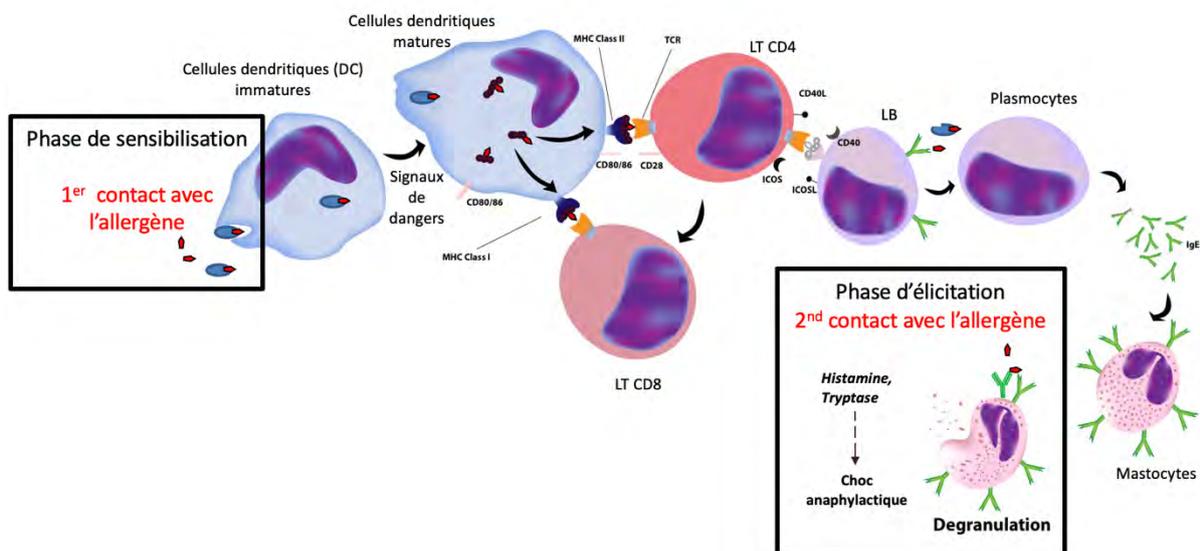
**Figure 1. Mécanismes d'activation directe ou indirecte des cellules dendritiques par les molécules allergisantes.** Les molécules allergisantes peuvent avoir un effet sur les cellules, tel qu'un stress, entraînant la libération de DAMP qui agissent comme des seconds messagers pouvant conduire à l'activation des DC d'une manière indirecte. Le tableau en bas à gauche résume les modifications phénotypiques de la DC immature à mature leur permettant d'activer les LT. DAMP : *damage-associated molecular pattern*, PAMP : *pathogen-associated molecular pattern*, PRR : *pattern recognition receptor*, LT : Lymphocyte T, DC : cellule dendritique. (2)

Le second consiste au fait que l'allergène peut être directement reconnu par les lymphocytes B (LB), cellules qui sont aussi douées de phagocytose. Elles reconnaissent l'allergène spécifiquement via leur récepteur des cellules B (BCR) puis il est apprêté et présenté par le CMH-II aux lymphocytes Th2 spécifiques activés. S'ensuit alors une coopération LT-LB, consolidée par l'interaction entre le CD40L des LT et le CD40 des LB et par la sécrétion d'interleukines : IL-4, IL-5 et IL-13 par les lymphocytes Th2 (2). Cela permet aux LB de se différencier en plasmocytes, c'est-à-dire en cellules sécrétrices d'IgE spécifiques de l'allergène. Les IgE sécrétées se fixent sur les récepteurs de haute affinité (FcεRI) via leur fragment Fc présents à la surface des mastocytes tissulaires et des basophiles sanguins. Une fois fixées, les IgE ont une durée de vie plus longue de plusieurs mois voire plusieurs années à la surface des cellules. Tandis que sous forme libre dans le sang circulant, leur demi-vie est de quelques jours,

cela explique en partie le fait que leur concentration sérique soit faible comparée à celle des autres immunoglobulines (100 000 fois moins que les IgG). (8)

La phase effectrice est déclenchée s'il y a un nouveau contact ou une nouvelle introduction de l'allergène.

Cette phase se divise en deux parties : la phase immédiate et la phase tardive. Les épitopes de l'allergène seront reconnus par les parties variables des IgE directement liés aux mastocytes et/ou basophiles. L'allergène doit être reconnu par au moins deux IgE spécifiques et de sorte à ce qu'il puisse ensuite former des ponts entre plusieurs IgE permettant ainsi l'agrégation des FcεRI. Une cascade de signalisation intracellulaire se déclenche alors aboutissant en quelques minutes à la libération des médiateurs préformés intracellulaires, comme l'histamine ainsi que des protéases neutres, dont la tryptase, et divers facteurs chimiotactiques. Suivant les territoires touchés l'action de l'histamine ne sera pas la même. Elle peut entraîner une relaxation des cellules musculaires lisses associée à une augmentation de la perméabilité vasculaire ou alors elle induit une contraction des muscles lisses responsable alors de la bronchoconstriction et des signes digestifs. De nombreux médiateurs sont aussi impliqués dans la genèse des manifestations allergiques, telle que la cascade du complément, la coagulation et le système kallikréine-kinine participant à la vasodilatation et à l'augmentation de la perméabilité vasculaire. (9) D'autres médiateurs tels que les prostaglandines D2 produites par les mastocytes et la production de leucotriènes (LTC4, LTD4, LTE4) ont pour effet d'entretenir l'inflammation et de prolonger dans le temps la symptomatologie.



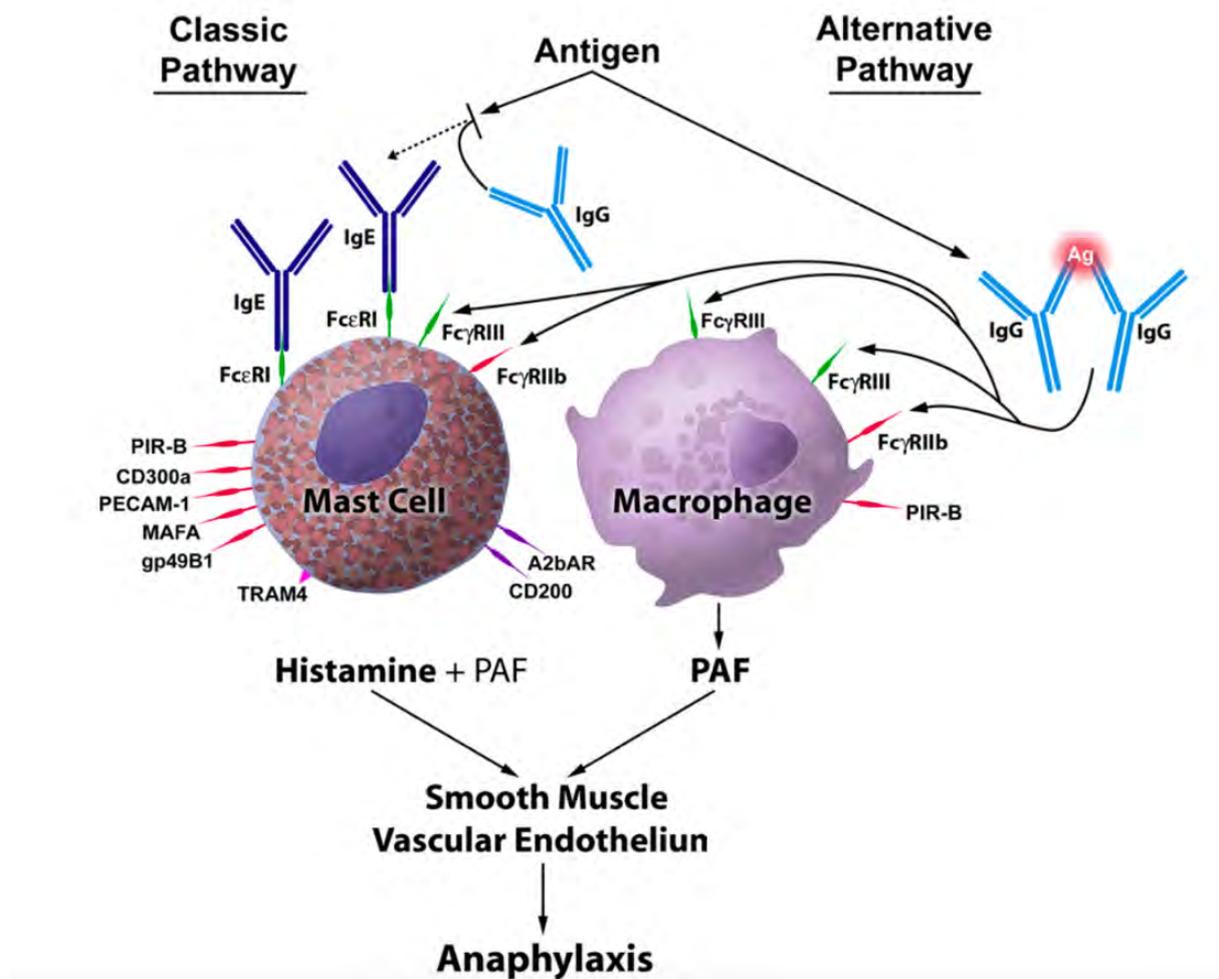
**Figure 2 : Mécanisme générale de l'hypersensibilité de type I.** La première phase à lieu lors

de la première rencontre avec l'allergène : elle aboutit à la production d'IgE spécifiques de cet allergène. Ces immunoglobulines se fixent alors sur les récepteurs FcεRI présents à la surface des mastocytes ou des basophiles. Lors de la deuxième phase, au second contact, l'allergène est directement reconnu par les IgE, il y a alors pontage de deux IgE, entraînant la dégranulation libérant l'histamine par exemple.

### 1.2.3. Hypersensibilité immunologique non IgE

Comme évoqué précédemment, des voies indépendantes des IgE peuvent aussi être à l'origine des réactions anaphylactiques. Il a notamment été démontré dans des modèles murins d'anaphylaxie que les IgG et le facteur d'activation plaquettaire (PAF) peuvent jouer un rôle majeur (10). Chez des souris dépourvues de mastocytes, de récepteurs aux IgE (FcεRI) ou d'IgE, il a été mis en évidence l'existence d'une autre voie dite « alternative » qui ne dépend pas des IgE. Ces études ont montré que le récepteur FcεRIa est nécessaire pour la voie classique. Les récepteurs aux IgG (FcγRII et III) présents à la surface des neutrophiles ou des macrophages en revanche eux sont nécessaires pour activer la voie alternative. (11)(12)(13) Le PAF serait un médiateur essentiel dans cette voie alternative, notamment pour l'induction de la bronchoconstriction, de la vasoconstriction coronarienne, de l'agrégation plaquettaire, du recrutement et de l'activation des polynucléaires neutrophiles. (14) Grâce à un modèle de souris humanisées il a été mis en évidence que le rôle des plaquettes était indispensable pour ce type d'anaphylaxie IgG-médiée. Ce mécanisme « alternatif » (dépendant des IgG et des neutrophiles) pourrait en partie expliquer les anaphylaxies indépendantes des IgE. Il est aussi envisagé qu'il contribue à la gravité des chocs anaphylactiques induits par le mécanisme dit « classique ». (15)(16) Le complément peut aussi intervenir en présence d'IgG qui vont former des complexes immuns, mais aussi en l'absence d'IgG, comme cela peut être le cas lors d'administration de sulfate de protamine utilisé comme antidote chez les patients en surdosage d'héparine. La voie du complément peut être activée par les médicaments solubilisés dans des liposomes thérapeutiques ou par des excipients à base de lipides qui peuvent former de grosses micelles avec les lipides sériques et le cholestérol. Cela entraîne alors la libération de C3a, C5a et C5b-9, qui déclenchent à leur tour l'activation des mastocytes et des basophiles via leurs récepteurs spécifiques, entraînant une dégranulation et une libération de médiateurs. (10)(17)(16)

Les différents mécanismes des voies IgE médiées (dites « classiques ») et non IgE médiée (dites « alternatives ») sont représentés dans la figure 3 ci-dessous.



**Figure 3 : Les différentes voies immunologiques pouvant conduire à une anaphylaxie (10).** La voie classique réticule les IgE liées au FcεRI des mastocytes permettant la libération d'histamine et de PAF. Pour la voie alternative, des complexes avec l'IgG réticulent les FcγRIII des macrophages (ou des neutrophiles via FcγRIIa), stimulant la libération de PAF. Le PAF et l'histamine provoquent les symptômes de l'anaphylaxie principalement en induisant une contraction des muscles lisses et une augmentation de la perméabilité vasculaire. Les stimuli qui induisent l'activation des mastocytes et des macrophages sont médiés par des récepteurs (indiqués en vert sur le schéma), et les récepteurs indiqués en rouge, eux peuvent supprimer l'activation des mastocytes et des macrophages.

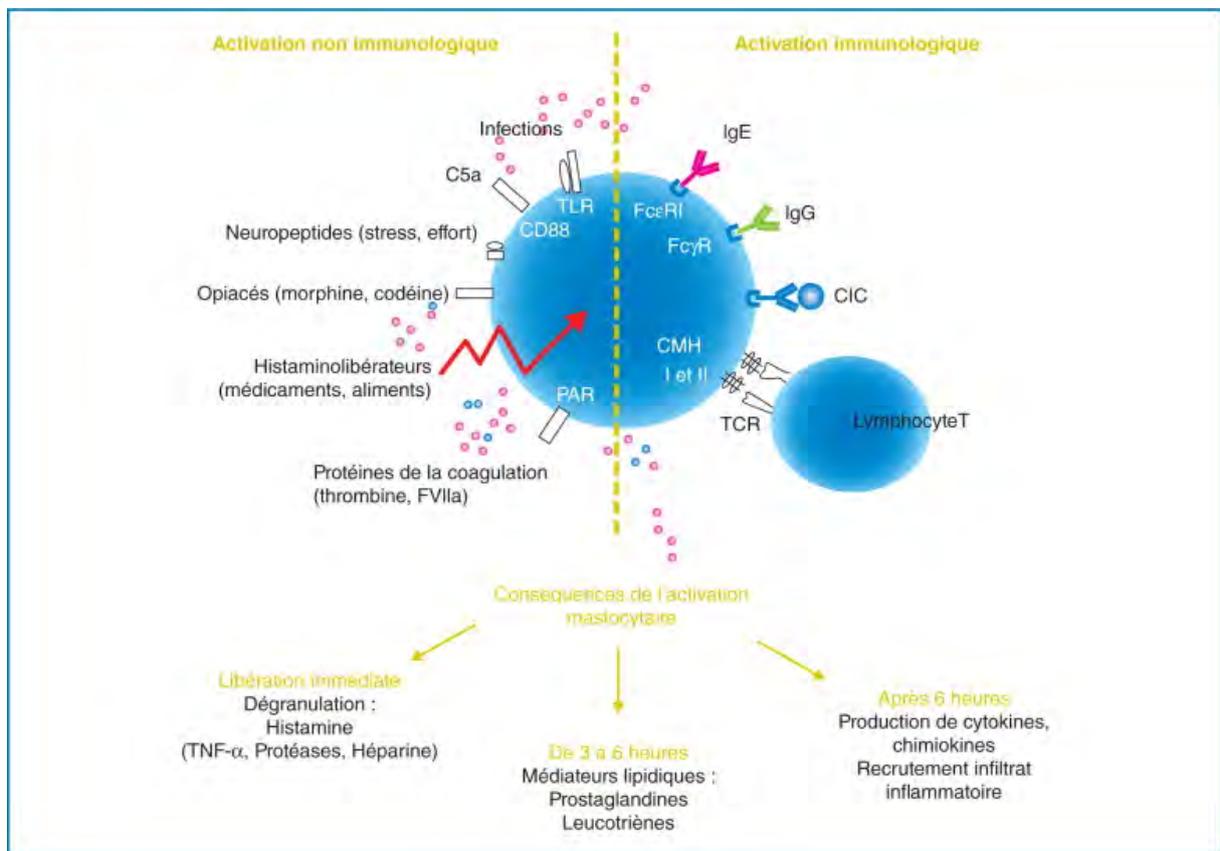
#### 1.2.4. Hypersensibilité non immunologique.

Des mécanismes non immunologiques peuvent également provoquer une symptomatologie similaire aux réactions IgE-dépendantes. Ils correspondent à une réponse anormalement excessive vis-à-vis d'une substance étrangère amenant à la dégranulation des mastocytes mais dont le mécanisme n'est pas déclenché par la reconnaissance de l'allergène par les cellules du système immunitaire. Ces mécanismes correspondent principalement à un des effets pharmacologiques du médicament incriminé. C'est le cas par exemple, des réactions anaphylactiques provoquées par la libération de leucotriènes secondaire à l'inhibition de la cyclooxygénase par les AINS et l'aspirine. Elles comprennent aussi des facteurs physiques (par exemple l'exercice ou le froid) et des agents iatrogènes (y compris les milieux de radio-contraste et les dérivés opioïdes) qui peuvent stimuler la dégranulation directe des mastocytes. (18)(19)

Il a également été montré sur un modèle murin que certains bloqueurs neuromusculaires pouvaient activer la dégranulation des mastocytes par l'activation d'un récepteur membranaire : le MrgprB2, l'orthologue du récepteur couplé à la protéine G (GPCR) humain, le Mas-related G-protein-coupled receptor member X2 soit le MrgprX2. Lorsque les souris n'expriment pas le récepteur MrgprB2 cela entraîne une diminution de la libération d'histamine, de l'inflammation et de la contraction des voies respiratoires, mettant ainsi en évidence un rôle potentiel du MrgprX2 dans l'allergie. Il est donc légitime de se demander si certains facteurs prédisposent les individus à ce type d'anaphylaxie, cela nécessiterait davantage de recherche. (20) (21)

Il existe aussi des troubles mastocytaires primaires où les mastocytes peuvent libérer leurs granules riches en histamine et tryptase à la fois indépendamment et en réponse à des allergènes tels que les aliments et les médicaments entraînant des manifestations cliniques non spécifiques. Ces signes cliniques peuvent se manifester par exemple par une hypotension, une congestion nasale, un prurit, des maux de tête, une diarrhée, une urticaire ou encore un gonflement de la gorge mais ce sont les grandes quantités dans le sérum de tryptase qui vont permettre de diagnostiquer un trouble mastocytaire. (22). Plus de 90 % des patients atteints de mastocytose présentent une mutation somatique à gain de fonction dans la tyrosine kinase du récepteur KIT, récepteur aux facteurs de croissance, qui entraîne une augmentation de la survie et de la prolifération cellulaire des mastocytes néoplasiques. Dans des conditions physiologiques normales, les mastocytes sont fortement régulés par la disponibilité du ligand de KIT. Dans des conditions pathologiques, la prolifération incontrôlée et la survie accrue des mastocytes peuvent contribuer à la pathogenèse de la maladie (23).

Les différents mécanismes, immunologiques et non immunologiques, à l'origine de la dégranulation des mastocytes sont présentés dans la figure 4.



**Figure 4 : Les différents mécanismes pouvant entraîner la dégranulation des mastocytes(24).** CIC : complexe immunitaire circulant

### 1.2.5. Hypersensibilité idiopathique.

On diagnostique une anaphylaxie idiopathique lorsque les tests cutanés aux allergènes sont négatifs, que les quantités d'IgE mesurées sont négatives ou indétectables pour des allergènes courants et qu'un historique précis des expositions et des événements antérieurs ne donne aucun indice sur les déclencheurs potentiels. Il est à envisager toutefois, la possibilité d'un déclencheur non reconnu auparavant. La sensibilisation à un nouveau déclencheur peut être identifiée par l'historique de l'événement et ensuite confirmée par des tests objectifs. Ceux-ci peuvent inclure des tests cutanés du patient et de témoins avec des extraits l'allergène suspecté ou le développement d'ELISA personnalisés et d'autres tests *in vitro*, y compris l'électrophorèse sur

gel et l'immunoblotting d'IgE, pour l'identification d'IgE spécifiques à l'allergène suspecté. (25)  
(26)

### **1.3. Diagnostic de l'anaphylaxie**

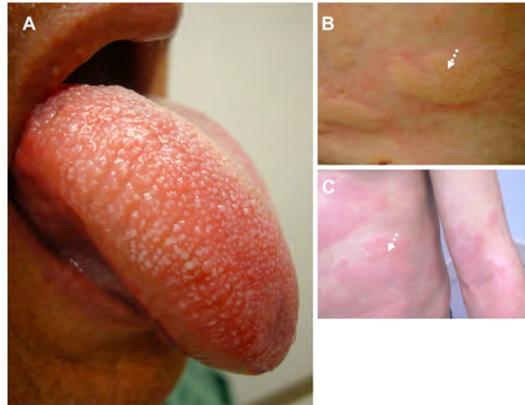
#### **1.3.1. Symptômes et signes cliniques de l'anaphylaxie**

Les réactions anaphylactiques, même en étant rares, constituent un problème de santé publique car elles sont imprévisibles et leur évolution, souvent rapide, est peut-être fatale.

Les manifestations de l'anaphylaxie sont variables et non spécifiques, de ce fait, différents organes peuvent être ciblés par les médiateurs libérés au moment de la réaction (27)(4). La gravité et la symptomatologie varient d'un individu à l'autre et peut inclure de façon aspécifique des symptômes cutanés, respiratoires, gastro-intestinaux, neurologiques et vasculaires. (28)(25)  
Le diagnostic de l'anaphylaxie est basé uniquement sur des manifestations cliniques ce qui nécessite une reconnaissance rapide. Actuellement, il n'existe pas de biomarqueurs permettant de prédire l'anaphylaxie sévère, bien qu'il ait été suggéré l'utilisation du test d'activation des basophiles (BAT) (29). Cependant, cette découverte n'a pas été validée et, à ce jour, le test d'activation des basophiles est limité par la nécessité de disposer de sang frais. De plus, 10 à 15 % des patients ont des résultats ininterprétables en raison de basophiles qui ne réagissent pas aux stimuli induits par les IgE. (29) (30)

Des caractéristiques ont été établies afin de repérer les premiers signes d'une anaphylaxie dont le premier critère repose sur l'apparition très rapide de symptômes cutanés comme la formation d'une urticaire se traduisant par un prurit et un rash cutané ou muqueux (formation de plaques rouges), ou de l'apparition d'un angioedème (figure 5), avec une difficulté de ventilation ou des signes d'hypotension artérielle voire une absence de pouls (28) (25) (31). Le plus fréquemment (94%) on retrouve des signes cutanéomuqueux touchant le cou, la face, le thorax et se généralisant. Les signes respiratoires sont présents dans 40% des cas. Ils sont dus à une infiltration œdémateuse de la muqueuse, à cela s'ajoute une bronchoconstriction du muscle lisse pouvant toucher différents niveaux du tractus respiratoire. Une atteinte des voies aériennes se manifeste par un œdème de la langue, une rhinorrhée, une obstruction nasale, une toux sèche puis une dyspnée qui peut évoluer en bronchospasme. Il existe aussi des signes cardiaques se manifestant initialement par une hypotension associée à une tachycardie, évoluant ensuite rapidement vers une arythmie sévère et un collapsus cardio-vasculaire en l'absence de prise en

charge adaptée (32). Il est possible de voir apparaître une bradycardie en cas d'hypovolémie extrême. Lorsqu'un traitement adapté est rapidement mis en place, administration d'adrénaline dans les cas les plus graves ou d'anti-histaminiques dans les cas peu sévères, l'évolution est le plus souvent favorable en une dizaine de minutes (32). Comme nous venons de le décrire précédemment, les réactions anaphylactiques sont des événements graves pouvant conduire jusqu'au décès du patient.



**Figure 5 : Exemple de manifestations cliniques de l'anaphylaxie.** (A) Angioedème de la langue et de l'oropharynx. (B) Lésions urticariennes discrètes chez un patient présentant une réaction allergique aiguë. (C) Urticaire coalescente et érythème diffus chez un patient présentant une réaction allergique systémique sévère.

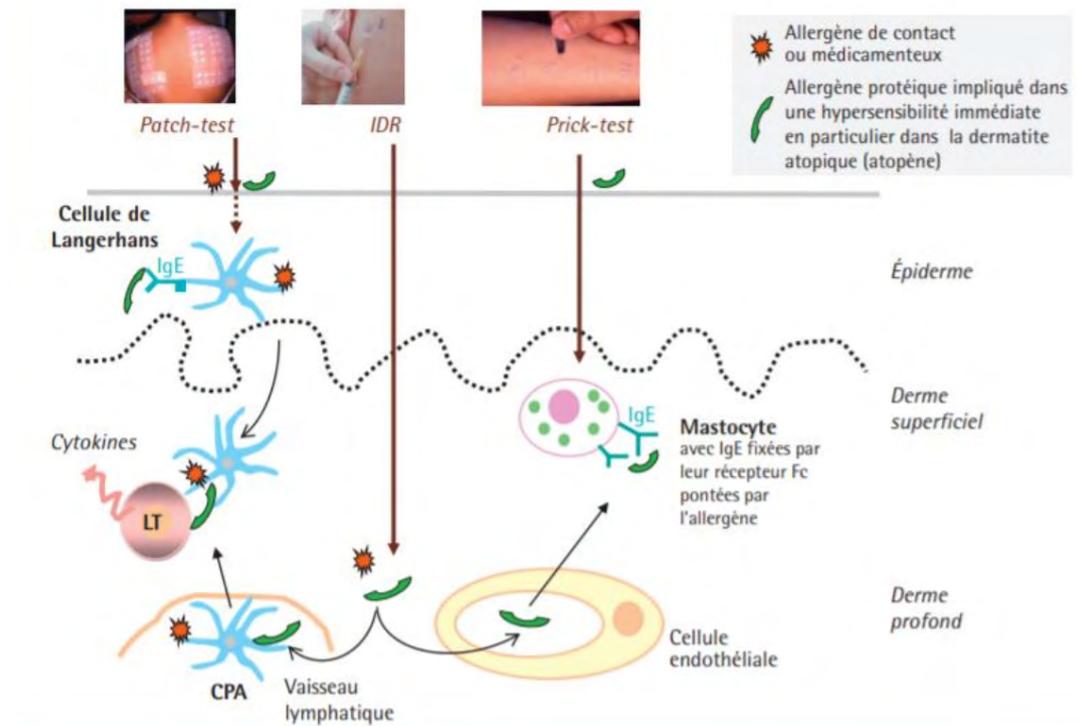
### 1.3.2. Tests de détection des allergies :

Il est important de pouvoir identifier la cause de l'induction d'une anaphylaxie et de mettre en place un processus d'évitement de l'allergène incriminé. Chez certains patients le diagnostic clinique d'anaphylaxie aiguë peut être confirmé par un test sanguin, par exemple une augmentation du taux d'histamine plasmatique ou du taux de tryptase totale en comparaison avec les niveaux basaux obtenus après l'épisode aigu. Ces tests ne sont malheureusement pas spécifiques de l'élément déclencheur de l'anaphylaxie. Pour confirmer la présence d'un déclencheur potentiel d'un épisode anaphylactique d'autres tests décrits ci-dessous sont disponibles :

- Tests cutanés :
  - o **Prick test** : percutané. Le médecin applique sur la peau de l'avant-bras une goutte qui contient l'allergène, il pique ensuite la peau à l'aide d'une aiguille à

travers la goutte. Les cellules présentes dans l'épiderme entrent ainsi en contact avec l'allergène. Pour qu'un test cutané soit considéré comme positif, il faut que sur la peau, au contact de l'allergène il y ait la formation d'une papule (gonflement de la peau et rougeur) de 3mm de diamètre plus large que celle du contrôle négatif (solution saline, NaCl), le contrôle positif sera l'histamine. (33)  
(34)

- **IDR** : injection intra-dermique de l'allergène de façon stérile. Ce test permet une exploration des réactions IgE-médiées ou lymphocytes T-médiées. Il est souvent utilisé pour vérifier les allergies aux hyménoptères et aux médicaments. Le produit suspecté de contenir l'allergène est dilué, on réalise une injection en intradermique d'une papule d'environ 4mm sur l'avant-bras. La lecture peut se faire 20 minutes après, 72 heures après voire même 7 jours après. On considère que le test est positif si la taille de la papule est de plus de 4 mm. Un très bon exemple de ce test est le test à la tuberculine.
  
- **Patch test** : épicutané. Ce test est utilisé pour détecter les allergies de contact. Il permet de mettre en évidence une hypersensibilité à certaines substances qui entrent en contact avec la peau ou les muqueuses. Des pansements imbibés des allergènes sont appliqués sur la peau pendant 48h, si la personne est allergique la peau réagira par la formation d'eczéma, de papules érythémateuses, de vésicules ou d'ampoules. Ces tests sont effectués sur le dos et sont indolores. Ce test permet de détecter les allergènes présents dans les médicaments, les cosmétiques, les colorants, les parfums ou encore les conservateurs. Il est peu utilisé en dehors de ces indications car il génère beaucoup de faux positifs (35).

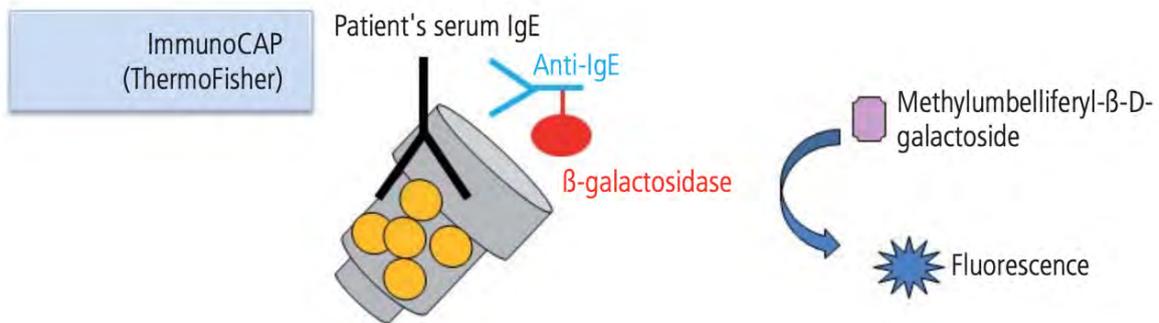


**Figure 6 : Résumé des 3 tests cutanés possibles et leur mode d'action : patch-test, IDR, prick-test.**

(Cours du Dr Bellange Laure)

- Dosage d'IgE dans le sérum : par un ELISA quantitatif ou néphélométrie ou technique ImmunoCAP (cf. infra)
  - o **IgE totales** : L'augmentation des IgE totales ( $> 150 \text{ kUI/l}$ , unité internationale par litre,  $1 \text{ UI} = 2.4 \text{ ng}$ ) n'est pas spécifique d'une réaction allergique. Il est recommandé de chercher à identifier les IgE spécifiques, cela permet aussi de détecter les éventuelles réactions croisées.
  - o **IgE spécifiques** : pour détecter la présence d'IgE spécifiques on réalise la plupart du temps un ELISA couplé à de la fluorométrie tel que le permet la technique ImmunoCAP, proposé par ThermoFisher®, qui a aujourd'hui la plus grande part du marché mondiale, même si d'autres fabricants avec des techniques différentes commencent à émerger. L'allergène (en jaune dans la figure 7) est fixé sur une mousse de cellulose greffée au fond d'un puits en plastique. On incube ensuite le sérum de patients à tester. Les anticorps spécifiques vont se fixer aux antigènes. Un lavage des puits est nécessaire pour enlever les anticorps non fixés. La première étape va permettre la liaison de l'allergène et des IgE spécifiques présentes dans le

sérum du patient. Dans la seconde étape, l'IgE spécifique est détectée par un second anticorps anti-IgE (en bleu) conjugué à l'enzyme beta-galactosidase (en rouge). Cette enzyme catalyse la transformation d'un substrat (4-methylumbelliferyl  $\beta$ -D-glucopyranoside) en un produit spécifique (4-methylumbelliférol) fluorescent. L'intensité de fluorescence dépend de la concentration du produit et est corrélée avec la quantité d'IgE liées à l'allergène. Cette corrélation est établie à partir d'une courbe standard avec un minimum de 6 points de concentration (figure 7) (36).



**Figure 7 : Technique ImmunoCAP (ThermoFisher ®) pour la détection d'IgE spécifiques dans les sérums de patients allergiques (37)**

- Tests de provocation avec l'allergène médicamenteux ou alimentaire

Il n'est pas recommandé de faire des tests de provocation en raison du risque élevé d'induire une anaphylaxie chez les patients ayant des antécédents assez éloquentes d'anaphylaxie à un aliment spécifique ou à un médicament en plus des preuves de sensibilisation. Les patients pour qui les antécédents sont ambigus et où la sensibilisation est faible ou modérée sont plus enclin à bénéficier d'un test de provocation progressif sous la surveillance d'un médecin. La dose initiale, l'augmentation de la dose et les intervalles entre les doses sont déterminés en fonction de l'expérience et des antécédents du patient. Un test positif permet de mettre en place l'évitement de l'aliment ou du médicament incriminé. Un test négatif permet d'introduire ou de réintroduire l'aliment en question dans le régime alimentaire du patient (38) (26).

- Tests d'activation cellulaires

Ces tests se font *in vitro* sur du sang de patient et ne présentent donc aucun risque de réponse allergique chez le patient. Ces tests ont une meilleure spécificité par rapport aux tests sérologiques conventionnels.

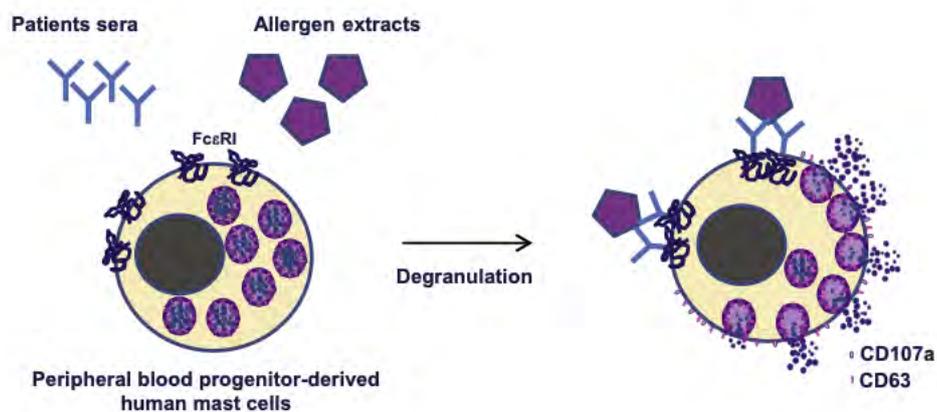
o **Des basophiles (BAT) :**

Le principe est de mesurer le niveau d'activation des basophiles au contact des allergènes suspectés en cytométrie en flux, par exemple par la technique commerciale de Flow Cast ®. La première étape du test consiste à stimuler la fraction de sang totale prélevé chez le patient avec des allergènes spécifiques ainsi que des contrôles de stimulation. L'échantillon est marqué à l'aide de deux anticorps monoclonaux fluorescents : un pour la sélection des basophiles (anti-CCR3-PE) et un pour la détermination du statut d'activation des basophiles (anti-CD63-FITC). Le récepteur de chimiokines CCR3 est exprimé de manière constitutive sur les éosinophiles et les basophiles et permet ainsi leur sélection. L'anticorps CD63 reconnaît une protéine transmembranaire présente sur les vésicules intracellulaires. On la retrouve au sein des cellules contenant des granules sécrétoires apparentées aux lysosomes comme les polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles. Cette molécule est transmembranaire, elle fait partie des composants des membranes endosomales et lysosomales, elle est présente à la surface des cellules seulement après la dégranulation des basophiles. Il a été aussi décrit que l'anticorps CD203c peut être également utilisé comme marqueur d'activation car il reconnaît un membre de la famille des ecto-nucléotides pyrophosphatase (E-NPP3) exprimé à la membrane et dans le cytoplasme de la cellule. Il est intéressant à utiliser car son expression membranaire, déjà présente à l'état basal, augmente de façon dose-dépendante à l'activation de ces cellules par les IgE. Il est aussi possible d'étudier le surnageant de culture afin de doser les molécules sécrétées par les basophiles (39).

L'inconvénient du BAT est qu'il nécessite du sang frais et le matériel adéquat à proximité. De plus, une proportion non négligeable (jusqu'à 15%) des individus ont des résultats de BAT ininterprétables causés par des basophiles non réactifs, c'est-à-dire des basophiles qui ne répondent pas aux IgE.

○ **Des mastocytes (MAT) :**

Bien que moins utilisé, le test d'activation des mastocytes suit le même principe que le BAT. Seulement, les mastocytes ne sont pas récupérés tels quels lors d'un prélèvement sanguin car il n'y a pas de mastocytes dans le sang en temps normal. (40) Les précurseurs des mastocytes, les cellules CD34+, sont isolées et purifiées à partir de cellules souches hématopoïétiques autologues périphériques prélevés chez le patient. (41) On obtient ainsi au bout de trois mois de culture cellulaire des mastocytes humains (hMC). Les hMC sont ensuite sensibilisés avec du sérum de patient, puis ils sont stimulés avec des allergènes et des anti-IgE comme contrôle positif. Les modifications du nombre de cellules positives pour CD63 et la libération d'histamine sont quantifiées simultanément par cytométrie de flux. L'augmentation de l'expression du CD63 et ainsi que du CD107a (figure 8) par rapport au contrôle négatif signe l'activation des mastocytes au contact d'allergènes spécifiques. Le surnageant est également étudié et si les taux de prostaglandines et de beta-hexosaminidase sont augmentés cela indique que les mastocytes ont dégranulé (42). Il serait une alternative aux tests évoqués précédemment notamment pour identifier les allergies aux arachides par exemple de façon précise. Les IgE spécifiques de l'arachide sont associées à des résultats faussement positifs et à un surdiagnostic. Ainsi, une proportion considérable de patients doit se soumettre à un test de provocation alimentaire par voie orale, mais ces tests comportent le risque de provoquer des réactions allergiques, y compris l'anaphylaxie. Le MAT permettrait de discriminer la sensibilisation à un aliment de l'allergie sans aucun risque pour le patient. Ce test ne requière pas de sang frais comme c'est le cas pour le BAT, il est donc possible de réaliser un test différé, cependant sa mise en place est longue cela constitue un inconvénient non négligeable (41) (42).



**Figure 8 : Test d'activation des mastocytes dans le diagnostic des maladies allergiques et de l'anaphylaxie (42)**

Il est important de noter que des tests cutanés positifs et une augmentation des taux d'IgE spécifiques indiquent une sensibilisation aux allergènes testés mais ne permettent pas de diagnostiquer une anaphylaxie, car la sensibilisation à un ou plusieurs allergènes alimentaires est courante dans la population générale des personnes en bonne santé.

## **1.4. Étiologies**

Des enquêtes épidémiologiques menées en Amérique du Nord, en Australie et au Royaume-Uni indiquent que l'incidence de l'anaphylaxie toutes causes confondues a augmenté au cours des deux dernières décennies, particulièrement les incidences de l'anaphylaxie aux aliments et aux médicaments. (43)(44)(45)

### **1.4.1. Médicamenteuse**

Un médicament constitue le plus souvent un allergène de structure trop petite pour être directement immunogène. C'est lorsqu'il va se lier à une protéine du soi que l'allergène (on parle d'haptène) va pouvoir être pris en charge par le système immunitaire. Le médicament une fois lié au peptides issu de la protéine porteuse est reconnue spécifiquement par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I ou II. Il est possible que dans certains cas une métabolisation du médicament soit nécessaire afin de rendre possible la complexation avec la protéine porteuse rendant la molécule médicamenteuse plus réactive et plus apte à créer des liaisons. On parle alors de pro-haptène puis d'haptène une fois métabolisé. Il a été décrit dans la littérature qu'ils peuvent être à l'origine d'hypersensibilité immédiate médiée par les IgE (antibiotiques, curares...) et retardée médiée par les lymphocytes T (antibiotiques, antiépileptiques...).

Une enquête transversale menée aux États-Unis a estimé que les médicaments étaient impliqués dans 35 % des cas d'anaphylaxie (46) même si tous les médicaments ne sont pas associés au même risque d'anaphylaxie grave. Les médicaments le plus fréquemment impliqués dans les anaphylaxies médicamenteuses mortelles varient également selon le pays ou la région. Un examen des certificats de décès aux États-Unis entre 1999 et 2010 a révélé que lorsqu'un médicament était identifié, les antibiotiques représentaient 40 % des cas mortels, en particulier la catégorie des beta-lactamines (47).

De plus, les anesthésiques généraux sont la cause la plus fréquente d'anaphylaxie médicamenteuse mortelle au Royaume-Uni, les agents bloquants neuromusculaires (curares) étant le principal facteur déclenchant (48). Une autre catégorie de médicaments associée à un risque plus élevé de mortalité est celle des chimiothérapies. Aux Etats-Unis, les médicaments chimiothérapeutiques se sont avérés être la troisième cause la plus fréquente d'anaphylaxie fatale d'origine médicamenteuse (47). Alors que les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), les opioïdes, les anesthésiques locaux et les inhibiteurs de la pompe à protons ont été associés à des réactions d'hypersensibilité IgE-médiées et non IgE-médiées, ils sont des causes peu fréquentes d'anaphylaxie mortelle.

#### **1.4.2. Alimentaire**

En France, sur une population de 62 millions, 3 millions de personnes (5 %) sont allergiques. Les aliments sont responsables de 4% des allergies (49). Il existe des différences géographiques dans les déclencheurs alimentaires précis, la plupart des pays signalant que l'arachide et les fruits à coque sont la cause la plus fréquente d'anaphylaxie mortelle, représentant 55 à 87 % des décès attribués à des réactions d'allergie alimentaire dans le monde (50). Plus largement parmi les aliments les plus couramment incriminés on retrouve le lait de vache ou de brebis, les œufs, le blé, le soja, les arachides, les fruits à coque, le poisson et les crustacés (51) Ces patients peuvent avoir eu des expositions antérieures inconnues par le biais du lait maternel, de la contamination d'autres aliments ou de l'utilisation de produits topiques contenant des huiles alimentaires, par exemple de l'arachide.

#### **1.4.3. Les venins**

Le venin est la deuxième cause d'anaphylaxie chez l'adulte après les médicaments. Au cours des dernières années en Amérique du Nord, il a été observé une augmentation du nombre d'hospitalisation à cause de piqûre de venin mais les taux de mortalité restent stables. De fait, l'incidence estimée de mortalité pour une anaphylaxie au venin reste faible et ajoute peu au risque global de mortalité par anaphylaxie (52).

Les piqûres des insectes hyménoptères tels que les apidés (abeilles domestiques et bourdons), les vespides (guêpes jaunes, frelons et guêpes) et les fourmis urticantes, sont la cause la plus fréquente d'anaphylaxie liée au venin. L'insecte qui sera le plus probablement en cause est lié à l'exposition, qui varie en fonction de facteurs géographiques, environnementaux et écologiques. Bien que l'on pense généralement que le venin de vespides est plus susceptible de provoquer

des réactions graves que le venin d'abeille, une étude australienne et anglaise a montré que l'abeille domestique était la cause la plus fréquente d'anaphylaxie mortelle due au venin (53).

### **1.5. Prise en charge**

L'anaphylaxie est considérée comme une urgence médicale en raison de son apparition immédiate (quelques secondes à quelques minutes) et de son évolution rapide vers un collapsus cardiovasculaire et/ou respiratoire entraînant la mort dans les minutes qui suivent.

D'après les recommandations du Vidal ®, le traitement d'urgence du choc anaphylactique est l'injection de 1 mg d'adrénaline toutes les 3 à 5 minutes jusqu'à rétablissement de l'état hémodynamique c'est-à-dire jusqu'à recirculation du sang de façon normale.

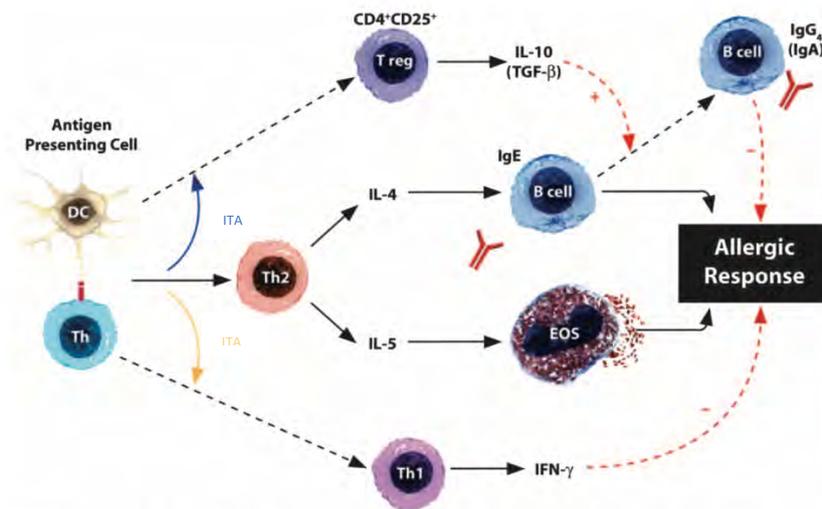
Il existe de nombreuses raisons pour lesquelles l'utilisation de l'adrénaline est retardée, notamment le manque de connaissances (diagnostic manqué, technique inadéquate, etc.) et le manque d'accès ou même le manque d'utilisation malgré la disponibilité. En outre, les patients présentant des symptômes respiratoires primaires lors d'une anaphylaxie peuvent confondre celle-ci avec de l'asthme, ce qui peut jouer un rôle important dans le retardement de l'utilisation de l'adrénaline. L'adrénaline est le médicament de premier choix pour le traitement d'une anaphylaxie, l'injection doit être rapide comme le recommandent toutes les lignes directrices sur l'anaphylaxie. La plupart des directives recommandent l'administration à l'aide d'un auto-injecteur par voie intramusculaire dans la partie médio-latérale de la cuisse. La dose d'adrénaline pour les premiers secours est de 0,01 mg/kg. L'adrénaline est connue pour ses effets vasoconstricteurs  $\alpha$ 1-adrénergiques puissants sur les petites artérioles et les sphincters précapillaires dans la plupart des viscères, elle réduit l'œdème des muqueuses, prévenant l'obstruction des voies aériennes supérieures. Elle prévient également l'hypotension, ses effets  $\beta$ 1-adrénergiques entraînent une augmentation de la force et du rythme des contractions cardiaques, et ses effets  $\beta$ 2 entraînent une bronchodilatation accrue et une diminution de la libération de médiateurs, tels que l'histamine et la tryptase, par les mastocytes et les basophiles.

En cas de détresse respiratoire, le patient doit être placé dans une position de confort et les vêtements trop serrés doivent être retirés ou desserrés. Un bronchodilatateur agoniste  $\beta$ 2 à courte durée d'action (salbutamol) doit être administré. (25) (31) (54) (3)

Les antihistaminiques (antagonistes) H1 sont des thérapies adjuvantes recommandés pour l'anaphylaxie particulièrement en soutien des effets de l'adrénaline et non en substitut. Ils ne préviennent ni ne soulagent l'obstruction des voies aériennes supérieures ou inférieures, l'hypotension ou le choc comme le fait l'adrénaline, ils vont surtout être efficace sur les signes cutanés comme le prurit ou l'urticaire. Les corticostéroïdes ont également un début d'action lent (4 à 6 heures) et par conséquent, comme les antihistaminiques, ils ne sont pas efficaces dans la gestion aiguë de l'anaphylaxie. Leur utilisation est toutefois critiquée car ils ne montrent pas d'efficacité réelle sur l'amélioration de l'anaphylaxie (25)(31)(55)(55).

L'adrénaline est le traitement de la crise, mis en place en urgence, il existe toutefois une solution qui pourra jouer sur le long terme.

Pour la prise en charge des chocs anaphylactiques en réponse aux venins d'insectes, l'académie européenne d'allergologie et d'immunologie clinique (EAACI) est en train d'élaborer les lignes directrices sur l'immunothérapie allergénique (ITA). En dehors des traitements classiques évoqués en amont, le seul traitement qui peut potentiellement prévenir d'autres réactions systémiques aux piqûres est l'ITA par venin. L'ITA est la pratique d'administrer des quantités progressivement croissantes d'un extrait d'allergène à un sujet allergique pour améliorer les symptômes associés à l'allergie secondaire (56). Il en résulte des avantages cliniques à long terme et une amélioration de la qualité de vie. Cependant, malgré ces avantages potentiels, l'ITA n'est pas encore couramment utilisée par les médecins dans tous les pays européens. Cela montre l'incertitude face aux avantages cliniques et aux risques associés à l'utilisation de l'ITA. Un des mécanismes de l'immunothérapie consiste en une augmentation des IgG4 spécifiques de l'allergène qui vont bloquer la libération d'histamine IgE dépendante par les basophiles mais aussi la présentation de l'antigène aux cellules T spécifiques. L'ITA agit sur les cellules T pour modifier les réponses TH2 périphériques et muqueuses à l'allergène en faveur d'une réponse TH1 connue pour antagoniser la réponse TH2. Des études récentes ont identifié une augmentation de la production d'IL-10 dans le sang périphérique et les muqueuses après une ITA. Cette cytokine a de nombreuses propriétés antiallergiques potentielles car elle active directement les cellules T régulatrices (Treg) et participe notamment la suppression des réponses des mastocytes, des éosinophiles et des lymphocytes T effecteurs, elle agit aussi sur les lymphocytes B pour favoriser le changement de classe de la chaîne lourde en IgG4 bloquant contre les allergènes de venin (57)(58)(59).



**Figure 9 : Résumé des effets de l'immunothérapie (ITA) sur les réponses des cellules T.** L'ITA rétablit l'équilibre entre les réponses TH2/TH1 en faveur d'une réponse TH1. On observe également une augmentation des cellules T productrices d'IL-10, et des cellules T régulatrices (Treg) (58)

Pour l'anaphylaxie induite par certains déclencheurs non immunitaires, tels que le froid, la chaleur, la lumière du soleil (rayons UV) ou l'éthanol, l'évitement du déclencheur est la conduite à adopter pour la prévention des récurrences (25). De façon générale, l'évitement du déclencheur spécifique confirmé reste la clé de la prévention de la récurrence de l'anaphylaxie.

Enfin, il est important d'adopter une approche personnalisée envers chaque patient et son allergie. De plus, il est important que les allergologues et tous autres professionnels de santé, notamment le pharmacien, qui gèrent l'anaphylaxie mettent en place une éducation thérapeutique individualisée.

### 1.6. Facteurs de risques et comorbidités

Il a été très souvent décrit dans la littérature que le degré de sévérité de l'anaphylaxie dépendait de la présence des facteurs de risques associés.

En premier lieu, l'âge est à prendre en compte. Les garçons de moins de 15 ans ainsi que les jeunes femmes de plus de 15 ans sont sujet à développer une réaction forte. Cependant, les jeunes enfants souffrant d'allergies alimentaires, en particulier à l'œuf, au blé ou au soja,

présentent non seulement un faible risque d'anaphylaxie grave (surtout lorsque des stratégies d'évitement sont appliquées), mais ils ont également de fortes chances de développer naturellement une tolérance à ces aliments en vieillissant (60). L'anaphylaxie liée à l'alimentation est assez rare chez les nourrissons et les jeunes enfants, même si ce groupe représente la plus grande proportion d'allergies et d'hospitalisations liées à l'anaphylaxie d'origine alimentaire. Au contraire, les personnes âgées sont de façon générale plus vulnérables et présentent pour la plupart des comorbidités, elles seront donc plus facilement sujet à une anaphylaxie sévère voire mortelle (28) (45). Les antécédents d'allergies comme l'asthme sévère (non contrôlé), les maladies cardiovasculaires ou les allergies aux latex, venins, aliments sont des facteurs aggravant et favorisent un terrain pour l'anaphylaxie. Il faut aussi prendre en compte la présence de polypathologies (cardiomyopathie dilatée ischémique, maladie coronarienne etc...) (28)(31).

Il faut aussi tenir compte du contexte médicamenteux du patient, certaines prises en charge thérapeutiques peuvent augmenter la sévérité de la réponse allergique et le risque d'anaphylaxie grave, comme les bêta-bloquants, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, les antidépresseurs ou encore les antiparkinsoniens tels que les inhibiteurs de mono-amine oxydase (IMAO) car ces médicaments peuvent interférer avec la capacité de l'adrénaline à exercer ses effets sur les récepteurs adrénergiques (61).

La possibilité que de futurs épisodes d'anaphylaxie entraînent des symptômes mettant en danger la vie du patient peut avoir un impact négatif sur la qualité de vie et conduire à une anxiété extrême chez certains patients (28)(31)(62).

## 2. Anaphylaxie peropératoire

L'anaphylaxie reste l'une des causes potentielles de décès peropératoire. Étant généralement imprévue, elle évolue rapidement vers une situation mettant en danger la vie du patient.

### **2.1. Réactions anaphylactiques peropératoires : l'anaphylaxie aux curares**

L'anaphylaxie péropératoire est de plus en plus fréquente, probablement en raison d'une augmentation de l'utilisation de l'anesthésie et de la complexité croissante des médicaments utilisés. En 2011, des études menées en France, Australie, Nouvelle-Zélande, Royaume-Uni,

Espagne et Norvège, ont montré que les chocs anaphylactiques peropératoires pouvaient entraîner un taux de mortalité de 3% à 9% (63).

Les curares sont une cause majeure de réaction allergique après les antibiotiques. D'après les études menées par le Groupe d'Étude des Réactions Anaphylactiques Peranesthésiques (GERAP) depuis les années 1980, l'incidence des réactions allergiques peranesthésiques toutes substances confondues est estimée à 1 pour 10 000 procédures. Ces réactions sont à 70% IgE-médiées (64)(27)(65). De plus, dans près de 60 % des cas observés, un curare a été considéré comme responsable du choc anaphylactique (66)(21). Cependant, dans environ 30% des cas, ces réactions apparaissent sans exposition antérieure à un curare mettant en avant que les patients se sont sensibilisés antérieurement par exposition à des molécules possédant des structures chimiques communes avec les curares. En effet, dès 1983, les travaux de Baldo et Fisher ont mis en évidence pour la première fois une réactivité croisée des IgE spécifiques de l'alcuronium envers cinq autres curares myorelaxants. Le point commun principal au niveau des structures chimiques de ces molécules de curares est la présence du groupe ammonium quaternaire (AQ) (67). A partir de cette observation, ils ont fait des tests d'inhibition de la liaison IgE-alcuronium par plusieurs molécules composées d'un ou des ions AQ. Ils ont testé l'acétylcholine, divers sels d'alkyltriméthylammonium ou encore la morphine et ils ont mis en évidence que ces composés étaient tous capables d'être reconnus par les IgE anti-alcuronium présent dans les sérums de patients ayant fait un choc anaphylactique. Ceci a permis de montrer que le pouvoir allergisant des curares est lié en partie à leurs deux groupements ammoniums tertiaires ou quaternaires.

Ces observations permettent d'émettre une autre hypothèse : des composés de structures similaires aux curares, ayant donc une amine tertiaire ou un AQ, induiraient une sensibilisation. Lorsque la molécule déclenchante (comme les curares) possède deux AQ formants des motifs antigéniques reconnus spécifiquement par les IgE, cela faciliterait un rapprochement et une agrégation de deux IgE et entraînerait donc la dégranulation des mastocytes et des basophiles.

Dans la partie suivante nous allons parler de travaux récents qui ont mis en évidence que la pholcodine, dérivé opioïde, analogue de la morphine, pourrait agir comme agent sensibilisateur en Norvège où, contrairement à la Suède, les réactions anaphylactiques aux curares ne sont pas rares et où le médicament est en vente libre (68).

## **2.2. Origine de l'anaphylaxie aux curares : la pholcodine comme agent sensibilisant**

### **2.2.1. Pholcodine et anaphylaxie : études épidémiologiques**

Des études épidémiologiques ont montré une corrélation entre la consommation de pholcodine en vente libre, qui contient deux amines tertiaires (encadrés en verts dans la figure 10) et l'incidence de l'anaphylaxie aux curares.

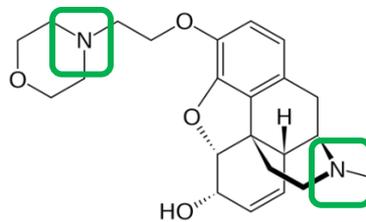
Parmi les études épidémiologiques évoquées précédemment sur les curares, l'équipe de Florvaag et Johansson a mis en évidence que la Norvège comptait six fois plus de réactions anaphylactiques aux curares que la Suède. De façon étonnante, 0,4 % des donneurs sains et 3,7 % des patients norvégiens avec un terrain allergique avaient des IgE contre le suxaméthonium alors qu'aucun sérum des patients suédois n'en avait. Parmi les patients norvégiens qui avaient développé une réaction anaphylactique peranesthésique 39 % avaient des IgE anti-suxaméthonium (66). Pour comprendre et expliquer ces différences observées entre la Norvège et la Suède, des tests d'inhibition des IgE anti-suxaméthonium de quatre-vingt-quatre produits chimiques de l'environnement domestique des Norvégiens et des Suédois ont été réalisés. Il a alors été mis en évidence une seule différence significative pour la pholcodine. Ceci s'explique par le fait que la Suède avait retiré les spécialités pharmaceutiques à base de pholcodine depuis 1989 alors qu'en Norvège elles étaient en vente libre durant l'étude de 2002. Il a été observé une diminution du nombre de réactions anaphylactiques aux curares six ans après ce retrait (69).

De plus, il a été montré que l'administration de pholcodine à des patients allergiques à un curare peut induire une augmentation significative, c'est-à-dire de 60 à 105 fois, des taux d'IgE totales, avec une augmentation significative des IgE reconnaissant le groupe AQ (30 à 80 fois) (66). Une fois sensibilisée, la réexposition à la pholcodine multipliera par 100 environ les niveaux d'anticorps IgE spécifiques. (70)

La pholcodine et les curares partagent l'épitope allergénique de la présence d'ammoniums quaternaires ce qui encourage à penser qu'il existerait une réaction croisée. Cependant, il n'existe aucune preuve moléculaire de ce mécanisme et la seule implication de la pholcodine est insuffisante pour expliquer les différences d'incidence de l'allergie aux curares. Le présent

projet vise donc à documenter *in vitro* l'implication de la pholcodine dans la phase de sensibilisation de l'anaphylaxie aux curares.

## 2.2.2 Structure chimique – pharmacocinétique - pharmacodynamie



**Figure 10 : Représentation de la structure chimique de la pholcodine (3-morpholinoéthylmorphine)**

La pholcodine (figure 10) a un groupement alkyl ether en position 3 en plus du noyau morphinique. On comprend donc que de par sa structure que c'est un dérivé opioïde. Elle ne possède pas des propriétés analgésiques comme la morphine et la codéine mais principalement une activité antitussive. D'après le Vidal ®, on la retrouve dans des sirops pour calmer les toux non productives à des concentrations inférieures à 1,3 mg/ml (BIOCALYPTOL ®). En ce qui concerne ses propriétés pharmacocinétiques, elle possède une absorption de 88% à 100% pour 20 mg à 30 mg ingéré, un  $T_{max} = 1,6 \pm 1,2h$ , une  $C_{max} = 26,3 \pm 6 \text{ ng/ml}$  et une dose cumulée croissante de 65,9 pM. Elle se lie entre 10% et 23% aux protéines plasmatiques par voie orale (71)(72). Elle n'est pas métabolisée en morphine comme l'est la codéine, une propriété qui peut contribuer de manière significative à son absence d'activité analgésique et expliquer qu'elle n'induit pas de dépendance chez l'homme, même lorsqu'elle est administrée à des doses très élevées. Elle est éliminée à 30% à 50% sous forme inchangée dans les urines et en partie par voie pulmonaire (71). Sa demi vie est de 37 à 50 heures et sa clairance rénale = 137ml/min.

Le mode d'action de la pholcodine est très mal connu. Il a toutefois été étudié dans les années 1950 et il a été démontré que son efficacité antitussive varie selon l'étiologie de la maladie sous-jacente. Ainsi, la toux provenant d'une bronchite induite par le tabagisme semblait réfractaire au traitement par la pholcodine alors qu'une toux issue de bronchites d'autres causes répondait bien au médicament, c'est pour cela qu'à l'heure actuelle la pholcodine est indiquée pour les toux sèches. Ces données sont à traiter avec prudence car les populations de patients étaient hétérogènes et les normes d'études pré-cliniques et cliniques très différentes d'aujourd'hui (71).

Connaissant désormais sa structure et son appartenance à la famille des opioïdes, il est possible de deviner ses interactions, effets indésirables et les contres indications associées. La polymédication de substances ayant un effet dépresseur du système nerveux centrale contribue à la diminution de la vigilance. D'après le Vidal ®, de façon générale l'utilisation concomitante de plusieurs opioïdes avec des médicaments sédatifs comme les benzodiazépines ou médicaments apparentés augmente le risque de sédation, de dépression respiratoire, de coma et de mort en raison du cumul des effets dépresseurs du système nerveux central (73).

### 3. Modèle d'études du potentiel sensibilisant des produits chimiques

Des tests *in vitro* ont été mis au point afin de caractériser le potentiel sensibilisant des molécules et produits chimiques tels que le DPRA, h-CLAT et MoDC. Nous avons utilisé le modèle cellulaire dendritiques différenciées à partir de monocytes de donneurs sains (MoDC).

#### 3.1. Test DPRA (direct peptide reactivity assay)

Le Direct Peptide Reactive Assay est un test *in chemico* réalisé dans le but de mesurer la réactivité des substances chimiques potentiellement allergisantes d'après l'ECVAM (74). Il est considéré que lorsqu'un produit chimique est capable de réagir avec les protéines de l'épiderme, il a le potentiel d'agir comme un sensibilisateur. La réactivité est mesurée par le pourcentage de déplétion des heptapeptides synthétiques contenant de la cystéine ou de la lysine au fil du temps après une incubation d'environ 24 heures avec la molécule testée. Ce pourcentage de déplétion est mesuré par détection HPLC-UV. L'interprétation des résultats se fait en comparaison d'un modèle de classification établis sur la base de substances chimiques avec des propriétés de réactivité connues, dans laquelle les produits sont classés en ayant une réactivité minimale, faible, moyenne ou haute. On classe les substances comme ayant un potentiel sensibilisant lorsqu'elles ont une réactivité faible à forte. En revanche, ce test ne permet pas d'évaluer des pro et pré-haptènes puisqu'ils requièrent une activation au préalable par métabolisation avant leur interaction avec les protéines de soi.

### 3.2. Le test h-CLAT

Ce test a été développé par Kao corporation et Shiseido (Japon), répertorié par l'OCDE (442E) et a été validé par l'ECVAM en 2015. Ce test est *in vitro*, il permet de discriminer les molécules sensibilisantes de celles qui ne le sont pas : ceci en mesurant l'activation des DC en réponse à une substance chimique. Pour jouer le rôle de substitue de DC, la lignée THP-1 est utilisée dans ce modèle, il s'agit d'une lignée pro-monocytaire. Les cellules sont stimulées 20h à 24h avec des substances chimiques à huit concentrations différentes, basées sur une concentration induisant 70% de survie cellulaire, prédéterminée avec de l'iodure de propidium. On détermine le niveau d'activation des THP-1 en mesurant l'expression du CD86 (une molécule de co-stimulation) et le CD54 (une molécule d'adhésion) s'exprimant lorsque les cellules sont acitivées, ceci par cytométrie en flux. Il est considéré qu'une molécule est sensibilisante si l'intensité relative de fluorescence (RFI) de CD86 et/ou de CD54 dépasse un certain seuil :

$\geq 150$  pour CD54 et  $\geq 200$  pour CD86. Il est avantageux d'utiliser ce test puisque les THP-1 sont facilement disponible et leur culture est relativement simple (75).

### 3.3. Modèle de cellule dendritiques différenciées à partir de monocytes de donneurs sains : les MoDC

Il a été mis au point des méthodes utilisant des modèles cellulaires de DC plus physiologiques et génétiquement stables (76). Elles sont acquiesent à partir des monocytes de sang frais de donneurs sains, possédant donc des caractéristiques phénotypiques, morphologiques et fonctionnelles de DC typiques (77). Après quatre jours de culture en présence de l'interleukine 4 (IL-4), et de facteur de croissance myéloïde (GM-CSF), elles forment des cellules dendritiques que l'on qualifie d'immatures. Celles-ci sont alors incubées à 37° avec la substance à tester pendant environ vingt heures dans notre cas. Après exposition, la viabilité cellulaire doit être d'au moins 70 % et la prédiction de la capacité sensibilisante de la molécule testée est basée sur l'augmentation de l'expression du CD86 à la surface des MoDC par rapport aux cellules contrôles exposées au véhicule seul. D'autres marqueurs peuvent refléter l'activation des MoDC, comme le CD80, le CD83, ou CD86.

D'après la réglementation, afin qu'un produit chimique entre dans la catégorie de substances dites sensibilisantes, il doit être caractérisé par deux tests *in vitro* sur trois réalisés.

## Hypothèse et Objectifs :

Nous faisons l'hypothèse que la pholcodine peut être reconnue par le système immunitaire et provoquer l'apparition des IgE anti-curares. Nous proposons d'adresser la question sous trois angles :

-Déterminer le potentiel d'activation des cellules dendritiques (DC) par la pholcodine et les mécanismes sous-jacents.

-Étudier la capacité de la molécule à être reconnue comme antigène et présentée aux lymphocytes T.

-Évaluer la réactivité envers les curares des lymphocytes T activés par la pholcodine.

# Matériels et méthodes

## Les modèles cellulaires utilisés

### Le modèle de cellules dendritiques dérivant de monocytes

Les cellules dendritiques dérivant de monocytes (MoDc) ont été obtenues par différenciation de monocytes (CD14<sup>+</sup>) humains issus de sang total de donneurs sains obtenu auprès de l'Établissement Français du Sang (Rungis, France). Les cellules mononucléées de sang périphérique (PBMC) ont été séparées sur gradient de Ficoll. Les monocytes ont ensuite été isolés par sélection positive à l'aide d'anticorps anti-CD14 couplés à des billes magnétiques (Miltenyi Biotec, Paris, France) puis mis en culture à  $1.10^6$  cellules/mL en milieu complet supplémenté par des cytokines humaines recombinantes : GM-CSF (Miltenyi Biotec) 550 U/mL et IL-4 (Miltenyi Biotec) 550 U/mL. Après quatre jours de culture, le phénotype des DC a été analysé par cytométrie en flux par mesure de l'expression du CD1a (CD1aPE/IgG1PE), du DC-SIGN (DC-SIGNAPC/IgG2bAPC), du CD86 (CD86FITC/IgG1PE) et du CD83 (CD83APC/IgG1APC). Tous les anticorps utilisés en cytométrie en flux ont été obtenus auprès de BD Biosciences (Le Pont de Claix, France).

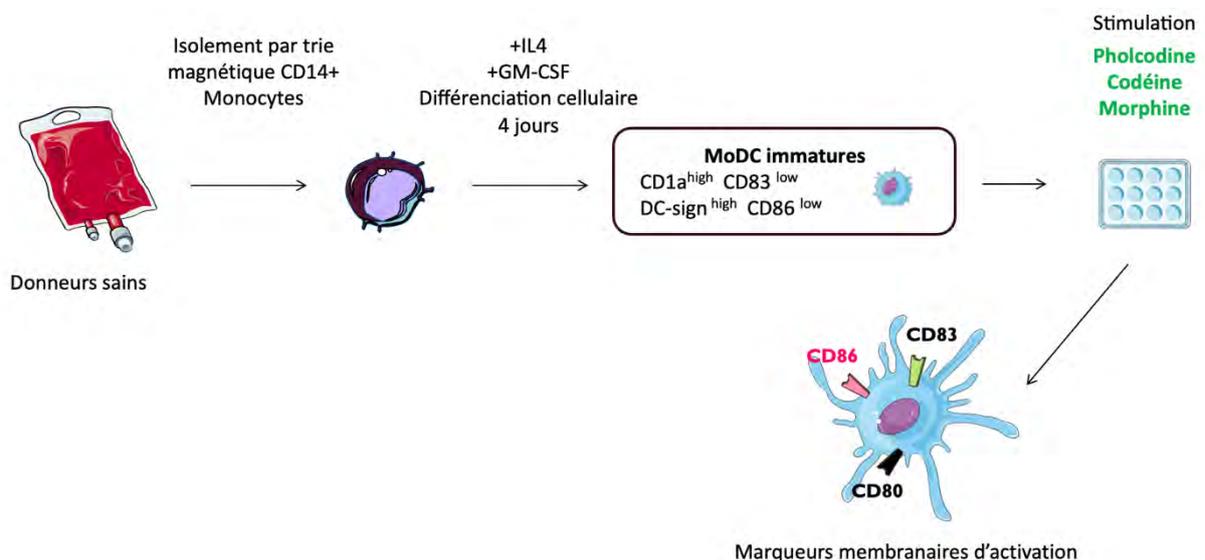


Figure 11 : schéma de la récupération des MoDC à partir de donneurs sains et mise en culture

## **Les molécules étudiées**

Trois dérivés opioïdes ainsi qu'un antagoniste non sélectif des récepteurs aux opioïdes ont été utilisés pour ce projet : la pholcodine (Sigma, ref #003SUh) 10 mg reconstituée avec 2ml de PBS (5mg/mL) ; la morphine (10mg/ml), obtenue auprès de la pharmacie à usage intérieur de l'hôpital Bichat à Paris ; la codéine (Sigma, ref #00Uzpw) 10mg reconstituée avec 2ml de PBS (5mg/ml) ; la naloxone (Sigma , ref #00QxqJ) 5,1mg reconstituée avec 1ml de PBS (5,1 mg/ml). Le contrôle positif d'activation utilisé a été le LPS (Sigma, ref#L6529) à la concentration finale de 25 ng/mL. Le potentiel activateur du LPS est bien connu et il est utilisé en tant que contrôle positif dans de nombreuses études de ce type. Les produits ont été reconstitués dans leur solvant (PBS) respectif de façon à ce que la concentration finale de solvant n'excède pas 0,1% dans le milieu de culture.

## **Traitement *in vitro* par les différents stimulants**

Après 4 jours de différenciation, les MoDCs sontensemencées à la densité de 1 million de cellules/mL dans du milieu RPMI complet puis ont été traitées par les dérivés opioïdes et les contrôles positifs pendant différents temps allant de 1 heure à 20 heures selon l'analyse souhaitée. Pour chaque condition, un témoin négatif contenant uniquement le véhicule PBS était présent. Le lipopolysaccharide (LPS) est utilisé comme contrôle positif à une concentration de 25 ng/mL. C'est un composant essentiel de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, se comportant comme un signal de danger pour les cellules dendritiques.

## **Étude de la cytotoxicité**

Dans des études préliminaires, les MoDC ont été traitées par différentes concentrations de chaque opioïde et la cytotoxicité a été évaluée après 20 heures. À partir de ces résultats, les concentrations utilisées pour l'étude ont été déterminées telles que la mortalité cellulaire n'excède pas 30%. La cytotoxicité a été mesurée par marquage à l'iodure de propidium (IP) (Invitrogen, France). Pour cela, 200 000 cellules ont été lavées deux fois puis marquées par 625 ng/mL d'IP. La cytotoxicité a été immédiatement mesurée en cytomètre de flux (cytomètre Attune NxT Acoustic, ThermoFisher Scientific, Illkirch, France). Les analyses ont été réalisées avec le logiciel FlowJo.

## **Étude des marqueurs d'activation de surface par cytométrie en flux**

Après 20h heures de traitement par les opioïdes, les cellules sont lavées dans du PBS 1X froid. Les culots cellulaires ont ensuite été remis en suspension dans une solution de PBS 1X enrichie de 0,5 % d'albumine de sérum bovin (BSA) (PAA Laboratories GmbH, Autriche). Les cellules ont alors été incubées 20 minutes à 4°C en présence de chaque anticorps à raison de 5 µL pour un million de cellules, comme indiqué sur la fiche technique de l'anticorps. Après lavage des cellules dans du PBS 1X froid, l'expression de différents marqueurs d'activation a été analysée : CD86, CD83 et CD80 pour les MoDC. Les intensités moyennes de fluorescence (MFI) des anticorps d'intérêt ont été corrigées par les MFI des contrôles isotypiques. Les résultats sont exprimés en intensité de fluorescence (Mean Fluorescence Intensity) MFI.

$$\text{MFI corrigée} = \text{MFI de l'anticorps spécifique} - \text{MFI de l'anticorps isotype}$$

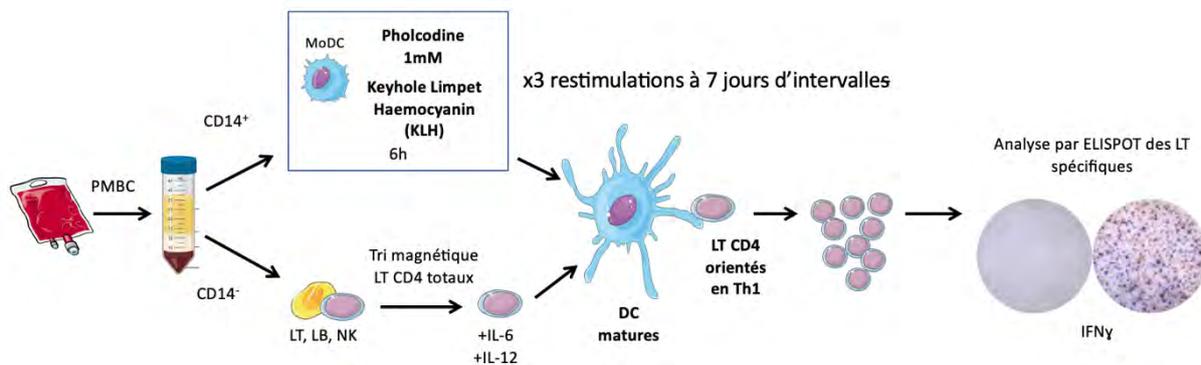
## **Modèle de coculture autologue DC-LT**

Les LT CD4<sup>+</sup> naïfs sont isolés par purification magnétique négative (Naive CD4<sup>+</sup> T cell Isolation Kit II human, Miltenyi Biotec Paris, France). Les MoDCs immatures sont ensuite incubées avec le LPS à 10µg/ml dans un milieu d'isocove complet (Isocove Modified Dulecco's Medium + Serum AB + mix Acides Aminés). Au bout d'une heure, la pholcodine (1mM) et la KLH sont ajoutées ou non pour une durée de 6 heures. Les cellules sont lavées et mises en culture avec les LT CD4<sup>+</sup> naïfs au rapport 1 :10 (10 000 moDCs par puits pour 100 000 LT) dans un milieu RPMI 1640 à 10% de SAB (Gibco, Invitrogen, Saint Aubin, France) supplémenté avec de l'IL-12 (10 ng.mL<sup>-1</sup>, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) (Invitrogen, Saint Aubin, France), de l'IL-6 (10000 U.mL<sup>-1</sup>, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) et de la primocine (5 µg.mL<sup>-1</sup>) (Invitrogen, Saint Aubin, France). Les LT CD4<sup>+</sup> naïfs sont ensuite restimulés de façon similaire trois fois à 7 jours d'intervalle avec des MoDCs chargées comme précédemment en présence d'IL-2 (10 U.mL<sup>-1</sup>)(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), et d'IL-7 (5 ng.mL<sup>-1</sup>) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). La KLH est utilisée en tant que contrôle positif, c'est un antigène protéique immunogène et est principalement utilisée dans les études immunotoxicologiques

## **ELISPOT**

Un ELISpot-IFN-γ est réalisé une semaine après la troisième restimulation afin de détecter les lignées lymphocytaires T spécifiques de la pholcodine. Les plaques de nitrocellulose (96

puits, Millipore, Guyancourt, France) sont incubées avec un anticorps de capture IgG1 humain anti-IFN- $\gamma$  (1- D1K, Mabtech, Augustendalstorget, Suède) pendant une nuit à 4°C. Les plaques sont ensuite saturées avec du milieu de culture RPMI supplémenté avec 10% de SVF sur la nuit à 4°C. Ces plaques sont ensuite lavées et utilisées pour établir une co-culture avec les LT CD4+ induits précédemment et des MoDCs préalablement chargées avec la PHA (témoin) dans un milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10% de SAB au ratio 1 :10 (3000 moDCs pour 30 000 LT). La co-culture est incubée sur la nuit à 37°C. Le lendemain, les cellules sont éliminées des plaques et un anticorps secondaire biotinylé IgG1 murin anti-IFN- $\gamma$  (7B6-1, Mabtech, Augustendalstorget, Suède) est ajouté pendant 2 heures à 37°C. Les plaques sont ensuite lavées et incubées avec une solution d'extravidine pendant 1 heure à température ambiante. Ces plaques sont ensuite lavées puis incubées avec du substrat (nitrobleu tétrazolium/5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate, Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France) jusqu'à l'apparition des premiers spots. Les spots sont comptés par un lecteur de plaque ELISpot Autoimmun Diagnostika (AID, Straßberg, Allemagne). Une lignée de LT CD4+ est jugée positive si le nombre de spots est supérieur à 30 spots et supérieur à deux fois le nombre de spot obtenus par le bruit de fond.



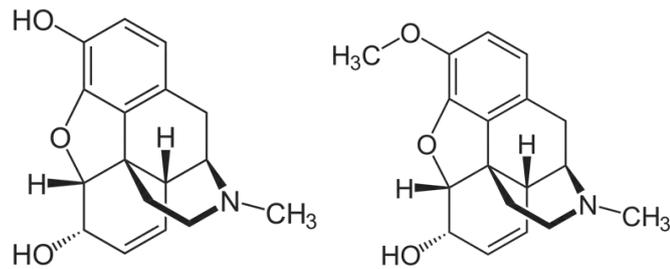
**Figure 12 : Schéma du modèle de coculture autologue DC-LT CD4+ et de l'étude de la sécrétion des LT CD4+ d'interféron  $\gamma$  en réponse à la stimulation des DC matures chargées avec la pholcodine, la KLH étant le contrôle positif.**

### Étude statistique des résultats

L'analyse statistique des résultats a été réalisée avec le logiciel GraphPad Prism 7.04. Le test non paramétrique de Mann Whitney a été appliqué pour comparer deux groupes de variables non paramétriques. Les valeurs de  $p < 0,05$  ont été considérées comme statistiquement significatives.

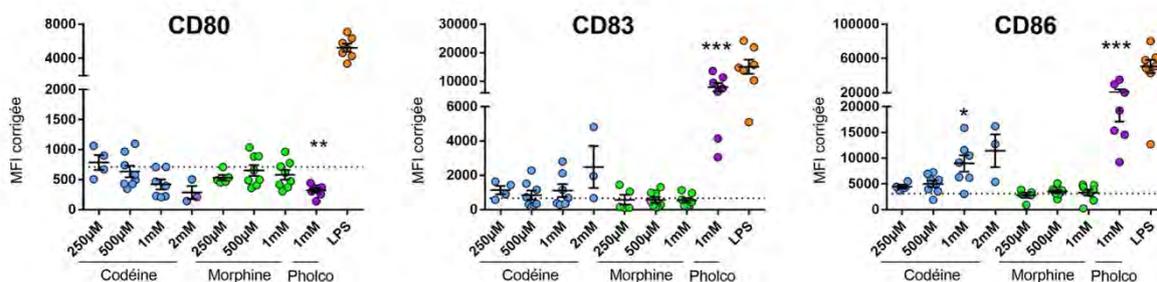
# Résultats

Comme les IgE reconnaissant les curares montrent une réaction croisée avec la morphine dans des tests d'inhibition évoqués en amont, nous avons dans un premier temps, mesuré l'activation des MoDC par la pholcodine (1mM) et certains dérivés opioïdes de structures proches telles que la morphine et la codéine ci-dessous (figure 1) :



**Figure 1 : Morphine (gauche) et Codéine (droite)**

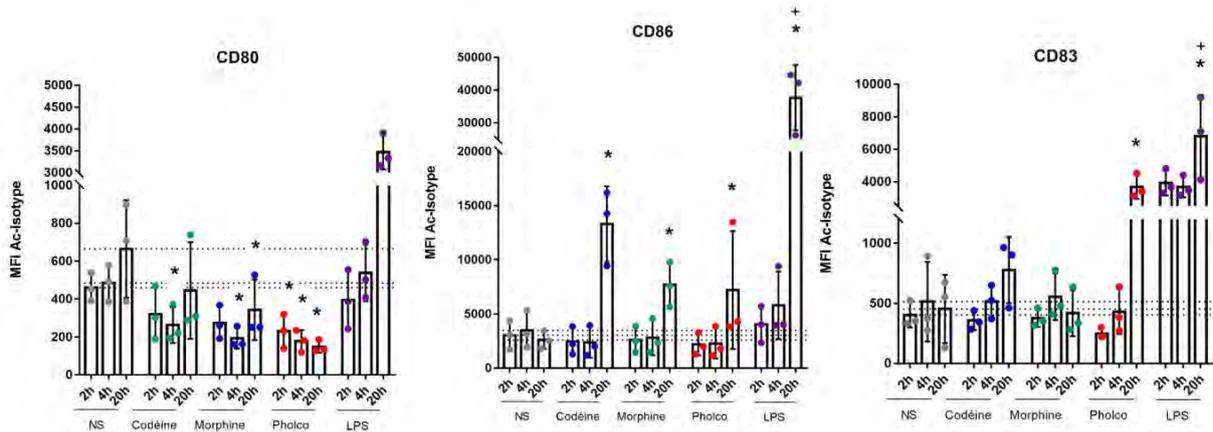
Précédemment, des études ont permis d'évaluer la cytotoxicité par marquage à l'iode de propidium (IP) à différentes concentrations de pholcodine, de codéine (500  $\mu$ M, 1mM, 2mM) et de morphine (250  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 1mM). Les concentrations qui avaient été retenues sont celles qui induisent un maximum de 30% de mortalité cellulaire (datas non montrés). La pholcodine induit une augmentation de l'expression de molécules de costimulation CD86 ainsi que de molécules de maturation comme le CD83 ( $p < 0,0001$ ). L'induction est comparable à celle retrouvée en réponse au LPS, contrôle positif de stimulation. Cela suggère que les dérivés opioïdes, et particulièrement la pholcodine, activent les MoDc (figure 2). Ce n'est pas le cas pour le CD80 pour lequel la MFI est significativement plus basse que celle des cellules traitées au PBS lorsqu'on utilise la pholcodine. De façon générale, quel que soit la concentration utilisée, les cellules traitées avec la codéine ou la morphine ont une intensité de fluorescence moyenne pour l'expression du CD80 proche de la condition PBS.



**Figure 2 : Mesure de l'expression du CD80, CD86, CD86 sur les MoDC après exposition à la codéine, la morphine et la pholcodine.**

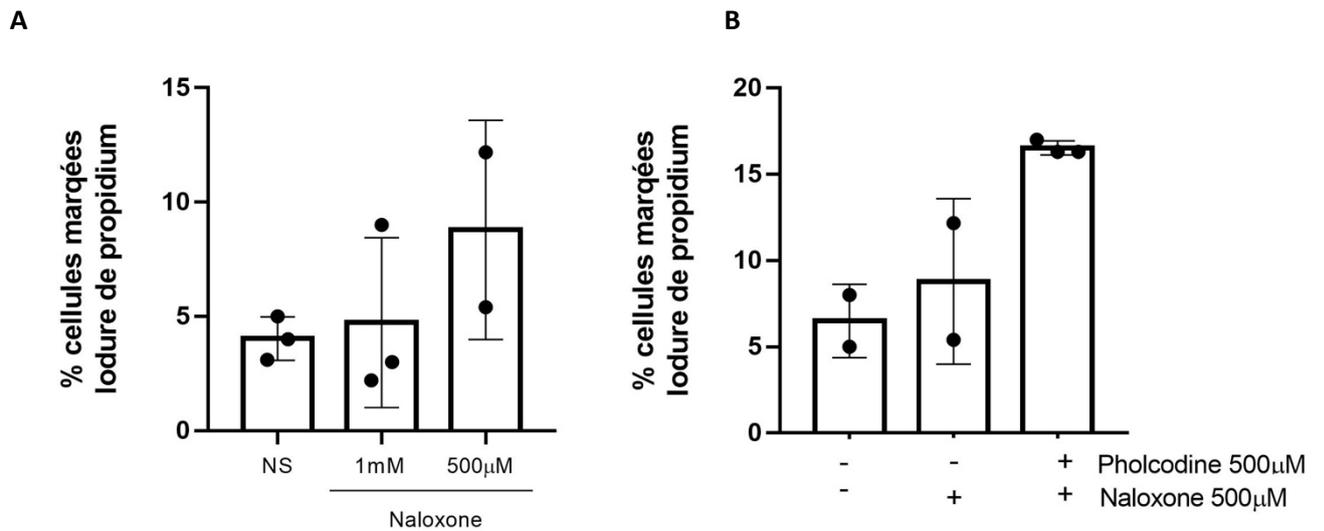
Les MoDC ont été exposés pendant 20h à la codéine (500  $\mu$ M, 1mM, 2mM), la morphine (250  $\mu$ M, 500  $\mu$ M et 1mM) et à la pholcodine (1mM). Représentation graphique des moyennes de CD80, CD86, CD83, les lignes en pointillées représentent le seuil de PBS. Comparaison des conditions PBS, codéine 1mM, morphine 1mM et pholcodine 1mM. Test statistique de Kruskal-Wallis avec un test post-hoc de Dune \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Afin de comprendre pourquoi le CD80 n'est pas exprimé à 20 h nous avons fait l'hypothèse que son expression est plus précoce dans le temps avant d'être ensuite diminuée. Nous avons donc mesuré l'expression au cours du temps selon une cinétique d'expression à 2h, 4h et 20h. Les MoDC ont été stimulées par les dérivées opioïdes à 1mM. La cinétique montre une diminution de l'expression du CD80 avant 2h lorsque les MoDC sont traitées avec la pholcodine 1mM. On peut également constater que l'augmentation de l'expression du CD83 et CD86 est plus tardive et survient à 20h (figure 3). Il y a une augmentation significative de l'expression du CD86 lorsque les cellules sont traitées avec la morphine et la codéine, que l'on ne retrouve pas pour l'expression du CD83, et on retrouve une expression du CD80 inférieure à celle des cellules non stimulées.



**Figure 3 : Mesure de l'expression du CD80, CD86, CD86 sur les MoDc après exposition à la codéine, la morphine, la pholcodine et au LPS.** Les MoDc ont été exposées pendant 2h, 4h et 20h à la codéine (1mM), la morphine (1mM), à la pholcodine (1mM) et au LPS (25ng/ml). Représentation graphique des moyennes de CD80, CD86, CD83, les lignes en pointillées représentent le seuil de PBS pour les trois temps, n=3. Tests statistiques : Mann-Whitney par rapport au NS au même temps \*p< 0,05; Kruskal-Wallis avec un test post-hoc de Dunn : + p< 0,05

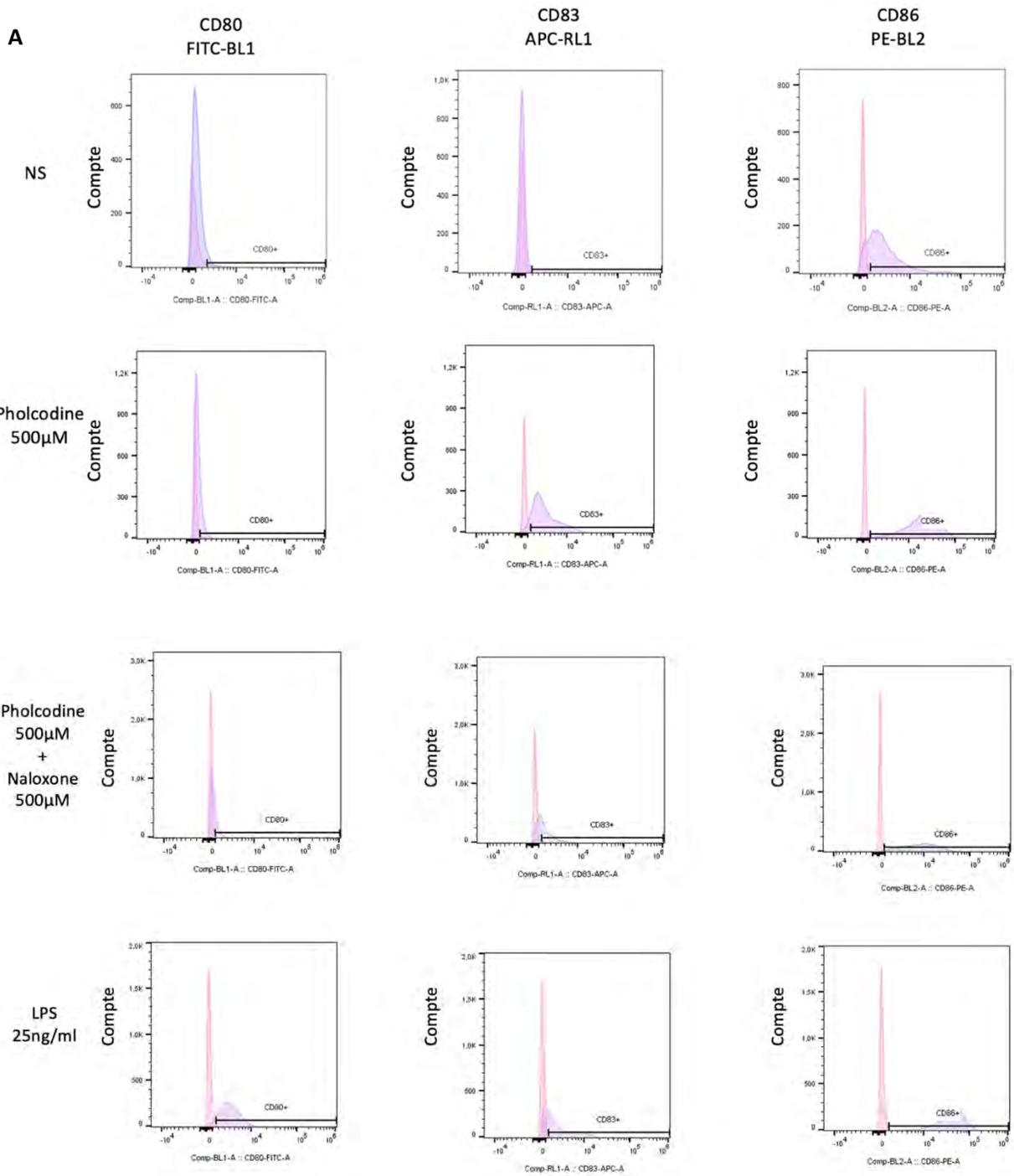
Les dérivés opioïdes semblent avoir un effet activateur sur les MoDc. Bien que ce sujet ait été peu étudié, les rares données de la littérature suggèrent l'existence de récepteurs opioïdes mu, delta à la surface des MoDc (78) (79). Pour vérifier cette hypothèse nous avons donc utilisé un antagoniste non sélectif des récepteurs opioïdes, la naloxone. Le potentiel cytotoxique de la naloxone avec ou sans pholcodine a été évalué aux concentrations de 500  $\mu$ M et 1mM (figure 4 A). Nous observons que la viabilité cellulaire, lorsqu'on additionne les deux molécules à 1mM, dépasse 40% de mortalité cellulaire (datas non montrés) alors qu'à 500  $\mu$ M la viabilité reste supérieure à 80% (figure 4 B). Nous avons donc retenue une concentration de travail à 500  $\mu$ M pour les deux molécules.

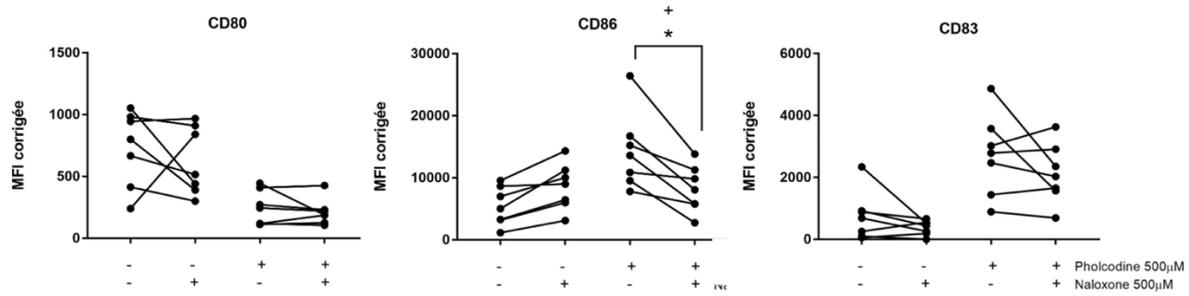
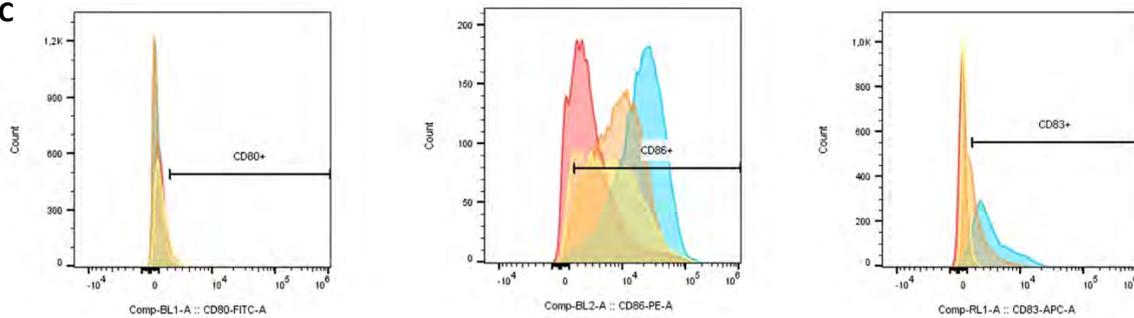


**Figure 4 : Mesure de la viabilité après exposition à la naloxone.**

(A) Taux de cellules mortes par l'iodure de propidium sur les MoDC après une exposition de 20h avec la naloxone (1mM, 500 µM) (B) Mesure du taux de cellules mortes par l'iodure de propidium sur les MoDC après une exposition de 20h avec addition de la naloxone (500 µM) et la pholcodine (500 µM)

Nous avons donc traité les MoDC avec la naloxone pendant 1h puis ajouté la pholcodine pour une incubation de 20h. Le phénotypage réalisé le lendemain montre que la naloxone diminue l'expression du CD86 de façon significative (figure 5B, 5C) en comparaison du phénotypage obtenu avec la pholcodine seule (n=8). Ces résultats suggèrent que la pholcodine passerait par le récepteur des opioïdes mais pas uniquement. On retrouve également une diminution de l'expression du CD80 lorsque les cellules sont traitées avec la pholcodine en comparaison avec les cellules traitées au PBS comme vu précédemment. Nos résultats ne mettent pas en évidence de variation de l'expression du CD83.



**B****C**

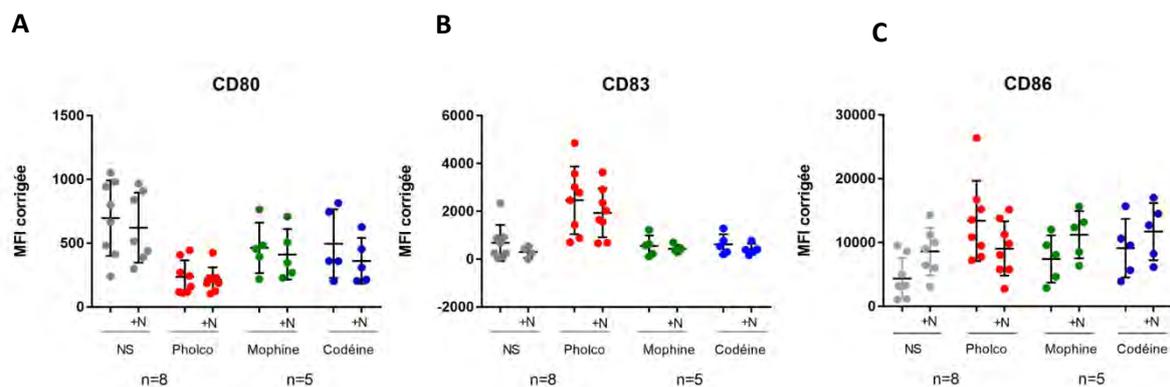
**Figure 5 : Expression des marqueurs membranaire CD80, CD86, CD83 d'activation des MoDC traitées par la pholcodine avec ou sans naloxone.**

(A) Nombre d'événements en fonction des MFI du CD80, CD83 et du CD86 d'une expérience représentative. La courbe violette correspond à l'anticorps d'intérêt et la courbe rose correspond au contrôle isotypique (B) Mesure de l'expression du CD80, CD86, CD86 sur les MoDC après une exposition de 20h avec la pholcodine 500 µM sans ou avec la Naloxone à 500 µM, n=8 (C) Nombre d'événements en fonction des MFI du CD80, CD83 et CD86 d'une expérience représentative. Les cellules non stimulées apparaissent en rouge, les cellules traitées avec la pholcodine (500 µM) en bleu, les cellules traitées avec l'association pholcodine (500 µM) et naloxone (500 µM) en orange et les cellules traitées avec la naloxone seule en jaune. Tests statistiques : Wilcoxon \* $p < 0,05$  ; Kruskal-Wallis avec un test post-hoc de Dunn : +  $p < 0,05$

La naloxone a un effet qui tend vers l'inhibition de l'augmentation de l'expression CD86 à 20h ; il est important de regarder plus spécifiquement quel sous-type de récepteur est impliqué en utilisant des antagonistes sélectifs des récepteurs opioïdes.

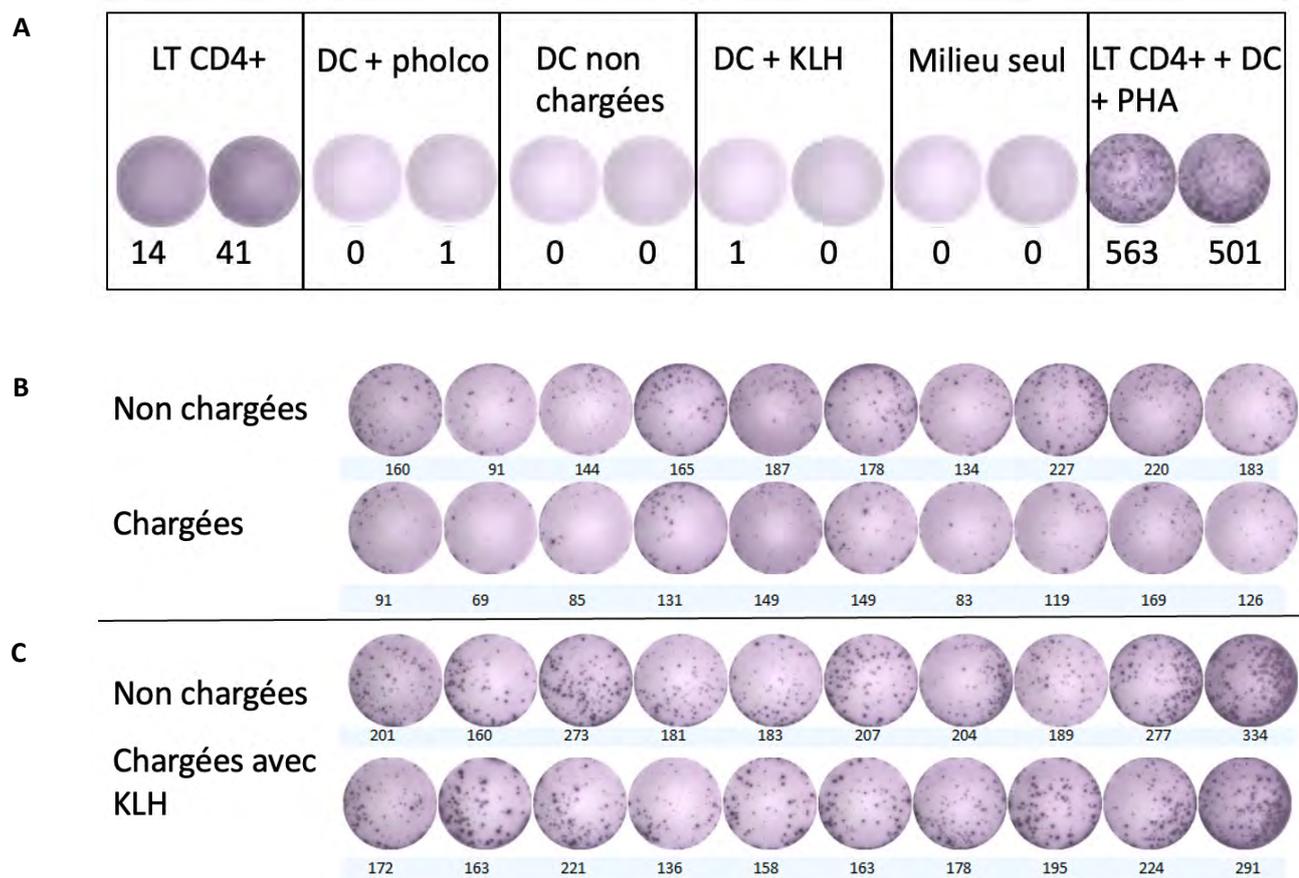
Nous avons également regardé l'effet de la naloxone sur des MoDC traitées avec d'autres dérivés opioïdes tels que la codéine et la morphine. On constate que la naloxone ne semble pas

modifier l'expression du CD80 (figure 6A) et du CD83 (figure 6B) lorsque les MoDC sont stimulées avec la morphine (vert) et la codéine (bleu). L'expression du CD86 (figure 6C) pour les cellules traitées avec la morphine et la codéine ne semble pas différer de la condition NS (gris) lorsqu'on ajoute de la naloxone. Cela suggère que la naloxone n'a pas d'effet sur des MoDC stimulées avec d'autres dérivés opioïdes.



**Figure 6 : Expression des marqueurs membranaires CD80, CD86, CD83 d'activation des MoDC traitées par la pholcodine et d'autres dérivés opioïdes avec ou sans naloxone.** Mesure de l'expression du CD80 (A), CD86 (B), CD86 (C) sur les MoDC après une exposition de 20h avec la pholcodine 500  $\mu$ M (rouge) et morphine 500  $\mu$ M (vert), codéine 500 $\mu$ M (bleu) sans ou avec (+N) la naloxone à 500  $\mu$ M.

Dans un second temps nous avons cherché à étudier la capacité de la pholcodine à être reconnue comme antigène et présentée aux lymphocytes T. Afin de déterminer si les MoDC préalablement exposées à la pholcodine (1mM) sont fonctionnelles, et plus particulièrement si elles sont capables d'induire la prolifération de LT CD4+, nous avons mis en place un modèle de coculture autologue. Pour cela, des MoDC ont été chargées, ou non, pendant 6h avec la pholcodine (1 mM) et la *Keyhole Limpet Haemocyanin* (KLH) (10  $\mu$ g/ml) en tant que contrôle positif. La coculture est orientée volontairement vers une polarisation Th1, grâce à l'ajout d'IL-12 dans le milieu, afin de pouvoir détecter les lignées positives avec un ELISPOT interféron gamma (IFN- $\gamma$ ).



**Figure 7 : Représentation d'un résultat ELISPOT IFN- $\gamma$  après coculture autologue entre des LT CD4 et DC préalablement chargée avec la pholcodine ou le contrôle positif KLH** (A) tableau représentant les contrôles effectués : LT CD4+ seul, DC chargées à la pholcodine, DC seules non chargées, DC traitées avec la KLH, milieu seul, et contrôle positif LT CD4+ mis en contact avec des DC chargées avec la phytohemagglutinine (PHA) et dessous le nombre de spot compté pour chaque puit. (B) Présentation de 10 lignées représentatives des 100 puits de cocultures en présence de DC préalablement chargées avec la pholcodine 1mM (C) les DC ont été chargées avec le contrôle positif KL.

Afin de dire qu'une lignée de LT CD4 a produit de l'IFN- $\gamma$ , la quantité de spot dans le puits chargé avec la molécule d'intérêt doit être le double de la quantité de spot du puits avec les DC non chargées. Ici, le contrôle positif (KLH) n'est pas sorti. Il n'y a pas de différence significative entre les lignées de LT CD4+/DC qui ont été chargées avec la pholcodine et non chargées, cela peut être dû à plusieurs éléments énoncés dans la discussion.

## Discussion

Les réactions anaphylactiques per opératoires sont des évènements rares mais graves pouvant aller jusqu'au décès du patient. En France, ce sont les curares les plus fréquemment incriminées, cependant les mécanismes immunologiques impliqués restent toutefois peu documentés et mal connus. Les études épidémiologiques ont montré que la prévalence de ces réactions différait selon les pays étudiés. De plus, ces études ont mis en évidence que ces réactions anaphylactiques survenaient sans exposition antérieure à un curare, ceci étant contradictoire avec la définition de l'allergie telle que nous l'avons évoqué précédemment. Cette constatation amène à penser l'existence d'une réaction croisée entre les curares et d'autres molécules possédant une structure chimique proche. Baldo et Fischer (80) ont montré que l'élément allergisant au sein de la structure du curare était le motif AQ/amine tertiaire, présents dans des médicaments, tels que les dérivés opioïdes. Pour comprendre les mécanismes immunologiques des réactions anaphylactiques aux curares il est donc essentiel d'étudier le potentiel allergisant des dérivés opioïdes capables d'induire une immunisation contre les molécules myorelaxantes ; les curares. Les DC étant centrales dans l'initiation de la réponse immunitaire, il nous a paru judicieux d'étudier le potentiel de stimulation immunitaire la pholcodine dans un modèle *in vitro* de DC dérivées de monocytes humains (MoDC).

Dans un premier temps, nous avons montré que des concentrations de 1mM et de 500µM de pholcodine induisaient une modification du phénotype des cellules des MoDC. Les résultats obtenus à partir des cellules MoDC ont montré que la pholcodine augmentait de façon significative l'expression des marqueurs d'activation CD86 et CD83 par rapport aux conditions témoins. En revanche, nous observons une diminution de l'expression du CD80 apparaissant dans les deux heures après exposition. Afin de mieux comprendre la sous-expression du CD80 nous avons étudié l'effet de la pholcodine sur la modulation de l'expression du CD80 induit par le LPS. Nous avons observé une diminution de l'expression du CD80 lorsque celles-ci sont préalablement traitées avec la pholcodine puis ensuite stimulées avec le LPS, cela met en évidence que la molécule a un effet inhibiteur direct sur l'expression du CD80 en réponse à une stimulation au LPS. D'autres études similaires ont été réalisées avec un autre modèle cellulaire et avec un dérivé opioïde différent du nôtre, la morphine. En 2013, Stevens et al. ont montré que le co-traitement de cellules rapportrices pour TLR4, les HEK-Blue®, avec de la morphine plus du LPS connu pour être un agoniste de TLR4, a conduit à une inhibition significative de l'activation de la signalisation TLR4 par rapport au LPS seul (81). Ce phénomène d'inhibition

par les opioïdes de l'activation de la signalisation TLR4 naturellement induite par le LPS a également été montré sur des cellules humaines telles que les mastocytes, neutrophiles et macrophages. Lorsque les cellules sont traitées avec de la morphine, il a été observé une diminution de la production des cytokines TNF-alpha, IL-6, IL-8, IL-10 et IL-12 normalement produites en réponse à une stimulation de ces cellules par le LPS (82). Il serait donc intéressant de vérifier si ces résultats sont extrapolables sur des MoDC et de voir si la modulation du LPS par la pholcodine est liée à une signalisation dépendante de TLR4.

Nous avons ensuite observé que l'expression du CD86 et CD83 survient plus tardivement, entre 4h et 20h. Il a déjà été montré que les molécules allergisantes induisent la production de stress oxydant tel que les ROS, entraînant l'activation des DC et de ce fait induisant l'augmentation de l'expression du CD86. Il serait intéressant de savoir si la pholcodine induit la formation d'espèces radicalaires, ce qui expliquerait notamment l'augmentation de l'expression du CD86 (83). Afin d'améliorer nos connaissances sur le mode de maturation des DC par les dérivées opioïdes, nous sommes actuellement en train d'étudier les voies indirectes d'activation des DC, en particulier via la production de ROS.

Nous avons montré que la naloxone inhibe en partie l'effet de la pholcodine sur l'activation des MoDC, en diminuant le CD86. Il est connu dans la littérature que les DC expriment les récepteur opioïdes mu, delta et kappa (84)(78)(85)(86). L'utilisation d'antagonistes sélectifs de ces sous-types pourra nous orienter vers la catégorie de récepteur impliqué lorsque les cellules sont stimulées avec la pholcodine. La naloxone n'inhibant pas totalement l'effet activateur de la pholcodine, il est probable qu'un autre mécanisme d'activation soit impliqué.

De plus, nous avons également observé une augmentation de l'expression du CD86 de façon significative et une tendance à l'augmentation du CD83 lorsque les cellules sont stimulées avec la codéine, alors que la morphine ne semble pas ou peu activer les MoDC. Au niveau de la structure chimique, on émet l'hypothèse que cette différence d'activation des MoDC est due à la présence de la chaîne latérale morpholinoéthyl présent sur la pholcodine et non au noyau morphinique commun aux trois opioïdes testés. De plus, il est connu dans la littérature que la morphine a un effet immunomodulateur (79), en effet, comme les DC expriment les récepteurs aux opioïdes, cela peut expliquer que chez les personnes recevant un traitement morphinique chronique rencontre des problèmes d'immunodépression (87) et que les personnes ayant une addiction aux opioïdes sont beaucoup plus enclins aux infections. Il est aussi important de tenir compte de l'affinité des molécules opioïdes pour les différents sous types de récepteurs, car

cela pourrait entrer en ligne de compte dans les variations d'activation sur les DC que l'on a obtenues.

Les récepteurs opioïdes sont des récepteurs RCPG à 7 passages transmembranaires (88)(89) et sont couplés à une protéine G inhibitrice. Il est connu qu'ils inhibent l'adénylate cyclase et que selon le sous-type du récepteur il y ait activation de la voie des MAP kinase (88)(90)(91), impliquant les cascades de signalisation de JNK, ERK et p38 connues pour leurs effets activateurs sur la prolifération et différenciation. Étant donné que la pholcodine active les MoDC et que cette signalisation passe en partie par les récepteurs aux opioïdes, il nous semblerait pertinent de regarder quelles voies de signalisation intracellulaires sont activées. La phosphorylation des protéines JNK, p38 et ERK a donc été étudiée par Western blot sur des cellules préalablement traitées avec la pholcodine, le LPS ou le PBS, à des temps différents afin de déterminer le temps optimal où la cascade de signalisation est activée. De même que l'utilisation d'un inhibiteur p38 additionné à la pholcodine puis réalisation d'un phénotypage a été suggéré afin vérifier si la cascade de la voie p38 est impliquée. Ces expérimentations sont actuellement en cours au laboratoire.

Pour comprendre l'étude des voies de signalisation, des phosphokinase array seront réalisés pour avoir une détection plus large de l'activation des cascades intra-cytoplasmiques.

Concernant la capacité de la molécule à être reconnue comme antigène et présentée aux lymphocytes T, nous avons réalisé un ELISPOT qui n'a pas donné de résultats concluants. On s'interroge en premier lieu sur la non réponse du contrôle positif. Il est envisagé que cela provient d'un temps de chargement des MoDC trop court. Au-delà de 6h d'incubation la mortalité cellulaire était largement augmentée, provenant du fait que les DC d'un même donneur étaient congelés. On s'est donc limité à 6h de stimulation.

Il est compliqué de donner un avis sur ces premiers résultats, n'ayant pas de contrôle pour valider la technique. Il est aussi possible que les difficultés rencontrées pourraient être due au fait que l'on a orienté préalablement nos LT CD4<sup>+</sup> avec des cytokines propres à une réponse de type 1, générant ainsi des LT CD4 Th1. On pourrait donc penser que la pholcodine sensibilise les DC vers une réponse de type Th2 que l'on retrouve généralement dans les réponses allergiques. En suggérant que les LT CD4<sup>+</sup> qui auraient été activés par les DC chargées à la pholcodine sont de type Th2 et génèrent donc d'autres cytokines que l'IFN- $\gamma$ . Il serait plus judicieux d'utiliser une autre technique de détection et de vérifier la sécrétion de cytokines Th2

comme l'IL-5 par ces lignées. Il serait intéressant de réaliser d'autres cocultures sans avoir orienté la polarisation des LT CD4 en Th1 et d'analyser le type de cytokines présentes dans le surnageant par une technique d'analyse multiplex comme l'électro-chimioluminescence (Meso Scale Discovery) ou par fluorospot. En outre, il est à envisager que ce n'est peut-être pas la pholcodine elle-même qui est reconnue par les DC mais un de ses bio-conjugés ou un de ses métabolites tels que la pholcodinone.

Afin d'évaluer la réactivité envers les curares des lymphocytes T activés par la pholcodine, il est envisagé d'utiliser la technique de coculture avec double ELISPOT. Dans cette technique les LT spécifiques de la pholcodine identifiés dans un premier ELISPOT sont ensuite mis au contact de DC préalablement chargées aux curares afin d'étudier leur réactivité croisée.

## Conclusion et perspectives

Notre projet avait pour but d'étudier le potentiel d'activation de dérivés opioïdes sur un modèle cellulaires de DC. Les résultats obtenus ont mis en évidence une activation des cellules MoDC ainsi qu'un engagement des DC vers un état mature lors d'une exposition à la pholcodine. La caractéristique principale du traitement est l'augmentation de l'expression de CD86 et CD83 par les MoDC. Ces résultats suggèrent que la pholcodine peut être responsable d'une activation de la réponse immune primaire via les DC et qu'elle possède un potentiel sensibilisant. Il reste toutefois à établir quel est le mécanisme d'activation impliqué.

Par la suite, des études *in vivo* consistant en l'exposition d'un modèle animal aux dérivés opioïdes puis à l'analyse de l'infiltrat inflammatoire au site d'exposition et des populations cellulaires ganglionnaires pourraient être réalisées.

Ainsi, en documentant le potentiel allergisant des dérivés opioïdes nous pourrions identifier ceux qui sont le plus à risque de provoquer une réaction croisée avec les curares afin de proposer des mesures de prévention primaire, par exemple le retrait des produits contenant les molécules incriminées, comme cela a été réalisé en Norvège et plus récemment en France avec les sirops contenant de la pholcodine.

# Références

1. Simons FER, Arduzzo LRF, Bilò MB, Cardona V, Ebisawa M, El-Gamal YM, et al. International consensus on (ICON) anaphylaxis. *World Allergy Organization Journal*. 2014;7:9.
2. Cornejo-Garcia JA, Fernandez TD, Torres MJ, Carballo M, Hernan I, Antunez C, et al. Differential cytokine and transcription factor expression in patients with allergic reactions to drugs. *Allergy*. déc 2007;62(12):1429-38.
3. Bennett JR. Anaphylaxis attributed to exercise: considerations for sports medicine specialists. *The Physician and Sportsmedicine*. 2 janv 2015;43(1):1-12.
4. Descotes J, Choquet-Kastylevsky G. Gell and Coombs's classification: is it still valid? *Toxicology*. févr 2001;158(1-2):43-9.
5. Aubert N, Mertes PM, Janaszak M, Moneret-Vautrin DA, Laxenaire MC, Kanny G, et al. Dendritic cells present neuromuscular blocking agent-related epitopes to T cells from allergic patients. *Allergy*. sept 2004;59(9):1022-3.
6. Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Schaniel C, Lenig D, Mackay CR, et al. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol*. sept 1998;28(9):2760-9.
7. Kabashima K, Shiraishi N, Sugita K, Mori T, Onoue A, Kobayashi M, et al. CXCL12-CXCR4 Engagement Is Required for Migration of Cutaneous Dendritic Cells. *The American Journal of Pathology*. oct 2007;171(4):1249-57.
8. Immunologie fondamentale et immunopathologie: Enseignements thématique et intégré - Tissu lymphoïde et sanguin / Immunopathologie et immuno-intervention. Elsevier Health Sciences; 2018. 343 p.
9. Montañez MI, Mayorga C, Bogas G, Barrionuevo E, Fernandez-Santamaria R, Martin-Serrano A, et al. Epidemiology, Mechanisms, and Diagnosis of Drug-Induced Anaphylaxis. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2017 [cité 4 nov 2022];8. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.00614>
10. Finkelman FD. Anaphylaxis: Lessons from mouse models. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. sept 2007;120(3):506-15.
11. Takai T, Ono M. Activating and inhibitory nature of the murine paired immunoglobulin-like receptor family: PIR structure and function. *Immunological Reviews*. juill 2001;181(1):215-22.
12. 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.
13. 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.

14. Vadas P, Perelman B. Effect of epinephrine on platelet-activating factor–stimulated human vascular smooth muscle cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. mai 2012;129(5):1329-33.
15. Beutier H, Hechler B, Godon O, Wang Y, Gillis CM, de Chaisemartin L, et al. Platelets expressing IgG receptor Fc RIIA/CD32A determine the severity of experimental anaphylaxis. *SCIENCE IMMUNOLOGY*. 2018;12.
16. Finkelman FD, Khodoun MV, Strait R. Human IgE-independent systemic anaphylaxis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. juin 2016;137(6):1674-80.
17. Szebeni J. Complement activation-related pseudoallergy: A stress reaction in blood triggered by nanomedicines and biologicals. *Molecular Immunology*. oct 2014;61(2):163-73.
18. Stevenson DD, Sanchez-Borges M, Szczeklik A. Classification of allergic and pseudoallergic reactions to drugs that inhibit cyclooxygenase enzymes. *Ann Allergy Asthma Immunol*. sept 2001;87(3):177-80.
19. Miller CWT, Guha B, Krishnaswamy G. Exercise-Induced Anaphylaxis: A Serious but Preventable Disorder. *The Physician and Sportsmedicine*. janv 2008;36(1):87-94.
20. McNeil BD, Pundir P, Meeker S, Han L, Undem BJ, Kulka M, et al. Identification of a mast-cell-specific receptor crucial for pseudo-allergic drug reactions. *Nature*. 12 mars 2015;519(7542):237-41.
21. Mertes PM, Ebo DG, Garcez T, Rose M, Sabato V, Takazawa T, et al. Comparative epidemiology of suspected perioperative hypersensitivity reactions. *British Journal of Anaesthesia*. juill 2019;123(1):e16-28.
22. Giannetti A, Filice E, Caffarelli C, Ricci G, Pession A. Mast Cell Activation Disorders. *Medicina*. 30 janv 2021;57(2):124.
23. Chatterjee A, Ghosh J, Kapur R. Mastocytosis: a mutated KIT receptor induced myeloproliferative disorder. *Oncotarget*. 30 juill 2015;6(21):18250-64.
24. Nosbaum A, Augéy F, Nicolas JF, Bérard F. Physiopathologie de l'urticaire. *Annales de Dermatologie et de Vénéréologie*. nov 2014;141:S559-64.
25. Simons FER. Anaphylaxis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. févr 2010;125(2):S161-81.
26. Simons F, Frew A, Ansotegui I, Bochner B, Golden D, Finkelman F, et al. Risk assessment in anaphylaxis: Current and future approaches. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. juill 2007;120(1):S2-24.
27. Mertes PM, Alla F, Tréchet P, Auroy Y, Jouglu E. Anaphylaxis during anesthesia in France: An 8-year national survey. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. août 2011;128(2):366-73.
28. Mikhail I, Stukus DR, Prince BT. Fatal Anaphylaxis: Epidemiology and Risk Factors. *Curr Allergy Asthma Rep*. avr 2021;21(4):28.

29. Santos AF, Couto-Francisco N, Bécares N, Kwok M, Bahnson HT, Lack G. A novel human mast cell activation test for peanut allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. août 2018;142(2):689-691.e9.
30. Parrish CP, Kim H. Food-Induced Anaphylaxis: an Update. *Curr Allergy Asthma Rep*. août 2018;18(8):41.
31. LoVerde D, Iweala OI, Eginli A, Krishnaswamy G. Anaphylaxis. *Chest*. févr 2018;153(2):528-43.
32. Mertes PM, Tajima K, Regnier-Kimmoun MA, Lambert M, Iohom G, Guéant-Rodriguez RM, et al. Perioperative anaphylaxis. *Med Clin North Am*. juill 2010;94(4):761-89, xi.
33. Cho JH, Suh JD, Kim JK, Hong SC, Park IH, Lee HM. Correlation between skin-prick testing, individual specific IgE tests, and a multiallergen IgE assay for allergy detection in patients with chronic rhinitis. *Am J Rhinol Allergy*. oct 2014;28(5):388-91.
34. van der Valk JPM, Gerth van Wijk R, Hoorn E, Groenendijk L, Groenendijk IM, de Jong NW. Measurement and interpretation of skin prick test results. *Clin Transl Allergy*. 2015;6:8.
35. Johansen JD, Aalto-Korte K, Agner T, Andersen KE, Bircher A, Bruze M, et al. European Society of Contact Dermatitis guideline for diagnostic patch testing - recommendations on best practice. *Contact Dermatitis*. oct 2015;73(4):195-221.
36. Goikoetxea M, Sanz M, García B, Mayorga C, Longo N, Gamboa P, et al. Recommendations for the Use of In Vitro Methods to Detect Specific Immunoglobulin E: Are They Comparable? *Journal of investigational allergology & clinical immunology*. 1 janv 2013;23:448-54; quiz 2 p preceding 455.
37. Goikoetxea M, Sanz M, García B, Mayorga C, Longo N, Gamboa P, et al. Recommendations for the Use of In Vitro Methods to Detect Specific Immunoglobulin E: Are They Comparable? *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2013;23:8.
38. Nowak-Wegrzyn A, Assa'ad AH, Bahna SL, Bock SA, Sicherer SH, Teuber SS, et al. Work Group report: oral food challenge testing. *J Allergy Clin Immunol*. juin 2009;123(6 Suppl):S365-383.
39. Beauvillain C, Drouet M, Renier G. Le test d'activation des basophiles. *Revue Francophone des Laboratoires*. août 2008;2008(404):67-77.
40. Cop N, Decuyper I, Faber M, Sabato V, Bridts C, Hagendorens M, et al. Phenotypic and functional characterization of *in vitro* cultured human mast cells: Phenotypic and Functional Characterization of *In Vitro* Cultured Human Mast Cells. *Cytometry*. sept 2017;92(5):348-54.
41. Schmetzer O, Valentin P, Smorodchenko A, Domenis R, Gri G, Siebenhaar F, et al. A novel method to generate and culture human mast cells: Peripheral CD34+ stem cell-derived mast cells (PSCMCs). *Journal of Immunological Methods*. nov 2014;413:62-8.

42. Bahri R, Custovic A, Korosec P, Tsoumani M, Barron M, Wu J, et al. Mast cell activation test in the diagnosis of allergic disease and anaphylaxis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. août 2018;142(2):485-496.e16.
43. Rudders SA, Arias SA, Camargo CA. Trends in hospitalizations for food-induced anaphylaxis in US children, 2000-2009. *J Allergy Clin Immunol*. oct 2014;134(4):960-962.e3.
44. Ma L (Larry), 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.
45. 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*. avr 2015;135(4):956-963.e1.
46. Wood RA, Camargo CA, Lieberman P, Sampson HA, Schwartz LB, Zitt M, et al. Anaphylaxis in America: The prevalence and characteristics of anaphylaxis in the United States. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. févr 2014;133(2):461-7.
47. Jerschow E, Lin RY, Scaperotti MM, McGinn AP. Fatal anaphylaxis in the United States, 1999-2010: Temporal patterns and demographic associations. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. déc 2014;134(6):1318-1328.e7.
48. Pumphrey. Lessons for management of anaphylaxis from a study of fatal reactions: Lessons for management of anaphylaxis. *Clinical & Experimental Allergy*. août 2000;30(8):1144-50.
49. Masson E. Épidémiologie de l'allergie alimentaire et prévalence relative des Trophallergènes [Internet]. EM-Consulte. [cité 1 août 2022]. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/78845/epidemiologie-de-l-allergie-alimentaire-et-prevale>
50. 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. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. avr 2015;135(4):956-963.e1.
51. Wang J, Sampson HA. Food anaphylaxis. *Clin Exp Allergy*. mai 2007;37(5):651-60.
52. Turner PJ, Jerschow E, Umasunthar T, Lin R, Campbell DE, Boyle RJ. Fatal Anaphylaxis: Mortality Rate and Risk Factors. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. sept 2017;5(5):1169-78.
53. Mullins RJ, Wainstein BK, Barnes EH, Liew WK, Campbell DE. Increases in anaphylaxis fatalities in Australia from 1997 to 2013. *Clin Exp Allergy*. août 2016;46(8):1099-110.
54. 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 Organization Journal*. 2015;8:32.

55. Campbell RL, Li JTC, Nicklas RA, Sadosty AT. Emergency department diagnosis and treatment of anaphylaxis: a practice parameter. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. déc 2014;113(6):599-608.
56. Bousquet J, Lockey R, Malling HJ, Alvarez-Cuesta E, Canonica GW, Chapman MD, et al. Allergen Immunotherapy: Therapeutic Vaccines for Allergic Diseases. *ANNALS OF ALLERGY*. 1998;81:5.
57. Dhami S, Zaman H, Varga EM, Sturm GJ, Muraro A, Akdis CA, et al. Allergen immunotherapy for insect venom allergy: a systematic review and meta-analysis. *Allergy*. mars 2017;72(3):342-65.
58. Till SJ, Francis JN, Nouri-Aria K, Durham SR. Mechanisms of immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. juin 2004;113(6):1025-34.
59. Ozdemir C, Kucuksezer UC, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of immunotherapy to wasp and bee venom: Mechanisms in venom immunotherapy. *Clinical & Experimental Allergy*. sept 2011;41(9):1226-34.
60. Sampson HA, Aceves S, Bock SA, James J, Jones S, Lang D, et al. Food allergy: A practice parameter update—2014. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. nov 2014;134(5):1016-1025.e43.
61. Lee S, Hess EP, Nestler DM, Bellamkonda Athmaram VR, Bellolio MF, Decker WW, et al. Antihypertensive medication use is associated with increased organ system involvement and hospitalization in emergency department patients with anaphylaxis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. avr 2013;131(4):1103-8.
62. Ruëff F, Przybilla B, Biló MB, Müller U, Scheipl F, Aberer W, et al. Predictors of severe systemic anaphylactic reactions in patients with Hymenoptera venom allergy: Importance of baseline serum tryptase—a study of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. nov 2009;124(5):1047-54.
63. Caimmi S, Caimmi D, Bernardini R, Caffarelli C, Crisafulli G, Pingitore G, et al. Perioperative Anaphylaxis: Epidemiology. *Int J Immunopathol Pharmacol*. juill 2011;24(3\_suppl):21-6.
64. Harper NJN, Cook TM, Garcez T, Farmer L, Floss K, Marinho S, et al. Anaesthesia, surgery, and life-threatening allergic reactions: epidemiology and clinical features of perioperative anaphylaxis in the 6th National Audit Project (NAP6). *British Journal of Anaesthesia*. juill 2018;121(1):159-71.
65. Tacquard C, Collange O, Gomis P, Malinovsky JM, Petitpain N, Demoly P, et al. Anaesthetic hypersensitivity reactions in France between 2011 and 2012: the 10th GERAP epidemiologic survey. *Acta Anaesthesiol Scand*. mars 2017;61(3):290-9.
66. Florvaag E, Johansson SGO, Öman H, Harboe T, Nopp A. Pholcodine stimulates a dramatic increase of IgE in IgE-sensitized individuals. A pilot study. *Allergy*. janv 2006;61(1):49-55.

67. Baldo BA, Fisher MMcD. Anaphylaxis to muscle relaxant drugs: Cross-reactivity and molecular basis of binding of IgE antibodies detected by radioimmunoassay. *Molecular Immunology*. déc 1983;20(12):1393-400.
68. Baldo BA, Fisher MM, Pham NH. On the origin and specificity of antibodies to neuromuscular blocking (muscle relaxant) drugs: an immunochemical perspective. *Clinical & Experimental Allergy*. mars 2009;39(3):325-44.
69. de Pater GH, Florvaag E, Johansson SGO, Irgens Å, Petersen MNH, Guttormsen AB. Six years without pholcodine; Norwegians are significantly less IgE-sensitized and clinically more tolerant to neuromuscular blocking agents. *Allergy*. mai 2017;72(5):813-9.
70. Florvaag E, Johansson SGO. The pholcodine Case. Cough Medicines, IgE-Sensitization, and Anaphylaxis: A Devious Connection. *World Allergy Organization Journal*. 2012;5(7):73-8.
71. Findlay JWA. PHOLCODINE. *J Clin Pharm Ther*. févr 1988;13(1):5-17.
72. Chen Z, Bochner F, Somogyi A. Pharmacokinetics of pholcodine in healthy volunteers: single and chronic dosing studies. *British Journal of Clinical Pharmacology*. oct 1988;26(4):445-53.
73. Substances Pholcodine - VIDAL eVIDAL [Internet]. [cité 8 nov 2022]. Disponible sur: <https://evidal-vidal-fr-s.docadis.univ-tlse3.fr/substance/details/2753/pholcodine.html>
74. Wong CL, Ghassabian S, Smith MT, Lam AL. In vitro methods for hazard assessment of industrial chemicals – opportunities and challenges. *Front Pharmacol* [Internet]. 5 mai 2015 [cité 10 oct 2022];6. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fphar.2015.00094/abstract>
75. Cho S, Choi M, Park S, An S, Park J. Application of Spectro-DPRA, KeratinoSens<sup>TM</sup> and h-CLAT to estimation of the skin sensitization potential of cosmetics ingredients. *J Appl Toxicol*. févr 2020;40(2):300-12.
76. Reuter H, Spieker J, Gerlach S, Engels U, Pape W, Kolbe L, et al. In vitro detection of contact allergens: Development of an optimized protocol using human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells. *Toxicology in Vitro*. févr 2011;25(1):315-23.
77. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*. 1 avr 1994;179(4):1109-18.
78. Makarenkova VP, Esche C, Kost NV, Shurin GV, Rabin BS, Zozulya AA, et al. Identification of delta- and mu-type opioid receptors on human and murine dendritic cells. *Journal of Neuroimmunology*. juill 2001;117(1-2):68-77.
79. Messmer D, Hatsukari I, Hitosugi N, Schmidt-Wolf IGH, Singhal PC. Morphine reciprocally regulates IL-10 and IL-12 production by monocyte-derived human dendritic cells and enhances T cell activation. *Mol Med*. déc 2006;12(11-12):284-90.

80. Baldo BA, Fisher MM. Substituted ammonium ions as allergenic determinants in drug allergy. *Nature*. nov 1983;306(5940):262-4.
81. Stevens CW, Aravind S, Das S, Davis RL. Pharmacological characterization of LPS and opioid interactions at the toll-like receptor 4. *Br J Pharmacol*. mars 2013;168(6):1421-9.
82. Zhang P, Yang M, Chen C, Liu L, Wei X, Zeng S. Toll-Like Receptor 4 (TLR4)/Opioid Receptor Pathway Crosstalk and Impact on Opioid Analgesia, Immune Function, and Gastrointestinal Motility. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2020 [cité 8 nov 2022];11. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.01455>
83. Migdal C, Botton J, El Ali Z, Azoury ME, Guldemann J, Giménez-Arnau E, et al. Reactivity of Chemical Sensitizers Toward Amino Acids In Cellulo Plays a Role in the Activation of the Nrf2-ARE Pathway in Human Monocyte Dendritic Cells and the THP-1 Cell Line. *Toxicological Sciences*. juin 2013;133(2):259-74.
84. Al-Hashimi M, Scott SWM, Thompson JP, Lambert DG. Opioids and immune modulation: more questions than answers. *British Journal of Anaesthesia*. juill 2013;111(1):80-8.
85. Bidlack JM, Khimich M, Parkhill AL, Sumagin S, Sun B, Tipton CM. Opioid Receptors and Signaling on Cells from the Immune System. *Jrnl Neuroimmune Pharm*. sept 2006;1(3):260-9.
86. Chen ZR, Irvine RJ, Somogyi AA, Bochner F. Mu receptor binding of some commonly used opioids and their metabolites. *Life Sciences*. janv 1991;48(22):2165-71.
87. Roy S, Loh HH. Effects of opioids on the immune system. *Neurochem Res*. nov 1996;21(11):1375-86.
88. Al-Hasani R, Bruchas MR. Molecular Mechanisms of Opioid Receptor-dependent Signaling and Behavior. *Anesthesiology*. 1 déc 2011;115(6):1363-81.
89. Valentino RJ, Volkow ND. Untangling the complexity of opioid receptor function. *Neuropsychopharmacol*. déc 2018;43(13):2514-20.
90. Zhou Y, Wu J, Liu C, Guo X, Zhu X, Yao Y, et al. p38 $\alpha$  has an important role in antigen cross-presentation by dendritic cells. *Cell Mol Immunol*. mars 2018;15(3):246-59.
91. Azzam AAH, McDonald J, Lambert DG. Hot topics in opioid pharmacology: mixed and biased opioids. *British Journal of Anaesthesia*. juin 2019;122(6):e136-45.

# Study of dendritic cell activation by pholcodine in type 1 hypersensitivity reaction

## Abstract

Perioperative anaphylaxis are serious events that can lead to the death of the patient. Neuromuscular blocking agents (NMBA) are the most frequently incriminated drugs in these reactions in France. NMBA anaphylaxis occurs without any previous exposure to a NMBA in about 30% of cases, which is in contradiction with the physiopathology of the allergic reaction itself. Based on this observation, the existence of a cross-reaction between NMBAs and other molecules with a similar chemical structure has been proposed. NMBAs have quaternary ammonium groups (AQ), which are found in many cleaning products, disinfectants, cosmetics, or drugs. Several epidemiological studies have shown a link between pholcodine, an anti-tussive molecule possessing the AQ motif, and the occurrence of perioperative anaphylaxis, reinforcing the hypothesis of cross-sensitization. To show that pholcodine can be a sensitizer-agent, we studied its ability to activate dendritic cells (DCs), by measuring an increase of CD83 expression and costimulatory markers CD80 and CD86 expressions. We also investigated the signaling pathways involved in this mechanism and the role of opioid receptors in the activation of DCs by pholcodine.



Auteur : Virginie Paulet

Titre : Étude de l'activation des cellules dendritiques par la pholcodine dans la réaction d'hypersensibilité de type 1

Directeur de thèse : Dr Luc de Chaisemartin

Lieu et date de soutenance : Toulouse, le 18 Janvier 2023

## RESUME

Les réactions anaphylactiques peropératoires sont des événements graves pouvant conduire au décès du patient. En France, les curares sont les substances les plus fréquemment incriminées dans ces réactions. Cependant, dans environ 30% des cas, elles apparaissent sans exposition antérieure à un curare ce qui est en contradiction avec la physiopathologie même de la réaction allergique. Sur cette constatation, l'existence d'une réaction croisée entre les curares et d'autres molécules possédant une structure chimique proche a été proposée. Les curares possèdent des groupements ammonium quaternaires (AQ), retrouvés dans des nombreux produits de nettoyage, des désinfectants, des cosmétiques, ou des médicaments. Plusieurs études épidémiologiques ont montré un lien entre la pholcodine, molécule antitussive possédant le motif AQ, et la survenue de chocs aux curares, renforçant l'hypothèse d'une sensibilisation croisée. Pour montrer que la pholcodine peut être une substance sensibilisante, nous avons étudié sa capacité à activer les cellules dendritiques (DC), activation mesurée par une augmentation de l'expression du CD83 et de marqueurs de costimulation CD80 et CD86. Nous avons également recherché les voies de signalisation impliquées dans ces mécanismes et le rôle des récepteurs opioïdes dans l'activation des DC par la pholcodine.

---

**DISCIPLINE administrative** : immunologie, toxicologie

---

**MOTS-CLES** : pholcodine, cellules dendritiques, curares, ammonium quaternaire, choc anaphylactique

---

**INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE** :

Faculté de Pharmacie, Université Paris-Saclay, 19 avenue des Sciences, 91400 Orsay