



**HAL**  
open science

# Etude de l'initiation de la tolérance de l'immunothérapie spécifique aux venins d'hyménoptères par ultra-rush

Guillaume Mahay

## ► To cite this version:

Guillaume Mahay. Etude de l'initiation de la tolérance de l'immunothérapie spécifique aux venins d'hyménoptères par ultra-rush. Immunothérapie. Normandie Université, 2019. Français. NNT : 2019NORMR091 . tel-03905723

**HAL Id: tel-03905723**

**<https://theses.hal.science/tel-03905723>**

Submitted on 19 Dec 2022

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

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

# THÈSE

**Pour obtenir le diplôme de doctorat**

**Spécialité** : Science de la vie et de la Santé

**Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie**

**Étude de l'initiation de la tolérance dans l'immunothérapie spécifique aux venins d'hyménoptères par ultra-rush**

**Présentée et soutenue par  
Guillaume MAHAY**

**Thèse soutenue publiquement le (date de soutenance)  
devant le jury composé de**

Pr Antoine MAGNAN	PU-PH, Nantes	Rapporteur
Dr Joana VITTE	MCU-PH, Marseille	Rapporteur
Pr Luc THIBERVILLE	PU-PH, Rouen	Directeur de thèse
Dr Jérémie MARTINET	PU-PH, Rouen	Codirecteur de thèse

**Thèse dirigée par le Professeur Luc THIBERVILLE et le Docteur Jérémie MARTINET, laboratoire Physiopathologie, Auto-immunité, maladies Neuromusculaires et THÉrapies Régénératrices, INSERM U1234**



## Résumé en français

L'immunothérapie spécifique (ou désensibilisation) aux venins d'hyménoptères est un traitement qui permet de prévenir la récurrence d'une anaphylaxie chez les patients allergiques au venin de guêpe ou d'abeille. Une augmentation très rapide des doses est souvent utilisée lors de la phase initiale de ce traitement dont la bonne tolérance n'est pas bien expliquée.

Le but de ce travail était de décrire les changements précoces du système immunitaire pendant l'initiation de l'immunothérapie aux venins d'hyménoptères pouvant expliquer cette bonne tolérance.

Nous avons inclus 29 patients traités pour une allergie au venin d'hyménoptères avec une initiation de traitement par « ultra-rush » en 3h30. Des prélèvements sanguins ont été pratiqués avant le début du traitement, à 1h30 et juste avant la dernière injection de venin. L'évolution de la tryptase sanguine a été analysée. L'activation des polynucléaires basophiles ainsi que l'expression FcεRI à leur surface ont été analysées par intensité moyenne de fluorescence par cytométrie en flux. Pour évaluer l'évolution de la réactivité des polynucléaires basophiles, un test d'activation des basophiles (TAB) a été réalisé à chaque temps. L'évolution des populations lymphocytaires T et myéloïdes a été également analysée par cytométrie en flux.

Nous avons montré une diminution significative de la tryptase sérique pendant l'ultra-rush, de même qu'une diminution significative de l'activation des polynucléaires basophiles et une diminution de l'expression de FcεRI à leur surface. Étonnamment, le TAB a montré une réponse *in vitro* des basophiles significativement plus élevée à l'extrait de venin à la fin de « l'ultra-rush » par rapport à avant le début du traitement. Nous avons également montré une augmentation significative des cellules dendritiques et une diminution significative des lymphocytes « Natural Killer » (NK) dans le sang. Concernant les populations lymphocytaires T, nous avons montré une augmentation significative des populations lymphocytaires T dans le sang, sauf pour les Lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> naïfs.

En conclusion, l'augmentation des doses de venin par « ultra-rush » est bien tolérée grâce à une inhibition des polynucléaires basophiles impliquant une diminution de l'expression de FcεRI à leur surface. L'ultra-rush entraîne également des modifications précoces dans la réponse immunitaire innée et adaptative.

## Titre en anglais

Study of the initiation of tolerance in allergen specific immunotherapy to hymenoptera venom by ultra-rush

## Résumé en anglais

Hymenoptera venom immunotherapy (VIT) is a treatment that prevents sting inducing anaphylaxis in allergic patient. Fast-up dosing schedule are often used at the initial phase of VIT. This fast dosing schedule well tolerated, but the mechanisms behind this good tolerance have not yet been elucidated, as well as its consequences on the rest of the immune systems.

The aim of this study is to describe early immune system change during initial phase of VIT

We included 29 patients undergoing VIT by 3h30 ultra-rush up dosing phase. Blood puncture was performed before the beginning of the treatment, at 1h30 and just before the last venom injection. Blood tryptase evolution was measured. Basophils phenotype and FcεRI surface expression were analyzed by flow cytometry at each step of the ultra-rush. To assess basophils responsiveness evolution, basophils activation test (BAT) was also perform. Myeloid and T lymphocytes population's evolution were analyzed by flow cytometry.

We have shown a significantly lower concentration of blood tryptase at the end of ultra-rush, and a significantly lower basophils activation and FcεRI expression. Surprisingly, BAT has shown a significantly higher in vitro response to venom extract at the end of ultra-rush. We also found significantly increase in blood dendritic cells concentration and lower blood Natural Killer (NK) Cells. We observed higher lymphocytes population in blood except for naïve CD4+ and CD8+ T cells.

In conclusion, ultra-rush fast up dosing is well tolerated thanks to a basophils inhibition involving lower FcεRI surface expression. Ultra-rush also leads to early change in innate and adaptive immune response.

### **Mots clés en français**

Désensibilisation, immunothérapie aux venins d'hyménoptères, « ultra-rush », Polynucléaires basophiles, Test d'activation des basophiles, Lymphocytes NK, FcεRI, Mécanismes de la tolérance aux allergènes.

### **Mots clés en anglais**

Allergic immunotherapy, Venom Immunotherapy, Ultra-rush, Basophils, Basophils activation tests, Flow cytometry, Natural killer's cells, FcεRI, Allergen tolerance mechanism.

### **Intitulé et adresse du laboratoire ou la thèse a été préparée**

Laboratoire de Physiopathologie, Autoimmunité, maladies Neuromusculaires et THÉrapies Régénératrices (PANTHER), INSERM UMR\_1234.

Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie

22 boulevard Gambetta

76183 Rouen cedex 1

## Liste des abréviations

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé.  
ARNm : Acide ribonucléique messenger  
BCR : récepteur des cellules B  
BLIMP-1 : protéine de maturation des lymphocytes B  
Btk : tyrosine kinase de Bruton  
CCL : CC « Chemokine Ligand »  
CD : Cluster de différenciation  
CXCL : CXC « Chemokine Ligand »  
DC : Cellules dendritiques  
FcεRI : Récepteur au fragment constant des Immunoglobulines E de type I  
FcγR : Récepteur au fragment constant des Immunoglobulines G  
GATA : « Trans-acting T-cell-specific transcription factor »  
IDR : Intra Dermo Réaction  
IFN γ : Interféron gamma  
Ig : Immunoglobuline  
IL : Interleukine  
ILC : Cellules lymphoïdes innées  
INF : Interféron  
Ins : Inositol  
IRS : Super famille des récepteurs inhibiteurs  
ITAM: « immunoreceptor tyrosine-based activation motif »  
ITIM: « immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif »  
MFI : « Mean Fluorescence Intensity » (fluorescence moyenne)  
moDC : Cellules dendritiques dérivées des monocytes  
PCR : « Polymerase Chain Reaction »  
PGD2 : Prostaglandine D2  
PNE : Polynucléaires éosinophiles  
PNN : Polynucléaires neutrophiles  
PtdIns : phosphatidylinositol  
ROR : « RAR-related orphan receptor »  
SHIP : « Src homology 2 domain containing inositol polyphosphate 5-phosphatase »  
STAT: signal transducer and activator of transcription  
T-bet : « T box expressed in T cells »  
TGF : Facteur de croissance transformant  
TLR : « Toll Like recepteur »  
TNF : Facteur de nécrose tumorale  
TSLP : lymphopoïétine stromale thymique

## Remerciements

A Monsieur le Professeur Luc Thiberville

Vous m'avez fait l'honneur de diriger ce travail

Merci pour votre soutien depuis le début de mon internat jusqu'à aujourd'hui, notamment pour le développement de l'allergologie et de l'asthme sévère au sein de votre service.

A Monsieur le Docteur Jérémie Martinet

Vous m'avez fait l'honneur de m'encadrer au quotidien pour ce travail

Je vous remercie également de m'avoir aidé pour la réalisation des TAB et du dosage des tryptases, mais aussi pour votre aide au quotidien au sein du laboratoire d'immunologie du CHU pour la prise en charge des patients allergiques.

A Monsieur le Professeur Antoine Magnan

Vous me faites l'honneur de juger cette thèse.

Je tiens à tout particulièrement vous remercier pour m'avoir accueilli dans votre équipe de recherche pour mon master 2 il y a quelques années, ainsi que pour tout le soutien que vous m'avez apporté et que vous m'apportez encore au niveau national dans le développement de mes projets pour la prise en charge des patients allergiques et asthmatiques sévères.

A Madame le Docteur Joana Vitte

Vous me faites l'honneur de juger cette thèse, je vous en remercie

A l'ensemble des membres du Jury

Veillez accepter l'expression de ma sincère reconnaissance

Au Professeur Olivier Boyer

Je vous remercie de m'avoir accepté dans votre laboratoire et de m'avoir donné les moyens de réaliser cette recherche

A Monsieur Gäetan Rioux

Merci pour la grande aide que tu m'apportée pour la réalisation des analyses de cytométrie en flux, notamment d'avoir commencé à prendre en charge les prélèvements pendant que je finissais la surveillance des patients, ainsi que pour avoir passé les cellules au cytométrie trieur pour l'ensemble des patients.

A Monsieur le Docteur Laurent Drouot

Merci pour ton aide précieuse dans la réalisation de l'ensemble des opérations de biologie moléculaires et du Luminex®

A l'ensemble des internes du service d'immunologie du CHU de Rouen

Merci pour votre aide dans la réalisation des TAB

A Madame le Docteur Julie Chesne et Monsieur le Docteur Faouzi Braza que je n'ai malheureusement pas vu depuis plusieurs années

Merci d'avoir assumé avec « brio » la très lourde tâche de m'encadrer pendant mon master 2. Vous m'avez donné le gout de la recherche et j'espère que ce travail fait honneur à tout ce que vous m'avez appris

A l'ensemble des pneumologues du service de pneumologie du CHU de Rouen,

Merci pour votre aide au quotidien notamment quand j'ai dû m'absenter du service pour aller réaliser ce travail au laboratoire.



A mes parents Andrée et Arnaud Mahay

Je vous remercie de m'avoir permis de faire ce fabuleux métier

Je remercie ma mère pour son aide dans la relecture de ce travail, notamment de l'article en Anglais

A toi Laure ma femme

Je te remercie pour tout le bonheur et le soutien que tu m'apportes au quotidien. Je te remercie également d'avoir pris le temps de relire ce travail.

Je t'aime

Un petit mot pour ma future fille, toi qui vas naître de manière imminente au moment où j'écris ces lignes, je vais bientôt avoir la joie de te connaître et de devenir père. Tu sais, je ne sais pas vraiment comment je serai en tant que père mais je m'imagine te voir évoluer avec fierté jusqu'à ce que tu prennes ton envol et regretter déjà le temps où je te tenais dans mes bras la nuit. J'espère que je serai à la hauteur de ce nouveau défi qui s'offre à moi et que tu seras un jour fière de ton papa.

## Table des matières

Résumé en français .....	2
Titre en anglais .....	3
Résumé en anglais.....	3
Mots clés en français.....	4
Mots clés en anglais .....	4
Intitulé et adresse du laboratoire ou la thèse a été préparée .....	4
Liste des abréviations.....	5
Remerciements .....	6
Table des illustrations .....	11
Introduction.....	12
Mécanisme de l’hypersensibilité de type 1.....	12
La phase de sensibilisation .....	12
La phase de révélation .....	14
Histoire de l’immunothérapie anti allergénique.....	18
L’allergie aux venins d’hyménoptères.....	21
Le venin d’abeille.....	22
Le venin de guêpe commune .....	22
Manifestations cliniques .....	23
Bilan initial .....	24
La désensibilisation aux venins .....	25
Les mécanismes d’action de l’immunothérapie spécifique .....	26
Voies d’inhibition des mastocytes et des basophiles.....	34
Article .....	39

Résultats complémentaires.....	69
Tests d'activation des basophiles.....	69
Populations leucocytaires .....	70
Cytokines et Chimiokines .....	73
ARN messenger .....	75
Discussion.....	77
Bibliographie .....	83

## Table des illustrations

Figure 1 : Description de la phase de sensibilisation .....	14
Figure 2 : Description de la phase de révélation.....	17
Figure 3 : Voie de signalisation de FcεRI .....	18
Figure 4 : Voie de signalisation de FcγRIIB).....	36
Figure 5 : Test d'activation des basophiles réalisé avec le venin auquel le patient est désensibilisé à la concentration de 11.5 ng/ml. ....	69
Figure 6 : Test d'activation des basophiles réalisé avec le venin auquel le patient est désensibilisé à la concentration de 11.5 pg/ml. ....	69
Figure 7 : Evolution du nombre absolu de leucocytes en G/L dans le sang.....	71
Figure 8 : Evolution du nombre absolu de PNN en G/L dans le sang.....	71
Figure 9 : Evolution du nombre absolu de PNE en G/L.....	72
Figure 10 : Evolution du nombre absolu des monocytes en G/L.....	72
Figure 11 : Evolution du nombre absolu des lymphocytes Th1, Th2 et Th17 en G/L .....	73
Figure 12 : Evolution de la concentration en TNFα, IP-10 (CXCL10) et interféron γ.....	74
Figure 13 : Evolution de la concentration de l'IL-7, IL-12p70, IL-18 et IL-23 .....	75
Figure 14 : Evolution de l'ARN messenger de SHIP-1.....	76
Figure 15 : Evolution de l'ARN messenger du récepteur de type 4. ....	76

## Introduction

### Mécanisme de l'hypersensibilité de type 1

Gell et Coombs classent l'hypersensibilité en 4 types en 1963, cette classification est encore utilisée aujourd'hui (1). L'anaphylaxie, au même titre que l'asthme allergique et la rhinite allergique correspond au type I de cette classification. C'est donc sur ce type d'hypersensibilité qu'agit la désensibilisation.

### La phase de sensibilisation (Figure 1)

Comme l'avaient montré en 1902 Richets et Portier sans encore en comprendre les mécanismes, l'hypersensibilité de type 1 nécessite d'abord une phase de sensibilisation. Cette phase de sensibilisation conduit, entre autres à la production d'IgE. Cette phase de sensibilisation commence par un dysfonctionnement au niveau des cellules épithéliales et des cellules dendritiques qui conduit à l'initiation, en réponse à un antigène, d'une réponse immunologique de type 2. L'allergène, qui est bien souvent une protéine soit avec une activité protéase, soit qui est reconnue par un récepteur de type «Toll Like Recepteur» (TLR), favorise lors de sa pénétration dans l'organisme la sécrétion de signaux de dangers (tels que CC « Chemokine Ligand » (CCL) 2, CCL20, L'IL-33, la lymphopoïétine stromale thymique (TSLP), L'IL-25) par les cellules épithéliales chez des sujets prédisposés. Ce milieu pro-inflammatoire de type 2 favorise le recrutement de cellules innées de type 2 comme les cellules lymphoïdes innées (ILC)-2 et les polynucléaires basophiles qui eux-mêmes vont produire notamment de l'IL-13 qui va recruter les cellules dendritiques. Sous l'influence de ces cytokines pro T2, les cellules dendritiques dérivées des monocytes (moDC), qui ont la particularité d'exprimer le cluster de différenciation (CD) 11c et un sous type de cellules dendritiques, les cellules dendritiques de type 2 (DC2) vont présenter l'antigène aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs et favoriser leur différenciation en lymphocytes Th2, avec l'aide de polynucléaires basophiles qui sécrètent de l'IL-4 (2). Cependant, l'ensemble de ces mécanismes ont été décrits suite à expériences murines et il existe des disparités notamment au niveau des cellules dendritiques entre la souris et l'homme. Le reste de la

phase de sensibilisation est mieux connue. Sous l'influence de l'IL-13 et de l'IL-4 sécrétées par les lymphocytes TH2, les lymphocytes B dont le récepteur des cellules B (BCR) a reconnu l'antigène vont réaliser leur commutation isotopique vers les IgE en se transformant en plasmocytes sous l'influence de deux facteurs de transcription, BLIMP-1 (B-cell maturation protein) et la X-Box Protéine (3). Ils vont ensuite produire des IgE qui vont se retrouver dans la circulation puis se fixer aux récepteurs aux IgE, principalement FcεRI, qui sont présents à la surface des mastocytes, des polynucléaires basophiles, des cellules dendritiques et des polynucléaires éosinophiles.

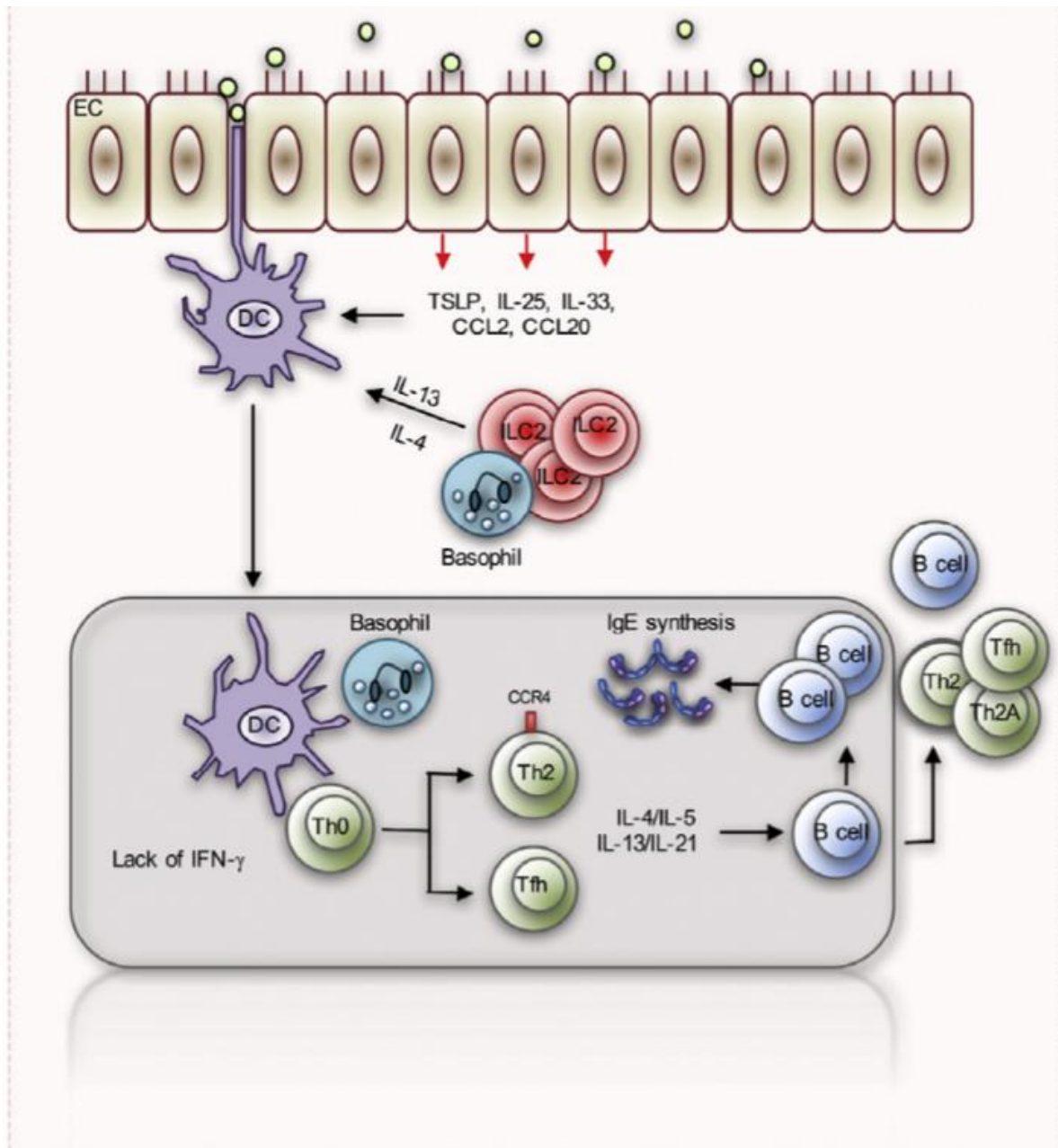


Figure 1 : Description de la phase de sensibilisation d'après Shamji et al. JACI 2017 (4)

### La phase de révélation (Figure 2 et Figure 3)

FcεRI est un récepteur exprimé à la surface des mastocytes et des polynucléaires basophiles sous sa forme tétramérique. Il comprend une sous unité alpha, une sous unité beta et deux

sous unités gamma. Lors d'un nouveau contact avec l'allergène, les différents épitopes d'un antigène seront reconnus par plusieurs IgE fixées aux récepteurs FcεRI. Cette reconnaissance conduit à l'agrégation des récepteurs FcεRI à la surface des basophiles et des mastocytes et cette agrégation conduit à la phosphorylation des motifs ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) présents dans la partie cytoplasmique des sous unités bêta et gamma. Cette phosphorylation est médiée par Lyn qui est associée à la sous unité bêta de FcεRI et qui est donc activée par l'agrégation des récepteurs FcεRI secondaire à la reconnaissance de l'antigène. Les domaines SH2 des motifs ITAM des sous unités gamma vont former des tandems qui recruteront la tyrosine kinase Syk. Syk comprend parmi ses substrats la phospholipase Cγ qui une fois activée hydrolyse le phosphatidylinositol (PtdIns)(4,5)P<sub>2</sub> en inositol (Ins)(1,4,5)P<sub>3</sub> et en diacylglycérol. Ces deux seconds messagers modulent le calcium intracellulaire et activent des protéines kinases C qui provoquent la réorganisation du cytosquelette conduisant à la dégranulation des mastocytes et des basophiles mais aussi à la modification de l'expression des gènes notamment ceux codants pour différentes cytokines et chemokines (Cf ci-dessous) au sein de ces cellules. L'agrégation des récepteurs FcεRI va également activer la phosphatidylinositol 3 (PI3) kinase. Celle-ci va produire le PtdIns (3,4,5)P<sub>3</sub> à partir du PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. Le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> va permettre le recrutement à la membrane cellulaire et l'activation de la tyrosine kinase de Bruton (Btk) qui induit JNK, SAPK et la MAP kinase p38. Btk a également pour substrat la phospholipase Cγ (ou PLCγ). L'agrégation des récepteurs FcεRI stimule aussi le recrutement et l'activation de p21<sup>ras</sup> qui déclenche la cascade d'activation Ras/Raf-1/MEK/Erk, mais active également JNK la MAP kinase p38, la PI3 Kinase mais aussi d'autres GTPases. Cette cascade d'activation permet la translocation de nombreux facteurs de transcription au noyau cellulaire, conduisant à la production de nombreuses cytokines et chémokines (5).

L'activation des mastocytes et des polynucléaires basophiles va donc conduire à la libération de médiateurs en 2 temps. Tout d'abord les granules contenant des médiateurs pré-formés vont très rapidement libérer leur contenu, puis les mastocytes et les polynucléaires basophiles activés, via une modification de la transcription dans le noyau cellulaire, vont



produire différents médiateurs après quelques heures. Ces médiateurs sont de plusieurs types. Le plus connu d'entre eux est l'histamine qui via ses récepteurs H1, H2, H3 et H4 va avoir pour effet une contraction des muscles lisses, une vasodilatation, une augmentation de la perméabilité vasculaire et une augmentation de la sécrétion de mucus. L'histamine est très rapidement métabolisée par méthylation ou oxydation. Un autre médiateur contenu dans les granules et libéré en grande quantité est la tryptase, la protéase la plus abondante dans les granules des mastocytes et des basophiles. La tryptase a pour action de favoriser la contraction du muscle lisse, de dégrader des neuropeptides, d'activer la collagénase, de favoriser la prolifération des fibroblastes, de générer les fractions du complément C3a et C3b et de la bradykinine et d'inactiver le fibrinogène. La tryptase est plus stable que l'histamine et peut être facilement dosée dans le sang. Son augmentation deux heures après une réaction pouvant évoquer un choc anaphylactique permet de confirmer le diagnostic. Une autre protéase libérée est la Chymase qui génère de l'angiotensine II à partir de l'angiotensine I mais qui favorise aussi la sécrétion de mucus, la dégradation de la matrice extracellulaire, l'activation de métalloprotéase et du TGF bêta. Des médiateurs lipidiques sont également synthétisés *de novo* après l'activation des mastocytes et des polynucléaires basophiles, via l'activation de la phospholipase A2 qui synthétise de l'acide arachidonique à partir de des phospholipides membranaires. L'acide arachidonique est ensuite métabolisé en prostaglandine par la cyclooxygénase et en leucotriène par la lipooxygénase. La prostaglandine principalement synthétisée après activation est la prostaglandine D2 (PGD2) qui a une action vasodilatatrice et d'augmentation de la perméabilité vasculaire ainsi que de recrutement des polynucléaires éosinophiles. Les leucotriènes vont favoriser la contraction du muscle lisse, la production de mucus et le recrutement des polynucléaires neutrophiles ainsi qu'augmenter la perméabilité vasculaire. Les mastocytes et les polynucléaires basophiles ont également un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire et après activation vont sécréter du TNF alpha (qui est également présent sous forme préformée dans les vésicules), de l'IL-1bêta, de l'IL-4, IL-5, IL-13, IL-6, IL-12, IL-15, IL-16, IL-18, du GM-

CSF, de l'interféron  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , ainsi que plusieurs chémokines (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 et CXCL8) (6).

L'ensemble de ces médiateurs expliquent les symptômes qui sont présents rapidement après le contact avec l'allergène mais aussi les symptômes retardés.

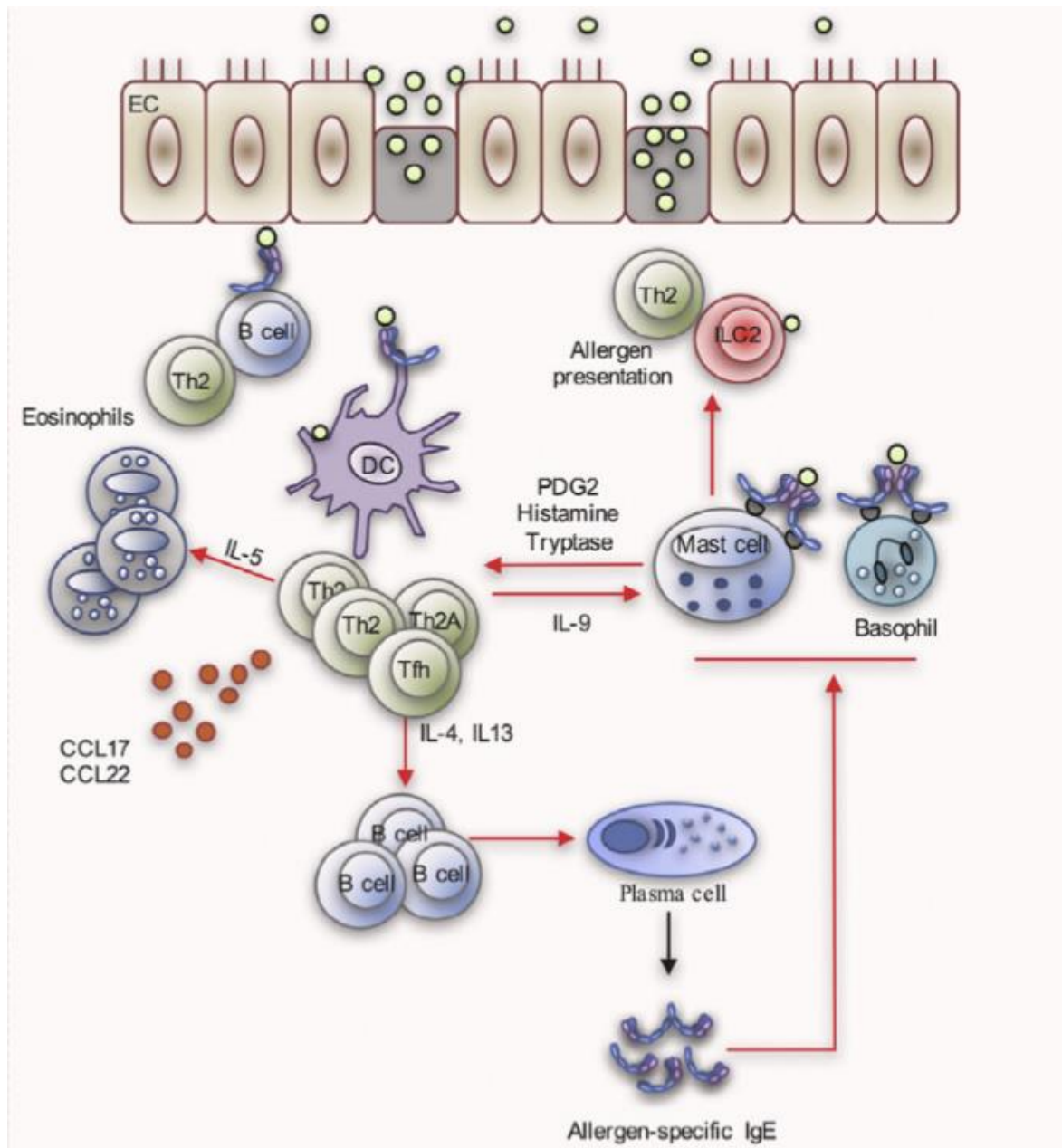


Figure 2 : Description de la phase de révélation d'après Shamji et al. JACI 2017 (4)

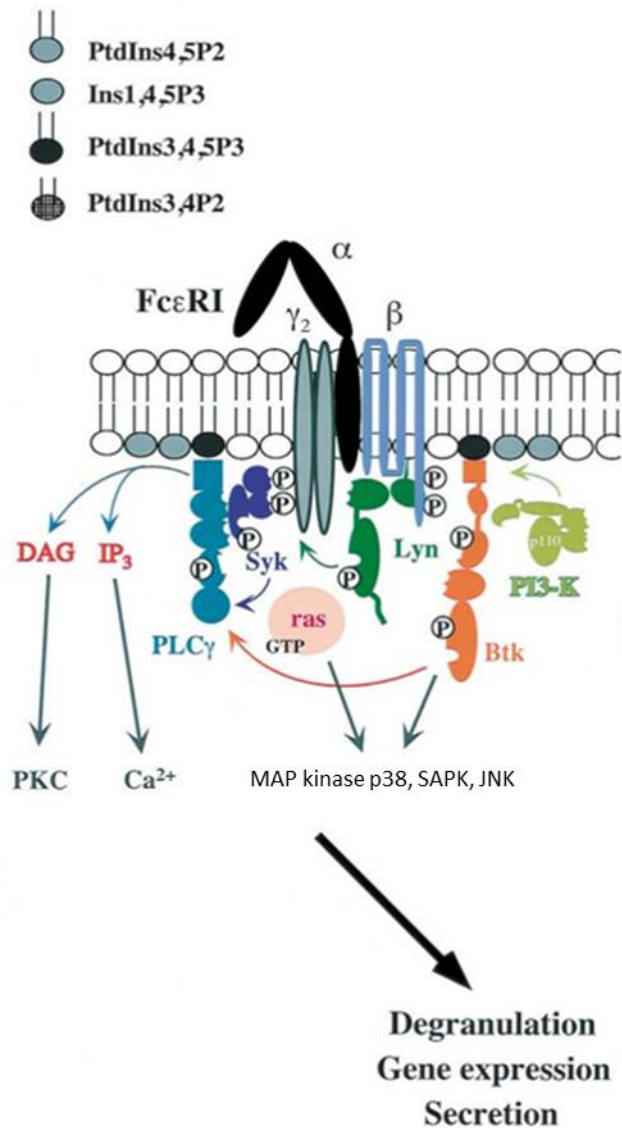


Figure 3 : Voie de signalisation de FcεRI adapté d'après Ott et al. JACI 2000 (5)

### Histoire de l'immunothérapie anti allergénique

L'immunothérapie anti allergénique ou désensibilisation a été utilisée pour la première fois chez l'homme en 1911 par Leonhard Noon puis John Freeman sans doute inspiré par le

travail d'Alexandre Besredka (cf ci-dessous) (7,8). Il avait été auparavant constaté que les rhino conjonctivites saisonnières survenant de mai à juillet pouvaient être reproduites en administrant sur l'œil du pollen de graminée en dehors de la saison. Partant de l'hypothèse que certains individus régissaient à une « Toxine » présente dans le pollen de graminée auquel le reste de la population n'était pas sensible, ils ont tenté d'administrer en sous cutané de l'extrait de pollen de graminée à ces patients dans le but de leur faire produire ce qu'ils pensaient être une « anti toxine ». Ils ont ainsi constaté qu'en injectant des faibles doses à intervalle régulier de quelques jours, ils pouvaient progressivement augmenter les doses et que les patients réagissaient moins aux tests conjonctivaux après quelques mois de traitement puis développaient moins de symptômes pendant la saison pollinique.

Les populations dans les études ont progressivement été augmentées dans les années 1920 et 30, aidées par la création des premiers départements d'immunologie, notamment à New York sous la direction de Robert A. Cook et Arthur F. Coca. Les premiers cas d'anaphylaxie pendant les tests ou les désensibilisations ont également été décrits à cette période (9). John Freeman a également décrit les premières augmentations de doses sous forme de rush à cette période (10). La dose d'allergène été augmentée de 10 à 20% tous les jours. C'est d'ailleurs à cette époque que le terme allergie s'impose progressivement.

Après la guerre ont été réalisées les premières études contrôlées de désensibilisation, notamment celle de 1954 par A.W. Frankland avec des pollens de graminées (11). 2 ans plus tard Loveless démontra qu'une désensibilisation réalisée avec de l'extrait de Sac à Venin protégeait les patient allergiques en cas de nouvelle piqure (provoquée pour le protocole) (12). Il s'agissait de la première étude dans laquelle été utilisé du venin purifié et non de l'extrait total de corps d'insecte. Toutefois il aura fallu attendre 1978 pour que la première étude randomisée contrôlée soit réalisée (13). Il y avait 3 groupes avec entre 20 et 11 patients par groupe, un groupe placebo, un groupe désensibilisé avec de l'extrait de corps entier d'hyménoptères et un groupe avec du venin purifié. Seul le groupe traité avec du venin purifié était différent significativement du placebo. En effet 7 patients sur 12 réagirent

dans le groupe placebo après 10 semaines de traitement, 7 sur 11 dans le groupe « extrait de corps entier » et seulement 1 sur 18 dans le groupe extrait de venin purifié. Depuis, non seulement l'intérêt de la désensibilisation aux venins a été démontré, mais aussi l'extrait de venin s'est imposé pour la réalisation de la désensibilisation.

Progressivement, les schémas thérapeutiques d'augmentation de doses se sont accélérés, même si plusieurs protocoles sont encore utilisés aujourd'hui. Aucun protocole n'a démontré de supériorité par rapport à un autre et certaines équipes dans le monde utilisent encore une montée de dose lente, en partant de 0.01 µg en doublant la dose toutes les semaines, sur plusieurs mois (14). D'autres utilisent un protocole de type rush au cours desquelles la dose est augmentée progressivement sur 4 jours, en partant de 0.001 µg et en doublant toutes les 30 min au début puis les intervalles sont progressivement espacés (15). En France aujourd'hui, le protocole le plus utilisé est celui de type ultra rush, la dose cible de 101.1 µg est administrée en 3h30 (16). Sont d'abord injectées toutes les 30 minutes 0.1µg puis 1 µg puis 10 µg puis 20µg et ensuite toutes les heures 30 µg puis 40µg. Il est aujourd'hui recommandé de traiter les patients par anti-histaminique avant de débiter la désensibilisation afin de diminuer les risques de réactions locale. La dose d'entretien recommandée aujourd'hui est de 100 µg d'extrait de venin (17). Cette dose peut être augmentée à 200 µg en cas de réaction lors d'une injection de rappel, chez le patient atteint de mastocytose ou chez l'apiculteur car il a été montré qu'une dose de 200 µg permettait de protéger un patient qui avait récidivé une réaction généralisée après piqure accidentelle alors qu'il était déjà désensibilisé à la dose de 100 µg (17,18). La désensibilisation doit durer au minimum 5 ans et doit dans certains cas être poursuivie à vie, notamment en cas de réaction initiale sévère, de réaction systémique durant la désensibilisation, ou chez les apiculteurs poursuivant leur activité (17).

En ce qui concerne les autres désensibilisations notamment aux pollens et aux acariens la situation a également évolué depuis l'après-guerre. Dès les années 60 elle est très utilisée, mais il aura fallu attendre la fin des années 80 et les années 90 pour voir se multiplier les

études randomisées et contrôlées, bien que les effectifs étaient encore faibles et les protocoles variables d'une étude à l'autre (19–21). Vers la fin des années 1990 s'est développée la désensibilisation sublinguale qui est mieux tolérée et tout aussi efficace (22,23). Même si les effectifs des essais augmentent progressivement, la méthodologie reste imparfaite et les essais sont difficilement comparables entre eux (24). Il faut attendre les années 2010 et l'arrivée des comprimés de désensibilisation pour voir des études avec des effectifs importants et de bonne qualité qui mettent en évidence un bénéfice net et une bonne tolérance de la désensibilisation (25–28) dans d'autres indications que l'allergie aux venins d'hyménoptères.

Concernant la désensibilisation aux venins d'hyménoptères, la voie utilisée est toujours la voie sous-cutanée. En effet, même si certains essais ont mis en évidence un intérêt de la voie sublinguale dans cette indication, aucun extrait commercial n'est encore disponible en France pour les venins d'hyménoptères en désensibilisation sublinguale (29).

### **L'allergie aux venins d'hyménoptères**

Les hyménoptères sont un ordre d'insectes dont les fourmis, les abeilles, les guêpes et les frelons font partie. En France les insectes dont le venin peut donner des réactions allergiques sont l'abeille domestique ou *Apis mellifera*, Le guêpe commune ou *Vespula vulgaris*, le frelon européen ou *Vespa crabro*, depuis quelques années le frelon asiatique ou *Vespa velutina*, et la guêpe poliste ou *Polistes dominula* qui n'est pas présente en Normandie.

Ne sont disponibles pour le traitement et le diagnostic que des extraits de venin de guêpe commune, poliste ou d'abeille. Le venin de frelon européen ou asiatique est relativement proche du venin de la guêpe commune et en cas de test et d'IgE positives vis-à-vis de la guêpe commune, un patient qui a eu une réaction après une piqure de frelon sera traité avec du venin de guêpe commune (30).

## **Le venin d'abeille**

On estime qu'une abeille injecte par pique entre 50 à 140 µg de venin par pique.

Un des composants principaux du venin d'abeille est la phospholipase A2 qui représente 10 à 15% des protéines contenues dans le venin d'abeille, il s'agit d'un allergène majeur (plus de 50% des patients allergiques au venin d'abeille sont sensibilisés vis-à-vis de cette protéine) du venin d'abeille et son code dans la nomenclature internationale est api m1. Elle a une action cytotoxique importante et peut activer de manière non spécifique (non IgE médié) les polynucléaires basophiles humains (31).

La hyaluronidase permet de cliver l'acide hyaluronique et donc d'augmenter la perméabilité du tissu conjonctif. Son code dans la nomenclature internationale est api m2. Il s'agit aussi d'un allergène majeur du venin d'abeille.

La phosphatase acide ou api m 3 est un allergène mineur du venin d'abeille, comme la hyaluronidase elle permet une meilleure diffusion de celui-ci.

La metilline ou api m 4 représente 50% du poids du venin, elle est hémolytique, cytotoxique, vasodilatatrice, responsable d'une contraction du muscle lisse et peut provoquer une activation non spécifique des mastocytes et des polynucléaires basophiles. Il s'agit d'un allergène mineur du venin d'abeille.

L'icarapine ou api m 10 est un peptide riche en carbohydrate qui provient du revêtement du canal conducteur du venin. Il n'a donc pas de rôle toxique mais il s'agit d'un allergène majeur qui pose le problème de ne pas être à concentration constante dans les extraits de venin.

Le venin d'abeille contient aussi d'autres substances non immunisantes, notamment de l'histamine (30).

## **Le venin de guêpe commune**

La guêpe injecte entre 10 et 15 microgrammes de protéine par pique.

La phospholipase A1 ou ves v1 est un allergène majeur du venin de guêpe commune qui représente entre 8 et 14% du poids sec du venin. Si son action est proche de la phospholipase A2 de l'abeille, sa structure est différente et il n'existe donc pas de réactions croisées entre les deux.

L'antigène 5 ou ves v 5, est une protéine qui est absente du venin des abeilles. On connaît mal sa fonction mais il s'agit probablement d'une neurotoxine. Il s'agit également d'un allergène majeur.

La hyaluronidase des vespidés ou ves v 2 pour la guêpe commune, a une homologie de séquence importante avec celle des abeilles. Elle expliquerait une bonne partie des réactions croisées entre le venin de guêpe et d'abeille mais il s'agit d'un allergène mineur chez les patients allergiques au venin de guêpe.

Le venin des vespidés contient également des amines biogènes comme l'histamine (30).

### **Manifestations cliniques**

Les piqûres d'hyménoptères peuvent donner des manifestations locales et générales.

Les réactions locales sont la conséquence normale des réactions toxiques et immunitaires déclenchée par le venin. On peut observer une zone œdémateuse et érythémateuse, parfois prurigineuse, qui apparaît rapidement après la piqûre et peut persister quelques jours (32). Lorsque la zone œdémateuse dépasse 10 cm on parle de réaction loco-régionale. Celles-ci persistent plusieurs jours et leur mécanisme est moins bien connu. Dans 5 à 15% des cas les réactions locorégionales peuvent évoluer vers une réaction anaphylactique lors d'une nouvelle piqûre. Les réactions locales et locorégionales ne sont pas une indication à un bilan et une désensibilisation sauf en cas de risque majoré de nouvelle piqûre ou de complication (mastocytose, apiculteur) (30).

Les réactions généralisées sont plus rares, on a observé 0.34% de réactions systémiques après piqûres chez l'enfant (33) et 3.3% chez l'adulte (34). Elles peuvent toucher plusieurs organes. La réaction cutanéomuqueuse est la plus fréquente même si elle peut être absente.



Seule, elle n'est pas grave, sauf en cas d'œdème laryngé. L'atteinte respiratoire est caractérisée, quand elle existe, par l'existence d'une crise d'asthme dont la gravité varie de la simple toux à l'asthme aigu grave. L'atteinte digestive est assez fréquente sous forme de douleurs abdominales brutales et intenses, nausées, vomissements et diarrhées. L'atteinte circulatoire va du simple malaise à l'arrêt cardiaque, elle est liée à la vasodilatation et à la perméabilité vasculaire due à l'anaphylaxie. Les réactions généralisées sont classées en 4 grades de gravité selon Müller, le grade 1 correspondant à l'urticaire simple, le grade 2 à l'angioedème, le grade 3 à l'atteinte respiratoire ou à une confusion et le grade 4 à la chute de la pression artérielle (43).

### **Bilan initial**

Il est recommandé de réaliser un bilan chez tout patient qui a présenté une réaction généralisée après piqure d'hyménoptère ou en cas de réaction locorégionale chez un patient à risque (17). Celui-ci comporte tout d'abord un interrogatoire afin de caractériser l'insecte responsable s'il a été identifié, ainsi que la réaction présentée. On en profitera également pour étudier les facteurs de risques de nouvelles piqures (pratique de l'apiculture, travail en extérieur...) et les facteurs de risques de réactions plus sévères (cardiopathie, traitement par bêtabloquant, inhibiteur de l'enzyme de conversion ou antagonistes de l'angiotensine 2, mastocytose, âge). Le bilan sera ensuite complété par la réalisation de tests cutanés et de dosages d'IgE spécifiques. Les tests cutanés sont réalisés par intradermo réaction (IDR), une petite quantité de venin est injectée dans le derme (0.05 ml). On débute à la concentration de 0.001 µg/ml et on lit le résultat après 15 à 20 minutes. Un témoin positif (à base d'histamine ou de codéine) et un témoin négatif (à base du diluant) doivent également être réalisés. Le test est considéré comme positif s'il existe une papule supérieure à 3 mm ou supérieure au témoin positif, entourée d'un halo érythémateux. Si le test est négatif, on recommence avec une concentration 10 fois supérieure jusqu'à la concentration de 0.1µg/ml. Les venins d'abeille et de la guêpe commune sont systématiquement testés. Si jamais la réaction a eu lieu dans le sud de l'Europe, on pourra tester également le venin de la guêpe poliste (30).

Le bilan est ensuite complété par le dosage des IgE spécifiques vis-à-vis de la guêpe et de l'abeille. En France le dosage est réalisé par une méthode immuno-enzymatique commercialisée par Thermo-Fisher/Phadia, l'immunoCAP. En cas de double positivité, on pourra alors s'aider des dosages d'IgE spécifiques vis-à-vis de protéines spécifiques du venin afin de vérifier s'il s'agit d'une double sensibilisation ou d'une simple réaction croisée. En général le diagnostic de certitude est posé si le patient a présenté une réaction généralisée et que, à la fois le dosage d'IgE spécifique et le test cutané sont positifs. En cas de discordance, on répètera le bilan quelques mois plus tard (30).

Le bilan comprend également un dosage de la tryptasémie basale, si une étude de la cinétique de la tryptase n'a pas été réalisée au moment de la réaction, ce qui n'est malheureusement que très rarement le cas. Ce dosage sert à dépister la mastocytose, une pathologie rare qui est liée à une prolifération clonale, en général bénigne, de mastocytes dans un ou plusieurs tissus. La mastocytose est en effet associée statistiquement à l'allergie aux venins d'hyménoptères et en cas de mastocytose avérée, la désensibilisation sera maintenue à vie (30).

### **La désensibilisation aux venins**

Une fois la décision prise de désensibiliser, la désensibilisation comprend deux phases. La première phase est la phase d'augmentation de doses. Il est recommandé une prémédication par anti histaminique avant les injections au cours de cette phase (17). Aujourd'hui elle se fait en France principalement par « Ultra-rush » avec un protocole en 3h30 pour une dose cumulée de 101.1 µg. 15 jours plus tard, le patient est reconvoqué, et il bénéficie de 2 injections de 50 µg d'extrait de venin à 30 minutes d'intervalle. Enfin 45 jours après la 1ère journée, il bénéficie d'une injection de 100 µg. Pendant cette phase, le patient doit être hospitalisé, la pression artérielle et le pouls sont contrôlés avant chaque injection et 2 heures après la dernière injection, le patient est perfusé par sécurité (16). Ensuite débute la phase des injections de rappel. Au début, les injections sont mensuelles, puis elles peuvent être espacées à toutes les 6 semaines au début de la deuxième année. La troisième année, elles sont ensuite espacées toutes les 8 semaines jusqu'à 5 ans de traitement au

total. Il est en effet recommandé de poursuivre le traitement pendant 5 ans. Passé ce délai, chez les patients à faible risque et a fortiori si les tests se sont négativés, la désensibilisation peut être arrêtée. Il existe toutefois un risque de récurrence de 14% 5 à 10 ans après l'arrêt de la désensibilisation (35). Il faut donc discuter la poursuite de celle-ci au-delà de 5 ans, en cas de risque important de piqure (apiculteurs) ou chez les patients à risque de réaction plus sévère. Si la désensibilisation est poursuivie plus de 5 ans, les injections pourront être espacées jusqu'à toutes les 12 semaines (17). Les injections se font en sous cutané, d'ailleurs, la désensibilisation aux venins d'hyménoptères est presque la seule qui se fait par voie sous cutanée en France, la voie sublinguale ayant montré moins de complications et une efficacité similaire à la voie sous cutanée dans les autres indications. En France en 2015, seule une référence d'extrait de venin d'abeille et de venin de guêpe commune est disponible. Elle est commercialisée par Stallergène-Greer® sous le nom d'Alyostal et est disponible sous forme lyophilisée avec son diluant en dosage de 110 µg et de 550 µg. Elle est reconstituée dans du Diluant HSA (Human Serum Albumin) 0.03% pour une concentration finale de 100 µg par ml. Pour l'abeille, l'extrait de venin est fabriqué à partir de venin d'abeille qui est récupéré par électrostimulation et qui est donc pur. Le venin de guêpe, servant à la fabrication de l'extrait commercialisé, est récupéré quant à lui par dissection du sac à venin, il contient donc le venin mais aussi les protéines du sac à venin.

### **Les mécanismes d'action de l'immunothérapie spécifique**

L'immunothérapie spécifique est donc le seul traitement étiologique des manifestations allergiques médiées par les IgE. Comme expliqué ci-dessus, ce traitement a été développé de manière empirique sans que les mécanismes de l'allergie IgE médiée, ni a fortiori ceux de l'immunothérapie spécifique ne soient connus. La compréhension de ces mécanismes a cependant bien progressé ces dernières années.

Une des premières modifications constatées pendant l'immunothérapie spécifique a été la diminution des IgE (36–38) et une augmentation des IgG, notamment des sous classes IgG1

et IgG4, spécifiques de l'allergène (38,39). Concernant les IgE spécifiques de l'allergène, on constate en début de désensibilisation plutôt une augmentation du taux d'IgE (38) suivie d'une diminution après plusieurs années de traitement. La réponse clinique pendant les premières années d'immunothérapie spécifique serait donc a priori plutôt liée au rôle compétitif des IgG4 sur la fixation des allergènes avec les IgE (40,41).

Cependant, les IgE comme les IgG4 ne sont que des effecteurs dont la sécrétion dépend d'autres types cellulaires. Elles peuvent cependant moduler la réponse immunitaire. Par exemple, il est décrit que les IgG4 rentrent en compétition avec les IgE pour l'allergène et via le récepteur FcγRII2b présent à la surface des lymphocytes B, ils inhibent la présentation d'antigène médiée par les IgE aux lymphocytes T qui favorise une réponse de type Th2 (42–44). La présence d'IgG4 spécifique de l'allergène permet donc d'inhiber l'entretien de la réponse de type Th2. Les IgE comme les IgG4 sont sécrétées par les plasmocytes dérivés des lymphocytes B. Les lymphocytes B ont longtemps été considérés également comme des effecteurs intermédiaires sous l'influence d'autres types cellulaires. Très récemment ont été également décrits une sous population de lymphocytes B aux propriétés immunorégulatrices avec notamment une capacité de production d'IL-10, appelée lymphocytes B régulateurs (B reg) (45). Des travaux ont montré que des lymphocytes B régulateurs spécifiques de la phospholipase A2 producteurs d'IL-10 et d'IgG4 étaient retrouvées augmentées après 110 jours d'immunothérapie spécifique au venin d'abeille par rapport à avant le traitement et qu'ils atteignaient des niveaux comparables à ceux retrouvés chez des apiculteurs non allergiques aux abeilles (46,47). Ces résultats suggèrent donc un rôle non négligeable des lymphocytes B dans le mécanisme de la désensibilisation qui ne se cantonne pas au simple rôle d'effecteurs producteurs d'anticorps.

Cependant, l'action des lymphocytes B est étroitement liée et bien souvent régulée par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> helper. Ainsi, il a été montré que l'un des mécanismes principaux de la tolérance à long terme induite par l'immunothérapie spécifique est un rééquilibrage de la balance entre les différentes réponses T CD4<sup>+</sup>. En 1986 on découvre que les lymphocytes T

CD4<sup>+</sup> peuvent avoir plusieurs types de réponse. Il est décrit à l'époque deux sous types, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th1 et les CD4<sup>+</sup> Th2 (48).

Rapidement il a été émis l'hypothèse que l'allergie était une réponse Th2 anormale vis-à-vis de l'allergène alors que la réponse Th1 était la réponse normale et on a pensé que la désensibilisation permettait de réorienter correctement cette réponse en inhibant les lymphocytes Th2 et en stimulant les lymphocytes Th1 conforté par des observations montrant une augmentation locale de l'IFN  $\gamma$ , une diminution de l'IL-4 et des IgE (49).

Les lymphocytes TH1 sont en effet sécréteurs principalement d'interféron gamma (IFN  $\gamma$ ). Ils sont différenciés sous l'influence de l'IL-12, à partir de lymphocytes T indifférenciés dit Th0 via l'activation de STAT (signal transducer and activator of transcription) 4 (50) et de l'activation du facteur de transcription spécifique des Th1, T-bet (51) (T box expressed in T cells). T-bet augmente l'expression du gène de l'INF  $\gamma$  et inhibe l'expression des gènes de l'IL-4 et de l'IL-5 et donne ainsi le profil TH1 aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Celui-ci permet la promotion de la réponse anti virale et contre les germes intracellulaires. Les lymphocytes Th1 peuvent être différenciés par cytométrie en flux par l'expression du marqueur de surface CXCR3 alors qu'ils n'expriment pas CCR6 et CCR4. (52).

Les lymphocytes TH2 sont quant à eux sécréteurs d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13. Les lymphocytes Th2 se différencient sous l'influence de l'IL-4 via STAT6 (53) et l'activation du facteur de transcription GATA-3 (54) qui augmente l'expression des gènes de l'IL-5 et de l'IL-4 et inhibe l'expression du gène de l'IFN  $\gamma$ . Les lymphocytes Th2 favorisent la réponse anti parasitaire mais aussi allergique via notamment la promotion de la sécrétion d'IgE (55). Les lymphocytes Th2 peuvent être identifiés en cytométrie en flux par l'expression du marqueur de surface CCR4 alors qu'ils n'expriment pas CCR6 et CXCR3.

Cependant d'autres études suggéraient plutôt une diminution à la fois de la réponse TH1 et TH2 (56) avec une augmentation de l'IL-10 sécrétées par un autre type de lymphocytes CD4<sup>+</sup> qui expriment CD25 (57). L'IL-10 est immunosuppressive et favorise aussi la sécrétion

d'IgG4, aux fonctions immunorégulatrices par les lymphocytes B. La découverte des Lymphocytes T CD4<sup>+</sup> régulateur (58) (T reg) à la fin des années 90 ont apporté une lumière nouvelle sur les mécanismes de l'immunothérapie spécifique. Les T reg sont des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> qui ont notamment la particularité de sécréter de l'IL-10, et qui expriment fortement la protéine CD25 et faiblement CD123. C'est l'activation du facteur de transcription Foxp3 (59) qui permet la différenciation en lymphocytes T reg, notamment favorisée par la sécrétion d'IL-10. Rapidement a émergé l'hypothèse que la désensibilisation, plutôt que de favoriser un switch Th2 vers Th1 permet l'émergence de T reg spécifiques de l'allergène, puis une diminution de la réponse Th2 spécifique de l'allergène. Plusieurs études ont rapidement confirmé cette hypothèse(60–63).

Tout d'abord il a été montré une augmentation des T reg dans la muqueuse nasale de patient désensibilisé au pollen de graminées par voie sous cutanée après 2 ans de traitement par rapport aux patients allergiques non traités (60). Il a été aussi montré après un an de désensibilisation par voie orale en comprimé aux acariens une diminution significative des lymphocytes Th2 spécifiques des acariens chez les patients traités et, parmi ceux-ci, ils étaient significativement plus bas chez les patients considérés comme répondeurs (61). De même, il a été démontré que la désensibilisation orale dans l'allergie à l'arachide augmentait, après un an de traitement, la proportion parmi les lymphocytes CD4<sup>+</sup> de T reg spécifiques de l'allergène, alors que les T reg non spécifiques n'étaient pas augmentés. Il a aussi été observé une augmentation de l'expression et une diminution de la méthylation du gène de Foxp3 dans ces T reg spécifiques chez les patients traités (63). Des résultats similaires ont été obtenus chez des souris sensibilisées puis traitées par immunothérapie spécifique à l'arachide par voie épicutanée avec une augmentation de la méthylation de GATA-3 et une diminution de la méthylation de Foxp3 dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (62).

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de type Th17 qui ont essentiellement un rôle connu dans les défenses antifongiques et antibactériennes en sécrétant notamment l'IL-17 et l'IL-21, auraient un rôle dans la rhinite allergique (64) et dans l'asthme (65). Ce sous type de

lymphocytes T expriment CCR4, CCR6 mais pas CXCR3 (52). Le facteur de transcription ROR  $\gamma$ t induit par l'IL-6 et le TGF-béata permet leur différenciation (66). On a pu observer une diminution des lymphocytes Th17 dans le sang des patients après un an de désensibilisation contre les acariens par voie sublinguale (67), leur rôle dans l'allergie et dans l'immunothérapie spécifique n'est pas encore élucidé s'il existe.

D'autres cellules apparentées aux lymphocytes ont été découvertes plus récemment. Il s'agit des lymphocytes innés. Ces cellules n'ont pas de récepteur avec réarrangement comme le TCR (T Cell Receptor) ou le BCR (B Cell Receptor) mais ont des caractéristiques proches des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. On distingue les ILC1 (pour Innate Lymphoide Cells) qui ont une production de cytokines proche des lymphocytes Th1 et qui expriment T-bet, les ILC2 qui ont une production de cytokines proche des lymphocytes Th2 et expriment GATA3, les ILC3 qui ont une production de cytokines proche des lymphocytes Th17 et expriment ROR  $\gamma$ t, et les cellules lymphoïdes innées régulatrices. Ces cellules ne sont pas activées par la reconnaissance spécifique d'un antigène mais par des récepteurs de type Toll Like Receptor (TLR) ou apparentés ou par des cytokines (68). Il a été montré une augmentation moins importante des ILC2 dans le sang pendant la saison pollinique chez des patients allergiques au pollen de graminées désensibilisés par voie sous cutanée par rapport aux patients allergiques non désensibilisés (69). Des résultats similaires ont été retrouvés avec une diminution des ILC2 chez des patients allergiques aux acariens traités par immunothérapie spécifique par voie sous cutanée par rapport aux patients allergiques non traités, cette diminution a été constatée dès la première année et est stable jusqu'à plus de 3 ans après le début du traitement (70). Une autre équipe a également observé une augmentation des ILC1 et une diminution des ILC2 en proportion chez les patients allergiques aux acariens répondeurs à l'immunothérapie spécifique par voie sous cutanée après 2 ans de traitement par rapport aux non répondeurs et aux patients allergiques non traités pour se rapprocher des proportions observées chez les patients non allergiques, mais aussi une diminution de l'activation de ces ILC2 par rapport aux autres groupes de patients allergiques lorsque l'on stimulait des cellules mononuclées du sang périphérique de patients allergiques

désensibilisé avec de l'antigène d'acarien (71). Les cellules lymphoïdes innées régulatrices ont été décrites plus récemment et leur rôle dans l'immunothérapie spécifique n'est pas connu (72).

Les facteurs influençant cette modification de la réponse lymphoïde innée ne sont toutefois pas encore identifiés. Concernant la réponse lymphocytaire T, celle-ci est sous l'influence notamment des cellules présentatrices d'antigène. Nous avons vu plus haut le rôle des lymphocytes B et de la modification de la présentation de l'antigène médiée par les IgE. Il existe toutefois un autre type de cellule présentatrice d'antigène impliquée dans l'allergie et dans la tolérance, les cellules dendritiques. Les cellules dendritiques, selon l'environnement cytokinique, peuvent soit initier et maintenir une réponse de type Th2 et on les appelle alors DC2s (73,74), ou bien promouvoir la tolérance et on les appelle DCreg (75–77). Après 4 mois de désensibilisation par voie sublinguale aux pollens de graminées chez des patients allergiques, il a été noté une augmentation dans le sang des cellules dendritiques notamment des cellules dendritiques régulatrices chez les patients répondant cliniquement au traitement (76). Des résultats similaires ont été obtenus chez l'enfant après 1 an d'immunothérapie spécifique aux acariens par voie sublinguale avec une diminution des DC2 et une augmentation des DCreg (78). Il a également été observé une induction *in vitro* de Treg par des cellules dendritiques issues de la muqueuse buccale de souris désensibilisées par voie orale, par la production d'acide rétinoïque (79). Toujours chez la souris, on a pu reproduire les effets de la désensibilisation en injectant en intrapéritonéal des cellules dendritiques cultivées en présence d'acide rétinoïque puis chargées avec des allergènes (arachide ou à l'ovalbumine) chez des souris sensibilisées à l'arachide ou à l'ovalbumine. En effet, si les souris étaient mises en contact avec l'allergène 4 semaines après l'injection des cellules dendritiques, les souris allergiques traitées par les cellules dendritiques cultivées en présence d'acide rétinoïque et chargées avec l'allergène ne présentaient plus de signes cliniques d'anaphylaxie (80). Même s'il est difficile de transposer les résultats observés chez la souris à l'homme, surtout en ce qui concerne les cellules dendritiques, on peut en déduire qu'elles jouent un rôle central, par la manière dont elle présente l'antigène, dans le la



modulation de la réponse immunitaire adaptative par l'immunothérapie spécifique. Cependant même si on sait comment elles modifient la réponse immunitaire vers la tolérance, on ne sait pas encore pourquoi l'immunothérapie spécifique provoque cette réponse chez les cellules dendritiques (la désensibilisation n'est pas associée à des adjuvants favorisant ce type de réponse). On peut toutefois poser l'hypothèse que les fréquences d'administration et la dose administrée à la fois par voie sous cutanée et sublinguale, en l'absence de signaux d'agression, favorisent naturellement une réponse de type DCreg plutôt que DC2.

Néanmoins, l'ensemble de ces mécanismes, long à se mettre en place, n'expliquent pas la bonne tolérance des phases d'initiation type « ultra rush » de l'immunothérapie spécifique. Il existe un autre traitement pour lequel on administre des doses rapidement croissantes d'un allergène à un patient qui y est allergique, il s'agit de l'induction de tolérance dans l'allergie aux médicaments. L'induction de tolérance consiste à administrer un médicament à un patient allergique à ce médicament en débutant à de très faibles doses, en perfusion continue et à doubler la dose administrée en 30 minutes toutes les 30 minutes, en général en 12 paliers jusqu'à administration de la dose thérapeutique. Ce protocole thérapeutique permet de traiter le patient avec le médicament en question mais ne guéri pas l'allergie, en effet si le patient doit bénéficier à nouveau de ce traitement plus tard, l'induction de tolérance doit être recommencée. Ce traitement est surtout utilisé pour les antibiotiques, les chimiothérapies et les anticorps monoclonaux (81) et son mécanisme n'est pas à notre connaissance décrit. Comme il consiste à administrer en augmentant rapidement les dosages, un allergène auquel le patient est allergique, on peut penser que les mécanismes impliqués sont proches de « l'ultra rush ». Une meilleure description de ces mécanismes permettrait donc probablement de mieux comprendre l'induction de tolérance aux médicaments.

Il est fort probable compte tenu de la rapidité de l'efficacité de ces traitements qu'ils font directement intervenir des mécanismes de régulation au sein des cellules effectrices de l'immunité innée.

Comme expliqué précédemment, ces cellules sont principalement de deux types les mastocytes tissulaires et les polynucléaires basophiles.

On aurait pu croire qu'il s'agissait simplement de tachyphylaxie, c'est-à-dire d'un épuisement des médiateurs lors des injections de faibles doses empêchant les mastocytes et les basophiles de réagir en nombre lors de l'injection de doses plus importantes (82). La plupart des travaux, peu nombreux, explorant ces cellules pendant la phase d'augmentation de doses, montrent cependant une inhibition active de ces cellules.

Il a tout d'abord été démontré une diminution de la production des basophiles après stimulation *in vitro* par un anti IgE ou du venin d'abeille, entre ceux prélevés avant ultra-rush en 3h30 et ceux prélevés 30 minutes après la dernière injection (83). Les auteurs d'une autre étude, partant du constat que l'histamine est le principal médiateur des réactions allergiques immédiates ont mesuré l'expression des ARN messagers (ARNm) codant pour les récepteurs à l'histamine dans les basophiles sanguins triés par billes magnétiques avant de débiter un traitement de type ultra-rush en 6 heures, après la dernière injection, 2 jours et 4 jours après « l'ultra-rush ». Ils ont observé, non seulement une diminution du nombre absolu des basophiles sanguins, mais aussi une augmentation de l'expression des récepteurs 2 et 4 de l'histamine (H2R et H4R) après 6 heures « d'ultra-rush ». Ils ont ensuite montré *in vitro* que la stimulation de H2R inhibait la libération de médiateurs par les basophiles liée à l'activation de FcεRI (84).

Avec un protocole de rush plus lent, il a été aussi montré une diminution de l'activation de basophiles au 3<sup>ème</sup> jour du protocole par une baisse de leur sécrétion d'histamine et de l'expression de CD203c à leur surface mais aussi une diminution de leur sécrétion en IL-4 et en IL-13 (85), cytokines pro Th2, signe qu'ils peuvent être aussi le lien entre la bonne

tolérance de la phase d'augmentation de doses lorsqu'elle est rapide et l'efficacité de la désensibilisation sur le long terme.

Les mastocytes semblent moins affectés par l'ultra-rush, en effet il n'a été montré aucune modification dans la réaction locale après injection de venin par IDR ou de codéine, signe indirect de la dégranulation *in vivo* des mastocytes, si le test était réalisé avant «l'ultra-rush» ou 30 min après la dernière injection d'un protocole en 3h30. Il est à noter que les IDR étaient réalisées, pour des raisons de lecture, à distance des sites d'injection, les mastocytes n'étaient donc pas les mêmes que ceux stimulés par les injections de l'ultra-rush (86). Il n'est également pas précisé si les patients étaient pré traités par anti-histaminiques avant «l'ultra-rush», comme il est recommandé (17), ce qui peut modifier les résultats des tests cutanées.

### Voies d'inhibition des mastocytes et des basophiles

Si la désensibilisation est active via un mécanisme d'anergie des basophiles et peut être aussi des mastocytes, cela implique une mise en œuvre de voies de régulation inhibitrices dans la transduction du signal d'activation via les IgE. Il existe plusieurs récepteurs inhibiteurs, appartenant à la super famille des récepteurs inhibiteurs (IRS) (87) de structure proche. Il s'agit de récepteurs transmembranaires, avec un seul passage membranaire, dont le domaine intracellulaire comprenant au moins un motif ITIM (pour Inhibitory Tyrosine-based domaine) (88), la partie extracellulaire comprenant des domaines de type Immunoglobuline like ou C-type lectine. Ces récepteurs peuvent se coagrérer avec les récepteurs activateurs comme FcεRI, ce qui conduit à la phosphorylation des motifs ITIM, qui deviennent ainsi un site de fixation pour des tyrosines phosphatases contenant des domaines de type SH2 (SHP-1 et SHP-2) et des ins-5-phosphatases contenant aussi des domaines SH2 (SHIP1 et SHIP2).

Un de ces principaux récepteurs est FcγRIIB qui est un récepteur de faible affinité pour les IgG (89). Chez l'homme, il existe deux isoformes FcγRIIB1 et FcγRIIB2, une troisième isoforme

existant chez la souris : FcγRIIB1'. La coagrégation de FcγRIIB avec FcεRI conduit à la phosphorylation des tyrosines du motif ITIM de FcγRIIB par Lyn qui est associé à FcεRI. Cette phosphorylation conduit au recrutement de SHIP-1 (90). SHIP-1 catalyse la déphosphorylation du 5-phosphate de PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> et de Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> (91). Le clivage de PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> va inhiber le recrutement de Btk et de la phospholipase Cγ1 et ainsi toute la voie qui est nécessaire à la dégranulation et à l'activation de facteurs de transcription des mastocytes et des basophiles via FcεRI expliquée auparavant. (92). SHIP-1 contient aussi deux motifs carboxy-terminaux NPXY et plusieurs régions riches en prolines. Les motifs NPXY peuvent lier des molécules de signalisation qui contiennent des phosphotyrosines et les régions riches en prolines des domaines SH3. La fixation de grb2 via son domaine SH3 stabilise la fixation de SHIP-1 à FcγRIIB. Les motifs NPXY recrutent des protéines de la famille Dok et Shc (93). Les protéines de la famille Dok inhibent Erk et donc la cascade d'activation Ras/Raf-1/MEK/Erk (94). Shc inhibe la génération de l'inositol (Ins)(1,4,5)P<sub>3</sub> (95). (Figure 4)

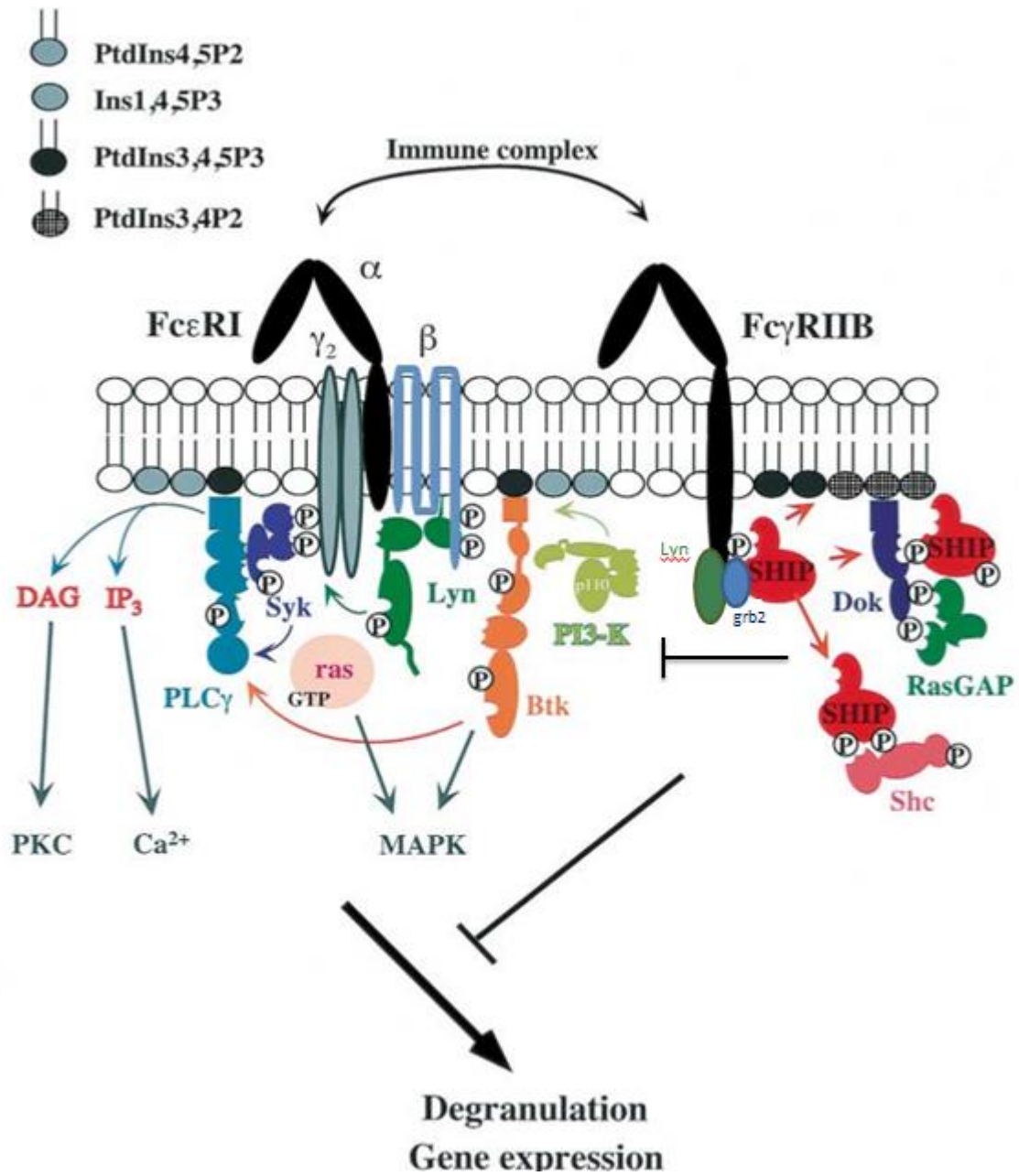


Figure 4 : Voie de signalisation de FcγRIIB adaptée d'après Ott et al. JACI 2000 (5)

gp49 est un autre récepteur inhibiteur qui comprend deux domaines ITIM au niveau intracellulaire (96). La coagrégation avec FcεRI conduit au recrutement non seulement de SHIP-1 mais aussi de SHP-1 (97).

PIR-B est une protéine transmembranaire qui s'associe au MHC de classe 1 qui lorsqu'elle se coagrège avec FcεRI, recrute SHP-1 (98,99). SHP-1 déphosphoryle Syk et Btk, les inhibant (100).

CD300a contient 4 motifs ITIM dans sa partie intra-membranaire. Son expression est augmentée rapidement par l'agrégation des récepteurs FcεRI via les IgE (101). CD300a est activé par l'enrichissement de la membrane extra cellulaire en phosphatidylsérine lié à la dégranulation des mastocytes et des polynucléaires basophiles. Son activation conduit à une inhibition de Syk, sans doute par l'intermédiaire de SHP-1 (elle ne semble pas fixer SHIP-1) (102,103), et donc de la dégranulation des mastocytes et basophiles.

Il existe donc de nombreux mécanismes de régulation négative possibles au sein des polynucléaires basophiles et des mastocytes. On peut poser l'hypothèse que ces mécanismes, plus que d'inhiber l'activation de ces cellules, les activent sans doute vers un autre phénotype, qui produit moins de médiateurs pro Th2 et qui sans doute favorisent l'initiation de la voie Treg dès le début de la désensibilisation.

C'est pourquoi nous avons posé l'hypothèse que l'ultra rush thérapie induit un mécanisme actif de régulation qui inhibe la dégranulation des polynucléaires basophiles, ce mécanisme étant activé par l'administration de doses croissantes initialement sous les seuils de dégranulation, et rapprochées d'allergène. De plus, nous avons posé l'hypothèse que ce mécanisme inhibiteur conduisait à l'initiation précoce de la modification de la réponse immunitaire vers une réponse régulatrice au lieu d'une réponse de type Th2. Afin d'explorer ces hypothèses, nous avons décidé d'étudier l'évolution dans le sang de la réponse des basophiles à l'allergène pendant la première journée de la phase d'augmentation de dose par ultra rush en 3h30, via le test d'activation des basophiles, mais aussi en explorant l'expression de CD64, marqueur d'activation à la surface des basophiles. Nous avons

également exploré, après tri des polynucléaires basophiles, l'expression en ARN messager des différents récepteurs à l'histamine et de SHIP-1. Afin d'explorer les modifications précoces du système immunitaire induites par «l'ultra-rush», nous avons mesuré dans le sang par cytométrie en flux les différentes populations lymphocytaires T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> de même que la polarisation TH1, Th2, TH17 et Treg des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Nous avons également exploré les modifications des différentes populations lymphoïdes et myéloïdes tels que les cellules NK, les cellules dendritiques et les monocytes, ainsi que différentes cytokines et chimiokines.

## Article

Soumission dans Journal of Allergy and Clinical Immunology (JACI)

**Ultra-rush venom immunotherapy induces basophils inhibition by a lower surface expression of FcεRI and leads to early change in innate and adaptive immune response.**

### List of authors

Guillaume Mahay<sup>(1,2)</sup>, MD

Gaetan Rioux<sup>(2)</sup>

Laurent Druot<sup>(2)</sup>, PhD

Olivier Boyer<sup>(2)</sup>, MD, PhD

Luc Thiberville<sup>(1)</sup>, MD, PhD

Jérémie Martinet<sup>(2)</sup>, PharmD, PhD

<sup>(1)</sup>Rouen University Hospital, Department of respiratory diseases, F-76000, Rouen, France

<sup>(2)</sup>Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1234, Pathophysiology, Autoimmunity, Neuromuscular diseases and regenerative THERapies (PANTHER), Faculty of Medicine and Pharmacy, 76183 Rouen Cedex, France.

### Contact

Guillaume Mahay

Rouen University Hospital, Department of respiratory diseases, F-76000, Rouen, France

[Guillaume.mahay@chu-rouen.fr](mailto:Guillaume.mahay@chu-rouen.fr)

Fax: 332 88 82 40

Phone: 332 88 82 47

### Role of the funding source



This study was fund by Rouen University Hospital and ADIR association.

## **Abstract**

**Background:** Hymenoptera venom immunotherapy (VIT) is a treatment that prevents sting inducing anaphylaxis in allergic patient. Fast-up dosing schedule are often used at the initial phase of VIT. This fast dosing schedule well tolerated, but the mechanisms behind this good tolerance have not yet been elucidated, as well as its consequences on the rest of the immune systems.

**Objective:** The aim of this study is to describe early immune system change during initial phase of VIT

**Methods:** We included 29 patients undergoing VIT by 3h30 ultra-rush up dosing phase. Blood puncture was performed before the beginning of the treatment, at 1h30 and just before the last venom injection. Blood tryptase evolution was measured. Basophils phenotype and FcεRI surface expression were analyzed by flow cytometry at each step of the ultra-rush. To assess basophils responsiveness evolution, basophils activation test (BAT) was also perform. Myeloid and T lymphocytes population's evolution were analyzed by flow cytometry.

**Results:** We have shown a significantly lower concentration of blood tryptase at the end of ultra-rush, and a significantly lower basophils activation and FcεRI expression. Surprisingly, BAT has shown a significantly higher *in vitro* response to venom extract at the end of ultra-rush. We also found significantly increase in blood dendritic cells concentration and lower blood Natural Killer (NK) Cells. We observed higher lymphocytes population in blood except for naïve CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells.

**Conclusion:** Ultra-rush fast up dosing is well tolerated thanks to a basophils inhibition involving lower FcεRI surface expression. Ultra-rush also leads to early change in innate and adaptive immune response.

## **Key Message**

VIT up dosing by ultra-rush is well tolerated thanks to basophils active inhibition

VIT up dosing by ultra-rush leads to lower FcεRI surface expression on basophils

VIT up dosing by ultra-rush leads to early change in innate and adaptive immune response

## **Capsule Summary**

Ultra-rush leads to basophils inhibition by a lower FcεRI surface expression; which explains its good tolerance. Ultra-rush also leads to early involvement of immune system elements such as dendritic cells and NK lymphocytes, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes

## **Key worlds**

Allergic immunotherapy, Venom Immunotherapy, Ultra-rush, Basophils, Basophils activation test, Flow cytometry, Natural killer's cells, FcεRI, Allergen tolerance mechanism

## **Abbreviations**

VIT: Hymenoptera venom immunotherapy

Th : T helper

IL: Interleukin

CD: Cluster differentiation

Ig: Immunoglobulin

BAT: Basophils activation test

NK: Natural Killer

MFI: mean fluorescence intensity

DC: Dendritic cells

## Introduction

Hymenoptera venom immunotherapy (VIT) is the only treatment that prevents sting inducing anaphylaxis in allergic patient (1). Immunotherapy is a treatment that is more than a century old, it has empirically and gradually developed. The mechanisms that explain its effectiveness are gradually being clarified but all its immunological effects are not yet known.

The aim of specific immunotherapy is to reduce Th2-type inflammation in response to the allergen and to increase the regulatory response. This has been shown by lower production of Th2 and Th1 cytokine in response to the allergen by patient lymphocytes after 2 month of immunotherapy (2), and higher production of IL-10 (3). It is now known that IL-10 is mainly produced by B regulatory cells (4) and T CD4<sup>+</sup> regulatory cells (5), and that immunotherapy induces a specific response of these two cell types (6,7). This results in lower allergen specific IgE and higher allergen specific IgG4 level (4,8). However it is, at our knowledge, not yet known how immunotherapies induce a response from these 2 cell types.

Furthermore, at the initial phase of VIT, fast-up dosing schedule called rush (9) and ultra-rush (10) are used and it has been shown that ultra-rush can induce in a few hours Th2 inhibition and T regulatory stimulation (11).

However, how ultra-rush is so well tolerated is not clearly explained. Venom cumulative dose of 101.1 µg is reached in 210 min (10) which implies basophils degranulation inhibition (12). *In vitro*, basophils can be desensitized (13), but we lack *in vivo* data on the mechanism of this early basophils desensitization.

In order to provide data on the early mechanisms of VIT, particularly on the mechanisms of basophils desensitizations, the early mechanisms of inhibition of the Th2 response and the increase of the regulatory response, we studied how ultra-rush modulates basophils response but also how it modulates T cells population and innate leucocytes in blood by evaluating cells surface markers and chemokine production.

## **Methods**

### **Study design**

We perform a monocentric prospective cohort study in Rouen's university hospital pneumology department. Demographic data were collected in paper form.

### **Patients**

Study was proposed to patient who had an indication of venom specific venom immunotherapy by ultra-rush. Indication was posed by history of systemic anaphylactic reaction after a hymenoptera sting, positive skin test against vespula wasp venom extract or honey bee venom extract (Stallergen-Greer<sup>®</sup>) and positive IgE against vespula wasp or honey bee venom (phadia immunocap). Patients were excluded if they had HIV infection, Mastocytosis, auto immune diseases, history of previous immunotherapy, pregnancy, malignancy, beta-blocking treatment, infection or hospitalization in the last 4 week or uncontrolled asthma.

### **Immunotherapy protocol**

Immunotherapy was performed with Vespula Wasp or Honey bee Alyostal venom extract from Stallergen-Greer<sup>®</sup>. The immunotherapy protocol used was Ultra-rush therapy as previously described (10). Briefly, a security infusion was laid, and subcutaneous injection of 0.1 µg, then 1µg, then 10 µg, then 20 µg every 30 minutes was done. After the 20 µg injection, 30 µg, and 40 µg were performed every 1h. The patient received cumulative dose of 101.1 µg in 3 hours and 30 minutes.

In order to carry out all the tests described below, patients underwent blood punctures just before the start of ultra-rush (T0), just before the dose of 20µg (T1h30) and just before last dose (T3H30) of venom extract. Samples were immediately send to the laboratory for analysis. BAT and Flow cytometry was performed on the same day of ultra-rush, Sera was kept at -80°C to be analyzed once all patients have been included.

Patients were monitored for 2 more hours and then were discharged and study was ended for the patient.

### **Blood tryptase concentration**

Blood tryptase were analyzed using ThermoFisher ELISA kit (ThermoFisher SA UK) as manufacturer instruction

## **Basophil Activation Test**

Basophil Activation Test (BAT) (Flow Cast) was performed as recommended by the manufacturer (Buhlman). Briefly, we incubated 15 minutes at 37°C whole blood from patients with labelled antibody (anti-CCR3 PE, anti-CD63 FITC) and the tested basophils activator (anti-IgE, fMLP, honey bee venom or Yellow jacket venom at the concentrations of 111.5 pg/ml. After blood lysis, basophils were analysed by flow cytometry (Navios, Beckman). Basophils we're defined as SSc low, CCR3 positive cells. Basophils activation was defined by the expression of CD63.

## **Flow cytometric analysis**

Basal activation without *ex vivo* allergen stimulation of basophils was assessed by measuring CD63 surface expression by flow cytometry. Basophils were defined as CD38<sup>+</sup> CD123<sup>+</sup> FcεRI<sup>+</sup> IgE<sup>+</sup> cells (Figure E1 in the Online Repository). FcεRI surface expression on basophils was also assessed by MFI.

Evolution of blood leucocyte population during ultra-rush therapy was also assessed using flow cytometry as previously described (14). Briefly, surface antibodies coupled to fluorochromes (CD3 eFluor450, CD4 PerCP-Cy5.5, CD25 FITC, CD127 APC, HLA-DR PE-Cy7, CD8 FITC, CD45RA APC, CCR7 PE, CD37 APC-Cy7, CD14 eFluor710, CD11c FITC, CD56 APC, CD123 PE, CD16 APC, CD63 PE-Cy7, IgE FITC, FcεRI APC, CD38 APCcy7; eBioscience ThermoFisher Scientific USA) were added at the recommended concentration to 50mL of whole blood and incubated for 15min at room temperature in the dark. For Foxp3 staining, cells were permeabilized with eBioscience Foxp3 staining buffer set (ebioscience ThermoFisher Scientific USA) and Intracellular antibodies (FoxP3 PE; ebioscience ThermoFisher Scientific USA) were added for 30min. For other staining, the cells were fixed with formaldehyde 2.5% and conserved at 4°C until use. Gating strategy is shown in Figure E2 to Figure E6 in the Online Repository). Fluorescence was detected on a LSRFortessa™ flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Analyses were obtained using FlowJo software (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

## **Chemokine concentration analysis**

Chemokines concentration in serum were also assessed during ultra-rush therapy by Luminex® analysis with 96TEST PorcartaPlex Human Cytokine and Chemokine Panel 1A (Fisher Scientific SA UK) following manufacturer instruction.

## **Statistical analysis**

Results were expressed as mean  $\pm$  Standard error. During VIT, kinetics of cytokines production and cell population variations were analyzed by Friedman test for repeated measures, if  $p > 0.05$ , data were compared between T0, T1h30 and T3h30 by Dunn's Multiple Comparison Test. A P-value below 0.05 was considered to be statistically significant. Analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 for Windows, (GraphPad software LLC, San Diego, USA).

## **Ethics**

The protocol was approved by local ethical comity.

Righted information was provided to the patient and all patients signed informed consent prior to inclusion.

This study is registered on ClinicalTrials.gov (NCT02295488).

Role of the funding source: this study was fund by the university hospital of Rouen and ADIR association.

## Results

### Population

29 patients (20 male and 9 female) were included in this study from March 2015 to April 2018. Study was stopped at 29 patients instead of 30 due to a supply disruption, in France, of hymenoptera venom from Stallergen-greer®. Mean age was 48.21 (range 18-69). In 21 cases, desensitization was performed with yellow jacked wasp venom and in 8 cases with honey bee venom. 24 patients had an history of at least grade 2 reaction in Müller classification (15) after a hymenoptera sting. Specific IgE concentration against the responsible venom was  $21.04 \pm 5.68$  kUA/L. There was no significant difference in specific IgE level between moderate and severe reactions (data not shown). Detailed data are available in table I. No patient had a generalized reaction during ultra-rush therapy.

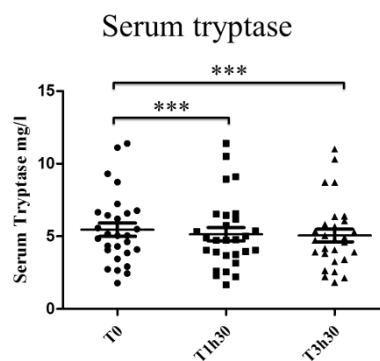


Patient N°	Age (years)	Sex	Allergen	Reaction severity	Specific IgE level (Ku/l)	Ultra rush date mon/day/year
1	55	Man	Yellowjacket Wasp	Moderate	26.50	03/23/2015
2	42	Woman	Honey Bee	Severe	9.81	05/11/2015
3	60	Man	Yellowjacket Wasp	Severe	19.70	05/18/2015
4	53	Man	Yellowjacket Wasp	Severe	>100	08/14/2015
5	49	Man	Yellowjacket Wasp	Severe	5.87	09/28/2015
6	41	Woman	Yellowjacket Wasp	Severe	2,07	10/12/2015
7	36	Man	Honey Bee	Moderate	13,50	11/19/2015
8	68	Man	Yellowjacket Wasp	Severe	>100	06/02/2016
9	36	Woman	Honey Bee	Moderate	6.55	09/08/2016
10	39	Man	Yellowjacket Wasp	Severe	4.71	09/22/2016
11	59	Woman	Honey Bee	Moderate	40.00	10/27/2016
12	55	Man	Yellowjacket Wasp	Severe	>100	11/03/2016
13	42	Man	Yellowjacket Wasp	Severe	11.40	01/05/2017
14	51	Man	Yellowjacket Wasp	Severe	4.56	01/19/2017
15	69	Man	Yellowjacket Wasp	Severe	10.30	03/02/2017
16	55	Woman	Honey Bee	Severe	57.50	04/13/2017
17	56	Man	Yellowjacket Wasp	Severe	9.88	05/11/2017
18	50	Man	Yellowjacket Wasp	Severe	1.63	06/01/2017
19	49	Man	Yellowjacket Wasp	Severe	4.37	09/07/2017
20	46	Man	Yellowjacket Wasp	Severe	<0.1	09/14/2017
21	52	Woman	Yellowjacket Wasp	Severe	6.65	10/12/2017
22	26	Woman	Honey Bee	Severe	3.98	10/19/2017
23	41	Woman	Yellowjacket Wasp	Severe	2.90	11/09/2017
24	60	Man	Honey Bee	Severe	1.54	12/07/2017
25	25	Man	Yellowjacket Wasp	Severe	9.78	02/08/2018
26	52	Woman	Yellowjacket Wasp	Moderate	1.64	02/15/2018
27	18	Man	Honey Bee	Severe	35.60	03/01/2018
28	62	Man	Yellowjacket Wasp	Severe	0.90	03/22/2018
29	51	Man	Yellowjacket Wasp	Severe	15.60	04/12/2018

**Table I:** Population characteristics: For reaction severity Müller grade 1 was qualified as moderate, grade 2 or more are qualified as severe. The specific IgE level is given before treatment for the hymenoptera (Honey Bee or Yellowjacket Wasp) to which the patient is treated.

## Serum tryptase evolution

To first investigate basophils degranulation, we measured blood tryptase levels at basal state, before the starting of the treatment, and before the last venom dose of ultra-rush. Interestingly, we find no increase in tryptase during the treatment but a significantly decrease from  $5.46 \pm 0.5$  to  $5.06 \pm 0.4$   $\mu\text{g/l}$ ,  $p < 0.0001$ . (fig. 1). These results suggest no basophils degranulation during ultra-rush.

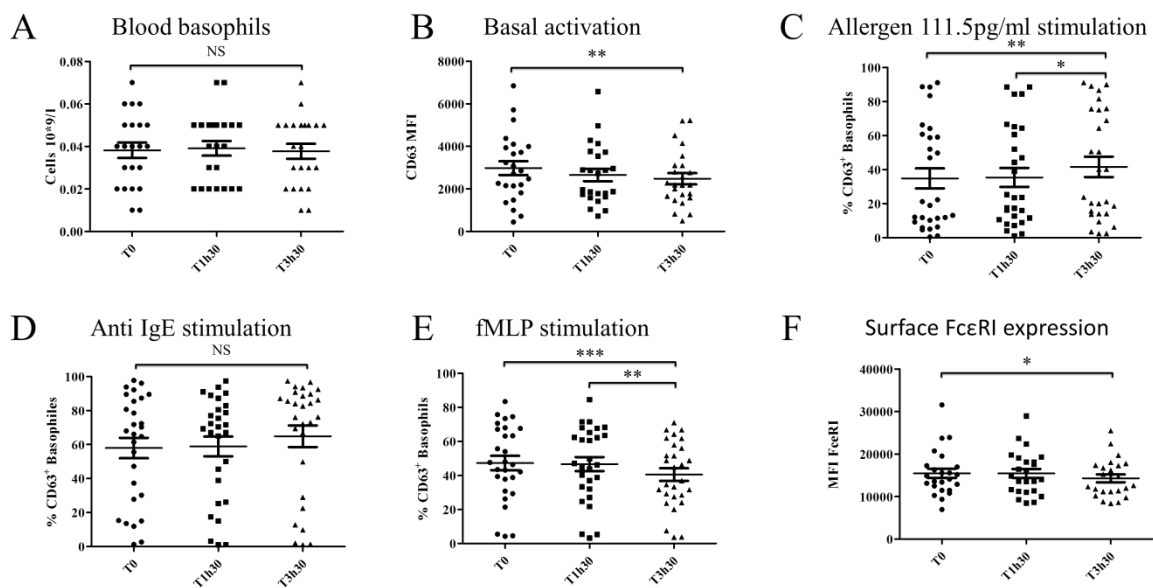


**Fig. 1:** Serum tryptase evolution during ultra-rush. Error bar represent Mean  $\pm$  SEM. \* =  $p > 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ . (n = 28)

## Basophils activation

Lower tryptase level and ultra-rush good tolerance is not explained by a blood basophils count decrease during the treatment. Indeed, we did not observe any significantly difference in blood basophils count from the beginning to the end of the treatment ( $37.73 \pm 3.54 \times 10^6$  cells/L before first venom dose and  $38.18 \pm 3.64 \times 10^6$  cells/L before last dose),  $p = 0.7725$  (Fig. 2A). *In vivo* activation of basophils was investigated by flow cytometry via analysis of CD63 expression on the surface of blood basophils by MFI. Results showed a decrease of CD63 MFI on basophils from  $5697 \pm 2811$  before starting ultra-rush to  $3586 \pm 1235$  before last venom dose,  $p = 0.0119$  (Fig. 2B). To investigate this lower basophils activation, we evaluated *ex vivo* basophils activation in response to different kinds of stimulation at different points of the therapy. First, we investigated *ex vivo* basophils activation using basophil activation test (BAT) in response to the venom used for ultra-rush therapy. Surprisingly, BAT did not show lower basophils activation during ultra-rush therapy in response to venom, but, contrariwise, an increase in basophils activation. Basophils *ex vivo* activation in response to the involved venom was significantly increased with a venom concentration of 111.5  $\mu\text{g/ml}$  (from  $34.84 \pm 5.85\%$  before ultra-rush to  $41.62 \pm 6.04\%$  before last dose, the difference occurred in the second part of ultra-rush),  $p = 0.0038$  (Fig. 2C). On the other hand, when we analyzed more generally the excitability of basophils using the two BAT positive controls, which reflects two different ways of activations, the results differs. The anti IgE stimulation control did not show a significantly difference in basophils activation during ultra-rush  $p = 0.0687$  (Fig. 2D). But in another hand, results from the other positive control using fMLP investigating another basophils activation pathway have shown a significantly decrease in basophils activation during ultra-rush therapy from

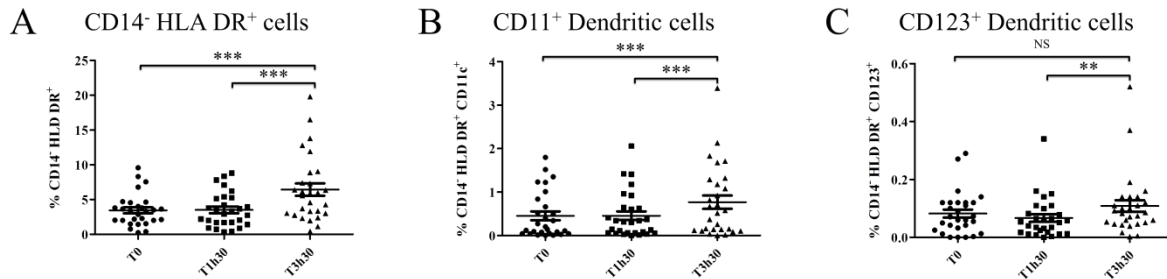
47.33 ± 4.21% to 40.51 ± 3.68%,  $p < 0.0001$  (Fig. 2E). These results suggest *in vivo* basophils down regulation involving this pathway during ultra-rush therapy. Again, the difference occurred in the second part of ultra-rush. Our initial hypothesis being an implication of the FcεRI pathway, we also analyzed FcεRI expression on surface basophils, by MFI, to assess FcεRI internalization. Our results have shown a decrease in FcεRI MFI on basophils between the start of ultra-rush and last venom dose from 14638 ± 1034 to 13648 ± 846.2,  $p = 0.0264$ , nevertheless suggesting an involvement of the FcεRI activation path but whose analysis is put in default by the BAT results (fig. 2F).



**Fig. 2:** Basophils response during ultra-rush therapy. A: blood basophils count during ultra-rush therapy (n = 22). B: Basal Basophils activation measured by CD63 MFI in basophils population (n = 28) C: Basophils activation test results at concentration of 111.5 pg/ml during ultra-rush therapy (n = 28). D: Basophil activation test used with anti IgE stimulation during ultra-rush therapy (n = 28). E: Basophils activation test used with fMLP during ultra-rush therapy (n = 28) measured by flow cytometry. F: Surface FcεRI expression on basophils measured by FcεRI MFI on basophils population. (n = 28). Error bar represent Mean ± SEM. \* =  $p > 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ .

## Dendritic cells

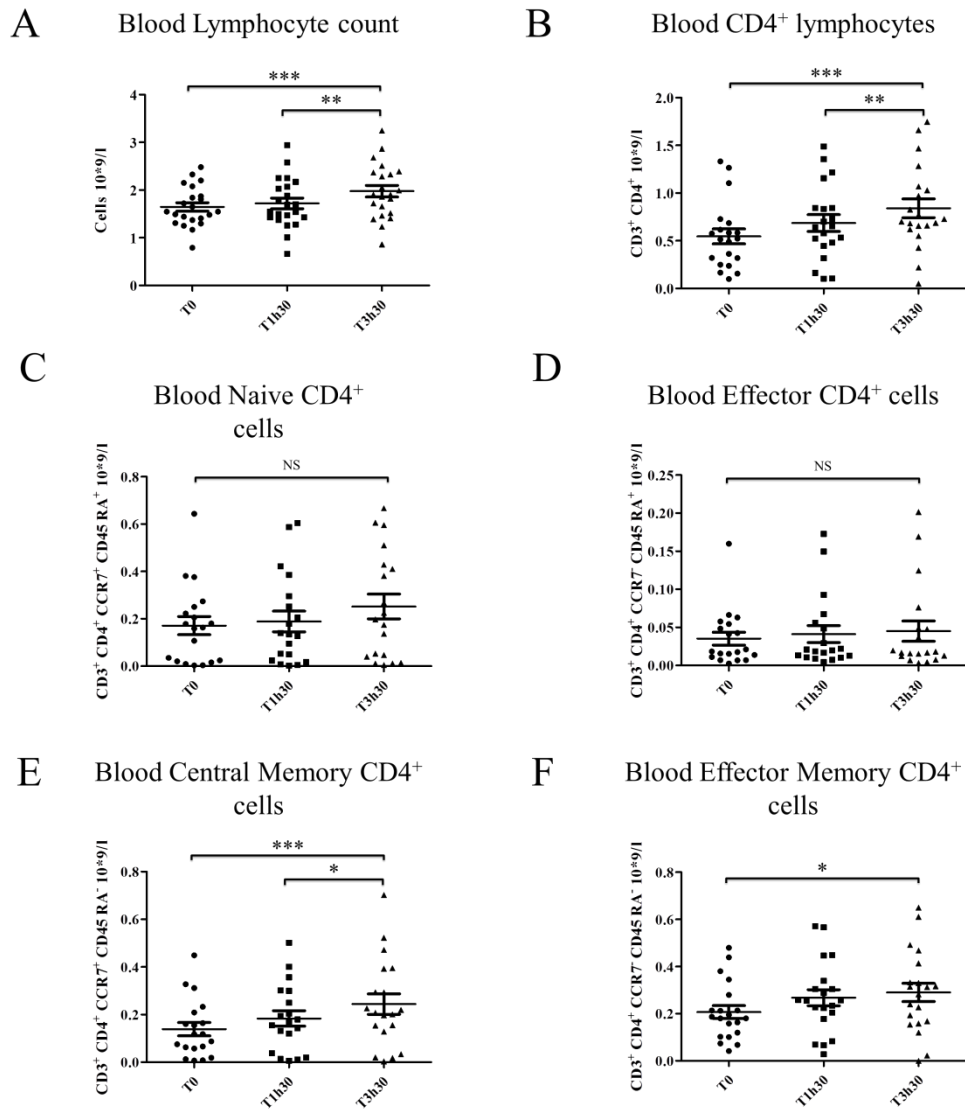
Ultra-rush is also where long term tolerance to allergen starts. To investigate how this long term tolerance is initiated, we first looked at blood dendritic cells evolution during ultra-rush therapy by flow cytometry. Our results showed a significantly increase in blood dendritic cells proportion during ultra-rush therapy from 3.45 ± 0.44% to 6.43 ± 0.90%,  $p < 0.0001$ , the difference occurred in the second part of ultra-rush (fig. 3A). This increase concerns CD11c positive dendritic cells, called myeloid dendritic cells. Our results showed, indeed, a significantly increase especially in the second part in CD11c positive dendritic cells from 0.45 ± 0.1% to 0.77 ± 0.15%,  $p < 0.0001$  (Fig. 3B). There was also a little increase, only in the second part in CD123 positive dendritic cells (from 0.07 ± 0.01% at 1h30 to 0.1 ± 0.02% at 3h30 of single cells,  $p = 0.0106$ ) (fig. 3C).



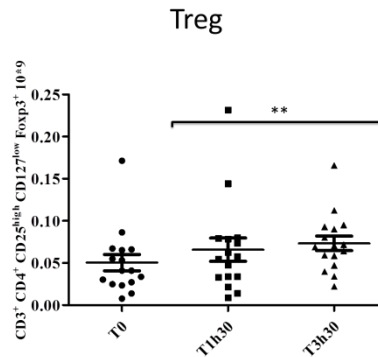
**Fig. 3:** Blood Dendritic cells evolution during ultra-rush therapy. A: Blood dendritic cells gated as CD14<sup>+</sup> HLA DR<sup>+</sup> Cells evolution during ultra-rush (n=28). B: Blood myeloid dendritic cells gated as CD11<sup>+</sup> dendritic cells evolution during ultra-rush (n=28). C: Blood plasmacytoid dendritic cells gated as CD123<sup>+</sup> dendritic cells evolution during ultra-rush (n=28). Error bar represent Mean  $\pm$  SEM. \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ .

## T helper lymphocytes

We analyzed CD4<sup>+</sup> helper T lymphocytes phenotype, another central cell type in immune response regulation. First, we observed a significantly increase in total blood lymphocyte count during ultra-rush therapy especially during second part of ultra-rush (from  $1.65 \pm 0.09 \cdot 10^9$  cells/L to  $1.98 \pm 0.12 \cdot 10^9$  cells/L,  $p < 0.0001$ ) (Fig. 4A). CD4<sup>+</sup> T lymphocytes were also increased (from  $0.55 \pm 0.08 \cdot 10^9$  cells/L to  $0.84 \pm 0.12 \cdot 10^9$  cells/L,  $p < 0.0001$ ) meaning engagement of these cells since the very beginning of immunotherapy (Fig. 4B). We looked further which CD4<sup>+</sup> helper T cells sub-population is affected by this increase. We showed that central memory (from  $0.14 \pm 0.03 \cdot 10^9$  cells/L to  $0.24 \pm 0.04 \cdot 10^9$  cells/L,  $p = 0.0001$ ) (Fig. 4E) and effector memory (from  $0.21 \pm 0.03 \cdot 10^9$  cells/L to  $0.29 \pm 0.04 \cdot 10^9$  cells/L,  $p = 0.039$ ) (Fig. 4F) CD4<sup>+</sup> cells are significantly increased but not CD4<sup>+</sup> effector cells (Fig. 4D) (from  $0.04 \pm 0.01 \cdot 10^9$  cells/L to  $0.05 \pm 0.01 \cdot 10^9$  cells/L,  $p = 0.6918$ ). For naïve CD4<sup>+</sup> T cells, there was a significant difference during ultra-rush but Dunn's Multiple Comparison Test did not shown significantly difference between T0, T1h30 and T3h30 showed by (from  $0.17 \pm 0.04 \cdot 10^9$  cells/L to  $0.25 \pm 0.05 \cdot 10^9$  cells/L,  $p = 0.0403$ ), (fig. 4C). We then sought to characterize T CD4<sup>+</sup> regulatory cells response during ultra-rush therapy. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup>, CD127<sup>low</sup> Fox p3<sup>+</sup> cells are increased during ultra-rush therapy from  $50.46 \pm 9.71 \cdot 10^6$  cells/L to  $73.33 \pm 8.6 \cdot 10^6$  cells/L,  $p = 0.0063$ ) (fig. 5).



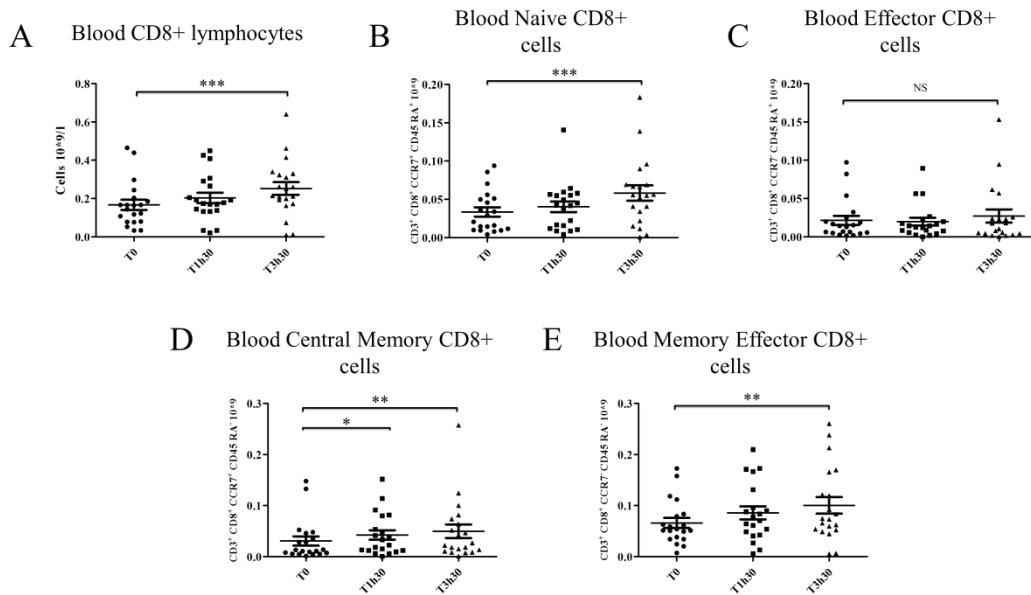
**Fig. 4:** Blood lymphocyte helper evolution response during ultra-rush. A: Blood total lymphocyte count evolution during ultra-rush (n = 22). B: Blood CD4<sup>+</sup> lymphocyte count evolution during ultra-rush (n=21). C, D, E, and F: Blood Naive CD4<sup>+</sup> Cells (C), Effector CD4<sup>+</sup> cells (D), Central Memory CD4<sup>+</sup> cells (E) and Memory Effector CD4<sup>+</sup> cells (F) (n = 20). Error bar represent Mean ± SEM. \* = p > 0.05 , \*\* = p < 0.01, \*\*\* = p < 0.001.



**Fig. 5:** Blood CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> CD127<sup>low</sup> Foxp3<sup>+</sup> lymphocyte count evolution during ultra-rush (n=16). Error bar represent Mean  $\pm$  SEM. \*\* = p < 0.01.

### Cytotoxic T lymphocytes

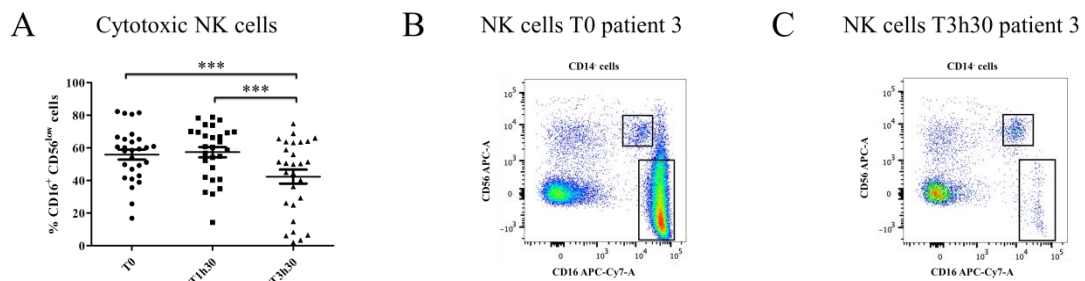
To address how the other lymphocyte subset responded during ultra-rush we looked after CD8<sup>+</sup> lymphocyte evolution. CD8<sup>+</sup> T lymphocytes were also increased (from  $173.5 \pm 26.12 \cdot 10^6$  cells/L to  $265.1 \pm 33.86 \cdot 10^6$  cells/L, p = 0.0003) (fig. 6A). Then, we analyzed as further which CD8<sup>+</sup> helper sub-population was affected by this increase. Identical to T CD4<sup>+</sup> lymphocytes, we showed that naïve (from  $33.46 \pm 6.05 \cdot 10^6$  cells/L to  $58.29 \pm 9.98 \cdot 10^6$  cells/L, p = 0.0001) (Fig. 6B), central memory (from  $30.53 \pm 9.12 \cdot 10^6$  cells/L to  $49.61 \pm 1.34 \cdot 10^6$  cells/L, p = 0.0013) (Fig. 6D) and effector memory (from  $66 \pm 9.8 \cdot 10^6$  cells/L to  $100.4 \pm 16.33 \cdot 10^6$  cells/L, p = 0.002) CD8<sup>+</sup> (Fig. 6E) cells are significantly increased but not CD8<sup>+</sup> effector cells (from  $21.42 \pm 5.95 \cdot 10^6$  cells/L to  $27.14 \pm 9.17 \cdot 10^6$  cells/L, p = 0.3499) (fig. 6C).



**Fig. 6:** Blood CD8<sup>+</sup> lymphocyte evolution response during ultra-rush. A: Blood CD8<sup>+</sup> lymphocyte count evolution during ultra-rush (n=20). B, C, D, and E: Blood Naïve CD8<sup>+</sup> Cells (B), Effector CD8<sup>+</sup> cells (C), Central Memory CD8<sup>+</sup> cells (D) and Memory Effector CD8<sup>+</sup> cells (E) (n = 20). Error bar represent Mean ± SEM. \* = p < 0.05, \*\* = p < 0.01, \*\*\* = p < 0.001.

## NK Cytotoxic cells

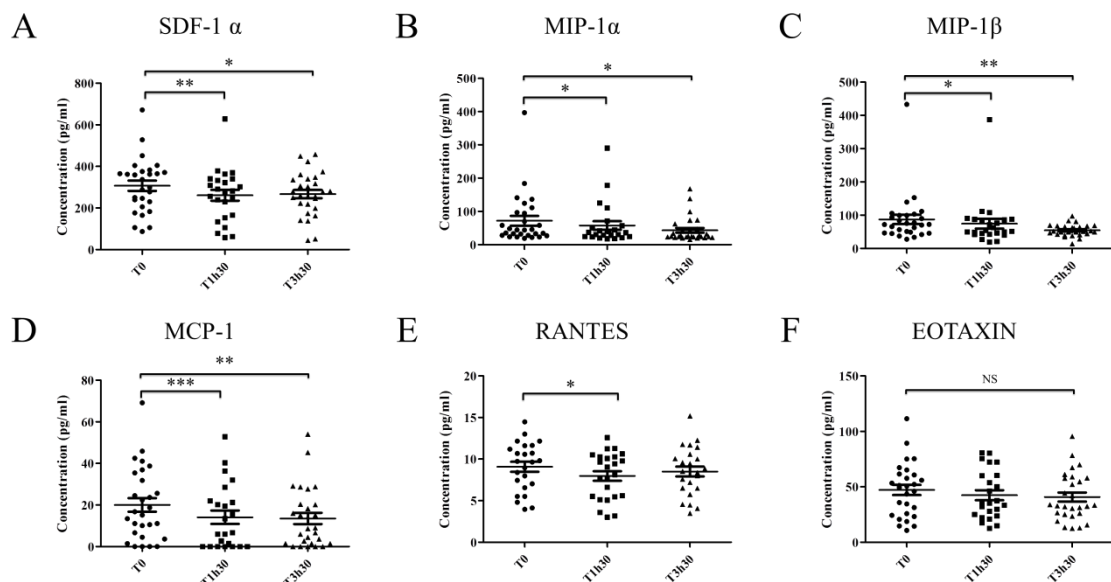
Unlike to cytotoxic T CD8<sup>+</sup> lymphocytes, NK cells are significantly decreased in blood from start of ultra-rush (55.9 ± 3.08% of CD14<sup>-</sup> cells) to the last dose (42.31 ± 4.29% of CD14<sup>-</sup> cells). As for other cell types, this alteration occurred within the second part of ultra-rush. In some patients this decrease was dramatic (fig. 7).



**Fig. 7:** Blood NK lymphocytes evolution during ultra-rush therapy. A: Blood NK cytotoxic CD56<sup>low</sup> CD16<sup>high</sup> lymphocytes evolution during ultra-rush (n=28). B: NK cells dot plot gated as CD14<sup>-</sup> single cells from patient 3 at T0. C: NK cells dot plot gated as CD14<sup>-</sup> single cells from patient 3 at T3h30. Error bar represent Mean ± SEM. \*\*\* = p < 0.001.

## Serum chemokine evolution

To better understand how immune cells are modified during ultra-rush, we investigated the evolution of many chemokine with Luminex® technology in the Serum. Lots of chemokines are significantly decreased during desensitization. More exactly we have observed lower serum level after ultra-rush than before for SDF-1 alpha (CXCL12) (from  $307.2 \pm 24.77$  pg/ml to  $267 \pm 19.76$  pg/ml,  $p = 0.0041$ ) (fig. 8A), MIP-1 alpha (CCL3) (from  $71.95 \pm 14.62$  pg/ml to  $43.14 \pm 7.01$  pg/ml,  $p = 0.0061$ ) (fig. 8B), MIP-1 beta (CCL4) (from  $87.15 \pm 14.09$  pg/ml to  $54.53 \pm 3.3$  pg/ml,  $p = 0.0046$ ) (fig. 8C), MCP-1 (CCL2) (from  $20.03 \pm 3.29$  pg/ml to  $13.53 \pm 2.7$  pg/ml,  $p < 0.0001$ ) (fig. 8D), and RANTES (CCL5) (from  $9.07 \pm 0.6$  pg/ml to  $8.50 \pm 0.59$  pg/ml,  $p = 0.0094$ ) (fig. 8E) but not for EOTAXIN (CCL11) (from  $47.14 \pm 4.59$  pg/ml to  $40.77 \pm 4.07$  pg/ml,  $p = 0.1019$ ) (fig. 8F). Interestingly, at the opposite of cells population, the change in chemokines occurred in the first part of ultra-rush.



**Fig. 8:** Serum Chemokine response during ultra-rush therapy measured by Luminex® . A: Stromal cell-derived factor 1(SDF-1 alpha) (CXCL12) response during ultra-rush therapy. B: Macrophage inflammatory protein 1-alpha (MIP-1 alpha) (CCL3) response during ultra-rush therapy. C: Macrophage inflammatory protein 1-beta (MIP-1 beta) (CCL4) response during ultra-rush therapy. D: Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) (CCL2) response during ultra-rush therapy. E: RANTES (CCL5) response during ultra-rush therapy. E: Eotaxin (CCL11) response during ultra-rush therapy Error bar represent Mean  $\pm$  SEM. \* =  $p > 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ .  $n = 25$



## Discussion

First, our study confirms the good tolerance and efficiency of ultra-rush therapy as no complication was observed within the 29 patients included. Study population was similar to other studies that shown a mean age a little below 50, more Yellow Jacketed Wasp than honey bee allergic patients, and more patients who had a history of severe reaction (10,16,17). The sex ratio, with a majority of men in our population, is very different according to the studies, probably related to cultural differences in exposure to hymenoptera sting.

There are very few studies that analyzed the immune response during the ultra-rush phase, and we looked after many components of immune response. The aim of this study was not to explain deep mechanism of ultra-rush therapy, but to take a picture of very early change *in vivo* in the blood of human patients who underwent ultra-rush in order to lay the foundation for further investigations.

The stability of tryptase level during ultra-rush suggests that stimulation of basophils by venom injections remains below the activation threshold in blood, meaning an increase of this threshold. But we have not only observed a lack of increase but especially a decrease in tryptase levels suggesting, in combination with this increase in the activation threshold, an active inhibition of basophils basal activation.

Likewise, these results cannot be explained by the specific IgE/IgG switches which takes months (18). E. Mamessier and all. describes a Th2/Th1 and T regulatory switch starting on the first day of desensitization using ultra rush therapy (11), but this does not totally explain how basophils degranulation is inhibited. Wang and al. suggests a negative mast cells degranulation regulation involving CD300a which is activated by phosphatidylserine which is itself externalized during mast cells degranulation (19). As Basophils also express CD300a, we were expecting to find a similar mechanism in our study (20) with lower basophils degranulation in response to allergen or anti IgE before last dose of ultra-rush. But we observed the opposite. CD300a inhibits FcεRI dependent degranulation but not FcεRI independent degranulation (19), and we have shown that ultra-rush inhibits only FcεRI independent degranulation *in vitro*. However, since BAT is an *in vitro* test, it cannot reflect all the mechanisms involved and we can make hypothesis that other regulatory factors are present *in vivo*. Indeed, we have shown a decrease in FcεRI expression on basophils cells surface, meaning a change in the relationship between FcεRI and FcγRII expression, favoring crosslinking of FcεRI with FcγRII compared to FcεRI with itself. As FcγRII needs immune complex to be activated (21), BAT did not allow FcγRII and FcεRI crosslinking, but allows only FcεRI co-aggregation. Therefore, because FcγRII down regulation pathway can't be involved, BAT, and anti IgE positive control, only explores the FcεRI pathway without this negative regulation, explaining ours results. fMLP does not activate basophils via immunoglobulin receptors, so it does not modify the phosphorylation of ITIM and ITAM motifs initiated by the immunoglobulin receptors pathway, both FcεRI coaggregation and FcγRII and FcεRI crosslinking, which was involved *in vivo* before blood puncture, so it is normal to see

a decrease in degranulation during ultra-rush therapy when using it. Our results therefore suggest rather inhibition via internalization of FcεRI than by activation of CD300a.

Ultra-rush is not only a safe way to administer high dose of allergen to which the patient is sensitized, it is also the start of mid and long term tolerance (11). This starts to antigen processing by antigen presenting cells to naïve T cells or switching Th2 cells to T reg or Th1 cells. We have demonstrated that Myeloids Dendritic cells, a cell type whose main role is to be an antigen presenting cell, are recruited and circulate during the ultra-rush.

Many other cell types are experiencing increase in their blood population. These populations are mainly cell populations that mediate the modulation of the immune response more than effector cells. Indeed, effector CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells are the only subpopulation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> which are not modified by ultra-rush in our study. One of the only effector cell populations which are involved by ultra-rush is NK cytotoxic cells, which at the opposite of other cell populations are diminished in blood. This can be explained by the fact that many of immune system cells are resident within peripheral tissues and lymph node, so their recruitment may require a passage through peripheral blood, while NK cells (and Basophils) are recruited directly from blood stream. Role of NK cells in allergy and allergen immunotherapy is unclear. It has been shown an increase of NK cells during maintenance phase of house dust mite immunotherapy (22), but, at our knowledge, this is the first study looking after at early NK cell changes during induction phase of allergen immunotherapy. It is known that NK cells can modulate and select the most suitable DC and at this point of view can be regulatory cells (23), and so are not only effector cells.

Another unexpected result in regard of the many inflammatory cells which are recruited is the lower level of many chemokine in blood. All of these chemokine are involved in acute inflammation and tissue recruitment (24). If blood levels of these chemokine reflect the levels of these chemokines throughout the body, lower level means lower acute and tissue inflammation what is the objective of ultra-rush, and if inflammatory cells are no more in periphery tissues they circulate by blood, what we found. These chemokine have many sources, epithelial cells, DC, macrophage, including mast cells and basophils. Lower level of these chemokine means down regulation of basal secretion by administration of very low level of allergen. Indeed the levels of these chemokine are significantly lower only 30 min after the two first doses (cumulative dose of 1.1µg) of ultra-rush therapy. It has been shown that subthreshold dose of allergen can desensitize basophils without degranulation (13,25). We can hypothesize a lower expression of chemokine by basophils and mast cells by subthreshold dose of allergen.

To summarize, we have confirmed good tolerance of ultra-rush therapy and shown a lower basal basophils activation which is not explained by intrinsic lower response from FcεRI stimulation by basophils meaning implication of external regulation, a very early down regulation of many chemokine that may lead to increase in blood of many inflammatory cell types including antigen presenting cells and T cells. We also have shown a decrease in blood population of NK cells, meaning

there recruitment in periphery tissues or lymph node without showing how, where and why. This study therefore gives some insights for *ex vivo* mechanical and animal models study.

**Table I**

Patient N°	Âge (years)	Sex	allergen	Reaction severity	Specific IgE level (Ku/l)	Ultra rush date mon/day/year
1	55	Man	Yellowjacket Wasp	Moderate	26.50	03/23/2015
2	42	Woman	Honey Bee	Severe	9.81	05/11/2015
3	60	Man	Yellowjacket Wasp	Severe	19.70	05/18/2015
4	53	Man	Yellowjacket Wasp	Severe	>100	08/14/2015
5	49	Man	Yellowjacket Wasp	Severe	5.87	09/28/2015
6	41	Woman	Yellowjacket Wasp	Severe	2.07	10/12/2015
7	36	Man	Honey Bee	Moderate	13,50	11/19/2015
8	68	Man	Yellowjacket Wasp	Severe	>100	06/02/2016
9	36	Woman	Honey Bee	Moderate	6.55	09/08/2016
10	39	Man	Yellowjacket Wasp	Severe	4.71	09/22/2016
11	59	Woman	Honey Bee	Moderate	40.00	10/27/2016
12	55	Man	Yellowjacket Wasp	Severe	>100	11/03/2016
13	42	Man	Yellowjacket Wasp	Severe	11.40	01/05/2017
14	51	Man	Yellowjacket Wasp	Severe	4.56	01/19/2017
15	69	Man	Yellowjacket Wasp	Severe	10.30	03/02/2017
16	55	Woman	Honey Bee	Severe	57.50	04/13/2017
17	56	Man	Yellowjacket Wasp	Severe	9.88	05/11/2017
18	50	Man	Yellowjacket Wasp	Severe	1.63	06/01/2017
19	49	Man	Yellowjacket Wasp	Severe	4.37	09/07/2017
20	46	Man	Yellowjacket Wasp	Severe	<0.1	09/14/2017
21	52	Woman	Yellowjacket Wasp	Severe	6.65	10/12/2017
22	26	Woman	Honey Bee	Severe	3.98	10/19/2017
23	41	Woman	Yellowjacket Wasp	Severe	2.90	11/09/2017
24	60	Man	Honey Bee	Severe	1.54	12/07/2017
25	25	Man	Yellowjacket Wasp	Severe	9.78	02/08/2018
26	52	Woman	Yellowjacket Wasp	Moderate	1.64	02/15/2018
27	18	Man	Honey Bee	Severe	35.60	03/01/2018
28	62	Man	Yellowjacket Wasp	Severe	0.90	03/22/2018
29	51	Man	Yellowjacket Wasp	Severe	15.60	04/12/2018

Population characteristics: For reaction severity Müller grade 1 was qualified as moderate, grade 2 or more are qualified as severe.

The specific IgE level is given before treatment for the hymenoptera (Honey Bee or Yellowjacket Wasp) to which the patient is treated.

## Figures legends

**Fig. 1:** Serum tryptase evolution during ultra-rush. Error bar represent Mean  $\pm$  SEM. \* =  $p > 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ . (n = 28)

**Fig. 2:** Basophils response during ultra-rush therapy. A: blood basophils count during ultra-rush therapy (n = 22). B: Basal Basophils activation measured by CD63 MFI in basophils population (n = 28) C: Basophils activation test results at concentration of 111.5 pg/ml during ultra-rush therapy (n = 28). D: Basophil activation test used with anti IgE stimulation during ultra-rush therapy (n = 28). E: Basophils activation test used with fMLP during ultra-rush therapy (n = 28) measured by flow cytometry. F: Surface Fc $\epsilon$ RI expression on basophils measured by Fc $\epsilon$ RI MFI on basophils population. (n = 28). Error bar represent Mean  $\pm$  SEM. \* =  $p > 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ .

**Fig. 3:** Blood Dendritic cells evolution during ultra-rush therapy. A: Blood dendritic cells gated as CD14<sup>-</sup> HLA DR<sup>+</sup> Cells evolution during ultra-rush (n=28). B: Blood myeloid dendritic cells gated as CD11<sup>+</sup> dendritic cells evolution during ultra-rush (n=28). C: Blood plasmacytoid dendritic cells gated as CD123<sup>+</sup> dendritic cells evolution during ultra-rush (n=28). Error bar represent Mean  $\pm$  SEM. \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ .

**Fig. 4:** Blood lymphocyte helper evolution response during ultra-rush. A: Blood total lymphocyte count evolution during ultra-rush (n = 22). B: Blood CD4<sup>+</sup> lymphocyte count evolution during ultra-rush (n=21). C, D, E, and F: Blood Naïve CD4<sup>+</sup> Cells (C), Effector CD4<sup>+</sup> cells (D), Central Memory CD4<sup>+</sup> cells (E) and Memory Effector CD4<sup>+</sup> cells (F) (n = 20). Error bar represent Mean  $\pm$  SEM. \* =  $p > 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ .

**Fig. 5:** Blood CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> CD127<sup>low</sup> Fox p3<sup>+</sup> lymphocyte count evolution during ultra-rush (n=16). Error bar represent Mean  $\pm$  SEM. \*\* =  $p < 0.01$ .

**Fig. 6:** Blood CD8<sup>+</sup> lymphocyte evolution response during ultra-rush. A: Blood CD8<sup>+</sup> lymphocyte count evolution during ultra-rush (n=20). B, C, D, and E: Blood Naïve CD8<sup>+</sup> Cells (B), Effector CD8<sup>+</sup> cells (C), Central Memory CD8<sup>+</sup> cells (D) and Memory Effector CD8<sup>+</sup> cells (E) (n = 20). Error bar represent Mean  $\pm$  SEM. \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ .

**Fig. 7:** Blood NK lymphocytes evolution during ultra-rush therapy. A: Blood NK cytotoxic CD56<sup>low</sup> CD16<sup>high</sup> lymphocytes evolution during ultra-rush (n=28). B: NK cells dot plot gated as CD14<sup>-</sup> single cells from patient 3 at T0. C: NK cells dot plot gated as CD14<sup>-</sup> single cells from patient 3 at T3h30. Error bar represent Mean  $\pm$  SEM. \*\*\* =  $p < 0.001$ .

**Fig. 8:** Serum Chemokine response during ultra-rush therapy measured by Luminex®. A: Stromal cell-derived factor 1(SDF-1 alpha) (CXCL12) response during ultra-rush therapy. B: Macrophage inflammatory protein 1-alpha (MIP-1 alpha) (CCL3) response during ultra-rush therapy. C: Macrophage inflammatory protein 1-beta (MIP-1 beta) (CCL4) response during ultra-rush therapy. D: Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) (CCL2) response during ultra-rush therapy. E: RANTES

(CCL5) response during ultra-rush therapy. E: Eotaxin (CCL11) response during ultra-rush therapy  
Error bar represent Mean  $\pm$  SEM. \* =  $p > 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ . n = 25

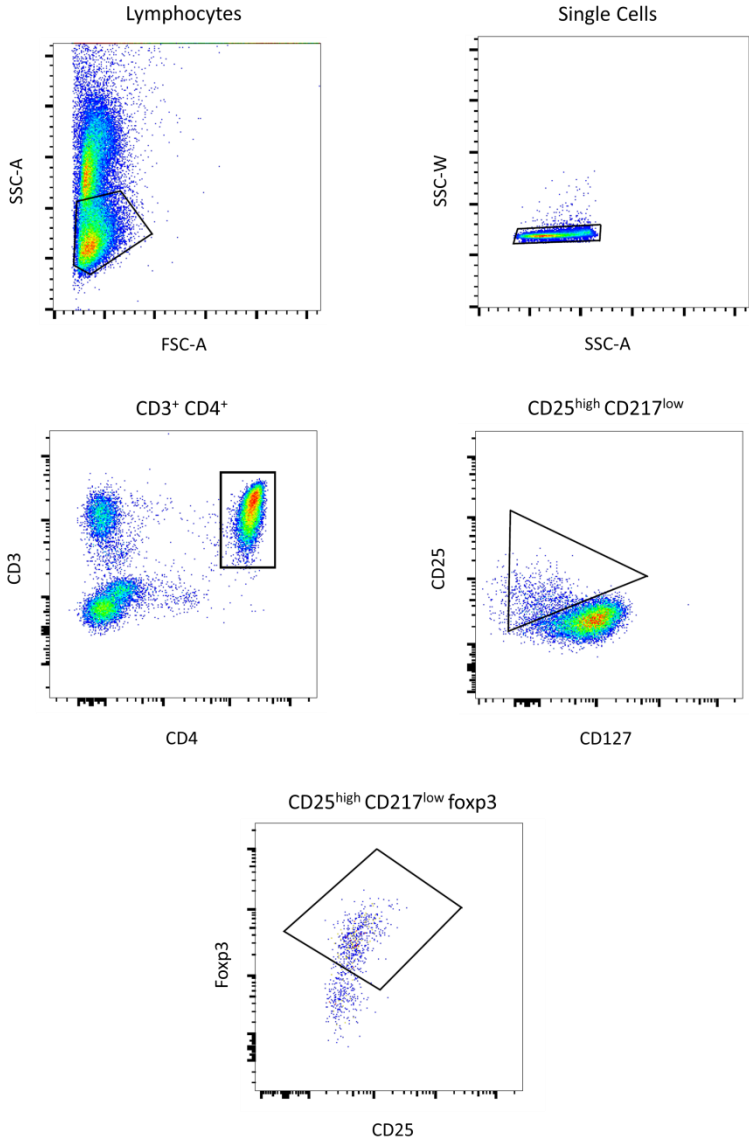
## References

1. Sturm GJ, Varga E-M, Roberts G, Mosbech H, Bilò MB, Akdis CA, et al. EAACI guidelines on allergen immunotherapy: Hymenoptera venom allergy. *Allergy*. 2018;73(4):744–64.
2. Müller U, Akdis CA, Fricker M, Akdis M, Blesken T, Bettens F, et al. Successful immunotherapy with T-cell epitope peptides of bee venom phospholipase A2 induces specific T-cell anergy in patients allergic to bee venom. *J Allergy Clin Immunol*. 1998 Jun;101(6 Pt 1):747–54.
3. Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wüthrich B, Blaser K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest*. 1998 Jul 1;102(1):98–106.
4. van de Veen W, Stanic B, Yaman G, Wawrzyniak M, Söllner S, Akdis DG, et al. IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Apr;131(4):1204–12.
5. Groux H, O’Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, Vries JE de, et al. A CD4 + T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 1997 Oct;389(6652):737–42.
6. Francis JN, Till SJ, Durham SR. Induction of IL-10+CD4+CD25+ T cells by grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Jun;111(6):1255–61.
7. Boonpiyathad T, Meyer N, Moniuszko M, Sokolowska M, Eljaszewicz A, Wirz OF, et al. High-dose bee venom exposure induces similar tolerogenic B-cell responses in allergic patients and healthy beekeepers. *Allergy*. 2017 Mar;72(3):407–15.
8. Gleich GJ, Zimmermann EM, Henderson LL, Yunginger JW. Effect of immunotherapy on immunoglobulin E and immunoglobulin G antibodies to ragweed antigens: a six-year prospective study. *J Allergy Clin Immunol*. 1982 Oct;70(4):261–71.
9. Laurent J, Smiejan JM, Bloch-Morot E, Herman D. Safety of Hymenoptera venom rush immunotherapy. *Allergy*. 1997 Jan;52(1):94–6.
10. Birnbaum J, Ramadour M, Magnan A, Vervloet D. Hymenoptera ultra-rush venom immunotherapy (210 min): a safety study and risk factors. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 2003 Jan;33(1):58–64.
11. Mamessier E, Birnbaum J, Dupuy P, Vervloet D, Magnan A. Ultra-rush venom immunotherapy induces differential T cell activation and regulatory patterns according to the severity of allergy. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 2006 Jun;36(6):704–13.
12. Jutel M, Müller UR, Fricker M, Rihs S, Pichler WJ, Dahinden C. Influence of bee venom immunotherapy on degranulation and leukotriene generation in human blood basophils. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 1996 Oct;26(10):1112–8.

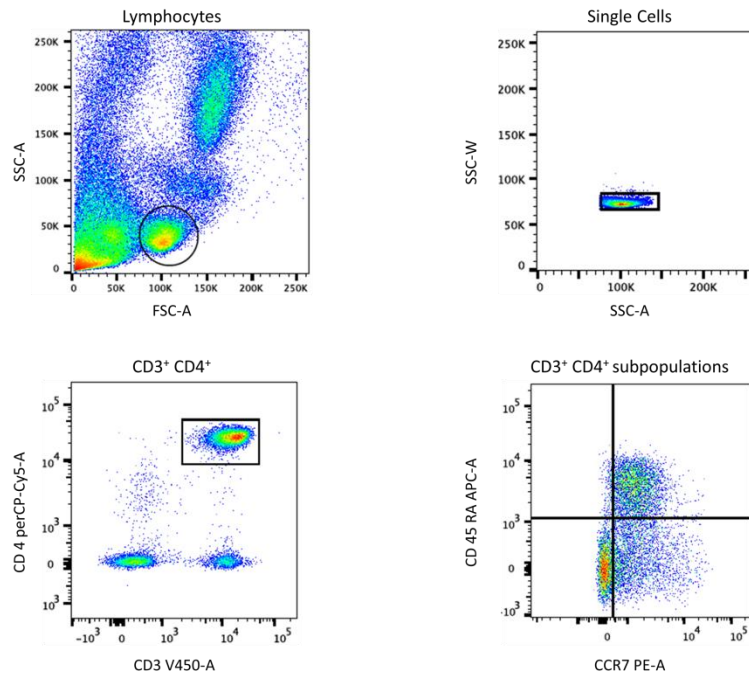
13. Witting Christensen SK, Krohn IK, Thuraiayah J, Skjold T, Schmid JM, Hoffmann HJH. Increasing time interval and decreasing allergen dose interval improves ex vivo desensitization of human blood basophils. *Cytometry B Clin Cytom.* 2017;92(5):340–7.
14. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol.* 2012 Mar;12(3):191–200.
15. Mueller HL. Diagnosis and treatment of insect sensitivity. *J Asthma Res.* 1966 Jun;3(4):331–3.
16. Cosme J, Spínola-Santos A, Pereira-Santos MC, Pereira-Barbosa M. Venom Immunotherapy: a 20-year experience with an ultra-rush protocol (210-min). *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* 2019 Jan 31;51(3):122–8.
17. Bożek A, Kołodziejczyk K. Safety of specific immunotherapy using an ultra-rush induction regimen in bee and wasp allergy. *Hum Vaccines Immunother.* 2017 Dec 6;14(2):288–91.
18. Ruëff F, Wolf H, Schnitker J, Ring J, Przybilla B. Specific immunotherapy in honeybee venom allergy: a comparative study using aqueous and aluminium hydroxide adsorbed preparations. *Allergy.* 2004 Jun;59(6):589–95.
19. Wang Y, Nakahashi-Oda C, Okayama Y, Shibuya A. Autonomous regulation of IgE-mediated mast cell degranulation and immediate hypersensitivity reaction by an inhibitory receptor CD300a. *J Allergy Clin Immunol.* 2019 Jul;144(1):323-327.e7.
20. Sabato V, Verweij MM, Bridts CH, Levi-Schaffer F, Gibbs BF, De Clerck LS, et al. CD300a is expressed on human basophils and seems to inhibit IgE/FcεRI-dependent anaphylactic degranulation. *Cytometry B Clin Cytom.* 2012 May;82(3):132–8.
21. Bruhns P, Iannascoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, Jorieux S, et al. Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood.* 2009 Apr 16;113(16):3716–25.
22. Chaoul N, Albanesi M, Giliberti L, Rossi MP, Nettis E, Di Bona D, et al. Maintenance-Phase Subcutaneous Immunotherapy with House Dust Mites Induces Cyclic Immunologic Effects. *Int Arch Allergy Immunol.* 2019;179(1):37–42.
23. Marcenaro E, Dondero A, Moretta A. Multi-directional cross-regulation of NK cell function during innate immune responses. *Transpl Immunol.* 2006 Dec;17(1):16–9.
24. Sokol CL, Luster AD. The chemokine system in innate immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015 Jan 29;7(5).
25. Komiya A, Hirai K, Iikura M, Nagase H, Yamada H, Miyamasu M, et al. Induction of basophil desensitization in physiological medium: enhancement after IgE-dependent upregulation of surface IgE binding on basophils. *Int Arch Allergy Immunol.* 2003 Jan;130(1):40–50.



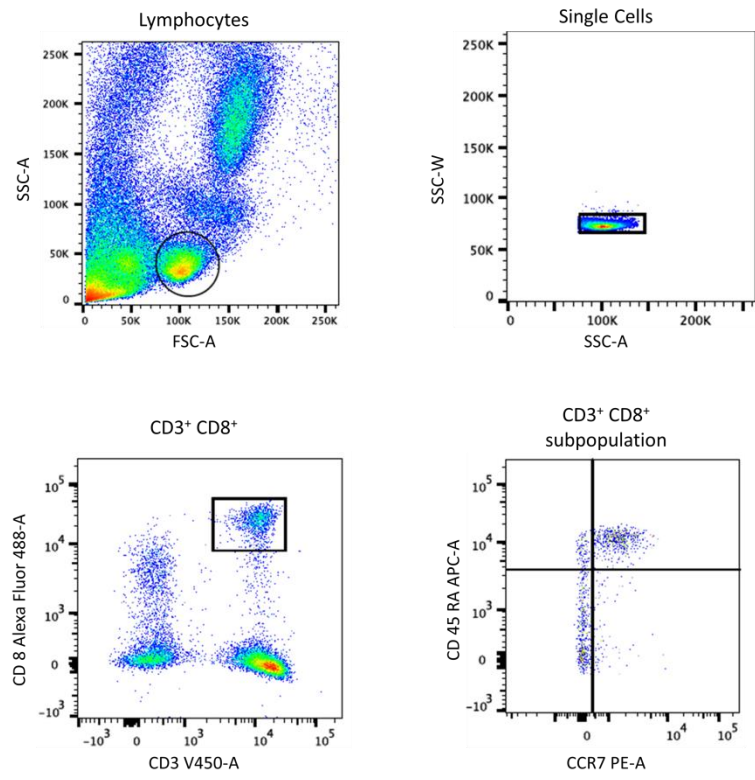
Supplementary Data



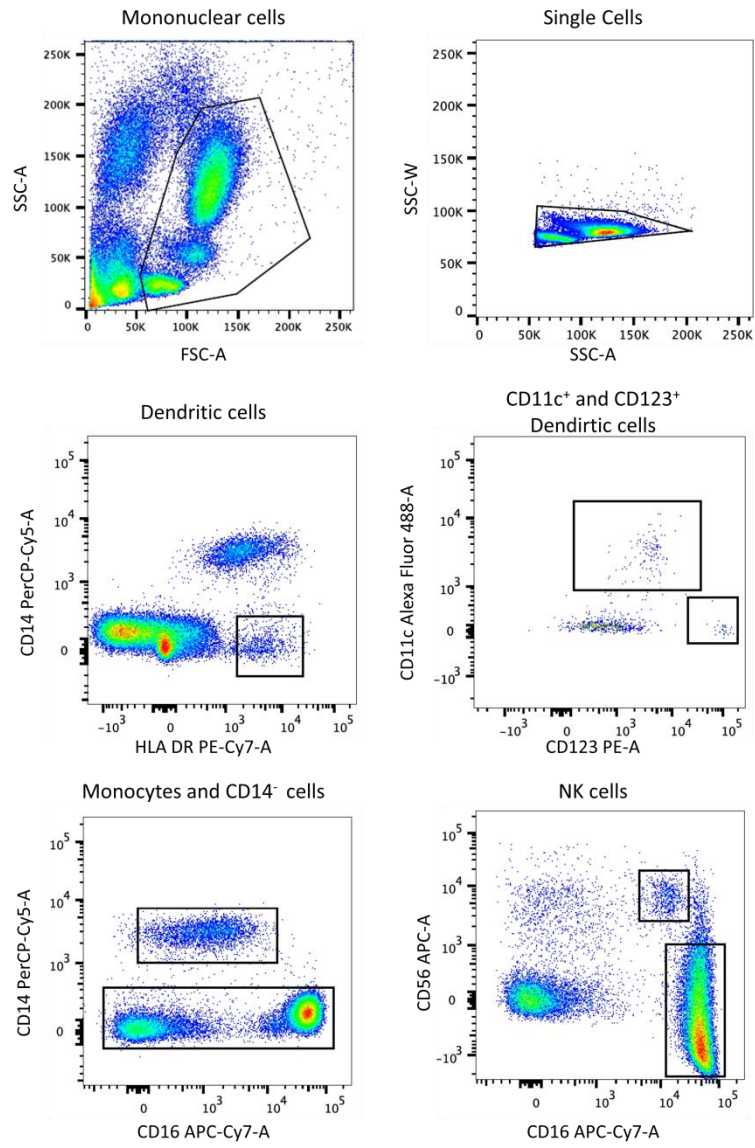
**Fig. E1:** Representative gating strategy for CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> CD127<sup>low</sup> Foxp3<sup>+</sup> cells



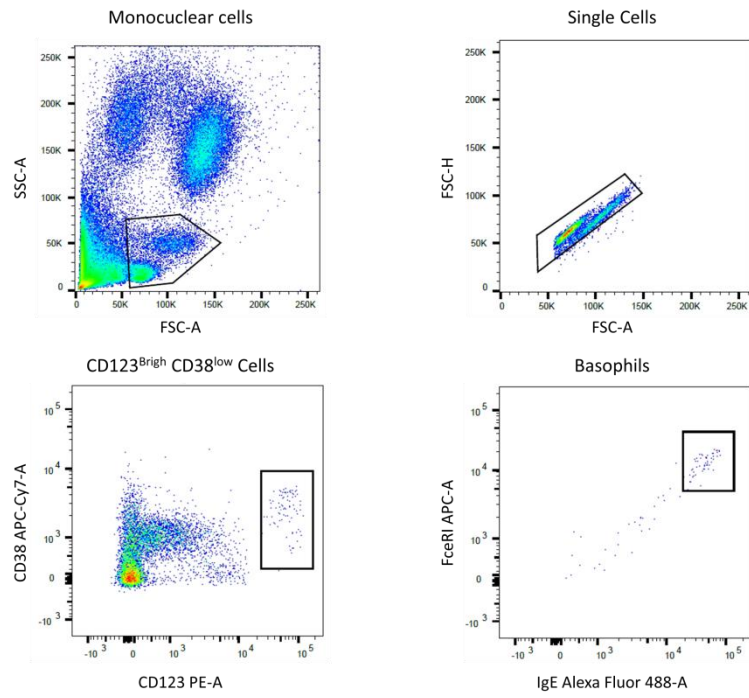
**Fig. E2:** Representative gating strategy for CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> subpopulation



**Fig. E3:** Representative gating strategy for CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> subpopulation



**Fig. E4:** Representative gating strategy for Dendritic cells and NK Cells



**Fig. E5:** Representative gating strategy for Basophils

## Résultats complémentaires

### Tests d'activation des basophiles

Le test d'activation des basophiles a également été réalisé avec le venin auquel est sensibilisé le patient à différentes concentrations. A la concentration de 11.5 ng/ml, nous avons pu observer une augmentation significative de l'activation des basophiles en réponse au venin de guêpe vespula ou d'abeille entre le temps 0 ( $45.94 \pm 5.47$  % de basophiles activés) et le temps 3h30 ( $52.76 \pm 5.61$ % de basophiles activés),  $p = 0.0313$  (Figure 5)

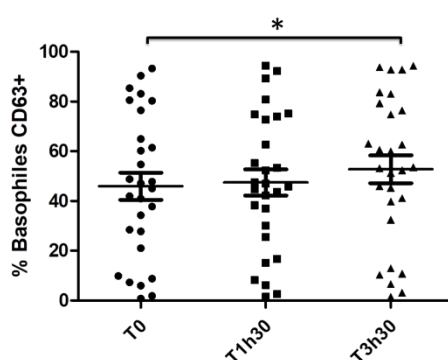


Figure 5 : Test d'activation des basophiles réalisé avec le venin auquel le patient est désensibilisé à la concentration de 11.5 ng/ml. Résultats exprimés en % de basophiles exprimant CD63. (\*  $p < 0.05$ ) (n = 28)

A la concentration de 11.5 pg/ml, aucune différence n'a été observée entre le début de la désensibilisation ( $13 \pm 3.52$ % de basophiles activés) par ultra-rush et la dernière dose ( $13.63 \pm 3.8$ % de basophiles activés),  $p = 0.6431$  (Figure 6)

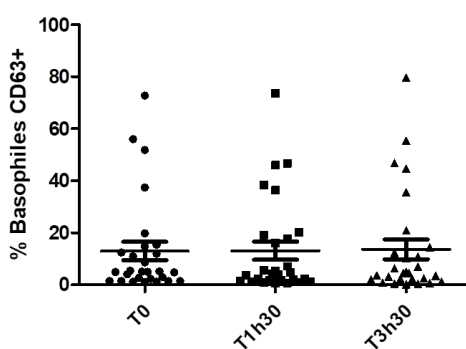


Figure 6 : Test d'activation des basophiles réalisé avec le venin auquel le patient est désensibilisé à la concentration de 11.5 pg/ml. Résultats exprimés en % de basophiles exprimant CD63. (n = 28)

L'ensemble des résultats concernant les tests d'activation des basophiles sont exprimés pour 28 patients, car le patient 5 n'avait pas assez de basophiles pour la réalisation des tests d'activation.

### **Populations leucocytaires**

L'ensemble des populations leucocytaires en valeurs absolues sont réalisées sur 22 patients maximum car nous n'avons pas de numération pour les 7 premiers patients. De plus, l'ensemble des résultats de cytométrie ne sont réalisés que sur 28 patients car il y a vraisemblablement eu un problème lors de la lyse des globules rouges pour le patient 10 et l'ensemble de la cytométrie (en dehors du TAB) n'a pu être réalisée chez ce patient. Le marquage CD4 n'a pas fonctionné pour le 3<sup>ème</sup> temps du patient 26. Les résultats sont donc exprimés sur 20 patients pour les polarisations Th1, Th2 et Th17. Des problèmes lors de la perméabilisation cellulaire nécessaire pour le marquage Foxp3, ne nous a pas permis d'analyser les lymphocytes T régulateurs pour les patients 25, 27,28 et 29 ce qui explique que les résultats sont donnés sur 16 patients. Nous avons également eu un problème sur le marquage CD3 pour le patient 8 sur le mix donnant les populations CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, expliquant que les résultats sont exprimés sur 20 patients pour ces populations.

Le nombre total de leucocytes augmente entre le début de la désensibilisation ( $5.46 \pm 0.27$  G/L) et avant la dernière dose de l'ultra-rush ( $5.88 \pm 0.26$  G/L),  $p = 0.0018$ . Cette augmentation semble plus importante au début de la désensibilisation. (Figure 7)

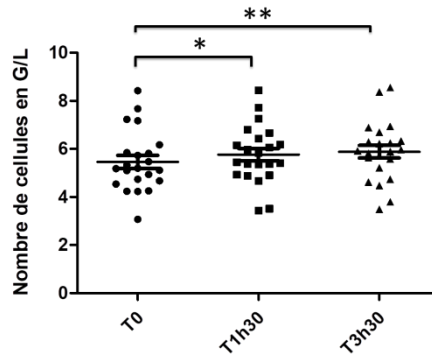


Figure 7 : Evolution du nombre absolu de leucocytes en G/L dans le sang pendant l'ultra-rush thérapie. (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ) (n = 22)

Par contre le nombre de polynucléaires neutrophiles (PNN) ne varie pas de manière significative entre le début de la désensibilisation ( $3.13 \pm 0.23$  G/L) et avant la dernière dose de l'ultra-rush ( $3.26 \pm 0.22$  G/L),  $p = 0.075$  (Figure 8).

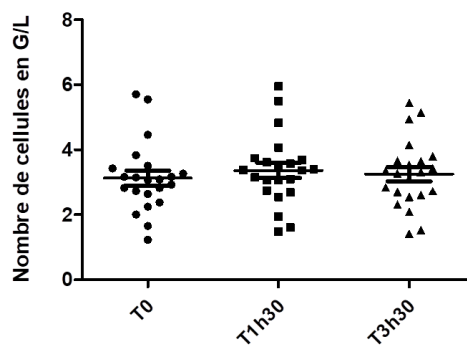


Figure 8 : Evolution du nombre absolu de PNN en G/L dans le sang pendant l'ultra-rush thérapie. (n = 22)

De même le nombre de polynucléaires éosinophiles (PNE) dans le sang ne varie pas non plus de manière significative pendant l'ultra-rush thérapie. ( $0.19 \pm 0.03$  G/L avant de débuter et  $0.17 \pm 0.02$  avant la dernière dose,  $p = 0.1778$ ). (Figure 9)



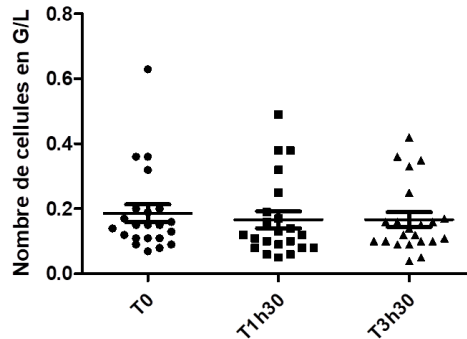


Figure 9 : Evolution du nombre absolu de PNE en G/L dans le sang pendant l'ultra-rush thérapie. (n =22)

Par ailleurs, nous avons observé une diminution significative du nombre de monocytes dans le sang entre le début ( $0.47 \pm 0.03$  G/L) de l'ultra-rush et avant la dernière dose ( $0.44 \pm 0.03$  G/L),  $p = 0.0006$ . Cette diminution est plus importante à la fin de la désensibilisation (Figure 10)

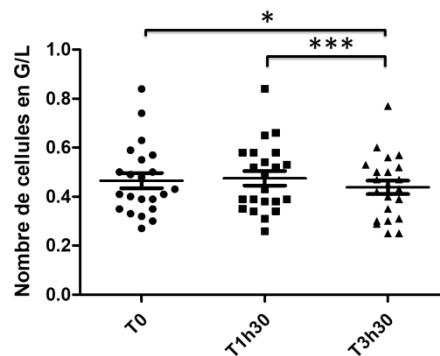


Figure 10 : Evolution du nombre absolu des monocytes en G/L dans le sang pendant l'ultra-rush thérapie. (\*  $p <0.05$ , \*\*\*  $p <0.001$ ) (n =22)

Comme il a déjà été décrit (52), nous avons analysé la polarisation des lymphocytes T  $CD4^+$  (Th1, Th2 et Th17) par des marqueurs de surface. Les lymphocytes Th1 étaient identifiés par un marquage  $CD3^+ CD4^+ CXCR3^+ CCR6^-$ , les lymphocytes Th2 par un marquage  $CD3^+ CD4^+ CXCR3^- CCR6^- CCR4^+$  et les lymphocytes Th17 par un marquage  $CD3^+ CD4^+ CXCR3^- CCR6^+$ .

Nous avons mis en évidence une augmentation significative des lymphocytes Th1 (de  $108.2 \pm 34.14 \cdot 10^6/L$  à  $233.1 \pm 28.98 \cdot 10^6/L$ ,  $p < 0.0001$ ), des Lymphocytes Th2 (de  $84.83 \pm 11.51 \cdot 10^6/L$  à  $138.3 \pm 18.05 \cdot 10^6/L$ ,  $p = 0.0002$ ) et des lymphocytes Th17 ( $14.26 \pm 04.12 \cdot 10^6/L$  à  $21.88 \pm 5.88 \cdot 10^6/L$ ,  $p = 0.0193$ ) au cours de la désensibilisation (Figure 11).

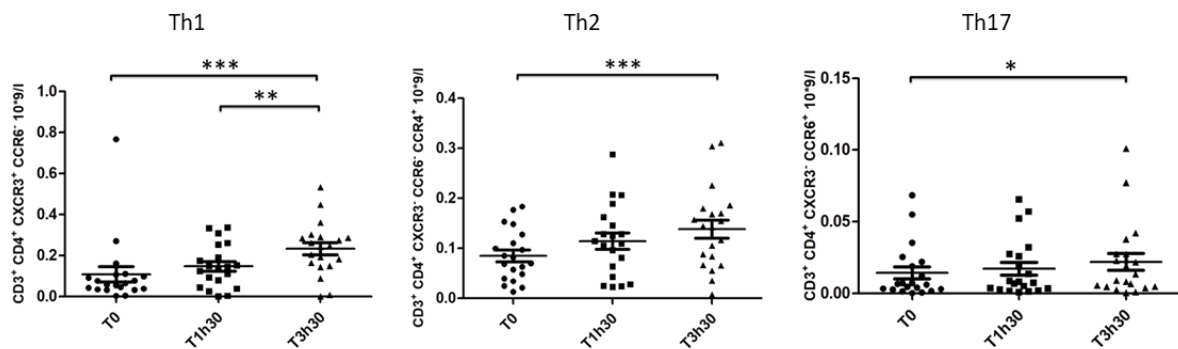


Figure 11 : Evolution du nombre absolu des lymphocytes Th1, Th2 et Th17 en G/L dans le sang pendant l'ultra-rush thérapie. (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ) (n =20)

## Cytokines et Chimiokines

Nous avons étudié l'évolution de la concentration de plusieurs cytokines au cours de la désensibilisation. Les taux sériques des cytokines suivantes étaient en dessous du seuil de dosage du kit de Luminex® : GM-CSF, GRO- $\alpha$ /KC (CXCL1), IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1 RA, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-21, IL-22, IL-27, IL-31 et interféron  $\alpha$ .

Nous n'avons pas montré de différence significative de concentration entre le début et la fin de l'ultra rush thérapie en TNF $\alpha$ , ( $p = 0.4216$ ), IP-10 (CXCL10) ( $p = 0.053$ ) et interféron  $\gamma$  ( $p = 0.6286$ ) (Figure 12)

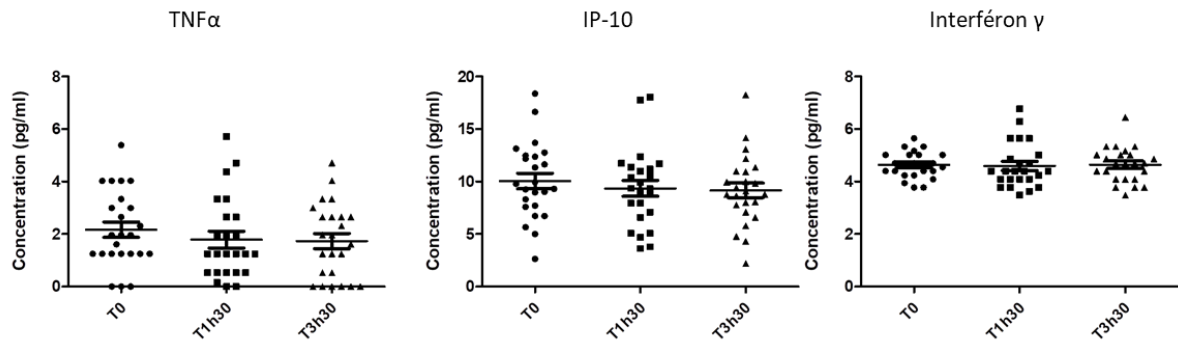


Figure 12 : Evolution de la concentration en TNF $\alpha$ , IP-10 (CXCL10) et interféron  $\gamma$  dans le sérum pendant l'ultra-rush thérapie (n=24).

En ce qui concerne l'évolution de la concentration des interleukines, étudiées pendant l'ultra-rush, il n'y a pas de modification significative dans la concentration en IL-7 ( $p = 0.2081$ ), IL-12 p70 ( $p = 0,8612$ ), IL-18 ( $p = 0.1042$ ) et IL-23 ( $p = 0.8078$ ) (Figure 13)

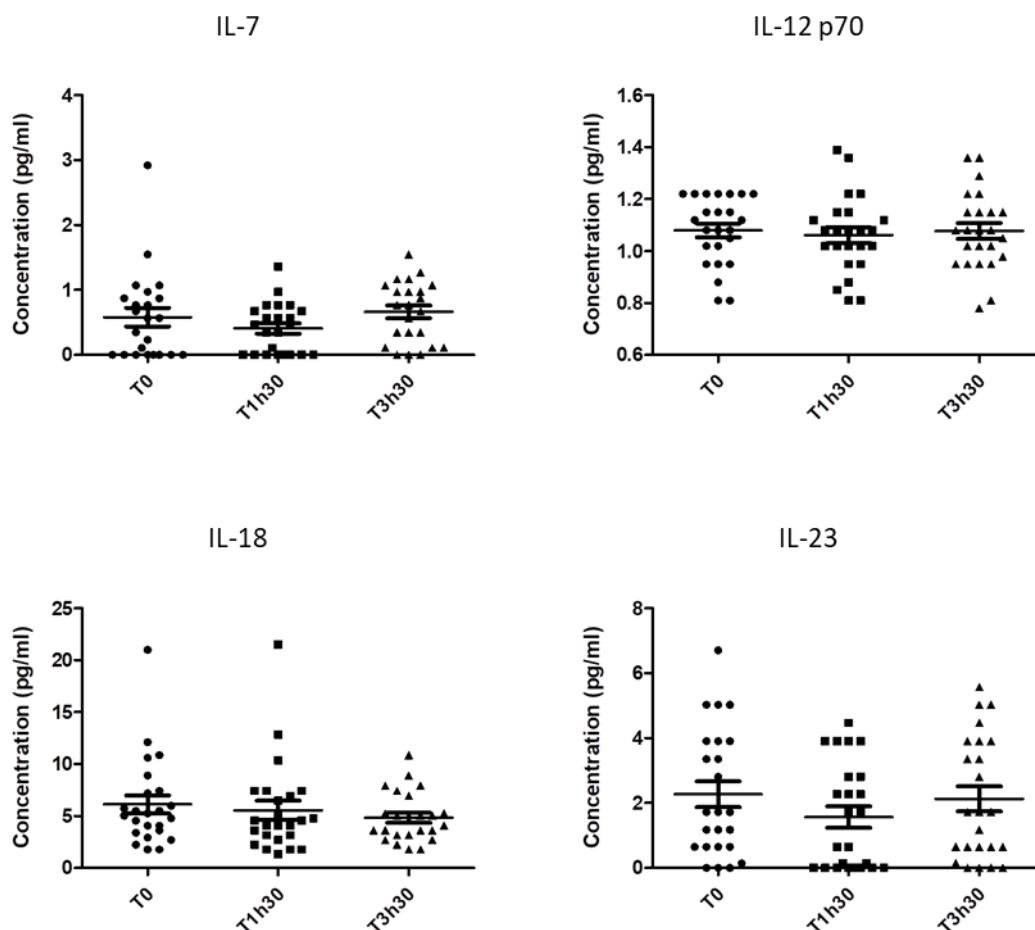


Figure 13 : Evolution de la concentration de l'IL-7, IL-12p70, IL-18 et IL-23 dans le sérum pendant l'ultra-rush thérapie (n=24).

### ARN messenger

Nous avons pour objectifs d'étudier l'évolution en ARN messenger de SHIP-1 et des différents récepteurs à l'histamine pendant l'ultra-rush dans des basophiles triés par cytométrie en flux et dans le sang total. Malheureusement nous avons très peu d'ARN messenger extrait et nous n'avons pu analyser que l'évolution de l'ARN messenger SHIP-1 dans les basophiles et du récepteur de type 4 à l'histamine.

Concernant SHIP-1, nous n'avons pas observé de modification significative dans l'expression de son ARN messenger par l'ultra-rush thérapie mais une légère tendance à l'augmentation

nous amène à nous poser la question de l'intérêt d'une étude sur un groupe plus important de patients ( $p = 0.7704$ ) (Figure 14).

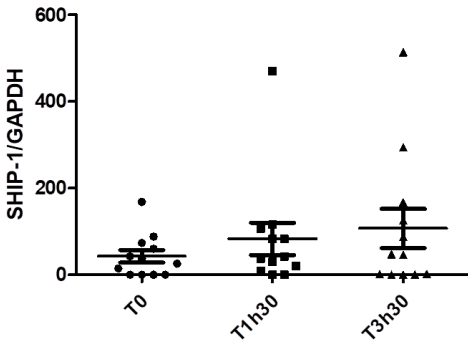


Figure 14 : Evolution de l'ARN messenger de SHIP-1, normalisé par rapport à l'expression de GAPDH, pendant l'ultra-rush (n =12).

Concernant le récepteur de type 4 à l'histamine, aucune différence n'a été observée pendant l'ultra-rush ( $p = 0.6293$ ) (Figure 15)

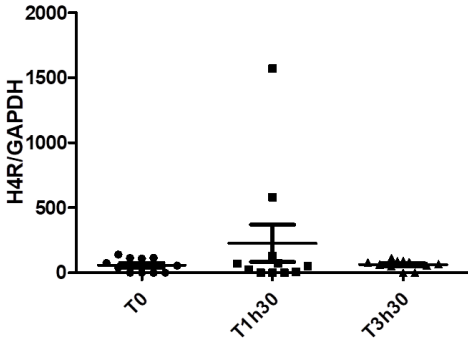


Figure 15 : Evolution de l'ARN messenger du récepteur de type 4 à l'histamine, normalisé par rapport à l'expression de GAPDH, pendant l'ultra-rush (n =11).

## Discussion

Les études s'intéressant aux mécanismes impliqués aux premiers instants de la désensibilisation sont rares. Celles qui sont transversales et qui sont réalisées à partir de prélèvement *in vivo* chez l'homme le sont d'autant plus. C'est pourquoi nous avons donc décidé d'inclure dans cette étude un nombre significatif de patients, 30 initialement prévus, à l'introduction d'une désensibilisation aux venins d'hyménoptères par ultra-rush dont l'efficacité ne fait pas débat et est quasi constante par rapport aux autres désensibilisations (17) et d'étudier les modifications précoces dans le sang dans les différentes populations cellulaires du système immunitaire. Le choix de l'ultra-rush qui atteint la dose cible de la désensibilisation en 3h30 permettait sur des prélèvements réalisés dans un délai court d'étudier à la fois les mécanismes de la tolérance précoce à l'allergène induite par le protocole d'augmentation rapide des doses mais aussi les mécanismes initiant la tolérance à long terme qui s'engage très précocement comme cela avait déjà été démontré (104) et les possibles liens entre les deux.

Cette étude a permis de confirmer certaines hypothèses concernant les mécanismes de la désensibilisation, mais aussi de mettre en évidence des éléments non connus et inattendus ainsi que poser de nouvelles hypothèses.

Tout d'abord, elle confirme la bonne tolérance de la désensibilisation par ultra-rush et donc son efficacité pour atteindre rapidement la dose cible étant donné qu'aucun patient n'a eu d'effets indésirables immédiats. Ensuite l'âge moyen des patients désensibilisés est comparable à ce qui est connu avec un âge un peu en dessous de 50 ans (16,105,106), l'allergie aux venins d'hyménoptère étant plutôt une pathologie touchant l'adulte et peu les enfants. La prédominance de réaction sévère est également connue (16), même s'il existe peut-être un biais, les patients ayant expérimenté une réaction sévère étant plus motivés pour consulter et suivre le traitement de désensibilisation. La prédominance de l'allergie à la guêpe vespula par rapport à l'abeille (16) est également connue et sans doute liée au caractère plus agressif des guêpes par rapport aux abeilles. Le Sex ratio est quant à lui très

variable selon les études et étant donné que la plupart d'entre elles sont mono-centriques sans doute lié à des caractéristiques culturelles modifiant le risque de se faire piquer selon le sexe de l'individu.

Nous avons posé l'hypothèse que la désensibilisation par ultra-rush conduit à un mécanisme inhibant la dégranulation des basophiles. Nos résultats tendent à confirmer cette hypothèse. En effet, la diminution de l'expression de CD63 à la surface des basophiles, que nous avons pu observer par diminution de la MFI de CD63 entre le début de la désensibilisation et avant la dernière dose, signe une diminution de la dégranulation de ceux-ci, CD63 étant exprimé à la surface des basophiles lors de leurs dégranulation (107). Le mécanisme conduisant à cette inhibition n'est toutefois pas élucidé. Nous avons posé l'hypothèse d'une implication de SHIP-1, mais nous n'avons pas pu le confirmer même si une légère tendance non statistique nous amène à penser que ce serait possible. En effet nous voulions étudier l'expression de l'ARN messager de SHIP-1 dans les basophiles triés, mais nous n'avons pas assez de matériels chez beaucoup de patient pour avoir une PCR interprétable. Nous aurions pu analyser la protéine SHIP-1, plutôt que son ARN messager, analyser la phosphorylation de son site de fixation sur les motifs ITIM des différents récepteurs inhibiteurs ou utiliser la technique du « Single Cell qPCR » qui permet de réaliser une PCR sur une seule cellule. Au vu de nos résultats, il nous semble important que ces éléments puissent être étudiés lors d'études ultérieures.

Par ailleurs, nous avons observé une diminution de l'expression de FcεRI à la surface des Basophiles. Ce résultat pourrait être expliqué par une internalisation du récepteur. Il a été démontré une internalisation de FcεRI lors de l'utilisation d'un protocole de désensibilisation rapide (palier de 30 min) dans des mastocytes de souris (108), mais il s'agit à notre connaissance de la première étude *in vivo* suggérant un tel mécanisme chez l'homme. S'il existe une internalisation de FcεRI, cela diminue la coagrégation des récepteurs entre eux et favorise la formation d'une coagrégation entre FcεRI et FcγRIIb qui est inhibitrice (90). Ce résultat permet aussi d'expliquer l'absence de diminution, voir l'augmentation de la

dégranulation des basophiles observée lors du TAB en réponse à l'allergène et aux antis IgE et la diminution de la dégranulation en réponse à fMLP. En effet FcγRIIb fixe des complexes immuns et non des IgG isolées (109). Le TAB ne favorise pas la formation de ces complexes immuns, il n'y a alors plus que la coagrégation des récepteurs FcεRI entre eux qui est possible et donc la voie activatrice, ce qui peut expliquer notre résultat. L'utilisation de fMLP n'active pas les polynucléaires basophiles par la voie des récepteurs aux immunoglobulines, il ne modifie donc pas la phosphorylation des motifs ITIM présents sur la partie intracellulaire de ces récepteurs. Les signaux inhibiteurs engagés, tel que par exemple le recrutement de SHIP-1, sont donc conservés, et vont ainsi pouvoir moduler la réponse au fMLP. Il est donc normal de voir une diminution de la dégranulation pendant l'ultra-rush thérapie lors son utilisation.

Nos résultats sont donc concordants avec un mécanisme de régulation active des basophiles impliquant une internalisation des récepteurs FcεRI de la surface des basophiles par de faibles concentrations d'allergène lors des premières injections de l'ultra-rush.

L'ultra-rush thérapie est la première étape de mise en place de la tolérance sur le long terme et fait intervenir également les cellules de l'immunité dite adaptative comme il a déjà été suggéré (104). Nos résultats confirment cette hypothèse. Il a déjà été démontré que les cellules dendritiques ont un rôle primordial dans la régulation et l'orientation de la réponse immune en orientant la réponse lymphocytaire T vers une réponse de type régulatrice ou Th2 (73–77). L'augmentation de leur population dans le sang que nous avons observé est le signe d'une mobilisation et d'une circulation de celles-ci, ce qui confirme leur implication dès cette phase très précoce de la désensibilisation. Les cellules dendritiques n'agissent toutefois pas seules mais en régulant les lymphocytes T. Nous avons pu observer que ceux-ci sont engagés précocement, avec une augmentation des populations mémoires et naïves, et non effectrices, montrant plutôt une initiation sur le long terme d'une réponse T plutôt qu'une simple activation de ces cellules pendant l'ultra-rush. Très peu de données sont disponibles sur le rôle des lymphocytes T pendant la phase d'initiation de l'ultra-rush, seule



une étude a montré une augmentation de la sécrétion après stimulation *in vitro* d'IL-10 et d'interféron  $\gamma$  des lymphocytes alors qu'il existait une diminution de leur sécrétion en IL-4 et en IL-13 pendant l'ultra-rush (104). Ces résultats ne sont pas contradictoires avec les nôtres qui montrent une augmentation de toutes les populations Th1, Th2, Th17 et T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> CD127<sup>low</sup> Foxp3<sup>+</sup> car leur circulation dans le sang ne préjuge pas de leur état d'activation que nous n'avons pas étudié, et au contraire confirme un engagement très précoce des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> dans la désensibilisation aux venins d'hyménoptères qui demanderait à être étudié plus en détail.

En dehors d'une étude qui a observé une diminution de RANTES (CCL5) (110) pendant un traitement de type rush aux venins d'hyménoptères, il s'agit à notre connaissance de la seule étude observant l'évolution des chimiokines pendant la phase d'ascension des doses de la désensibilisation. Non seulement nous confirmons la diminution de RANTES, et montrons que celle-ci est très précoce dès les 90 premières minutes de la désensibilisation, mais nous montrons en plus une diminution tout aussi précoce de tout un ensemble de chimiokines dans le sérum des patients désensibilisés. En effet nous montrons également une diminution dès 90 min d'ultra-rush soit 30 min après la dose cumulée de 1.1 $\mu$ g de venin, une diminution de MCP-1 (CCL2), de MIP-1 $\alpha$  (CCL3), de MIP-1 $\beta$  (CCL4) et de SDF-1 $\alpha$  (CXCL12). Nous n'avons pas observé de résultats significatifs pour l'EOTAXINE (CCL11) et IP10 (CXCL10) mais il semble y avoir une tendance à la baisse également. Il semble également y avoir une tendance à la baisse pour le TNF- $\alpha$  mais pas pour l'interféron- $\gamma$ . L'ensemble des chimiokines qui diminuent au cours de la rush-thérapie, sauf SDF-1 $\alpha$ , sont impliquées dans le recrutement des lymphocytes et des cellules innées dans les tissus inflammatoires (111), leurs diminution est donc probablement le marqueur d'un processus anti-inflammatoire. L'augmentation, plus tardive des populations cellulaires dans le sang peut être secondaire à ce recrutement moins important dans les tissus. Nous pouvons également poser l'hypothèse que ces cellules sont en cours de transit des tissus vers le sang puis des organes lymphoïdes secondaires. Nous n'avons toutefois pas pu étudier l'évolution de chimiokines les recrutant

vers ces organes lymphoïdes secondaires. SDF-1  $\alpha$  est quant à elle impliquée dans le maintien des cellules dans la moelle osseuse (111).

Nous avons également observé une diminution, parfois drastique, des lymphocytes NK. Il s'agit, à notre connaissance, de la première observation d'une telle diminution pendant une désensibilisation, mais le rôle de ces cellules dans l'allergie a été peu étudié. Il a été décrit un rôle des lymphocytes NK dans la modulation de la réponse des cellules dendritiques et qu'elles pouvaient avoir un rôle régulateur (112). Si elles sont engagées dans cette modulation de la réponse des cellules dendritiques qui a lieu dans les organes lymphoïdes secondaires, il est normal de voir une diminution dans le sang de ces cellules plutôt que l'augmentation observée pour les autres cellules engagées par l'ultra-rush thérapie. En effet le « réservoir principal » des lymphocytes NK est le sang alors qu'il s'agit des tissus périphériques ou des organes lymphoïdes pour les populations cellulaires qui augmentent.

Nous pouvons également discuter le choix de points de prélèvement. Le prélèvement avant début de désensibilisation permet d'avoir un point de départ et était indispensable. Nous avons choisi de réaliser un prélèvement intermédiaire et afin de savoir si les modifications observées étaient précoces, tardives, ou progressives et nous avons choisi le point à 1 heure 30 minutes car avant les doses sont multipliées par 10 avant chaque injections puis elles sont ensuite uniquement augmentées de 10  $\mu\text{g}$  par injection. Les temps entre les injections sont également de 30 minutes avant et de 1 heure après. Ce point correspond donc à un changement dans le rythme de l'ultra-rush. Nous avons également choisi de prélever avant la dernière injection plutôt qu'après, car nous nous intéressions plus à savoir pourquoi elle était bien tolérée plutôt qu'à connaître ses effets. Concernant les effets à long terme nous avons posé l'hypothèse que ceux-ci étaient déjà engagés avant cette injection, plus de la moitié de la dose totale de l'ultra-rush ayant déjà été administrée (61.1  $\mu\text{g}$  sur 101.1  $\mu\text{g}$ ).

Nous avons analysé les populations par cytométrie directement, c'est-à-dire sans stimulation ou traitement *in vitro* après les prélèvements sanguin (en dehors du test d'activation des basophiles), de même que les différentes cytokines et chimiokines présentes dans le sang.

Notre objectif était éviter tout risque de modifier secondairement les populations cellulaires afin de pouvoir observer, avec le moins d'interférences possibles, ce qu'il se passe réellement *in vivo* chez l'homme pendant l'ultra-rush. Ce choix a eu plusieurs conséquences. Tout d'abord, dans le sérum nous ne pouvons pas identifier les sources de sécrétions des différentes chimiokines et cytokines, ensuite notamment en ce qui concerne les cytokines, les taux sanguins étaient malheureusement trop faibles pour être détectés par le Luminex®.

Au regard des résultats obtenus nous souhaiterions toutefois réaliser des tests de stimulation *in vitro* sur des cellules différenciées à partir de sang de donneur ou sur modèles animaux. Il nous faudrait aussi tester sur ces modèles différents inhibiteurs ou agonistes notamment de SHIP-1 spécifiques de la voie des récepteurs aux immunoglobulines pour étudier plus en profondeur les mécanismes impliqués.

En conclusion, cette étude permet de confirmer la bonne tolérance de l'ultra-rush, de l'expliquer par un mécanisme d'autorégulation des basophiles, via une internalisation des récepteurs FcεRI secondaire à des doses qui sont sous le seuil de dégranulation, conduisant à une inhibition de celle-ci. Ensuite, l'ultra-rush permet un engagement très précoce d'éléments de régulation du système immunitaire tels que les cellules dendritiques et les lymphocytes NK, ainsi que des différentes populations lymphocytaires CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> mémoires et naïves, via une diminution très précoce de certaines chimiokines. Toutefois les interactions cellulaires ainsi que la source de ces chimiokines n'ont pas pu être étudiées et donc d'autres études complémentaires sont nécessaires afin d'élucider l'ensemble des mécanismes immunologiques engagés par le traitement de désensibilisation de type ultra-rush.

## Bibliographie

1. Gell PHG, Coombs RRA. The classification of allergic reactions underlying disease. In: Clinical Aspects of Immunology. Blackwell Science; 1963.
2. Deckers J, De Bosscher K, Lambrecht BN, Hammad H. Interplay between barrier epithelial cells and dendritic cells in allergic sensitization through the lung and the skin. *Immunol Rev.* 2017;278(1):131–144.
3. Froidure A, Mouthuy J, Durham SR, Chanez P, Sibille Y, Pilette C. Asthma phenotypes and IgE responses. *Eur Respir J.* 2016 Jan;47(1):304–319.
4. Shamji MH, Durham SR. Mechanisms of allergen immunotherapy for inhaled allergens and predictive biomarkers. *J Allergy Clin Immunol.* 2017 Dec;140(6):1485–98.
5. Ott VL, Cambier JC. Activating and inhibitory signaling in mast cells: new opportunities for therapeutic intervention? *J Allergy Clin Immunol.* 2000 Sep;106(3):429–40.
6. González-de-Olano D, Álvarez-Twose I. Mast Cells as Key Players in Allergy and Inflammation. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2018 Dec;28(6):365–78.
7. Noon L. Prophylactic Inoculation against Hay Fever. *Int Arch Allergy Immunol.* 1953;4(4):285–8.
8. Freeman J. FURTHER OBSERVATIONS ON THE TREATMENT OF HAY FEVER BY HYPODERMIC INOCULATIONS OF POLLEN VACCINE. *The Lancet.* 1911 Sep 16;178(4594):814–7.
9. Cooke RA. Studies in Specific Hypersensitiveness: III. On Constitutional Reactions: the Dangers of the Diagnostic Cutaneous Test and Therapeutic Injection of Allergens. *J Immunol.* 1922 Mar 1;7(2):119–46.
10. Freeman J. " RUSH " INOCULATION, WITH SPECIAL REFERENCE TO HAY-FEVER TREATMENT. *The Lancet.* 1930 Apr 5;215(5562):744–7.
11. Frankland AW, Augustin R. Prophylaxis of summer hay-fever and asthma: a controlled trial comparing crude grass-pollen extracts with the isolated main protein component. *Lancet Lond Engl.* 1954 May 22;266(6821):1055–7.
12. Fackler WR, Loveless MH. Wasp venom allergy and immunity. *Ann Allergy.* 1956 Oct;14(5):347–66.
13. Hunt KJ, Valentine MD, Sobotka AK, Benton AW, Amodio FJ, Lichtenstein LM. A controlled trial of immunotherapy in insect hypersensitivity. *N Engl J Med.* 1978 Jul 27;299(4):157–61.

14. Golden DB, Valentine MD, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM. Regimens of Hymenoptera venom immunotherapy. *Ann Intern Med.* 1980 May;92(5):620–4.
15. Laurent J, Smiejan JM, Bloch-Morot E, Herman D. Safety of Hymenoptera venom rush immunotherapy. *Allergy.* 1997 Jan;52(1):94–6.
16. Birnbaum J, Ramadour M, Magnan A, Vervloet D. Hymenoptera ultra-rush venom immunotherapy (210 min): a safety study and risk factors. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* 2003 Jan;33(1):58–64.
17. Sturm GJ, Varga E-M, Roberts G, Mosbech H, Bilò MB, Akdis CA, et al. EAACI guidelines on allergen immunotherapy: Hymenoptera venom allergy. *Allergy.* 2018;73(4):744–64.
18. Ruëff F, Wenderoth A, Przybilla B. Patients still reacting to a sting challenge while receiving conventional Hymenoptera venom immunotherapy are protected by increased venom doses. *J Allergy Clin Immunol.* 2001 Dec 1;108(6):1027–32.
19. Weyer A, Donat N, L’Heritier C, Juilliard F, Pauli G, Soufflet B, et al. Grass pollen hyposensitization versus placebo therapy. I. Clinical effectiveness and methodological aspects of a pre-seasonal course of desensitization with a four-grass pollen extract. *Allergy.* 1981 Jul;36(5):309–17.
20. Bousquet J, Hejjaoui A, Skassa-Brociek W, Guérin B, Maasch HJ, Dhivert H, et al. Double-blind, placebo-controlled immunotherapy with mixed grass-pollen allergoids. I. Rush immunotherapy with allergoids and standardized orchard grass-pollen extract. *J Allergy Clin Immunol.* 1987 Oct;80(4):591–8.
21. Ewan PW, Alexander MM, Snape C, Ind PW, Agrell B, Dreborg S. Effective hyposensitization in allergic rhinitis using a potent partially purified extract of house dust mite. *Clin Allergy.* 1988 Sep;18(5):501–8.
22. Passalacqua G, Albano M, Fregonese L, Riccio A, Pronzato C, Mela GS, et al. Randomised controlled trial of local allergoid immunotherapy on allergic inflammation in mite-induced rhinoconjunctivitis. *Lancet Lond Engl.* 1998 Feb 28;351(9103):629–32.
23. Caffarelli C, Sensi LG, Marcucci F, Cavagni G. Preseasonal local allergoid immunotherapy to grass pollen in children: a double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Allergy.* 2000 Dec;55(12):1142–7.
24. Roberts G, Pfaar O, Akdis CA, Ansotegui IJ, Durham SR, Gerth van Wijk R, et al. EAACI Guidelines on Allergen Immunotherapy: Allergic rhinoconjunctivitis. *Allergy.* 2018;73(4):765–98.

25. Virchow JC, Backer V, Kuna P, Prieto L, Nolte H, Villesen HH, et al. Efficacy of a House Dust Mite Sublingual Allergen Immunotherapy Tablet in Adults With Allergic Asthma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2016 Apr 26;315(16):1715–25.
26. Klimek L, Mosbech H, Ziegelmayer P, Rehm D, Stage BS, Demoly P. SQ house dust mite (HDM) SLIT-tablet provides clinical improvement in HDM-induced allergic rhinitis. *Expert Rev Clin Immunol*. 2016;12(4):369–77.
27. pubmeddev, al HS et. Five-grass pollen 300IR SLIT tablets: efficacy and safety in children and adolescents. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2019 Aug 14]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/20718927>
28. Wessel F, Chartier A, Meunier J-P, Magnan A. Safety and tolerability of an SQ-standardized GRAss ALLergy immunotherapy tablet (GRAZAX®) in a real-life setting for three consecutive seasons - the GRAAL trial. *Clin Drug Investig*. 2012 Jul 1;32(7):451–63.
29. Patriarca G, Nucera E, Roncallo C, Aruanno A, Lombardo C, Decinti M, et al. Sublingual desensitization in patients with wasp venom allergy: preliminary results. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2008 Sep;21(3):669–677.
30. 2012-04-19\_Livre\_Allergie\_aux\_insectes.pdf [Internet]. [cited 2019 Aug 19]. Available from: [http://allergo.lyon.inserm.fr/maladies\\_allergiques/2012-04-19\\_Livre\\_Allergie\\_aux\\_insectes.pdf](http://allergo.lyon.inserm.fr/maladies_allergiques/2012-04-19_Livre_Allergie_aux_insectes.pdf)
31. Morita Y, Aida N, Miyamoto T. Role of phospholipase A2 activation in histamine release from human basophils. *Allergy*. 1983 Aug;38(6):413–8.
32. Moffitt JE, Golden DBK, Reisman RE, Lee R, Nicklas R, Freeman T, et al. Stinging insect hypersensitivity: a practice parameter update. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Oct;114(4):869–86.
33. Novembre E, Cianferoni A, Bernardini R, Veltroni M, Ingargiola A, Lombardi E, et al. Epidemiology of insect venom sensitivity in children and its correlation to clinical and atopic features. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 1998 Jul;28(7):834–8.
34. Golden DB, Marsh DG, Freidhoff LR, Kwiterovich KA, Addison B, Kagey-Sobotka A, et al. Natural history of Hymenoptera venom sensitivity in adults. *J Allergy Clin Immunol*. 1997 Dec;100(6 Pt 1):760–6.
35. Golden DB, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM. Survey of patients after discontinuing venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Feb;105(2 Pt 1):385–90.

36. Gleich GJ, Zimmermann EM, Henderson LL, Yunginger JW. Effect of immunotherapy on immunoglobulin E and immunoglobulin G antibodies to ragweed antigens: a six-year prospective study. *J Allergy Clin Immunol*. 1982 Oct;70(4):261–71.
37. Eifan AO, Akkoc T, Yildiz A, Keles S, Ozdemir C, Bahceciler NN, et al. Clinical efficacy and immunological mechanisms of sublingual and subcutaneous immunotherapy in asthmatic/rhinitis children sensitized to house dust mite: an open randomized controlled trial. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 2010 Jun;40(6):922–32.
38. Durham SR, Emminger W, Kapp A, de Monchy JGR, Rak S, Scadding GK, et al. SQ-standardized sublingual grass immunotherapy: confirmation of disease modification 2 years after 3 years of treatment in a randomized trial. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Mar;129(3):717-725.e5.
39. Jutel M, Jaeger L, Suck R, Meyer H, Fiebig H, Cromwell O. Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Sep;116(3):608–13.
40. Aalberse RC, Schuurman J. IgG4 breaking the rules. *Immunology*. 2002 Jan;105(1):9–19.
41. Rispens T, Ooijevaar-de Heer P, Bende O, Aalberse RC. Mechanism of immunoglobulin G4 Fab-arm exchange. *J Am Chem Soc*. 2011 Jul 6;133(26):10302–11.
42. van Neerven RJ, Wikborg T, Lund G, Jacobsen B, Brinch-Nielsen A, Arned J, et al. Blocking antibodies induced by specific allergy vaccination prevent the activation of CD4+ T cells by inhibiting serum-IgE-facilitated allergen presentation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1999 Sep 1;163(5):2944–52.
43. Würtzen PA, Lund G, Lund K, Arvidsson M, Rak S, Ipsen H. A double-blind placebo-controlled birch allergy vaccination study II: correlation between inhibition of IgE binding, histamine release and facilitated allergen presentation. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 2008 Aug;38(8):1290–301.
44. Burton OT, Tamayo JM, Stranks AJ, Koleoglou KJ, Oettgen HC. Allergen-specific IgG antibody signaling through FcγRIIb promotes food tolerance. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(1):189-201.e3.
45. Rosser EC, Mauri C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity*. 2015 Apr 21;42(4):607–12.
46. van de Veen W, Stanic B, Yaman G, Wawrzyniak M, Söllner S, Akdis DG, et al. IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Apr;131(4):1204–12.

47. Boonpiyathad T, Meyer N, Moniuszko M, Sokolowska M, Eljaszewicz A, Wirz OF, et al. High-dose bee venom exposure induces similar tolerogenic B-cell responses in allergic patients and healthy beekeepers. *Allergy*. 2017 Mar;72(3):407–15.
48. Liew FY. T(H)1 and T(H)2 cells: a historical perspective. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(1):55–60.
49. Durham SR, Kay AB, Hamid Q. Changes in Allergic Inflammation Associated with Successful Immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol*. 1995;107(1–3):282–4.
50. Jacobson NG, Szabo SJ, Weber-Nordt RM, Zhong Z, Schreiber RD, Darnell JE, et al. Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4. *J Exp Med*. 1995 May 1;181(5):1755–62.
51. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*. 2000 Mar 17;100(6):655–69.
52. Mahnke YD, Beddall MH, Roederer M. OMIP-017: Human CD4+Helper T-cell Subsets Including Follicular Helper Cells. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol*. 2013 May;83(5):439–40.
53. Takeda K, Tanaka T, Shi W, Matsumoto M, Minami M, Kashiwamura S, et al. Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature*. 1996 Apr 18;380(6575):627–30.
54. Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*. 1997 May 16;89(4):587–96.
55. Snapper CM, Paul WE. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science*. 1987 May 22;236(4804):944–7.
56. Müller U, Akdis CA, Fricker M, Akdis M, Blesken T, Bettens F, et al. Successful immunotherapy with T-cell epitope peptides of bee venom phospholipase A2 induces specific T-cell anergy in patients allergic to bee venom. *J Allergy Clin Immunol*. 1998 Jun;101(6 Pt 1):747–54.
57. Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wüthrich B, Blaser K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest*. 1998 Jul 1;102(1):98–106.
58. Groux H, O’Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 1997 Oct 16;389(6652):737–42.



59. Torgerson TR, Ochs HD. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome: a model of immune dysregulation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2002 Dec;2(6):481–7.
60. Radulovic S, Jacobson MR, Durham SR, Nouri-Aria KT. Grass pollen immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4+ CD25+ cells in the nasal mucosa. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Jun;121(6):1467–72, 1472.e1.
61. Ihara F, Sakurai D, Yonekura S, Iinuma T, Yagi R, Sakurai T, et al. Identification of specifically reduced Th2 cell subsets in allergic rhinitis patients after sublingual immunotherapy. *Allergy*. 2018 Sep;73(9):1823–32.
62. Mondoulet L, Dioszeghy V, Busato F, Plaquet C, Dhelft V, Bethune K, et al. Gata3 hypermethylation and Foxp3 hypomethylation are associated with sustained protection and bystander effect following epicutaneous immunotherapy in peanut-sensitized mice. *Allergy*. 2019 Jan;74(1):152–64.
63. Syed A, Garcia MA, Lyu S-C, Bucayu R, Kohli A, Ishida S, et al. Peanut oral immunotherapy results in increased antigen-induced regulatory T-cell function and hypomethylation of forkhead box protein 3 (FOXP3). *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Feb;133(2):500–10.
64. Liu Y, Zeng M, Liu Z. Th17 response and its regulation in inflammatory upper airway diseases. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 2015 Mar;45(3):602–12.
65. Chesné J, Braza F, Chadeuf G, Mahay G, Cheminant M-A, Loy J, et al. Prime role of IL-17A in neutrophilia and airway smooth muscle contraction in a house dust mite-induced allergic asthma model. *J Allergy Clin Immunol*. 2015 Jun;135(6):1643-1643.e3.
66. Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol*. 2007 Dec;19(6):652–7.
67. Tian M, Wang Y, Lu Y, Jiang Y, Zhao D. Effects of sublingual immunotherapy for *Dermatophagoides farinae* on Th17 cells and CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in peripheral blood of children with allergic asthma. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2014 May;4(5):371–5.
68. Głobińska A, Kowalski ML. Innate lymphoid cells: the role in respiratory infections and lung tissue damage. *Expert Rev Clin Immunol*. 2017;13(10):991–9.
69. Lao-Araya M, Steveling E, Scadding GW, Durham SR, Shamji MH. Seasonal increases in peripheral innate lymphoid type 2 cells are inhibited by subcutaneous grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Nov;134(5):1193-1195.e4.

70. Fan D-C, Wang X-D, Wang C-S, Wang Y, Cao F-F, Zhang L. Suppression of Immunotherapy on Group 2 Innate Lymphoid Cells in Allergic Rhinitis. *Chin Med J (Engl)*. 2016 05;129(23):2824–8.
71. Mitthamsiri W, Pradubpongsa P, Sangasapaviliya A, Boonpiyathad T. Decreased CRTH2 Expression and Response to Allergen Re-stimulation on Innate Lymphoid Cells in Patients With Allergen-Specific Immunotherapy. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2018 Nov;10(6):662–74.
72. Wang S, Xia P, Chen Y, Qu Y, Xiong Z, Ye B, et al. Regulatory Innate Lymphoid Cells Control Innate Intestinal Inflammation. *Cell*. 2017 Sep 21;171(1):201-216.e18.
73. Pilette C, Jacobson MR, Ratajczak C, Detry B, Banfield G, VanSnick J, et al. Aberrant dendritic cell function conditions Th2-cell polarization in allergic rhinitis. *Allergy*. 2013 Mar;68(3):312–21.
74. Gueguen C, Bouley J, Moussu H, Luce S, Duchateau M, Chamot-Rooke J, et al. Changes in markers associated with dendritic cells driving the differentiation of either TH2 cells or regulatory T cells correlate with clinical benefit during allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 Feb;137(2):545–58.
75. van der Aar AMG, Sibiryak DS, Bakdash G, van Capel TMM, van der Kleij HPM, Opstelten D-JE, et al. Vitamin D3 targets epidermal and dermal dendritic cells for induction of distinct regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Jun;127(6):1532-1540.e7.
76. Zimmer A, Bouley J, Le Mignon M, Pliquet E, Horiot S, Turfkruyer M, et al. A regulatory dendritic cell signature correlates with the clinical efficacy of allergen-specific sublingual immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Apr;129(4):1020–30.
77. Sato K, Uto T, Fukaya T, Takagi H. Regulatory Dendritic Cells. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2017;410:47–71.
78. Angelini F, Pacciani V, Corrente S, Silenzi R, Di Pede A, Polito A, et al. Dendritic cells modification during sublingual immunotherapy in children with allergic symptoms to house dust mites. *World J Pediatr WJP*. 2011 Feb;7(1):24–30.
79. Tanaka Y, Nagashima H, Bando K, Lu L, Ozaki A, Morita Y, et al. Oral CD103-CD11b+ classical dendritic cells present sublingual antigen and induce Foxp3+ regulatory T cells in draining lymph nodes. *Mucosal Immunol*. 2017;10(1):79–90.
80. Dawicki W, Li C, Town J, Zhang X, Gordon JR. Therapeutic reversal of food allergen sensitivity by mature retinoic acid-differentiated dendritic cell induction of LAG3+CD49b-Foxp3- regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2017 May;139(5):1608-1620.e3.

81. Sloane D, Govindarajulu U, Harrow-Mortelliti J, Barry W, Hsu FI, Hong D, et al. Safety, Costs, and Efficacy of Rapid Drug Desensitizations to Chemotherapy and Monoclonal Antibodies. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2016 Jun;4(3):497–504.
82. Maintz L, Bussmann C, Bieber T, Novak N. Contribution of histamine metabolism to tachyphylaxis during the buildup phase of rush immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Mar;123(3):701–3.
83. Jutel M, Müller UR, Fricker M, Rihs S, Pichler WJ, Dahinden C. Influence of bee venom immunotherapy on degranulation and leukotriene generation in human blood basophils. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 1996 Oct;26(10):1112–8.
84. Novak N, Mete N, Bussmann C, Maintz L, Bieber T, Akdis M, et al. Early suppression of basophil activation during allergen-specific immunotherapy by histamine receptor 2. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Nov;130(5):1153-1158.e2.
85. Plewako H, Wosińska K, Arvidsson M, Bjorkander J, Skov PS, Håkansson L, et al. Basophil interleukin 4 and interleukin 13 production is suppressed during the early phase of rush immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2006;141(4):346–53.
86. Jutel M, Skrbic D, Pichler WJ, Müller UR. Ultra rush bee venom immunotherapy does not reduce cutaneous weal responses to bee venom and codeine phosphate. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 1995 Dec;25(12):1205–10.
87. Long EO. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:875–904.
88. Cambier JC. Inhibitory receptors abound? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jun 10;94(12):5993–5.
89. Daëron M. Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:203–34.
90. Malbec O, Fong DC, Turner M, Tybulewicz VL, Cambier JC, Fridman WH, et al. Fc epsilon receptor I-associated lyn-dependent phosphorylation of Fc gamma receptor IIB during negative regulation of mast cell activation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1998 Feb 15;160(4):1647–58.
91. Rohrschneider LR, Fuller JF, Wolf I, Liu Y, Lucas DM. Structure, function, and biology of SHIP proteins. *Genes Dev*. 2000 Mar 1;14(5):505–20.
92. Scharenberg AM, El-Hillal O, Fruman DA, Beitz LO, Li Z, Lin S, et al. Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PtdIns-3,4,5-P3)/Tec kinase-dependent calcium signaling pathway: a target for SHIP-mediated inhibitory signals. *EMBO J*. 1998 Apr 1;17(7):1961–72.

93. Getahun A, Cambier JC. Of ITIMs, ITAMs, and ITAMis: revisiting immunoglobulin Fc receptor signaling. *Immunol Rev.* 2015 Nov;268(1):66–73.
94. Tamir I, Stolpa JC, Helgason CD, Nakamura K, Bruhns P, Daron M, et al. The RasGAP-binding protein p62dok is a mediator of inhibitory FcγRIIB signals in B cells. *Immunity.* 2000 Mar;12(3):347–58.
95. Galandrini R, Tassi I, Morrone S, Lanfrancone L, Pelicci P, Piccoli M, et al. The adaptor protein shc is involved in the negative regulation of NK cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Immunol.* 2001 Jul;31(7):2016–25.
96. Castells MC, Wu X, Arm JP, Austen KF, Katz HR. Cloning of the gp49B gene of the immunoglobulin superfamily and demonstration that one of its two products is an early-expressed mast cell surface protein originally described as gp49. *J Biol Chem.* 1994 Mar 18;269(11):8393–401.
97. Kuroiwa A, Yamashita Y, Inui M, Yuasa T, Ono M, Nagabukuro A, et al. Association of tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2, inositol 5-phosphatase SHIP with gp49B1, and chromosomal assignment of the gene. *J Biol Chem.* 1998 Jan 9;273(2):1070–4.
98. Colonna M, Nakajima H, Navarro F, López-Botet M. A novel family of Ig-like receptors for HLA class I molecules that modulate function of lymphoid and myeloid cells. *J Leukoc Biol.* 1999 Sep;66(3):375–81.
99. Bléry M, Kubagawa H, Chen CC, Vély F, Cooper MD, Vivier E. The paired Ig-like receptor PIR-B is an inhibitory receptor that recruits the protein-tyrosine phosphatase SHP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Mar 3;95(5):2446–51.
100. Abram CL, Lowell CA. Shp1 function in myeloid cells. *J Leukoc Biol.* 2017 Sep;102(3):657–75.
101. Sabato V, Verweij MM, Bridts CH, Levi-Schaffer F, Gibbs BF, De Clerck LS, et al. CD300a is expressed on human basophils and seems to inhibit IgE/FcεRI-dependent anaphylactic degranulation. *Cytometry B Clin Cytom.* 2012 May;82(3):132–8.
102. DeBell KE, Simhadri VR, Mariano JL, Borrego F. Functional requirements for inhibitory signal transmission by the immunomodulatory receptor CD300a. *BMC Immunol.* 2012 Apr 26;13:23.
103. Wang Y, Nakahashi-Oda C, Okayama Y, Shibuya A. Autonomous regulation of IgE-mediated mast cell degranulation and immediate hypersensitivity reaction by an inhibitory receptor CD300a. *J Allergy Clin Immunol.* 2019 Jul;144(1):323-327.e7.

104. Mamessier E, Birnbaum J, Dupuy P, Vervloet D, Magnan A. Ultra-rush venom immunotherapy induces differential T cell activation and regulatory patterns according to the severity of allergy. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 2006 Jun;36(6):704–13.
105. Cosme J, Spínola-Santos A, Pereira-Santos MC, Pereira-Barbosa M. Venom Immunotherapy: a 20-year experience with an ultra-rush protocol (210-min). *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2019 Jan 31;51(3):122–8.
106. Bożek A, Kołodziejczyk K. Safety of specific immunotherapy using an ultra-rush induction regimen in bee and wasp allergy. *Hum Vaccines Immunother*. 2017 Dec 6;14(2):288–91.
107. Mikkelsen S, Bibby BM, Dolberg MKB, Dahl R, Hoffmann HJ. Basophil sensitivity through CD63 or CD203c is a functional measure for specific immunotherapy. *Clin Mol Allergy CMA*. 2010;8(1):2.
108. Oka T, Rios EJ, Tsai M, Kalesnikoff J, Galli SJ. Rapid desensitization induces internalization of antigen-specific IgE on mouse mast cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Oct;132(4):922-932.e16.
109. Bruhns P, Iannascoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, Jorieux S, et al. Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*. 2009 Apr 16;113(16):3716–25.
110. Gawlik R, Glück J, Jawor B, Rogala B. Effects of venom immunotherapy on serum level of CCL5/RANTES in patients with Hymenoptera venom allergy. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2015;37(4):375–9.
111. Sokol CL, Luster AD. The chemokine system in innate immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015 Jan 29;7(5).
112. Marcenaro E, Dondero A, Moretta A. Multi-directional cross-regulation of NK cell function during innate immune responses. *Transpl Immunol*. 2006 Dec;17(1):16–9.