



HAL
open science

La trans-inhibition : une nouvelle propriété inhibitrice des RFc γ IIB

Odile Malbec

► **To cite this version:**

Odile Malbec. La trans-inhibition : une nouvelle propriété inhibitrice des RFc γ IIB. Immunologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66247 . tel-00833016

HAL Id: tel-00833016

<https://theses.hal.science/tel-00833016>

Submitted on 11 Jun 2013

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

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

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité
Immunologie

Ecole doctorale Physiologie et Physiopathologie

Présentée par

Mlle Odile Malbec

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

La Trans-inhibition : une nouvelle propriété inhibitrice des Rf γ IIb

soutenue le 26 juin 2012

devant le jury composé de :

Pr Pierre-André Cazenave
Dr Sylvain Latour
Pr Salvatore Valitutti
Pr Eric Vivier
Dr Renato Monteiro
Dr Marc Daëron

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

*A Régis et à Jeanne,
avec tout mon amour*

Je tiens tout d'abord à remercier Marc Daëron pour toutes ces années de collaboration, son soutien constant et pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse. Je le remercie pour m'avoir enseigné la démarche expérimentale et m'avoir donné le goût pour la recherche.

Je remercie Pierre André Cazenave pour la présidence de mon jury, Sylvain Latour et Salvatore Valitutti pour avoir accepté d'être mes rapporteurs, Eric Vivier et Renato Monteiro pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Je remercie Lydie Cassard pour son amitié, sa présence, son aide et ses précieux encouragements.

Je remercie Fredericke Jönsson pour son aide, sa gentillesse et les bons moments partagés.

Je remercie David Mancardi pour son calme, sa sérénité et son aide dans le monde animal.

Je remercie Marcello Albanesi pour sa bonne humeur et son interactivité.

Je remercie Yacine Bounab pour son expertise en biochimie et ses gâteaux parfumés

Je remercie Bruno Iannascoli pour son expertise dans le monde des anticorps et sa disponibilité.

Je remercie Christine Detchepare pour sa vitalité, son aide, sa gentillesse et sa connaissance du genre humain.

Je remercie Pierre Bruhns pour son regard critique et avisé sur mon travail.

Je remercie également les gens qui ont quitté récemment le laboratoire en particulier Ana-Ines Lalanne et Cécile Schiffer.

Je remercie les gens que j'ai rencontrés à l'Institut Pasteur comme Bérengère Hugo, Anne Lesty, Cécile Pham, Shen Dong, Francina Langa Vives, Marie Martin, Sylvie Aubert, les membres de l'équipe de Philippe Bousso et les membres de l'équipe de James Di Santo.

Je remercie ma famille et en particulier mes parents que j'aime profondément.

Je remercie mes amis pour leur soutien même pendant les moments difficiles.

Liste des abréviations

| | |
|----------------|--|
| β2M | β2 Microglobuline |
| BCL-10 | caspase-recruitment-domain-containing protein B-Cell Lymphoma 10 |
| BCR | B Cell Receptor |
| BMMC | Bone Marrow-derived Mast Cells |
| BSA | Bovine Serum Albumin |
| BTK | Bruton's Tyrosine Kinase |
| Cbp/PAG | Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains |
| CMH | Complexe Majeur d'Histocompatibilité |
| CRKL | Crk-like protein |
| CRP | C-Reactive Protein |
| Csk | C-terminal Src Kinase |
| DAG | Di-Acyl-Glycérol |
| DNP | Di-Nitro-Phényl |
| Gab-2 | GRB2-Associated Binding Protein 2 |
| GADs | GRB2-related adaptor protein |
| GEF | Guanine Exchange Factor |
| GFP | Green Fluorescent Protein |
| GM-CSF | Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor |
| GPI | Glycosyl-Phosphatidyl Inositol |
| GRB2 | Growth-factor-receptor-bound protein 2 |
| GRM | Globules Rouges de Mouton |
| GST | Glutathion S Transferase |
| HDL | High Density Lipoprotein |
| HSA | Human Serum Albumin |
| Ig | Immunoglobuline |
| IL | InterLeukine |
| IP3 | Inositol Phosphate (IP) (1,4,5)P3 |
| IRAK | Interleukin-1 receptor-associated kinase |
| ITAM | Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif |
| ITIM | Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif |

| | |
|--------------------|--|
| ITSM | Immunoreceptor tyrosine-based Switch Motif |
| JAK | Janus Kinase |
| KIR | Killer cell Inhibitory Receptor |
| LAT | Linker of Activation of T cells |
| LTC4 | Leucotriènes C4 |
| mAb | monoclonal Antibody |
| MAFA | MAst cell Function-associated Antigen |
| MAIR | Myeloid-Associated Immunoglobulin-like Receptor |
| MALT1 | paracaspase Mucosa-Associated-Lymphoid tissue lymphoma-Translocation protein 1 |
| MAPK | Mitogen-Activated Protein Kinase |
| MAR | Mouse Anti-Rat Ig |
| MIP | Macrophage Inflammatory Protein |
| NFAT | Nuclear Factor of Activated T-cells |
| NK | Natural Killer |
| NTAL | Non T Cell Activation Linker |
| PCMC | Peritoneal Cells-derived Mast Cells |
| PECAM | Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 |
| pH | Pleckstrin Homology |
| PI(3,4,5)P3 | Phosphatidyl inositol 3,4,5 tris-phosphate |
| PI3K | Phosphatidyl Inositol (PI) 3 Kinase |
| PIR-B | Paired Immunoglobulin-like Receptor B |
| PKC | Protéine Kinase C |
| PLC | Phospholipase |
| PMA | Phorbol Meristyl Acetate |
| PTP | Protein Tyrosine Phosphatase |
| RasGAP | Ras GTPase activating protein |
| RBL | Rat Basophilic Leukemia cells. |
| RFc | Récepteurs pour la portion Fc des immunoglobulines |
| RTK | Receptor Tyrosine Kinase |
| SAP | SH2 domain-containing protein |
| SCF | Stem Cell Factor |
| SDF-1 | Stromal-derived Factor 1 |

| | |
|---------------|---|
| SH | Src Homology |
| SHIP | Src Homology domain-containing Inositol Phosphatase |
| SHP | Src Homology domain-containing Phosphatase |
| SIRP | Signal-Regulatory Protein |
| SLAM | Signaling lymphocytic activation molecule |
| SLP-76 | SH2-domain-containing leukocyte protein of 76 kD |
| SOS | Son of sevenless homolog |
| STAT | Signal Transducers and Activators of Transcription |
| STIM-1 | STromal Interaction Molécule 1 |
| TCR | T Cell Receptor |
| TH1/2 | T Helper ½ |
| TLR | Toll-Like Receptor |
| TNF | Tumor Necrosis Factor |
| TRAF | TNF receptor associated factors |
| TSLP | Thymic Stromal Lymphopoietin |

Liste des figures

| | |
|---|-------------|
| Figure 1 : Homologie structurale des immunorécepteurs | p.16 |
| Figure 2 : Représentation schématique des RFc murins et humains | p.17 |
| Figure 3 : Illustration des domaines SH2 et PH | p.23 |
| Figure 4 : Métabolisme des phospholipides | p.24 |
| Figure 5 : Illustration de molécules recrutées par LAT1 | p.25 |
| Figure 6 : Schéma d'activation des mastocytes par les RFcεI | p.29 |
| Figure 7 : Les phosphatases cytosoliques à domaine SH2 | p.34 |
| Figure 8 : Les principaux récepteurs à ITIM des mastocytes | p.41 |
| Figure 9 : Schéma d'inhibition par les RFcγIIB | p.43 |
| Figure 10 : Substrats de SHIP1 dans les cascades de signalisations déclenchées par les RFcεI | p.44 |
| Figure 11 : Ligands utilisés pour la trans-inhibition à deux IgE | p.47 |
| Figure 12 : Ligands utilisés pour la trans-inhibition entre RFcεI et Kit | p.48 |
| Figure 13 : Ligands utilisés dans les basophiles humains | p.49 |
| Figure 14 : Ligands utilisés pour la cis-inhibition dans les cellules BaF/3-Kitdelta-IIB | p.50 |
| Figure 15 : Ligands utilisés pour la trans-inhibition dans les cellules MMC-1 | p.51 |
| Figure 16 : Les différentes inhibitions dépendantes de SHIP1 dans les mastocytes | p.69 |

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCTION | 10 |
| I. LES RECEPTEURS ACTIVATEURS DELIVRENT DES SIGNAUX POSITIFS | 12 |
| 1. LES LIGANDS ET LES SIGNAUX D'ACTIVATION | 13 |
| <u>1.1. GENERALITES</u> | 13 |
| <u>1.2. LES IMMUNORECEPTEURS</u> | 13 |
| <u>1.3. LES RECEPTEURS DES MASTOCYTES</u> | 14 |
| 2. LES RECEPTEURS | 14 |
| <u>2.1. GENERALITES</u> | 14 |
| <u>2.2. LES IMMUNORECEPTEURS</u> | 15 |
| 2.2.1. <i>STRUCTURE DES IMMUNORECEPTEURS</i> | 15 |
| 2.2.2. <i>EXPRESSION DES IMMUNORECEPTEURS</i> | 18 |
| <u>2.3. LES RECEPTEURS DES MASTOCYTES</u> | 18 |
| 2.3.1. <i>LES RFcϵI</i> | 18 |
| 2.3.2. <i>LES RFcγ</i> | 19 |
| 2.3.3. <i>AUTRES RECEPTEURS MEMBRANAIRES</i> | 19 |
| 3. LA TRANSDUCTION DES SIGNAUX D'ACTIVATION | 19 |
| <u>3.1. GENERALITES</u> | 19 |
| <u>3.2. LES IMMUNORECEPTEURS</u> | 20 |
| <u>3.3. LES RECEPTEURS DES MASTOCYTES</u> | 21 |
| 4. LES COMPLEXES DE SIGNALISATION | 22 |
| <u>4.1. GENERALITES</u> | 22 |
| 4.1.1. <i>LES DOMAINES SH2</i> | 22 |
| 4.1.2. <i>LES DOMAINES PLECKSTRIN HOMOLOGY (PH)</i> | 23 |
| <u>4.2. LES IMMUNORECEPTEURS</u> | 24 |
| <u>4.3. LES RECEPTEURS DES MASTOCYTES</u> | 25 |
| 4.3.1. <i>LA VOIE LYN</i> | 25 |
| 4.3.2. <i>LA VOIE FYN</i> | 26 |
| 5. LA PROPAGATION INTRACELLULAIRE DES SIGNAUX. | 26 |
| <u>5.1. GENERALITES</u> | 26 |
| <u>5.2. LES IMMUNORECEPTEURS</u> | 27 |
| <u>5.3. LES RECEPTEURS DES MASTOCYTES</u> | 27 |
| 5.3.1. <i>LA VOIE CALCIQUE</i> | 28 |
| 5.3.2. <i>LA VOIE DES MAPK ET DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION</i> | 28 |
| 6. LES REPONSES BIOLOGIQUES | 30 |
| <u>6.1. GENERALITES</u> | 30 |
| <u>6.2. LES IMMUNORECEPTEURS</u> | 30 |
| <u>6.3. LES RECEPTEURS DES MASTOCYTES</u> | 30 |
| 6.3.1. <i>LES REPONSES PRECOCES ET TARDIVES</i> | 30 |
| 6.3.2. <i>LES MEDIEURS PRO-ALLERGIQUES</i> | 31 |
| 6.3.3. <i>LES MEDIEURS PRO-INFLAMMATOIRES</i> | 33 |

| | |
|---|-----------|
| II. LES RECEPTEURS ACTIVATEURS DELIVRENT DES SIGNAUX NEGATIFS | 33 |
| 1. GENERALITES | 34 |
| <u>1.1. LES PHOSPHATASES</u> | 34 |
| <u>1.2. AUTRES MECANISMES</u> | 35 |
| 2. LES IMMUNORECEPTEURS | 35 |
| <u>2.1. LES PHOSPHATASES</u> | 35 |
| 2.1.2. <i>SHP-1</i> | 35 |
| 2.1.2. <i>SHIP1</i> | 35 |
| <u>2.3. LES ADAPTATEURS</u> | 36 |
| 2.3.1. <i>LES ADAPTATEURS MEMBRANAIRES</i> | 36 |
| 2.3.2. <i>LES ADAPTATEURS CYTOSOLIQUES</i> | 36 |
| <u>2.3. LES KINASES</u> | 37 |
| 3. LES RECEPTEURS DES MASTOCYTES | 37 |
| <u>3.1. LES PHOSPHATASES</u> | 37 |
| 3.1.1. <i>SHP-1</i> | 37 |
| 3.1.2. <i>SHIP1</i> | 37 |
| <u>3.2. LES ADAPTATEURS</u> | 38 |
| <u>3.3. LES KINASES</u> | 38 |
| III. DES CORECEPTEURS INHIBITEURS REGULENT LES RECEPTEURS ACTIVATEURS | 39 |
| 1. DEFINITION DES RECEPTEURS A ITIM | 39 |
| 2. LES RECEPTEURS A ITIM RECRUTANT SHP-1 | 39 |
| <u>2.1. GENERALITES</u> | 39 |
| 2.1.1. <i>DANS LES CELLULES HEMATOPOÏÉTIQUES</i> | 39 |
| 2.1.2. <i>DANS LES MASTOCYTES</i> | 40 |
| 3. LES RFcyIIB | 41 |
| <u>3.1. STRUCTURE ET EXPRESSION</u> | 41 |
| <u>3.2. SPECIFICITE DU RECRUTEMENT DE SHIP1</u> | 41 |
| <u>3.3. MECANISME DE L'INHIBITION</u> | 42 |
| IV. TRAVAIL DE THESE | 45 |
| 1. OBJECTIFS ET MOYENS MIS EN OEUVRE | 45 |
| 2. RESUME DES RESULTATS | 51 |
| <u>2.1. LES RFcyIIB PEUVENT INHIBER LA PROLIFERATION DE CELLULES TRANSFORMEES</u> | 51 |
| <u>2.2. LA TRANS-INHIBITION : UNE NOUVELLE PROPRIETE INHIBITRICE DES RFcyIIB</u> | 51 |
| 2.2.1. <i>DEMONSTRATION DU PHENOMENE</i> | 51 |
| 2.2.2. <i>MODALITES DE LA TRANS-INHIBITION</i> | 52 |
| 2.2.3. <i>MECANISME DE LA TRANS-INHIBITION</i> | 52 |
| 2.2.4. <i>EXTENSION DE LA TRANS-INHIBITION A D'AUTRES RECEPTEURS MURINS</i> | 53 |
| 2.2.5. <i>EXTENSION DE LA TRANS-INHIBITION A LA CROISSANCE D'UNE TUMEUR</i> | 53 |
| 2.2.6. <i>EXTENSION DE LA TRANS-INHIBITION AUX CELLULES HUMAINES</i> | 53 |

| | |
|--|-----------|
| RESULTATS | 54 |
| <i>ARTICLE PRINCIPAL</i> | 55 |
| INTRODUCTION | 56 |
| DISCUSSION | 57 |
| <i>ARTICLE ANNEXE</i> | 59 |
| INTRODUCTION | 60 |
| DISCUSSION | 61 |
| | |
| DISCUSSION | 63 |
| | |
| I. LA TRANS-INHIBITION DANS L'HISTOIRE DES CAPACITES INHIBITRICES DES RFCγIIB | 64 |
| | |
| II. DECLENCHEMENT DE LA TRANS-INHIBITION | 69 |
| | |
| III. MECANISME DE LA TRANS-INHIBITION | 72 |
| | |
| IV. CONSEQUENCES DE LA TRANS-INHIBITION | 74 |
| | |
| V. LA TRANS-INHIBITION EN PHYSIOLOGIE | 75 |
| 5.1. LA TRANS-INHIBITION DANS LE DEVELOPPEMENT DES MASTOCYTES ET DES BASOPHILES | 75 |
| 5.2. LA TRANS-INHIBITION DANS LES DIFFERENTS MASTOCYTES | 76 |
| 5.3. LA TRANS-INHIBITION DANS LES LYMPHOCYTES B APRES COAGREGATION DU BCR ET DES RFC γ IIB | 77 |
| 5.4. COMPARAISON DE LA TRANS-INHIBITION AVEC L'INHIBITION INDUITE PAR DES LIGANDS MONOVALENTS DES RFC | 77 |
| | |
| VI. LA TRANS-INHIBITION EN PATHOLOGIE | 78 |
| | |
| VII. TRANS-INHIBITION EN THERAPEUTIQUE | 80 |
| 7.1. LA TRANS-INHIBITION DANS L'ALLERGIE | 80 |
| 7.2. LA TRANS-INHIBITION DANS LES MALADIES AUTO-IMMUNES | 81 |
| 7.3. LA TRANS-INHIBITION DANS LE CANCER | 81 |
| | |
| BIBLIOGRAPHIE | 83 |

INTRODUCTION

Comme le montre une expérience simple, les cellules au repos ne sont pas inactives. En effet, si elles sont traitées à 37°C par du pervanadate, un puissant inhibiteur des tyrosine phosphatases, la phosphorylation des tyrosines de nombreuses protéines intracellulaires est induite. Ceci indique que dans des cellules au repos, de nombreuses kinases sont en activité mais que de nombreuses phosphatases déphosphorylent en permanence leurs substrats. Ainsi, le repos cellulaire est un état d'équilibre entre phosphorylation et déphosphorylation, entre activation et inhibition. Cet équilibre permet le maintien d'une activité basale nécessaire à la vie de la cellule comme l'absorption de nutriments et la synthèse de protéines. Une activation cellulaire permet la mise en route de programmes biologiques non réalisés dans l'activité basale. Certains, comme la prolifération, sont communs à toutes les cellules nucléées. D'autres, comme l'exocytose ou la sécrétion de cytokines, sont spécifiques de certaines cellules. Les différentes réponses biologiques d'une cellule dépendent de processus de spécialisation mis en place au cours de la différenciation et de la maturation de la cellule.

Les signaux d'activation reçus par une cellule sont à tout moment contrôlés par des signaux d'inhibition. Ces derniers sont générés par les récepteurs activateurs eux-mêmes ou par des corécepteurs exprimés par la même cellule. La réponse biologique de la cellule est l'intégration de ces signaux positifs et négatifs.

Dans le système immunitaire, deux grandes catégories de cellules sont retrouvées : les cellules lymphoïdes et les cellules myéloïdes. Les cellules lymphoïdes comprennent les lymphocytes B, les lymphocytes T et les cellules NK. Les cellules myéloïdes sont très nombreuses et très différentes les unes des autres. Elles comprennent notamment les macrophages, les cellules dendritiques, les polynucléaires et les mastocytes. Les cellules lymphoïdes et myéloïdes sont capables de réponses biologiques variées. Par exemple, les lymphocytes produisent des cytokines, les lymphocytes B prolifèrent et se différencient en plasmocytes producteurs d'anticorps et les lymphocytes T prolifèrent et se différencient en lymphocytes T auxiliaires CD4+, en lymphocytes T cytotoxiques CD8+ ou lymphocytes T régulateurs CD25+. Toutes les cellules hématopoïétiques endocytent des molécules. Les macrophages et les polynucléaires phagocytent des particules. Les cellules dendritiques présentent l'antigène aux lymphocytes. Les mastocytes synthétisent des molécules inflammatoires et les stockent dans leurs granules.

Toutes ces cellules coopèrent pour déclencher une réponse immunitaire efficace. Les cellules myéloïdes et les cellules NK sont à l'origine de la réponse immunitaire innée qui n'est pas spécifique de l'antigène, tandis que les lymphocytes B et T sont à l'origine de la réponse immunitaire adaptative. Les activations cellulaires, qui génèrent les activités biologiques variées déclenchées au cours de la réponse immunitaire, sont induites par des ligands qui, en se fixant sur des récepteurs membranaires spécifiques, déclenchent des cascades d'activation intracellulaires.

Les récepteurs pour l'antigène comme le BCR, le TCR et les récepteurs pour la portion Fc des immunoglobulines (RFc) sont nommés les immunorécepteurs. Les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK), comme Kit, fixent des facteurs de croissance. Ils peuvent générer des signaux positifs et négatifs et être régulés par des corécepteurs membranaires. Mon travail de thèse concerne les propriétés inhibitrices d'un type de RFc, les RFc γ IIB, qui inhibent l'activation et la prolifération cellulaire.

Dans l'introduction de ma thèse, je présenterai quatre chapitres. Le premier chapitre exposera les signaux d'activation déclenchés par des récepteurs activateurs, en particulier les immunorécepteurs. Le deuxième chapitre décrira les signaux d'inhibition déclenchés par ces mêmes récepteurs. Le troisième chapitre portera sur des corécepteurs inhibiteurs qui les régulent, en particulier les RFc γ IIB, des RFc pour les IgG. Le quatrième chapitre résumera les travaux effectués au cours de ma thèse, qui étend les propriétés inhibitrices des RFc γ IIB.

I. Les récepteurs activateurs délivrent des signaux positifs

Ce chapitre de l'introduction sera séparé en trois parties : tout d'abord une partie concernant les cellules en général pour mettre en place les principes communs à la plupart des récepteurs membranaires ; puis une partie concernant les cellules hématopoïétiques essentiellement pour restreindre les fonctions aux immunorécepteurs exprimés par les lymphocytes T et par les lymphocytes B ; enfin une partie concernant les mastocytes, qui m'ont servi de principal modèle d'études, pour développer les spécificités de ces cellules et des immunorécepteurs qu'elles expriment.

1. Les ligands et les signaux d'activation

1.1. Généralités

Contrairement aux activités basales, les activités biologiques, qui dépendent de l'activation cellulaire, ne sont pas mises en œuvre spontanément dans une cellule. Elles nécessitent que des signaux d'activation soient délivrés à la cellule, qu'ils soient reçus et qu'ils déclenchent une réponse. La cellule reçoit à tout moment de nombreux signaux, Certains ne déclenchent pas de réponse, d'autres induisent une cascade d'événements intracellulaires conduisant aux réponses biologiques. Une cellule, en effet, fait le tri dans la « mer » de molécules capables de délivrer des signaux dont elle est entourée. La plupart des signaux ne sont pas détectés par la cellule car elle ne possède pas le bon système de reconnaissance. En effet, un signal n'existe que quand il est reçu par la cellule. Un ligand extracellulaire se fixe sur une structure, à la membrane de la cellule, capable à la fois de se lier au ligand et de délivrer un signal. Ces propriétés sont celles des récepteurs membranaires.

Le ligand se fixe sur un récepteur quand l'affinité de l'interaction est suffisante. L'affinité est définie par une constante d'affinité. Cette constante est le rapport entre la constante d'association et la constante de dissociation. Elle détermine la force et la durée de l'interaction entre le ligand et son récepteur.

Les ligands peuvent être des molécules secrétées par l'organisme comme des hormones, des facteurs de croissance, des cytokines, des chimiokines. Ils peuvent également provenir de l'extérieur, comme les antigènes.

1.2. Les immunorécepteurs

Les antigènes sont reconnus par les immunorécepteurs qui sont le récepteur des lymphocytes B (BCR), le récepteur des lymphocytes T (TCR) et les RFc. Le BCR reconnaît l'antigène sous forme native tandis que le TCR le reconnaît sous forme de peptides associés aux molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) sur les cellules présentatrices d'antigène. Les RFc, quant à eux, ne peuvent reconnaître l'antigène que s'il est recouvert d'anticorps.

Les anticorps sont des molécules capables de reconnaître les antigènes mais sont le plus souvent dépourvus d'activité biologique par eux-mêmes. Seuls les anticorps agonistes sont capables de déclencher des réponses biologiques. Les anticorps reconnaissent les antigènes par leur portion Fab et permettent le recrutement et l'action de systèmes effecteurs

sur les antigènes par leur portion Fc. En effet, la portion Fc permet le couplage de l'antigène avec des molécules du complément et avec les RFc. Les RFc sont exprimés par de nombreuses cellules capables de réponses biologiques variées mais qui ne possèdent pas de récepteurs pour l'antigène. Ainsi les anticorps, qui sont des produits de la réponse adaptative, peuvent enrôler les cellules de l'immunité innée dans l'immunité adaptative. Des RFc pour chaque classe d'immunoglobuline sont décrits, à savoir les RFc α pour les IgA, les RFc μ pour les Ig M, les RFc γ pour les IgG et les RFc ϵ pour les IgE.

1.3. Les récepteurs des mastocytes

Les mastocytes peuvent fixer des antigènes via des IgE parce qu'ils expriment des récepteurs de forte affinité pour les IgE, les RFc ϵ I. Ces récepteurs peuvent fixer des IgE monomériques. Cette fixation est de forte affinité, de $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, car la constante de dissociation du récepteur est très faible. Cette étape, appelée sensibilisation, augmente l'expression membranaire des RFc ϵ I en les stabilisant à la surface des cellules et en diminuant leur dégradation². Dans un deuxième temps, l'antigène est reconnu par les IgE fixées à la surface des cellules.

Les mastocytes peuvent également fixer des antigènes via des IgG parce qu'ils expriment des récepteurs de faible affinité pour les IgG, les RFc γ . Ces récepteurs ne peuvent fixer que des complexes immuns, à savoir un antigène recouvert d'anticorps.

Les mastocytes peuvent répondre à d'autres stimuli. Ils reconnaissent les microorganismes en fixant des structures d'origine bactérienne comme les endotoxines, le CpG, ou le peptidoglycane^{3,4}. Ils prolifèrent et/ou se différencient en réponse à l'interleukine (IL) 3 et au facteur de croissance Stem Cell Factor (SCF)⁵. Ils fixent également des chimiokines comme CCL2⁶ et des hormones comme l'oestradiol et la progestérone⁷ ce qui induit leur migration.

2. Les récepteurs

2.1. Généralités

Les récepteurs sont des structures généralement protéiques qui sont exprimées sur la membrane cytoplasmique des cellules. Leur distribution peut être ubiquitaire ou au contraire très restreinte. Les récepteurs possèdent un domaine extracellulaire qui fixe le ligand. La plupart des récepteurs sont transmembranaires c'est à dire qu'ils possèdent un domaine

transmembranaire qui traverse la membrane cytoplasmique de part en part. Cependant, certains récepteurs sont ancrés dans le feuillet externe de la membrane par un groupement glycosyl phosphatidylinositol (GPI)⁸. Ils sont localisés dans les rafts, qui sont des domaines de la membrane plasmique riches en cholestérol et en sphingolipides. Les récepteurs transmembranaires possèdent un domaine intracytoplasmique plus ou moins long, le plus souvent non structuré. Certains récepteurs sont monocaténaires, d'autres sont pluricaténaires.

2.2. Les immunorécepteurs

2.2.1. Structure des immunorécepteurs

Le BCR est constitué d'une immunoglobuline de membrane associée à un hétérodimère $Ig\alpha - Ig\beta$ ⁹. Le TCR est composé d'un hétérodimère $\alpha\beta$ associé au complexe de signalisation CD3 et à un homodimère de sous-unités TCR ζ . Le complexe CD3 comprend deux hétérodimères $\epsilon\gamma$ et $\epsilon\delta$ ¹⁰. Les RFc possèdent une chaîne α qui fixe le ligand. Les RFc pluricaténaires sont associés à un homodimère de sous-unité FcR γ . La sous-unité FcR γ est commune aux RFc ainsi qu'à d'autres récepteurs. Elle peut remplacer la sous-unité TCR ζ dans le TCR¹¹ (**Figure 1**).

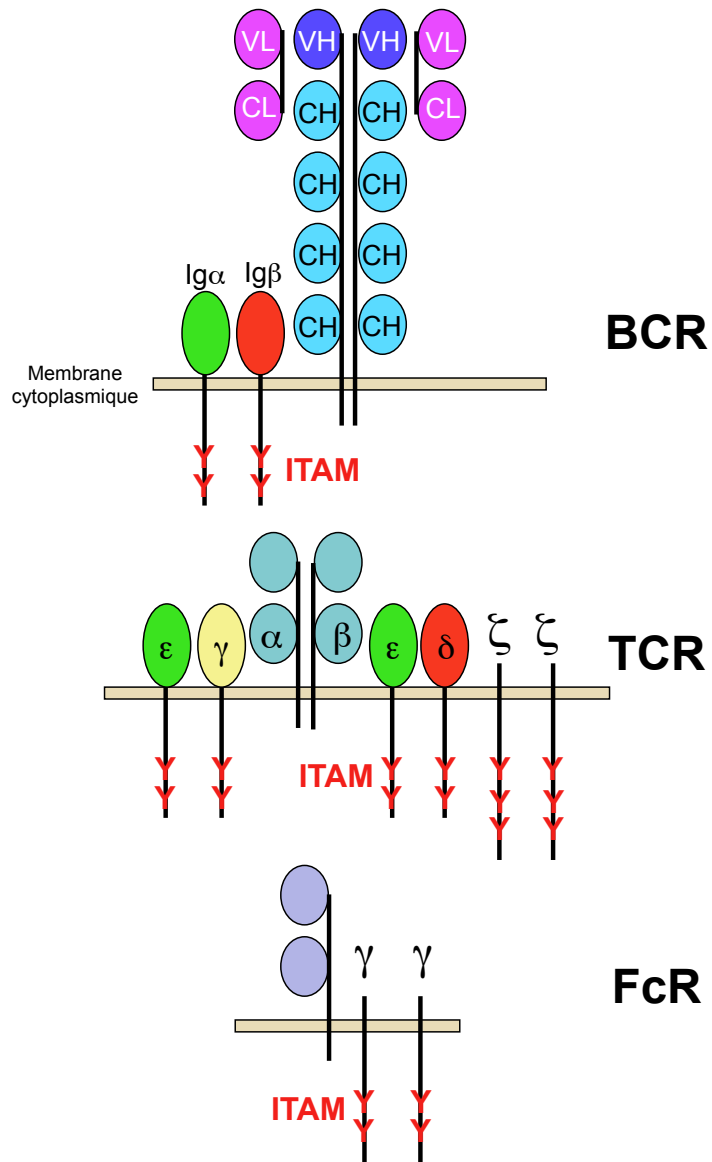


Figure 1

Homologie structurale des immunorécepteurs

Les domaines extracellulaires de la superfamille des immunoglobulines sont symbolisés par des ronds. Pour le BCR, CH et CL indiquent les domaines constants des chaînes lourdes et légères, VH et VL les domaines variables. Pour le TCR, l'hétérodimère $\alpha\beta$ est représenté en bleu. Les ovales symbolisent les domaines extracellulaires des sous-unités associées au BCR, le dimère Ig α - Ig β , ou des sous-unités du complexe CD3 associé au TCR. γ et ζ sont pour les sous-unités FcR γ et TCR ζ respectivement. Les Tyrosines des motifs ITAM sont indiqués en rouge.

L'association entre sous-unités peut dépendre de plusieurs mécanismes. L'homodimère FcR γ des RFc pluricaténaires est associé aux sous-unité α par l'intermédiaire d'un acide-aminé chargé ¹². La sous-unité FcR γ est indispensable à l'expression des RFc pluricaténaires. En effet, les chaînes α des RFc ϵ I ¹³ et des RFc γ IIIA ¹⁴ possèdent dans leur domaine intracytoplasmique une séquence de rétention. Cette séquence, qui est caractérisée par la présence de deux lysines en position -3 et -7 à l'extrémité C-terminale, est responsable de la rétention des chaînes α dans le réticulum endoplasmique. L'association de la sous-unité FcR γ masque cette séquence et permet aux récepteurs de s'exprimer à la membrane. La sous-unité FcR γ est également associée aux chaînes α des RFc γ I murins et humains et des RFc γ IV¹⁵

Les RFc γ IIA sont des RFc activateurs qui ont la particularité de ne pas être associés à des sous-unités. Les RFc γ IIB sont aussi monocaténaires mais étant des récepteurs inhibiteurs, ils seront exposés dans le troisième chapitre de cette introduction.

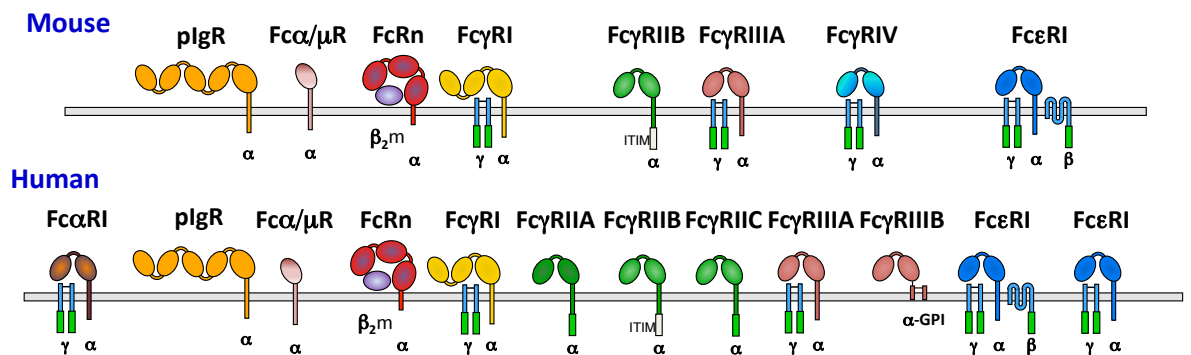


Figure 2

Représentation schématique des RFc murins et humains

Seuls les RFc de la superfamille des immunoglobulines sont représentés. Les domaines extracellulaires sont représentés par des ovales. Les motifs activateurs ITAM sont représentés par des rectangles verts et les motifs inhibiteurs ITIM par des rectangles gris. α , β et γ symbolisent les sous-unités FcR α , FcR β et FcR γ respectivement. GPI est pour glucosyl phosphatidylinositol. β_2m est pour beta-2-microglobuline.

Les sous-unités associées aux immunorécepteurs possèdent dans leurs domaines intracytoplasmiques des motifs d'activation centrés sur deux résidus tyrosine et nommés Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif ou ITAM. La séquence consensus des ITAM est : D/EX₇D/EX₂YX₂LX₇YX₂L¹⁶. L'ITAM des RFcγIIA est particulier car il contient treize acides aminés au lieu de sept entre ces deux groupements YxxL¹⁷. Depuis leur mise en évidence, des ITAM ont été identifiés dans d'autres sous-unités comme la sous-unité DAP12, qui est notamment exprimée dans les cellules NK¹⁸.

2.2.2. Expression des immunorécepteurs

Le BCR est spécifiquement exprimé par les lymphocytes B et le TCR par les lymphocytes T. L'expression des RFc est beaucoup plus variée.

Chez la souris, les RFcγI sont exprimés par les macrophages, les monocytes et les polynucléaires neutrophiles. Les RFcγIIIA sont exprimés par les mastocytes et les basophiles, ainsi que par les polynucléaires neutrophiles, les polynucléaires éosinophiles, les macrophages et les cellules NK. Les RFcγIV sont exprimés par les monocytes, les macrophages et les polynucléaires neutrophiles¹⁹. Ce récepteur n'est exprimé que chez la souris.

Chez l'homme, les RFcγI sont exprimés par les macrophages et les monocytes. Les polynucléaires neutrophiles l'expriment après induction par l'interféron γ (IFN-γ)²⁰ ou par le G-CSF *in vivo*²¹. Les RFcγIIIA sont exprimés par les cellules NK, les monocytes, les cellules dendritiques et les polynucléaires éosinophiles. Les RFcγIIA sont exprimés par les polynucléaires, les mastocytes, les macrophages, les monocytes et les plaquettes²².

2.3. Les récepteurs des mastocytes

2.3.1. Les RFcεI

Les mastocytes expriment des RFcεI. Ces récepteurs, qui fixent les IgE, sont associés non seulement à la sous-unité FcRγ, mais également à la sous-unité FcRβ. Cette sous-unité possède quatre domaines transmembranaires. La sous-unité FcRβ est indispensable à l'expression des RFcεI murins mais pas à

celle des RFcεI humains¹³. Elle masque une séquence de rétention située dans le domaine extracellulaire des RFcεI murins et qui est absente dans celui des RFcεI humains²³. La sous-unité FcRβ n'est exprimée que par les mastocytes et par les basophiles²⁴. Ainsi, l'expression constitutive des RFcεI est restreinte aux mastocytes et aux basophiles chez la souris tandis qu'ils peuvent être aussi exprimés par les monocytes, les cellules de Langerhans, les polynucléaires éosinophiles et les cellules dendritiques chez l'homme²⁵.

2.3.2. Les RFcγ

Les mastocytes de souris expriment aussi des RFcγIIIa. La sous-unité FcRα des RFcγIIIa possède également dans son domaine intracytoplasmique une séquence de rétention¹⁴. C'est l'association avec la sous-unité FcRγ qui masque cette séquence et permet l'expression membranaire des RFcγIIIa. Les mastocytes humains expriment des RFcγIIa²⁶.

2.3.3. Autres récepteurs membranaires

Les mastocytes expriment aussi d'autres types de récepteurs. A titre d'exemples, ils expriment des récepteurs pour des interleukines comme l'IL-3R chez la souris²⁷ et l'IL-4R chez l'homme²⁸, des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) comme Kit, dont le ligand est le Stem Cell Factor (SCF)²⁹, des récepteurs de chimiokines comme CXCR3³⁰ et CCR2⁶, des TLR comme TLR2 et TLR4^{31,32,33} ou encore des intégrines^{34,35}.

3. La transduction des signaux d'activation

3.1. Généralités

Un récepteur est non seulement capable de fixer un ligand de façon plus ou moins spécifique mais également de transduire un signal. Transduire un signal signifie faire passer une information à travers la membrane cytoplasmique. La transduction du signal est la transformation d'une perturbation extracellulaire en une perturbation intracellulaire.

La perturbation extracellulaire peut être une liaison entraînant un transconformation : c'est le modèle allostérique³⁶. C'est un mode de régulation de l'activité d'une enzyme par lequel la fixation d'une molécule effectrice en un site de

l'enzyme modifie les conditions de fixation d'une autre molécule, en un autre site distant de l'enzyme. La fixation de la molécule effectrice induit un changement de conformation spatiale de la protéine enzymatique. Les protéines allostériques existent sous deux conformations différentes : l'une appelée T, pour tendue, désignant conventionnellement la forme de faible affinité pour le substrat, l'autre R, pour relaxée, de forte affinité pour le substrat ³⁷. La notion d'allostérie s'applique au cas des canaux ioniques, comme les canaux calciques de la membrane, bien qu'il n'y ait pas de réaction chimique catalysée mais plutôt un transfert de matière (ion) à travers une membrane. Dans ce cas, la fixation de l'effecteur positif favorisera l'ouverture du canal, quel que soit le mode d'ouverture du canal. Inversement, dans le cas d'un effecteur négatif, le processus d'ouverture sera défavorisé ³⁸.

En revanche, pour d'autres récepteurs, la simple fixation du ligand ne suffit pas à transduire un signal. Il faut que plusieurs récepteurs soient engagés ensemble par des ligands divalents ou multivalents : c'est le modèle associatif ³⁹. La dimérisation est réalisée entre deux récepteurs, comme dans le cas de Kit. L'agrégation est réalisée entre plusieurs récepteurs. L'agrégation peut se faire entre récepteurs identiques (homoagrégation) ou entre récepteurs différents (hétéroagrégation). En se fixant sur les domaines extracellulaires, un ligand plurivalent entraîne l'agrégation des domaines intracellulaires.

Cette perturbation extracellulaire mécanique se transforme en une perturbation intracellulaire chimique. En effet, des enzymes comme des kinases, sont reliés aux récepteurs à l'intérieur de la cellule et pourront rencontrer leurs substrats. Ces phosphorylations peuvent être induites de différentes manières. Par exemple, les RTK possèdent un domaine kinase intracytoplasmique. Les récepteurs de cytokines utilisent les kinases JAK qui fonctionnent par paires.

3.2. Les immunorécepteurs

Les ITAM sont phosphorylés par les kinases de la famille src. Elles sont ancrées dans le feuillet interne de la membrane plasmique par leur domaine de myristilation. Une fraction des kinases src est associée aux immunorécepteurs ou à leurs corécepteurs. L'activation des kinases de la famille src est induite par la phosphatase membranaire CD45 qui déphosphoryle leur tyrosine régulatrice ⁴⁰. En effet, dans les cellules au repos, les kinases de la famille src sont phosphorylées sur

cette tyrosine ce qui entraîne un repliement intramoléculaire qui inhibe le domaine kinase. L'agrégation des récepteurs à ITAM déclenche la déphosphorylation de cette tyrosine par CD45.

Dans les lymphocytes T, Lck est associée aux corécepteurs du TCR, CD4 et CD8, qui de concert avec Fyn, phosphoryle les ITAM de TCR ζ et de CD3 après l'engagement du TCR par le complexe CMH-peptide antigénique^{41, 42}. Dans les lymphocytes B, les kinases Lyn, Fyn, Lck, Blk et Fgr sont activées et phosphorylent les ITAM des sous-unités Ig α et Ig β après engagement du BCR par l'antigène natif⁴³.

D'autre part, les immunorécepteurs sont transloqués dans des domaines spécifiques de la membrane plasmique riches en cholestérol et en sphingolipides et appelés rafts, microdomaines ou radeaux lipidiques^{44, 45}. Ces microdomaines sont résistants à la lyse par des détergents anioniques comme le Triton X100⁴⁶. Ils sont nécessaires à l'activation cellulaire induite par les immunorécepteurs car leur destruction par des drogues comme la filipine ou la cyclodextrine, inhibe les réponses induites par les immunorécepteurs⁴⁷. Les microdomaines contiennent en effet de nombreuses molécules nécessaires à la transduction du signal comme les kinases de la famille src et les adaptateurs LAT1 pour Linker of Activation of T cells et LAT2 ou NTAL pour Non T Cell Activation Linker. Ces adaptateurs permettent la formation de complexes sous-membranaires de signalisation.

3.3. Les récepteurs des mastocytes

Quand les IgE fixées sur les RFc ϵ I reconnaissent un antigène multivalent, les RFc ϵ I sont agrégés. Par exemple, des IgE anti-DNP peuvent être agrégées par du DNP-BSA, des IgE anti-ova par de l'ovalbumine. Les IgE peuvent aussi être agrégées par des anticorps anti-IgE.

Dans les mastocytes, Lyn est la première kinase de la famille src qui a été impliquée dans la transduction des signaux délivrés par les RFc ϵ I. En effet, l'agrégation des RFc ϵ I entraîne le rapprochement des RFc ϵ I à la surface des cellules et l'activation de Lyn constitutivement associée aux RFc ϵ I. Cette fraction de Lyn s'autophosphoryle sur sa tyrosine activatrice contenue dans son domaine kinase. Un fois phosphorylée, Lyn phosphoryle les tyrosines des ITAM dans les sous-unités des récepteurs adjacents par un mécanisme de transphosphorylation⁴⁸. L'agrégation des RFc ϵ I induit également leur entrée dans les rafts où les ITAM phosphorylés peuvent recruter d'avantage de Lyn⁴⁹. Ceci permet de maintenir et

d'augmenter le signal de phosphorylation des RFcεI.

4. Les complexes de signalisation

4.1. Généralités

Les phosphorylations des récepteurs membranaires entraînent des cascades de signaux d'activation qui conduisent à la réponse de la cellule. Les tyrosines phosphorylées permettent les liaisons de protéines intracytoplasmiques entre elles. Certaines de ces protéines, comme les kinases, jouent un rôle dans la transduction du signal grâce à leur activité catalytique. D'autres, comme les adaptateurs, jouent un rôle parce qu'elles sont capables de s'associer à d'autres protéines pour constituer des complexes de signalisation. Les adaptateurs ne possèdent pas de domaine enzymatique mais uniquement des séquences reconnues par des domaines d'interaction. Ces domaines, d'environ cent acides-aminés, permettent la reconnaissance intermoléculaire et la fixation des protéines entre elles. Ils comprennent notamment :

4.1.1. Les domaines SH2

Ils ont été décrits en premier dans la famille des kinases src, le domaine SH1 étant le domaine kinase. Ces domaines reconnaissent des séquences spécifiques de quatre acides aminés centrées sur une tyrosine phosphorylée. Certains acides-aminés des domaines SH2 forment cinq séquences invariantes et conservées dans tous les domaines SH2. Une molécule à deux domaines SH2 est mobilisée par l'engagement de ses deux domaines SH2 ^{50,51} (**Figure 3**).

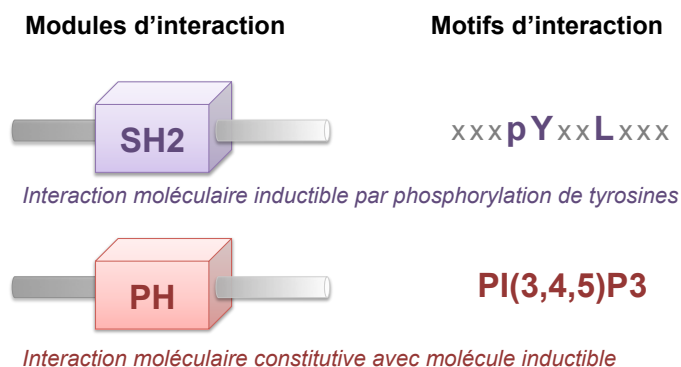


Figure 3

Illustration des domaines SH2 et PH

Les domaines SH2 reconnaissent spécifiquement des séquences d'acides aminés YxxL dans lesquelles la tyrosine est phosphorylée. Les domaines PH sont reconnaissent spécifiquement des phosphoinositides comme le PI(3,4,5)P3.

4.1.2. Les domaines Pleckstrin Homology (PH)

Ils reconnaissent des phospholipides membranaires ⁵². Ils contiennent des acides-aminés conservés et beaucoup d'acides-aminés chargés. Le domaine PH fut initialement découvert dans la pleckstrine, protéine substrat de la protéine kinase C abondamment exprimée dans les plaquettes ⁵³. De nombreux processus de signalisation dépendent des phosphoinositides membranaires. C'est le cas du contrôle des transporteurs ⁵⁴ et des canaux ioniques ⁵⁵, de la régulation du cytosquelette d'actine ^{56, 57}, de la régulation de divers facteurs d'échange GEFs qui contrôlent l'activité de nombreuses petites protéines G ⁵⁸ mais aussi des mécanismes tels que l'endocytose ⁵⁹ et l'exocytose. On retrouve un domaine PH dans plus de 250 protéines humaines, telles que des protéines adaptatrices (Dok), des kinases (Akt, PDK1), des phospholipases (PLCδ et γ, PLD), des protéines régulatrices de petites protéines G (Vav, SOS), des protéines du cytosquelette (Dynamin, Cytohésine) ⁶⁰. Le Phosphatidyl Inositol 3,4,5 tri-phosphate (PI(3,4,5)P3) est un des partenaires privilégiés des domaines PH. Le PI(3,4,5)P3 est indétectable dans les cellules quiescentes. Il est seulement produit de manière transitoire par la Phosphatidyl Inositol 3 Kinase (PI3K) IA au niveau des membranes plasmiques des cellules stimulées. Le PI(3,4,5)P3 intervient dans de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération cellulaire, l'apoptose et la motilité cellulaire ⁶¹ (**Figure 3**)

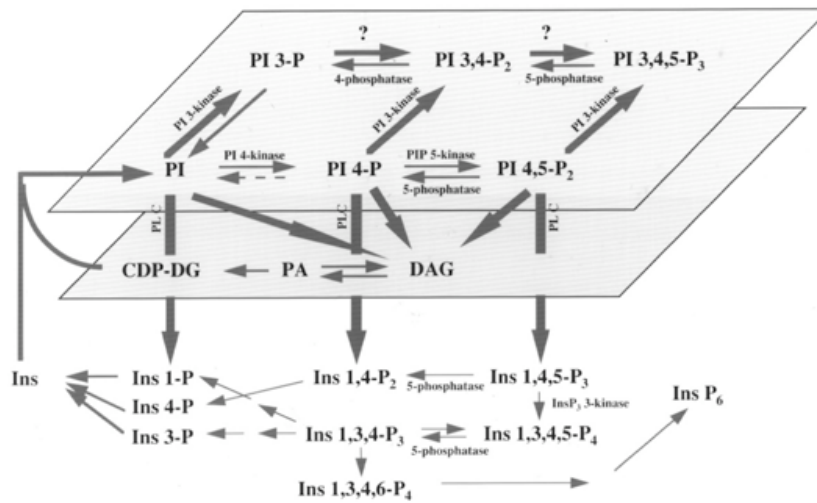


Figure 4

Métabolisme des phospholipides

Zhang P. and Majerus P.

Seminars in Cell & Developmental Biology 1998 Vol.9 p.153

Le PI est le phospholipide majoritaire dans les cellules. Un jeu de kinases et de phosphatases permet la synthèse des phospholipides plus ou moins phosphorylés. Le PI(4,5)P₂ est clivé par la PLCγ en IP₃ et en DAG. Il est également le substrat de la PI3K qui le transforme en PI(3,4,5)P₃, qui est majoritairement responsable du signal après l'engagement des immunorécepteurs.

4.2. Les immunorécepteurs

Après les kinases de la famille src et la phosphorylation des tyrosines des ITAM, les kinases de la famille syk, qui comprend ZAP-70 et syk, entrent en jeu. Ces protéines tyrosine kinases cytosoliques possèdent deux domaines SH2 en tandem, pour lesquels la fixation de l'un sur un des groupements YxxL des ITAM entraîne une augmentation de l'affinité de l'autre pour les deuxième⁶², ⁶³, ⁶⁴. Dans les lymphocytes T, ZAP-70 se fixe sur les ITAM de TCRζ. Dans les lymphocytes B, syk se fixe sur l'ITAM de Igα. Ces kinases phosphorylent de nombreux substrats dont les adaptateurs LAT1 et LAT2.

LAT1 est exprimé par les lymphocytes T tandis que LAT2 est exprimé par les lymphocytes B. Ces adaptateurs transmembranaires, situés dans les rafts, n'ont pas de

domaine d'interaction moléculaire mais leurs tyrosines permettent le recrutement de plusieurs molécules de signalisation comme la phospholipase PLC γ , les adaptateurs cytosoliques SLP-76 et GADs ou encore le facteur d'échange GRB2^{65,66,67}. Ces molécules sont impliquées dans les lymphocytes et les cellules myéloïdes après engagement des immunorécepteurs. Un complexe de signalisation sous-membranaire, qui constitue un échafaudage de molécules de signalisation organisé dans le temps et dans l'espace, est alors mis en place. Ainsi l'empilement de protéines se fait dans un ordre précis et suit un scénario adapté pour permettre le maintien et la transmission du signal d'activation (**Figure 5**).

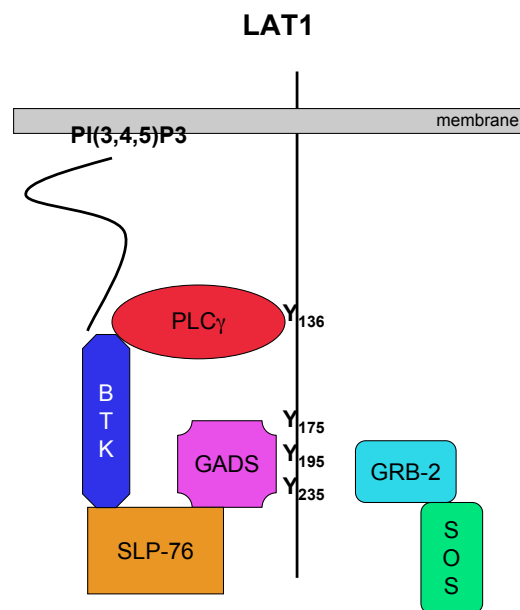


Figure 5

Illustration de molécules recrutées par LAT1

4.3. Les récepteurs des mastocytes

4.3.1. La voie Lyn

Les ITAM phosphorylés de la sous-unité FcR γ recrutent la tyrosine kinase à deux domaines SH2, Syk^{68, 69, 70}, qui activée par sa phosphorylation par Lyn et par autophosphorylation, phosphoryle à son tour des effecteurs de la signalisation, en particulier des adaptateurs transmembranaires comme LAT1^{71, 72}.

Contrairement aux lymphocytes T et B, les mastocytes comme les macrophages, les cellules NK et les plaquettes expriment à la fois LAT1 et LAT2. Ils

ont dans ces cellules des effets antagonistes, LAT1 régulant positivement l'activation cellulaire et LAT2 régulant négativement l'activation cellulaire. LAT1 possède plusieurs tyrosines dans son domaine intracytoplasmique ce qui lui permet de recruter de nombreuses molécules et d'organiser un réseau de signalisation conduisant à la production des seconds messagers⁷³. Ainsi la tyrosine 136 de LAT1 permet le recrutement de la PLC γ tandis que les tyrosines 175, 195 et 235 permettent le recrutement de GADs et GRB2⁷⁴

4.3.2. La voie Fyn

Parallèlement à la voie de signalisation qui dépend de Lyn, les ITAM phosphorylés recrutent également la kinase de la famille Src, Fyn, qui phosphoryle l'adaptateur Gab-2 permettant le recrutement et l'activation de la PI3K^{75, 72}. Celle-ci transforme le PI(4,5)P2 membranaire en PI(3,4,5)P3⁷⁶. Le PI(3,4,5)P3 est un site de liaison pour les domaines PH, ce qui permet la translocation à la membrane du facteur d'échange vav, de la serine thréonine kinase Akt et de sa kinase activatrice PDK-1, de la Bruton's Tyrosine Kinase BTK et des Phospholipases PLC γ -1 et 2^{77, 78}.

La mise en route et l'orchestration de toutes ces molécules de signalisation permet la formation d'un signalosome qui déclenche les différentes voies de signalisation et conduit aux différentes réponses des mastocytes.

5. La propagation intracellulaire des signaux.

5.1. Généralités

Il serait ici trop long de détailler les différentes voies de signalisation empruntées dans les différentes cellules d'un organisme et déclenchées par les nombreux récepteurs qu'elles expriment. Cependant, la plupart des voies de signalisation partagent la possibilité de constituer un complexe de signalisation sous membranaire qui permet l'activation de différentes molécules de signalisation. Ce complexe de signalisation permet la production de seconds messagers solubles qui propagent le signal de la membrane vers le noyau. La plupart des cascades de signalisation conduisent à l'activation de facteurs de transcription qui se fixent sur les promoteurs des gènes. La transcription est alors suivie de la traduction des protéines qui peuvent être secrétées ou adressées dans les différents compartiments de la cellule comme la membrane plasmique par exemple.

A titre d'exemple, les RTK activent la PI3K^{79, 80} et la PLC γ ⁸¹. La PLC γ 1 est exprimée largement et la PLC γ 2 est presque exclusivement restreinte aux cellules hématopoïétiques bien qu'elle ait été décrite en premier dans le cerveau. La PLC γ 1 est critique dans de nombreuses cellules mais dans le système immunitaire, la PLC γ 1 est requise dans les fonctions des lymphocytes T et des cellules NK alors que la PLC γ 2 est requise dans les fonctions des mastocytes, des lymphocytes B et des plaquettes⁸².

D'autres récepteurs utilisent des protéines différentes pour propager les signaux intracellulaires. Les récepteurs de cytokines utilisent les kinases JAK, qui phosphorylent les facteurs de transcription STAT et permettent la transcription de gènes⁸³. Les Toll Like Receptor (TLR) recrutent l'adaptateur Myd88 qui via les Interleukin receptor-associated kinases (IRAK) et les TNF-receptor-associated factors (TRAF) active le facteur de transcription NF κ B^{84,85,86}. Dans d'autres systèmes de transduction, comme Notch, le domaine intracytoplasmique du récepteur est clivé par l'activation et migre dans le noyau pour permettre la transcription des gènes⁸⁷.

5.2. Les immunorécepteurs

Après la formation du signalosome, les immunorécepteurs initient la voie calcique et les différentes voies d'activation des facteurs de transcription. La propagation intracellulaire des signaux passe par le clivage d'un phospholipide central, le PI(4,5)P2 par la PLC γ pour produire l'Inositol Phosphate (IP) (1,4,5)P3 et le Di-Acyl-Glycérol (DAG)⁸⁸.

La complète activation de la PLC γ 1 nécessite l'intervention de Syk et de BTK⁸⁹. L'IP3 se fixe sur ses récepteurs à la surface du réticulum endoplasmique. Ces récepteurs sont des canaux calciques et s'ouvrent lorsque l'IP3 s'y fixe, libérant ainsi les stocks de calcium intracellulaire⁹⁰. Le DAG active la Protein Kinase C (PKC)⁹¹, qui participe à l'activation des petites protéines G. Ces protéines déclenchent des phosphorylations de sérine-thréonine kinases qui aboutissent à l'activation des MAPK

5.3. Les récepteurs des mastocytes

Dans la lignée tumorale de mastocytes de rat RBL-2H3 (RBL), la seule réponse calcique suffit à induire la dégranulation. Ainsi un calcium ionophore suffit à induire l'activation de RBL alors qu'il ne le permet pas dans des mastocytes normaux comme les Bone-Marrow-derived Mast cells (BMMC), dérivés de la moelle osseuse. En effet, dans les cellules primaires, l'intervention de la PKC est nécessaire comme le montrent les expériences

réalisées dans des mastocytes déficients en PKC⁹² tandis que la voie Ras est mutée dans RBL⁹³.

5.3.1. La voie calcique

La diminution de la concentration de calcium intracellulaire est détectée par la STromal Interaction Molecule 1 (STIM-1). En effet, STIM-1, localisé dans le réticulum endoplasmique, possède une région transmembranaire avec un site de liaison pour le calcium. La déplétion du calcium des stocks du réticulum induit la rapide translocation de STIM-1 à la membrane⁹⁴. STIM-1 interagit avec le canal calcique CRACM1/Orai1, ce qui contribue à la sélectivité du canal et induit l'entrée de calcium extracellulaire^{95,96}. L'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire active le facteur de transcription NFAT⁹⁷. NFAT est une protéine cytoplasmique qui est phosphorylée dans les cellules au repos. Après activation, NFAT est déphosphorylée par la calcineurine, transloquée dans le noyau où elle devient active pour transcrire des gènes⁹⁸ (**Figure 6**).

5.3.2 La voie des MAPK et des facteurs de transcription

La voie Ras est activée par le facteur d'échange sos, qui est mobilisé par le complexe Grb2 via LAT. Cette voie aboutit à l'activation de la MAPK erk, qui conduit à l'activation du facteur de transcription AP1⁹⁹. La voie Rac est activée par le facteur d'échange vav, qui est mobilisé par le PI(3,4,5)P3^{100,101}. Cette voie aboutit à l'activation des MAPK JNK¹⁰² et p38⁷¹. La PKC active aussi le facteur de transcription NFκB via BCL-10, MALT1 et IκB¹⁰³ (**Figure 6**).

L'activation de ces différents facteurs de transcription permet la transcription des gènes de cytokines, de chimiokines et de cyclines¹⁰⁴.

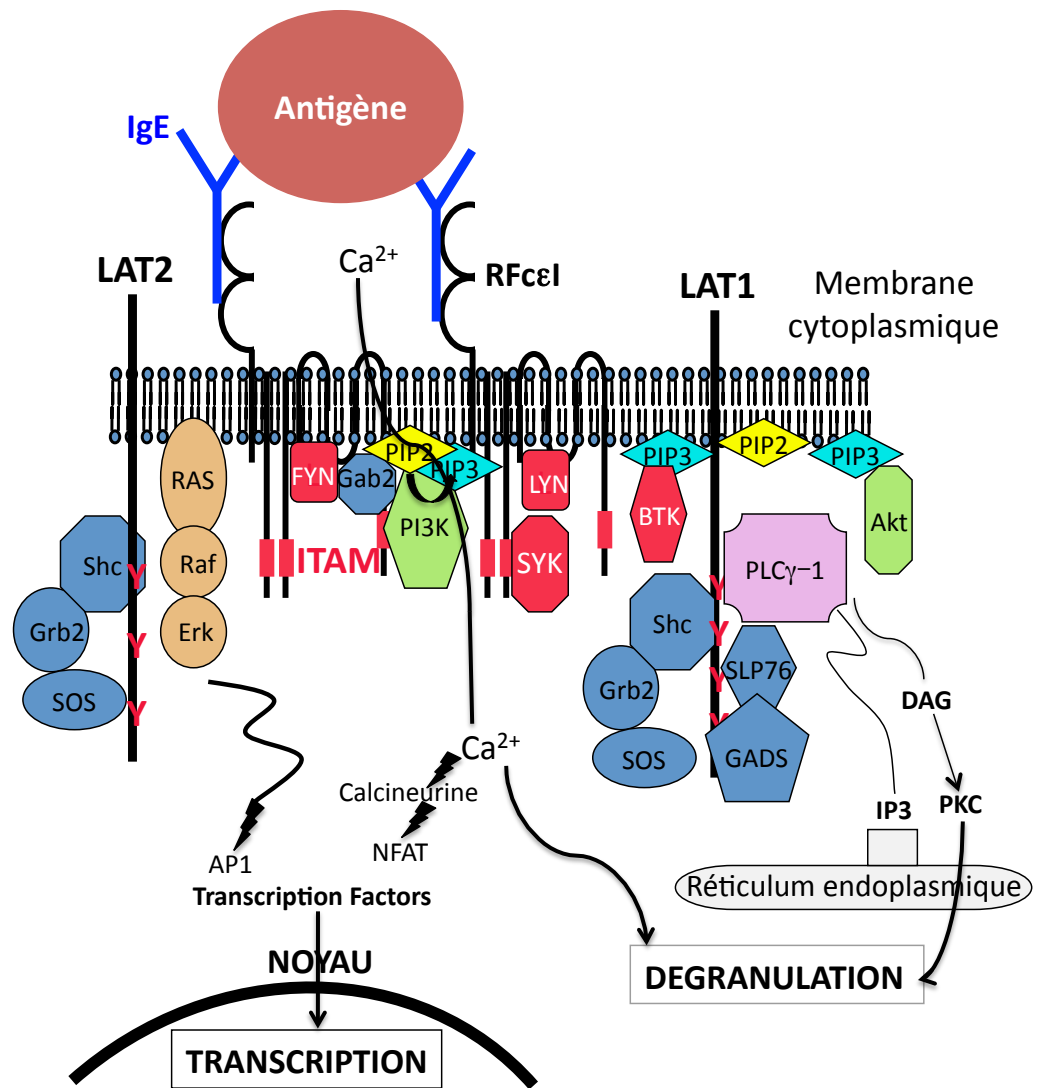


Figure 6

Schéma d'activation des mastocytes par les RFcεI

Après sensibilisation par les IgE et agrégation par un antigène multivalent, les kinases Lyn sont activées et phosphorylent les ITAM des RFcεI. Ceci permet le recrutement de la kinase Syk qui activée phosphoryle les adaptateurs LAT1 et LAT2. D'autre part, la kinase Fyn active la PI3K via Gab2. Ceci conduit à la production de PIP3 membranaire. Les adaptateurs LAT1 et LAT2 recrutent de nombreuses molécules de signalisation permettant l'entrée de Ca²⁺ extracellulaire et l'activation des MAPK kinases. Le Ca²⁺ et la PKC coopèrent pour induire la dégranulation. Le Ca²⁺ et la voie ras déclenchent la transcription des gènes

6. Les réponses biologiques

6.1. Généralités

Certaines réponses biologiques sont déclenchées très rapidement, de l'ordre de quelques minutes, voire instantanément après la fixation du ligand sur son récepteur. D'autres réponses sont plus longues à se mettre en place, de quelques heures à quelques jours, et nécessitent la mise en jeu et l'orchestration de différents facteurs de transcription transloqués dans le noyau pour permettre l'expression des gènes nécessaires. Un stimulus peut induire la production de molécules actives comme des hormones qui agissent ailleurs dans l'organisme par voie sanguine. D'autres stimuli induisent la prolifération ou la migration. Il serait impossible ici de faire une liste complète des différentes réponses cellulaires qui sont induites dans un organisme.

6.2. Les immunorécepteurs

Les immunorécepteurs induisent des réponses différentes selon les cellules qui les expriment et peuvent induire des réponses variées dans une même cellule.

Un BCR ou un TCR donné sont spécifiques d'un clone de lymphocytes B ou de lymphocytes T. Selon le stade de maturation des différents lymphocytes, l'agrégation du BCR ou du TCR déclenche des réponses différentes comme la prolifération, l'apoptose, la production de cytokines.

L'intensité de l'agrégation détermine également la nature de la réponse déclenchée. Un même antigène peut induire une activation ou non selon la dose utilisée, la durée du contact avec le récepteur.

6.3. Les récepteurs des mastocytes

6.3.1. Les réponses précoces et tardives

Les mastocytes possèdent de nombreux granules de sécrétion. Ces granules contiennent des médiateurs inflammatoires comme des amines à savoir l'histamine et la sérotonine et des enzymes comme la β -hexosaminidase et de nombreuses protéases. L'activation des mastocytes par les RFc ϵ I et les RFc γ induit l'exocytose des granules, qui conduit à la libération très rapide, en quelques minutes, du contenu granulaire.

Cette dégranulation met en jeu des mécanismes dépendant du calcium et de la PKC. Elle mobilise presque tous les granules intracellulaires par un mécanisme d'exocytose cumulative, impliquant, d'une part la fusion hétérotypique des granules

avec la membrane plasmique et d'autre part la fusion homotypique des granules entre eux ¹⁰⁵. Les mécanismes généraux du trafic intracellulaire vers la membrane plasmique dépendent de l'interaction de protéines SNAREs ¹⁰⁶, situées d'une part sur la membrane cible (t-SNAREs) et d'autre part sur les vésicules sécrétoires (v-SNAREs), capables de former un complexe catalysant la fusion membranaire. Dans les mastocytes de rat de la lignée RBL-2H3, certaines de ces protéines ont été caractérisées. Les complexes mis en évidence sont composés des t-SNAREs Syntaxine 2,3,4 et SNAP-23 et des v-SNAREs VAMP-2,-3, et -8 ¹⁰⁷, ¹⁰⁸. Certaines protéines comme les protéines Sec1/Munc18, capables de lier les SNAREs Syntaxines, ou les GTPases Rab3 peuvent réguler spécifiquement la formation de ce complexe.

Le contenu granulaire des mastocytes est responsable des réactions d'hypersensibilité immédiate. C'est l'ensemble des phénomènes résultant de l'interaction d'un antigène et des IgE fixées sur les RFcεI des mastocytes et des basophiles. L'interaction de l'allergène avec les anticorps IgE induit la dégranulation des mastocytes et des basophiles entraînant la libération de médiateurs vaso-actifs tels que l'histamine et la sérotonine, et la production des prostaglandines, des leucotriènes ou encore des bradikininines. La libération de ces médiateurs est responsable soit de réactions importantes et brutales, les chocs anaphylactiques qui engagent le pronostic vital du patient soit de réactions moins graves et plus localisées, plus ou moins chroniques, chez les individus prédisposés. L'hypersensibilité immédiate est également la réaction provoquée par les tests cutanés cherchant à déterminer la sensibilisation des patients et appelés prick test. Ce test consiste à piquer dans l'épiderme à travers une goutte d'allergène et à observer la réponse qui se manifeste par un prurit, un érythème, une papule ou l'apparition d'un anneau rougeâtre.

L'agrégation des RFcεI et des RFcγ induit également la sécrétion de cytokines, de chimiokines et de facteurs de croissance plus tardivement, dans les heures qui suivent. Ces médiateurs participent à des manifestations allergiques chroniques.

6.3.2. Les médiateurs pro-allergiques

Tous les médiateurs participent à la constitution d'une réaction inflammatoire allergique. Les granules des mastocytes contiennent des médiateurs préformés comme l'histamine. Cette dernière augmente la perméabilité vasculaire, déclenche la contraction des muscles lisses, active les nerfs nociceptifs. Ces effets sont transmis par les récepteurs H1R à H4R qui sont des récepteurs couplés aux protéines G et qui sont

exprimés par de nombreuses cellules hématopoïétiques comme les cellules dendritiques, les cellules NK, les lymphocytes T et les granulocytes mais aussi par des cellules non hématopoïétiques comme les cellules épithéliales. Elle induit les papules cutanées, les érythèmes et les démangeaisons dans les cas d'allergies cutanées. Elle contribue à la sécrétion de mucus dans l'asthme ¹⁰⁹.

Les protéases sont également des médiateurs mastocytaires préformés. La tryptase est un facteur angiogénique. La chymase augmente la prolifération des cellules musculaires lisses et des fibroblastes et stimule la synthèse de collagène ¹¹⁰.

D'autres médiateurs sont synthétisés à partir de l'acide arachidonique. Ce sont des médiateurs lipidiques tels que les leucotriènes, les prostaglandines, les thromboxanes et le Platelet-Activated Factor (PAF). Les PGD2 et les LTC4 sont bronchoconstricteurs, augmentent la perméabilité vasculaire et induisent de la fibrose dans les bronches. Ils activent les éosinophiles et attirent les neutrophiles sur les sites allergiques ¹¹¹.

Des protéines néotranscrites participent aussi à l'établissement d'une allergie, comme des cytokines telles que l'IL-6, des chimiokines telles que MIP-1 α et des facteurs de croissance tels que le GM-CSF. Le TNF- α facilite le trafic des leucocytes dans les sites inflammatoires en augmentant l'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales et épithéliales. L'IL-4, en partie responsable du développement TH2, induit la production d'IgE par les lymphocytes B. L'IL-13 stimule l'hypersecretion de mucus. L'IL-5 induit la maturation et l'infiltration d'éosinophiles. D'autres cytokines permettent l'infiltration de neutrophiles (IL-8) et de monocytes (Monocyte Chemotactic Protein-1, -3 ou -4) ¹¹⁰.

Les nombreux médiateurs sécrétés par les mastocytes activés contribuent à l'établissement d'une réaction inflammatoire locale. La réaction aigüe déclenchée en quelques minutes ¹¹² est suivie d'une réaction tardive en quelques jours ¹¹³, d'une réaction chronique en quelques semaines et d'un remodelage tissulaire en quelques mois ¹¹⁴.

6.3.3. Les médiateurs pro-inflammatoires

Les mastocytes ont aussi été impliqués dans des maladies auto-immunes inflammatoires tissulaires comme la sclérose en plaques, une maladie neurologique chronique due à une démyélinisation des fibres nerveuses de la substance blanche du système nerveux ¹¹⁵, la polyarthrite rhumatoïde caractérisée par une atteinte articulaire évoluant par poussées vers la déformation et la destruction des articulations atteintes ¹¹⁶, la thyroïde d'Hashimoto, une inflammation de la glande thyroïde qui peut aboutir à sa destruction ou encore le syndrome de Sjögren caractérisé par une atteinte des glandes lacrymales et salivaires. Ces maladies auto-immunes sont toutes caractérisées par la présence d'auto-anticorps de type IgG spécifiques d'antigènes tissulaires. Cependant le rôle des mastocytes dans ces pathologies a été récemment remis en cause dans des travaux utilisant la recombinaison CRE pour déléter les mastocytes ¹¹⁷.

Les mastocytes sont donc des cellules myéloïdes participant à l'immunité innée et activables par l'agrégation de leurs RFcεI par des IgE et un antigène. Cette agrégation délivre des signaux d'activation qui conduisent à l'activation de la PLC-γ et de la PI3K. Les cascades de signalisation induisent la réponse calcique et l'activation de facteurs de transcription qui aboutissent à la dégranulation et la production de médiateurs néo-transcrits comme des cytokines.

II. Les récepteurs activateurs délivrent des signaux négatifs

Ce chapitre de l'introduction sera également séparé en trois parties : généralités, immunorécepteurs et récepteurs des mastocytes

Des phénomènes de régulation négative permettent d'inhiber les réponses biologiques déclenchées par les récepteurs activateurs. Le récepteur activateur lui-même peut parfois déclencher cette régulation négative. Par la suite, cette régulation négative sera appelée « auto-régulation négative »

Plusieurs molécules participent à l’auto-régulation négative. Certaines sont spécialisées dans cette fonction, d’autres participent également à l’activation cellulaire mais le contexte moléculaire est alors différent.

1. Généralités

Les principales molécules impliquées dans la régulation négative sont des phosphatases. Elles ont en effet un rôle antagoniste aux kinases qui jouent un rôle prépondérant dans l’activation cellulaire. Ceci est néanmoins une simplification inexacte. Certaines phosphatases participent en effet directement à la génération des signaux positifs qui conduisent à l’activation cellulaire.

1.1. Les phosphatases

Deux grandes catégories de phosphatases existent. Ce sont les protéines phosphatases et les lipides phosphatases qui diffèrent par leurs substrats. Les protéines phosphatases déphosphorylent des sérines, des thréonines et/ou des tyrosines. Les lipides phosphatases déphosphorylent les lipides membranaires. Les phosphatases peuvent être membranaires ou cytosoliques. Deux familles de phosphatases à domaine SH2 sont également retrouvées. Ce sont les tyrosines phosphatases SHP-1 et SHP-2 qui déphosphorylent les tyrosines ¹¹⁸ et les inositol phosphate phosphatases SHIP1 et SHIP2 qui déphosphorylent le PI(3,4,5)P3 ¹¹⁹. SHP-1 et SHIP1 sont exprimées dans les cellules hématopoïétiques tandis que SHP-2 et SHIP2 sont ubiquitaires (**Figure 7**).

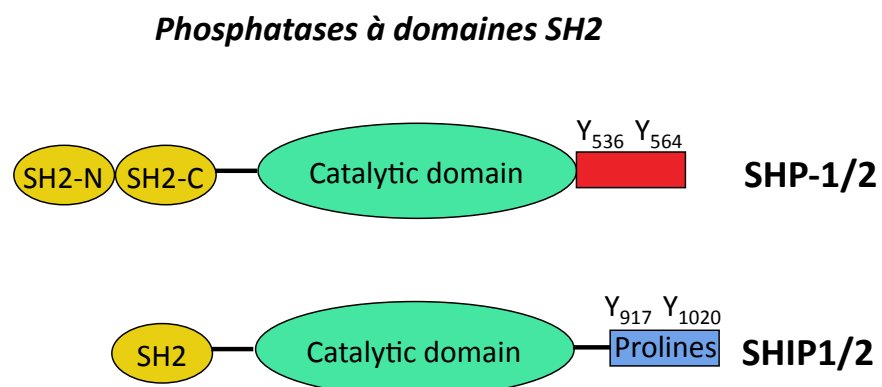


Figure 7

Les phosphatases cytosoliques à domaine SH2

1.2. Autres mécanismes

D'autres molécules sont également impliquées dans l'auto-régulation négative comme certaines kinases mais aussi des ubiquitinasés telle que cbl. En effet, de nombreuses molécules de signalisation mises en jeu et phosphorylées, sont presque aussitôt ubiquitinées. Cette transformation conduit à leur dégradation par le protéasome ¹²⁰.

D'autres processus contribuent à l'auto-régulation négative. L'engagement par leur ligand de nombreux récepteurs membranaires peut conduire à l'endocytose du complexe ligand – récepteur ou à son clivage et sa libération dans le milieu extracellulaire. Une partie des récepteurs disparaît de la surface, limitant ainsi leur réengagement.

2. Les immunorécepteurs

Les immunorécepteurs peuvent également générer des signaux négatifs. SHP-1 et SHIP1 sont les phosphatases étudiées pendant ce travail de thèse.

2.1. Les phosphatases

2.1.2. SHP-1

L'importance de SHP-1 dans les mécanismes de régulation est mise en évidence par les souris déficientes en SHP-1. Ainsi, les souris SHP-1^{-/-}, aussi appelées « motheaten », meurent rapidement d'autoimmunité et d'immunodéficiences. Dans ces souris, les lymphocytes B et T sont hyper réactifs à l'antigène ¹²¹.

SHP-1 déphosphoryle les premiers événements de phosphorylation déclenchés notamment par les récepteurs à ITAM, comme les ITAM eux-mêmes, les kinases de la famille src et de la famille syk, et l'adaptateur LAT1.

Les RFcαI peuvent fixer SHP-1 en présence d'IgA monomériques ¹²² et les RFcγI le peuvent en présence d'IgG monomériques¹²³

2.1.2. SHIP1

SHIP1 régule l'activation et la prolifération de nombreuses cellules. Les souris déficientes pour SHIP1, qui ont une prolifération trop importante et incontrôlée des cellules myéloïdes, meurent d'une infiltration dans les poumons ¹²⁴. SHIP1

déphosphoryle le PI(3,4,5)P3, le produit de la PI3K, en PI(3,4)P2, inhibant ainsi les cascades de signalisation de nombreux récepteurs.

2.3. Les adaptateurs

2.3.1. Les adaptateurs membranaires

Plusieurs adaptateurs sont impliqués dans l'auto-régulation négative. Certains adaptateurs sont membranaires tels que LAT1 et LAT2. LAT1 est une molécule clé dans l'activation des lymphocytes T par le TCR et l'activation des mastocytes par les RFcεI. Grâce à ces tyrosines intracytoplasmiques, LAT1 organise un complexe moléculaire sous-membranaire recrutant de nombreuses protéines impliquées dans la transduction du signal. L'étude de mutants des différentes tyrosine de LAT1 nous a permis de révéler que la tyrosine 136 jouait un rôle inhibiteur ¹²⁵. Les souris génétiquement modifiées exprimant ce mutant de LAT1 présentent des désordres lymphoprolifératifs incluant des cellules T polyclonales qui produisent de grandes quantités de cytokines TH2 ¹²⁶. Bien que LAT1 ait un rôle globalement positif, il peut recruter la phosphatase SHIP1 ⁷⁴.

LAT2 a tout d'abord été décrit comme l'équivalent de LAT1 dans les lymphocytes B. Cet adaptateur ne possède cependant pas la tyrosine qui fixe la PLC-γ.

Dans plusieurs cellules hématopoïétiques, comme les mastocytes, les macrophages les DC, les NK et les plaquettes, LAT1 et LAT2 sont coexprimés. Dans ces cellules, LAT2 semble jouer un rôle négatif. Il semble que dans ces cas là, LAT2 exerce son activité inhibitrice par compétition, en diminuant la quantité de molécules effectrices libres pour s'associer à LAT1 ⁷⁴ (Figure 8).

2.3.2. Les adaptateurs cytosoliques

L'adaptateur cytosolique Dok joue aussi un rôle négatif, principalement en se fixant à la phosphatase SHIP1. SHIP1 a été surexprimée dans la lignée BaF/3 et les auteurs ont montré que SHIP1 s'associaient avec Dok, la PI3K et CRKL ¹²⁷. Dok se fixe à SHIP1 par son domaine PTB. Les tyrosines 917 et 1020 de SHIP1 semblent impliquées dans cette interaction. CRKL se fixe à SHIP1 par son domaine SH2. Ceci conduit notamment à l'inhibition de la migration cellulaire. Dans les lymphocytes T, cette interaction conduit à l'inhibition de la phosphorylation de LAT ¹²⁸.

2.3. Les kinases

La première fonction reconnue à Lyn dans l'activation cellulaire par les immunorécepteurs est son rôle dans la phosphorylation des ITAM. Cependant, Lyn est également impliquée dans des voies de signalisation négative. Par exemple, Lyn phosphoryle SHIP1. Le mécanisme moléculaire à l'origine de cette capacité repose sur la c-terminal src kinase, Csk. Csk est une tyrosine kinase cytosolique qui phosphoryle une tyrosine inhibitrice dans la région C-terminale des membres de la famille des kinases src¹²⁹. Cette phosphorylation induit des interactions intramoléculaires entre la tyrosine phosphorylée et le domaine SH2 de ces kinases aboutissant à un repliement de la molécule et à une diminution de l'activité kinase. Pour être active, Csk a besoin d'être relocalisée à la membrane et d'interagir avec l'adaptateur transmembranaire Cbp/PAG¹³⁰.

3. Les récepteurs des mastocytes

3.1. Les phosphatases

3.1.1. SHP-1

SHP-1 contrôle la réponse des mastocytes en s'associant aux RFcεI¹³¹ et en déphosphorylant les tyrosines des ITAM¹³².

3.1.2. SHIP1

SHIP1 régule aussi la dégranulation des mastocytes¹³³. L'activation des mastocytes par IgE et antigène augmente avec la concentration en antigène jusqu'à un optimum, puis la réponse décroît progressivement quand la concentration en antigène est encore augmentée pour finalement retourner au bruit de fond¹³⁴.

Cette réponse des mastocytes en forme en cloche a pendant longtemps été interprétée comme une conséquence de la diminution de l'agrégation des récepteurs due à une incapacité pour les concentrations élevées d'antigène à agréger correctement les RFcεI^{135,136}. Les signaux intracellulaires ne diminuent pas avec la concentration d'antigène mais augmentent. La phosphorylation sur tyrosine de substrats intracellulaires, en particulier celle de FcRβ et de la PLC-γ1, est augmentée avec des concentrations supra-optimales d'antigène comparées à celles obtenues avec des concentrations optimales. Cependant, les réponses sécrétoires diminuent parce que les signaux négatifs augmentent et deviennent dominants sur les signaux positifs.

La phosphorylation sur tyrosine inductible de SHIP1, qui est proportionnelle à son recrutement dans les complexes de signalisation, augmente avec la dose

d'antigène même avec des concentrations supra-optimales d'antigène. L'inhibition de la sécrétion en excès d'antigène est abolie dans des mastocytes dérivés de souris déficientes pour SHIP1¹³⁷. Ces mastocytes répondent aussi plus intensément aux signaux d'activation. A titre d'exemple, des BMMC déficients pour SHIP1 dégranulent beaucoup plus que des BMMC sauvages quand ils sont activés par IgE et antigène¹³⁴. Ces résultats indiquent que SHIP1 est l'effecteur de la régulation négative autonome des RFcεI qui abolit la réponse des mastocytes en excès d'antigène. Le mécanisme par lequel SHIP1 est recruté par les RFcεI est mal connu. SHIP1 est potentiellement recrutée par FcRβ¹³⁸ et nous avons montré que SHIP1 est capable de s'associer avec LAT1⁷⁴.

3.2. Les adaptateurs

Dans les mastocytes, LAT1 joue des rôles positifs et des rôles négatifs. Ainsi, des souris knock-in pour les différentes tyrosines de LAT1 ont révélé que la tyrosine en position 136 est impliquée dans des signaux négatifs¹³⁹. En effet, les mastocytes dérivés des souris dans lesquelles les quatre tyrosines sont mutées dégranulent plus que ceux dans lesquelles les trois tyrosine distales sont mutées (ici, seule la tyrosine 136 est gardée intacte). Il en est de même pour la production de cytokines, la réponse calcique et la phosphorylation de Erk¹²⁵.

Cette augmentation est induite aussi bien par une stimulation IgE plus antigène que par une stimulation par des complexes immuns à IgG. Le ou les mécanismes moléculaires mis en jeu restent à être décrits. La tyrosine 136 est celle qui recrute la PLC-γ. LAT1 contient deux sites de fixation pour le domaine SH2 de SHIP1 : la tyrosine 136 et dans une moindre mesure la tyrosine 235 comme nous l'avons montré dans des expériences d'interaction entre des domaines SH2 et des peptides de LAT1. LAT1 recrute SHIP1 après agrégation des RFcεI et ce recrutement est augmenté quand les cellules sont déficientes en LAT2⁷⁴. Les souris déficientes en LAT2 ont des réponses induites par les IgE augmentées¹⁴⁰.

3.3. Les kinases

Les RFcεI exprimés par les mastocytes sont donc non seulement capables de délivrer des signaux positifs mais ils sont également capables d'induire des signaux négatifs. Ils participent ainsi à leur propre auto-régulation. Ces signaux négatifs impliquent principalement des phosphatases, des kinases et des adaptateurs.

III. Des corécepteurs inhibiteurs régulent les récepteurs activateurs

Les cellules qui expriment des immunorécepteurs sont aussi soumises à de la régulation induite par l'engagement d'autres récepteurs qui sont coexprimés par les cellules. Ces corécepteurs peuvent réguler positivement ou négativement les réponses biologiques de ces cellules. Ce chapitre de l'introduction sera consacré aux corécepteurs inhibiteurs à ITIM pour Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif. Il sera séparé en trois parties : tout d'abord un paragraphe de définitions, puis un paragraphe sur les récepteurs à ITIM recrutant SHP-1, en particulier les KIR, et enfin un paragraphe sur les RFcγIIB.

1. Définition des récepteurs à ITIM

Les récepteurs à ITIM possèdent dans leur domaine intracytoplasmique un ou plusieurs motif(s) inhibiteur(s) de treize acides aminés contenant une tyrosine dans un contexte **YxxV/L** et appelé ITIM en référence aux ITAM. La capacité d'inhibition des récepteurs à ITIM est liée à la phosphorylation de la tyrosine de l'ITIM et à leur propriété de recruter des phosphatases à domaine SH2. Les fondements moléculaires de la co-inhibition (co-régulation négative) dépendent de plusieurs mécanismes, selon que les récepteurs à ITIM recrutent une tyrosine phosphatase ou une inositol phosphatase.

Le premier ITIM décrit a été celui présent dans les RFcγIIB. De nombreux ITIM ont depuis été décrits dans d'autres récepteurs inhibiteurs ¹⁴¹. Des molécules à ITIM sont exprimées chez les oiseaux, les grenouilles, les poissons, les drosophiles et même chez certains nématodes ce qui semble indiquer leur importance comme pression de sélection ¹⁴¹. La plupart des récepteurs à ITIM recrutent la tyrosine phosphatase SHP-1 mais les RFcγIIB recrutent SHIP1.

2. Les récepteurs à ITIM recrutant SHP-1

2.1. Généralités

2.1.1. Dans les cellules hématopoïétiques

Les récepteurs à ITIM qui recrutent SHP-1 sont différemment exprimés sur les cellules hématopoïétiques. Les LAIR-1 pour leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1 sont exprimés par de nombreux leucocytes ¹⁴². Les ILT3 pour

Immunoglobulin-like transcript 3¹⁴³ et DCAL-2 pour Dendritic-Cell-Associated C-type Lectin 2¹⁴⁴ sont exprimés par les cellules dendritiques. Les FCRL pour FC Receptor-Like molecule¹⁴⁵, les LILR pour Leukocyte Ig-Like Receptor¹⁴⁶ et CD72¹⁴⁷ sont exprimés par les lymphocytes B. CD31¹⁴⁸ est notamment exprimé par les lymphocytes T. CD300 est exprimé par les monocytes¹⁴⁹. Siglec-9 pour sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 9 est exprimé par les polynucléaires¹⁵⁰. Cette liste n'est bien sur pas exhaustive mais illustre la variété des récepteurs à ITIM recrutant SHP-1.

Les KIR, exprimés par les cellules NK, sont les prototypes des récepteurs à ITIM recrutant SHP-1. Les ligands des KIR sont les molécules du CMH I qui sont exprimées par toutes les cellules de l'organisme. L'expression des molécules de CMH I et leur fixation sur les KIR empêchent les cellules NK de détruire les cellules du « soi » en inhibant la lyse NK. Par contre, dans le cas de cellules cancéreuses ou infectées par un virus qui n'expriment plus les molécules du CMH I, les cellules NK peuvent être activées et détruire les cellules cibles^{151,152}. L'inhibition via les KIR dépend du recrutement de la tyrosine phosphatase SHP-1 par ses deux domaines SH2 qui se fixent sur les deux motifs ITIM des KIR. SHP-1 peut déphosphoryler les tyrosines des ITAM¹⁵³, des kinases de la famille src¹⁵⁴, de la kinase syk¹⁵⁵, ou encore de SLP65¹⁵⁶, de SLP76¹⁵⁷ et de Vav¹⁵⁸. Tous ces signaux inhibés sont très précoces dans les cascades de signalisation via les immunorécepteurs^{159,160}.

2.1.2. Dans les mastocytes

Dans les mastocytes, des corécepteurs négatifs recrutant SHP-1 sont aussi exprimés. gp49B1 possède deux ITIM, fixe l'intégrine alpha(v)beta3 et inhibe les réponses anaphylactiques¹⁶¹. PIR-B, pour Paired immunoglobulin-like receptor B, possède trois ITIM, fixe le CMH et inhibe l'activation des mastocytes induite par les RFcεI et la prolifération induite par Kit¹⁶². SIRP-α, pour Signal Regulatory Protein α, possède deux ITIM, fixe CD47 et inhibe la dégranulation¹⁶³ (**Figure 8**).

MAFA pour MAsT Cell Function-associated Antigen¹⁶⁴, PECAM-1 pour Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 (CD31)¹⁶⁵ et MAIR-I pour Myeloid-Associated Immunoglobulin-like Receptor¹⁶⁶ inhibent aussi l'activation des mastocytes mais leurs ligands sont inconnus à ce jour.

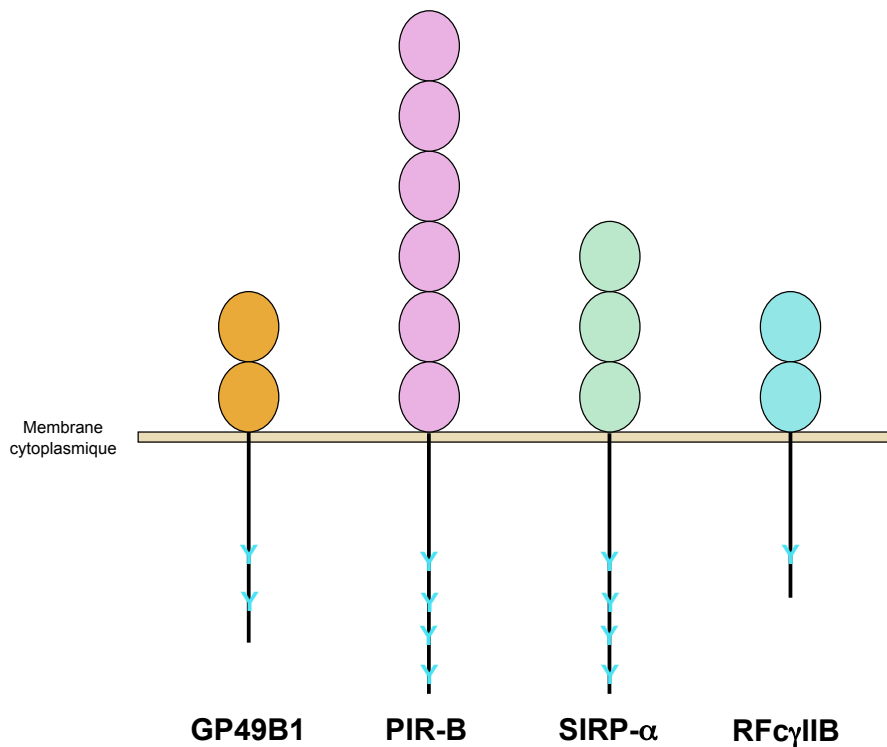


Figure 8

Les principaux récepteurs à ITIM des mastocytes

Les ronds représentent les domaines de la superfamille des immunoglobulines. Les tyrosines des ITIM sont indiquées en bleu

3. Les RFcγIIB

3.1. Structure et expression

Les RFcγIIB sont les seuls RFcγ inhibiteurs. Ils sont monocaténaires et possèdent un ITIM dans leur domaine intracytoplasmique. La séquence de l'ITIM des RFcγIIB est **ITYSSL**. Ils sont exprimés sur toutes les cellules hématopoïétiques à l'exception des cellules NK et des lymphocytes T chez la souris ²². Chez l'homme, ils sont exprimés par les mêmes cellules mais leur expression sur les mastocytes est controversée.

3.2. Spécificité du recrutement de SHIP1

John Cambier a le premier décrit le recrutement de phosphatases à domaines SH2 par les RFcγIIB. La première évidence de la capacité des RFcγIIB à recruter des phosphatases a été révélée par la capacité de peptides, consistant en la séquence de l'ITIM, phosphorylés sur la tyrosine de l'ITIM, de précipiter dans un lysat de cellules SHP-1. Puis, cette phosphatase a

été coprécipitée par le récepteur après coengagement des RFcγIIB et du BCR dans une lignée de lymphocytes B murins, IIA1.6, exprimant des RFcγIIB murins recombinants¹⁶⁷. Par la suite, il s'avéra que les RFcγIIB ne recrutait pas SHP-1 mais SHIP1^{168,169,170}.

Des travaux de notre laboratoire ont expliqué cette spécificité. En effet, SHP-1 possède deux domaines SH2 qui doivent être simultanément engagés ce que ne peuvent pas effectuer les RFcγIIB. Seul l'utilisation *in vitro* du peptide de l'ITIM des RFcγIIB fixé en grande quantité sur des billes permet la précipitation de SHP-1 dans des lysats cellulaires¹⁷¹. D'autre part, des acides-aminés spécifiques doivent être présents, comme la leucine ou l'isoleucine en position Y-2 pour la fixation des domaines SH2 de SHP-1. Le recrutement de SHIP1 par l'ITIM des RFcγIIB repose sur la présence des acides aminés SL entre le Y et le L de la séquence YxxL de l'ITM. Des mutations appropriées de ces acides aminés peuvent transformer un ITIM de RFcγIIB en ITIM de KIR2DL3 et vice versa¹⁷².

3.3. Mécanisme de l'inhibition

Les RFcγIIB sont capables d'inhiber l'activation cellulaire induite par les immunorécepteurs¹⁷³. Pour inhiber, les RFcγIIB doivent être co-agrégés avec les récepteurs activateurs par des ligands extracellulaires communs, comme des complexes immuns à IgG. La co-agrégation des récepteurs activateurs et des RFcγIIB permet à la kinase Lyn de phosphoryler non seulement les tyrosines des ITAM mais aussi la tyrosine de l'ITIM¹⁷⁰. Si on soumet les protéines immunoprécipitées avec les RFcεI à un *in vitro* kinase assay en présence d'une protéine de fusion contenant le domaine intracytoplasmique des RFcγIIB, on induit la phosphorylation de ce domaine qui contient la tyrosine de l'ITIM¹⁷⁰. Cette phosphorylation est perdue dans des mastocytes dérivés de souris déficientes pour Lyn mais pas de souris déficientes pour Syk (Figure 9).

La phosphorylation de la tyrosine de l'ITIM permet le recrutement de l'inositol phosphate phosphatase SHIP1 via son domaine SH2¹⁶⁸. La fixation de SHIP1 est stabilisée par l'association avec les adaptateurs cytosoliques Grap ou Grb-2 qui se lient sur la deuxième tyrosine intracellulaire des RFcγIIB murins¹⁷⁴.

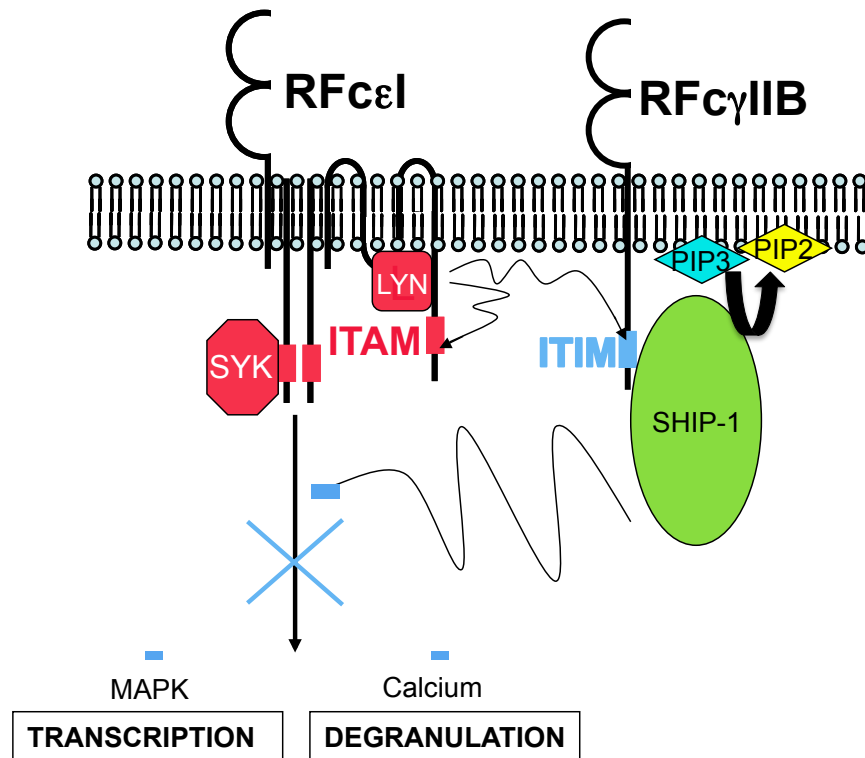


Figure 9

Schéma d'inhibition par les RFc γ IIB.

Quand les RFc ϵ I sont co-agrégés avec des RFc γ IIB, cela permet à la kinase Lyn de phosphoryler les ITAM des RFc ϵ I mais aussi l'ITIM des RFc γ IIB qui recrutent la phosphatase SHIP1.

Le substrat principal de SHIP1 est le PI(3,4,5)P3¹⁷⁵. En dégradant le PI(3,4,5)P3, SHIP1 inhibe le recrutement membranaire des molécules à domaine PH, dont la PLC- γ et BTK¹⁷⁶. SHIP1 bloque l'accumulation de PI(3,4,5)P3 et décroît la concentration d'IP3. Ceci conduit à une inhibition de la réponse calcique, et plus précisément de l'influx de calcium extracellulaire. En effet, le signal calcique devient transitoire¹⁷⁷. L'inhibition de la réponse calcique inhibe la dégranulation des mastocytes. L'activation des MAPK JNK et p38 de la voie Rac est également inhibée, conséquence du défaut potentiel de recrutement de vav via le PI(3,4,5)P3.

SHIP1 peut également inhiber la voie ras sans l'intervention de son activité catalytique. En effet, quand SHIP1 est recrutée à la membrane, elle est phosphorylée sur tyrosine et peut fixer Dok-1 ce qui mobilise RasGAP. RasGAP permet la transformation de

Ras-GTP en Ras-GDP ce qui inhibe son activité. Ceci prévient la cascade de phosphorylation qui en découle et inhibe l'activation des MAPK Erk1/2¹⁷⁸. Les facteurs de transcription, qui forment le complexe AP-1, ne sont alors plus activés et la transcription des gènes dont les gènes de cytokines est inhibée (Figure 10).

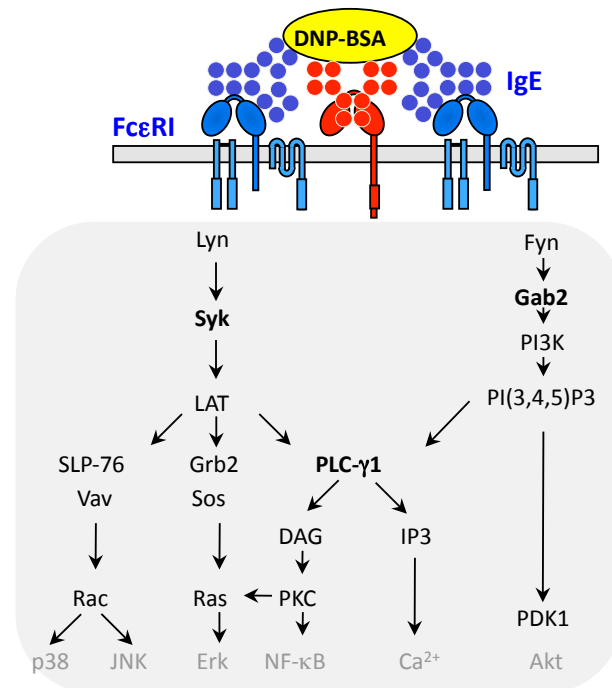


Figure 10

Substrats de SHIP1 dans les cascades de signalisation déclenchées par les RFcεI

SHIP1 dégrade le PIP3 et inhibe ras, ce qui conduit à une inhibition de la réponse calcique et de l'activation des MAPK. La réponse des mastocytes est alors inhibée.

SHIP1 est l'effecteur de l'inhibition par les RFcγIIB. En effet, l'inhibition de l'activation cellulaire est perdue dans des cellules issues de souris déficientes pour SHIP1¹³⁴. D'autre part, l'inhibition peut être reproduite en remplaçant le domaine intracytoplasmique des RFcγIIB par le domaine phosphatase de SHIP1¹⁷⁹. Ces expériences ont ainsi permis de montrer que SHIP1 est nécessaire et suffisante à l'inhibition induite par les RFcγIIB. D'autre part, SHIP1 est associée avec la filamin-1, une protéine de cytosquelette d'actine. Au cours de l'inhibition, les RFcγIIB s'associent à SHIP1 et à la filamine ce qui entraîne les RFcεI dans le cytosquelette. En recrutant plus de SHIP1 dans les complexes d'activation, les RFcγIIB amplifient l'auto-régulation des RFcεI¹⁸⁰. En effet, dans l'auto-régulation des RFcεI, SHIP1

est responsable de l'inhibition de la réponse. Quand les RFcεI sont co-agrégés avec les RFcγIIB, ceux-ci augmentent la quantité de SHIP1 dans le signalosome et l'inhibition de la réponse est plus efficace.

Dans les mastocytes, les RFcγIIB sont également capables d'inhiber la prolifération induite par un récepteur à activité tyrosine kinase, Kit. Après dimérisation par son ligand, le Stem Cell Factor (SCF), Kit recrute et phosphoryle la PI3K qui produit du PI(3,4,5)P3. Quand les RFcγIIB sont co-agrégés avec Kit, les RFcγIIB deviennent phosphorylés et recrutent SHIP1 qui dégrade le PI(3,4,5)P3. La phosphorylation des MAPK et de Akt ainsi que l'induction des cyclines D2, D3 et A sont inhibées. Les cellules restent vivantes mais sont bloquées en phase G0/G1 du cycle cellulaire^{181,179}. Cette inhibition est perdue dans des BMDC SHIP1^{-/-} et peut être reproduite par une chimère contenant le domaine catalytique de SHIP1^{181,179}. Ainsi SHIP1 est nécessaire et suffisante pour inhiber non seulement l'activation cellulaire induite par les récepteurs à ITAM comme les RFcεI mais aussi pour inhiber la prolifération induite par les RTK comme Kit.

IV. Travail de thèse

1. Objectifs et moyens mis en oeuvre

Mon travail de thèse a porté sur les propriétés inhibitrices des RFcγIIB. Des travaux antérieurs de notre laboratoire et d'autres groupes de recherche ont montré que les RFcγIIB peuvent inhiber l'activation des cellules induites par l'agrégation de tous les récepteurs à ITAM et la prolifération des cellules induite par la dimérisation de Kit. L'inhibition induite par les RFcγIIB nécessite la co-agrégation des récepteurs inhibés et des RFcγIIB et requiert le recrutement de l'inositol phosphate phosphatase SHIP1.

L'étude de l'inhibition induite par les RFcγIIB s'est principalement limitée aux récepteurs co-engagés avec les RFcγIIB. En effet, d'après l'analyse du mécanisme de l'inhibition, on comprend que cette co-ligation est nécessaire pour permettre à Lyn de phosphoryler l'ITIM des RFcγIIB, ce qui entraîne le recrutement de SHIP1 et finalement la régulation négative de l'activation. Ainsi dans les mastocytes, les recherches ont porté sur l'engagement conjoint des RFcεI et des RFcγIIB par des IgE et des complexes immuns à IgG. Seules les réponses déclenchées par les RFcεI co-agrégés ont été étudiées.

La molécule critique dans cette inhibition est le PI(3,4,5)P3, un phosphoinositide qui est impliqué dans de nombreuses cascades de signalisation déclenchées par des récepteurs différents capables d'induire l'activation ou la prolifération cellulaire. Pour cette raison, l'inhibition induite par les RFcγIIB n'est peut-être pas restreinte aux récepteurs co-engagés mais pourrait s'exercer simultanément sur d'autres récepteurs adjacents, utilisant le PI(3,4,5)P3 et co-exprimés par les mêmes cellules mais agrégés indépendamment. Ainsi la cis-inhibition induite quand les RFcγIIB sont co-agrégés avec un récepteur activateur, qui inhibe les signaux délivrés par ce récepteur, pourrait s'effectuer en trans sur d'autres récepteurs activateurs non co-agrégés. La cis-inhibition s'étendrait en trans-inhibition.

Pour éprouver cette hypothèse de travail, nous avons développé un modèle expérimental permettant d'étudier les effets de la co-ligation d'un pool de RFcεI sensibilisés par une IgE 1 et co-agrégés aux RFcγIIB sur l'activation induite par un autre pool de RFcεI sensibilisés par une IgE 2 et agrégés par un antigène. La combinaison de ligands 1 comprend une IgE de rat qui est agrégée par des IgG de souris anti-Ig de rat (IgG MAR). Ces anticorps reconnaissent et agrègent l'IgE 1 par leur portion Fab et co-engagent les RFcγIIB par leur portion Fc. La combinaison de ligands 2 comprend une IgE de souris anti-DNP et un antigène multivalent DNP-BSA. L'IgE 2 n'est pas reconnue par les IgG MAR et est agrégée par le DNP-BSA. Cette combinaison de ligands nous a permis de démontrer l'existence de la trans-inhibition (**Figure 11**).

BMMC

RFc γ IIB+RFc ϵ I sur RFc ϵ I

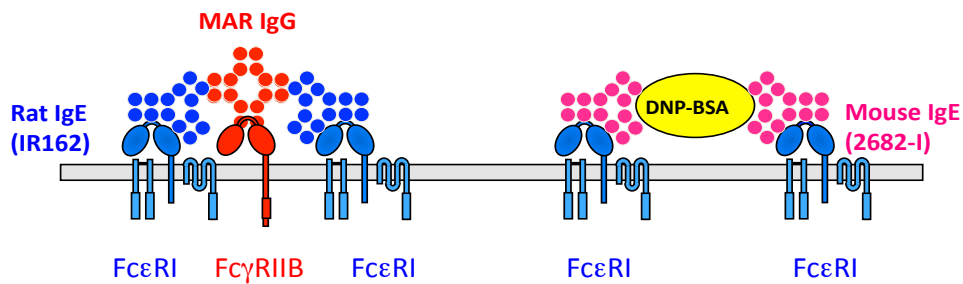


Figure 11

Ligands utilisés pour la trans-inhibition à deux IgE

Dans la combinaison à deux IgE utilisée dans les mastocytes de souris, l'IgE de rat reconnue par les IgG Mouse anti-Rat permet la co-agrégation des RFc ϵ I et des RFc γ IIB tandis que l'IgE de souris anti-DNP et le DNP-BSA permettent d'agréger entre eux des RFc ϵ I.

Nous avons également recherché si la dégranulation induite par les RFc ϵ I pouvait être inhibée en co-agrégeant Kit avec les RFc γ IIB. Pour cela, les mastocytes ont été sensibilisés par des IgE anti-DNP puis stimulés par du DNP-BSA en présence de complexes immuns composés d'anticorps anti-Kit (ACK2) biotinylés et d'anticorps de souris anti-biotine (**Figure 12**).

BMMC

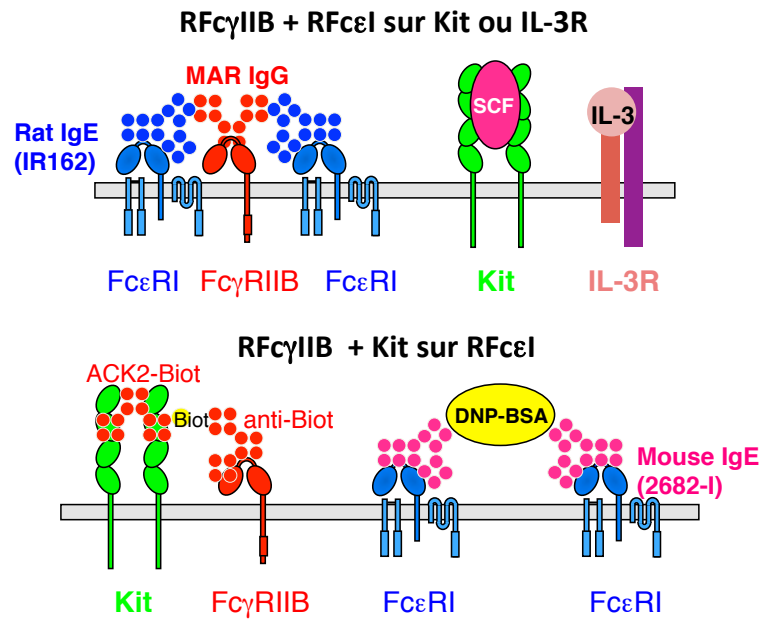


Figure 12

Ligands utilisés pour la trans-inhibition entre RFc ϵ I et Kit

Pour la co-ligation de Kit et des RFc γ IIB, nous avons utilisé des anticorps anti-Kit biotinylés recouverts d'anticorps anti-biotine. Les autres ligands ont été décrits précédemment.

Pour évaluer la pertinence de la trans-inhibition dans un modèle humain, nous avons utilisé des basophiles du sang périphérique. Dans ces basophiles, le pool 1 de RFc ϵ I est sensibilisé par une IgE de rat et est co-agrégé avec les RFc γ IIB avec des IgG MAR et le pool 2 de RFc ϵ I est sensibilisé *in vivo* naturellement par l'IgE humaine et agrégé par des fragments F(ab')₂ d'IgG de lapin anti-IgE humaines (**Figure 13**).

Basophiles humains

RFc γ IIB+RFc ϵ I sur RFc ϵ I

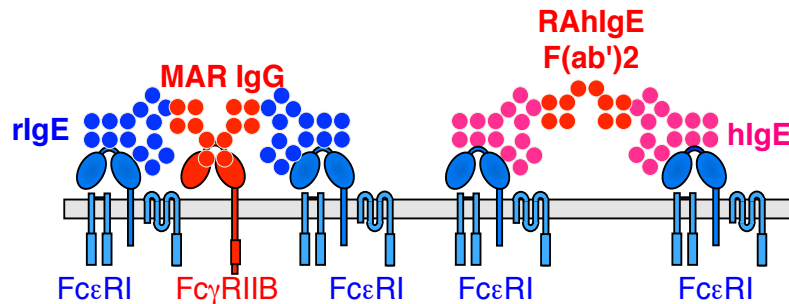


Figure 13

Ligands utilisés dans les basophiles humains

Dans les basophiles humains, la co-agrégation des RFc ϵ I et des RFc γ IIB est assurée par l'IgE de rat et les IgG MAR et l'agrégation des RFc ϵ I à eux-mêmes est assurée par l'IgE humaine déjà fixée *in vivo* et les fragments F(ab')₂ Rabbit anti-Human IgG.

Ce nouveau mode de régulation serait intéressant dans les pathologies allergiques car les patients sont souvent sensibilisés à différents allergènes et la prise en charge de l'un des allergènes par une cis-inhibition médiée par les RFc γ IIB permettrait de trans-inhiber les effets d'autres allergènes.

Les capacités de la trans-inhibition pourraient également être utilisées dans d'autres pathologies humaines, en particulier dans les cancers.

Les RFc γ IIB peuvent cis-inhiber la prolifération de mastocytes normaux quand ils sont coagrégés avec Kit. Nous avons recherché si les RFc γ IIB sont capables de cis-inhiber la prolifération de cellules tumorales. Pour cela, nous avons utilisé la lignée pro-B murine, BaF/3, exprimant un Kit qui porte une délétion partielle du domaine transmembranaire (Kit Δ). L'expression de ce Kit muté dans les cellules BaF/3 induit la dimérisation constitutive de Kit

et leur permet de proliférer en absence de facteurs de croissance. Nous avons transfecté ces cellules avec des RFcγIIB WT ou mutants pour étudier les effets de la co-agrégation des RFcγIIB et de KitΔ sur la prolifération autonome des double transfectants (BaF/3- KitΔ-IIB. Nous avons tout d’abord utilisé des anticorps agonistes anti-Kit (**Figure 12**). Puis, pour utiliser les ligands naturels de Kit et des RFcγIIB, nous avons synthétisé et utilisé une protéine de fusion constituée de la GST associée au SCF (GST-SCF). L’incubation des cellules avec des complexes composés de GST-SCF et d’anticorps de lapin anti-GST (GST-SCF-anti-GST) permet également la co-agrégation de Kit et des RFcγIIB et d’en étudier les conséquences sur la prolifération autonome induite par un Kit muté (**Figure 14**). Ce travail a fait l’objet d’un article publié. Il se trouvera en article annexe dans la partie résultats.

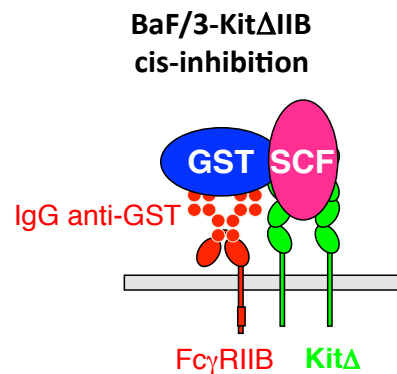


Figure 14

Ligands utilisés pour la cis-inhibition dans les cellules BaF/3-Kitdelta-IIB

Pour la cis-inhibition réalisée dans BaF/3-Kitdelta-IIB, nous avons notamment utilisé une protéine de fusion GST-SCF complexée avec des anticorps anti-GST.

Dans un modèle de mastocytome, MMC-1, dont la prolifération dépend de Abl, nous avons recherché si la co-ligation des RFcγIIB et de Kit, qui ne porte pas de mutation dans cette lignée, pouvait trans-inhiber la prolifération autonome dépendante de Abl. Pour cela, nous avons utilisé les complexes GST-SCF-anti-GST et étudié les conséquences de la co-agrégation de Kit et des RFcγIIB sur la prolifération autonome induite par Abl.

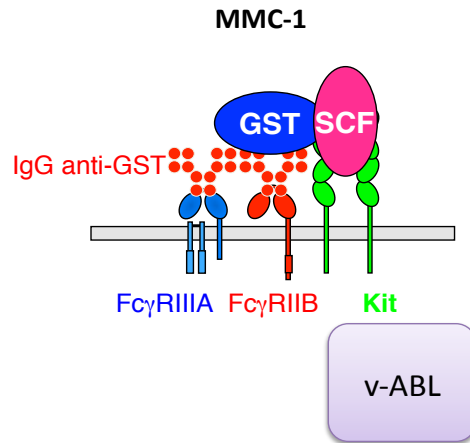


Figure 15

Ligands utilisés pour la trans-inhibition dans les cellules MMC-1

Pour la trans-inhibition réalisée dans MMC1, nous avons utilisé une protéine de fusion GST-SCF complexée avec des anticorps anti-GST. V-ABL est cytoplasmique.

2. Résumé des résultats

2.1. Les RFcγIIB peuvent inhiber la prolifération de cellules transformées

L'utilisation des transfectants BaF/3 m'a permis de démontrer que les RFcγIIB sont capables d'inhiber la prolifération autonome de cellules tumorales. Ainsi l'inhibition induite par les RFcγIIB n'est pas limitée à la prolifération des cellules normales. L'inhibition dans les cellules tumorales dépend aussi du domaine intracytoplasmique des RFcγIIB et peut être induite par des anticorps anti-Kit ou par les ligands naturels de Kit et des RFcγIIB, à savoir le SCF et les IgG¹⁸².

2.2. La trans-inhibition : une nouvelle propriété inhibitrice des RFcγIIB

2.2.1. Démonstration du phénomène

Dans des BMCC sensibilisées par l'une ou l'autre des IgE, j'ai vérifié que les deux combinaisons de ligands étaient bien indépendantes. Dans des BMCC sensibilisées par les deux IgE et stimulées par du DNP-BSA en présence ou en absence d'IgG MAR, j'ai démontré que la co-ligation des RFcγIIB et d'un pool de RFcεI inhibe l'activation induite par les deux pools de RFcεI, ceux qui sont co-engagés avec les RFcγIIB et ceux qui ne le sont pas. Nous proposons d'appeler Cis-

inhibition, l'inhibition de l'activation cellulaire concernant les RFcεI co-engagés avec les RFcγIIB et Trans-inhibition, l'inhibition de l'activation cellulaire concernant les RFcεI qui ne sont pas co-engagés avec les RFcγIIB mais seulement adjacents à d'autres RFcεI qui sont inhibés et agrégés en même temps que ces derniers.

2.2.2. Modalités de la trans-inhibition

J'ai ensuite étudié les modalités de la trans-inhibition. Elle n'est pas induite par des fragments F(ab')₂ MAR ce qui indique que les portions Fc des anticorps reconnaissant l'IgE de rat sont requises. Elle n'est pas induite par des IgG normales de souris ce qui montre qu'elle repose sur la reconnaissance de l'IgE de rat. Elle est effective non seulement dans des BMMC dérivés de souris déficientes pour les RFcγIIIA qui n'expriment que des RFcγIIB mais aussi dans des BMMC WT qui co-expriment des RFcγIIB et des RFcγIIIA, ce qui démontre que la trans-inhibition est dominante. Elle est en revanche levée dans des BMMC dérivés de souris déficientes pour les RFcγIIB. La trans-inhibition affecte toutes les réponses biologiques des mastocytes : la libération de β-hexosaminidase et d'histamine granulaires, la synthèse de LTC-4, la production de cytokines telles que le TNF-α et de chimiokines telles que MIP1-α. Elle inhibe également tous les médiateurs qui induisent une anaphylaxie systémique chez la souris.

2.2.3. Mécanisme de la trans-inhibition

J'ai ensuite étudié le mécanisme de la trans-inhibition. Elle affecte une activation induite par des RFcεI mais pas celle induite non spécifiquement par PMA + ionomycine. Elle diminue la réponse calcique et les signaux tardifs de phosphorylation tels que la phosphorylation d'Akt, des MAPK Erk, JNK et p38 et du facteur de transcription NFκB. Par contre, les événements plus précoces, tels que la phosphorylation globale sur tyrosine et les phosphorylations de Syk, LAT et de Gab2 ne sont pas inhibés. J'ai démontré que l'effecteur de la trans-inhibition est, comme pour la cis-inhibition, SHIP1. En effet, la trans-inhibition est perdue dans des BMMC déficients pour SHIP1. D'ailleurs, les événements de phosphorylation inhibés retrouvent un niveau normal ou augmentent dans ces BMMC SHIP1^{-/-}. En collaboration avec le groupe de Bernard Payrastre, j'ai mis en évidence que la trans-inhibition abolit la production de PIP3 induite par l'antigène. D'autre part, SHIP1 ne peut pas être remplacée par les tyrosine phosphatases SHP-1/2 dans la trans-inhibition.

En effet, la trans-inhibition ne peut pas être induite par un KIRL, récepteur à ITIM des cellules NK, qui recrute SHP-1 mais pas SHIP1. La trans-inhibition est donc plus restreinte que la cis-inhibition qui peut, elle, être induite par des récepteurs recrutant SHP-1/2. La trans-inhibition est aussi rapide que l'activation et est réversible.

Au cours de la trans-inhibition, les deux groupes de RFcεI sont endocytés indépendamment, l'antigène induisant spécifiquement l'endocytose de l'IgE de souris anti-DNP et les IgG MAR celle de l'IgE de rat. En collaboration avec le groupe d'Andrès Alcover, cependant, j'ai montré que les deux signalosomes impliqués, l'inhibiteur contenant l'IgE de rat et l'inhibé contenant l'IgE de souris sont endocytés dans des compartiments qui se rencontrent à l'intérieur de la cellule, pouvant expliquer qu'ils puissent agir l'un sur l'autre.

2.2.4. Extension de la trans-inhibition à d'autres récepteurs murins

En présence de deux IgE, la trans-inhibition peut être induite par un excès d'antigène. Ainsi une forte dose de DNP-BSA, qui ne permet pas d'activer les BMMC, inhibe la dégranulation induite par des concentrations optimales d'IgE de rat et des fragments F(ab')₂ MAR. J'ai également montré que la trans-inhibition peut être étendue à d'autres récepteurs que les RFcεI. La trans-inhibition peut être induite par la co-ligation des RFcγIIB et de Kit et agir sur l'activation via les RFcεI. La co-ligation des RFcγIIB et des RFcεI inhibe également la prolifération des mastocytes induite par le SCF, ligand de Kit.

2.2.5. Extension de la trans-inhibition à la croissance d'une tumeur

J'ai également démontré que la trans-inhibition diminue la prolifération autonome induite par une protéine de fusion Abl dans la lignée de mastocytes de souris MMC-1 ainsi que sa croissance *in vivo*.

2.2.6. Extension de la trans-inhibition aux cellules humaines

J'ai finalement montré que la trans-inhibition est également effective chez l'homme, en particulier dans les basophiles humains qui co-expriment des RFcεI et des RFcγIIB.

Ce travail concernant la trans-inhibition représente le sujet principal de ma thèse et sera soumis prochainement. Il se trouvera en article principal dans la partie résultats.

RESULTATS

Article principal

Trans-inhibition, a new immunoregulatory property that anergyze FcR expressing cells.

Odile Malbec, Lydie Cassard, Patrice Dubreuil, Marcello Albanasi, Friederike Jönsson, David Mancardi, Gaëtan Chicanne, Helena Soares, Pierre Bruhns, Bernard Payrastre, Andrés Alcover and Marc Daëron.

Introduction

Les récepteurs de faible affinité pour la portion Fc des IgG, qui contiennent un ITIM, pour Immunorecepteur Tyrosine-based Inhibition Motif, dans leur domaine intracellulaire, sont depuis longtemps connus pour réguler négativement la production des anticorps par les lymphocytes B. Plus tard, ils ont été reconnus comme des récepteurs capables d'inhiber l'activation cellulaire induite par tous les récepteurs à ITAM, pour Immunorecepteur Tyrosine-based Activation Motif, comme les récepteurs de forte affinité pour les IgE, les RFcεI, et la prolifération cellulaire induite par les récepteurs à activité tyrosine kinase comme Kit. Dans ce travail, nous avons étendu les propriétés inhibitrices des RFcγIIB. Nous avons montré que la coagrégation des RFcγIIB avec les RFcεI n'inhibe pas seulement l'activation induite par ces récepteurs mais inhibe aussi l'activation induite par d'autres récepteurs activateurs adjacents qui ne sont pas coagrégés avec les RFcγIIB. Ainsi la coagrégation des RFcγIIB avec un récepteur contrôlant l'activation inhibe profondément la cellule, l'empêchant de répondre à un autre stimulus. Ce blocage est également induit par et peut s'effectuer sur un récepteur contrôlant la prolifération. D'autre part, cette inhibition globale est également inductible dans des cellules humaines. Nous avons appelé ce nouveau phénomène d'inhibition, la trans-inhibition, en opposition à l'inhibition classique ou cis-inhibition concernant les récepteurs activateurs coagrégés aux RFcγIIB. La trans-inhibition induit la phosphorylation de l'ITIM des RFcγIIB et repose sur le recrutement et la mise en route de l'inositol phosphate phosphatase à domaine SH2, SHIP1, comme pour la cis-inhibition. La production de PI(3,4,5)P3 par la PI3K est complètement inhibée par la trans-inhibition. La trans-inhibition est abolie dans des mastocytes dérivés de moëlle osseuse de souris déficientes en SHIP1. Enfin, la trans-inhibition bloque la prolifération *in vitro* et la croissance *in vivo* d'une tumeur dont la prolifération autonome est due à un oncogène viral, Abl.

Trans-inhibition, a novel regulatory mechanism by which antibodies can anergize Fc Receptor-expressing cells

Odile Malbec ^{**}, Lydie Cassard ^{**}, Patrice Dubreuil [¶], Marcello Albanesi ^{**}, Friederike Jönsson ^{**}, David Mancardi ^{**}, Gaëtan Chicanne ⁺, Helena Soares [§], Pierre Bruhns ^{**}, Bernard Payrastre ⁺, Andrés Alcover [§] and Marc Daëron ^{**}.

*Institut Pasteur, Département d'Immunologie, Unité d'Allergologie Moléculaire & Cellulaire, Paris, France;

#Inserm, Unité 760, Paris, France;

¶Inserm, Unité 891, Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France;

+Inserm, Unité 1048, Université Paul Sabatier, Toulouse, France;

§Institut Pasteur, Département d'Immunologie, Unité de Biologie Cellulaire des Lymphocytes, Paris, France.

Abstract

Cell activation/proliferation is controlled by positive and negative signals triggered by membrane receptors. Negative signals can be generated by the same activating receptors that generate positive signals (auto-regulation) or by inhibitory receptors that are co-engaged with activating receptors (co-regulation). Negative signals depend on SH2 domain-containing phosphatases that are recruited into signalosomes where they hydrolyse phosphorylated kinase products (cis-inhibition). We demonstrate here that negative signals that depend on the SH2 domain-containing inositol phosphatase SHIP1 can affect positive signals generated in other signalosomes by activating receptors that are not co-engaged with the receptors that recruit this phosphatase (trans-inhibition). Trans-inhibition was observed during co-regulation or auto-regulation, in mouse mast cells, in mouse basophils and in human basophils. It was induced by Fc γ RIIB when co-aggregated with Fc ϵ RI or Kit, or by Fc ϵ RI when hyperaggregated in excess of antigen. It affected IgE-induced mast cell/basophil activation and SCF-induced mast cell proliferation. Fc γ RIIB-dependent trans-inhibition also affected the constitutive in vitro proliferation and in vivo growth of mouse mastocytoma cells transformed by the v-Abl oncogene. Trans-inhibition can therefore generate an anergic state, preventing cells from responding to extracellular or intracellular activation/proliferation signals. It might be exploited to induce a "universal" desensitization in allergic patients and, possibly, to control the proliferation of FcR-expressing tumor cells such as in myeloid proliferative disorders.

Introduction

Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif (ITAM)-containing receptors generate activation signals when they are engaged by extracellular ligands on cell membranes. They also generate inhibition signals (reviewed in (1)). High-affinity IgE receptors (Fc ϵ RI), which are critical in the initiation of allergic reactions, are such receptors. When occupied by IgE antibodies, they can be aggregated by specific plurivalent antigens which dose-dependently activate mast cells and basophils (2). Beyond an optimal antigen concentration, however, cell responses are dose-dependently inhibited, and they are abrogated in large excess of antigen (3). Inhibition results from a negative auto-regulation mechanism that depends on the Src-homology 2 (SH2) domain-containing inositol 5-phosphatase SHIP1 (4). Inhibition in excess of antigen was indeed abrogated in mast cells from SHIP1^{-/-} mice (5). Noticeably, Fc ϵ RI-dependent mast cell responses induced by sub-optimal and by optimal antigen concentrations were markedly enhanced in SHIP1^{-/-} mast cells (6). Fc ϵ RI therefore generates both positive signals that are negatively regulated by SHIP1, and negative signals that depend on SHIP1 and control positive signals.

How SHIP1 inhibits cell activation is well documented. SHIP1 hydrolyzes the 5-phosphate group in the inositol ring of phosphatidylinositol 3,4,5-tris-phosphate [PI(3,4,5)P₃] (4), generated by phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), preventing thus the recruitment of Pleckstrin Homology (PH) domain-containing molecules (7). SHIP1 also functions as an adapter. When tyrosyl-phosphorylated, it recruits the phosphotyrosine-binding (PTB) domain-containing adapter Dok-1 which recruits the SH2 domain-containing molecule RasGAP. RasGAP inhibits Ras activation and the subsequent activation of the MAP kinases Erk1/2 (8). As a consequence, cell responses are inhibited. Contrasting with this well-characterized mechanism of action, how SHIP1 is recruited by Fc ϵ RI is poorly known. Minute amounts of SHIP1 were found to co-precipitate with FcR β (9), one of the two ITAM-containing subunits of Fc ϵ RI. We identified two binding sites for the SH2 domain of SHIP1 in the trans-membrane adapter LAT1 and showed that SHIP1 co-precipitates with phosphorylated LAT1, but also in small amounts unless the antagonistic adapter NTAL (LAT2) was deleted (10). We also found that SHIP1 is constitutively associated with the actin-binding molecule Filamin-1 and that Fc ϵ RI associate with the actin cytoskeleton as receptor aggregation increases (11).

Unlike Fc ϵ RI, the inhibitory receptors Fc γ RIIB can recruit high amounts of SHIP1 through well-defined molecular interactions. Fc γ RIIB are single-chain low-affinity receptors for the Fc portion of IgG antibodies. They are expressed by numerous cells of hematopoietic origin and by some nonhematopoietic cells (reviewed in(12)). They can inhibit ligand-induced cell activation and proliferation triggered by ITAM-containing receptors (13) and proliferation triggered by growth factor Receptors with an intrinsic protein Tyrosine Kinase activity (RTK) (14). We found recently that Fc γ RIIB could also inhibit the ligand-independent proliferation of cells transformed as a consequence of the expression of an oncogenic form of RTK (Malbec and Daëron, Immunol. Let. 2012, in press). Inhibition depends on an Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif (ITIM) in the intracytoplasmic domain of Fc γ RIIB. It is induced when Fc γ RIIB are co-aggregated with activating receptors on the membrane of the same cell by a common extracellular ligand, such as immune complexes. Inhibition

does not occur when activating receptors and Fc γ RIIB are independently aggregated by separate ligands (15). Co-aggregation of the two receptors indeed enables the src family protein tyrosine kinase which phosphorylates ITAMs in activating receptors to phosphorylate the ITIM in Fc γ RIIB (16). The SH2 domain of SHIP1 has an affinity for the phosphorylated Fc γ RIIB ITIM, but not for those of most other ITIM-containing inhibitory receptors (17). The specificity of SHIP1 for Fc γ RIIB depends on a leucine residue at position Y+2 that is present in the Fc γ RIIB ITIM but not in other ITIMs (18). Once recruited in signaling complexes, SHIP1 is the effector of Fc γ RIIB-dependent negative regulation (19, 20). The inhibitory properties of Fc γ RIIB were indeed abrogated in SHIP1^{-/-} cells (21). Fc γ RIIB-dependent negative co-regulation therefore lies on the same SHIP1-mediated mechanism of inhibition as Fc ϵ RI auto-regulation (11).

Because co-aggregation is required for Fc γ RIIB to inhibit activating receptors, inhibition of responses triggered by activating receptors that were co-engaged with Fc γ RIIB only has been studied. Having noticed in previous works that not only BCR-dependent increase of PI(3,4,5)P3 was abrogated upon co-engagement of Fc γ RIIB with BCR, but that the global level of PI(3,4,5)P3 was reduced below resting state levels in murine B cells (22), we hypothesized that Fc γ RIIB might inhibit PI(3,4,5)P3-dependent signals triggered by activating receptors other than those with which they are co-engaged. We found that, when co-engaged with an activating receptor by IgG antibodies, Fc γ RIIB could inhibit IgE-induced activation signals and SCF-induced proliferation signals triggered in the same cells by Fc ϵ RI or Kit that were not co-engaged with Fc γ RIIB. This phenomenon, which we refer to as trans-inhibition, was observed in mouse mast cells, in mouse basophils and in human basophils where it lasted for several days. Trans-inhibition selectively involved and required SHIP1. As a consequence, trans-inhibition could be induced not only upon co-aggregation of Fc γ RIIB with Fc ϵ RI, but also upon super-aggregation of Fc ϵ RI in excess of antigen. Importantly, IgG immune complexes that co-engaged Fc γ RIIB with Kit could prevent both the in vitro and the in vivo growth of transformed tumor cells whose proliferation depends on a viral oncogene. Trans-inhibition is therefore a novel SHIP1-dependent regulatory mechanism, by which antibodies can anergize FcR-expressing hematopoietic cells.

Materiel and Methods

Cells. Mouse mast cells. Bone Marrow-derived Mast Cells (BMMC) were obtained by culturing mouse bone marrow cells in IL-3-containing medium as described in (23). RBL transfectants. RBL cells expressing murine Fc γ RIIB1 or a chimeric receptor made of the extracellular and transmembrane domains of Fc γ RIIB and the intracytoplasmic domain of KIR2DL3 were previously described (18). Mouse mastocytoma cells. MMC-1 cells (24) were a kind gift of Dr. Reuben Siraganian (NIH, Bethesda, MD). Mouse basophils. Mouse Bone Marrow cells were seeded at 5×10^5 cells/ml and cultured for 8 days in Opti-MEM supplemented with 10% FCS, 100 IU/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 50 mM β -mercaptoethanol and 1ng/ml mIL-3. After 24h of culture, adherent cells were discarded. Cells were split once during this period. Basophil-rich cultures were further enriched by depleting Kit⁺ cells using the CD117-Microbead kit and an AutoMACS (Miltenyi) according to the manufacturer's instructions. The purity of basophils thus obtained was generally 90%. Human basophils. Whole blood from normal donors collected on ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) was obtained from the Etablissement Français du Sang (EFS, Paris, France) in accordance with a convention between Institut Pasteur and EFS. This study was approved by the Comité de Protection des Personnes (CPP, Ile de France) and the Ministère de l'Education Nationale de la Recherche et de Technologie (Déclaration collective 2008-68). All donors provided written informed consent for the collection of samples and subsequent analysis. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation.

Reagents. The rat anti-mouse mAb Kit ACK-2 (25) and the rat anti-mouse Fc γ RIIB/IIIA mAb 2.4G2 (26) were affinity-purified on Proteine G-sepharose. DNP-BSA and TNP-BSA-Biotin were prepared as described. Glutathion S-transferase (GST)-SCF was produced in E. Coli and affinity-purified on Glutathion-agarose. DNP-HSA was purchased from SIGMA. Mouse IgG anti-rat Ig (MAR IgG) and corresponding F(ab')₂ fragments [MAR Fab']₂, Rabbit IgG a-human IgE (RAHE), Fluorescein isithiocyanate (FITC)-conjugated Rat anti-mouse IgE antibodies and FITC-conjugated Mouse anti-rat Ig antibodies were from Jackson Immunoresearch (); Phycoerythrine (PE)-conjugated anti-CD203c antibodies from Beckman Coulter (); Allophycocyanin (APC)-conjugated anti-human Fc ϵ R1 α antibodies from E-Bioscience (); Rabbit anti-GST antibodies, Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit antibodies, normal mouse IgG and mouse anti-pPLC γ -1 antibodies from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); Rabbit anti-Akt, pAkt, pSyk, pGab2, pNF- κ B, pp38 MAPK, pp44/42 MAPK and pJNK antibodies from Cell Signaling Technology (Beverly, MA); rabbit anti-pLAT antibodies from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY).

Mast cell activation. BMMC were sensitized by an overnight incubation at 37°C with 0.1 μ g/ml mouse IgE anti-DNP 2682-I (27) and 3 μ g/ml rat IgE IR162 (28) and challenged for various periods of times with the indicated concentrations of ligands. β -hexosaminidase was quantitated in 10-min supernatants using an enzymatic assay (ref.). LTC-4 and MIP1- α were titrated in 30-min supernatants by ELISA (Neogen and

R&D systems respectively). TNF- α was titrated in 3-h supernatants by an ELISA (R&D systems).

Systemic Anaphylaxis. 6-8-week old C57BL/6J mice (Charles River) were injected i.v. with supernatants from BMMC sensitized with mouse IgE 2682-I anti-DNP and rat IgE IR162, harvested 10 min after challenge with indicated ligands. Alternatively, C57BL/6J mice were injected i.v. with 4×10^6 BMMC sensitized with mouse IgE 2682-I anti-DNP and rat IgE IR162 and incubated with MAR IgG for 10 min. Mice were challenged by an i.v. injection of 500 μ g DNP-BSA 15 min later. Rectal temperature was monitored using a Precision Digital Thermometer 4600 (YSI, Dayton, Ohio, USA).

Calcium mobilization. BMMC sensitized with mouse IgE 2682-I anti-DNP and rat IgE IR162 were loaded with 0.5 μ M Fluo-3-AM (Invitrogen, Carlsbad, CA) for 1h at room temperature, and analyzed by flow cytometry (Becton Dickinson) before and after stimulation with indicated ligands.

Western blot analysis. BMMC sensitized with mouse IgE 2682-I anti-DNP and rat IgE IR162 were challenged with 10 ng/ml DNP-BSA, 15 μ g/ml MAR IgG or both for 1, 3 or 10 min, lysed in SDS at 95°C, fractionated by SDS-PAGE and Western blotted with indicated antibodies. HRP was detected using an ECL kit (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

PI(3,4,5)P3 measurement. BMMC sensitized with mouse IgE 2682-I anti-DNP and rat IgE IR162 were labeled with 32 P in phosphate-free medium before they were challenged for 10 min with DNP-HSA, MAR IgG or both. Lipids were extracted, separated by thin-layer chromatography and analyzed by HPLC.

Confocal microscopy. BMMC sensitized with mouse IgE 2682-I anti-DNP and rat IgE IR162 were stimulated for 10 min with the indicated ligands or without, plated onto poly-L-lysine-coated cover slips, fixed in paraformaldehyde for 15 min, and treated with 50 mM NH₄Cl in PBS for 10 min to quench aldehyde groups. Cover slips were washed, incubated for 15 min with 1% BSA and 0.05% saponin in PBS and examined under a Zeiss LSM 510 confocal microscope (Carl Zeiss) with a 63X objective. Z-stacks optical sections were acquired at 0.2 μ m depth increments, both green and red laser excitation were intercalated to minimize cross-talk between the acquired fluorescence channels. Complete image stack deconvolution was performed with Huygens Essential (version 3.0, Scientific Volume Imaging), and 2D images were generated from a maximum intensity projection over a 3D volume cut of 1 μ m depth centered either on the intracellular compartment when visible or on the cell center. Determination of the 3D colocalization between the different signaling molecules intracellular compartments was performed through the Imaris (Bitplane) software on the region of interest (intracellular compartment). Threshold settings were first estimated in order to minimize the inclusion of unspecific fluorescence background signal from the sample and then kept constant throughout the multiple datasets analysis. Data was collected using identical acquisition parameters in order to avoid hardware-induced signal variations. Statistical analysis was performed by Mann–Whitney non-parametric test using the Prism software (Graphpad).

Proliferation assays. ³H-thymidine incorporation: MMC-1 preincubated or not with 2.4G2 were challenged for 10 min at 37°C with preformed immune complexes made of GST-SCF and Rabbit a-GST antibodies. Cells were seeded at 10⁵ cells/ml and cultured for 4 days. ³H-thymidine was added, and cell-associated radioactivity was measured 18h later. CFSE dilution assay: MMC-1 were labeled with CFSE for 10 min at room temperature, preincubated with 2.4G2 or without and challenged with immune complexes made of GST-SCF and Rabbit a-GST for 10 min. Cells were cultured at 10⁵ cells/ml for the indicated periods of time. Fluorescence was analyzed by flow cytometry using a FACScalibur.

Human basophil stimulation. Human PBMC (10⁶ cells/ml in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 1% sodium pyruvate, 1% non-essential amino acids, 1% hepes buffer and 1% penicillin-streptomycin) were incubated overnight at 37°C with 3 µg/ml rat IgE IR162 or without. Nonsensitized PBMC were challenged with Rabbit anti-human IgE (RAHE) for 30 min at 37°C. PBMC sensitized with rat IgE were challenged with RAHE and MAR. Cells were stained with PE-conjugated anti-CD203c and APC-conjugated anti-FcεRIα.

Results

Fc γ RIIB can inhibit mouse mast cell responses triggered by Fc ϵ RI other than those with which they are co-aggregated.

To investigate whether Fc γ RIIB-dependent negative regulation is restricted or not to activation signals triggered within the same signaling complex by ITAM-containing receptors, we devised a simple experimental system, in which mouse mast cells could be stimulated by engaging separately two independent sets of Fc ϵ RI. BMMC from Fc γ RIIIA^{-/-} mice were sensitized with mouse IgE anti-DNP (mAb 2682-I), with rat IgE (myeloma IR162), or with a mixture of both. DNP-BSA activated cells sensitized with 2682-I, as judged by the release of β -hexosaminidase, but not cells sensitized with IR162. Conversely, F(ab')₂ fragments of polyclonal mouse antibodies anti-rat Ig [MAR F(ab')₂] activated cells sensitized with IR162, but not cells sensitized with 2682-I (Fig. S1A). Either DNP-BSA or MAR F(ab')₂, however, activated doubly sensitized cells (Fig. S1B). DNP-BSA and MAR F(ab')₂ therefore specifically engage Fc ϵ RI-bound 2682-I and Fc ϵ RI-bound IR162, respectively, i.e. two independent sets of Fc ϵ RI that activate similarly mast cells, but do not interact with each other.

Unlike MAR F(ab')₂, and as expected, intact MAR IgG failed to activate doubly sensitized Fc γ RIIIA^{-/-} BMMC (Fig. 1A). These cells indeed express Fc γ RIIB whose co-aggregation with Fc ϵ RI by intact MAR IgG inhibited IgE-induced signaling. Noticeably, MAR IgG dose-dependently inhibited also DNP-BSA-induced activation of the same cells (Fig. 1B). Neither normal mouse IgG (Fig. 1C), nor MAR F(ab')₂ (Fig. 1D) did. Inhibition was abrogated in BMMC lacking Fc γ RIIB (Fc γ RIIIA^{-/-} Fc γ RIIB^{-/-}), and, importantly, it was as efficient in wt BMMC (Fc γ RIIIA^{+/+} Fc γ RIIB^{+/+}) as in Fc γ RIIIA^{-/-} BMMC (Fig. 1E). MAR IgG similarly inhibited antigen-induced β -hexosaminidase release in Fc γ RIIIA^{-/-} BMMC doubly sensitized with IR162 and with another mouse IgE anti-DNP (mAb C48) (Fig. 1F) or a mouse IgE anti-ovalbumin (mAb 2C6) (Fig. 1G).

Inhibition induced in BMMC under these conditions affected the release of β -hexosaminidase and of another granular mediator, histamine. It also affected, albeit to a lesser degree, the secretion of the lipid mediator LTC₄, of the chemokine MIP1- α , and of the cytokine TNF- α (Fig. 2A). Importantly, the release and/or secretion of all mediators that account for systemic anaphylaxis were inhibited, as judged by monitoring the rectal temperature of C57BL/6 mice injected i.v. with supernatants from in vitro activated BMMC (Fig. 2B). Likewise, adoptive systemic anaphylaxis induced by an i.v. injection of DNP-BSA in C57BL/6 mice previously injected i.v. with doubly sensitized Fc γ RIIIA^{-/-} BMMC, was abrogated if MAR IgG were added to cells 10 min before they were injected (Fig. 2C).

These data demonstrate that Fc γ RIIB can inhibit not only mast cell responses triggered by Fc ϵ RI with which they are co-aggregated by the same ligand. They can inhibit also mast cell responses and their in vivo consequences triggered simultaneously by Fc ϵ RI that are independently aggregated by unrelated antigens, via receptor-bound IgE having different specificities. Inhibition of responses triggered by receptors that are not co-aggregated with Fc γ RIIB will be referred to as "trans-

inhibition" whereas inhibition of responses triggered by receptors that co-aggregated with Fc γ R1IB will be referred to as "cis-inhibition".

Trans-inhibition involves and requires the lipid phosphatase SHIP1.

In a first approach of the mechanism of trans-inhibition, doubly sensitized Fc γ R1IIIA^{-/-} BMMC were challenged with a mixture of either MAR IgG and DNP-BSA or MAR IgG and PMA+ionomycin. MAR IgG inhibited antigen-induced, but not PMA+ionomycin-induced mast cell activation (Fig. 3A). Also, antigen-induced Ca²⁺ mobilization observed in doubly sensitized BMMC was decreased in cells challenged with DNP-BSA and MAR IgG, but not in cells challenged with DNP-BSA and MAR F(ab')₂ (Fig. 3B). Antigen-induced tyrosyl-phosphorylation of intracellular proteins was, however, not affected by MAR IgG (Fig. 3C). Trans-inhibition therefore does not prevent Fc ϵ RI from activating tyrosine kinases that phosphorylate intracellular proteins, but affects signaling events that stand upstream of Ca²⁺ mobilization.

We therefore investigated the inducible phosphorylation of key signaling molecules of the Lyn- and Fyn-dependent pathways that are known to be launched upon Fc ϵ RI engagement (29), in cell lysates from doubly sensitized Fc γ R1IIIA^{-/-} BMMC. Syk, LAT, Gab2 and PLC γ -1 were not less phosphorylated in cells challenged with a mixture of DNP-BSA and MAR IgG than in cells challenged with DNP-BSA alone. Akt, Erk1/2, JNK, p38 and NF- κ B, however, were less phosphorylated (Fig. 3D). MAR IgG therefore decreased antigen-induced distal, but not proximal signaling events (Fig. S2), some of which, like Syk and PLC γ -1 phosphorylation, were rather enhanced.

One such event, SHIP1 phosphorylation, was markedly enhanced in cells challenged with MAR IgG, whether with DNP-BSA or without, compared to DNP-BSA alone (Fig. 4A). SHIP1 phosphorylation is a consequence of its recruitment into signalosomes where Lyn is activated (30). We therefore investigated the contribution of this phosphatase in trans-inhibition. As expected (21), DNP-BSA-induced β -hexosaminidase release was enhanced in doubly sensitized BMMC from SHIP1^{-/-} mice, compared to BMMC from wt mice. Not only trans-inhibition observed in wt BMMC was abrogated in SHIP1^{-/-} BMMC, but β -hexosaminidase release induced by a mixture of DNP-BSA and MAR IgG was dramatically increased (Fig. 4B). Likewise, instead of being decreased as in wt BMMC, the phosphorylation of Akt, Erk1/2, JNK, p38 and NF- κ B induced by DNP-BSA and MAR IgG was markedly increased in SHIP1^{-/-} BMMC (Fig. 4C). Trans-inhibition therefore involves and depends on SHIP1.

SHIP1 hydrolyzes 5-phosphate in 3-phosphorylated phosphatidylinositides (4). Its main substrate is PI(3,4,5)P3 that mediates the membrane recruitment of PH domain-containing signaling molecules such as Akt (31). We therefore measured PI(3,4,5)P3 in doubly sensitized BMMC challenged as above or not challenged. As expected, the concentration of PI(3,4,5)P3 increased in cells challenged with DNP-BSA, but not in cells challenged with MAR IgG. DNP-BSA-induced PI(3,4,5)P3 increase was prevented if cells were challenged with a mixture of DNP-BSA and MAR IgG (Fig. 4D). Trans-inhibition is therefore associated with an inhibition of the increased PI(3,4,5)P3 concentration induced upon Fc ϵ RI aggregation.

We next wondered whether trans-inhibition could be induced by co-aggregating Fc ϵ RI with inhibitory receptors that recruit the tyrosine phosphatases SHP-1/2 instead of SHIP1. To this aim, we used stable RBL-2H3 transfectants that express either a murine Fc γ RIIB or a chimeric molecule made of the extracellular and transmembrane domains of murine Fc γ RIIB and the intracytoplasmic domain of KIR2DL3 (Fc γ RIIB-KIRL). These cells enabled us to demonstrate earlier that Fc γ RIIB recruit SHIP1, whereas KIRL recruit SHP-1 (18). As expected, both recombinant molecules inhibited Fc ϵ RI signaling as MAR IgG activated non-transfected cells doubly sensitized with 2682-I and IR162, but neither Fc γ RIIB- nor Fc γ RIIB-KIRL-expressing transfectants (Fig. 4E). Antigen-induced β -hexosaminidase release was however reduced in cells expressing Fc γ RIIB, but not in cells expressing Fc γ RIIB-KIRL, when DNP-BSA was mixed with MAR IgG (Fig. 4F). Trans-inhibition was therefore not induced by inhibitory receptors that recruit SHP-1.

Another SHIP1-dependent phenomenon is inhibition of IgE-dependent mast cell activation in excess of antigen (5). We therefore investigated whether supra-optimal concentrations of antigen could induce trans-inhibition. As expected, BMMC doubly sensitized with 2682-I and IR162, which released β -hexosaminidase when challenged with MAR F(ab')₂, did not when challenged with a high concentration (10 μ g/ml) of DNP-BSA. MAR F(ab')₂-induced β -hexosaminidase release was markedly reduced when cells were simultaneously challenged with 10 μ g/ml DNP-BSA (Fig. 4G). A super-aggregation of Fc ϵ RI can therefore replace the co-aggregation of Fc ϵ RI with Fc γ RIIB to induce trans-inhibition.

This set of data altogether demonstrate that, whereas either tyrosine or lipid phosphatases can be the effectors of cis-inhibition, depending on the inhibitory receptor, the lipid phosphatase SHIP1 is the effector of trans-inhibition and it cannot be replaced by the tyrosine phosphatases SHP-1/2. Trans-inhibition, however, does not depend on a specific receptor. It can even be induced by ITAM-containing receptors when hyper-aggregated by an excess of ligand, i.e. upon SHIP1-dependent negative auto-regulation.

Activating signalosomes and inhibitory signalosomes are rapidly and independently internalized, but they can meet in endosomes.

As inhibition requires that activating and Fc γ RIIB be co-aggregated by the same ligand (15), activation and inhibition signals are triggered simultaneously and they are integrated in the same signalosomes during cis-inhibition. Trans-inhibition involves the constitution of the same signalosomes as cis-inhibition, but inhibitory signals generated in these signalosomes affect also activation signals generated in distinct signalosomes formed beneath independently aggregated activating receptors. Differing from cis-inhibition, trans-inhibition therefore enables one to investigate spatio-temporal relationships between inhibitory and activating signalosomes. Indeed, DNP-BSA induced the internalization of 2682-I, but not of IR162, in doubly sensitized BMMC, MAR F(ab')₂ or IgG induced the internalization of IR162, but not of 2682-I, and a mixture of DNP-BSA and MAR IgG induced the internalization of both IgE, (Fig. 5A). When engaged by different ligands via IgE with different specificities, Fc ϵ RI are therefore internalized independently.

On the basis of this observation, we exposed doubly sensitized mast cells to MAR IgG and DNP-BSA at different times. We found that trans-inhibition persisted if DNP-BSA challenge was delayed for 20-30 min after the addition of MAR IgG (Fig. 5B). Inhibition observed under these conditions was not due to a decreased accessibility of IgE antibodies for antigen on the cell surface, due to MAR IgG-induced internalization of Fc ϵ RI. Indeed, similar amounts of TNP-BSA bound to doubly sensitized mast cells, whether they were previously exposed to MAR IgG or not (Fig. 5C). MAR IgG therefore does not remove 2682-I from the cell surface and does not prevent DNP-BSA from binding to cell-bound 2682-I. These data indicate that inhibitory signalosomes can form and get internalized before activating signalosomes are formed. Noticeably, trans-inhibition was transient. It started to decline after 1 hr (Fig. 5B), and was abrogated after a few hours (Fig. 5D). It is therefore rapidly reversible in BMMC.

The effect of trans-inhibition on PI(3,4,5)P3 can be explained if SHIP1, recruited in inhibitory signalosomes can reach PI(3,4,5)P3 generated in activating signalosomes. We explored this hypothesis by confocal microscopy. Fc γ RIIIA^{-/-} BMMC were doubly sensitized with Alexa 488-labeled 2682-I and Cyan 5-labeled IR162. IgE concentrations used, which corresponded to concentrations used for β -hexosaminidase release, were too low for IgE to be visible by confocal microscopy on the membrane of non-challenged cells. IgE aggregates, which were rapidly endocytosed upon challenge, became however visible as small intracellular patches. As expected, DNP-BSA induced the endocytosis of 2682-I, but not of IR162, whereas MAR IgG induced the endocytosis of IR162, but not of 2682-I (Fig. 5E). When endocytosed upon challenge with a mixture of DNP-BSA and MAR IgG, both IgE colocalized in the same endosomes (Fig. 5E&F, Supplementary video). Although they are internalized independently, activating receptor complexes can therefore meet with inhibitory receptor complexes in endosomes.

Trans-inhibition can affect Kit-dependent mast cell proliferation and prevent the *in vitro* and the *in vivo* growth of transformed cells whose proliferation depends on a viral oncogene.

As cis-inhibition could be observed when Fc γ RIIB were co-aggregated with Kit (14), we investigated whether trans-inhibition could be induced under these conditions. Indeed, antigen-induced β -hexosaminidase release was dose-dependently inhibited when BMMC sensitized with 2682-I were challenged with a mixture of DNP-BSA and increasing concentrations of IgG immune complexes made with biotinylated anti-Kit (mAb ACK2) and anti-biotin antibodies (Fig. 6A). Trans-inhibition can therefore be induced when co-engaging Fc γ RIIB with a growth factor receptor and affect cell activation induced by Fc ϵ RI.

By decreasing the concentration of PI(3,4,5)P3, trans-inhibition can possibly inhibit biological responses triggered not only by Fc ϵ RI, but also by other receptors that activate PI3K. Kit is one such receptor and, indeed, SCF-induced cell proliferation is inhibited by SHIP1 (21). We therefore investigated whether trans-inhibition would affect proliferation signals generated by Kit. Indeed, the SCF-induced proliferation of BMMC sensitized with IR162 was decreased if cells were exposed to MAR IgG (Fig.

6B). Trans-inhibition can therefore affect not only antibody-induced cell activation, but also growth factor-induced cell proliferation.

MMC-1 are transformed mouse mastocytoma cells (24) that proliferate in the absence of added growth factor. They express the SCF receptor Kit as shown by the binding of the anti-Kit mAb ACK2 or of a GST-SCF fusion protein (Fig. S3). We unexpectedly found that their proliferation is not due to a Kit mutation but to the expression of a constitutively phosphorylated v-Abl oncogene (Fig. 6C). Indeed, Kit bears no mutation in MMC-1 cells (data not shown), and both v-Abl phosphorylation (Fig. 6C) and cell proliferation (Fig. S4) were inhibited by the Abl+RTK inhibitor STI571 (Imatinib or Gleevec®) (32), but not by similar concentrations of the RTK inhibitor SU11248 (Sunitinib) (33). The growth factor-independent proliferation of MMC-1 therefore does not result from a gain-of-function mutation of Kit, as in other mastocytomas cells (34), but from the expression of an oncogenic v-Abl protein.

MMC-1 cells express not only Kit, but also Fc γ RIIB and Fc γ RIIIA (Fig. S3). MMC-1 proliferation was dose-dependently inhibited when co-aggregating Fc γ R (IIB+IIIA) and Kit using GST-SCF-anti-GST immune complexes, and inhibition was prevented by the anti-Fc γ RIIB/IIIA mAb 2.4G2. Similar results were observed when assessing cell proliferation by measuring thymidine incorporation (Fig. 6D), by counting cell numbers (not shown) or by monitoring CFSE dilution (Fig. 6E). As judged by CFSE dilution, proliferation was inhibited by 90% at day 5 of culture (Fig. 6F). Trans-inhibition can therefore affect the proliferation of transformed cells that express an oncogene.

MMC-1 cells formed tumors when injected s.c. into immuno-incompetent mice. Tumor growth was prevented or markedly inhibited if MMC-1 cells were incubated for 15 min with GST-SCF-anti-GST immune complexes before they were injected. Similar results were observed in Nude, Rag-deficient or Rag/FcR γ -doubly deficient mice (Fig. 6G), excluding antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity or other immune rejection mechanisms as the possible causes of tumor growth inhibition. Trans-inhibition can therefore inhibit tumor growth in vivo.

Trans-inhibition could therefore affect both the growth factor-induced in vitro proliferation of BMMC, the growth factor-independent in vitro proliferation of MMC-1 cells and the in vivo growth of MMC-1 tumors.

Trans-inhibition operates in mouse and human basophils and it is long-lasting in human basophils.

When sensitized with IR162 and challenged with MAR F(ab')₂, purified bone marrow-derived basophils (BMB) from wt mice secreted IL-4, but not when challenged with equimolar concentrations of MAR IgG. Rat IgE-sensitized BMB from Fc γ RIIB^{-/-} mice, however, secreted comparable amounts of IL-4, whether challenged with MAR F(ab')₂ or IgG (Fig. S5A). Cis-inhibition therefore operates in mouse basophils. BMB doubly sensitized with 2682-I and IR162 also secreted IL-4 when challenged with DNP-BSA, and BMB from Fc γ RIIB^{-/-} mice responded similarly as BMB from wt mice. IL-4 secretion by wt BMB was of a lower magnitude when DNP-BSA was mixed with

MAR IgG. It was not lower, but markedly increased in $Fc\gamma RIIB^{-/-}$ BMB (Fig. 7A). Trans-inhibition therefore operates in mouse basophils as in mouse mast cells.

Human basophils express $Fc\epsilon RI$, a fraction of which are occupied with human IgE. They could be activated by $F(ab')_2$ fragments of rabbit anti-human IgE (RAHE), as judged by CD203c upregulation (35). They could also be activated with MAR $F(ab')_2$, when sensitized with IR162. Rat IgE indeed bind to human $Fc\epsilon RI$ with a high affinity (36). CD203c upregulation was however markedly lower when IR162-sensitized basophils were challenged with MAR IgG (Fig. S5B). Cis-inhibition can therefore be induced by $Fc\gamma R$ in human basophils. Noticeably, however, MAR IgG also inhibited CD203c upregulation induced by RAHE $F(ab')_2$ in basophils sensitized with IR162. Conversely, RAHE IgG inhibited CD203c upregulation induced by MAR $F(ab')_2$ in the same cells (Fig. 7B). Likewise, IR162-sensitized basophils released less histamine when challenged with a mixture of MAR IgG and RAHE $F(ab')_2$ than when challenged with RAHE $F(ab')_2$ only (Fig. 7C). Trans-inhibition therefore operates in human basophils. Noticeably, trans-inhibition was still observed if IR162-sensitized basophils were challenged with RAHE $F(ab')_2$ up to 72h hours after they were incubated with MAR IgG (Fig. 7D). Trans-inhibition therefore operates and is long-lasting in human basophils.

Finally, we investigated whether cis-inhibition could be induced by aggregating human basophil $Fc\epsilon RI$ with a supra-optimal concentration of ligand. Indeed, CD203c upregulation induced upon challenge of IR162-sensitized basophils with increasing concentrations of MAR $F(ab')_2$ displayed a bell-shape curve. This phenomenon was shown to depend on SHIP (37). The dose-dependent CD203c upregulation induced by RAHE $F(ab')_2$ in IR162-sensitized basophils was abrogated by a supra-optimal concentration of MAR $F(ab')_2$ (Fig. 7E). Trans-inhibition can therefore be induced independently of $Fc\gamma RIIB$ in human basophils.

These data altogether demonstrate that trans-inhibition can be induced in human basophils under the same conditions as in mouse mast cells. It however lasts much longer in human basophils.

Discussion

We describe here a novel regulatory mechanism by which FcR can control ligand-dependent and -independent cell activation and proliferation. This mechanism is susceptible to affect a wide array of biological responses in hematopoietic cells, whether physiological or pathological. It can possibly be exploited as a new therapeutic tool in a variety of diseases, including allergy and cancer.

The biological activity of hematopoietic cells is positively and negatively regulated by membrane receptors. Negative regulation can be induced either by the same receptors that generate activation signals (auto-regulation) or by ITIM-containing inhibitory receptors that are co-engaged with activating receptors (co-regulation). When phosphorylated, ITIM-containing receptors recruit SH2 domain-containing phosphatases (reviewed in (38)). Four such phosphatases have been described: the two-SH2 tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2, and the single-SH2 inositol phosphatases SHIP1 and SHIP2. SHP-1 and SHIP1 are expressed in hematopoietic cells only, whereas SHP-2 and SHIP2 are ubiquitous. The overwhelming majority of ITIM-containing receptors, such as KIR2DL3, contain two ITIM or more, and they recruit SHP-1/2. Few inhibitory receptors, such as Fc γ RIIB, contain one ITIM only, and they recruit SHIP1/2. Both types of inhibitory receptors require to be co-engaged with activating receptors to inhibit, but for different reasons. Aggregation is sufficient for KIRL to be phosphorylated and to recruit SHP-1/2. Co-aggregation enables them to bring tyrosine phosphatases close to proteins that are tyrosyl-phosphorylated in signalosomes generated by activating receptors, and to dephosphorylate them. Fc γ RIIB need to be co-aggregated with activating receptors in order to be phosphorylated and to recruit SHIP1/2. These phosphatidylinositol 5-phosphatases can thus hydrolyze PI(3,4,5)P3 that is generated by PI3K in the same signalosome. In both cases, ITIM-containing receptors "cis-inhibit" signals generated by activating receptors in the signalosomes where they are recruited. We show here that, when recruited into signalosomes, SHIP1 can "trans-inhibit" activation signals generated in other signalosomes (Fig. 8).

Trans-inhibition was unraveled by co-engaging Fc γ RIIB with Fc ϵ RI sensitized with one IgE and by examining responses induced by aggregating Fc ϵ RI sensitized with another IgE in the same cells. For this demonstration, Fc γ RIIB were co-engaged with Fc ϵ RI using IgG anti-Ig antibodies that bound to Fc ϵ RI-bound IgE via their Fab portions and to Fc γ RIIB via their Fc portion. This experimental setting has been extensively used to investigate Fc γ RIIB-dependent negative regulation of BCR signaling in B cells (39). Trans-inhibition was observed in BMMC from Fc γ RIIIA-deficient mice or from wt mice, but not from Fc γ RIIB-deficient mice. It was induced neither by F(ab')₂ fragments of IgG anti-Ig antibodies nor by intact normal IgG. It did not depend on the specificity of IgE antibodies used to co-engage Fc γ RIIB with Fc ϵ RI and to aggregate Fc ϵ RI, provided that cells were sensitized with the two IgE antibodies. Trans-inhibition could be induced also by co-engaging Fc γ RIIB with Kit and, under this condition, it affected mast cell activation triggered by aggregating Fc ϵ RI with IgE and antigen. Noticeably, trans-inhibition was observed also when hyper-aggregating Fc ϵ RI. Indeed, when doubly sensitized BMMC were challenged with a supra-optimal concentration of ligand recognized by one IgE, they failed to

respond to an optimal concentration of ligand recognized by the other IgE. Fc ϵ RI hyper-aggregation could therefore replace the co-aggregation of Fc ϵ RI with Fc γ RIIB and induce trans-inhibition. Trans-inhibition was, however, not induced by co-engaging Fc ϵ RI with Fc γ RIIB whose intracytoplasmic domain was replaced by that of a KIRL, although this chimeric receptor efficiently cis-inhibited Fc ϵ RI signaling in the same cells. We previously demonstrated that intact Fc γ RIIB recruited SHIP1, whereas the Fc γ RIIB-KIRL chimera recruited SHP-1 in these cells (18). One common feature of receptors capable of inducing trans-inhibition is that they use SHIP1/2 for cis-inhibition.

Trans-inhibition is indeed a property of the lipid phosphatase SHIP1. SHIP1 was heavily tyrosyl-phosphorylated in cells submitted to trans-inhibition, indicating that it was recruited in signalosomes where it became a substrate of the src kinase Lyn (30). There, it could hydrolyse PI(3,4,5)P3, generated as a result of PI3K activation (4). Indeed, the amount of antigen-induced PI(3,4,5)P3 was markedly reduced in cells undergoing either cis- or trans-inhibition. PI(3,4,5)P3 is critical for the recruitment and activation of Akt, Btk, PLC- γ 1, and Vav that contain a PH domain (7). Indeed, PI(3,4,5)P3-dependent phosphorylation of PH domain-containing molecules and their consequences such as Ca²⁺ responses were markedly reduced. SHIP1 is constitutively active and phosphorylation does not affect its catalytic activity. When its C-terminal tyrosines are phosphorylated, SHIP1, however acquires the properties of an adapter molecule that sequentially recruits Dok-1 and RasGAP, which inhibits Ras (8). Indeed, a distal consequence of Ras activation such as Erk1/2 phosphorylation was also reduced. Like cis-inhibition (21), trans-inhibition was abrogated in mast cells from SHIP1-deficient mice, which, instead, released massive amounts of granular mediators. Accordingly, the antigen-induced phosphorylation of Akt, NF- κ B, Erk1/2, JNK and p38 was enhanced in SHIP1-deficient mast cells and, instead of being reduced as in wt cells, it remained enhanced when cells were submitted to cis- or trans-inhibition. SHIP1 is therefore the effector of trans-inhibition, and it affects the same signals as in cis-inhibition.

The mechanism of cis-inhibition is easily explained by the recruitment of SHIP1 in the same signalosome where PI(3,4,5)P3 is generated and Ras activated. How can SHIP1 account for trans-inhibition is less clear. Indeed, activating signalosomes subjected to trans-inhibition are distinct from inhibitory signalosomes where SHIP1 is recruited. This implies either that PI(3,4,5)P3 can diffuse from activating signalosomes where it was generated, and meet SHIP1 in inhibitory signalosomes, or that SHIP1 can leave inhibitory signalosomes where it was recruited, and meet PI(3,4,5)P3 in activating signalosomes. Evidence that PI(3,4,5)P3 can diffuse in the membrane was provided in T cells. This phospholipid is generated in plasma membranes at the leading edge of immunological synapses where PI3K is activated. Increased amounts of PI(3,4,5)P3 were however observed not only within but also outside immunological synapses (40). Supporting this mechanism, inhibition of antigen-induced PI(3,4,5)P3 generation could be observed when measuring the total amount of this phospholipid in cells subjected to trans-inhibition. The PI(3,4,5)P3 level, however, did not decrease below basal levels as it was observed in B cells (22). Evidence that SHIP1 can relocalize after it has been recruited was provided in anergic B cells whose BCR was chronically engaged. SHIP1 can be recruited via its SH2 domain by Ig α / β ITAMs that are mono-phosphorylated in these cells, thus enabling its C-terminal tyrosines to be phosphorylated by Lyn. Dok-1, translocated to

the plasma membrane via its PH domain by a PI3K-dependent mechanism, is recruited by phosphorylated SHIP1 via its PTB domain and phosphorylated. When phosphorylated, SHIP1 and Dok-1 can form bidentate complexes through the interactions of the Dok-1 PTB domain with phosphorylated SHIP1 tyrosines, and of the SHIP1 SH2 domain with phosphorylated Dok-1 tyrosines (41). Similar phosphorylated SHIP-1/Dok-1 complexes were described in B cells, following the coaggregation of BCR with Fc γ RIIB (8). Such complexes can leave Fc γ RIIB, and Dok-1 can possibly target SHIP1 to other PI(3,4,5)P₃-rich membrane areas via its PH domain. Supporting this possibility, trans-inhibition could be observed when activating signalosomes were formed several hours after inhibitory signalosomes. This finding suggests that effectors of trans-inhibition, such as Dok-1-SHIP-1 complexes could leave inhibitory signalosomes, once they were formed and persist for hours. The translocation of Dok-1-SHIP1 complexes from inhibitory signalosomes to activating signalosomes remains, however, to be demonstrated. Besides these molecular mechanisms, cellular mechanism can contribute to trans-inhibition. Fc ϵ RI are rapidly internalized when engaged by multivalent ligands. Fc ϵ RI internalize independently of each others as shown with IgE labeled with different fluorochromes and, noticeably, internalization was not prevented when Fc ϵ RI were co-aggregated with Fc γ RIIB. Endosomes containing different Fc ϵ RI-bound IgE, however, rapidly merged intracellularly. Whether this enables inhibitory signalosomes to meet activating signalosomes is a possibility that needs to be demonstrated.

Trans-inhibition could affect Fc ϵ RI-dependent mast cell activation and it decreased the release of all granular mediators and the secretion of all secretory products tested, although to variable degrees. Importantly, all mediators that contribute to systemic anaphylaxis were inhibited as shown by the passive administration of mast cell supernatant to normal mice and by the adoptive transfer of IgE-sensitized mast cells followed by antigen challenge. Trans-inhibition was not restricted to one cell type as it affected Fc ϵ RI-dependent mouse and human basophil activation. Not surprisingly, trans-inhibition also affected SCF-induced Kit-dependent mast cell proliferation. Indeed, we found previously that SHIP1 was necessary and sufficient for dampening Kit signaling in mast cells subjected to cis-inhibition (21). RTK-dependent cell proliferation involves the activation of PI3K, and it depends on MAP kinases that control the transcription of cyclin genes (42). We recently reported that Fc γ RIIB-dependent cis-inhibition could affect ligand-independent proliferation in cells transformed as a result of the expression of a constitutively active form of Kit (Malbec and Daëron, *Immunol. Let.* 2012, in press). We show here that Fc γ RIIB-dependent trans-inhibition can also affect the constitutive proliferation of mastocytoma cells transformed as the result of the expression of an oncogene. We indeed found that MMC-1 cells express v-Abl, that this oncogene is constitutively phosphorylated, and that both cell proliferation and v-Abl phosphorylation could be inhibited by an Abl-specific tyrosine kinase inhibitor used in Chronic Myeloid Leukemia (32), but not by a multi-targeted RTK inhibitor (33). Trans-inhibition was induced by co-aggregating Fc γ R (IIB+IIIA) with Kit, which bears no mutation in MMC-1 cells, using GST-SCF-anti-GST IgG immune complexes. It could be observed not only in vitro, by assessing thymidine incorporation, cell numbers or CFSE dilution, but also in vivo, by assessing tumor growth in Nu/Nu, Rag^{-/-}, and RAG^{-/-} FcR γ ^{-/-} mice, i.e. immunodeficient mice unable to mount an immune response or to develop ADCC against tumor cells.

In conclusion, trans-inhibition is a novel regulatory mechanism that can generate an anergic state, preventing cells from responding to extracellular or intracellular activation and proliferation signals. By markedly broadening the field of application and biological significance of Fc γ RIIB-dependent negative regulation, trans-inhibition endows IgG antibodies with previously unsuspected regulatory properties. By extending negative regulation to ITAM-containing activating receptors, it endows all antibodies with such properties. Whether trans-inhibition could affect cell activation, cell proliferation, or other biological responses in physiopathology is a likely but not validated possibility. One can indeed anticipate that it can be induced when enough SHIP1 is recruited into signalosomes, whether by activating receptors during auto-inhibition or by inhibitory receptors during co-inhibition, and that it can affect responses that depend on PI(3,4,5)P3 and/or Ras activation. Numerous receptors that control the activation and/or proliferation of hematopoietic cells in ontogeny or during immune responses activate PI3K and/or Ras. Trans-inhibition also provides the theoretical grounds for novel therapeutic approaches not only of inflammatory diseases, such as allergies, but perhaps also, of some proliferative diseases. Our results in human basophils suggest that trans-inhibition, which could be induced by a variety of means, might be exploited as a “universal” desensitization that would render basophils from allergic patients non-responsive to allergen stimulation irrespectively of the specificity of IgE antibodies. The duration of trans-inhibition observed in human basophils being comparable to the lifespan of these cells, trans-inhibition could anergize basophils irreversibly. Our results in MMC-1 cells suggest that trans-inhibition could be used to stop, or at least to control the proliferation of FcR-expressing cells such as in myeloid proliferative disorders.

Legends to figures

Fig. 1 : Trans-inhibition induced by Fc γ RIIB. (A) Fc γ RIIB-dependent cis-inhibition. FcR γ IIIA^{-/-} BMMC, sensitized with rat IgE (IR162), were challenged with MAR F(ab')₂ or IgG for 10 min at 37°C. (B) Fc γ RIIB-dependent trans-inhibition. FcR γ IIIA^{-/-} BMMC, sensitized with mouse IgE anti-DNP 2682-I and rat IgE IR162, were challenged with MAR IgG plus DNP-BSA for 10 min at 37°C. (C) Trans-inhibition requires specific antibodies. FcR γ IIIA^{-/-} BMMC, sensitized with mouse IgE anti-DNP 2682-I and rat IgE IR162, were challenged with MAR IgG or normal mouse IgG plus DNP-BSA for 10 min at 37°C. (D) Trans-inhibition requires the Fc portion of MAR antibodies. FcR γ IIIA^{-/-} BMMC, sensitized with mouse IgE anti-DNP 2682-I and rat IgE IR162, were challenged with MAR F(ab')₂ or IgG plus DNP-BSA for 10 min at 37°C. (E) Trans-inhibition depends on Fc γ RIIB. FcR γ IIIA^{-/-}, Fc γ RIIB^{-/-} FcR γ IIIA^{-/-} and Fc γ RIIB^{+/+} FcR γ IIIA^{+/+} BMMC, sensitized with mouse IgE anti-DNP 2682-I and rat IgE IR162, were challenged with DNP-BSA and MAR IgG for 10 min at 37°C. (F) Trans-inhibition can affect mast cell activation by other IgE anti-DNP. FcR γ IIIA^{-/-} BMMC, sensitized with mouse IgE anti-DNP C48 and rat IgE IR162, were challenged with MAR IgG plus DNP-BSA for 10 min at 37°C. (G) Trans-inhibition can affect mast cell activation by IgE anti-ova. FcR γ IIIA^{-/-} BMMC, sensitized with mouse IgE anti-ova 2C6 and rat IgE IR162, were challenged with MAR IgG plus ova for 10 min at 37°C. (A-G) β -hexosaminidase released in the supernatants was measured. The percentage of release was expressed as a function of stimulus concentrations.

Fig. 2 : Inhibition of mast cell responses. (A) Trans-inhibition affects all mast cell secretory responses. FcR γ IIIA^{-/-} BMMC sensitized with mouse IgE anti-DNP 2682-I and rat IgE IR162 were challenged with MAR IgG and DNP-BSA for 30 min or 3 h at 37°C. β -hexosaminidase, histamine, LTC-4, MIP-1 α and TNF- α released in the supernatants were measured. Mediator release or secretion was expressed as a function of stimulus concentrations. (B) Trans-inhibition affects mediators responsible for anaphylactic shock. FcR γ IIIA^{-/-} BMMC, sensitized with mouse IgE anti-DNP 2682-I and rat IgE IR162, were challenged with MAR IgG and DNP-BSA for 10 min. β -hexosaminidase was measured in supernatants (left panel). Supernatants from 9 x 10⁵ cells were injected i.v. into C57BL/6 mice and rectal temperature was monitored for 40 min. Temperature loss (Δ -body temperature) was expressed as a function of time (right panel). (C) Trans-inhibition affects adoptive anaphylaxis. FcR γ IIIA^{-/-} BMMC, sensitized with mouse IgE anti-DNP 2682-I and rat IgE IR162, were challenged with MAR IgG for 10 min and injected i.v. into C57BL/6 mice. 10 min later, DNP-BSA was injected i.v. and rectal temperature was monitored for 60 min. Temperature loss (Δ -body temperature) was expressed as a function of time.

Fig. 3 : Signaling events affected by trans-inhibition. FcR γ IIIA^{-/-} BMMC were sensitized with mouse IgE anti-DNP 2682-I and rat IgE (IR162). (A) Trans-inhibition does not affect mast cell activation by PMA+ionomycin. BMMC sensitized with mouse IgE anti-DNP 2682-I and rat IgE IR162 were challenged with MAR IgG and DNP-BSA or MAR IgG and PMA+ionomycin for 10 min at 37°C. β -hexosaminidase released in the supernatants was measured. The percentage of release was expressed as a function of DNP-BSA or ionomycin concentrations. (C) Trans-inhibition affects calcium mobilization. FcR γ IIIA^{-/-} BMMC sensitized with mouse IgE anti-DNP 2682-I and rat IgE IR162 were loaded with Fluo-3, before they were

challenged with DNP-BSA, DNP-BSA + MAR F(ab')₂ or DNP-BSA + IgG for the indicated periods of time. Fluorescence was recorded by flow cytometry and the fluorescence intensity was expressed as a function of time. (C & D) Trans-inhibition inhibits late phosphorylation events. FcR γ IIIA^{-/-} BMMC sensitized with mouse IgE anti-DNP 2682-I and rat IgE IR162 were challenged with MAR IgG and DNP-BSA for 1 min (phosphotyrosine analysis), 3 min (Syk, LAT, Gab2 and PLC γ 1 analysis) or 10 min (Akt, Erk, JNK and p38 analysis). Cells lysates were fractionated by SDS-PAGE and Western blotted with indicated antibodies.

Fig. 4 : Trans-inhibition depends on SHIP1. (A) SHIP1 is phosphorylated upon trans-inhibition. SHIP1^{+/+} and SHIP1^{-/-} BMMC sensitized with mouse IgE anti-DNP 2682-I and rat IgE IR162 were challenged with MAR IgG and DNP-BSA for 10 min. Cell lysates were fractionated by SDS-PAGE and Western blotted with anti-phospho-SHIP1 or anti-actin antibodies. (B) Cis- and trans-inhibition are lost in SHIP1^{-/-} BMMC. SHIP1^{+/+} and SHIP1^{-/-} BMMC sensitized with mouse IgE anti-DNP 2682-I and rat IgE IR162 were challenged with MAR IgG and DNP-BSA for 10 min. β -hexosaminidase released in the supernatants was measured. The percentage of release was expressed as a function of DNP-BSA concentration. (C) Trans-inhibition of late phosphorylation events is prevented in SHIP1^{-/-} BMMC. SHIP1^{+/+} and SHIP1^{-/-} BMMC sensitized with mouse IgE anti-DNP 2682-I and rat IgE IR162 were challenged with MAR IgG and DNP-BSA for 10 min. Cell lysates were fractionated by SDS-PAGE and Western blotted with indicated antibodies. (D) Trans-inhibition abrogates PI(3,4,5)P₃ upregulation. Wt BMMC sensitized with mouse IgE anti-DNP 2682-I and rat IgE IR162 were loaded with ³²P and challenged with MAR IgG and DNP-BSA for 10 min. Phosphatidylinositides were extracted, separated by TLC and quantitated by HPLC. cpm from PI(3,4,5)P₃ were expressed as a function of stimulus. (E) Cis-inhibition in RBL transfectants. RBL, RBL-Fc γ RIIB1 and RBL-Fc γ RIIB-KIRL cells were sensitized with rat IgE IR162 and challenged with MAR F(ab')₂ or MAR IgG for 10 min. β -hexosaminidase released in the supernatants was measured. The percentage of release was expressed as a function of MAR concentration. (F) Trans-inhibition is not induced in RBL-Fc γ RIIB-KIRL. RBL-Fc γ RIIB1 and RBL-Fc γ RIIB-KIRL cells were sensitized with mouse IgE anti-DNP 2682-I and rat IgE IR162 and challenged with MAR IgG plus DNP-BSA for 10 min. β -hexosaminidase released in the supernatants was measured. The percentage of release was expressed as a function of DNP-BSA concentration. (G) Trans-inhibition induced by Fc ϵ RI hyperaggregation. Wt BMMC were sensitized with mouse IgE anti-DNP 2682-I and rat IgE IR162 and challenged with 10 μ g/ml DNP-BSA and MAR F(ab')₂ for 10 min at 37°C. β -hexosaminidase released in the supernatants was measured. The percentage of release was expressed as a function of MAR F(ab')₂ concentrations.

Fig. 5 : Space and time analysis of trans-inhibition (A) Mouse and rat IgE are endocytosed independently. Wt BMMC sensitized with mouse IgE anti-DNP 2682-I and rat IgE IR162 were challenged with DNP-BSA, MAR F(ab')₂ or MAR IgG for 10 min before they were placed on ice. Mouse and rat IgE remaining on cell surface were detected with FITC anti-mouse IgE or FITC anti-rat Ig. The fluorescence was analyzed by flow cytometry. (B & D) Trans-inhibition is transient. Fc γ RIIIA^{-/-} BMMC sensitized with mouse IgE anti-DNP 2682-I and rat IgE IR162 were challenged with MAR IgG and, after the indicated periods of times with DNP-BSA for 10 min at 37°C.

β -hexosaminidase released in the supernatants was measured. The percentage of release was expressed as a function of DNP-BSA concentration (B) or as a function of time (D). (C) MAR IgG does not prevent the binding of DNP-BSA. Wt BMMC sensitized with mouse IgE anti-DNP 2682-I and rat IgE IR162 and were challenged with MAR IgG before they were placed on ice. Cells were incubated with TNP-BSA-Biotin whose binding was revealed by Neutravidin-PE. (E & F) Mouse and rat IgE co-localize during trans-inhibition. Wt BMMC sensitized with Alexa 488-labeled mouse IgE anti-DNP (A_{488} -2682-I) and Cyanine 5-labeled rat IgE (Cy5-IR162) were challenged with DNP-BSA, MAR IgG or both for 10 min before they were placed on cover slips and fixed. Fluorescence was analyzed using confocal microscopy.

Figure 6 : Trans-inhibition and cell proliferation. (A) Trans-inhibition can be induced by coaggregating Kit with Fc γ RIIB. Wt and Fc γ RIIB^{-/-} BMMC sensitized with mouse IgE anti-DNP 2682-I were challenged with immune complexes made of the indicated concentrations of ACK2 and MAR IgG plus DNP-BSA for 10 min at 37°C. β -hexosaminidase released in the supernatants was measured. The percentage of release was expressed as a function of DNP-BSA concentration. (B) Trans-inhibition affects SCF-induced proliferation. Fc γ RIIA^{-/-} BMMC sensitized with rat IgE IR162 were challenged with MAR IgG for 10 min before they were put in culture with increasing concentrations of SCF for 3 days. They were counted by Trypan blue exclusion and the numbers of cells were expressed as a function of SCF concentration. (C) MMC-1 autonomous proliferation depends on v-Abl. MMC-1 and Ba/F3 BCR-ABL were treated or not with STI571 (Abl inhibitor) or SU11248 (Kit inhibitor) before v-Abl was precipitated. Immunoprecipitates were fractionated by SDS-PAGE and Western blotted with anti-PY or anti-Abl antibodies. (D) Coaggregating Kit with Fc γ R inhibits thymidine incorporation in MMC-1. MMC-1 cells were incubated for 24 h with immune complexes made of GST-SCF and Rabbit IgG anti-GST, before they were incubated with ³H-thymidine O/N. Incorporated cpm are shown as a function of ligands. (E & F) Coaggregating Kit with Fc γ R inhibits MMC-1 proliferation as assessed by CFSE dilution. MMC-1 were loaded with CFSE, preincubated with 2.4G2 or without, and seeded in culture with immune complexes made of GST-SCF and increasing concentrations of rabbit anti-GST antibodies for 3 days (E) or for the indicated periods of time (F). Fluorescence was analyzed by flow cytometry. (G) Trans-inhibition affects the growth of MMC-1 tumors in vivo. 3 x 10⁵ MMC-1 cells were incubated 15 min at 37°C with immune complexes made of 3 μ g/ml GST-SCF and 30 μ g/ml rabbit anti-GST antibodies before they were injected s.c. into Nude, RAG^{-/-} and RAG^{-/-}FcR γ ^{-/-} mice. Tumor volume was measured for 15 days.

Fig. 7 : Trans-inhibition in murine and human basophils. (A) Trans-inhibition can be induced in murine basophils. WT and Fc γ RIIB^{-/-} bone-marrow-derived basophils, sensitized with mouse IgE anti-DNP 2682-I and rat IgE IR162 were challenged with MAR IgG and increasing concentrations of DNP-HSA for 24 hr at 37°C. IL-4 was titrated in the supernatants by ELISA. The concentration of IL-4 is shown as a function of MAR concentration. (B) Trans-inhibition can be induced in human basophils. Fresh human basophils were sensitized with rat IgE and challenged with MAR IgG and F(ab')₂ fragments of Rabbit anti-human IgE (left panel) or with Rabbit anti-human IgE IgG and MAR F(ab')₂ (right panel) for 25 min at 37°C. Cells were stained with APC-conjugated anti-Fc ϵ RI and PE-conjugated anti-CD203c for 20 min at 0°C. Fluorescence was analyzed by flow cytometry. CD203c MFI in CD203c-

/Fc ϵ RI- positive cells is shown as a function of stimulus concentration. (C) Trans-inhibition can affect histamine release in human basophils. Fresh human basophils incubated with rat IgE were challenged with MAR IgG and F(ab')₂ of Rabbit anti-human IgE for 25 min at 37°C. Histamine was measured in supernatants. (D) Trans-inhibition in human basophils lasts for several days. Fresh human basophils sensitized with rat IgE were preincubated with MAR IgG for the indicated periods of time before they were challenged with F(ab')₂ of Rabbit anti-human IgE for 25 min at 37°C. Cells were stained with APC-conjugated anti-Fc ϵ RI and PE-conjugated anti-CD203c for 20 min at 0°C. Fluorescence was analyzed by flow cytometry. CD203c MFI in CD203c-/Fc ϵ RI-positive cells is shown as a function of stimulus concentration. (E) Fc ϵ RI-dependent human basophil activation is inhibited in excess of ligand. Fresh human basophils sensitized with rat IgE were challenged with increasing concentrations of MAR F(ab')₂ for 25 min at 37°C. Cells were stained with APC-conjugated anti-Fc ϵ RI and PE-conjugated anti-CD203c for 20 minutes at 0°C. Fluorescence was analyzed by flow cytometry. CD203c MFI in CD203c-/Fc ϵ RI-positive cells is shown as a function of stimulus concentration. (F) Trans-inhibition can be induced by hyperaggregation of Fc ϵ RI in human basophils. Fresh human basophils sensitized with rat IgE were challenged with 90 μ g/ml MAR F(ab')₂ plus F(ab')₂ of Rabbit anti-human IgE for 25 min at 37°C. Cells were stained with APC-conjugated anti-Fc ϵ RI and PE-conjugated anti-CD203c for 20 min at 0°C. Fluorescence was analyzed by flow cytometry. CD203c MFI in CD203c-/Fc ϵ RI-positive cells is shown as a function of stimulus concentration.

Fig. 8 : Schematic representation of trans-inhibition during auto- and co-regulation of Fc ϵ RI signaling. Trans-inhibition can be induced whenever high enough SHIP-1 has been recruited into inhibitory signalosomes by Fc ϵ RI or by Fc γ RI, during auto-regulation (above) or co-regulation (below), respectively.

Fig. S1 : Fc ϵ RI are engaged independently by 2682-I and IR162. wt BMMC were sensitized with mouse IgE anti-DNP (2682-I) (S1A), or rat IgE (IR162) (S1A) or both (S1B) before they were challenged with DNP-BSA or MAR F(ab')₂ for 10 min at 37°C. β -hexosaminidase was titrated in the supernatants. The % β -hexosaminidase released was expressed as a function of DNP-BSA or MAR F(ab')₂.

Fig. S2 : Schematic representation of major Fc ϵ RI-dependent signaling pathways. Signaling events that are inhibited during trans-inhibition are in gray.

Fig. S3 : Expression of Kit, Fc ϵ RI and Fc γ R by MMC-1 cells. GST-SCF labeling. MMC-1 were incubated with 10 μ g/ml GST-SCF for 30 min at 0°C, washed, incubated with 10 μ g/ml mouse IgG anti-GST for 30 min at 0°C, washed and labeled with FITC-labeled goat anti-mouse Ig for 30 min at 0°C. Fluorescence was analyzed by flow cytometry. Receptor expression. MMC-1 cells were incubated with 10 μ g/ml ACK2, 2.4G2 F(ab')₂, K9.361 F(ab')₂ or anti Fc γ RIIIA antibodies for 30 min at 0°C, washed and labeled with FITC-labeled anti-mouse or anti-rat Ig. Fluorescence was analyzed by flow cytometry.

Fig. S4 : The autonomous proliferation of MMC-1 cells is inhibited by the Abl inhibitor STI571. MMC-1 and IL-3 stimulated BaF/3 cells were incubated with increasing concentrations of either Abl inhibitor STI571 or the FLT3 inhibitor Su11248. Following incubation for 48 hours, 10 μ l WST-1 (Roche Applied

Science) was added and the cells grown for another 3 hours. Viable cells were quantitated by measuring absorbance at 450nm with a scanning multiwell MultiScan-MS Spectrophotometer (Thermolabs System France). 100%: proliferation without inhibitor.

Fig. S5 : Cis-inhibition in mouse and human basophils. (A). Cis-inhibition in murine basophils. wt and $Fc\gamma RIIB^{-/-}$ bone-marrow-derived basophils, sensitized with rat IgE (IR162), were challenged with the indicated concentrations of MAR $F(ab')_2$ or IgG for 24 hr at 37°C. IL-4 secretion was measured by ELISA as indicated by the manufacturer. (B) Cis-inhibition in human basophils. Fresh human PBMC were sensitized with rat IgE and challenged with MAR $F(ab')_2$ or IgG for 25 min. at 37°C. Basophils were labeled with APC-conjugated anti-Fc ϵ RI antibodies and PE-conjugated anti-CD203c antibodies for 20 min. at 0°C. Fluorescence was analyzed by flow cytometry. CD203c MFI was expressed as a function of the concentration of stimuli in Fc ϵ RI $^+$ CD203c $^+$ cells.

References

1. Daëron M, Lesourne R. Negative signaling in Fc receptor complexes. *Advances in immunology*. 2006;89:39-86. Epub 2006/05/10.
2. Turner H, Kinet JP. Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI. *Nature*. 1999;402(6760 Suppl):B24-30. Epub 1999/12/10.
3. Dembo M, Goldstein B, Sobotka AK, Lichtenstein LM. Histamine release due to bivalent penicilloyl haptens: control by the basophil plasma membrane. *J Immunol*. 1978;121(1):354-8. Epub 1978/07/01.
4. Damen JE, Liu L, Rosten P, Humphries RK, Jefferson AB, Majerus PW, et al. The 145-kDa protein induced to associate with Shc by multiple cytokines is an inositol tetrakisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(4):1689-93. Epub 1996/02/20.
5. Gimborn K, Lessmann E, Kuppig S, Krystal G, Huber M. SHIP down-regulates FcepsilonR1-induced degranulation at supraoptimal IgE or antigen levels. *J Immunol*. 2005;174(1):507-16. Epub 2004/12/22.
6. Huber M, Helgason CD, Damen JE, Liu L, Humphries RK, Krystal G. The src homology 2-containing inositol phosphatase (SHIP) is the gatekeeper of mast cell degranulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(19):11330-5. Epub 1998/09/16.
7. 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. *The EMBO journal*. 1998;17(7):1961-72. Epub 1998/06/06.
8. Tamir I, Stolpa JC, Helgason CD, Nakamura K, Bruhns P, Daëron M, et al. The RasGAP-binding protein p62dok is a mediator of inhibitory Fc gammaRIIB signals in B cells. *Immunity*. 2000;12(3):347-58. Epub 2001/02/07.
9. Kimura T, Sakamoto H, Appella E, Siraganian RP. The negative signaling molecule SH2 domain-containing inositol-polyphosphate 5-phosphatase (SHIP) binds to the tyrosine-phosphorylated beta subunit of the high affinity IgE receptor. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(21):13991-6. Epub 1997/05/23.
10. Roget K, Malissen M, Malbec O, Malissen B, Daëron M. Non-T cell activation linker promotes mast cell survival by dampening the recruitment of SHIP1 by linker for activation of T cells. *J Immunol*. 2008;180(6):3689-98. Epub 2008/03/07.
11. Lesourne R, Fridman WH, Daëron M. Dynamic interactions of Fc gamma receptor IIB with filamin-bound SHIP1 amplify filamentous actin-dependent negative regulation of Fc epsilon receptor I signaling. *J Immunol*. 2005;174(3):1365-73. Epub 2005/01/22.
12. Daëron M. Fc receptor biology. *Annual review of immunology*. 1997;15:203-34. Epub 1997/01/01.
13. Daëron M, Latour S, Malbec O, Espinosa E, Pina P, Pasmans S, et al. The same tyrosine-based inhibition motif, in the intracytoplasmic domain of Fc gamma RIIB, regulates negatively BCR-, TCR-, and FcR-dependent cell activation. *Immunity*. 1995;3(5):635-46. Epub 1995/11/01.
14. Malbec O, Fridman WH, Daëron M. Negative regulation of c-kit-mediated cell proliferation by Fc gamma RIIB. *J Immunol*. 1999;162(8):4424-9. Epub 1999/04/14.

15. Daëron M, Malbec O, Latour S, Arock M, Fridman WH. Regulation of high-affinity IgE receptor-mediated mast cell activation by murine low-affinity IgG receptors. *The Journal of clinical investigation*. 1995;95(2):577-85. Epub 1995/02/01.
16. 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*. 1998;160(4):1647-58. Epub 1998/02/20.
17. Ono M, Bolland S, Tempst P, Ravetch JV. Role of the inositol phosphatase SHIP in negative regulation of the immune system by the receptor Fc(gamma)RIIB. *Nature*. 1996;383(6597):263-6. Epub 1996/09/19.
18. Bruhns P, Vely F, Malbec O, Fridman WH, Vivier E, Daëron M. Molecular basis of the recruitment of the SH2 domain-containing inositol 5-phosphatases SHIP1 and SHIP2 by fcgamma RIIB. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(48):37357-64. Epub 2000/10/04.
19. Lesourne R, Bruhns P, Fridman WH, Daëron M. Insufficient phosphorylation prevents fc gamma RIIB from recruiting the SH2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase SHP-1. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(9):6327-36. Epub 2000/12/02.
20. Fong DC, Malbec O, Arock M, Cambier JC, Fridman WH, Daëron M. Selective in vivo recruitment of the phosphatidylinositol phosphatase SHIP by phosphorylated Fc gammaRIIB during negative regulation of IgE-dependent mouse mast cell activation. *Immunology letters*. 1996;54(2-3):83-91. Epub 1996/12/01.
21. Malbec O, Schmitt C, Bruhns P, Krystal G, Fridman WH, Daëron M. Src homology 2 domain-containing inositol 5-phosphatase 1 mediates cell cycle arrest by FcgammaRIIB. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(32):30381-91. Epub 2001/05/22.
22. Fong DC, Brauweiler A, Minskoff SA, Bruhns P, Tamir I, Mellman I, et al. Mutational analysis reveals multiple distinct sites within Fc gamma receptor IIB that function in inhibitory signaling. *J Immunol*. 2000;165(8):4453-62. Epub 2000/10/18.
23. Malbec O, Roget K, Schiffer C, Iannascoli B, Dumas AR, Arock M, et al. Peritoneal cell-derived mast cells: an in vitro model of mature serosal-type mouse mast cells. *J Immunol*. 2007;178(10):6465-75. Epub 2007/05/04.
24. Barsumian EL, McGivney A, Basciano LK, Siraganian RP. Establishment of four mouse mastocytoma cell lines. *Cellular immunology*. 1985;90(1):131-41. Epub 1985/01/01.
25. Ogawa M, Matsuzaki Y, Nishikawa S, Hayashi S, Kunisada T, Sudo T, et al. Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *The Journal of experimental medicine*. 1991;174(1):63-71. Epub 1991/07/01.
26. Unkeless JC. Characterization of a monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors. *The Journal of experimental medicine*. 1979;150(3):580-96. Epub 1979/09/19.
27. Liu FT, Bohn JW, Ferry EL, Yamamoto H, Molinaro CA, Sherman LA, et al. Monoclonal dinitrophenyl-specific murine IgE antibody: preparation, isolation, and characterization. *J Immunol*. 1980;124(6):2728-37. Epub 1980/06/01.
28. Bazin H, Beckers A, Querinjean P. Three classes and four (sub)classes of rat immunoglobulins: IgM, IgA, IgE and IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c. *European journal of immunology*. 1974;4(1):44-8. Epub 1974/01/01.
29. Parravicini V, Gadina M, Kovarova M, Odom S, Gonzalez-Espinosa C, Furumoto Y, et al. Fyn kinase initiates complementary signals required for IgE-dependent mast cell degranulation. *Nature immunology*. 2002;3(8):741-8. Epub 2002/06/29.

30. Phee H, Jacob A, Coggeshall KM. Enzymatic activity of the Src homology 2 domain-containing inositol phosphatase is regulated by a plasma membrane location. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(25):19090-7. Epub 2000/04/15.
31. Carver DJ, Aman MJ, Ravichandran KS. SHIP inhibits Akt activation in B cells through regulation of Akt membrane localization. *Blood*. 2000;96(4):1449-56. Epub 2000/08/15.
32. Mauro MJ, Druker BJ. STI571: targeting BCR-ABL as therapy for CML. *The oncologist*. 2001;6(3):233-8. Epub 2001/06/26.
33. Mendel DB, Laird AD, Xin X, Louie SG, Christensen JG, Li G, et al. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2003;9(1):327-37. Epub 2003/01/23.
34. Boissan M, Feger F, Guillosson JJ, Arock M. c-Kit and c-kit mutations in mastocytosis and other hematological diseases. *Journal of leukocyte biology*. 2000;67(2):135-48. Epub 2000/02/12.
35. Buhning HJ, Streble A, Valent P. The basophil-specific ectoenzyme E-NPP3 (CD203c) as a marker for cell activation and allergy diagnosis. *International archives of allergy and immunology*. 2004;133(4):317-29. Epub 2004/03/20.
36. Conrad DH, Wingard JR, Ishizaka T. The interaction of human and rodent IgE with the human basophil IgE receptor. *J Immunol*. 1983;130(1):327-33. Epub 1983/01/01.
37. Gibbs BF, Rathling A, Zillikens D, Huber M, Haas H. Initial Fc epsilon RI-mediated signal strength plays a key role in regulating basophil signaling and deactivation. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2006;118(5):1060-7. Epub 2006/11/08.
38. Daëron M, Jaeger S, Du Pasquier L, Vivier E. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs: a quest in the past and future. *Immunological reviews*. 2008;224:11-43. Epub 2008/09/02.
39. Phillips NE, Parker DC. Fc-dependent inhibition of mouse B cell activation by whole anti-mu antibodies. *J Immunol*. 1983;130(2):602-6. Epub 1983/02/01.
40. Harriague J, Bismuth G. Imaging antigen-induced PI3K activation in T cells. *Nature immunology*. 2002;3(11):1090-6. Epub 2002/10/22.
41. O'Neill SK, Getahun A, Gauld SB, Merrell KT, Tamir I, Smith MJ, et al. Monophosphorylation of CD79a and CD79b ITAM motifs initiates a SHIP-1 phosphatase-mediated inhibitory signaling cascade required for B cell anergy. *Immunity*. 2011;35(5):746-56. Epub 2011/11/15.
42. Rottapel R, Reedijk M, Williams DE, Lyman SD, Anderson DM, Pawson T, et al. The Steel/W transduction pathway: kit autophosphorylation and its association with a unique subset of cytoplasmic signaling proteins is induced by the Steel factor. *Molecular and cellular biology*. 1991;11(6):3043-51. Epub 1991/06/01.

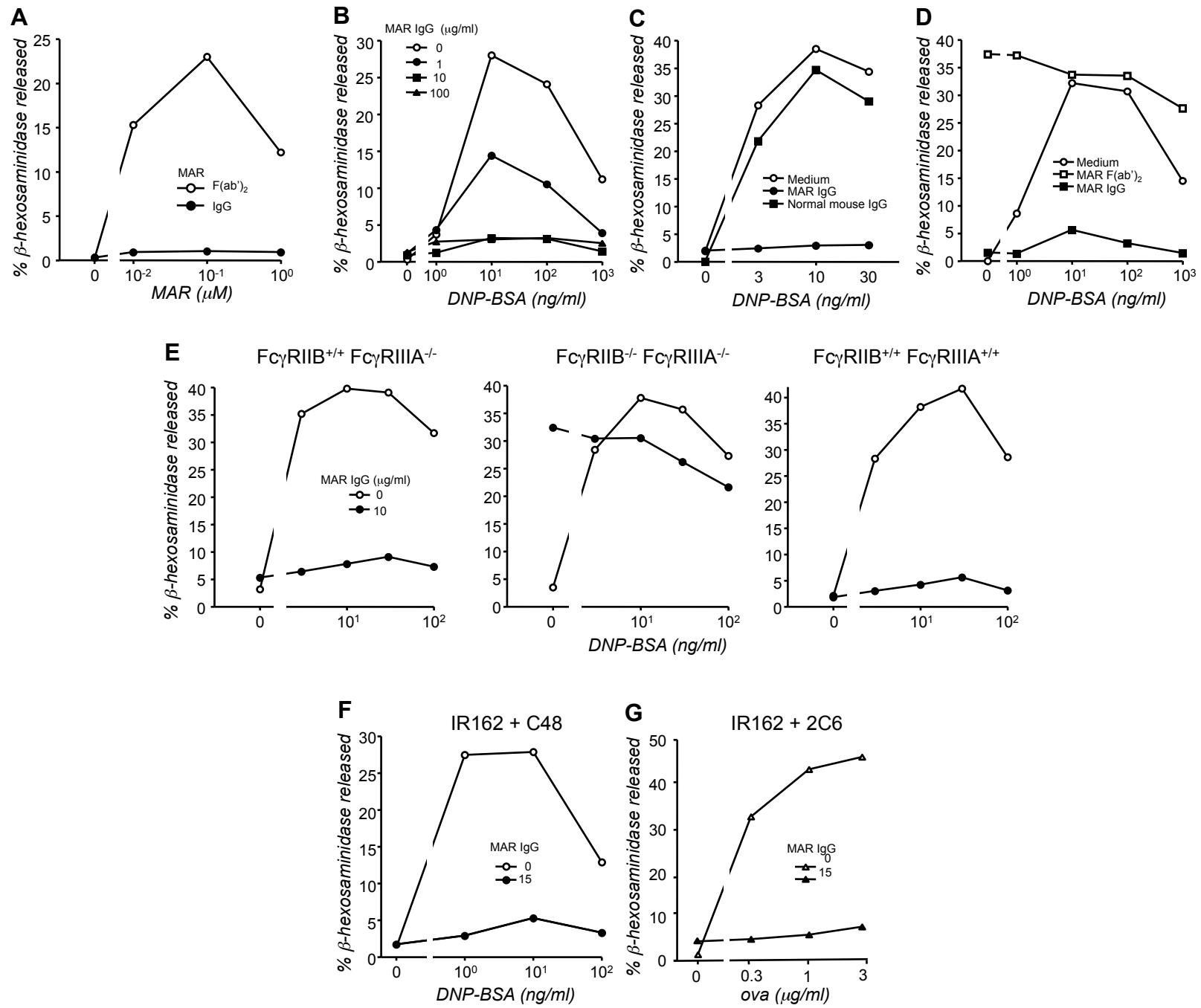


Fig. 1

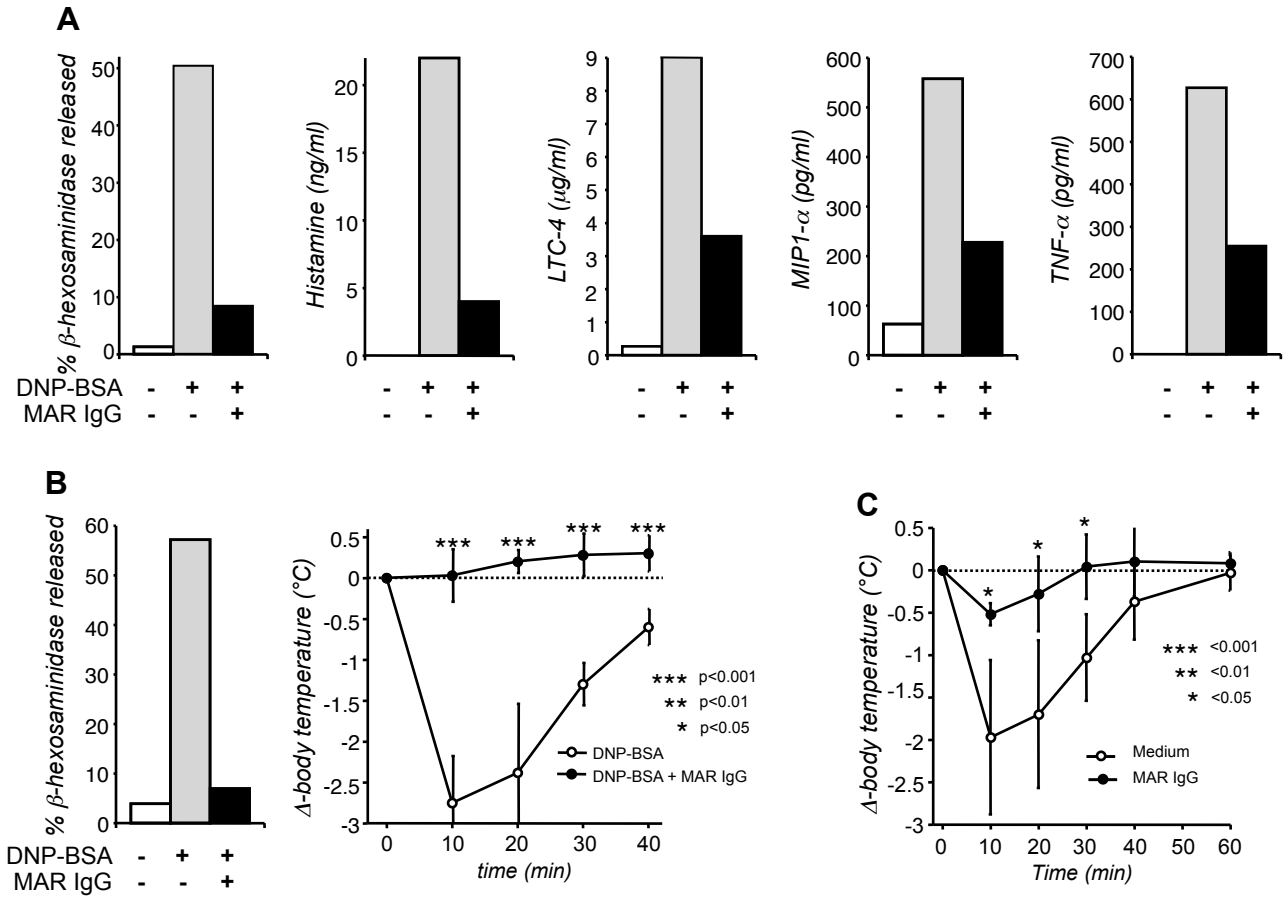


Fig. 2

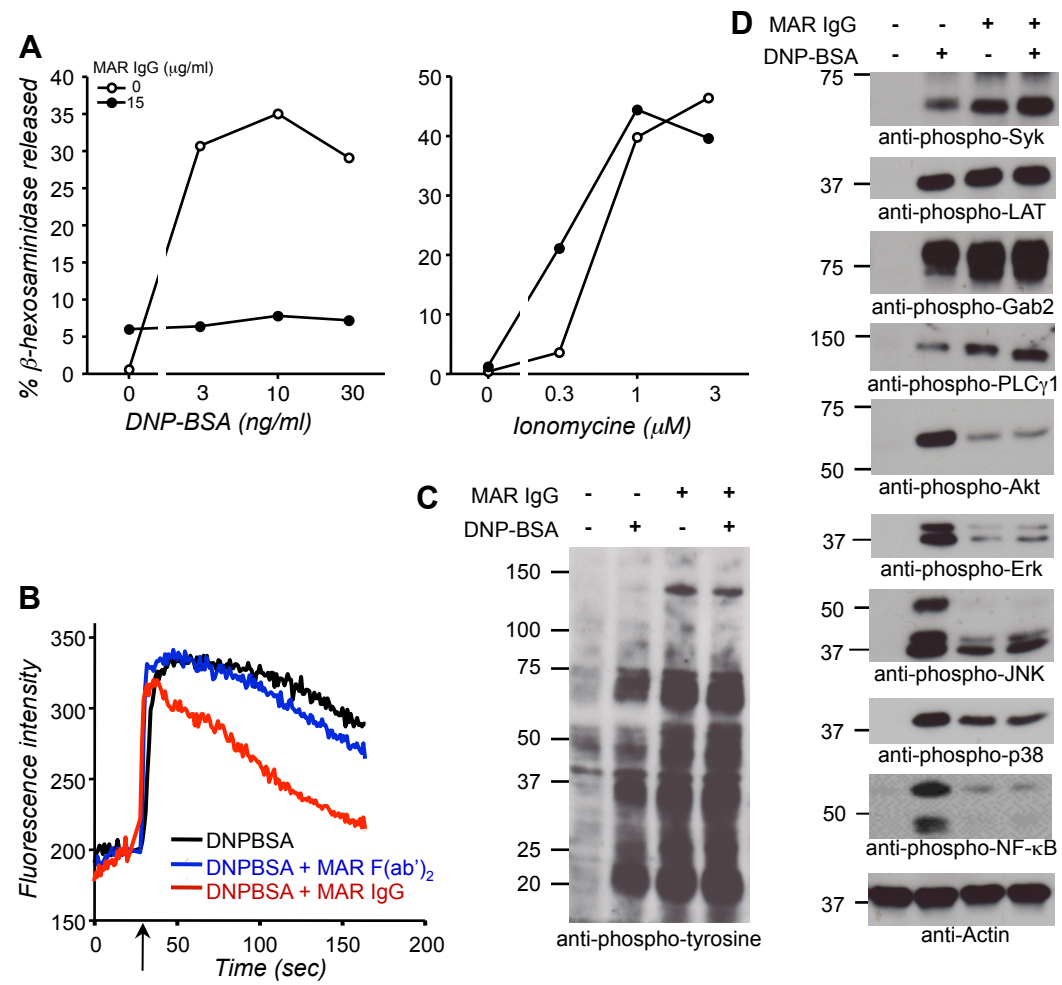


Fig. 3

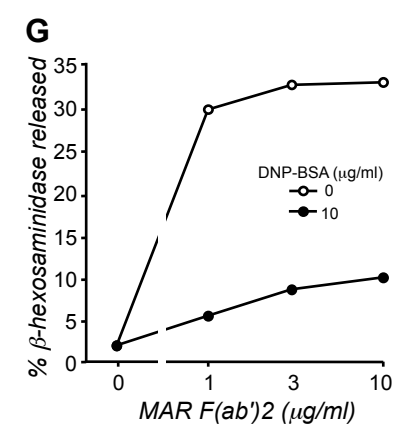
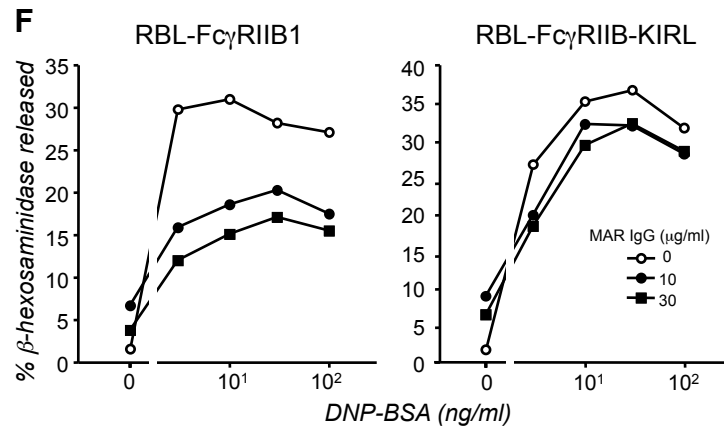
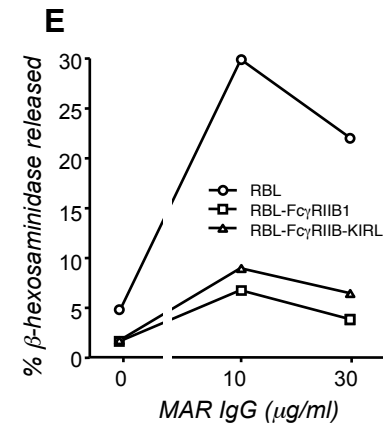
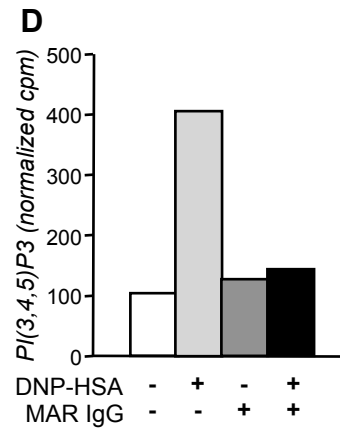
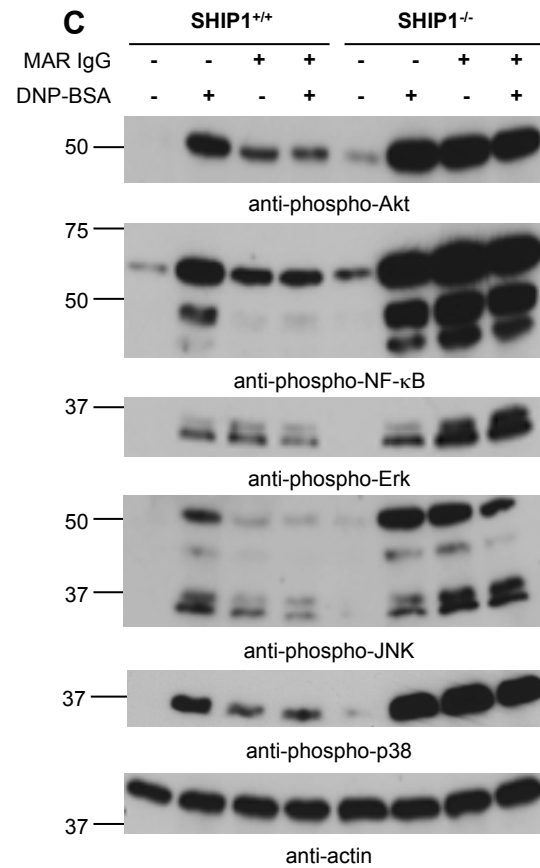
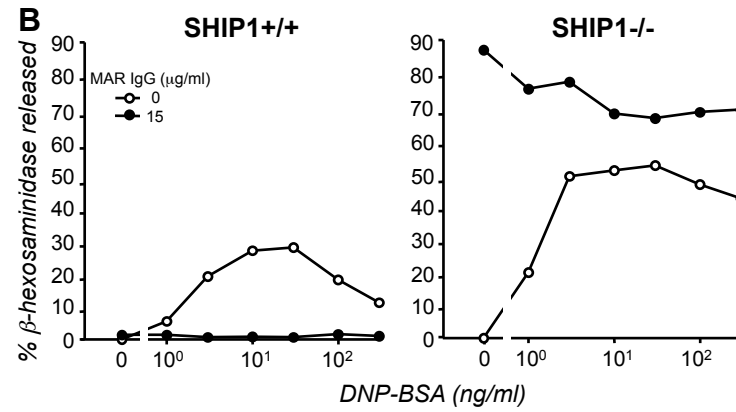
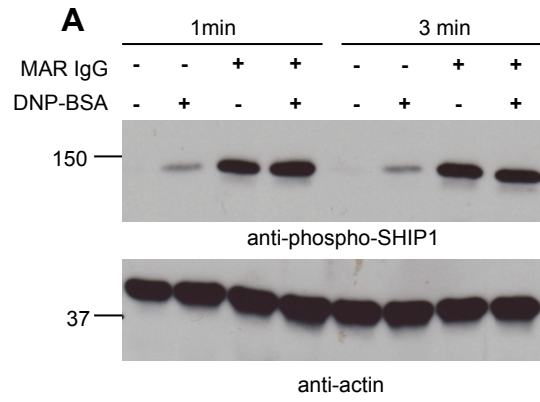


Fig. 4

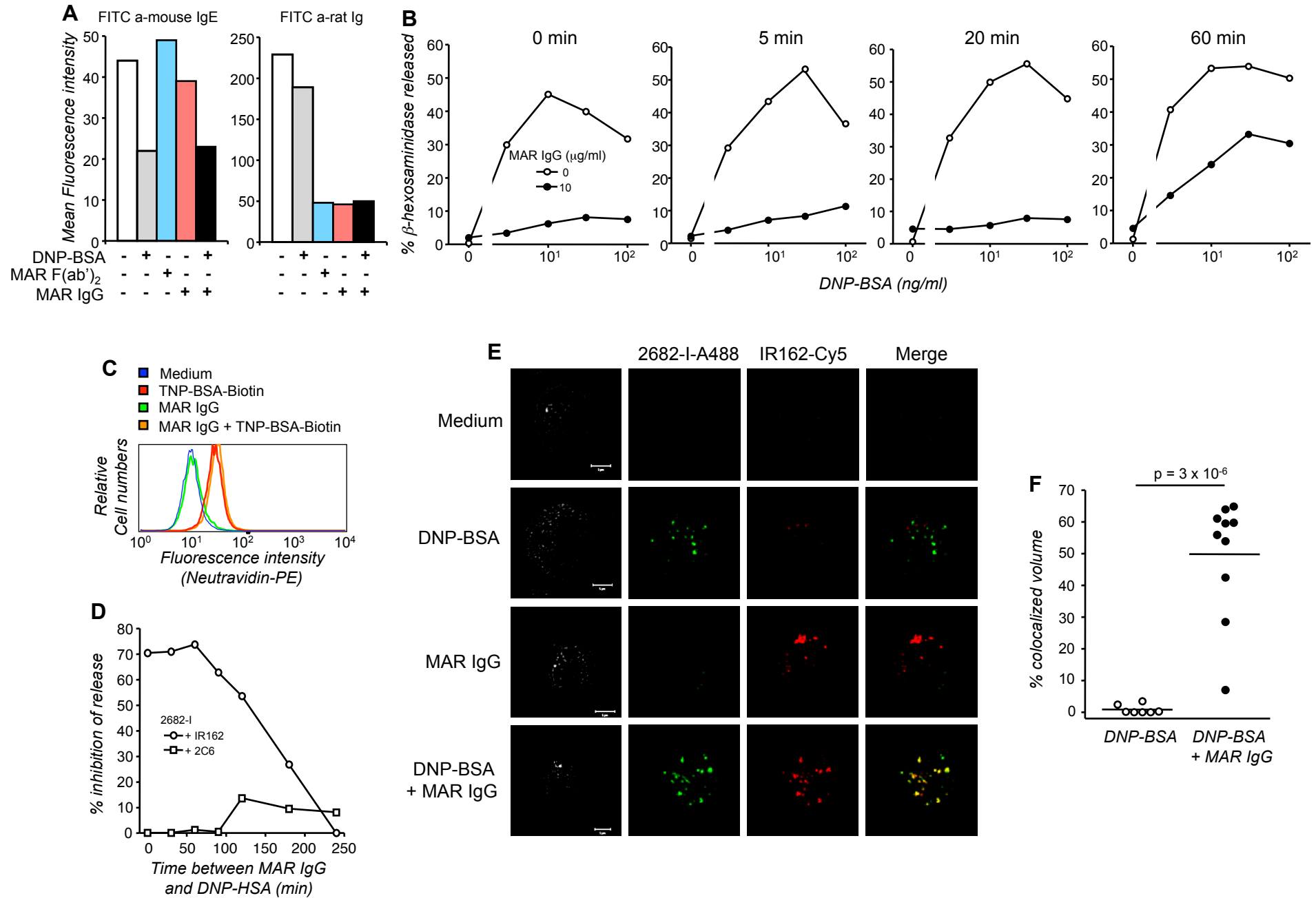


Fig. 5

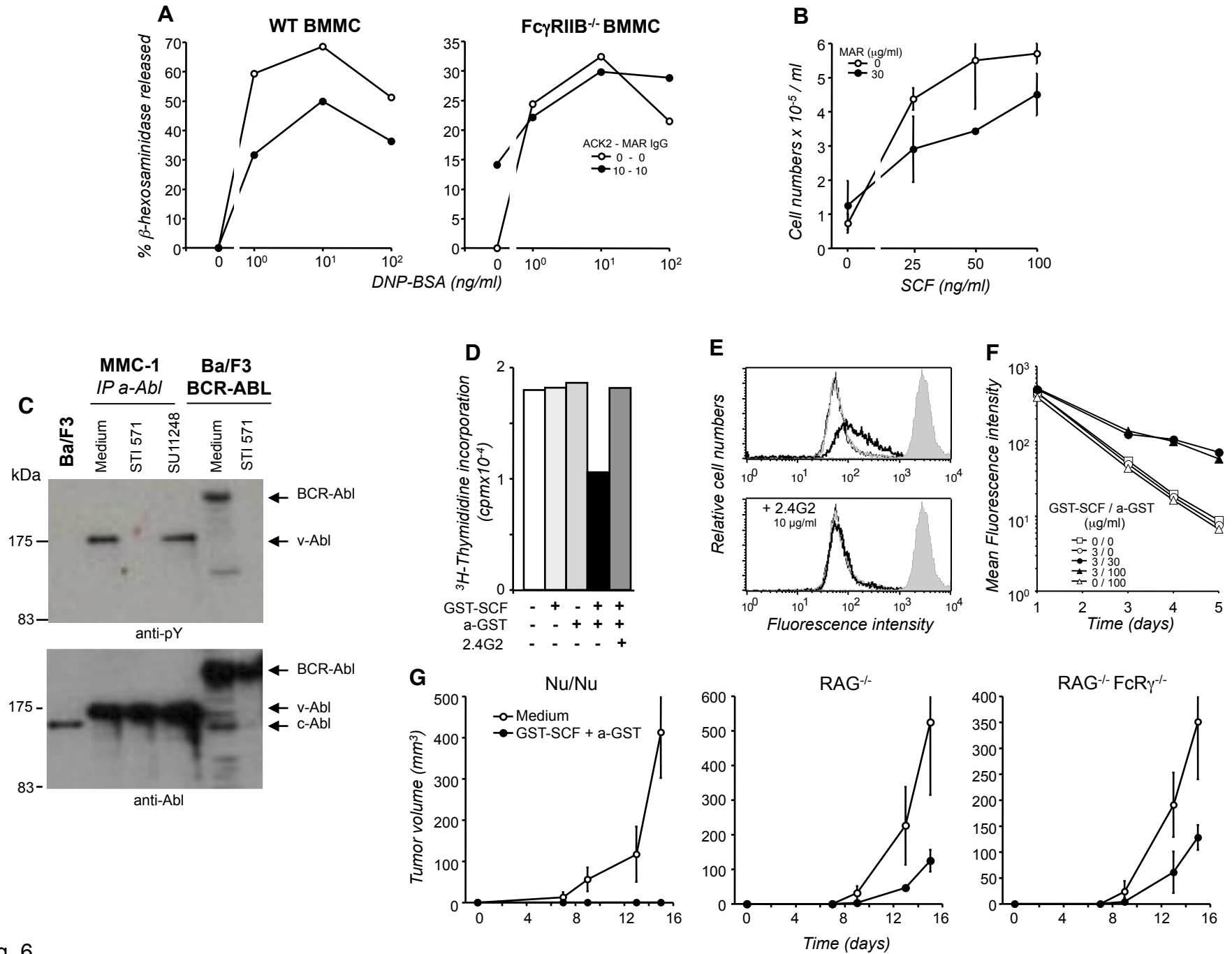


Fig. 6

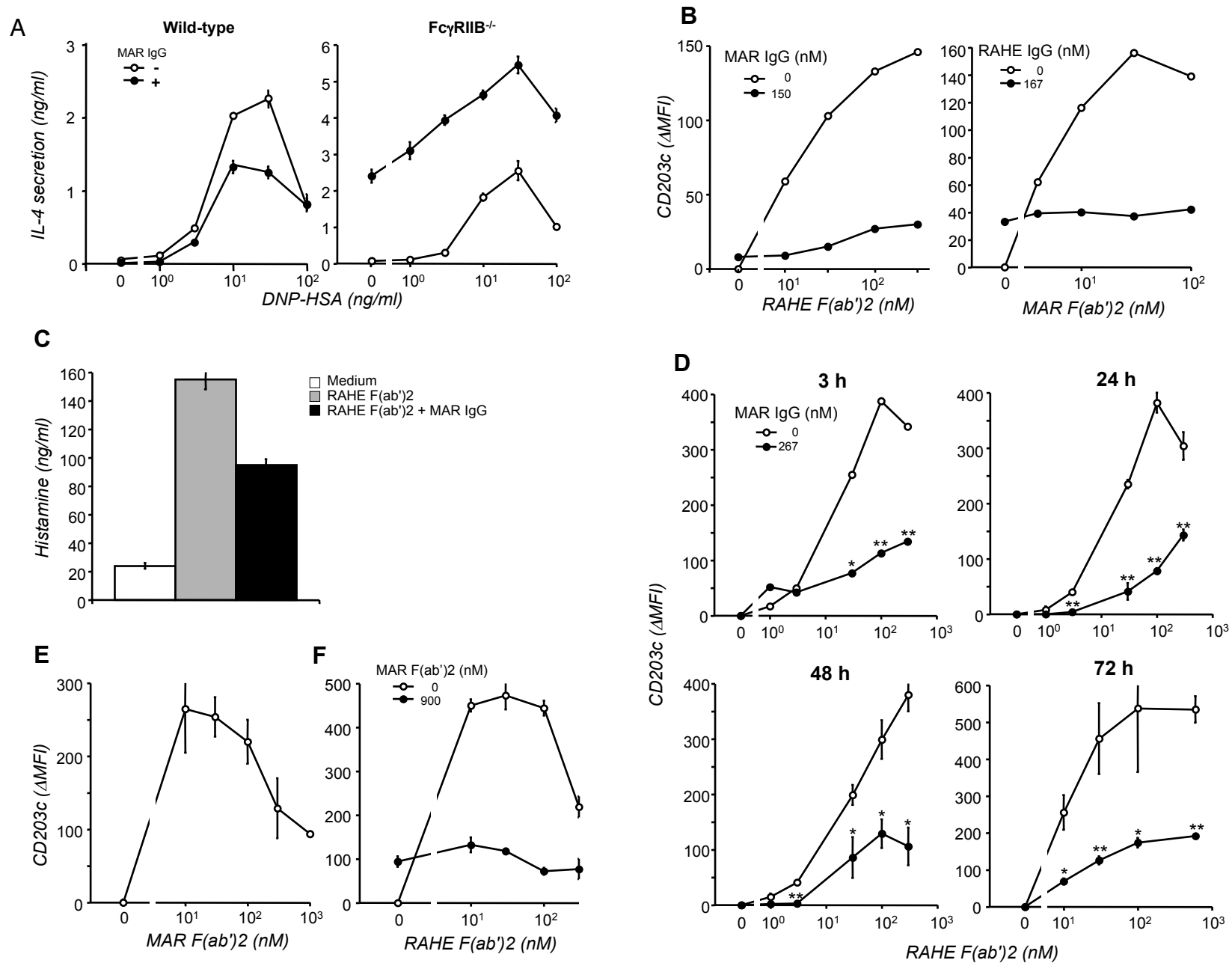


Fig. 7

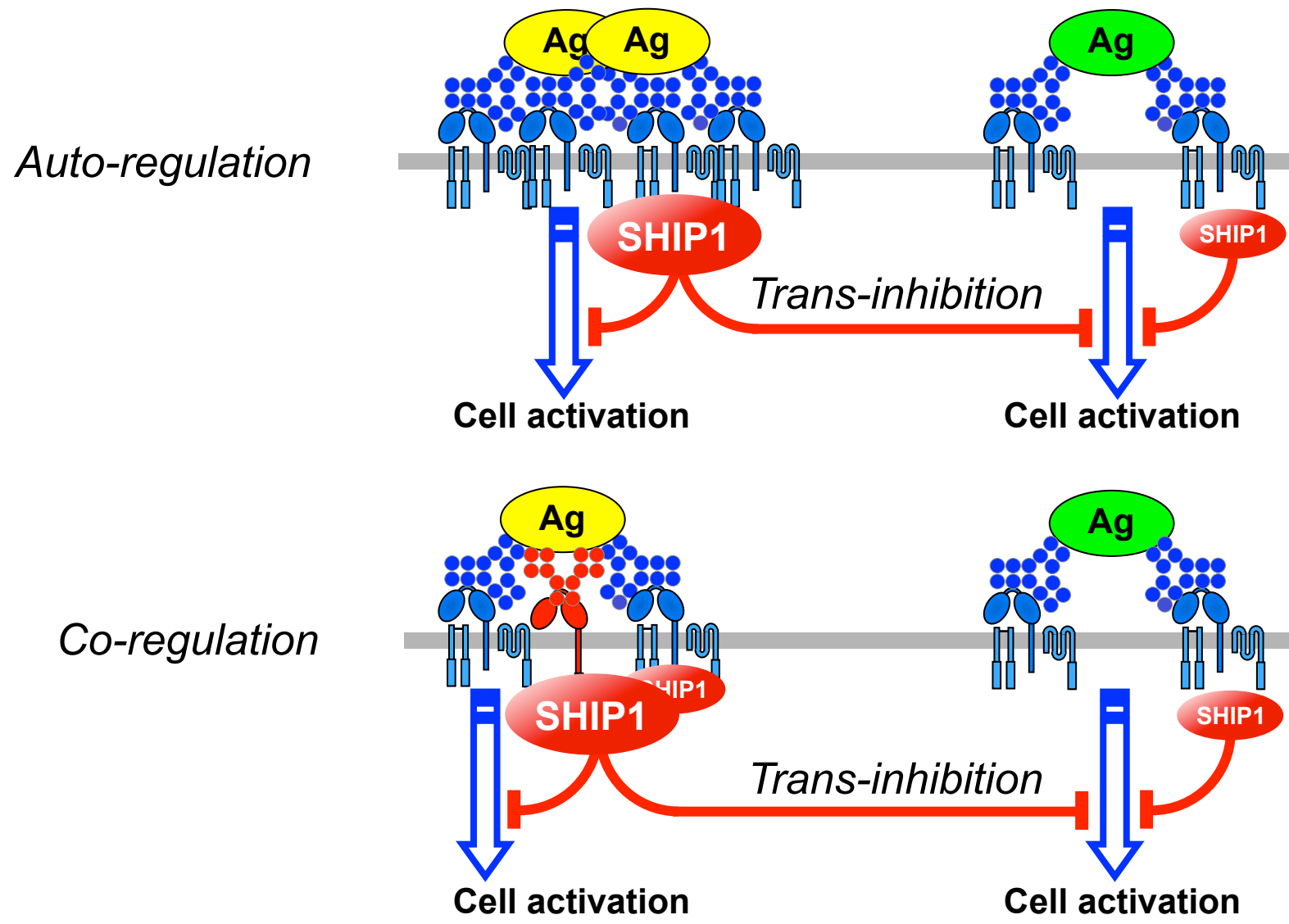


Fig. 8

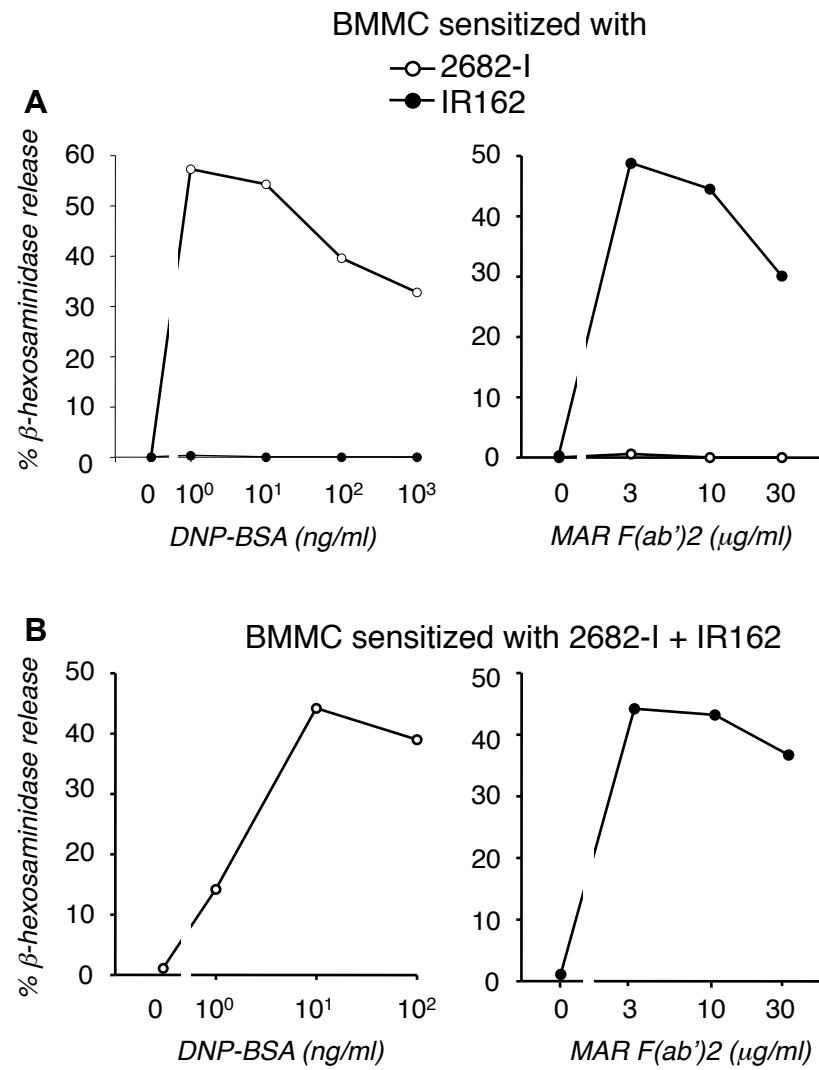


Fig. S1

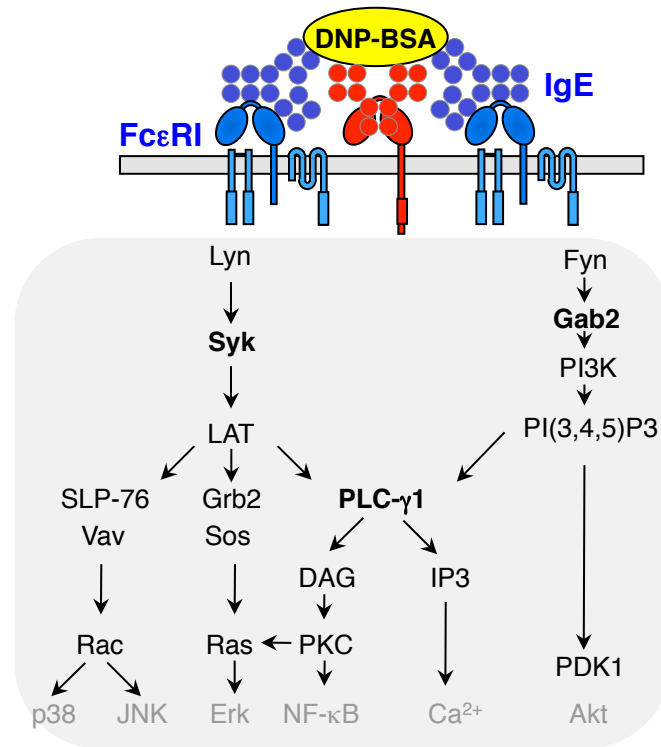


Fig. S2

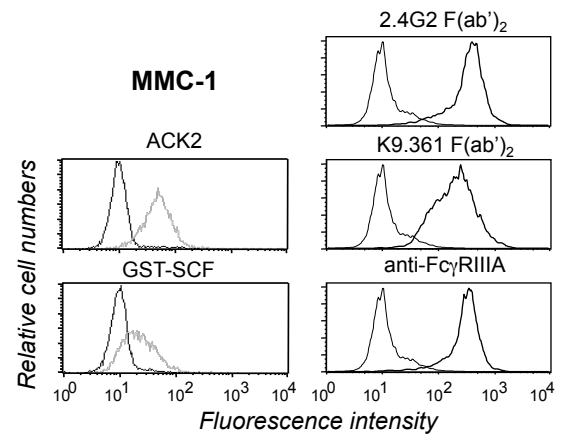


Fig. S3

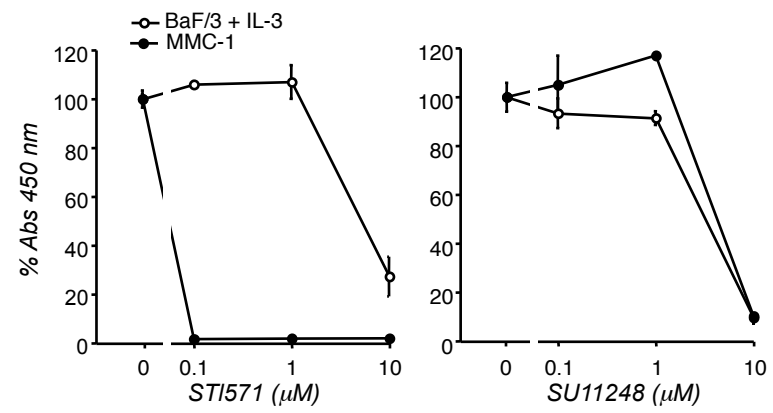


Fig. S4

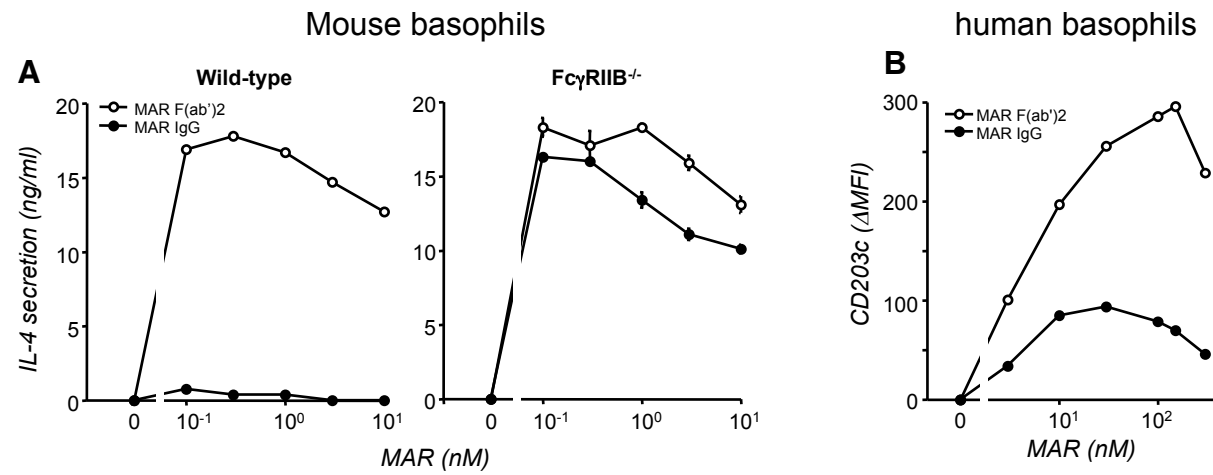


Fig. S5

Discussion

Ce travail modifie profondément la compréhension des propriétés inhibitrices des RFcγIIB. Ces récepteurs pour les IgG sont connus depuis longtemps comme des récepteurs inhibiteurs et leur champ d'action est tout d'abord passé d'un rétrocontrôle limité aux lymphocytes B à une inhibition plus étendue s'appliquant à tous les récepteurs à ITAM en plus du BCR des lymphocytes B, comme le TCR des lymphocytes T et les différents RFc activateurs comme les récepteurs de forte affinité pour les IgE, les RFcεI, ou encore les récepteurs de faible affinité pour les IgG, les RFcγIIIA. Puis l'inhibition induite par les RFcγIIB a été étendue à la prolifération cellulaire induite par les récepteurs à activité tyrosine kinase comme Kit. Les propriétés immunorégulatrices des RFcγIIB reposent sur leur capacité de recruter l'inositol phosphate phosphatase à domaine SH2, SHIP1, via l'ITIM qui est phosphorylé par la coagrégation. En effet, c'est une kinase associée au récepteur activateur, comme la kinase de la famille src Lyn dans le cas des RFcεI, qui phosphoryle la tyrosine de l'ITIM en même temps que les tyrosines des ITAM. Ainsi le récepteur activateur inhibé participe lui-même à sa propre inhibition en permettant le recrutement de l'effecteur de cette inhibition, SHIP1. L'inhibition induite par les RFcγIIB dépend bien de SHIP1 puisqu'elle est perdue quand on utilise des mastocytes dérivés de souris déficientes en SHIP1 et qu'elle peut être reproduite par des récepteurs chimériques contenant les domaines extracellulaire et transmembranaire des RFcγIIB et le domaine catalytique de SHIP1 comme domaine intracytoplasmique. Dans cet article, nous démontrons que l'inhibition n'est pas réduite au récepteur activateur coligué avec les RFcγIIB mais s'applique également à d'autres récepteurs activateurs adjacents qui ne sont pas coagrégés avec les RFcγIIB. L'inhibition n'est pas restreinte à un type de récepteur partageant un ligand commun avec les RFcγIIB mais s'étend aux autres récepteurs de la cellule pourvu que ces récepteurs utilisent la PI3K et le PI(3,4,5)P3 dans leur cascade de signalisation. Nous avons appelé cis-inhibition, le contrôle des récepteurs coagrégés aux RFcγIIB et trans-inhibition le contrôle des autres récepteurs sur la même cellule qui ne sont pas coagrégés avec RFcγIIB. La trans-inhibition affecte également la prolifération qu'elle soit normale, déclenchée par un récepteur à activité tyrosine kinase, Kit, ou autonome, sous le contrôle d'un oncogène viral comme Abl. La trans-inhibition peut donc inhiber la prolifération induite par un oncogène cytoplasmique qui n'est pas ciblable à la surface de la cellule. Ainsi les larges propriétés de la trans-inhibition permettent d'imaginer

son implication dans des protocoles thérapeutiques. Les anticorps sont déjà des molécules utilisées en immunothérapie en particulier dans le traitement de certains cancers. Cependant dans ces essais, on doit connaître une cible exprimée par les cellules cancéreuses. Ces thérapies visent surtout à diriger vers la cellule cancéreuse des systèmes effecteurs toxiques du système immunitaire comme des lymphocytes T CD8. La connaissance de la trans-inhibition modifie le but qui pourrait être recherché. Les anticorps pourraient cibler un antigène de la cellule cancéreuse pour inhiber profondément sa prolifération.

ARTICLE ANNEXE

Antibodies against growth factor receptors can inhibit the proliferation of transformed cells via a cis-interaction with inhibitory FcR.

Odile Malbec and Marc Daëron

Introduction

Les RFc γ IIB sont des récepteurs de faible affinité pour la portion Fc des IgG qui possèdent un ITIM, pour Immunorecepteur Tyrosine-based Inhibition Motif, dans leur domaine intracytoplasmique. Ils sont capables d'inhiber l'activation cellulaire induite par les récepteurs de forte affinité pour les IgE, les RFc ϵ I et la prolifération cellulaire induite par un récepteur à activité tyrosine kinase, Kit. Ainsi la coagrégation des RFc γ IIB avec les RFc ϵ I par des IgE et des complexes immuns à IgG inhibe la dégranulation des mastocytes. De même, la coagrégation des RFc γ IIB avec Kit par des complexes à IgG anti-Kit inhibe la prolifération normale dépendante de facteurs de croissance des mastocytes. Dans cet article, nous avons démontré que cette inhibition de la prolifération n'était pas restreinte aux mastocytes mais pouvait s'appliquer dans une lignée de pro-B, BaF/3. Nous avons également démontré que la coagrégation des RFc γ IIB et d'un kit muté, entraînant une prolifération anormale en absence de facteurs de croissance, inhibait également cette prolifération autonome. En effet des mutations de Kit peuvent entraîner la prolifération autonome des cellules en absence de facteurs de croissance. Ces mutations peuvent être situées dans le domaine kinase ce qui entraîne une activation constitutive de Kit ou dans le domaine transmembranaire ce qui entraîne une dimérisation constitutive de Kit. C'est la prolifération autonome provenant de cette dernière mutation que nous avons pu abolir en coagrégeant ce kit muté avec les RFc γ IIB. Cette inhibition de la prolifération peut être induite par des anticorps agonistes anti-Kit sous forme de complexes ou par des complexes immuns formés par une protéine de fusion GST-SCF (le SCF est le ligand de kit) et des anticorps anti-GST. Ainsi la coagrégation des deux récepteurs par leurs ligands naturels inhibe la prolifération. Ces résultats permettent d'imaginer que les RFc γ IIB pourraient être utilisés pour contrôler la prolifération de cellules et notamment la prolifération anormale de cellules cancéreuses.



Antibodies against growth factor receptors can inhibit the proliferation of transformed cells *via* a *cis*-interaction with inhibitory FcR

Odile Malbec^{a,b}, Marc Daëron^{a,b,*}

^a Institut Pasteur, Département d'Immunologie, Unité d'Allergologie Moléculaire & Cellulaire, Paris, France

^b Inserm, Unité 760, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 22 February 2012

Keywords:

Antibodies
Fc receptors
Immunoregulation
Cell proliferation
Cancer

ABSTRACT

When dimerized by Stem Cell Factor (SCF), the Receptor Tyrosine Kinase Kit triggers the proliferation of hematopoietic progenitors, including pro-B cells, and of some differentiated cells, including mast cells. We found previously that anti-Kit antibodies can mimic SCF and that anti-Kit-induced mast cell proliferation can be inhibited by the low-affinity IgG receptors FcγRIIB, when the two receptors are co-aggregated by IgG immune complexes. We show here that the same immune complexes inhibited anti-Kit-induced proliferation of Ba/F3 pro-B cells expressing wt Kit and FcγRIIB and that inhibition required the intracytoplasmic domain of FcγRIIB. Constitutively active Kit mutants are oncogenic. We show that Kit-dependent, ligand-independent proliferation of Ba/F3 cells expressing a constitutively dimerized Kit mutant was also inhibited by IgG immune complexes *via* FcγRIIB. FcγRIIB-dependent negative regulation therefore also affects Kit-dependent proliferation of transformed cells. Interestingly, the co-aggregation of Kit with FcγRIIB by immune complexes containing SCF also inhibited both growth factor-dependent and growth factor-independent proliferation of Ba/F3 cells expressing wt or mutated Kit, respectively. These results provide the basis for novel immunotherapeutical approaches of FcγRIIB-expressing tumors.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

As discussed in the accompanying review, by Albanesi and Daëron, therapeutic antibodies against cell surface molecules not only bind to specific antigens *via* their Fab portions, but they also engage receptors for the Fc portion of immunoglobulins (FcR) expressed on the same (*cis* binding) or on adjacent (*trans* binding) cells. These receptors, which can either activate cells or inhibit cell activation, are often co-expressed on the same cells. When engaged by antibodies, they generate a mixture of signals the integration of which determines most of the biological activities of antibodies. This markedly enhances the complexity of mechanisms used by therapeutic antibodies. It also enhances the functional repertoire of therapeutic antibodies and enables one to imagine new strategies of immunotherapy.

One can indeed conceive both new antibodies and new means to use them for passive immunotherapy. For instance, instead of aiming at killing tumor cells with therapeutic antibodies, one can aim at inhibiting their proliferation by co-engaging inhibitory receptors such as the low-affinity IgG receptor FcγRIIB. FcγRIIB

is a single-chain low-affinity IgG receptor the intracytoplasmic domain of which contains an *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif* (ITIM). FcγRIIB can inhibit not only cell activation but also cell proliferation. The example described below demonstrates that, when co-engaging a constitutively active growth factor receptor with FcγRIIB *in cis*, an anti-growth factor receptor antibody that has agonist-like properties or other ligands with similar properties can inhibit the proliferation of transformed cells.

Kit is a single-chain Receptor Tyrosine Kinase (RTK) of the platelet-derived growth factor receptor family. Its large extracellular domain, composed of five Ig-like domains, binds Stem Cell Factor (SCF). Its intracytoplasmic domain contains a tyrosine kinase domain [1]. Upon binding, SCF dimerizes Kit which autophosphorylates [2] and recruits phosphatidylinositol 3-kinase that generates phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP3). PIP3 mediates the membrane recruitment of pleckstrin homology domain-containing signaling molecules [2–4] that lead to the transcription of cyclin genes whose products control the cell cycle. Ultimately, cells enter the G1 phase, synthesize DNA and divide. Kit thus controls the growth and proliferation of hematopoietic progenitor cells and of a few differentiated cells including mast cells that express this RTK [5].

A variety of mutations were identified in Kit, some of which induce the constitutive activation of Kit and lead to proliferative disorders. Such gain-of-function mutations are of two types [6].

* Corresponding author at: Unité d'Allergologie Moléculaire & Cellulaire, Bâtiment Metchnikoff, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France. Tel.: +33 1 4568 8642; fax: +33 1 4061 3160.

E-mail address: daeron@pasteur.fr (M. Daëron).

Mutations of the first type are point mutations of selective residues in the phosphotransferase region, which induce the constitutive activation of the kinase domain in the absence of receptor dimerization. Mutations of the second type are juxtamembrane point mutations or deletions of variable lengths that induce the constitutive dimerization of Kit [7,8]. Both types of mutations are oncogenic. Due to continuous internalization, the expression of constitutively active Kit is reduced on transformed cells.

The rat anti-mouse Kit antibody ACK2 was described as a blocking antibody that inhibits Kit signaling by preventing the binding of SCF to its receptor [9]. We found previously that this antibody, however, can mimic SCF and induce mouse mast cell proliferation, provided that it is complexed with a second antibody. Importantly, we demonstrated that the same antibody can also inhibit Kit-dependent mouse mast cell proliferation when co-engaging FcγRIIB on the same cell [10]. Under these conditions, the FcγRIIB ITIM is phosphorylated and it recruits the SH2 domain-containing phosphatidylinositol 5-phosphatase SHIP1 that accounts for FcγRIIB-dependent inhibition of Kit signaling [11]. Human FcγRIIB contains the same ITIM as mouse FcγRIIB and both recruit SHIP1 [12]. Using either the agonist anti-Kit antibody ACK2 or SCF-containing immune complexes, we show here that FcγRIIB can also inhibit the growth factor-independent proliferation of cells expressing a constitutively active form of Kit.

2. Materials and methods

2.1. Cells

Ba/F3, Ba/F3-Kit and Ba/F3-Kit Δ_{JM} cells were previously described [13]. Ba/F3 and Ba/F3-Kit were cultured with 0.2% X63-IL3-conditioned medium as described [14]. Culture reagents were from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). cDNAs encoding wild-type FcγRIIB1 (FcγRIIB) or intracytoplasmic domain-deleted FcγRIIB (FcγRIIB Δ_{IC}) were stably transfected into Ba/F3-Kit and Ba/F3-Kit Δ_{JM} cells as described [15]. Clones expressing comparable levels of FcγRIIB were selected.

2.2. Antibodies

The rat mAbs anti-mouse FcγRIIB/IIIA 2.4G2 [16] and anti-mouse Kit ACK2 [17] were purified on Protein G-sepharose (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). ACK2 antibodies were biotinylated as described [10]. Fluorescein isothiocyanate-labeled F(ab')₂ fragments of Mouse anti-Rat Ig (FITC-MAR-F(ab')₂), F(ab')₂ fragments of Goat anti-Mouse Ig (FITC-GAM-F(ab')₂), and mouse anti-biotin mAb were from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA). Rabbit anti-GST antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Mouse anti-GST serum was raised in BALB/c mice. Biotinylated ACK2-anti-biotin immune complexes were preformed at 37 °C for 15 min immediately before use.

2.3. Fusion proteins

cDNA encoding mouse SCF was amplified by PCR from NIH-3T3 cells using as primers: *sense*, 5'-CCT CTT GTC GGA TCC AAG GAG ATC TGC GGG-3'; *antisense*, 5'-ATT CGG GAT CCT CAT TGT AGG CCC GAG TCT TC-3', and cloned into the pGEX-4T-2 vector (GE Healthcare). GST and GST-SCF were produced in transformed DH5 α *Escherichia coli*, and purified on glutathione-agarose (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). GST-SCF-rabbit anti-GST immune complexes were preformed at 37 °C for 15 min immediately before use.

2.4. Indirect immunofluorescence

Cells were incubated for 1 h at 0 °C with 2.4G2 or ACK2, and stained for 30 min at 0 °C with FITC-MAR F(ab')₂ or FITC-GAM F(ab')₂. Cells were incubated for 1 h at 0 °C first with GST or GST-SCF, then with mouse anti-GST antibodies, and stained for 30 min at 0 °C with FITC-GAM F(ab')₂. Fluorescence was analyzed using a FACScalibur (Becton Dickinson).

2.5. Thymidine incorporation

Aliquots of 3×10^4 Ba/F3-Kit or 10^4 Ba/F3-Kit Δ_{JM} cells, preincubated with 2.4G2 or without for 1 h at 37 °C, were incubated with mouse rIL3, mouse rSCF (AbCys, Paris, France) or immune complexes for 24 h at 37 °C in RPMI containing 1% FCS and 0.5% BSA (Sigma, Saint Louis, MO). 5 μ Ci [³H]thymidine/well were added (GE Healthcare), and radioactivity incorporated into cells was measured 4 h later.

2.6. Cell proliferation assay

Cells were seeded at 5×10^4 /ml and cultured for 3 days with immune complexes or without in complete medium. Trypan blue-excluding cells were enumerated at 24, 48 and 72 h.

3. Results

3.1. Growth factor-dependent and independent, Kit-mediated proliferation of Ba/F3 cells

The IL-3-dependent murine pro-B cells Ba/F3 do not express Kit. Stable Ba/F3 clones expressing either w.t. Kit (Ba/F3-Kit) or an oncogenic form of Kit bearing a juxta-membrane deletion known to induce the constitutive dimerization of the receptor (Ba/F3-Kit Δ_{JM}) was previously constructed [14]. As expected, Ba/F3-Kit cells expressed higher levels of recombinant Kit than Ba/F3-Kit Δ_{JM} cells (Fig. 1A). Activated Kit is indeed rapidly internalized.

Ba/F3 and Ba/F3-Kit cells dose-dependently proliferated in response to recombinant mouse IL-3, as assessed by ³H-thymidine incorporation. Ba/F3-Kit, but not Ba/F3 cells, dose-dependently proliferated in response to recombinant mouse SCF. Ba/F3-Kit Δ_{JM} cells proliferated without added growth factor, and the addition of recombinant IL-3 or SCF did not increase thymidine incorporation (Fig. 1B).

3.2. Anti-Kit antibodies can either induce or inhibit the proliferation of cells that express a wt Kit, depending on whether they co-engage FcγRIIB or not

Ba/F3-Kit cells, which do not express FcγR, were stably transfected with cDNA encoding w.t. murine FcγRIIB (Ba/F3-Kit-IIB) or FcγRIIB bearing a deletion of the whole intracytoplasmic domain (Ba/F3-Kit-IIB Δ_{IC}). All three cells expressed comparable levels of Kit. Ba/F3-Kit-IIB cells and Ba/F3-Kit-IIB Δ_{IC} cells expressed comparable levels of FcγRIIB (Fig. 2A).

As previously demonstrated in mouse mast cells [10], immune complexes made with biotinylated-anti-Kit and anti-biotin antibodies (anti-Kit Ab cplx) (Fig. 2B) induced Ba/F3-Kit and Ba/F3-Kit-IIB cells to proliferate similarly when cells were preincubated with anti-FcγRIIB antibodies (Fig. 2C and D). Anti-Kit Ab cplx-induced proliferation of Ba/F3-Kit-IIB cells, but not of Ba/F3-Kit cells (Fig. 2C) or Ba/F3-Kit-IIB Δ_{IC} cells (Fig. 2D), was markedly reduced when cells were not preincubated with anti-FcγRIIB antibodies. FcγRIIB can therefore inhibit the ligand-induced,

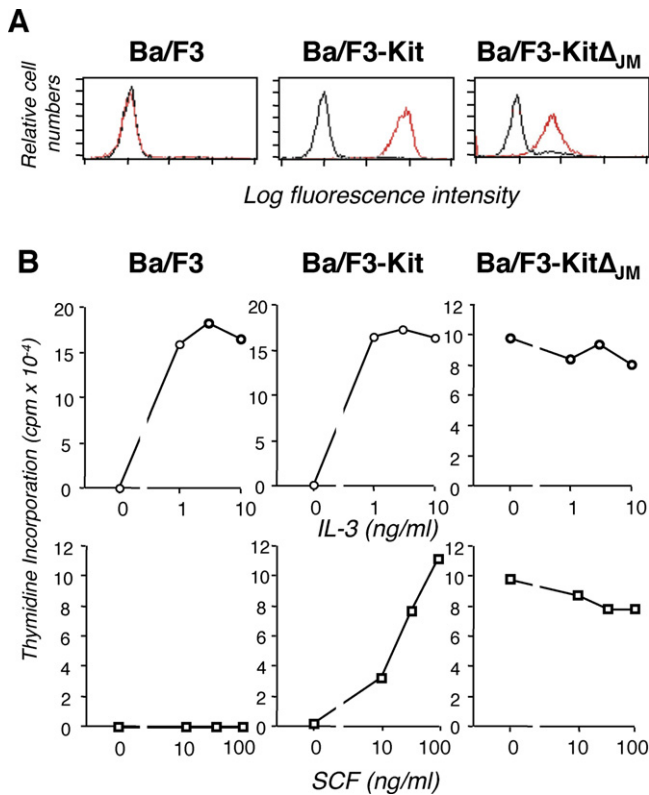


Fig. 1. Kit-mediated proliferation of Ba/F3 cells expressing w.t. or mutant Kit. (A) Kit expression by Ba/F3, Ba/F3-Kit and Ba/F3-Kit Δ_{JM} cells. Red histograms: cells incubated with ACK2 for 1 h at 0 °C and with FITC-MAR F(ab')₂ for 30 min at 0 °C; black histograms: cells incubated with FITC-MAR F(ab')₂ only. (B) SCF- and IL-3-induced thymidine incorporation in Ba/F3, Ba/F3-Kit and Ba/F3-Kit Δ_{JM} cells. Cells were incubated with the indicated concentrations of recombinant IL3 or SCF for 24 h at 37 °C. Thymidine was added and incorporation was measured 4 h later. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

Kit-dependent proliferation of Ba/F3-Kit-IIB transfectants, when co-engaged with Kit by anti-Kit antibodies.

3.3. Anti-Kit antibodies can inhibit the constitutive proliferation of cells that express an oncogenic form of Kit, provided that they co-engage Fc γ RIIB

Ba/F3-Kit Δ_{JM} cells were stably transfected either with w.t. Fc γ RIIB (Ba/F3-Kit Δ_{JM} -IIB) or with Fc γ RIIB Δ_{IC} (Ba/F3-Kit Δ_{JM} -IIB Δ_{IC}). Ba/F3-Kit Δ_{JM} -IIB and Ba/F3-Kit Δ_{JM} -IIB Δ_{IC} cells expressed similar levels of Fc γ RIIB. They also expressed similar levels of Kit as Ba/F3-Kit Δ_{JM} cells (Fig. 3A). All three cells proliferated autonomously.

Thymidine incorporation in Ba/F3-Kit Δ_{JM} -IIB cells, but not in Ba/F3-Kit Δ_{JM} was inhibited by anti-Kit Ab cplx (Fig. 3B) and inhibition was abrogated when Ba/F3-Kit Δ_{JM} -IIB cells were preincubated with anti-Fc γ RIIB antibody (Fig. 3B). Inhibition of thymidine incorporation observed in Ba/F3-Kit Δ_{JM} -IIB cells was abrogated in Ba/F3-Kit Δ_{JM} -IIB Δ_{IC} cells (Fig. 3C).

The proliferation of Ba/F3-Kit Δ_{JM} -IIB cells, but not of Ba/F3-Kit Δ_{JM} or Ba/F3-Kit Δ_{JM} -IIB Δ_{IC} cells was similarly inhibited by anti-Kit Ab cplx, when assessed by counting viable cells recovered at different time points from cultures (Fig. 3D). The autonomous proliferation of cells bearing an oncogenic form of Kit can therefore be inhibited by anti-Kit antibodies that co-engage Kit and Fc γ RIIB.

3.4. Antibodies of an unrelated specificity can be used to inhibit both the ligand-induced and the constitutive proliferation of cells that express a wt Kit or an oncogenic Kit, respectively

On the basis of these results, we investigated other means to co-engage Kit with Fc γ RIIB *via* antibodies. A GST fusion protein containing mouse SCF (GST-SCF), but not GST alone, bound to Kit-expressing Ba/F3 cells. As seen with anti-Kit antibodies, higher amounts of GST-SCF bound to Ba/F3-Kit cells than to Ba/F3-Kit Δ_{JM} cells (Fig. 4A). Ba/F3-Kit cells proliferated in response to GST-SCF.

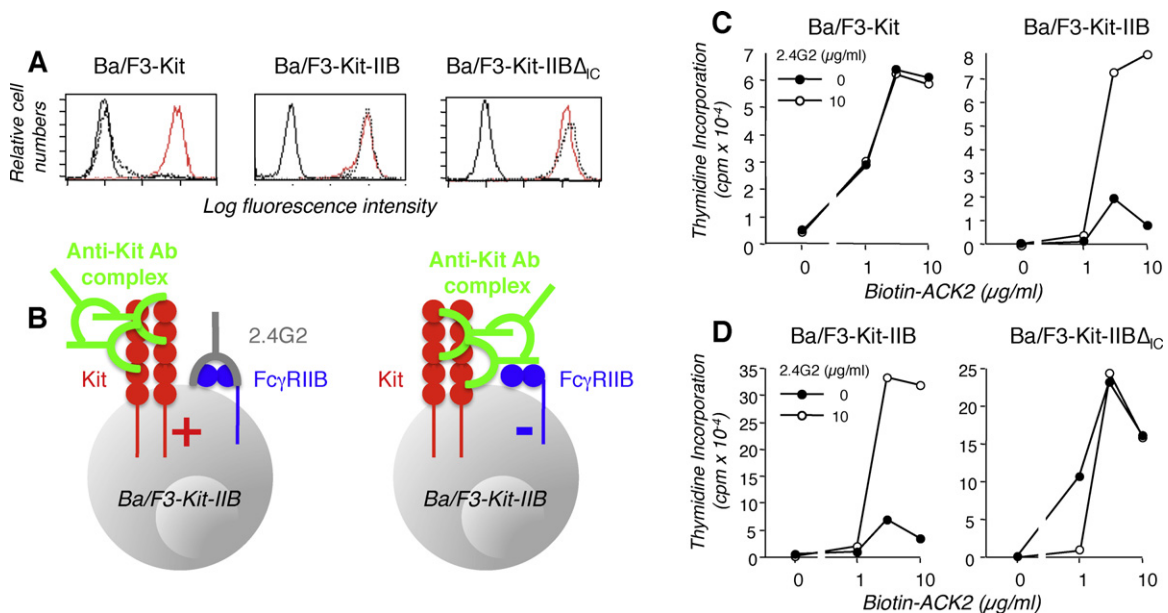


Fig. 2. Anti-Kit-induced inhibition of ligand-dependent Kit-mediated proliferation of Ba/F3-Kit cells by Fc γ RIIB. (A) Kit and Fc γ RIIB expression by Ba/F3-Kit, Ba/F3-Kit-IIB1 and Ba/F3-Kit-IIB Δ_{IC} cells. Red histograms: cells incubated with ACK2 for 1 h at 0 °C and with FITC-MAR F(ab')₂ for 30 min at 0 °C; dotted histograms: cells incubated with 2.4G2 and FITC-MAR F(ab')₂; black histograms: cells incubated with FITC-MAR F(ab')₂ only. (B) Schematic representation of the cis interactions of anti-Kit antibodies with Kit and Fc γ RIIB in the presence (left) and in the absence (right) of 2.4G2. (C, D) Anti-Kit immune complex-induced thymidine incorporation. Ba/F3-Kit, Ba/F3-Kit-IIB1 cells and Ba/F3-Kit-IIB Δ_{IC} cells, preincubated for 1 h at 37 °C with 2.4G2 (open circles) or without 2.4G2 (closed circles), were incubated with immune complexes made of indicated concentrations of biotin-ACK2 and anti-biotin antibodies for 24 h at 37 °C. Thymidine was added and incorporation was measured 4 h later.

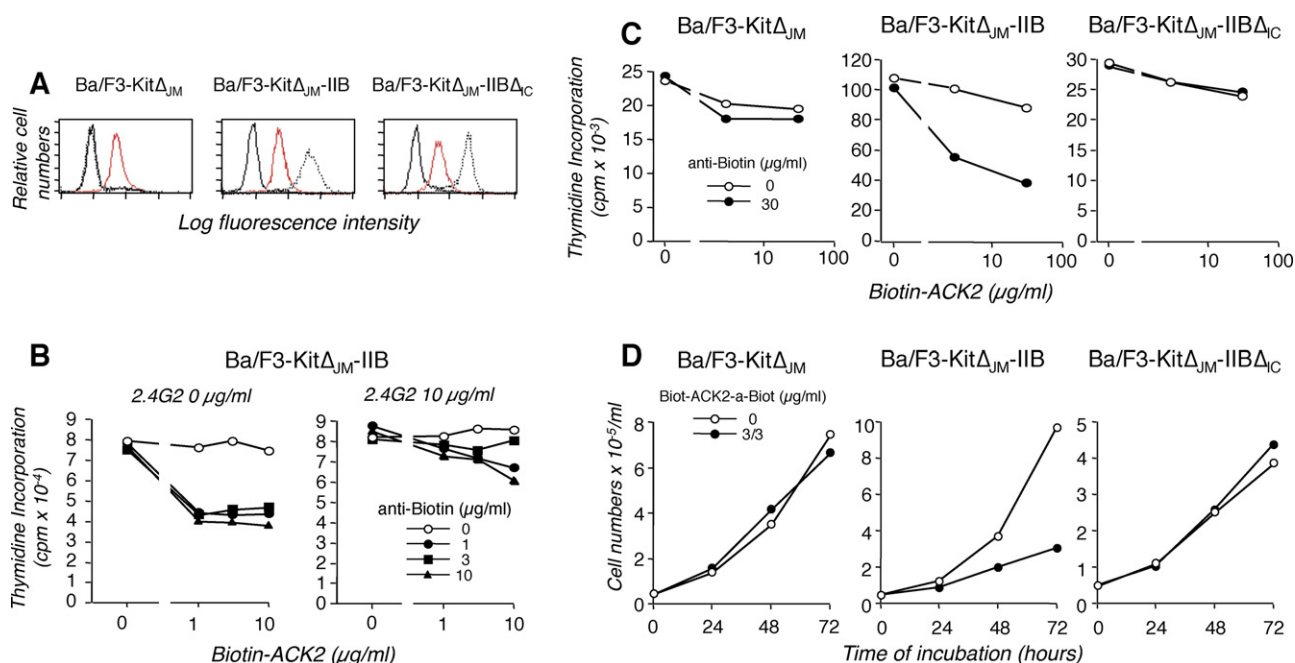


Fig. 3. Anti-Kit-induced inhibition of ligand-independent Kit-mediated proliferation of Ba/F3-Kit Δ_{JM} cells by Fc γ RIIB. (A) Kit and Fc γ RIIB expression by Ba/F3-Kit Δ_{JM} , Ba/F3-Kit Δ_{JM} -IIB1 and Ba/F3-Kit Δ_{JM} -IIB Δ_{IC} cells. Red histograms: cells incubated with ACK2 for 1 h at 0 °C and with FITC-MAR F(ab')₂ for 30 min at 0 °C; dotted histograms: cells incubated with 2.4G2 and FITC-MAR F(ab')₂; black histograms: cells incubated with FITC-MAR F(ab')₂ only. (B) Inhibition of thymidine incorporation by Fc γ RIIB. Ba/F3-Kit Δ_{JM} -B1 cells, preincubated for 1 h at 37 °C with 2.4G2 or without, were incubated with immune complexes made of indicated concentrations of biotin-ACK2 and anti-biotin antibodies for 24 h at 37 °C. Thymidine was added and incorporation was measured 4 h later. (C) Inhibition of thymidine incorporation by anti-Kit immune complexes. Ba/F3-Kit Δ_{JM} , Ba/F3-Kit Δ_{JM} -IIB1 and Ba/F3-Kit Δ_{JM} -IIB Δ_{IC} cells were incubated with immune complexes made of the indicated concentrations of biotin-ACK2 and anti-biotin antibodies (closed circles) or with biotin-ACK2 only (open circles) for 24 h at 37 °C. Thymidine was added and incorporation was measured 4 h later. (D) Inhibition of cell proliferation by anti-Kit immune complexes. Ba/F3-Kit Δ_{JM} , Ba/F3-Kit Δ_{JM} -B1 and Ba/F3-Kit Δ_{JM} -B1 Δ_{IC} cells were cultured for the indicated periods of time with immune complexes made of 3 μ g/ml biotin-ACK2 and 3 μ g/ml anti-biotin antibodies. The cells were enumerated by trypan blue exclusion. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

Comparable thymidine incorporation was induced by GST-SCF and SCF. Ten-fold higher molar concentrations of GST-SCF were however required (Fig. 4B).

Since GST-SCF bound to and triggered the proliferation of Ba/F3-Kit cells, we investigated the effect of GST-SCF and of GST-SCF-anti-GST immune complexes on Ba/F3-Kit-IIB cells (Fig. 4C). GST-SCF induced Ba/F3-Kit-IIB cells to proliferate. The proliferation of Ba/F3-Kit-IIB cells was decreased when GST-SCF was complexed with anti-GST antibodies (Fig. 4D). Importantly, the proliferation of Ba/F3-Kit Δ_{JM} -IIB cells was also inhibited by GST-SCF-anti-GST immune complexes, and inhibition was abrogated by preincubating cells with anti-Fc γ RIIB antibodies (Fig. 4E).

4. Discussion

This work is the first demonstration that Fc γ RIIB can inhibit the autonomous proliferation of cells transformed as a result of the expression of an oncogenic RTK. Using a combination of agonist anti-Kit antibodies and of blocking anti-Fc γ RIIB antibodies, we show that Fc γ RIIB-dependent negative regulation of Kit-mediated cell proliferation can control not only ligand-induced Kit-mediated proliferation, but also the growth factor-independent proliferation of Ba/F3 cells transformed by the expression of a constitutively active form of Kit. We also show that immune complexes which contain IgG antibodies, the natural ligands of Fc γ RIIB, and SCF, the natural ligand of Kit, can be used instead of anti-Kit antibodies to coaggregate the two receptors and inhibit growth factor-dependent and -independent cell proliferation.

We found previously that Kit-mediated proliferation of mouse mast cells can be negatively regulated by coaggregating Kit with

Fc γ RIIB [10]. Mast cells coexpress constitutively Kit and Fc γ RIIB. We show here that Fc γ RIIB can also inhibit Kit-dependent proliferation of a murine pro-B cell line. The IL-3-dependent pro-B cells Ba/F3 express neither Kit nor Fc γ RIIB. IL-3 could however be substituted for SCF, GST-SCF or anti-Kit antibodies to promote the proliferation of Ba/F3 cells when stably expressing w.t. Kit. The coligation of Kit with Fc γ RIIB by IgG immune complexes inhibited Kit-dependent proliferation of Ba/F3-Kit-IIB cells. Inhibition was abrogated by blocking Fc γ RIIB, and it required the intracytoplasmic domain of Fc γ RIIB. Fc γ RIIB-dependent negative regulation of Kit-mediated cell proliferation can therefore potentially affect the growth of a variety of cells that coexpress Kit and Fc γ RIIB, including B cell precursors at the time when they express Kit [18].

When expressing a mutant form of Kit bearing a juxtamembrane deletion (Kit Δ_{JM}) that induces the constitutive aggregation of the receptor [13], Ba/F3 cells proliferated in the absence of added growth factors, and their autonomous proliferation was unaffected by IL-3, SCF, GST-SCF or anti-Kit antibodies. When Ba/F3-Kit Δ_{JM} cells were transfected with Fc γ RIIB, their autonomous proliferation could be inhibited by IgG immune complexes which coaggregated Kit Δ_{JM} with Fc γ RIIB. Fc γ RIIB affected similarly the incorporation of thymidine measured at 24 h and the increase in cell numbers recovered after 3 days in culture. Inhibition of both thymidine incorporation and actual cell proliferation was not seen when Kit Δ_{JM} was coaggregated by the same ligands with intracytoplasmic domain-deleted Fc γ RIIB. Growth factor-independent cell proliferation could therefore be inhibited when Kit Δ_{JM} was coaggregated with Fc γ RIIB bearing an intact intracytoplasmic domain.

Although not necessary for triggering proliferation signals in Ba/F3-Kit Δ_{JM} cells, immune complexes that could coaggregate

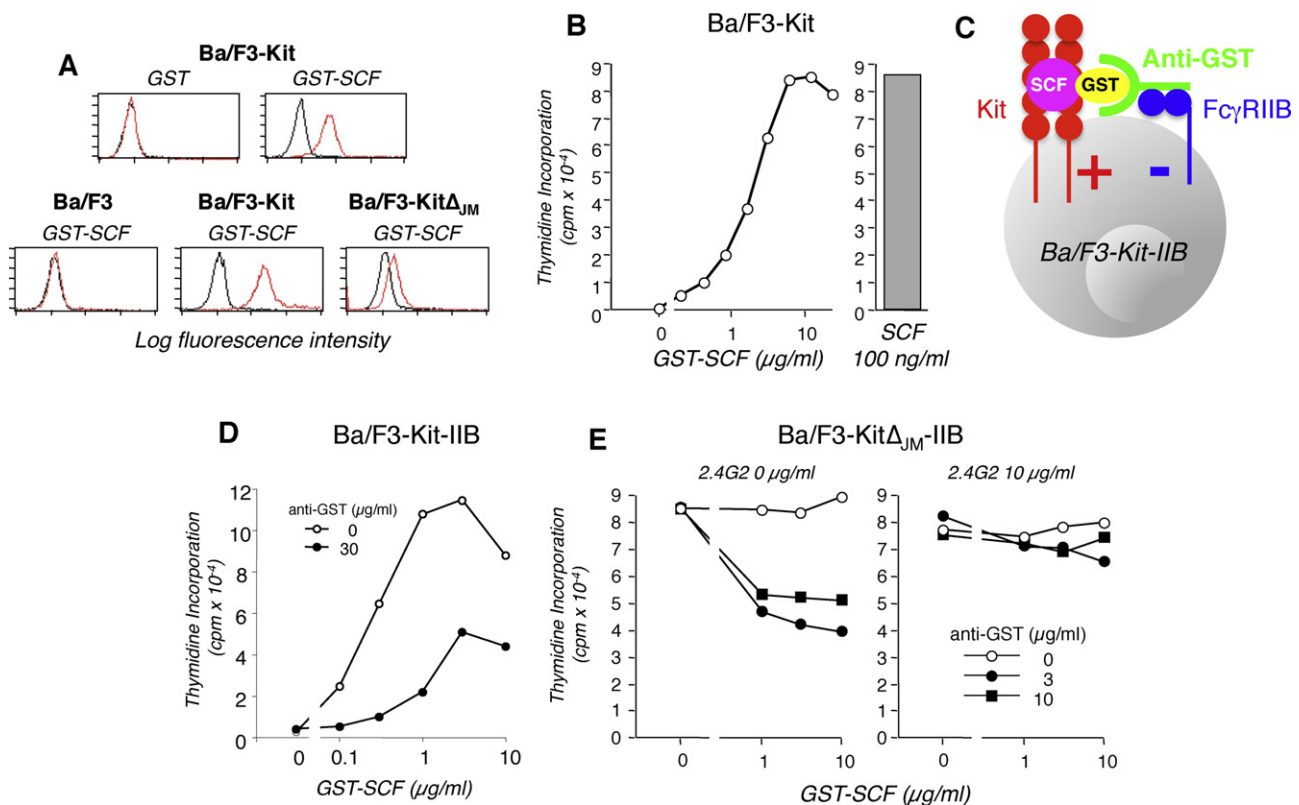


Fig. 4. GST-SCF-anti-GST immune complex-induced inhibition of ligand-dependent and ligand-independent Kit-mediated proliferation of Ba/F3-Kit cells and Ba/F3-Kit Δ_{JM} cells by Fc γ RIIB. (A) Binding of GST-SCF to Ba/F3-Kit and Ba/F3-Kit Δ_{JM} cells. Cells were successively incubated with GST or GST-SCF for 1 h at 0 °C, with anti-GST mouse polyclonal antibodies for 1 h at 0 °C, and with FITC-GAM F(ab')₂ for 30 min at 0 °C. Red histograms: cells incubated with GST-SCF, anti-GST mouse polyclonal antibodies and FITC-GAM F(ab')₂; dotted histograms: cells incubated with GST-SCF and FITC-GAM F(ab')₂ only. (B) GST-SCF-induced thymidine incorporation. Ba/F3-Kit cells were incubated with indicated concentrations of GST-SCF or 100 ng/ml rSCF for 24 h at 37 °C. Thymidine was added and incorporation was measured 4 h later. (C) Schematic representation of the cis interactions of GST-SCF-anti-GST immune complexes with Kit and Fc γ RIIB. (D) GST-SCF-anti-GST immune complex-induced thymidine incorporation in Ba/F3-Kit-IIB1 cells. Cells were incubated with the indicated concentrations of GST-SCF, complexed with rabbit anti-GST antibodies (closed circles) or not complexed (open circles) for 24 h at 37 °C. Thymidine was added and incorporation was measured 4 h later. (E) Inhibition of thymidine incorporation by GST-SCF-anti-GST immune complexes. Ba/F3-Kit Δ_{JM} -B1 cells, preincubated for 1 h at 37 °C with 2.4G2 (right panel) or without (left panel), were incubated with immune complexes made of the indicated concentrations of GST-SCF and rabbit anti-GST antibodies for 24 h at 37 °C. Thymidine was added and incorporation was measured 4 h later.

Kit Δ_{JM} with Fc γ RIIB were required for Fc γ RIIB to trigger inhibition signals in Ba/F3-Kit Δ_{JM} -IIB cells. Inhibition indeed requires first that Fc γ RIIB be tyrosyl-phosphorylated by a protein tyrosine kinase that is provided by the cell-activating receptor [15]. Upon coaggregation with Kit Δ_{JM} , Fc γ RIIB can be phosphorylated either by the constitutively active RTK or by protein tyrosine kinases that are recruited in the signaling complex. Since SHIP1, the effector of Fc γ RIIB-dependent inhibition of Kit-mediated mast cell proliferation [11], affects signaling events that stand downstream to Kit phosphorylation, it can be expected to affect the same events triggered by Kit Δ_{JM} . These results altogether indicate that Fc γ RIIB-dependent negative regulation is not restricted to ligand-induced proliferation mediated by normal Kit. It can also affect ligand-independent autonomous proliferation mediated by an oncogenic Kit mutant.

Interestingly, biotin-ACK2-anti-biotin immune complexes could be substituted for GST-SCF-anti-GST IgG immune complexes to inhibit cell proliferation. These complexes combine the physiological ligands of Fc γ RIIB and Kit. GST-SCF bound specifically to Kit-expressing cells and, although higher molar concentrations were required, it triggered comparable levels of thymidine incorporation in Ba/F3-Kit cells as rSCF. Noticeably, GST-SCF can aggregate Kit without requiring that Fc γ RIIB be blocked prior to stimulation. Both Kit ligand-induced proliferation of Ba/F3-Kit-IIB cells and Kit ligand-independent proliferation of Ba/F3-Kit Δ_{JM} -IIB cells were inhibited by GST-SCF-anti-GST immune complexes, and inhibition was abrogated by blocking Fc γ RIIB.

On the basis of this observation, anti-RTK antibodies or immune complexes capable of co-engaging RTK with Fc γ RIIB may enable new therapeutic interventions in cancer. Therapeutic antibodies against molecules expressed by tumor cells have been mostly used either to generate pro-apoptotic signals in tumor cells or to engage activating receptors in *trans*, aiming at eliciting antibody-dependent cell mediated cytotoxicity to kill transformed cells. We provide here the proof of concept that antibodies against a RTK can be used not to kill but to inhibit the constitutive proliferation of transformed cells when co-engaging the inhibitory receptor Fc γ RIIB in *cis*. Importantly, anti-Kit antibodies could be replaced by SCF-containing immune complexes made with antibodies of an unrelated specificity. On the basis of this experimental model, similar immune complexes might be tailored for specific tumors expressing Fc γ RIIB, such as mastocytomas, B cell malignancies or melanomas, using the appropriate recombinant growth factor associated with an unrelated protein capable of eliciting an IgG antibody response.

Conflict of interest

The authors declare to have no financial conflict of interest.

Acknowledgments

This investigation was initiated while OM and MD were at Inserm U.255, directed by Prof. W. H. Fridman, Institut Curie,

Paris, France. We are grateful to Dr. J.-P. Attal (Inserm U.255) for fusion proteins, and to Dr. P. Dubreuil (Institut de Cancérologie et d'Immunologie de Marseille, France) for Ba/F3-Kit, Ba/F3-Kit Δ _{JM} and X63-IL-3 cells. This work was supported in part by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) and the Institut Pasteur. OM is an Inserm Ingénieur d'Etudes. MD is a Directeur de Recherche de classe exceptionnelle (DRE) at Inserm and a Chef de Laboratoire at Institut Pasteur.

References

- [1] Qiu F, Ray P, Brown K, Baker PE, Jhanwar S, Ruddle FH, et al. Primary structure of c-kit: relationship with the CSF-1/PDGF receptor tyrosine kinase family—oncogenic activation of v-kit involves the deletion of extracellular domain and C terminus. *EMBO J* 1988;7:1003–10.
- [2] Salim K, Bottomley MJ, Querfurth E, Zvelebil MJ, Gout I, Scaife R, et al. Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase. *EMBO J* 1996;15:6241–50.
- [3] Roskoski Jr R. Signaling by Kit protein-tyrosine kinase—the stem cell factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;337:1–13.
- [4] Orfao A, Garcia-Montero AC, Sanchez L, Escribano L. Recent advances in the understanding of mastocytosis: the role of KIT mutations. *Br J Haematol* 2007;138:12–30.
- [5] Dubreuil P, Rottapel R, Reith AD, Forrester L, Bernstein A. The mouse W/c-kit locus. A mammalian gene that controls the development of three distinct cell lineages. *Ann N Y Acad Sci* 1990;599:58–65.
- [6] Kitamura Y, Hirota S, Morii E, Nishida T. Gain-of-function mutations of c-kit in human diseases. In: Marone G, Lichtenstein LM, Galli SJ, editors. *Mast cells and basophils*. Academic Press; 2000. p. 21–9.
- [7] Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998;279:577–80.
- [8] Metcalfe DD. Mast cells and mastocytosis. *Blood* 2008;112:946–56.
- [9] Ogawa M, Matsuzaki Y, Nishikawa S, Hayashi S, Kunisada T, Sudo T, et al. Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *J Exp Med* 1991;174:63–71.
- [10] Malbec O, Fridman WH, Daéron M. Negative regulation of c-kit-mediated cell proliferation by FcγRIIB. *J Immunol* 1999;162:4424–9.
- [11] Malbec O, Schmitt C, Bruhns P, Krystal G, Fridman WH, Daéron M. The SH2 domain-containing Inositol 5-Phosphatase SHIP1 mediates cell cycle arrest by FcγRIIB. *J Biol Chem* 2001;276:30381–91.
- [12] Isnardi I, Bruhns P, Bismuth G, Fridman WH, Daeron M. The SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase SHIP1 is recruited to the intracytoplasmic domain of human FcγRIIB and is mandatory for negative regulation of B cell activation. *Immunol Lett* 2006;104:156–65.
- [13] De Sepulveda P, Okkenhaug K, La Rose J, Hawley RG, Dubreuil P, Rottapel R. Socs1 binds to multiple signaling proteins and suppresses steel factor-dependent proliferation. *EMBO J* 1999;18:904–15.
- [14] Casteran N, Beslu N, Lecocq E, Gomez S, Dubreuil P. Specific common activities of the FLT3 and KIT tyrosine kinase receptors revealed by the use of cultured mast cells. *Leukemia* 1998;12:1089–98.
- [15] Malbec O, Fong D, Turner M, Tybulewicz VJ, Cambier JC, Fridman WH, et al. FcεRI-associated lyn-dependent phosphorylation of FcγRIIB during negative regulation of mast cell activation. *J Immunol* 1998;160:1647–58.
- [16] Unkeless JC. Characterization of monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors. *J Exp Med* 1979;150:580–96.
- [17] Ogawa M, Matsuzaki Y, Nishikawa S, Hayashi S, Kunisada T, Sudo T, et al. Expression and function of c-kit in hematopoietic cells. *J Exp Med* 1991;174:63–71.
- [18] Busslinger M. Transcriptional control of early B cell development. *Annu Rev Immunol* 2004;22:55–79.

Discussion

Ce travail a permis de montrer pour la première fois que les RFcγIIB sont capables d'inhiber la prolifération autonome de cellules transformées, ici par une mutation dans le domaine transmembranaire de Kit qui conduit à une dimérisation constitutive que l'on retrouve dans des tumeurs gastro-intestinales¹⁸³. Dans la lignée pro-B BaF/3, qui n'exprime pas constitutivement Kit mais nécessite de l'IL-3 pour sa croissance, on peut remplacer l'IL-3 par le SCF quand les cellules sont transfectées avec Kit. On induit une prolifération indépendante de facteur de croissance quand on transfecte un mutant de Kit, portant une délétion dans le domaine transmembranaire. Ce mutant déclenche l'activation de la PI3K en absence de ligand, ce qui explique qu'il soit sensible à l'inhibition induite par les RFcγIIB dépendante de SHIP1. De nombreux autres mutants de Kit existent, il s'agit de mutants dans le domaine kinase de Kit qui induisent une activation constitutive de Kit et qui sont retrouvés dans les mastocytoses¹⁸⁴. Ces mutants activent aussi la PI3K et sont donc susceptibles d'être sensibles à l'inhibition médiée par les RFcγIIB. Une confirmation de cette inhibition permettrait d'étendre les possibilités de l'inhibition par les RFcγIIB. D'autres récepteurs de facteurs de croissance présentent des mutations qui les rendent oncogéniques¹⁸⁵. C'est le cas du récepteur pour le PDGF (PDGF-R), du récepteur pour le M-CSF ou encore de FLT3. Ces récepteurs exprimés à la surface des cellules hématopoïétiques sont également susceptibles d'être régulés négativement par les RFcγIIB et pourraient permettre de contrôler la croissance des cellules qui les expriment. Des mutations du PDGF-R sont retrouvées dans des leucémies myéloïdes chroniques et des mutations de FLT-3 sont retrouvées dans des leucémies myéloïdes aiguës¹⁸⁶. L'inhibition induite par les RFcγIIB pourrait être utilisée dans de nombreuses pathologies cancéreuses.

Dans cette étude, nous avons utilisé différents réactifs. Tout d'abord nous avons utilisé des anticorps anti-Kit agonistes que nous avons utilisés pour démontrer que les RFcγIIB sont capables d'inhiber la prolifération des mastocytes normaux de souris dérivés de moëlle osseuse induite par Kit¹⁸¹. Ces anticorps permettent de coliguer Kit et les RFcγIIB et on peut bloquer cette coagrégation par des anticorps bloquant anti-RFcγIIB. Ici, nous avons utilisé également des complexes formés par les ligands naturels de Kit et des RFcγIIB, à savoir le SCF et les IgG. Pour cela, nous avons construit une protéine de fusion GST-SCF. Cette protéine de fusion est capable de remplacer le SCF mais doit être utilisée plus concentrée que le SCF pour induire la même prolifération. L'utilisation d'anticorps thérapeutiques pourrait

être employée afin d'inhiber directement la croissance des cellules tumorales et pas seulement de cibler sur elles des effecteurs cytotoxiques de la réponse immune.

DISCUSSION

Mon travail de thèse a permis d'étendre les propriétés immunorégulatrices des RFcγIIB. Ainsi, quand on coagrège un récepteur activateur avec les RFcγIIB, on induit non seulement l'inhibition de l'activation induite par ce récepteur mais également l'inhibition de l'activation induite par des récepteurs qui sont coexprimés par la même cellule sans être coagrégés avec les RFcγIIB. Nous avons appelé cette nouvelle propriété des RFcγIIB la trans-inhibition. La trans-inhibition peut potentiellement être induite par tous les récepteurs qui engagent une kinase susceptible de phosphoryler les RFcγIIB. Elle peut affecter les récepteurs dont l'activation dépend de la PI3K et induit la production de PI(3,4,5)P3. En effet, l'effecteur de la trans-inhibition est l'inositol phosphate phosphatase SHIP1 qui déphosphoryle le PI(3,4,5)P3. La trans-inhibition n'est pas réduite à l'activation des cellules et la dégranulation ou la production de molécules néosynthétisées comme les cytokines mais peut affecter également la prolifération de cellules normales. De plus, nous avons pu inhiber la croissance *in vivo* d'une tumeur dépendante d'un oncogène viral (Abl) après coagrégation de Kit et des RFcγIIB.

I. La trans-inhibition dans l'histoire des capacités inhibitrices des RFcγIIB

En 1968, Henry et Jerne ont démontré que la réponse immunitaire anti-Globules Rouges de Mouton (GRM) pouvait être inhibée par des IgG anti-GRM mais pas par des fragments F(ab')₂¹⁸⁷. En 1971, Sinclair a démontré que la coligation du BCR avec les RFc exprimés par les lymphocytes B régulait négativement l'activation de ces cellules¹⁸⁸. D'autres expériences ont été réalisées *in vivo* et ont montré que cette inhibition des lymphocytes B par les IgG était effective aussi chez l'animal. Ceci fut interprété comme un rétrocontrôle de la production des anticorps. Cette inhibition a été montrée être dépendante des RFcγIIB qui ont été clonés dans la fin des années 1980^{189,190,191,192}. Des délétants du domaine intracytoplasmique des RFcγIIB ont été réalisés, mettant en évidence l'importance d'une séquence de treize acides-aminés contenant un résidu tyrosine dans l'inhibition de l'activation des lymphocytes B¹⁹³. L'expression des RFcγIIB n'étant pas restreinte aux lymphocytes B, nous avons recherché les capacités inhibitrices des RFcγIIB sur l'activation

induite dans d'autres cellules par les autres récepteurs à ITAM. Nous avons démontré qu'effectivement les RFcγIIB sont capables d'inhiber non seulement l'activation des lymphocytes B induite par le BCR, mais également l'activation des mastocytes induite par les RFcεI et l'activation des lymphocytes T induite par le TCR. En effet, la coligation du TCR et des RFcγIIB dans les lignées tumorales de lymphocytes T, RMA et 2B4, inhibe la production d'IL-2. D'autre part les RFcγIIB inhibent l'activation d'une lignée tumorale de mastocytes, RBL, stimulée par des récepteurs chimériques recombinants contenant les domaines intracytoplasmiques de la sous-unité FcRγ des RfC ou la sous-unité TCRζ du TCR. Ainsi, nous avons montré que les RFcγIIB contrôlent l'activation des cellules induite par tous les immunorécepteurs à ITAM. Les capacités inhibitrices des RFcγIIB ne sont donc pas restreintes à un rétrocontrôle de la production des anticorps par les lymphocytes B ¹⁹⁴. Certains RFcγIIB sont également capables d'internaliser des antigènes (endocytose et phagocytose). L'isoforme RFcγIIB2, qui contient 47 acides-aminés dans son domaine intracytoplasmique, peut internaliser l'antigène complexé à des IgG. En revanche, l'isoforme RFcγIIB1, qui contient 94 acides-aminés dans son domaine intracytoplasmique, inhibe l'internalisation ^{195,196}. Les RFcγIIB1 sont également capables de se regrouper en amas de récepteurs à un pôle de la cellule quand ils sont agrégés ¹⁹⁷. Ce sont des caps ou clusters.

Les RFcγIIB ne possèdent pas de motif d'activation et sont donc incapables de transduire des signaux d'activation conduisant à une réponse biologique comme la dégranulation ou la sécrétion de cytokines dans les mastocytes ^{198,199}. La séquence de treize acide-aminés indispensable à l'inhibition de l'activation est très conservée entre les RFcγIIB murins et les RFcγIIB humains. Dans cette séquence, nous avons identifié un motif d'inhibition qui a été nommé ITIM pour Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif ¹⁷³. Cette séquence a ensuite été observée dans un autre récepteur inhibiteur, les KIRL exprimés par les cellules NK ^{200,201}. La tyrosine de l'ITIM doit être suivie en position +3 par une leucine, une isoleucine ou une valine. La définition du motif ITIM fut plus tard complétée en décrivant l'importance du résidu en position Y-2 qui, bien que moins conservé, est souvent une leucine, une isoleucine ou une valine ¹⁷². La régulation de l'activation cellulaire par les RFcγIIB ne peut être mise en œuvre que si les RFcγIIB sont phosphorylés sur la tyrosine de l'ITIM. Cette phosphorylation est induite par la coligation des récepteurs à ITAM et des RFcγIIB qui permet à la kinase de la famille src associée aux récepteurs activateurs de phosphoryler non seulement les tyrosines des ITAM mais aussi la tyrosine de l'ITIM des

RFcγIIB¹⁷⁰. Pour mettre en évidence ce mécanisme, nous avons utilisé des mastocytes dérivés de souris déficientes pour la kinase de la famille src, Lyn, ou pour la kinase Syk. Nous avons montré que la phosphorylation des RFcγIIB était détectable dans les mastocytes Syk^{-/-} mais pas dans les mastocytes Lyn^{-/-}¹⁷⁰. Les propriétés inhibitrices des RFcγIIB reposent sur leur capacité de recruter l'inositol phosphate phosphatase à domaine SH2, SHIP1¹⁶⁸. *In vitro*, un peptide constitué de la séquence de l'ITIM des RFcγIIB phosphorylé peut s'associer aux quatre phosphatases à domaine SH2, les deux tyrosine phosphatases SHP-1 et SHP-2 et les deux inositol phosphate phosphatases SHIP1 et SHIP2¹⁶⁷. Cependant seules les inositol phosphate phosphatases coprécipitent avec les RFcγIIB phosphorylés dans les cellules. Cette différence est due à une moins forte densité de phosphorylation des RFcγIIB dans les cellules comparée à celle de peptides utilisés *in vitro*. Ainsi les RFcγIIB ne peuvent pas fixer SHP-1 car leur degré de phosphorylation ne permet pas de s'associer avec les deux domaines SH2 de SHP-1, condition requise pour que le recrutement soit stable et détectable¹⁷¹. Dans des mastocytes dérivés de souris SHIP1^{-/-}, l'inhibition de l'activation des RFcεI par les RFcγIIB est complètement abolie. Par contre, l'inhibition est conservée dans des BMDC dérivés de souris SHP-1^{-/-} ou motheaten²⁰². Ces deux observations indiquent que c'est bien SHIP1 et pas SHP-1 qui est responsable de l'inhibition induite par les RFcγIIB.

SHIP1 est exprimée dans toutes les cellules hématopoïétiques et dégrade le PI(3,4,5)P3, produit de la PI3K, en PI(3,4)P2. En absence de PI(3,4,5)P3, les molécules de signalisation à domaine PH ne peuvent plus être transloquées à la membrane plasmique, et ainsi la cascade de signaux intracellulaires conduisant à la réponse calcique et la dégranulation ainsi qu'à la transcription des gènes comme les gènes de cytokines est inhibée^{203,170}. SHIP1 peut également inhiber la voie ras grâce à ses propriétés de molécule adaptatrice. En effet, une fois transloquée à la membrane, SHIP1 est phosphorylée, vraisemblablement par la kinase Lyn, et recrute alors l'adaptateur cytosolique Dok. Dok fixe RasGAP qui peut activer la transformation de Ras-GTP en Ras-GDP et inhiber la phosphorylation des MAPK Erk 1-2¹⁷⁸. La phosphorylation des MAPK JNK et p38 est probablement inhibée par le défaut de recrutement du facteur d'échange Vav, une fois le PI(3,4,5)P3 dégradé.

Les RFcγIIB sont également capables de réguler négativement la prolifération cellulaire induite par les Receptor Tyrosine Kinase (RTK) comme Kit exprimé notamment par les mastocytes. L'agrégation de Kit par des anticorps agonistes anti-Kit complexés sont

capables d'induire la prolifération de mastocytes dont les RFcγIIB sont saturés par des anticorps bloquant. En absence de ces anticorps bloquants, les RFcγIIB et Kit sont coagrégés ce qui entraîne une inhibition profonde de la prolifération induite par les complexes immuns anti-Kit. Cette inhibition est perdue dans des mastocytes dérivés de souris déficientes pour les RFcγIIB²⁰⁴ ce qui indique que la diminution de la prolifération est bien une conséquence de l'engagement des RFcγIIB. L'inhibition bloque le cycle cellulaire en phase G1 en diminuant la synthèse des cyclines D2, D3 et A. L'inhibition de la prolifération induite par les RFcγIIB est perdue dans des mastocytes dérivés de souris SHIP1^{-/-} ce qui indique que l'inhibition de la prolifération, comme l'inhibition de l'activation, repose sur le recrutement de SHIP1. D'autre part, l'inhibition de la prolifération peut être mimée par un récepteur chimérique composé des domaines extracellulaire et transmembranaire des RFcγIIB et d'un domaine intracytoplasmique composé du domaine phosphatase de SHIP1¹⁸¹. L'inhibition induite par les RFcγIIB n'est donc pas restreinte à l'activation cellulaire.

Au cours de ma thèse, j'ai montré que les RFcγIIB peuvent également inhiber la prolifération autonome d'une cellule transformée. Les cellules lymphoïdes BaF/3, dont la prolifération dépend de l'IL-3, peuvent être rendues indépendantes de facteurs de croissance en les transfectant avec un récepteur Kit muté. En effet, la transfection de Kit qui porte une délétion dans le domaine transmembranaire induisant une dimérisation constitutive de Kit entraîne une prolifération autonome des cellules BaF/3. Si des RFcγIIB sont coexprimés dans ces cellules transformées et qu'ils sont co-agrégés avec les Kit mutés par des anticorps anti-Kit complexés, la prolifération autonome est fortement inhibée. Cette inhibition peut également être induite par la co-ligation par des complexes immuns composés des ligands naturels de Kit et des RFcγIIB, à savoir le SCF et les IgG. Nous avons en effet produit une molécule recombinante GST-SCF et utilisé des anticorps anti-GST pour former les complexes immuns¹⁸². Ce travail étend les propriétés inhibitrices des RFcγIIB à la prolifération en absence de facteur de croissance et leur ouvre des possibilités d'intervenir dans des pathologies cancéreuses.

Au cours de ma thèse, j'ai également démontré que la co-ligation des RFcεI et des RFcγIIB inhibe non seulement l'activation induite par les RFcεI co-ligués mais aussi l'activation induite par d'autres RFcεI adjacents et non co-ligués avec les RFcγIIB. La description de cette trans-inhibition étend les propriétés inhibitrices des RFcγIIB et révèle des mécanismes d'inhibition capables d'affecter des récepteurs qui ne sont pas co-ligués²⁰⁵. La

trans-inhibition repose sur le recrutement de SHIP1 et peut s'effectuer en trans sur un seul type de récepteur. C'est le cas des RFcεI qui peuvent engager SHIP1 et qui en excès de ligand s'autorégulent. L'inhibition induite par un excès d'antigène sur un groupe de RFcεI inhibe également la réponse d'un autre groupe de RFcεI agrégés par une concentration optimale de ligand. La trans-inhibition est spécifique des RFcγIIB mais n'a pas un besoin absolu des RFcγIIB car elle peut être induite en excès d'antigène. Tous les récepteurs sensibles à la cis-inhibition pourraient éventuellement inhiber les signaux d'activation en excès de ligand. Il serait intéressant de réaliser des expériences en excès de SCF dans les mastocytes ou en excès d'antigène dans les lymphocytes B.

Les RFcγIIB amplifient la régulation autonome des récepteurs activateurs¹⁸⁰. Ainsi la coagrégation des RFcεI avec les RFcγIIB inhibe les réponses cellulaires induites par les IgE. Cette co-régulation est de la cis-inhibition, au même titre que la régulation autonome des RFcεI. Elle peut également s'effectuer en trans sur un groupe de récepteurs qui utilisent le PI(3,4,5)P3 et qui ne sont pas coagrégés aux RFcγIIB. La cis-inhibition est la régulation d'un récepteur sur l'autre au cours d'une co-ligation. La co-ligation est requise pour permettre la phosphorylation du motif inhibiteur par les kinases associées au récepteur activateur, ce qui permet le recrutement de SHIP1. La trans-inhibition s'effectue quand la cis-inhibition déborde du signalosome concerné et que l'inhibition affecte les signalosomes adjacents en absence de ligand commun. La trans-inhibition peut affecter la signalisation induite par plus de récepteurs que la cis-inhibition.

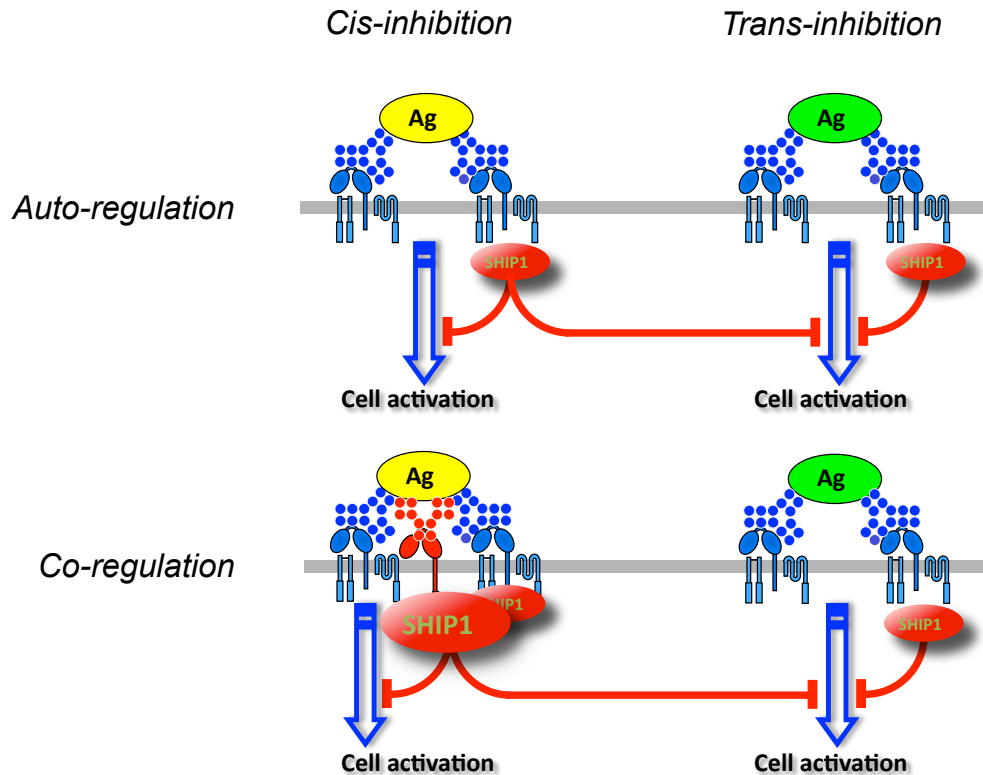


Figure 16

Les différentes inhibitions dépendantes de SHIP1 dans les mastocytes

Ce schéma récapitule les différentes possibilités d'inhibition. L'auto-régulation implique un seul type de récepteurs et s'exerce en excès d'antigène. Elle peut affecter le groupe de récepteurs hyperagrégés (cis-inhibition) ou un autre groupe de récepteurs stimulés en même temps même par une concentration optimale d'antigène (trans-inhibition). La co-régulation implique l'intervention des RFcγIIB qui sont co-ligués avec les RFcεI (cis-inhibition). Le déclenchement de la cis-inhibition entraîne une trans-inhibition sur les autres récepteurs activateurs qui ne sont pas co-ligués avec les RFcγIIB (trans-inhibition).

II. Déclenchement de la trans-inhibition

La trans-inhibition peut être induite par la coagrégation des RFcγIIB avec les RFcεI. Dans ce cas, c'est la kinase de la famille src Lyn qui phosphoryle l'ITIM des RFcγIIB. La trans-inhibition peut également être induite par la coagrégation des RFcγIIB avec Kit. Dans ce cas, on peut imaginer que le domaine kinase de Kit lui-même ou une kinase induite lors de la cascade d'activation déclenchée par la dimérisation de Kit soit responsable de la

phosphorylation des RFcγIIB¹⁷⁹. Ainsi le déclenchement de la trans-inhibition n'est pas restreint à un seul type de récepteur. Elle peut être induite par des récepteurs contrôlant l'activation cellulaire ou la prolifération cellulaire. Cependant d'autres récepteurs sont susceptibles d'induire la trans-inhibition. C'est le cas des récepteurs dont la co-ligation avec les RFcγIIB inhibe les signaux induits par ce récepteur, c'est à dire des récepteurs sensibles à la cis-inhibition. Les TLR, qui reconnaissent des structures bactériennes, sont inhibés par les RFcγIIB²⁰⁶. En effet, l'activation de cellules dendritiques via TLR4 par du LPS en présence de complexes immuns inhibe la maturation phénotypique de ces cellules dendritiques et inhibe la prolifération induite de lymphocytes T. L'importance d'anticorps pathogéniques et du LPS a été démontrée dans l'arthrite rhumatoïde. Les patients souffrant d'arthrite rhumatoïde débutante ont une expression de RFcγIIB élevée comparée à des patients souffrant d'arthrite active²⁰⁶. Le TLR4 sensible à la cis-inhibition est donc susceptible d'induire la trans-inhibition. Dans les cellules endothéliales, la C-Reactive Protein (CRP) inhibe la production d'oxyde nitrique (NO) par la NO synthétase (eNOS) induite par l'insuline²⁰⁷, l'œstrogène E2²⁰⁸, les HDL (High density lipoprotein)²⁰⁹. La CRP, dont la production est corrélée avec un dysfonctionnement endothélial et un risque augmenté de maladie cardiovasculaire, se fixe sur les RFcγIIB et déclenche l'inhibition par l'intermédiaire de SHIP1²⁰⁷. Dans les lymphocytes B, la co-ligation du BCR et des RFcγIIB inhibe la migration induite par le Stromal-derived Factor 1 (SDF-1) via CXCR4²¹⁰. Ce phénomène peut être expliqué par l'induction de la trans-inhibition.

La trans-inhibition peut être induite par la co-ligation des RFcεI ou de Kit et des RFcγIIB mais n'est pas induite par la co-ligation des RFcγIIIA et des RFcγIIB chez la souris ou des RFcγIIA et des RFcγIIB chez l'homme par des immuns complexes (Malbec, résultats supplémentaires). Nous avons obtenu ces résultats dans des conditions expérimentales précises impliquant des complexes immuns particuliers qui combinent certaines doses d'anticorps et d'antigène. Ces conditions expérimentales n'étaient peut-être pas efficaces pour déclencher la trans-inhibition. Cependant, cette distinction est un résultat surprenant puisque que les RFcγIIIA partagent les mêmes sous-unités de signalisation avec les RFcεI et que les RFcγIIA contiennent aussi un ITAM, bien qu'il soit particulier. Le déclenchement des cascades de signalisation induites par les RFcγIIIA et les RFcγIIA engagent elles aussi l'intervention de kinases de la famille src²¹¹. La coagrégation de ces récepteurs avec les RFcγIIB devrait donc pouvoir permettre la phosphorylation de la tyrosine de l'ITIM et déclencher la trans-inhibition. Dans des travaux antérieurs, nous avons d'ailleurs montré que

les RFcγIIB pouvaient inhiber l'activation cellulaire induite par les RFcγIIIA et par les RFcγIIA¹⁷³. Ainsi, on peut penser que ce n'est pas la phase initiale qui fait défaut puisque la cis-inhibition fonctionne avec ces récepteurs activateurs. Une hypothèse permettant d'expliquer ce défaut serait la présence dans les domaines intracellulaires de la chaîne α des RFcγIIIA et des RFcγIIA de séquences ne permettant pas à la trans-inhibition de s'exercer, comme une différence d'adressage dans des compartiments intracellulaires spécifiques. Dans des fibroblastes, les RFcγIIA et les RFcγIIB2 internalisent tous les deux des complexes immuns par endocytose dépendante de clathrine. Cependant, les RFcγIIA sont retrouvés dans des lysosomes tandis que les RFcγIIB sont recyclés à la surface des cellules²¹², indiquant des devenir différents à l'intérieur des cellules. Les résultats différents obtenus entre les RFcγIIIA et les RFcεI ne permettent donc pas de généraliser le déclenchement de la trans-inhibition à tous les récepteurs à ITAM.

Différents récepteurs membranaires sont susceptibles d'être contrôlés par la trans-inhibition. C'est le cas des récepteurs dont la signalisation induit l'activation de la PI3K et dépend de la production de PI(3,4,5)P3, comme les récepteurs de chimiokines régulant la migration cellulaire. Les lymphocytes B et les neutrophiles²¹³ expriment des RFcγIIB et SHIP1 ce qui permet d'envisager un contrôle de la migration par des IgG par cis-inhibition, auto-régulation ou trans-inhibition. Dans les lymphocytes T, la migration semble beaucoup moins sous le contrôle de la PI3K²¹⁴. Dans les neutrophiles, l'aldostérone augmente la production de VEGF (Vascular Endothelium Growth Factor) via la PI3K²¹⁵. Dans ces mêmes cellules, le fMLP (N-formyl-méthionyl-leucyl-phenylalanine) induit la production de superoxyde en activant la PI3K²¹⁶. Dans les fibroblastes, l'hormone thyroïdienne déclenche l'activation de la PI3K²¹⁷. Dans les ostéoblastes, l'ATP active la PI3K via les récepteurs P2Y₂ et induit la prolifération²¹⁸. Certaines intégrines peuvent potentiellement être la cible de la trans-inhibition. SHIP1 est en effet impliquée dans l'agrégation des plaquettes par la thrombine^{219,220}. Il serait intéressant de rechercher une inhibition de l'activation via ces récepteurs par des complexes immuns.

La trans-inhibition n'est pas restreinte à un récepteur défini contrairement à la cis-inhibition, à savoir le récepteur activateur qui est coagrégé aux RFcγIIB. La trans-inhibition peut inhiber une réponse biologique induite par un récepteur même en absence de ligand commun permettant la coagrégation avec les RFcγIIB. Ainsi les propriétés inhibitrices des RFcγIIB sont étendues à de nombreux récepteurs et à des fonctions variées de l'organisme. Le

seul pré-requis est l'expression de la phosphatase SHIP1 dont l'expression est strictement restreinte aux cellules hématopoïétiques. Cependant la trans-inhibition peut aussi s'appliquer en dehors du système immunitaire à condition que ces cellules expriment une inositol phosphate phosphatase comme SHIP2, qui a une expression plus ubiquitaire. SHIP2 dégrade le même substrat que SHIP1 et est capable d'induire la cis-inhibition dans les lymphocytes B quand le BCR est coagrégé aux RFcγIIB^{221,222}. SHIP2 doit pouvoir être l'effecteur de la trans-inhibition. SHIP2 est exprimé dans les cellules hématopoïétiques et en dehors du système immunitaire comme dans le foie, le cœur et le cerveau.

III. Mécanisme de la trans-inhibition

Le mécanisme de l'inhibition repose sur le recrutement de SHIP1 qui déphosphoryle le PI(3,4,5)P3. La molécule de PI(3,4,5)P3 est diffusible dans la membrane plasmique après sa synthèse. Une évidence de la diffusion du PI(3,4,5)P3 a été démontrée dans les lymphocytes T au niveau de la synapse avec les cellules dendritiques. En effet, une protéine de fusion GFP-PH-Akt relocalise et s'accumule dans l'espace où les membranes des deux cellules se touchent puis diffuse tout autour de la membrane plasmique en dehors de la synapse jusqu'à former un anneau membranaire²²³. Dans les lymphocytes B, la quantité de PI(3,4,5)P3 produite redescend sous le niveau basal quand le BCR est coligué avec les RFcγIIB²²⁴. Cela indique que les conséquences de l'inhibition induite par les RFcγIIB et le recrutement de SHIP1 affecte la quantité de PI(3,4,5)P3 de toute la cellule et pas seulement celle produite par l'agrégation du BCR. On peut donc imaginer que toute nouvelle molécule de PI(3,4,5)P3 synthétisée peut se retrouver au contact de SHIP1 recrutée à la membrane par les RFcγIIB phosphorylés et ainsi être rapidement dégradée. Cependant le recrutement de SHIP1 n'est peut-être pas suffisant bien que la trans-inhibition soit complètement levée dans des mastocytes déficients en SHIP1. En effet, les récepteurs activateurs RFcγIIIA et RFcγIIA sont sensibles à l'inhibition par les RFcγIIB et donc permettent l'engagement de SHIP1 mais sont incapables d'induire de la trans-inhibition dans les conditions expérimentales que nous avons utilisées.

Le déroulement exact des événements moléculaires de la trans-inhibition n'est pas précisément connu. Nous avons observé que le signalosome inhibiteur et le signalosome inhibé se rencontrent à l'intérieur de la cellule dans des endosomes. Ceci montre qu'ils peuvent agir l'un sur l'autre mais n'explique pas comment et en quoi.

Les RFcγIIB ne peuvent pas être remplacés par un autre récepteur à ITIM qui recruterait la tyrosine phosphatase SHP-1. Dans les cas d'une inhibition via SHP-1, les substrats déphosphorylés sont principalement les kinases de la famille src et les ITAM. Certains travaux identifient également LAT et SLP-76 comme substrats de SHP-1 dans les cellules NK¹⁵⁸. Ces événements sont restreints au signalosome engagé et ne peuvent diffuser dans la membrane pour atteindre les signalosomes adjacents. Ce type d'inhibition touche des événements de signalisation situés très en amont dans la cascade et donc très spécifiques du récepteur inhibé. Dans le cas de la cis-inhibition ou de la trans-inhibition induites par les RFcγIIB, la cible de l'inhibition se situe plus en aval dans la cascade de signalisation et est donc plus commune aux différents récepteurs engagés à un même moment dans la cellule. Ainsi l'inhibition dépendante de SHP-1 est plus locale que l'inhibition induite par SHIP1. Cette différence met en valeur le potentiel inhibiteur des RFcγIIB qui se retrouvent capable d'inhiber un large panel de récepteurs et de réponses biologiques.

La trans-inhibition affecte l'activation et la prolifération cellulaire induites par des récepteurs membranaires, comme les RFcεI et Kit. Dans le cas du mastocytome MMC-1, la trans-inhibition affecte les signaux induits par une molécule oncogénique intracellulaire. MMC-1 exprime une protéine de fusion Abelson (Abl) qui induit la prolifération de ces cellules en absence de facteur de croissance. La coagrégation de Kit et des RFcγIIB inhibe la prolifération autonome sous le contrôle de Abl. Cette molécule ne peut que difficilement être ciblée à la membrane de la cellule au contraire de toutes les autres molécules inhibées jusqu'à présent, à savoir des récepteurs membranaires. Ainsi la trans-inhibition permet de cibler des molécules inaccessibles par les molécules utilisées le plus souvent en immunothérapie des cancers, à savoir des anticorps qui fixent des structures exprimées à la surface des cellules cancéreuses. Certaines études visent à cibler des oncogènes cytoplasmiques en traversant la membrane des cellules mais cela reste très difficile. Des essais cliniques utilisant des virus s'emploient à cibler la voie PI3K ou la voie des MAPK²²⁵. Des matériaux capables de traverser les membranes par des mécanismes de phagocytose comme des nanoparticules peuvent également être utilisés²²⁶. Dans ce cas, les drogues cytostatiques sont enfermées dans

des sphères qui sont injectées par différentes voies d'administration. Des groupes ont développé des fragments d'anticorps capables de pénétrer dans les cellules qui peuvent cibler des protéines intracellulaires et transporter des drogues ou des enzymes ²²⁷.

IV. Conséquences de la trans-inhibition

Certains des événements inhibés par la trans-inhibition sont plus facilement explicables par l'intervention de SHIP1 que d'autres. La dégradation du PI(3,4,5)P3 par SHIP1 rend compte de l'inhibition de la voie calcique. En effet, sans PI(3,4,5)P3, le recrutement de la PLC- γ et de BTK à la membrane plasmique ne sont plus assurés. La production d'IP3 est donc diminuée voir abolie ce qui bloque la mobilisation des stocks de calcium intracellulaire et l'entrée de calcium extracellulaire ²²⁸. D'autre part, le recrutement de Vav n'est plus assuré ce qui conduit à l'inhibition de la phosphorylation des MAPK JNK et de p38 ¹⁷⁹. La dégradation du PI(3,4,5)P3 explique le défaut de phosphorylation de AKT qui est directement recrutée par le PI(3,4,5)P3 via son domaine PH ²²⁹. L'inhibition de ces événements n'est pas restreinte à la trans-inhibition. Les mêmes événements sont également inhibés par la cis-inhibition. Par contre, il est plus difficile de comprendre comment la trans-inhibition affecte la phosphorylation de Erk. Dans la cis-inhibition cette diminution de l'activation de Erk passe par le recrutement de RasGAP via Dok mais ce recrutement paraît difficilement diffusible comme le PI(3,4,5)P3 ¹⁷⁸. On doit alors imaginer que SHIP1 pourrait se déplacer à la membrane plasmique une fois recrutée par les RF γ IIB ou que d'autres molécules inhibitrices seraient mises en jeu dans la trans-inhibition.

La trans-inhibition est de courte durée dans les mastocytes de souris. En effet, parès deux heures de coagrégation, la cis-inhibition n'est plus capable d'affecter l'activation des mastocytes par un autre stimulus. La trans-inhibition est donc rapidement réversible chez la souris. Par contre, dans les basophiles humains, la trans-inhibition dure plusieurs jours, le nombre maximum de jours pendant lesquels on peut maintenir des basophiles humains *ex vivo* en culture et qui correspondent à la durée de vie des basophiles *in vivo*. Des différences peuvent expliquer ces résultats. Nous avons étudié deux espèces différentes et on compare deux types de cellules, des mastocytes de souris et des basophiles humains. Les mastocytes et les basophiles sont des cellules issues de progéniteurs distincts ^{230,231}. Ils expriment tous les deux des RF ϵ I. Ils sont situés dans des environnements différents que sont le sang pour les

basophiles et les muqueuses ou séreuses pour les mastocytes. Ces environnements peuvent jouer un rôle dans l'évolution d'une réponse dans les deux cellules. Dans les expériences que nous avons réalisé *in vitro*, les mastocytes de souris homogènes sont incubés dans du milieu de culture tandis que les basophiles humains sont incubés en présence de tous les autres PBMC. Il ne peut être exclu que les autres cellules sanguines humains contribuent à l'inhibition. D'autre part, dans les expériences de cinétique, nous avons examiné des réponses différentes à savoir la libération de β -hexosaminidase dans les mastocytes murins et l'uprégulation d'un marqueur d'activation membranaire, le CD203c, dans les basophiles humains²³². Il faudrait évaluer l'effet de la durée de la trans-inhibition sur d'autres types de réponses tels que la libération d'histamine dans les basophiles ou la production de cytokines dans les deux types de cellules.

V. La trans-inhibition en physiologie

5.1. La trans-inhibition dans le développement des mastocytes et des basophiles

J'ai réalisé mon travail de thèse dans des mastocytes de souris et des basophiles murins et humains.

Les mastocytes dérivent de précurseurs hématopoïétiques de la moëlle osseuse qui expriment le Récepteur à activité Tyrosine Kinase (RTK) Kit (ou CD117)²³³. Les progéniteurs des mastocytes immatures quittent la moëlle, circulent dans le sang et migrent vers les tissus périphériques, où ils achèvent leur maturation sous le contrôle du Stem Cell Factor (SCF), ligand de Kit²³³. Les basophiles proviennent d'un précurseur granulocytes-monocytes commun dans la moëlle osseuse. Ce précurseur peut se différencier en précurseurs d'éosinophiles, de basophiles ou de mastocytes. Les basophiles réalisent leur maturation dans moëlle osseuse et cette maturation dépend de l'expression du facteur de transcription GATA-2. Ils se retrouvent matures dans la circulation. Les basophiles ont une durée de vie assez courte donc pour maintenir une population en périphérie les basophiles sont régulièrement remplacés à partir de la moëlle osseuse²³⁴. La trans-inhibition pourrait intervenir au cours du développement des mastocytes et des basophiles et ainsi affecter leur nombre, leur phénotype ou encore leur localisation. SHIP1 a récemment été impliquée dans le développement des mastocytes muqueux et séreux²³⁵.

La trans-inhibition pourrait également réguler les mastocytes et les basophiles matures et affecter entre autres leurs réponses aux anticorps, aux facteurs de croissance, chimiokines et interleukines et aux composés bactériens. Dans ces deux types de cellules, la trans-inhibition pourra réguler de nombreuses réponses dépendant du PI(3,4,5)P3. Dans les mastocytes, les RFcγIIB régulent les signaux induits par les RFcεI, Kit et les TLR²³⁶. Les basophiles expriment également les RFcεI. Ils expriment aussi le récepteur pour l'IL-3²³⁷, important dans leur différenciation, le récepteur pour l'IL-33 et les TLR. Ces cellules sont de gros producteurs d'IL-4, sécrétion qui peut être inhibée par les RFcγIIB²³⁸.

5.2. La trans-inhibition dans les différents mastocytes

Différents types de mastocytes sont disponibles pour étudier leurs fonctions *in vitro*. Chez la souris, on peut différencier des mastocytes à partir des cellules de la moëlle osseuse en présence d'IL-3 seule ou avec du SCF, appelés les BMMC pour Bone Marrow-derived Mast cells. On peut également expandre en culture les mastocytes présents dans le péritoine en présence de SCF et obtenir plusieurs dizaines de millions de PCMC pour Peritoneal Cells-derived Mast Cells. Ces PCMC ont la particularité de répondre non seulement à une stimulation IgE plus antigène, mais aussi à une stimulation par des complexes immuns à IgG via leurs RFcγIIIA. J'ai démontré que cette fonctionnalité repose sur une utilisation moins efficace de SHIP1 ce qui conduit à une régulation négative via les RFcγIIB moins forte que dans les BMMC¹³⁴. Cependant la régulation négative via les RFcγIIB est déclenchée dans ces deux cellules, que ce soit la cis-inhibition ou la trans-inhibition (résultats non publiés). Différentes lignées tumorales de mastocytes murins sont également disponibles. La prolifération spontanée de la plupart d'entre elles est sous le contrôle d'un Kit muté, que ce soit une mutation ponctuelle dans le domaine kinase conduisant à une activation continue du récepteur ou une délétion d'une partie du domaine transmembranaire conduisant à une dimérisation constitutive. La lignée tumorale murine la plus utilisée est RBL pour Rat Basophilic Leukemia cells. Dans les mastocytes normaux dérivés de la moëlle osseuse ou du péritoine et dans la lignée tumorale RBL exprimant des RFcγIIB recombinants de souris, nous avons pu mettre en évidence la trans-inhibition²⁰⁵. La trans-inhibition n'est donc pas restreinte aux cellules normales ou tumorales mais peut s'exercer dans les BMMC, les PCMC et dans RBL.

5.3. La trans-inhibition dans les lymphocytes B après coagrégation du BCR et des RFcγIIB

En dehors des mastocytes, les RFcγIIB sont notamment exprimés par les lymphocytes B et inhibent l'activation via le BCR quand ils sont coagrégés avec le BCR¹⁹³. Le mécanisme de l'inhibition de l'activation des lymphocytes B par les RFcγIIB est le même que dans les mastocytes avec la phosphorylation de la tyrosine de l'ITIM, le recrutement de SHIP1, la dégradation du PI(3,4,5)P3 et l'inhibition de la voie calcique, et le recrutement de Dok et l'inhibition de la voie ras^{224,178}. Ainsi dans les lymphocytes B, la trans-inhibition pourrait aussi être déclenchée. Cela pourrait aboutir à une anergie des lymphocytes B et une inhibition de la réponse humorale. La trans-inhibition pourrait affecter les autres réponses des lymphocytes B induites par d'autres récepteurs, comme les récepteurs de facteurs de croissance, les récepteurs de cytokines, les récepteurs de chimiokines, les récepteurs TLR et sûrement encore bien d'autres, à condition qu'ils utilisent la PI3K pour transduire des signaux d'activation.

5.4. Comparaison de la trans-inhibition avec l'inhibition induite par des ligands monovalents des RFc

Des travaux récents du groupe de Renato Monteiro ont montré que les récepteurs pour les IgA, les RFcαI, possèdent un ITAM capable de déclencher des signaux inhibiteurs en présence de ligand monovalent. C'est également le cas des RFcεI qui peuvent mettre en route SHIP1 mais quand ils sont agrégés par des ligands multivalents. L'ITAM des RFcαI recrute la tyrosine phosphatase SHP-1 qui peut déphosphoryler les tout premiers événements de signalisation déclenchant l'activation cellulaire. La fixation d'IgA monovalente entraîne la coségrégation de récepteurs activateurs et de récepteurs recrutant SHP-1 dans les mêmes compartiments intracellulaires que les auteurs ont nommés inhibisomes¹²². Dans RBL, la colocalisation de RFcαI recombinants recrutant SHP-1 et de RFcεI endogènes inhibe les signaux transduits par IgE et antigène. Dans des macrophages, des monocytes et des neutrophiles, ils ont également démontré que les IgG monomériques avaient les mêmes propriétés. L'ITAM des RFcγIIIA et l'expression de SHP-1 sont nécessaires à cette inhibition¹²³. Cependant l'inhibition par les ligands monomériques des RFcαI et des RFcγIIIA est plus restreinte que les propriétés des RFcγIIB au cours de la trans-inhibition car les effets de SHP-1 sont plus restreints que les effets de SHIP1.

VI. La trans-inhibition en pathologie

La trans-inhibition est un phénomène permettant un contrôle global des fonctions d'une cellule en coagrégeant un de ces récepteurs contrôlant l'activation ou la prolifération avec les RFcγIIB. On peut imaginer des situations pathologiques dans lesquelles la trans-inhibition ferait défaut ou serait exagérée ce qui conduirait à un mauvais fonctionnement de certaines fonctions de l'organisme. La trans-inhibition pourrait par exemple prévenir la réponse immunitaire anti-tumorale, notamment en inhibant la production d'anticorps par les lymphocytes B ou en inhibant la présentation de l'antigène par les cellules dendritiques, ce qui donnerait un avantage à la tumeur. La trans-inhibition pourrait jouer un rôle délétère dans les cancers des cellules hématopoïétiques et dans les cancers affectant les autres cellules de l'organisme, à condition qu'il y ait SHIP1 ou peut être SHIP2.

Avec les cellules dendritiques et les monocytes, les mastocytes représentent les premières cellules immunitaires à rencontrer les antigènes. Les mastocytes ont été de plus en plus impliqués dans la lutte contre des agents infectieux^{239,240,241}. Les mastocytes augmentent la clairance des microorganismes par phagocytose ou par sécrétion de peptides antimicrobiens. Ils jouent un rôle dans la neutralisation de peptides toxiques et de venins en dégradant des peptides endogènes toxiques et certains composants des venins. La trans-inhibition pourrait inhiber ces fonctions avec l'intervention d'anticorps qui inhiberaient la phagocytose ou la sécrétion ce qui représenterait un désavantage pour l'organisme. Ainsi en inhibant les fonctions des mastocytes, la prolifération des microorganismes pourrait être augmentée et les atteintes induites par des toxines pourraient être aggravées.

Les mastocytes sont des cellules immunorégulatrices pouvant être positives ou négatives selon le contexte. Ils augmentent le recrutement des cellules de l'immunité innée^{242,243} et de l'immunité adaptative²⁴⁴. Ils induisent la maturation et la migration des cellules dendritiques^{245,246}. Ils favorisent la migration, la maturation, la différenciation et les fonctions des cellules immunitaires par la sécrétion de TNF-α, de chimiokines, d'histamine, de LTB4 et de protéases. Ils peuvent présenter l'antigène^{247,248} et polariser la réponse lymphocytaire²⁴⁹. Ils présentent l'antigène aux lymphocytes T et augmentent la présentation en capturant des antigènes recouverts d'IgE via les RFcεI²⁵⁰. Ils augmentent la production d'IgE par les lymphocytes B via l'IL-4, l'IL-13 et CD40L²⁵¹ ainsi que la production d'IgA

via l'IL-6. En réponse à certains activateurs des mastocytes utilisés en même temps que des vaccins, ils augmentent le développement de la réponse immunitaire adaptative en réponse aux pathogènes. Dans ces fonctions des mastocytes, la trans-inhibition pourrait diminuer la réponse immunitaire. Les mastocytes induisent la suppression du développement de certaines réponses T induites par les piqûres d'anophèles²⁵². Ils suppriment la production de cytokines par les lymphocytes T et les monocytes. Ils augmentent la capacité des cellules dendritiques à réduire la prolifération des lymphocytes T et la production de cytokines. Dans ces fonctions des mastocytes, la trans-inhibition pourrait augmenter la réponse immunitaire. Dans toutes ces conditions régulatrices qu'elles soient positives ou négatives, l'intervention de la trans-inhibition par l'expression des RFcγIIB et de SHIP1 pourrait moduler ces fonctions des mastocytes dans le système immunitaire. La trans-inhibition pourrait affecter ces propriétés immunorégulatrices à condition que des anticorps soient mis en jeu et puissent induire une co-ligation.

Les mastocytes sont impliqués dans la modulation des réponses de certaines cellules de l'organisme en dehors du système immunitaire. Ils induisent l'expression de TSLP (thymic stromal lymphopoietin) par les cellules épithéliales²⁵³. Ils uprégulent l'expression des molécules d'adhérence sur les cellules endothéliales vasculaires²⁵⁴. Ils induisent la production de chimiokines et de cytokines par les cellules musculaires aériennes²⁵⁵. Ils induisent la tolérance aux greffes de peau²⁵⁶. Ils suppriment la production de cytokines proinflammatoires par les kératinocytes²⁵⁷. Dans toutes ces conditions, l'intervention de la trans-inhibition avec l'expression des RFcγIIB et de SHIP1 pourrait moduler ces fonctions des mastocytes en dehors du système immunitaire.

La trans-inhibition pourrait également affecter les réponses d'autres cellules de l'organisme de façon délétère. Dans les lymphocytes B, elle pourrait inhiber la production des anticorps au même titre que la cis-inhibition. Cela préviendrait une réponse humorale efficace contre les pathogènes. Au contraire un défaut de trans-inhibition dans les lymphocytes B pourrait conduire à des manifestations auto-immunes dépendantes d'anticorps ou à des proliférations lymphoïdes non contrôlées. Dans les polynucléaires neutrophiles, la trans-inhibition pourrait prévenir leur recrutement sur les sites inflammatoires ou au contraire conduire à un recrutement anarchique. La trans-inhibition pourrait aussi affecter l'endocytose ou la phagocytose assurées par les polynucléaires neutrophiles et par les cellules dendritiques et conduire à des défauts de clairance de molécules toxiques ou d'agents pathogènes ainsi qu'à des défauts de présentation de l'antigène aux lymphocytes T. Il a été montré récemment

que les cellules NK de certains individus expriment des RFcγIIB²⁵⁸. Cette expression permettrait le déclenchement de la cis- et de la trans-inhibition dans ces cellules ce qui affecterait la lyse cellulaire par les cellules NK.

VII. Trans-inhibition en thérapeutique

Les capacités inhibitrices des RFcγIIB sont grandement élargies avec le concept de trans-inhibition, pouvant ainsi s'exercer sur de nombreux récepteurs et dans des fonctions biologiques variées. On peut imaginer des systèmes permettant d'appliquer la trans-inhibition dans différentes pathologies comme l'allergie, les maladies autoimmunes ou le cancer.

7.1. La trans-inhibition dans l'allergie

Le terme allergie regroupe plusieurs pathologies pouvant affecter différents organes. Le système respiratoire peut être la cible comme dans le cas de l'asthme qui affecte les fonctions pulmonaires^{259,260} ou certaines formes de rhinites²⁶¹. On trouve aussi des allergies affectant la peau comme la dermatite atopique²⁶². Le système digestif peut aussi être atteint dans certaines allergies alimentaires^{263,264}. D'autres allergies se manifestent au niveau systémique. C'est le cas des chocs anaphylactiques après l'ingestion d'un aliment spécifique²⁶⁵, la prise de drogues ou de médicaments²⁶⁶ ou après des piqûres d'insectes²⁶⁷. Différentes molécules telles que les anti-histaminiques et les corticoïdes peuvent être utilisées pour traiter ces allergies. Quand l'allergène est connu, il est dans certains cas possible de désensibiliser les patients en leur administrant progressivement des doses croissantes d'allergène^{268,269}. Pour inhiber les manifestations allergiques, on peut coliguer les RFcγIIB avec les RFcεI à la surface des mastocytes²⁷⁰. Cette inhibition pourra affecter non seulement les réponses à l'allergène incriminé mais également les réponses à d'autres allergènes. En effet, la coligation des RFcεI sensibilisés par une IgE dirigée contre un allergène donné et coligués aux RFcγIIB inhibera les réponses induites par cet allergène mais aussi les réponses induites par d'autres allergènes. Ainsi, dans le cas de patients allergiques polysensibilisés, il suffira de cibler un seul allergène pour inhiber les réponses déclenchées par tous les autres. Même dans le cas où tous les allergènes ne seraient pas identifiés, la trans-inhibition pourrait également prévenir les manifestations allergiques. On pourrait parler de désensibilisation universelle. Cependant la mise en place d'un tel traitement nécessiterait un contrôle important des

patients. En effet, il reste très risqué d'engager des RFcεI à la surface des cellules de patients allergiques.

7.2. La trans-inhibition dans les maladies auto-immunes

Dans le cas des maladies auto-immunes, la trans-inhibition pourrait être utilisée pour prévenir ou diminuer voir abolir la production d'auto-anticorps détruisant des tissus de l'organisme. Les mastocytes jouent des rôles de plus en plus reconnus et étudiés dans les maladies auto-immunes ²⁷¹. Leur contrôle pourrait être bénéfique dans de nombreuses pathologies. En inhibant profondément les réponses des mastocytes, la trans-inhibition pourrait ainsi prévenir la destruction des tissus comme la myéline du système nerveux central due aux protéases des mastocytes ²⁷², le recrutement de neutrophiles dans le pemphigus ²⁷³, le déclenchement des arthrites inflammatoires ¹¹⁶, l'établissement de maladies rénales ²⁷⁴ ou encore l'aggravation de l'encéphalomyélite expérimentale allergique ²⁷⁵. Le rôle des mastocytes dans la genèse des maladies auto-immunes a toutefois récemment été remis en cause dans de nouvelles souris rendues déficientes en mastocytes grâce à l'utilisation de la recombinaison Cre ¹¹⁷.

La mise en place de la trans-inhibition dans d'autres cellules hématopoïétiques permettrait de contrôler certaines maladies auto-immunes en particulier celles qui dépendent d'anticorps auto-réactifs. En effet, les principaux acteurs de ces maladies sont les lymphocytes B ²⁷⁶. Hors, la trans-inhibition doit pouvoir être effective dans ces cellules. Pour ce qui concerne les maladies auto-immunes dépendantes des lymphocytes T, la mise en place de la trans-inhibition est moins envisageable car l'expression des RFcγIIB reste controversée dans ces cellules.

7.3. La trans-inhibition dans le cancer

Dans les cas de cancers, la trans-inhibition pourrait être mise en œuvre pour traiter des cancers affectant des cellules hématopoïétiques et des cellules en dehors du système immunitaire. Cela ne peut s'appliquer qu'aux tumeurs qui expriment des RFcγIIB et une inositol phosphate phosphatase que ce soit SHIP1 ou SHIP2. En ce qui concerne les cellules d'origine hématopoïétique, la trans-inhibition pourrait particulièrement affecter des mastocytomes ²⁷⁷ et des lymphomes B ^{278,279,280,281}. Cependant tous les lymphomes

n'expriment pas des RFcγIIB²⁸². La mise en route de la trans-inhibition devrait être un traitement combiné ou non avec les radiothérapies, les chimiothérapies et/ou les immunothérapies. La trans-inhibition est une autre forme d'immunothérapie qui présente l'avantage de pouvoir cibler des oncogènes intracellulaires et pas seulement des molécules membranaires. En ce qui concerne les cellules d'origine non-hématopoïétique, les RFcγIIB sont exprimés par les cellules endothéliales du placenta²⁸³, par les cellules épithéliales du rectum²⁸⁴ et par les cellules de la thyroïde²⁸⁵. Les RFcγIIB peuvent également être exprimés par des cellules cancéreuses d'origine non-hématopoïétique de certains cancers du rein, du colon ou du sein²⁸⁶, ou encore de 40% des mélanomes métastatiques²⁸⁷. Grâce à la trans-inhibition, on pourrait inhiber la prolifération anormale de cellules dont on ne connaît pas le plus souvent tous les facteurs oncogéniques impliqués. Dans le cas des mélanomes métastatiques, la plupart des cellules expriment ErbB2 un récepteur à activité tyrosine kinase mais la prolifération des cellules tumorales apparaît être indépendante de ErbB2. Toutefois, la prolifération des cellules de mélanome, coexprimant ErbB2 et des RFcγIIB, peut être inhibée par des anticorps anti-ErbB2 qui peuvent coagrèger ErbB2 et les RFcγIIB (Cassard, résultats non publiés). La trans-inhibition pourrait expliquer ces résultats. Dans ce cas on ne sait pas quelle(s) autre(s) voie(s) est (sont) inhibée(s). Ceci est un bon exemple d'application thérapeutique potentielle de la trans-inhibition chez les patients atteints de mélanomes coexprimant ErbB2 et des RFcγIIB. Dans le cas de cancers faisant intervenir plusieurs mutations, la trans-inhibition simplifierait le traitement en ciblant un oncogène connu ce qui inhiberait tous les autres non connus.

BIBLIOGRAPHIE

1. Mendoza, G.R. & Metzger, H. Disparity of IgE binding between normal and tumor mouse mast cells. *J Immunol* **117**, 1573-1578 (1976).
2. Furuichi, K., Rivera, J. & Isersky, C. The receptor for immunoglobulin E on rat basophilic leukemia cells: effect of ligand binding on receptor expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 1522-1525 (1985).
3. Supajatura, V., *et al.* Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J Clin Invest* **109**, 1351-1359 (2002).
4. Hochdorfer, T., *et al.* Activation of the PI3K pathway increases TLR-induced TNF- α and IL-6 but reduces IL-1 β production in mast cells. *Cell Signal* **23**, 866-875 (2011).
5. Austen, K.F. & Boyce, J.A. Mast cell lineage development and phenotypic regulation. *Leuk Res* **25**, 511-518 (2001).
6. Collington, S.J., *et al.* The role of the CCL2/CCR2 axis in mouse mast cell migration in vitro and in vivo. *J Immunol* **184**, 6114-6123 (2010).
7. Jensen, F., *et al.* Estradiol and progesterone regulate the migration of mast cells from the periphery to the uterus and induce their maturation and degranulation. *PLoS One* **5**, e14409 (2010).
8. Cebecauer, M., Cerny, J. & Horejsi, V. Incorporation of leucocyte GPI-anchored proteins and protein tyrosine kinases into lipid-rich membrane domains of COS-7 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **243**, 706-710 (1998).
9. Matsuuchi, L. & Gold, M.R. New views of BCR structure and organization. *Curr Opin Immunol* **13**, 270-277 (2001).
10. Kuhns, M.S., Davis, M.M. & Garcia, K.C. Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex. *Immunity* **24**, 133-139 (2006).
11. Ohno, H., Ono, S., Hirayama, N., Shimada, S. & Saito, T. Preferential usage of the Fc receptor gamma chain in the T cell antigen receptor complex by gamma/delta T cells localized in epithelia. *J Exp Med* **179**, 365-369 (1994).
12. Wines, B.D., Trist, H.M., Ramsland, P.A. & Hogarth, P.M. A common site of the Fc receptor gamma subunit interacts with the unrelated immunoreceptors Fc α RI and Fc ϵ RI. *J Biol Chem* **281**, 17108-17113 (2006).
13. Letourneur, F., Hennecke, S., Demolliere, C. & Cosson, P. Steric masking of a dilysine endoplasmic reticulum retention motif during assembly of the human high affinity receptor for immunoglobulin E. *J Cell Biol* **129**, 971-978 (1995).
14. Lobell, R.B., Arm, J.P., Raizman, M.B., Austen, K.F. & Katz, H.R. Intracellular degradation of Fc gamma RIII in mouse bone marrow culture-derived progenitor mast cells prevents its surface expression and associated function. *J Biol Chem* **268**, 1207-1212 (1993).
15. Nimmerjahn, F., Bruhns, P., Horiuchi, K. & Ravetch, J.V. Fc γ RIV: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity. *Immunity* **23**, 41-51 (2005).
16. Reth, M. Antigen receptor tail clue. *Nature* **338**, 383-384 (1989).
17. Van den Herik-Oudijk, I.E., Capel, P.J., van der Bruggen, T. & Van de Winkel, J.G. Identification of signaling motifs within human Fc gamma RIIa and Fc gamma RIIb isoforms. *Blood* **85**, 2202-2211 (1995).
18. Lanier, L.L. DAP10- and DAP12-associated receptors in innate immunity. *Immunol Rev* **227**, 150-160 (2009).
19. Mancardi, D.A., *et al.* Fc γ RIV is a mouse IgE receptor that resembles macrophage Fc ϵ RI in humans and promotes IgE-induced lung inflammation. *J Clin Invest* **118**, 3738-3750 (2008).

20. Karehed, K., Dimberg, A., Dahl, S., Nilsson, K. & Oberg, F. IFN-gamma-induced upregulation of Fc gamma-receptor-I during activation of monocytic cells requires the PKR and NFkappaB pathways. *Mol Immunol* **44**, 615-624 (2007).
21. Repp, R., *et al.* Neutrophils express the high affinity receptor for IgG (Fc gamma RI, CD64) after in vivo application of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* **78**, 885-889 (1991).
22. Daeron, M. Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol* **15**, 203-234 (1997).
23. Fiebiger, E., Tortorella, D., Jouvin, M.H., Kinet, J.P. & Ploegh, H.L. Cotranslational endoplasmic reticulum assembly of Fc epsilon RI controls the formation of functional IgE-binding receptors. *J Exp Med* **201**, 267-277 (2005).
24. Kuster, H., Zhang, L., Brini, A.T., MacGlashan, D.W. & Kinet, J.P. The gene and cDNA for the human high affinity immunoglobulin E receptor beta chain and expression of the complete human receptor. *J Biol Chem* **267**, 12782-12787 (1992).
25. Wang, B., *et al.* Epidermal Langerhans cells from normal human skin bind monomeric IgE via Fc epsilon RI. *J Exp Med* **175**, 1353-1365 (1992).
26. Jonsson, F., *et al.* Human Fc gamma RIIA induces anaphylactic and allergic reactions. *Blood* **119**, 2533-2544 (2012).
27. Dy, M. & Schneider, E. Interleukin-3 (IL-3) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): two cytokines increasing histamine synthesis by hematopoietic cells. *Eur Cytokine Netw* **2**, 153-172 (1991).
28. Yanagida, M., *et al.* Effects of T-helper 2-type cytokines, interleukin-3 (IL-3), IL-4, IL-5, and IL-6 on the survival of cultured human mast cells. *Blood* **86**, 3705-3714 (1995).
29. Mekori, Y.A., Oh, C.K. & Metcalfe, D.D. The role of c-Kit and its ligand, stem cell factor, in mast cell apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol* **107**, 136-138 (1995).
30. Willox, I., Mirkina, I., Westwick, J. & Ward, S.G. Evidence for PI3K-dependent CXCR3 agonist-induced degranulation of human cord blood-derived mast cells. *Mol Immunol* **47**, 2367-2377 (2010).
31. Dietrich, N., *et al.* Mast cells elicit proinflammatory but not type I interferon responses upon activation of TLRs by bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 8748-8753 (2010).
32. Babolewska, E., Witczak, P., Pietrzak, A. & Brzezinska-Blaszczyk, E. Different potency of bacterial antigens, both TLR2 and TLR4 ligands, in stimulating mature mast cells to cysteinyl leukotriene synthesis. *Microbiol Immunol* (2012).
33. Pietrzak, A., Wierzbicki, M., Wiktorska, M. & Brzezinska-Blaszczyk, E. Surface TLR2 and TLR4 expression on mature rat mast cells can be affected by some bacterial components and proinflammatory cytokines. *Mediators Inflamm* **2011**, 427473 (2011).
34. Ducharme, L.A. & Weis, J.H. Modulation of integrin expression during mast cell differentiation. *Eur J Immunol* **22**, 2603-2607 (1992).
35. Gurish, M.F., *et al.* Expression of murine beta 7, alpha 4, and beta 1 integrin genes by rodent mast cells. *J Immunol* **149**, 1964-1972 (1992).
36. Goh, C.S., Milburn, D. & Gerstein, M. Conformational changes associated with protein-protein interactions. *Curr Opin Struct Biol* **14**, 104-109 (2004).
37. Volkman, B.F., Lipson, D., Wemmer, D.E. & Kern, D. Two-state allosteric behavior in a single-domain signaling protein. *Science* **291**, 2429-2433 (2001).
38. Maksay, G. Ligand-gated pentameric ion channels, from binding to gating. *Curr Mol Pharmacol* **2**, 253-262 (2009).

39. Metzger, H. Transmembrane signaling: the joy of aggregation. *J Immunol* **149**, 1477-1487 (1992).
40. Saunders, A.E. & Johnson, P. Modulation of immune cell signalling by the leukocyte common tyrosine phosphatase, CD45. *Cell Signal* **22**, 339-348 (2010).
41. Klausner, R.D., Patel, M.D., O'Shea, J.J. & Samelson, L.E. Phosphorylation of the T cell antigen receptor: multiple signal transduction pathways. *J Cell Physiol Suppl Suppl* **5**, 49-51 (1987).
42. Patel, M.D., Samelson, L.E. & Klausner, R.D. Multiple kinases and signal transduction. Phosphorylation of the T cell antigen receptor complex. *J Biol Chem* **262**, 5831-5838 (1987).
43. Gauld, S.B. & Cambier, J.C. Src-family kinases in B-cell development and signaling. *Oncogene* **23**, 8001-8006 (2004).
44. Horejsi, V. Membrane rafts in immunoreceptor signaling: new doubts, new proofs? *Trends Immunol* **23**, 562-564 (2002).
45. Matko, J., *et al.* GPI-microdomains (membrane rafts) and signaling of the multi-chain interleukin-2 receptor in human lymphoma/leukemia T cell lines. *Eur J Biochem* **269**, 1199-1208 (2002).
46. Hoessli, D.C., *et al.* Signaling through sphingolipid microdomains of the plasma membrane: the concept of signaling platform. *Glycoconj J* **17**, 191-197 (2000).
47. Grassme, H., *et al.* CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. *J Biol Chem* **276**, 20589-20596 (2001).
48. Pribluda, V.S., Pribluda, C. & Metzger, H. Transphosphorylation as the mechanism by which the high-affinity receptor for IgE is phosphorylated upon aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11246-11250 (1994).
49. Yamashita, T., Mao, S.Y. & Metzger, H. Aggregation of the high-affinity IgE receptor and enhanced activity of p53/56lyn protein-tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11251-11255 (1994).
50. Mayer, B.J. & Gupta, R. Functions of SH2 and SH3 domains. *Curr Top Microbiol Immunol* **228**, 1-22 (1998).
51. Filippakopoulos, P., Muller, S. & Knapp, S. SH2 domains: modulators of nonreceptor tyrosine kinase activity. *Curr Opin Struct Biol* **19**, 643-649 (2009).
52. Ferguson, K.M., Lemmon, M.A., Schlessinger, J. & Sigler, P.B. Structure of the high affinity complex of inositol trisphosphate with a phospholipase C pleckstrin homology domain. *Cell* **83**, 1037-1046 (1995).
53. Harlan, J.E., Hajduk, P.J., Yoon, H.S. & Fesik, S.W. Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* **371**, 168-170 (1994).
54. Hilgemann, D.W. Biochemistry. Oily barbarians breach ion channel gates. *Science* **304**, 223-224 (2004).
55. Horowitz, L.F., *et al.* Phospholipase C in living cells: activation, inhibition, Ca²⁺ requirement, and regulation of M current. *J Gen Physiol* **126**, 243-262 (2005).
56. Arai, Y., *et al.* Developmental changes of synaptojanin expression in the human cerebrum and cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res* **129**, 1-9 (2001).
57. Yin, H.L. & Janmey, P.A. Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Physiol* **65**, 761-789 (2003).
58. Klarlund, J.K., *et al.* Signaling by phosphoinositide-3,4,5-trisphosphate through proteins containing pleckstrin and Sec7 homology domains. *Science* **275**, 1927-1930 (1997).
59. Cremona, O., *et al.* Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell* **99**, 179-188 (1999).

60. Rebecchi, M.J. & Scarlata, S. Pleckstrin homology domains: a common fold with diverse functions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **27**, 503-528 (1998).
61. Cantley, L.C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**, 1655-1657 (2002).
62. Weissenhorn, W., Eck, M.J., Harrison, S.C. & Wiley, D.C. Phosphorylated T cell receptor zeta-chain and ZAP70 tandem SH2 domains form a 1:3 complex in vitro. *Eur J Biochem* **238**, 440-445 (1996).
63. Ottinger, E.A., Botfield, M.C. & Shoelson, S.E. Tandem SH2 domains confer high specificity in tyrosine kinase signaling. *J Biol Chem* **273**, 729-735 (1998).
64. Grucza, R.A., Futterer, K., Chan, A.C. & Waksman, G. Thermodynamic study of the binding of the tandem-SH2 domain of the Syk kinase to a dually phosphorylated ITAM peptide: evidence for two conformers. *Biochemistry* **38**, 5024-5033 (1999).
65. Salojin, K.V., Zhang, J., Meagher, C. & Delovitch, T.L. ZAP-70 is essential for the T cell antigen receptor-induced plasma membrane targeting of SOS and Vav in T cells. *J Biol Chem* **275**, 5966-5975 (2000).
66. Zhang, W., *et al.* Association of Grb2, Gads, and phospholipase C-gamma 1 with phosphorylated LAT tyrosine residues. Effect of LAT tyrosine mutations on T cell antigen receptor-mediated signaling. *J Biol Chem* **275**, 23355-23361 (2000).
67. Houtman, J.C., Barda-Saad, M. & Samelson, L.E. Examining multiprotein signaling complexes from all angles. *FEBS J* **272**, 5426-5435 (2005).
68. Benhamou, M., Ryba, N.J., Kihara, H., Nishikata, H. & Siraganian, R.P. Protein-tyrosine kinase p72syk in high affinity IgE receptor signaling. Identification as a component of pp72 and association with the receptor gamma chain after receptor aggregation. *J Biol Chem* **268**, 23318-23324 (1993).
69. Costello, P.S., *et al.* Critical role for the tyrosine kinase Syk in signalling through the high affinity IgE receptor of mast cells. *Oncogene* **13**, 2595-2605 (1996).
70. Zhang, J., Kimura, T. & Siraganian, R.P. Mutations in the activation loop tyrosines of protein tyrosine kinase Syk abrogate intracellular signaling but not kinase activity. *J Immunol* **161**, 4366-4374 (1998).
71. Saitoh, S., *et al.* LAT is essential for Fc(epsilon)RI-mediated mast cell activation. *Immunity* **12**, 525-535 (2000).
72. Parravicini, V., *et al.* Fyn kinase initiates complementary signals required for IgE-dependent mast cell degranulation. *Nat Immunol* **3**, 741-748 (2002).
73. Wonerow, P. & Watson, S.P. The transmembrane adapter LAT plays a central role in immune receptor signalling. *Oncogene* **20**, 6273-6283 (2001).
74. Roget, K., Malissen, M., Malbec, O., Malissen, B. & Daeron, M. Non-T cell activation linker promotes mast cell survival by dampening the recruitment of SHIP1 by linker for activation of T cells. *J Immunol* **180**, 3689-3698 (2008).
75. Gu, H., *et al.* Essential role for Gab2 in the allergic response. *Nature* **412**, 186-190 (2001).
76. Ali, K., *et al.* Essential role for the p110delta phosphoinositide 3-kinase in the allergic response. *Nature* **431**, 1007-1011 (2004).
77. Rivera, J. Molecular adapters in Fc(epsilon)RI signaling and the allergic response. *Curr Opin Immunol* **14**, 688-693 (2002).
78. Iwaki, S., Tkaczyk, C., Metcalfe, D.D. & Gilfillan, A.M. Roles of adaptor molecules in mast cell activation. *Chem Immunol Allergy* **87**, 43-58 (2005).
79. van Dijk, T.B., *et al.* Stem cell factor induces phosphatidylinositol 3'-kinase-dependent Lyn/Tec/Dok-1 complex formation in hematopoietic cells. *Blood* **96**, 3406-3413 (2000).

80. Zhang, H., *et al.* PDGFRs are critical for PI3K/Akt activation and negatively regulated by mTOR. *J Clin Invest* **117**, 730-738 (2007).
81. Trieselmann, N.Z., Soboloff, J. & Berger, S.A. Mast cells stimulated by membrane-bound, but not soluble, steel factor are dependent on phospholipase C activation. *Cell Mol Life Sci* **60**, 759-766 (2003).
82. Wilde, J.I. & Watson, S.P. Regulation of phospholipase C gamma isoforms in haematopoietic cells: why one, not the other? *Cell Signal* **13**, 691-701 (2001).
83. Pernis, A.B. & Rothman, P.B. JAK-STAT signaling in asthma. *J Clin Invest* **109**, 1279-1283 (2002).
84. Muzio, M., Polentarutti, N., Bosisio, D., Manoj Kumar, P.P. & Mantovani, A. Toll-like receptor family and signalling pathway. *Biochem Soc Trans* **28**, 563-566 (2000).
85. Martin, M.U. & Wesche, H. Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochim Biophys Acta* **1592**, 265-280 (2002).
86. Suzuki, N., Suzuki, S. & Yeh, W.C. IRAK-4 as the central TIR signaling mediator in innate immunity. *Trends Immunol* **23**, 503-506 (2002).
87. Andersson, E.R., Sandberg, R. & Lendahl, U. Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development* **138**, 3593-3612 (2011).
88. Beaven, M.A. & Metzger, H. Signal transduction by Fc receptors: the Fc epsilon RI case. *Immunol Today* **14**, 222-226 (1993).
89. Fluckiger, A.C., *et al.* Btk/Tec kinases regulate sustained increases in intracellular Ca²⁺ following B-cell receptor activation. *EMBO J* **17**, 1973-1985 (1998).
90. Putney, J.W., Jr., Takemura, H., Hughes, A.R., Horstman, D.A. & Thastrup, O. How do inositol phosphates regulate calcium signaling? *FASEB J* **3**, 1899-1905 (1989).
91. Ozawa, K., *et al.* Ca(2+)-dependent and Ca(2+)-independent isozymes of protein kinase C mediate exocytosis in antigen-stimulated rat basophilic RBL-2H3 cells. Reconstitution of secretory responses with Ca²⁺ and purified isozymes in washed permeabilized cells. *J Biol Chem* **268**, 1749-1756 (1993).
92. Nechushtan, H., Leitges, M., Cohen, C., Kay, G. & Razin, E. Inhibition of degranulation and interleukin-6 production in mast cells derived from mice deficient in protein kinase Cbeta. *Blood* **95**, 1752-1757 (2000).
93. Roa, M., Paumet, F., Le Mao, J., David, B. & Blank, U. Involvement of the ras-like GTPase rab3d in RBL-2H3 mast cell exocytosis following stimulation via high affinity IgE receptors (Fc epsilon RI). *J Immunol* **159**, 2815-2823 (1997).
94. Liou, J., *et al.* STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Curr Biol* **15**, 1235-1241 (2005).
95. Peinelt, C., *et al.* Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nat Cell Biol* **8**, 771-773 (2006).
96. Vig, M., *et al.* CRACM1 multimers form the ion-selective pore of the CRAC channel. *Curr Biol* **16**, 2073-2079 (2006).
97. Yang, J., *et al.* Calcineurin/nuclear factors of activated T cells (NFAT)-activating and immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)-containing protein (CNAIP), a novel ITAM-containing protein that activates the calcineurin/NFAT-signaling pathway. *J Biol Chem* **278**, 16797-16801 (2003).
98. Hao, S., Kurosaki, T. & August, A. Differential regulation of NFAT and SRF by the B cell receptor via a PLCgamma-Ca(2+)-dependent pathway. *EMBO J* **22**, 4166-4177 (2003).

99. Prieschl, E.E., Pendl, G.G., Harrer, N.E. & Baumruker, T. p21ras links Fc epsilon RI to NF-AT family member in mast cells. The AP3-like factor in this cell type is an NF-AT family member. *J Immunol* **155**, 4963-4970 (1995).
100. Teramoto, H., Salem, P., Robbins, K.C., Bustelo, X.R. & Gutkind, J.S. Tyrosine phosphorylation of the vav proto-oncogene product links FcepsilonRI to the Rac1-JNK pathway. *J Biol Chem* **272**, 10751-10755 (1997).
101. Manetz, T.S., *et al.* Vav1 regulates phospholipase cgamma activation and calcium responses in mast cells. *Mol Cell Biol* **21**, 3763-3774 (2001).
102. Hata, D., *et al.* Bruton's tyrosine kinase-mediated interleukin-2 gene activation in mast cells. Dependence on the c-Jun N-terminal kinase activation pathway. *J Biol Chem* **273**, 10979-10987 (1998).
103. Klemm, S., *et al.* The Bcl10-Malt1 complex segregates Fc epsilon RI-mediated nuclear factor kappa B activation and cytokine production from mast cell degranulation. *J Exp Med* **203**, 337-347 (2006).
104. Gilfillan, A.M. & Tkaczyk, C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat Rev Immunol* **6**, 218-230 (2006).
105. Blank, U. The mechanisms of exocytosis in mast cells. *Adv Exp Med Biol* **716**, 107-122 (2011).
106. McNew, J.A., *et al.* Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature* **407**, 153-159 (2000).
107. Guo, Z., Turner, C. & Castle, D. Relocation of the t-SNARE SNAP-23 from lamellipodia-like cell surface projections regulates compound exocytosis in mast cells. *Cell* **94**, 537-548 (1998).
108. Paumet, F., *et al.* Soluble NSF attachment protein receptors (SNAREs) in RBL-2H3 mast cells: functional role of syntaxin 4 in exocytosis and identification of a vesicle-associated membrane protein 8-containing secretory compartment. *J Immunol* **164**, 5850-5857 (2000).
109. O'Mahony, L., Akdis, M. & Akdis, C.A. Regulation of the immune response and inflammation by histamine and histamine receptors. *J Allergy Clin Immunol* **128**, 1153-1162 (2011).
110. Hart, P.H. Regulation of the inflammatory response in asthma by mast cell products. *Immunol Cell Biol* **79**, 149-153 (2001).
111. Bloemen, K., *et al.* The allergic cascade: review of the most important molecules in the asthmatic lung. *Immunol Lett* **113**, 6-18 (2007).
112. Galli, S.J., Zsebo, K.M. & Geissler, E.N. The kit ligand, stem cell factor. *Adv Immunol* **55**, 1-96 (1994).
113. Galli, S.J. New insights into "the riddle of the mast cells": microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. *Lab Invest* **62**, 5-33 (1990).
114. Kitamura, Y. Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations. *Annu Rev Immunol* **7**, 59-76 (1989).
115. Pedotti, R., *et al.* Multiple elements of the allergic arm of the immune response modulate autoimmune demyelination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 1867-1872 (2003).
116. Lee, D.M., *et al.* Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. *Science* **297**, 1689-1692 (2002).
117. Feyerabend, T.B., *et al.* Cre-Mediated Cell Ablation Contest Mast Cell Contribution in Models of Antibody- and T Cell-Mediated Autoimmunity. *Immunity* (2011).

118. Neel, B.G., Gu, H. & Pao, L. The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem Sci* **28**, 284-293 (2003).
119. Backers, K., Blero, D., Paternotte, N., Zhang, J. & Erneux, C. The termination of PI3K signalling by SHIP1 and SHIP2 inositol 5-phosphatases. *Adv Enzyme Regul* **43**, 15-28 (2003).
120. Gustin, S.E., Thien, C.B. & Langdon, W.Y. Cbl-b is a negative regulator of inflammatory cytokines produced by IgE-activated mast cells. *J Immunol* **177**, 5980-5989 (2006).
121. Shultz, L.D., Coman, D.R., Bailey, C.L., Beamer, W.G. & Sidman, C.L. "Viable motheaten," a new allele at the motheaten locus. I. Pathology. *Am J Pathol* **116**, 179-192 (1984).
122. Pfirsch-Maisonnas, S., *et al.* Inhibitory ITAM signaling traps activating receptors with the phosphatase SHP-1 to form polarized "inhibisome" clusters. *Sci Signal* **4**, ra24 (2011).
123. Aloulou, M., *et al.* IgG1 and IVIg induce inhibitory ITAM signaling through FcγRIII controlling inflammatory responses. *Blood* **119**, 3084-3096 (2012).
124. Helgason, C.D., *et al.* Targeted disruption of SHIP leads to hemopoietic perturbations, lung pathology, and a shortened life span. *Genes Dev* **12**, 1610-1620 (1998).
125. Malbec, O., *et al.* Linker for activation of T cells integrates positive and negative signaling in mast cells. *J Immunol* **173**, 5086-5094 (2004).
126. Malissen, B., Aguado, E. & Malissen, M. Role of the LAT adaptor in T-cell development and Th2 differentiation. *Adv Immunol* **87**, 1-25 (2005).
127. Sattler, M., *et al.* SHIP1, an SH2 domain containing polyinositol-5-phosphatase, regulates migration through two critical tyrosine residues and forms a novel signaling complex with DOK1 and CRKL. *J Biol Chem* **276**, 2451-2458 (2001).
128. Dong, S., *et al.* T cell receptor for antigen induces linker for activation of T cell-dependent activation of a negative signaling complex involving Dok-2, SHIP-1, and Grb-2. *J Exp Med* **203**, 2509-2518 (2006).
129. Ohtake, H., Ichikawa, N., Okada, M. & Yamashita, T. Cutting Edge: Transmembrane phosphoprotein Csk-binding protein/phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains as a negative feedback regulator of mast cell signaling through the FcεRI. *J Immunol* **168**, 2087-2090 (2002).
130. Solheim, S.A., *et al.* Interactions between the Fyn SH3-domain and adaptor protein Cbp/PAG derived ligands, effects on kinase activity and affinity. *FEBS J* **275**, 4863-4874 (2008).
131. Zhu, Z., *et al.* Tyrosine phosphatase SHP-1 in allergic and anaphylactic inflammation. *Immunol Res* **47**, 3-13 (2010).
132. Nakata, K., *et al.* Positive and negative regulation of high affinity IgE receptor signaling by Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1. *J Immunol* **181**, 5414-5424 (2008).
133. Rivera, J. & Olivera, A. Src family kinases and lipid mediators in control of allergic inflammation. *Immunol Rev* **217**, 255-268 (2007).
134. Malbec, O., *et al.* Peritoneal cell-derived mast cells: an in vitro model of mature serosal-type mouse mast cells. *J Immunol* **178**, 6465-6475 (2007).
135. Dembo, M. & Goldstein, B. Theory of equilibrium binding of symmetric bivalent haptens to cell surface antibody: application to histamine release from basophils. *J Immunol* **121**, 345-353 (1978).

136. Wofsy, C., Goldstein, B. & Dembo, M. Theory of equilibrium binding of asymmetric bivalent haptens to cell surface antibody: application to histamine release from basophils. *J Immunol* **121**, 593-601 (1978).
137. Gimborn, K., Lessmann, E., Kuppig, S., Krystal, G. & Huber, M. SHIP down-regulates FcεR1-induced degranulation at supraoptimal IgE or antigen levels. *J Immunol* **174**, 507-516 (2005).
138. Kimura, T., Sakamoto, H., Appella, E. & Siraganian, R.P. The negative signaling molecule SH2 domain-containing inositol-polyphosphate 5-phosphatase (SHIP) binds to the tyrosine-phosphorylated beta subunit of the high affinity IgE receptor. *J Biol Chem* **272**, 13991-13996 (1997).
139. Blagoeva, E., *et al.* Cytokinin N-glucosylation inhibitors suppress deactivation of exogenous cytokinins in radish, but their effect on active endogenous cytokinins is counteracted by other regulatory mechanisms. *Physiol Plant* **121**, 215-222 (2004).
140. Volna, P., *et al.* Negative regulation of mast cell signaling and function by the adaptor LAB/NTAL. *J Exp Med* **200**, 1001-1013 (2004).
141. Daeron, M., Jaeger, S., Du Pasquier, L. & Vivier, E. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs: a quest in the past and future. *Immunol Rev* **224**, 11-43 (2008).
142. Meyaard, L., *et al.* LAIR-1, a novel inhibitory receptor expressed on human mononuclear leukocytes. *Immunity* **7**, 283-290 (1997).
143. Cella, M., *et al.* A novel inhibitory receptor (ILT3) expressed on monocytes, macrophages, and dendritic cells involved in antigen processing. *J Exp Med* **185**, 1743-1751 (1997).
144. Chen, C.H., *et al.* Dendritic-cell-associated C-type lectin 2 (DCAL-2) alters dendritic-cell maturation and cytokine production. *Blood* **107**, 1459-1467 (2006).
145. Mechetina, L.V., *et al.* FCRL, a novel member of the leukocyte Fc receptor family possesses unique structural features. *Eur J Immunol* **32**, 87-96 (2002).
146. Brown, D., Trowsdale, J. & Allen, R. The LILR family: modulators of innate and adaptive immune pathways in health and disease. *Tissue Antigens* **64**, 215-225 (2004).
147. Adachi, T., Flaszinkel, H., Yakura, H., Reth, M. & Tsubata, T. The B cell surface protein CD72 recruits the tyrosine phosphatase SHP-1 upon tyrosine phosphorylation. *J Immunol* **160**, 4662-4665 (1998).
148. Newton-Nash, D.K. & Newman, P.J. A new role for platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31): inhibition of TCR-mediated signal transduction. *J Immunol* **163**, 682-688 (1999).
149. Kim, E.J., Lee, S.M., Suk, K. & Lee, W.H. CD300a and CD300f differentially regulate the MyD88 and TRIF-mediated TLR signalling pathways through activation of SHP-1 and/or SHP-2 in human monocytic cell lines. *Immunology* **135**, 226-235 (2012).
150. Rashmi, R., *et al.* Siglec-9 and SHP-1 are differentially expressed in neonatal and adult neutrophils. *Pediatr Res* **66**, 266-271 (2009).
151. Colonna, M., Moretta, A., Vely, F. & Vivier, E. A high-resolution view of NK-cell receptors: structure and function. *Immunol Today* **21**, 428-431 (2000).
152. Stewart, C.A., *et al.* Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 13224-13229 (2005).

153. Yamashita, T., *et al.* Differential dephosphorylation of the FcRgamma immunoreceptor tyrosine-based activation motif tyrosines with dissimilar potential for activating Syk. *J Biol Chem* **283**, 28584-28594 (2008).
154. Chiang, G.G. & Sefton, B.M. Specific dephosphorylation of the Lck tyrosine protein kinase at Tyr-394 by the SHP-1 protein-tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* **276**, 23173-23178 (2001).
155. Dustin, L.B., *et al.* Expression of dominant-negative src-homology domain 2-containing protein tyrosine phosphatase-1 results in increased Syk tyrosine kinase activity and B cell activation. *J Immunol* **162**, 2717-2724 (1999).
156. Mizuno, K., *et al.* Src homology region 2 (SH2) domain-containing phosphatase-1 dephosphorylates B cell linker protein/SH2 domain leukocyte protein of 65 kDa and selectively regulates c-Jun NH2-terminal kinase activation in B cells. *J Immunol* **165**, 1344-1351 (2000).
157. Lorenz, U. SHP-1 and SHP-2 in T cells: two phosphatases functioning at many levels. *Immunol Rev* **228**, 342-359 (2009).
158. Stebbins, C.C., *et al.* Vav1 dephosphorylation by the tyrosine phosphatase SHP-1 as a mechanism for inhibition of cellular cytotoxicity. *Mol Cell Biol* **23**, 6291-6299 (2003).
159. Renard, V., *et al.* Transduction of cytotoxic signals in natural killer cells: a general model of fine tuning between activatory and inhibitory pathways in lymphocytes. *Immunol Rev* **155**, 205-221 (1997).
160. Blery, M., Olcese, L. & Vivier, E. Early signaling via inhibitory and activating NK receptors. *Hum Immunol* **61**, 51-64 (2000).
161. Katz, H.R. Inhibition of anaphylactic inflammation by the gp49B1 receptor on mast cells. *Mol Immunol* **38**, 1301-1305 (2002).
162. Chen, C.C., Kong, D.W., Cooper, M.D. & Kubagawa, H. Mast cell regulation via paired immunoglobulin-like receptor PIR-B. *Immunol Res* **26**, 191-197 (2002).
163. Lienard, H., Bruhns, P., Malbec, O., Fridman, W.H. & Daeron, M. Signal regulatory proteins negatively regulate immunoreceptor-dependent cell activation. *J Biol Chem* **274**, 32493-32499 (1999).
164. Licht, A., Pecht, I. & Schweitzer-Stenner, R. Regulation of mast cells' secretory response by co-clustering the Type 1 Fcepsilon receptor with the mast cell function-associated antigen. *Eur J Immunol* **35**, 1621-1633 (2005).
165. Wong, M.X., Roberts, D., Bartley, P.A. & Jackson, D.E. Absence of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) leads to increased severity of local and systemic IgE-mediated anaphylaxis and modulation of mast cell activation. *J Immunol* **168**, 6455-6462 (2002).
166. Yotsumoto, K., *et al.* Paired activating and inhibitory immunoglobulin-like receptors, MAIR-I and MAIR-II, regulate mast cell and macrophage activation. *J Exp Med* **198**, 223-233 (2003).
167. D'Ambrosio, D., *et al.* Recruitment and activation of PTP1C in negative regulation of antigen receptor signaling by Fc gamma RIIB1. *Science* **268**, 293-297 (1995).
168. Ono, M., Bolland, S., Tempst, P. & Ravetch, J.V. Role of the inositol phosphatase SHIP in negative regulation of the immune system by the receptor Fc(gamma)RIIB. *Nature* **383**, 263-266 (1996).
169. Nadler, M.J., Chen, B., Anderson, J.S., Wortis, H.H. & Neel, B.G. Protein-tyrosine phosphatase SHP-1 is dispensable for FcgammaRIIB-mediated inhibition of B cell antigen receptor activation. *J Biol Chem* **272**, 20038-20043 (1997).

170. Malbec, O., *et al.* Fc epsilon receptor I-associated lyn-dependent phosphorylation of Fc gamma receptor IIB during negative regulation of mast cell activation. *J Immunol* **160**, 1647-1658 (1998).
171. Lesourne, R., Bruhns, P., Fridman, W.H. & Daeron, M. Insufficient phosphorylation prevents fc gamma RIIB from recruiting the SH2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase SHP-1. *J Biol Chem* **276**, 6327-6336 (2001).
172. Bruhns, P., *et al.* Molecular basis of the recruitment of the SH2 domain-containing inositol 5-phosphatases SHIP1 and SHIP2 by fcgamma RIIB. *J Biol Chem* **275**, 37357-37364 (2000).
173. Daeron, M., *et al.* The same tyrosine-based inhibition motif, in the intracytoplasmic domain of Fc gamma RIIB, regulates negatively BCR-, TCR-, and FcR-dependent cell activation. *Immunity* **3**, 635-646 (1995).
174. Isnardi, I., *et al.* Two distinct tyrosine-based motifs enable the inhibitory receptor FcgammaRIIB to cooperatively recruit the inositol phosphatases SHIP1/2 and the adapters Grb2/Grap. *J Biol Chem* **279**, 51931-51938 (2004).
175. Giuriato, S., *et al.* SH2-containing inositol 5-phosphatases 1 and 2 in blood platelets: their interactions and roles in the control of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate levels. *Biochem J* **376**, 199-207 (2003).
176. Bolland, S., Pearse, R.N., Kurosaki, T. & Ravetch, J.V. SHIP modulates immune receptor responses by regulating membrane association of Btk. *Immunity* **8**, 509-516 (1998).
177. Scharenberg, A.M. & Kinet, J.P. PtdIns-3,4,5-P3: a regulatory nexus between tyrosine kinases and sustained calcium signals. *Cell* **94**, 5-8 (1998).
178. Tamir, I., *et al.* The RasGAP-binding protein p62dok is a mediator of inhibitory FcgammaRIIB signals in B cells. *Immunity* **12**, 347-358 (2000).
179. Malbec, O., *et al.* Src homology 2 domain-containing inositol 5-phosphatase 1 mediates cell cycle arrest by FcgammaRIIB. *J Biol Chem* **276**, 30381-30391 (2001).
180. Lesourne, R., Fridman, W.H. & Daeron, M. Dynamic interactions of Fc gamma receptor IIB with filamin-bound SHIP1 amplify filamentous actin-dependent negative regulation of Fc epsilon receptor I signaling. *J Immunol* **174**, 1365-1373 (2005).
181. Malbec, O., Fridman, W.H. & Daeron, M. Negative regulation of c-kit-mediated cell proliferation by Fc gamma RIIB. *J Immunol* **162**, 4424-4429 (1999).
182. Malbec, O. & Daëron, M. Antibodies against growth factor receptors can inhibit the proliferation of transformed cells via a cis--interaction with inhibitory FcR. *Immunology letters* **143**, 28-33 (2012).
183. Antonescu, C. Gastrointestinal Stromal Tumors. *Curr Top Microbiol Immunol* (2011).
184. Orfao, A., Garcia-Montero, A.C., Sanchez, L. & Escribano, L. Recent advances in the understanding of mastocytosis: the role of KIT mutations. *Br J Haematol* **138**, 12-30 (2007).
185. Matsumura, I., Mizuki, M. & Kanakura, Y. Roles for deregulated receptor tyrosine kinases and their downstream signaling molecules in hematologic malignancies. *Cancer Sci* **99**, 479-485 (2008).
186. Mizuki, M., *et al.* Oncogenic receptor tyrosine kinase in leukemia. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **49**, 907-922 (2003).
187. Henry, C. & Jerne, N.K. Competition of 19S and 7S antigen receptors in the regulation of the primary immune response. *J Exp Med* **128**, 133-152 (1968).

188. Chan, P.L. & Sinclair, N.R. Regulation of the immune response. V. An analysis of the function of the Fc portion of antibody in suppression of an immune response with respect to interaction with components of the lymphoid system. *Immunology* **21**, 967-981 (1971).
189. Hibbs, M.L., *et al.* The murine Fc receptor for immunoglobulin: purification, partial amino acid sequence, and isolation of cDNA clones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 6980-6984 (1986).
190. Stuart, S.G., *et al.* Isolation and expression of cDNA clones encoding a human receptor for IgG (Fc gamma RII). *J Exp Med* **166**, 1668-1684 (1987).
191. Qiu, W.Q., de Bruin, D., Brownstein, B.H., Pearse, R. & Ravetch, J.V. Organization of the human and mouse low-affinity Fc gamma R genes: duplication and recombination. *Science* **248**, 732-735 (1990).
192. Hogarth, P.M., *et al.* Structure of the mouse beta Fc gamma receptor II gene. *J Immunol* **146**, 369-376 (1991).
193. Amigorena, S., *et al.* Cytoplasmic domain heterogeneity and functions of IgG Fc receptors in B lymphocytes. *Science* **256**, 1808-1812 (1992).
194. Daeron, M., Malbec, O., Latour, S., Arock, M. & Fridman, W.H. Regulation of high-affinity IgE receptor-mediated mast cell activation by murine low-affinity IgG receptors. *J Clin Invest* **95**, 577-585 (1995).
195. Miettinen, H.M., Rose, J.K. & Mellman, I. Fc receptor isoforms exhibit distinct abilities for coated pit localization as a result of cytoplasmic domain heterogeneity. *Cell* **58**, 317-327 (1989).
196. Daeron, M., *et al.* Distinct intracytoplasmic sequences are required for endocytosis and phagocytosis via murine Fc gamma RII in mast cells. *Int Immunol* **5**, 1393-1401 (1993).
197. Kwiatkowska, K. & Sobota, A. Engagement of spectrin and actin in capping of Fc gamma RII revealed by studies on permeabilized U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **259**, 287-293 (1999).
198. Daeron, M., Bonnerot, C., Latour, S. & Fridman, W.H. Murine recombinant Fc gamma RIII, but not Fc gamma RII, trigger serotonin release in rat basophilic leukemia cells. *J Immunol* **149**, 1365-1373 (1992).
199. Latour, S., Bonnerot, C., Fridman, W.H. & Daeron, M. Induction of tumor necrosis factor-alpha production by mast cells via Fc gamma R. Role of the Fc gamma RIII gamma subunit. *J Immunol* **149**, 2155-2162 (1992).
200. Wagtmann, N., *et al.* Molecular clones of the p58 NK cell receptor reveal immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra- and intracellular domains. *Immunity* **2**, 439-449 (1995).
201. Moretta, A., *et al.* Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells. *J Exp Med* **182**, 875-884 (1995).
202. Fong, D.C., *et al.* Selective in vivo recruitment of the phosphatidylinositol phosphatase SHIP by phosphorylated Fc gamma RIIB during negative regulation of IgE-dependent mouse mast cell activation. *Immunol Lett* **54**, 83-91 (1996).
203. Ono, M., *et al.* Deletion of SHIP or SHP-1 reveals two distinct pathways for inhibitory signaling. *Cell* **90**, 293-301 (1997).
204. Malbec, O., Attal, J.P., Fridman, W.H. & Daeron, M. Negative regulation of mast cell proliferation by Fc gamma RIIB. *Mol Immunol* **38**, 1295-1299 (2002).
205. Malbec, O., *et al.* Trans-inhibition, a new immunoregulatory property that anergyze FcR expressing cells. *in preparation* (2012).

206. Wenink, M.H., *et al.* The inhibitory Fc gamma IIB receptor dampens TLR4-mediated immune responses and is selectively up-regulated on dendritic cells from rheumatoid arthritis patients with quiescent disease. *J Immunol* **183**, 4509-4520 (2009).
207. Tanigaki, K., *et al.* C-reactive protein inhibits insulin activation of endothelial nitric oxide synthase via the immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif of FcgammaRIIB and SHIP-1. *Circ Res* **104**, 1275-1282 (2009).
208. Hien, T.T., *et al.* Nectandrin B Activates eNOS Phosphorylation in Endothelial Cells: Role of the AMP-activated Protein Kinase/estrogen Receptor {alpha}/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt Pathway. *Mol Pharmacol* (2011).
209. Mineo, C. & Shaul, P.W. Circulating cardiovascular disease risk factors and signaling in endothelial cell caveolae. *Cardiovasc Res* **70**, 31-41 (2006).
210. Wain, C.M., Westwick, J. & Ward, S.G. Heterologous regulation of chemokine receptor signaling by the lipid phosphatase SHIP in lymphocytes. *Cell Signal* **17**, 1194-1202 (2005).
211. Strzelecka, A., Kwiatkowska, K. & Sobota, A. Tyrosine phosphorylation and Fcgamma receptor-mediated phagocytosis. *FEBS Lett* **400**, 11-14 (1997).
212. Zhang, C.Y. & Booth, J.W. Divergent intracellular sorting of Fc{gamma}RIIA and Fc{gamma}RIIB2. *J Biol Chem* **285**, 34250-34258 (2010).
213. Kolsch, V., Charest, P.G. & Firtel, R.A. The regulation of cell motility and chemotaxis by phospholipid signaling. *J Cell Sci* **121**, 551-559 (2008).
214. Ward, S.G. Do phosphoinositide 3-kinases direct lymphocyte navigation? *Trends Immunol* **25**, 67-74 (2004).
215. Walczak, C., *et al.* Aldosterone increases VEGF-A production in human neutrophils through PI3K, ERK1/2 and p38 pathways. *Biochim Biophys Acta* (2011).
216. Sadhu, C., Masinovsky, B., Dick, K., Sowell, C.G. & Staunton, D.E. Essential role of phosphoinositide 3-kinase delta in neutrophil directional movement. *J Immunol* **170**, 2647-2654 (2003).
217. Moeller, L.C., *et al.* Stanniocalcin 1 induction by thyroid hormone depends on thyroid hormone receptor beta and phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **119**, 81-85 (2011).
218. Katz, S., Ayala, V., Santillan, G. & Boland, R. Activation of the PI3K/Akt signaling pathway through P2Y receptors by extracellular ATP is involved in osteoblastic cell proliferation. *Arch Biochem Biophys* **513**, 144-152 (2011).
219. Lamb, L.E., Zarif, J.C. & Miranti, C.K. The androgen receptor induces integrin alpha6beta1 to promote prostate tumor cell survival via NF-kappaB and Bcl-xL Independently of PI3K signaling. *Cancer Res* **71**, 2739-2749 (2011).
220. Giuriato, S., *et al.* Tyrosine phosphorylation and relocation of SHIP are integrin-mediated in thrombin-stimulated human blood platelets. *J Biol Chem* **272**, 26857-26863 (1997).
221. Muraille, E., Bruhns, P., Pesesse, X., Daron, M. & Erneux, C. The SH2 domain containing inositol 5-phosphatase SHIP2 associates to the immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif of Fc gammaRIIB in B cells under negative signaling. *Immunol Lett* **72**, 7-15 (2000).
222. Brauweiler, A., Tamir, I., Marschner, S., Helgason, C.D. & Cambier, J.C. Partially distinct molecular mechanisms mediate inhibitory FcgammaRIIB signaling in resting and activated B cells. *J Immunol* **167**, 204-211 (2001).

223. Harriague, J. & Bismuth, G. Imaging antigen-induced PI3K activation in T cells. *Nat Immunol* **3**, 1090-1096 (2002).
224. Fong, D.C., *et al.* Mutational analysis reveals multiple distinct sites within Fc gamma receptor IIB that function in inhibitory signaling. *J Immunol* **165**, 4453-4462 (2000).
225. Antonarakis, E.S., Carducci, M.A. & Eisenberger, M.A. Novel targeted therapeutics for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Cancer Lett* **291**, 1-13 (2010).
226. Brigger, I., Dubernet, C. & Couvreur, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev* **54**, 631-651 (2002).
227. Hudson, P.J. & Souriau, C. Engineered antibodies. *Nat Med* **9**, 129-134 (2003).
228. Okada, H., *et al.* Role of the inositol phosphatase SHIP in B cell receptor-induced Ca²⁺ oscillatory response. *J Immunol* **161**, 5129-5132 (1998).
229. Jacob, A., Cooney, D., Tridandapani, S., Kelley, T. & Coggeshall, K.M. Fc gammaRIIb modulation of surface immunoglobulin-induced Akt activation in murine B cells. *J Biol Chem* **274**, 13704-13710 (1999).
230. Shelburne, C.P. & Abraham, S.N. The mast cell in innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol* **716**, 162-185 (2011).
231. Voehringer, D. Basophils in allergic immune responses. *Curr Opin Immunol* **23**, 789-793 (2011).
232. Buhring, H.J., *et al.* The monoclonal antibody 97A6 defines a novel surface antigen expressed on human basophils and their multipotent and unipotent progenitors. *Blood* **94**, 2343-2356 (1999).
233. Maurer, M., *et al.* The c-kit ligand, stem cell factor, can enhance innate immunity through effects on mast cells. *J Exp Med* **188**, 2343-2348 (1998).
234. Siracusa, M.C., Perrigoue, J.G., Comeau, M.R. & Artis, D. New paradigms in basophil development, regulation and function. *Immunol Cell Biol* **88**, 275-284 (2010).
235. Ruschmann, J., *et al.* The Role of SHIP in the Development and Activation of Mouse Mucosal and Connective Tissue Mast Cells. *J Immunol* (2012).
236. Komiya, A., *et al.* Expression and function of toll-like receptors in human basophils. *Int Arch Allergy Immunol* **140 Suppl 1**, 23-27 (2006).
237. Valent, P. Cytokines involved in growth and differentiation of human basophils and mast cells. *Exp Dermatol* **4**, 255-259 (1995).
238. Min, B. Basophils: what they 'can do' versus what they 'actually do'. *Nat Immunol* **9**, 1333-1339 (2008).
239. Echtenacher, B., Mannel, D.N. & Hultner, L. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature* **381**, 75-77 (1996).
240. Malaviya, R. & Abraham, S.N. Mast cell modulation of immune responses to bacteria. *Immunol Rev* **179**, 16-24 (2001).
241. Dawicki, W. & Marshall, J.S. New and emerging roles for mast cells in host defence. *Curr Opin Immunol* **19**, 31-38 (2007).
242. Galli, S.J., Maurer, M. & Lantz, C.S. Mast cells as sentinels of innate immunity. *Curr Opin Immunol* **11**, 53-59 (1999).
243. Mekori, Y.A. & Metcalfe, D.D. Mast cells in innate immunity. *Immunol Rev* **173**, 131-140 (2000).
244. Galli, S.J., Nakae, S. & Tsai, M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* **6**, 135-142 (2005).
245. Jawdat, D.M., Albert, E.J., Rowden, G., Haidl, I.D. & Marshall, J.S. IgE-mediated mast cell activation induces Langerhans cell migration in vivo. *J Immunol* **173**, 5275-5282 (2004).

246. Suto, H., *et al.* Mast cell-associated TNF promotes dendritic cell migration. *J Immunol* **176**, 4102-4112 (2006).
247. Frandji, P., *et al.* Antigen-dependent stimulation by bone marrow-derived mast cells of MHC class II-restricted T cell hybridoma. *J Immunol* **151**, 6318-6328 (1993).
248. Kambayashi, T., *et al.* Indirect involvement of allergen-captured mast cells in antigen presentation. *Blood* **111**, 1489-1496 (2008).
249. Jutel, M., *et al.* Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. *Nature* **413**, 420-425 (2001).
250. Valitutti, S. & Espinosa, E. Cognate interactions between mast cells and helper T lymphocytes. *Self Nonself* **1**, 114-122 (2010).
251. Gauchat, J.F., *et al.* Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. *Nature* **365**, 340-343 (1993).
252. Demeure, C.E., *et al.* Anopheles mosquito bites activate cutaneous mast cells leading to a local inflammatory response and lymph node hyperplasia. *J Immunol* **174**, 3932-3940 (2005).
253. Miyata, M., *et al.* Mast cell regulation of epithelial TSLP expression plays an important role in the development of allergic rhinitis. *Eur J Immunol* **38**, 1487-1492 (2008).
254. Zhang, J., *et al.* Regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by mast cells, macrophages, and neutrophils. *PLoS One* **6**, e14525 (2011).
255. Kaur, D., *et al.* Mast cell-airway smooth muscle crosstalk: the role of thymic stromal lymphopoietin. *Chest* (2011).
256. de Vries, V.C., Elgueta, R., Lee, D.M. & Noelle, R.J. Mast cell protease 6 is required for allograft tolerance. *Transplant Proc* **42**, 2759-2762 (2010).
257. Becherel, P.A., *et al.* Inducible nitric oxide synthase and proinflammatory cytokine expression by human keratinocytes during acute urticaria. *Mol Med* **3**, 686-694 (1997).
258. van der Heijden, J., *et al.* Phenotypic Variation in IgG Receptors by Nonclassical FCGR2C Alleles. *J Immunol* **188**, 1318-1324 (2012).
259. Bhakta, N.R. & Woodruff, P.G. Human asthma phenotypes: from the clinic, to cytokines, and back again. *Immunol Rev* **242**, 220-232 (2011).
260. Broide, D.H., Finkelman, F., Bochner, B.S. & Rothenberg, M.E. Advances in mechanisms of asthma, allergy, and immunology in 2010. *J Allergy Clin Immunol* **127**, 689-695 (2011).
261. Rosenwasser, L.J. Current understanding of the pathophysiology of allergic rhinitis. *Immunol Allergy Clin North Am* **31**, 433-439 (2011).
262. Boguniewicz, M. & Leung, D.Y. Atopic dermatitis: a disease of altered skin barrier and immune dysregulation. *Immunol Rev* **242**, 233-246 (2011).
263. Liacouras, C.A., *et al.* Eosinophilic esophagitis: updated consensus recommendations for children and adults. *J Allergy Clin Immunol* **128**, 3-20 e26; quiz 21-22 (2011).
264. Wang, J. & Liu, A.H. Food allergies and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **11**, 249-254 (2011).
265. Boden, S.R. & Wesley Burks, A. Anaphylaxis: a history with emphasis on food allergy. *Immunol Rev* **242**, 247-257 (2011).
266. Cernadas, J.R., *et al.* General considerations on rapid desensitization for drug hypersensitivity - a consensus statement. *Allergy* **65**, 1357-1366 (2010).
267. Tracy, J.M. Insect allergy. *Mt Sinai J Med* **78**, 773-783 (2011).

268. Holgate, S.T. Pathophysiology of asthma: what has our current understanding taught us about new therapeutic approaches? *J Allergy Clin Immunol* **128**, 495-505 (2011).
269. Valenta, R., Linhart, B., Swoboda, I. & Niederberger, V. Recombinant allergens for allergen-specific immunotherapy: 10 years anniversary of immunotherapy with recombinant allergens. *Allergy* **66**, 775-783 (2011).
270. Van Scott, M.R., *et al.* Systemic administration of an Fc γ 1-Fc(ϵ)-fusion protein in house dust mite sensitive nonhuman primates. *Clin Immunol* **128**, 340-348 (2008).
271. Sayed, B.A., Christy, A., Quirion, M.R. & Brown, M.A. The master switch: the role of mast cells in autoimmunity and tolerance. *Annu Rev Immunol* **26**, 705-739 (2008).
272. Lock, C., *et al.* Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* **8**, 500-508 (2002).
273. Chen, R., *et al.* Mast cells play a key role in neutrophil recruitment in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest* **108**, 1151-1158 (2001).
274. Hohegger, K., *et al.* Role of mast cells in experimental anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Eur J Immunol* **35**, 3074-3082 (2005).
275. Robbie-Ryan, M., Tanzola, M.B., Secor, V.H. & Brown, M.A. Cutting edge: both activating and inhibitory Fc receptors expressed on mast cells regulate experimental allergic encephalomyelitis disease severity. *J Immunol* **170**, 1630-1634 (2003).
276. Pillai, S., Mattoo, H. & Cariappa, A. B cells and autoimmunity. *Curr Opin Immunol* **23**, 721-731 (2011).
277. Horny, H.P., Sotlar, K. & Valent, P. Mastocytosis: state of the art. *Pathobiology* **74**, 121-132 (2007).
278. Eberle, F.C., Mani, H. & Jaffe, E.S. Histopathology of Hodgkin's lymphoma. *Cancer J* **15**, 129-137 (2009).
279. Gribben, J.G. Implications of the tumor microenvironment on survival and disease response in follicular lymphoma. *Curr Opin Oncol* **22**, 424-430 (2010).
280. Nogai, H., Dorken, B. & Lenz, G. Pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* **29**, 1803-1811 (2011).
281. Campo, E., *et al.* The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* **117**, 5019-5032 (2011).
282. Camilleri-Broet, S., *et al.* Fc γ RIIB is differentially expressed during B cell maturation and in B-cell lymphomas. *Br J Haematol* **124**, 55-62 (2004).
283. Matre, R., Tonder, O. & Endresen, C. Fc receptors in human placenta. *Scand J Immunol* **4**, 741-745 (1975).
284. Hussain, L.A., *et al.* The expression of Fc receptors for immunoglobulin G in human rectal epithelium. *AIDS* **5**, 1089-1094 (1991).
285. Estienne, V., *et al.* Androgen-dependent expression of Fc γ RIIB2 by thyrocytes from patients with autoimmune Graves' disease: a possible molecular clue for sex dependence of autoimmune disease. *FASEB J* **16**, 1087-1092 (2002).
286. Noltenius, H.W. Fc and complement receptors on malignant tumor cells. *Cancer* **48**, 1761-1767 (1981).
287. Cassard, L., *et al.* Selective expression of inhibitory Fc γ receptor by metastatic melanoma impairs tumor susceptibility to IgG-dependent cellular response. *Int J Cancer* **123**, 2832-2839 (2008).

La Trans-inhibition : une nouvelle propriété inhibitrice des RFcγRIIB

Odile Malbec

Institut Pasteur, INSERM U760, Unité d'Allergologie Moléculaire et Cellulaire
25 rue du Dr Roux, Paris, France.

Immunoreceptors recognize antigens and activate cells when they are coligated by multivalent ligands. They share Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs (ITAM). This is the case of FcεRI, the high-affinity receptors for IgE. When they are sensitized by IgE and aggregated by multivalent antigens, they induce secretory responses by mast cells and basophils, leading to the initiation of allergic reactions. By contrast, the low-affinity receptors for IgG, FcγRIIB, which contain an Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif (ITIM), generate inhibitory signals when they are coaggregated with ITAM-bearing receptors. They can also inhibit mast cell proliferation induced by Receptor Tyrosine Kinase such as Kit. Inhibitory capabilities of FcγRIIB lie on the phosphorylation of ITIM tyrosine and the recruitment of the SH2 domain-containing Inositol 5-Phosphatase SHIP1. SHIP1's substrate is the Phosphatidyl Inositol trisphosphate PI(3,4,5)P3, which is produced by the phosphatidyl inositol 3-kinase, PI3K. PI(3,4,5)P3 is a second Messenger shared by numerous transduction pathways induced by various receptors. My thesis work consisted to investigate whether the coligation of an activating receptor with FcγRIIB could inhibit mast cell activation induced by FcεRI that are not coaggregated with FcγRIIB. We found that, when coaggregated with FcεRI, FcγRIIB inhibited not only activation signals induced by co-engaged FcεRI, but also activation triggered by other FcεRI and proliferation signals triggered by Kit. Furthermore, the coaggregation of Kit with FcγRIIB inhibited mast cell activation induced by FcεRI. We named this new property of FcγRIIB trans-inhibition and inhibition of receptors co-ligated with FcγRIIB, cis-inhibition. Trans-inhibition inhibited all secretory responses of mast cells and was also observed in mouse basophils. Trans-inhibition was restricted to ITIM receptors that recruit SHIP1. It could not be induced by ITIM receptors which recruit the tyrosine phosphatase SHP-1, such as KIRL. Trans-inhibition could be achieved in human basophils where it lasted for several days. This desactivation of human basophils could be very interesting to control allergic reactions, in particular concerning polysensitized patients. In fact, the control of the sensitization to one allergen could trans-inhibit the responses to all other allergens, even those that are not characterized. Finally, I have shown that trans-inhibition could have therapeutic implications in the treatment of cancers. In fact, the coaggregation of Kit and FcγRIIB inhibited the *in vitro* proliferation and the *in vivo* growth of a mouse mastocytoma whose autonomous proliferation depends on the oncogen Abl. My thesis work allows therefore to extend the inhibitory properties of FcγRIIB and open new therapeutic possibilities concerning allergology and cancer.

La Trans-inhibition : une nouvelle propriété inhibitrice des RFcγIIB

Odile Malbec

Institut Pasteur, INSERM U760, Unité d'Allergologie Moléculaire et Cellulaire
25 rue du Dr Roux, Paris, France.

Les immunorécepteurs sont les récepteurs capables de reconnaître l'antigène et de déclencher l'activation des cellules qui les expriment quand ils sont agrégés. Ils possèdent en effet des motifs d'activation intracytoplasmiques nommés ITAM pour Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif. C'est le cas des RFcεI, les récepteurs de forte affinité pour les IgE. Lorsqu'ils sont sensibilisés par des IgE et agrégés par un antigène multivalent, les RFcεI induisent des réponses sécrétoires dans les mastocytes et les basophiles, ce qui conduit à l'initiation des réactions allergiques. Par contre, les RFcγIIB, des récepteurs de faible affinité pour les IgG ne sont pas capables d'activer les cellules. L'activation cellulaire induite par les récepteurs à ITAM peut être inhibée par les RFcγIIB quand ils sont coaggrégés par des complexes immuns à IgG. Les RFcγIIB possèdent dans leur domaine intracytoplasmique un motif d'inhibition nommé ITIM pour Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif. Ils sont également capables d'inhiber la prolifération cellulaire induite par des récepteurs à activité tyrosine kinase ou RTK comme Kit. Les capacités inhibitrices des RFcγIIB reposent sur la phosphorylation de la tyrosine de l'ITIM et le recrutement de l'inositol phosphate phosphatase SHIP1. Le substrat de SHIP1 est le phosphatidyl Inositol (3,4,5) tri-phosphate (PI(3,4,5)P3) qui est produit par la phosphatidyl inositol 3-kinase ou PI3K. Le PI(3,4,5)P3 est un second messenger lipidique commun à de nombreuses voies de signalisation empruntées par de nombreux récepteurs membranaires. Mon travail de thèse a consisté à rechercher si la coligation d'un récepteur activateur avec les RFcγIIB peut inhiber d'autres signaux intracellulaires que ceux transmis par le récepteur co-ligué. J'ai montré que la coaggrégation des RFcεI et des RFcγIIB inhibe l'activation des mastocytes induite par des RFcεI non coaggrégés avec les RFcγIIB ainsi que la prolifération des mastocytes induite par Kit. En parallèle, la coaggrégation de Kit et des RFcγIIB inhibe l'activation des mastocytes induite par les RFcεI. Nous avons appelé cette nouvelle propriété des RFcγIIB, la trans-inhibition, et par analogie, nous avons appelé l'inhibition des signaux induits par les récepteurs coaggrégés aux RFcγIIB, la cis-inhibition. La trans-inhibition affecte toutes les réponses sécrétoires des mastocytes et peut être active dans d'autres types cellulaires tels que les basophiles de souris. La trans-inhibition est restreinte aux récepteurs à ITIM recrutant SHIP1. En effet, elle n'est pas induite par des récepteurs à ITIM recrutant la tyrosine phosphatase SHP-1 comme KIRL des cellules NK. La trans-inhibition est également fonctionnelle dans les basophiles humains dans lesquels elle dure plusieurs jours. Cette désactivation des basophiles humains serait particulièrement intéressante dans la prise en charge de manifestations allergiques surtout concernant les patients polysensibilisés. En effet la prise en charge de la sensibilité à un allergène permettrait de contrôler la réponse aux autres allergènes même pour ceux qui ne seraient pas identifiés. Finalement, j'ai montré que la trans-inhibition pourrait avoir une implication thérapeutique dans le traitement des cancers. En effet, la coaggrégation de Kit et des RFcγIIB inhibe la prolifération *in vitro* et la croissance *in vivo* d'un mastocytome murin dont la prolifération autonome dépend de l'oncogène Abl. Mon travail de thèse a par conséquent permis d'étendre les capacités inhibitrices des RFcγIIB et ouvre de nouvelles possibilités thérapeutiques en allergologie et en cancérologie.