



HAL
open science

Mise en évidence de nouvelles lignées mastocytaires humaines exprimant un récepteur aux IgE fonctionnel et différents types de récepteurs KIT, utilisées comme modèles d'étude de l'allergie et des mastocytoses

Rosine Saleh

► **To cite this version:**

Rosine Saleh. Mise en évidence de nouvelles lignées mastocytaires humaines exprimant un récepteur aux IgE fonctionnel et différents types de récepteurs KIT, utilisées comme modèles d'étude de l'allergie et des mastocytoses. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA11T009 . tel-00963789

HAL Id: tel-00963789

<https://theses.hal.science/tel-00963789>

Submitted on 22 Mar 2014

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.

**UNIVERSITE PARIS XI
FACULTE DE MEDECINE PARIS SUD**

ÉCOLE DOCTORALE DE CANCÉROLOGIE

Année universitaire 2012-2013

THÈSE
Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI
Spécialité: Biologie cellulaire et moléculaire

Présentée et soutenue publiquement par :

Rosine SALEH

Le 21 Mars 2013

Mise en évidence de nouvelles lignées mastocytaires humaines exprimant un récepteur aux IgE fonctionnel et différents types de récepteurs KIT, utilisées comme modèles d'étude de l'allergie et des mastocytoses

JURY

Président : Monsieur le Pr. Christian AUCLAIR
Rapporteur : Monsieur le Pr. Jean-Louis BEAUDEUX
Rapporteur : Monsieur le Dr. Marc BENHAMOU
Examineur : Monsieur le Pr. François DAUTRY
Examineur : Monsieur le Dr. Fatah OUAAZ
Directeur de thèse : Monsieur le Pr. Michel AROCK

Sommaire

REMERCIEMENTS.....	5
ABREVIATIONS.....	7
AVANT-PROPOS.....	10
I-INTRODUCTION	12
I-1 Les mastocytes	12
I-1.1 Généralités	12
I-1.2 Morphologie des MCs en microscopie optique.....	13
I-1.3 Morphologie des mastocytes en microscopie électronique.....	14
I-2 Répartition et classification des mastocytes.....	15
I-2.1 Chez les rongeurs	15
I-2.2 Chez l'homme	16
I-3 Ontogénie des mastocytes.....	17
I-4 Les principaux modèles de mastocytes primaires en culture.....	19
I-4.1 Les modèles murins : BMMC et PCMC.....	20
I-4.2 Les modèles chez l'homme : CBMC et PBMC	21
I-5 Les facteurs de différenciation mastocytaire	22
I-5.1 L'interleukine 3 (IL-3)	22
I-5.2 L'interleukine 6 (IL-6)	23
I-5.3 L'interleukine 4 (IL-4)	23
I-5.4 Le nerve growth factor (NGF)	24
I-6 Médiateurs mastocytaires	25
I-6.1 Médiateurs préformés	25
I-6.1.1 Histamine	25
I-6.1.2 Protéoglycanes : héparine et chondroïtine sulfate	26
I-6.1.3 Les protéases neutres : tryptase, chymase et carboxypeptidase A.....	28
I-6.1.4 Les hydrolases acides	30
I-6.2 Médiateurs néoformés et synthétisés	30
I-6.2.1 Les dérivés des lipides membranaires	30
I-6.2.2 Les cytokines et chimiokines.....	32
I-6.2.3 Le monoxyde d'azote (NO)	33
I-7 Fonctions des mastocytes	34

I-7.1 Immunopathologie et mastocyte.....	34
I-7.1.1 L'allergie	34
I-7.1.2 La sclérose en plaque	37
I-7.2 Rôle dans l'immunité adaptative	38
I-7.3 Rôle dans la défense contre les parasites et les bactéries	40
I-7.4 Rôle dans la défense contre les parasites	40
I-7.5 Rôle dans la défense contre les bactéries	41
I-8 L'activation mastocytaire via le récepteur FcεRI	46
I-8.1 Structure du récepteur de haute affinité aux IgE (FcεRI)	46
I-8.2 Le récepteur de faible affinité pour les IgE (FcεRII ou CD23)	49
I-8.3 Rôle des IgE	49
I-8.4 La signalisation du récepteur FcεRI	51
I-8.5 La régulation négative du récepteur FcεRI	53
I-8.6 Expression des FcεRI par les mastocytes	53
I-9 Le SCF et son récepteur KIT (CD117)	55
I-9.1 Structure du récepteur KIT.....	56
I-9.2 Activation de KIT	57
I-9.3 Expression tissulaire	58
I-10 Les mastocytoses	60
I-10.1 Définition.....	60
I-10.2 Classification des mastocytoses	60
I-10.3 Physiopathologie des mastocytoses	63
I-10.4 Traitement	64
I-11 Les lignées mastocytaires humaines	65
I-11.1 La lignée HMC1 et ses deux sous-clones HMC1.1 et HMC1.2	66
I-11.2 La lignée LAD	68
I-11.3 La lignée LUVA	69
II- OBJECTIF DU TRAVAIL	71
III- MATERIELS ET METHODES	73
III-1 Obtention de mastocytes humains dérivés de progéniteurs de sang de cordon ombilical (CBMC).....	73
III-2 Coloration de May-Grünwald Giemsa (MGG) et bleu de toluidine	74
III-3 Immunomarquage.....	75
III-4 Analyse et tri cellulaire par cytométrie en flux.....	75
III-4.1 Principe.....	75

III-4.2 Les anticorps et fluorochromes utilisés	76
III-4.3 Préparation des cellules	76
III-5 Production d'IgE humaines	77
III-6 Stimulation des mastocytes	77
III-6.1 Sensibilisation des mastocytes	77
III-6.2 Stimulation par les anti-IgE	78
III-7 Dosage de la β -hexosaminidase.....	78
III-8 Dosage de l'histamine	79
III-9 Techniques de dosage d'autres médiateurs libérés par les mastocytes	80
III-9.1 Dosage du TNF- α	80
III-9.2 Dosage de la PGD2	81
III-10 Analyse de la clonogénicité des lignées cellulaires.....	81
III-11 Analyse par western blot de l'expression de différentes protéines et de leur phosphorylation	82
III-12 Etablissement de 2 lignées cellulaires portant des mutations de KIT	83
III-12.1 Procédure de transfection	83
III-13 Co-culture des lignées mastocytaires avec la lignée stromale de souris MS-5	85
III-14 Etude du caryotype des lignées cellulaires	85
III-15 Xénogreffe des cellules ROSA dans des souris NSG (NOD-SCID-IL2 gamma null).....	86
III-16 Séquençage de KIT	86
III-17 Extraction protéique et dosage de l'activité télomérase	87
III-18 Traitement des cellules par les inhibiteurs de tyrosine kinase.....	87
III-19 Traitement des cellules par l'inhibiteur d'AKT	88
III-20 Etude de la prolifération et de la viabilité cellulaire par test MTT	88
III-21 Microscopie électronique	89
III-22 Analyse statistique	89
IV RESULTATS	90
IV-1 : Isolement, caractérisation et entretien de populations pures de mastocytes à partir de sang de cordon ombilical humain normal : la lignée ROSA KIT WT.	90
IV-1.1 Isolement de la lignée ROSA KIT WT.....	90
IV-1.2 Caractérisation morphologique de la lignée ROSA KIT WT	91
IV-1.3 Mise en évidence de l'expression de tryptase et de l'histidine décarboxylase (HDC) au niveau des cellules ROSA KIT WT.....	92
IV-1.4 Mise en évidence du récepteur KIT et du récepteur de haute affinité pour les IgE (Fc ϵ RI) sur les cellules ROSA KIT WT	92

IV-1.5 Effet du traitement par différentes cytokines et par l'IgE sur l'expression de KIT et de FcεRI au niveau des cellules de la lignée ROSA KIT WT	93
IV-1.6 Immunophénotypage de la lignée ROSA KIT WT.....	94
IV-1.7 Mise en évidence de l'activation des cellules de la lignée ROSA KIT WT par le couple IgE-anti IgE	95
IV-1.8 Mise en évidence de l'aptitude des cellules de la lignée ROSA KIT WT à devenir matures après co-culture sur une sous-couche de cellules MS-5	96
IV-2 Obtention de lignées immortalisées de mastocytes humains infectées par un récepteur KIT de structure anormale: les lignées ROSA KIT D816V et ROSA KIT Delta417-419InsY	99
IV-2.1 Etude du caryotype des 3 lignées cellulaires :.....	100
IV-2.2 Etude de l'activité télomérase dans les 3 lignées cellulaires par méthode TRAP	100
IV-2.3 Caractérisation morphologique des ROSA KIT D816V et ROSA KIT Delta 417-419 insY	102
IV-2.4 Effet du traitement par IL-4 et par l'IgE sur l'expression de KIT et de FcεRI au niveau des cellules ROSA KIT D816V et ROSA KIT Delta 417-419 insY.....	103
IV-2.5 Effet du rhSCF sur l'expression de CD203c, CD38 et KIT sur les 3 lignées cellulaires.....	104
IV-2.6 Etude de la clonogénicité des 3 lignées cellulaires en milieu semi solide.....	105
IV-2.7 Etude de l'activation des cellules de la lignée ROSA KIT D816V et ROSA KITDelta417-419InsY par le couple IgE-anti IgE	105
IV-2.8 Etude de la phosphorylation de KIT, AKT et STAT5 dans les 3 lignées cellulaires ROSA.....	106
IV-2.9 Evaluation des effets antiprolifératifs de trois inhibiteurs de tyrosine kinase sur les cellules ROSA	108
IV-2.10 Evaluation de l'effet antiprolifératif d'un inhibiteur d'AKT sur les cellules ROSA KIT D816V et ROSA KIT WT.....	109
IV-2.11 Evaluation du pouvoir tumorigène des cellules ROSA KIT WT et ROSA KIT D816V dans des souris NSG.....	110
IV-2.12 Corrélation entre le pourcentage des cellules CD45+/CD117+ et les cellules tryptase + et chymase+	113
V – DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	115
VI – CONCLUSIONS.....	130
VII – BIBLIOGRAPHIE	132
VIII – ANNEXE	147

REMERCIEMENTS

Ce travail est le fruit de nombreuses rencontres avec diverses personnes que je souhaite remercier ici pour toute l'aide, le soutien, les conseils qu'elles m'ont apportés ou tout simplement pour leur bonne humeur et leur joie de vivre qui ont fait de ces trois années une aventure incroyable.

Tout d'abord, je souhaite remercier le Directeur de l'Ecole Doctorale de Cancérologie, le Professeur Christian AUCLAIR, président de ce jury. Merci également pour son accueil au sein de son équipe.

J'adresse mes profonds remerciements au Professeur Jean-Louis BEAUDEUX, ainsi qu'au Docteur Marc BENHAMOU, d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse et de bien avoir voulu évaluer ce travail dans les courts délais que nous avons sollicités. Merci également au Professeur Francois DAUTRY et Docteur Fatah OUAAZ, d'avoir accepté d'évaluer la qualité de mon travail en tant qu'examineur.

Ce travail n'existerait pas sans la confiance et l'immense aide et soutien qu'il m'a apporté au cours de ces trois années, je parle bien évidemment de mon directeur de thèse Michel AROCK. Mille fois merci car c'est au moins le nombre de fois où je suis venu vous déranger pour poser des questions en tout genre dont parfois certaines naïves. Vous avez toujours su y répondre avec gentillesse et avec le sourire. Merci pour votre soutien, confiance, patience et pour tout le temps que vous m'avez consacré.

Ce travail a été réalisé au sein du LBPA (Laboratoire de Biologie et Pharmacologie Appliquée). Je souhaite remercier le directeur du laboratoire Docteur Malcolm BUCKLE de m'avoir accueilli au sein du laboratoire. J'ai pu travailler dans un cadre particulièrement agréable, grâce à l'ensemble des membres de l'équipe LBPA. Je pense particulièrement à Frédéric, Ilham, Marilyne, Thierry, lue, Badia. Merci à tous pour votre bonne humeur et pour toutes ces discussions scientifiques.

Ce travail a été effectué en collaboration avec le Service d'Hématologie Clinique de Vienne. Je tiens à remercier plus particulièrement le Pr Peter VALENT et son équipe qui m'ont aidé à effectuer l'étude in vivo, le dosage d'histamine ainsi que la microscopie électronique. Je remercie également le Laboratoire Central d'hématologie, du Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière de Paris, particulièrement Patrick BONNEMY, Martine BRISSARD, le Dr Elise CHAPIRO, le Dr Magali LE GARFF-TAVERNIER, le Pr Hélène MERLE-BERAL et le Pr Florence NGUYEN-KHAC pour leur aide précieuse dans l'étude du caryotype et du phénotypage des lignées cellulaires.

J'aimerais adresser mes remerciements au Docteur Iuba TCHERTANOV et son équipe, pour leur gentillesse tout au long de ces années. Je remercie également le département de Biologie pour son accueil. Merci au Dr Gerald PEYROCHE, à Sophie, Dany et Jean.

Ghaith, merci surtout d'avoir été présente durant ces trois années. Je te remercie pour l'aide précieuse que tu m'as apporté pour les expériences et surtout ton expertise dans le domaine de l'étude de l'activité télomérase. Plus qu'une amie, tu es devenue une sœur. Merci pour toutes les soirées que l'on a passées ensemble et surtout pour les cadeaux que tu m'as rapportés de Vienne.

Un immense merci à Caro d'avoir été présente dans mes moments de doutes; de m'avoir remonté le moral et encouragé à ne pas laisser tomber. Ton soutien a été précieux et surtout ton dosage ELISA de PGD2 et ton aide avec le logiciel prisme.

Marianne, un immense merci, tu es une amie très spéciale, qui m'aura énormément fait rire, m'aura soutenu et m'aura aidé dans les périodes de doute. Merci pour ta bonne humeur et pour tes histoires drôles.

Manal, merci pour tes conseils, ta bonne humeur.

Sandra, tu étais la première à me faire confiance, merci pour tout.

Siham, merci pour ton soutien, je n'oublierai jamais la soirée filles avec Nawal.

Sylvie, merci pour ton aide précieuse et surtout pour les gâteaux que tu as préparés.

Christine, merci pour tes conseils précieux pour les western-blot et surtout ta disponibilité et ton sourire

Manish, Thank you (merci).

Merci Anne marie et Janine pour votre accueil, les conseils et surtout pour votre patience.

Merci Mme Muriel Nicoletti pour votre accueil et votre aide précieuse.

Mes derniers mots je les adresse à ma famille et mes amis :

Faythen Soyo, ma sœur de galère.

Rajae, je ne sais pas quoi te dire..... Merci.

Perla, Merci.

Stéphanie, ma psychologue.

Ali, merci pour tout ce que tu as fait pour moi, pour ton soutien et ta patience.

Abbas, Bouchra, merci.

Soumaya et ahmed, merci pour votre soutien. Sans vous je ne serai pas la aujourd'hui.

Caroline, Nadine, Raymonda, Hoda, Rita, Rami et Alouchi, je vous aime énormément.

Titi, Alouchi, Charouffe et Hamoudi, vous êtes les plus beaux cadeaux que j'ai. Je vous adore.

Finalement, mes parents qui m'auront permis de poursuivre mes études jusqu'à aujourd'hui. Quoi que je dise, quoi que je fasse, je ne saurais jamais remercier les deux très chères personnes à mon cœur, ceux à qui ni les mots, ni les gestes, ni rien au monde pourra exprimer mes sentiments envers eux, à ceux qui me donnent la joie de vivre, grâce à qui la vie devient un paradis au quotidien, et qui n'ont jamais douté de moi.....A vous les perles de mes yeux...Papa, Maman "je vous aime".

ABREVIATIONS

AA : Acide arachidonique

APC : Allophycocyanine

ADN : Acide déoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

BCR : B cell receptor

BMMC : Bone marrow derived mast cell

BSA : Bovine serum albumin

BTK : Bruton's tyrosine kinase

CBMC : Cord blood derived mast cell

CD : Cluster de différenciation

CMH : Complex majeur d'histocompatibilité

COX : Cyclo-oxygénase

CPA : Cellule(s) présentatrice(s) d'antigène

DAG : Diacylglycérol

DCM : Mastocytose cutanée diffuse

D.O. : Densité optique

EAE : Encéphalomyélite allergique expérimentale

ECD : Extracellular domain

ELISA : Enzyme linked immunosorbent assay

ERK : Extracellular signal related kinase

FITC : Fluoresceine isothiocyanate

GADS : Growth factor receptor bound GRB2 related adaptor protein

GAG : Glysoaminoglycanes

GM-CSF : Granulocyte macrophage colony stimulating factor

H1/4 : Récepteurs histamine

ICAM-1 : Intercellular adhesion molecule-1

IFN- γ : interféron gamma

IgX : Immunoglobuline de type X

IL-X : Interleukine-X

ITAM : Immunoreceptor Tyrosine based activatory motif

ITIM : Immunoreceptor Tyrosine based inhibitory motif

JAK : Janus kinase

KDa : Kilo Dalton

LCR : Liquide céphalo-rachidien

LB : lymphocyte B

LFA1 : Lymphocyte functional associated antigen 1

LOX : Lipo-oxygénase

LPS : Lipopolysaccharide

LT : Lymphocyte T

LTB4, C4, D4 et E4 : Leucotriènes B4, C4, D4 et E4

MAPK : Mitogen activated protein kinase

MC (s) : mastocyte (s)

MCM : Mastocyte(s) de rongeur de phénotype muqueux

MCP : Mast cell progenitor

MCS : Mastocyte(s) de rongeur de phénotype séreux

MCT : Mastocyte(s) humain(s) tryptase positif

MCTC : Mastocyte(s) humain(s) tryptase chymase positif

MCC : Mastocyte(s) humain(s) chymase positif

MCP-1 : mast cell protease 1

MGG : May-Grünwald Giemsa

MPCM : Mastocytose cutanée maculo-papulaire

NGF : Nerve growth factor

NK : Natural Killer

NO : monoxide d'azote

NOS : Nitric oxyde synthase

PAF : Plateled activating factor

PAR-2 : Protease activated receptor 2

PBMC : peripheral blood derived mast cells
PCMC : Peritoneal cell derived mast cell
PDK1 : 3 Phosphoinositide dependent protein kinase 1
PDGFR : Plated derived growth factor receptor
PGD2 : Prostaglandine D2
PGN : Peptidoglycanes
PIP3 : Phosphatidyl inositol (3,4,5) triphosphate
PLA2 : Phospholipase A2
RE : Reticulum endoplasmique
RTK : Receptor tyrosine kinase
SCF : Stem cell factor
SLP76 : SH2 domain containing leukocyte protein of 76 KDa
SM : mastocytose systémique
SOS : Sun of sevenless
SP : Sclérose en plaque
SPHK : Sphingosine kinase
STAT : Signal transducer and activator of transcription
SYK : Spleen tyrosine kinase
TBS : Tris buffered saline
TCR : Tcell receptor
Th : lymphocytes T helper
TMEP : Telangiectasia macularis eruptiva perstans
TNF- α : Tumor necrosis factor alpha

AVANT-PROPOS

Les mastocytes (MCs) sont des cellules tissulaires issues des cellules hématopoïétiques multipotentes non engagées CD34+. Leur différenciation, leur survie et leur prolifération sont essentiellement sous la dépendance du stem cell factor (SCF) dont le récepteur spécifique, dénommé KIT, est une molécule transmembranaire à activité tyrosine-kinase (TK) intrinsèque. Les MCs jouent un rôle important dans l'initiation de la réponse immunitaire innée et adaptative, ainsi que dans les réactions allergiques IgE-dépendantes.

Les mastocytoses sont des néoplasies myéloïdes caractérisées par une accumulation anormale et l'activation fréquente de mastocytes dans divers organes. Les organes généralement atteints sont la moelle osseuse, la peau, le foie et le tractus gastro-intestinal. Chez les enfants, la forme la plus fréquente est limitée à une atteinte cutanée. Par contre, chez la plupart des patients adultes, on diagnostique la forme systémique de la maladie. Alors que dans les mastocytoses pédiatriques un certain nombre de mutations de *KIT* différentes peuvent être détectées (dont la mutation KIT Delta 417-419 insY), la mutation KIT D816V est retrouvée chez la plupart (>85%) des patients adultes avec mastocytose systémique. Ces mutations ont été montrées comme induisant l'activité TK de KIT en l'absence de SCF.

Au cours de ma thèse, nous avons réussi à établir, à partir de cellules souches hématopoïétiques de sang de cordon cultivées à long terme en présence de SCF, une nouvelle lignée mastocytaire humaine stable, dénommée ROSA KIT^{WT}, exprimant le récepteur de haute affinité aux IgE (FcεRI) et présentant un récepteur KIT de structure normale. Nous avons donc pu ensuite caractériser cette nouvelle lignée qui reste dépendante du SCF pour sa survie et sa croissance. Cette lignée pourra être utilisée pour mieux analyser les événements intracellulaires découlant de l'activation du FcεRI, identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans le cadre de l'allergie et pour mettre au point un test de criblage à haut débit de molécules potentiellement antidégranulantes.

Par ailleurs, pour pouvoir étudier le rôle transformant des mutants de *KIT* retrouvés au cours des mastocytoses, nous avons transfecté les cellules de la lignée ROSA *KIT*^{WT} par des vecteurs lentiviraux apportant une construction codant pour le *KIT* muté en D816V ou le *KIT* muté Delta 417-419 insY. Ceci nous a permis d'établir deux nouvelles lignées mastocytaires humaines SCF indépendantes, ROSA *KIT*^{D816V} et ROSA *KIT*^{Delta 417-419 insY}, qui pourront être utilisées pour étudier l'impact des mutations de *KIT* sur la signalisation intracellulaire, afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. En outre, ces cellules présentant un *KIT* muté pourront être utilisées pour le criblage à haut débit de molécules à activité antiproliférative potentielle. Enfin, nous avons réussi à greffer les cellules *KIT* muté à des souris NSG, y reproduisant une maladie similaire à la mastocytose systémique chez l'homme. De ce fait, les molécules identifiées comme potentiellement intéressantes *in vitro* pourront être administrées ultérieurement *in vivo* pour estimer leur activité sur animal greffé.

I-INTRODUCTION

I-1 Les mastocytes

I-1.1 Généralités

Les mastocytes (MCs) ont été décrits et mis en évidence pour la première fois il y a plus d'un siècle par le scientifique allemand Paul Ehrlich (*Ehrlich 1878*). Il baptisa ces éléments «mastzellen» pour «cellules bien nourries» et il fit à l'époque l'hypothèse, qui s'avèrera erronée, que les granules cytoplasmiques correspondaient à des produits de phagocytose et étaient le reflet de la richesse nutritionnelle locale.

Les mastocytes sont des cellules tissulaires localisées dans les tissus conjonctifs de la peau, du tractus digestif et respiratoire, à proximité des vaisseaux et des terminaisons nerveuses, ainsi que dans les muqueuses intestinale et respiratoire (*Weidner et Austen 1993*). Ils ne circulent jamais dans le sang à l'état normal. Ces cellules représentent toutefois une population très hétérogène, d'une espèce à l'autre, mais aussi au sein d'une même espèce, avec des variations phénotypiques importantes aussi bien au niveau morphologique que biochimique et fonctionnel (*Csaba et Kovacs 1975 ; Welle 1997*).

Les mastocytes, indépendamment de leur localisation, ont en commun certaines caractéristiques, dont la présence de nombreux granules intracytoplasmiques, la coloration métachromatique de ces granules par des colorants basiques ou leur capacité à libérer des médiateurs en réponse à une activation induite par des IgE. Ces cellules sont donc impliquées dans les réactions d'hypersensibilité immédiate, mais aussi dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques dans l'organisme.

L'origine des mastocytes est longtemps restée inconnue et fut l'objet de nombreuses hypothèses au sein de la communauté scientifique, jusqu'à ce qu'on découvre que ces éléments dérivent des cellules souches hématopoïétiques multipotentes.

I-1.2 Morphologie des MCs en microscopie optique

Après coloration par le May-Grünwald Giemsa et observation en microscope optique, le MC au repos apparaît comme une cellule mononucléée de 8 à 20 μm de diamètre avec une forme variable (ronde, ovale, polygonale, étoilée ou fusiforme). Le cytoplasme est incolore ou légèrement basophile et rempli de grosses granulations colorées en violet foncé. Les granules (d'un diamètre de 0,2 à 0,6 μm) sont limités par une simple membrane périgranulaire et leur morphologie varie en fonction de leur degré de maturation et de l'espèce considérée.

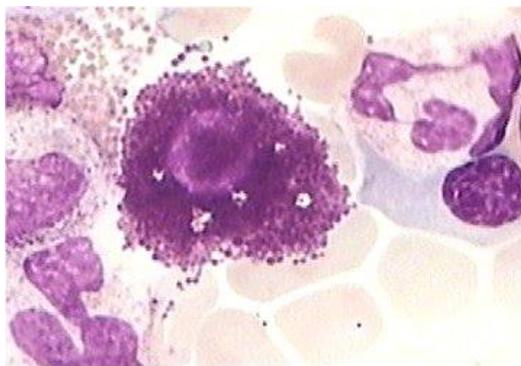


Figure 1 : Aspect cytologique d'un mastocyte médullaire (coloration au May-Grünwald Giemsa)

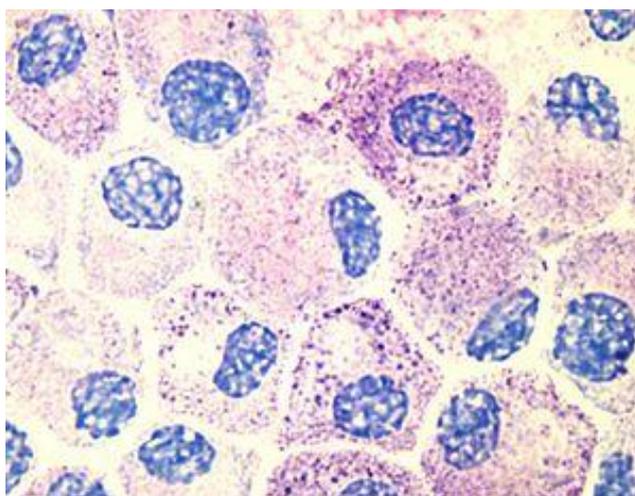


Figure 2 : Aspect cytologique des mastocytes après coloration au bleu de toluidine : mise en évidence de la métachromasie du contenu granulaire.

Ces granulations sont métachromatiques avec le bleu de toluidine et le Giemsa sur coupe en paraffine et certaines se colorent avec la safranine et le sulfate de berbérine. Les granulations fixent également l'acridine orange ce qui permet de les déceler sur coupes étudiées en lumière ultraviolette (fluorescence rouge sur fond vert). Le noyau du mastocyte est central ou excentré, constitué généralement d'un seul lobe de forme régulière mais peut présenter parfois une forme irrégulière, voire un aspect polylobé, et relativement important (représentant jusqu'à 50% de la surface cellulaire totale). Ce noyau peut présenter un ou deux nucléoles.

I-1.3 Morphologie des mastocytes en microscopie électronique

Les mastocytes apparaissent en microscopie électronique comme des cellules mononucléées dont le cytoplasme est rempli par des granules. Le noyau, qui ne présente aucune particularité notable, est étendu et contient une chromatine partiellement condensée. La surface des cellules comprend des replis discrets régulièrement disposés.

Les granulations présentent une organisation ultrastructurale très caractéristique. Elles sont entourées d'une membrane simple. Leur contenu, très variable, apparaît sous forme d'un matériel plus ou moins dense aux électrons, souvent d'aspect inhomogène, avec des particules petites ou moyennes. Des particules granulaires, organisées en un réseau irrégulier, ainsi que des structures cristallines ou paracristallines peuvent être observées.

La membrane cytoplasmique émet souvent des prolongements plus ou moins étendus et plus ou moins nombreux. Dans le cytoplasme, divers organites habituels (mitochondries, réticulum endoplasmique lisse et rugueux) sont présents ainsi que des vacuoles lipidiques et des filaments intermédiaires.

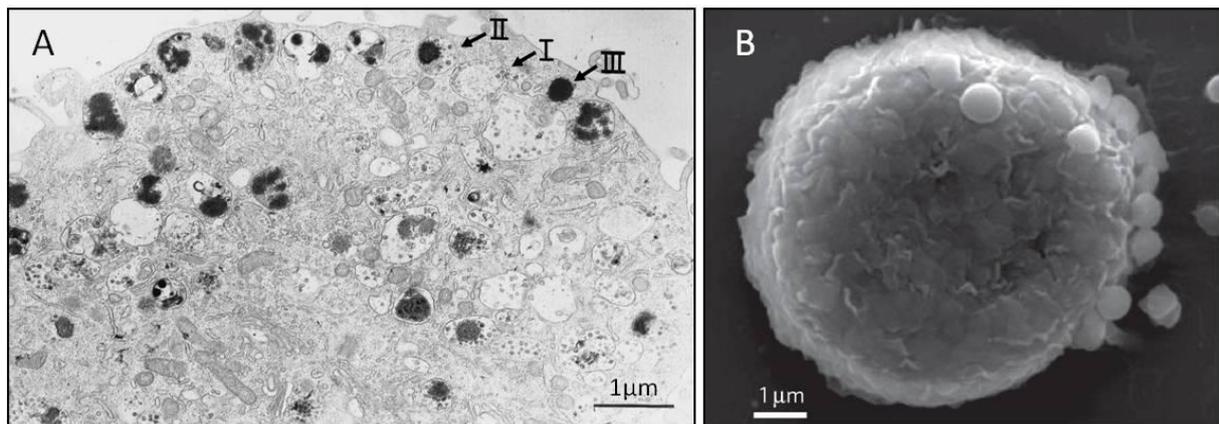


Figure 3 : Morphologie des granules: (A) Microscopie électronique du contenu d'un mastocyte, identification des granules de type I, II et III. (B) Microscopie électronique à balayage d'un mastocyte partiellement dégranulé. Modifié de Raposo *et al.* et de St. John *et al.* (Raposo *et al.* 1997 ; St John *et al.* 2012).

I-2 Répartition et classification des mastocytes

Anatomiquement, les mastocytes sont localisés dans tous les organes. Ils sont souvent situés près des vaisseaux sanguins et lymphatiques, près des terminaisons nerveuses et sous les surfaces épithéliales (tractus respiratoire et digestif, peau). Ils sont ainsi exposés aux antigènes de l'environnement. Les mastocytes occupent ainsi une position tissulaire particulière, près de la porte d'entrée de substances ou organismes étrangers. Ces cellules sont en effet retrouvées en plus grand nombre au niveau des voies aériennes supérieures et inférieures, des conjonctives, du derme ou de la muqueuse gastro-intestinale.

La classification en sous-types mastocytaires a été basée sur l'observation morphologique de ces cellules et sur l'étude de leur composition biochimique en protéases.

I-2.1 Chez les rongeurs

On distingue deux sous-types majoritaires : les mastocytes séreux (MCS) et les mastocytes muqueux (MCM). Les différences entre les 2 sous-types incluent la taille, le contenu en histamine, en protéoglycanes (héparine et chondroïtine sulfate) et en protéases neutres. Le diamètre des mastocytes varie de 10 à 20 µm pour les MCS à 5 à 10 µm pour les MCM.

Les mastocytes de type séreux (MCS) sont présents dans le tissu conjonctif de nombreux organes, dans le derme, dans le péritoine. Ils ont une morphologie caractéristique. Ces mastocytes contiennent une assez grande quantité d'histamine, par exemple dans le péritoine, 15 pg /cellule. Ils contiennent aussi de l'héparine (*Tsai et al. 1991*). Plus de 50 % des protéines sont constituées d'une protéase particulière, la mast cell protease 1 (MCP-1) et d'une carboxypeptidase. Les mastocytes séreux fabriquent de grandes quantités de prostaglandines, en particulier de la PGD2. Enfin, le nombre et la densité des récepteurs aux IgE y sont plus importants que sur les mastocytes muqueux.

Les mastocytes de type muqueux (MCM) sont présents dans les muqueuses, en particulier au niveau du tractus gastro-intestinal (*Vliagoftis et Befus 2005*). De plus petite taille, ils sont moins riches en granules. Ceux-ci sont colorables seulement par le bleu alcian, mais ni par la safranine, ni par le sulfate de berbérine. Ces granules contiennent surtout de la chondroïtine sulfate E, mais une plus faible quantité d'histamine, de 1 à 2 pg/cellule. Ils fabriquent de grandes quantités de leucotriènes, comme la LTC4 (*Razin et al. 1982 ; Razin et al. 1983*). Les mastocytes de type conjonctif semblent plus ou moins indépendants d'une régulation par les lymphocytes T, alors que ceux de type muqueux y répondraient. L'interleukine-3 (IL-3) stimule la croissance en culture de mastocytes analogues à ceux de type muqueux et qui contiennent de façon prédominante de la chondroïtine sulfate E (*Ronnberg et al. 2012*). Ces deux sous-types de mastocytes présentent également des différences de fonctions, incluant leurs réponses non identiques à des stimulations variées ou à des drogues.

I-2.1 Chez l'homme

Les mastocytes humains présentent également une hétérogénéité et sont classés selon leur contenu en protéases et leur localisation.

Il est possible de distinguer trois grands sous-types de mastocytes humains. Un premier sous-type exprime simultanément de la tryptase, de la chymase, la carboxypeptidase et la cathepsine G (MCTC) ; c'est le sous-type majoritaire de la peau et de la cavité péritonéale (analogue des MCS de rongeurs) (*Krishnaswamy et al. 2001*). Un deuxième sous-type, constitué de mastocytes exprimant uniquement la

tryptase (MCT), est retrouvé majoritairement dans les poumons et la muqueuse intestinale (proche des MCM de rongeurs) (*Schwartz et al. 1987 ; Vliagoftis et Befus 2005*). Il existe par ailleurs un troisième sous-type de mastocytes humains qui n'expriment que la chymase (MCC) (*Weidner et Austen 1991*).

I-3 Ontogénie des mastocytes

Les mastocytes de souris dérivent de cellules souches hématopoïétiques pluripotentes de la moelle osseuse. Ceci a pu être démontré par Kitamura et son équipe grâce à des expériences de transplantation de moelle osseuse entre souris présentant le syndrome de Chediak-Higashi, caractérisé par la présence des granules géants dans les mélanocytes et les mastocytes, et des souris normales (*Kitamura et al. 1977 ; Kitamura et al. 1979*).

Différentes équipes ont décrit des techniques d'obtention de mastocytes *in vitro* à partir de la moelle osseuse de souris. Des études ont montré que la culture de cellules médullaires en présence d'IL-3 pendant 3 à 5 semaines permet l'obtention d'une population de mastocytes de type MCM pure exprimant le récepteur de haute affinité pour les IgE (*Razin et al. 1981 ; Razin et al. 1982 ; Dy 1982 ; Razin et al. 1983*).

Diverses études ont permis également de caractériser plusieurs molécules favorisant la prolifération de mastocytes murin, comme l'IL-4, l'IL-9, l'IL-10 ou le nerve growth factor (NGF) (*Metcalfe et al. 1997*).

Chez l'homme, les mastocytes sont issus de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques CD34+ ou CD133+ présents dans la moelle osseuse, le sang de cordon ombilical, le sang périphérique ou le foie fœtal (*Gibbs et Ennis 2001*).

Il est très difficile d'obtenir en nombre suffisant des mastocytes humains en les purifiant à partir de tissus et ce n'est qu'en 1992 qu'une équipe a réussi à mettre au point un système de culture *in vitro* à long terme des cellules mononucléées de sang de cordon ombilical en présence d'une sous-couche de fibroblastes 3T3 de souris, permettant ainsi l'obtention d'un nombre important de mastocytes matures (*Dvorak et al. 1992 ; Mitsui et al. 1993*).

Par la suite, il a été montré que les mastocytes humains peuvent aussi être obtenus par culture de cellules de foie fœtal en présence des cellules 3T3 (*Irani et al. 1992*).

La différenciation mastocytaire chez l'homme s'accompagne de l'apparition séquentielle de trois catégories de marqueurs : des antigènes précoces présents sur des progéniteurs mastocytaires que l'on retrouve en circulation (CD34, CD13, CD117 ou KIT), des marqueurs précoces de différenciation mastocytaire (FcεRI ou récepteur de haute affinité pour les IgE, histamine, tryptase) et des marqueurs tardifs de différenciation mastocytaire (héparine, chymase) (*Welker et al. 2000*). Ces deux derniers types de marqueurs sont retrouvés uniquement dans les mastocytes ayant déjà gagné les tissus. La tryptase et la chymase sont spécifiques des mastocytes et la tryptase est utilisée comme le marqueur de choix pour identifier ce type cellulaire.

La chymase est beaucoup moins utilisée comme marqueur car non seulement elle n'est pas retrouvée dans toutes les populations mastocytaires, mais en plus elle n'est présente que dans une certaine sous-population de mastocytes.

Dans les tissus, des facteurs locaux (cytokines, molécules d'adhésion) vont permettre la différenciation des précurseurs mastocytaires en mastocytes matures. Ce processus, appelé mastopoïèse, est lent et peut prendre 2 à 3 mois.

Les mastocytes humains se distinguent des autres cellules, notamment des polynucléaires basophiles dont la maturation est entièrement intra-médullaire, par leur différenciation tissulaire, étape après laquelle ils deviennent morphologiquement identifiables. Les mastocytes ont des nombreuses ressemblances structurales et fonctionnelles avec les polynucléaires basophiles qui dérivent comme eux d'un même précurseur myéloïde et possèdent comme les mastocytes de granulations métachromatiques dans leur cytoplasme (*Arock et al. 2002 ; Stone 2010*). Leur différenciation se fait sous l'influence de cytokines différentes dont la principale est, pour les mastocytes, le Stem Cell Factor et, pour les basophiles, l'interleukine-3 (*Arock et al. 1993 ; Abraham et Arock 1998 ; Wedemeyer et Galli 2000*).

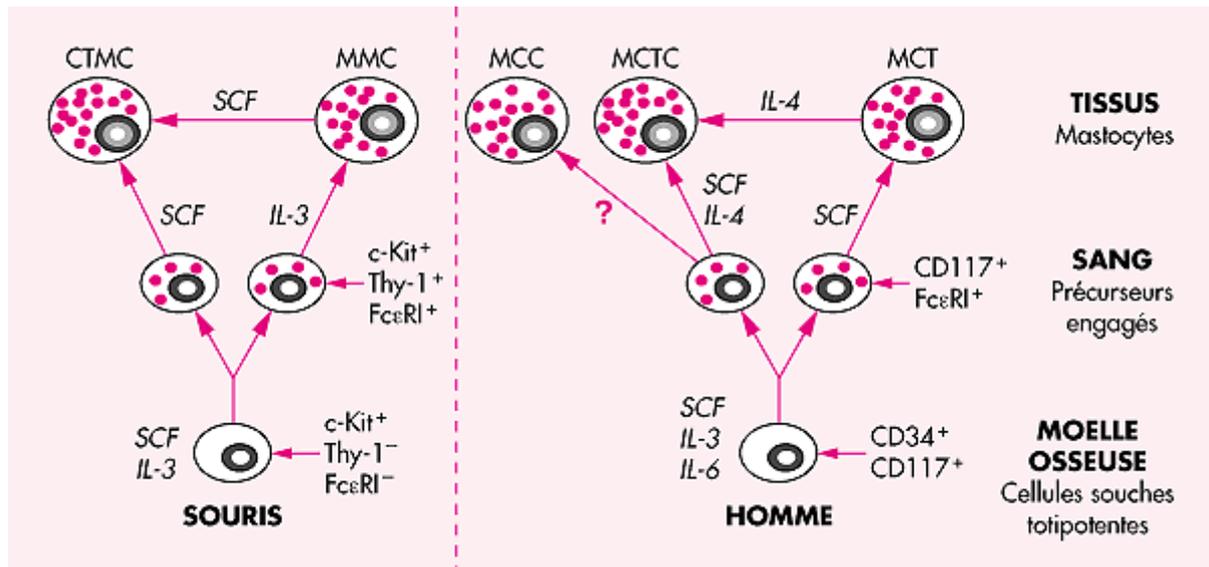


Figure 4 : schéma simplifié de la différenciation mastocytaire chez la souris et chez l'homme à partir de la cellule souche médullaire : MMC : mastocyte muqueux ; CTMC : mastocyte du tissu conjonctif ; MCC : mastocyte tryptase chymase⁺ ; MCTC : mastocyte tryptase⁺ chymase⁺ ; MCT : mastocyte tryptase⁺ chymase⁻ ; FcεRI : récepteur de haute affinité pour les IgE ; IL- : interleukine ; SCF : Stem cell factor.

Contrairement aux MCs, les basophiles achèvent leur maturation dans la moelle osseuse puis circulent dans le sang pour finalement gagner les tissus où ils vont exercer leurs différentes fonctions. Une fois mature, le basophile perd son potentiel de prolifération, tandis que le mastocyte mature semble pouvoir proliférer dans les tissus périphériques (*Valent et Bettelheim 1992*). Les MCs matures sont donc morphologiquement identifiables dans les différents tissus de l'organisme au terme de leur différenciation. Ils y sont révélés, entre autres, par la coloration au bleu de toluidine qui colore les granulations en rouge violacé.

I-4 Les principaux modèles de mastocytes primaires en culture

Il est possible d'isoler *ex vivo* des mastocytes d'une souris après lavage péritonéal ou broyat et digestion d'organes tels que la peau ou les poumons. Cependant, devant le faible nombre de mastocytes isolés, la communauté scientifique a développé des cultures primaires *in vitro* de mastocytes à partir de progéniteurs hématopoïétiques.

I-4.1 Les modèles murins : BMMC et PCMC

Les mastocytes dérivés de la moelle osseuse (BMMCs: bone marrow-derived MCs) sont obtenus par culture de cellules médullaires de souris selon la méthode décrite par Razin *et al* (Razin *et al.* 1981). Les cellules sont maintenues dans un milieu contenant de l'IL-3 et les cellules adhérentes sont éliminées à chaque renouvellement du milieu. Ces conditions de culture permettent l'obtention des populations de mastocytes pures à plus de 98 % après 3 à 4 semaines de culture. Ces mastocytes immatures, de phénotype proche des MCM, peuvent se différencier en mastocytes séreux par addition de stem cell factor (SCF) pendant une semaine supplémentaire ou par co-culture sur des sous-couches de fibroblastes murins 3T3 ou de cellules préadipocytaires MS-5 (Mitsui *et al.* 1993 ; Arock *et al.* 1994 ; Yoshikubo *et al.* 2006). Ce modèle mastocytaire est un des plus utilisés dans la littérature actuelle, il sert notamment pour la reconstitution des populations mastocytaires dans des souris dépourvues de mastocytes.

L'équipe d'accueil a récemment décrit, en collaboration avec l'équipe de Marc Daëron, un autre modèle de mastocytes murins dérivés à partir de progéniteurs péritonéaux, ce sont les PCMC (peritoneal cell-derived mast cells) (Malbec *et al.* 2007). C'est un modèle de mastocytes qui s'avère plus mature que le modèle BMMC. Les PCMC sont proches des mastocytes péritonéaux, et ont besoin de SCF pour proliférer et survivre. Ils n'ont par contre pas besoin d'IL-3. Il est à noter que les progéniteurs mastocytaires (MCP) utilisés pour générer les BMMC et les PCMC ne proviennent pas du même site (respectivement la moelle osseuse et le péritoine), il n'est donc pas à exclure qu'ils proviennent soit de différents MCP, soit de mêmes MCP mais à un stade de maturation bien distinct.

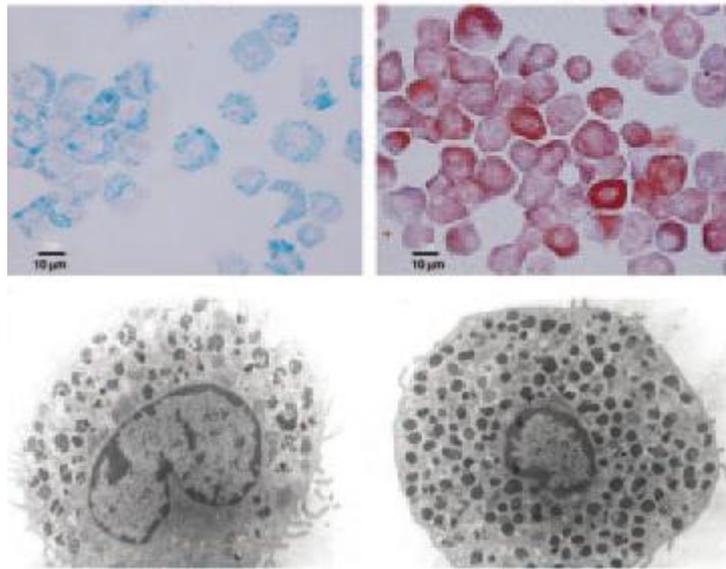


Figure 5 : Aspect cytotologique et ultrastructural des PCMCs comparé à ceux des BMMCs. En haut : les BMMCs (à gauche) et les PCMCs (à droite) ont été cytocentrifugés et colorés par le bleu Alcian / safranine, puis observés au microscope optique. En bas : ultrastructure d'un BMMC (à gauche) et d'un PCMC (à droite) après observation par microscopie électronique à transmission.

I-4.2 Les modèles chez l'homme : CBMC et PBMC

La culture de mastocytes issus de sang de cordon ombilical (CBMC) est maintenant un modèle largement utilisé et reconnu. Il présente l'intérêt de permettre l'obtention de grandes quantités de mastocytes purs exprimant le récepteur FcεRI (*Mitsui et al. 1993*). Ces mastocytes sont obtenus par culture de progéniteurs CD34+ à partir de sang de cordon ombilical (*Furitsu et al. 1989 ; Saito et al. 1996 ; Radinger et al. 2010*). Les facteurs de croissance utilisés sont le SCF et l'IL-6. En fin de culture, on favorise la maturation des mastocytes et l'expression de FcεRI en incubant les mastocytes avec l'IL-4 pendant 4 à 5 jours.

Il faut noter que les mastocytes issus de sang de cordon ombilical peuvent présenter deux phénotypes selon leur condition de culture. En effet si les progéniteurs de sang de cordon sont cultivés en présence de fibroblastes (en co-culture), les futurs mastocytes exprimeront à la fois de la tryptase et de la chymase, ressemblant à des mastocytes cutanés (*Furitsu et al. 1989 ; Dvorak et al. 1993*) ; tandis que si les progéniteurs sont cultivés en présence de SCF soluble, les mastocytes n'exprimeront que la tryptase

(Dvorak et al. 1993 ; Igarashi et al. 1996 ; Saito et al. 1996), leur phénotype étant ainsi assimilé à celui des mastocytes pulmonaires.

Dans un autre modèle, les mastocytes humains sont générés également à partir des progéniteurs CD34+ issus du sang périphérique de donneurs sains et cultivés en présence de SCF, ce sont les PBMC (peripheral blood derived mast cells) (Kirshenbaum et Metcalfe 2006 ; Lappalainen et al. 2007). Dans ce type de modèle, l'IL-3 est nécessaire dans la première semaine pour démarrer la culture.

Pour ces deux modèles de culture, outre le SCF qui est indispensable, l'IL-6 est un facteur crucial pour la culture à long terme de mastocytes humains (Saito et al. 1995 ; Kanbe et al. 1998 ; Kirshenbaum et al. 1999), ainsi que pour la survie de ces cellules puisqu'elle exerce sur la culture une activité anti-apoptotique non négligeable (Yanagida et al. 1995 ; Oskeritzian et al. 1999 ; Cruse et al. 2008).

I-5 Les facteurs de différenciation mastocytaire

En plus du SCF, présenté au chapitre suivant, diverses cytokines, souvent produites par les lymphocytes T (LT), agissent en synergie pour orienter la prolifération et la différenciation des progéniteurs en mastocytes pleinement matures. On peut ainsi citer l'IL-3, l'IL-4, l'IL-6 et le NGF (nerve growth factor).

I-5.1 L'interleukine 3 (IL-3)

L'IL-3 est une cytokine qui permet le développement des mastocytes murins et lorsqu'elle est associée au SCF, qui potentialise le développement ainsi que la maturation des mastocytes. En effet, la culture de cellules médullaires normales de souris ou de rat, en présence d'IL-3, conduit à l'obtention en quelques semaines de populations pures de mastocytes dont le phénotype les rapproche des mastocytes muqueux (Arock et al. 1986). Ces mastocytes obtenus en présence d'IL-3 peuvent acquérir des caractéristiques des mastocytes séreux lorsqu'ils sont cultivés en présence de SCF (Haig, Huntley et al. 1994). Il a été également rapporté que l'IL-3 stimule la prolifération et la survie des mastocytes de souris

de type tissu conjonctif *in vitro* (Lumholtz 1979 ; Nakahata et al. 1986 ; Tsuji et al. 1990 ; Gurish et al. 1992).

Chez l'homme, le rôle de l'IL-3 est encore discuté. Dans le modèle PBMC seulement, l'IL-3 est nécessaire dans la première semaine de culture, car il permet une amplification plus importante des progéniteurs au départ (Yuan et al. 1998; Kirshenbaum et al. 1999). Ici encore, l'IL-3 ne joue un rôle sur les MCP qu'à un stade bien précis correspondant au tout début de la longue période de culture qui est nécessaire à la génération de mastocytes primaires humains.

I-5.2 L'interleukine 6 (IL-6)

Les effets de l'IL-6 sur la croissance et la différenciation des mastocytes murins et humains ont été étudiés par différentes équipes et les résultats obtenus montrent que cette cytokine agit différemment chez l'homme et chez la souris.

Ainsi, dans les modèles murins, cette cytokine joue un rôle dans la croissance et le développement des mastocytes (Hu et al. 1997; Yuan et al. 1998).

Chez l'homme, l'équipe de Saito a montré que l'IL-6, en présence de sérum, peut promouvoir le développement des MCT à partir du sang de cordon ombilical *in vitro* lorsqu'elle est ajoutée dès le début de la culture (Saito et al. 1996). Une autre équipe a montré que l'ajout de l'IL-6 à partir de la troisième semaine de culture inhibe la croissance des mastocytes et cela en absence de sérum. Par contre, l'addition d'IL-6 après 10 semaines de culture induit une augmentation de la taille des cellules ainsi que de leur contenu en chymase et en histamine (Kinoshita et al. 1999).

I-5.3 L'interleukine 4 (IL-4)

L'IL-4, qui est une cytokine de type Th2, agit en synergie avec l'IL-3 pour faciliter la différenciation des mastocytes murins et permettre l'orientation de la population vers un profil de type tissu conjonctif (Hamaguchi et al. 1987; Tsuji et al. 1990).

Chez l'homme, l'effet de l'IL-4 a été étudié *in vitro* et dépend du stade de différenciation mastocytaire. Il a été démontré que l'ajout d'IL-4 en début de culture inhibe la différenciation des mastocytes à partir des progéniteurs cellulaires de foie fœtal (*Nilsson et al. 1994; Xia et al. 1997*).

En 2005, l'équipe de Dean Metcalfe a montré que l'IL-4 inhibe la différenciation en réduisant l'expression du récepteur KIT sur des progéniteurs CD34+ de sang périphérique (*Kulka et Metcalfe 2005*). Par contre l'ajout d'IL-4 dans une culture de mastocytes déjà matures provenant de sang de cordon ou de sang périphérique induit non seulement la prolifération des mastocytes matures mais augmente aussi l'expression du récepteur FcεRI ainsi que celles des molécules d'adhésion ICAM-1 (intercellular adhesion molecule -1) et LFA-1 (lymphocyte function associated antigen-1), les rendant plus sensibles à la dégranulation (*Toru et al. 1996; Bischoff et al. 1999*).

I-5.4 Le nerve growth factor (NGF)

Le NGF, ou Nerve Growth Factor, est un facteur impliqué dans la régulation de la neurogenèse (*Frielingsdorf et al. 2007*). C'est un polypeptide qui appartient à la famille des neurotrophines. Outre les cellules nerveuses, le NGF est produit par un grand nombre de cellules, comme les cellules du système immunitaire, en particulier les lymphocytes et les mastocytes (*Leon et al. 1994*), mais également par les cellules musculaires lisses bronchiques et vasculaires (*Creedon et Tuttle 1991*).

Le NGF stimule la prolifération de BMMC murins en présence d'IL-3 en orientant la culture vers un phénotype de mastocyte des tissus connectifs (*Matsuda et al. 1991*).

Chez l'homme, le rôle du NGF est controversé. Les travaux de Yanagida *et al* démontrent que le NGF n'a aucun effet sur la différenciation et la prolifération de mastocytes humain (*Yanagida et al. 1995*), alors que ceux de Welker *et al* affirment le contraire (*Welker et al. 2000*). Cependant, il a été observé que le NGF, en agissant en synergie avec le SCF, pouvait promouvoir une activité anti-apoptotique sur la culture (*Kanbe et al. 2000*). Enfin, une étude plus récente a révélé que la tryptase sécrétée dans les tissus contribuait au clivage du pro-NGF en NGF, le rendant ainsi assimilable par les mastocytes et par les

cellules avoisinantes (Spinnler et al. 2011). Il n'est donc pas à exclure que le NGF ainsi rendu biologiquement actif, joue un rôle *in vivo* sur les mastocytes tissulaires.

I-6 Médiateurs mastocytaires

I-6.1 Médiateurs préformés

I-6.1.1 Histamine

L'histamine est l'un des premiers médiateurs à avoir été associé aux mastocytes. Elle est synthétisée dans l'appareil de Golgi des mastocytes et des basophiles à partir de la L-histidine, un acide aminé essentiel, par action de l'enzyme histidine décarboxylase (White et al. 1987 ; Metcalfe et al. 1997). Une fois formée, elle est retrouvée dans les granules, associée aux résidus acides des glycosaminoglycanes (Uvnas et al. 1970). Elle est rapidement dégradée après libération, par l'histamine-N-méthyltransférase et par l'histaminase, d'où son activité locale et brève.

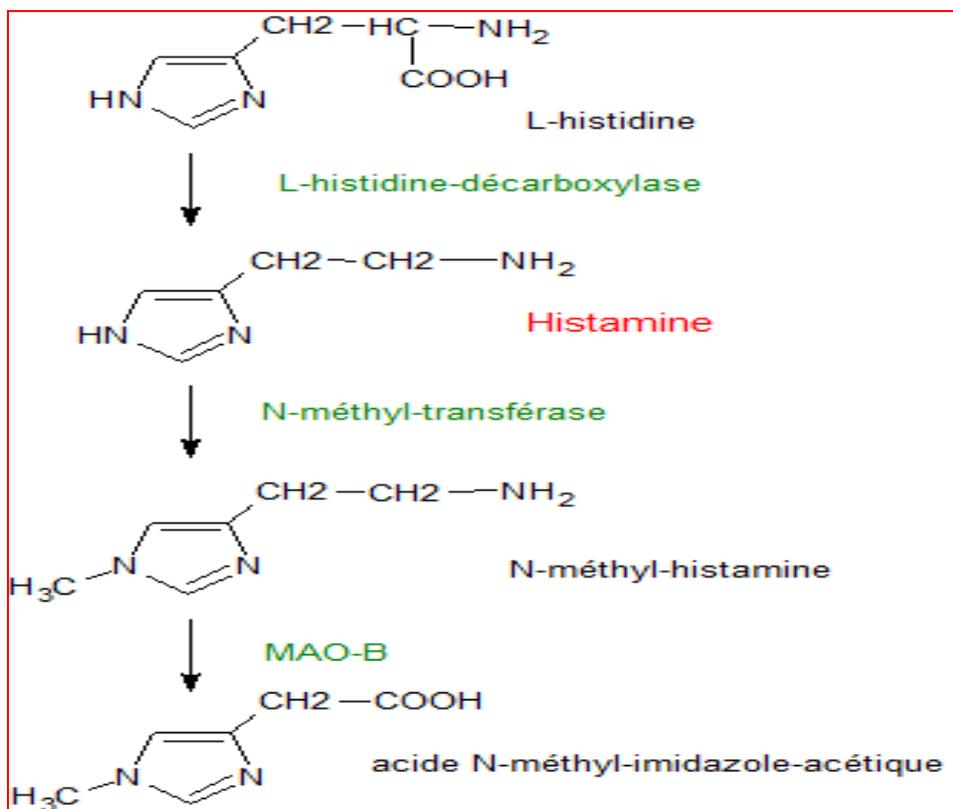


Figure 6 : Les étapes de la synthèse et de la dégradation de l'histamine

L'histamine peut agir sur les vaisseaux sanguins, les muscles lisses des bronches et de l'intestin, l'estomac, les fibres nerveuses ou encore sur les éosinophiles via quatre récepteurs différents (H1-4) (*Metcalfe et al. 1997 ; Leurs et al. 1998 ; Akdis et al. 2005*).

Une fois libérée par les mastocytes, elle va se fixer dans le voisinage, sur les récepteurs H1 des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et les récepteurs H2 des cellules musculaires lisses (*Metcalfe et al. 1997; Bowrey et al. 2000*). Il en résulte une vasodilatation et la formation d'un œdème local accompagnant les allergies cutanées et nasales (*Metcalfe et al. 1997*). La vasodilatation capillaire, provoquée probablement par la libération de monoxyde d'azote (NO) est à l'origine de la rougeur du visage et de certaines céphalées (*Levy 2009*). En cas de libération massive d'histamine, ces effets sont généralisés avec une chute de tension importante.

L'histamine joue un rôle important dans les mécanismes de l'intolérance alimentaire et de l'allergie. Elle est responsable de manifestations allergiques telles que la vasodilatation, le prurit et les œdèmes), de l'anaphylaxie, de l'urticaire, des phénomènes inflammatoires (*Raphael et Metcalfe 1986*). Son taux plasmatique augmente pendant la réaction allergique immédiate.

Le contenu en histamine dépend de la taille de la cellule et peut aller de 1 à 15 pg/cellule. Elle est la seule amine hydrophile vaso-active stockée dans les mastocytes humains, alors que les mastocytes de rongeurs renferment aussi de la sérotonine (*Soll et al. 1981*).

I-6.1.2 Protéoglycanes : héparine et chondroïtine sulfate

Les protéoglycanes sont responsables des propriétés métachromatiques des mastocytes observées avec des colorants basiques (*Ehrlich 1878*). Ce sont des macromolécules constituées d'une chaîne peptidique, composée d'un enchaînement de résidus sérine et glycine, sur lequel des chaînes de glycosaminoglycanes (GAG) hautement sulfatés sont liées de manière covalente (*Hines 2002*).

Selon la nature et le degré de sulfatation des glycosaminoglycanes (GAG), on distingue 2 types de protéoglycanes : L'héparine et le chondroïtine sulfate (B chez le rat et E chez la souris et chez l'homme).

L'héparine est sécrétée par les mastocytes qui bordent les artères, dans le foie, les poumons et la peau. Elle est le GAG le plus négativement chargé du corps humain, elle est exclusivement synthétisée par le mastocyte et stockée dans ses granules sécrétoires. L'héparine est retrouvée dans tous les types de mastocytes, par contre chez les rongeurs elle est uniquement présente dans les mastocytes de type MCS (*Metcalfe et al. 1981 ; Carlsson et Kjellen 2012; Ronnberg et al. 2012*).

L'autre GAG important des granules du mastocytes est le chondroïtine sulfate, qui est, quant à lui, retrouvé dans les mastocytes de type MCM chez le rongeur et dans les mastocytes de la muqueuse intestinale et pulmonaire chez l'homme (*Stevens et al. 1983 ; Stevens 1986; Gilead et al. 1987 ; Thompson et al. 1988 ; Davidson et al. 1990*).

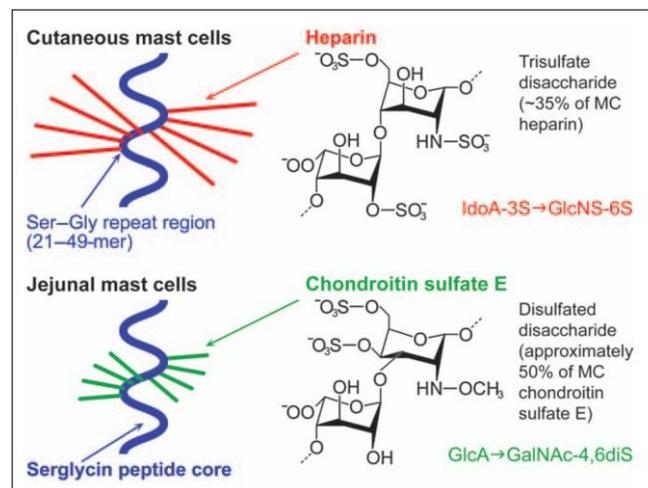


Figure 7 : Structure des protéoglycanes à motifs serglycine et de leurs glycosaminoglycanes sulfatés. D'après Stevens et al (*Stevens 1986*).

A pH acide, les protéoglycanes forment des complexes avec l'histamine, les protéases neutres et les hydrolases acides et permettent le maintien intra-granulaire d'un pH bas pour inactiver les protéases neutres. Lors de la dégranulation mastocytaire, il y a dissociation de ce complexe à la faveur d'échanges ioniques avec le calcium et le sodium extracellulaire (*Schwartz 1987*).

Les protéoglycanes sont capables également de réguler les propriétés d'adhésion de certaines protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine, la vitronectine et la laminine (*Ronnberg et al. 2012*).

I-6.1.3 Les protéases neutres : Tryptase, chymase et carboxypeptidase A

Les protéases neutres constituent la majorité des protéines contenues dans les granules des mastocytes (*Metcalfe et al. 1997; Hines 2002*). Elles sont à l'origine de la classification phénotypique des mastocytes et sont stockées dans les granules complexées aux GAG.

I-6.1.3.a La tryptase

La tryptase est une sérine protéase, contenue dans les granules cytoplasmiques de tous les mastocytes dont elle est étroitement spécifique : plus de 99 % de la tryptase de l'organisme est d'origine mastocytaire. Sa demi-vie est de 90 à 120 minutes *in vivo*. Il s'agit d'un tétramère, constitué de 2 sous-unités α et 2 sous-unités β liées de façon non covalente, de poids moléculaire 143 kDa (*Schwartz et al. 1981 ; Hogan et Schwartz 1997*).

L'étude de ses effets *in vitro* a montré sa possible intervention dans trois domaines métaboliques distincts :

- la coagulation : la tryptase est étroitement liée à l'héparine au sein des granules mastocytaires (*Huang et al. 1997 ; Thomas et al. 1998*),
- le métabolisme du tissu conjonctif : la tryptase active, par l'intermédiaire d'une métalloprotéinase, les procollagénases en collagénases ; celles-ci pourraient donc intervenir comme agent de destruction ou de réparation de ces tissus lors de connectivites, en relation avec le grand nombre de mastocytes retrouvés dans les lésions tissulaires de ces affections (*Lohi et al. 1992*)
- le complément : la tryptase active le C3 en C3a, dont l'activité d'anaphylatoxine potentialise les effets de l'histamine (*el-Lati et al. 1994*).

Chacune de ces actions contribue à une augmentation de la contractilité des muscles lisses (notamment en réponse à une stimulation par l'histamine).

On retrouve 12 pg/cellule de tryptase dans les MCT pulmonaires et 35 pg/cellule dans les MCTC cutanés (<0,05 pg/basophile). Elle est retrouvée également en forte concentration dans les lavages broncho-alvéolaires des patients atteints d'asthme allergique (*Wenzel et al. 1988*), et dans le fluide

cérébrospinal de patients atteints de sclérose multiple ou d'arthrite rhumatoïde (*Rozniecki et al. 1983*), suggérant un rôle proinflammatoire néfaste dans ces pathologies.

Enfin, des études *in vitro* ont permis d'identifier le récepteur PAR-2 (protease-activated receptor-2) présent à la surface des cellules endothéliales comme un substrat physiologique potentiel activé par les tryptases (*Sommerhoff 2001*).

I-6.1.3.b La chymase

La chymase est une sérine protéase chymotrypsique (elle clive après des résidus aromatiques tels que la phénylalanine ou la tyrosine) retrouvée au sein de granules différents de ceux contenant la tryptase et associée aux GAG (*Schwartz et Austen 1980 ; Goldstein et al. 1992*). Chez l'homme, le rôle de la chymase dans l'asthme reste encore à ce jour débattu, la présence de mastocytes chymase+ est rapportée comme étant de bon pronostic dans certains cas (*Balzar et al. 2005*) et de mauvais dans d'autres (*Shiang et al. 2009 ; Trivedi et Caughey 2010*). Des études pharmacologiques, utilisant des inhibiteurs de la chymase, impliquent cette dernière dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires. En effet, un des substrats de la chymase est l'angiotensine I qui est convertie en angiotensine II, orientant alors le système rénine/angiotensine/aldostérone vers une augmentation pro-pathologique de la pression artérielle (*Miyazaki et al. 2006*). Par contre, des études menées chez des modèles murins déficients en chymase (MCP-1) montrent que cette dernière est impliquée, au même titre que la tryptase, dans la lutte contre les infections parasitaires (*Knight et al. 2000 ; Trivedi et al. 2009*).

I-6.1.3.c La carboxypeptidase A

La carboxypeptidase A n'est retrouvée que dans les mastocytes exprimant aussi la chymase (*Hines 2002*). Elle favorise la bronchoconstriction de façon similaire à la tryptase.

Des études ont montré que les mastocytes, en libérant des protéases telles que la carboxypeptidase A qui dégradent les toxines, réduisent les effets d'au moins certains venins animaux (*Metz et al. 2006*).

De plus, il existe un brevet, déposé en 2008, concernant l'utilisation de la carboxypeptidase mastocytaire comme marqueur de l'anaphylaxie ou de la mastocytose dans des échantillons sériques, plasmatiques ou salivaires (*Mast cell carboxypeptidase as a marker for anaphylaxis and mastocytosis 22 oct. 2008 brevet, Patent application number: 20110262931*).

I-6.1.4 Les hydrolases acides

Les granules des mastocytes contiennent 4 types d'hydrolases acides (la β -glucuronidase, la β -galactosidase, l'arylsulfatase et la β -hexosaminidase), libérées lors de la dégranulation mastocytaire (*Schwartz et al. 1981*). Ces hydrolases acides sont retrouvées normalement dans les compartiments lysosomaux d'autres types cellulaires, ce qui a permis de définir les granules des mastocytes comme des «lysosomes modifiés». La β -hexosaminidase est la plus importante quant à l'activité libérée après dégranulation, peut être facilement mesurée, et sert donc comme marqueur de la dégranulation mastocytaire (*Hohman et Dreskin 2001*).

I-6.2 Médiateurs néoformés et synthétisés

I-6.2.1 Les dérivés des lipides membranaires

L'activation des mastocytes conduit, en plus de la libération de médiateurs stockés dans les granules, à la synthèse de dérivés à partir des lipides membranaires. La stimulation des mastocytes induit l'activation de la phospholipase A2 (PLA2) qui génère du lyso-PAF (lyso-platelet activating factor) et de l'acide arachidonique (AA) (*Hines 2002*).

Le PAF a comme effets physio(patho)logiques de provoquer une réaction inflammatoire aiguë par dégranulation des mastocytes. Il peut aussi provoquer un choc anaphylactique avec un bronchospasme extrêmement violent ; il induit également l'agrégation plaquettaire. À noter que le PAF est actif à très faible concentration (10^{-12} M). Le PAF est excrété de façon juxtacrine et agit directement sur les mastocytes ou les polynucléaires (*Nilsson et al. 2000*).

Le PAF est aussi capable de stimuler le chimiotactisme des mastocytes et la libération de médiateurs à partir des plaquettes, des neutrophiles et des éosinophiles. Il peut également réguler la production d'immunoglobulines par les lymphocytes et la production de cytokines par les monocytes et les macrophages (*White 1999*).

Enfin, l'administration de PAF *in vivo* induit une hypotension sévère, une bronchoconstriction, une augmentation de la perméabilité des cellules endothéliales ainsi que des altérations pulmonaires (*Triggiani et al. 1995*).

Suite à l'activation du mastocyte, des médiateurs lipidiques sont néosynthétisés à partir de l'acide arachidonique (AA). L'AA est un acide gras libéré à partir des phospholipides des membranes cellulaires, par la phospholipase A2 (surtout des leucocytes et des plaquettes) activée suite à une agression initiale (stimulus mécanique ou chimique) ou à une activation cellulaire par divers médiateurs (C5a par exemple) (*Erdei et al. 1997 ; Fujishima et al. 1999*).

Une partie de l'AA est sécrétée sous forme non modifiée, alors que l'autre partie est métabolisée par la voie de la cyclo-oxygénase (COX) qui conduit à la formation de prostaglandines (PG) et de thromboxanes ou bien par la voie de la lipoxygénase (LOX), conduisant à la production des leucotriènes.

Les mastocytes humains produisent essentiellement de la PGD₂, dont les effets incluent la broncho-constriction, l'augmentation de la perméabilité vasculaire, l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, l'induction de la sensation de la douleur (*Church et Clough 1999 ; Yamaguchi et al. 1999*). La PGD₂ a également une action chimiotactique pour les neutrophiles (*Raible et al. 1992*).

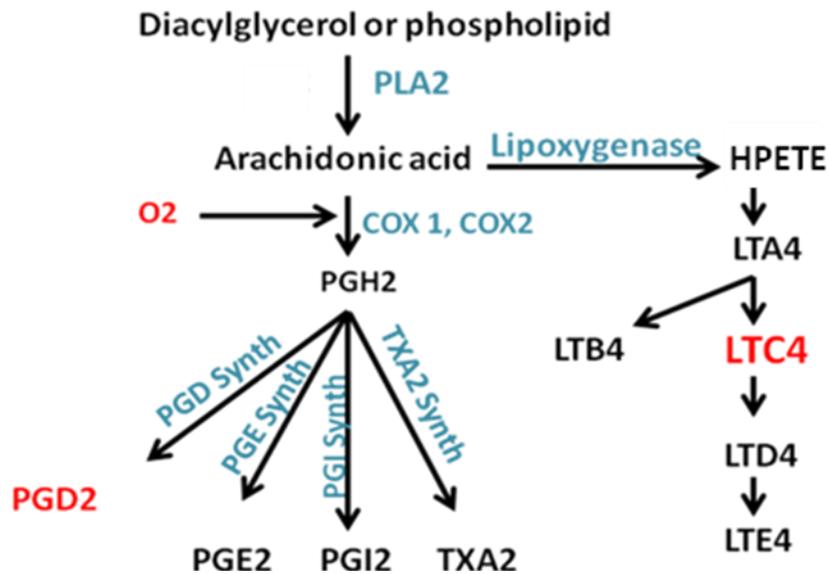


Figure 8 : Biosynthèse des leucotriènes et des prostaglandines. Les principales molécules synthétisées par le mastocyte humain sont la PGD2 et le LTC4.

Le rôle des leucotriènes et en particulier celui des LTC4, LTD4 et LTE4 a été bien établi. Ils jouent un rôle dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire, dans l'inflammation notamment dans l'asthme (O'Byrne 1997).

I-6.2.2 Les cytokines et chimiokines

Les mastocytes sont une source importante de cytokines et chimiokines néoformées. Il s'agit de familles de protéines ou de glycoprotéines sécrétées par certaines cellules et qui incluent le TNF- α , les interférons, les interleukines, le SCF, le GM-CSF (Granulocyte Monocyte-Colony-stimulating factor), le VEGF (Vascular endothelial growth factor) ou encore le NGF. La synthèse et la libération de cytokines et de chimiokines suivent une activation des mastocytes et peuvent être détectées en l'absence de dégranulation (Bradding et al. 1993 ; Church et McGill 2002).

Les cytokines mastocytaires peuvent être divisées en deux sous-groupes suivants leurs propriétés biologiques et leur cinétique de libération après activation. On distingue d'une part des cytokines dites pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-9, et TNF) et des chimiokines (IL-8, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3 α , TCA3) qui sont libérées rapidement et transitoirement après activation, et d'autre part des cytokines dites immuno-modulatrices (IL-3, IL-4, IL-5, IL-10) et le facteur de croissance GM-CSF, libérées plus tardivement.

Tableau I : Activités biologiques des principales cytokines ou chimiokines libérées par le mastocyte.
(LT : lymphocytes T ; LB : lymphocytes B).

Cytokines	Activités biologiques
IL-1	Activation des lymphocytes B, T et des macrophages
IL-2	Activation des lymphocytes T et B
IL-3	Facteur de croissance et de survie pour les mastocytes, activation des macrophages
IL-4	-Facteur de croissance et de maturation pour les mastocytes. -Prolifération des LT et induction d'un phénotype Th2 -Augmentation de la production d'IgE par les LB. -Augmentation de l'expression des molécules d'adhésion par les cellules endothéliales. -Chimiotactisme pour les éosinophiles.
IL-5	Facteur de croissance, d'activation et de chimiotactisme des éosinophiles.
IL-6	-Croissance et d'activation des LT. -Augmentation de la production des IgE par les LB. -Augmentation de la sécrétion de mucus par les cellules glandulaires.
IL-8	Chimiotactisme pour les neutrophiles, les éosinophiles, les LT et les mastocytes.
IL-9	Activation des LT
IL-10	Activation des LB et inhibition du phénotype Th1
IL-11	Réorganisation tissulaire et participation à l'inflammation
IL-12	Activation des LT et activation du phénotype Th1
IL-13	-Augmentation de la production d'IgE par les LB. -Augmentation de l'expression des molécules d'adhésion par les cellules endothéliales. -Chimiotactisme pour les éosinophiles.
IL-15	-Facteur de croissance des LT. -Facteur de différenciation et de prolifération pour LB et NK. -Chimiotactisme pour les LT.
IL-16	Chimiotactisme pour les LT.
GM-CSF	Facteur de croissance pour plusieurs lignées hématopoïétiques (granulocytes et monocytes/macrophages).
IFN-γ	Activation des LB et des macrophages.
TNF-α	-Augmentation de la cytotoxicité des éosinophiles. -Libération des médiateurs mastocytaires. -Augmentation de l'expression des molécules d'adhésion par les cellules endothéliales. -Chimiotactisme pour les macrophages. -Croissance des LT. -Chimiotactisme et croissance des fibroblastes. -Augmentation de la sécrétion du mucus par les cellules glandulaires.
TNF-β	Action cytotoxique sur les LT.
TGF-β	Chimiotactisme et croissance des fibroblastes.
MCP-1	Chimiotactisme pour les LT et les monocytes.
MIP1-α et β	-Chimiotactisme et augmentation de cytotoxicité des neutrophiles. -Différenciation des macrophages
MIP-3α	Chimiotactisme pour les LT et les cellules dendritiques.
RANTES	Chimiotactisme pour les LT et les monocytes.
Lymphotactine	Chimiotactisme pour les LT.
TCA3	Chimiotactisme pour les neutrophiles.
Fractalkine	Chimiotactisme pour les leucocytes et les mastocytes.

Les cytokines pro-inflammatoires sont impliquées dans l'induction d'un afflux de leucocytes au site inflammatoire grâce à leur action sur l'expression de molécules d'adhésion à la surface de l'endothélium vasculaire et des leucocytes circulants et grâce à leurs propriétés chimiotactiques.

Quant aux cytokines immuno-modulatrices, elles prennent en quelque sorte le relais des cytokines pro-inflammatoires et participent au maintien et à l'activation des leucocytes présents sur le foyer de l'inflammation.

Les mastocytes sont hétérogènes en termes d'expression des cytokines et chimiokines dont les rôles sont résumés dans le tableau I.

I-6.2.3 Le monoxyde d'azote (NO)

Le monoxyde d'azote (NO) est un radical libre à demi-vie très courte (quelques secondes), produit par oxydation de l'arginine sous l'action d'une famille d'enzymes : les NO synthases ou NOS (*Marletta 1993*). L'activation de certaines NOS inductibles au cours de l'inflammation génère des quantités importantes de NO. Le NO possède des propriétés inflammatoires : vasodilatation, œdème, érythème (*Cals-Grierson et Ormerod 2004; Eisenhut 2012*). Il existe 3 isoformes de NOS qui diffèrent par leur mode d'expression et leur régulation liée à la concentration intracellulaire en Ca^{2+} : la NOSI ou neuronale et la NOSIII ou endothéliale d'une part, les deux étant dépendantes du calcium et constitutives, et la NOSII inductible d'autre part, retrouvée dans de très nombreux types cellulaires, notamment les cellules du système immunitaire et qui est, quant à elle, Ca^{2+} indépendante.

Diverses études ont montré la capacité des mastocytes à libérer du NO après activation (*Bidri et al. 2001 ; Forsythe et al. 2001 ; Moon et al. 2012*). Les MC péritonéaux de rat sont capables de libérer des nitrites qui potentialisent la cytotoxicité de ces cellules lorsqu'elles sont activées par l'ionophore calcique (*Bissonnette et al. 1991*). Des études ont montré également que l'activation IgE-dépendante des MCs murins de type muqueux ou séreux entraînent l'expression de la NO synthétase inductible (NOSII) et la libération de nitrites (*Bidri et al. 1997*).

I-7 Fonctions des mastocytes

I-7.1 Immunopathologie et mastocyte

L'importance du mastocyte dans la physiopathologie de certaines maladies est déjà connue (tableau II)

Tableau II : Principales pathologies dans lesquelles un rôle du mastocyte a pu être prouvé ou évoqué.

Etiologies	Pathologies
Auto immune	Polyarthrite rhumatoïde, Sjögren, lupus, sclérodermie dermatopolymyosite et polymyosite, pemphigus et pemphigoïde psoriasis
Inflammatoire chronique	Spondylarthrite ankylosante, maladie de Crohn et rectocolite ulcéro-hémorragique, vascularite à ANCA, sarcoïdose
Neurologique	Sclérose en plaque, sclérose latérale amyotrophique, maladie d'Alzheimer, syndrome anxio-dépressif, autisme
Allergique	Dermatite atopique et eczéma, urticaire, asthme
Néoplasique	Mastocytose systémique, lymphomes hodgkiniens et non hodgkiniens, cancers solides (poumon, sein, colorectal, pancréas cutané)

L'implication des mastocytes dans certaines pathologies, par exemple l'allergie et la sclérose en plaque que nous développerons, a été démontrée *in vivo* en utilisant des animaux dépourvus de mastocytes, ou chez l'homme en montrant un effet bénéfique de molécules inhibant les médiateurs mastocytaires (Frenzel et Hermine 2012). Par ailleurs, du fait de son tropisme naturel pour les muqueuses et épithéliums, le mastocyte peut avoir une place prépondérante dans la physiopathologie de certaines maladies inflammatoires de la peau comme le psoriasis et les dermatites bulleuses (Navi et al. 2007 ; Harvima et al. 2008), ainsi que dans certaines maladies inflammatoires chroniques de l'intestin comme la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique (Dvorak et al. 1980 ; Fox et al. 1990).

I-7.1.1 L'allergie

Le mastocyte est peut-être la cellule la plus intimement liée à la notion d'allergie car elle est susceptible de résumer à elle seule les traits physiopathologiques essentiels de l'hypersensibilité immédiate : fixation d'immunoglobulines E (IgE), activation par l'antigène (allergène), production et

libération de médiateurs ayant un effet délétère sur les organes cibles que sont la peau, les vaisseaux ou les voies aériennes.

Les réactions allergiques les plus communes incluent eczéma, urticaire, rhinite allergique, attaques d'asthme, allergies alimentaires et réactions aux venins après une piqûre d'insecte tels que les guêpes et les abeilles (*Holgate 2004*).

L'allergie est l'une des pathologies associées aux mastocytes les mieux étudiées. Il s'agit d'une réaction du système immunitaire générée par un contact avec une substance généralement étrangère à l'organisme conduisant à l'établissement d'une réponse adaptative faisant intervenir les cellules T et B et les cellules présentatrices d'antigène (CPA) (*Nauta et al. 2008*). L'orientation de la réponse des cellules T auxiliaires favorisant le phénomène allergique, est de profil Th2, sécrétant des cytokines de type pro-inflammatoire, tandis que les cellules auxiliaires T de profil Th1 secrètent des cytokines antagonistes de la réponse allergique (*Akdis et al. 2004*).

L'orientation Th2 de la réponse immunitaire spécifique conduit à la synthèse et à la sécrétion d'un taux élevé d'IgE qui se fixent, entre autres, sur le récepteur de haute affinité pour la chaîne lourde des IgE, le FcεRI, entraînant, lors d'un nouveau contact avec l'allergène, une activation des mastocytes (mais aussi des polynucléaires basophiles qui présentent aussi le FcεRI à leur membrane) (*Prussin et Metcalfe 2006 ; Stone et al. 2010*). Cette activation va induire la sécrétion de plusieurs molécules contenues dans les granulations du mastocyte (histamine, protéases comme la tryptase). Ce processus est appelé la dégranulation. L'activation induit également la synthèse *de novo* d'autres médiateurs (médiateurs lipidiques (prostaglandines), cytokines et chimiokines) (*Kuehn et al. 2010*). Tous ces médiateurs entraînent, lors de la réaction allergique, diverses manifestations cliniques telles que l'hypotension, les œdèmes, la bronchoconstriction, les rashes cutanées ou l'augmentation de la sécrétion de mucus (*Metcalfe et al. 1997*).

Lors du déclenchement de la réaction allergique, on distingue deux phases. L'une est très rapide, précoce et spasmogène, et est principalement due aux effets immédiats de l'histamine libérée, dont le

mode d'action se situe au niveau des récepteurs H1 des vaisseaux et des bronches (*Jutel et al. 2006*). L'autre phase est plus tardive et dépend des médiateurs lipidiques, des facteurs chimiotactiques et des cytokines produits par le mastocyte activé (*Williams et Galli 2000*).

Phase précoce

L'histamine, libérée dans les secondes qui suivent l'activation des mastocytes provoque la dilatation des petits vaisseaux sanguins, augmente la perméabilité vasculaire, et stimule la contraction transitoire des muscles lisses (*White 1990*). Les protéases qui sont également libérées peuvent provoquer des lésions des tissus locaux (*Reed et Kita 2004*). Des médiateurs néoformés suite à l'activation cellulaire sont également rapidement libérés. Ce sont essentiellement les métabolites de l'acide arachidonique qui comprennent la prostaglandine D2 (PGD2) et le leucotriène C4 (LTC4), et les produits issus de son métabolisme (LTD4 et LTE4). Ces médiateurs stimulent la contraction prolongée des muscles lisses et augmentent la perméabilité vasculaire (*Nijkamp et Sitsen 1982*). Ils jouent également un rôle chimiotactique pour les cellules inflammatoires comme les polynucléaires éosinophiles (*Kubes et Kanwar 1994*).

Phase tardive

La phase précoce est souvent suivie par une phase tardive qui se met en place dans les deux à huit heures suivant la dégranulation, et qui persiste pendant au moins un à deux jours.

Cette seconde phase correspond à une réponse inflammatoire déclenchée par les médiateurs libérés par les mastocytes et les basophiles tels que le TNF- α , l'IL-4, l'IL-3, le GM-CSF, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-8 et l'IL-16 ou encore le CCL3 (*Lorentz et al. 2000*). Certains de ces médiateurs possèdent une activité chimiotactique qui va favoriser le recrutement d'éosinophiles, de neutrophiles, de monocytes et de lymphocytes au site de l'inflammation. Le TNF- α et l'IL-4 produits par les mastocytes favorisent une inflammation riche en neutrophiles et en éosinophiles (*Galli et Costa 1995*). L'IL-5 produite par les lymphocytes Th2 et les mastocytes activent les polynucléaires éosinophiles (*Dumitrascu 1996*). Les cellules recrutées libèrent alors des protéases qui provoquent des lésions tissulaires.

I-7.1.2 La sclérose en plaque

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie neurologique auto-immune chronique du système nerveux central (*Alsen 1958*). Elle est multifactorielle et ses manifestations cliniques sont liées à une démyélinisation des fibres nerveuses du cerveau, de la moelle épinière et du nerf optique. La présence de mastocytes dans le système nerveux central de patients atteints de SEP est déjà connue depuis longtemps (*Olsson 1974 ; Kruger et al. 1990 ; Secor et al. 2000*).

L'EAE (encéphalomyélite auto-immune expérimentale) est un modèle d'étude chez la souris mimant la SEP développée par l'homme (*Costanza et al. 2012*). De manière surprenante, dans un modèle murin d'EAE active dans des souris MC knock-in, la production d'IL-4 par les mastocytes favorise l'apparition de lymphocytes Th1 encéphalitogènes et contribue de ce fait à la sévérité de la maladie.

Dans ces travaux, la sécrétion d'IL-4 par les mastocytes semble être régulée négativement par le facteur de transcription Ikaros qui diminue l'accès au locus de l'IL-4 par remodelage de la chromatine (*Zappulla et al. 2002*).

Les Th17 sont un sous-type de lymphocyte Th impliqués dans la lutte antifongique, dans de nombreux processus inflammatoires et certaines maladies auto-immunes comme l'EAE (*Theoharides et al. 2008*). L'équipe de Carlo Pucillo a étudié en détail l'implication des mastocytes dans la réponse Th17. Elle a notamment démontré que des lymphocytes T régulateurs (Treg) cultivés en présence de mastocytes pouvaient changer de phénotype, perdre leurs propriétés suppressives et devenir pro-inflammatoires (*Gri et al. 2012*). Ce phénomène est rendu possible par l'intermédiaire de l'IL-6 et d'une interaction Treg/mastocyte *via* l'axe OX40/OX40L. Il est observé un glissement du phénotype Treg vers un phénotype Th17 producteur de fort taux d'IL-17. Par ailleurs, d'étroites appositions sont observées entre des lymphocytes Treg produisant de l'IL-6, des lymphocytes Th17 exprimant OX40 et des mastocytes, dans des coupes de ganglions de souris atteintes d'EAE (*Carlson et al. 2008*).

Ces données suggèrent qu'une telle coopération pourrait amplifier la réponse inflammatoire lors d'une pathologie auto-immune telle que l'EAE. Par ailleurs, il a été montré que l'utilisation de molécules

inhibitrices de la dégranulation mastocytaire permet le ralentissement du processus de démyélinisation dans ces modèles de souris EAE (*Secor et al. 2000*).

Chez l'homme, au cours de la SEP, l'interaction entre les mastocytes et les astrocytes *via* le CD40/CD40L va induire la libération d'IL-33 et d'IL-1 β par les mastocytes, responsable de la libération des produits de dégranulation au niveau de la barrière hémato-encéphalique en la rendant perméable. Ceci va permettre le passage de cellules inflammatoires recrutées par les mastocytes dans le système nerveux central et entraîner l'inflammation (*Frenzel et Hermine 2012*).

Une autre équipe a montré qu'il existe une augmentation du nombre de mastocytes lors de poussées de SEP. Ceci s'accompagne de façon concomitante de la présence dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) de ces patients de produits de dégranulation mastocytaire tels que la tryptase, des protéases, l'histamine ainsi que d'ARN messagers codant pour le récepteur Fc ϵ RI (*Rozniecki, et al. 1995*). De même, l'activation des mastocytes chez les patients atteints de SEP entraînerait la production de cytokines inflammatoires et de molécules chimiotactiques recrutant ainsi les cellules immunitaires telles que les neutrophiles, cellules dendritiques et les LT notamment les Th17 (*Carlson et al. 2008*).

I-7.2 Rôle dans l'immunité adaptative

Les mastocytes, comme les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B, expriment à leur surface les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et II (CMHI ET CMHII) (*Banovac et al. 1989 ; Malaviya et al. 1996 ; Raposo et al. 1997*). Ces cellules expriment également les molécules de co-stimulation capable d'activer les LT et d'établir ainsi une réponse immunitaire adaptative.

Les premières données suggérant un rôle des MCs dans l'immunité adaptative proviennent des études ayant montré l'expression des molécules du CMH classe II par les mastocytes dérivés de moelle osseuse de souris (BMDC) qui ont la capacité d'apprêter et de présenter l'antigène (*Frandji et al. 1993*). Cette propriété est modulée par différentes cytokines. L'addition d'IL4 et de GM-SCF augmente l'expression des molécules du CMH classe II alors que l'IFN- γ inhibe cette expression (*Frandji et al. 1995*).

Frandji *et al* ont montré également l'expression de molécules de co-stimulation, CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2) par les BMMCs qui ont donc la capacité de promouvoir la co-stimulation des LT normaux (Frandsen *et al.* 1996). Cette fonction a été aussi démontrée chez les mastocytes péritonéaux de rat qui expriment également les CMHII (Fox *et al.* 1994). Néanmoins, il existe une limitation importante à ces études utilisant des cultures primaires de mastocytes dérivés de moelle osseuse de souris : il est impossible d'exclure une éventuelle contamination des cultures cellulaires par des CPA professionnelles résiduelles. Effectivement, la présence inopportune d'un très faible nombre de CPA, ayant capté l'antigène, suffirait à induire une activation significative des lymphocytes T dans ces expériences. Kambayashi *et al.* ont analysé ce point et décrivent qu'après capture de l'antigène *via* les IgE, les BMMC qui meurent par apoptose, sont phagocytés par les CPA contaminant la culture qui peuvent alors présenter l'antigène aux lymphocytes T *via* leurs molécules de CMH-II (Kambayashi *et al.* 2008). Après avoir méticuleusement éliminé les possibles CPA présentes dans les préparations cellulaires, ils ont testé les capacités de présentation d'antigènes par des cultures de BMMC. Ces études relatent qu'en l'absence de CPA, les BMMC ne peuvent pas activer les lymphocytes T, car même s'ils peuvent capturer l'antigène, ils n'expriment pas de molécules de CMH-II (que ce soit au repos ou après traitement avec de l'IL-4, du GM-CSF ou de l'IFN- γ). Néanmoins, l'action combinée du LPS et de l'IFN- γ induit l'expression fonctionnelle de CMH-II par les BMMC, devenant ainsi capables d'activer les Trég. (Kambayashi *et al.* 2009) Plus récemment, Gaudenzio *et al*, utilisant des lignées primaires de mastocytes de souris dérivés du péritoine (PCMC), ainsi que des mastocytes péritonéaux obtenus *ex vivo*, ont montré que ces cellules peuvent acquérir un phénotype de CPA (expression de molécules de classe II et de co-stimulation) lorsqu'ils sont traités en présence d'IFN- γ pendant 72 heures. Ce phénotype est exacerbé lorsque de l'IL-4 est associée à l'IFN- γ . Ainsi conditionnés, les mastocytes capturent, appréhendent et présentent l'antigène à des lymphocytes T CD4+ effecteurs, mais restent incapables d'activer leurs homologues naïfs (Gaudenzio *et al.* 2009). Durant cette interaction, une véritable synapse immunologique est mise en place où le lymphocyte Th polarise son TCR et toute sa machinerie sécrétoire vers l'aire de contact intercellulaire. En retour, le

mastocyte s'active et baisse significativement le seuil d'activation de ses récepteurs FcεRI suite à une stimulation par des IgE.

Au total, ces résultats indiquent que les mastocytes, au moins chez la souris, peuvent établir une coopération spécifique avec des lymphocytes Th pendant laquelle a lieu un authentique dialogue intercellulaire.

L'expression des molécules du CMH classe II a aussi été observée dans une lignée de mastocytes leucémiques humains, la lignée HMC-1. Ces cellules expriment aussi les molécules de co-stimulation B7-1 et B7-2 qui permettent d'activer les LB de façon indépendante des LT (*Gauchat et al. 1993*). Enfin, cette capacité de présentation a été aussi démontrée chez les mastocytes humains obtenus par culture primaire de cellules CD34+ (*Dimitriadou et al. 1998 ; Poncet et al. 1999*).

Ainsi, sous certaines conditions, les mastocytes semblent posséder toutes les caractéristiques de cellules présentatrices d'antigène : internalisation et dégradation des protéines antigéniques en peptides, expression des complexes CMH classe II-peptides à leur surface, présentation des molécules de co-stimulation.

I-7.3 Rôle dans la défense contre les parasites et les bactéries

Le mastocyte est connu de longue date comme l'élément initiateur des réactions allergiques IgE-dépendantes mais, plus récemment, un rôle bénéfique de cette cellule a été suggéré dans la défense de l'organisme contre les infections bactériennes et parasitaires.

I-7.4 Rôle dans la défense contre les parasites

Les infections parasitaires sont fréquemment accompagnées d'une augmentation du nombre d'éosinophiles et de basophiles circulants, d'une élévation du taux d'IgE sérique et d'un accroissement du nombre de mastocytes au niveau des tissus atteints. L'intervention des mastocytes dans certaines réponses antiparasitaires implique la présence d'IgE et donc l'établissement d'une réponse immunitaire orientant les LT vers un profil Th2 et la production d'IgE par les LB (*Wedemeyer et al. 2000*). D'autres

travaux ont mis en évidence l'activation des mastocytes au site de l'infestation parasitaire et la participation de médiateurs mastocytaires à l'expulsion des parasites (*Befus et al. 1982 ; Jarrett et Miller 1982 ; King et al. 1993*).

Il a été rapporté récemment que les mastocytes muqueux contribuent à l'expulsion d'un certain nombre de nématodes, parasites gastro-intestinaux, et il a été démontré qu'ils ont un rôle essentiel dans la clairance de *Trichinella spiralis* dans le tractus intestinal (*Thrasher et al. 2013*).

En outre, des études menées chez la souris montrent que la résistance à l'infection par des stades larvaires de tiques de l'espèce *Haemaphysalis longicornis* est dépendante de la présence de mastocytes (*Matsuda et al. 1990*).

Comme l'allergie, la réponse antiparasitaire fait intervenir les mastocytes, qui sont recrutés et activés au site de l'infestation parasitaire, aboutissant à l'expulsion des parasites. Cependant, les mastocytes peuvent jouer un rôle néfaste dans les infections parasitaires (*Galli et Tsai 2010*). Leur rôle bénéfique ou non semble dépendre du type de parasite. En effet, lors d'une infection à l'oreille provoquée par *Leishmania major*, les souris normales présentent des lésions cutanées plus développées que celles des souris déficientes en mastocytes, même si l'élimination du parasite suit la même cinétique dans les deux souches de souris (*Wershil et al. 1994*). De même, l'équipe d'accueil a démontré que les parasites du genre *Leishmania* peuvent directement activer les mastocytes murins *in vitro* et infecter ces cellules en s'y multipliant (*Bidri et al. 1997*).

I-7.5 Rôle dans la défense contre les bactéries

Les mastocytes participent aux réponses anti bactériennes ; ils reconnaissent et répondent directement contre les pathogènes. En effet, les mastocytes phagocytent et lysent différentes bactéries, libèrent des médiateurs pro-inflammatoires bénéfiques, et concourent à la récupération structurelle et fonctionnelle des tissus (*Feger et al. 2002*).

L'interaction entre MCs et bactéries s'effectue soit d'une manière directe, c'est à dire que les mastocytes reconnaissent des structures présentes sur la bactérie, la phagocyte et la tue en libérant des

médiateurs pro-inflammatoires tels que le TNF- α ou l'IL-1 (Abraham et Malaviya 1997 ; Arock et al. 1998), soit d'une manière indirecte. Dans ce cas, les MCs interagissent avec des produits bactériens.

I-7.5.a Interactions directes avec les bactéries

Le rôle primordial du mastocyte dans la défense anti bactérienne a été établi par des études *in vivo* chez les souris déficientes en MCs qui, contrairement à des souris normales, ne survivent pas à une péritonite infectieuse provoquée par piqure caecale ou par inoculation nasale de *Klebsiella pneumoniae* (Malaviya et al. 1996 ; Mannel et al. 1996). La réplétion par des mastocytes normaux de ces souris déficientes en MCs provoque leur survie et cette protection fait intervenir certains médiateurs mastocytaires, en particulier le TNF- α , qui favorise le recrutement des neutrophiles, nécessaires à l'élimination des bactéries.

D'autres médiateurs mastocytaires libérés au cours de l'interaction mastocyte-bactérie jouent un rôle important dans le recrutement de neutrophiles et dans l'établissement de l'inflammation au cours des infections bactériennes. Il a ainsi été montré que l'activation des MCs *in vitro* par *Pseudomonas aeruginosa* induit la libération d'IL-6, de MIP-3 α , d'IL-1 α et - β qui entraîneraient le recrutement des neutrophiles (Boudreau et al. 2002 ; Lin et al. 2002).

Par ailleurs, les mastocytes peuvent interagir de deux manières différentes avec des bactéries selon la présence ou non d'opsonines (Feger et al. 2002) :

- D'une part, en présence d'opsonines (Ig, fragments du complément), des études *in vitro* ont montré que les mastocytes peuvent reconnaître des bactéries opsonisées, par leur récepteur au fragment C3 du complément (Sher et al. 1979). Le rôle du complément dans les interactions entre MCs et bactéries a été confirmé *in vivo* chez des souris déficientes en fractions du complément qui ne survivent pas à une péritonite provoquée (Prodeus et al. 1997).
- D'autre part, les MCs, dans des conditions opsonines-indépendantes, sont capables d'interagir avec des bactéries Gram-négatif exprimant les fimbriae de type I comportant la sous unité mineure FimH, comme *E. coli*, par le biais du récepteur CD48 (Munoz et al. 2003). Il s'agit du

premier récepteur pour les bactéries identifié sur les MCs et dont le ligand naturel est le CD2 exprimé par les LT.

Les bactéries dont l'internalisation se fait par opsonisation empruntent la voie des endosomes et lysosomes ou elles sont tuées. Par contre, l'internalisation par l'intermédiaire du récepteur CD48 semble passer par une voie distincte de la voie classique des endosomes et des lysosomes, et utilisant des sites cellulaires, riches en lipides, nommées caveolae observées à la surface cellulaire des MCs. Cette voie permet à la bactérie de pénétrer dans le MC sans y être dégradée et de s'y multiplier. Le mastocyte joue dans ce cas le rôle de «réservoir à pathogènes» et pourrait être responsable de la récurrence de certaines infections bactériennes (Feger et al. 2002).

I-7.5.b Interactions indirectes avec des produits bactériens

En plus de son interaction directe avec les bactéries, le MC est capable d'interagir avec des produits bactériens (toxines, LPS, PGN), qui sont essentiels à l'établissement de l'inflammation et à l'activation des cellules immunes au cours des infections bactériennes.

Les toxines bactériennes sont capables d'activer spécifiquement les mastocytes, en induisant différents types de réponse. Par exemple, la toxine A de *Clostridium difficile* induit une libération *in vitro* de TNF- α par des mastocytes péritonéaux de rat mais n'induit pas la libération d'histamine (Calderon et al. 1998), ou encore la cytotoxine VacA d'*Helicobacter pylori* qui induit la libération de TNF- α , MIP-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10 et IL13 sans induire une dégranulation des BMMC (Supajatura et al. 2002).

Plus récemment, il a été montré que les mastocytes de souris et humains pouvaient être stimulés par des composés bactériens comme le lipopolysaccharide (LPS) dérivé des bactéries Gram négatif ou les peptidoglycanes (PGN) (Supajatura et al. 2002 ; Ikeda et 2003 ; Yoshikawa et Tasaka 2003; Varadaradjalou et al. 2003). Il a été montré en outre que le LPS agit sur les mastocytes en se fixant sur son récepteur TLR4 présent à la surface des mastocytes, en induisant la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, le TNF- α et l'IL-1. mais non d'histamine donc, a priori, sans processus de dégranulation. A contrario, il a été rapporté que le PGN de *S. aureus* interagit *in vivo* et *in vitro* avec le

TLR2 et induit, non seulement une libération massive de TNF- α , d'IL-4, d'IL-5, d'IL-6 et d'IL-13, mais aussi une libération d'histamine, traduisant un processus de dégranulation.

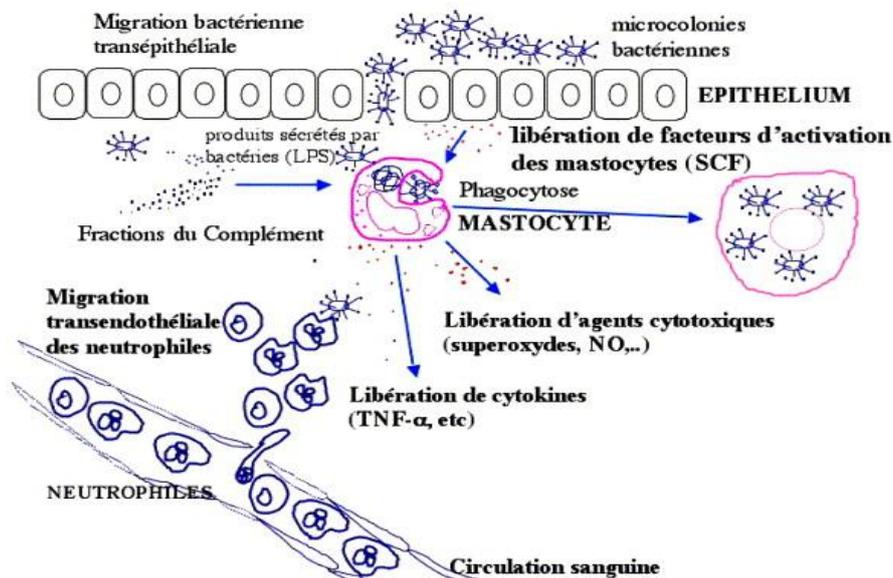


Figure 9 : Principaux mécanismes d'intervention du mastocyte au cours de l'immunité antibactérienne.

I-7.5.c Les récepteurs Toll-like

Les récepteurs Toll-like (TLRs) sont des récepteurs appartenant à la grande famille des patterns recognition receptors (PRR) qui jouent un rôle fondamental dans la reconnaissance des pathogènes pénétrant l'organisme. L'expression des TLR par les mastocytes dépend du modèle et de l'espèce étudiée et il est influencé par le microenvironnement.

Des études menées sur des mastocytes murins ont montré que ces cellules pouvaient potentiellement posséder les ARN codants tous les TLRs, à l'exception du TLR5 (*Supajatura et al. 2001 ; Matsushima et al. 2004 ; Stelekati et al. 2007 ; Brzezinska-Blaszczyk et Wierzbicki 2010*). Chez l'homme, les mastocytes expriment également la majorité des ARN des TLR à l'exception de TLR 8 qui n'est détecté qu'au sein de lignées HMC1 et LAD2 (*Kulka et al. 2004 ; Stelekati et al. 2007*).

Des études ont montré qu'il existe une expression différentielle des TLRs au niveau des mastocytes qui pourrait être le reflet de leurs fonctions spécialisées dans la réponse immunitaire. Ainsi,

par exemple, le TLR9 est plus exprimé par les mastocytes de la peau et le TLR7 par ceux de poumons (Matsushima et al. 2004 ; Kulka et Metcalfe 2006).

Tableau III : les principaux TLRs chez l'homme et leurs ligands.

Récepteurs	Ligands naturels	Adaptateurs
TLR1	triacyl des lipoprotéines	MyD88/MAL
TLR2	lipoprotéines, peptidoglycane des bactéries Gram+, acides lipotéichoïques, champignons, glycoprotéines virales	MyD88/MAL
TLR3	ARN double brin d'origine virale ou parasitaire	TRIF
TLR4	lipopolysaccharide, glycoprotéines virales	MyD88/MAL/TRIF/TRAM
TLR5	Flagelline	MyD88
TLR6	diacyl des lipoprotéines	MyD88/MAL
TLR7	ARN simple brin	MyD88
TLR8	ARN simple brin	MyD88
TLR9	ADN CPG non-méthylés	MyD88

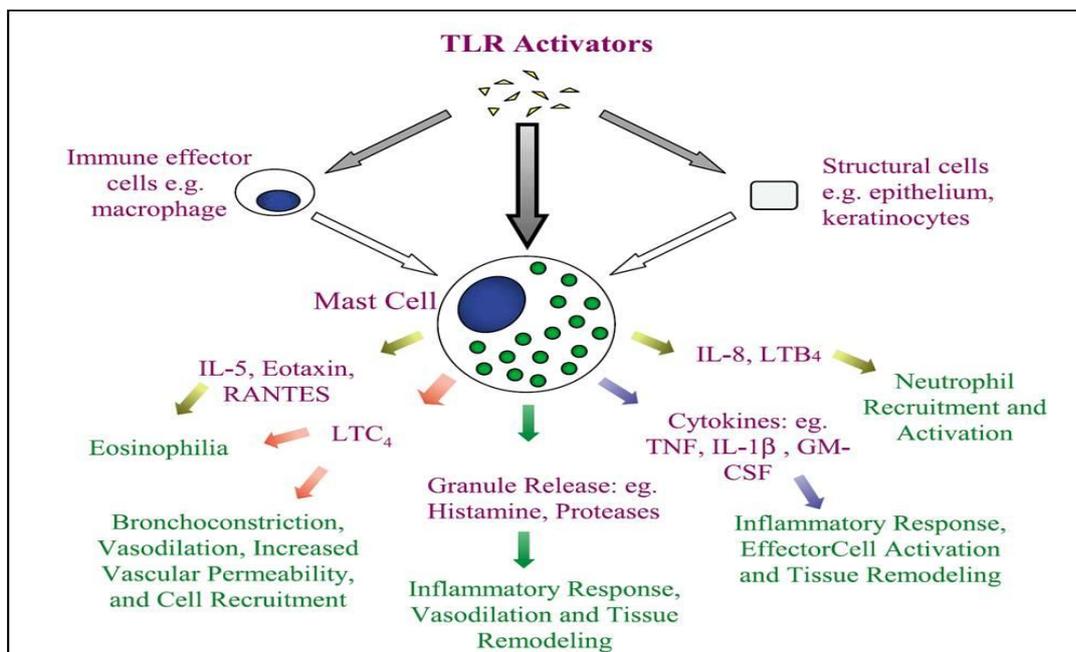


Figure 10: Impact de l'activation des mastocytes par les TLRs. D'après Marshall et al.1993 (Marshall et al. 2003)

I-8 L'activation mastocytaire *via* le récepteur FcεRI

L'interaction spécifique d'un antigène (souvent un allergène) avec les IgE déjà liées sur les récepteurs FcεRI induit l'agrégation des récepteurs et l'initiation d'une importante cascade de signalisation dont les résultantes seront l'activation des mastocytes et la libération du contenu granulaire cytoplasmique.

Il faut noter également que la signalisation *via* les FcγR peut, elle aussi, induire une activation des MCs. De plus, il existe une variété d'agents pharmacologiques qui sont aussi capables d'induire l'activation mastocytaire.

I-8.1 Structure du récepteur de haute affinité aux IgE (FcεRI)

Le FcεRI est abondamment exprimé à la surface des mastocytes et des basophiles (*Blank et al. 1989; Miller et al. 1989*). Malgré une concentration sérique peu élevée des IgE (100 ng/mL), elles occupent en permanence une proportion appréciable de ce récepteur du fait de la haute affinité de cette liaison ($KD = 10^{-9}$ à 10^{-11} M) (*Malveaux et al. 1978*).

Ce récepteur appartient à la superfamille des récepteurs impliqués dans la reconnaissance des antigènes au même titre que les récepteurs BCR et TCR. Il s'agit d'un récepteur hétérotétramérique composé d'une sous-unité α qui lie les IgE, d'une sous-unité β ayant quatre domaines transmembranaires, et de deux sous-unités γ identiques (FcRγ) reliées par des ponts disulfures.

La sous-unité α est celle qui lie l'IgE (*Hakimi et al. 1990; Blank et al. 1991*). Elle possède deux domaines de type immunoglobuline qui semblent impliqués dans la liaison de l'IgE. Le premier est impliqué dans la stabilisation du complexe IgE/récepteur alors que le second lie l'IgE elle-même. Elle possède également un domaine transmembranaire qui contient un motif conservé acide aspartique (*Kinet 1999*). La chaîne alpha humaine est N-glycosylée sur sept sites. Cette glycosylation est nécessaire pour une bonne interaction entre la chaîne alpha et la machinerie assurant son repliement correct dans le réticulum endoplasmique (RE) (*Letourneur et al. 1995*). La portion intracellulaire de la chaîne alpha n'a pas de fonction de signalisation apparente (*Kinet 1999*).

La région extracellulaire de la chaîne α a été cristallographiée sous forme d'une protéine isolée ou dans un complexe avec le fragment Fc d'une IgE (*Garman et al. 1998 ; Wurzburg et al. 2000 ; Garman et al. 2000 ; Mackay et al. 2002*). Cette structure du complexe montre une forte affinité pour les IgE du Fc ϵ RI en raison principalement du faible taux de dissociation. Ce faible taux de dissociation s'explique par la capacité de chaque site récepteur dissocié à relire de nouveau l'IgE lorsque l'autre site est encore occupé par l'IgE. Ainsi, chaque site récepteur présente une affinité intrinsèque (probablement dans la gamme μ molaire) qui est beaucoup plus faible que l'affinité du récepteur entier. Cette constatation est importante pour le développement de stratégies visant à interférer avec l'interaction IgE-Fc ϵ RI. On peut prédire qu'un médicament qui interfère avec l'un des sites de liaison serait suffisant pour bloquer la liaison des IgE en induisant la dissociation.

La chaîne β est spécifique des mastocytes et des basophiles et elle sert d'amplificateur de la réponse induite par les IgE. En effet, il a été montré que le complexe $\alpha\gamma_2$ est suffisant pour induire l'activation par les IgE, mais cette réponse est plus faible que celle observée en présence de la sous unité β (*Turner et Kinet 1999 ; Nadler et al. 2000 ; Gilfillan et Tkaczyk 2006*). Les sous unités γ sont identiques, reliées par des ponts disulfures et sont nécessaires pour la transduction du signal car elles possèdent deux motifs activateurs ITAMs (Immunoreceptor Tyrosine Based Activation Motif) (*Kinet 1999*). Les motifs ITAM sont des motifs peptidiques présents dans des sous-unités associées à différents récepteurs immunitaires tels que CD3 (ϵ/δ , ϵ/γ , ξ/ξ) associé au récepteur TCR des lymphocytes T, l'Ig α et Ig β associés aux récepteurs BCR des lymphocytes B, le FcR γ associé à plusieurs récepteurs aux immunoglobulines dont le Fc ϵ RI dont l'expression est hématopoïétique, et DAP12 associés aux récepteurs NKp44 des cellules Natural Killer. Ces motifs sont impliqués dans la transduction du signal (*Cambier 1995*).

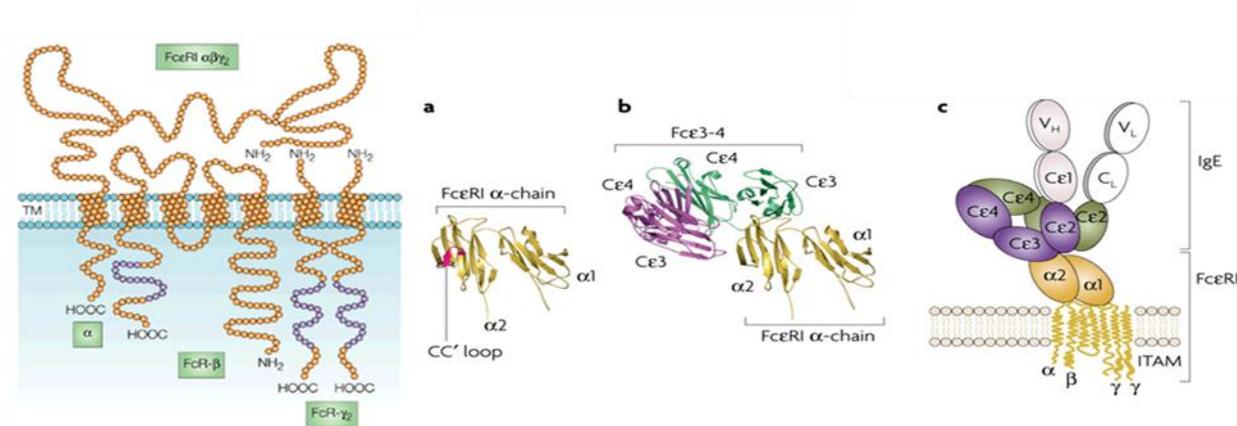


Figure 11 : Différentes représentations du récepteur FcεRI

Il faut noter également que le FcεRI murin est confiné à la surface des mastocytes et des basophiles, alors que chez l'homme, il existe une distribution plus large des FcεRI. Les monocytes, les cellules de Langerhans, les éosinophiles et les cellules dendritiques (CD) sont capable d'exprimer la forme trimérique $\alpha\gamma_2$ du FcεRI (*Kinet et al 1999*). Les différences entre FcεRI humain et murin sont résumées dans le tableau IV.

Tableau IV : Différences entre le FcεRI humains et souris : FcεRI : high-affinity Fc receptor for IgE; IL-4 : interleukin-4 (*Kinet 1999 ; Geiger et al. 2000 ; Gounni et al. 2001 ; Novak et al. 2003*)

Propriétés	FcεRI de souris	FcεRI humain
Structure	Tétramère $\alpha\beta\gamma_2$	Tétramère $\alpha\beta\gamma_2$ et trimère $\alpha\gamma_2$
Pattern d'expression	Mastocytes et basophiles	Mastocytes, basophiles, monocytes, macrophages, cellules dendritiques, cellules de Langerhans, éosinophiles et plaquettes
Régulation de l'expression	L'IL4 n'induit pas l'expression de la chaîne α du récepteur	L'IL4 induit l'expression de la chaîne α du récepteur
Propriétés de liaison	Liaison aux IgE murines	Liaison aux IgE murines et humaines

I-8.2 Le récepteur de faible affinité pour les IgE (FcεRII ou CD23)

Il existe aussi un récepteur de faible affinité pour les IgE, FcεRII ou CD23. Comme les autres récepteurs à Fc de faible affinité, et à l'inverse du FcεRI, il ne lie pas les IgE tant que celles-ci ne sont pas couplées à leur allergène. En d'autres termes, le CD23 lie des IgE déjà engagées dans des complexes immuns IgE-allergène. FcεRI et CD23 diffèrent par plusieurs points. En particulier, l'expression cellulaire de CD23 est beaucoup plus large que celle de FcεRI et, de ce fait, le rôle de ces récepteurs de basse affinité est non négligeable.

Le CD23 est le second récepteur capable de lier des IgE avec, toutefois, une affinité plus faible que celle du FcεRI. C'est un homotrimère membranaire qui existe sous deux formes: CD23a et CD23b. La forme CD23a est constitutivement exprimée par les lymphocytes B. L'autre forme, CD23b, est induite par l'IL-4 sur les cellules T, les cellules de Langerhans, les monocytes, les macrophages et les éosinophiles (*Yokota et al. 1988*). Le CD23 a une forte affinité pour le complexe immunitaire IgE-antigène, mais une très faible affinité pour l'IgE lorsqu'elle n'est pas liée à son antigène. Il joue un rôle dans la production des IgE en participant à la présentation des antigènes et à la stimulation des lymphocytes T. Il est également impliqué dans la génération de médiateurs de l'inflammation, notamment par les éosinophiles (*Novak et al. 2001*).

I-8.3 Rôle des IgE

De masse relative de 188 kDa, les IgE produites sont présentes dans le sang circulant et dans les tissus, libres ou fixées à la surface des mastocytes et des basophiles. A la surface de ces cellules, les IgE sont fixées par leur fragment constant Fc à la sous-unité α du récepteur de forte affinité pour les IgE, FcεRI, laissant la région variable Fab libre pour la reconnaissance de l'allergène correspondant. Les IgE persistent plusieurs mois à la surface des cellules mais seulement quelques jours sous forme libre dans le sang périphérique.

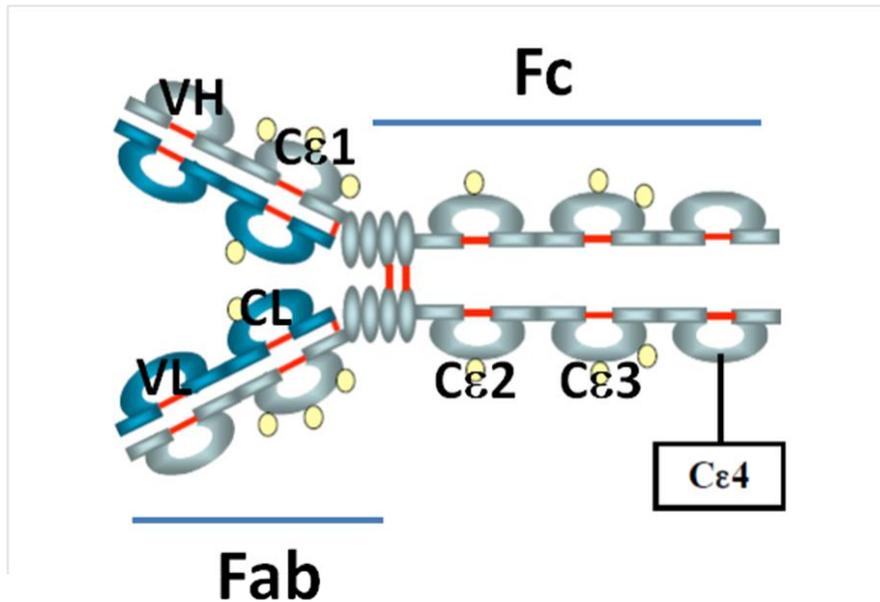


Figure 12 : Représentation schématique d'une immunoglobuline E : Fc : fragment constant ; Fab : fragment de reconnaissance de l'antigène ; Cε1-4 : domaines constants de la chaîne lourde ; C_L : domaine constant de la chaîne légère ; V_H : domaine variable de la chaîne lourde ; V_L : domaine variable de la chaîne légère. Extrait de Blank et coll., 2003 (*Blank et al. 2003*).

La première observation de la régulation de FcεRI par son ligand IgE a été faite par Malveaux *et al.* qui ont montré une corrélation entre les niveaux d'IgE sériques et la quantité d'IgE liée aux mastocytes et aux basophiles (*Malveaux et al. 1978*). Plus tard, une autre équipe a montré que l'IgE sous forme de monomère pourrait augmenter l'expression du FcεRI à la surface cellulaire (*Furuichi et al. 1985 ; Quarto et al. 1985*). Par ailleurs, il a été observé que le faible niveau d'expression de FcεRI sur les mastocytes de souris déficientes en IgE pouvait être considérablement augmenté par incubation avec les IgE *in vitro* ou par injection d'IgE *in vivo* (*Yamaguchi et al. 1997*).

D'autres études ont confirmé des effets similaires de l'IgE sur les niveaux d'expression du FcεRI à la surface des basophiles, des mastocytes, des monocytes et des cellules dendritiques (*MacGlashan et al. 1997 ; Lantz et al. 1997 ; Novak et al. 2003*). Cette régulation positive de l'expression de FcεRI médiée par les IgE conduit, pour certains types d'IgE, à une augmentation de la libération des médiateurs des mastocytes.

L'effet des IgE sur la régulation de l'expression du FcεRI à la surface des mastocytes s'explique par une stabilisation des récepteurs à la surface cellulaire par le ligand. Cette stabilisation empêche la dégradation des récepteurs exprimés, tout en préservant la synthèse basale. Ceci, à son tour, conduit à l'accumulation progressive de récepteurs à la surface cellulaire (*Sakurai et al. 2004*).

Ce mécanisme de stabilisation s'applique à la fois aux récepteurs α2 et aux αβγ2 (*Borkowski et al. 2001*). Il est à noter que tout traitement qui affecte la synthèse basale de FcεRI (telles que l'IL-4) aurait indirectement un effet sur la régulation positive des récepteurs à la surface cellulaire. Cependant, il n'existe aucune preuve de l'effet des IgE sur la transcription ou la traduction de FcεRI. Les IgE peuvent également induire une régulation positive de l'expression de FcεRI par les cellules dendritiques par un mécanisme comparable (*Novak et al. 2003*).

Les IgE monomériques restent liées et disponibles longtemps sur le récepteur avec une très grande affinité de l'ordre de 10^{10} M^{-1} et la dissociation du complexe IgE/FcεRI est lente. Il est à noter également que des études ont montré que la fixation des IgE seules sur leur récepteur a un effet antiapoptotique et peut induire la prolifération des mastocytes de souris. Néanmoins, le traitement de patients atopiques avec des IgE spécifiques conduit paradoxalement à une baisse d'expression du FcεRI sur les basophiles (*MacGlashan et al. 1997*).

I-8.4 La signalisation du récepteur FcεRI

Le FcεRI présente des motifs ITAM couplés aux tyrosine-kinases LYN et SYK, et, lorsqu'il y a un pontage du récepteur, un signal d'activation est transmis à la cellule. Rapidement amplifié, ce signal provoque la migration des granulations sécrétoires vers la membrane plasmique et l'exocytose du contenu granulaire dans le milieu extracellulaire (*Turner et Kinet 1999 ; Gilfillan et Tkaczyk 2006*).

I-8.4.a Voie principale

Lorsqu'il y a agrégation du récepteur, la première étape est l'activation de la tyrosine kinase LYN qui phosphoryle les motifs ITAM au niveau des chaînes γ du récepteur FcεRI, induisant ainsi le recrutement et la phosphorylation de SYK (Spleen Tyrosine Kinase) (*Parravicini et al. 2002*).

SYK phosphoryle LAT (linker for activation of T cells), qui recrute GADS (growth-factor-receptor-bound protein 2 (GRB2)-related adaptor protein), SLP76 (SH2-domain-containing leukocyte protein of 76 kDa), et PLC γ (phospholipase C γ) qui, quant à elle, peut être activée par le recrutement membranaire de BTK (Bruton's tyrosine kinase) (*Pivniouk et al. 1999 ; Saitoh et al. 2000*). BTK, pour être pleinement active, doit préalablement être recrutée à partir de la membrane par des phosphatidyl-inositol (3,4,5) triphosphate (PIP3). Elle devient alors accessible pour être phosphorylée par LYN et s'autophosphoryler. LYN et BTK ont cependant des rôles équivoques mais indispensables à l'activation des mastocytes (*Kawakami et al. 2000 ; Kawakami, et al. 2005*).

La PLC γ est une enzyme dont les produits finaux sont l'IP3 et le DAG. L'IP3 peut se fixer sur des récepteurs situés sur la membrane du réticulum endoplasmique et provoquer la libération du calcium à partir du réticulum, ce qui entraîne une augmentation du calcium intracellulaire puis une vague calcique (*Turner et Kinet 1999*). Le DAG est responsable de l'activation de nombreuses protéines kinases C. En définitive, la déplétion et la mobilisation des réserves calciques conduit à la dégranulation.

I-8.4.b Voie complémentaire

Des études ont montré que des BMMCs déficients en LYN présentent une dégranulation normale, ce qui indique qu'il y a compensation par d'autres molécules dans les cellules déficientes en LYN ou qu'une deuxième voie est impliquée dans la dégranulation (*Nishizumi et Yamamoto 1997*).

Il existe en effet une autre voie complémentaire ou FYN active SYK, induisant la formation d'un complexe de signalisation comportant la protéine adaptatrice Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2), GAB2 (GRB2-associated binding protein 2) et PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinases) (*Parravicini et al. 2002*). L'activation de la PI3K conduit au recrutement membranaire de PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase) qui active alors la PKC δ , conduisant finalement à la dégranulation.

La sphingosine kinase (SPHKs) peut être également activée par LYN ou FYN et cette activation conduit à un influx de Ca²⁺ extracellulaire aboutissant également à la dégranulation (*Baumruker et Prieschl 2000*).

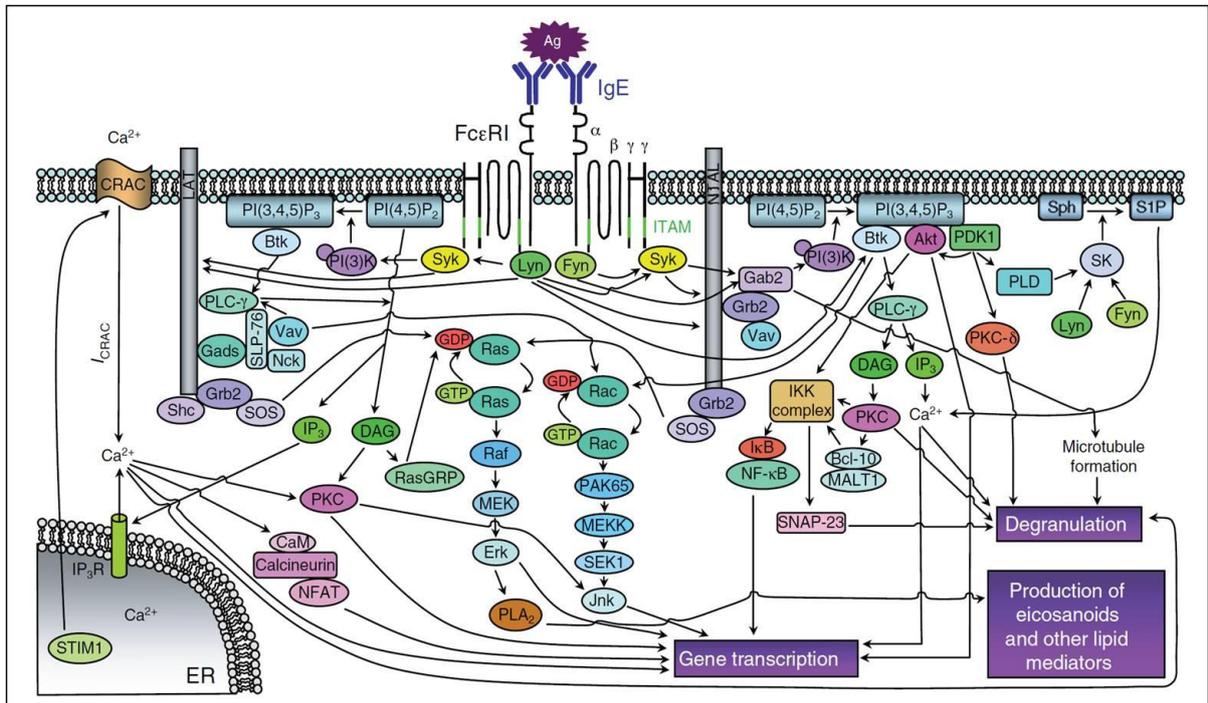


Figure 13 : la signalisation du récepteur FcεRI (Kalesnikoff et Galli 2008).

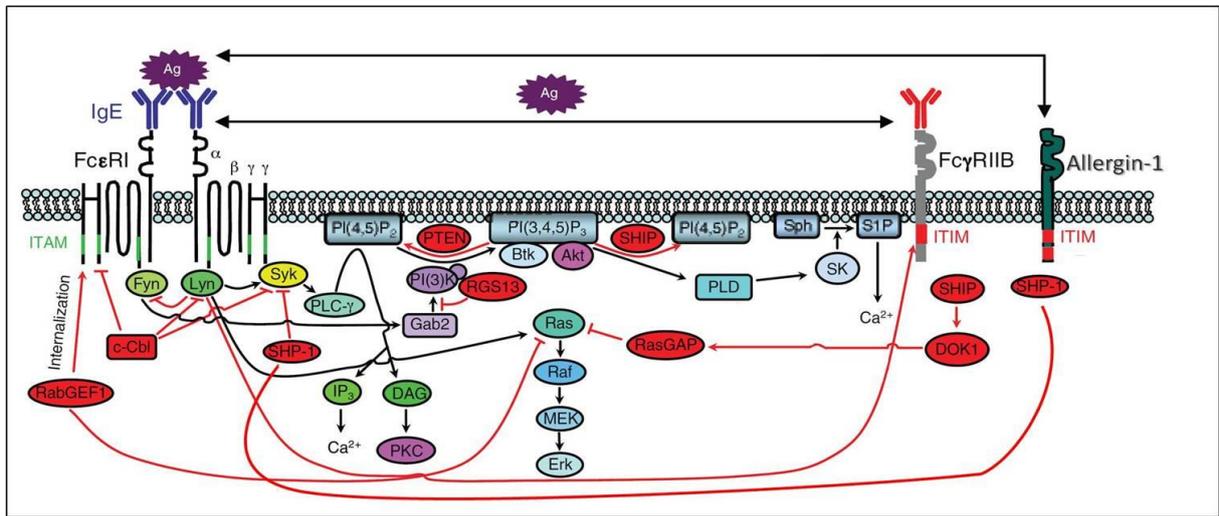


Figure 14 : Régulation négative de la signalisation du récepteur FcεRI. Modifié de Kalesnikoff et al (Kalesnikoff et Galli 2008)

Grb2 et SOS (son of sevenless) sont associés à la fois à la voie primaire et complémentaire et conduisent à l'activation de RAS, ce qui conduit à l'activation d'ERK (extracellular-signal-related kinase) et de la MAPK (mitogen-activated protein kinase), l'activation de cette dernière aboutissant à la production d'eicosanoïdes par PLA2.

Quant à la production de cytokines par les mastocytes, elle est régulée par des facteurs de transcription différents, dont l'activation est dépendante du Ca^{2+} et de PKC, AKT, BCL-10, MALT1 (mucosa-associated-lymphoid-tissue lymphoma-translocation protein 10), 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1) et le phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (*Kalesnikoff et Galli 2008*).

I-8.5 La régulation négative du récepteur FcεRI

Les mécanismes de régulation négative du récepteur FcεRI limitent la dégranulation et, de ce fait, tendent à modérer les effets néfastes d'une activation mastocytaire exagérée.

Plusieurs molécules sont impliquées dans cette régulation négative de la dégranulation en agissant à plusieurs endroits de la voie de signalisation du récepteur FcεRI. Citons tout d'abord la molécule LYN, qui est impliquée à la fois dans l'activation et dans l'inhibition du récepteur, mais aussi des protéines RabGEF1 ou RGS13 qui agissent respectivement au niveau des voies ERK et PI3K et les immunorécepteurs porteurs de motifs ITIM tels que le FcγRIIB et l'Allergin-1 (*Siraganian 2003 ; Tam et al. 2004; Galli et al. 2005 ; Bansal et al. 2008 ; Kalesnikoff et Galli 2008*).

I-8.6 Expression des FcγR par les mastocytes

Les IgG, sécrétées par les lymphocytes B lors de la réponse immunitaire adaptative, peuvent exercer plusieurs fonctions comme la neutralisation de toxines ou de particules virales, l'activation de la cascade protéique du complément, ou encore l'opsonisation. Cette dernière fonction permet d'augmenter la prise en charge du pathogène par les cellules possédant des récepteurs au fragment constant des IgG (FcγR) à leur surface.

Mis à part le récepteur FcεRI, il a été démontré que les mastocytes de souris expriment de manière constitutive les récepteurs FcγRIIB et FcγRIIIA (*Daeron et al. 1980 ; Benhamou et al. 1990*).

Dans les BMDC, l'agrégation des récepteurs FcγRIIIA par des complexes GST/IgG et anti GST induit au même titre qu'une stimulation *via* FcεRI, la dégranulation des mastocytes et la production de TNF-α (*Malbec et Daeron 2007*). La signalisation induite lors de l'activation du récepteur FcγRIIIA est relativement similaire à celle induite lors de l'agrégation des récepteurs FcεRI, car ces récepteurs possèdent les deux mêmes sous-unités γ portant deux résidus ITAMs activateurs (*Daeron 1997*).

Chez l'homme, l'analyse des FcγR basée sur les explants tissulaires (peau) a montré que, contrairement aux modèles murins, les mastocytes humains n'expriment pas le FcγRIIIA ni le récepteur FcγRIIB mais expriment constitutivement le récepteur FcγRIIA. Néanmoins, les CBMC expriment les deux récepteurs FcγRIIA et FcγRIIB (*Ghannadan et al. 1998 ; Kepley et al. 2004 ; Zhao et al. 2006*).

La stimulation des récepteurs FcγRIIA sur des mastocytes dérivés de la peau humaine induit une dégranulation avec libération d'histamine (*Zhao et al. 2006 ; Jonsson et al. 2012*).

Le FcγRIIB est monocaténaire, constitué d'une chaîne α avec un domaine extracellulaire contenant un site d'interaction spécifique pour la portion IgG. Par épissages alternatifs, plusieurs isoformes peuvent être générées, qui diffèrent par leurs régions intracytoplasmiques (*Latour et al. 1996*). Chez la souris, 2 isoformes ont été observées : le FcγRIIB1 et le FcγRIIB2. Il a été mis en évidence la présence de motifs ITIM dans la partie intracytoplasmique de FcγRIIB1 capable d'inhiber l'activation mastocytaire.

Le FcγRIIA comprend une chaîne α avec un domaine extracellulaire contenant un site d'interaction spécifique pour la portion Fc des IgG et un domaine d'activation ITAM dans sa partie intracellulaire. Chez la souris, le FcγRIIB et le FcγRIIA présentent 95 % d'homologie dans la séquence en acides aminés de leurs domaines extracellulaires. Ils lient les IgG de même sous-classe (1, 2a et 2b). Par contre, il n'existe pas d'homologie dans les séquences peptidiques de leurs domaines transmembranaires et intracytoplasmiques (*Katz et Lobell 1995*).

Enfin, il est intéressant de noter qu'après stimulation par l'interféron γ, les mastocytes cutanés humains peuvent exprimer le récepteur de haute affinité aux IgG, le FcγRI (*Okayama et al. 2000*).

Tableau V : Expression des FcγR par les mastocytes murins et humains et effets de leur activation.

Récepteur	Expression par les mastocytes murins	Expression par les mastocytes humains	Médiateurs produits
FcγRI	NON	OUI	Histamine, IL-3, IL-13, TNF-α, GM-CSF, PGD2 et LTC4
FcγRIIIA	OUI	NON	Histamine, TNF-α, IL-6, GM-CSF, PGD2, LTC4 et RANTES
FcγRIIA	NON	OUI	Histamine, TNF-α, IL-6, GM-CSF, PGD2, LTC4 et RANTES
FcγRIIB	OUI	OUI	Inhibition de la dégranulation

I-9 Le SCF et son récepteur KIT (CD117)

De nombreuses cytokines agissent sur la différenciation des mastocytes, mais celle jouant un rôle critique dans ce phénomène est le stem cell factor (SCF). Le SCF est décrit comme une cytokine hématopoïétique présente sous deux formes biologiquement actives : soluble ou membranaire. Ces deux formes sont générées par épissage alternatif. La forme soluble circule sous forme d'un dimère glycosylé de 28 à 40 KD, alors que la forme membranaire est exprimée à la surface des cellules endothéliales, fibroblastiques, épithéliales et stromales (*Heinrich et al. 1993*).

Lors de l'hématopoïèse, le SCF a une action synergique avec l'érythropoïétine, l'IL-3, l'IL-7, le GM-CSF (Granulocyte macrophage-colony-stimulating factor) et le G-CSF (Granulocyte-colony-stimulating factor).

Le SCF agit sur la survie et l'entrée dans le cycle cellulaire. Il fonctionne comme un agent chimiotactique pour certains progéniteurs hématopoïétiques (*Broudy 1997*). Le SCF possède un rôle majeur dans la prolifération, la différenciation, l'activation et les fonctions de sécrétion des mastocytes (*Galli et al. 1993*) ainsi que dans certains processus d'adhésion cellulaire (*Kinashi et Springer 1994*).

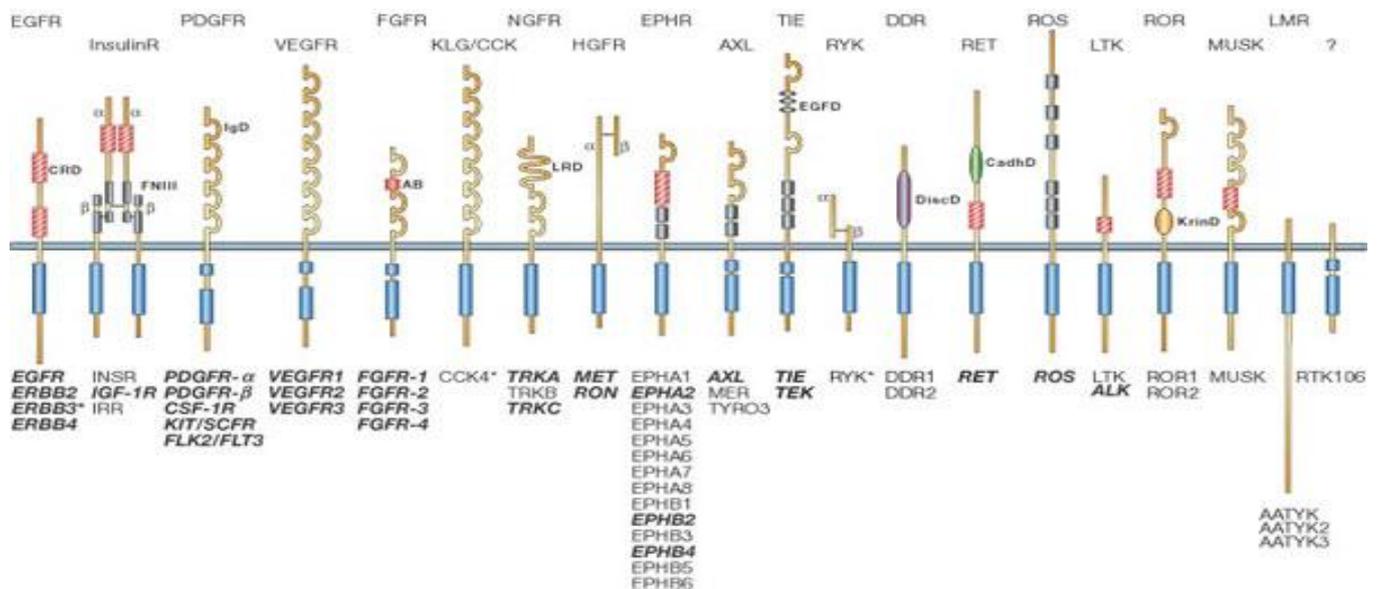


Figure 15 : classification des 20 sous familles de récepteurs tyrosine kinase humains. Extrait de (Blume-Jensen and hunter,2001), EGFR: epidermal growth factor receptor, InsR: insulin receptor, PDGFR: platelet-derived growth factor receptor, VEGFR: vascular endothelial growth factor receptor, FGFR: fibroblast growth factor receptor, KLG/CCK: colon carcinoma kinase, NGFR: nerve growth factor receptor, HGFR: hepatocyte growth factor receptor, EphR: ephrin receptor, Axl, a Tyro3 PTK et TIE : récepteur tyrosine kinase dans les cellules endothéliales, RYK : récepteur relié aux tyrosine kinases, DDR: discoidin domain receptor, Ret : réarrangé pendant la transfection, ROS, RPTK : exprimé dans certaines cellules épithéliales, LTK : leucocyte tyrosine kinase, ROR : receptor orphan, MuSK : muscle specific kinase, LMR : lemur, AB : acidic box, CadhD :cadherin like domain, CRD :cysteine-rich domain, DiscD : discoidin-like domain, EGFD : epidermal growth factor like domain, FNIII : fibronectin type III-like domain, IgD : immunoglobulin-like domain, KrinD : Kringle-like domain, LRD : leucine-rich domain.

Chez l'homme, le gène codant pour le SCF est localisé sur le chromosome 12, au locus 12q22-q24. Il est composé de huit exons et les séquences codantes sont hautement conservées entre le rat et l'homme. Il existe 83% d'homologie entre les séquences protéiques du SCF humain et murin.

I-9.1 Structure du récepteur KIT

Le récepteur KIT est un récepteur à activité tyrosine kinase (RTK) de type III. Le proto-oncogène *KIT* a été identifié à partir d'un rétrovirus transformant (HZ4-FeSV) en 1986 (Besmer, Murphy et al. 1986). Chez l'homme, le gène *KIT* est localisé sur le chromosome 4, au locus 4q11-q12, et est codé par 21 exons.

KIT est un récepteur transmembranaire de 145 KD possédant une activité tyrosine kinase (TK) intrinsèque. Les récepteurs à activité TK se divisent en 20 sous-familles et sont généralement des récepteurs de facteurs de croissance (*Blume-Jensen et Hunter 2001*)

KIT appartient à la famille du PDGF-R (plated derived growth factor receptor) qui est caractérisée par la présence d'une portion extracellulaire glycosylée contenant 5 domaines immunoglobuline-like, une seule hélice transmembranaire et une région cytoplasmique contenant un domaine à activité tyrosine kinase bipartite. En absence de son ligand, KIT se trouve sous forme monomérique.

La région extracellulaire de KIT est codée par les exons 1 à 9. Elle est constituée de 5 domaines semblables aux domaines immunoglobulines (Ig-like) présentant 10 sites potentiels de N-glycosylation.

Deux domaines fonctionnels ont été identifiés : le domaine de fixation du ligand, formé de 3 premiers domaines immunoglobulines D1, D2 et D3 et le domaine de stabilisation du dimère formé de deux derniers domaines immunoglobulines D4 et D5 (*Chabot et al. 1988 ; Qiu et al. 1988*).

La région transmembranaire est codée par l'exon 10 et forme une hélice hydrophobe permettant l'insertion du récepteur dans la membrane plasmique.

La région intracellulaire est formée d'une région juxtamembranaire, d'un domaine kinase bipartite et d'une région KID (kinase insert domain) séparant les deux domaines kinases. La région juxtamembranaire, codée par l'exon 11, joue un rôle important dans la modulation de la fonction du récepteur (*Yarden et al. 1986 ; Blechman et al. 1993*). Elle est connue pour avoir une fonction auto-

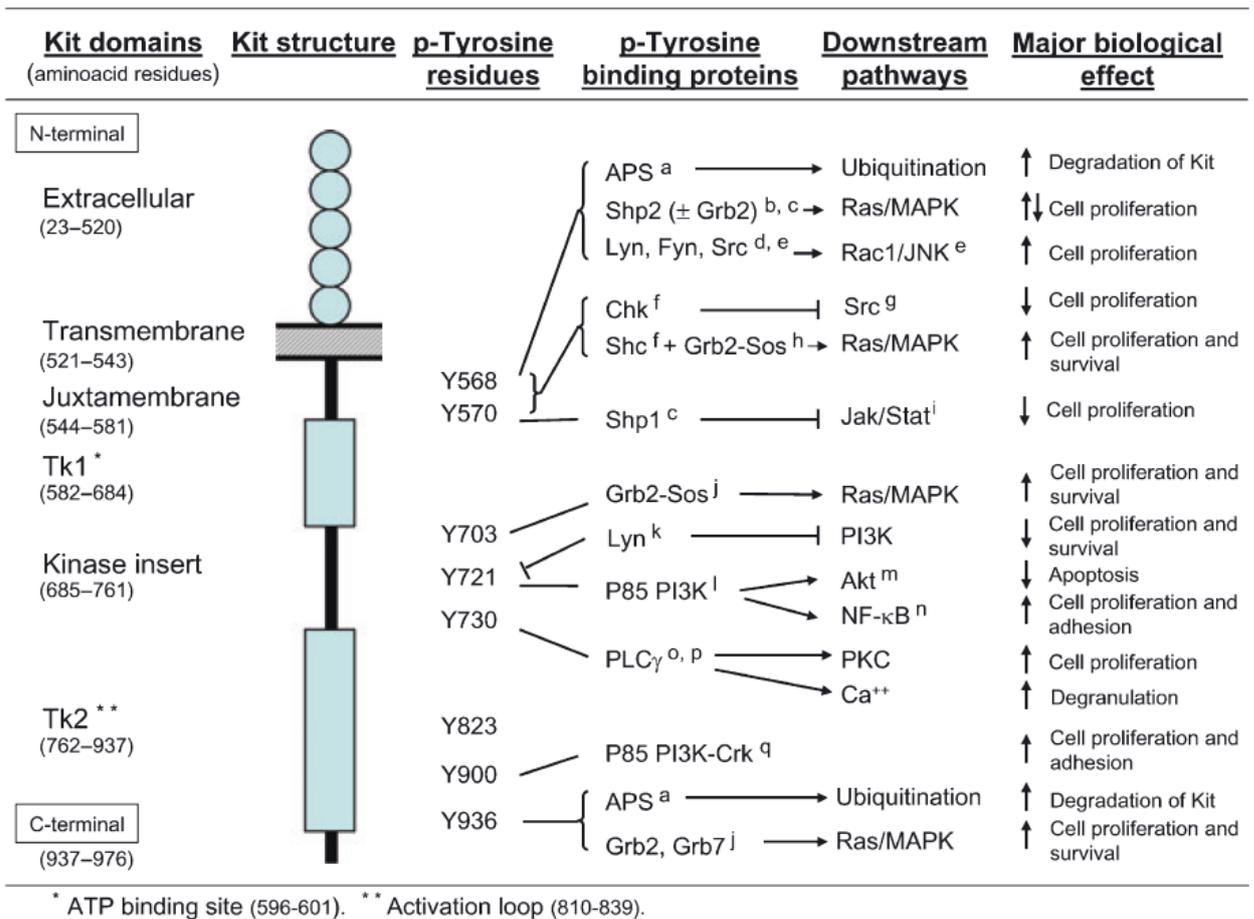


Figure 16 : Représentation schématique de la structure de KIT et sa liaison avec d'autres protéines par le biais de ces tyrosines phosphorylées. Résumé des voies de signalisation activées en aval de récepteur KIT et leurs effets biologiques majeurs. Adapté de Alberto Orfao (*Orfao et al. 2007*)

inhibitrice sur l'activité kinase du récepteur. La région tyrosine kinase est divisé en deux domaines : le domaine de fixation de l'ATP, codé par les exons 12 et 14 et le domaine phosphotransférase, codé par les exons 16 à 20 (*Yarden et al. 1986*). La région KID codée par l'exon 15 possède quatre résidus tyrosines phosphorylables (Y702, Y721, Y730 et Y747) (*Hong et al. 2004*). Sa fonction principale est de favoriser les interactions du récepteur avec les protéines adaptatrices à domaine SH2. Deux tyrosines du domaine juxtamembranaire (Y568 et Y570) et trois en C terminal (Y823, Y900 et Y936) sont aussi phosphorylables.

KIT est présent sous 4 isoformes chez l'homme. Les deux isoformes les plus courantes sont les isoformes avec ou sans les quatre acides aminés (G-N-N-K) directement en amont de la région transmembranaire et le rôle biologique de ces différentes isoformes n'est pas encore élucidé. Elles sembleraient jouer un rôle dans l'initiation de différentes voies de signalisation (*Caruana et al. 1999*).

I-9.2 Activation de KIT

En se fixant sous forme du dimère sur son récepteur, le SCF induit la dimérisation de KIT permettant l'autophosphorylation spécifique de plusieurs résidus tyrosines de la région intracellulaire du récepteur : Y568, Y570, Y703, Y721, Y730, Y747, Y821 et Y936. Ces phosphorylations conduisent à l'activation des domaines à activité tyrosine kinase. Les protéines adaptatrices possédant des domaines SH2 (Grb2, Shc) et PI3K sont alors recrutées et induisent la transduction de plusieurs voies de signalisation dont les acteurs principaux sont les PI3K, la PLC γ , les membres de la famille Src (tyrosine kinase du Sarcome de Rous), la voie Ras-Raf-MAPK (mitogen activated protein kinase) et la voie JAK (Janus Kinase)/STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) (figure 17). Ces voies induisent des effets biologiques multiples tels que la différenciation, la prolifération, la survie, l'adhérence, la migration cellulaire et pour les mastocytes la dégranulation (*Roskoski 2005*).

L'activité tyrosine kinase est finement contrôlée grâce à des protéines de régulation négatives du récepteur KIT activé. Il a été montré chez la souris que les tyrosines phosphatase SHP1 et SHP2 possèdent des domaines SH2 permettant leur fixation respective sur les tyrosines phosphorylées Y569 et Y567 de

KIT. La mutation de ces résidus en phénylalanine (Y569F et Y567F) a montré dans les deux cas une absence de fixation des tyrosines phosphatases et une hyperprolifération cellulaire en réponse au SCF (Kozlowski *et al.* 1998).

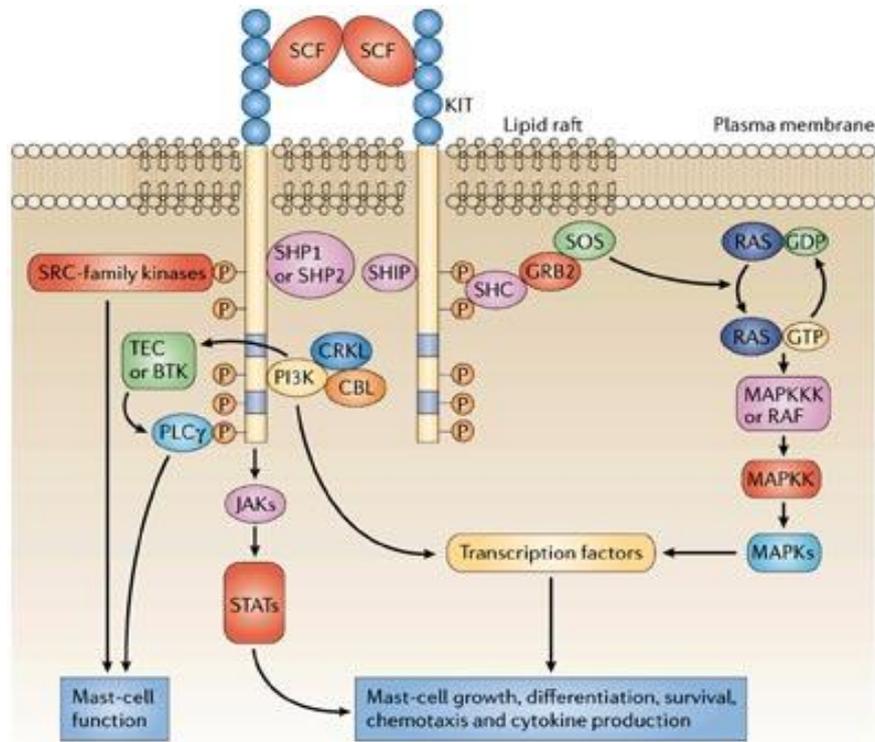


Figure 17 : Schéma des voies de signalisation induites suite à l'activation de KIT par SCF dans les mastocytes. Extrait de Gilfillan and Tkaczyk, 2006 (Gilfillan *et Tkaczyk* 2006).

I-9.3 Expression tissulaire

Dans les conditions physiologiques normales, le gène *KIT* est exprimé dans un grand nombre de types cellulaires comme les mastocytes, les cellules souches hématopoïétiques (Andre *et al.* 1989), les progéniteurs des lymphocytes B et T (Yamaguchi *et al.* 1993), les mélanocytes (Orr-Urtreger, Avivi *et al.* 1990), certains kératinocytes (Peters *et al.*, 2003), les cellules germinales (Manova *et al.* 1990) et les cellules interstitielles de Cajal (Sarlomo-Rikala *et al.* 1998).

Lors de l'embryogénèse, le SCF et KIT sont exprimés le long de la voie de migration des premières cellules germinales et des mélanocytes, dans les sites hématopoïétiques, dans le tractus intestinal et dans

le système nerveux central (*Matsui et al. 1990*). Le SCF devient ensuite constitutivement exprimé par les cellules endothéliales, fibroblastiques et stromales (*Heinrich et al. 1993*).

Une dérégulation de l'activité tyrosine kinase de KIT va entraîner des perturbations dans les différentes voies de signalisation pouvant conduire ou participer à une transformation maligne. Plusieurs études ont montré qu'une activité autocrine du système SCF/KIT mais surtout que l'apparition de mutations de *KIT* étaient impliquées au sein d'une grande variété de pathologies tumorales à potentiel métastatique.

L'activation d'une boucle autocrine SCF/KIT induisant la prolifération cellulaire a été observée dans les cancers du sein (*Hines et al. 1995*), les leucémies aiguës myéloïdes (*Pietsch et al. 1992*), les neuroblastomes (*Cohen et al. 1994*), les tumeurs du colon (*Toyota et al. 1993*), les tumeurs gynécologiques (*Inoue et al. 1994*), le mélanome (*Davar et Kirkwood 2012 ; Bourillon et al. 2013*), les tumeurs gastro-intestinales stromales (GIST) (*Wu et al. 2012; Ashman et Griffith 2013*), les gliomes malins (*Stanulla et al. 1995*) et les carcinomes pulmonaires à petites cellules (*Rygaard et al. 1993*).

Une inactivation du gène codant pour KIT ou pour le SCF induit, chez la souris, une déficience en mastocytes (*Galli et al. 1992*).

En revanche, des mutations activatrices de *KIT* sont associées à une augmentation de la prolifération mastocytaire (*Piao et Bernstein 1996*).

Plus de 30 mutations de type gain de fonction associées à des pathologies humaines ont été identifiées sur le récepteur KIT. Le premier groupe de mutations comprend les mutations de la portion catalytique du récepteur. C'est le cas de la mutation de l'aspartate 816 substitué par une valine (D816V) qui provoque un changement de charge de la boucle d'activation, ce qui fait que le domaine phosphotransférase reste ouvert engendrant une activité constitutive du récepteur (*Arock et Valent 2010*).

De telles mutations activatrices « gain de fonction » ont été identifiées et sont fréquentes dans des lignées leucémiques mastocytaires, mais également dans des échantillons provenant de patients atteints de mastocytoses systémiques (*Feger et al. 2002*).

Le deuxième groupe de mutations comporte les mutations qui touchent le domaine juxtamembranaire du récepteur. Ces mutations telles que celles touchant les acides aminés 570 et 568, modifient la régulation du récepteur en induisant des modifications de conformation du domaine juxtamembranaire empêchant la fixation des protéines inhibitrices telles que SHP1 et SHP2, permettant ainsi l'activation constitutive du récepteur (*Kozlowski et al. 1998*).

Enfin la région extracellulaire de KIT présente aussi une fonction de régulation en plus de son rôle de fixation du ligand. Des mutations affectant cette région peuvent aussi induire une activation spontanée du récepteur en absence du ligand. Les mutations situées dans les domaines Ig D4 et D5 ont été répertoriées chez des patients atteints respectivement de leucémies aiguës myéloïdes (*Ikeda et al. 1991 ; Gari et al. 1999*) et de GIST (*Sakurai et al. 2001*). Certaines formes pédiatriques de mastocytose peuvent aussi impliquer des mutations dans le domaine extracellulaire du récepteur KIT (*Bodemer et al. 2010*).

I-10 Les mastocytoses

I-10.1 Définition

Les mastocytoses, maladies orphelines (incidence de 1 cas pour 2 à 300 000 patients/an), sont des pathologies hétérogènes se définissant comme une accumulation ou une prolifération anormale de mastocytes (MCs) dans un ou plusieurs organes (*Brockow et Metcalfe 2001*).

I-10.2 Classification des mastocytoses

La classification actuelle de l'OMS (Organisation mondiale de la santé) distingue plusieurs formes des mastocytoses selon leurs manifestations cliniques et leur pronostic. Cette classification distingue très schématiquement les mastocytoses cutanées d'une part et les mastocytoses systémiques d'autre part.

I-10.2.a Les mastocytoses cutanées (CM)

Maladies généralement bénignes, et dans lesquelles l'infiltration mastocytaire est limitée à la peau, elles se voient préférentiellement chez l'enfant et peuvent régresser spontanément (*Bodemer et al.2010*) Il existe quatre formes cliniques de mastocytose cutanée :

- **Mastocytose cutanée maculo-papulaire (MPCM)** (anciennement : Urticaria Pigmentosa (UP)) : c'est la plus fréquente (90%). Survenant à tout âge, surtout après 6 mois de vie et même chez le sujet âgé de plus de 60 ans, elle réalise une éruption relativement monomorphe faite de macules ou maculo-papules non squameuses à bord flous présentant selon les malades une grande variabilité dans la taille de chaque élément (1 mm à plus de 1 cm de diamètre), leur nombre (moins de 10 à plusieurs centaines) et leur couleur allant de rouge-violacé à brun-beige. Chez l'enfant, les lésions sont de grande taille, peu nombreuses, ovalaires, allongées selon les plis cutanés, de teinte brun clair, de consistance élastique donnant chez certains enfants un aspect tigré ou « peau de léopard ».
- **Mastocytose cutanée diffuse (DCM)** : une forme très rare présente à la naissance qui se manifeste par une peau épaissie jaunâtre, de consistance pâteuse sur une grande partie de corps. Du fait de papules bien visibles à jour frisant, l'aspect est granité, comme du cuir, avec une accentuation des lésions dans les grands plis de flexion. Le prurit est parfois très intense, les bulles et les érosions post bulleuses sont fréquentes.
- **Telangiectasia macularis eruptiva perstans (TMEP)** : Elle se manifeste sous forme de plaques violettes persistantes sur la peau du corps chez les adultes. Des rougeurs et des démangeaisons accompagnées de fins vaisseaux sanguins peuvent également apparaître.
- **La mastocytose cutanée papulo nodulaire à type de mastocytome** : elle ne s'observe que chez les enfants de moins de 2 ans, parfois dès la naissance. Les lésions appelées mastocytomes correspondent à des plaques ou des nodules de 1 à 4 cm bien limitées de teint brun rouge à jaune orangé, de consistance pâteuse ou élastique.

Tableau VI : Classification des mastocytoses (OMS 2001) et nouvelles formes (adapté de Akin et al) (Akin et Metcalfe 2004)

Catégorie	Critères diagnostiques	Pronostic
Mastocytose cutanée	Absence d'atteinte systémique Age de survenue inférieur à 2 ans	Bon
Mastocytose systémique indolente	Age de survenue supérieur à 2 ans Sous-type le plus fréquent chez l'adulte Pas d'argument en faveur d'une mastocytose systémique grave	Bon
Mastocytose « Smoldering »	Infiltration médullaire, tryptase supérieur à 200 ng/ml Pas de signe d'insuffisance d'organe. Dysmyélopoïèse, organomégalie	Mauvais
Syndrome d'activation mastocytaire monoclonal ou non	Signes cliniques évocateurs de dégranulation Pas d'amas mastocytaire, cellules CD25+/KIT+ Mutations de KIT présente ou non	Mauvais
Mastocytose systémique associée à une hémopathie maligne non mastocytaire	Classiquement associée à une myélodysplasie ou un syndrome myéloprolifératif + rarement associée à une leucémie aigüe ou un lymphome non hodgkinien	Celui de l'hémopathie associée
Mastocytose systémique agressive	Existence de signe témoin d'une défaillance d'organe secondaire à l'infiltration mastocytaire Insuffisance médullaire Insuffisance hépatique avec ascite Splénomégalie avec hypersplénisme Ostéolyses et fractures pathologiques Atteinte du tractus digestif avec malabsorption et amaigrissement	Mauvais
Leucémies à mastocytes	Mastocytes atypiques (multilobulés, multinucléés) et > 10% de mastocytes circulants ou > 20% de mastocytes sur le myélogramme	Mauvais
Leucémies à mastocytes aleucémiques	Idem mais <10% mastocytes circulants	Mauvais
Sarcome mastocytaire	Tumeur maligne détruisant les tissus mous Atypie cellulaire mastocytaire+++	Mauvais
Mastocytome extra cutané	Tumeur bénigne rare Cellules matures normales	Bon

I-10.2.b Les mastocytoses systémiques (SM)

Ce sont des syndromes myéloprolifératifs définis par l'atteinte d'un ou plusieurs organes, dont la moelle osseuse, avec ou sans atteinte cutanée. Elles représentent 10 à 30 % des mastocytoses et surviennent généralement chez l'adulte. Elles sont caractérisées par la prolifération anormale de mastocytes dans différents organes : la moelle osseuse, l'os, les muqueuses des voies digestives et parfois, dans les cas les plus graves, le foie et la rate. La plus ancienne classification est celle de Travis *et al* en 1988 qui a été élaborée à partir de 58 patients atteints de mastocytoses (Travis *et al.* 1988) puis révisée en 1991 par Metcalfe (Metcalfe 1991), qui distingue 4 groupes :

Le groupe I est celui des mastocytoses indolentes. Ce sont les plus fréquentes (60 à 70 % des cas). La survie à long terme n'est pas différente de celle de la population générale. L'évolution vers un autre groupe plus agressif demeure exceptionnelle.

Le groupe II (20 à 35 %) correspond aux mastocytoses associées à une hémopathie autre que la leucémie mastocytaire, qui en conditionne le pronostic. Il s'agit de mastocytoses associées à : une leucémie aiguë myéloblastique, des syndromes myélodysplasiques, des syndromes myéloprolifératifs, la leucémie myéloïde chronique, la leucémie myélo-monocytaire chronique ou le lymphome non hodgkinien.

Le groupe III correspond par exclusion des autres groupes, aux mastocytoses agressives qui comportent fréquemment des adénopathies et une éosinophilie mais dans lesquelles les signes cutanés sont inconstants. La survie moyenne est de 2 à 4 ans, et le décès étant lié à une infiltration polyviscérale s'accompagnant d'une malabsorption sévère ou à l'apparition d'une hémopathie associée.

Le groupe IV est représenté par les leucémies à mastocytes caractérisées par un taux de mastocytes circulants et sur un frottis médullaire supérieur à 20%.

Une classification plus récente de l'OMS a été proposée en 2001 et révisée en 2008. Elle est décrite dans le tableau VI.

I-10.3 Physiopathologie des mastocytoses

Il semble, d'après la plupart des études effectuées, que le récepteur spécifique du SCF, KIT, soit le facteur le plus important impliqué dans la pathogénie des mastocytose du fait de l'émergence d'un clone portant une anomalie acquise du gène codant pour KIT. En effet, l'activation de KIT a été constatée en l'absence du ligand SCF dans des lignées de cellules mastocytaires (*Furitsu et al. 1993*) et dans des cas de mutations activatrices de KIT observées au cours des hémopathies myéloïdes (*Longley et al. 2001*).

Ainsi la présence des mutations activatrices de KIT entraîne une autophosphorylation à l'origine de la différenciation, de la migration et de l'accumulation de mastocytes dans les différents tissus (*Nagata et al. 1995 ; Kitayama et al. 1996 ; Feger et al. 2002 ; Akin et al. 2004*).

Actuellement, les données obtenues grâce à l'étude de populations de patients atteints de mastocytose, ont permis de mettre en évidence une mutation principale au codon 816 (Asp816Val) de l'exon 17 de *KIT* touchant le domaine phosphotransférase (PTD) à activité tyrosine kinase de ce récepteur. Cette mutation a été retrouvée chez 93 % des patients atteints de mastocytose systémique indolente ou agressive (*Garcia-Montero et al. 2006*).

Certaines études considèrent cette mutation comme un facteur de mauvais pronostic; en effet cette mutation touche la zone catalytique de la tyrosine kinase, ce qui la rend résistante à l'imatinib mésylate. Il existe d'autres mutations dans le domaine catalytique, bien que beaucoup plus rares, capables d'activer le récepteur d'une manière constitutive, par exemple au codon 816 (Asp816Tyr, Asp816Phe, Asp816His), au codon 839 (Glu839Val) dans des formes pédiatriques, au codon 820 (Gly820Val) décrit dans un cas de leucémie à mastocytes (*Valent et al. 1999 ; Pullarkat et al. 2000 ; Feger et al. 2002*).

Par ailleurs, d'autres mutations touchant le domaine juxta-membranaire sont capables d'activer le récepteur (*Frost et al. 2002 ; Akin et al. 2004*). L'activation constitutive du récepteur due à ces mutations, à la différence des mutations du site catalytique, est inhibée par l'imatinib mésylate.

Tableau VII : mutations de *KIT* décrite dans les différents types de mastocytoses : La fréquence « élevée » signifie que cette mutation a été retrouvée chez un grand nombre de patients testés et faible correspond à une fréquence retrouvée dans un nombre limité de patients (dans certains cas un seul patient) (*Feger et al. 2002; Bodemer et al. 2010*).

Type de mastocytose	Mutation de KIT	Nature de la mutation	Fréquence
Mastocytose pédiatrique typique	KIT ^{E839K}	Inactivation	Faible
Mastocytose pédiatrique atypique	KIT ^{D816V}	Activation	Faible
	KIT ^{D816Y}	Activation	Faible
	KIT ^{D816F}	Activation	Faible
	KIT ^{Δ417-419insY}	Activation	Faible
	KIT ^{Δ419}	Activation	Faible
	KIT ^{C443Y}	Activation	Faible
	KIT ^{S476I}	Activation	Faible
	KIT ^{ITD501-502}	Activation	Faible
	KIT ^{ITD502-503}	Activation	Faible
	KIT ^{ITD505-508}	Activation	Faible
	KIT ^{K509I}	Activation	Faible
	KIT ^{D572A}	Activation	Faible
	KIT ^{M541L}	Activation	Faible
Mastocytose systémique indolente	KIT ^{D816V}	Activation	Elevée
	KIT ^{V560G}	Régulation	Faible
Mastocytose systémique avec maladie hématologique clonale associée non-mastocytaire (SM-AHNMD)	KIT ^{D816V}	Activation	Elevée
	KIT ^{V560Y}	Activation	Faible
	KIT ^{D816H}	Activation	Faible
Mastocytose systémique Smouldering (SSM)	KIT ^{D816V}	Activation	Elevée
mastocytose systémique agressifs (ASM)	KIT ^{D816V}	Activation	Moyenne
	Kit ^{D820G}	ND	Faible
Leucémie à mastocytes (MCL)	KIT ^{D816V}	Activation	Moyenne

Dans les formes pédiatriques, la plupart des études ne retrouvent la mutation *KIT* D816V que de façon minoritaire. Sa présence serait associée peut-être préférentiellement aux formes qui ne régressent pas à l'adolescence. En fait, une étude récente sur 50 patients pédiatriques a montré que plus de 85% des enfants avec une mastocytose pédiatrique présentent des mutations de *KIT* (Bodemer et al. 2010). De façon intéressante chez les enfants, les mutations de *KIT* sont localisées préférentiellement dans les exons 8 ou 9, codant pour le domaine extracellulaire (ECD). Elles induisent, comme la mutation D816V, une autophosphorylation du récepteur, mais semblent provoquer des cascades de phosphorylations intracellulaires différentes de celles de la mutation D816V. Elles sont sans doute oncogéniques, étant retrouvées dans d'autres tumeurs comme les leucémies aiguës (Yang et al. 2010).

Les voies de signalisation intracellulaires diffèrent entre les mutants ECD versus PTD de *KIT*. Toutes les mutations signalent par la voie STAT/SRC, mais les formes ECD signalent surtout par la voie AKT. De plus, il existe une forte activité transformante des mutants ECD alors que les mutants PTD semblent induire surtout une différenciation mastocytaire (Yang et al. 2010).

I-10.4 Traitement

Les mastocytoses nécessitent une adaptation thérapeutique à chaque profil de patient. Le traitement des mastocytoses doit être fondé sur deux axes différents : d'une part un traitement symptomatique visant à inhiber la libération des médiateurs par les mastocytes et/ou neutraliser les effets délétères de ces médiateurs et d'autre part un traitement curatif qui a pour objectif d'inhiber la prolifération et/ ou la survie des mastocytes anormaux.

Actuellement, il n'existe pas de traitement curatif efficace des mastocytoses mais les récents progrès accomplis dans la compréhension de la physiopathologie ont permis de nouvelles approches thérapeutiques; ainsi des inhibiteurs de tyrosine kinases sont en cours de développement afin d'inhiber l'activité tyrosine kinase de *KIT* et ainsi bloquer l'activation, la migration et la survie des mastocytes pathologiques

Un schéma adapté de Tefferi et Pardanani correspondant aux différents types d'atteintes et au schéma thérapeutique associé est présenté dans la figure ci-dessous (Tefferi et Pardanani 2004 ; Tefferi et al. 2008).

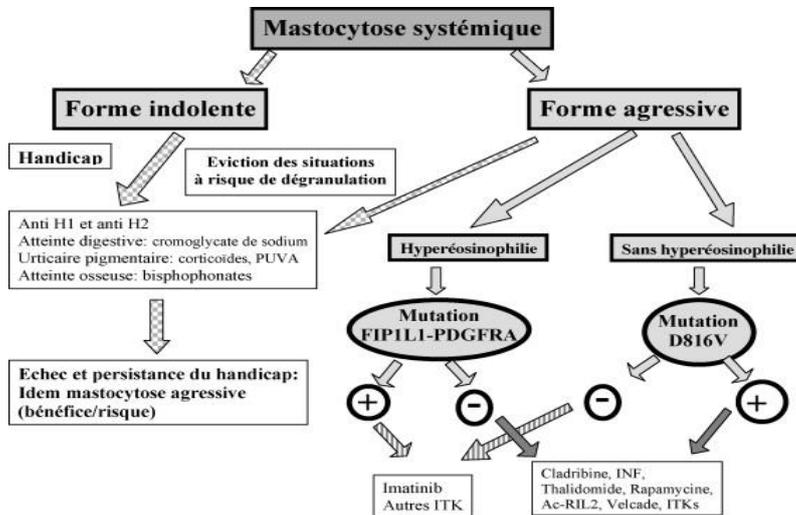


Figure 18 : Traitement proposé selon le type d'atteinte. D'après Tefferi et al. Mastocytose indolente : mastocytose systémique sans arguments en faveur d'une mastocytose systémique grave et âge de survenue supérieur à deux ans. Mastocytose agressive : mastocytose systémique avec signes témoignant d'une défaillance d'organe secondaire à l'infiltration mastocytaire (signes C : insuffisance médullaire ; insuffisance hépatique avec ascite ; splénomégalie avec hypersplénisme ; ostéolyses et fractures pathologiques ; atteinte du tractus digestif avec malabsorption et amaigrissement). ITK : inhibiteur de tyrosine kinase ; INF : interféron ; RIL : récepteur interleukine.

I-11 Les lignées mastocytaires humaines

Des études, effectuées sur les mastocytes humains, ont principalement utilisé les cellules dérivées *in vitro* du sang de cordon ombilical, des progéniteurs hématopoïétiques de la moelle osseuse, du sang périphérique ou du foie fœtal. Néanmoins, le maintien de ces cultures, qui demandent 8 à 10 semaines pour obtenir des mastocytes purs, est techniquement difficile et nécessite de grandes quantités de cytokines recombinantes, habituellement SCF et IL-6. C'est pourquoi plusieurs équipes ont établi des lignées mastocytaires *in vitro*.

Trois lignées mastocytaires humaines ont été décrites à ce jour : la lignée HMC-1, la lignée LAD et la lignée LUVA.

I-11.1 La lignée HMC1 et ses deux sous-clones HMC1.1 et HMC1.2

Il s'agit d'une lignée de cellules présentant de nombreuses caractéristiques de mastocytes immatures et établie à partir du sang périphérique d'un patient atteint de leucémie à mastocytes (*Butterfield et al. 1988*). Dans cette lignée cellulaire humaine, le récepteur KIT a été trouvé phosphorylé sur tyrosine de façon constitutive sans addition de SCF, suggérant que l'activation constitutive de ce récepteur était ligand indépendant. Deux clones ont été isolés à partir de la lignée d'origine : HMC1.1 et HMC1.2 (*Sundstrom et al. 2003*). Le séquençage de la région codante entière de *KIT* a révélé que le gène *KIT* des cellules HMC1.1 était composé d'un allèle sauvage et d'un allèle muté avec une mutation résultant de substitution d'acide aminé intracellulaire de Gly-560 par Val, tandis que pour HMC1.2 deux mutations de *KIT* ont été identifiées : une au niveau du codon 816 (Asp>Val) (ce codon correspond par son emplacement au codon 814 de la souris) et une autre au niveau du codon 560 (Val>Gly) (*Furitsu et al. 1993 ; Kanakura et al. 1994*).

Les cellules HMC1 cultivées contiennent de faibles niveaux d'histamine, sont colorées par le bleu de toluidine et ne possèdent pas les récepteurs IgE (*Butterfield et al. 1988*), ce qui constitue un inconvénient majeur pour l'utilisation de cette lignée comme modèle de dégranulation mastocytaire.

Des analyses moléculaires, initialement décrites chez la souris, ont été appliquées à la lignée HMC1. En effet, *Furitsu et al* ont montré, par mutagenèse dirigée suivie de transfection dans des cellules embryonnaires humaines, que la mutation observée dans la lignée HMC1 en position 816 était responsable de l'activation constitutive de KIT (*Furitsu et al. 1993*). En revanche, l'effet activateur du mutant construit en position 560 (Val>Gly) s'est montré nettement plus faible.

Des études plus récentes effectuées sur les lignées HMC1 ont montré que la stimulation de la PKC a des effets différents dans HMC1.1 (560) et HMC1.2 (560 et 816), ce qui serait lié à la différence de mutations activatrices dans les deux lignées de mastocytes. (*Tobio et al. 2011*).

En outre, *Chaix et al* ont montré que la mutation D816V dans la lignée HMC1.2 induit une phosphorylation constitutive de STAT1, 3 et 5 sur des résidus sérines (*Chaix et al. 2011*).

Plus récemment, l'équipe de Peter Valent à Vienne a montré qu'il existe une phosphorylation constitutive de LYN et BTK dans les 2 clones HMC1, ainsi que dans les mastocytes malins des patients atteints de SM avec mutations KIT D816V (*Gleixner et al. 2011*).

Outre le fait qu'il s'agit d'une lignée leucémique présentant de nombreuses autres anomalies moléculaires pouvant être impliquées dans la prolifération anormale de ces cellules (non retrouvées chez les patients atteints de mastocytose systémique), la lignée HMC1 présente des limitations majeures :

- elle n'exprime absolument pas le récepteur FcεRI et n'est donc pas activable par ce biais (*Guhl et al. 2010*),
- elle ne comprend pas de clone ne portant que la mutation KIT D816V (mutation responsable de l'activité tyrosine kinase spontanée du récepteur KIT, rencontrées chez plus de 85% des patients atteints de mastocytose systémique), et
- elle ne comprend pas de clone n'exprimant que le récepteur KIT sauvage (KIT WT)

Ce modèle ne peut être utilisé ni pour le criblage de molécules à activité anti-allergique potentielle, ni pour étudier les interactions entre la signalisation induite par l'activation de KIT par mutation en 816 et la signalisation induite par l'activation de FcεRI au cours des mastocytoses, ni pour mesurer une éventuelle toxicité non spécifique de toute molécule ciblant potentiellement la mutation D816V.

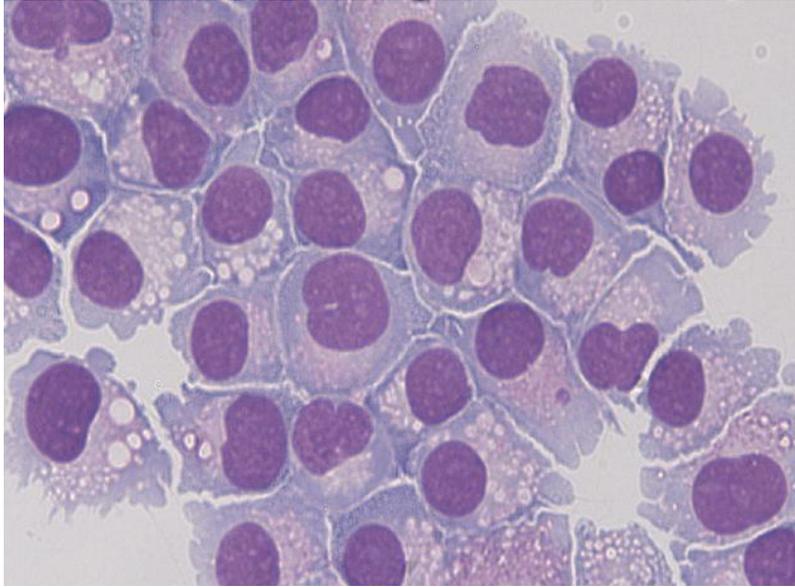


Figure 19 : Aspect cytomorphe des cellules HMC1 après coloration au May-Grünwald-Giemsa.

I-11.2 La lignée LAD

Deux autres lignées ont été établies à partir d'aspirations de moelle osseuse provenant d'un patient atteint de sarcome à mastocytes. Ces lignées, dénommées LAD1 et LAD2, présentent les caractéristiques ultrastructurales des mastocytes humains et expriment le récepteur de haute affinité pour les IgE le FcεRI, le CD4, le CD9, l'histamine, la tryptase et la chymase (*Kirshenbaum et al. 2003*)

LAD1 et LAD2 ne présentent pas de mutations activatrices au niveau du codon 816 de *KIT*. Cette lignée qui reste dépendante du SCF pour sa survie et sa prolifération est potentiellement intéressante mais, outre le fait qu'elle a été obtenue à partir d'un prélèvement tumoral, son temps de doublement très long de l'ordre de 15 jours la rend impropre à l'utilisation dans des tests de criblage à haut débit qui nécessitent l'obtention simultanée d'un grand nombre de cellules.

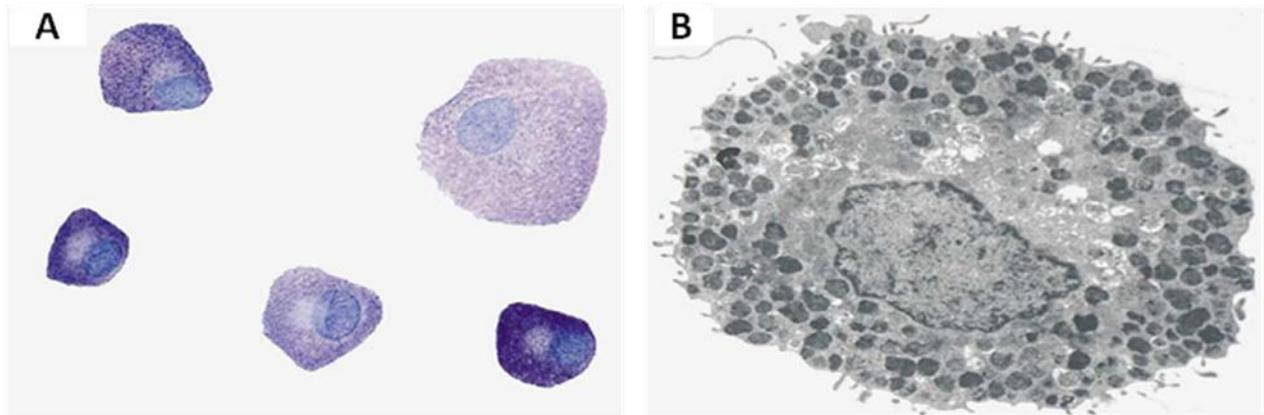


Figure 20 : A) Coloration au bleu de toluidine des cellules de la lignée LAD (630X). B) Aspect en microscopie électronique à transmission des cellules de la lignée LAD.

I-11.3 La lignée LUVA

Une autre équipe a réussi à établir plus récemment une troisième lignée mastocytaire à partir des cellules CD34+ provenant d'un patient présentant une maladie respiratoire allergique. Ces cellules (appelées cellules LUVA) ont proliféré sans ajout supplémentaire de facteurs de croissance et ont été maintenues en culture pendant environ 2 ans (*Laidlaw et al. 2011*).

Les cellules LUVA possédaient au moment de leur description des granules cytoplasmiques métachromatiques contenant la tryptase, la cathepsine G, et la carboxypeptidase A3, la chymase et l'histidine décarboxylase. Elles exprimaient également le récepteur de haute affinité pour les IgE le FcεRI et le FcγRII (*Laidlaw et al. 2011*).

L'agrégation du FcεRI induisait la libération de β-hexosaminidase, la prostaglandine D2 et le thromboxane A2. L'immortalisation n'avait pas été associée soit à une mutation connue génomique de *KIT* chez le donneur ou une mutation somatique de *KIT* dans les cellules, et elle n'a pas été associée à une phosphorylation constitutive de *KIT* (*Laidlaw et al. 2011*). Depuis, aucune équipe dans le monde n'a plus été capable de mettre en évidence le FcεRI sur les cellules cultivées pendant plusieurs mois. De plus, il s'avère que la lignée LUVA a dérivé et ne présente plus de granulations. En outre, c'est là-aussi une lignée obtenue à partir d'un prélèvement effectué chez un patient non sain. Enfin, cette lignée ne

permet pas d'étudier la signalisation par le récepteur KIT D816V et ne permet pas le criblage à haut débit de molécules inhibant spécifiquement ce récepteur.

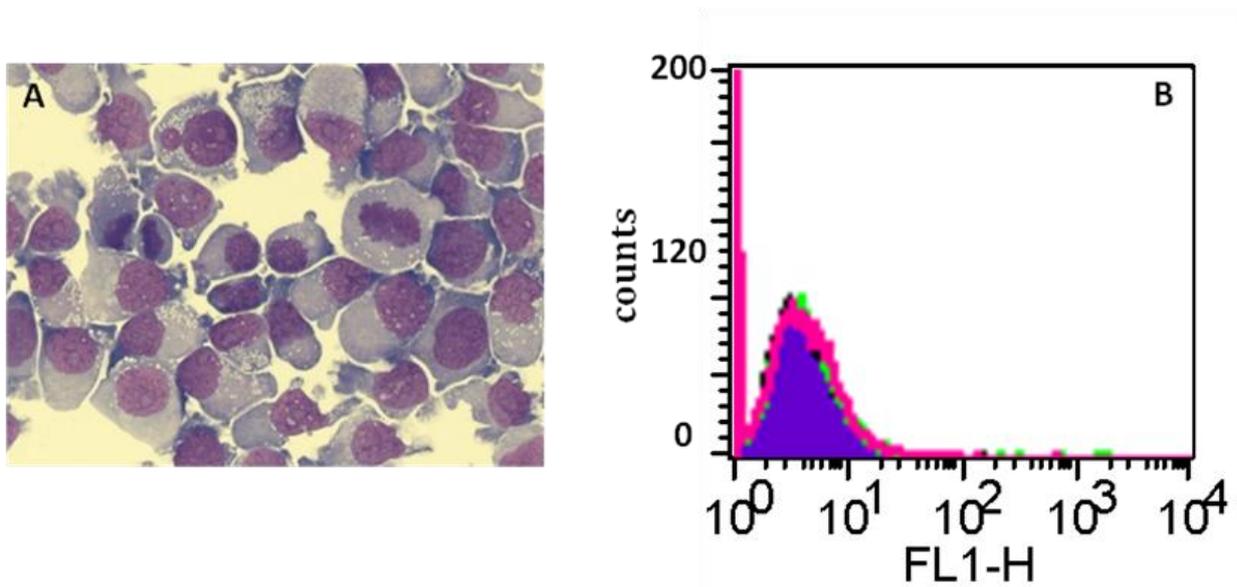


Figure 21 : A) Coloration au May-Grünwald Giemsa des cellules LUVA montrant un aspect blastique agranulaire. B) Absence d'expression du récepteur de haute affinité pour les IgE (FcεRI) par les cellules LUVA (analyse par cytométrie en flux).

Ainsi, à l'heure actuelle, les modèles cellulaires utilisables dans le contexte des allergies ou des pathologies malignes mentionnées ci-dessus présentent de nombreuses limitations, soit parce qu'ils sont peu reproductibles et coûteux à produire (modèles de cultures primaires), soit parce qu'ils s'éloignent du mastocyte en terme de propriétés biologiques (lignées cellulaires).

II- OBJECTIFS DU TRAVAIL

Compte-tenu des limitations précitées concernant soit les mastocytes humains obtenus par culture primaire, soit les lignées de mastocytes humains existantes à l'heure actuelle, notre travail a eu pour but d'établir, à partir de cellules souches hématopoïétiques de sang de cordon, des lignées cellulaires mastocytaires humaines stables portant ou non une mutation de *KIT* et exprimant le récepteur de haute affinité aux IgE. Cette approche innovante a été envisagée pour nous permettre de mieux comprendre la physiologie des mastocytes ainsi que leur implication dans différents processus pathologiques tel que l'allergie, l'inflammation, les cancers. En outre, nous avons voulu établir, par ce biais un modèle *in vitro* de mastocytose portant une ou l'autre des mutations activatrices de *KIT*.

Dans un premier temps, nous avons réussi à isoler une lignée cellulaire dénommée ROSA *KIT*^{WT} qui a un aspect morphologique et ultrastructural comparable à celui des mastocytes humains dérivés classiquement des cellules CD34+ de sang de cordon. Cette lignée, dépendante de la présence de SCF humain pour sa croissance, présente un récepteur *KIT* de structure normale et le FcεRI. Son temps de doublement de 48 heures est compatible avec l'obtention d'un grand nombre de cellules. De ce fait, cette nouvelle lignée de mastocytes humains peut notamment être utilisée comme modèle pour étudier l'activation mastocytaire par le couple IgE-anticorps anti-IgE ou par un couple IgE spécifique-allergène correspondant conduisant à une dégranulation de ces mastocytes.

Dans un second temps, nous avons décidé de créer, par transfection lentivirale, deux nouveaux modèles *in vitro* de mastocytes humains présentant la mutation *KIT*^{D816V} ou *KIT*^{Delta 417-419 InsY}, dénommées respectivement ROSA *KIT*^{D816V} et ROSA *KIT*^{Delta 417-419 InsY}, deux mutations présentes chez les patients atteints de mastocytose.

Ces deux lignées mastocytaires humaines SCF-indépendantes, présentant une anomalie structurale de *KIT*, ont été utilisées pour analyser les voies de signalisation induites par *KIT* muté ou par l'agrégation du FcεRI de ces cellules, en les comparant avec celles induites dans les cellules ROSA *KIT*^{WT}.

L'utilisation de ces lignées avec un KIT muté permettra aussi de découvrir de nouvelles cibles moléculaires pour le traitement des patients atteints de mastocytoses.

III- MATERIELS ET METHODES

III-1 Obtention de mastocytes humains dérivés de progéniteurs de sang de cordon ombilical (CBMC)

Cette technique consiste à recueillir sur héparinate de lithium les sangs de cordon normaux obtenus après consentement éclairé des patientes. Après homogénéisation et dilution au demi dans du tampon phosphate dépourvu de calcium et de magnésium (PBS), les cellules mononucléées sont séparées par centrifugation à 700 g pendant 25 minutes, sur un gradient de densité d'une solution de Ficoll (Eurobio, Courtaboeuf, France).

Les cellules mononucléées, qui forment un anneau à l'interface entre le Ficoll et le sérum dilué, sont récupérées et lavées avec du tampon PBS. La numération et la viabilité cellulaire sont effectuées en utilisant le bleu trypan (Invitrogen, Saint Aubin, France).

Les progéniteurs hématopoïétiques de sang de cordon exprimant l'antigène de surface CD34 sont ensuite sélectionnés positivement par tri immuno-magnétique en utilisant le système MACS (Miltenyi, Paris, France). Les cellules sont incubées en présence de billes magnétiques recouvertes d'anticorps anti CD34 pendant 30 minutes à 4°C, puis passées dans une colonne fixée à un aimant, permettant la rétention des cellules CD34+ attachées aux billes. Les cellules non retenues sont éliminées. La colonne est ensuite retirée de l'aimant, et les cellules retenues sont récupérées par trois lavages successifs dans du PBS contenant 0,05% d'EDTA. Les cellules purifiées sont ensuite lavées au PBS, dénombrées, puis les cellules sontensemencées à $5 \cdot 10^4$ par mL en milieu Iscove Modified Dulbecco Medium (IMDM)-Glutamax® (Invitrogen), supplémenté avec de la Pénicilline/Streptomycine 100 U/ml (P/S) (PAA), 1% de pyruvate de sodium (Invitrogen), 1% de vitamines (Invitrogen), 1% de Glutamine (Invitrogen), 2% d'acides aminés non essentiels (Invitrogen), 1% d'une solution commerciale d'insuline-transferrine-sélénite de sodium (Invitrogen) et 0,3% d'albumine bovine (BSA) (PAA, Vélizy-Villacoublay, France). Ces cellules sontensemencées dans des flacons de culture (TPP, Deutsher, Brumath, France).

Différentes cytokines sont ajoutées à la suspension cellulaire afin d'orienter la différenciation vers le mastocyte : rh-SCF à 80 ng/mL (R&D, Lille, France), IL-6 à 50 ng /mL et IL-3 à 1 ng/mL (Novartis, Rueil Malmaison, France). L'IL3 et l'IL6 n'étant ajoutée que pendant la première semaine de culture.

Le milieu est renouvelé une fois par semaine et les cellules sont entretenues à 7.10^5 par mL. Au bout de 8 à 10 semaines de culture, les cellules arrêtent de proliférer et plus de 95 % des cellules sont identifiées comme étant des mastocytes par coloration May-Grünwald-Giemsa et bleu de toluidine.

III-2 Coloration de May-Grünwald Giemsa (MGG) et bleu de toluidine

Le May-Grünwald Giemsa (MGG) est la méthode de coloration de référence utilisée en hématologie pour différencier les cellules du sang lors des préparations cellulaires.

La coloration de MGG repose sur l'action combinée de deux colorants neutres : Le May-Grünwald, contenant un colorant acide, l'éosine, et un colorant basique, le bleu de méthylène, et le Giemsa, contenant lui aussi de l'éosine, et un colorant basique, l'azur de méthylène.

Les cellules sont préalablement étalées par cyto centrifugation sur une lame (400 tours/min, 10 min), le frottis cellulaire est séché puis recouvert pendant 3 min par la solution de May-Grünwald (Ral Diagnostics, Martillac, France), qui contient une solution alcoolique capable de fixer les cellules. Puis le colorant est enlevé et remplacé par une solution de May-Grünwald dilué au demi dans de l'eau neutre pendant 3 min. Ensuite la lame est lavée à l'eau et recouverte pendant 10 min par une solution de Giemsa (Ral Diagnostics), diluée au dixième dans de l'eau neutre. La lame est ensuite lavée, séchée et observée sous microscope optique à immersion.

Les granulations des mastocytes prennent l'azur en le faisant virer au rouge violacé par leur propriété de métachromasie. L'intensité de la coloration varie en fonction du degré de maturation des mastocytes.

La deuxième coloration est celle du bleu de toluidine qui est une méthode histo chimique utilisant le principe de la métachromasie, propriété de certaines molécules.

Le colorant chargé positivement se fixe et polymérise sur des substances tissulaires chargées négativement comme les noyaux, des mucopolysaccharides et les granulations des mastocytes qui apparaissent de couleur pourpre à violacée. Les cellules sont préalablement étalées par cyto centrifugation sur des lames qui sont ensuite recouvertes pendant 10 minutes par la solution de bleu de toluidine (0,1% bleu de toluidine (Sigma, St-Louis, Mo, USA) dans de l'éthanol 50% à pH=3,5). Les lames sont ensuite lavées à l'eau et observées sous microscope optique à immersion.

III-3 Immunomarquage

La technique d'immunomarquage est utilisée afin de visualiser deux protéases, la tryptase et la chymase, ainsi que la carboxypeptidase et l'histidine décarboxylase (HDC).

Les cellules sont préalablement étalées par cyto centrifugation sur des lames, puis séchées et fixées par immersion dans une solution d'acétone pendant 10 min. Elles sont ensuite rincées à 2 reprises avec du TBS contenant 0,25% tween pour perméabiliser les cellules. Les lames sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire (soit l'anticorps anti tryptase (Dako) dilué au 1/250ème dans du TBS-1%BSA, soit l'anticorps anti chymase (Santa Cruz) dilué au 1/250 dans du TBS-1%BSA, ou anti HDC (Santa Cruz) dilué au 1/250 dans du TBS-1%BSA) 1heure à température ambiante en chambre humide. Après un rinçage avec du TBS (2 x 5 min), les lames sont incubées avec l'anticorps secondaire (anti lapin IgG biotinylé produit chez la chèvre (Dako)) 30min à température ambiante en chambre humide. Après rinçage, on additionne un complexe de streptavidine et de phosphatase alcaline (Dako) pendant 10 min. ces deux dernières étapes utilisant les propriétés des complexes biotine-streptavidine permettent d'amplifier le signal. Une coloration avec l'hématoxyline de Meyer est réalisée et, après un rinçage à l'eau distillée pendant 10 min, les lames sont montées avec de la glycérine gélatinée et observées par microscopie optique.

III-4 Analyse et tri cellulaire par cytométrie en flux

III-4.1 Principe

Cette technique permet de caractériser, en termes de taille, de complexité relative et de fluorescence, une cellule isolée à l'intérieur d'un flux liquidien. Les cellules isolées passent dans une chambre d'analyse, traversée par une source excitatrice (laser), permettant d'obtenir, pour chaque cellule, des caractéristiques de taille relative (Forward Scatter, FSC), de granulosité relative (Side Scatter, SSC), ainsi que l'intensité de la fluorescence émise après l'excitation des fluorochromes couplés aux anticorps d'intérêts fixés à la cellule.

III-4.2 Les anticorps et fluorochromes utilisés

Nous avons utilisé différents fluorochromes : le FITC, la R-phycoérythrine (PE), qui sont excités à 488 nm et émettent respectivement à une longueur d'onde de 540 nm et 585 nm et l'allophycocyanine (APC) qui, excitée à 633 nm, émet à une longueur d'onde d'environ 660 nm.

Différents anticorps ont été utilisés, dirigés contre les antigènes suivants : FcεRIα, KIT (CD117), CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD9, CD10, CD11b, CD25, CD34, CD54, CD203c (tous de BioLegend, San Diego, CA), CD13, CD14, CD16, CD17, CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD31, CD32, CD33, CD38, CD44, CD45, CD48, CD50, CD52, CD56, CD58, CD59, CD63, CD64, CD66a, CD69, CD71, CD87, CD90, CD95, CD96, CD105, CD114, CD115, CD116, CD123, CD127, CD133, CD134, CD138, CD144, CD146, CD150, CD164, CD166, CD213a, CD218a, CD273, CD274, CD300a, CD309 et CD326 (tous fournis par BD Biosciences).

III-4.3 Préparation des cellules

L'expression des antigènes de surface cellulaire au niveau des cellules est analysée par immunofluorescence directe utilisant le FACSCalibur et le FACS Aria (BD Biosciences). Brièvement, 2.10^5 cellules non traitées ont été incubées avec les anticorps monoclonaux spécifiques pendant 1 heure à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées et reprises dans du PBS -1% SVF et analysées. Les contrôles isotypiques ont été utilisés pour chaque expérience, et au moins 10.000 événements ont été enregistrés pour chaque analyse sur un BD FACSCalibur et BD FACS Aria.

III-5 Production d'IgE humaines

La reconnaissance IgE/anti-IgE nécessite à la surface des récepteurs FcεRI des IgE humaines. Pour produire ces protéines, nous utilisons une lignée de plasmocytes humains provenant d'un patient atteint d'un myélome à IgE (U266). Cette lignée est cultivée normalement dans un milieu RPMI-1640 (Invitrogen) additionnée de 10% de SVF (PAA). Les cellules sontensemencées à 2.10^5 /mL et le milieu est renouvelé toutes les semaines. Lors de la production d'IgE, les cellules sontensemencées dans un volume important (plus de 2L) et sont laissées en culture jusqu'à la mort d'une partie des cellules (la teneur finale en IgE dépend de la durée de la culture). Lorsque la décision de stopper de la culture est prise, le surnageant est recueilli par centrifugation puis une concentration en protéines est réalisée par dialyse. Pour ce faire, le surnageant est déposé dans un tube de dialyse dont la taille des pores laisse passer les molécules de PM inférieur à 12000 - 16000 Daltons (VWR, Fontenay-sous-bois, France). Ces tubes sont recouverts de polyvinyl-pyrrolidone (VWR) pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, les tubes sont nettoyés et subissent une contre dialyse contre du sérum physiologique pendant 24 heures à 4°C. Les tubes sont ensuite ouverts et leur contenu est récupéré, filtré stérilement, aliquoté puis congelé. Un échantillon de cette solution est ensuite analysé par technique immunonéphélométrique pour déterminer sa concentration en IgE totales (automate BNII® de Dade Behring®).

III-6 Stimulation des mastocytes

III-6.1 Sensibilisation des mastocytes

Il s'agit d'une stimulation par le complexe IgE/anti-IgE. Or les mastocytes dérivés de sang de cordon n'expriment que faiblement le FcεRI à leur surface. Il s'avère néanmoins que, d'une part, l'IL-4 est en mesure d'augmenter l'expression de ce récepteur (Toru et al 1996), et que, d'autre part, l'addition d'IgE favorise aussi cette expression et qu'elle agit en synergie avec l'IL-4 (Yamaguchi et al 1999). Ainsi, avant de réaliser une stimulation par le complexe IgE/anti-IgE, nous avons augmenté le nombre de FcεRI à la surface des mastocytes. Pour ce faire, nous avons incubé préalablement les mastocytes dans leur milieu

de culture classique additionné d'IL-4 (20 ng/mL) (Miltenyi), et d'IgE (2 µg/mL) (Calbiochem, La Jolla, CA), pendant 4-5 jours avant leur stimulation.

III-6.2 Stimulation par les anti-IgE

Après incubation avec l'IL-4 et les IgE, les cellules (en général 10^6 cellules/mL) sont lavées puis stimulées avec des anti-IgE à la concentration de 5 à 10 µg/mL (Biovalley, La Vallée, France). La durée de la stimulation est fonction des médiateurs que l'on veut recueillir dans les surnageants. Dans le cas où l'on va doser l'histamine ou la β -hexosaminidase, la durée de la stimulation est de 1 heure à 37°C, temps au bout duquel les surnageants acellulaires sont recueillis par centrifugation. Lorsque l'on souhaite étudier les cytokines libérées par les mastocytes, la durée de la stimulation est en général de 6 heures.

III-7 Dosage de la β -hexosaminidase

La β -hexosaminidase est une exo-glycosylase acide lysosomale contenue dans les granules sécrétoires des mastocytes. Cette enzyme clive les aminoacétyl hexosamines terminales des oligosaccharides, des glycolipides, des glycoprotéines et glycosaminoglycane. Elle est libérée après stimulation immunologique des mastocytes en même temps que l'histamine.

Pour doser la β -hexosaminidase, nous avons utilisé son pouvoir catalytique pour transformer le p-nitrophénol-N-acétyl- β -D-glucosaminide en p-nitrophénol- β -D-acétamino-2-déoxyglucopyranoside. La formation du produit de la réaction enzymatique est arrêtée par addition de la glycine qui permet le développement d'une coloration jaune dont l'intensité dépend de la quantité de p-nitrophénol- β -D-acétamino-2-déoxyglucopyranoside formé et qui peut être évaluée par spectrophotométrie (*Schwartz et al. 1979*).

Après 1 heure de stimulation, les surnageants et les culots de mastocytes (10^6 cellules/mL), stimulés ou non, ont été récupérés afin de pouvoir calculer les pourcentages de libération de la β -hexosaminidase. Les culots sont lysés dans 100 µL de PBS 0,1% triton X-100.

Trente µL de surnageant ou du culot sont ensuite transférés dans des plaques 96 puits et 10 µL de la solution de substrat sont ajoutés. La solution de substrat est réalisée de façon suivante : 14,33 g de

Na₂HPO₄, 12 H₂O sont dissous dans 200 mL d'eau distillée. On obtient une solution de Na₂HPO₄ à 0,2M. Soixante-dix mL de cette solution sont ajustés à pH 4,5 avec une solution d'acide citrique 0,4N (16,81 g d'acide citrique sont dissous dans 200 mL d'eau distillée). Soixante mL de la solution à pH 4,5 et ensuite additionnée de 90 mL d'eau distillée et de 200 mg de p-nitrophénol-N-acétyl-β-D-glucosaminide (Sigma). Après dissolution complète, cette solution est conservée à -20°C.

Pour la mesure de la β-hexosaminidase, la plaque 96 puits contenant les échantillons et la solution de substrat est placée à 37°C, sous agitation pendant 1 heure. La réaction est arrêtée par l'addition de 100 µL d'une solution glycine 0,1M à pH 10,5 dans chaque puits et l'absorbance est lue à 405 nm au moyen d'un lecteur de plaque.

Pour chaque condition de stimulation, le pourcentage de libération de la β-hexosaminidase est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\% \text{ de } \beta \text{ - hexosaminidase libérée} = \frac{DO_s}{(DO_s + DO_c)} \times 100$$

DO_s= densité optique du surnageant à tester.

DO_c= densité optique du culot cellulaire à tester.

III-8 Dosage de l'histamine

Le dosage de l'histamine a été réalisé dans les surnageants et les culots cellulaires selon la technique décrite par Lebel *et al* en 1983. Brièvement, 100 µL de culots cellulaires et du surnageants sont récupérés dans 1 mL d'acide perchlorique (PCA) 0,4N afin de précipiter les protéines. Après une centrifugation de 10 min à 1500 g et à 4°C, l'histamine est extraite tout d'abord par du n-butanol, puis par NaCl en présence de n-heptane. La phase aqueuse ainsi obtenue est alors récupérée et mise en présence d'orthophtaldialdéhyde (OPT) et de NaOH 1M pour permettre la formation du complexe fluorescent OPT-histamine. Ce fluorophore est finalement stabilisé à PH=3, par acidification avec de l'acide orthophosphorique 0,5 M. la lecture s'effectue à 450 nm. La sensibilité du dosage est de l'ordre de ng/mL.

Pour chaque condition de stimulation, le pourcentage net d'histamine libérée est calculé pour chaque point, par soustraction de la libération d'histamine spontanée selon la formule:

$$\% \text{ net d'histamine libérée} = \frac{C_s - C_{st}}{C_s + C_c} \times 100$$

C_s : concentration d'histamine dans les surnageants

C_c : concentration d'histamine dans les culots cellulaires

C_{st} : concentration d'histamine dans les surnageants des témoins non stimulés

III-9 Techniques de dosage d'autres médiateurs libérés par les mastocytes

Les médiateurs libérés par les mastocytes sont dosés par la technique ELISA.

La technique ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) est un test immuno-enzymatique qui permet de doser une protéine d'intérêt dans des liquides biologiques. Cette technique permet de visualiser une réaction anticorps/antigène à l'aide d'une réaction colorimétrique produite par l'action d'une enzyme fixée à un anticorps secondaire (de révélation), sur un substrat chromogène.

III-9.1 Dosage du TNF- α

Le dosage est effectué en utilisant un KIT ELISA spécifique du TNF- α humain (R&D). Brièvement, les échantillons à doser et la gamme étalon sont incubés dans les puits d'une plaque de microtitration recouverte d'un premier anticorps de capture dirigé contre le TNF- α . Après l'incubation, la plaque est lavée et un deuxième anticorps conjugué à la phosphatase alcaline est ajouté. Cet anticorps reconnaît le complexe anticorps-TNF- α . Après incubation, le contenu des puits est vidé et rincé et l'activité enzymatique est révélée par l'addition d'un substrat de para-nitrophénylphosphate et la réaction est arrêtée par ajout du NaOH 1N. L'intensité de coloration développée est proportionnelle à la concentration de TNF- α présent dans les échantillons. La lecture des densités optiques est effectuée à 450 nm et les concentrations sont déduites à partir de la gamme d'étalon.

III-9.2 Dosage de la PGD2

Le dosage de PGD2 est effectué en utilisant un KIT d'ELISA par compétition (Cayman Chemical). Le principe du dosage est basé sur une compétition entre la PGD2 des échantillons et la PGD2 acétylcholinestérase (AChE) conjuguée à un traceur (PGD2 traceur) et ce, pour un nombre fixe d'anticorps monoclonaux de capture. Ainsi, la quantité de PGD2 traceur capable de se lier à l'anticorps monoclonal de capture est inversement proportionnelle à la concentration de PGD2 présent dans les échantillons

Les échantillons à doser et la gamme étalon sont incubés dans les puits d'une plaque de microtitration recouvert de l'anticorps de capture. Après incubation, le contenu des puits est vidé et les puits sont rincés. L'activité enzymatique est révélée par l'addition d'un substrat de l'AChE.

L'intensité de coloration développée est inversement proportionnelle à la concentration en PGD2 présent dans les échantillons. La lecture des densités optiques est effectuée à 410 nm après 90 min et les concentrations sont déduites à partir de la gamme d'étalon.

III-10 Analyse de la clonogénicité des lignées cellulaires

Nous avons étudié l'efficacité de clonage des 3 lignées mastocytaires (ROSA KIT^{WT}, ROSA KIT^{D816V}, ROSA KIT^{Delta 417-419 ins Y}) dans un milieu semi solide (méthylcellulose). Pour ce faire, 5000 cellules de chaque lignée sontensemencées dans des boîtes de Pétri de 35 mm contenant 1 mL de milieu de culture supplémenté de méthylcellulose à 1% (Methocult, Stem Cell technologies), 20% de sérum de veau fœtal (SVF, PAA), 0,3 % de BSA (PAA). Quarante-vingt ng/mL de rh-SCF sont ajoutés également pour les cellules ROSA KIT^{WT}. Ces boîtes sont incubées, pendant 15 jours pour ROSA KIT^{WT} et 28 jours pour ROSA KIT^{D816V} et ROSA KIT^{Delta 417-419 ins Y}, dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂ à 37°C. Au bout de cette période les colonies de plus de 50 cellules sont comptées par microscopie optique.

III-11 Analyse par western blot de l'expression de différentes protéines et de leur phosphorylation

Les cellules traitées ou non sont récupérées dans du tampon PBS froid, centrifugées et les culots cellulaires sont repris dans 100 µL de tampon de lyse (NaCl 150 mM ; Tris HCl PH=6,7 50 mM ; EDTA 1mM ; orthovanadate 2mM ; Pyrophosphate de sodium 7,5 mM, NaF 100 mM, PMSF 2mM, quelques

Tableau VIII : les différents anticorps utilisés en Western Blot.

Anticorps primaire	Fournisseur et utilisation	Anticorps secondaire	Fournisseur et utilisation
Anti phospho-AKT (Ser473) (60 KDa)	Cell signaling 1/1000 dans 5% BSA, TBS 1X, 0,1% Tween-20 à 4°C, une nuit	Anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de lapin couplés HRP (Horseradish peroxidase)	Dako 1/2000 dans 5% BSA, PBS 1X, 0,1% Tween-20, température ambiante, 1 heure
Anti AKT polyclonal (60 KDa)	Idem	Idem	Idem
Anti phospho STAT5 (Tyr 694)(92 KDa)	Santa Cruz Biotechnology 1/500 dans 5% BSA, PBS 1X, 0,1% Tween-20 à 4°C, une nuit	Idem	Idem
Anti STAT 5 (H-134) (92 KDa)	idem,	Idem	Idem
Anti p44/42 MAPK 44, 42 KDa	Cell signaling 1/2000 dans 5% BSA, TBS 1X, 0,1% Tween-20 à 4°C, une nuit	Idem	Idem
Antiphosphop44/42 MAPK (Erk 1/2) (Thr 202/Tyr204) 44, 42 KDa	Idem	Idem	Idem
Anti phospho-KIT (Tyr703) 145 KDa	Idem	Idem	Idem
Anti KIT (AB81) 145 KDa	Santa Cruz Biotechnology 1/500 dans 5% BSA, PBS 1X, 0,1% Tween-20 à 4°C, une nuit	Idem	Rockland 1/2000 dans 5% BSA, PBS 1X, 0,1% Tween-20, température ambiante, 1 heure
Anti phospho-LYN (Tyr 507) 53,56 KDa	Cell signaling 1/1000 dans 5% BSA, TBS 1X, 0,1% Tween-20 à 4°C, une nuit	Idem	Dako 1/2000 dans 5% BSA, PBS 1X, 0,1% Tween-20, température ambiante, 1 heure
Anti LYN (C13F9)	Idem	Idem	Idem
Anti phosphor-BTK (Tyr 223) 77 KDa	Idem	Idem	Idem
Anti BTK (77 KDa)	Idem	Idem	Idem
Anti GAPDH	Santa Cruz Biotechnology 1/100 dans 5% BSA, PBS 1X, 0,1% Tween-20 à 4°C, une nuit	Idem	Rockland 1/2000 dans 5% BSA, PBS 1X, 0,1% Tween-20, température ambiante, 1 heure

grains d'aprotinine, deoxycholate de sodium, 1 µL de NP40 et cocktail d'anti protéases (Sigma) dilué au 1/25) et incubés 20 min sur glace, puis centrifugés à 10000g, 10 min à 4°C. La concentration protéique des surnageants est déterminée par la technique colorimétrique BCA (BC Assay).

Les protéines (30 µg) sont mélangées à 1/5 de tampon de charge 5X (Tris-HCl 50 mM pH 6,8 ; SDS 2 % ; Glycérol 10 % ; dithiothréitol 100 mM ; Bleu de Bromophénol 0,1 %), puis dénaturées 5 min à 95°C. Les protéines sont ensuite séparées sur un gel d'électrophorèse dénaturant 10 %. La migration s'effectue pendant 2 heures (60 mA) dans le tampon de migration (Tris 25 mM; Glycine 250 mM ; SDS 0,1%, pH 8,5).

Après la migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham Pharmacia Biotech). Le transfert s'effectue pendant 1h30 (400 mA) dans du tampon de transfert (Tris 48 mM ; Glycine 30 mM ; MeOH 20% ; SDS 0,03% pH=8,5).

Les membranes sont ensuite incubées pendant 1 heure à température ambiante sous agitation avec du tampon de blocage (PBS 1x-Lait 5% ou TBS 1x-Lait 5%) en fonction de l'anticorps utilisé afin de saturer les sites aspécifiques, puis les membranes sont incubées avec les anticorps primaires dilués dans le tampon de blocage. Les anticorps utilisés et les conditions de préparation sont présentés dans le tableau VIII ci-contre.

Après incubation, les membranes sont lavées plusieurs fois dans du tampon de lavage (PBS 1X-Tween 0,1 % - 0,1% NP40). La révélation des complexes antigène-anticorps spécifiques se fait sous agitation douce 1h à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire dilué dans le tampon de blocage. Les membranes sont ensuite lavées dans le tampon de lavage afin d'éliminer l'excès d'anticorps secondaire.

La révélation est réalisée par une réaction de chimiluminescence en utilisant le système ECL™ (ECL Western Blotting Reagents, Amersham Pharmacia Biotech) et les membranes sont exposées à un film pour autoradiographie (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech).

Le poids moléculaire des bandes spécifiques ainsi révélées est déterminé grâce à la migration de marqueurs de poids moléculaires connus (Biorad Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards).

III-12 Etablissement de 2 lignées cellulaires portant des mutations de *KIT*

Dans le but d'obtenir deux autres lignées portant des mutations de *KIT*, nous avons transfecté les cellules ROSA *KIT*^{WT} avec des vecteurs lentiviraux portant les constructions *KIT*^{D816V} et *KIT*^{Delta417-419 ins Y}, les deux mutations rencontrées respectivement au cours de la mastocytose systémique chez les adultes et dans la mastocytose cutanée chez l'enfant.

III-12.1 Procédure de transfection

III-12.1.a Mutagénèse dirigée

L'ADNc codant pour *KIT* sauvage (*KIT* WT) a été excisé du vecteur pBS-hKitWT par digestion par Sall-Acc65I. Le fragment d'ADNc a été ensuite cloné dans le vecteur pENTR1A (Invitrogen, France). Les deux mutations de *KIT* (*KIT*^{D816V} et *KIT*^{Delta417-419 ins Y}) ont été introduites dans ce vecteur, codant également pour la GFP, en utilisant un Kit de mutagénèse dirigée (QuickChange Kit, Stratagene), en suivant le protocole du fournisseur. Pour *KIT*^{D816V}, en position 816 le GAC est remplacé par GTC et pour *KIT*^{Delta417-419 ins Y}, les codons 417/418/419 (ACT TAC GAC) ont été supprimés et ont été remplacés par ATC.

III-12.1.b Amplification bactérienne et purification des plasmides codant pour les formes mutées de *KIT*

Cinq µL du plasmide sont additionnés à des bactéries (XL10-Gold Cells Ultracompetent # 200314, Stratagene), qui subissent un choc thermique (30 min sur glace, 40 sec à 42°C et 2 min sur glace). Puis on ajoute aux bactéries 1 mL de milieu (SOC) sans ampicilline et les bactéries sont incubées 30 min à 37°C sous agitation. Les bactéries transformées sont ensuite étalées sur des boîtes de pétri contenant du milieu LB avec de l'ampicilline (2 boîtes de pétri pour chaque plasmide codant soit pour *KIT*^{D816V} soit pour *KIT*^{Delta417-419 ins Y}). Ces boîtes sont incubées à 37°C pendant la nuit.

Après cette incubation, une colonie bactérienne pour chaque plasmide est repiquée et mis en suspension dans du milieu LB+ ampicilline et incubée à 37°C pendant la nuit. La préparation est ensuite centrifugée pendant 15 min à 4°C à 8000 g et l'extraction d'ADN est effectuée en utilisant un Kit Maxiprep (Quiagen Plasmid Maxi Kit) suivant les instructions du fournisseur. Le dosage d'ADN plasmidique est effectué par Nanodrop et l'intégrité du plasmide est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose.

III-12.1.c Production des particules lentivirales

Les particules lentivirales sont produites par la transfection transitoire d'une lignée de fibroblastes embryonnaires humains HEK 293. Cinq.10⁶ cellules 293T sontensemencées la veille dans des flasks de 75 cm², dans du milieu DMEM en présence de 10% de sérum de veau foetal (SVF) en présence d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine) et de 1mM de L-glutamine. La transfection est réalisée dans du milieu dépourvu d'antibiotiques, à l'aide de 8µg de plasmide codant pour Gag-pol, 3 µg de plasmide codant pour l'enveloppe virale du virus G vésiculaire de la stomatite (VSV-G) et 15 µg d'ADN plasmidique codant soit pour *KIT*^{D816V} soit pour *KIT*^{Delta417-419 ins Y}. 24 heures plus tard, le surnageant de culture est filtré avec un filtre de 0,45 µm. Le surnageant filtré est ensuite centrifugé sous vide à 20000 tours/min pendant 2 h. Après centrifugation, le culot (virus) est repris dans 200 µL de PBS. Ces stocks viraux sont aliquotés dans des tubes et congelés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

III-12.1.d Transduction des ROSA KIT^{WT} par les surnageants lentiviraux

Un million de cellules ROSA KIT^{WT} ont été incubées pendant 1 heure dans 1 ml de milieu contenant 80 ng/mL de rhSCF et 8µg/mL de polybrène. Les cellules sont ensuite incubées pendant 3 heures avec différentes quantités de particules infectieuses. La transduction est réalisée par centrifugation des cellules à 2500 tours/minute durant 90 minutes. L'infectiosité est estimée par la mesure, par cytométrie en flux, du nombre de cellules GFP positives dans les suspensions cellulaires. Deux lignées cellulaires ont ainsi été établies : ROSA KIT^{D816V} et ROSA KIT^{Delta417-419 ins Y}. Il s'agit de deux lignées SCF indépendantes.

III-13 Co-culture des lignées mastocytaires avec la lignée stromale de souris MS-5

Les cellules stromales de souris MS-5 sont mises en culture dans des flasks de 300 cm² (TPP) dans du milieu Iscove Modified Dulbecco Medium (IMDM)-Glutamax[®] supplémenté avec de la Pénicilline/Streptomycine 100 U/ml (P/S) (PAA), 1% de pyruvate de sodium (Invitrogen) et 10 % de SVF.

On prépare des suspensions contenant 3.10⁵ cellules ROSA KIT^{WT}, KIT^{D816V} ou KIT^{Delta417-419 ins Y} dans du milieu Iscove Modified Dulbecco Medium (IMDM)-Glutamax[®] supplémenté avec de la

Pénicilline/Streptomycine 100 U/ml (P/S), 1% de pyruvate de sodium, 1% de vitamines, 1% de Glutamine, 2% d'acides aminés non essentiels, 1% d'une solution commerciale d'insuline-transferrine-sélénite de sodium, 0,3% de BSA, 5% de sérum de SVF et 80 ng/ml de rhSCF pour ROSA KIT^{WT}, alors que pour ROSA KIT^{D816V} et KIT^{Delta417-419 ins Y}, on ajoute 10% de SVF mais pas de SCF.

Lorsqu'on obtient une couche de cellules MS-5 à confluence, on enlève tout doucement le milieu et on ajoute 100 mL des suspensions cellulaires déjà préparées en évitant de toucher la monocouche de MS-5. Le milieu de culture est ensuite renouvelé à moitié tous les 3-4 jours.

III-14 Etude du caryotype des lignées cellulaires

Les chromosomes sont préparés à partir des 3 lignées cellulaires ROSA après 24-48 heures de culture dans du milieu RPMI 1640 (Gibco). Les chromosomes sont ensuite classés selon la nomenclature internationale de cytogénétique ISCN (international system for human cytogenetic nomenclature). L'analyse d'hybridation *in situ* FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) est effectuée en utilisant des sondes commerciales conformément aux protocoles du fournisseur. Les sondes suivantes ont été utilisées : TP53 (17p13)/SE17, EGFR1 (5q31)/CSF1R(5q33)/hTERT (5p15), PCM1, WCP10 et WCP16. Les résultats sont lus en utilisant le microscope à fluorescence Eclipse 90i (Nikon), équipé de filtres appropriés, d'une caméra digitale CCD et d'un logiciel d'imagerie numérique Alphelys (Genikon).

III-15 Xénogreffe des cellules ROSA dans des souris NSG (NOD-SCID-IL2 gamma null)

Les cellules ROSA KIT^{WT}, KIT^{D816V} et KIT^{Delta417-419 ins Y} sont mises en suspension dans 150 µL de PBS supplémenté à 2% par du SVF. On injecte 0,4-5.10⁶ cellules en sous cutanée ou en intraveineuse à des souris NSG adultes (The Jackson laboratory). 3 à 5 souris sont injectées par groupe. Les souris injectées en intraveineuse ont été préalablement irradiées (2,4 Gy) 24 heures avant l'injection.

Après injection, les souris sont suivies quotidiennement et sacrifiées dès qu'elles développent des symptômes de maladie ou après une période d'observation qui ne dépasse pas les 6 mois.

Les cellules de la moelle osseuse ont été obtenues à partir des os de fémurs, tibias et des humérus par « flushing ». Les tumeurs issues des cellules injectées ont été recueillies et dispersées par digestion à

la collagénase. De plus, les échantillons de la moelle osseuse et des tumeurs sont récupérés et préparés pour des études histologiques et immunohistochimiques.

L'expérimentation animale a été effectuée en collaboration avec l'équipe du Pr VALENT à l'Université Médicale de Vienne (Autriche) et approuvée par le comité d'éthique de cette Université.

III-16 Séquençage de *KIT*

La structure du gène codant pour le récepteur *KIT* a été analysée dans les 3 lignées ROSA. Les ARN totaux sont extraits des cellules en utilisant un Kit d'extraction d'ARN (RNeasy Mini Kit, Qiagen) selon le protocole du fournisseur. La concentration et la pureté des ARN sont déterminées par Nanodrop ND-1000 spectrophotomètre et les échantillons sont congelés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Les ADNc sont obtenus à partir des ARN en utilisant un Kit StrataScript (Stratagene) selon les instructions du fournisseur. Brièvement, 1µg d'ARN est dilué dans 20 µL de tampon DNase (1X) contenant 2U de DNase RNase free puis mis à incuber à 37°C pendant 30 minutes. Puis à ce mélange sont ajoutés 2µL de DNase STOP, 5 µL de random primers (40 ng/mL), 2 µL de DNTP (10 mM) et 1µL de l'enzyme reverse transcriptase (200 U/µL).

Les échantillons sont incubés à 25°C pendant 5 min, puis 30 min à 42°C. On rend la reverse transcriptase inactive, en l'incubant 5 min à 85°C et les échantillons sont conservés à -20°C.

Les séquences codantes de *KIT* sont ensuite amplifiées par PCR en utilisant l'ADN polymérase HotStar TAq (Qiagen). Les amorces (Eurogentec, Angers, France) utilisées sont : F-HKIT^{D816V} : CTT GGC AGC CAG AAA TAT CC ; R-HKIT^{D816V} : CAT CCA CTT CAC AGG TAG TG ; F-HKIT^{Delta417-419 ins Y} : GCA CCG AAG GAG GCA CTT AC; R-HKIT^{Delta417-419 ins Y} : TGG GAA TCC TGC TGC CAC AC.

On effectue 40 cycles de PCR : 94°C (30 sec), 57°C (30 sec) et 72°C (45 sec). Les produits de PCR sont purifiés à l'aide d'un Kit GeneClean III (Qbiogene) et toutes les régions codantes de *KIT* sont séquencées à l'aide d'un séquenceur ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems) et analysées grâce à un logiciel BigDye Terminator V1.1 (Applied Biosystems).

III-17 Extraction protéique et dosage de l'activité télomérase

La télomérase est une enzyme formée d'ARN matriciel dont la sous-composante protéique possède une activité transcriptase inverse : la télomérase est capable d'ajouter des séquences (TTAGGG) à l'extrémité des chromosomes. Ainsi, les cellules bénéficiant de cette enzyme peuvent réparer les séquences terminales et continuer à se diviser indéfiniment et devenir «immortelles».

Nous avons utilisé le Kit télomérase PCR Elisa (Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France) qui utilise une méthode non radio-active. Deux millions de cellules sont lysées dans 50 µL de tampon CHAPS contenant un inhibiteur de RNAase. Après incubation sur de la glace pendant 30 minutes, le lysat a été centrifugé à 16000 g pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant a été délicatement recueilli et transféré dans un nouveau tube. La concentration en protéines a été mesurée selon la technique de réduction du cuivre par les protéines (BCA, Protein Assay kit, Pierce, Rockford, USA). Une quantité protéique (1 µg) a été testée pour chaque échantillon. Un contrôle positif (cellules de rein humain immortalisées fournies par le Kit) et un contrôle négatif (eau stérile) ont été testés parallèlement.

Le résultat a été visualisé par une méthode colorimétrique. Les échantillons étaient considérés comme positifs pour l'activité télomérase lorsque la valeur différentielle d'absorbance (entre 450 et 620 nm) était supérieure à 0,2. Le contrôle positif devait avoir une valeur différentielle d'absorbance supérieure à 1,5.

III-18 Traitement des cellules par les inhibiteurs de tyrosine kinase

L'effet anti-prolifératif de trois inhibiteurs de tyrosines kinases a été évalué sur la prolifération de ROSA KIT^{WT}, ROSA KIT^{D816V} et ROSA KIT^{Delta417-419 ins Y}. Les cellules sontensemencées à une concentration initiale de 3.10⁵/mL dans des plaques 96 puits (100 µL/puits) et incubées à 37°C dans un incubateur humidifié (5% de CO₂ dans l'air) pendant 48 heures en présence de 1µM d'imatinib (Sequoia Research, Pangbourne, Royaume Uni), de dasatinib (Sequoia Research), de midostaurine (Sigma), dilués dans du DMSO, ou de 0,1% de DMSO (Sigma). A la fin de cette incubation, l'étude de la prolifération et de la viabilité cellulaire est réalisée en utilisant un test MTT.

III-19 Traitement des cellules par l'inhibiteur d'AKT

Afin d'évaluer l'implication d'AKT dans la prolifération des lignées ROSA, les cellules sont ensemencées à une concentration initiale de $3 \cdot 10^5$ /mL dans des plaques 96 puits (100 μ L/puits) et incubées à 37°C dans un incubateur humidifié (5% de CO₂ dans l'air) pendant 48 heures en présence de différentes concentrations du composé A6730 (0,01 à 5M) (Sigma), un inhibiteur spécifique de l'activité AKT1/AKT2, ou en présence de 0,1% de DMSO. A la fin de cette incubation, l'étude de la prolifération et de la viabilité cellulaire est réalisée en utilisant un test MTT.

III-20 Etude de la prolifération et de la viabilité cellulaire par test MTT

Le test au MTT (Mosmann 1983) est utilisé pour évaluer le nombre de cellules viables. Il est basé sur la transformation du MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide) en cristaux bleus de formazan par une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. Les cristaux de formazan formés sont solubilisés et sont ainsi détectables par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 570 nm. Ce test est utilisé par exemple pour évaluer l'effet toxique des molécules testées sur les cellules.

Les cellules sont ensemencées en plaques 96 puits et le traitement est réalisé pendant la phase de croissance et dure de 1 à 4 jours. Pour chaque temps étudié, 10 μ L de la solution de MTT (Sigma) (5 mg/ml dans du PBS) sont ajoutés dans chaque puits. Après 3h d'incubation à 37°C en atmosphère humide, les cristaux de formazan sont dissous dans 100 μ L d'isopropanol acidifié. L'absorbance est mesurée à 570 nm, par un lecteur de plaques.

Les résultats sont présentés en pourcentage du contrôle : $(DO \text{ moyenne des cellules traitées} / DO \text{ moyenne des cellules contrôles}) \times 100 \pm \text{écart-type}$; ou présentés sous forme de courbes retraçant l'évolution de l'absorbance en fonction du temps.

III-21 Microscopie électronique

Des études en microscopie électronique à transmission ont été effectuées sur les cellules ROSA KIT^{WT} en utilisant des techniques standards (*Dvorak et al, 1987*). Brièvement, Les cellules ont été fixées sur grille à l'aide d'une solution contenant 4% de PFA et 0,1% de glutaraldéhyde puis une étape d'inclusion dans une résine est effectuée. Les cellules sont ensuite colorées avec 0,5% d'acétate d'uranyle et avec du citrate de plomb, et les grilles sont observées avec un microscope électronique à transmission (Libra Zeiss, Allemagne).

III-22 Analyse statistique

Les résultats sont obtenus à partir d'au moins trois expériences indépendantes. Dans ce travail, les résultats d'une expérience représentative sont donnés, avec la valeur moyenne et l'erreur standard de triplicats obtenus au sein de la même expérience. Les différences sont considérées comme significatives avec le test de Student pour $p < 0,05$.

IV RESULTATS :

IV-1 : Isolement, caractérisation et entretien de populations pures de mastocytes à partir de sang de cordon ombilical humain normal : la lignée ROSA KIT^{WT}.

IV-1.1 Isolement de la lignée ROSA KIT^{WT}

Pour pouvoir étudier les mécanismes moléculaires liés à l'activation IgE-dépendante des mastocytes, notre équipe utilise de façon routinière, et ce depuis des années, une technique de culture en milieu liquide en présence continue de Stem Cell Factor (SCF) pour obtenir des populations pures de mastocytes humains normaux en partant de cellules souches CD34+ de sang de cordon ombilical. Ces cellules CD34+ sont d'abord purifiées par immuno-affinité et mises en culture en milieu liquide en présence de 80 ng/mL de SCF qui favorise leur différenciation en mastocytes. Lors de la première semaine de culture, on ajoute 1 ng/mL d'IL-3 et 50 ng/mL d'IL-6 qui favorisent la différenciation ainsi que la prolifération mastocytaire.

Au bout de 8 à 10 semaines de culture dans ces conditions, nous obtenons des populations pures (> 98%) de mastocytes qui ne prolifèrent plus et qui ne sont pas congelables.

Ce type de culture primaire présente des inconvénients majeurs. D'une part, il est nécessaire de mettre en culture de façon répétée des cellules CD34+ provenant de différents sangs de cordon de façon à pouvoir disposer de quantités suffisantes de mastocytes tout au long des expériences, ceci ayant de plus un coût élevé lié aux réactifs utilisés pour la purification des cellules CD34+. D'autre part, le rendement d'obtention des mastocytes en fin de culture est extrêmement variable d'un sang de cordon à un autre et les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des mastocytes obtenus en fin de culture varient d'un sang de cordon à l'autre. Les expériences nécessitent donc d'être renouvelées avec plusieurs lots de mastocytes pour obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Afin de contourner ces difficultés, il était souhaitable de disposer d'une lignée de mastocytes humains de phénotype le plus proche possible des mastocytes normaux, exprimant le récepteur FcεRI,

pouvant être activés par ce récepteur, ayant un temps de doublement compatible avec une production en masse, facilement congelable, et dont les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles restent stables dans le temps. Or, une telle lignée n'existait pas au début de mon travail de thèse.

Lors d'une de nos cultures routinières de cellules CD34+ obtenues à partir d'un sang de cordon normal, mises en culture le 9 septembre 2009, dans des conditions habituelles d'obtention de mastocytes, nous avons constaté qu'à l'inverse du comportement habituel de ce type de culture, non seulement la croissance cellulaire ne s'est pas arrêtée au bout de 8 à 10 semaines de culture, mais qu'elle s'est poursuivie jusqu'à ce jour.

Nous avons donc pu réussir à isoler et caractériser une nouvelle lignée mastocytaire humaine, qui reste dépendante du Stem Cell Factor pour sa survie et sa croissance, en culture continue depuis maintenant près de deux ans, que nous avons dénommée ROSA KIT^{WT} du fait de la structure normale de son récepteur KIT.

Les cellules ROSA KIT^{WT} ont donc été maintenues en culture depuis le début par dilution au 1/3 ou 1/4 dans du milieu de culture neuf tous les 3 ou 4 jours. Les cellules sont congelables et décongelables de façon répétée en utilisant les méthodes de congélation classiques (Sérum de Veau Fœtal additionné de 10% de DMSO).

IV-1.2 Caractérisation morphologique de la lignée ROSA KIT^{WT}

L'aspect cytologique des mastocytes a été étudié après coloration au bleu de toluidine et coloration de May-Grünwald Giemsa (MGG).

Après coloration au MGG (Figure 22 A), les cellules de la lignée ROSA KIT^{WT} apparaissent arrondies avec un rapport nucléo-cytoplasmique intermédiaire. Dans le cytoplasme, qui est basophile, on note la présence de nombreuses granulations de couleur violet foncé; le nombre et la taille des granulations varient : elles sont petites et peu nombreuses dans les cellules considérées comme immatures; elles sont nombreuses et volumineuses dans les cellules considérées comme plus matures.

La métachromasie a été révélée par la technique de coloration au bleu de toluidine (Figure 22 B).

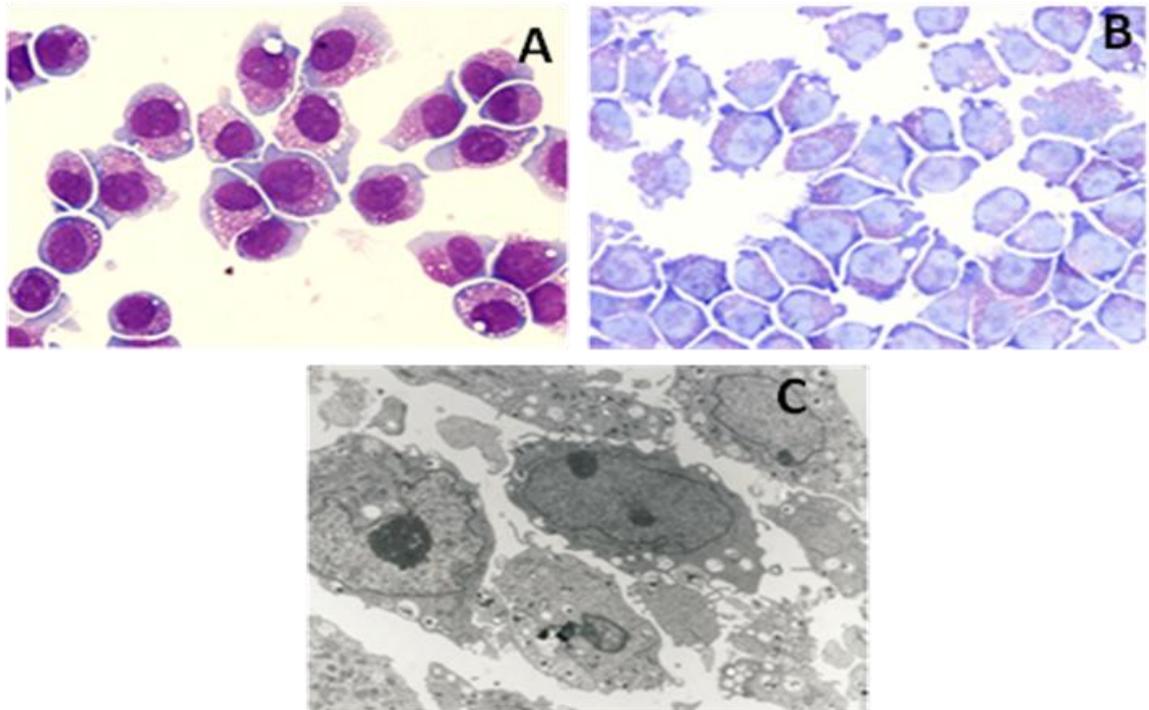


Figure 22 : Caractérisation cytotogique et ultrastructurale des cellules ROSA KIT^{WT} : les mastocytes obtenus par culture des progéniteurs issus du sang de cordon ombilical ont été colorés par le May-Grünwald Giemsa (MGG) (A), ou par le bleu de toluidine (B) et observés par microscopie optique à immersion. On peut remarquer la présence de nombreuses granulations violet foncé dans le cytoplasme et la position excentrée du noyau. (C) Cellules ROSA KIT^{WT} observées par microscopie électronique à transmission (TEM) après coloration à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb: on peut observer les nombreux replis de la membrane plasmique, les nucléoles et les granules caractéristiques des mastocytes.

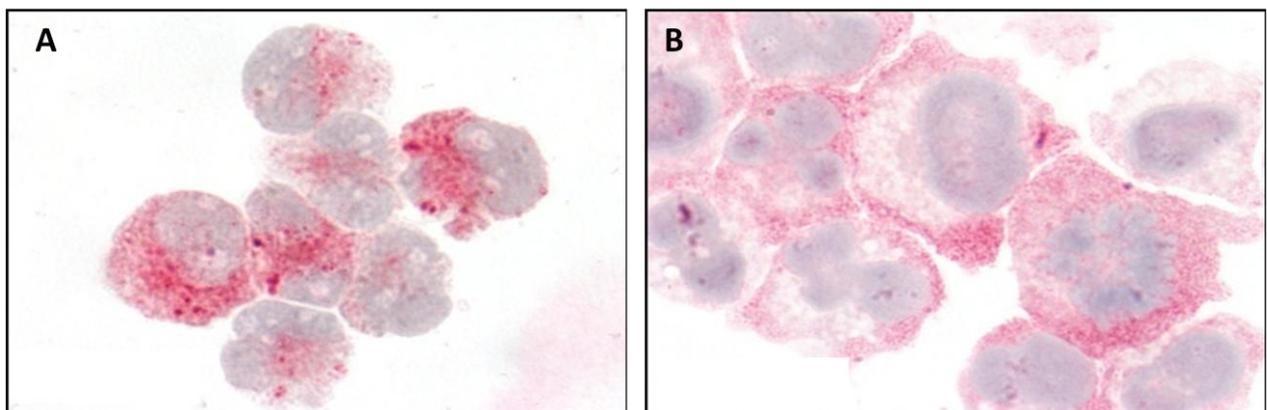


Figure 23 : Mise en évidence du contenu en tryptase et en HDC des cellules de la lignée ROSA KIT^{WT} par méthode immunocytochimique: les cellules ROSA KIT^{WT} ont été déposées sur des lames par cyto-centrifugation puis fixées par l'acétone. Les cellules ont été ensuite incubées avec l'anticorps anti tryptase (A) ou anti histidine décarboxylase (B) puis révélées par une phosphatase alcaline. Les noyaux ont été colorés avec de l'hématoxyline de Meyer.

La caractérisation cytologique a été complétée par une observation en microscopie électronique (Figure 22 C). Les mastocytes de la lignée ROSA KIT^{WT} observés sont des cellules qui ont un noyau volumineux, avec une chromatine lâche suggérant qu'il s'agit de cellules assez jeunes. Dans le noyau, on observe un à deux nucléoles. Le cytoplasme contient des ribosomes, de nombreuses mitochondries et de nombreuses granulations. Ces granulations sont du même type que celles décrites dans des mastocytes humains en culture primaire.

IV-1.3 Mise en évidence de l'expression de tryptase et de l'histidine décarboxylase (HDC) au niveau des cellules ROSA KIT^{WT}

La présence de tryptase, marqueur spécifique des mastocytes, et de l'histidine décarboxylase (HDC) intracellulaire a été mise en évidence par des méthodes immunohistochimiques sur cellules cytocentrifugées.

On observe un marquage positif pour les deux enzymes dans la quasi totalité des cellules ROSA KIT^{WT}. La forte positivité de la tryptase confirme la nature mastocytaire des cellules de la lignée ROSA KIT^{WT}.

IV-1.4 Mise en évidence du récepteur KIT et du récepteur de haute affinité pour les IgE (FcεRI) sur les cellules ROSA KIT^{WT}

Des marquages directs à différents temps de la culture ont été effectués en cytométrie en flux sur les mastocytes en culture avec un anticorps dirigé contre la chaîne alpha (α) du récepteur à haute affinité aux IgE couplé au fluorochrome FITC (Fluorescéine) ou avec l'anticorps anti KIT (CD117) humain couplé à l'APC.

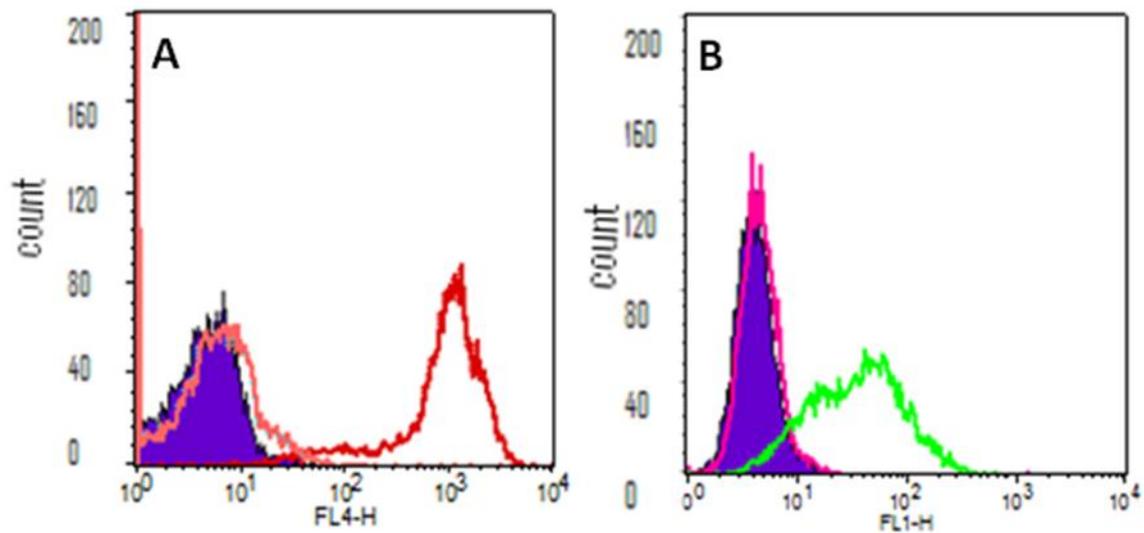


Figure 24 : Marquage membranaire des cellules ROSA KIT^{WT} : les cellules sont incubées avec soit l'anticorps anti KIT (CD117) humain(A) couplé à l'APC (rouge) soit l'anticorps dirigé contre la chaîne alpha (α) du récepteur à haute affinité aux IgE (B) couplé au fluorochrome FITC (Fluorescéine) (vert).

Il apparaît donc que les cellules ROSA KIT^{WT} analysées présentent à la surface le récepteur de haute affinité pour les IgE ainsi que le récepteur KIT.

IV-1.5 Effet du traitement par différentes cytokines et par l'IgE sur l'expression de KIT et de FcεRI au niveau des cellules de la lignée ROSA KIT^{WT}

Comme il a été montré dans la littérature que l'interleukine 4 (IL-4) induit une diminution d'expression de KIT et une augmentation d'expression du FcεRI par les mastocytes humains normaux, nous avons voulu vérifier si ce phénomène pouvait aussi être observé sur la lignée ROSA KIT^{WT}. Nous avons testé également l'effet d'autres interleukines ainsi que l'effet des IgE sur cette expression.

Les cellules ROSA KIT^{WT} ont été traitées ou non par l'IL-3 (20 ng/mL), l'IL-6 (10 ng/mL), l'IL-4 (20 ng/mL), IgE (2μg/mL) ou bien par une combinaison de ces différentes molécules pendant 5 jours puis analysées par cytométrie de flux pour l'expression du FcεRI et de KIT.

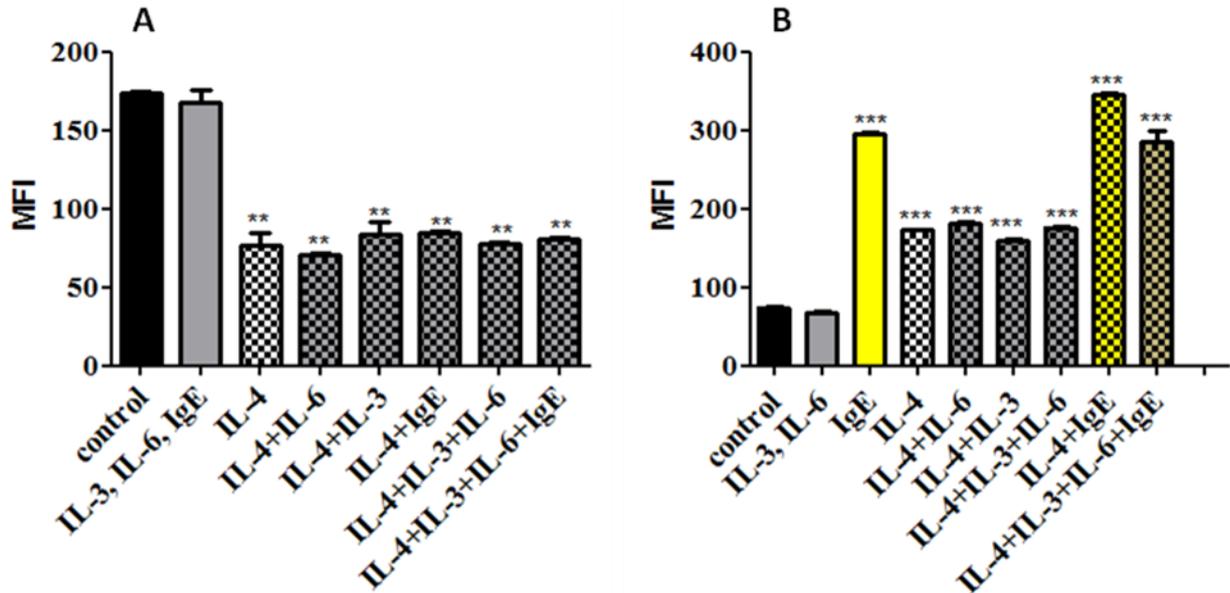


Figure 25 : Etude par cytométrie en flux des effets des différentes molécules sur l'expression de KIT et de FcεRI à la surface des cellules ROSA KIT^{WT} : les cellules sont traitées ou non avec l'IL-3 (20 ng/mL), l'IL-6 (10 ng/mL), l'IL-4 (20 ng/mL), l'IgE (2μg/mL) ou bien par une combinaison de ces différentes molécules pendant 5 jours, puis incubées avec soit l'anticorps anti KIT (CD117) humain couplé à l'APC (A), soit l'anticorps dirigé contre la chaîne alpha (α) du récepteur à haute affinité aux IgE couplé au fluorochrome FITC (Fluorescéine) (B). Les résultats sont exprimés en termes de MFI (intensité moyenne de fluorescence). Les étoiles ** ou *** indiquent que les résultats sont significativement différents des valeurs obtenues avec les ROSA KIT^{WT} non traitées. (** : p<0,005, *** : p<0,001). Les résultats montrés sont représentatifs d'au moins deux expériences indépendantes.

Les résultats obtenus (figure 25) montrent que le traitement des cellules par l'IL-4 induit une augmentation de l'expression de récepteur de haute affinité pour les IgE, FcεRI et une diminution de l'expression de KIT. Ces cellules se comportent comme les mastocytes humains normaux. De plus, on remarque que l'IgE induit à elle toute seule une augmentation de FcεRI et cette augmentation est d'autant plus forte lorsqu'elle est associée à l'IL-4. En revanche, le traitement des cellules par l'IL-3 ou l'IL-6 n'a aucun effet sur l'expression de FcεRI et de KIT.

IV-1.6 Immunophénotypage de la lignée ROSA KIT^{WT}

En plus de l'expression de FcεRI et de KIT, nous avons analysé également l'expression de différents marqueurs membranaires à la surface des cellules ROSA KIT^{WT} par cytométrie en flux. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau IX.

Tableau IX : Expression des différents marqueurs membranaires à la surface des cellules ROSA KIT

^{WT}: les cellules sont incubées pendant 1heure avec les différents anticorps directement couplés et les résultats sont exprimés en termes de ratio de MFI : MFI antigène/MFI isotype contrôle. MFI ratio < 1.19:-, MFI ratio 1.2 - 2.9:+/-, MFI ratio 3-9.9: +, MFI ratio 10-99.9: ++, MFI ratio >100:+++.

CD2	-	CD32	++	CD114	-	Anti HR1	-
CD3	-	CD33	++	CD115	-	CD30 Ligand	+/-
CD4	++	CD34	-	CD116	-	CXCR4	-
CD5	-	CD38	-	CD117	++	c-MET	+/-
CD8	-	CD44	+++	CD123	+/-	EGF-R	-
CD9	++	CD45	+++	CD127	+/-	EPCAM	-
CD10	-	CD48	+	CD133	-	EpoR	+/-
CD11b	+/-	CD50	++	CD134	+/-	Flt3	+/-
CD13	+/-	CD52	++	CD138	-	HLA-DR	-
CD14	-	CD54	+	CD144	+/-	IGF1R	+/-
CD15	-	CD56	-	CD146	+/-	IL-9R	+/-
CD16	-	CD58	+	CD150	+/-	KDR	+/-
CD17	-	CD59	+/-	CD164	+	MDR-1	-
CD19	-	CD63	+++	CD166	++	OSM-R β	-
CD20	-	CD64	+/-	CD213a	-		
CD22	+	CD66a	+++	CD218a	+/-		
CD23	-	CD69	+	CD203c	++		
CD24	+/-	CD71	+	CD273	-		
CD25	-	CD87	+	CD274	-		
CD26	-	CD90	+/-	CD279	-		
CD27	-	CD95	-	CD300a	++		
CD30	-	CD96	+/-	CD309	+/-		
CD31	+	CD105	-	CD326	+/-		

Outre l'expression de CD117 (KIT) et de FcεRI, il apparaît que la lignée ROSA KIT^{WT} exprime fortement le CD4, le CD9, le CD32, le CD33, le CD44, le CD45, le CD50, le CD52, le CD63, le CD66a, et le CD300a. L'intérêt de l'expression de ces différents marqueurs sera développé dans la partie discussion. Enfin, les cellules ROSA KIT^{WT} expriment fortement le CD203c, qui est un marqueur de dégranulation mastocytaire.

IV-1.7 Mise en évidence de l'activation des cellules de la lignée ROSA KIT^{WT} par le couple IgE-anti IgE

Afin de savoir si les cellules de la lignée ROSA KIT^{WT} sont activables par le couple IgE-anticorps anti-IgE, conduisant à une dégranulation avec libération immédiate d'histamine et de β-hexosaminidase associée à une augmentation importante de l'expression membranaire du CD203c et à une libération retardée de TNF-alpha et de PGD2, des cellules sont traitées par IL-4 (20ng/ml) et IgE (2μg/ml) pendant 5 jours puis stimulées par anti IgE (5 ou 10 μg/ml) ou par le calcium ionophore (Cai) (1 μmol/l) pendant 1 ou 6 heures. Le surnageant de 1 heure ainsi que le culot sont utilisés pour doser l'histamine, la β-hexosaminidase et pour mesurer l'expression de CD203c à la surface cellulaire alors que le TNF-alpha est mesuré par méthode ELISA spécifique dans le surnageant des cellules après 6 heures de stimulation. Nous avons tout d'abord regardé la variation d'expression de CD203c (figure 26 A) à la surface des cellules ROSA KIT^{WT} stimulées ou non et les résultats montrent une augmentation nette de l'expression de CD203c lorsque ces cellules sont traitées par IL4+IgE et stimulées par l'anticorps anti-IgE. Cette augmentation est aussi observée lorsque ces cellules sont traitées par l'ionophore calcique.

Nous avons ensuite mesuré l'activation des ROSA KIT^{WT} en déterminant le pourcentage de β-hexosaminidase libérée (figure 26 B) dans le surnageant des cellules stimulées pendant 1 heure. Les résultats montrent une induction de la libération de β-hexosaminidase qui peut aller jusqu'à 38% du contenu total enzyme des cellules de la lignée ROSA KIT^{WT} sensibilisées par IL-4 et IgE et stimulées par l'anticorps anti-IgE. L'ionophore calcique induit une augmentation du pourcentage de libération de β-hexosaminidase qui peut aller jusqu'à 60%.

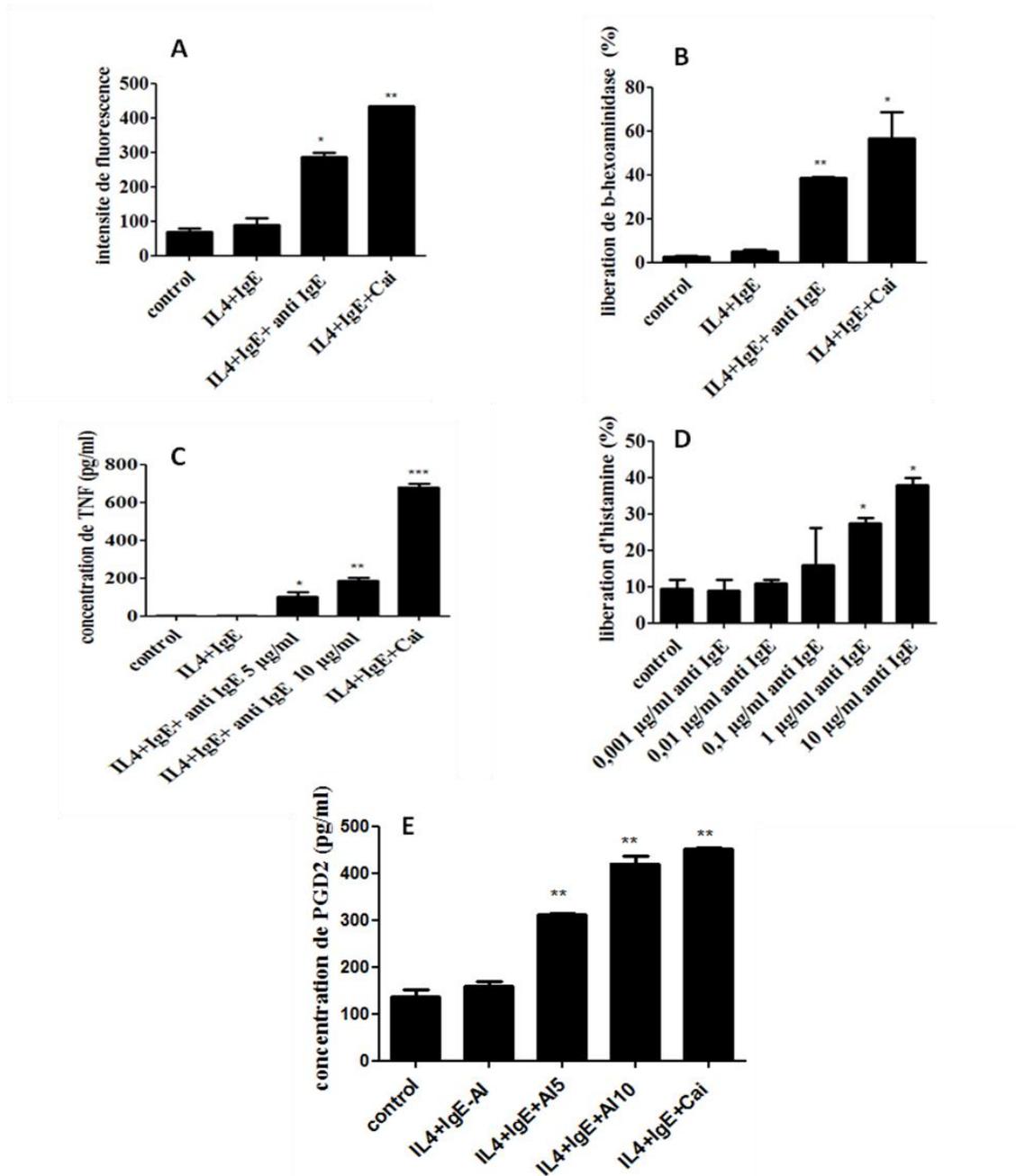


Figure 26 : Activation des cellules ROSA KIT^{WT} par le couple IgE-anti IgE: les cellules sont sensibilisées pendant 5 jours par IL-4 (20ng/mL) et IgE (2µg/mL) puis stimulées par l'anticorps anti-IgE à différentes concentrations ou par le calcium ionophore (Cal) à 1µM. Après 1 heure de stimulation, les cellules sont incubées avec l'anticorps CD203c couplé à l'APC pendant 1 heure et les résultats sont exprimés en termes de MFI. (A) Après 1 heure de stimulation, le surnageant et le culot des cellules sont utilisés pour doser le % de libération de la β-hexosaminidase (B) ou l'histamine (D) par les cellules ROSA KIT^{WT}. La concentration de TNF-α libérée (C) et la concentration de PGD2 libérée (E) sont dosés dans le surnageant et le culot des cellules ROSA KIT^{WT} stimulées pendant 6 heures. On note que la concentration pg/mL signifie pg/10⁶cellules. Les étoiles *, ** ou *** indiquent que les résultats sont significativement différents des valeurs obtenues avec les ROSA KIT^{WT} non traitées. (* : p< 0,05, ** : p<0,005, *** : p<0,001). Les résultats montrés sont représentatifs d'au moins deux expériences indépendantes.

Le dosage de l'histamine a été réalisé dans les surnageants et les culots des cellules stimulées pendant 1 heure (figure 26 D) et les résultats montrent une augmentation dose-dépendante (en fonction de la concentration d'anti-IgE rajoutée) de la libération d'histamine par les cellules de la lignée ROSA KIT^{WT} stimulées.

A l'aide d'un kit ELISA spécifique, nous avons quantifié la libération tardive de TNF-alpha (Figure 26 C) et de la prostaglandine D2 (figure 26 E) par les cellules ROSA KIT^{WT} traités par IL-4 et IgE, activées ensuite pendant 6 heures à 37°C en présence de 5% de CO₂, par différentes concentrations de l'anticorps anti IgE (5 ou 10 µg/ml) ou par l'ionophore calcique (Cai) (1 µmol/l). Les résultats montrent une augmentation dose-dépendante de la libération de TNF-alpha et de prostaglandine D2 par les cellules ROSA KIT^{WT} stimulées par l'anticorps anti IgE.

Ces résultats montrent que la lignée cellulaire ROSA KIT^{WT} est une lignée cellulaire activable par le couple IgE-anticorps anti-IgE, conduisant à une dégranulation mastocytaire et à une synthèse de prostaglandine et de cytokines.

IV-1.8 Mise en évidence de l'aptitude des cellules de la lignée ROSA KIT^{WT} à devenir matures après co-culture sur une sous-couche de cellules MS-5

Les cellules de la lignée ROSA KIT^{WT} présentent un phénotype de mastocytes humains relativement immatures. Elles présentent une métachromasie relativement peu importante avec positivité de la tryptase mais une négativité de la chymase.

Notre équipe avait précédemment démontré que la culture de progéniteurs hématopoïétiques humains CD34+ sur une sous-couche de cellules lipoblastiques de souris (lignée MS-5) permettait la différenciation mastocytaire terminale de ces progéniteurs (*Arock et al. 1994*). Nous avons donc cultivé des cellules de la lignée ROSA KIT^{WT} sur une sous-couche de cellules MS-5 à confluence, et ce pendant plus de 3 mois, le milieu de culture étant renouvelé par moitié tous les 3 ou 4 jours. Au bout de ce temps de co-culture, les cellules non adhérentes de la co-culture ont été analysées pour leur aspect

morphologique après coloration au MGG (figure 27 A), leur métachromasie au bleu de toluidine (figure 27 B).

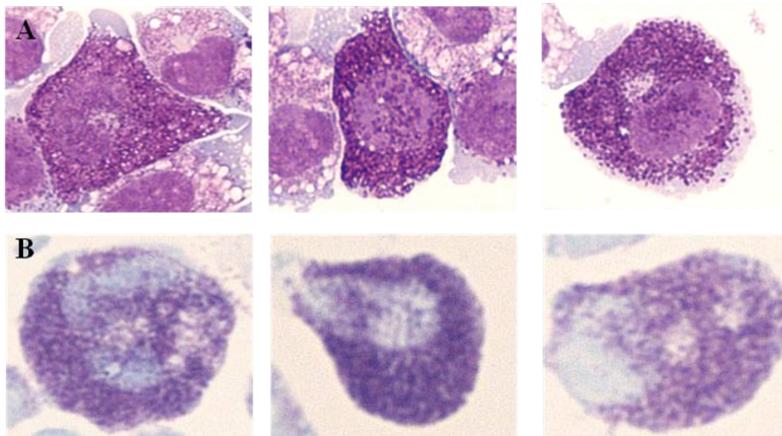


Figure 27 : caractérisation cytologique des cellules ROSA KIT^{WT} co-cultivées sur un feeder de cellules MS-5. Les mastocytes obtenus après co-culture ont été colorés par le May-Grünwald Giemsa (MGG) (A), ou par le bleu de toluidine (B) et observés par microscopie optique à immersion. On peut remarquer la présence de nombreuses granulations violet foncé dans les cellules co-cultivées.

Il apparaît ainsi que les cellules co-cultivées présentent une augmentation considérable du nombre de granulations dans leur cytoplasme (coloration du MGG) qui sont métachromatiques (coloration au bleu de toluidine).

Nous avons aussi analysé le contenu en chymase et en tryptase des cellules co-cultivées avec MS-5 par des méthodes immunohistochimiques

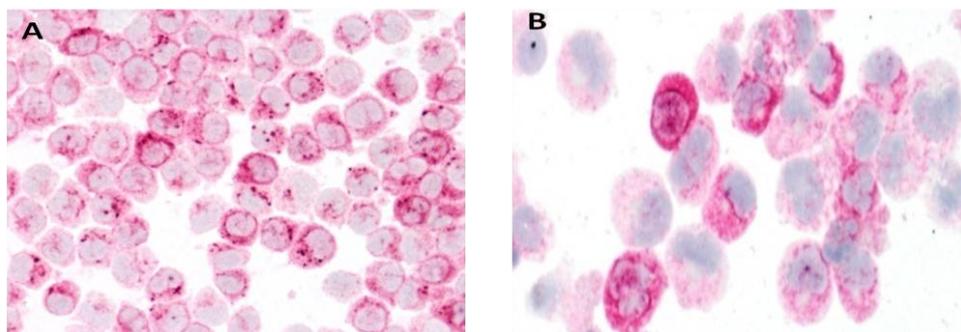


Figure 28 : Mise en évidence du contenu en tryptase et en chymase des cellules de la lignée ROSA KIT^{WT} co-cultivées sur une monocouche de MS-5, par méthode immunocytochimique : les cellules ont été déposées sur des lames par cyto centrifugation puis fixés par l'acétone. Les cellules ont été ensuite incubées avec l'anticorps anti tryptase (A) ou anti chymase (B) puis révélées par une phosphatase alcaline. Les noyaux ont été colorés avec de l'hématoxyline de Meyer.

L'analyse de ces résultats montre que les cellules de la lignée ROSA KIT^{WT} peuvent acquérir un phénotype de mastocytes humains totalement matures (MCTC) après un temps de co-culture de plusieurs semaines sur cellules MS-5, tout en gardant leur viabilité.

Finalement, nous avons analysé l'expression de différents marqueurs de surface, y compris le KIT, le FcεRI, le CD54 et le CD203c à la surface des cellules ROSA KIT^{WT} co-cultivées.

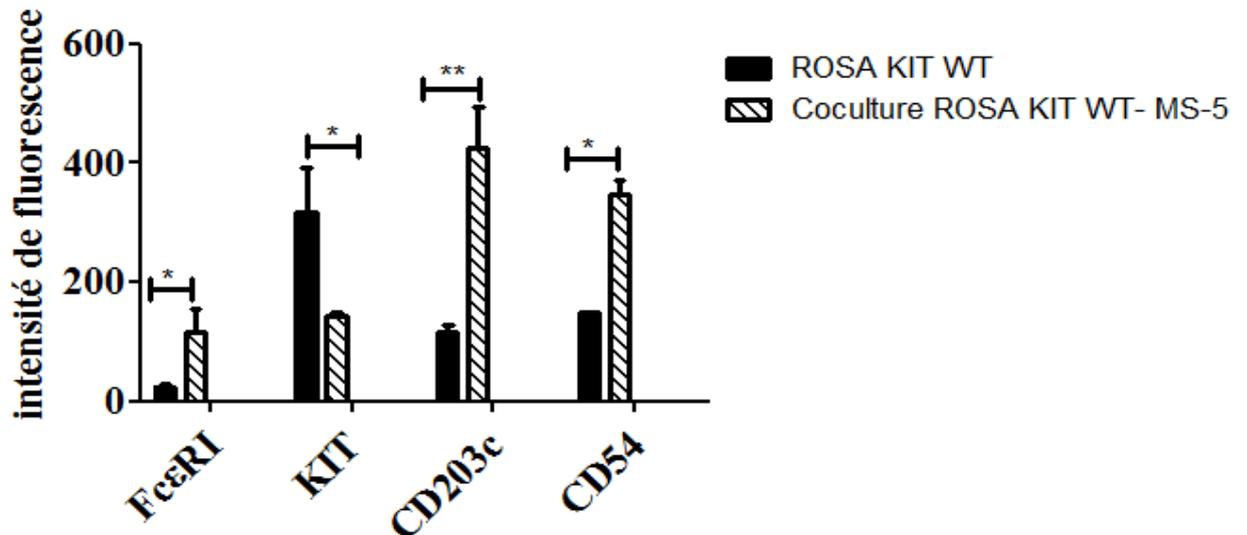
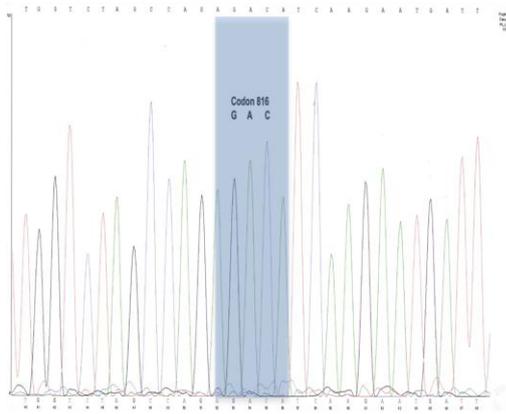
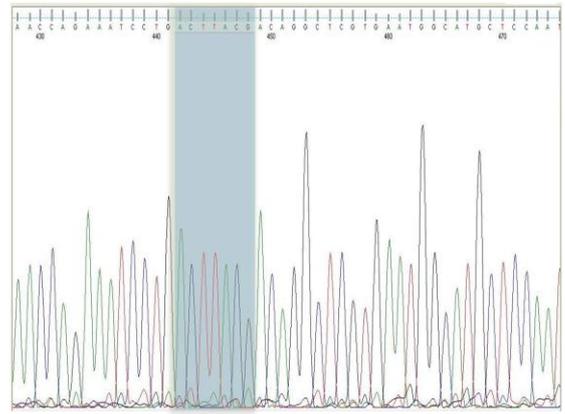


Figure 29 : Etude par cytométrie en flux des différents marqueurs à la surface des cellules ROSA KIT^{WT} et des ROSA KIT^{WT} co-cultivées sur une monocouche de MS-5 : les cellules sont incubés avec l'anticorps anti KIT (CD117) humain couplé à l'APC, l'anticorps dirigé contre la chaîne alpha (α) du récepteur à haute affinité aux IgE couplé au fluorochrome FITC (Fluorescéine), l'anticorps anti CD203c couplé à l'APC ou bien l'anticorps anti CD54 couplé à l'APC . Les résultats sont exprimés en termes d'intensité de fluorescence. Les étoiles * ou ** indiquent que les résultats sont significativement différents des valeurs obtenues avec les ROSA KIT^{WT} non traitées. (* : p< 0,05, ** : p<0,005). Les résultats montrés sont représentatifs d'au moins deux expériences indépendantes.

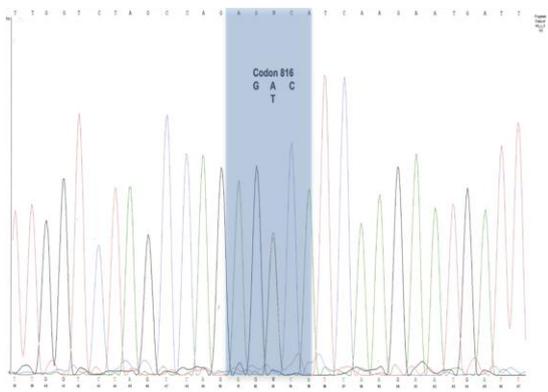
Les résultats obtenus montrent que les cellules co-cultivées sont plus positives que les cellules non co-cultivées pour l'expression du FcεRI, du CD54 et du CD203c, qui sont tous les trois des marqueurs de maturation, tandis que l'expression de KIT est diminuée dans les cellules co-cultivées.



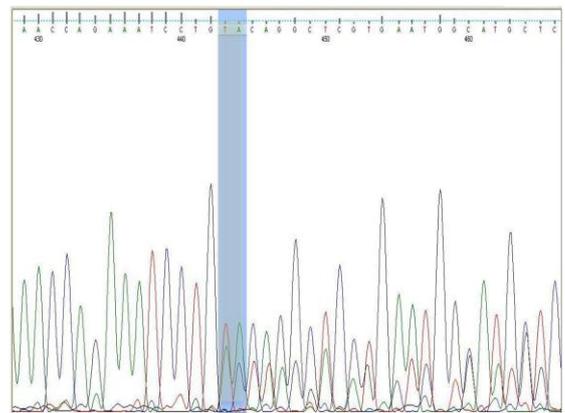
ROSA KIT WT



ROSA KITWT



ROSA KIT D816V



**ROSA KIT Delta 417-419
insY**

Figure 30 : Structure du récepteur KIT dans les 3 lignées ROSA analysée par séquençage: Les séquences codantes de KIT sont amplifiées par PCR en utilisant l'ADN polymérase HotStar TAq (Qiagen). Toutes les régions codantes de KIT sont ensuite séquencées à l'aide d'un séquenceur ABI PRISM 3100 et analysées grâce à un logiciel BigDye Terminator V1.1.

IV-2 Obtention de lignées immortalisées de mastocytes humains infectées par un récepteur KIT de structure anormale: les lignées ROSA KIT^{D816V} et ROSA KIT^{Delta417-419InsY}

Pour pouvoir étudier le rôle transformant des mutants de KIT retrouvés au cours des mastocytoses, nous avons transfecté les cellules ROSA KIT^{WT} par des vecteurs lentiviraux apportant une construction codant pour le *KIT* muté en D816V touchant le domaine tyrosine kinase ou le *KIT* muté delta 417-419 insY touchant le domaine extracellulaire (ECD) du récepteur, rencontré respectivement dans les mastocytoses systémiques chez les adultes et la mastocytose cutanée de l'enfant.

Nous avons donc réussi à caractériser deux nouvelles lignées, ROSA KIT^{D816V} et ROSA KIT^{Delta 417-419 insY}, qui sont SCF indépendantes. Ces lignées sont en culture continue depuis maintenant près de deux ans. Les cellules ROSA KIT^{D816V} et ROSA KIT^{Delta 417-419 insY} sont donc maintenues en culture depuis le début par dilution au 1/3 ou 1/4 dans du milieu de culture neuf tous les 3 ou 4 jours. Les cellules sont congelables et décongelables de façon répétée en utilisant les méthodes de congélation classiques.

Afin de vérifier l'introduction de la mutation dans la lignée de départ, nous avons séquencé la région codante de KIT dans les deux lignées cellulaires transfectées ainsi que dans la lignée de départ ROSA KIT^{WT}.

Comme attendu, la structure de *KIT* a été retrouvée normale dans toutes les régions analysées pour les cellules ROSA KIT^{WT} et nous avons pu montrer la présence simultanée de deux variantes de KIT dans les cellules ROSA KIT^{D816V} ainsi que dans ROSA KIT^{Delta 417-419 insY}. Dans les cellules ROSA KIT^{D816V}, en position 816, on trouve une variante avec le codon GAC correspondant à la forme WT de KIT et une autre variante avec le codon GTC correspondant au KIT D816V. De même, pour la lignée ROSA KIT^{Delta 417-419 insY}, on remarque la présence simultanée de deux variantes de KIT à la position 417/418/419 : une variante de la séquence complète (ACTTACGAC) correspondant à la forme WT et une autre variante où cette séquence est remplacée par TAC et conduisant à l'expression de la forme Delta 417-419 InsY.

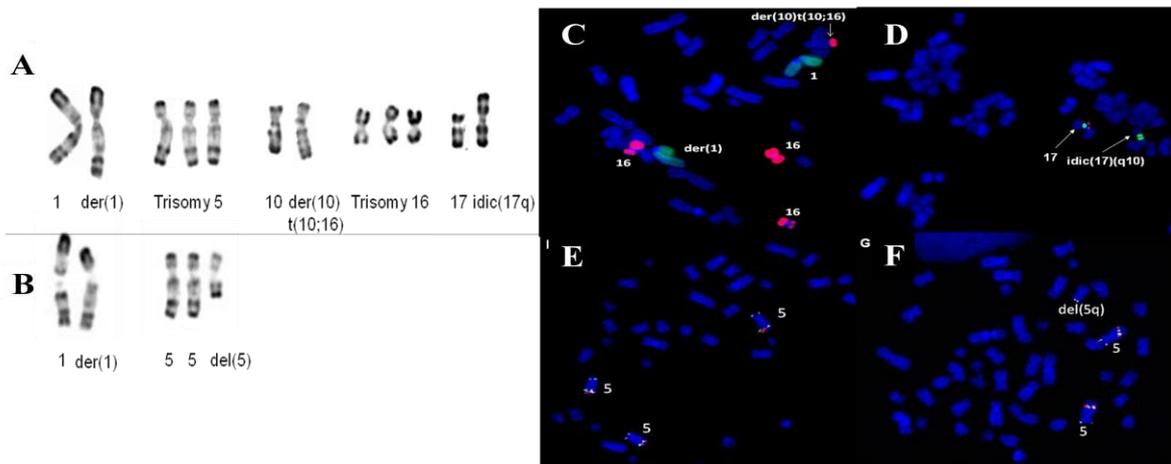


Figure 31 : Etude du caryotype et analyse par FISH des 3 lignées cellulaires : Les chromosomes sont préparés à partir des 3 lignées cellulaires après 24-48 h de culture dans du milieu RPMI. Les sondes suivantes ont été utilisées : TP53 (17p13)/SE17, EGFR1 (5q31)/CSF1R(5q33)/hTERT (5p15), PCM1, WCP10 et WCP16. Caryotype de la lignée ROSA KIT^{WT} au début de la culture (A) et après 12 mois de culture (B). Analyse FISH (C-F) : des cellules en métaphase sont hybridées avec WCP1 (marqué en vert) ou WCP16 (marqué en rouge). Le chromosome 1 remanié est hybridé avec la sonde WCP1 alors que la sonde WCP16 confirme la trisomie 16 et la translocation d'une partie de chromosome 16 sur le bras long du chromosome 10 (Figure C).

Les cellules ROSA KIT^{WT} en métaphase sont hybridées avec la sonde TP53 (marqué en rouge) et une sonde de centromère de chromosome 17 (marqué en vert). On note la présence de deux signaux verts et l'absence de signal rouge, indiquant le caractère dicentrique du chromosome 17 et confirmant la perte d'une copie du gène TP53 (figure D). Après 12 mois de culture, les cellules sont hybridées avec la sonde EGR1 (5q31) (marqué en vert), CSF1R (5q33) (marqué en rouge) et hTERT (5p15) (marqué en bleu) (figure E et F). Visualisation d'une trisomie 5 (E). Ce profil est présent dans 2/15 métaphases. (F) Présence de 2 chromosomes 5 normales, hybridés avec les 3 sondes, et d'un troisième chromosome 5 qui présente une délétion en 5q (del 5q), avec une perte d'EGR1 et de CSF1R tandis que la sonde hTERT reste sur le bras court du chromosome remanié. Ce profil a été observé dans 10/15 métaphases analysées.

IV-2.1 Etude du caryotype des 3 lignées cellulaires

Des analyses de cytogénétiques et d'hybridation *in situ* (FISH) ont été effectuées sur les lignées ROSA afin de détecter des aberrations chromosomiques ou d'identifier certains aspects du génome de l'individu comme le sexe par exemple (XX ou XY). Le caryotype de la lignée ROSA KIT^{WT} de départ est le suivant :

47,XY,der(1)inv(1)(p31q21)del(1)(q24q32),+52/47,s1,der(10)t(10;16)(q26;q24),idic(17)(q10)8/48, sd11,+164 (figure 31 A).

Douze mois après le début de la culture, le caryotype de la lignée ROSA KIT^{WT} présente une évolution (Figure 31 B) avec la perte des anomalies secondaires y compris idic 17q avec apparition d'un sous clone présentant une trisomie 5 partielle. Par ailleurs, le caryotype de la lignée ROSA KIT^{D816V} et celui de la lignée ROSA KIT^{Delta 417-419 insY} sont similaires au caryotype de ROSA KIT^{WT} cultivées pendant 12 mois.

Les résultats de l'analyse FISH confirment ceux obtenus avec le caryotype et confirme également la perte d'une copie de gène TP53 résultant de l'isochromosomie dicentrique du bras long du chromosome 17 (17q idic) (Figure 31 C et 31 D). La trisomie 5 partielle et complète est également confirmée par cette technique (figure 31 E et 31 F).

IV-2.2 Etude de l'activité télomérase dans les 3 lignées cellulaires par méthode TRAP

Chaque réplication de l'ADN implique une perte d'au moins une dizaine de nucléotides au niveau des télomères, à l'extrémité des chromosomes. Les cellules immortelles doivent donc posséder un mécanisme permettant d'éviter l'attrition totale des télomères. En effet, Greider et Blackburn ont montré en 1985 que des extraits cellulaires de *Tetrahymena* (famille des ciliés) contiennent une activité permettant l'ajout des séquences répétées TTGGGG à la suite d'amorces télomériques (Greider et Blackburn 1985). L'enzyme impliquée dans ce processus est la télomérase.

La télomérase est une enzyme douée d'une activité transcriptase inverse, qui permet de rallonger les extrémités télomériques par addition des séquences spécifiques répétées, et ainsi de limiter leur érosion au cours des divisions cellulaires. La télomérase humaine est une ribonucléoprotéine composée d'une sous unité catalytique à activité transcriptase inverse, hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase) et d'une sous-unité ribonucléique composée d'une matrice d'ARN, hTR (human Telomerase RNA) permettant l'addition de séquences TTAGGG à l'extrémité 3' du télomère.

La détection de l'activité de la télomérase dans des échantillons biologiques peut être réalisée grâce à la méthode TRAP (Telomere Repeat Amplification Protocol). Cette technique est composée de deux phases, la première permet l'élongation *in vitro* d'un fragment télomérique synthétique par la télomérase contenue dans l'extrait cellulaire, la deuxième permet la détection de ces produits d'élongation (Chaves-Dias et al. 2001).

Dans le but d'analyser si les 3 lignées disposent d'une activité télomérase, un test TRAP a été effectué et les résultats obtenus montrent que les 3 lignées cellulaires possèdent une activité télomérasique, ce qui peut expliquer leur immortalisation.

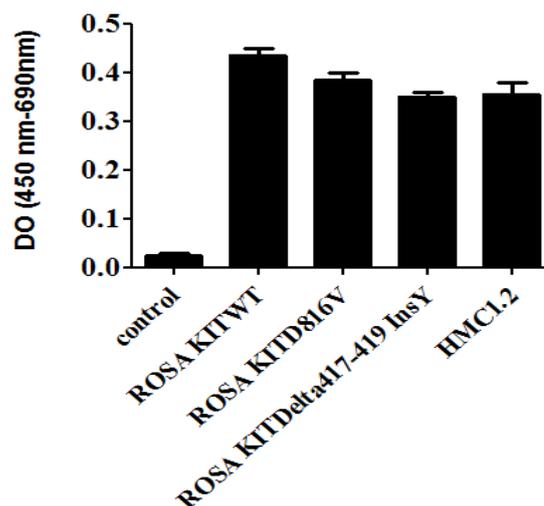


Figure 32 : Etude de l'activité télomérase par méthode TRAP dans les 3 lignées cellulaires : 1 µg de protéine a été testée pour chaque échantillon. Un contrôle négatif (eau stérile) a été testé en parallèle. Les échantillons ont été considérés comme positifs pour l'activité télomérasique lorsque la valeur différentielle d'absorbance (entre 450 et 620 nm) était supérieure à 0,2. Le contrôle positif devait avoir une valeur différentielle d'absorbance supérieure à 1,5 et le contrôle négatif une valeur différentielle d'absorbance inférieure à 0,25. Les résultats montrés sont représentatifs d'au moins deux expériences indépendantes.

IV-2.3 Caractérisation morphologique des ROSA KIT^{D816V} et ROSA KIT^{Delta 417-419 insY}.

L'aspect cytotologique des cellules a été analysé après coloration au bleu de toluidine et coloration de May-Grünwald Giemsa (MGG). Après coloration au MGG, les cellules de la lignée ROSA KIT^{Delta 417-419 insY} apparaissent relativement immatures avec un cytoplasme basophile avec peu ou pas de granulations (figure 33 C). Par contre, les cellules de la lignée ROSA KIT^{D816V} apparaissent beaucoup plus matures avec présence dans le cytoplasme de nombreuses granulations rouge violacé. On note aussi la présence de cellules en apoptose, phénomène susceptible d'être lié à la maturation excessive induite par l'introduction du mutant KIT^{D816V} (Figure 33 A). La coloration de Wright-Giemsa (figure 33 B) met en évidence un aspect fusiforme des cellules ROSA KIT^{D816V}.

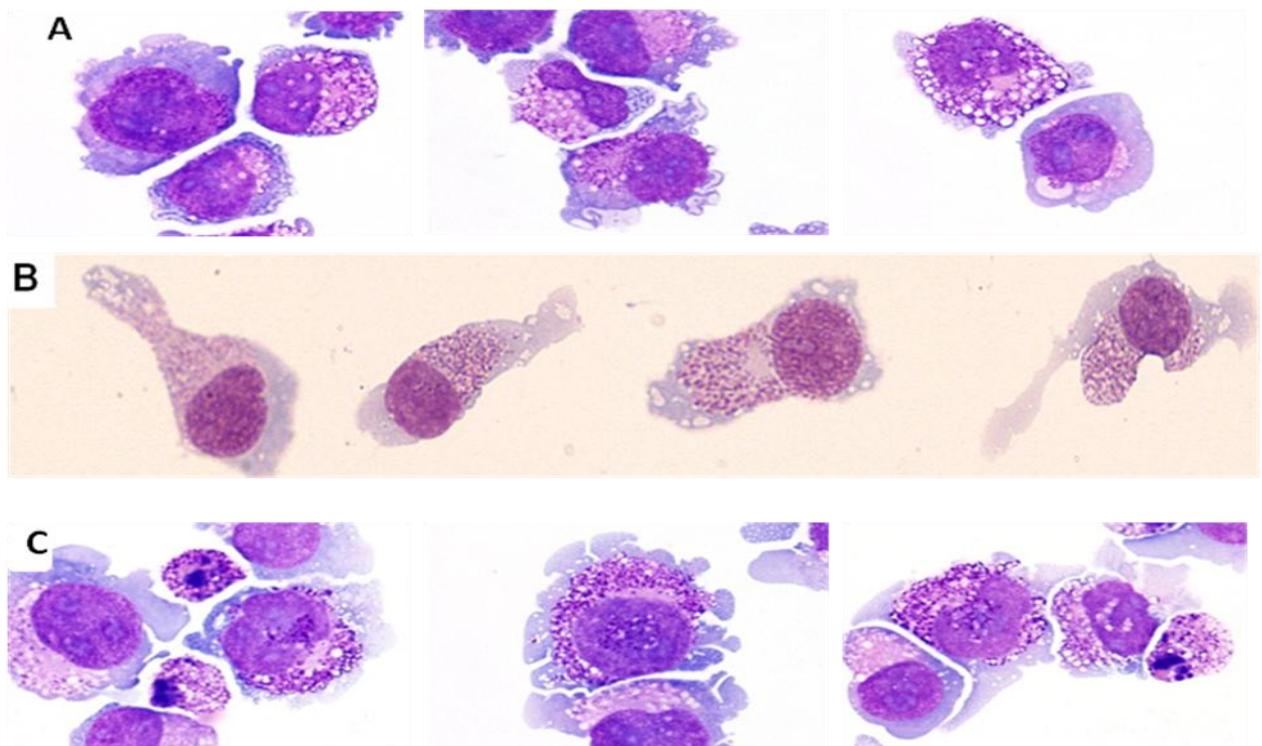


Figure 33 : caractérisation cytotologique des cellules ROSA KIT^{D816V} et ROSA KIT^{Delta 417-419 insY} : les cellules ROSA KIT^{D816V} (A) et ROSA KIT^{delta 417-419 insY} (C) ont été déposées sur des lames par cyto centrifugation et colorées par le May-Grünwald Giemsa (MGG). Un frottis fait à partir d'une suspension de cellules ROSA KIT^{D816V} (B) a été coloré par le Wright-Giemsa. Grossissement x 500. Les lames ont ensuite été observées par microscopie optique à immersion.

IV-2.4 Effet du traitement par IL-4 et par l'IgE sur l'expression de KIT et de FcεRI au niveau des cellules

ROSA KIT^{D816V} et ROSA KIT^{Delta 417-419 insY}

Nous avons testé également l'effet de l'IL-4 et de l'IgE sur l'expression du FcεRI et de KIT par les cellules ROSA KIT^{D816V} et ROSA KIT^{Delta 417-419 insY}. Pour cela, les 2 lignées cellulaires sont traitées ou non par l'IL-4 (20 ng/mL) et l'IgE (2μg/mL) pendant 5 jours puis analysées par cytométrie de flux pour l'expression du FcεRI et de KIT.

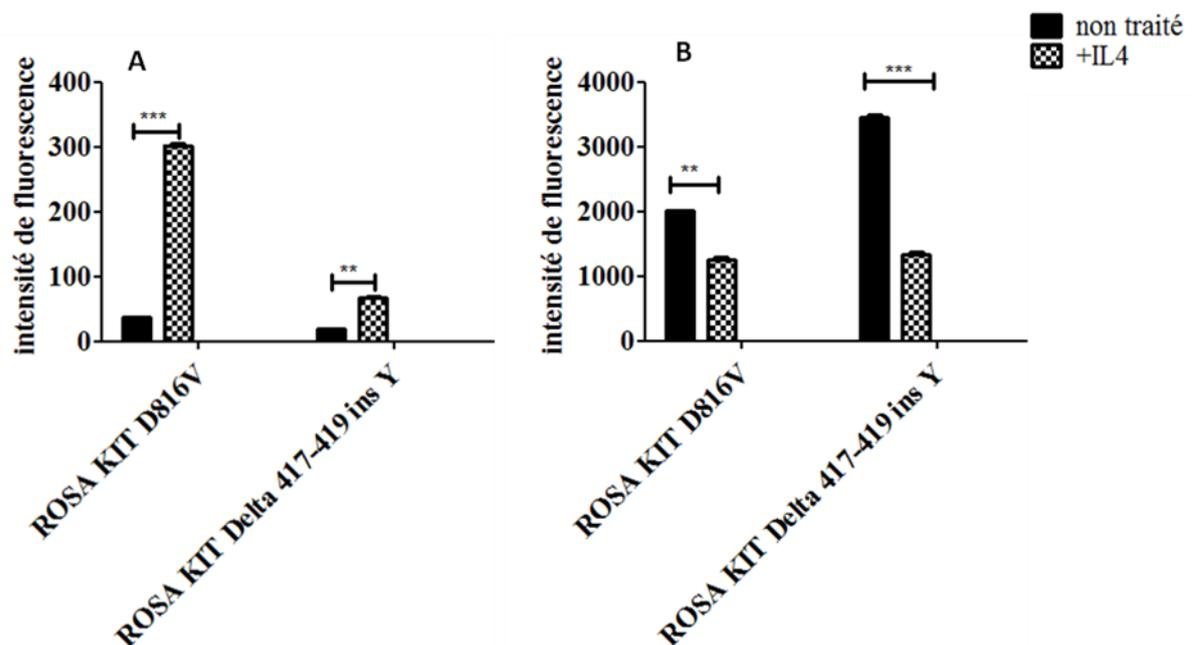


Figure 34 : Etude par cytométrie en flux de l'effet de l'IL-4 et de l'IgE sur l'expression du FcεRI (A) et KIT (B) par les cellules ROSA KIT^{D816V} et ROSA KIT^{Delta 417-419 insY}. Les cellules sont traitées pendant 5 jours par IL-4 et IgE puis incubées avec l'anticorps dirigé contre la chaîne alpha (α) du récepteur à haute affinité aux IgE couplé à l'APC (A) ou l'anticorps anti KIT (CD117) humain couplé à l'APC (B). Les résultats sont exprimés en termes d'intensité de fluorescence. Les étoiles ** ou *** indiquent que les résultats sont significativement différents des valeurs obtenues avec les ROSA KIT^{D816V} et ROSA KIT^{Delta 417-419 insY} non traitées. (** : p< 0,005, *** : p<0,001). Les résultats présentés sont représentatifs d'au moins deux expériences indépendantes.

Les résultats obtenus (figure 34) montrent que le traitement par IL-4 et IgE des deux lignées cellulaires induit une augmentation de l'expression du récepteur de haute affinité pour les IgE (FcεRI) et une diminution de l'expression de KIT d'une manière comparable à celle obtenue avec la lignée ROSA KIT^{WT} (voir figure 25).

IV-2.5 Effet du rhSCF sur l'expression de CD203c, CD38 et KIT sur les 3 lignées cellulaires

Nous avons également voulu explorer l'effet du traitement par le rhSCF sur l'expression du CD203c, du CD38 et de KIT par les 3 lignées cellulaires ROSA.

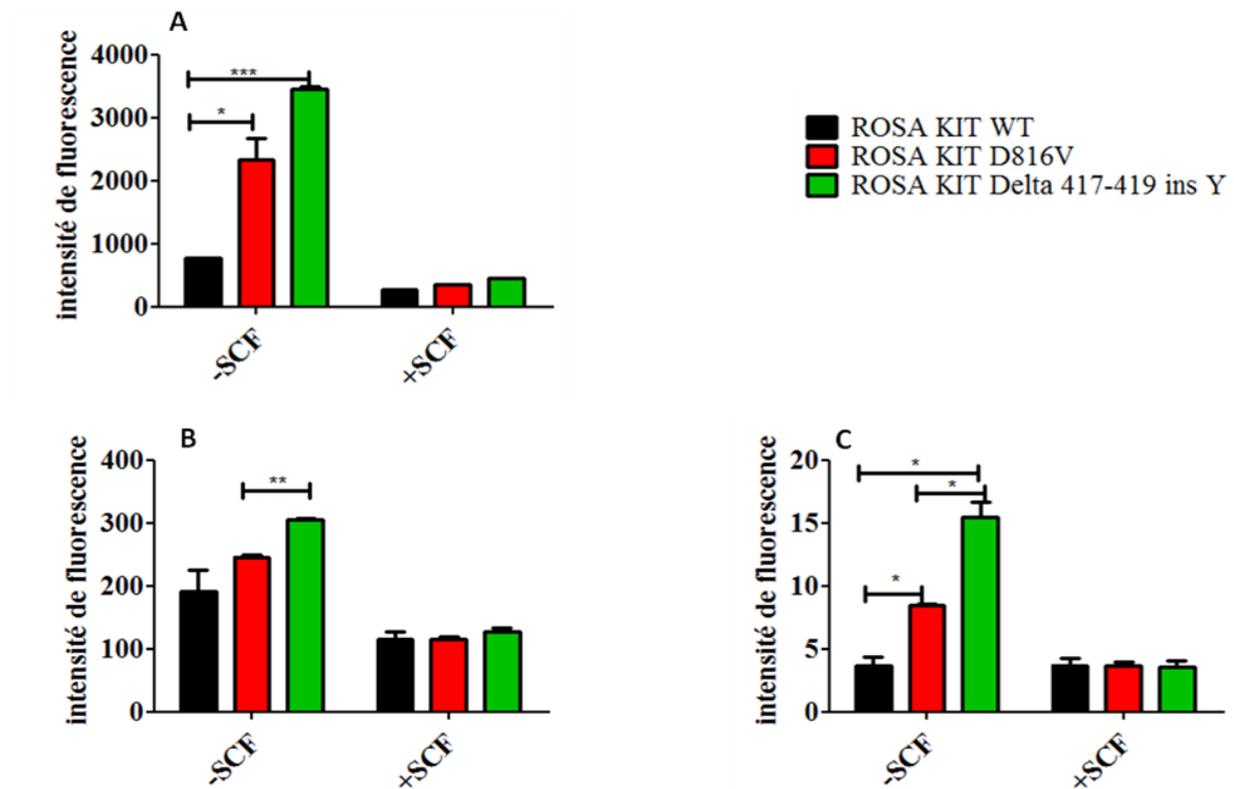


Figure 35 : Etude par cytométrie en flux de l'effet du SCF sur l'expression de CD38, de KIT et de CD203C par les 3 lignées cellulaires: les cellules sont traitées ou non par rhSCF (80 ng/mL) pendant 24 heures puis incubées avec l'anticorps anti KIT (CD117) humain couplé à l'APC (A), l'anticorps dirigé contre le CD203 couplé à l'APC (B) ou l'anticorps anti CD38 couplé à l'APC (C). Les résultats sont exprimés en termes d'intensité de fluorescence. (* : p < 0,05, ** : p < 0,005, *** : p < 0,001). Les résultats présentés sont représentatifs d'au moins deux expériences indépendantes.

D'après cette expérience, on remarque que les lignées ROSA KIT^{D816V} et ROSA KIT^{Delta417-419InsY}, en absence de SCF, expriment des niveaux significativement plus élevés de CD203c, de CD38 et de KIT par rapport à la lignée ROSA KIT^{WT}. Fait intéressant, cette augmentation d'expression de ces récepteurs est abolie en présence de rhSCF.

IV-2.6 Etude de la clonogénicité des 3 lignées cellulaires en milieu semi solide

Nous avons ensuite étudié la capacité des cellules des 3 lignées mastocytaires à former des colonies en milieu semi solide (méthylcellulose).

Tableau X : Etude de la clonogénicité des cellules ROSA KIT^{WT}, KIT^{Delta 417-419 insY} et KIT^{D816V} en milieu semi solide. 5000 cellules de chaque lignée sontensemencées dans des boîtes de pétri contenant 1 mL de milieu de culture supplémenté de méthylcellulose à 1% et de 20% de sérum de veau foetal. Quatre-vingt ng/mL de rh-SCF est ajouté également pour les cellules ROSA KIT^{WT}. Ces boîtes sont incubées, pendant 15 jours pour ROSA KIT^{WT} et 28 jours pour ROSA KIT^{D816V} et ROSA KIT^{Delta 417-419 insY}. Au bout de cette période, les colonies de plus de 50 cellules sont comptées.

Lignée cellulaire	Nombre de colonies	Nombre de colonies	Nombre de colonies	Moyenne	% de clonogénicité
	boite1	boite 2	boite 3		
ROSA KIT WT	238	408	372	333±89	6,8±1,7
ROSA KIT Δ 417-419 insY	173	438	445	352±155	7,04±3,1
ROSA KIT D816V	203	117	292	204±87	4,08±1,7

Les résultats obtenus montrent que les 3 lignées mastocytaires ont une capacité de clonogénicité presque identique de l'ordre de 6%.

IV-2.7 Etude de l'activation des cellules de la lignée ROSA KIT^{D816V} et ROSA^{KITDelta417-419InsY} par le couple

IgE-anti IgE

Afin de savoir si les cellules des lignées ROSA KIT^{D816V} et ROSA KIT^{Delta417-419InsY} sont activables par le couple IgE-anticorps anti-IgE, les cellules ont été traitées par IL-4 (20ng/ml) et IgE (2µg/ml) pendant 5 jours puis stimulées par anti IgE (5 ou 10 µg/ml) ou par le calcium ionophore (Cai) (1 µmol/l) pendant 1 heure. Le surnageant ainsi que le culot sont utilisés pour doser la β-hexosaminidase. Par ailleurs, nous avons mesuré également l'expression de CD203c à la surface cellulaire.

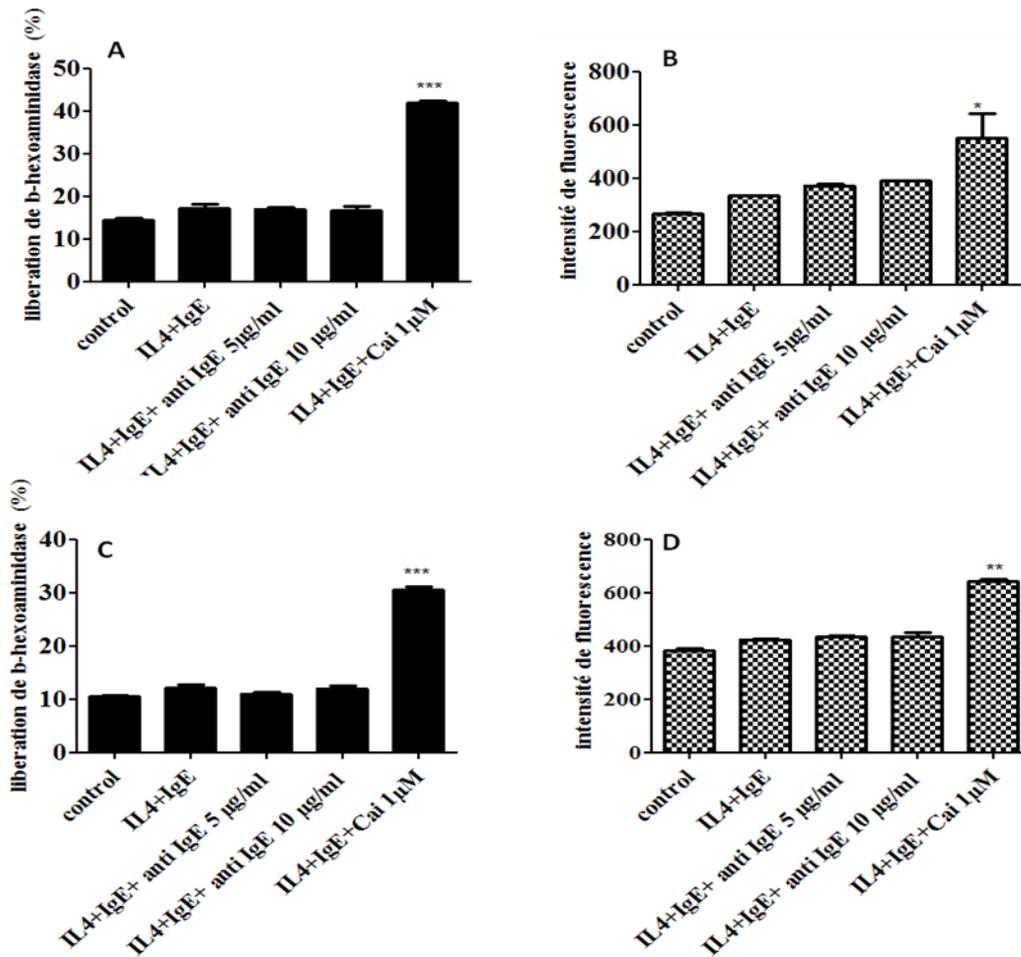


Figure 36 : Activation des cellules ROSA KIT^{D816V} (A et B) et ROSA KIT^{Delta417-419InsY} (C et D) par le couple IgE-anti IgE: les cellules sont sensibilisées pendant 5 jours par IL-4 (20ng/mL) et IgE (2µg/mL) puis stimulées par l'anticorps anti-IgE à différentes concentrations ou par le calcium ionophore à 1µM. Après 1 heure de stimulation, les cellules sont incubés avec l'anticorps CD203c couplé à l'APC pendant 1 heure et les résultats sont exprimés en termes de MFI (B et D).Après 1 heure de stimulation, le surnageant et le culot des cellules sont utilisés pour doser le % de libération de la β-hexosaminidase (A et C) par les cellules. Les étoiles *, ** ou *** indiquent que les résultats sont significativement différents des valeurs obtenues avec les ROSA KIT^{D816V} et ROSA KIT^{Delta417-419InsY} non traitées. (* : p<0,05, ** : p<0,005, *** : p<0,001). Les résultats présentés sont représentatifs deux expériences indépendantes.

On peut remarquer qu'il n'y a pas d'augmentation de l'expression de CD203c, ni de libération de la β-hexosaminidase par les cellules ROSA KIT^{D816V} et ROSA KIT^{Delta417-419InsY} stimulées par l'anticorps anti-IgE, ce qui reflète la non-activation des ROSA KIT^{D816V} et ROSA KIT^{Delta417-419InsY} par le couple IgE/anti-IgE.

IV-2.8 Etude de la phosphorylation de KIT, AKT et STAT5 dans les 3 lignées cellulaires ROSA

Pour déterminer si les lignées cellulaires transfectées par KIT muté présentaient une activation constitutive de KIT, nous avons examiné par western blot la phosphorylation de la tyrosine 703 de ce

récepteur en présence et absence de rhSCF pendant 24 heures et cela en le comparant avec la lignée HMC1.2. Nous avons également analysé le taux de phosphorylation d'AKT et de STAT5 dans les différentes lignées cellulaires.

Les résultats obtenus (Figure 37 A) montrent qu'en absence de rhSCF, il existe une phosphorylation constitutive de KIT dans les lignées ROSA KIT^{D816V} et ROSA KIT^{Delta417-419InsY} ainsi que dans la lignée HMC1.2, tandis que la lignée ROSA KIT^{WT} présente un niveau de phosphorylation beaucoup plus faible. La stimulation par rhSCF entraîne une augmentation du niveau de phosphorylation dans les ROSA KIT^{WT} et dans les ROSA KIT^{D816V} et ROSA KIT^{Delta417-419InsY}, mais pas dans les cellules HMC1.2.

Nous avons également analysé le niveau de phosphorylation de la sérine 473 d'AKT dans les différentes lignées cellulaires (figure 37 B). Les résultats obtenus montrent que la phosphorylation d'AKT dans la lignée ROSA KIT^{WT} nécessite la présence de rhSCF alors que dans les lignées ROSA KIT^{D816V} et ROSA KIT^{Delta417-419InsY}, AKT est constitutivement phosphorylée en absence de rhSCF.

Enfin, nous avons démontré la phosphorylation constitutive de STAT-5 dans les ROSA KIT^{D816V} et ROSA KIT^{Delta417-419InsY} mais pas dans la lignée ROSA KIT^{WT} et cela même en présence de rhSCF (Figure 37 C). Il faut noter également que le taux de phosphorylation de STAT-5 n'est pas modifié par le rhSCF dans les ROSA KIT^{D816V} et ROSA KIT^{Delta417-419InsY} mais qu'il est augmenté dans la lignée HMC1.2 en présence de cette cytokine.

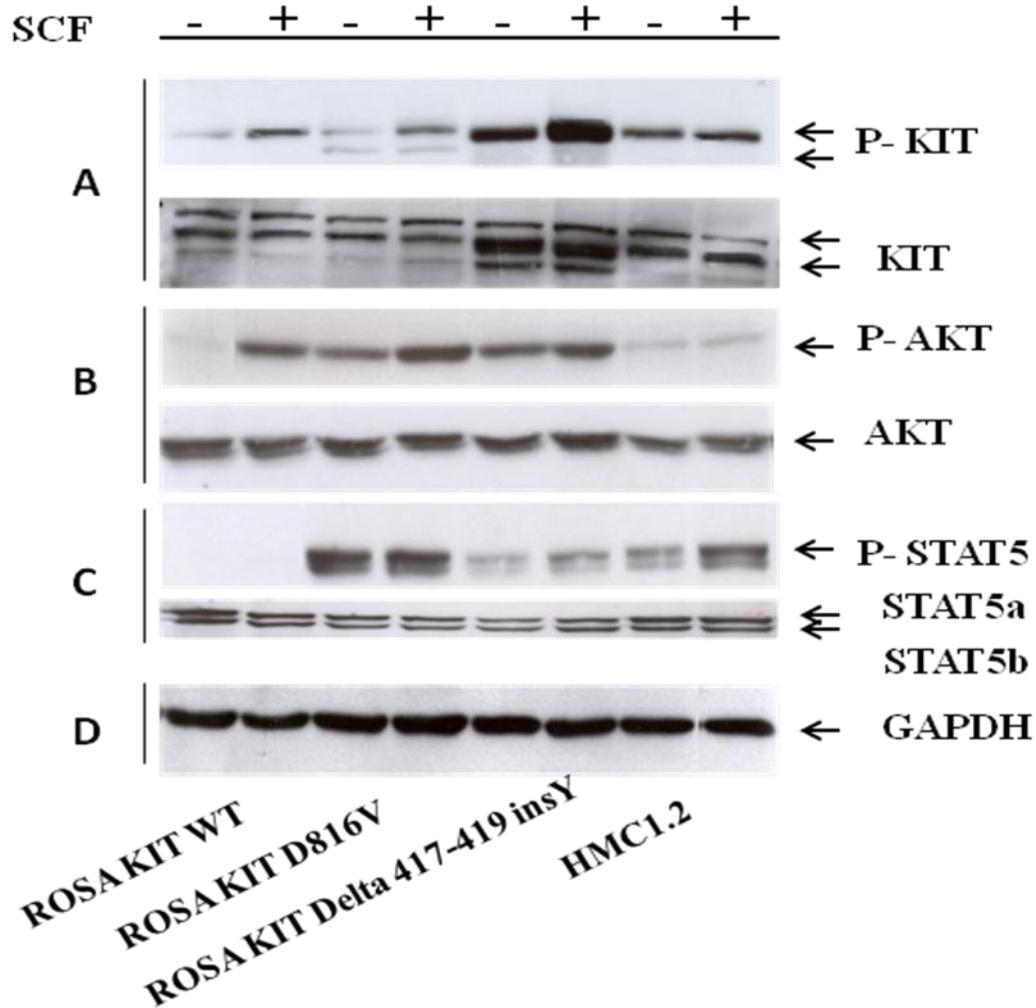


Figure 37 : Démonstration par western blot de la phosphorylation constitutive de KIT, AKT et STAT5 dans les cellules ROSA KIT^{D816V} et ROSA KIT^{Delta417-419insY} : Les cellules ont été stimulées ou non par rhSCF pendant 10 minutes puis lysées. Les lysats des cellules ont été migrés sur membrane et les membranes ont ensuite été incubées avec un anti phospho KIT Y703 ou KIT (A), un anti phospho AKT S473 ou un anti KIT (B), un anti phospho STAT5 Y694 ou STAT5 (C). Le GAPDH (D) est utilisé comme gène de référence.

IV-2.9 Evaluation des effets antiprolifératifs de trois inhibiteurs de tyrosine kinase sur les cellules ROSA

Nous avons testé l'effet de trois inhibiteurs de tyrosine kinase, à savoir l'imatinib, le dasatinib et la midostaurine (PKC412) sur la prolifération des 3 lignées mastocytaires humaines.

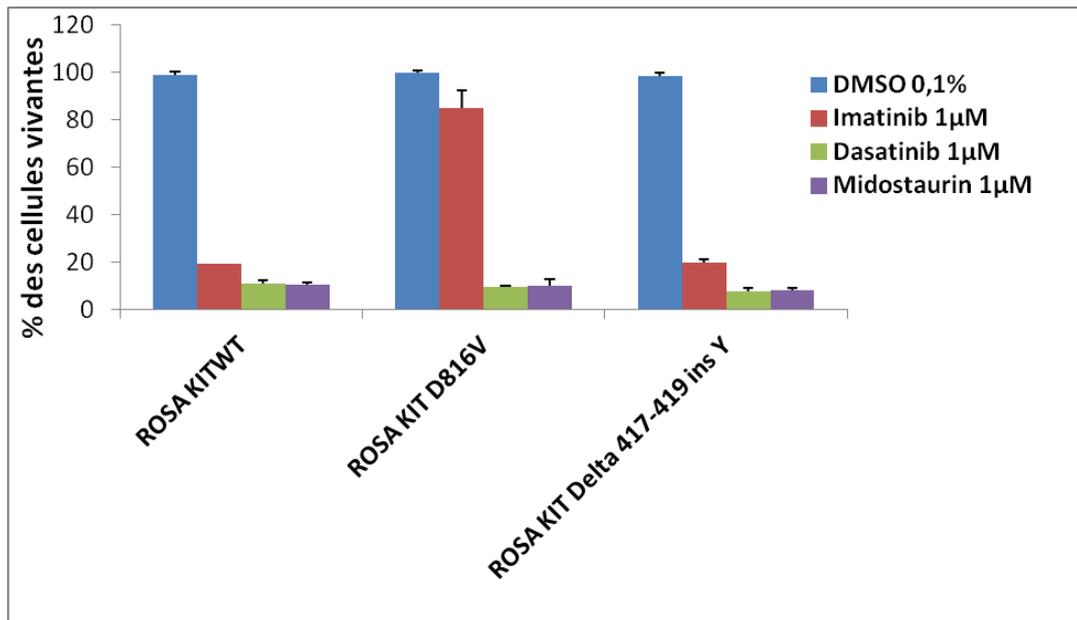


Figure 38 : Effet de trois inhibiteurs de tyrosine kinase sur la prolifération des 3 lignées cellulaires ROSA : les cellules ont étéensemencées en présence d’imatinib, de dasatinib, de midostaurine (PKC412) ou de DMSO 0,1%(condition contrôlé) à 1µM pendant 48 heures. Le nombre de cellules vivantes a été ensuite mesuré pour chaque condition et les résultats sont présentés en pourcentage par rapport au contrôlé DMSO: (DO moyenne des cellules traitées/DO moyenne des cellules contrôlés) x 100 ± écart-type.

Les résultats obtenus sont présentés dans figure 38 et sont cohérents avec ceux de la littérature (Shah *et al.* 2006). En effet, Ces résultats montrent que le dasatinib et la midostaurine sont capables d’inhiber les 3 lignées cellulaires alors que l’imatinib était incapable d’inhiber la prolifération des cellules ROSA KIT^{D816V} alors que les lignées ROSA KIT^{Delta417-419InsY} et ROSA KIT^{WT} sont sensibles à l’effet inhibiteur de l’imatinib (inhibiteur de KIT WT ou muté dans le domaine extracellulaire).

IV-2.10 Evaluation de l’effet antiprolifératif d’un inhibiteur d’AKT sur les cellules ROSA KIT^{D816V} et ROSA KIT^{WT}

Afin d’évaluer l’effet d’un inhibiteur d’AKT sur la prolifération des lignées ROSA KIT^{D816V} et ROSA KIT^{WT}, nous avons traité les deux lignées cellulaires avec différentes concentrations d’un inhibiteur spécifique d’AKT1/AKT2, le composé A6730 (0,01 à 5M).

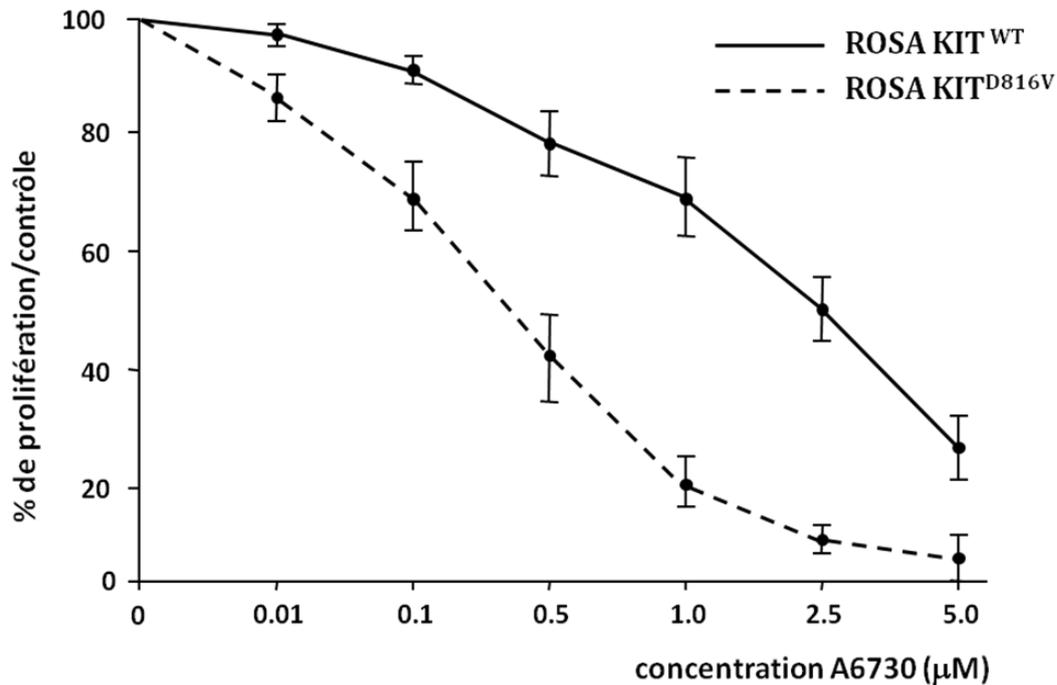


Figure 39 : Effet d'un inhibiteur d'AKT, le A6730 sur la prolifération des lignées ROSA KIT^{D816V} et ROSA KIT^{WT}: les cellules ont étéensemencées en présence de différentes concentrations d'A6730 (0,01 à 5M) ou de DMSO 0,1%(condition contrôle) pendant 48 heures. Le nombre de cellules vivantes a été ensuite mesuré pour chaque condition et les résultats sont présentés en pourcentage par rapport au contrôle DMSO: (DO moyenne des cellules traitées/DO moyenne des cellules contrôles) x 100 ± écart-type.

Les résultats obtenus nous ont permis de déterminer l'IC50 de l'inhibiteur sur les ROSA KIT^{WT} et ROSA KIT^{D816V}. On remarque que l'IC50 du composé A6730 est de l'ordre de 3 µM pour les cellules ROSA KIT^{WT} alors que le même composé inhibe à 50% la prolifération des cellules ROSA KIT^{D816V} à une concentration de 0,5 µM, suggérant ainsi que la phosphorylation d'AKT est critique pour l'effet transformant de KIT^{D816V}.

IV-2.11 Evaluation du pouvoir tumorigène des cellules ROSA KIT^{WT} et ROSA KIT^{D816V} dans des souris NSG

Nous avons ensuite cherché à déterminer si les deux lignées cellulaires ROSA KIT^{WT} et ROSA KIT^{D816V} pouvaient être greffées dans des souris NSG (NOD-SCID IL-2 γ KO).

Pour ce faire, des cellules ROSA KIT^{WT} et ROSA KIT^{D816V} ont été injectées à des souris NSG par voie intraveineuse ou en sous-cutanée. Dès que les symptômes de la maladie sont apparus ou après une

période maximale de six mois, les souris ont été sacrifiées et, en fonction du site d'injection, des échantillons de la moelle osseuse ou des dispersas de tumeurs sous-cutanées ont été analysés par cytométrie en flux pour 2 marqueurs humains CD117/CD45. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau XI ci-dessous.

Tableau XI : test de tumorigénicité des cellules ROSA KIT^{WT} et ROSA KIT^{D816} chez les souris NSG : étude du développement de tumeurs ou de l'infiltration médullaire suivant l'injection en sous-cutanée ou en intraveineuse de 5X10⁶ cellules ROSA KIT^{WT} ou 0,4X10⁶ cellules ROSA KIT^{D816V}.

	Nombre de cellules injectées X10 ⁶	Prise de greffe au niveau de la moelle osseuse (positive/total)*	Moyenne de la prise de greffe des souris injectées en intraveineuse (%)	Développement des tumeurs sous cutanées (positive/total)**
ROSA KIT ^{WT}	5	4/5 (18 semaines)	2,62%	1/5
ROSA KIT ^{D816V}	0,4	4/4 (21 semaines)	52%	1/4

Les résultats montrent que presque toutes les souris injectées en intraveineuse avec les deux lignées cellulaires ROSA KIT^{WT} et ROSA KIT^{D816V}, présentent une prise de greffe dans la moelle osseuse. Cependant, le pourcentage des cellules CD45+/CD117+ dans la moelle osseuse est significativement plus élevé chez les souris injectées avec les cellules ROSA KIT^{D816V} (52%) par rapport aux souris injectées par les cellules ROSA KIT^{WT} (2,62%).

Chez les souris injectées en sous-cutanée, les données sont moins claires puisqu'une souris sur 5 a développé une tumeur en sous-cutanée lorsqu'elles ont été injectées avec ROSA KIT^{WT} et une souris sur 4 quand elles ont été injectées avec ROSA KIT^{D816V}.

Par ailleurs, les cellules de la moelle osseuse des souris sacrifiées ont été cytocentrifugées et colorées par le MGG.

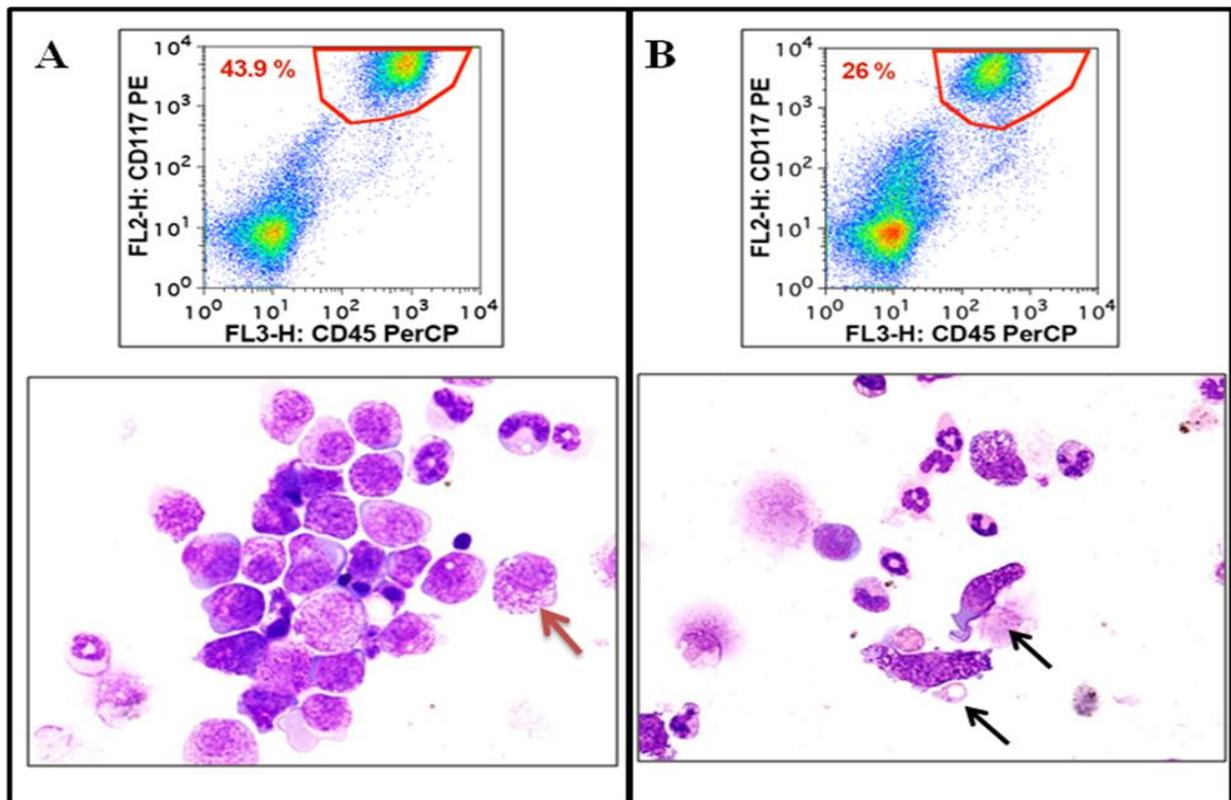


Figure 40 : caractérisation cytologique des cellules ROSA KIT^{WT} et ROSA KIT^{D816V} greffées en intraveineuse dans des souris NSG: les cellules de la moelle osseuse des souris NSG greffées avec ROSA KIT^{WT} (A) ou ROSA KIT^{D816V} (B) ont été analysées pour leur expression de CD45+/CD117+ (A et B, panel supérieur). Les cellules ont été également déposées sur lame par cyto centrifugation et colorées avec le MGG puis observées en microscopie optique (panel inférieur). Les mastocytes issus des souris greffées par ROSA KIT^{WT} présentent une forme arrondie, semblable à celle observée dans la culture *in vitro* (flèche rouge) alors que les mastocytes issus des souris NSG greffées par ROSA KIT^{D816V} ont un aspect fusiforme (flèches noires). Grossissement X200.

Les résultats obtenus (Figure 40) montrent les cellules ROSA KIT^{WT} greffées en intraveineuse, et envahissant la moelle osseuse des souris, gardent un aspect morphologique comparable à celui observé *in vitro*, alors que les cellules ROSA KIT^{D816V} prennent un aspect fusiforme comparable à celui observé sur le frottis ou dans la moelle osseuse des patients atteints de mastocytose systémique.

IV-2.12 Corrélation entre le pourcentage des cellules CD45+/CD117+ et les cellules tryptase + et chymase+

Nous avons tout d'abord étudié, chez les souris injectées par ROSA KIT^{D816V} en intraveineuse, la corrélation entre le pourcentage de cellules CD45+/CD117+ et les cellules tryptase + et les résultats obtenus sont présentés dans la figure 41 ci-dessous :

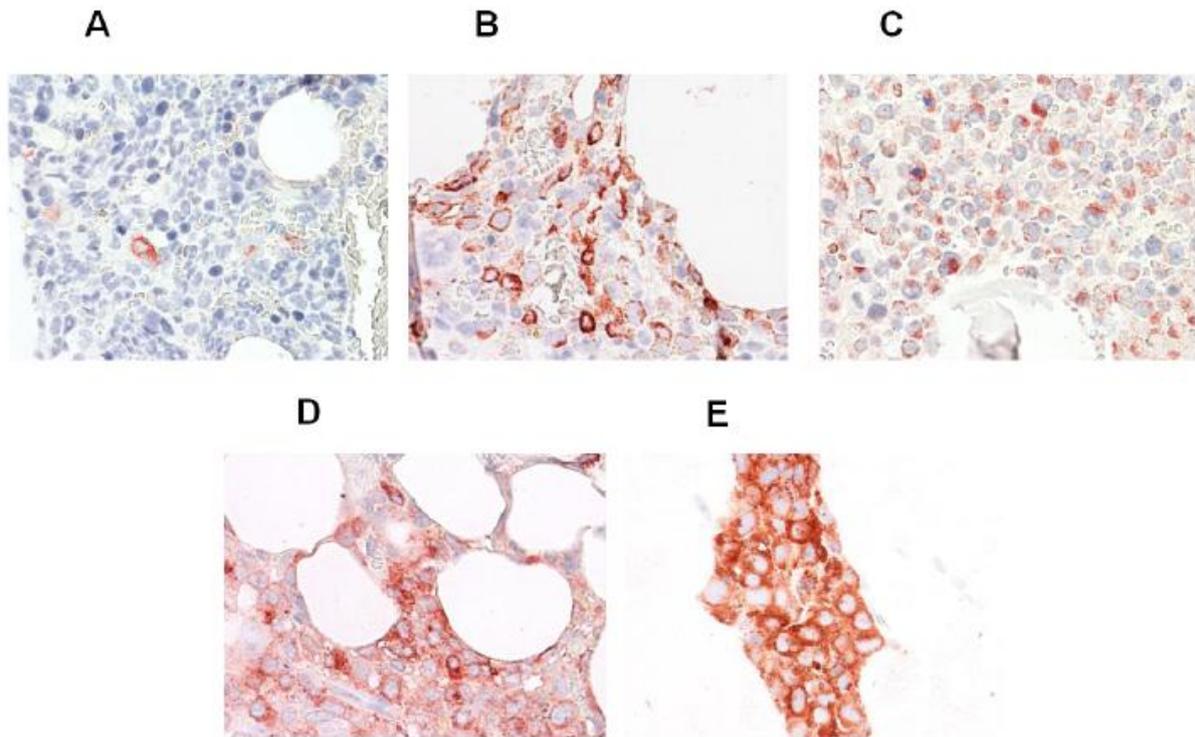


Figure 41 : Corrélation entre le pourcentage de cellules CD45+/CD117+ mesuré par cytométrie en flux et le marquage de la tryptase chez la souris NSG greffée avec les ROSA KIT^{D816V}. (A) 7% de cellules CD45+/CD117+ par FACs, (B) 37% de cellules CD45+/CD117+ par FACs, (C) 66% de cellules CD45+/CD117+ par FACs, (D) 76% de cellules CD45+/CD117+ par FACs, (E) 100% de cellules CD45+/CD117+ par FACs au niveau d'une tumeur sous-cutanée. Pour le marquage de la tryptase, les cellules ont été incubées avec l'anticorps anti-tryptase comme décrit précédemment. Grossissement X100.

On remarque qu'il existe une corrélation étroite entre le pourcentage de cellules CD45+/CD117+ et l'intensité du marquage de la tryptase. En effet, plus il y a de cellules CD45+/CD117+, plus il y a de cellules tryptase positives, ce pourcentage pouvant atteindre 100% de cellules tryptase + au niveau de tumeurs locales.

Etant donné que la nature du microenvironnement peut influencer le phénotype des mastocytes, nous nous sommes ensuite demandés s’il pouvait exister une différence d’expression de chymase entre les cellules KIT^{D816V} greffées en sous-cutanée ou en intraveineuse. Les résultats, présentés dans le tableau ci-dessous, montrent qu’il y a une nette augmentation d’expression de la chymase dans les cellules injectées en sous-cutanée par rapport aux cellules greffées dans la moelle osseuse qui sont restées négatives pour la chymase.

Tableau XII : Expression du CD117 et de la chymase dans les cellules ROSA KIT^{D816V} greffées dans des souris NSG développant des tumeurs. Les souris NSG ont été injectées en intraveineuse ou sous-cutanée avec des cellules ROSA KIT^{D816V}. Les souris malades ont été sacrifiées et les cellules de la moelle osseuse ont été obtenues à partir des fémurs, des tibias et des humérus, tandis que les cellules issues des tumeurs sous-cutanées ont été recueillies et dispersées par digestion à la collagénase. Le pourcentage de cellules CD117+ a été déterminé pour chaque échantillon par cytométrie en flux. Un marquage immunocytochimique de la chymase a été réalisé sur des lames d’échantillons de moelle osseuse ou de tumeur fixés par le formol. Le pourcentage de cellules chymase + a été déterminé en utilisant un système de score.

Numéro	ROSA injecté	Cytométrie de flux CD117 (%)	IHC chymase
Tumeur sous cutané P751	D816V	58	+
Tumeur sous cutané P752	D816V	58	-/+
P757 MO	D816V	66	-
P761 MO	D816V	76	-

V – DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Notre équipe utilise de façon routinière une technique de culture en milieu liquide en présence continue de Stem Cell Factor (SCF) pour obtenir des populations pures de mastocytes humains normaux en partant de cellules souches CD34+ de sang de cordon ombilical (*Royer et al. 2001*). Au bout de 8 à 10 semaines de culture, nous obtenons des populations pures (> 99%) de mastocytes qui ne prolifèrent plus et qui ne sont pas congelables. Ces cellules sont ensuite utilisées dans des tests d'activation IgE-dépendants. Les inconvénients majeurs de ce type de culture primaire sont les suivants:

- Il est nécessaire de mettre en culture de façon répétée des cellules CD34+ provenant de différents sangs de cordon de façon à pouvoir disposer de quantités suffisantes de mastocytes tout au long des expériences, ceci ayant de plus un coût élevé lié aux réactifs utilisés pour la purification des cellules CD34+,

- Le rendement d'obtention des mastocytes en fin de culture est extrêmement variable d'un sang de cordon à un autre,

- Les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des mastocytes obtenus en fin de culture varient d'un sang de cordon à l'autre. Les expériences nécessitent donc d'être renouvelées avec plusieurs lots de mastocytes pour obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Afin de contourner ces difficultés, il serait souhaitable de disposer d'une lignée de mastocytes humains de phénotype le plus proche possible des mastocytes normaux, exprimant le récepteur FcεRI, pouvant être activés par ce récepteur, ayant un temps de doublement compatible avec une production en masse, facilement congelable, et dont les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles restent stables dans le temps. Or, une telle lignée n'existe pas à l'heure actuelle. En effet, les lignées mastocytaires humaines actuellement disponibles sont les suivantes:

- Lignée HMC-1 dérivées du sang périphérique d'un patient atteint de leucémie à mastocyte (*Butterfield et al. 1988*). 2 sous clones ont été caractérisés : le sous-clone HMC-1.1, présente une mutation juxtamembranaire KIT V560G et le sous-clone HMC-1.2 présente deux mutations de KIT (V560G et

D816V). Outre le fait qu'il s'agit d'une lignée leucémique, son inconvénient majeur est qu'elle n'exprime absolument pas le récepteur FcεRI et n'est donc pas activable par ce biais. Ce n'est donc pas un modèle utilisable pour le criblage de molécules à activité anti-allergique potentielle.

- Lignée LAD-2 et ses sous-clones: il s'agit d'une lignée mastocytaire dérivée de la moelle osseuse d'un patient atteint d'un sarcome à mastocyte (*Kirshenbaum et al. 2003*) et qui exprime le récepteur de haute affinité aux IgE. Cette lignée qui reste dépendante du SCF pour sa survie et sa prolifération est donc potentiellement intéressante mais, outre le fait qu'elle a été obtenue à partir d'un prélèvement tumoral, son temps de doublement très long de l'ordre de 15 jours la rend impropre à l'utilisation dans des tests de criblage à haut débit qui nécessitent l'obtention simultanée d'un grand nombre de cellules. Par ailleurs, ayant un récepteur KIT de structure normale, cette lignée ne peut pas être utilisée pour étudier le rôle transformant des mutants de KIT retrouvés au cours des mastocytoses.

- Lignée LUVA: il s'agit d'une lignée dérivée de cellules de sang périphérique d'un patient allergique. (*Laidlaw et al. 2011*) Elle est indépendante de tout facteur de croissance pour sa prolifération et ne présente pas le récepteur de haute affinité aux IgE. Là encore, c'est une lignée obtenue à partir d'un prélèvement effectué chez un patient non sain. En outre son temps de doublement long la rend aussi impropre à une utilisation dans le cadre d'un criblage *in vitro* à haut débit. Par ailleurs, ayant un récepteur KIT de structure normale, cette lignée ne peut pas être utilisée pour étudier le rôle transformant des mutants de KIT retrouvés au cours des mastocytoses.

Or, lors d'une de nos cultures routinières de cellules CD34+ obtenues à partir d'un sang de cordon normal, dans des conditions habituelles d'obtention de mastocytes, nous avons constaté qu'à l'inverse du comportement habituel de ce type de culture, non seulement la croissance cellulaire ne s'est par arrêtée au bout de 8 à 10 semaines de culture, mais qu'elle s'est poursuivie jusqu'à ce jour. Nous avons donc pu ainsi isoler et caractériser une nouvelle lignée mastocytaire humaine, qui reste dépendante du Stem Cell Factor pour sa survie et sa croissance, en culture continue depuis maintenant près de deux ans, que nous avons dénommée ROSA KIT^{WT}. Cette lignée est toujours dépendante de SCF, congelable et décongelable

de façon répétée en utilisant les méthodes de congélation classiques et clonogénique *in vitro* en milieu semi-solide.

De plus, les cellules de la lignée ROSA KIT^{WT} présentent une forte positivité pour la tryptase et possèdent un récepteur KIT de structure normale, dit wild type (WT) ou sauvage. Par ailleurs, elles expriment d'une manière constante le récepteur de haute affinité des IgE, FcεRI, dont l'expression peut être augmentée de façon significative par prétraitement avec de l'Interleukine 4 (IL-4) et/ou des IgE monomériques. Plusieurs études ont montré que l'ajout d'IL-4 dans une culture de mastocytes réduit l'expression du récepteur KIT (*Kulka et Metcalfe 2005*) et induit en plus une augmentation de l'expression du récepteur FcεRI, les rendant plus sensibles à la dégranulation (*Toru et al. 1996 ; Bischoff et al. 1999*).

Cette lignée exprime à sa surface le CD63 et le CD203c, qui sont des marqueurs présents à la surface des granules des mastocytes et des basophiles. L'augmentation d'expression de ces deux antigènes constitue un témoin de la dégranulation des mastocytes et des basophiles (*MacGlashan 2010*).

Ces cellules présentent le CD4, une glycoprotéine exprimée au niveau des mastocytes issus du cordon ombilical, mais également par les cellules régulatrices T, par les monocytes et les cellules dendritiques et qui est indispensable à l'interaction avec les molécules de CMH. De plus, CD4 est le récepteur utilisé par le VIH-1 pour infecter ces cellules (*Parmentier 1997 ; Li et al. 2001*).

Par ailleurs, les cellules ROSA présentent également le CD45 qui est une tyrosine phosphatase exprimé normalement par les mastocytes du cordon ombilical (*Nilsson et al. 1996*), et le CD9, molécule impliquée dans la régulation de la migration, l'adhérence et le homing des cellules CD34+ du sang du cordon ombilical (*Leung et al. 2011*).

Fait intéressant, ces cellules expriment également le CD300a (IRp60), qui est un récepteur inhibiteur possédant un motif ITIM exprimés aussi par les mastocytes issus du cordon ombilical. L'équipe de Bachelet a montré en 2005 que les mastocytes issus du cordon ombilical expriment d'une manière constitutive le CD300a (*Bachelet et al. 2005*) et que la coagrégation de ce récepteur avec le FcεRI provoque une inhibition de la dégranulation médié par les IgE (*Bachelet et al. 2006*). Pour évaluer le rôle

de ce récepteur *in vivo*, cette équipe a utilisé un modèle murin BALB/C dans lequel l'homologue murin de IRp60, LMIR1 (leukocyte mono-Ig-like receptor), a été neutralisé par des anticorps monoclonaux (Kumagai *et al.* 2003). Cette neutralisation a conduit à une libération plus importante de médiateurs de l'inflammation, ce qui peut constituer une nouvelle voie pour la régulation des réactions allergiques et des maladies associées aux mastocytes. Cette même équipe a montré en 2008 que la coagrégation de CD300a avec KIT sauvage induit une diminution de la survie des mastocytes issus du cordon ombilical ainsi qu'une inhibition de l'activation mastocytaire SCF-dépendante sur des cellules HMC-1 (Bachelet *et al.* 2008).

Une autre étude a montré que le CD300a ne stimule pas la phagocytose de cellules apoptotiques par les macrophages, mais plutôt qu'il inhibe la production des cytokines inflammatoires et de chimiokines par les mastocytes lors de sa liaison avec la phosphatidylserine qui constitue un signal pour phagocyter les cellules apoptotiques (Nakahashi-Oda *et al.* 2012).

Comme nous avons pu montrer que les cellules ROSA KIT^{WT} et ROSA KIT^{D816V} expriment fortement le CD300a, nous nous proposons d'étudier l'effet de la coagrégation de cette molécule avec FcεRI sur l'activation IgE-dépendante sur les premières cellules et avec KIT sur la prolifération sur les cellules KIT mutées.

En 1989, l'équipe d'Ishizaka avait montré que la culture *in vitro* à long terme des cellules mononucléées de sang de cordon ombilical en présence d'une sous-couche de fibroblastes 3T3 de souris, permet d'obtenir des mastocytes matures (Furitsu *et al.* 1989), et l'équipe d'accueil avait précédemment démontré que la culture de progéniteurs hématopoïétiques humains CD34+ sur une sous-couche de cellules lipoblastiques de souris (lignée MS-5) permettait la différenciation mastocytaire terminale de ces progéniteurs (Arock *et al.* 1994). De ce fait, nous nous sommes demandés si la coculture des cellules ROSA sur des cellules MS-5 pouvait induire leur maturation. Ainsi, nous avons pu montrer que la lignée ROSA KIT^{WT}, mais aussi les deux lignées ROSA présentant un KIT muté, pouvait maturer lors de la co-culture à long terme avec des sous-couches de cellules stromales, ceci se traduisant par exemple par une augmentation très nette du nombre de granulations dans les cellules ou par l'induction de l'expression de

la chymase (figures 27,28 et 29). Ces lignées co-cultivées constituent ainsi un nouveau modèle de mastocytes humains matures et permettent de s'affranchir du problème constitué par l'immaturation des mastocytes obtenus par culture primaire de progéniteurs de sang de cordon.

La lignée ROSA KIT^{WT} a un temps de doublement de 48 heures, et activable par le couple IgE-anticorps anti-IgE conduisant à une dégranulation avec libération immédiate d'histamine et de bêta-hexosaminidase associée à une augmentation importante de l'expression membranaire du CD203c (marqueur d'activation des mastocytes) et à une libération retardée de TNF-alpha (figure 26). Notre nouvelle lignée mastocytaire permet ainsi d'une part, de s'affranchir du problème posé par la lignée LAD qui a un temps de doublement d'environ 15 jours et, d'autre part, de celui posé par l'absence du récepteur de haute affinité aux IgE (FcεRI) sur les lignées HMC-1 et LUVA. Cette lignée cellulaire pourrait donc constituer un nouveau modèle cellulaire permettant d'envisager la mise au point de tests de criblage à haut débit de molécules anti-allergiques.

Nous avons également effectué des expériences préliminaires pour explorer la capacité des cellules ROSA KIT^{WT} à être activées pour le couple IgE spécifique-allergène correspondant, et non pas le couple IgE-anti IgE. Dans ce but, nous avons utilisé les sérums de patients allergiques ou non à l'amoxicilline ou au venin d'abeille et nous avons traité les cellules ROSA KIT^{WT} pendant 4-5 jours par ces sérums dilués au 1/5. Nous avons ensuite stimulé les cellules par l'amoxicilline à 0,1 mg/mL ou par 100 ng/mL de venin d'abeille.

Les résultats obtenus montrent qu'il existe une augmentation nette de l'expression de CD203c lorsque ces cellules sont traitées par le sérum des patients allergiques à l'un ou l'autre des allergènes, puis stimulées par les allergènes correspondants. D'autres couples sérums de patients allergiques /allergènes sont en cours d'étude.

Ces résultats préliminaires montrent que ces cellules pourraient être utilisées pour mettre au point un test comparable au test de dégranulation des basophiles (*Moneret-Vautrin et al. 1999*), pour déterminer si un sujet est bien allergique à tel ou tel allergène. En effet, le test de dégranulation des

basophiles comporte une étape d'enrichissement en basophiles par centrifugation du sang sur Triosil-Ficoll.

La lignée ROSA KIT^{WT} dont nous disposons nous permettra de contourner les inconvénients rencontrés avec ce test de dégranulation des basophiles, à savoir la nécessité de purifier de façon répétée des cellules provenant de différents sangs de façon à pouvoir disposer de quantités suffisantes de basophiles tout au long des expériences, ceci ayant de plus un coût élevé lié aux réactifs utilisés pour la purification des cellules. En plus, le rendement d'obtention des basophiles en fin de purification est extrêmement variable d'un sang à un autre et, surtout, les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des basophiles purifiés varient d'un sang à l'autre. Les expériences nécessitent donc d'être renouvelées avec plusieurs lots de basophiles pour obtenir des résultats statistiquement significatifs.

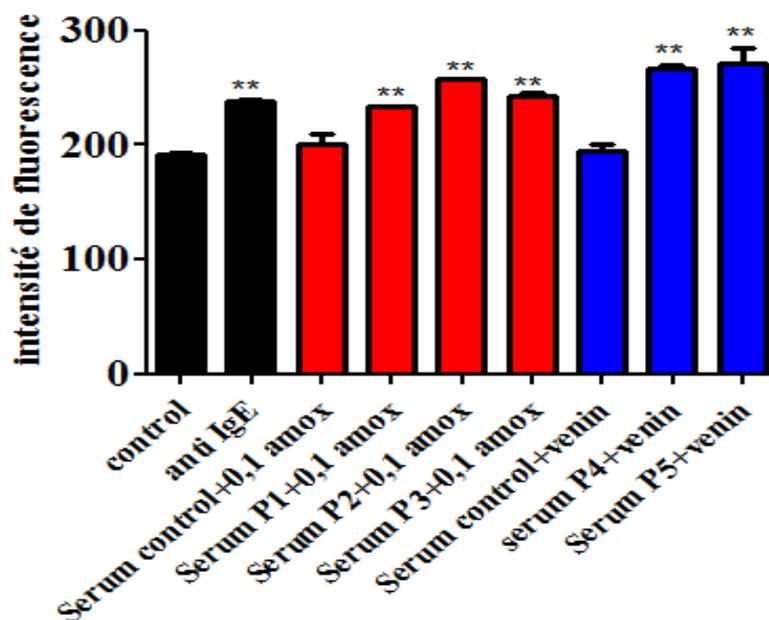


Figure 42 : **Activation des cellules ROSA KIT^{WT} par le couple IgE spécifique-allergène correspondant**: les cellules sont sensibilisées pendant 5 jours par IL-4 (20ng/mL) et IgE (2µg/mL), par le sérum de 3 patients P1, P2 et P3, allergique à l'amoxicilline (courbe rouge), par le sérum de 2 patients P4 et P5, allergiques au venin d'abeille (courbe bleu) ou par un sérum d'un patient non allergique (Sérum control). Les cellules sont ensuite stimulées par l'anticorps anti IgE, par l'amoxicilline à 0,1 mg/mL ou par le venin d'abeille à 100 ng/mL. Après 1 heure de stimulation, les cellules sont incubées avec l'anticorps CD203c couplé à l'APC pendant 1 heure et les résultats sont exprimés en termes de MFI. Les étoiles ** ou *** indiquent que les résultats sont significativement différents des valeurs obtenues avec les ROSA KIT^{WT} non traitées. (** : p<0,005, *** : p<0,001). Les résultats montrés sont représentatifs d'au moins deux expériences indépendantes.

Des études ont montré que les mastocytes de souris et humains pouvaient être stimulés par des composés bactériens comme le lipopolysaccharide (LPS) dérivé des bactéries Gram négatif ou les peptidoglycane (PGN) (Supajatura et al. 2002 ; Ikeda et Funaba 2003 ; Varadaradjalour et al. 2003 ; Yoshikawa et Tasaka 2003) et il a été montré que le LPS agit sur les mastocytes en se fixant sur son récepteur TLR4 présent à la surface des mastocytes, en induisant la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , mais non d'histamine donc, *a priori*, sans processus de dégranulation. Par ailleurs, il a été rapporté que le PGN de *S. aureus* interagit *in vivo* et *in vitro* avec le TLR2 et induit, non seulement une libération massive de TNF- α , mais aussi une libération d'histamine, traduisant un processus de dégranulation (Varadaradjalou et al. 2003). De façon intéressante, des études préliminaires effectuées dans le laboratoire d'accueil montrent que le traitement des cellules ROSA KIT^{WT} par le PGN induit une augmentation de CD203c reflétant ainsi la dégranulation alors que le LPS n'induit pas une augmentation de CD203c donc, *a priori*, pas de processus de dégranulation (figure 43). Puisque le PGN et le LPS induisent la synthèse de TNF- α par des mastocytes humains obtenus en culture primaire, notre étude sera complétée par un dosage de TNF- α libéré dans le surnageant des cellules stimulées ou non par LPS ou PGN. Par ailleurs, nous étudierons l'expression, par les cellules des lignées ROSA, des ARNm et des protéines correspondants aux différents TLRs connus comme étant exprimés par le mastocyte humain.

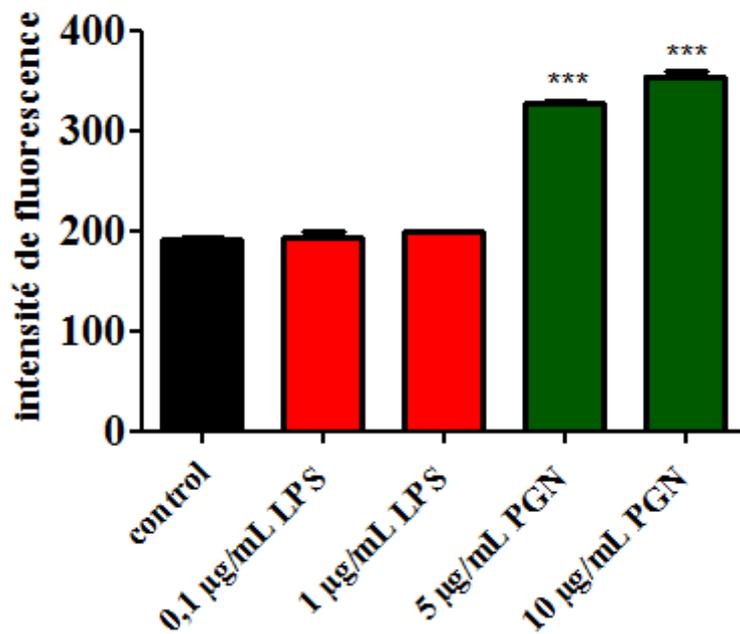


Figure 43 : **Activation des cellules ROSA KIT^{WT} par le LPS ou PGN**: les cellules sont sensibilisées pendant 5 jours par IL-4 (20ng/mL) et IgE (2µg/mL), en présence de SVF. Les cellules sont ensuite stimulées par le LPS à 0,1 ou 1µg/mL ou par le PGN à 5 ou 10 µg/mL. Après 1 heure de stimulation, les cellules sont incubées avec l'anticorps CD203c couplé à l'APC pendant 1 heure et les résultats sont exprimés en termes de MFI. Les étoiles *** indiquent que les résultats sont significativement différents des valeurs obtenues avec les ROSA KIT^{WT} non traitées (control). (***) : p<0,001). Les résultats montrés sont représentatifs d'au moins de deux expériences indépendantes.

En tenant compte de l'ensemble des résultats présentés dans notre mémoire de thèse, il apparait que les cellules mastocytaires humaines ROSA KIT^{WT} ont des caractéristiques fonctionnelles les rapprochant des mastocytes obtenus par culture primaire de progéniteurs hématopoïétiques de sang de cordon et peuvent donc être utilisées avantageusement, compte-tenu de la facilité de leur obtention en grand nombre et de leur stabilité dans le temps, pour l'identification de modulateurs de la survie, de la prolifération des mastocytes humains et pour l'analyse biochimique des signaux intracellulaires précoces ou tardifs consécutifs à l'activation de leurs récepteurs de haute affinité aux IgE ou de tout autre récepteur présent à leur surface.

Par ailleurs, outre son rôle au cours de l'immunité innée ou adaptative et des réactions allergiques et/ou inflammatoires, le mastocyte humain est impliqué dans un groupe de pathologies tumorales rares, les mastocytoses.

Chez les patients adultes atteints de mastocytose systémique indolente, on retrouve dans plus de 85% des cas la même mutation activatrice acquise de *KIT*, au codon 816 (Asp816Val) ou mutation D816V, située au niveau du domaine phosphotransférase (*Feger et al. 2002 ; Akin et Metcalfe 2004*). Les autres patients adultes présentent soit une structure normale de *KIT* (*KIT WT*), soit de rares anomalies (mutations, délétions, insertions, etc...) pouvant se situer soit dans le domaine kinase, soit dans le domaine juxta-membranaire de *KIT*. La plupart de ces anomalies, et en particulier *KIT D816V*, sont transformantes aussi bien *in vitro* sur lignées cellulaires qu'*in vivo* chez la souris (*Baumgartner et al. 2009 ; Gleixner et al. 2011*)

Chez les enfants, la situation est différente. Si plus de 80% des enfants présentent une anomalie de *KIT* (le reste présentant un *KIT WT*), la mutation *KIT D816V* n'est pas majoritaire chez ces patients (*Bodemer et al. 2010*). En effet, 36% des enfants présentent cette mutation tandis que 44% des enfants ont des anomalies variées de l'exon 8 ou de l'exon 9, qui codent pour la partie extramembranaire du récepteur, plusieurs de ces mutations particulières ayant été décrites dans d'autres types de pathologies malignes comme des leucémies aiguës myéloïdes ou des tumeurs gastro-intestinales stromales. Citons en particulier les anomalies suivantes : *KIT Del417-419insY*, *KIT S476I*, *KIT ITD502-503*, et *KIT K509I*. Là encore, ces anomalies sont transformantes *in vitro* et *in vivo* (*Bodemer et al. 2010*).

A l'heure actuelle, le traitement des mastocytoses, en particulier chez l'adulte, est décevant. En effet, si l'imatinib a montré une certaine efficacité chez les patients présentant un *KIT WT* ou des anomalies de *KIT* au niveau juxta-membranaire, cette molécule est totalement inactive sur la mutation *KIT D816V*, la plus fréquemment rencontrée chez l'adulte. En outre, bien que le Dasatinib et le midostaurine, autres inhibiteurs de tyrosine-kinases, aient une activité intéressante *in vitro* sur la mutation *KIT D816V*, leur passage en thérapeutique s'est avéré décevant du fait d'une moindre efficacité que prévue et d'une grande toxicité. Le traitement des formes agressives avec mutation *KIT D816V* fait donc actuellement appel à des chimiothérapies peu spécifiques et lourdes, non dénuées d'effets secondaires.

Puisque la thérapeutique actuelle des mastocytoses ne permet pas encore la guérison de cette maladie, il est nécessaire de disposer de modèles cellulaires de mastocytes humains aisément manipulables, présentant la mutation activatrice de *KIT* D816V, et utilisables à des fins d'études physiopathologiques et pour pouvoir effectuer des tests de criblage à haut débit afin de rechercher des molécules ciblant spécifiquement cette anomalie de *KIT* ou des voies de signalisation en aval de *KIT* muté. Le seul modèle cellulaire de mastocytes humains portant une mutation de *KIT*, disponible à l'heure actuelle est la lignée HMC-1 et ses deux sous clones HMC-1.1 et HMC-1.2 (*Butterfield et al. 1988*). En effet, HMC-1, comme le sous-clone HMC-1.1, présente une mutation juxtamembranaire *KIT* V560G et est sensible à l'imatinib, tandis que le sous-clone HMC-1.2 présente deux mutations de *KIT* (V560G et D816V) et est sensible au Dasatinib mais pas à l'Imatinib (*Horny et al. 2007 ; Bohm et al. 2010*). Les inconvénients majeurs de ces lignées sont tout d'abord qu'il n'y a pas de clone ne portant que la mutation *KIT* D816V, d'où la difficulté d'interprétation d'un éventuel effet sélectif d'une molécule sur la mutation D816V isolée, et qu'il n'y a pas de clone n'exprimant que *KIT* WT, d'où la difficulté de mesurer une éventuelle toxicité non spécifique de *KIT* D816V de toute molécule ciblant potentiellement cette anomalie.

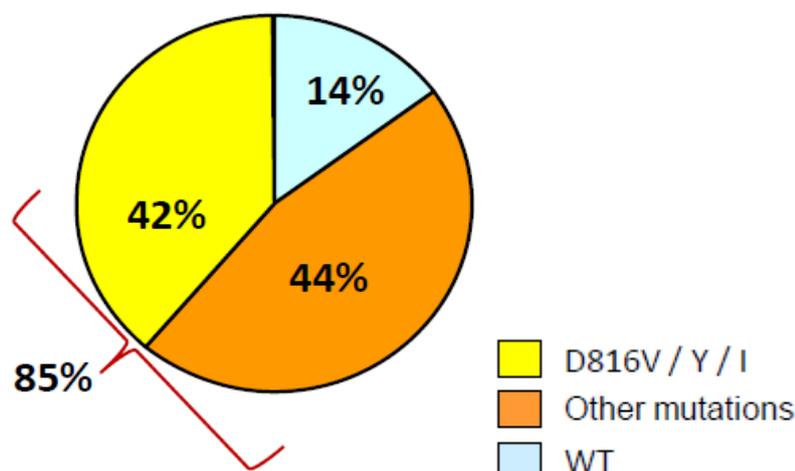


Figure 44 : Analyse des mutations de *KIT* chez 50 enfants âgés de 0-16 mois atteints de mastocytose. 42% des cas présentent une mutation au niveau du codon 816 de l'exon 17. Des mutations en dehors de l'exon 17 sont retrouvées dans 44% des cas et 14% des enfants présentent une structure normale (WT) de *KIT*. (*Bodemer et al. 2010*).

En outre, cette lignée leucémique présente de nombreuses autres anomalies moléculaires que KIT muté, pouvant être impliquées dans la prolifération anormale de ces cellules, et non retrouvées chez les patients atteints de mastocytose systémique. Enfin, cette lignée n'exprime pas le récepteur de haute affinité pour les IgE, interdisant toute analyse des éventuelles interactions positives ou négatives pouvant exister entre les voies de signalisation de KIT et celles du FcεRI au cours des mastocytoses

Devant ces insuffisances présentées par la lignée HMC-1, et compte-tenu de la disponibilité et des propriétés de prolifération de la lignée ROSA KIT^{WT}, nous avons décidé de créer deux nouveaux modèles cellulaires *in vitro* de mastocytes humains présentant uniquement la seule mutation *KIT* D816V, la plus fréquente de l'adulte, ou la mutation *KIT* Delta 417-419 insY, présente chez l'enfant. Pour ce faire, nous avons transfecté les cellules ROSA KIT^{WT} par un vecteur lentiviral apportant une construction codant pour le KIT muté en D816V et coexprimant la GFP ou une construction codant pour le KIT Delta 417-419 insY et coexprimant la GFP, anomalie rencontrée chez certains patients pédiatriques.

Après sélection des cellules effectivement transduites par les vecteurs lentiviraux, nous avons donc pu établir deux nouvelles lignées mastocytaires humaines SCF-indépendantes, proliférant de façon autonome avec un temps de doublement de 48 heures, ROSA KIT^{D816V} et ROSA KIT^{Delta 417-419 insY}. Ces deux lignées conservent un phénotype mastocytaire au point de vue morphologique. Elles sont CD117+, CD33+, CD203c+, tryptase+, FcεRI+. L'expression membranaire de CD117 (KIT) est significativement plus élevée dans ces deux lignées que dans la lignée parentale ROSA KIT^{WT}. Cette expression plus élevée est expliquée par le fait qu'elles sont privées de SCF. D'ailleurs, l'ajout de SCF dans le milieu induit une diminution de l'expression de KIT (figure 35).

Fait intéressant, les lignées cellulaires ROSA KIT^{D816V} et ROSA KIT^{Delta 417-419 insY} ne sont pas activées par le couple IgE-anti-IgE, bien qu'elles expriment toutes les deux le FcεRI, dont l'expression est d'ailleurs aussi augmentée, comme pour les ROSA KIT^{WT}, par un traitement par IgE et/ou IL-4 (figure 36). Cette absence d'activation pourrait être expliquée par le fait qu'il existe une phosphorylation constitutive de KIT au niveau de ces 2 lignées. En effet, il a été montré qu'il existe des éléments communs entre la voie de

signalisation de KIT et celle du FcεRI (*Hundley et al. 2004*). Par ailleurs d'autres travaux ont démontré que l'exposition prolongée au SCF atténue la dégranulation médiée par le récepteur FcεRI (*Ito et al. 2012*). Notre hypothèse pour expliquer ce résultat négatif est donc que l'activation constitutive et exagérée de KIT dans ses formes mutées consomme de façon importante des substrats communs impliqués aussi dans l'activation IgE-dépendante des lignées présentant un récepteur muté.

En effet, si à l'état normal, sur des mastocytes possédant un récepteur KIT sauvage, des études ont montré que les deux voies de signalisation agissent en synergie pour accroître la dégranulation et l'activation mastocytaire (*Hundley et al. 2004*), nous sommes ici en présence de récepteurs KIT mutés induisant des phosphorylations bien plus intenses que le récepteur sauvage (figure 37). On peut donc émettre l'hypothèse que la phosphorylation constitutive et exagérée de KIT muté pourrait détourner des substrats communs et induire une inactivation (anergie) de la voie FcεRI par consommation de ces substrats. Néanmoins, la stimulation continue des cellules par le récepteur KIT muté pourrait également expliquer la libération excessive des médiateurs par les mastocytes anormaux conduisant parfois à l'anaphylaxie idiopathique observée chez certains patients atteints de mastocytose (*Akin et al. 2007*). Ces hypothèses sont actuellement en cours d'étude au sein du laboratoire.

Dans ce but, nous avons entamé une analyse des voies de signalisation induites par l'agrégation du récepteur FcεRI de cellules ROSA KIT^{WT} en comparaison avec celles induites par l'activation du récepteur dans les cellules mutées, ROSA KIT^{D816V} et ROSA KIT^{Delta 417-419 insY}, à la recherche d'un effet d'anomalies de la signalisation de KIT pouvant interférer avec le signal induit par le FcεRI et pouvant expliquer les anomalies rencontrées chez les patients atteints de mastocytoses.

Des études ont montré qu'il existe une phosphorylation constitutive de KIT dans les cellules portant une mutation de ce récepteur (*Sundstrom et al. 2003*). C'est pourquoi nous avons voulu savoir si une telle phosphorylation constitutive pouvait être observée au niveau des cellules ROSA portant une mutation de KIT. Nous avons mis en évidence une phosphorylation constitutive de KIT dans les lignées ROSA KIT^{D816V} et ROSA KIT^{Delta417-419InsY} en présence ou en absence de rh-SCF, tandis que la lignée ROSA

KIT^{WT} présente un niveau de phosphorylation beaucoup plus faible en absence de SCF et cette phosphorylation est augmentée lorsque nous ajoutons le SCF. Néanmoins, comme attendu, la stimulation par rhSCF entraîne une augmentation du taux de phosphorylation au niveau de cette lignée ROSA KIT^{WT}.

Pour déterminer la sensibilité de nos cellules à différents inhibiteurs de KIT, en fonction de la mutation présente, nous avons testé sur nos trois lignées l'effet sur la prolifération de plusieurs inhibiteurs de tyrosines kinases. En effet, des études précédentes menées *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'imatinib était incapable d'inhiber la prolifération des cellules portant la mutation D816V de KIT (Longley et al. 2000 ; Ma et al. 2002 ; Pagano et al. 2008 ; Vega-Ruiz et al. 2009).

Un autre inhibiteur de tyrosine kinase a été testé, le dasatinib, qui est une molécule qui, à une concentration nanomolaire, est capable d'empêcher *in vitro* la prolifération des cellules portant un KIT WT ainsi que des cellules portant la mutation KIT D816V (Shah et al. 2006). En dépit de ces résultats *in vitro* prometteurs, le passage de cette molécule *in vivo* s'est avéré décevant puisque cette molécule présente une grande toxicité (Aichberger et al. 2008 ; Purtil et al. 2008 ; Verstovseki et al. 2008).

Un troisième inhibiteur a été testé également, la midostaurine ou PKC 412. La midostaurine est un inhibiteur de la PKC (Meyer et al. 1989), et de multiples kinases tels que KIT, FLT-3 et PDGFR. Des études ont précédemment montré que la midostaurine est capable d'inhiber la prolifération de cellules BAF3 portant la mutation KIT D816V (Gotlib et al. 2005). La midostaurine a été également testée *in vivo* et des essais de phase II ont montré que cette molécule, utilisée à la posologie de 100mg, deux fois par jour, pouvait entraîner une amélioration de la réponse chez 69% des patient traités atteints de mastocytose systémique agressive (Gotlib et al. 2005).

Nous avons donc testé l'effet de ces trois inhibiteurs de kinases sur nos trois lignées cellulaires et les résultats obtenus (figure 38) montrent que lignée ROSA KIT^{D816V} est bien résistante à l'Imatinib, mais sensible au Dasatinib et PKC 412 en terme d'inhibition de prolifération. En revanche, la lignée

transfectée avec KIT Delta 417-419 insY est bien sensible aux trois inhibiteurs de tyrosines kinases utilisés.

Il avait déjà été souligné que la voie de signalisation PI3K/AKT est impliquée dans la croissance et l'activation des mastocytes (*Metcalfe 2008*). Nous avons montré ici que l'introduction de KIT D816V et de KIT Delta417-419InsY dans les cellules ROSA KIT^{WT} induit, en plus d'une phosphorylation constitutive de récepteur, une activation des voies de signalisation en aval de ce récepteur, comme celle d'AKT qui est constitutivement phosphorylée même en absence de rhSCF, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus par d'autres équipes (*Casteran et al. 2003*). De plus, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique d'AKT nous a permis de montrer que la lignée ROSA portant une mutation de KIT en D816V est plus sensible que la lignée ROSA KIT^{WT} à l'inhibition d'AKT (figure 39), suggérant qu'AKT pourrait jouer un rôle critique dans la transduction du signal de KIT muté et pourrait constituer une cible pharmacologique intéressante.

Plusieurs équipes ont montré que, chez des patients atteints de mastocytose systémique et présentant la mutation KIT D816V, il existe une phosphorylation constitutive de STAT5 (*Harir et al. 2008 ; Baumgartner et al. 2009 ; Chaix et al. 2011*). Nous avons pu confirmer ces résultats en montrant qu'il existe une phosphorylation constitutive de STAT5 dans les ROSA KIT^{D816V} et ROSA KIT^{Delta417-419InsY} mais pas dans la lignée ROSA KIT^{WT} et cela, même lorsque ces dernières cellules sont traitées par du rhSCF. Ainsi, les cellules ROSA KIT^{D816V} et ROSA KIT^{Delta417-419InsY} peuvent représenter des outils précieux pour tester des nouveaux inhibiteurs potentiels de STAT5 qui constitue clairement une nouvelle cible thérapeutique au cours des mastocytoses.

Finalement, des études *in vivo* dans des souris NSG ont été effectuées. Nous avons remarqué que la prise de greffe dans la moelle osseuse est significativement plus élevée chez les souris injectées avec les cellules ROSA KIT^{D816V} (52%) par rapport aux souris injectées par les cellules ROSA KIT^{WT} (2,62%) (Figure 40). Ce nouveau modèle constitue une avancée significative car les souris greffées avec les cellules ROSA KIT^{D816V} ont présentés une pathologie très comparable à celle observée chez des patients atteints de

mastocytose avec KIT D816V. De plus, étant donné que la nature de microenvironnement peut influencer le phénotype des mastocytes (*Galli et al. 1982 ; Levi-Schaffer et al. 1986 ; Kitamura 1989*) nous avons recherché si un tel effet pouvait être observé chez les souris greffées. Nous avons ainsi pu remarquer qu'il y a une nette augmentation d'expression de la chymase dans les cellules injectées en sous-cutanée par rapport aux cellules greffées dans la moelle osseuse qui sont restées négatives pour la chymase (Tableau XII), ce qui est cohérent avec les données concernant le rôle d'un micro-environnement de type séreux (comme la peau) dans l'induction de l'expression de la chymase par les mastocytes humains.

VI – CONCLUSIONS

En conclusion, il apparaît que les deux lignées mastocytaires humaines SCF-indépendantes, présentant une anomalie structurale de KIT (ROSA KIT^{D816V} et ROSA KIT^{Delta 417-419 insY}) pourraient être utilisées dans des tests de criblage à haut débit de molécules à visée anti-proliférative dirigées soit contre la molécule de KIT muté, soit contre l'une ou l'autre des molécules intracellulaires impliquées dans la transduction du signal KIT muté. Les molécules qui montreront une activité contre le mutant KIT D816V et/ou le mutant KIT Delta 417-419 insY seront testées contre la lignée ROSA KIT^{WT} pour apprécier la spécificité de leur activité. Par ailleurs, les souris NSG greffées par des cellules ROSA KIT^{WT} ou ROSA KIT^{D816V} pourraient être utilisées comme modèle *in vivo* de confirmation des effets antiprolifératifs des molécules sélectionnées dans les tests *in vitro*, utilisées par voie orale ou en injection, seules ou en combinaison.

Jusqu'à présent, dans le but d'étudier des composés antidégranulants et/ou anti-inflammatoires qui ciblent le mastocyte, nous avons utilisé soit des cultures primaires de mastocytes humains (modèle peu reproductible, complexe et coûteux) ou des lignées cellulaires qui ne possèdent pas toutes les caractéristiques de mastocytes humains (absence de récepteur de haute affinité pour les IgE, production limitée en nombre de cellules, ou d'un phénotype anormal). Il était donc difficile d'adapter des modèles existants pour un test de criblage à haut débit. La découverte de notre nouvelle lignée cellulaire humaine ROSA KIT^{WT} avec toutes les caractéristiques d'un mastocyte humain, y compris l'expression du récepteur de haute affinité pour les IgE (FcεR1) et un KIT de type sauvage, facile à cultiver en grandes quantités en utilisant des réactifs et des matériels peu coûteux, permet d'envisager la mise au point d'un test de criblage à haut débit dans le domaine de la thérapeutique anti-allergique et / ou anti-inflammatoire.

En ce qui concerne la mastocytose, le développement de lignées cellulaires avec des mutations activatrices de KIT les plus fréquemment rencontrées dans ces pathologies (KIT D816V et KIT Delta 417-419 Ins y) est également une amélioration sur le plan scientifique car ces clones sont faciles à manipuler et semblent se comporter biologiquement comme les mastocytes malins des patients. De ce fait, leur

utilisation pourrait être envisagée pour la mise au point de tests recherchant des inhibiteurs spécifiques de l'activité TK des KIT mutés ou des voies de signalisation initiées par eux.

VII - BIBLIOGRAPHIE

- Abraham, S. N. and M. Arock (1998). "Mast cells and basophils in innate immunity." Semin Immunol **10**(5): 373-381.
- Abraham, S. N. and R. Malaviya (1997). "Mast cells in infection and immunity." Infect Immun **65**(9): 3501-3508.
- Aichberger, K. J., W. R. Sperr, et al. (2008). "Treatment responses to cladribine and dasatinib in rapidly progressing aggressive mastocytosis." Eur J Clin Invest **38**(11): 869-873.
- Akdis, M., K. Blaser, et al. (2005). "T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases." J Allergy Clin Immunol **116**(5): 961-968; quiz 969.
- Akdis, M., J. Verhagen, et al. (2004). "Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells." J Exp Med **199**(11): 1567-1575.
- Akin, C., G. Fumo, et al. (2004). "A novel form of mastocytosis associated with a transmembrane c-kit mutation and response to imatinib." Blood **103**(8): 3222-3225.
- Akin, C. and D. D. Metcalfe (2004). "The biology of Kit in disease and the application of pharmacogenetics." J Allergy Clin Immunol **114**(1): 13-19; quiz 20.
- Akin, C. and D. D. Metcalfe (2004). "Systemic mastocytosis." Annu Rev Med **55**: 419-432.
- Akin, C., L. M. Scott, et al. (2007). "Demonstration of an aberrant mast-cell population with clonal markers in a subset of patients with "idiopathic" anaphylaxis." Blood **110**(7): 2331-2333.
- Alsen, V. (1958). "[Clinical definition and etiology of multiple sclerosis]." Munch Med Wochenschr **100**(6): 220-224.
- Andre, C., L. d'Auriol, et al. (1989). "c-kit mRNA expression in human and murine hematopoietic cell lines." Oncogene **4**(8): 1047-1049.
- Arock, M., A. Gorenflot, et al. (1986). "[Culture of murine mastocytes: heterogeneity of the ultrastructural aspects]." C R Seances Soc Biol Fil **180**(6): 633-641.
- Arock, M., F. Hervatin, et al. (1994). "Differentiation of human mast cells from bone-marrow and cord-blood progenitor cells by factors produced by a mouse stromal cell line." Ann N Y Acad Sci **725**: 59-68.
- Arock, M., M. D. Mossalayi, et al. (1993). "Purification of normal human bone-marrow-derived basophils." Int Arch Allergy Immunol **102**(1): 107-111.
- Arock, M., E. Ross, et al. (1998). "Phagocytic and tumor necrosis factor alpha response of human mast cells following exposure to gram-negative and gram-positive bacteria." Infect Immun **66**(12): 6030-6034.
- Arock, M., E. Schneider, et al. (2002). "Differentiation of human basophils: an overview of recent advances and pending questions." J Leukoc Biol **71**(4): 557-564.
- Arock, M. and P. Valent (2010). "Pathogenesis, classification and treatment of mastocytosis: state of the art in 2010 and future perspectives." Expert Rev Hematol **3**(4): 497-516.
- Ashman, L. K. and R. Griffith (2013). "Therapeutic targeting of c-KIT in cancer." Expert Opin Investig Drugs **22**(1): 103-115.
- Bachelet, I., A. Munitz, et al. (2008). "Suppression of normal and malignant kit signaling by a bispecific antibody linking kit with CD300a." J Immunol **180**(9): 6064-6069.
- Bachelet, I., A. Munitz, et al. (2006). "Abrogation of allergic reactions by a bispecific antibody fragment linking IgE to CD300a." J Allergy Clin Immunol **117**(6): 1314-1320.
- Bachelet, I., A. Munitz, et al. (2005). "The inhibitory receptor IRp60 (CD300a) is expressed and functional on human mast cells." J Immunol **175**(12): 7989-7995.
- Balzar, S., H. W. Chu, et al. (2005). "Relationship of small airway chymase-positive mast cells and lung function in severe asthma." Am J Respir Crit Care Med **171**(5): 431-439.
- Banovac, K., D. Neylan, et al. (1989). "Are the mast cells antigen presenting cells?" Immunol Invest **18**(7): 901-906.
- Bansal, G., Z. Xie, et al. (2008). "Suppression of immunoglobulin E-mediated allergic responses by regulator of G protein signaling 13." Nat Immunol **9**(1): 73-80.

- Baumgartner, C., S. Cerny-Reiterer, et al. (2009). "Expression of activated STAT5 in neoplastic mast cells in systemic mastocytosis: subcellular distribution and role of the transforming oncoprotein KIT D816V." Am J Pathol **175**(6): 2416-2429.
- Baumruker, T. and E. E. Prieschl (2000). "The role of sphingosine kinase in the signaling initiated at the high-affinity receptor for IgE (FcεRI) in mast cells." Int Arch Allergy Immunol **122**(2): 85-90.
- Befus, A. D., F. L. Pearce, et al. (1982). "Mucosal mast cells. I. Isolation and functional characteristics of rat intestinal mast cells." J Immunol **128**(6): 2475-2480.
- Benhamou, M., C. Bonnerot, et al. (1990). "Molecular heterogeneity of murine mast cell Fc gamma receptors." J Immunol **144**(8): 3071-3077.
- Besmer, P., J. E. Murphy, et al. (1986). "A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family." Nature **320**(6061): 415-421.
- Bidri, M., F. Feger, et al. (2001). "Mast cells as a source and target for nitric oxide." Int Immunopharmacol **1**(8): 1543-1558.
- Bidri, M., S. Ktorza, et al. (1997). "Nitric oxide pathway is induced by Fc epsilon RI and up-regulated by stem cell factor in mouse mast cells." Eur J Immunol **27**(11): 2907-2913.
- Bidri, M., I. Vouldoukis, et al. (1997). "Evidence for direct interaction between mast cells and Leishmania parasites." Parasite Immunol **19**(10): 475-483.
- Bischoff, S. C., G. Sellge, et al. (1999). "IL-4 enhances proliferation and mediator release in mature human mast cells." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(14): 8080-8085.
- Blank, U., M. Daeron, et al. (1989). "Identification of the Fc gamma RII-related component of murine IgG-BF." Mol Immunol **26**(2): 107-114.
- Blank, U., M. H. Jouvin, et al. (2003). "[The high-affinity IgE receptor: lessons from structural analysis]." Med Sci (Paris) **19**(1): 63-69.
- Blank, U., C. S. Ra, et al. (1991). "Characterization of truncated alpha chain products from human, rat, and mouse high affinity receptor for immunoglobulin E." J Biol Chem **266**(4): 2639-2646.
- Blechman, J. M., S. Lev, et al. (1993). "Structure-function analyses of the kit receptor for the steel factor." Stem Cells **11 Suppl 2**: 12-21.
- Blume-Jensen, P. and T. Hunter (2001). "Oncogenic kinase signalling." Nature **411**(6835): 355-365.
- Bodemer, C., O. Hermine, et al. (2010). "Pediatric mastocytosis is a clonal disease associated with D816V and other activating c-KIT mutations." J Invest Dermatol **130**(3): 804-815.
- Bohm, A., K. Sonneck, et al. (2010). "In vitro and in vivo growth-inhibitory effects of cladribine on neoplastic mast cells exhibiting the imatinib-resistant KIT mutation D816V." Exp Hematol **38**(9): 744-755.
- Borkowski, T. A., M. H. Jouvin, et al. (2001). "Minimal requirements for IgE-mediated regulation of surface Fc epsilon RI." J Immunol **167**(3): 1290-1296.
- Boudreau, R. T., R. Garduno, et al. (2002). "Protein phosphatase 2A and protein kinase Calpha are physically associated and are involved in Pseudomonas aeruginosa-induced interleukin 6 production by mast cells." J Biol Chem **277**(7): 5322-5329.
- Bourillon, A., H. H. Hu, et al. (2013). "Genetic variation at KIT locus may predispose to melanoma." Pigment Cell Melanoma Res **26**(1): 88-96.
- Bowrey, P. F., J. King, et al. (2000). "Histamine, mast cells and tumour cell proliferation in breast cancer: does preoperative cimetidine administration have an effect?" Br J Cancer **82**(1): 167-170.
- Bradding, P., I. H. Feather, et al. (1993). "Immunolocalization of cytokines in the nasal mucosa of normal and perennial rhinitic subjects. The mast cell as a source of IL-4, IL-5, and IL-6 in human allergic mucosal inflammation." J Immunol **151**(7): 3853-3865.
- Brockow, K. and D. D. Metcalfe (2001). "Mastocytosis." Curr Opin Allergy Clin Immunol **1**(5): 449-454.
- Broudy, V. C. (1997). "Stem cell factor and hematopoiesis." Blood **90**(4): 1345-1364.
- Brzezinska-Blaszczyk, E. and M. Wierzbicki (2010). "[Mast cell Toll-like receptors (TLRs)]." Postepy Hig Med Dosw (Online) **64**: 11-21.
- Butterfield, J. H., D. Weiler, et al. (1988). "Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia." Leuk Res **12**(4): 345-355.

- Calderon, G. M., J. Torres-Lopez, et al. (1998). "Effects of toxin A from Clostridium difficile on mast cell activation and survival." Infect Immun **66**(6): 2755-2761.
- Cals-Grierson, M. M. and A. D. Ormerod (2004). "Nitric oxide function in the skin." Nitric Oxide **10**(4): 179-193.
- Cambier, J. C. (1995). "Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)." J Immunol **155**(7): 3281-3285.
- Carlson, T., M. Kroenke, et al. (2008). "The Th17-ELR+ CXC chemokine pathway is essential for the development of central nervous system autoimmune disease." J Exp Med **205**(4): 811-823.
- Carlsson, P. and L. Kjellen (2012). "Heparin biosynthesis." Handb Exp Pharmacol(207): 23-41.
- Caruana, G., A. C. Cambareri, et al. (1999). "Isoforms of c-KIT differ in activation of signalling pathways and transformation of NIH3T3 fibroblasts." Oncogene **18**(40): 5573-5581.
- Casteran, N., P. De Sepulveda, et al. (2003). "Signal transduction by several KIT juxtamembrane domain mutations." Oncogene **22**(30): 4710-4722.
- Chabot, B., D. A. Stephenson, et al. (1988). "The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus." Nature **335**(6185): 88-89.
- Chaix, A., S. Lopez, et al. (2011). "Mechanisms of STAT protein activation by oncogenic KIT mutants in neoplastic mast cells." J Biol Chem **286**(8): 5956-5966.
- Chaves-Dias, C., T. R. Hundley, et al. (2001). "Induction of telomerase activity during development of human mast cells from peripheral blood CD34+ cells: comparisons with tumor mast-cell lines." J Immunol **166**(11): 6647-6656.
- Church, M. K. and G. F. Clough (1999). "Human skin mast cells: in vitro and in vivo studies." Ann Allergy Asthma Immunol **83**(5): 471-475.
- Church, M. K. and J. I. McGill (2002). "Human ocular mast cells." Curr Opin Allergy Clin Immunol **2**(5): 419-422.
- Cohen, P. S., J. P. Chan, et al. (1994). "Expression of stem cell factor and c-kit in human neuroblastoma. The Children's Cancer Group." Blood **84**(10): 3465-3472.
- Costanza, M., M. P. Colombo, et al. (2012). "Mast cells in the pathogenesis of multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis." Int J Mol Sci **13**(11): 15107-15125.
- Creedon, D. and J. B. Tuttle (1991). "Nerve growth factor synthesis in vascular smooth muscle." Hypertension **18**(6): 730-741.
- Cruse, G., S. Cockerill, et al. (2008). "IgE alone promotes human lung mast cell survival through the autocrine production of IL-6." BMC Immunol **9**: 2.
- Csaba, G. and P. Kovacs (1975). "Demonstration of the heterogeneity of the mast cell population on the basis of the mucopolysaccharide content." Acta Morphol Acad Sci Hung **23**(3): 227-233.
- Daeron, M. (1997). "Negative regulation of mast cell activation by receptors for IgG." Int Arch Allergy Immunol **113**(1-3): 138-141.
- Daeron, M., A. Prouvost-Danon, et al. (1980). "Mast cell membrane antigens and Fc receptors in anaphylaxis. II. Functionally distinct receptors for IgG and for IgE on mouse mast cells." Cell Immunol **49**(1): 178-189.
- Davar, D. and J. M. Kirkwood (2012). "New therapies in the treatment of melanoma." Expert Opin Investig Drugs **21**(11): 1643-1659.
- Davidson, S., L. Gilead, et al. (1990). "Synthesis of chondroitin sulfate D and heparin proteoglycans in murine lymph node-derived mast cells. The dependence on fibroblasts." J Biol Chem **265**(21): 12324-12330.
- Dimitriadou, V., S. Mecheri, et al. (1998). "Expression of functional major histocompatibility complex class II molecules on HMC-1 human mast cells." J Leukoc Biol **64**(6): 791-799.
- Dumitrascu, D. (1996). "Mast cells as potent inflammatory cells." Rom J Intern Med **34**(3-4): 159-172.
- Dvorak, A. M., T. Furitsu, et al. (1993). "Ultrastructural morphology of human mast cell progenitors in sequential cocultures of cord blood cells and fibroblasts." Int Arch Allergy Immunol **100**(3): 219-229.
- Dvorak, A. M., T. Furitsu, et al. (1992). "Ultrastructural identification of human mast cells resembling skin mast cells stimulated to develop in long-term human cord blood mononuclear cells cultured with 3T3 murine skin fibroblasts." J Leukoc Biol **51**(6): 557-569.

- Dvorak, A. M., R. A. Monahan, et al. (1980). "Crohn's disease: transmission electron microscopic studies. II. Immunologic inflammatory response. Alterations of mast cells, basophils, eosinophils, and the microvasculature." Hum Pathol **11**(6): 606-619.
- Dy, M. (1982). "Increase in histamine production and mast cell proliferation during allograft rejection." Transplant Proc **14**(3): 575-577.
- Ehrlich (1878). "contribution to the theory and practice of histological dyes
- Eisenhut, M. (2012). "Role of nitric oxide metabolites in reduction of sodium potassium ATPase dependent pulmonary edema clearance." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **303**(5): L487.
- el-Lati, S. G., C. A. Dahinden, et al. (1994). "Complement peptides C3a- and C5a-induced mediator release from dissociated human skin mast cells." J Invest Dermatol **102**(5): 803-806.
- Erdei, A., K. Kerekes, et al. (1997). "Role of C3a and C5a in the activation of mast cells." Exp Clin Immunogenet **14**(1): 16-18.
- Feger, F., A. Ribadeau Dumas, et al. (2002). "Kit and c-kit mutations in mastocytosis: a short overview with special reference to novel molecular and diagnostic concepts." Int Arch Allergy Immunol **127**(2): 110-114.
- Feger, F., S. Varadaradjalou, et al. (2002). "The role of mast cells in host defense and their subversion by bacterial pathogens." Trends Immunol **23**(3): 151-158.
- Forsythe, P., M. Gilchrist, et al. (2001). "Mast cells and nitric oxide: control of production, mechanisms of response." Int Immunopharmacol **1**(8): 1525-1541.
- Fox, C. C., S. D. Jewell, et al. (1994). "Rat peritoneal mast cells present antigen to a PPD-specific T cell line." Cell Immunol **158**(1): 253-264.
- Fox, C. C., A. J. Lazenby, et al. (1990). "Enhancement of human intestinal mast cell mediator release in active ulcerative colitis." Gastroenterology **99**(1): 119-124.
- Frandji, P., C. Oskertizian, et al. (1993). "Antigen-dependent stimulation by bone marrow-derived mast cells of MHC class II-restricted T cell hybridoma." J Immunol **151**(11): 6318-6328.
- Frandji, P., C. Tkaczyk, et al. (1996). "Exogenous and endogenous antigens are differentially presented by mast cells to CD4+ T lymphocytes." Eur J Immunol **26**(10): 2517-2528.
- Frandji, P., C. Tkaczyk, et al. (1995). "Presentation of soluble antigens by mast cells: upregulation by interleukin-4 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and downregulation by interferon-gamma." Cell Immunol **163**(1): 37-46.
- Frenzel, L. and O. Hermine (2012). "Mast cells and inflammation." Joint Bone Spine.
- Frielingsdorf, H., D. R. Simpson, et al. (2007). "Nerve growth factor promotes survival of new neurons in the adult hippocampus." Neurobiol Dis **26**(1): 47-55.
- Frost, M. J., P. T. Ferrao, et al. (2002). "Juxtamembrane mutant V560GKit is more sensitive to Imatinib (STI571) compared with wild-type c-kit whereas the kinase domain mutant D816VKit is resistant." Mol Cancer Ther **1**(12): 1115-1124.
- Fujishima, H., R. O. Sanchez Mejia, et al. (1999). "Cytosolic phospholipase A2 is essential for both the immediate and the delayed phases of eicosanoid generation in mouse bone marrow-derived mast cells." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(9): 4803-4807.
- Furitsu, T., H. Saito, et al. (1989). "Development of human mast cells in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(24): 10039-10043.
- Furitsu, T., T. Tsujimura, et al. (1993). "Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product." J Clin Invest **92**(4): 1736-1744.
- Furuichi, K., J. Rivera, et al. (1985). "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**(5): 1522-1525.
- Galli, S. J. and J. J. Costa (1995). "Mast-cell-leukocyte cytokine cascades in allergic inflammation." Allergy **50**(11): 851-862.
- Galli, S. J., A. M. Dvorak, et al. (1982). "Mast cell clones: a model for the analysis of cellular maturation." J Cell Biol **95**(2 Pt 1): 435-444.
- Galli, S. J., A. Iemura, et al. (1993). "Reversible expansion of primate mast cell populations in vivo by stem cell factor." J Clin Invest **91**(1): 148-152.

- Galli, S. J., S. Nakae, et al. (2005). "Mast cells in the development of adaptive immune responses." Nat Immunol **6**(2): 135-142.
- Galli, S. J. and M. Tsai (2010). "Mast cells in allergy and infection: versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity." Eur J Immunol **40**(7): 1843-1851.
- Galli, S. J., M. Tsai, et al. (1992). "Analyzing mast cell development and function using mice carrying mutations at W/c-kit or Sl/MGF (SCF) loci." Ann N Y Acad Sci **664**: 69-88.
- Garcia-Montero, A. C., M. Jara-Acevedo, et al. (2006). "KIT mutation in mast cells and other bone marrow hematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients." Blood **108**(7): 2366-2372.
- Gari, M., A. Goodeve, et al. (1999). "c-kit proto-oncogene exon 8 in-frame deletion plus insertion mutations in acute myeloid leukaemia." Br J Haematol **105**(4): 894-900.
- Garman, S. C., J. P. Kinet, et al. (1998). "Crystal structure of the human high-affinity IgE receptor." Cell **95**(7): 951-961.
- Garman, S. C., B. A. Wurzburg, et al. (2000). "Structure of the Fc fragment of human IgE bound to its high-affinity receptor Fc epsilonRI alpha." Nature **406**(6793): 259-266.
- Gauchat, J. F., S. Henchoz, et al. (1993). "Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils." Nature **365**(6444): 340-343.
- Gaudenzio, N., N. Espagnolle, et al. (2009). "Cell-cell cooperation at the T helper cell/mast cell immunological synapse." Blood **114**(24): 4979-4988.
- Geiger, E., R. Magerstaedt, et al. (2000). "IL-4 induces the intracellular expression of the alpha chain of the high-affinity receptor for IgE in in vitro-generated dendritic cells." J Allergy Clin Immunol **105**(1 Pt 1): 150-156.
- Ghannadan, M., M. Baghestanian, et al. (1998). "Phenotypic characterization of human skin mast cells by combined staining with toluidine blue and CD antibodies." J Invest Dermatol **111**(4): 689-695.
- Gibbs, B. F. and M. Ennis (2001). "Isolation and purification of human mast cells and basophils." Methods Mol Med **56**: 161-176.
- Gilead, L., N. Livni, et al. (1987). "Human gastric mucosal mast cells are chondroitin sulphate E-containing mast cells." Immunology **62**(1): 23-28.
- Gilfillan, A. M. and C. Tkaczyk (2006). "Integrated signalling pathways for mast-cell activation." Nat Rev Immunol **6**(3): 218-230.
- Gleixner, K. V., M. Mayerhofer, et al. (2011). "KIT-D816V-independent oncogenic signaling in neoplastic cells in systemic mastocytosis: role of Lyn and Btk activation and disruption by dasatinib and bosutinib." Blood **118**(7): 1885-1898.
- Goldstein, S. M., J. Leong, et al. (1992). "Protease composition of exocytosed human skin mast cell protease-proteoglycan complexes. Tryptase resides in a complex distinct from chymase and carboxypeptidase." J Immunol **148**(8): 2475-2482.
- Gotlib, J., C. Berube, et al. (2005). "Activity of the tyrosine kinase inhibitor PKC412 in a patient with mast cell leukemia with the D816V KIT mutation." Blood **106**(8): 2865-2870.
- Gounni, A. S., B. Lamkhioued, et al. (2001). "Human neutrophils express the high-affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI): role in asthma." FASEB J **15**(6): 940-949.
- Greider, C. W. and E. H. Blackburn (1985). "Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts." Cell **43**(2 Pt 1): 405-413.
- Gri, G., B. Frossi, et al. (2012). "Mast cell: an emerging partner in immune interaction." Front Immunol **3**: 120.
- Guhl, S., M. Babina, et al. (2010). "Mast cell lines HMC-1 and LAD2 in comparison with mature human skin mast cells--drastically reduced levels of tryptase and chymase in mast cell lines." Exp Dermatol **19**(9): 845-847.
- Gurish, M. F., N. Ghildyal, et al. (1992). "Differential expression of secretory granule proteases in mouse mast cells exposed to interleukin 3 and c-kit ligand." J Exp Med **175**(4): 1003-1012.
- Haig, D. M., J. F. Huntley, et al. (1994). "Effects of stem cell factor (kit-ligand) and interleukin-3 on the growth and serine proteinase expression of rat bone-marrow-derived or serosal mast cells." Blood **83**(1): 72-83.

- Hakimi, J., C. Seals, et al. (1990). "The alpha subunit of the human IgE receptor (FcERI) is sufficient for high affinity IgE binding." J Biol Chem **265**(36): 22079-22081.
- Hamaguchi, Y., Y. Kanakura, et al. (1987). "Interleukin 4 as an essential factor for in vitro clonal growth of murine connective tissue-type mast cells." J Exp Med **165**(1): 268-273.
- Harir, N., C. Boudot, et al. (2008). "Oncogenic Kit controls neoplastic mast cell growth through a Stat5/PI3-kinase signaling cascade." Blood **112**(6): 2463-2473.
- Harvima, I. T., G. Nilsson, et al. (2008). "Is there a role for mast cells in psoriasis?" Arch Dermatol Res **300**(9): 461-478.
- Heinrich, M. C., D. C. Dooley, et al. (1993). "Constitutive expression of steel factor gene by human stromal cells." Blood **82**(3): 771-783.
- Hines, C. (2002). "The diverse effects of mast cell mediators." Clin Rev Allergy Immunol **22**(2): 149-160.
- Hines, S. J., C. Organ, et al. (1995). "Coexpression of the c-kit and stem cell factor genes in breast carcinomas." Cell Growth Differ **6**(6): 769-779.
- Hogan, A. D. and L. B. Schwartz (1997). "Markers of mast cell degranulation." Methods **13**(1): 43-52.
- Hohman, R. J. and S. C. Dreskin (2001). "Measuring degranulation of mast cells." Curr Protoc Immunol **Chapter 7**: Unit 7 26.
- Holgate, S. T. (2004). "The epidemic of asthma and allergy." J R Soc Med **97**(3): 103-110.
- Hong, L., V. Munugalavada, et al. (2004). "c-Kit-mediated overlapping and unique functional and biochemical outcomes via diverse signaling pathways." Mol Cell Biol **24**(3): 1401-1410.
- Horny, H. P., K. Sotlar, et al. (2007). "Mastocytosis: state of the art." Pathobiology **74**(2): 121-132.
- Hu, Z. Q., K. Kobayashi, et al. (1997). "Tumor necrosis factor-alpha- and interleukin-6-triggered mast cell development from mouse spleen cells." Blood **89**(2): 526-533.
- Huang, C., G. W. Wong, et al. (1997). "The tryptase, mouse mast cell protease 7, exhibits anticoagulant activity in vivo and in vitro due to its ability to degrade fibrinogen in the presence of the diverse array of protease inhibitors in plasma." J Biol Chem **272**(50): 31885-31893.
- Hundley, T. R., A. M. Gilfillan, et al. (2004). "Kit and FcepsilonRI mediate unique and convergent signals for release of inflammatory mediators from human mast cells." Blood **104**(8): 2410-2417.
- Igarashi, Y., M. Kurosawa, et al. (1996). "Characteristics of histamine release from cultured human mast cells." Clin Exp Allergy **26**(5): 597-602.
- Ikeda, H., Y. Kanakura, et al. (1991). "Expression and functional role of the proto-oncogene c-kit in acute myeloblastic leukemia cells." Blood **78**(11): 2962-2968.
- Ikeda, T. and M. Funaba (2003). "Altered function of murine mast cells in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan." Immunol Lett **88**(1): 21-26.
- Inoue, M., S. Kyo, et al. (1994). "Coexpression of the c-kit receptor and the stem cell factor in gynecological tumors." Cancer Res **54**(11): 3049-3053.
- Ito, T., D. Smrz, et al. (2012). "Stem cell factor programs the mast cell activation phenotype." J Immunol **188**(11): 5428-5437.
- Jarrett, E. E. and H. R. Miller (1982). "Production and activities of IgE in helminth infection." Prog Allergy **31**: 178-233.
- Jonsson, F., D. A. Mancardi, et al. (2012). "Human Fc gammaRIIA induces anaphylactic and allergic reactions." Blood **119**(11): 2533-2544.
- Jutel, M., K. Blaser, et al. (2006). "The role of histamine in regulation of immune responses." Chem Immunol Allergy **91**: 174-187.
- Kalesnikoff, J. and S. J. Galli (2008). "New developments in mast cell biology." Nat Immunol **9**(11): 1215-1223.
- Kambayashi, T., E. J. Allenspach, et al. (2009). "Inducible MHC class II expression by mast cells supports effector and regulatory T cell activation." J Immunol **182**(8): 4686-4695.
- Kambayashi, T., J. D. Baranski, et al. (2008). "Indirect involvement of allergen-captured mast cells in antigen presentation." Blood **111**(3): 1489-1496.
- Kanakura, Y., T. Furitsu, et al. (1994). "Activating mutations of the c-kit proto-oncogene in a human mast cell leukemia cell line." Leukemia **8 Suppl 1**: S18-22.

- Kanbe, N., M. Kurosawa, et al. (1998). "Carnoy's fixative reduces the number of chymase-positive cells in immunocytochemical staining of cord-blood-derived human cultured mast cells." Allergy **53**(10): 981-985.
- Kanbe, N., M. Kurosawa, et al. (2000). "Nerve growth factor prevents apoptosis of cord blood-derived human cultured mast cells synergistically with stem cell factor." Clin Exp Allergy **30**(8): 1113-1120.
- Katz, H. R. and R. B. Lobell (1995). "Expression and function of Fc gamma R in mouse mast cells." Int Arch Allergy Immunol **107**(1-3): 76-78.
- Kawakami, T., J. Kitaura, et al. (2005). "IgE regulation of mast cell survival and function." Novartis Found Symp **271**: 100-107; discussion 108-114, 145-151.
- Kawakami, Y., J. Kitaura, et al. (2000). "Redundant and opposing functions of two tyrosine kinases, Btk and Lyn, in mast cell activation." J Immunol **165**(3): 1210-1219.
- Kepley, C. L., S. Taghavi, et al. (2004). "Co-aggregation of FcgammaRII with FcepsilonRI on human mast cells inhibits antigen-induced secretion and involves SHIP-Grb2-Dok complexes." J Biol Chem **279**(34): 35139-35149.
- Kinashi, T. and T. A. Springer (1994). "Steel factor and c-kit regulate cell-matrix adhesion." Blood **83**(4): 1033-1038.
- Kinet, J. P. (1999). "The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology." Annu Rev Immunol **17**: 931-972.
- King, C. L., C. C. Low, et al. (1993). "IgE production in human helminth infection. Reciprocal interrelationship between IL-4 and IFN-gamma." J Immunol **150**(5): 1873-1880.
- Kinoshita, T., N. Sawai, et al. (1999). "Interleukin-6 directly modulates stem cell factor-dependent development of human mast cells derived from CD34(+) cord blood cells." Blood **94**(2): 496-508.
- Kirshenbaum, A. S., C. Akin, et al. (2003). "Characterization of novel stem cell factor responsive human mast cell lines LAD 1 and 2 established from a patient with mast cell sarcoma/leukemia; activation following aggregation of FcepsilonRI or FcgammaRI." Leuk Res **27**(8): 677-682.
- Kirshenbaum, A. S., J. P. Goff, et al. (1999). "Demonstration that human mast cells arise from a progenitor cell population that is CD34(+), c-kit(+), and expresses aminopeptidase N (CD13)." Blood **94**(7): 2333-2342.
- Kirshenbaum, A. S. and D. D. Metcalfe (2006). "Growth of human mast cells from bone marrow and peripheral blood-derived CD34+ pluripotent progenitor cells." Methods Mol Biol **315**: 105-112.
- Kitamura, Y. (1989). "Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations." Annu Rev Immunol **7**: 59-76.
- Kitamura, Y., H. Matsuda, et al. (1979). "Clonal nature of mast-cell clusters formed in W/W^v mice after bone marrow transplantation." Nature **281**(5727): 154-155.
- Kitamura, Y., M. Shimada, et al. (1977). "Development of mast cells from grafted bone marrow cells in irradiated mice." Nature **268**(5619): 442-443.
- Kitayama, H., T. Tsujimura, et al. (1996). "Neoplastic transformation of normal hematopoietic cells by constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase." Blood **88**(3): 995-1004.
- Knight, P. A., S. H. Wright, et al. (2000). "Delayed expulsion of the nematode *Trichinella spiralis* in mice lacking the mucosal mast cell-specific granule chymase, mouse mast cell protease-1." J Exp Med **192**(12): 1849-1856.
- Kozlowski, M., L. Larose, et al. (1998). "SHP-1 binds and negatively modulates the c-Kit receptor by interaction with tyrosine 569 in the c-Kit juxtamembrane domain." Mol Cell Biol **18**(4): 2089-2099.
- Krishnaswamy, G., J. Kelley, et al. (2001). "The human mast cell: functions in physiology and disease." Front Biosci **6**: D1109-1127.
- Kruger, P. G., L. Bo, et al. (1990). "Mast cells and multiple sclerosis: a light and electron microscopic study of mast cells in multiple sclerosis emphasizing staining procedures." Acta Neurol Scand **81**(1): 31-36.
- Kubes, P. and S. Kanwar (1994). "Histamine induces leukocyte rolling in post-capillary venules. A P-selectin-mediated event." J Immunol **152**(7): 3570-3577.
- Kuehn, H. S., M. Radinger, et al. (2010). "Measuring mast cell mediator release." Curr Protoc Immunol Chapter 7: Unit7 38.

- Kulka, M., L. Alexopoulou, et al. (2004). "Activation of mast cells by double-stranded RNA: evidence for activation through Toll-like receptor 3." J Allergy Clin Immunol **114**(1): 174-182.
- Kulka, M. and D. D. Metcalfe (2005). "High-resolution tracking of cell division demonstrates differential effects of TH1 and TH2 cytokines on SCF-dependent human mast cell production in vitro: correlation with apoptosis and Kit expression." Blood **105**(2): 592-599.
- Kulka, M. and D. D. Metcalfe (2006). "TLR3 activation inhibits human mast cell attachment to fibronectin and vitronectin." Mol Immunol **43**(10): 1579-1586.
- Kumagai, H., T. Oki, et al. (2003). "Identification and characterization of a new pair of immunoglobulin-like receptors LMIR1 and 2 derived from murine bone marrow-derived mast cells." Biochem Biophys Res Commun **307**(3): 719-729.
- Laidlaw, T. M., J. W. Steinke, et al. (2011). "Characterization of a novel human mast cell line that responds to stem cell factor and expresses functional Fc epsilon RI." J Allergy Clin Immunol **127**(3): 815-822 e811-815.
- Lantz, C. S., M. Yamaguchi, et al. (1997). "IgE regulates mouse basophil Fc epsilon RI expression in vivo." J Immunol **158**(6): 2517-2521.
- Lappalainen, J., K. A. Lindstedt, et al. (2007). "A protocol for generating high numbers of mature and functional human mast cells from peripheral blood." Clin Exp Allergy **37**(9): 1404-1414.
- Latour, S., W. H. Fridman, et al. (1996). "Identification, molecular cloning, biologic properties, and tissue distribution of a novel isoform of murine low-affinity IgG receptor homologous to human Fc gamma RIIB1." J Immunol **157**(1): 189-197.
- Lebel, B. (1983). "A high-sampling-rate automated continuous-flow fluorometric technique for the analysis of nanogram levels of histamine in biological samples." Anal Biochem **133**(1): 16-29.
- Leon, A., A. Burianni, et al. (1994). "Mast cells synthesize, store, and release nerve growth factor." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(9): 3739-3743.
- Letourneur, O., S. Sechi, et al. (1995). "Glycosylation of human truncated Fc epsilon RI alpha chain is necessary for efficient folding in the endoplasmic reticulum." J Biol Chem **270**(14): 8249-8256.
- Leung, K. T., K. Y. Chan, et al. (2011). "The tetraspanin CD9 regulates migration, adhesion, and homing of human cord blood CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells." Blood **117**(6): 1840-1850.
- Leurs, R., P. Blandina, et al. (1998). "Therapeutic potential of histamine H3 receptor agonists and antagonists." Trends Pharmacol Sci **19**(5): 177-183.
- Levi-Schaffer, F., K. F. Austen, et al. (1986). "Coculture of interleukin 3-dependent mouse mast cells with fibroblasts results in a phenotypic change of the mast cells." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(17): 6485-6488.
- Levy, D. (2009). "Migraine pain, meningeal inflammation, and mast cells." Curr Pain Headache Rep **13**(3): 237-240.
- Li, Y., L. Li, et al. (2001). "Mast cells/basophils in the peripheral blood of allergic individuals who are HIV-1 susceptible due to their surface expression of CD4 and the chemokine receptors CCR3, CCR5, and CXCR4." Blood **97**(11): 3484-3490.
- Lin, T. J., R. Garduno, et al. (2002). "Pseudomonas aeruginosa activates human mast cells to induce neutrophil transendothelial migration via mast cell-derived IL-1 alpha and beta." J Immunol **169**(8): 4522-4530.
- Lohi, J., I. Harvima, et al. (1992). "Pericellular substrates of human mast cell tryptase: 72,000 dalton gelatinase and fibronectin." J Cell Biochem **50**(4): 337-349.
- Longley, B. J., Y. Ma, et al. (2000). "New approaches to therapy for mastocytosis. A case for treatment with kit kinase inhibitors." Hematol Oncol Clin North Am **14**(3): 689-695.
- Longley, B. J., M. J. Reguera, et al. (2001). "Classes of c-KIT activating mutations: proposed mechanisms of action and implications for disease classification and therapy." Leuk Res **25**(7): 571-576.
- Lorentz, A., S. Schwengberg, et al. (2000). "Human intestinal mast cells are capable of producing different cytokine profiles: role of IgE receptor cross-linking and IL-4." J Immunol **164**(1): 43-48.
- Lumholtz, I. B. (1979). "[Drug information: agents for the treatment of gynecologic diseases. Hormone substitution in the climacteric]." Sygeplejersken **79**(38): 10.

- Ma, Y., S. Zeng, et al. (2002). "The c-KIT mutation causing human mastocytosis is resistant to STI571 and other KIT kinase inhibitors; kinases with enzymatic site mutations show different inhibitor sensitivity profiles than wild-type kinases and those with regulatory-type mutations." Blood **99**(5): 1741-1744.
- MacGlashan, D., Jr. (2010). "Expression of CD203c and CD63 in human basophils: relationship to differential regulation of piecemeal and anaphylactic degranulation processes." Clin Exp Allergy **40**(9): 1365-1377.
- MacGlashan, D. W., Jr., B. S. Bochner, et al. (1997). "Down-regulation of Fc(epsilon)RI expression on human basophils during in vivo treatment of atopic patients with anti-IgE antibody." J Immunol **158**(3): 1438-1445.
- Mackay, G. A., M. D. Hulett, et al. (2002). "Mutagenesis within human FcepsilonRIalpha differentially affects human and murine IgE binding." J Immunol **168**(4): 1787-1795.
- Malaviya, R., T. Ikeda, et al. (1996). "Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha." Nature **381**(6577): 77-80.
- Malaviya, R., N. J. Twosten, et al. (1996). "Mast cells process bacterial Ags through a phagocytic route for class I MHC presentation to T cells." J Immunol **156**(4): 1490-1496.
- Malbec, O. and M. Daeron (2007). "The mast cell IgG receptors and their roles in tissue inflammation." Immunol Rev **217**: 206-221.
- Malbec, O., K. Roget, et al. (2007). "Peritoneal cell-derived mast cells: an in vitro model of mature serosal-type mouse mast cells." J Immunol **178**(10): 6465-6475.
- Malveaux, F. J., M. C. Conroy, et al. (1978). "IgE receptors on human basophils. Relationship to serum IgE concentration." J Clin Invest **62**(1): 176-181.
- Mannel, D. N., L. Hultner, et al. (1996). "Critical protective role of mast cell-derived tumour necrosis factor in bacterial infection." Res Immunol **147**(8-9): 491-493.
- Manova, K., K. Nocka, et al. (1990). "Gonadal expression of c-kit encoded at the W locus of the mouse." Development **110**(4): 1057-1069.
- Marletta, M. A. (1993). "Nitric oxide synthase structure and mechanism." J Biol Chem **268**(17): 12231-12234.
- Marshall, J. S., J. D. McCurdy, et al. (2003). "Toll-like receptor-mediated activation of mast cells: implications for allergic disease?" Int Arch Allergy Immunol **132**(2): 87-97.
- Matsuda, H., Y. Kannan, et al. (1991). "Nerve growth factor induces development of connective tissue-type mast cells in vitro from murine bone marrow cells." J Exp Med **174**(1): 7-14.
- Matsuda, H., N. Watanabe, et al. (1990). "Necessity of IgE antibodies and mast cells for manifestation of resistance against larval *Haemaphysalis longicornis* ticks in mice." J Immunol **144**(1): 259-262.
- Matsui, Y., K. M. Zsebo, et al. (1990). "Embryonic expression of a haematopoietic growth factor encoded by the Sl locus and the ligand for c-kit." Nature **347**(6294): 667-669.
- Matsushima, H., N. Yamada, et al. (2004). "TLR3-, TLR7-, and TLR9-mediated production of proinflammatory cytokines and chemokines from murine connective tissue type skin-derived mast cells but not from bone marrow-derived mast cells." J Immunol **173**(1): 531-541.
- Metcalfe, D. D. (1991). "Classification and diagnosis of mastocytosis: current status." J Invest Dermatol **96**(3 Suppl): 2S-4S; discussion 4S, 60S-65S.
- Metcalfe, D. D. (2008). "Mast cells and mastocytosis." Blood **112**(4): 946-956.
- Metcalfe, D. D., D. Baram, et al. (1997). "Mast cells." Physiol Rev **77**(4): 1033-1079.
- Metcalfe, D. D., M. Kaliner, et al. (1981). "The mast cell." Crit Rev Immunol **3**(1): 23-74.
- Metz, M., A. M. Piliponsky, et al. (2006). "Mast cells can enhance resistance to snake and honeybee venoms." Science **313**(5786): 526-530.
- Meyer, T., U. Regenass, et al. (1989). "A derivative of staurosporine (CGP 41 251) shows selectivity for protein kinase C inhibition and in vitro anti-proliferative as well as in vivo anti-tumor activity." Int J Cancer **43**(5): 851-856.
- Miller, L., U. Blank, et al. (1989). "Expression of high-affinity binding of human immunoglobulin E by transfected cells." Science **244**(4902): 334-337.

- Mitsui, H., T. Furitsu, et al. (1993). "Development of human mast cells from umbilical cord blood cells by recombinant human and murine c-kit ligand." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(2): 735-739.
- Miyazaki, M., S. Takai, et al. (2006). "Pathological roles of angiotensin II produced by mast cell chymase and the effects of chymase inhibition in animal models." Pharmacol Ther **112**(3): 668-676.
- Moneret-Vautrin, D. A., J. Sainte-Laudy, et al. (1999). "Human basophil activation measured by CD63 expression and LTC4 release in IgE-mediated food allergy." Ann Allergy Asthma Immunol **82**(1): 33-40.
- Moon, T. C., T. Yoshimura, et al. (2012). "Microenvironmental regulation of inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in mouse bone marrow-derived mast cells." J Leukoc Biol **91**(4): 581-590.
- Munoz, S., R. Hernandez-Pando, et al. (2003). "Mast cell activation by Mycobacterium tuberculosis: mediator release and role of CD48." J Immunol **170**(11): 5590-5596.
- Nadler, M. J., S. A. Matthews, et al. (2000). "Signal transduction by the high-affinity immunoglobulin E receptor Fc epsilon RI: coupling form to function." Adv Immunol **76**: 325-355.
- Nagata, H., A. S. Worobec, et al. (1995). "Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(23): 10560-10564.
- Nakahashi-Oda, C., S. Tahara-Hanaoka, et al. (2012). "Apoptotic cells suppress mast cell inflammatory responses via the CD300a immunoreceptor." J Exp Med **209**(8): 1493-1503.
- Nakahata, T., T. Kobayashi, et al. (1986). "Extensive proliferation of mature connective-tissue type mast cells in vitro." Nature **324**(6092): 65-67.
- Nauta, A. J., F. Engels, et al. (2008). "Mechanisms of allergy and asthma." Eur J Pharmacol **585**(2-3): 354-360.
- Navi, D., J. Saegusa, et al. (2007). "Mast cells and immunological skin diseases." Clin Rev Allergy Immunol **33**(1-2): 144-155.
- Nijkamp, F. P. and J. M. Sitsen (1982). "Leukotrienes, allergy and inflammation." Pharm Weekbl Sci **4**(6): 165-171.
- Nilsson, G., T. Blom, et al. (1996). "Stem cell factor-dependent human cord blood derived mast cells express alpha- and beta-tryptase, heparin and chondroitin sulphate." Immunology **88**(2): 308-314.
- Nilsson, G., D. D. Metcalfe, et al. (2000). "Demonstration that platelet-activating factor is capable of activating mast cells and inducing a chemotactic response." Immunology **99**(2): 314-319.
- Nilsson, G., U. Miettinen, et al. (1994). "Interleukin-4 inhibits the expression of Kit and tryptase during stem cell factor-dependent development of human mast cells from fetal liver cells." Blood **84**(5): 1519-1527.
- Nishizumi, H. and T. Yamamoto (1997). "Impaired tyrosine phosphorylation and Ca²⁺ mobilization, but not degranulation, in lyn-deficient bone marrow-derived mast cells." J Immunol **158**(5): 2350-2355.
- Novak, N., S. Kraft, et al. (2001). "IgE receptors." Curr Opin Immunol **13**(6): 721-726.
- Novak, N., S. Kraft, et al. (2003). "Unraveling the mission of FcepsilonRI on antigen-presenting cells." J Allergy Clin Immunol **111**(1): 38-44.
- Novak, N., C. Tepel, et al. (2003). "Evidence for a differential expression of the FcepsilonRIgamma chain in dendritic cells of atopic and nonatopic donors." J Clin Invest **111**(7): 1047-1056.
- O'Byrne, P. M. (1997). "Leukotrienes in the pathogenesis of asthma." Chest **111**(2 Suppl): 27S-34S.
- Okayama, Y., A. S. Kirshenbaum, et al. (2000). "Expression of a functional high-affinity IgG receptor, Fc gamma RI, on human mast cells: Up-regulation by IFN-gamma." J Immunol **164**(8): 4332-4339.
- Olsson, Y. (1974). "Mast cells in plaques of multiple sclerosis." Acta Neurol Scand **50**(5): 611-618.
- Orfao, A., A. C. Garcia-Montero, et al. (2007). "Recent advances in the understanding of mastocytosis: the role of KIT mutations." Br J Haematol **138**(1): 12-30.
- Orr-Urtreger, A., A. Avivi, et al. (1990). "Developmental expression of c-kit, a proto-oncogene encoded by the W locus." Development **109**(4): 911-923.
- Oskeritzian, C. A., Z. Wang, et al. (1999). "Recombinant human (rh)IL-4-mediated apoptosis and recombinant human IL-6-mediated protection of recombinant human stem cell factor-dependent human mast cells derived from cord blood mononuclear cell progenitors." J Immunol **163**(9): 5105-5115.

- Pagano, L., C. G. Valentini, et al. (2008). "Advanced mast cell disease: an Italian Hematological Multicenter experience." Int J Hematol **88**(5): 483-488.
- Parmentier, M. (1997). "[Cloning and characterization of CCR5 receptors of chemokines, principal receptors of the AIDS virus]." Bull Mem Acad R Med Belg **152**(7-9): 311-316; discussion 317.
- Parravicini, V., M. Gadina, et al. (2002). "Fyn kinase initiates complementary signals required for IgE-dependent mast cell degranulation." Nat Immunol **3**(8): 741-748.
- Peters, EM, et al. (2003). "Kit is expressed by epithelial cells in vivo". J Invest Dermatol Nov; **121**(5):976-84
- Piao, X. and A. Bernstein (1996). "A point mutation in the catalytic domain of c-kit induces growth factor independence, tumorigenicity, and differentiation of mast cells." Blood **87**(8): 3117-3123.
- Pietsch, T., U. Kvas, et al. (1992). "Effects of human stem cell factor (c-kit ligand) on proliferation of myeloid leukemia cells: heterogeneity in response and synergy with other hematopoietic growth factors." Blood **80**(5): 1199-1206.
- Pivniouk, V. I., T. R. Martin, et al. (1999). "SLP-76 deficiency impairs signaling via the high-affinity IgE receptor in mast cells." J Clin Invest **103**(12): 1737-1743.
- Poncet, P., M. Arock, et al. (1999). "MHC class II-dependent activation of CD4+ T cell hybridomas by human mast cells through superantigen presentation." J Leukoc Biol **66**(1): 105-112.
- Prodeus, A. P., X. Zhou, et al. (1997). "Impaired mast cell-dependent natural immunity in complement C3-deficient mice." Nature **390**(6656): 172-175.
- Prussin, C. and D. D. Metcalfe (2006). "5. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils." J Allergy Clin Immunol **117**(2 Suppl Mini-Primer): S450-456.
- Pullarkat, V. A., S. T. Pullarkat, et al. (2000). "Mast cell disease associated with acute myeloid leukemia: detection of a new c-kit mutation Asp816His." Am J Hematol **65**(4): 307-309.
- Purtill, D., J. Cooney, et al. (2008). "Dasatinib therapy for systemic mastocytosis: four cases." Eur J Haematol **80**(5): 456-458.
- Qiu, F. H., P. Ray, et al. (1988). "Primary structure of c-kit: relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family--oncogenic activation of v-kit involves deletion of extracellular domain and C terminus." EMBO J **7**(4): 1003-1011.
- Quarto, R., J. P. Kinet, et al. (1985). "Coordinate synthesis and degradation of the alpha-, beta- and gamma-subunits of the receptor for immunoglobulin E." Mol Immunol **22**(9): 1045-1051.
- Radinger, M., B. M. Jensen, et al. (2010). "Generation, isolation, and maintenance of human mast cells and mast cell lines derived from peripheral blood or cord blood." Curr Protoc Immunol **Chapter 7**: Unit 7 37.
- Raible, D. G., E. S. Schulman, et al. (1992). "Mast cell mediators prostaglandin-D2 and histamine activate human eosinophils." J Immunol **148**(11): 3536-3542.
- Raphael, G. D. and D. D. Metcalfe (1986). "Mediators of airway inflammation." Eur J Respir Dis Suppl **147**: 44-56.
- Raposo, G., D. Tenza, et al. (1997). "Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation." Mol Biol Cell **8**(12): 2631-2645.
- Razin, E., C. Cordon-Cardo, et al. (1981). "Growth of a pure population of mouse mast cells in vitro with conditioned medium derived from concanavalin A-stimulated splenocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(4): 2559-2561.
- Razin, E., J. M. Mencia-Huerta, et al. (1982). "Generation of leukotriene C4 from a subclass of mast cells differentiated in vitro from mouse bone marrow." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(15): 4665-4667.
- Razin, E., J. M. Mencia-Huerta, et al. (1983). "IgE-mediated release of leukotriene C4, chondroitin sulfate E proteoglycan, beta-hexosaminidase, and histamine from cultured bone marrow-derived mouse mast cells." J Exp Med **157**(1): 189-201.
- Razin, E., R. L. Stevens, et al. (1982). "Culture from mouse bone marrow of a subclass of mast cells possessing a distinct chondroitin sulfate proteoglycan with glycosaminoglycans rich in N-acetylgalactosamine-4,6-disulfate." J Biol Chem **257**(12): 7229-7236.

- Reed, C. E. and H. Kita (2004). "The role of protease activation of inflammation in allergic respiratory diseases." J Allergy Clin Immunol **114**(5): 997-1008; quiz 1009.
- Ronnberg, E., F. R. Melo, et al. (2012). "Mast cell proteoglycans." J Histochem Cytochem **60**(12): 950-962.
- Roskoski, R., Jr. (2005). "Signaling by Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor." Biochem Biophys Res Commun **337**(1): 1-13.
- Royer, B., S. Varadaradjalou, et al. (2001). "Inhibition of IgE-induced activation of human mast cells by IL-10." Clin Exp Allergy **31**(5): 694-704.
- Rozniecki, J., P. Gorski, et al. (1983). "[Comparative evaluation of the effectiveness of sodium cromoglycate and ketotifen in bronchial asthma and their effect on blood histamine and polmyxin-induced bronchial spasm]." Pneumonol Pol **51**(11): 547-551.
- Rozniecki, J. J., S. L. Hauser, et al. (1995). "Elevated mast cell tryptase in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients." Ann Neurol **37**(1): 63-66.
- Rygaard, K., T. Nakamura, et al. (1993). "Expression of the proto-oncogenes c-met and c-kit and their ligands, hepatocyte growth factor/scatter factor and stem cell factor, in SCLC cell lines and xenografts." Br J Cancer **67**(1): 37-46.
- Saito, H., M. Ebisawa, et al. (1995). "Characterization of cord-blood-derived human mast cells cultured in the presence of Steel factor and interleukin-6." Int Arch Allergy Immunol **107**(1-3): 63-65.
- Saito, H., M. Ebisawa, et al. (1996). "Selective growth of human mast cells induced by Steel factor, IL-6, and prostaglandin E2 from cord blood mononuclear cells." J Immunol **157**(1): 343-350.
- Saitoh, S., R. Arudchandran, et al. (2000). "LAT is essential for Fc(epsilon)RI-mediated mast cell activation." Immunity **12**(5): 525-535.
- Sakurai, D., S. Yamasaki, et al. (2004). "Fc epsilon RI gamma-ITAM is differentially required for mast cell function in vivo." J Immunol **172**(4): 2374-2381.
- Sakurai, S., S. Oguni, et al. (2001). "Mutations in c-kit gene exons 9 and 13 in gastrointestinal stromal tumors among Japanese." Jpn J Cancer Res **92**(5): 494-498.
- Sarlomo-Rikala, M., A. J. Kovatich, et al. (1998). "CD117: a sensitive marker for gastrointestinal stromal tumors that is more specific than CD34." Mod Pathol **11**(8): 728-734.
- Schwartz, L. B. (1987). "Mediators of human mast cells and human mast cell subsets." Ann Allergy **58**(4): 226-235.
- Schwartz, L. B. and K. F. Austen (1980). "Enzymes of the mast cell granule." J Invest Dermatol **74**(5): 349-353.
- Schwartz, L. B., K. F. Austen, et al. (1979). "Immunologic release of beta-hexosaminidase and beta-glucuronidase from purified rat serosal mast cells." J Immunol **123**(4): 1445-1450.
- Schwartz, L. B., A. M. Irani, et al. (1987). "Quantitation of histamine, tryptase, and chymase in dispersed human T and TC mast cells." J Immunol **138**(8): 2611-2615.
- Schwartz, L. B., R. A. Lewis, et al. (1981). "Acid hydrolases and tryptase from secretory granules of dispersed human lung mast cells." J Immunol **126**(4): 1290-1294.
- Secor, V. H., W. E. Secor, et al. (2000). "Mast cells are essential for early onset and severe disease in a murine model of multiple sclerosis." J Exp Med **191**(5): 813-822.
- Shah, N. P., F. Y. Lee, et al. (2006). "Dasatinib (BMS-354825) inhibits KITD816V, an imatinib-resistant activating mutation that triggers neoplastic growth in most patients with systemic mastocytosis." Blood **108**(1): 286-291.
- Sher, A., A. Hein, et al. (1979). "Complement receptors promote the phagocytosis of bacteria by rat peritoneal mast cells." Lab Invest **41**(6): 490-499.
- Shiang, C., T. Mauad, et al. (2009). "Pulmonary periarterial inflammation in fatal asthma." Clin Exp Allergy **39**(10): 1499-1507.
- Siraganian, R. P. (2003). "Mast cell signal transduction from the high-affinity IgE receptor." Curr Opin Immunol **15**(6): 639-646.
- Soll, A. H., K. J. Lewin, et al. (1981). "Isolation of histamine-containing cells from rat gastric mucosa: biochemical and morphologic differences from mast cells." Gastroenterology **80**(4): 717-727.

- Sommerhoff, C. P. (2001). "Mast cell tryptases and airway remodeling." Am J Respir Crit Care Med **164**(10 Pt 2): S52-58.
- Spinnler, K., T. Frohlich, et al. (2011). "Human tryptase cleaves pro-nerve growth factor (pro-NGF): hints of local, mast cell-dependent regulation of NGF/pro-NGF action." J Biol Chem **286**(36): 31707-31713.
- St John, A. L., C. Y. Chan, et al. (2012). "Synthetic mast-cell granules as adjuvants to promote and polarize immunity in lymph nodes." Nat Mater **11**(3): 250-257.
- Stelekati, E., Z. Orinska, et al. (2007). "Mast cells in allergy: innate instructors of adaptive responses." Immunobiology **212**(6): 505-519.
- Stevens, R. L. (1986). "Secretory granule proteoglycans of mast cells and natural killer cells." Ciba Found Symp **124**: 272-285.
- Stevens, R. L., E. Razin, et al. (1983). "Synthesis of chondroitin sulfate E glycosaminoglycan onto p-nitrophenyl-beta-D-xyloside and its localization to the secretory granules of rat serosal mast cells and mouse bone marrow-derived mast cells." J Biol Chem **258**(9): 5977-5984.
- Stone, K. D., C. Prussin, et al. (2010). "IgE, mast cells, basophils, and eosinophils." J Allergy Clin Immunol **125**(2 Suppl 2): S73-80.
- Sundstrom, M., H. Vliagoftis, et al. (2003). "Functional and phenotypic studies of two variants of a human mast cell line with a distinct set of mutations in the c-kit proto-oncogene." Immunology **108**(1): 89-97.
- Supajatura, V., H. Ushio, et al. (2002). "Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity." J Clin Invest **109**(10): 1351-1359.
- Supajatura, V., H. Ushio, et al. (2001). "Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4." J Immunol **167**(4): 2250-2256.
- Supajatura, V., H. Ushio, et al. (2002). "Cutting edge: VacA, a vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*, directly activates mast cells for migration and production of proinflammatory cytokines." J Immunol **168**(6): 2603-2607.
- Tam, S. W., S. Demissie, et al. (2004). "A bispecific antibody against human IgE and human FcγRII that inhibits antigen-induced histamine release by human mast cells and basophils." Allergy **59**(7): 772-780.
- Tefferi, A. and A. Pardanani (2004). "Systemic mastocytosis: current concepts and treatment advances." Curr Hematol Rep **3**(3): 197-202.
- Tefferi, A., S. Verstovsek, et al. (2008). "How we diagnose and treat WHO-defined systemic mastocytosis in adults." Haematologica **93**(1): 6-9.
- Theoharides, T. C., D. Kempuraj, et al. (2008). "Human mast cells stimulate activated T cells: implications for multiple sclerosis." Ann N Y Acad Sci **1144**: 74-82.
- Thomas, V. A., C. J. Wheelless, et al. (1998). "Human mast cell tryptase fibrinogenolysis: kinetics, anticoagulation mechanism, and cell adhesion disruption." Biochemistry **37**(8): 2291-2298.
- Thompson, H. L., E. S. Schulman, et al. (1988). "Identification of chondroitin sulfate E in human lung mast cells." J Immunol **140**(8): 2708-2713.
- Thrasher, S. M., L. K. Scalfone, et al. (2013). "In vitro modelling of rat mucosal mast cell function in *Trichinella spiralis* infection." Parasite Immunol **35**(1): 21-31.
- Tobio, A., A. Alfonso, et al. (2011). "C-kit mutations and PKC crosstalks: PKC translocates to nucleus only in cells HMC(5)(6)(0),(8)(1)(6)." J Cell Biochem **112**(9): 2637-2651.
- Toru, H., C. Ra, et al. (1996). "Induction of the high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) on human mast cells by IL-4." Int Immunol **8**(9): 1367-1373.
- Toyota, M., Y. Hinoda, et al. (1993). "Expression of c-kit and kit ligand in human colon carcinoma cells." Tumour Biol **14**(5): 295-302.
- Travis, W. D., C. Y. Li, et al. (1988). "Systemic mast cell disease. Analysis of 58 cases and literature review." Medicine (Baltimore) **67**(6): 345-368.
- Triggiani, M., A. Oriente, et al. (1995). "Metabolism of lipid mediators in human basophils and mast cells." Chem Immunol **61**: 135-147.

- Trivedi, N. N. and G. H. Caughey (2010). "Mast cell peptidases: chameleons of innate immunity and host defense." Am J Respir Cell Mol Biol **42**(3): 257-267.
- Trivedi, N. N., B. Tamraz, et al. (2009). "Human subjects are protected from mast cell tryptase deficiency despite frequent inheritance of loss-of-function mutations." J Allergy Clin Immunol **124**(5): 1099-1105 e1091-1094.
- Tsai, M., ., et al. (1991). "The rat c-kit ligand, stem cell factor, induces the development of connective tissue-type and mucosal mast cells in vivo. Analysis by anatomical distribution, histochemistry, and protease phenotype." J Exp Med **174**(1): 125-131.
- Tsuji, K., T. Nakahata, et al. (1990). "Effects of interleukin-3 and interleukin-4 on the development of "connective tissue-type" mast cells: interleukin-3 supports their survival and interleukin-4 triggers and supports their proliferation synergistically with interleukin-3." Blood **75**(2): 421-427.
- Turner, H. and J. P. Kinet (1999). "Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI." Nature **402**(6760 Suppl): B24-30.
- Uvnas, B., C. H. Aborg, et al. (1970). "Storage of histamine in mast cells. Evidence for an ionic binding of histamine to protein carboxyls in the granule heparin-protein complex." Acta Physiol Scand Suppl **336**: 1-26.
- Valent, P. and P. Bettelheim (1992). "Cell surface structures on human basophils and mast cells: biochemical and functional characterization." Adv Immunol **52**: 333-423.
- Valent, P., L. Escribano, et al. (1999). "Recent advances in mastocytosis research. Summary of the Vienna Mastocytosis Meeting 1998." Int Arch Allergy Immunol **120**(1): 1-7.
- Varadaradjalou, S., F. Feger, et al. (2003). "Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human mast cells." Eur J Immunol **33**(4): 899-906.
- Vega-Ruiz, A., J. E. Cortes, et al. (2009). "Phase II study of imatinib mesylate as therapy for patients with systemic mastocytosis." Leuk Res **33**(11): 1481-1484.
- Verstovsek, S., A. Tefferi, et al. (2008). "Phase II study of dasatinib in Philadelphia chromosome-negative acute and chronic myeloid diseases, including systemic mastocytosis." Clin Cancer Res **14**(12): 3906-3915.
- Vliagoftis, H. and A. D. Befus (2005). "Rapidly changing perspectives about mast cells at mucosal surfaces." Immunol Rev **206**: 190-203.
- Wedemeyer, J. and S. J. Galli (2000). "Mast cells and basophils in acquired immunity." Br Med Bull **56**(4): 936-955.
- Wedemeyer, J., M. Tsai, et al. (2000). "Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity." Curr Opin Immunol **12**(6): 624-631.
- Weidner, N. and K. F. Austen (1991). "Ultrastructural and immunohistochemical characterization of normal mast cells at multiple body sites." J Invest Dermatol **96**(3): 26S-30S; discussion 30S-31S.
- Weidner, N. and K. F. Austen (1993). "Heterogeneity of mast cells at multiple body sites. Fluorescent determination of avidin binding and immunofluorescent determination of chymase, tryptase, and carboxypeptidase content." Pathol Res Pract **189**(2): 156-162.
- Welker, P., J. Grabbe, et al. (2000). "Nerve growth factor-beta induces mast-cell marker expression during in vitro culture of human umbilical cord blood cells." Immunology **99**(3): 418-426.
- Welle, M. (1997). "Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase." J Leukoc Biol **61**(3): 233-245.
- Wenzel, S. E., A. A. Fowler, 3rd, et al. (1988). "Activation of pulmonary mast cells by bronchoalveolar allergen challenge. In vivo release of histamine and tryptase in atopic subjects with and without asthma." Am Rev Respir Dis **137**(5): 1002-1008.
- Wershil, B. K., C. M. Theodos, et al. (1994). "Mast cells augment lesion size and persistence during experimental *Leishmania* major infection in the mouse." J Immunol **152**(9): 4563-4571.
- White, M. (1999). "Mediators of inflammation and the inflammatory process." J Allergy Clin Immunol **103**(3 Pt 2): S378-381.
- White, M. V. (1990). "The role of histamine in allergic diseases." J Allergy Clin Immunol **86**(4 Pt 2): 599-605.

- White, M. V., J. E. Slater, et al. (1987). "Histamine and asthma." Am Rev Respir Dis **135**(5): 1165-1176.
- Williams, C. M. and S. J. Galli (2000). "The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease." J Allergy Clin Immunol **105**(5): 847-859.
- Wu, J., S. O. Joseph, et al. (2012). "Targeted therapy: its status and promise in selected solid tumors part I: areas of major impact." Oncology (Williston Park) **26**(10): 936-943.
- Wurzburg, B. A., S. C. Garman, et al. (2000). "Structure of the human IgE-Fc C epsilon 3-C epsilon 4 reveals conformational flexibility in the antibody effector domains." Immunity **13**(3): 375-385.
- Xia, H. Z., Z. Du, et al. (1997). "Effect of recombinant human IL-4 on tryptase, chymase, and Fc epsilon receptor type I expression in recombinant human stem cell factor-dependent fetal liver-derived human mast cells." J Immunol **159**(6): 2911-2921.
- Yamaguchi, M., C. S. Lantz, et al. (1997). "IgE enhances mouse mast cell Fc(epsilon)RI expression in vitro and in vivo: evidence for a novel amplification mechanism in IgE-dependent reactions." J Exp Med **185**(4): 663-672.
- Yamaguchi, M., K. Sayama, et al. (1999). "IgE enhances Fc epsilon receptor I expression and IgE-dependent release of histamine and lipid mediators from human umbilical cord blood-derived mast cells: synergistic effect of IL-4 and IgE on human mast cell Fc epsilon receptor I expression and mediator release." J Immunol **162**(9): 5455-5465.
- Yamaguchi, Y., Y. Gunji, et al. (1993). "Expression of c-kit mRNA and protein during the differentiation of human hematopoietic progenitor cells." Exp Hematol **21**(9): 1233-1238.
- Yanagida, M., H. Fukamachi, et al. (1995). "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**(10): 3705-3714.
- Yang, Y., S. Letard, et al. (2010). "Pediatric mastocytosis-associated KIT extracellular domain mutations exhibit different functional and signaling properties compared with KIT-phosphotransferase domain mutations." Blood **116**(7): 1114-1123.
- Yarden, Y., J. A. Escobedo, et al. (1986). "Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors." Nature **323**(6085): 226-232.
- Yokota, A., H. Kikutani, et al. (1988). "Two species of human Fc epsilon receptor II (Fc epsilon RII/CD23): tissue-specific and IL-4-specific regulation of gene expression." Cell **55**(4): 611-618.
- Yoshikawa, H. and K. Tasaka (2003). "Caspase-dependent and -independent apoptosis of mast cells induced by withdrawal of IL-3 is prevented by Toll-like receptor 4-mediated lipopolysaccharide stimulation." Eur J Immunol **33**(8): 2149-2159.
- Yoshikubo, T., T. Inoue, et al. (2006). "Differentiation and maintenance of mast cells from CD34(+) human cord blood cells." Exp Hematol **34**(3): 320-329.
- Yuan, Q., M. F. Gurish, et al. (1998). "Generation of a novel stem cell factor-dependent mast cell progenitor." J Immunol **161**(10): 5143-5146.
- Zappulla, J. P., M. Arock, et al. (2002). "Mast cells: new targets for multiple sclerosis therapy?" J Neuroimmunol **131**(1-2): 5-20.
- Zhao, W., C. L. Kepley, et al. (2006). "Fc gamma RIIa, not Fc gamma RIIb, is constitutively and functionally expressed on skin-derived human mast cells." J Immunol **177**(1): 694-701.

VIII - ANNEXE

Accusé de réception

Par la présente, nous accusons réception de votre demande de traitement d'une demande internationale au titre du Traité de coopération en matière de brevets, comme suit:

Numéro de soumission	1867403	
Numéro de demande PCT	PCT/EP2012/071731	
Date de réception	02 novembre 2012	
Office récepteur	Office européen des brevets, La Haye	
Votre référence	B1166PC00	
Demandeur	CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE	
Nombre de demandeurs	3	
Pays	FR	
Titre	LIGNEES DE MASTOCYTES HUMAINS, PREPARATION ET UTILISATIONS	
Documents produits	eolf-pkda.xml eolf-appb.xml eolf-fees.xml eolf-biod-000002.pdf (2 p.) eolf-othd-000001.pdf (61 p.) eolf-appb-P000001.pdf (19 p.)	eolf-requ.xml eolf-seql.txt eolf-biod-000001.xml eolf-vlog.xml eolf-abst.txt
Effectué par	CN=A.-C. Starck-Loudes 11682,O=Cabinet Becker & Associés,C=FR	

Méthode de soumission

En ligne

Date et heure de
réception

02 novembre 2012, 14:06 (CET)

Message condensé

F9:08:D9:D5:93:E8:B0:D3:71:D0:D4:C1:E4:C5:0D:20:05:8D:9C:9E

Correction par l'OEB d'erreurs figurant dans les ordres de débit transmis via eOLF

Les erreurs figurant dans les ordres de débit transmis via eOLF et causées par une modification des informations saisies dans le formulaire 1038E ou une utilisation persistante de logiciels dépassés (tous les formulaires) peuvent être corrigées automatiquement par l'OEB, sans que la date de paiement soit modifiée (cf. décision T 152/82, JO OEB 1984, 301 et point 6.3 s. RCC, supplément au JO OEB 10/2007).

/Office européen des brevets/

CNCM

Collection Nationale
de Cultures de Microorganismes

INSTITUT PASTEUR

25, Rue du Docteur Roux
F-75724 PARIS CEDEX 15

Tel : +33 1 45 68 82 50

Fax : +33 1 45 68 82 36

Paris, le 2 novembre 2011

PAR TÉLÉCOPIE

01 44 96 83 21

01 47 40 20 74

01 47 40 76 31

ET PAR VOIE ÉLECTRONIQUE

presidence@ens-cachan.fr

lila.ammour@cnrs-dir.fr

michel.acock@psl.aphp.fr

rosinesaleh84@hotmail.com

M JEAN-YVES MÉRINDOL

PRÉSIDENT

ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE DE CACHAN

61 AVENUE DU PRÉSIDENT WILSON

94235 CACHAN CEDEX

et

M PIERRE GOHAR

DIRECTEUR

DIRECTION DE L'INNOVATION ET DES RELATIONS AVEC LES ENTREPRISES

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

3 RUE MICHEL ANGE

75794 PARIS CEDEX 16

V/R : L 02615 / DIRE / LD

N/R : CNCM-30125.1111

OBJ : TROIS LIGNÉES CELLULAIRES À DÉPOSER SOUS LE TRAITÉ DE BUDAPEST.

C/C : M FRÉDÉRIC FOUBERT, DIRE, CNRS,
PR MICHEL AROCK ET MME ROSINE SALEH, LBPA CNRS UMR 8113, ENS CACHAN.

Messieurs,

Par la présente nous vous confirmons avoir reçu aujourd'hui aux fins de trois dépôts initiaux aux termes du Traité de Budapest douze échantillons congelés pour chacune des lignées cellulaires citées ci-dessous. Les originaux des documents de dépôt correspondants ont été reçus précédemment.

Ces matériels ont été enregistrés à la date du 2 novembre 2011 au nom de :

ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE DE CACHAN
61 AVENUE DU PRÉSIDENT WILSON
94235 CACHAN CEDEX

ET

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
3 RUE MICHEL ANGE
75794 PARIS CEDEX 16

sous les numéros :

*Références d'identification
des lignées à déposer*

ROSA KIT WT

ROSA KIT D816V

ROSA KIT Delta 417-419 InsY

*Numéros d'enregistrement
des matériels biologiques reçus*

CNCM I-4551

CNCM I-4552

CNCM I-4553

CNCM

Collection Nationale
de Cultures de Microorganismes

INSTITUT PASTEUR

25, Rue du Docteur Roux
F-75724 PARIS CEDEX 15

Tel : +33 1 45 68 82 50

Fax : +33 1 45 68 82 36

CNCM-30125.1111

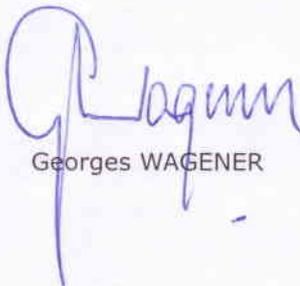
PAGE 2 / 2

02/11/2011

Le numéro d'ordre attribué par la CNCM à chaque lignée est identique au numéro d'enregistrement du matériel qui s'y rapporte, et la date du dépôt est la date de cet enregistrement, si la lignée est acceptée.

Il est entendu que M Frédéric FOUBERT, DIRE, CNRS, assure les fonctions d'interlocuteur de la CNCM pour tous les aspects administratifs concernant ces dépôts.

Restant à votre disposition,
je vous prie d'agréer, Messieurs, l'expression de mes meilleures salutations.



Georges WAGENER

ARTICLE SOUMIS

Technical Advances

A New Human Mast Cell Line Expressing a Functional IgE Receptor converts to Factor-Independence and Tumorigenicity by *KIT* D816V-Transfection

Rosine SALEH¹, Ghaith WEDEH^{1,2}, Harald HERRMANN³, Sabine CERNY-REITERER³, Irina SADOVNIK², Katharina BLATT², Emir HADZIJUSUFOVIC³, Catherine BLANC⁴, Magali LEGARFF-TAVERNIER⁵, Elise CHAPIRO⁵, Florence NGUYEN-KHAC⁵, Frédéric SUBRA¹, Patrick BONNEMYE⁵, Patrice DUBREUIL⁶, Hélène MERLE-BERAL⁵, Christian AUCLAIR¹, Michael WILLMANN⁷, Thomas RUELICKE⁸, Peter VALENT^{2,3}, Michel AROCK^{1,5}

¹Laboratoire de Biologie et Pharmacologie Appliquée, CNRS UMR 8113, Ecole Normale Supérieure de Cachan, Cachan, France.

²Department of Internal Medicine I, Division of Hematology and Hemostaseology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria.

³Ludwig Boltzmann Cluster Oncology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria.

⁴Flow Cytometry Core CyPS, Université Pierre & Marie Curie, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France.

⁵Laboratoire Central d'Hématologie, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France.

⁶Inserm U891, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Marseille, France.

⁷Department of Companion Animals and Horses, Clinic for Internal Medicine and Infectious Diseases, University of Veterinary Medicine Vienna, Vienna Austria.

⁸Institute of Laboratory Animal Science, University of Veterinary Medicine Vienna, Vienna, Austria.

Address correspondence to Michel Arock, LBPA CNRS UMR 8113, Ecole Normale Supérieure de Cachan, 61 Ave du Président Wilson, 94235 Cachan CEDEX, France. Phone: 33.1.47.40.76.85; Fax: 33.1.47.40.76.31; E-Mail: arock@ens-cachan.fr

Abstract

In systemic mastocytosis (SM), clinical problems arise from factor-independent proliferation and IgE-receptor-dependent or -independent activation of mast cells (MCs). Oncogenic signaling through the KIT receptor and IgE-receptor-dependent MC activation are critical events in these patients. However, no human cell line models useful for studying MC activation in the context of SM are available. We have created a stable stem cell factor (SCF)-dependent human MC line, $ROSA^{KIT\ WT}$, which expresses a functional IgE-receptor. Transfection with *KIT* D816V converted $ROSA^{KIT\ WT}$ cells into an SCF-independent clone, $ROSA^{KIT\ D816V}$ that produces a mastocytosis-like disease in NSG mice. *In vitro* cultured $ROSA^{KIT\ D816V}$ exhibited biochemical and phenotypic properties resembling immature human MC. However, co-culturing on stromal cells resulted in their maturation, including chymase expression and high-level expression of IgE-receptors. $ROSA^{KIT\ D816V}$ cells should be a valuable tool for studying mechanisms underlying the pathogenesis of mastocytosis and MC activation syndromes (MCAS). In addition, $ROSA^{KIT\ D816V}$ cells should greatly facilitate the development of novel drugs used to treat patients with SM and/or MCAS.

Introduction

Mast cells (MCs) are hematopoietic stem cell-derived metachromatically granulated cells found in vascularized organs (1). These cells are located in the connective tissues, particularly in the skin, digestive and respiratory tract, and in the intestinal and respiratory mucosa (2). Development of MCs from their progenitor cells is regulated by stem cell factor (SCF), also known as KIT ligand (3). Tissue MCs can be classified into two major sub-types on the basis of their protease content: MC_T cells contain only tryptase and MC_{TC} contain tryptase and chymase (4). MC_T cells are mostly found in the mucosa of the respiratory and gastro-intestinal (GI) tract (5), whereas MC_{TC} are primarily detectable in connective tissues (6). Thus, tryptase staining virtually identifies all MCs, and, apart from KIT, is the recommended method for identifying tissue MCs in various organs, including the BM (7).

MCs express large amounts of vasoactive and immunomodulatory mediators as well as the high affinity receptor for IgE (FcεRI), making them potent effector cells of type I allergic reactions (1). Moreover, MCs play a pivotal role in the initiation and enhancement of the innate and adaptive immune response against various pathogens and represent a potential source of multifunctional cytokines that participate in the recruitment and activation of other cells in the inflammatory microenvironment (8).

MCs are key effector cells involved in MC activation syndromes (MCAS) defined by the presence of typical clinical symptoms associated with a transient increase in serum tryptase or another established MC mediator and response to anti-mediator drugs (9). MCAS can be divided into a) primary MCAS (pMCAS) where a monoclonal MC population is found, b) secondary MCAS (sMCAS) related to type I allergy or another underlying disease leading to MC activation (MCA) and c) idiopathic MCAS (iMCAS) where no allergy, no other underlying disease and no monoclonal MCs can be found (9). Primary MCAS are characterized by the presence of activating mutations in the *KIT* gene (9). Primary

MCAS can occur in patients with mastocytosis where *KIT* mutations are frequently found (10). In patients with systemic mastocytosis (SM) the most frequent point mutation is *KIT* D816V (11), whereas in pediatric patients, where the disease is usually restricted to the skin (cutaneous mastocytosis; CM), different *KIT* defects have been detected, mostly in the extracellular portion of *KIT* (12).

Since MCs can be obtained only in limited amounts by purification techniques from different tissues (13), studies on MC properties have been mainly conducted using MC lines or MCs obtained by primary cultures of CD34+ cells. Today, only three human MC lines are available. HMC-1, a human FcεRI-negative MC line was established from the peripheral blood of a patient with MC leukemia (14). HMC-1 cells contain low numbers of granules, low levels of tryptase and exhibit *KIT* mutations (15). The FcεRI-positive LAD2 cell line, derived from the bone marrow aspirate of a patient with *KIT* D816V+ MC sarcoma/leukemia, was the first reported human SCF-dependent MC line (16). It has a normal *KIT* structure but a variable and usually slow doubling time (16). Finally, another immature SCF-independent human MC line, termed LUVA, has been described recently. These cells have a few cytoplasmic granules and a very low expression of FcεRI (17). Thus, none of these three cell lines can be considered as a *KIT* D816V+ and FcεRI+ model closely reflecting clonal MCs in SM or MCAS. In the present study, we have established a novel human MC line, ROSA^{KIT WT}, bearing a functional FcεRI. We also created a factor-independent subclone, termed ROSA^{KIT D816V}, by stably introducing *KIT* D816V in ROSA^{KIT WT} cells. Finally, we were able to show that ROSA^{KIT D816V} cells produce a mastocytosis-like disease in NSG mice.

Results:

Establishment and growth characteristics of ROSA^{KIT WT}, a new SCF-dependent MC line

ROSA^{KIT WT} cells were maintained in culture for more than 30 months in the continuous presence of rhSCF. The mean doubling time of ROSA cells is about 24 hours and cells are split every 3 to 4 days. Optimal growth is obtained by suspending the cells at 2×10^5 cells/mL at day 0 in serum-free medium (SFM) containing 80 ng/mL of rhSCF. After 3-4 days of culture the final cell concentration varies between 1 and 1.5×10^6 cells/mL. The original cell strain has been cloned in semi-solid medium, giving rise to several SCF-dependent subclones which appear very similar to the parental strain in morphology, phenotype, karyotype, and reactivity to SCF (data not shown).

ROSA^{KIT WT} cells are MCs by morphology and phenotype

Cytological examination of cytopsin preparations of ROSA^{KIT WT} cells stained with May-Grünwald Giemsa (MGG) showed that most of the cells appear round with a relatively high nuclear-to-cytoplasm ratio (Figure 1A and 1B). The cytoplasm, which is slightly basophilic, contains purple granules, their number and size being variable from cell to cell: they are few and small in more immature cells, and they are more numerous and voluminous in the cells considered as more mature. Metachromasia was revealed by staining with toluidine blue (Figure 1C). The characterization of this cell line was continued by transmission electron microscopy studies (TEM) (Figure 1D) showing that ROSA^{KIT WT} cells have a large nucleus with loose chromatin, suggesting that the cells are relatively immature. In the nucleus, one to two nucleoli are present. The cytoplasm contains ribosomes, a well developed Golgi apparatus and abundant mitochondria. In addition the cytoplasm contained secretory granules with spherical electron

dense cores surrounded by electron lucent space similar to those described in human cord blood-derived MCs (CBMCs) in primary culture (18).

Finally almost all the cells were strongly positive for tryptase (Figure 1E) and KIT (Figure 1F), but were negative for chymase (data not shown), confirming that the ROSA^{KIT WT} cells are of the MC_T phenotype.

Generation and characterization of the new human SCF-independent MC line, ROSA^{KIT D816V}

Since there is a lack of *in vitro* models of human FcεRI+ MC harboring the *KIT* D816V mutant, and because this *KIT* defect is commonly found in monoclonal MCAS including SM in adults (10, 19-21), we transfected ROSA^{KIT WT} cells with a lentiviral vector carrying the mutant *KIT D816V receptor* gene. The resulting new human SCF-independent MC line, named ROSA^{KIT D816V}, has a mean doubling time similar to that of ROSA^{KIT WT}. ROSA^{KIT D816V} cells are split at 1/5 every 3 to 4 days and can be stored in liquid nitrogen for several months, keeping their viability and their phenotype after thawing. Morphological analysis of ROSA^{KIT D816V} cells showed significant differences when compared to ROSA^{KIT WT} cells. In fact, as assessed by Wright-Giemsa staining, ROSA^{KIT D816V} cells appear to be more mature cells containing more granules per cell (Figure 2A). This is in agreement with previously published data reporting that the introduction of the *KIT* D816V mutation in mouse hematopoietic precursor cells induces the appearance of MC differentiation antigens (22). Interestingly, some of the *in vitro* cultured ROSA^{KIT D816V} cells exhibited a spindle-shaped morphology (Figure 2B), which was not observed with ROSA^{KIT WT} cells (Figure 2C). However, ROSA^{KIT D816V} cells retained a MC_T phenotype since they expressed intracellular tryptase, but not chymase (data not shown).

KIT-sequencing in the ROSA cell lines

The entire structure of the coding regions of *KIT* was sequenced in the 2 ROSA cell lines, and was found normal in all the regions analyzed for ROSA^{KIT WT} cells. Since starting cells used for the transfection of *KIT* D816V contained the endogenous *KIT* WT gene, we expected to find both WT and D816V genes in transfected cells. As a matter of fact, we were able to show the simultaneous presence of two variants of the *KIT* gene in ROSA^{KIT D816V} cells, at position 816: one variant with the codon GAC, corresponding to the WT form, and one variant with the codon GTC at the same position, corresponding to the D816V mutated receptor (data not shown).

Conventional cytogenetics and fluorescence in situ hybridization (FISH) analyses of the ROSA cell lines

ROSA^{KIT WT} cells presented initially with the following karyotype: 47,XY,der(1)inv(1)(p31q21)del(1)(q24q32),+52/47,sl,der(10)t(10;16)(q26;?q),idic(17)(q10)8/48,sdl1,+164 (Figure 3A). Twelve months after the beginning of the culture period, ROSA^{KIT WT} cells presented an evolution of their karyotype (Figure 3B), with loss of the secondary abnormalities, including idic 17q, and appearance of a main sub-clone with the derived chromosome 1 and partial trisomy 5: 46,XY,der(1)inv(1)(p31q21)del(1)(q24q32)447,sl,+53/47,sl,+del(5)(q14q34)13. Interestingly, the karyotype of ROSA^{KIT D816V} cells was similar to that of ROSA^{KIT WT} cells cultured for twelve months. Results from FISH analysis were in accordance with the karyotype of ROSA^{KIT WT} and confirmed the deletion of one copy of *TP53* gene resulting from the dicentric isochromosome of long arm of chromosome 17 (idic 17q) (Figures 3C and 3D). Complete and partial trisomy 5 was also confirmed by this technique (Figures 3E and 3F).

Analysis of the expression of various cell surface antigens by the ROSA cell lines

Both ROSA cell lines stained strongly and uniformly positive for FcεRIα and KIT (CD117) (Supplementary Table 1). The levels of KIT (CD117) were higher in *KIT* D816V+ ROSA cells compared to wt KIT ROSA cells. Regarding these two highly specific MC antigens, we observed that treatment of the ROSA cell lines with IL-4 and with human monoclonal IgE induced a significant decrease in the expression of KIT, as well as an increased expression of FcεRI (Figure 4). All in all, the phenotype of ROSA^{KIT D816V} cells was comparable to the one of ROSA^{KIT WT} cells. Indeed both cell lines were found to express CD45, CD33, and the MC activation marker CD203c (Supplementary Table 1). A number of other antigens known to be expressed by human cultured MCs (23) were also detected on ROSA cells, such as CD32, CD44, CD50, CD66a, CD166 and CD300a (Supplementary Table 1). Surprisingly, ROSA^{KIT D816V} cells were negative for CD2 and CD25, two antigens aberrantly and frequently expressed by BM MCs in patients with SM (24) (Supplementary Table 1).

We were also interested to look at the effect of rhSCF treatment on the expression of two MC specific surface antigens, namely CD117/KIT and CD203c, on the ROSA cell lines. In these experiments, we were able to show (Figure 5) that ROSA^{KIT D816V} cells spontaneously expressed (in the absence of rhSCF) significantly higher levels of CD203c and KIT than ROSA^{KIT WT} cells. Interestingly, this increased expression was totally abolished in the presence of rhSCF (Figure 5).

Clonogenicity of the ROSA cell lines

We next studied the cloning efficiency of the mutant cell line ROSA^{KIT D816V} in semi-solid medium in the absence of rhSCF, and compared this cloning efficiency to that of ROSA^{KIT WT} cells cultured in the presence of rhSCF. We found that ROSA^{KIT WT} cells have a clonogenic capability of around 7%

(mean±SD: 6.8±1.7%; n=3), while ROSA^{KIT D816V} cells appear to be less clonogenic (mean±SD: 4.08±1.7; n=3), which is consistent with the more differentiated state of these latter cells.

FcεRI-activated ROSA^{KIT WT}, but not FcεRI-activated ROSA^{KIT D816V} release MC-related mediators

In order to determine whether the ROSA cell lines could be activated by cross-linking of the IgE receptor, cells were primed first with rhIL-4 and human monoclonal IgE for 5 days (to increase the expression of FcεRI) and were then stimulated by anti-human IgE (5 µg/ml) or by Ca-ionophore A23187 (1 µM) for 1 hour. Anti-IgE-induced activation of ROSA^{KIT WT} cells, but not of ROSA^{KIT D816V}, induced a significant increase of the cell surface expression of CD203c (Figure 6A and data not shown). β-hexosaminidase assay showed the same profile of response. In fact, anti-IgE-activated ROSA^{KIT WT} cells released up to 38% of the total cell content of enzyme after 1 hour of stimulation, whereas ROSA^{KIT D816V} cells did not release β-hexosaminidase on exposure to anti-IgE (Figure 6B and data not shown). As expected, Ca-ionophore induced a strong increase of the expression of CD203c on both ROSA cell lines (Figure 6A and data not shown) as well as a release of up to 80% of β-hexosaminidase (Figure 6B and data not shown), which is consistent with data presented in the literature (25)(26).

Histamine was also released by ROSA^{KIT WT} cells stimulated by various concentrations of anti-IgE (Figure 6C) with a maximum percentage of release peaking around 40% of the total histamine content of the cells with an optimal concentration of anti-IgE (10 µg/mL). The same release was not observed with activated ROSA^{KIT D816V} cells (data not shown). Finally, we characterized the potential of ROSA^{KIT WT}, but not of ROSA^{KIT D816V} cells to synthesize TNF-α and to release this cytokine when stimulated through FcεRI. Indeed, as shown in Figure 6D, there was a dose-dependent (related to the concentration of anti-IgE applied) increase in the release of TNF-α in the cell-free supernatant by primed and then stimulated ROSA^{KIT WT} cells. The same increase was not observed for primed ROSA^{KIT D816V} cells stimulated upon

the same conditions (data not shown). All in all, these data suggest that, surprisingly, *KIT* D816V does not promote releasability or activation in neoplastic MC which is consistent with the notion that many patients with SM do not at all suffer from mediator-related symptoms.

KIT phosphorylation and KIT-dependent signaling are constitutively activated in ROSA^{KIT D816V} cells

To determine whether the ROSA cell lines exhibited constitutive activation of KIT, we examined by the phosphorylation of the tyrosine residue 703 of this receptor by Western blotting in the presence or absence of rhSCF, and compared the responses of ROSA cells with that of HMC1.2 cells. As shown in Figure 7A, in the absence of rhSCF, ROSA^{KITD816V} and HMC-1.2 cells exhibited a constitutive phosphorylation of KIT, whereas ROSA^{KIT WT} cells exhibited only low level of KIT phosphorylation. Stimulation with rhSCF resulted in higher level of phosphorylation of KIT in ROSA^{KIT WT} cells, and increased its level of phosphorylation of in ROSA^{KITD816V} cells, but not in HMC-1.2 cells (Figure 7A).

We also examined the level of phosphorylation of the residue serine 473 of AKT on the presence or absence of rhSCF in the two ROSA cell lines as compared to the one of HMC-1.2 cells. We noticed that, contrasting ROSA^{KIT WT} cells which required the presence of SCF to express phospho-AKT, ROSA^{KIT D816V} cells exhibited a significant phosphorylation of AKT in the absence of rhSCF (Figure 7B). Interestingly, the level of phospho-AKT was even higher in ROSA^{KIT D816V} cells than in HMC1.2 cells (Figure 7B).

Finally, we demonstrated the constitutive phosphorylation of STAT-5 in ROSA^{KIT D816V} cells, but not in ROSA^{KIT WT}, even in the presence of rhSCF (Figure 7C). These data are in accordance with previously published reports showing that STAT-5 is constitutively phosphorylated in neoplastic MCs of *KIT* D816V+ SM patients (22,27-29). Of note, the level of phosphorylation of STAT-5 was not altered by SCF in ROSA^{KIT D816V} cells, but was increased by the cytokine in HMC-1.2 cells (Figure 7C).

Activation of AKT is critical for the proliferation of ROSA^{KIT D816V} cells

In order to evaluate the potential role of AKT in the proliferation of ROSA cells, we treated both cell lines with various concentrations (0.01 to 5 μ M) of a potent and selective inhibitor of AKT1/AKT2 (compound A6730), which allowed us to determine the approximate IC50 of the molecule on ROSA^{KIT^{WT}} and on ROSA^{KIT D816V} cells. Interestingly, as shown in supplementary Figure 1, while the IC50 of compound A6730 was found to be around 3 μ M for ROSA^{KIT^{WT}} cells, the same compound inhibited by 50% the proliferation of ROSA^{KIT D816V} cells at a concentration nearing 0.5 μ M, suggesting that phosphorylation of AKT is critical for the transforming effect of *KIT* D816V.

ROSA cells can be employed as a major new model-system for in vitro drug-testing

We evaluated the effects of three inhibitors of KIT tyrosine kinase activity, namely Imatinib, Dasatinib and Midostaurin (PKC412), each at 1 μ M, on the proliferation of ROSA cell lines. Results are presented in Figure 8. In line with published results on other cell line models (30) we show that ROSA cells bearing KIT WT are sensitive to the inhibitory effects of Imatinib, Dasatinib and Midostaurin, whereas Imatinib was unable to inhibit the proliferation of ROSA^{KIT D816V} cells. As expected, both Dasatinib and Midostaurin were found to inhibit the growth of ROSA cells expressing *KIT* D816V (Figure 8).

Co-culture of ROSA^{KIT^{WT}} and of ROSA^{KIT D816V} cells with MS-5 monolayers induces maturation.

Since we have previously reported that the culture of human hematopoietic CD34+ progenitors on a monolayer of lipoblastic mouse cell line (MS-5) allowed the terminal differentiation of these progenitors into MCs (31), we then tried to drive the differentiation of the ROSA cell lines by such co-culture. We therefore cultured ROSA^{KIT^{WT}} or ROSA^{KIT D816V} cells for up to three months on a confluent monolayer of MS-5 cells. At the beginning of the coculture, most of the cells of both ROSA cell lines adhered

firmly to the monolayer. Afterwards, free non-adherent cells were continuously released in the supernatant of the 3 co-cultured ROSA cell lines. These non-adherent co-cultured ROSA cells were analyzed at regular intervals for their morphology after MGG staining, their metachromasia after toluidine blue staining, their content in chymase by immunocytochemistry and their expression of different surface markers, including KIT, FcεRI, CD54 and CD203c.

Analysis of the ROSA^{KIT WT} or ROSA^{KIT D816V} cells co-cultured for 3 months showed that the cells acquired a more mature phenotype in co-culture. Indeed, a significant percentage of the co-cultured ROSA^{KIT WT} or ROSA^{KIT D816V} cells were highly granulated as evidenced after MGG staining (Figure 9A and 9B). In co-cultured ROSA^{KIT WT} or ROSA^{KIT D816V} cells, these numerous cytoplasmic granules were strongly metachromatic after toluidine blue staining (Figure 9C and 9D). In addition, a significant percentage of co-cultured ROSA^{KIT WT} and ROSA^{KIT D816V} cells strongly expressed chymase (Figure 9E and 9F) and this was particularly evident for ROSA^{KIT WT} (Figure 9E). Finally, co-culture on MS-5 cells induced a strong and significant increase in the expression of FcεRI, of CD54 which is consistently more expressed on mature MCs than on CBMCs (32) and of CD203c on ROSA^{KIT WT} or on ROSA^{KIT D816V} cells as compared to non co-cultured cells (Figure 9G and data not shown).

The two ROSA cell lines differentially engraft NOD-SCID IL-2Rgamma^{null} (NSG) mice

We sought to investigate whether the two ROSA cell lines could engraft highly immunodeficient NOD-SCID IL-2Rgamma^{null} (NSG) mice. Mice were injected intravenously or subcutaneously with ROSA^{KIT WT} or ROSA^{KIT D816V} cells. As soon as disease symptoms appeared or after a maximum period of 6 months, the mice were sacrificed and, depending on the site of injection, BM samples or dispersed subcutaneous tumors were analyzed by flow cytometry for their content of CD117+/CD45+ cells. As shown in Table 1, nearly all the mice injected intravenously with the two different ROSA cells presented

a significant BM engraftment. However, the mean percentage of CD117+/CD45+ in BM was significantly higher in the mice injected with ROSA^{KIT D816V} (52%) than in the mice injected with ROSA^{KIT WT} cells (2.62%) (Table 1). In the mice that were injected subcutaneously, the data were more nuanced since only one mouse out of five developed a sub-cutaneous tumor when injected with ROSA^{KIT WT} cells and one out of four when injected with ROSA^{KIT D816V} cells (Table 1). In all cases, the sub-cutaneous tumors consisted of at least 50% CD117+/CD45+ cells (range: 58-99%). In addition, BM cells from sacrificed mice were cytocentrifuged and stained by MGG. As shown in Figure 10A, BM-engrafted ROSA^{KIT WT} cells kept a morphological aspect comparable to the one observed for cells maintained *in vitro*, while in BM-engrafted ROSA^{KIT D816V} cells, we observed the presence of spindle-shaped elements resembling those found *in vitro* on smears (Figure 2B) and *in vivo* in BM MCs from patients with *KIT* D816V+ SM (19) (Figure 10B). Always concerning BM involvement of mice injected intravenously with ROSA^{KIT D816V}, we compared the level of engraftment as testified by flow cytometry for CD117+/CD45+ to the level of infiltration of the BM evaluated by specific immunohistochemistry (IHC) for tryptase on BM biopsy. Data presented in Figure 11A to 11E show that there is a highly significant correlation between the percentage of CD117+/CD45+ cells in total BM cells and the level of infiltration by tryptase positive cells.

Finally, since the nature of the microenvironment can influence the phenotype of MCs, we asked whether there is a difference in the intensity of IHC staining for chymase between cells grafted subcutaneously and cells engrafted in the BM of mice engrafted with ROSA^{KIT D816V} cells. The results, presented in Table 2, show that there is a clear tendency to increased expression of chymase when ROSA^{KIT D816V} cells are transplanted subcutaneously, as compared to BM-grafted cells that remained negative for chymase.

Discussion

Mast cell research is greatly suffering from a lack of human cell lines stably expressing a functional IgE receptor. We have established and characterized a new FcεRI-positive SCF-dependent human MC line, termed ROSA^{KIT WT}, derived from CD34+ hematopoietic precursors of a normal human CB. Moreover, we have established various subclones of ROSA, including one SCF-independent subclone, ROSA^{KIT D816V}, which was generated by transfection of *KIT* D816V into ROSA^{KIT WT} cells.

ROSA^{KIT WT} cells are dependent on the continuous presence of SCF for their growth, as evidenced by cell death induced by deprivation of SCF. In addition, ROSA^{KIT WT} cells have a normal *KIT* structure. As already published for normal human MCs (33), addition of recombinant IL-4 on ROSA^{KIT WT} cells induced a decrease in *KIT* expression and upregulated the expression of FcεRI. ROSA^{KIT WT} cells have metachromatically stained granules and are strongly positive for tryptase, but negative for chymase, meaning that the cell population has a MC_T phenotype, as it is also the case for cord blood-derived MCs (CBMCs) (34). By contrast to these latter elements, ROSA^{KIT WT} cells have been continuously cultured for more than 30 months in our laboratory, with a doubling time of around 24 hours and without significant alterations of their phenotype and functions over this period. Interestingly, and contrasting to what is observed with CBMCs, ROSA^{KIT WT} cells are easy to freeze and to thaw by conventional techniques.

To study the biology of MCs and the potential anti-degranulating and/or anti-inflammatory effect of chemical compounds that target MCs, either human MCs obtained in primary culture of hematopoietic progenitors (31), MCs purified from tissues (31) or cell lines might be used. Regarding primary cultures or MCs purified from tissues, in both cases, these are complex and expensive models, poorly reproducible, with a variable and frequently low yield (31). Regarding human cell lines, only two FcεRI+ models have been yet published: LAD-2 and LUVA cells. The SCF-dependent LAD-2 cell line

and its subclones, derived from the BM of a patient with a *KIT* D816V+ MC sarcoma (16), express a functional FcεRI, but has a very long doubling time of around 15 days. Besides, the SCF-independent LUVA cells, derived from peripheral blood cells of an allergic patient (17), have a normal *KIT* structure, but express very low amount of FcεRI and is hard to activate by this means. As a result of these limitations, the establishment of our new granulated human MC line, ROSA^{KIT WT}, stably expressing a fully functional FcεRI, with a short doubling time allowing its obtention in large quantities using inexpensive reagents and materials, opens new access to investigations on human MC functions. In addition, these properties make it a suitable model for high-throughput screening tests in the field of anti-allergic and/or anti-inflammatory therapeutics.

MCs are the pivotal cells involved in the so-called “MC activation syndromes” (MCAS). A new classification of MCAS has been recently introduced (9) and distinguishes three categories of MCAS: 1) primary MCAS (pMCAS) where a monoclonal MC population can be found, 2) secondary MCAS related to type I allergy or another underlying disease leading to MCA and 3) idiopathic MCAS where no allergy, no other underlying disease or no monoclonal MCs can be found (9). Primary MCAS are characterized by the presence of activating mutations in the *KIT* gene (9). When patients with pMCAS fulfill the diagnostic WHO criteria for mastocytosis (35), the final diagnostic is mastocytosis with pMCAS. In adult mastocytosis patients, where the disease is often systemic (systemic mastocytosis; SM) and sometimes aggressive, the most frequent *KIT* defect found is a point mutation in the catalytic domain of *KIT*, *KIT* D816V (11). In pMCAS that do not fulfill the above cited criteria, and where there is no cutaneous involvement, a (mono)clonal MCAS (mMCAS) is evoked (9). In this later case, a *KIT* D816V point mutation is also often found in the clonal MC population (9). This *KIT* mutation accounts for the pathophysiology of the disease as already demonstrated by us and other authors in *in vitro* (36) and *in vivo* models (37). However, *in vitro* models available today to study the pathophysiology of

MCAS and the impact of *KIT* D816V mutation on activation of human MCs are limited. Indeed, the only available cellular model of human MCs, carrying *KIT* defects, is the FcεRI-negative HMC-1 cell line and its two sub-clones HMC-1.1 and HMC-1.2 (15). Both clones have a T-to-G mutation at codon 560 in the juxtamembrane domain of the *KIT* gene (V560G), whereas the HMC-1.2 subclone exhibits in addition the *KIT* D816V mutation (15). The major drawback of these HMC-1 cell lines is the absence of subclone bearing only the D816V mutation, and of subclones presenting with a normal *KIT* gene which makes it difficult to compare signaling recruited by normal or mutant forms of *KIT* in the same cellular model. Thus, in order to overcome these limitations, we have stably transfected ROSA^{KIT WT} cells with a lentiviral vector providing construct encoding the *KIT* D816V mutation, allowing us to establish a new human SCF-independent MC line (ROSA^{KIT D816V}), which constitutes, to our knowledge the first *in vitro* model of human MC with *KIT* D816V mutant alone. ROSA^{KIT D816V} cells are particularly easy to grow in large quantities, their doubling time being around 24 hours. Moreover, they can be easily frozen and thawed using conventional freezing methods. Interestingly, the morphology of ROSA^{KIT D816V} cells appears similar to the one of neoplastic MCs encountered in involved tissues in SM, with a spindle-shaped appearance (19). Of note, ROSA^{KIT D816V} cells express CD117, CD203c and tryptase but they also express FcεRI at a similar level comparable to the one of ROSA^{KIT WT} cells. Intriguingly, despite this significant expression of FcεRI, which was up-regulated by IL-4/IgE priming and by co-culture on MS-5 monolayers, ROSA^{KIT D816V} cells were not activated by cross-linking of this receptor. This discrepancy could be related to the continuous autophosphorylation of KIT and recruitment of downstream signaling events in ROSA^{KIT D816V} cells. Indeed, common signaling pathways are used by KIT and FcεRI (38) and MCs chronically exposed to SCF displayed a marked attenuation of FcεRI-mediated degranulation and cytokine production (39). One might thus hypothesize that the continuous and exaggerated phosphorylation of KIT-related signaling pathways in ROSA^{KIT D816V} cells might divert

common substrates from their use during FcεRI aggregation, leading to anergy towards this activation. In addition, the constant stimulation of the cells by the mutant KIT receptor might also explain the excessive release of mediators from abnormal MCs, sometimes leading to idiopathic anaphylaxis, as observed in primary MCAS (40). These assumptions are currently under investigation in our laboratory. Activation of KIT by ligation of SCF recruits a number of signaling pathways in MCs. Particularly, the activation of the PI3K/AKT pathway has been shown to contribute to important KIT-dependent cellular functions, such as proliferation, survival, maturation, adhesion or activation (41, 42). Interestingly, we show here that introduction of *KIT* D816V in ROSA cells can induce the autophosphorylation of the receptor in the absence of the ligand but also the constitutive activation of critical downstream signaling events, such as AKT, which is consistent over previously reported data (43). In addition, it has been shown that the presence of a mutant KIT D816V receptor leads to the recruitment of alternative signaling pathways not evoked by its wild-type counterpart, and particularly of STAT-5 (22, 27-29). Interestingly, ROSA^{KIT D816V} cells expressed constitutively phosphorylated STAT-5 even in the absence of rhSCF, meaning that these cells utilize the same alternative pathways like the ones used by MCs from mastocytosis patients. Moreover, using a specific inhibitor of AKT activity, we showed that ROSA^{KIT D816V} cells are much more sensitive to the antiproliferative effects of this molecule than are the ROSA^{KIT WT} cells. Together with our results concerning the constitutive phosphorylation of STAT-5 in *KIT* D816V+ MCs, this later data are consistent with a previously published report suggesting that oncogenic *KIT* controls neoplastic MC growth through a STAT-5/PI3-kinase signaling cascade with consecutive AKT activation and that the knock-down of AKT activity resulted in growth inhibition of neoplastic *KIT* D816V+ MCs (36).

All in all, to the best of our knowledge, our data represents the first direct demonstration that *de novo* introduction of the *KIT* D816V activating point mutation in a model of human MC *in vitro* can induce

constitutive phosphorylation of STAT-5. Thus, ROSA^{KIT D816V} cell line might represent a valuable tool to explore the mechanisms involved in such deviation of the use of KIT-related signaling pathways. As well, ROSA^{KIT D816V} cells might constitute an interesting model to screen potential STAT-5 inhibitors *in vitro*.

Besides, it has been described that KIT WT is sensitive to the inhibitory effects of Imatinib, a tyrosine kinase inhibitor (TKI) targeting BCR/ABL and KIT (44-46), while *KIT* mutations occurring in the phosphotransferase domain, and particularly *KIT* D816V, are resistant to Imatinib, but sensitive to some other TKIs, such as Dasatinib (47) or Midostaurin (48). In our hands, ROSA^{KIT WT} cells were sensitive to Imatinib, whereas ROSA^{KIT D816V} cells were resistant to the same TKI. By contrast, and as expected, both ROSA cell lines were equally sensitive to the antiproliferative effect of Dasatinib or of Midostaurin. These data emphasize the fact that the two ROSA cell lines are perfectly suited for the differential screening of inhibitors of various forms of *KIT* (wild type or mutated) and might be used as an *in vitro* model for high throughput screening of libraries of compounds to find molecules inhibiting selectively their proliferation by acting on the mutant form of *KIT*.

Finally, in other hematopoietic non MC models, such as BaF3 or UT-7 cells, *KIT* D816V induces the expression of MC related antigens, meaning that this particular mutation might induce some kind of maturation of the target cells (22). We confirm here this hypothesis and extend it to human MCs. Indeed, ROSA^{KIT D816V} cells are consistently more granulated than ROSA^{KIT WT} cells and less clonogenic, reflecting an increased maturation of the cells.

In summary, we have isolated and characterized a new human FcεRI+ ROSA^{KIT WT} MC line, presenting with the major characteristics of normal MCs, which has several advantages over previously available human MC models *in vitro* and might support future studies on MC biology as well as studies on pharmacologic modulation of the function of these cells. In addition, we have derived a unique model of

human MCs exhibiting the *KIT* D816V mutant and giving rise to mastocytosis-like disease in NSG mice. These noteworthy features will facilitate the development of physiopathological studies, of specific diagnostic tests and of new targeted therapy.

Methods

Establishment and characterization of a new human SCF-dependent mast cell line, ROSA^{KIT WT}

An umbilical cord blood (CB) sample (40 mL) was collected on heparin lithium, the 9th of September, 2009, after an informed consent was given by the patient at the clinic Ambroise Paré (Bourg-la-Reine, France). Mononuclear cells (MNC) were separated using Ficoll. CD34⁺ cells (0.85×10^6) were selected by immuno-magnetic sorting using the MACS system (Miltenyi Biotec, Paris, France) and seeded in 17 mL of serum-free medium (SFM) made by IMDM-Glutamax® (Invitrogen) supplemented with penicillin and streptomycin (100 µg/mL each), sodium pyruvate, vitamins, Glutamine, insulin-transferrin-sodium selenium (1% each; all from Invitrogen), 2% non-essential amino acids (Invitrogen) and 0.3% of bovine serum albumin (BSA) (PAA, Les Mureaux, France). Recombinant human (rh) SCF (80 ng/mL), rhIL-6 (50 ng/mL) and rhIL-3 (1 ng/mL) (all from R&D, Lille, France) were added to induce MC differentiation (37°C, 5% CO₂). After one week, cells were maintained in SFM containing SCF alone. After 8 weeks, the cells continued to divide, and they have now been maintained for more than two years in SFM containing rhSCF. After one year, cells were cloned by limiting dilution. The resulting cell line has been termed ROSA^{KIT WT} (for wild-type) because of its strict dependence on rhSCF for survival and growth and because of the normal structure of the coding sequences of the *KIT* gene, which was analyzed as described (12).

Lentiviral transfection of ROSA^{KIT WT} cells with KIT D816V

Human *KIT* cDNA was cloned in pRRL lentiviral vector (49) exactly as previously described (28). ROSA^{KIT WT} cells (10^6) were incubated for 1 hour in 1 mL of SFM containing rhSCF (80 ng/mL) and 8 µg/mL of polybrene. The cells were then incubated for 3 hours with varying amounts of infectious

particles, centrifuged and diluted in fresh medium containing rhSCF. The efficiency of infection was measured by flow cytometry (detection of green fluorescence of GFP) after 4 days. The GFP+ cells were selected by cell sorting and placed immediately in SFM deprived of rhSCF. The cells were maintained in culture for more than 16 months by regular dilution (every 3 or 4 days) in SFM without rhSCF. The resulting human SCF-independent MC line was designated ROSA^{KIT D816V}.

Morphologic characterization of the ROSA cell lines

The morphologic features of the 2 cell lines were analyzed by microscopy after cytopsin preparations or by production of a smear on glass slide from a cell pellet that were stained by May-Grünwald Giemsa (MGG), Wright-Giemsa stain or toluidine blue. Transmission electronic microscopy (TEM) was performed on ROSA^{KIT WT} cells using standard techniques (50).

Analysis of expression of tryptase and chymase by ROSA cells

Immunocytochemical staining was carried out on cytopsin preparations of the 2 ROSA cell lines to demonstrate the presence of tryptase or/and chymase using a mouse monoclonal anti-human tryptase (DAKO, Trappes, France) or a mouse anti-human chymase antibody (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) as previously described (51).

Karyotyping and Fluorescence in situ Hybridization of the ROSA cell lines

Chromosomes were prepared after 24-48 hours of *in vitro* culture. Conventional R-banding analysis was performed with standard methods and karyotypes were defined according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN 2009). Metaphasic fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analyses were performed with commercially available probes, according to the manufacturer's protocols.

The following probes provided by Kreatech (Amsterdam, Netherlands) were used: TP53(17p13)/SE17, EGR1(5q31)/CSF1R(5q33)/hTERT(5p15) and whole chromosome painting (WCP)1, WCP10 and WCP16. Results were recorded using Eclipse 90i fluorescence microscope (Nikon) fitted with appropriate filters, CCD camera and digital imaging software from Alphelys (Genikon).

Analysis of selected surface markers expressed on ROSA cell lines by flow cytometry

The expression of cell surface antigens on ROSA^{KIT WT} and ROSA^{KIT D816V} cells was analyzed by direct immunofluorescence using FACSCalibur and Aria flow cytometer (BD Biosciences). Briefly, 2×10^5 untreated cells were incubated with monoclonal murine anti human antibodies specific for FcεRIα, KIT (CD117), CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD9, CD10, CD11b, CD25, CD34, CD54, CD203c (all from Biolegend, San Diego, CA), CD13, CD14, CD16, CD17, CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD31, CD32, CD33, CD38, CD44, CD45, CD48, CD50, CD52, CD56, CD58, CD59, CD63, CD64, CD66a, CD69, CD71, CD87, CD90, CD95, CD96, CD105, CD114, CD115, CD116, CD123, CD127, CD133, CD134, CD138, CD144, CD146, CD150, CD164, CD166, CD213a, CD218a, CD273, CD274, CD300a, CD309 and CD326 (all from BD Biosciences). The expression of FcεRIα and KIT was also determined before or after incubation of the cell lines with rhIL-4 (20 ng/mL) (R&D) and human monoclonal IgE (2μg/mL) (Calbiochem, San Diego, CA) for 5 days. Isotype controls were used for each experiment, and at least 10,000 events were recorded for each analysis on a BD FACSCalibur and BD FACS Aria.

Assays of cell activation and mediator release in ROSA cells

In all cases, ROSA^{KIT WT} or ROSA^{KIT D816V} cells were first primed with rhIL-4 (20 ng/mL) and human monoclonal IgE (2µg/mL; Calbiochem) for 5 days in order to enhance the expression of FcεRI before activation experiments were conducted.

Expression of CD203c and β-hexosaminidase release: The primed cells were stimulated or not by anti-human IgE (5 µg/ml) (Biovalley, Marne La Vallée, France) or by calcium ionophore (Cai; 1 µM) (Sigma) for 1 hour. For analysis of expression of CD203c, cells were labeled with an anti human CD203c antibody coupled with APC and the fluorescence intensity was measured using a FACSCalibur. For the determination of β-hexosaminidase release, cells were centrifuged and the activity of β-hexosaminidase was measured in the supernatant and in the lysed cells. The net percentage of β-hexosaminidase release was determined exactly as previously described (52).

Histamine release: primed cells were stimulated or not with increasing concentrations of anti-human IgE antibodies (0.1–10 µg/mL) for 30 minutes at 37°C. Cells were then centrifuged at 4°C, and histamine content of the cell-free supernatants and cell pellets was analyzed for by radioimmunoassay (RIA, Immunotech, Marseille, France) according to manufacturer's instructions. The net percentage of histamine release was calculated exactly as previously described (25).

TNF-alpha release: primed cells were activated for 6 hours at 37°C with two different concentrations of anti human IgE antibodies (5 and 10 µg/mL) or with Cai (1 µM). The cells were then centrifuged and TNF-alpha level in the supernatants was determined using a specific ELISA kit (Enzyme linked immunosorbent assay, R&D), according to the manufacturer's instructions.

Analysis of the clonogenicity of ROSA cells Five hundred cells were plated in 35 mm Petri dishes containing 1 mL methylcellulose based medium (Methocult, Stem Cell technologies, Grenoble, France), supplemented with 20% fetal calf serum (FCS; PAA) and 0.3% bovine serum albumin (PAA) and with

human rhSCF at 80 ng/mL for ROSA^{KIT WT} but not for ROSA^{KIT D816V} cells. Petri dishes were then placed in an incubator at 37°C and 5% of CO₂. Colonies of more than 50 cells were enumerated by microscopy after 15 days of culture.

Assessment of the antiproliferative effects of the tyrosine kinase inhibitors (TKIs) Imatinib, Dasatinib and Midostaurin (PKC412) on ROSA cells

Cells seeded at a starting concentration of 3×10^5 per mL in 96-well plates (100 μ L per well) were incubated at 37°C and 5% CO₂ for 48 hours in the presence of 1 μ M of Imatinib, of Dasatinib (both supplied by Sequoia Research, Pangbourne, UK) or of Midostaurin (Sigma) diluted in DMSO 0.1% final concentration or in the presence of DMSO alone (0.1% final concentration) in SFM (with rhSCF at 80 ng/mL for ROSA^{KIT WT} but not for ROSA^{KIT D816V} cells). Ten μ L of WST-1 (Roche Applied Science, Meylan, France) were then added in each well and the cells were incubated for 3 hours at 37° C. The number of living cells was then measured for each condition by reading the absorbance at 450 nm using a plate reader Multiskan-MS (Thermo-Labsystems, Issy Les Moulineaux, France).

Western blotting for KIT signaling and inhibition of AKT pathway

The subclone HMC-1.2 of the HMC-1 cell line, exhibiting two *KIT* mutations (*KIT* G560V and *KIT* D816V) (14) was kindly provided by Dr J. H. Butterfield (Mayo Clinic, Rochester, MN). HMC-1.2 cells were grown in IMDM with 10% FCS, L-glutamine, and antibiotics at 37°C. HMC-1.2, ROSA^{KIT WT} and ROSA^{KIT D816V} cells were stimulated in the absence or presence of rhSCF (80 ng/mL) for 5 minutes. Western blots were performed with antibodies against total KIT, total STAT5 (both from Santa Cruz Biotechnology), total AKT, phosphorylated KIT (both from Cell signaling technology, Danvers, MA), phosphorylated STAT5 (Santa Cruz Biotechnology), phosphorylated AKT (Cell signaling technology).

Mouse monoclonal IgG1 anti human GAPDH antibody (Santa Cruz Biotechnology) was used to control loading.

In order to evaluate the specific implication of AKT in the proliferation of the ROSA cell lines, cells were seeded at a starting concentration of 3×10^5 per mL in 96-well plates (100 μ L per well) were incubated at 37°C and 5% CO₂ for 48 hours in the presence of various concentrations (0.01 to 5 μ M) of the compound A6730 (53), a potent and selective inhibitor of AKT1/AKT2 activity (Sigma), diluted in DMSO 0.1% final concentration or in the presence of DMSO alone (0.1% final concentration) in SFM (with rhSCF at 80 ng/mL for ROSA^{KIT WT} but not for ROSA^{KIT D816V} cells). The number of live cells was then determined in each condition exactly as described above for TKIs.

Co-culture of ROSA cells with the murine stromal cell line MS-5

Confluent monolayers of MS-5 cells were prepared as previously described (54). ROSA^{KIT WT} or ROSA^{KIT D816V} cells were seeded on these monolayers at a concentration of 10^5 per mL in IMDM supplemented with 10% FCS, and with 80 ng/mL of rhSCF for ROSA^{KIT WT} cells. After 24 hours, the culture medium containing non-adherent cells was removed and fresh medium was added to the cultures. Afterward half of the medium was replaced every 2-3 days. Supernatants containing floating cells released from the monolayer were harvested at different time points and the non-adherent co-cultured ROSA cells were analyzed for their morphology after MGG staining, for their metachromasia by staining with toluidine blue, for their chymase content by immunocytochemistry and for the expression of KIT, Fc ϵ RI, CD54 and CD203c by flow cytometry.

Cryopreservation

ROSA cell lines were frozen and stored according to conventional freezing methods by suspension of cells at 10^7 /mL in a freezing medium made by 90% FCS (PAA) and 10% of DMSO (Sigma), samples being cooled immediately at -80°C overnight then kept in liquid nitrogen until used.

Xenotransplantation of ROSA cells in NOD-SCID IL-2Rgamma^{null} (NSG) mice

ROSA^{KIT WT} or ROSA^{KIT D816V} cells were suspended in 0.15 mL PBS with 2% FCS. $0.4\text{-}5 \times 10^6$ cells were either injected into the tail vein of adult NSG mice (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) or were transplanted under the skin bilaterally dorsocaudal of the scapula (3-5 mice per group). The i.v. injected mice were irradiated (2.4 Gy) 24 hours prior to injection. After injection, mice were inspected daily and sacrificed as soon as they developed disease-symptoms or after a maximum observation period of 6 months. Bone marrow (BM) cells were obtained from flushed femurs, tibias, and humeri. Tumors grown from s.c. transplanted cells were collected and dispersed by collagenase digestion (55, 56). In addition, BM and tumors samples were recovered and prepared for histological and immunohistochemical analyses. Animal studies were approved by the ethics committee of the Medical University of Vienna, and carried out in accordance with guidelines for animal care and protection and protocols approved by the Austrian law (GZ 66.009/0040-II/10b/2009).

Flow cytometry analyses of ROSA cells in NSG mouse BM samples and digested tumors

Human engrafted cells were quantified in BM samples and tumor dispersates by multicolor flow cytometry essentially as already described (57), using PE-labeled monoclonal antibodies (mAb) directed against human CD117 (Biolegend) and CD45 BD (Biosciences). Engraftment with ROSA cells was defined as a population of CD45⁺/CD117⁺ cells (at least 0.1% of all nucleated cells) detectable in mouse BM cell suspensions by flow cytometry.

Immunohistochemistry (IHC) for mouse tissue sections

IHC was performed on slides prepared from paraffin-embedded, formalin-fixed BM and tumor biopsy specimens. The indirect immunoperoxidase staining technique was performed according to established protocols (29, 58) using the anti-chymase mAb B7 (work dilution: 1:50) and the anti-tryptase mAb G3 (1:100) (both from Chemicon, Temecula, CA). Prior to staining, sections were pretreated with citrate buffer and microwave oven (tryptase stain) or proteinase and waterbath (chymase stain). Endogenous peroxidase was blocked by methanol/H₂O₂. Slides were incubated with primary mAb diluted in 0.05 M TBS (pH 7.5) plus 10% FCS for 20 hours at 4°C then washed in Tris-buffered saline (TBS). After incubation with biotinylated anti-mouse IgG (Vector, Burlingame, CA) for 30 minutes, slides were washed three times in TBS, and then exposed to Vectastain ABC KIT for 30 minutes at room temperature. 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) (Sigma) was used as chromogen. All slides were counterstained in Mayer's Hemalun.

Statistics

All data points are the mean values (\pm SEM) of at least three independent experiments. Where appropriate, data were analyzed by the Student's *t*-test and differences were considered to be statistically significant when *p* was <0.05.

Acknowledgments

We would like to thank Tina Bernthaler, Siham Bibi, Sandra Brahim, Caroline Ohana, Gabriele Stefanzi and Verena Suppan for excellent technical assistance. This work was supported in part by a grant from Fondation de France. Ghaith Wedeh is a fellow of the Marie Curie Eurocancer Stemcell (CSC) Training Network.

References

1. Gilfillan, A.M., and Beaven, M.A. 2011. Regulation of mast cell responses in health and disease. *Crit Rev Immunol* 31:475-529.
2. Weidner, N., and Austen, K.F. 1993. Heterogeneity of mast cells at multiple body sites. Fluorescent determination of avidin binding and immunofluorescent determination of chymase, tryptase, and carboxypeptidase content. *Pathol Res Pract* 189:156-162.
3. Jamur, M.C., and Oliver, C. 2011. Origin, maturation and recruitment of mast cell precursors. *Front Biosci (Schol Ed)* 3:1390-1406.
4. Moon, T.C., St Laurent, C.D., Morris, K.E., Marcet, C., Yoshimura, T., Sekar, Y., and Befus, A.D. 2010. Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. *Mucosal Immunol* 3:111-128.
5. Vliagoftis, H., and Befus, A.D. 2005. Rapidly changing perspectives about mast cells at mucosal surfaces. *Immunol Rev* 206:190-203.
6. Krishnaswamy, G., Kelley, J., Johnson, D., Youngberg, G., Stone, W., Huang, S.K., Bieber, J., and Chi, D.S. 2001. The human mast cell: functions in physiology and disease. *Front Biosci* 6:D1109-1127.
7. Horny, H.P., Sillaber, C., Menke, D., Kaiserling, E., Wehrmann, M., Stehberger, B., Chott, A., Lechner, K., Lennert, K., and Valent, P. 1998. Diagnostic value of immunostaining for tryptase in patients with mastocytosis. *Am J Surg Pathol* 22:1132-1140.
8. Metz, M., and Maurer, M. 2007. Mast cells--key effector cells in immune responses. *Trends Immunol* 28:234-241.

9. Valent, P., Akin, C., Arock, M., Brockow, K., Butterfield, J.H., Carter, M.C., Castells, M., Escribano, L., Hartmann, K., Lieberman, P., et al. 2012. Definitions, criteria and global classification of mast cell disorders with special reference to mast cell activation syndromes: a consensus proposal. *Int Arch Allergy Immunol* 157:215-225.
10. Arock, M., and Valent, P. 2010. Pathogenesis, classification and treatment of mastocytosis: state of the art in 2010 and future perspectives. *Expert Rev Hematol* 3:497-516.
11. Lanternier, F., Cohen-Akenine, A., Palmerini, F., Feger, F., Yang, Y., Zermati, Y., Barete, S., Sans, B., Baude, C., Ghez, D., et al. 2008. Phenotypic and genotypic characteristics of mastocytosis according to the age of onset. *PLoS One* 3:e1906.
12. Bodemer, C., Hermine, O., Palmerini, F., Yang, Y., Grandpeix-Guyodo, C., Leventhal, P.S., Hadj-Rabia, S., Nasca, L., Georgin-Lavialle, S., Cohen-Akenine, A., et al. 2010. Pediatric mastocytosis is a clonal disease associated with D816V and other activating c-KIT mutations. *J Invest Dermatol* 130:804-815.
13. Gibbs, B.F., and Ennis, M. 2001. Isolation and purification of human mast cells and basophils. *Methods Mol Med* 56:161-176.
14. Butterfield, J.H., Weiler, D., Dewald, G., and Gleich, G.J. 1988. Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia. *Leuk Res* 12:345-355.
15. Sundstrom, M., Vliagoftis, H., Karlberg, P., Butterfield, J.H., Nilsson, K., Metcalfe, D.D., and Nilsson, G. 2003. Functional and phenotypic studies of two variants of a human mast cell line with a distinct set of mutations in the c-kit proto-oncogene. *Immunology* 108:89-97.
16. Kirshenbaum, A.S., Akin, C., Wu, Y., Rottem, M., Goff, J.P., Beaven, M.A., Rao, V.K., and Metcalfe, D.D. 2003. Characterization of novel stem cell factor responsive human mast cell lines

LAD 1 and 2 established from a patient with mast cell sarcoma/leukemia; activation following aggregation of FcepsilonRI or FcgammaRI. *Leuk Res* 27:677-682.

17. Laidlaw, T.M., Steinke, J.W., Tinana, A.M., Feng, C., Xing, W., Lam, B.K., Paruchuri, S., Boyce, J.A., and Borish, L. 2011. Characterization of a novel human mast cell line that responds to stem cell factor and expresses functional FcepsilonRI. *J Allergy Clin Immunol* 127:815-822 e811-815.
18. Andersen, H.B., Holm, M., Hetland, T.E., Dahl, C., Junker, S., Schiotz, P.O., and Hoffmann, H.J. 2008. Comparison of short term in vitro cultured human mast cells from different progenitors - Peripheral blood-derived progenitors generate highly mature and functional mast cells. *J Immunol Methods* 336:166-174.
19. Horny, H.P., Sotlar, K., and Valent, P. 2007. Mastocytosis: state of the art. *Pathobiology* 74:121-132.
20. Feger, F., Ribadeau Dumas, A., Leriche, L., Valent, P., and Arock, M. 2002. Kit and c-kit mutations in mastocytosis: a short overview with special reference to novel molecular and diagnostic concepts. *Int Arch Allergy Immunol* 127:110-114.
21. Sotlar, K., Fridrich, C., Mall, A., Jaussi, R., Bultmann, B., Valent, P., and Horny, H.P. 2002. Detection of c-kit point mutation Asp-816 --> Val in microdissected pooled single mast cells and leukemic cells in a patient with systemic mastocytosis and concomitant chronic myelomonocytic leukemia. *Leuk Res* 26:979-984.
22. Mayerhofer, M., Gleixner, K.V., Hoelbl, A., Florian, S., Hoermann, G., Aichberger, K.J., Bilban, M., Esterbauer, H., Krauth, M.T., Sperr, W.R., et al. 2008. Unique effects of KIT D816V in BaF3 cells: induction of cluster formation, histamine synthesis, and early mast cell differentiation antigens. *J Immunol* 180:5466-5476.

23. Hauswirth, A.W., Florian, S., Schernthaner, G.H., Krauth, M.T., Sonneck, K., Sperr, W.R., and Valent, P. 2006. Expression of cell surface antigens on mast cells: mast cell phenotyping. *Methods Mol Biol* 315:77-90.
24. Morgado, J.M., Sanchez-Munoz, L., Teodosio, C.G., Jara-Acevedo, M., Alvarez-Twose, I., Matito, A., Fernandez-Nunez, E., Garcia-Montero, A., Orfao, A., and Escribano, L. 2012. Immunophenotyping in systemic mastocytosis diagnosis: 'CD25 positive' alone is more informative than the 'CD25 and/or CD2' WHO criterion. *Mod Pathol* 25:516-521.
25. Royer, B., Varadaradjalou, S., Saas, P., Guillosson, J.J., Kantelip, J.P., and Arock, M. 2001. Inhibition of IgE-induced activation of human mast cells by IL-10. *Clin Exp Allergy* 31:694-704.
26. Hauswirth, A.W., Escribano, L., Prados, A., Nunez, R., Mirkina, I., Kneidinger, M., Florian, S., Sonneck, K., Vales, A., Schernthaner, G.H., et al. 2008. CD203c is overexpressed on neoplastic mast cells in systemic mastocytosis and is upregulated upon IgE receptor cross-linking. *Int J Immunopathol Pharmacol* 21:797-806.
27. Chaix, A., Lopez, S., Voisset, E., Gros, L., Dubreuil, P., and De Sepulveda, P. 2011. Mechanisms of STAT protein activation by oncogenic KIT mutants in neoplastic mast cells. *J Biol Chem* 286:5956-5966.
28. Yang, Y., Letard, S., Borge, L., Chaix, A., Hanssens, K., Lopez, S., Vita, M., Finetti, P., Birnbaum, D., Bertucci, F., et al. 2010. Pediatric mastocytosis-associated KIT extracellular domain mutations exhibit different functional and signaling properties compared with KIT-phosphotransferase domain mutations. *Blood* 116:1114-1123.
29. Baumgartner, C., Cerny-Reiterer, S., Sonneck, K., Mayerhofer, M., Gleixner, K.V., Fritz, R., Kerényi, M., Boudot, C., Gouilleux, F., Kornfeld, J.W., et al. 2009. Expression of activated

STAT5 in neoplastic mast cells in systemic mastocytosis: subcellular distribution and role of the transforming oncoprotein KIT D816V. *Am J Pathol* 175:2416-2429.

30. Gleixner, K.V., Mayerhofer, M., Sonneck, K., Gruze, A., Samorapoompichit, P., Baumgartner, C., Lee, F.Y., Aichberger, K.J., Manley, P.W., Fabbro, D., et al. 2007. Synergistic growth-inhibitory effects of two tyrosine kinase inhibitors, dasatinib and PKC412, on neoplastic mast cells expressing the D816V-mutated oncogenic variant of KIT. *Haematologica* 92:1451-1459.
31. Arock, M., Le Nours, A., Malbec, O., and Daeron, M. 2008. Ex vivo and in vitro primary mast cells. *Methods Mol Biol* 415:241-254.
32. Shimizu, Y., Sakai, K., Miura, T., Narita, T., Tsukagoshi, H., Satoh, Y., Ishikawa, S., Morishita, Y., Takai, S., Miyazaki, M., et al. 2002. Characterization of 'adult-type' mast cells derived from human bone marrow CD34(+) cells cultured in the presence of stem cell factor and interleukin-6. Interleukin-4 is not required for constitutive expression of CD54, Fc epsilon RI alpha and chymase, and CD13 expression is reduced during differentiation. *Clin Exp Allergy* 32:872-880.
33. Xia, H.Z., Du, Z., Craig, S., Klisch, G., Noben-Trauth, N., Kochan, J.P., Huff, T.H., Irani, A.M., and Schwartz, L.B. 1997. Effect of recombinant human IL-4 on tryptase, chymase, and Fc epsilon receptor type I expression in recombinant human stem cell factor-dependent fetal liver-derived human mast cells. *J Immunol* 159:2911-2921.
34. Yoshikubo, T., Inoue, T., Noguchi, M., and Okabe, H. 2006. Differentiation and maintenance of mast cells from CD34(+) human cord blood cells. *Exp Hematol* 34:320-329.
35. Horny, M.D., Bennett JM. 2008. WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. *International Agency for Research and Cancer* 54-63.

36. Harir, N., Boudot, C., Friedbichler, K., Sonneck, K., Kondo, R., Martin-Lannere, S., Kenner, L., Kerényi, M., Yahiaoui, S., Gouilleux-Gruart, V., et al. 2008. Oncogenic Kit controls neoplastic mast cell growth through a Stat5/PI3-kinase signaling cascade. *Blood* 112:2463-2473.
37. Zappulla, J.P., Dubreuil, P., Desbois, S., Letard, S., Hamouda, N.B., Daeron, M., Delsol, G., Arock, M., and Liblau, R.S. 2005. Mastocytosis in mice expressing human Kit receptor with the activating Asp816Val mutation. *J Exp Med* 202:1635-1641.
38. Hundley, T.R., Gilfillan, A.M., Tkaczyk, C., Andrade, M.V., Metcalfe, D.D., and Beaven, M.A. 2004. Kit and FcεRI mediate unique and convergent signals for release of inflammatory mediators from human mast cells. *Blood* 104:2410-2417.
39. Ito, T., Smrz, D., Jung, M.Y., Bandara, G., Desai, A., Smrzova, S., Kuehn, H.S., Beaven, M.A., Metcalfe, D.D., and Gilfillan, A.M. 2012. Stem cell factor programs the mast cell activation phenotype. *J Immunol* 188:5428-5437.
40. Akin, C., Scott, L.M., Kocabas, C.N., Kushnir-Sukhov, N., Brittain, E., Noel, P., and Metcalfe, D.D. 2007. Demonstration of an aberrant mast-cell population with clonal markers in a subset of patients with "idiopathic" anaphylaxis. *Blood* 110:2331-2333.
41. Ma, P., Mali, R.S., Munugalavadla, V., Krishnan, S., Ramdas, B., Sims, E., Martin, H., Ghosh, J., Li, S., Chan, R.J., et al. 2011. The PI3K pathway drives the maturation of mast cells via microphthalmia transcription factor. *Blood* 118:3459-3469.
42. Kim, M.S., Radinger, M., and Gilfillan, A.M. 2008. The multiple roles of phosphoinositide 3-kinase in mast cell biology. *Trends Immunol* 29:493-501.
43. Casteran, N., De Sepulveda, P., Beslu, N., Aoubala, M., Letard, S., Lecocq, E., Rottapel, R., and Dubreuil, P. 2003. Signal transduction by several KIT juxtamembrane domain mutations. *Oncogene* 22:4710-4722.

44. Akin, C., Brockow, K., D'Ambrosio, C., Kirshenbaum, A.S., Ma, Y., Longley, B.J., and Metcalfe, D.D. 2003. Effects of tyrosine kinase inhibitor STI571 on human mast cells bearing wild-type or mutated c-kit. *Exp Hematol* 31:686-692.
45. Zhang, L.Y., Smith, M.L., Schultheis, B., Fitzgibbon, J., Lister, T.A., Melo, J.V., Cross, N.C., and Cavenagh, J.D. 2006. A novel K509I mutation of KIT identified in familial mastocytosis-in vitro and in vivo responsiveness to imatinib therapy. *Leuk Res* 30:373-378.
46. Hoffmann, K.M., Moser, A., Lohse, P., Winkler, A., Binder, B., Sovinz, P., Lackner, H., Schwinger, W., Benesch, M., and Urban, C. 2008. Successful treatment of progressive cutaneous mastocytosis with imatinib in a 2-year-old boy carrying a somatic KIT mutation. *Blood* 112:1655-1657.
47. Shah, N.P., Lee, F.Y., Luo, R., Jiang, Y., Donker, M., and Akin, C. 2006. Dasatinib (BMS-354825) inhibits KITD816V, an imatinib-resistant activating mutation that triggers neoplastic growth in most patients with systemic mastocytosis. *Blood* 108:286-291.
48. Growney, J.D., Clark, J.J., Adelsperger, J., Stone, R., Fabbro, D., Griffin, J.D., and Gilliland, D.G. 2005. Activation mutations of human c-KIT resistant to imatinib mesylate are sensitive to the tyrosine kinase inhibitor PKC412. *Blood* 106:721-724.
49. Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R.J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., and Trono, D. 1998. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* 72:9873-9880.
50. Dvorak, A.M. 1987. Monograph-procedural guide to specimen handling for the ultra-structural pathology service laboratory. *J Electron Microscopy Techniques* 6:255-301.

51. Sperr, W.R., Bankl, H.C., Mundigler, G., Klappacher, G., Grossschmidt, K., Agis, H., Simon, P., Laufer, P., Imhof, M., Radaszkiewicz, T., et al. 1994. The human cardiac mast cell: localization, isolation, phenotype, and functional characterization. *Blood* 84:3876-3884.
52. Kuehn, H.S., Radinger, M., and Gilfillan, A.M. 2010. Measuring mast cell mediator release. *Curr Protoc Immunol* Chapter 7:Unit7 38.
53. Zhao, Z., Leister, W.H., Robinson, R.G., Barnett, S.F., Defeo-Jones, D., Jones, R.E., Hartman, G.D., Huff, J.R., Huber, H.E., Duggan, M.E., et al. 2005. Discovery of 2,3,5-trisubstituted pyridine derivatives as potent Akt1 and Akt2 dual inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 15:905-909.
54. Arock, M., Hervatin, F., Guillosson, J.J., Mencia-Huerta, J.M., and Thierry, D. 1994. Differentiation of human mast cells from bone-marrow and cord-blood progenitor cells by factors produced by a mouse stromal cell line. *Ann N Y Acad Sci* 725:59-68.
55. Valent, P., Ashman, L.K., Hinterberger, W., Eckersberger, F., Majdic, O., Lechner, K., and Bettelheim, P. 1989. Mast cell typing: demonstration of a distinct hematopoietic cell type and evidence for immunophenotypic relationship to mononuclear phagocytes. *Blood* 73:1778-1785.
56. Hadzijusufovic, E., Peter, B., Gleixner, K.V., Schuch, K., Pickl, W.F., Thaiwong, T., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Mirkina, I., Willmann, M., and Valent, P. 2010. H1-receptor antagonists terfenadine and loratadine inhibit spontaneous growth of neoplastic mast cells. *Exp Hematol* 38:896-907.
57. Herrmann, H., Kneidinger, M., Cerny-Reiterer, S., Rulicke, T., Willmann, M., Gleixner, K.V., Blatt, K., Hormann, G., Peter, B., Samorapoompichit, P., et al. 2012. The Hsp32 inhibitors SMA-ZnPP and PEG-ZnPP exert major growth-inhibitory effects on D34(+)/CD38(+) and CD34(+)/CD38(-) AML progenitor cells. *Curr Cancer Drug Targets* 12:51-63.

58. Krauth, M.T., Fodinger, M., Rebuzzi, L., Greul, R., Chott, A., and Valent, P. 2007. Aggressive systemic mastocytosis with sarcoma-like growth in the skeleton, leukemic progression, and partial loss of mast cell differentiation antigens. *Haematologica* 92:e126-129.

Table 1: Overview of ROSA NSG experiments. Engraftment of ROSA^{KIT WT} and of ROSA^{KIT D816V} cells in NSG mice. Percentage of engrafted human MCs was appreciated by flow cytometry using their double positivity for human CD45 and human CD117 antigens.

	Cells injected (x10⁶)	BM engraftment (positive/total)*	Median engraftment of i.v. injected mice (%)	s.c. tumor growth (positive/total)**
ROSA ^{KIT WT}	5	4/5 (18 weeks)	2.62%	1/5
ROSA ^{KIT D816V}	0.4	4/4 (21 weeks)	52%	1/4

* Number of mice showing an engraftment of ROSA cells > 0.1% in bone marrow after i.v. injection of total mice injected that survived more than 12 weeks

** Number of mice showing a subcutaneous tumor formation after s.c. injection of total mice injected (2 sites per mouse) that survived more than 12 weeks

Table 2: Level of chymase expression in ROSA^{KIT D816V} cells engrafting in NSG mice, as determined by immunohistochemistry (IHC) on biopsies of sub-cutaneous tumors or of infiltrated bone marrow (BM) samples. NSG mice were injected i.v. or s.c. with ROSA^{KIT D816V} cells as described in the Material and Methods section. The diseased mice were sacrificed and BM cells were obtained from flushed femurs, tibias, and humeri, whereas tumors grown from s.c. injected cells were collected and dispersed by collagenase digestion. The percentage of CD117 positive cells was determined for each sample by flow cytometry. IHC for chymase was performed on slides prepared from paraffin-embedded, formalin-fixed BM and tumor biopsy specimens. The percentage of chymase positive cells was expressed using a scoring system.

No.	ROSA Injected	Mouse No.	Flow Cytometry CD117 (%)	IHC Chymase
P751 Tumor	D816V	30	58	+
P752 Tumor	D816V	30	58	+/-
P757 BM	D816V	186	66	-
P761 BM	D816V	187	76	-

Score Result: +, most cells immunoreactive; +/-, 10-50% of cells reactive; -, no chymase+ cells found.

Figure 1: Phenotypic characterization of ROSA^{KIT WT} cells. Cells were stained by MGG (A, B) or toluidine blue (C). The ultrastructure of ROSA^{KIT WT} cells was analyzed by transmission electron microscopy (D). In addition, ROSA^{KIT WT} cells were treated with an antibody against tryptase (E) or KIT (CD117) (F). Positivity was revealed by indirect immunocytochemistry as described in the material and methods section. Magnification: A and C: x 200; B: x 500; D: x 2000, E: x 500, F: x 1000.

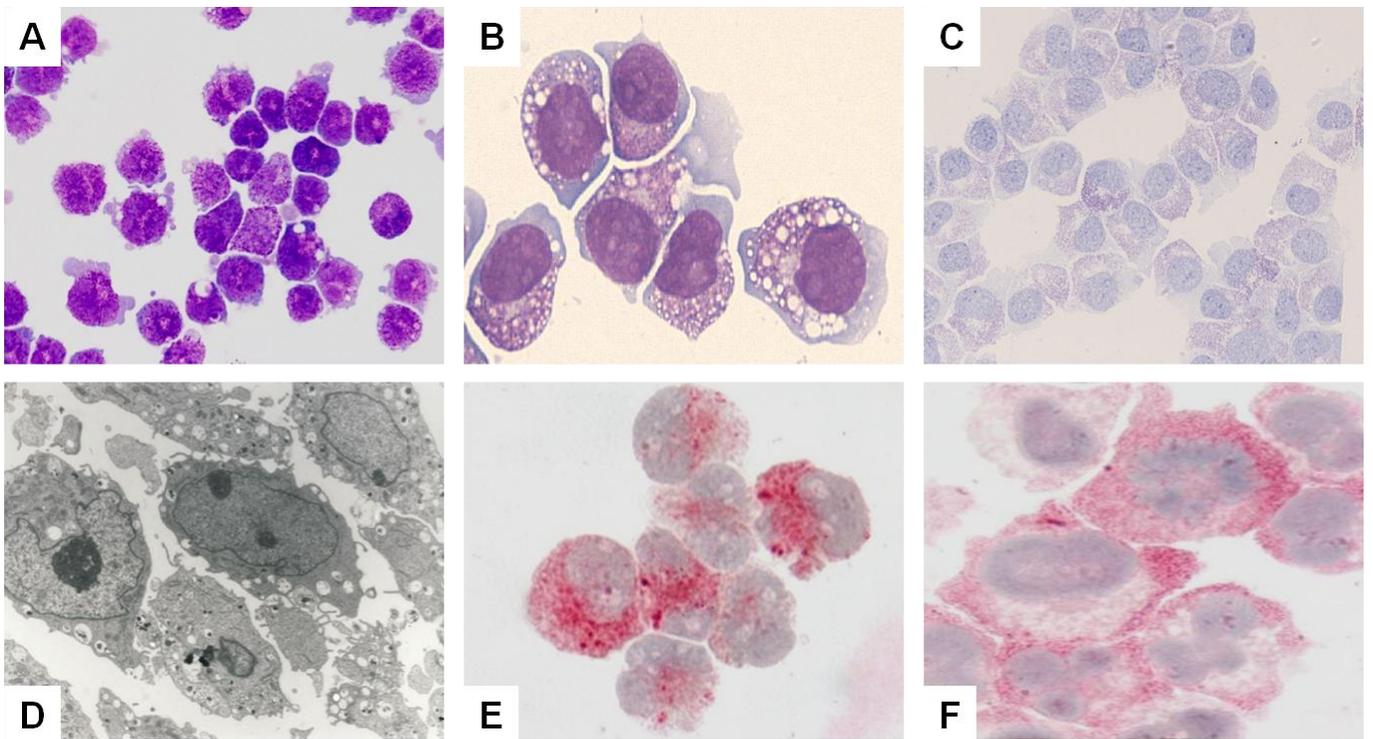


Figure 2: Morphological appearance of ROSA^{KIT D816V} cells. Cytospin preparations (A) or glass smears (B and C) were stained by Wright-Giemsa (A) or by MGG (B and C). A: Note the presence of many granules in ROSA^{KIT D816V} cells and of apoptotic cells, a phenomenon likely to be related to terminal maturation induced by the introduction of the *KIT* D816V mutant. B: On glass smear, a significant proportion of the ROSA^{KIT D816V} cells presented itself with spindle-shaped appearance, which was not noticed for ROSA^{KIT WT} cells (C). Magnification is x 500.

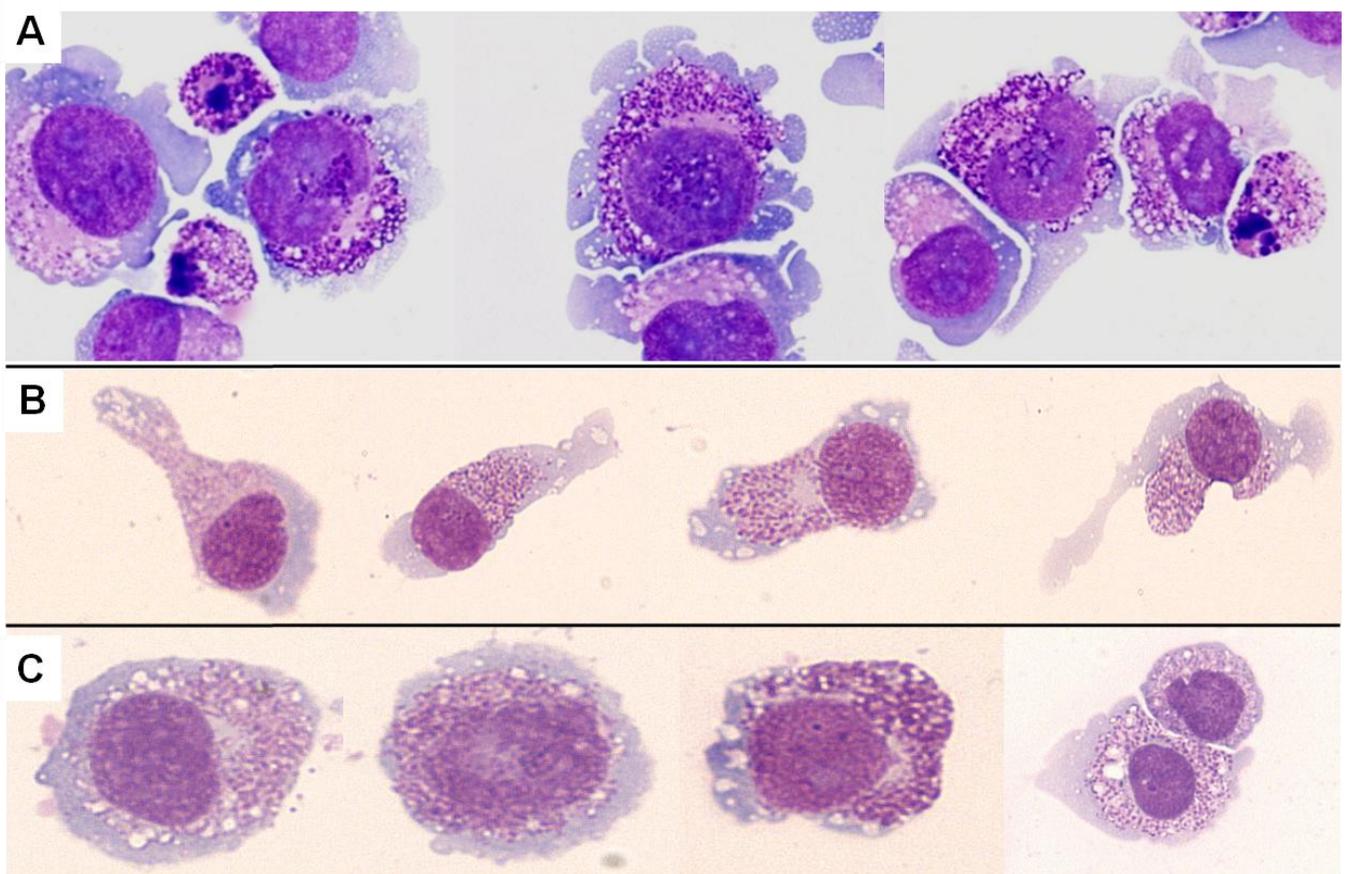


Figure 3: Partial R-banding karyotypes of ROSA^{KIT WT} cells and Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH). A: Karyotype of ROSA^{KIT WT} cells at the beginning of the culture, and (B) after 12 months of culture (main sub-clone). FISH analyses (C to F). C: ROSA^{KIT WT} metaphase hybridized with WCP1 (labeled in green), and WCP16 (labeled in red) probes. The inverted/deleted derived chromosome 1 is entirely hybridized with the WCP1 probe. The WCP16 probe confirmed the trisomy 16 and the presence of chromosome 16 material on the long arm of the derived chromosome 10. D: ROSA^{KIT WT} metaphase hybridized with TP53 (in red) and centromere of chromosome 17 (in green) probes. Note the presence of two green signals and the absence of a red signal on the derived chromosome 17, indicating the dicentric character of the isochromosome 17q, and confirming the subsequent loss of a copy of the *TP53* gene. Representative ROSA^{KIT WT} metaphases after 12 months of culture hybridized with the EGR1(5q31) (green), CSF1R(5q33) (red) and hTERT(5p15) (blue) probes. E: Visualization of a complete trisomy 5, with presence of the three probes on each chromosome 5. This profile was present in 2/15 metaphases analyzed. F: Presence of two normal chromosomes 5 hybridized with the three probes, and one additional deleted chromosome 5, del(5q), with loss of EGR1 and CSF1R probes while the hTERT probe on the short arm remained. This profile was observed in 10/15 metaphases analyzed.

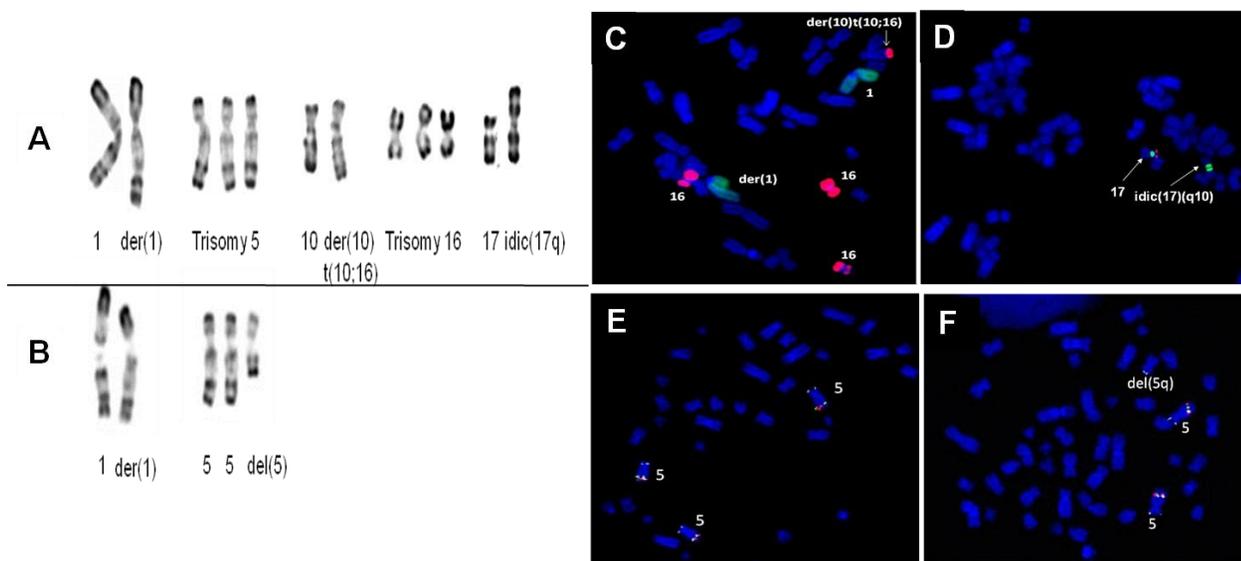


Figure 4: Effect of IL-4 on the expression of KIT (A) and FcεRI (B) by the two different ROSA cell lines. ROSA^{KIT WT} (black bars) or ROSA^{KIT D816V} (grey bars) cells were treated with IL-4 (20 ng/ml) for 5 days, washed, then incubated in the presence of anti-human KIT (CD117) or with anti human FcεRI, both coupled with APC. After labeling, the fluorescence intensity was measured using a FACSCalibur. Data presented are the mean ± SD from 3 independent experiments.

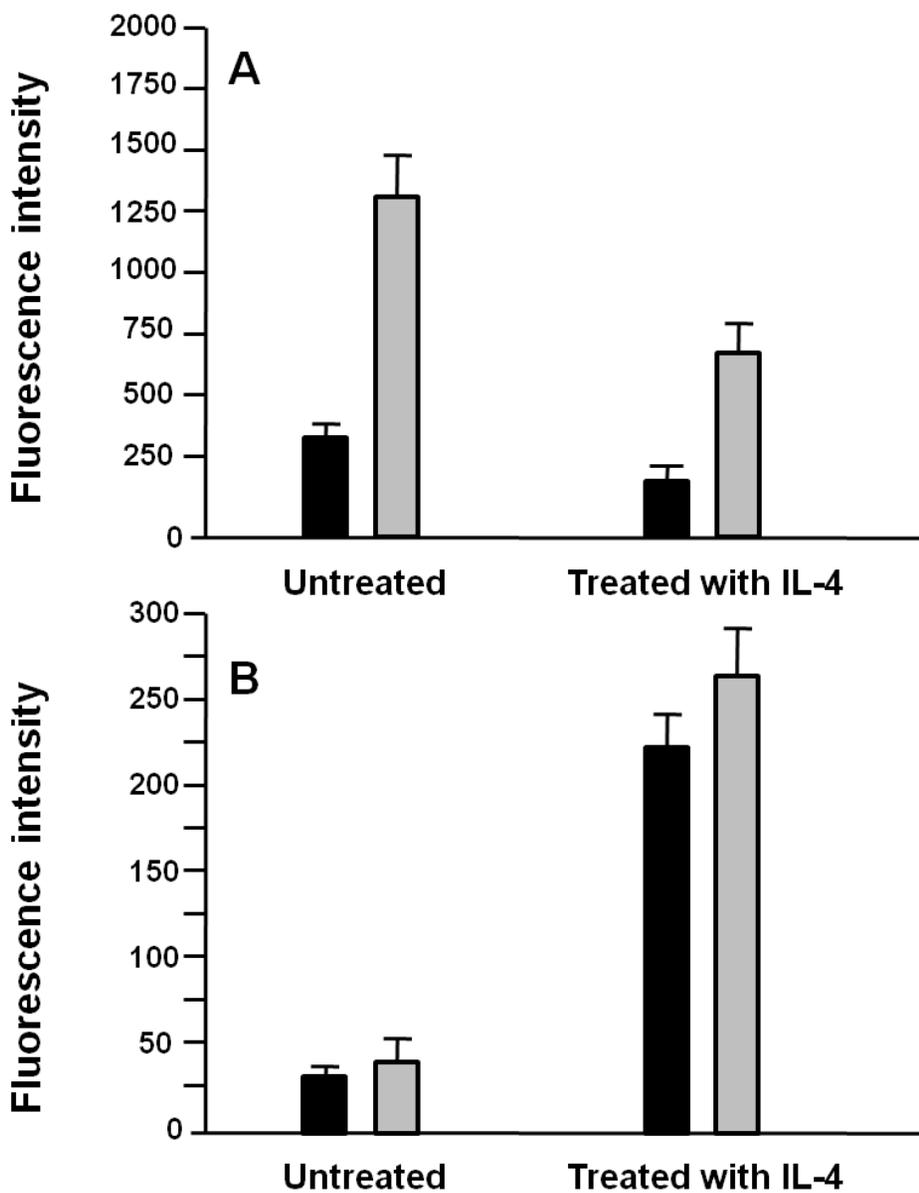


Figure 5: Effect of rhSCF on the surface expression of KIT (A) and CD203c (B) by ROSA^{KIT WT} and ROSA^{KIT D816V} cell lines. ROSA^{KIT WT} (black bars) or ROSA^{KIT D816V} (grey bars) cells were treated or not with rhSCF (80 ng/ml) for 24 hours then incubated in the presence of anti-human KIT (CD117) or anti human CD203c, both coupled with APC. After labeling, the fluorescence intensity was measured using a FACSCalibur. Data presented are the mean \pm SD from 3 independent experiments.

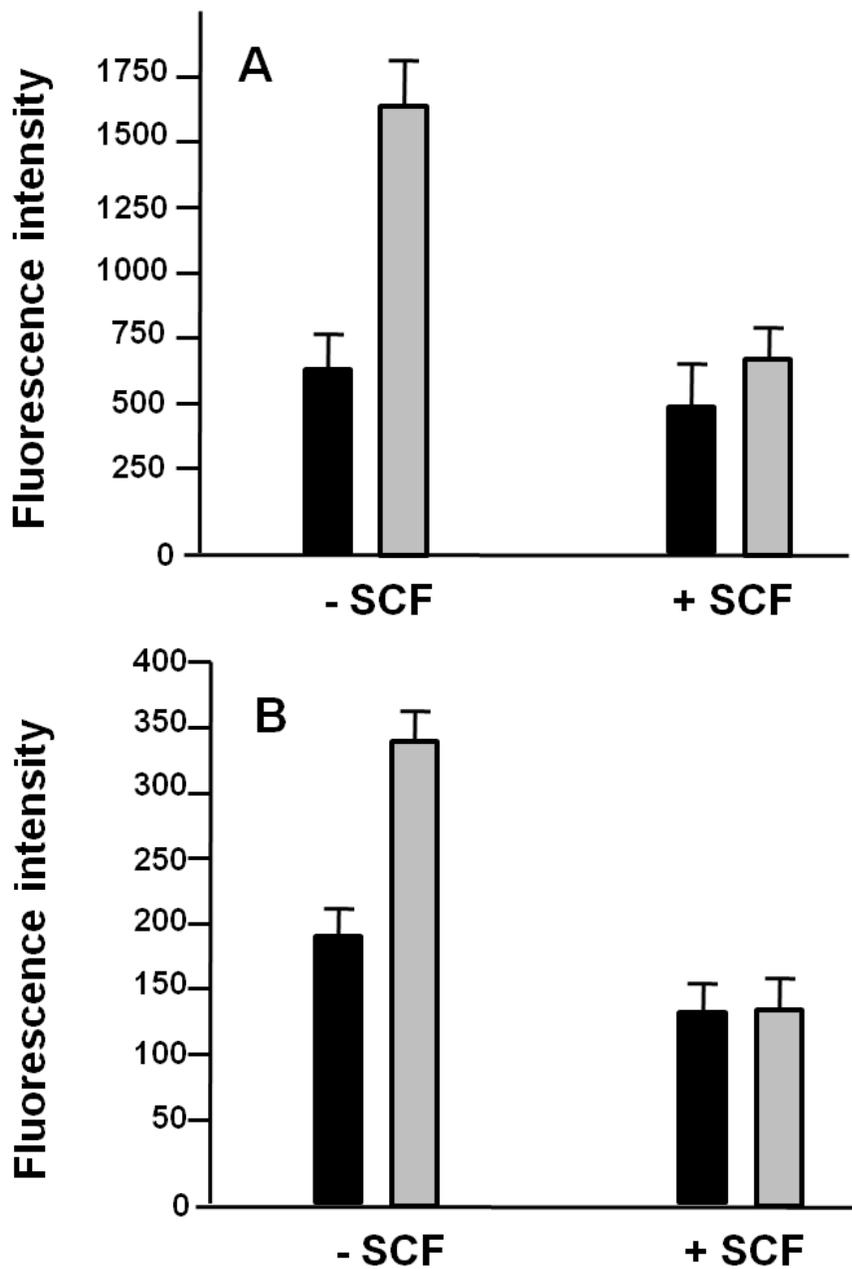


Figure 6: Biological effects of the cross-linking of FcεRI on ROSA^{KIT WT} cells. In all cases, cells were primed first with rhIL-4 (20 ng/mL) and human monoclonal IgE (2 μg/mL) for 5 days to increase the expression of FcεRI. **A:** *Expression of CD203c.* Primed cells were stimulated by anti-human IgE (5 μg/ml) or by Ca-ionophore (1 μM) (Ca-i) for 1 hour. After labeling with an anti human CD203c coupled with APC, the fluorescence intensity was measured using a FACSCalibur. **B, C and D:** *β-hexosaminidase, histamine and TNF-α release.* For β-hexosaminidase release (**B**), primed cells were stimulated by anti-human IgE or by Ca-i for 1 hour. Enzymatic activity was measured in the cell-free and cell lysis supernatants as described in the material and methods section. For histamine release (**C**), primed cells were stimulated with various concentrations of anti-human anti-IgE antibody at 37°C for 30 min. Thereafter, cells were centrifuged at 4°C, and the supernatants and total suspensions were analyzed for histamine content using a specific radioimmunoassay kit. Results of histamine release are expressed as percent of total histamine. For TNF-α release (**D**), primed cells were activated for 6 hours at 37°C, with different concentrations of anti IgE antibodies or by Ca-i for 1 hour. After centrifugation, TNF-α content was determined in the supernatants using a specific ELISA kit. For each parameter, data presented are the mean±SD from 3 independent experiments.

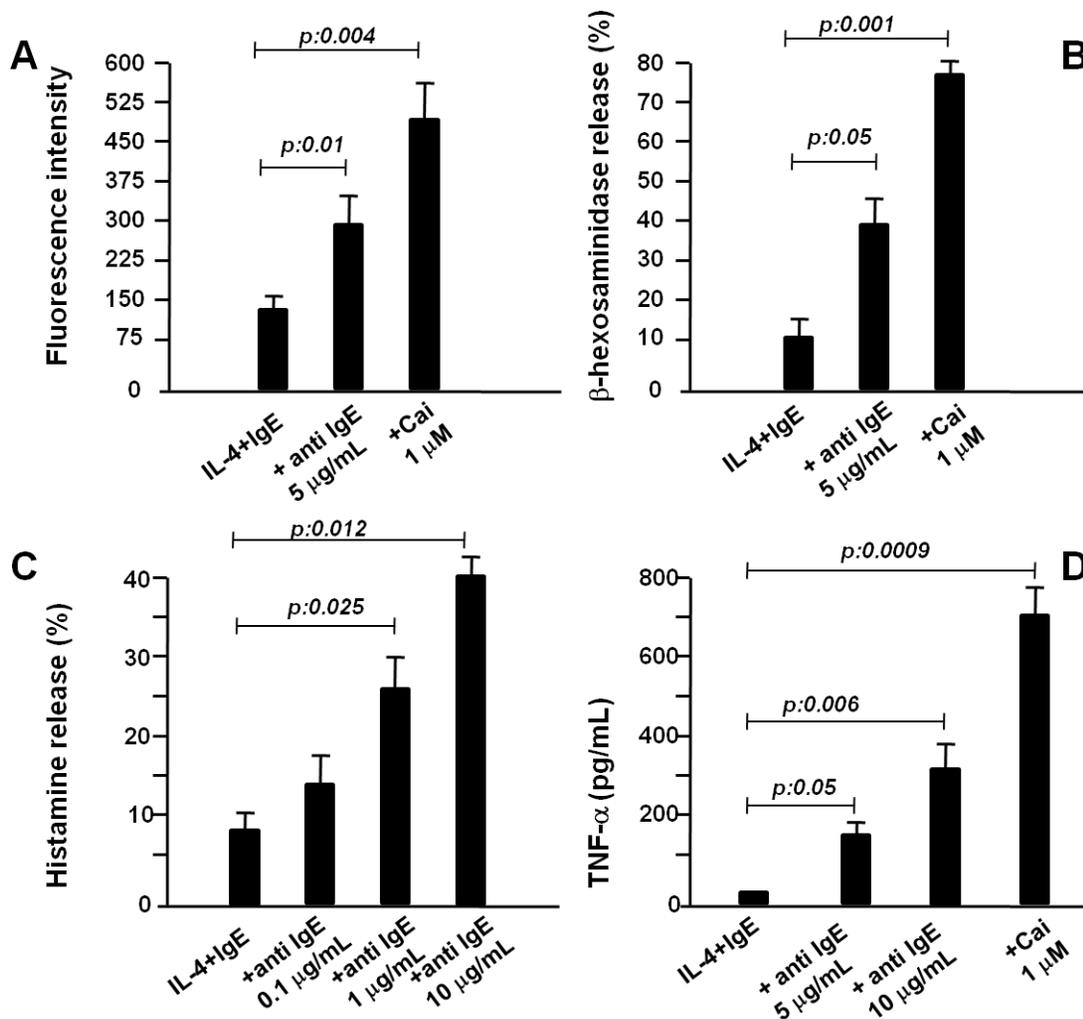


Figure 7: Demonstration by Western blotting of the spontaneous phosphorylation of KIT, AKT and STAT-5 in ROSA^{KIT D816V} cells. Cell lysates from unstimulated ROSA cell lines and HMC-1.2 cell line or from the same cells stimulated for 10 minutes with human SCF were subjected to electrophoresis in SDS-PAGE and treated with an anti-human total KIT or anti-P-KIT Y703 (A), with an anti-human total AKT or anti-P-AKT S473 (B), or with an anti-human total STAT-5 or anti-P-STAT-5 Y694 (C). D: An anti-human GAPDH was used as a loading control. The lanes were run on the same gel but were noncontiguous.

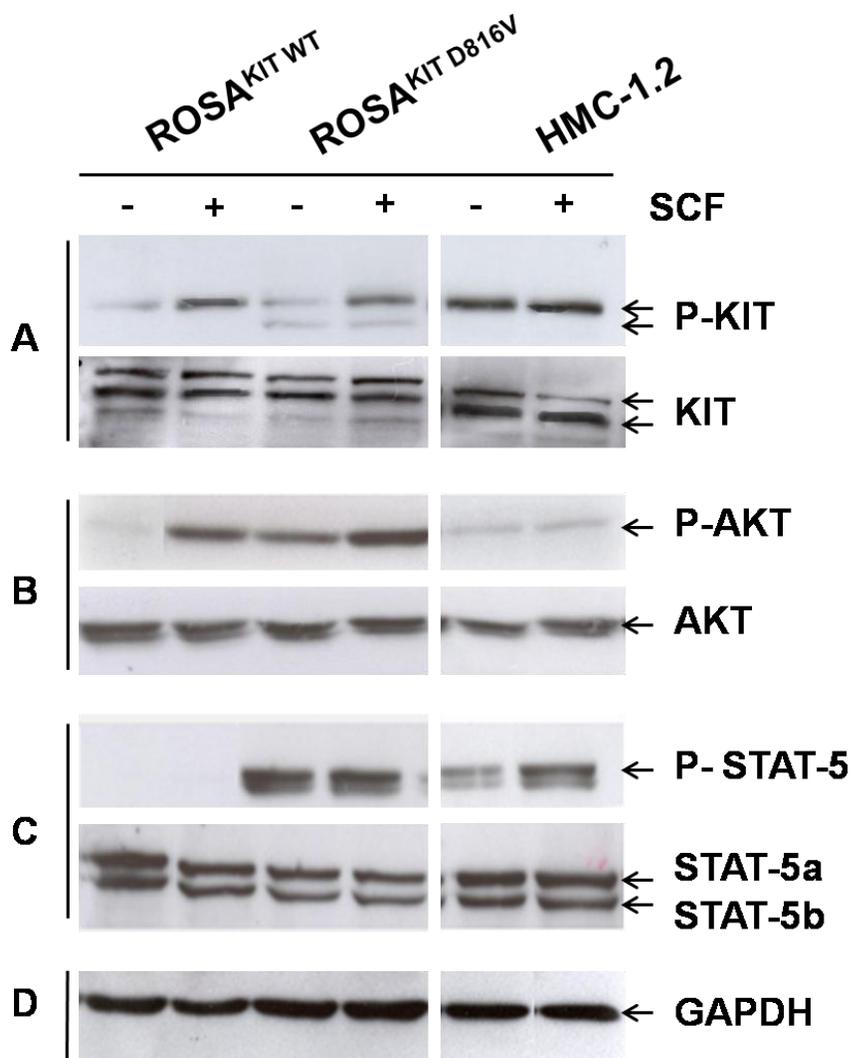


Figure 8: Effect of three tyrosine kinase inhibitors on the proliferation of the two ROSA cell lines.

Cells were seeded for 48 hours in the presence of Imatinib, Dasatinib or Midostaurin (1 μ M, provided in DMSO 0.1% final concentration) or in the presence of DMSO alone (0.1% final concentration) in the usual culture medium (containing human SCF at 80 ng/mL for ROSA^{KIT WT} but no SCF for ROSA^{KIT D816V} cells). At the end of this incubation, 10 μ L of MTT were added in each well (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) and the cells were incubated for 3 additional hours in an incubator at 37°C. The number of living cells was then measured for each condition by reading the absorbance at 450 nm. Data presented are the mean \pm SD from 3 independent experiments.

***: value significantly different from the control (DMSO alone) at $p < 0.0001$.

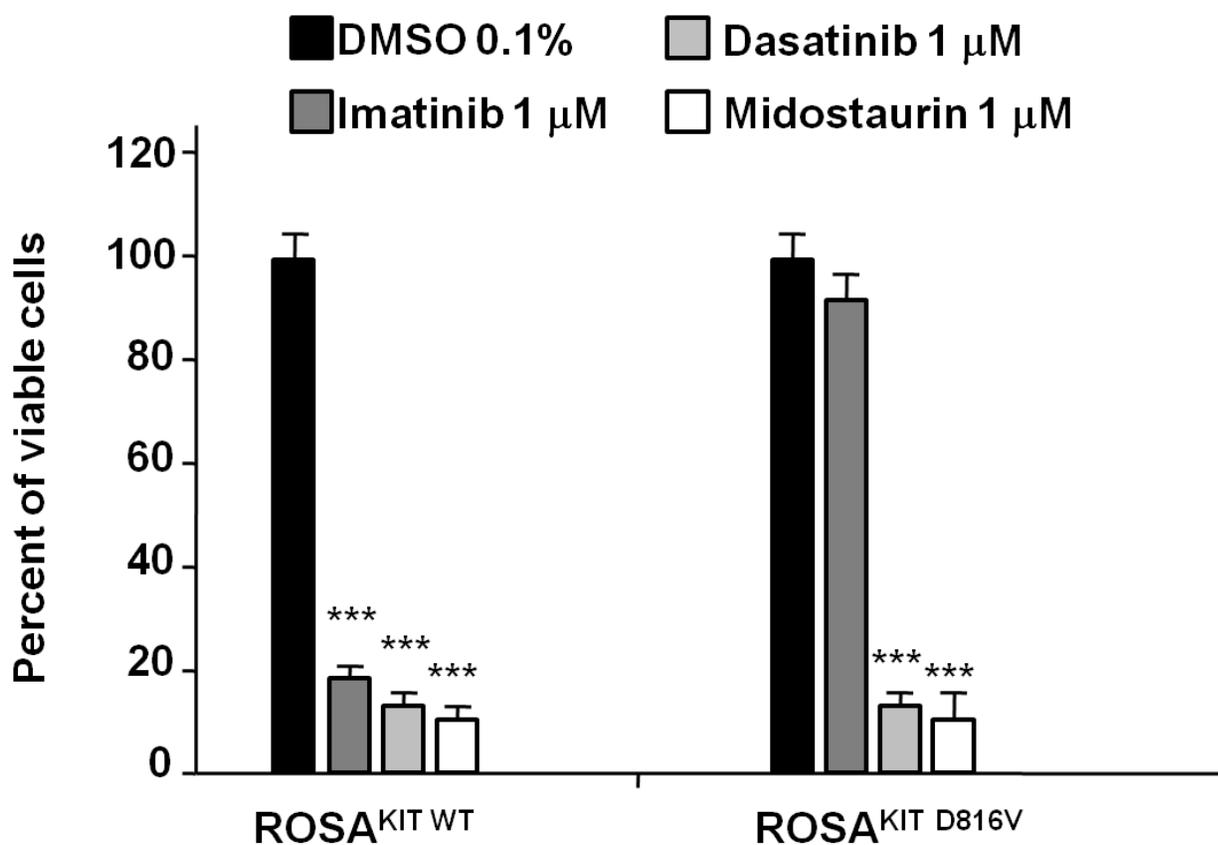


Figure 9: Morphological and phenotypic properties of ROSA^{KIT WT} or ROSA^{KIT D816V} cells co-cultured for more than three months on a sub-layer of MS-5 cells. Co-cultured ROSA cells were stained by MGG (A: ROSA^{KIT WT} and B: ROSA^{KIT D816V}) or toluidine blue (C: ROSA^{KIT WT} and D: ROSA^{KIT D816V}). Co-cultured ROSA cells were also stained with an antibody against chymase (E: ROSA^{KIT WT} and F: ROSA^{KIT D816V}) and analyzed by indirect immunocytochemistry as described in the methods section. G: Cocultured ROSA^{KIT WT} cells (grey bars) were also labeled with antibodies against FcεRI, KIT, CD203c or CD54 then the fluorescence intensity was analyzed by flow cytometry and compared to the one of non cocultured cells (black bars). Magnification: A, B, C and D: x 1000; E and F: x 200.

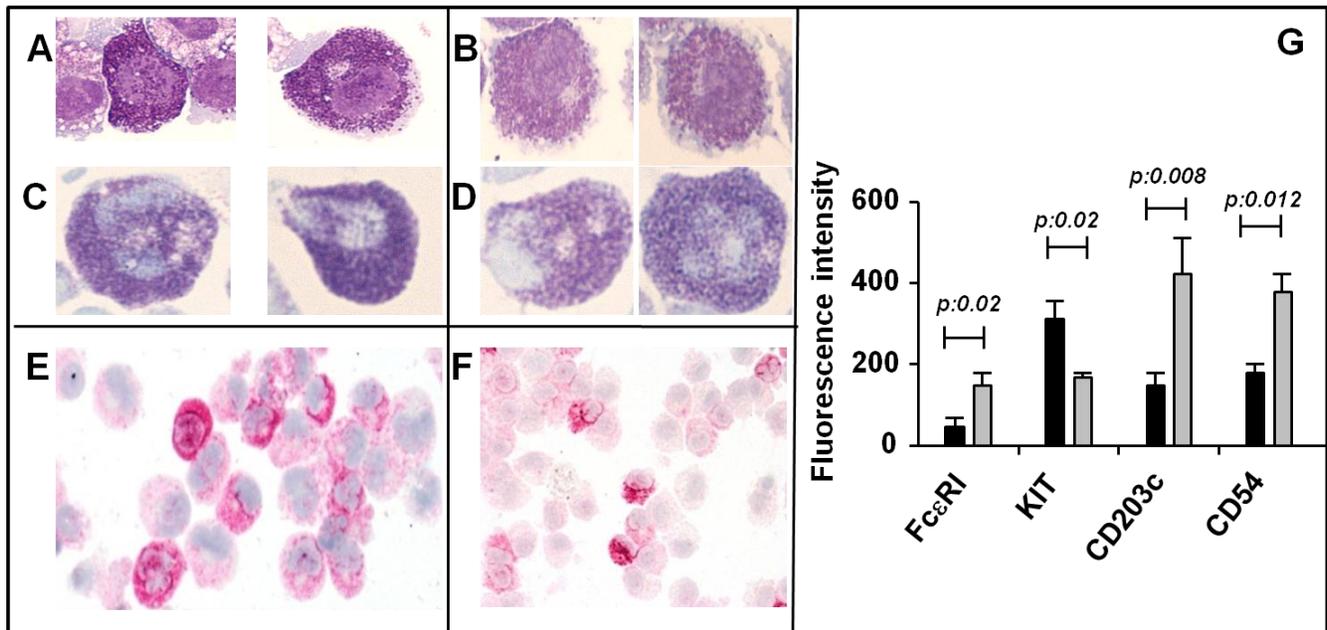


Figure 10: Morphological appearance of bone-marrow-engrafted $ROSA^{KIT\ WT}$ and $ROSA^{KIT\ D816V}$ cells in NSG mice. Whole bone marrow (BM) cells from NSG mice engrafted intravenously with $ROSA^{KIT\ WT}$ (A) or $ROSA^{KIT\ D816V}$ cells (B) were analyzed for their content of CD117+/CD45+ engrafted human MCs (A and B, top panel). The cells were also cytocentrifuged on glass slides, stained with MGG, then observed under light microscopy (bottom panel). Note the presence of spindle-shaped MCs with an abnormal distribution of granules in the BM of mice engrafted with $ROSA^{KIT\ D816V}$ cells (B, black arrows), whereas the BM MCs from mice engrafted with $ROSA^{KIT\ WT}$ cells presented with a rounded shape, similar to the one observed in culture (A, grey arrows). Magnification is x 200.

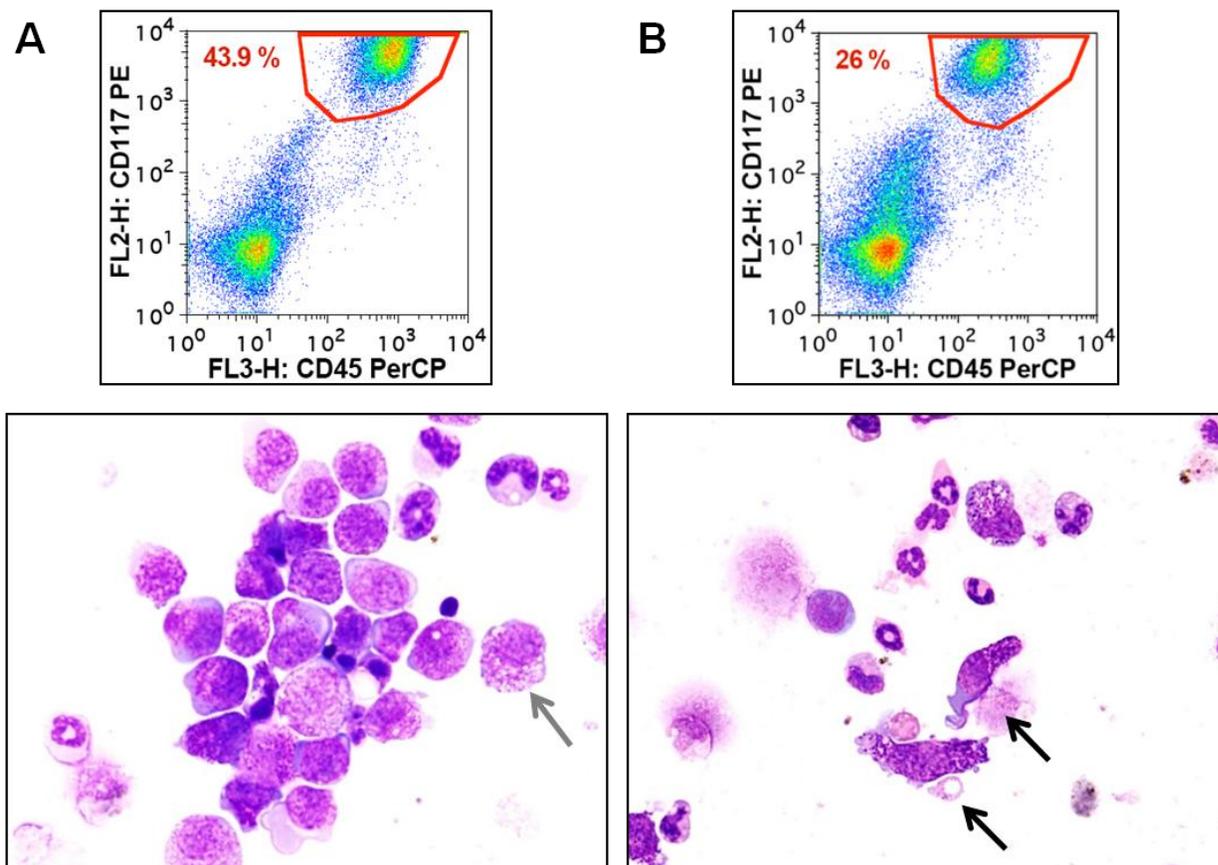
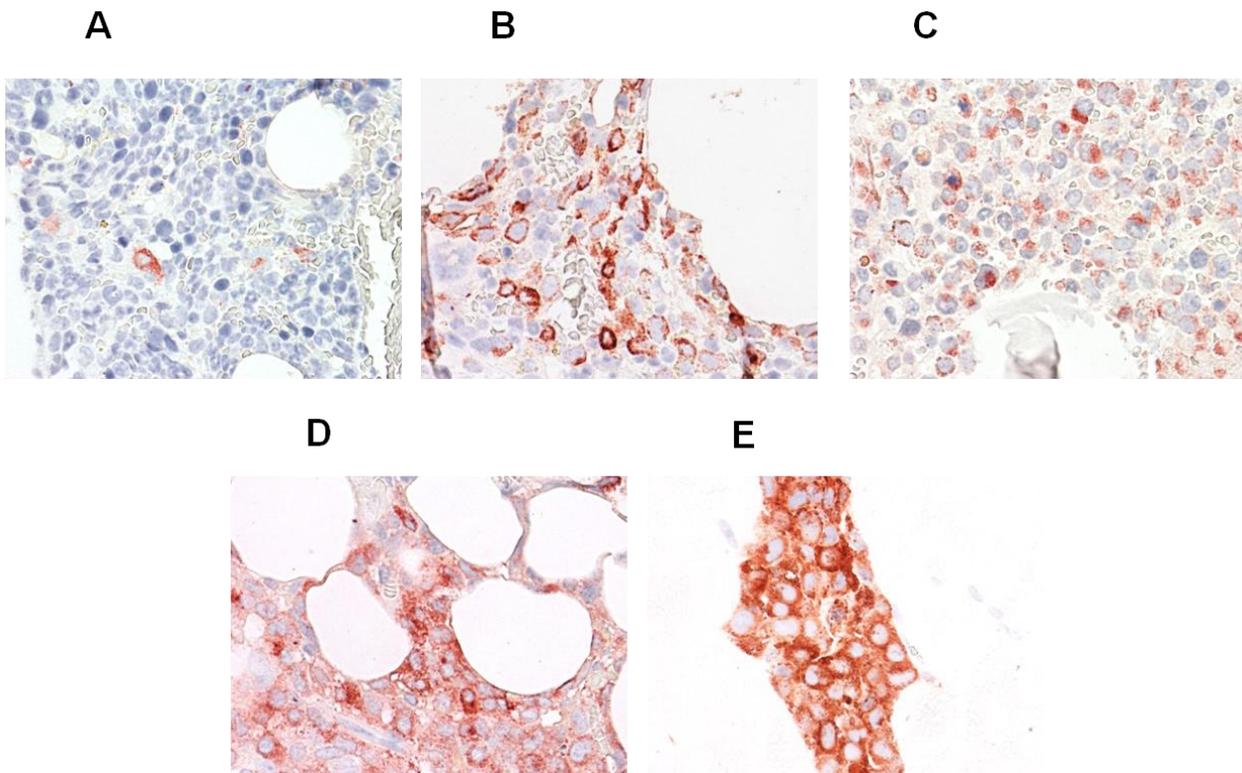


Figure 11: Engraftment of ROSA KIT^{D816V} Cells in NSG Mice. Correlation between the percentage of human CD45+/CD117+ cells measured by Flow Cytometry (FACS) on BM cells in suspension and intensity of tryptase staining on BM biopsy of the same animal. A: 7% of human MCs by FACS; B: 37% of human MCs by FACS; C: 66% of human MCs by FACS; D: 76% of human MCs by FACS; E: Local MC Tumor with nearly 100% of human MCs by FACS. For tryptase staining, IHC was performed with the anti-Tryptase mAb G3 as described in the methods section. Magnification is x 100.



Résumé :

Les mastocytes (MCs) sont issus des cellules hématopoïétiques multipotentes non engagées, CD34+, et jouent un rôle important dans l'initiation de la réponse immunitaire innée et adaptative, dans les réactions allergiques IgE-dépendantes et dans les réactions inflammatoires.

Les mastocytoses sont des néoplasies myéloïdes caractérisées par une accumulation anormale et l'activation fréquente de mastocytes dans divers organes. Les organes généralement atteints sont la moelle osseuse, la peau, le foie et le tractus gastro-intestinal. Elles sont caractérisées dans l'immense majorité des cas par la présence de mutations acquises de la structure du récepteur KIT (plus particulièrement *KIT* D816V dans les formes systémiques de l'adulte) qui induisent l'activation constitutive de ce récepteur à activité tyrosine kinase intrinsèque. Le traitement actuel de ces pathologies est décevant car la mutation *KIT* D816V résiste à la plupart des inhibiteurs de tyrosine kinases (ITKs).

Nous avons pu établir, à partir de cellules souches hématopoïétiques de sang de cordon humain normal cultivées à long terme en présence de stem cell factor (SCF), une nouvelle lignée mastocytaire humaine stable, dénommée ROSA *KIT*^{WT}, restant strictement dépendante pour sa survie et sa prolifération du SCF, exprimant le récepteur de haute affinité aux IgE (FcεRI), et présentant un récepteur KIT de structure normale. Cette lignée, facile à cultiver en grandes quantités, permet d'envisager l'étude approfondie des événements intracellulaires menant à l'activation mastocytaire IgE-dépendante et la mise au point de tests de criblage à haut débit dans le domaine de la thérapeutique anti-allergique et/ou anti-inflammatoire.

Par ailleurs, afin de pouvoir étudier le rôle transformant des mutants de *KIT* retrouvés au cours des mastocytoses, nous avons transfecté les cellules ROSA *KIT*^{WT} par des vecteurs lentiviraux apportant une construction codant pour le KIT muté en D816V ou le KIT muté Delta 417-419 insY. Nous avons ainsi obtenu deux nouvelles lignées mastocytaires humaines SCF-indépendantes, ROSA *KIT*^{D816V} et ROSA *KIT*^{Delta 417-419 insY}, pour lesquelles nous avons montré qu'il existe une activation constitutive de KIT, mais aussi de STAT5 et d'AKT. Ces deux lignées de pourront être utilisées soit pour étudier l'impact des mutations de *KIT* sur la signalisation intracellulaire, soit pour le criblage molécules à activité antiproliférative potentielle dirigées soit contre KIT muté, soit contre l'une ou l'autre des molécules intracellulaires impliquées dans la transduction du signal KIT muté.

Mast cells (MCs) are derived from CD34 + multipotent hematopoietic stem cells and are ubiquitously distributed in tissues. MCs play a fundamental role in the initiation of innate and adaptive immune responses, in IgE-dependent allergic reactions and in various inflammatory reactions.

Mastocytosis are myeloproliferative neoplasms, due to abnormal accumulation of MCs in one or more organ systems. Mastocytosis presents in cutaneous and systemic forms. The organs affected are usually the bone marrow, skin, liver and gastrointestinal tract. They are characterized in the vast majority of cases by the presence of acquired mutations of the KIT receptor. In adult patients, where the disease is systemic, the *KIT* D816V point mutation is often found, that induces constitutive activation of the receptor intrinsic tyrosine kinase activity. The current treatment of these diseases is disappointing because the D816V *KIT* mutation is resistant to most tyrosine kinase inhibitors (ITKs).

In a primary culture of MCs from cord blood-derived hematopoietic precursors, we have successfully isolated a new human FcεRI+ MC line, called ROSA *KIT*^{WT}, with a phenotype and reactivity comparable to those of normal MCs. This cell line is dependent on SCF for growth and expresses a normal *KIT* structure. It is easy to grow in large quantities, to freeze and to activate by IgE-anti IgE. This cell line can thus be used to study pathophysiological mechanisms of allergy and to develop high-throughput screening tests of molecules in search of potential anti-allergic properties.

In addition, by transfection of ROSA *KIT*^{WT} cells with lentivirus encoding *KIT* D816V or *KIT* Delta 417-419 insY, two *KIT* abnormalities encountered in the course of mastocytosis, we have established two new SCF-independent MC cell lines, ROSA *KIT*^{D816V} and ROSA *KIT*^{Delta417-419 insY}, which are particularly easy to grow in large quantities, and whose phenotype is similar to that of abnormal MCs during mastocytosis. These two cell lines can be used for pathophysiological studies on mastocytosis and for high-throughput screening of molecules in search of antiproliferative effects specifically directed against the mutated *KIT* or against one or other of the intracellular molecules involved in signal transduction induced by mutant *KIT*.