



HAL
open science

Etude fonctionnelle des formes oncogéniques de KIT : nouvelles stratégies d'inactivation de la signalisation oncogénique KIT

Marianne Le Gall

► **To cite this version:**

Marianne Le Gall. Etude fonctionnelle des formes oncogéniques de KIT : nouvelles stratégies d'inactivation de la signalisation oncogénique KIT. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA11T017 . tel-00993494

HAL Id: tel-00993494

<https://theses.hal.science/tel-00993494>

Submitted on 20 May 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-SUD

ÉCOLE DOCTORALE DE CANCEROLOGIE

Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier

Laboratoire de Biologie et de Pharmacologie Appliquée

DISCIPLINE : Science du vivant – Médecine – Santé

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 29/04/2014

par

Marianne LE GALL

Etude fonctionnelle des formes oncogéniques de KIT - Nouvelles stratégies
d'inactivation de la signalisation oncogénique KIT

Directrice de thèse : Marie-Alix POUL PU (IRCM)

Composition du jury :

Président du jury : Michel AROCK PU (LBPA)

Rapporteurs : Josée GOLAY Senior scientist (Center of Cell Therapy Lanzani)
Olivier KOSMIDER MCU-PH (Institut Cochin)

Examineurs : Patrick CHAMES CR1 (CRCM)

Guillaume CARTRON PU-PH (CHU Montpellier)

REMERCIEMENTS

Je souhaite adresser en premier lieu mes remerciements aux membres du jury pour avoir accepté de juger mon travail de thèse. Merci au Dr Josée Golay, au Dr Olivier Kosmider et au Pr Cuillaume Cartron d'avoir bien voulu consacrer de leur temps pour évaluer ces travaux. Un merci particulier au Pr Michel Arock pour sa grande disponibilité et tous ses conseils avisés. Un grand merci au Dr Patrick Chames pour ton aide dans ce projet. Merci d'avoir accepté de faire partie de mon comité et jury de thèse ; merci pour ton accueil, ta disponibilité, tes conseils et ta gentillesse durant mon séjour marseillais.

Je remercie très chaleureusement ma directrice de thèse le Pr Marie-Alix Poul : merci de m'avoir patiemment encadrée tout au long de mon stage de master et de cette thèse, merci pour ton aide, tes conseils, ta gentillesse et pour tout le temps que tu auras passé à corriger cette thèse. J'ai eu plaisir à travailler avec toi, merci pour ta bonne humeur, ton enthousiasme et ton soutien.

Je tiens à adresser mes remerciements au Dr André Pèlerin qui m'a accueillie dans son institut ainsi que dans son équipe. Malgré votre rôle de directeur de l'institut, vous avez su rester disponible pour votre équipe et je vous remercie sincèrement pour votre aide et votre soutien.

Mes remerciements vont également au Pr Christian Auclair. Merci de m'avoir donné l'opportunité de faire cette thèse et d'avoir accepté de m'accueillir au sein de votre équipe au LBPA.

Un grand merci aux membres de l'équipe Pèlerin qui font du labo un lieu où il fait bon travailler :

En tout premier lieu, je souhaite exprimer toute ma reconnaissance à Gene, notre maman du labo. Merci d'être notre confidente, d'être toujours là pour nous, dans les bons comme dans les mauvais moments, merci pour ton soutien sans faille, tu rends la vie au labo bien plus agréable :)

Un immense merci à Mimi, notre grand-m... sœur :D Merci de nous expliquer la mode à nous, pauvres terriens... Merci d'être venue vérifier si j'avais toujours le moral dans mon placard pendant la rédaction. Merci pour ton extrême générosité et pour toutes les soirées que l'on a passées ensemble : ce n'est que le début d'une grande série !

Je remercie sincèrement Gaga grâce à qui les journées au labo étaient plus fun ! On ne compte plus tes idées farfelues, tes tchouk-tchouks, tes facs sans cellules, les soirées mousse, les charlottes aux fruits qui ne prennent pas, les bébés de toutes les couleurs... Tu

fais sans nul doute partie des belles rencontres de cette thèse et j'ai hâte de te revoir à ton retour d'Australie.

Merci Wilhem pour m'avoir fait découvrir Montpellier à mon arrivée, merci pour toutes les soirées géniales, merci d'être toujours là pour moi quand j'ai besoin de toi et merci pour tes blagues pourries que j'adore !

Je remercie également Mady pour ton énergie débordante ! Merci d'être venue me voir tous les jours pendant la rédaction et pour les (très jolies !) manips de dernière minute.

Et comme un ch'ti ne vient jamais seul ;) merci Matthieu pour ta gentillesse et tes petites moqueries ; par contre tu dois encore progresser en breton...

Un grand merci à Yassamine pour ton écoute, tes conseils et ta gentillesse. J'espère te revoir bientôt, en métropole, en Guyane ou au Maroc !

Je remercie chaleureusement les deux nouvelles recrues arrivées tout droit de Franche-Comté, Charline et Cécile. Merci pour votre accent, votre dynamisme, votre humour un peu « spécial... », votre bonne humeur et vos goûts cinématographiques pour les moins douteux ! On ne risque pas de s'ennuyer avec vous !

Merci Bruno et Chris pour votre sympathie et pour les bons moments qu'on a passé ensemble. Merci Bruno pour tes questions pertinentes, tes « pourquoi ? » et merci de m'offrir une opportunité pour l'après-thèse.

Merci à Marion pour ton rire communicatif et tes origines nobles, Thierry pour ta gentillesse et ton aide, Feufeu pour ta douceur et ton sourire, Pauline pour ta gentillesse et ton soutien et Sabine pour tes conseils pour les manips et les commandes. Merci à Salomé, Alex et Riad pour la bonne ambiance que vous mettez dans notre couloir.

Mon Milou, un merci ne suffit pas... Il faut avouer que le labo n'est plus le même depuis que tu nous as quittés pour l'Italie ; ton enthousiasme débordant et ton romantisme légendaire manquent, les couchers de soleil en salle de culture sont presque fades... Merci d'être toujours là pour moi !

Je tiens à remercier particulièrement le Dr Pierre Martineau pour m'avoir permis de rédiger dans de très bonnes conditions ! Merci également pour vos nombreux conseils et votre aide pour le phage display.

Je tiens à remercier les membres de l'équipe Auclair au LBPA où j'ai débuté ma thèse :

Un très grand merci à Houcine et Ronan ; merci pour tout ce que vous m'avez appris, votre aide, vos conseils scientifiques et merci de m'avoir formée avec beaucoup de patience. J'ai beaucoup apprécié de pouvoir travailler avec vous.

Merci à mon homonyme Marianne, pour ton brin de folie et ton amitié hors pair ! Merci d'être toujours là pour moi, je te souhaite le meilleur.

Je remercie également Manale, Caroline et Christine, vous m'avez particulièrement bien accueillie au LBPA. Je n'oublierai pas votre gentillesse et tous nos fous rires :)

Je remercie Véro pour sa gentillesse et son aide précieuse à l'animalerie, Nadia pour son aide pour la cytométrie, Gautier pour le phage display, Laurent Gros pour la production de protéines, Patrice Dubreuil pour ses conseils et son aide concernant KIT, Sébastien Létard pour son accueil au CRCM.

Je tiens à remercier toute l'équipe anticorps thérapeutiques et immunociblage au Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille : Daniel Baty, Patrick, Brigitte, Elise, Damien, Marc, Lauren et Benjamin. Je vous remercie sincèrement pour votre accueil chaleureux et toute votre aide pendant notre collaboration.

Un merci tout particulier à mes amis de longue date : Ali, Camille & Fi, Nathalie, Arthur et Amélie. Merci pour tous les bons moments qu'on passe ensemble à Paris, à Rennes, au pays bigouden et bientôt à Lund et Dallas ! Merci pour les week-ends en tribu, les soirées Sing it ou au Pantalon, les nuits parisiennes et tous ces moments où l'on se sent presque en famille :)

Je tiens à remercier mes amis de master : Steve évidemment, heureusement que tu es là ! Merci de prendre soin de moi, je peux toujours compter sur toi... J'espère qu'on arrivera à se voir plus régulièrement à l'avenir. Merci également à Pilou, Amel et Kévin pour tous les bons moments qu'on passe ensemble, pour votre soutien, votre humour et votre amitié ; je n'oublierai jamais nos soirées !

Et bien évidemment, pour finir, je remercie ma famille plus que tout. A mes parents et mon frère, merci de m'avoir aidé et soutenu sans réserve durant toutes ces années. Merci aussi à mes cousins Noëlle, Thibaud, Jo et JB, pour votre bonne humeur et pour tous les bons moments qu'on passe ensemble.

Ce travail a été financé par le Ministère de l'Education Supérieure et de la Recherche et par le Labex MablImprove. Je tiens à remercier ces organismes pour m'avoir offert la possibilité d'accomplir ce travail dans de bonnes conditions.

TABLE DES MATIERES

Remerciements	2
Table des matières	5
Table des illustrations	7
Abréviations	10
Avant-propos.....	14
Introduction.....	15
I. LE ROLE PHYSIOLOGIQUE DE L'AXE KIT/SCF ET SON IMPLICATION EN PATHOLOGIE	16
1. Présentation de l'axe KIT/SCF	16
a) Rôle physiologique de l'axe KIT/SCF	16
b) Le SCF, le ligand de KIT.....	21
c) Le récepteur tyrosine kinase KIT.....	23
d) L'activation de KIT par le SCF	26
e) Interactions cytoplasmiques avec KIT actif.....	28
f) Les voies de signalisation intracellulaires activées par l'axe KIT/SCF	30
2. Implication de l'axe KIT/SCF en pathologie	37
i. Leucémies.....	40
i. GIST.....	42
ii. Mastocytoses	44
i. Mélanomes.....	49
ii. Tumeurs des cellules germinales	50
i. Cancer du poumon à petites cellules	50
ii. Neuroblastome.....	51
3. Conclusion.....	51
II. THERAPIES CIBLES EN ONCOLOGIE	52
1. Inhibiteurs de tyrosine kinase.....	53
2. Molécules pharmaceutiques autre que les inhibiteurs de kinases.....	64
3. Conclusion.....	67
4. Anticorps monoclonaux en oncologie	69
5. Limites des thérapies ciblées	78

Objectifs de la thèse	79
Résultats	82
I. DEVELOPPEMENT D'UN TEST DE CRIBLAGE FONCTIONNEL	83
1. Caractérisation des modèles cellulaires	83
2. Relocalisation des mutants de KIT par traitement aux ITK	90
3. Mise au point d'un test de criblage fonctionnel	93
4. Criblage de la chimiothèque Screen-Well Kinase Inhibitor Library (Enzo Life Sciences)	98
5. Validation des drogues sélectionnées	105
6. Conclusion / perspectives	108
II. GENERATION D'INTRABODIES ANTI-KIT	109
1. Production du domaine intracellulaire de KIT	110
2. Sélection de scFv anti-KIT-ICD	112
3. Sélection de VHH anti-KIT-ICD	115
4. Discussion et perspectives	121
III. CARACTERISATION D'ANTICORPS AU FORMAT SCFV-FC DIRIGES CONTRE LE DOMAINE EXTRACELLULAIRE DE KIT	122
1. Introduction	122
2. Résumé	122
3. Article	123
4. Résultats supplémentaires	157
a) Association des anticorps avec le dasatinib	157
5. Perspectives	159
Discussion	160
Annexes	169
Annexe 1 : carte du plasmide codant pour KIT WT fusionné à l'EGFP	170
Annexe 2 : chimiothèque Screen-Well® Kinase Inhibitor Library (Enzo Life Sciences)	170
Annexe 3 : carte du plasmide pMal – C2X (New England Biolabs)	174
Annexe 4 : carte du plasmide pMAL-KIT-ICD D816V	175
Annexe 5 : séquences des CDR des 11 scFv anti-KIT-ICD	175
Annexe 6 : carte du plasmide d'expression eukaryote des scFv	176
Bibliographie	177
Abstract :	203
Résumé :	204

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : schéma de la différenciation des différents lignages hématopoïétiques chez l'Homme.....	18
Figure 2 : visualisations d'ICC par microscopie.....	20
Figure 3 : représentation schématique des épissages alternatifs du SCF et différentes protéines produites.....	22
Figure 4 : organisation schématique de l'ARNm et de la structure de la protéine KIT.....	23
Figure 5 : organisation structurale de la protéine KIT.....	24
Figure 6 : représentation des structures secondaires du domaine intracellulaire de KIT.....	25
Table 1 : résidus catalytiques et régulateurs importants dans la séquence protéique de KIT (Roskoski Jr., 2005).....	26
Figure 7 : structure cristallographique d'un dimère de SCF et du domaine extracellulaire d'un dimère de KIT.....	27
Figure 8 : représentation schématique des molécules de signalisation et adaptatrices recrutées directement par les tyrosines phosphorylées du domaine intracellulaire de KIT...	28
Figure 9 : représentation schématique de l'activation de la voie des MAPK.....	32
Figure 10 : différents niveaux d'activation des MAPK par KIT.....	33
Figure 11 : personne atteinte de piébaldisme présentant une tâche de dépigmentation au niveau du crâne.....	37
Figure 12 : structure de KIT et ses différentes mutations dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM), GIST et mastocytoses (Ashman and Griffith, 2013a).....	38
Figure 13 : myélogramme de patient atteint de LAM.....	41
Figure 14 : image par endoscopie de tumeur stromale gastrique.....	42
Figure 15 : fréquences des différentes mutations retrouvées dans les GIST.....	43
Figure 16 : illustrations de mastocytes.....	44
Figure 17 : enfant atteint de mastocytose cutanée.....	45
Table 2 : critères d'évaluation de l'OMS pour la mastocytose systémique.....	47
Figure 18 : fréquence des altérations génétiques observées dans les mélanomes.....	49
Figure 19 : comparaison du mode de liaison des ITK de type I et II.....	54
Figure 20 : essai de phase III comparant la thérapie classique (IFN et cytarabine) à l'imatinib dans la leucémie myéloïde chronique (O'Brien et al., 2003).....	58
Figure 21 : patient atteint de GIST avant et après un mois de traitement à l'imatinib.....	59
Figure 22 : courbe de progression et de survie chez des patients traités à l'imatinib en fonction de leur statut mutationnel initial.....	59
Figure 23 : inhibition de prolifération des lignées HMC1 et de GIST à différentes concentrations de 17-AAG.....	66
Table 3 : récapitulatif des principaux ITK ciblant KIT utilisés en clinique.....	68
Table 4 : efficacité des inhibiteurs de KIT en clinique sur les différents types de mutants. ...	68
Figure 24 : structure d'une IgG.....	70

Figure 25 : les différents types d'anticorps (Carter, 2001).	71
Figure 26 : réduction de la vascularisation d'une xénogreffe de cancer du côlon à 7 jours après traitement au bevacizumab (500 µg/mL) (Yuan et al., 1996).	72
Figure 27 : différents formats de fragments d'anticorps.....	73
Figure 28 : mécanismes d'activation de l'ADCC et de la CDC.	75
Figure 29 : souris RET-mutantes traitées (haut) ou non (bas) par l'anticorps anti-KIT ACK2 (Kato et al., 2004).	76
Figure 30 : SR-1 inhibe la croissance de xénogreffes de la lignée de GIST 430 résistante à l'imatinib après 8 semaines de traitement (Edris et al., 2013).	76
Figure 31 : représentation schématique de la protéine KIT fusionnée à l'EGFP.	83
Figure 32 : analyse du statut de glycosylation des cellules CHO transfectées transitoirement par les 3 variants EGFP-KIT.....	84
Figure 33 : analyse des lignées CHO stables par Western blot.....	85
Figure 34 : numération des lignées CHO stables.	86
Figure 35 : analyse par Western blot de l'expression et de la phosphorylation de KIT dans les cellules CHO (lignée stables).	86
Figure 36 : analyse de l'expression totale et membranaire de KIT dans les CHO-EGFP-KIT WT en présence ou non de surnageant de CHO-KL.	87
Figure 37 : analyse par cytométrie en flux de l'expression totale et membranaire de KIT dans les 4 lignées de CHO exprimant stablement EGFP-KIT ou non.	88
Figure 38 : ratio de l'expression en surface de KIT/l'expression totale de KIT dans les lignées CHO stables.	88
Figure 39 : analyse en IF par microscopie confocale de l'expression totale et membranaire de KIT dans les lignées de CHO stables.	89
Figure 40 : analyse par cytométrie en flux de l'expression membranaire de KIT dans les lignées CHO stables après traitement aux ITK.	90
Figure 41 : analyse en IF par microscopie confocale de l'expression membranaire de KIT dans les lignées CHO stables après traitement aux ITK.....	91
Figure 42 : analyse par Western blot de la signalisation des lignées CHO-EGFP-KIT mutant après traitement aux ITK.....	92
Figure 43 : analyse par Western blot de la signalisation de la lignée CHO-EGFP-KIT WT après traitement aux ITK.....	93
Figure 44 : étude cinétique de l'expression membranaire de KIT par cytométrie en flux après traitement aux ITK des lignées CHO stables.	94
Figure 45 : analyse par cytométrie en flux de la relocalisation de KIT en surface après traitement à différentes concentrations d'ITK des lignées CHO stables.	95
Table 5 : IC50 de l'imatinib et du dasatinib pour l'inhibition de l'activité kinase sur les mutants V560G et D816V de KIT (Schittenhelm et al., 2006).	96
Figure 46 : analyse par cytométrie en flux de la relocalisation de KIT mutant en surface après traitement à différentes concentrations d'ITK des lignées CHO stables.	97

Figure 47 : analyse par cytométrie en flux de la relocalisation de KIT mutant en surface après traitement par la chimiothèque à 1 μ M des lignées CHO stables.	99
Table 6 : molécules de la chimiothèque relocalisant KIT mutant à la surface cellulaire à 1 μ M.	100
Figure 48 : analyse par cytométrie en flux de la relocalisation de KIT WT activé en surface après traitement par la chimiothèque à 1 μ M des lignées CHO stables.	101
Figure 49 : analyse par cytométrie en flux de la relocalisation de KIT mutant en surface après traitement par la chimiothèque à 100 nM des lignées CHO stables.	101
Table 7 : molécules de la chimiothèque relocalisant les mutants de KIT à la surface cellulaire à 100 nM.....	102
Figure 50 : analyse par cytométrie de l'effet du GF 109203X et de l'hypericine sur la fluorescence de cellules Raji.	102
Table 8 : récapitulatif des molécules de la chimiothèque relocalisant les mutants V560G et D816V.....	103
Figure 51 : étude de l'effet d'ITK sur la prolifération cellulaire des lignées HMC1 par MTS.	106
Figure 52 : analyse par Western blot de l'effet des drogues sur la phosphorylation de KIT dans les lignées HMC1.....	107
Figure 53 : représentation schématique des 2 modes d'action possibles des intrabodies inhibiteurs.	109
Figure 54 : représentation schématique de la protéine de fusion MBP-KIT-ICD.....	110
Figure 55 : analyse en gel SDS-PAGE et Western blot des différentes protéines recombinantes.	111
Figure 56 : représentation schématique d'un scFv.....	112
Table 9 : titres phagiques et enrichissements des différents tours de sélection de la banque Sheets sur MBP-KIT-ICD D816V.....	113
Figure 57 : analyse en IF par microscopie confocale de l'expression cytoplasmique des scFv.	114
Figure 58 : analyse par Western blot de l'expression cytoplasmique des intrabodies.	114
Figure 59 : analyse par Western blot de la co-IP de KIT et des scFv.....	115
Figure 60 : représentation schématique d'IgG classique et d'IgG à chaîne lourde retrouvée uniquement chez les camélidés (Muyldermans, 2001).	116
Figure 61 : criblage de la sélection MBP-KIT-ICD D816V sur billes époxy.	117
Figure 62 : schéma décrivant la sélection masquée.	118
Figure 63 : criblage de la sélection MBP-KIT-ICD D816V masquée MBP-KIT-ICD KD sur billes époxy.	119
Figure 64 : analyse de la production en grand volume et purification des VHH.	120
Figure 65 : étude de l'effet des anticorps sur l'apoptose des cellules HMC1.2.	157
Figure 66 : quantification des signaux de Western blot.	158
Figure 67 : analyse par cytométrie en flux de la liaison des anticorps à la lignée p815.....	159

ABREVIATIONS

5-FU : fluorouracile	CaMKII : Ca ²⁺ /calmoduline-dépendante protéine kinase II
6-his : tag de 6 résidus histidines	
A loop : boucle d'activation	CBF : core binding factor
AA : acide aminé	Cbl : E3 ubiquitine-ligase Casitas B-lineage Lymphoma
Ac : anticorps	CCND1 : cycline D1
ADCC : cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps	CD : cluster of differentiation
ADN : acide désoxyribonucléique	CDC : cascade du complément
AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens	CDK4 : cyclin-dépendant kinase 4
Alk : anaplastic lymphoma kinase	CDKN2A : cyclin-dépendant kinase 2a, ou p16
AML1 : acute myeloid leukemia 1 protein	CDR : complementarity determining region
APS : adaptor molecules containing PH and SH2 domains	CH : domaine constant de la chaîne lourde d'un anticorps
ARNm : acide ribonucléique messenger	CHK : Csk homologous kinase
ATP : adenosine triphosphate	CHO : cellule d'ovaire de hamster chinois
Bad : Bcl-2-associated death promoter	CHO-KL : cellules CHO sécrétant du SCF
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2	Co-IP : co-immunoprécipitation
Bcl-XL : B-cell lymphoma-extra large	CSD : chronic sun-induced damage
Bcr-Abl : protein de fusion breakpoint cluster region - Abelson	CSF-1 : Colony stimulating factor 1 receptor
Bim : B-cell lymphoma 2 interacting mediator of cell death	CTLA4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
Boucle A : boucle d'activation	Cy : cyanine
BRAF : équivalent cellulaire de v-raf (Virus-induced Rapidly Accelerated Fibrosarcoma)	DAG : diacylglycérol
C helix : hélice de contrôle	DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole
Ca ²⁺ : ion calcium	

DC : cellules dendritiques

DFG : motif Asp-Phe-Gly de la boucle d'activation

DMSO : diméthylsulfoxyde

ECD : domaine extracellulaire

EGFP : enhanced green fluorescent protein

EGFR : récepteur à l'endothelial growth factor

ELISA : enzyme linked immunosorbent assay

Endo H : N-acetylglucosaminidase H

EpCam : molécule d'adhésion des cellules épithéliales

EPHA2 : ephrin type-A receptor 2

EPO : érythropoïétine

Erk : extracellular-signal-regulated kinase

ETO : eight twenty-one

Fab : fragment de liaison à l'antigène

Fc : fragment cristallisable d'un anticorps

FcεRI : récepteur de haute affinité pour le fragment Fc de l'IgE

FDA : food and drug administration

FDC-P1 : factor-dependent cell progenitors

FGFR : récepteur au fibroblast growth factor

FL : ligand de FLT3

FLT3 : récepteur Fms-like tyrosine kinase 3

Gab2 : Grb2-associated-binding protein 2

GDP : guanosine diphosphate

GIST : gastro-intestinal stromal tumor

GNNK : motif Gly-Asn-Asn-Lys du domaine extracellulaire de KIT

Grb2 : growth factor receptor-bound protein 2

GSK-3 : glycogen synthase kinase 3

GST : glutathion S-transférase

GTP : guanosine triphosphate

HER : human epidermal growth factor receptor

HMC : human mast cell leukemia

Hsp90 : heat shock protein 90

HZ4-FeSV : Hardy-Zukerman 4 Feline Sarcoma Virus

ICC : cellules interstitielles de Cajal

ICD : domaine intracellulaire

IF : immunofluorescence

IFN : interféron

Ig-like : immunoglobulin-like

IHC : immuno-histochimie

IL-2 : interleukine 2

IP₃ : inositol triphosphate

IPTG : Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

ITK : inhibiteur de tyrosine kinase

Jak : Janus kinase

JM : juxtamembranaire

JNK : c-Jun N-terminal kinases
 Kb : kilobase
 KD : kinase dead
 kDa : kilodalton
 KID : kinase insert domain
 LAM : leucémie aiguë myéloïde
 LB : lymphocytes B
 LLC : leucémies lymphoïdes chroniques
 LMC : leucémie myéloïde chronique
 LT : lymphocyte T
 LTh : lymphocyte T helper
 MAPK : mitogen-activated protein kinases
 MBP : maltose binding protein
 MC : mastocytose cutanée
 MFI : moyenne de fluorescence
 MS : mastocytose systémique
 mTOR : mammalian Target Of Rapamycin
 MYH11 : myosin, heavy chain 11
 NF1 : neurofibromatose 1
 NGF : nerve growth factor
 NK : lymphocyte natural killer
 NT : non traité
 OMS : organisation mondiale de la santé
 PD-1 : récepteur programmed cell death-1
 PDGFR : platelet derived growth factor receptor
 PDK1 : phosphoinositide-dependent kinase-1
 PE : phycoerythrine
 PGNase : peptide N-glycosidase
 PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase
 Pip₂ : phosphatidyl inositol diphosphate
 PIP₃ : phosphatidyl inositol (3,4,5)-triphosphate
 PKC : protein kinase C
 PLC γ : phospholipase C γ
 PSMA : prostate specific membrane antigen
 pY : phospho-tyrosine
 RE : réticulum endoplasmique
 RTK : récepteur tyrosine kinase
 SCF : stem cell factor
 SCLC : cancer du poumon à petites cellules
 SDH : succinate déshydrogénase
 Sf9 : cellules d'insecte Spodoptera frugiperda
 SFK : src family kinase
 SH2 : src homology 2
 Shc : Src homology 2 domain containing
 Shp 1/2 : Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1 / 2
 Sl : steel
 SMC : cellules du muscle lisse
 SOCS : Suppressor Of Cytokine Signaling

Sos : son of sevenless

SS : séquence signal

Stat : Signal Transducer and Activator of Transcription

SVF : sérum de veau foetal

Syk : Spleen tyrosine kinase

TGF β : transforming growth factor

TIE-2 : tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains

TNF : facteur de nécrose tumorale

Tr-KIT : forme tronquée de KIT

Tyrphostine : tyrosine phosphorylation inhibitor

UV : ultraviolets

VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

VH : fragment variable de la chaîne lourde

VL : fragment variable de la chaîne légère

W : white spotting

WT : wildtype

AVANT-PROPOS

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de deux équipes situées au Laboratoire de Biologie et de Pharmacologie Appliquée (LBPA) et à l'Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (IRCM). L'équipe du Dr André Pèlerin à l'IRCM est spécialisée dans le ciblage de différents récepteurs tyrosine kinase (RTK) comme la famille human epidermal growth factor receptor (HER) et Axl par des anticorps thérapeutiques. Les thèmes de recherche de l'équipe du Pr Christian Auclair au LBPA portent sur l'inhibition de RTK, plus particulièrement KIT, par des molécules pharmacologiques.

L'objectif initial de cette thèse était le développement de nouvelles thérapeutiques visant à inhiber la voie Stem Cell Factor (SCF)/KIT oncogénique. KIT est un récepteur tyrosine kinase activé par la fixation de son ligand le SCF. Ils forment un axe de signalisation impliquée dans de nombreuses pathologies, notamment certains cancers. Nous avons donc choisi de cibler cet axe par différentes stratégies thérapeutiques.

Dans un premier temps, l'introduction présentera la physiologie du récepteur KIT et du SCF, ainsi que leur implication dans différentes pathologies, notamment en oncologie. Par la suite, nous aborderons les différentes stratégies de thérapie ciblée en oncologie, à savoir l'utilisation de petites molécules pharmacologiques inhibitrices d'activité enzymatique clé dans l'oncogenèse et l'utilisation d'anticorps monoclonaux.

Nous présenterons ensuite les résultats obtenus par les 3 approches de ciblage de KIT adoptées durant ce travail : tout d'abord nous décrirons la mise au point d'un test de criblage de petites molécules inhibitrices ; par la suite nous détaillerons la génération d'anticorps intracellulaires dirigés contre le domaine intracellulaire du récepteur KIT. Puis nous finirons par exposer la caractérisation d'anticorps ciblant le domaine extracellulaire de KIT (KIT-ECD).

INTRODUCTION

I. LE RÔLE PHYSIOLOGIQUE DE L'AXE KIT/SCF ET SON IMPLICATION EN PATHOLOGIE

KIT est un récepteur membranaire portant une activité tyrosine kinase intracellulaire. La liaison de son ligand, le SCF, permet la dimérisation de KIT et l'activation de l'enzyme. La signalisation qui en découle régule de nombreuses fonctions de l'organisme et peut parfois être impliquée dans des phénomènes d'oncogenèse.

1. Présentation de l'axe KIT/SCF

a) Rôle physiologique de l'axe KIT/SCF

Au sein d'un être vivant, les différentes fonctions biologiques sont régulées grâce à des systèmes de communication entre les cellules. L'axe SCF/KIT représente une de ces voies de signalisation ; la liaison du SCF permet à une cellule exprimant le récepteur KIT à sa surface d'intégrer un signal venant de son environnement et de le traduire en réponse cellulaire. Le SCF et KIT sont exprimés de façon simultanée dans différents lieux de l'organisme et sont essentiels au développement embryonnaire ; en effet, l'absence de KIT et/ou de SCF chez la souris se traduit par une mort *in utero* ou périnatale due à une anémie macrocytaire (Motro et al., 1991).

L'axe SCF/KIT permet également la régulation des fonctions de certains types cellulaires à l'âge adulte. L'étude des souris présentant des mutations naturelles aux loci Steel (*Sl*) et White spotting (*W*) (codant pour le SCF et KIT respectivement) a permis de mettre en évidence les nombreuses fonctions du couple SCF/KIT. Ces souris, dont l'activité de l'axe SCF/KIT est plus ou moins affectée en fonction des mutants, présentent un large spectre d'altérations de leurs fonctions physiologiques : une anémie, une diminution de la fertilité, un défaut de la motricité intestinale, un défaut de pigmentation et une diminution des mastocytes ; celle-ci a pour conséquence une diminution des phénomènes inflammatoires (Motro et al., 1991). Il a été montré par la suite qu'à l'état embryonnaire, KIT est exprimé dans les cellules impliquées dans ces différentes fonctions : les cellules souches hématopoïétiques, les mastocytes, les cellules germinales primordiales, les mélanocytes, les cellules interstitielles de Cajal (intestin) et les neurones. Le SCF est exprimé dans l'environnement de ces cellules lorsqu'elles migrent puis dans leur niche ; c'est-à-dire le lieu où se développera ce lignage par la suite, composé des cellules elles-mêmes mais aussi de leur microenvironnement de soutien (Matsui et al., 1990; Orr-Urtreger et al., 1990). On le retrouve également exprimé au niveau des os en développement, suggérant un rôle dans l'ostéogénèse. A l'âge adulte, KIT continue de jouer un rôle dans l'hématopoïèse, la reproduction, l'immunité, le développement et les fonctions des mélanocytes et dans la motricité digestive.

- **Hématopoïèse et immunité**

KIT joue un rôle primordial dans l'hématopoïèse fœtale qui a lieu dans le foie, le sac vitellin puis la moelle osseuse ; il participe notamment au maintien du réservoir de cellules souches hématopoïétiques ainsi qu'à la formation du lignage érythroïde dans lequel il coopère avec l'érythropoïétine (EPO) (Munugalavadla and Kapur, 2005). On observe également une expression de KIT au niveau des précurseurs lymphocytaires B et T au sein du foie fœtal (Broudy, 1997).

A l'âge adulte, l'activité de KIT reste requise dans la rate et la moelle osseuse pour l'hématopoïèse ; tout comme fms-like tyrosine 3 kinase (FLT3), un autre RTK de la même famille, il joue un rôle important dans l'hématopoïèse précoce chez la souris et chez l'Homme. On peut noter certaines différences concernant l'expression de ces 2 RTK : chez la souris, les cellules souches hématopoïétiques expriment KIT mais pas FLT3 ; leur survie est donc dépendante de FL, le ligand de FLT3. La perte de l'expression de FLT3 est corrélée à la perte d'auto-renouvellement des cellules qui deviennent alors des progéniteurs, c'est-à-dire des cellules qui ont perdu la capacité d'auto-renouvellement mais qui donnent naissance à plusieurs lignages. A l'inverse, chez l'Homme, les cellules souches hématopoïétiques expriment faiblement KIT mais sont dépendantes de FL pour leur survie (Sitnicka et al., 2003). Lorsque les cellules s'engagent dans une voie de différenciation (on parle alors de précurseurs), certaines perdent l'expression de KIT. Les cellules hématopoïétiques matures qui maintiennent une expression de KIT sont les éosinophiles (Yuan et al., 1997), les basophiles (Columbo et al., 1992), une partie des Natural Killer (NK) et les mastocytes (figure 1).

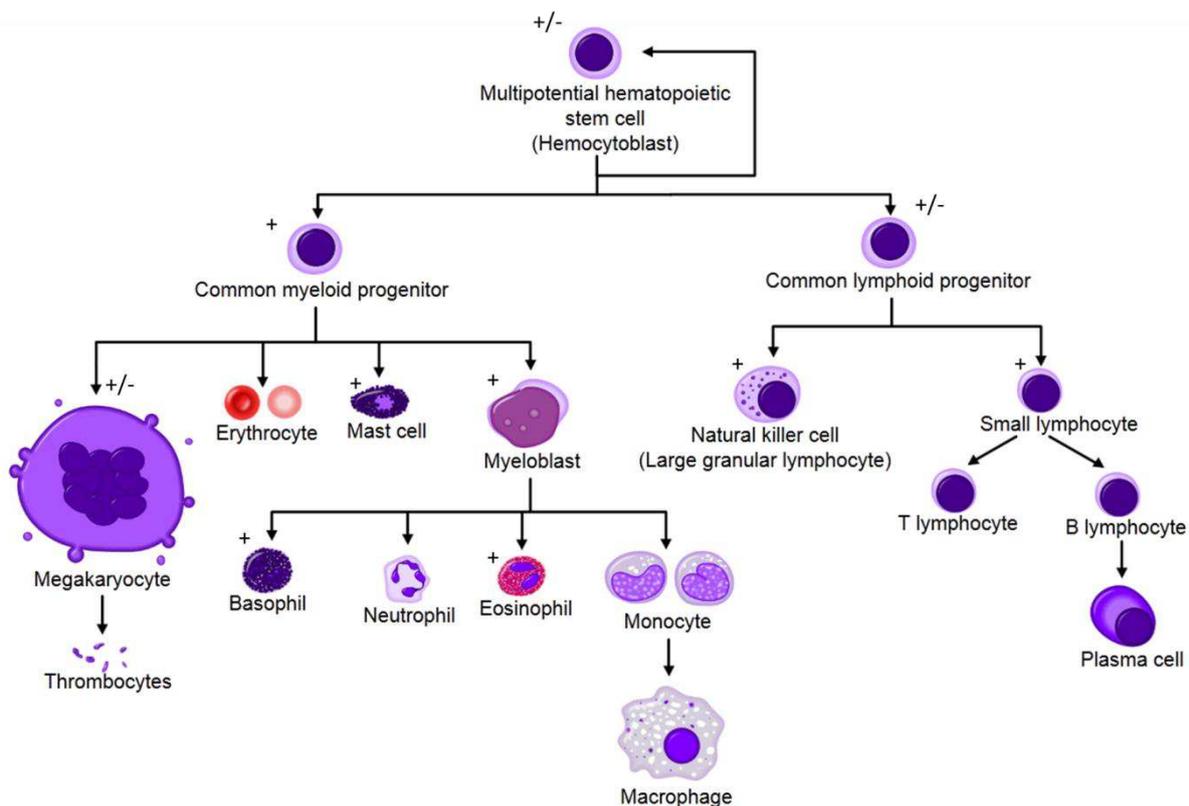


Figure 1 : schéma de la différenciation des différents lignages hématopoïétiques chez l'Homme.

+ : cellules exprimant KIT, +/- : KIT est exprimé par certaines sous-populations.

La sous-population périphérique de NK exprimant KIT, les $CD56^{bright}$, sont sensibles au SCF ; celui-ci agit en synergie avec l'IL-2 pour induire leur prolifération et augmenter leur pouvoir lytique (Matos et al., 1993). Le SCF a été décrit comme induisant la différenciation des progéniteurs en granulocytes éosinophiles ; il active également leur dégranulation, tout comme dans les mastocytes et les basophiles (Koketsu et al., 2008; Ray et al., 2010). Les basophiles et les mastocytes sont des effecteurs des phénomènes d'inflammation et d'allergie ; ils partagent la même morphologie et les mêmes fonctions (Kocabas et al., 2005). L'origine de ces deux types cellulaires n'est pas bien définie, certaines publications proposant une origine commune, d'autres non (Voehringer, 2013).

Le rôle de l'axe SCF/KIT est crucial pour le développement des mastocytes : les souris déficientes pour l'un ou l'autre présentent une absence quasi totale de mastocytes (Kitamura et al., 1978). En plus d'activer leur dégranulation, le SCF est chimiotactique pour les mastocytes et induit donc leur migration orientée vers le gradient de concentration (Meininger et al., 1992; Costa et al., 1996). Il permet également leur différenciation, leur adhérence à la matrice extracellulaire ainsi que la synthèse des médiateurs contenus dans leurs granules (Da Silva et al., 2006).

De récentes données démontrent une fonction du couple SCF/KIT dans les cellules dendritiques (DC) ; ces dernières, qui présentent les antigènes aux lymphocytes T (LT),

promouvent la différenciation et la polarisation des LT helper (Th). L'activation des DC par certains stimuli peut induire l'expression de KIT et/ou du SCF par celles-ci ; elles vont alors sécréter de l'IL-6 qui promeut la polarisation de Th en Th2 et Th17 (Krishnamoorthy et al., 2008). De plus, il semblerait que KIT ait un rôle dans la régulation de l'activité de DC. Le gleevec ou imatinib, est un inhibiteur de kinases qui cible de KIT ; les DC expriment KIT et l'activation de cette signalisation inhibe l'activation des NK par les DC. Le traitement des DC par l'imatinib restaure leur capacité à activer les NK. Ces derniers expriment également KIT mais ne sont pas sensibles au traitement pas l'imatinib (Borg et al., 2004).

- **Mélanogénèse**

Le rôle de l'axe SCF/KIT dans la mélanogénèse a été décrit très tôt puisque les études sur le locus *W* codant pour KIT chez la souris datant du début des années 1900 montraient un défaut de pigmentation (Russell, 1949). L'expression du SCF et de KIT promeut la survie des précurseurs des mélanocytes et leur permet de migrer de la crête neurale à l'épiderme durant le développement de l'embryon murin et humain (Wehrle-Haller, 2003). A l'âge adulte, le SCF n'est plus exprimé dans le derme murin et les mélanocytes sont présents uniquement dans le bulbe pileux. Chez l'Homme en revanche, le couple KIT/SCF est nécessaire à la survie des mélanocytes lors de la migration dans le derme et dans l'épiderme (Yoshida et al., 2001) ; le SCF est exprimé par les kératinocytes de l'épiderme, maintenant la stimulation des mélanocytes voisins qui expriment KIT.

- **Reproduction**

On observe une expression de KIT et du SCF par les cellules germinales primordiales lorsqu'elles commencent à proliférer et migrer du mésentère dorsal vers les gonades embryonnaires, qui les expriment également (Mauduit et al., 1999). Le SCF est impliqué dans la migration des cellules germinales primordiales, puis dans leur survie et prolifération dans les gonades, où il est sécrété par les cellules de soutien, qui sont les cellules de Sertoli chez le mâle et la granulosa chez la femelle (Sette et al., 2000). Chez la femelle, KIT et son ligand sont exprimés par les ovogonies, c'est-à-dire les cellules en prolifération qui sont à l'origine du stock de gamètes. Une fois la phase de prolifération terminée, les cellules entrent dans une phase de différenciation et on observe un arrêt de l'expression de KIT ; chez la femelle, cette étape correspond à l'entrée dans la méiose, on parle alors d'ovocytes primaires (Høyer et al., 2005).

Puis chez l'adulte, l'expression de KIT est nécessaire à la production de gamètes matures en réponse aux hormones gonadotrophiques : chez le mâle cela correspond à la prolifération et la survie des spermatogonies (seules cellules qui prolifèrent pendant la spermatogénèse) et les cellules de Leydig, et chez la femelle à la croissance et la différenciation des ovocytes. De plus, les cellules de soutien aux cellules germinales, c'est-à-dire les cellules de Sertoli et de la granulosa, expriment le SCF.

Il existe une forme tronquée de KIT, tr-KIT (cf c. i. le gène c-kit) qui est exprimée à la fin de la spermatogénèse (à partir du stade spermatocyte) et semble être localisé au niveau de la tête du spermatozoïde ; il joue un rôle dans l'activation de l'ovocyte en stimulant la phosphorylation de la phospholipase γ (PLC γ), bien qu'il soit dépourvu d'activité kinase, ce qui suggère qu'il interagit avec une autre kinase (Rossi et al., 2003).

- **Motricité intestinale**

KIT est également impliqué dans la formation de cellules particulières du tractus digestif, les cellules interstitielles de Cajal (ICC). Ces cellules d'origine mésenchymateuse sont situées dans les couches musculaires de l'œsophage jusqu'au rectum. Elles sont organisées en réseaux bi ou tridimensionnels de cellules électriquement connectées qui forment des contacts avec les nerfs et le muscle lisse (figure 2). Elles sont responsables du péristaltisme intestinal car elles sont dotées d'une activité électrique spontanée.

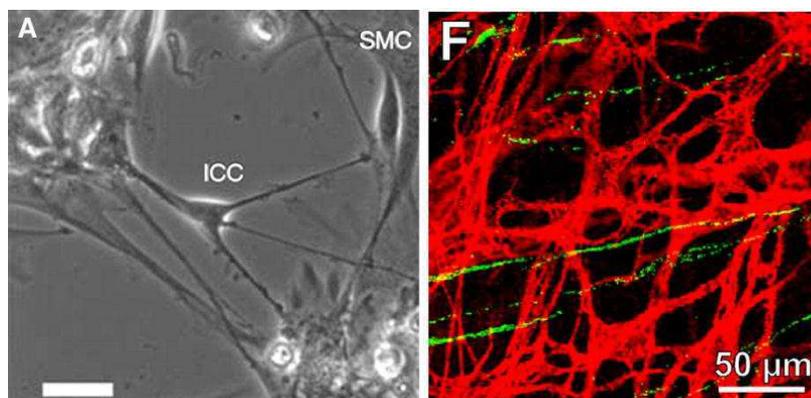


Figure 2 : visualisations d'ICC par microscopie.

Gauche : culture primaire d'ICC murines observée par microscope à contraste de phase. SMC, cellules du muscle lisse, barre = 25 μm . (Lee et al., 1999). Droite : observation par microscopie confocale d'ICC (en rouge) et de neurones (en vert) de coupe d'intestin humain (Chen et al., 2007).

Après la naissance, les précurseurs mésenchymateux communs aux ICC et aux cellules musculaire lisses se différencient en l'un ou l'autre, en fonction de la présence de SCF ou non respectivement (Ward and Sanders, 2001). Chez les personnes présentant des pertes de fonction de KIT, comme dans le piébaldisme, un des symptômes est une constipation chronique, liée à l'absence de ces cellules.

- **Système nerveux**

L'implication du couple SCF/KIT dans le développement et le fonctionnement du système nerveux n'est pas encore bien définie.

Lors du développement murin, l'axe KIT/SCF est impliqué dans l'organisation du tube neural et du cerveau (Keshet et al., 1991) ; de plus, le SCF est responsable de la migration et de

prolifération des progéniteurs neuronaux exprimant KIT puis de la prolifération et survie des neurones (Hirata et al., 1993).

Chez l'adulte, on observe une co-expression du SCF et de KIT dans le cerveau au niveau du bulbe olfactif, du cortex cérébral, de l'hippocampe et du cervelet (Motro et al., 1991). L'expression de KIT semble être présente dans les neurones et dans la glie, alors que celle du SCF serait restreinte aux neurones. La migration des axones des neurones des ganglions de la racine dorsale semble être influencée par son expression au niveau de leurs cibles (peau, motoneurone de la moelle épinière).

On observe une implication de l'axe SCF/KIT lors de réparation d'une blessure au cerveau (Sun et al., 2004) : KIT est surexprimé dans les neurones sensoriels en régénération. Il a été montré que les axones des neurones des mutants de KIT ou du SCF présentent une capacité réduite à repeupler une blessure. En effet, la régénération axonale sensorielle qui est dépendante de KIT mais indépendante du Nerve Growth Factor (NGF), est altérée chez ces mutants alors que la croissance neuronale normale (NGF dépendante) ne l'est pas (Lourenssen et al., 2000).

Cependant, à ce jour peu de défauts du système nerveux ont été reliés à une perte de KIT ou du SCF. En plus d'une capacité réduite des axones à repeupler une blessure, il a été montré qu'une perte de KIT entraîne un défaut d'apprentissage spatial dépendant de l'hippocampe (Katafuchi et al., 2000). Il y a sans doute peu d'autres défauts neurologiques majeurs observés car les neurones sensibles au SCF sont également dépendants d'autres facteurs, notamment le NGF.

b) Le SCF, le ligand de KIT

i. Le gène du SCF

Le SCF est le ligand du récepteur KIT. Son gène est situé au locus *Sl* du chromosome 12 humain et 10 chez la souris et est composé de 9 exons.

Après transcription, le pré-ARN messager (ARNm) subit un épissage alternatif qui produit 2 ARNm : l'ARNm SCF²⁴⁸ contient l'exon 6 qui code pour un site de clivage protéolytique et produit une protéine de 248 acides aminés (AA) après traduction; en revanche sur l'ARNm SCF²²⁰, l'exon 6 est éliminé, on obtient après traduction une protéine de 220 AA (Broudy, 1997).

ii. La protéine SCF

La traduction de l'ARNm SCF248 donne naissance à une protéine membranaire de 248 AA qui sera rapidement clivée par des métalloprotéases ou des chymases pour libérer le SCF soluble (165 AA) (figure 3). Il circule sous forme de dimère non covalent de 28 à 40 kDa en

fonction de son taux de glycosylation. Sa concentration dans le sérum est d'environ 3,3 ng/mL (Langley et al., 1993).

La traduction de l'ARNm SCF²²⁰ produit le SCF membranaire, dépourvu du site de clivage et retrouvé sous forme de dimères (figure 3).

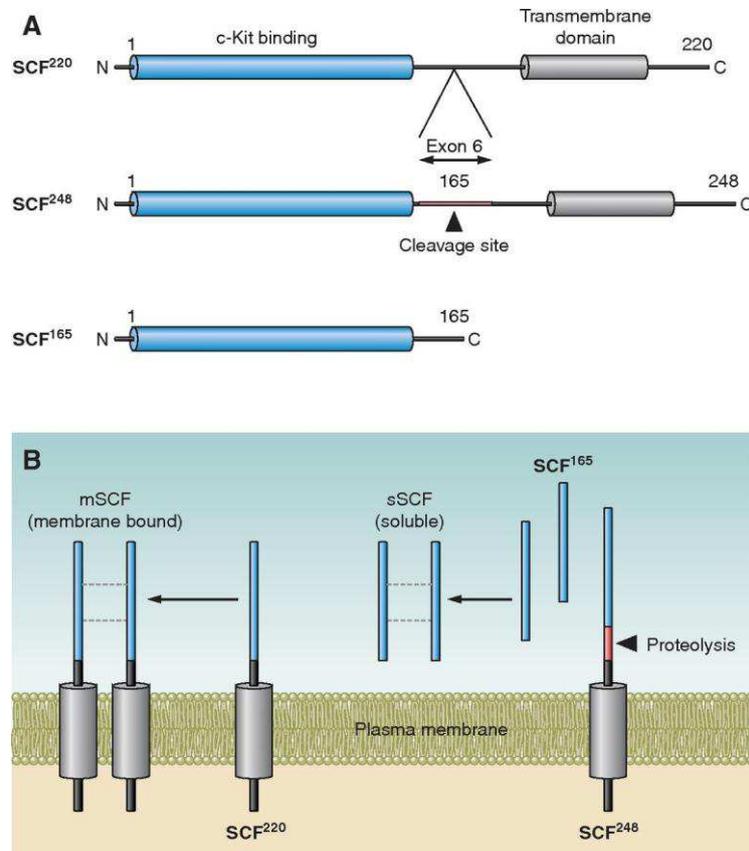


Figure 3 : représentation schématique des épissages alternatifs du SCF et différentes protéines produites.

A : 2 ARNm sont produits après épissage alternatif et donnent naissance aux protéines SCF²²⁰ et SCF²⁴⁸. L'ARNm du SCF²²⁰ ne contient pas l'exon 6 qui code pour le site de clivage protéolytique. L'ARNm du SCF²⁴⁸ contient l'exon 6 qui code pour le site de clivage protéolytique ; le clivage du SCF²⁴⁸ produit une protéine de 165 AA. B : le SCF²²⁰ reste ancré dans la membrane plasmique où il dimérise. Le SCF²⁴⁸ est clivé au niveau de son domaine extracellulaire pour être libéré puis va dimériser (Lennartsson and Rönstrand, 2012).

Les deux formes de SCF peuvent se lier à KIT et stimuler son activité kinase, bien que la forme membranaire ait une efficacité moindre et que les signalisations en aval soient différentes. Par exemple, la PLC γ n'est activée que par le SCF membranaire (Gommerman et al., 2000). Les deux formes de SCF présentent des patterns d'expression différents : dans les fibroblastes, le thymus, la moelle et le cerveau, la forme soluble est prédominante alors que dans la rate, les testicules, le placenta, le cœur et le cervelet, on retrouve une expression des deux formes (Huang et al., 1992).

Il existe des souris portant une mutation dans le gène du SCF qui provoque une expression exclusive de la forme soluble ; ces animaux présentent une stérilité, une anémie et des

défauts de pigmentation. Ceci suggère que les rôles des deux formes de SCF ne sont pas redondants au sein de l'organisme (Brannan et al., 1991).

c) Le récepteur tyrosine kinase KIT

i. Le gène c-kit

Le gène c-kit a été décrit pour la première fois en 1986 chez le chat, l'humain et la souris, comme étant l'équivalent cellulaire de l'oncogène viral porté par le rétrovirus félin HZ4-FeSV (Hardy-Zukerman 4 Feline Sarcoma Virus) étant à l'origine de fibrosarcome (Besmer et al., 1986). Le rôle du gène c-kit chez la souris était en réalité déjà bien caractérisé car il est situé au locus *W* présentant des mutations naturelles dont les phénotypes associés étaient étudiés dès les années 60 (MCCULLOCH et al., 1964) ; mais l'identification du locus *W* comme codant pour le gène c-kit n'a été fait qu'en 1988 (Chabot et al., 1988).

C-kit est un gène de 82 Kb, situé sur le bras long du chromosome 4 chez l'Homme (chromosome 5 chez la souris) et composé de 21 exons : les exons 2 à 9 codent pour le domaine extracellulaire, l'exon 10 pour le domaine transmembranaire et les exons 11 à 20 pour le domaine intracellulaire (figure 4).

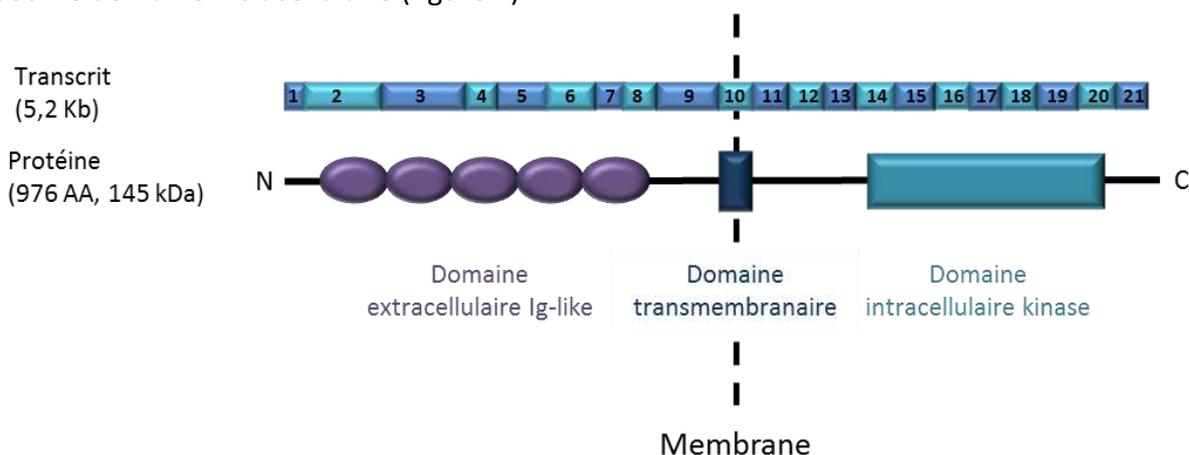


Figure 4 : organisation schématique de l'ARNm et de la structure de la protéine KIT.

En haut, découpage des différents exons de l'ARNm codant pour KIT. En bas, organisation structurale de la protéine KIT de l'extrémité N-terminale (N) extracellulaire à l'extrémité C-terminale (C) cytoplasmique.

La transcription du gène c-kit produit au moins 4 transcrits d'environ 5 Kb dont les deux plus décrits sont les formes $GNNK^-$ et $GNNK^+$: ils résultent de l'épissage alternatif de l'exon 9, insérant ou non le motif Gly-Asn-Asn-Lys dans le domaine extracellulaire (Reith et al., 1991) ; la forme $GNNK^-$ est la plus abondante.

Il existe également une forme tronquée de KIT appelée tr-KIT ; elle correspond à l'extrémité cytoplasmique du récepteur, de l'intron 16 à la queue C-terminal. Il a été montré que cette forme particulière de KIT est exprimée à la fin de la spermatogénèse (à partir du stade spermatocyte) au niveau de la tête du spermatozoïde et joue un rôle dans la fécondation ; en effet il a été montré que l'injection de cette forme tronquée dans un ovocyte induit son activation (Rossi et al., 2003).

ii. La protéine KIT

La protéine KIT est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase qui fait partie de la famille des RTK de type III comme les platelet derived growth factor receptor (PDGFR) α et β , colony stimulating factor 1 receptor (CSF-1) et FLT3 (Yarden et al., 1987; Matthews et al., 1991). KIT est composé de 976 AA (pour la forme GNNK⁺, qui est utilisée comme référence pour la numérotation). Son poids moléculaire varie entre 145 et 160 kDa en fonction de son état de glycosylation. En partant de l'extrémité COOH, on trouve d'abord la partie extracellulaire composée de 5 domaines Ig-like (Qiu et al., 1988; Blechman et al., 1993), un domaine transmembranaire unique et un domaine intracellulaire portant l'activité kinase (figure 5).

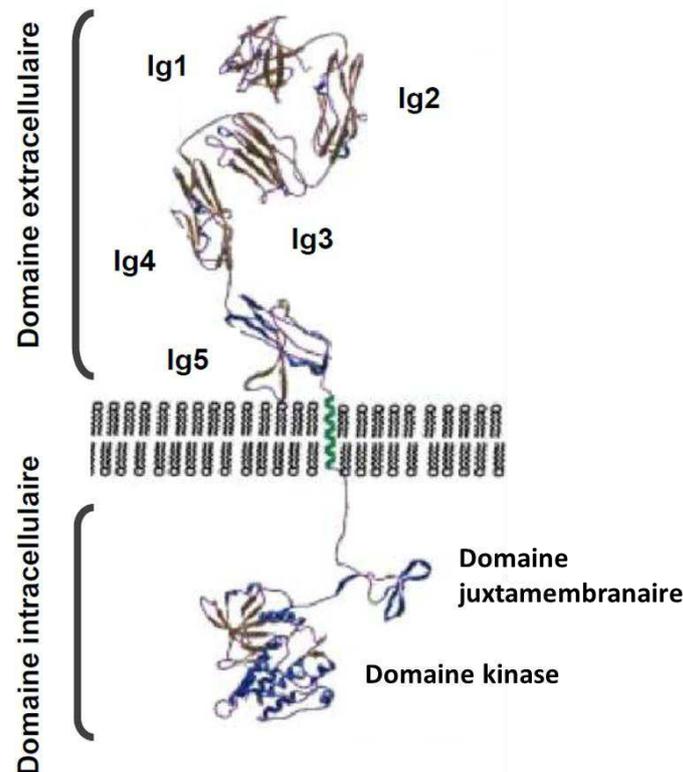


Figure 5 : organisation structurale de la protéine KIT.

Le domaine extracellulaire est composé de 5 domaines Ig-like. La portion intracellulaire est composée de 2 domaines fonctionnels : les domaines juxtamembranaire et à activité tyrosine kinase (Mol et al., 2003).

- Le domaine extracellulaire (524 AA) : on trouve tout d'abord une séquence signal de 25 AA qui permet d'adresser la protéine au Golgi puis est rapidement éliminée. Il est ensuite composé de 5 domaines Ig-like contenant des résidus cystéines qui permettent de stabiliser leur structure en boucle grâce aux ponts disulfure (sauf pour le domaine 4). Les 3 premiers domaines Ig-like permettent de lier le ligand SCF, ce qui induit la dimérisation de KIT, stabilisée par les domaines Ig-like 4 et 5 (Yuzawa et al., 2007). Ces domaines jouent un rôle important dans la répulsion des monomères de KIT en absence de SCF.

Le domaine extracellulaire possède 9 sites potentiels (asparagines) de N-glycosylation qui ont lieu dans le Golgi lors de son trafic vers la membrane plasmique (Majumder et al., 1988; Xiang et al., 2007).

- Le domaine transmembranaire (21 AA) est formé d'une hélice α hydrophobe.
- Le domaine intracellulaire (431 AA) formé par le domaine juxtamembranaire et le domaine kinase bipartite, caractéristique de cette famille de RTK.

Le domaine kinase est formé de 2 lobes : le petit lobe en N-terminal, composé de feuillets β et d'une hélice α (hélice contrôle ou C helix) qui fixe l'adénosine triphosphate (ATP) et le grand lobe en C-terminal, composé d'hélices α et qui contient la boucle d'activation (A loop) et fixe les substrats (figure 6). La famille des RTK de type III se différencie des autres par la présence d'un insert (KID) au milieu du domaine kinase (77 AA pour KIT) (Severinsson et al., 1990). Le site catalytique se situe à l'interface des 2 lobes ; leur mouvement relatif permet l'entrée et la sortie de l'ATP, ainsi que des substrats phosphorylables.

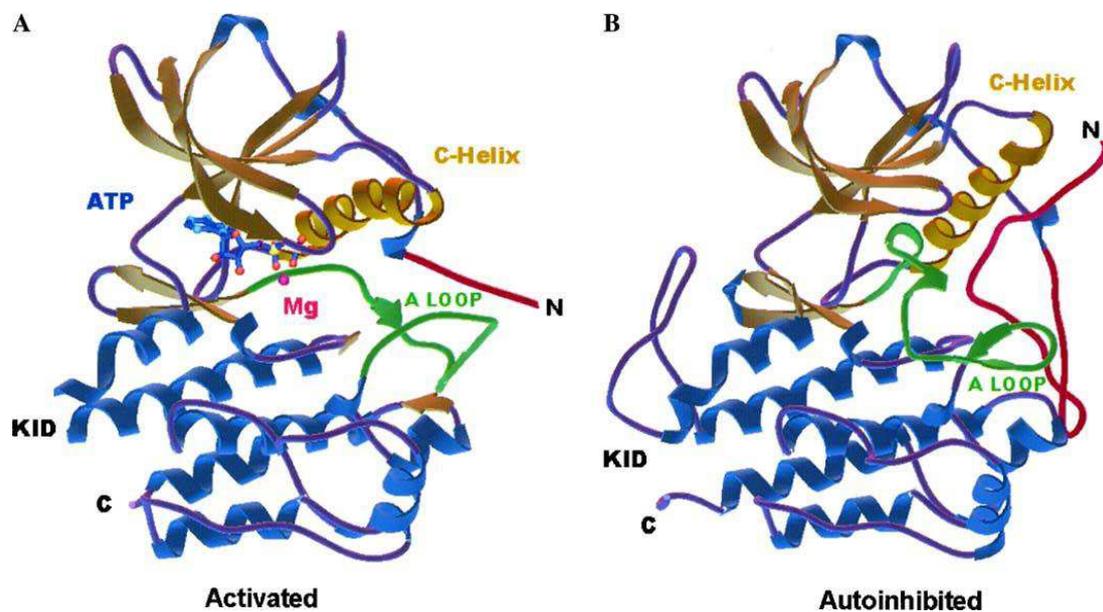


Figure 6 : représentation des structures secondaires du domaine intracellulaire de KIT. A l'extrémité N-terminale, on trouve le domaine juxtamembranaire (rouge), puis le lobe N qui est essentiellement formé de feuillets β (jaune foncé) et d'une hélice α , l'hélice de contrôle (C-Helix en jaune clair). Le lobe C est constitué d'hélices α (bleu) et contient la boucle d'activation (A loop en vert). A : conformation active de KIT, avec la boucle d'activation déployée. Le KID n'est pas représenté car ne peut être cristallisé. B : conformation inactive, où la boucle d'activation sert de pseudo-substrat dans le site catalytique (Mol et al., 2004).

Le domaine juxtamembranaire (JM) présente une activité auto-inhibitrice sur l'activité kinase du récepteur. En effet, lorsque le récepteur est en conformation inactive, le domaine JM s'insère entre les 2 lobes, bloquant ainsi l'entrée du site catalytique (Laine et al., 2011) et maintenant ainsi la kinase en configuration statique fermée ; il empêche alors, par encombrement stérique, le déploiement de la boucle d'activation qui est compactée entre les 2 lobes comme un pseudo-substrat dans le site actif (Mol et al., 2004).

En conformation active, la boucle A s'étend vers le domaine JM qui est complètement exposé ; ceci libère l'entrée du site catalytique pour l'ATP et les substrats. La boucle A est alors dans une conformation qui permet la liaison des peptides substrats, pour qui elle sert de plateforme (Huse and Kuriyan, 2002).

La boucle d'activation, et plus particulièrement le motif Asp-Phe-Gly (DFG 810-812) très conservé au sein des kinases situé à sa base, joue un rôle très important dans l'activité de la kinase puisqu'elle lie le magnésium qui coordonne les groupements phosphates de l'ATP (table 1).

L'hélice C est en contact direct avec la boucle d'activation et la lysine 623 qui coordonne les groupements phosphates de l'ATP, ce qui en fait un régulateur important des modifications de conformation de la kinase (table 1).

<i>Residue or motif</i>	
Signal sequence	1–22
Extracellular domain	23–520
Transmembrane segment	521–543
Juxtamembrane domain	544–581
JM phosphorylation sites	568, 570
Protein kinase domain	582–937
Glycine-rich nucleotide-binding loop	596–601
Phosphate-binding lysine	623
α C-Helix glutamate	640
Kinase insert domain	685–761
Kinase insert domain phosphorylation sites	703, 721, 730
Catalytic aspartate	792
Catalytic loop (HRDLAARN)	790–797
Activation loop beginning: DFG	810–812
Activation loop end: APE	837–839
Activation loop pTyr	823
C-terminal phosphorylation site	900, 936
Number of encoded amino acids	976

Table 1 : résidus catalytiques et régulateurs importants dans la séquence protéique de KIT (Roskoski Jr., 2005).

d) L'activation de KIT par le SCF

KIT est présent à la membrane plasmique sous forme monomérique inactive (Roskoski Jr., 2005). La fixation d'un dimère de SCF entraîne la dimérisation de 2 monomères de KIT. Chaque monomère de SCF interagit avec les domaines Ig-like D1, D2 et D3 d'un monomère de KIT (Yuzawa et al., 2007) (figure 7). On observe ensuite une forte modification de l'orientation des domaines D4 et D5 qui interagissent alors avec ceux du monomère associé. Les interactions D4-D4 et D5-D5 stabilisent la région extracellulaire du dimère (Liang, 2013).

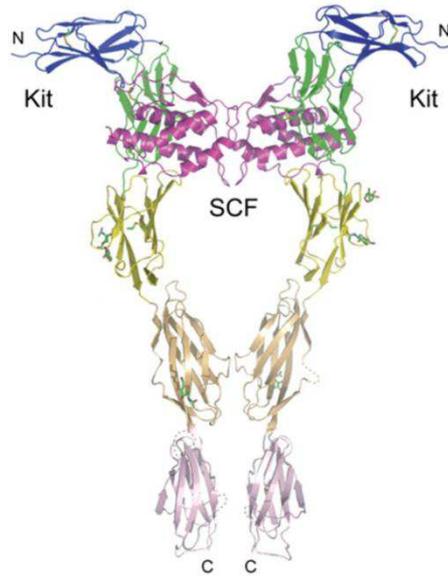


Figure 7 : structure cristallographique d'un dimère de SCF et du domaine extracellulaire d'un dimère de KIT.

Les 5 domaines Ig-like de KIT D1 à D5 sont représentés en bleu, vert, jaune, beige et mauve clair ; le dimère de SCF est représenté en mauve foncé (Yuzawa et al., 2007).

Les domaines transmembranaires et intracellulaires des 2 monomères de KIT sont alors rapprochés et chaque domaine kinase va servir à la fois d'enzyme et de substrat à celui du monomère associé. L'activation de KIT va entraîner des modifications conformationnelles intracellulaires, essentiellement au niveau du domaine JM et de la boucle d'activation. Le premier évènement de l'activation de KIT est la phosphorylation du domaine JM au niveau des résidus tyrosine 568 et 570 ; ceci modifie sa conformation, l'éloigne de l'entrée du site catalytique et lève l'auto-inhibition. La boucle d'activation se déplie pour adopter sa conformation active et l'entrée du site actif est alors libérée ; la kinase est alors en conformation pleinement active. Puis les autres tyrosines du domaine intracellulaire de KIT sont phosphorylées : 703, 721, 730, 823, 900 et 936. *In vitro*, on trouve également les tyrosines 547 et 553 phosphorylées (DiNitto and Wu, 2011). La phosphorylation de la tyrosine 823 de la boucle d'activation stabilise sa conformation active. Il est à noter que toutes les phosphorylations sur tyrosine du récepteur sont réalisées par KIT lui-même (trans-phosphorylation par le monomère associé), à l'exception de la tyrosine 900 qui est phosphorylée par les src family kinases (SFK) (Lennartsson et al., 2003). Les SFK sont des tyrosines kinases non récepteurs au nombre de 11 : lyn, fyn, src, yes, fgr, lck, hck, blk, yrk, srm et frk (Sen and Johnson, 2011).

L'activation de KIT par le SCF entraîne une modification de sa localisation membranaire : une fois phosphorylé, KIT est localisé dans les rafts lipidiques. Cette localisation est nécessaire pour enclencher la signalisation qui découle de l'activation de KIT (Jahn et al., 2007). KIT est alors actif et va recruter des partenaires de signalisation : c'est ainsi que l'information est transférée du récepteur aux effecteurs.

e) Interactions cytoplasmiques avec KIT actif

Une fois phosphorylées, 7 des tyrosines du domaine cytoplasmique de KIT (568, 570, 703, 721, 730, 900 et 936) vont servir de site d'ancrage pour ses partenaires de signalisation via leurs domaines src homology 2 (SH2), la tyrosine 823 n'ayant pas de partenaire connu à ce jour. Le signalosome du récepteur KIT a donné lieu à de nombreuses publications ; la figure 8 récapitule les interacteurs décrits de KIT, bien que les résultats des différentes études diffèrent parfois.

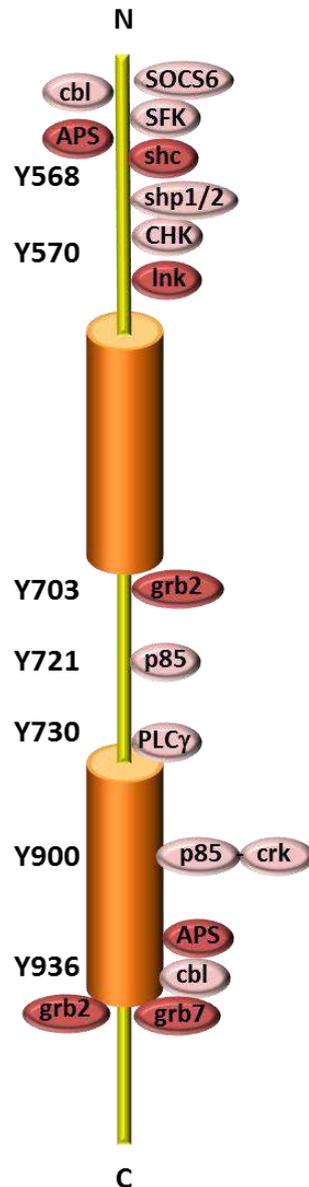


Figure 8 : représentation schématique des molécules de signalisation et adaptatrices recrutées directement par les tyrosines phosphorylées du domaine intracellulaire de KIT.

Molécules adaptatrices en rouge, enzymes en rose.

Le motif dityrosine phosphorylé 568-570 est un élément clé pour induire la signalisation après fixation du SCF ; c'est lui qui recrute le plus de partenaires, comprenant des molécules adaptatrices ou des enzymes.

La molécule adaptatrice contenant des domaines homologues de la pleckstrine et SH2 (APS) est une molécule adaptatrice de 84 kDa qui se lie aux phospho-tyrosines 568 et 936 via son domaine SH2 ; une fois phosphorylé (par les SFK entre autres), APS sert de site d'ancrage à l'E3 ubiquitine-ligase Casitas B-lineage Lymphoma (Cbl) ainsi qu'à la protéine adaptatrice Growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2) (Wollberg et al., 2003). Il semble que l'effet majeur consécutif à la liaison d'APS soit la dégradation du récepteur.

Cbl peut également être recruté directement par la phospho-tyrosine 568 (pY568) et pY936. Les SFK activent alors Cbl en le phosphorylant ; celui-ci va ubiquitinyler KIT et induire son internalisation et sa dégradation (Masson et al., 2006). Cbl nécessite non seulement d'être phosphorylé par les SFK, mais aussi d'être recruté sur les phospho-tyrosines de KIT pour l'ubiquitinyler. Les SFK jouent un rôle central dans l'internalisation de KIT et l'activation de la signalisation consécutive à la fixation du SCF.

Lyn et fyn, qui font partie de la famille des SFK, sont également recrutées sur pY568-pY570 grâce à leur domaine SH2 et activent la voie Rac/c-Jun N-terminal kinase (JNK) ainsi que extracellular-signal-regulated kinase (Erk) 1/2 d'une manière Src homology 2 domain containing (shc)-dépendante (Price et al., 1997, 1999).

Shc est une protéine adaptatrice qui se lie au motif dityrosine puis est phosphorylée par les SFK. Elle régule les voies phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt et Mitogen-activated protein kinase (MAPK) à différents niveaux. Une fois phosphorylée, elle devient alors un site d'ancrage pour Grb2 qui recrute Grb2-associated-binding protein 2 (Gab2), alors phosphorylé par les SFK. Gab2 peut ensuite activer la voie Rac/JNK (via shp2) et la PI3K (Lennartsson et al., 1999; Yu et al., 2006a). Grb2 est constitutivement associé à son *of sevenless* (sos) qui est un facteur d'échange de nucléotide guanosine diphosphate (GDP) en guanosine triphosphate (GTP) ; Ras-GTP va alors activer la cascade Raf/MEK/Erk 1/2.

Les tyrosines phosphatases Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1 (shp1) et shp2 (aussi appelée syp) se lient par leur domaine SH2 à pY570 et 568 respectivement (Kozlowski et al., 1998). Shp1 atténue l'activité kinase de KIT en le déphosphorylant, limitant son action proliférative. Shp2 quant à lui, ne semble pas avoir d'activité phosphatase sur KIT mais permet de transmettre les signaux de prolifération et de survie liés à l'activation de KIT : une fois phosphorylé, shp2 peut recruter Grb2 qui active les voies Raf/MEK/ERK des MAPK (Tauchi et al., 1994). Il induit également une activation de la voie PI3K/Akt (voir pY721).

La Csk homologous kinase (CHK) se lie au motif dityrosine par son domaine SH2 ; elle down-régule lyn et fyn en les phosphorylant sur une tyrosine particulière.

La protéine adaptatrice Ink, qui fait partie de la famille d'APS, se lie à pY568 via son domaine SH2 (Gueller et al., 2008). Elle est exprimée dans les tissus hématopoïétiques et inhibe les voies de signalisation activées par KIT, probablement en recrutant Cbl ce qui entraîne la dégradation de KIT. De plus, elle a été décrite comme inhibant les SFK et joue donc aussi un rôle dans la régulation négative des voies Rac/JNK et Erk 1/2.

La protéine Suppressor Of Cytokine Signaling 6 (SOCS6) est recrutée par pY568 (Zadjali et al., 2011). La protéine SOCS1 de la même famille est également recrutée sur le récepteur mais le site de liaison n'est pas décrit (Sepulveda et al., 1999). Ce sont des molécules connues pour inhiber la voie Janus kinase/signal transducers and activators of transcription (Jak/STAT) par différents mécanismes. SOCS 1 inhibe la prolifération cellulaire induite par la liaison du SCF. La liaison de SOCS6 est également décrite comme inhibant l'activité des MAPK (Bayle et al., 2004).

La protéine adaptatrice Grb2 est recrutée par les **pY703** et **936** (Thömmes et al., 1999). Contrairement au recrutement indirect de Grb2 par shp2 et shc sur pY568-570, le mécanisme principalement impliqué ici est la liaison à Cbl et donc la dégradation de KIT (Sun et al., 2007).

La **phospho-tyrosine 721** sert de site d'ancrage pour la sous-unité régulatrice de la PI3K, p85 (Chian et al., 2001). La liaison de p85 active la voie Rac/JNK et Akt. Il a également été montré que p85 forme un complexe avec Gab2 et shp2 qui régule la voie PI3K. La phosphorylation de shp2 semble favoriser l'interaction de p85 avec KIT et activer la voie PI3K (Mali et al., 2012).

La **phospho-tyrosine 730** active la PLC γ (Gommerman et al., 2000) (voir I.1.f) les voies de signalisation intracellulaire activées par l'axe KIT/SCF).

La **phospho-tyrosine 900** recrute les molécules adaptatrices crkL et crk II par l'intermédiaire de p85 (Sattler et al., 1997; Lennartsson et al., 2003) ; le rôle de ces interactions avec KIT n'est pas encore bien établi mais il semblerait passer par une liaison des crk avec Cbl et donc conduire à une dégradation de KIT.

En plus d'APS, Cbl et Grb2, la **pY936** fixe la protéine adaptatrice Grb7 par son domaine SH2. Son rôle dans la signalisation KIT n'a pas encore été bien défini, mais il a été décrit dans d'autres systèmes comme activant Ras et jouant un rôle important dans la migration (McIntyre et al., 2005a; Lennartsson and Rönstrand, 2012).

f) Les voies de signalisation intracellulaires activées par l'axe KIT/SCF

- La voie de la PI3K

La PI3K est une lipide kinase qui, lorsqu'elle est activée par le SCF, est impliquée dans la survie, la prolifération et la migration. Cette voie est activée lorsque sa sous-unité régulatrice

p85 se lie à une phospho-tyrosine par son ou ses domaines SH2. Il y a alors assemblage avec la sous-unité catalytique p110 qui permet la production de phosphatidyl inositol triphosphate (PIP₃). Celui-ci recrute alors la sérine/thréonine kinase phosphoinositide-dépendent kinase-1 (PDK1) à la membrane cellulaire où elle phosphoryle la sérine/thréonine kinase Akt. Il semblerait qu'une seconde phosphorylation d'Akt par mammalian Target Of Rapamycin (mTOR) soit nécessaire à son activation complète. L'activation d'Akt promeut la survie cellulaire en inactivant par phosphorylations des facteurs pro-apoptotiques comme Bcl-2-associated death promoter (Bad) et B-cell lymphoma 2 interacting mediator of cell death (Bim) et le facteur de transcription Foxo3. Une des cibles d'Akt est mTOR, qui une fois activée régule de nombreuses fonctions cellulaires comme la synthèse protéique, la survie et l'organisation du cytosquelette.

De plus, il a été montré que dans certains types cellulaires, la voie PI3K pouvait activer la voie Rac/JNK et induire la prolifération cellulaire.

La voie PI3K peut être activée par recrutement direct sur pY721, mais aussi indirectement par le motif dityrosine et par les pY703 et 936 via Gab2.

- La voie des MAPK

La voie des MAPK constitue l'une des voies principales de transmission des signaux de prolifération apportés par les facteurs de croissance. Elle est activée lorsque les protéines adaptatrices sont recrutées sur des récepteurs, notamment les RTK activés. Elles activent alors les petites protéines G à activité GTPase comme Rho, Ras ou Rac par l'intermédiaire de facteurs d'échange, ce qui est à l'origine d'une cascade de phosphorylation : les MAPKKK sont des sérine/thréonine kinases qui vont phosphoryler les MAPKK qui vont à leur tour phosphoryler les MAPK qui seront, pour une population importante d'entre elles, transloquées au noyau (figure 9). Il existe 5 grandes familles de MAPK : JNK (1, 2, 3), p38 (α , β , γ , δ), Erk (1 et 2), Erk (3 et 4) et Erk 5, les plus étudiées chez les mammifères étant JNK, p38 et Erk 1/2.

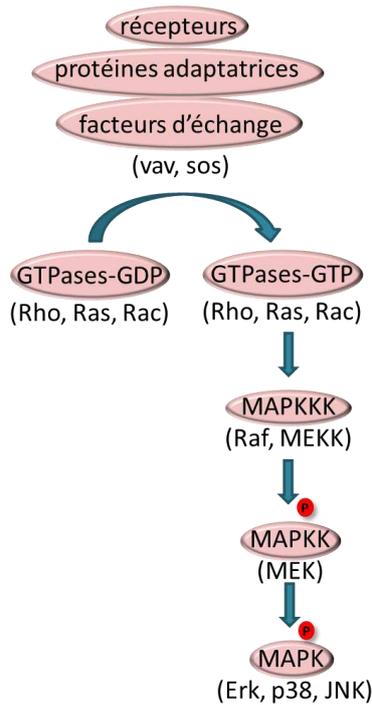


Figure 9 : représentation schématique de l'activation de la voie des MAPK.

Les récepteurs activés recrutent les facteurs d'échange par l'intermédiaire des protéines adaptatrices. Les GTPases sont activées par les facteurs d'échange et activent la cascade des MAPK.

La voie des MAPK est régulée de nombreuses façons grâce à différentes protéines interagissant avec KIT : par Grb2 essentiellement quand il est recruté indirectement sur KIT par APS ou shp2, ou par les SFK qui phosphorylent shc (figure 10).

De plus, il a été montré que dans certains types cellulaires, la voie PI3K pouvait activer la voie Rac/JNK. En effet, les produits de la PI3K activent le facteur d'échange vav qui convertit Rac-GDP en Rac-GTP, activant ainsi JNK (Han et al., 1998). Ceci a pour effet d'activer, entre autre, le facteur de transcription c-Jun qui induit la prolifération cellulaire.

CHK et Ink sont décrites pour inhiber les SFK, on peut donc penser qu'elles ont également un rôle de régulateur négatif sur les MAPK.

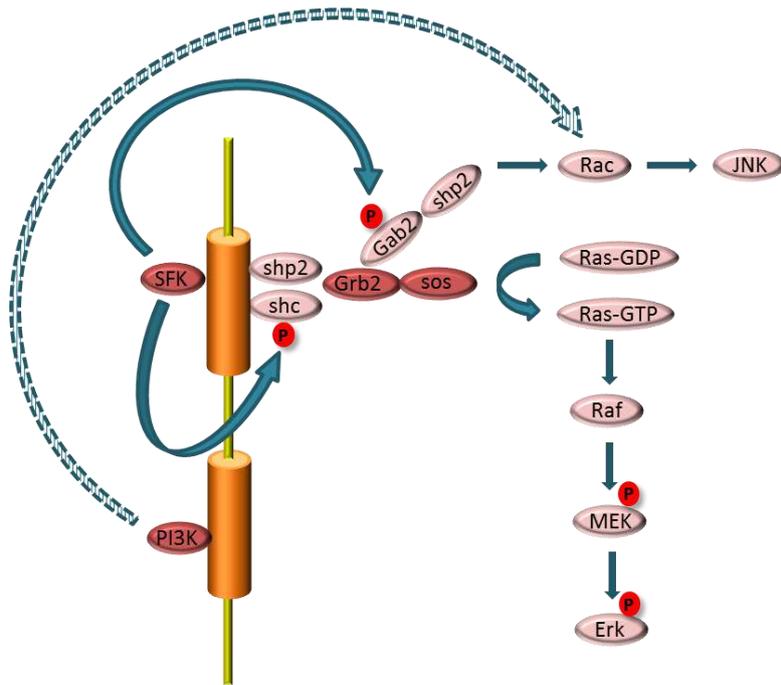


Figure 10 : différents niveaux d'activation des MAPK par KIT.

La voie des MAPK peut être activée par KIT grâce au recrutement des molécules adaptatrices Grb2 et shp2. De plus, l'activation des SFK peut conduire à l'activation des MAPK en phosphorylant shc et Gab2. La PI3K active de façon indirecte Rac (pointillé).

- SFK

Cette famille de kinases est composée de nombreux membres dont certains interagissent avec KIT lorsqu'il est phosphorylé, notamment fyn et lyn.

Lorsqu'elles sont activées par KIT, les SFK induisent la prolifération cellulaire et la migration. Elles sont recrutées au niveau du motif di-tyrosine 568-570 phosphorylé puis phosphorylent la tyrosine 900 afin que KIT soit entièrement activé. L'activation des SFK diminue l'expression de KIT surface car elles participent à son activation et donc à sa dégradation.

Elles jouent un rôle important dans la régulation des différentes voies de signalisation activées par KIT, notamment les MAPK comme vu précédemment, mais également de la PI3K ; en effet, elles diminuent la phosphorylation de la Y721, ce qui limite la fixation de p85. De plus, il a été montré qu'elles augmentent la phosphorylation de STAT3 (Shivakrupa and Linnekin, 2005), de Cbl et d'APS, créant ainsi un site de fixation pour Cbl (Roskoski, 2005).

Cette famille de kinases est régulée entre autre par CHK qui les phosphoryle sur une tyrosine inhibitrice.

- PLC γ

La PLC γ activée par KIT stimule l'hydrolyse du phosphatidyl inositol diphosphate (PIP $_2$) en inositol triphosphate (IP $_3$) et diacylglycérol (DAG). Le DAG active la protéine kinase C (PKC)

qui inhibe l'activité de KIT en le phosphorylant sur des résidus sérines (Blume-Jensen et al., 1994). L'IP₃ augmente la concentration en ion calcium (Ca²⁺) intracellulaire par 2 mécanismes : il promeut la mobilisation des stocks de Ca²⁺ du réticulum endoplasmique (RE) et permet l'influx de Ca²⁺ extracellulaire.

La voie de la PLC γ semble être activée essentiellement par le SCF membranaire (Gommerman et al., 2000), ce qui protège les cellules de l'apoptose, notamment lors de radiothérapie. La cytotoxicité induite par les rayonnements est due à l'activation du cycle de la sphingomyéline : il y a hydrolyse de la sphingomyéline par une sphingomyélinase et formation de céramide. La PKC inhibe les sphingomyélinases ; sa stimulation par le DAG inhibe l'apoptose induite par le céramide (Maddens et al., 2002).

- Jak/STAT

Les Jak sont des tyrosines kinases cytoplasmiques qui activent les facteurs de transcription STAT ; ceux-ci sont alors recrutés au niveau des récepteurs et phosphorylés par Jak. Par la suite, ils vont dimériser et être transloqués au noyau et induire la transcription de gènes cibles.

Le SCF induit l'activation de la voie Jak/STAT en phosphorylant Jak2 qui est constitutivement associé à KIT (Weiler et al., 1996). Il y a ensuite une phosphorylation de STAT1a, STAT3, STAT5a et b (Gotoh et al., 1996; Deberry et al., 1997; Brizzi et al., 1999). Les STAT ciblent un très grand nombre de gènes, près de 1000 gènes pour STAT3 (Kidder et al., 2008). Leurs effets sont donc très variables, avec notamment la promotion de la prolifération et l'inhibition de l'apoptose pour STAT3 et 5 et l'induction de la mort cellulaire pour STAT1.

Il est à noter que la signalisation induite par le SCF est différente en fonction des isoformes de KIT et du SCF. Par exemple, la forme GNNK⁻ de KIT induit une activation plus rapide et plus forte des SFK et donc de la PI3K que la forme GNNK⁺ ; en effet, les SFK phosphorylent Gab2 qui active à son tour la PI3K (Sun et al., 2008). De plus, les deux formes de SCF induisent des voies de signalisation préférentielles. La stimulation de KIT par le SCF membranaire active essentiellement la voie de la PLC γ (Gommerman et al., 2000).

g) Mécanismes de régulation négative du signal SCF/KIT

L'activation des voies de signalisation nécessite d'être atténuée pour que le système se régule et puisse être réenclenché. L'existence de boucles de rétrocontrôle négatif permet cet équilibre entre déclenchement et arrêt du signal. Il existe des régulations transitoires, comme l'inhibition de l'activité kinase ou des voies en aval, et des mécanismes qui dégradent les acteurs de la voie, nécessitant leur resynthèse.

- Inhibition de l'activité kinase

La fixation du SCF à KIT induit notamment l'activation de la PI3K qui permet la formation de DAG et augmente le Ca^{2+} intracellulaire. Ces 2 phénomènes ont pour effet d'activer la PKC qui phosphoryle KIT sur les sérines 741 et 746, ce qui inhibe son activité kinase par un mécanisme inconnu (Blume-Jensen et al., 1995).

Shp1 a été impliqué dans la régulation négative du signal SCF/KIT car c'est une phosphatase qui déphosphoryle le récepteur en se liant au motif dityrosine du domaine JM ; ceci limite le recrutement des molécules partenaires de signalisation et inhibe par conséquent les voies situées en aval.

Une autre famille de molécules a été décrite comme atténuant la signalisation SCF/KIT, les SOCS. SOCS1 se lie à KIT et à plusieurs de ses partenaires (Grb2, vav) inhibant ainsi la prolifération cellulaire en empêchant le recrutement des partenaires et en bloquant leur phosphorylation (Sepulveda et al., 1999). SOCS6 se lie au domaine JM de KIT et réduit l'activation des MAPK (Bayle et al., 2004). Les SOCS ont un rôle inhibiteur sur les kinases en agissant comme un pseudo-substrat, bien que ceci ne soit pas encore décrit pour leur inhibition de KIT.

- Dégradation du récepteur

Comme décrit précédemment, la phosphorylation de KIT induit sa relocalisation dans les rafts qui est nécessaire à la signalisation (Jahn et al., 2007). De plus, la déplétion de cellules en cholestérol membranaire réduit de façon dose-dépendante l'internalisation de KIT. Sa localisation au niveau des rafts est donc également nécessaire à son internalisation et par conséquent à sa dégradation (Jahn et al., 2002).

Les mécanismes conduisant à la dégradation de KIT ne sont pas encore pleinement élucidés : certains travaux impliquent la voie lysosomale, d'autres la voie protéasomale. Le SCF induit la dimérisation de KIT, sa phosphorylation et sa relocalisation au niveau des rafts. KIT active alors les SFK qui phosphorylent Cbl dont le recrutement est soit direct par les pY568 et 936, soit indirect par Crk, APS ou Grb2. Cbl ubiquitinye KIT qui va alors être endocyté dans des puits à clathrine. Le contenu endosomal est ensuite dégradé soit après fusion avec les lysosomes soit par le protéasome. Certaines données suggèrent que KIT serait mono-ubiquitinylé par Cbl, ce qui entraînerait une dégradation lysosomale (Masson et al., 2006) ; d'autres études démontrent une poly-ubiquitination de KIT, conduisant à sa dégradation protéasomale et que l'utilisation d'inhibiteur du protéasome entraîne une diminution de la dégradation de KIT (Zeng et al., 2005). Il semble donc probable qu'il existe un ou des carrefours.

Les SOCS font partie d'un complexe qui peut également avoir une activité ubiquitine-ligase (Piessevaux et al., 2008). Il a été montré que SOCS6 joue un rôle dans la dégradation de KIT (Zadjali et al., 2011).

La protéine chaperonne heat shock protein 90 (hsp90) permet le bon repliement des protéines néo-synthétisées dans les cellules normales, ou des protéines dénaturées dans les cellules qui ont subi un stress. Hsp90 stabilise et limite la dégradation de KIT ; elle joue notamment un rôle important pour les formes oncogéniques de KIT qui sont souvent mal repliées et en conformation instable (Fumo et al., 2004). C'est pourquoi l'utilisation d'un inhibiteur de hsp90 entraîne la dégradation de KIT mutant par le protéasome dans des lignées de tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST), limitant ainsi leur prolifération (Bauer et al., 2006a).

Des travaux récents ont également impliqué l'autophagie dans la dégradation de KIT ; il y est proposé que la dégradation de KIT serait dépendante à la fois du protéasome et de l'autophagie. L'utilisation d'inhibiteurs de l'autophagie réduit la dégradation de KIT, induite par un inhibiteur de hsp90 ou liée à son turn-over naturel (Hsueh et al., 2013a). Cependant, le rôle de l'autophagie dans la dégradation de KIT n'est pas bien défini à l'heure actuelle.

Les RTK sont pour la plupart des proto-oncogènes : dans les conditions physiologiques, ils régulent positivement la croissance cellulaire. Leur dérégulation peut conduire à la transformation cellulaire. Lorsque l'axe KIT/SCF est dérégulé, essentiellement par mutation gain de fonction ou surexpression de KIT et/ou du SCF, cela conduit à une signalisation oncogénique. Ce point va être détaillé dans la partie suivante.

2. Implication de l'axe KIT/SCF en pathologie

Les dérégulations de l'axe SCF/KIT induisent dans la majorité des cas une activation anormale de la signalisation. Ces mécanismes sont souvent engendrés par des mutations activatrices de KIT. Il existe également des cas de surexpression de KIT et/ou du SCF, ce qui conduit à la formation de boucles paracrines ou autocrines.

a) Mutations de KIT

Dans la grande majorité des cas, les mutations qui touchent KIT ont pour effet de l'activer de façon constitutive. Il existe une exception, où la perte de fonction de KIT conduit au piébaldisme, caractérisé par une dépigmentation de la peau.

Le **piébaldisme** est une maladie à transmission autosomique dominante dont 75 % des cas présentent des pertes de fonction de KIT dues à des mutations ou délétions. Elle se caractérise par des taches de dépigmentation sur la peau (front, abdomen et extrémités) et des mèches de cheveux décolorées (figure 11) ; ce sont des lésions qui sont présentes dès la naissance et qui n'évoluent en général pas au cours de la vie (López and Jordá, 2011). Elles sont liées à une absence de mélanocytes dans les zones affectées car KIT est responsable de la migration, prolifération, différenciation et survie des mélanoblastes.



Figure 11 : personne atteinte de piébaldisme présentant une tache de dépigmentation au niveau du crâne.

Le gène c-kit est un proto-oncogène, c'est à dire qu'en condition normale, il régule positivement la croissance cellulaire. Cependant, ce gène peut subir des modifications au sein de sa séquence, notamment des mutations gain de fonction : il devient alors oncogène, ce qui se traduit par une activation constitutive de l'enzyme qui induit une prolifération cellulaire anormale. Il existe plusieurs types de mutants oncogéniques de KIT, se différenciant par le site de mutation et impliquant des mécanismes d'activation du récepteur spécifiques. Les mutations les plus courantes touchent le domaine JM ou la boucle d'activation située dans le 2^e lobe du domaine kinase, mais des mutations du domaine extracellulaire et du site de liaison à l'ATP sont également observées (figure 12).

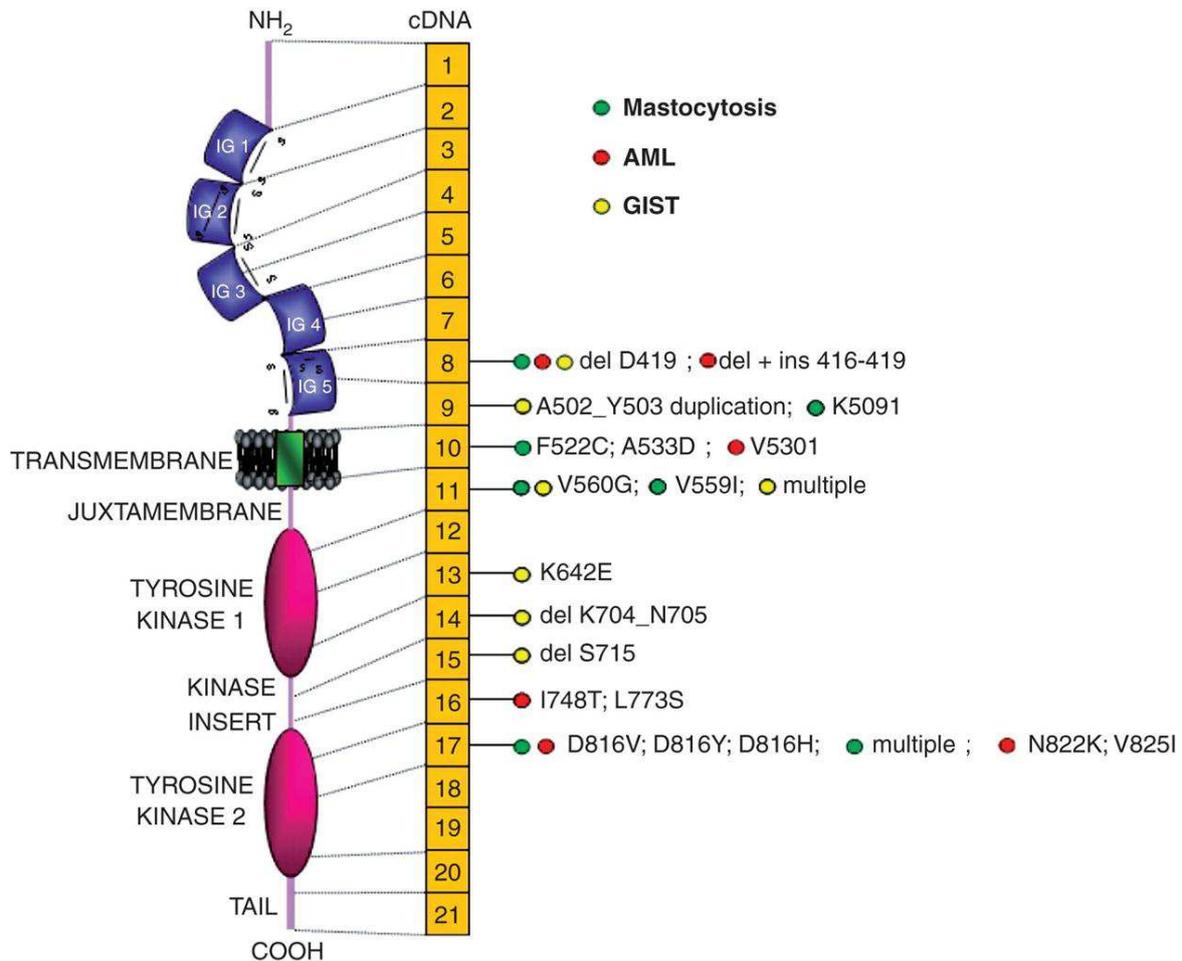


Figure 12 : structure de KIT et ses différentes mutations dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM), GIST et mastocytoses (Ashman and Griffith, 2013a).

A gauche est représentée la structure protéique de KIT et au centre, les exons correspondants aux différents domaines. Les mutations observées dans les mastocytoses (vert), LAM (rouge) et GIST (jaune) sont indiquées à droite.

Mutants du domaine extracellulaire (exons 8 et 9) : ce sont les mutants qui touchent le domaine Ig-like 5, responsable de la répulsion des monomères de KIT en absence de SCF et de la stabilisation des dimères de récepteur. Dans certains cas de GIST, une duplication de 2 AA dans l'exon 9 est observée (figure 12) ; lorsque la séquence de KIT correspondante est transfectée dans des cellules 293T, cela induit la phosphorylation constitutive de KIT (Hirota et al., 2001). Une étude sur les LAM a montré l'implication de délétions dans l'exon 8 du domaine extracellulaire de KIT (Goemans et al., 2005). Une étude française sur un grand nombre de mastocytoses pédiatriques (50 patients) a relevé des mutations au niveau de l'exon 8 (insertion, délétions, substitutions) et de l'exon 9 (substitutions, duplications internes en tandem), induisant toutes une activation du récepteur SCF-indépendante (Bodemer et al., 2009).

Mutants régulateurs du domaine JM (exon 11) : comme décrit précédemment, le domaine JM de KIT inhibe l'activité kinase en maintenant le récepteur en conformation inactive. Les

mutations de l'exon 11, caractéristiques des GIST, entraînent une déstabilisation du domaine JM qui tend vers une conformation plus étendue et ne peut plus exercer son activité régulatrice ; la kinase est alors activée de façon constitutive et SCF-indépendante, bien qu'il reste une faible proportion de kinase en conformation auto-inhibée. On observe différents types de mutations du domaine JM : des duplications en tandem, des délétions, des mutations ponctuelles, ou des combinaisons de ces deux dernières. Ce type de mutants présente la même affinité pour l'ATP que KIT wild type (WT) mais son activation est plus rapide (Chan et al., 2003). De plus, il a été montré que les mutants du JM peuvent avoir une spécificité différente vis-à-vis des substrats et donc une signalisation particulière. Dans la lignée modèle Ba/F3 (lignée pro-B murine), l'introduction d'un mutant du domaine JM – mutant K Δ 27 portant une délétion de 7 AA de 547 à 555 + une substitution G560K – engendre une signalisation particulière : une phosphorylation constitutive d'Akt, STAT1, 3 et 5 mais pas de Erk, alors que KIT WT phosphoryle peu STAT1 et 3 (Casteran et al., 2003). Dans le modèle de FDC-P1 (lignée murine myéloïde issue de moelle osseuse) modifié par infection pour exprimer KIT V560G, on observe une faible phosphorylation de Akt et STAT3 (Frost et al., 2002). De plus, certaines données suggèrent que les mutants oncogéniques de KIT du domaine JM dimérisent en absence de SCF (Kitayama et al., 1995; Tsujimura et al., 1996; Kim et al., 2011). Ces études démontrent que les formes WT et mutante du domaine JM de KIT se comportent différemment, aussi bien en termes d'activation que de signalisation.

Mutants du site de liaison à l'ATP, dits gatekeeper (exons 13 et 14) : ces mutants modifient le site de liaison à l'ATP, ce qui empêche la fixation de certains inhibiteurs de tyrosine kinases (ITK). Leur nom de gatekeeper vient du fait qu'ils contrôlent la susceptibilité des kinases à l'inhibition par des drogues. Les mutations les plus communes pour KIT sont la T670I et la V654A. Ce type de mutation est souvent responsable de la résistance acquise à l'imatinib observée chez les patients atteints de GIST et traités pendant une longue période (Tamborini et al., 2004; Heinrich et al., 2008a). Le pouvoir tumorigène de ces mutants semble être lié à une activation constitutive de la voie des MAPK (Guida et al., 2007).

Mutants catalytiques du 2^e lobe kinase (exons 17 et 18) : on retrouve fréquemment des mutations sur l'exon 17, c'est-à-dire dans le 2^e lobe du domaine kinase (figure 6). Le plus souvent, c'est l'asparagine en position 816 (située dans la boucle catalytique) qui est touchée. Elle peut être mutée en tyrosine, histidine, asparagine ou valine, et cela induit les mêmes conséquences. Ce type de mutant présente une plus grande affinité pour l'ATP et un temps d'induction de l'activation plus court que KIT WT (Lam et al., 1999; Chan et al., 2003). On observe également un profil de phosphorylations et une spécificité de substrats différents de ceux de KIT WT. En fonction des publications, on trouve :

- une forte dégradation de shp1, limitant son effet régulateur sur KIT (Piao et al., 1996)
- une activation constitutive de PI3K et STAT3 mais pas de Erk (Chian et al., 2001; Ning et al., 2001)
- une forte activation d'Akt et faible de Erk et STAT3 (Frost et al., 2002)
- une forte phosphorylation de STAT5 (Baumgartner et al., 2009).

Cette dernière étude met en évidence le rôle central de STAT5 dans le maintien des cellules néoplasiques KIT D816 mutant à l'origine des mastocytoses systémiques.

De nombreuses publications indiquent un rôle important des STAT dans la signalisation oncogénique induite par les mutants du domaine kinase : les membres de cette famille les plus souvent impliqués sont STAT1, 3 et 5 (Yang et al., 2010).

Il a également été montré que le mutant D816V de KIT, impliqué dans les mastocytoses, jouait un rôle protumoral en down-régulant le facteur pro-apoptotique Bim (Aichberger et al., 2009)

Pour les mutants du domaine kinase, les données publiées sont contradictoires en ce qui concerne la dimérisation SCF-indépendante du récepteur : des travaux sur le domaine cytoplasmique de KIT D814V (équivalent murin du mutant D816V humain) exprimé en levure indiquent qu'il est présent sous forme dimérique (Lam et al., 1999). D'autres données obtenues sur les lignées Ba/F3 et factor-dependent cell progenitors (FDC-P1) infectées par des rétrovirus codants pour KIT murin V559G et D814V démontrent une dimérisation du mutant V559G mais pas du D814V (Kitayama et al., 1995). Une étude a montré que, en utilisant une forme tronquée où le domaine de dimérisation était absent, les mutants du domaine kinase de KIT pourraient s'associer entre eux mais de façon différente à la dimérisation classique induite par le SCF (Tsujimura et al., 1999).

Il existe également des rares cas d'amplifications de KIT dans les mélanomes (Curtin et al., 2006).

Ces mutations activatrices de KIT sont à l'origine de nombreuses pathologies tumorales dont les principales sont décrites dans la partie suivante. Il est important de noter que les profils mutationnels sont différents en fonction des pathologies étudiées : les GIST sont très fréquemment la conséquence de mutations de type régulateur, alors que les mutations de type catalytique sont souvent retrouvées dans les mastocytoses par exemple (figure 12).

i. Leucémies

Les leucémies sont un ensemble de pathologies variées liées à une accumulation anormale de cellules hématopoïétiques dans la moelle osseuse ou dans le sang. En 2011, environ 8000 cas de leucémies, tous types confondus, ont été diagnostiqués en France. Les leucémies myéloïdes chroniques (LMC) sont des pathologies à évolution relativement lente par rapport aux LAM. Elles sont liées à la prolifération anormale de granulocytes matures. Les LAM sont des pathologies à évolution rapide dans lesquelles la moelle osseuse et le sang sont envahis par des précurseurs des cellules hématopoïétiques non différenciés, les blastes. L'hématopoïèse normale est alors inhibée. Le myélogramme, qui est l'élément clé du diagnostic, présente des blastes caractéristiques comportant des granulations et parfois des

corps d'Auer, structures allongées et fines provenant de la fusion de plusieurs granulations azurophiles (figure 13).

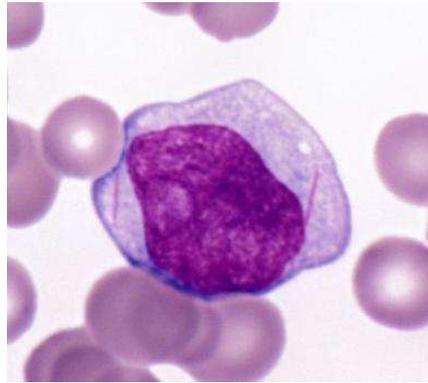


Figure 13 : myélogramme de patient atteint de LAM.

On observe un blaste présentant un corps d'Auer, mis en évidence par coloration de May-Grünwald Giemsa.

Une expression de KIT est observée dans les leucémies myéloïdes – 68 % des LAM et 80 % des LMC – mais rarement dans les leucémies lymphoïdes (Liang, 2013). Cette expression de KIT est d'ailleurs corrélée à un mauvais pronostic (Tsao et al., 2004). Cependant, les mutations de KIT sont des évènements rares dans les LAM, limitées aux LAM à Core Binding Factor (CBF) (17 % des LAM) (Ashman and Griffith, 2013).

La LAM à CBF est la conséquence d'un remaniement chromosomique de type translocation ou inversion : on retrouve la translocation 8-21 (t(8 ;21)) qui entraîne la fusion des gènes acute myeloid leukemia 1 protein (AML1) et eight twenty-one (ETO) ou l'inversion du chromosome 16 inv(16) qui conduit à la protéine de fusion CBF β - myosin, heavy chain 11 (MYH11). Les gènes AML1 et CBF β codent pour un complexe de facteur de transcription qui régule le développement des cellules hématopoïétiques souches (Higuchi et al., 2002). La translocation ou l'inversion qui entraîne l'altération génétique de ces facteurs de transcription associés à la différenciation hématopoïétique constitue le premier évènement génétique, fondamental pour initier la maladie. La mutation activatrice de KIT est un évènement secondaire mais crucial pour le développement de la leucémie car elle induit la prolifération et la survie (Wang et al., 2011b). Trente-sept % des adultes et 19 % des enfants développant une LAM à CBF présentent des mutations de KIT (Ashman and Griffith, 2013). Une étude sur 110 patients a montré que des mutations de l'exon 8 (domaine Ig-like 5) étaient retrouvées dans 24 % des inv(16) et 2 % des t(8 ;21) ; de plus, l'asparagine 816 (exon 17) est mutée dans 8 % des inv(16) et 10 % des t(8 ;21). Bien que les patients atteints de LAM à CBF aient un meilleur pronostic que les autres types de LAM, les patients ayant une inv(16) présentent de plus forts taux de rechute s'ils ont une mutation de l'exon 8 de KIT (Care et al., 2003). De plus, les mutations de l'exon 17 sont généralement associées à un mauvais pronostic (Liang, 2013).

i. GIST

- Pathologie et biologie moléculaire

Les tumeurs stromales gastro-intestinales sont les tumeurs d'origine mésenchymateuse (sarcomes) les plus courantes. Elles restent cependant une maladie rare, puisque leur incidence est d'environ 10 pour un million. Elles proviennent d'une prolifération anormale des cellules interstitielles de Cajal, dont l'activité pacemaker est responsable du péristaltisme du tractus digestif. Les symptômes les plus courants sont une douleur abdominale, des saignements gastro-intestinaux, une grande fatigue, des douleurs lors de la déglutition et une satiété précoce. Les tumeurs vont de quelques millimètres à plus de 40 cm touchant le plus souvent l'estomac (60 %) (figure 14) et l'intestin grêle (30 %) ; on trouve également des cas au niveau de l'œsophage, du rectum et du colon.



Figure 14 : image par endoscopie de tumeur stromale gastrique.

La prolifération incontrôlée des cellules de Cajal est due à une activation constitutive anormale de certains gènes. Les mutations les plus souvent impliquées sont situées sur KIT (75-80 %) ou sur PDGFR α (5-8 %) (mutations mutuellement exclusives) ; dans 15 % des cas, les deux récepteurs ne sont pas mutés et l'on trouve des mutations sur d'autres gènes : BRAF et Ras qui activent la voie des MAPK, les succinate déshydrogénases (SDH) qui font partie du cycle de Krebs et le gène neurofibromatose 1 (NF1) qui code pour une GTPase de la famille de Ras (Corless et al., 2011) (figure 15).

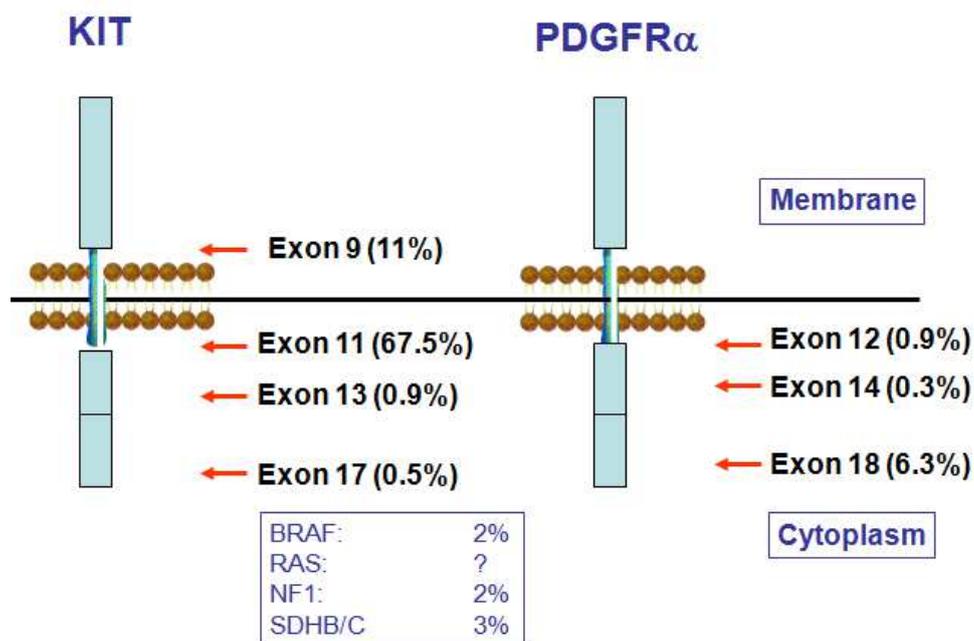


Figure 15 : fréquences des différentes mutations retrouvées dans les GIST. Elles touchent principalement KIT et le PDGFR α mais il en a aussi été observé sur BRAF, Ras, NF1 et SDH (Blay et al., 2012).

Lorsque KIT est muté dans les GIST, c'est le plus souvent l'exon 11 qui est touché, c'est-à-dire celui qui code pour le domaine JM ; rappelons que ce type de mutant est appelé « régulateur » car le domaine JM perd son rôle auto-inhibiteur et la kinase est activée de façon constitutive.

On observe également des mutations dans l'exon 9, c'est-à-dire dans le domaine extracellulaire du récepteur. Les deux autres grands types de mutants, à savoir gatekeeper (exon 13-14) et de la boucle d'activation (exon 17) sont très rarement observés chez les patients atteints de GIST non traités. En revanche, ces 2 types de mutations sont très courants après traitement à l'imatinib ; en effet, ce sont eux qui sont souvent responsables de la résistance acquise à l'imatinib par mutation secondaire de KIT.

- Traitements

Le seul traitement curatif des GIST primaires est la chirurgie ; en revanche, les patients présentant des GIST avancés non opérables ou métastatiques sont traités par l'imatinib. Cet ITK, initialement développé pour inhiber la protéine de fusion Breakpoint cluster region - Abelson (Bcr-Abl) dans les leucémies myéloïdes chroniques, inhibe également KIT et le PDGFR. Ce traitement a permis de faire passer la médiane de survie des patients atteints de GIST de 18 mois à 5 ans (Corless et al., 2011). Les patients les plus répondeurs sont ceux présentant une mutation de l'exon 11, avec 71 % de réponse ; les patients portant une mutation de l'exon répondent dans 38 % des cas et les patients PDGFR et KIT WT dans 28 % des cas (Wang et al., 2011a). Malheureusement, les patients sous traitement finissent

systématiquement par développer une résistance acquise à l'imatinib, due à une mutation secondaire sur les exons 13, 14 ou 17 de KIT. Il est décrit que les patients portant des mutations primaires de l'exon 11 sont plus susceptibles de développer une mutation secondaire que ceux portant une mutation de l'exon 9 (Guo et al., 2007). Le sunitinib est alors utilisé en seconde ligne de traitement, puis le regorafenib (ou Stivarga), molécule très proche du sorafenib, en troisième ligne (approbation par la FDA en février 2013) (Overton and Heinrich, 2014).

ii. Mastocytoses

Les mastocytoses sont un groupe hétérogène de pathologies liées à une prolifération anormale de mastocytes dans un ou plusieurs tissus ou organes (Valent et al., 2001).

- Les mastocytes

Les mastocytes sont des cellules d'origine hématopoïétique qui proviennent des progéniteurs myéloïdes de la moelle osseuse ; ils terminent leur différenciation au niveau de leurs tissus cibles. Ils sont présents à proximité des vaisseaux et des nerfs des tissus conjonctifs en contact avec l'environnement extérieur, notamment dans le derme et les muqueuses des tractus digestif et respiratoire. Les mastocytes induisent des réactions inflammatoires et jouent donc un rôle important dans la défense immunitaire et l'allergie ; en effet, ils contiennent des granules qui stockent de nombreux médiateurs : héparine, tryptase, histamine, sérotonine, prostaglandines, leucotriènes (figure 16).

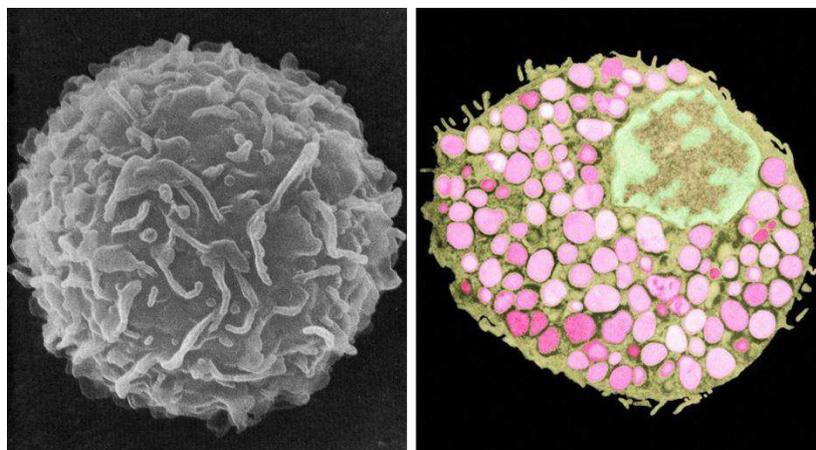


Figure 16 : illustrations de mastocytes.

Gauche, micrographie par microscopie à balayage électronique de la surface d'un mastocyte.

Droite, image de microscopie à transmission électronique sur tissu fixé, granules d'histamine en rose. Diamètre de la cellule : 8,4 μm .

Lorsque les IgE sont produites, elles se fixent aux récepteurs de haute affinité pour le fragment Fc de l'IgE (Fc ϵ RI) présents à la surface du mastocyte ; le mastocyte est alors armé. Lorsqu'un antigène se lie aux IgE spécifiques de celui-ci présentées à sa surface, le mastocyte est activé et relargue le contenu de ses granules par exocytose.

Les leucotriènes, les prostaglandines, l'histamine et la sérotonine entraînent une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité des vaisseaux ; l'héparine quant à elle, a un rôle anticoagulant. Ces mécanismes facilitent l'accès des cellules immunitaires effectrices au site inflammatoire. De plus, les leucotriènes et les prostaglandines sont chimiotactiques pour les neutrophiles et les macrophages qui phagocytent les agents pathogènes.

- Classification des mastocytoses

Les mastocytoses sont des maladies rares, avec une incidence estimée à 1/150000. L'organisation mondiale de la santé (OMS) classe les mastocytoses en 2 grandes catégories : la mastocytose cutanée (MC) et la mastocytose systémique (MS). La MC touche essentiellement les enfants et régressent spontanément à l'adolescence, alors que la MS est plus sévère. Les signes cliniques de la mastocytose sont dus à l'infiltration des mastocytes dans différents organes/tissus ainsi qu'à leur dégranulation (Boissan et al., 2000). Dans tous les types de mastocytoses, les manifestations liées à la libération de médiateurs sont observées : flushs (plaques rouges sur le corps), syncope (liée à une hypotension), troubles gastro-intestinaux (douleurs abdominales, diarrhées, nausées) et parfois manifestations neuropsychiatriques (dépression, changement d'humeur, baisse de la concentration).

La mastocytose cutanée est la plus fréquente (90 % des cas) ; elle est essentiellement retrouvée chez les enfants, chez qui elle touche uniquement la peau (absence d'atteintes systémiques) et disparaît le plus souvent à l'adolescence. Les symptômes sont l'apparition de macules (taches rouges/brunes) (figure 17), un prurit, des douleurs abdominales et osseuses. Il faut cependant noter que la majorité des enfants atteints auront peu de symptômes ou uniquement lors de crises transitoires qui surviennent spontanément ou après un choc. Du fait de la fréquente régression spontanée de cette forme de mastocytose, les patients ne sont généralement pas traités.



Figure 17 : enfant atteint de mastocytose cutanée.
Présence des macules pigmentées au niveau du tronc et des bras.

Il existe 3 sous-types de MC : la forme la plus fréquente est l'urticaria pigmentosa. Il se manifeste par des éruptions généralisées de macules pigmentées souvent localisées au niveau du tronc (Valent et al., 2001). La MC diffuse est une forme très rare et beaucoup plus sévère avec une infiltration des mastocytes dans toute la peau (Lange et al., 2012). Enfin, le mastocytome de la peau est une tumeur bénigne qui résulte d'une hyperplasie des mastocytes dans le derme (Valent et al., 2001).

Le caractère transitoire de la maladie laissait penser qu'elle n'était pas clonale. Mais des données récentes montrent une implication fréquente de mutations de KIT dans cette pathologie. Il a été montré que 86 % des patients portent une mutation de KIT, dont la moitié au niveau du codon 816 et le quart au niveau du 5^e domaine Ig-like (Bodemer et al., 2009). Ceci démontre que les mastocytoses cutanées sont des maladies clonales, c'est-à-dire qu'elles sont issues d'une même cellule souvent KIT mutante.

La régression spontanée fréquente de la MC n'est pas encore bien comprise. Le statut mutationnel de KIT ne suffit pas à expliquer la différence biologique entre la MC et la MS. On peut penser que, malgré que les mutations de KIT soient souvent impliquées dans cette pathologie, elles ne sont peut-être pas suffisantes à son développement ; il peut exister d'autres altérations génétiques qui limiteraient l'addiction des MC à KIT (Valent et al., 2012).

La MS peut être divisée en 4 sous-groupes : la MS indolente (2/3 des MS), la MS associée à une hémopathie maligne (1/4), la MS agressive (5 %) et la leucémie à mastocytes qui reste peu fréquente. Il existe également de très rares cas de sarcomes à mastocytes et de mastocytomes extra-cutanés. En plus des manifestations dues à la dégranulation des mastocytes comme dans la MC, on observe des signes induits par leur infiltration dans les tissus/organes. Dans 70 % des cas, les patients portent une mutation de KIT, presque toujours la D816V.

- La MS indolente est la forme la plus courante. On observe très fréquemment des macules au niveau de la peau, une accumulation modérée des mastocytes et pas d'atteintes aux fonctions des organes, même s'ils sont infiltrés par les mastocytes. Le pronostic des patients est favorable et leur espérance de vie est semblable à celle de la population générale.
- La MS agressive : les organes et tissus infiltrés par les mastocytes sont dans ce cas touchés ; on trouve par exemple des splénomégalies, des hépatomégalies, des atteintes osseuses voire une ostéoporose, un envahissement de la moelle (perturbation de la formule sanguine) ou une malabsorption intestinale. La médiane de survie des patients atteints de MS agressive est d'environ 40 mois.
- La MS peut évoluer et être associée à différentes hémopathies malignes non mastocytaires car les patients sont plus susceptibles d'en développer : lymphome non hodgkinien, syndrome myéloprolifératif, syndrome myélodysplasique, leucémie aiguë myéloïde, syndrome hyperéosinophilique, leucémie chronique myélomonocytaire. La médiane de survie des patients atteints de MS associée à une

hémopathie maligne est de 24 mois mais peut varier en fonction de la pathologie associée.

Le diagnostic de la MS est établi lorsqu'un patient présente le critère majeur et un critère mineur, ou 3 critères mineurs (table 2).

Critère majeur	Critères mineurs
Présence d'infiltrats denses (au moins 15) de mastocytes dans les sections de moelle osseuse. Confirmation par marquage en IHC (tryptase...)	Plus de 25 % des mastocytes sont immatures ou de morphologie atypique dans la moelle osseuse ou autre organe extra-cutané
	Expression aberrante de CD2 et/ou CD25 en plus de KIT par les mastocytes
	Présence de mutation de KIT D816 dans la moelle osseuse, le sang ou autre organe extra-cutané
	Tryptase sérique > 20 ng/mL (13,5 chez l'individu sain)

Table 2 : critères d'évaluation de l'OMS pour la mastocytose systémique.

Le diagnostic de la MS repose sur la présence d'un critère majeur et d'un critère mineur ou de 3 critères mineurs (Gotlib et al., 2013).

- Les MS agressives peuvent évoluer vers une autre catégorie, les leucémies à mastocytes (Valent et al., 2003). Elles se caractérisent par des infiltrats de mastocytes > à 20 % dans la moelle, des mastocytes circulants et des atteintes de plusieurs organes/tissus. La médiane de survie des patients atteints de leucémies à mastocytes est de 2 mois.
- Les cas de sarcomes à mastocytes et mastocytomes extra-cutanés restent très rares.

Les mastocytoses sont des maladies souvent associées à des mutations activatrices de KIT, le plus souvent dans l'exon 17. L'activation constitutive du récepteur conduit à une prolifération anormale des mastocytes qui envahissent alors certains tissus.

- Traitements des MS

Du fait de la grande hétérogénéité des symptômes associés à la MS, il n'existe pas de traitement de référence ; une adaptation thérapeutique est nécessaire à chaque patient.

Tout d'abord, la dégranulation des mastocytes peut être induite par un choc, il est donc essentiel de limiter tous les facteurs pouvant y conduire : l'exercice, l'alcool, le stress, l'aspirine et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), les opiacés, les curares, les hypnotiques et les produits de contraste...

En général, une thérapie visant à inhiber la dégranulation massive ou l'effet des médiateurs libérés par les mastocytes est prescrite :

- Pour limiter le prurit et les flushs : antihistaminiques H1, antagonistes des leucotriènes, anti-inflammatoire non stéroïdien (aspirine), psoralène + ultraviolets (UV)
- Pour cibler les symptômes abdominaux (douleurs, nausées, diarrhées) : antihistaminiques H2, inhibiteur de pompe à protons, cromoglycate de sodium, corticostéroïdes (prednisone)
- Pour limiter les symptômes neurologiques (céphalées, dépression) : antihistaminiques H1 et H2, cromoglycate de sodium
- Pour prendre en charge l'hypotension : adrénaline, anti-histaminiques H1 et H2, corticostéroïdes, cytoréducteur comme l'interféron α (IFN α)
- Pour limiter l'ostéoporose : biphosphonates, IFN α , cladribine (Pardanani, 2013).

Jusque récemment, cette approche ciblant uniquement les symptômes de la maladie était la seule proposée. Depuis quelques années, les patients atteints de MS agressive et de leucémies à mastocytes ont également accès à un traitement cytoréducteur dans le but de contrôler la croissance des cellules néoplasiques :

On trouve notamment l'**IFN α** (souvent IFN α -2B) qui, en plus d'améliorer les symptômes liés à la dégranulation, diminue l'infiltration médullaire. Cependant, il a un effet cytostatique plutôt que cytolytique, une rechute étant donc souvent observée. Il est fréquemment administré en parallèle à la prednisone qui améliore son efficacité et limite les phénomènes d'intolérance. La **cladribine** est également utilisée ; c'est un analogue purique qui inhibe la synthèse d'acide désoxyribonucléique (ADN). Elle améliore les symptômes, mais a peu d'effet sur l'infiltration médullaire et de nombreuses rechutes surviennent à la fin du traitement (Georgin-Lavialle et al., 2009).

En plus de ces traitements systémiques, de plus en plus d'études se tournent vers les ITK. La Food and Drug Administration (FDA) a autorisé en 2006 l'utilisation de l'imatinib chez les patients atteints de MS agressive sans mutation D816V ou au statut mutationnel de KIT inconnu. De plus, de nombreux essais cliniques de phase II ont été réalisés avec d'autres ITK ciblant KIT : dasatinib, nilotinib, PKC412 (midostaurine), masatinib (Shah et al., 2006; Moura et al., 2011) ... Le dasatinib et le PKC412 présentent l'avantage d'être actifs sur le mutant D816V. Cependant, les résultats de ces études montrent peu d'amélioration en termes de réponse complète chez les patients présentant la mutation D816V ; huit patients présentant la mutation D816V sur 33 ont démontré une amélioration des symptômes mais pas du nombre de mastocytes dans la moelle. La majorité des effets secondaires observés sont de grade 1 ou 2 (sur une échelle de 1 à 4) comprenant des difficultés respiratoires, des nausées, des maux de tête et plusieurs cas d'épanchement pleural de grade 3 (Verstovsek, 2013).

i. Mélanomes

L'incidence du mélanome a considérablement augmenté ces 50 dernières années. Les altérations génétiques associées sont étudiées depuis de nombreuses années : les gènes souvent impliqués sont BRAF, NRAS, ainsi que les gènes codant pour différentes protéines impliquées dans le cycle cellulaire comme CCND1 (codant pour la cycline D1), CDKN2A (codant pour l'inhibiteur de la kinase cycline-dépendante 2A) ou encore CDK4 (codant pour la kinase cycline-dépendante 4). On retrouve des mutations de BRAF dans 60 % des mélanomes de la peau sans signe d'exposition chronique au soleil (non-CDS) et de NRAS dans 10 à 20 % des mélanomes (Curtin et al., 2006). De par son rôle dans le développement des mélanocytes, KIT est de plus en plus décrit comme impliqué dans certains types de mélanomes depuis quelques années (Beadling et al., 2008). En effet, les mélanomes de type acral, muqueux ou induit par l'exposition au soleil (CSD) présentent fréquemment des mutations ou des amplifications de KIT (figure 18) : on observe des amplifications de KIT dans 30 % des mélanomes ainsi que des mutations activatrices dans les exons 11, 13, 17 et 18 (Liu and Colegio, 2013). Cependant, le rôle oncogénique de KIT dans les mélanomes ne semble pas toujours clair car il a également été montré que la perte de son expression était associée à la progression de certaines formes de mélanome (Lennartsson et al., 2005).

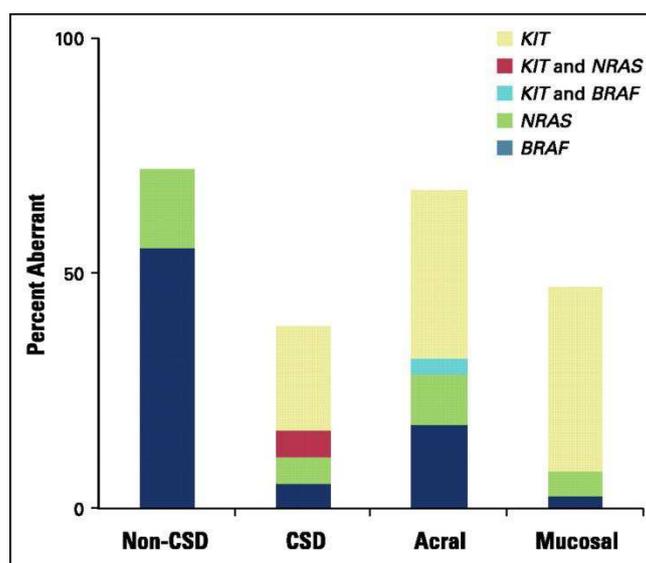


Figure 18 : fréquence des altérations génétiques observées dans les mélanomes. CSD=chronic sun-induced damage (Curtin et al., 2006).

Lorsque le mélanome est localisé, le traitement consiste en une résection chirurgicale. En revanche, dans les cas plus étendus ou en présence de métastases, les traitements de référence sont l'interleukine 2, l'IFN α et la dacarbazine qui est un agent cytostatique inhibant la synthèse de l'ADN. Ces 3 dernières années, d'autres thérapies plus ciblées ont été utilisées en clinique, ciblant les cellules cancéreuses avec des inhibiteurs de BRAF comme le vemurafenib (McArthur et al., 2014) et le dabrafenib (Ascierto et al., 2013), ou des inhibiteurs de MEK comme le trametinib (Alluri and Jimeno, 2013). D'autres stratégies

ciblent les points de contrôle immuns : un anticorps anti-cytotoxique T-lymphocyte antigène 4 (CTLA4) (ipilimumab) (Prieto et al., 2012). Cependant, les effets de ces traitements sont assez limités et tous les patients ne sont pas éligibles.

De par l'implication de KIT dans les mélanomes acraux, muqueux et CSD (amplifications ou mutations de KIT dans 30 % des cas), des essais cliniques de thérapies ciblant KIT ont été mis en place récemment : on peut citer notamment l'imatinib (Guo et al., 2011), le dasatinib (Kluger et al., 2011) et le nilotinib (Cho et al., 2012), mais les résultats de ces études sont assez mitigés. Cependant, une sélection des patients basée sur leur statut mutationnel de KIT permet d'obtenir de meilleurs résultats (Carvajal RD et al., 2011). En effet, tous les types de mutations de KIT ne présentent pas la même sensibilité aux différents ITK (cf II.1.inhibiteurs de tyrosine kinases).

ii. Tumeurs des cellules germinales

Ce sont des tumeurs qui dérivent des cellules germinales, comprenant entre autres les dysgerminomes chez la femme et les séminomes chez l'homme, et qui expriment presque toujours KIT (Hoei-Hansen et al., 2007). Au vu du rôle de KIT dans la prolifération et la migration des progéniteurs des cellules germinales, de plus en plus d'études s'intéressent à son implication dans les tumeurs des cellules germinales. KIT présente des mutations dans 10 à 25 % des séminomes en fonction des études, souvent au niveau de l'exon 17, ainsi que des duplications du gène c-kit dans 20 % des cas (Kemmer et al., 2004; McIntyre et al., 2005b). Les séminomes sont des pathologies présentant un bon pronostic avec des taux élevés de guérison, pour lesquelles la résection chirurgicale est le traitement principal. Chez les patients métastatiques, une chimiothérapie composée de bléomycine, etoposide et cisplatine est prescrite (Oldenburg et al., 2013). Les dysgerminomes quant à eux répondent bien à la chimiothérapie et la radiothérapie et sont de bon pronostic (Sever et al., 2005).

b) Cas de boucles para/autocrines : surexpression aberrante

i. Cancer du poumon à petites cellules

C'est une tumeur agressive de mauvais pronostic qui correspond à 20 % des cancers du poumon. Ce cancer répond à la chimiothérapie et radiothérapie, mais récidive systématiquement, la médiane de survie étant alors de 6 mois. KIT est souvent exprimé par les cancers du poumon à petites cellules (SCLC) (40 à 80 % en fonction des études) et est un facteur de mauvais pronostic. Il semble être impliqué dans leur prolifération par plusieurs mécanismes : il existe des boucles auto ou paracrines SCF/KIT dans environ 50 % des cas, ainsi que des mutations des exons 9 et 11 qui sont plus rarement observées (8 % des cas) (Hibi et al., 1991; Boldrini et al., 2004).

Plusieurs essais cliniques de phase II évaluant l'effet de l'imatinib ont été menés sur des patients atteints de SCLC et exprimant KIT ; cependant, l'imatinib ne présente pas d'activité

clinique au sein de ces études (Dy et al., 2005). L'absence de réponse au traitement est sans doute due au fait que les tumeurs SCLC ne dépendent pas de KIT pour leur croissance.

ii. Neuroblastome

Le neuroblastome est une tumeur pédiatrique qui dérive des crêtes neurales, d'où proviennent les mélanocytes. Au moment du diagnostic, 50 % des sujets ont déjà développé des métastases et ont un taux de survie à 5 ans de 30 %. On y observe souvent une boucle autocrine SCF/KIT qui semble essentielle à la prolifération de la tumeur (Cohen et al., 1994). L'imatinib inhibe la croissance des cellules de neuroblastome *in vitro* et *in vivo* en inhibant la phosphorylation de KIT et du PDGFR (Beppu et al., 2004). Un essai de phase II a montré des résultats encourageants et une bonne tolérance de l'imatinib dans le neuroblastome (Calafiore et al., 2013).

De plus, une surexpression de KIT et/ou la formation d'une boucle autocrine avec le SCF ont été rapportées dans différents types de cancers : ovaire, sein, colorectal, sarcome d'Ewing (Bellone et al., 1997; González et al., 2004; Tsuda et al., 2005; Chau et al., 2012).

3. Conclusion

L'axe SCF/KIT est une voie majeure du développement embryonnaire et continue à jouer un rôle à l'âge adulte dans les précurseurs hématopoïétiques et certains lignages cellulaires différenciés comme les mastocytes, les mélanocytes et les ICC. L'activation de KIT conduit à la prolifération et la survie cellulaire, notamment par les voies de signalisation MAPK et PI3K. De par son action proliférative et son rôle dans le maintien du statut indifférencié de certaines cellules, il est largement impliqué dans le processus cancéreux, avec un rôle de driver dans certains cancers comme les GIST. De très nombreuses altérations génétiques touchant KIT ont été décrites, le rendant pour la plupart constitutivement actif. Il existe également des boucles auto ou paracrines SCF/KIT qui conduisent à une tumorigenèse. C'est pourquoi il représente une cible pertinente en oncologie.

II. THERAPIES CIBLES EN ONCOLOGIE

Le cancer est fréquemment causé par des mutations génétiques qui engendrent des anomalies qualitatives ou quantitatives dans la synthèse des protéines codées par ces gènes. De larges efforts en matière de compréhension moléculaire des mécanismes oncogéniques initiés par ces anomalies ont été réalisés ces dernières années ; cela a permis de développer de nouvelles stratégies de thérapie ciblant les mécanismes à l'origine de la tumeur. Il apparaît de plus en plus clairement que la classification classique des cancers en fonction de leur tissu d'origine ne présente qu'une utilité limitée en termes de prise en charge thérapeutique. Aujourd'hui, l'amélioration du diagnostic permet un raffinement de la classification des cancers et donc une prise en charge plus adaptée à chaque patient.

La chimiothérapie classique est un traitement systémique largement utilisé en oncologie ; elle cible les cellules en division, affectant ainsi non seulement les cellules tumorales, mais aussi les cellules saines en prolifération (lignées hématopoïétiques, cellules des muqueuses buccale et intestinale). Les principaux modes d'action des chimiothérapies sont le ciblage :

- De l'ADN : inhibition de la réplication, de la transcription, (agents alkylants, dérivés du platine), inhibition des topoisomérases qui régulent la structure de l'ADN.
- Des métabolites : inhibition de la synthèse de bases ou compétition avec les bases, ce qui empêche la synthèse de l'ADN.
- Des microtubules : inhibition des fuseaux mitotiques (taxanes, alcaloïdes).

Ce type de thérapie présente donc l'inconvénient d'engendrer de nombreux effets secondaires tels qu'une modification de la formule sanguine, des vomissements, la chute de cheveux et une grande fatigue.

Ce chapitre est consacré aux principaux types de thérapie ciblée utilisés en oncologie. Une meilleure connaissance de la biologie de la tumeur a permis l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et le développement de thérapies ciblées. A la différence des chimiothérapies classiques, qui inhibent des processus biologiques ubiquitaires, les thérapies ciblées visent spécifiquement une protéine ou un mécanisme impliqué dans le développement de la tumeur. Cela nécessite la sélection appropriée des patients qui expriment la cible afin qu'ils tirent bénéfice de ces traitements ; c'est ce qu'on appelle la médecine personnalisée. Les principaux outils de thérapie ciblée disponibles à ce jour sont les molécules pharmacologiques de synthèse et les molécules biologiques que sont les anticorps. Nous développerons plus particulièrement les exemples ciblant le récepteur KIT lorsque c'est possible.

1. Inhibiteurs de tyrosine kinase

Ces dernières années, les tyrosine et sérine/thréonine kinases ont émergé comme une des cibles principales en oncologie de par leur forte implication dans la signalisation oncogénique. Les inhibiteurs de kinases, dont beaucoup sont des ITK, présentent l'avantage de cibler un groupe restreint de quelques protéines, ce qui limite les lourds effets secondaires observés avec les traitements systémiques que sont les chimiothérapies classiques. De plus, ces inhibiteurs sont administrés par voie orale, ce qui représente un certain confort pour les patients comparé aux traitements par anticorps monoclonal ou certaines chimiothérapies.

Le premier ITK à avoir été développé en 1996 est l'imatinib ciblant la tyrosine kinase Bcr-Abl (Buchdunger et al., 1996). Il a été mis sur le marché en 2001 pour le traitement des leucémies myéloïdes chroniques. Il a par la suite permis d'améliorer nettement la prise en charge des GIST dans lesquels il cible KIT et le PDGFR α . Depuis, de nombreux autres ITK ont été développés et constituent des outils de thérapie ciblée très efficaces en oncologie. On assiste ces dernières années à un développement rapide de ces molécules : en 2008, seulement 8 ITK étaient approuvés par la FDA ; il y en avait 15 en 2013 et 23 à ce jour (bosutinib, vandetanib, cabozantinib, imatinib, afatinib, ponatinib, ibrutinib, axitinib, gefitinib, ruxolitinib, trametinib, sorafenib, dasatinib, regorafenib, sunitinib, dabrafenib, erlotinib, nilotinib, lapatinib, pazopanib, crizotinib, tofacitinib et vemurafenib).

On peut classer les ITK en 5 catégories en fonction de leur site de liaison et de leur mécanisme d'action.

a) Type I

Les ITK de type I reconnaissent la kinase en conformation active et se fixent au site de liaison de l'ATP (figure 19). Ils miment le noyau adénine de l'ATP et forment une à 3 liaisons hydrogène avec la kinase, similaires à celles formées avec l'ATP ; ils entrent donc en compétition avec celui-ci (Gotink and Verheul, 2010). Cependant, le site de liaison à l'ATP est très similaire d'une kinase à l'autre (Liu and Gray, 2006) ; ce type d'inhibiteur présente donc l'inconvénient d'être assez peu spécifique. Cette faible sélectivité entraîne des effets secondaires, notamment au niveau cardiaque. Toutefois, dans certaines pathologies, il peut être utile de cibler plusieurs oncogènes à la fois, c'est pourquoi ces inhibiteurs moins spécifiques peuvent s'avérer être des outils thérapeutiques intéressants. A ce jour, la FDA a autorisé l'utilisation de 12 ITK de type I : gefitinib, erlotinib, dasatinib, sunitinib, pazopanib, vemurafenib, ruxolitinib, crizotinib, bosutinib, axitinib, dabrafenib et tofacitinib.

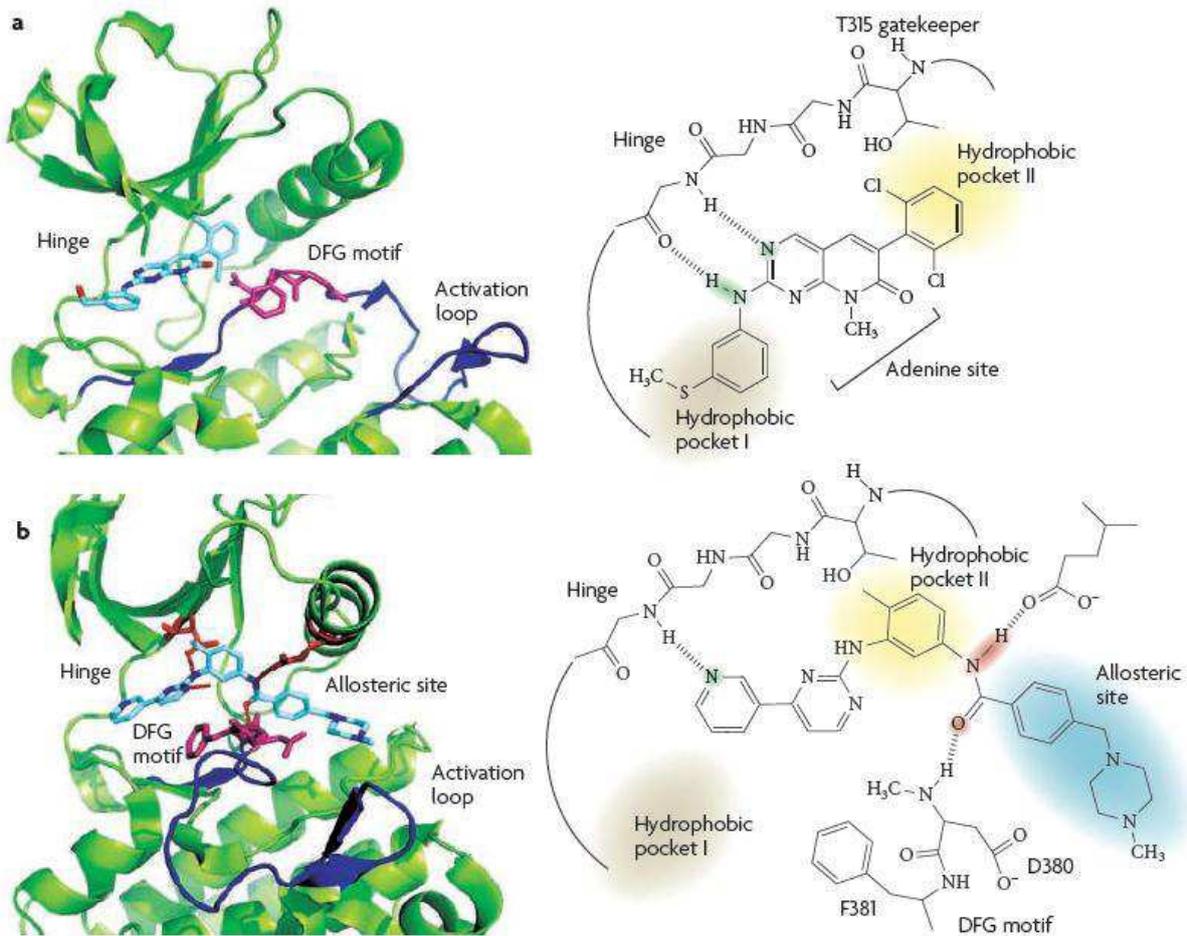
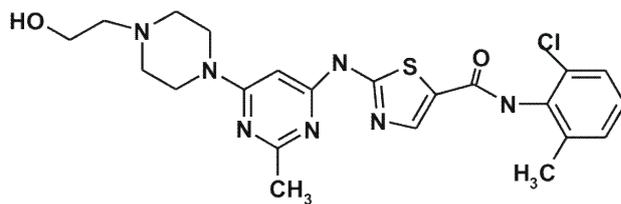


Figure 19 : comparaison du mode de liaison des ITK de type I et II.

a) ITK de type I (PD166326) dans la conformation active de l'enzyme. b) ITK de type II (imatinib) dans la conformation inactive de l'enzyme. ITK en bleu clair, motif DFG en rose. Site allostérique = poche hydrophobe adjacente au site de liaison à l'ATP utilisée par les ITK de type II (Liu and Gray, 2006).

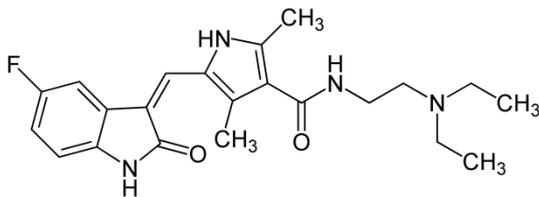
Dasatinib (Sprycel)



Le dasatinib est un inhibiteur de Bcr-Abl de deuxième génération, développé pour contrer les résistances à l'imatinib de Bcr-Abl. Cet inhibiteur présente un spectre d'action assez large : il inhibe également les SFK, ephrin type-A receptor 2 (EPHA2), le PDGFR et KIT. Il a été approuvé par la FDA pour le traitement des LMC résistantes ou intolérantes à l'imatinib et a permis d'obtenir de très bons taux de réponse, indépendamment du statut mutationnel de Bcr-Abl (Müller et al., 2009).

Il permet de cibler les mutants de KIT de la boucle d'activation (exon 17) qui favorisent la conformation active de l'enzyme, par exemple le mutant D816V de KIT, résistant à la plupart des ITK (voir table 4 en fin de chapitre). De par son activité sur les mutants du domaine kinase, le dasatinib a suscité de grand espoirs pour cibler KIT D816V (exon 17) dans les MS ; malheureusement, les études menées ont donné des résultats assez décevants, probablement liés à une faible concentration plasmatique de la molécule dans le plasma des patients, et une toxicité assez importante (Verstovsek et al., 2008; Pardanani, 2013). Des essais de phase II sont en cours dans les GIST.

Sunitinib (Sutent)



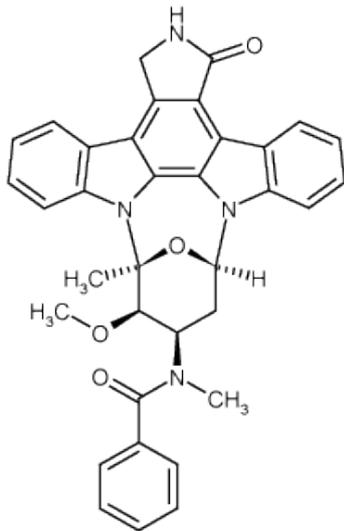
Cette molécule est utilisée en 2e ligne dans les GIST résistants ou intolérants à l'imatinib depuis 2006 pour cibler KIT et le PDGFR α . Le sunitinib est actif sur les mutants du domaine JM ainsi que sur certaines mutations secondaires induisant une résistance à l'imatinib, notamment les mutants du site de liaison à l'ATP V654A et T670I (mutations gatekeeper du domaine de liaison à l'ATP, résistantes à l'imatinib) (Prenen et al., 2006). En revanche, tout comme l'imatinib, il est inefficace sur les mutants de la boucle d'activation comme le D816V (exon 17).

Les mutations primaires retrouvées chez les patients atteints de GIST touchent les exons 11 ou 9 dans 90 % des cas mais peu affectent les exons 13-14 (mutants gatekeeper du domaine de fixation de l'ATP) ou 17 (boucle d'activation). Les patients sont traités à l'imatinib mais développent souvent une résistance acquise par mutations secondaires des exons 13-14 ou 17 de KIT. Le sunitinib est alors prescrit en seconde ligne dans les GIST devenus résistants à l'imatinib. Cependant, étant donné son inefficacité sur les mutants gatekeeper (exon 13-14) et de la boucle d'activation (exon 17), il serait sans doute intéressant de sélectionner uniquement les patients portant une mutation sensible au sunitinib et proposer une autre option thérapeutique à ceux qui lui sont résistants (Hsueh et al., 2013b) (voir table 4 en fin de chapitre). Le sunitinib est également approuvé dans le traitement des carcinomes rénaux et des tumeurs neuroendocrines du pancréas.

Le sunitinib est souvent décrit comme un inhibiteur de type I, compétiteur de l'ATP ; cependant, certains travaux ont montré une préférence de liaison à la conformation inactive de KIT, mais toujours au niveau du site de liaison de l'ATP ; il fixe l'enzyme en conformation inactive, empêchant les changements de conformation conduisant à l'activation de l'enzyme (Gajiwala et al., 2009).

Le sunitinib, en plus de cibler KIT, inhibe le vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR), le PDGFR, Ret (impliqué dans les cancers de la thyroïde) et FLT3 (impliqué dans les LAM). Grâce à son action sur le VEGFR et le PDGFR, qui jouent un rôle essentiel dans l'angiogenèse et la croissance tumorale (Kerbel and Folkman, 2002), il possède une forte activité anti-angiogénique qui peut constituer un outil efficace pour augmenter les effets antitumoraux (Morabito et al., 2006).

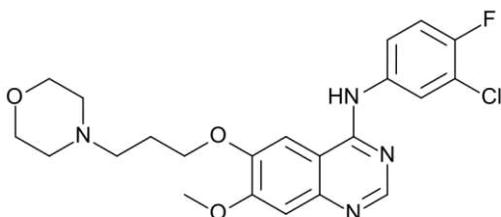
PKC412 (Midostaurine)



Le PKC412 est un dérivé de la staurosporine initialement développé pour inhiber la sérine/thréonine kinase PKC, mais il cible également le PDGFR, KIT et FLT3. Il a d'ailleurs été l'objet de nombreux essais cliniques dans les LAM portant une mutation de FLT3. Cette molécule se fixe dans la poche de liaison à l'ATP et inhibe de nombreux mutants de KIT, notamment D816V, T670I et V654A (Debiec-Rychter et al., 2005). L'efficacité du PKC412 a été testée dans deux essais cliniques sur la mastocytose. De plus, un patient atteint de leucémie à mastocytes a été traité au PKC412 : une amélioration de différents symptômes a été observée (Gotlib et al., 2005).

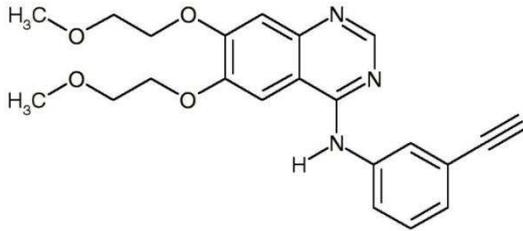
Malgré tout, le PKC412 n'est pour l'instant autorisé dans aucune pathologie, à cause d'une toxicité liée à son spectre d'action trop large.

Gefitinib (Iressa)



Le gefitinib est un inhibiteur du récepteur à l'endothelial growth factor (EGFR) qui est prescrit dans les formes localement avancées ou métastatiques de cancer bronchique non à petites cellules avec mutation d'EGFR. Il est utilisé en première intention ou après une chimiothérapie classique. Son utilisation permet d'obtenir une survie sans progression à un an chez 25 % des patients au lieu de 7 % chez les patients traités avec la chimiothérapie standard (combinaison carboplatine et paclitaxel) (Mok et al., 2009).

Erlotinib (Tarceva)



L'erlotinib est également un inhibiteur d'EGFR prescrit dans les formes localement avancées ou métastatiques de cancer bronchique non à petites cellules avec mutation d'EGFR. Une étude de phase III a montré que les patients traités à l'erlotinib avaient une survie sans progression de 13 mois au lieu de 5 pour les patients traités à la gemcitabine et carboplatine (Zhou et al., 2011).

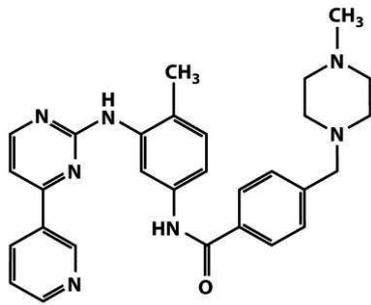
De plus, il est utilisé en association avec la gemcitabine pour traiter le cancer du pancréas métastatique.

b) Type II

Les ITK de type II se lient au site de liaison de l'ATP ainsi qu'à la poche hydrophobe adjacente. Ils entrent donc en compétition avec l'ATP de façon plus indirecte que les ITK de type I. Cette poche est formée par le déplacement du motif DFG situé à la base de la boucle d'activation (figure 19). Une fois fixés, ils empêchent les modifications de conformation qui activent la kinase. Ils sont plus spécifiques que les ITK de type I car ils se lient aux résidus de la poche hydrophobe qui sont moins conservés que ceux du site de liaison à l'ATP. Ces interactions hydrophobes ne peuvent pas avoir lieu lorsque la kinase est activée et phosphorylée. Ils fixent donc la conformation inactive de la kinase.

Les ITK de type II approuvés par la FDA sont l'imatinib, le sorafenib, le nilotinib, le regorafenib, le lapatinib, le cabozantinib et le ponatinib.

Imatinib (Glivec)



Initialement appelé CGP 57148 lors de sa découverte par Ciba Pharmaceuticals (qui a ensuite fusionné avec d'autres entreprises pour devenir Novartis), l'imatinib a d'abord été développé pour inhiber la protéine de fusion Bcr-Abl ; cette fusion est la conséquence de la translocation chromosomique (9 ; 22) et est responsable des leucémies myéloïdes chroniques (présente dans 95 % des cas). L'imatinib a été testé la première fois sur des patients en juin 1998 et a été approuvé par la FDA et en Europe en 2001 pour le traitement des leucémies myéloïdes chroniques (Arnold, 2001). Cette nouvelle thérapie a permis de révolutionner la prise en charge de cette pathologie sur laquelle la thérapie classique (IFN + cytarabine) n'avait peu d'effet (figure 20).

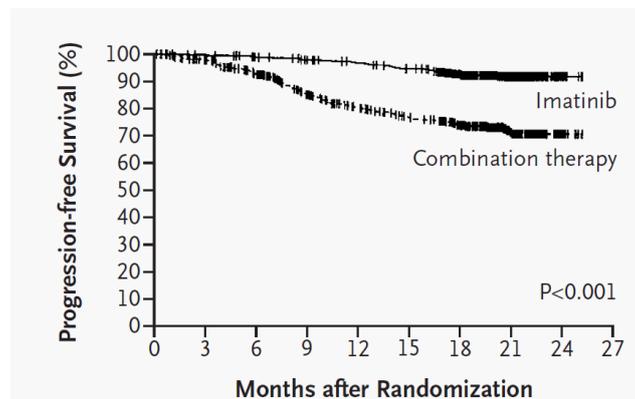


Figure 20 : essai de phase III comparant la thérapie classique (IFN et cytarabine) à l'imatinib dans la leucémie myéloïde chronique (O'Brien et al., 2003).

Il a par la suite été montré que l'imatinib inhibait également KIT et le PDGFR, il a donc été autorisé pour la prise en charge des GIST non opérables et/ou métastatiques par la FDA en 2002. Il a permis d'améliorer nettement le traitement de cette pathologie dont la médiane de survie est passée de 20 à 50 mois (Demetri et al., 2002; Cohen et al., 2009) (figure 21).

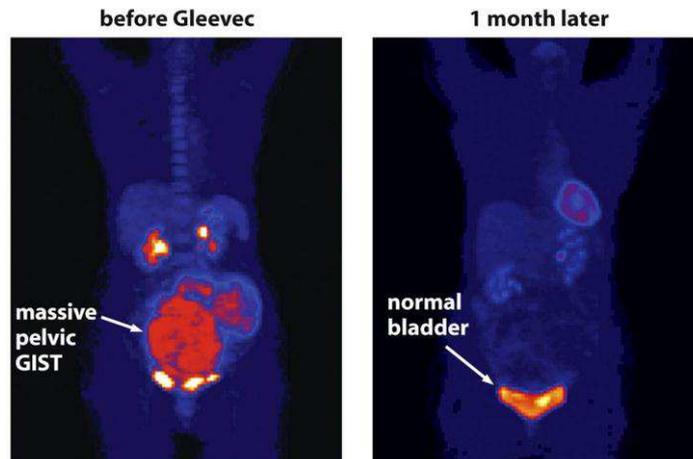


Figure 21 : patient atteint de GIST avant et après un mois de traitement à l'imatinib.

Cependant, l'imatinib n'est actif que sur les mutants de KIT de type régulateur (figure 22). C'est pourquoi les patients présentant une mutation dans d'autres exons (9, 17...) sont résistants au traitement (environ 15 % des patients) (Gajiwala et al., 2009). La mutation D816V située dans la boucle d'activation (exon 17) favorise fortement la conformation active de l'enzyme à laquelle l'imatinib ne peut se lier. La réponse à l'imatinib des mutants de l'exon 9 (domaine Ig-like 5) peut être améliorée si l'on augmente la dose (800 au lieu de 400 mg/jour). Ces mutants semblent mimer la fixation du SCF et induire l'adoption d'une conformation active du domaine kinase. Ce mécanisme d'activation étant plus en amont que celui des mutants du domaine JM, explique peut-être pourquoi ils sont moins sensibles à l'imatinib que ces derniers (Ashman and Griffith, 2013).

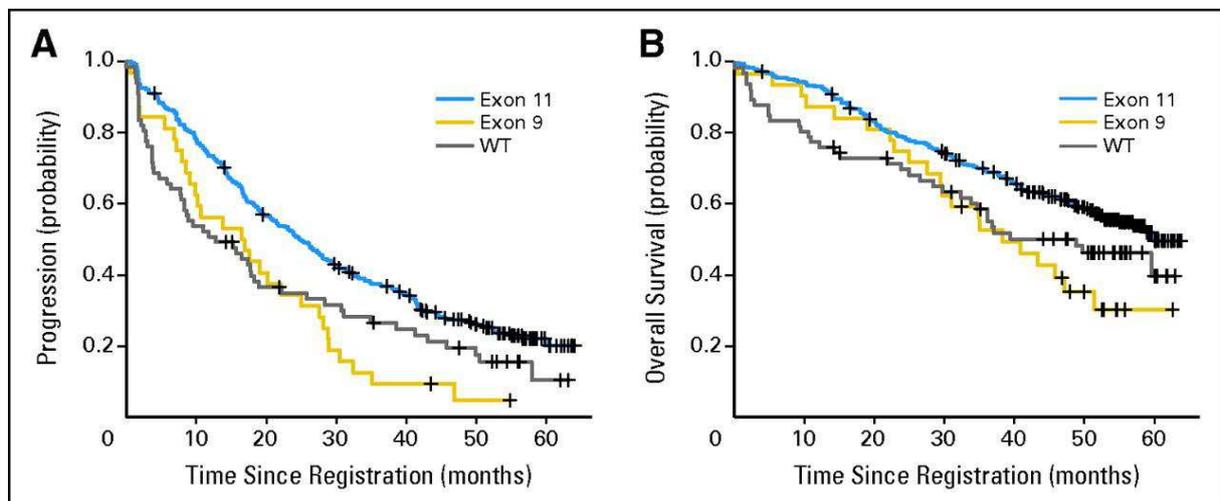


Figure 22 : courbe de progression et de survie chez des patients traités à l'imatinib en fonction de leur statut mutationnel initial.

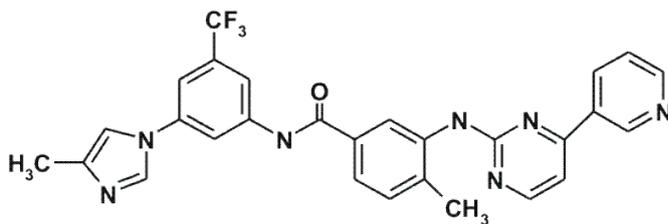
L'exon 11 code pour le domaine JM et l'exon 9 pour le 5^e domaine Ig-like extracellulaire (Heinrich et al., 2008b).

De plus, les patients sous traitement développent presque systématiquement une résistance acquise due à une mutation secondaire de KIT. Environ 50 % des patients rechutent au bout

de 2 ans de traitement à l'imatinib et l'on retrouve essentiellement des mutations gatekeeper et de la boucle d'activation. Les mutants gatekeeper de type V654A et T670I (exons 13-14) sont également résistants à l'imatinib. Dans le mutant V654A, il y a une perte d'une interaction hydrophobe clé avec l'imatinib qui le rend inefficace (DiNitto and Wu, 2011). Les mutants de la boucle d'activation déstabilisent la kinase en faveur de sa conformation active ; ils sont donc également résistants à l'imatinib qui ne se fixe qu'à la conformation inactive de l'enzyme (voir table 4 en fin de chapitre).

L'imatinib est un traitement relativement bien toléré, avec peu d'effets secondaires sévères (peu de grade 3 ou 4). La majorité des effets secondaires observés lors des traitements à l'imatinib sont le plus souvent des éruptions cutanées, des douleurs abdominales, des œdèmes et des nausées (DeMatteo et al., 2009). On peut également observer une faible toxicité cardiaque ainsi qu'une myélosuppression mais elle est généralement moins importante qu'avec le dasatinib ou le nilotinib (Giles et al., 2009).

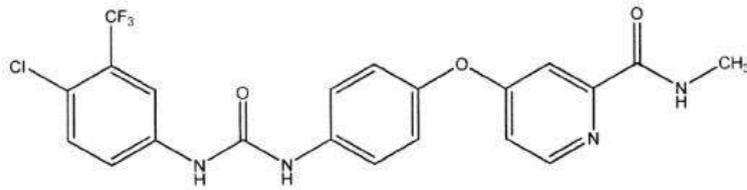
Nilotinib (Tasigna)



Cette molécule inhibe l'activité de Bcr-Abl et est utilisée en 2^e ligne pour traiter les LMC après échec ou intolérance à l'imatinib, tout comme le dasatinib. Les deux drogues présentent à peu près la même efficacité, bien qu'aucune étude comparative stricte n'ait été réalisée à ce jour. Cependant, le dasatinib entraîne plus souvent des myélosuppressions ainsi que des atteintes pulmonaires et cardiaques. Le nilotinib peut entraîner une pancréatite ou une toxicité hépatique, mais il semble toutefois être généralement mieux toléré (Agrawal et al., 2010). Le nilotinib inhibe également le PDGFR et KIT, notamment les mutants du domaine JM et le mutant gatekeeper V654A, mais il n'est pas actif sur le mutant gatekeeper T670I de KIT. L'activité du nilotinib sur les mutants du domaine kinase n'est pas clairement définie ; certains travaux démontrent une résistance du mutant 816 au nilotinib (Roberts et al., 2007) alors que d'autres études démontrent le contraire (von Bubnoff et al., 2005; Gleixner et al., 2006) (voir table 4 en fin de chapitre).

Un essai de phase II sur les GIST résistants à l'imatinib et au sunitinib a montré la stabilisation de la maladie par le nilotinib dans 20 % des cas (Gramza et al., 2009). De nombreux autres essais sont en cours, notamment dans les GIST et les mélanomes exprimant KIT.

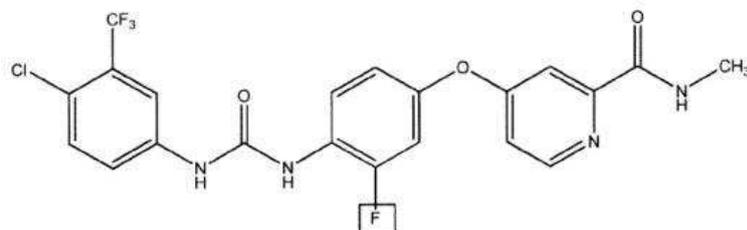
Sorafenib (Nexavar)



Le sorafenib est utilisé dans le traitement des carcinomes hépatocellulaires et rénaux et vient d'être autorisé pour la prise en charge du cancer de la thyroïde métastatique aux Etats-Unis. Cet inhibiteur cible Raf, le PDGFR, KIT, VEGFR et FLT3. Les mutants gatekeeper V564A et T670I de KIT, qui sont résistants à de nombreux ITK, sont inhibés par le sorafenib, bien qu'il ait une activité un peu moins importante sur ceux-ci que le sunitinib (Guo et al., 2007). Il a également été montré comme actif sur les mutants de la boucle d'activation (exon 17), sauf ceux du codon 816 (Heinrich et al., 2012) (voir table 4 en fin de chapitre).

Dans un essai de phase II incluant des GIST résistants à l'imatinib et/ou au sunitinib, 76 % des patients traités au sorafenib présentent une rémission partielle ou une pathologie stabilisée. De plus, lorsque le sorafenib est utilisé en 4^e ligne après imatinib, sunitinib et nilotinib, 44 % des patients présentent une stabilisation de la maladie (Gramza et al., 2009).

Regorafenib (Stivarga)

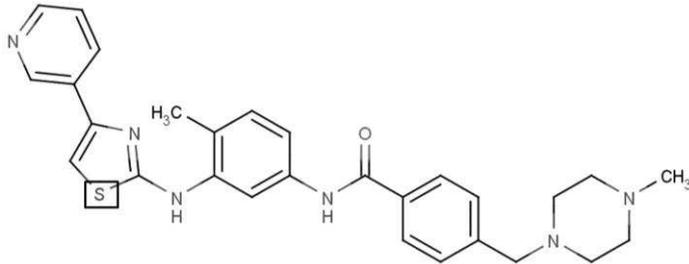


C'est une molécule très proche du sorafenib (= fluoro-sorafenib). Les kinases ciblées par le regorafenib sont nombreuses : VEGFR, PDGFR, KIT, RET, Raf, p38, tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains (TIE-2) et le récepteur au fibroblast growth factor (FGFR) à des concentrations un peu plus fortes que le sorafenib. Il a donc un fort effet anti-angiogénique, tout comme le sorafenib (Wilhelm et al., 2011). Peu de données sont à ce jour disponibles sur le spectre plus détaillé du regorafenib sur les mutants de KIT, mais il semble être similaire à celui du sorafenib (voir table 4 en fin de chapitre).

Cette molécule est utilisée dans le traitement du cancer colorectal métastatique qui ne répond plus au traitement standard, à savoir oxaliplatine, fluoropyrimidine, irinotecan et un anticorps anti-EGFR si KRAS n'est pas muté. Il permet d'améliorer la survie sans progression des patients (Grothey et al., 2013).

De plus, le regorafenib est prescrit en 3^e ligne dans les GIST ne répondant plus à l'imatinib et au sunitinib aux Etats-Unis.

Masatinib (Masivet)



C'est une molécule très proche de l'imatinib, se différenciant juste par un atome de soufre à la place d'un azote. Cet ITK cible KIT, le PDGFR, le FGFR, Lck et Lyn. Des résultats *in vitro* ont montré qu'il était actif sur les mutants de KIT du domaine JM mais pas de la boucle d'activation (Dubreuil et al., 2009). Il n'est pas encore autorisé pour les thérapies chez l'Homme, cependant il est utilisé pour la prise en charge des tumeurs à mastocytes non résecables avec mutation de KIT chez le chien ; il représente donc un espoir pour les patients atteints de mastocytose. Toutefois, il est important de noter que contrairement aux mastocytoses humaines, les tumeurs à mastocytes canines sont mutées au niveau de l'exon 11 de KIT dans 20 % des cas, alors que l'exon 17 est très peu fréquemment affecté (0,5 %) (Letard et al., 2008).

Plusieurs essais sont en cours chez l'Homme, notamment dans les mastocytoses, les GIST et le cancer du pancréas.

c) Type III, allostériques

Le développement d'inhibiteurs non compétiteurs de l'ATP semble une approche intéressante, surtout pour le ciblage des mutants du site de fixation de l'ATP ; les inhibiteurs allostériques en font partie.

Les inhibiteurs allostériques sont des molécules qui inhibent l'activité de l'enzyme sans entrer en compétition avec l'ATP, car ils ne se fixent pas au même site. Leur fixation induit des modifications de conformation, notamment au niveau du site de liaison à l'ATP, qui bloquent l'enzyme en conformation inactive. Puisqu'ils se lient à des sites moins conservés que le site de liaison à l'ATP, ils sont beaucoup plus spécifiques.

On peut citer par exemple les GNF-2 et 5 qui sont des inhibiteurs de Bcr-Abl (Fabbro et al., 2010; Blanc et al., 2013). Ils se fixent sur l'extrémité C-terminale du lobe C du domaine kinase, au niveau de la poche de fixation du myristate (la myristoylation des protéines intervient dans leur adressage à la membrane) (Choi et al., 2009). Le GNF-2 est la première démonstration que l'on peut moduler pharmacologiquement l'activité kinase de Bcr-Abl autrement qu'avec un inhibiteur du substrat ou qui se lie au site de liaison à l'ATP. Il a été

montré que leurs effets sont potentialisés s'ils sont utilisés en combinaison avec des ITK classiques (imatinib, nilotinib) (Zhang et al., 2010).

Le seul inhibiteur allostérique utilisé en clinique est le trametinib : c'est un inhibiteur des sérine/thréonine kinases MEK utilisé dans la prise en charge des mélanomes inopérables ou métastatiques avec mutation de BRAF (Falchook et al., 2012). Il peut être utilisé en association avec le dabrafenib, inhibiteur de type I ciblant BRAF dans les mélanomes.

d) Type IV : inhibiteurs dirigés contre les substrats

Ce sont des petites molécules qui se fixent également en dehors du site de liaison à l'ATP, au niveau de site de liaison de substrats de la kinase, avec lesquels elles entrent en compétition (Blanc et al., 2013). Ce sont des inhibiteurs spécifiques dans la mesure où leur site de liaison est unique pour chaque substrat, mais ils inhibent probablement la fixation de plusieurs substrats en même temps.

Un exemple que l'on peut citer est l'ON012380 qui inhibe Bcr-Abl en se fixant au site d'interaction avec Crk (Gumireddy et al., 2005). Il a également été décrit comme inhibant Lyn et le PDGFR (Maekawa et al., 2007).

Il n'y a pas d'essais cliniques testant ce type de molécules pour l'instant.

e) ITK irréversibles ou de type covalent

Les inhibiteurs covalents ne sont pas non plus des compétiteurs de l'ATP ; ils se lient de façon covalente aux atomes de soufre des cystéines du domaine kinase.

Quelques exemples d'inhibiteurs irréversibles que l'on peut citer : le vandetanib qui cible RET, le VEGFR et l'EGFR, est autorisé dans le cancer médullaire de la thyroïde. L'afatinib (inhibiteur d'EGFR, HER2 et HER4 (Solca et al., 2012)), est utilisé en première ligne dans le cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC) métastatique avec mutations d'EGFR. L'ibrutinib, inhibiteur de BTK, est prescrit dans le lymphome du manteau et est en essais cliniques dans d'autres cancers liés aux lymphocytes B (Maddocks and Blum, 2014). D'autres molécules sont en phase clinique, comme le pelitinib (EKB-569), inhibiteur d'EGFR et le neratinib (HKI-272), inhibiteur d'HER2.

2. Molécules pharmaceutiques autre que les inhibiteurs de kinases

a) Aptamères

Les aptamères sont des acides nucléiques de 25 à 100 nucléotides synthétisés *in vitro* à partir d'une banque d'environ 10^{15} molécules sur laquelle une sélection basée sur la liaison à la cible d'intérêt est réalisée.

Ces petites molécules présentent de nombreux avantages : elles sont très stables, faciles à produire et reconnaissent un large spectre de molécules, ce qui en fait un outil de choix pour le ciblage au niveau moléculaire, notamment dans le cancer (Hu and Zhang, 2013).

Les aptamères peuvent cibler, entre autre, des protéines membranaires et être internalisés dans les cellules ; ils peuvent donc s'avérer très utiles pour délivrer des drogues par couplage. Il existe par exemple un aptamère anti-HER2 couplé à un siARN dirigé contre le gène anti-apoptotique B-cell lymphoma 2 (Bcl2) ; l'internalisation de la molécule permet le blocage de l'expression du gène grâce au siARN et induit la mort des cellules de cancer du sein (Thiel et al., 2012). Une approche similaire a été développée avec un anti-PSMA (prostate specific membrane antigen) couplé à un shARN dirigé contre le gène anti-apoptotique B-cell lymphoma-extra large (Bcl-XL) ; cette molécule présente la particularité d'être également couplée à la doxorubicine et a démontré une bonne efficacité sur des lignées tumorales de prostate (Kim et al., 2010).

Le seul aptamère autorisé à ce jour est le pegaptanib, un anti-VEGF prescrit pour la prise en charge de la dégénérescence maculaire.

b) Inhibiteurs de hsp90

Hsp90 est une protéine chaperonne qui permet le bon repliement des protéines néosynthétisées dans les cellules normales, ou des protéines dénaturées dans les cellules qui ont subi un stress. Elle compte environ 200 protéines clientes, dont beaucoup de molécules de signalisation comme les récepteurs aux hormones, les kinases et les protéines régulatrices du cycle (Jhaveri and Modi, 2012).

Les protéines oncogéniques sont souvent mal repliées en conformation instable, ce qui nécessite une plus grande expression des protéines chaperonnes pour les stabiliser. On peut citer comme exemples de protéines clientes anaplastic lymphoma kinase (Alk), BRAF, Bcr-Abl et HER2 qui est décrit comme étant particulièrement sensible aux altérations de hsp90. Certaines oncoprotéines issues des mutants de SRC et de p53 sont stabilisées de façon anormale par hsp90, ce qui limite leur dégradation et augmente leur activité.

Cette forte implication de hsp90 dans la stabilité et l'activité de protéines oncogéniques en fait une cible de choix en oncologie. Ces dernières années, de nombreux composés inhibant

hsp90 ont été développés ; cette nouvelle stratégie consiste à cibler hsp90, ce qui déstabilise ses protéines clientes et les conduit à une dégradation par le protéasome (Rubin and Duensing, 2006).

Il existe plusieurs mécanismes d'inhibition d'hsp90 mais la plupart des inhibiteurs agissent en inhibant son activité ATPase, comme le 17-AAG. Cette molécule a été le premier inhibiteur de hsp90 à entrer en essai clinique en 1999. De nombreux autres essais ont été réalisés depuis en oncologie avec différents inhibiteurs, mais peu ont démontré une activité clinique, sans doute à cause d'une mauvaise solubilité ; il n'existe à ce jour aucun inhibiteur de hsp90 approuvé en clinique.

Depuis quelques années, il a été observé que KIT, et plus particulièrement ses formes oncogéniques, sont des protéines dépendantes de hsp90 par leur stabilité. Le 17-AAG a démontré une inhibition de l'activité de KIT et de la prolifération de différentes lignées mutées pour KIT : les cellules human mast cell leukemia (HMC1) qui sont des lignées de leucémie à mastocytes portant la mutation du domaine JM V560G +/- la mutation D816V de la boucle d'activation, la lignée Kasumi-1 qui est une lignée de LAM portant une mutation de la boucle d'activation (N822K) ainsi que différentes lignées de GIST sensibles ou résistantes à l'imatinib (Fumo et al., 2004; Bauer et al., 2006a; Yu et al., 2006b) (figure 23).

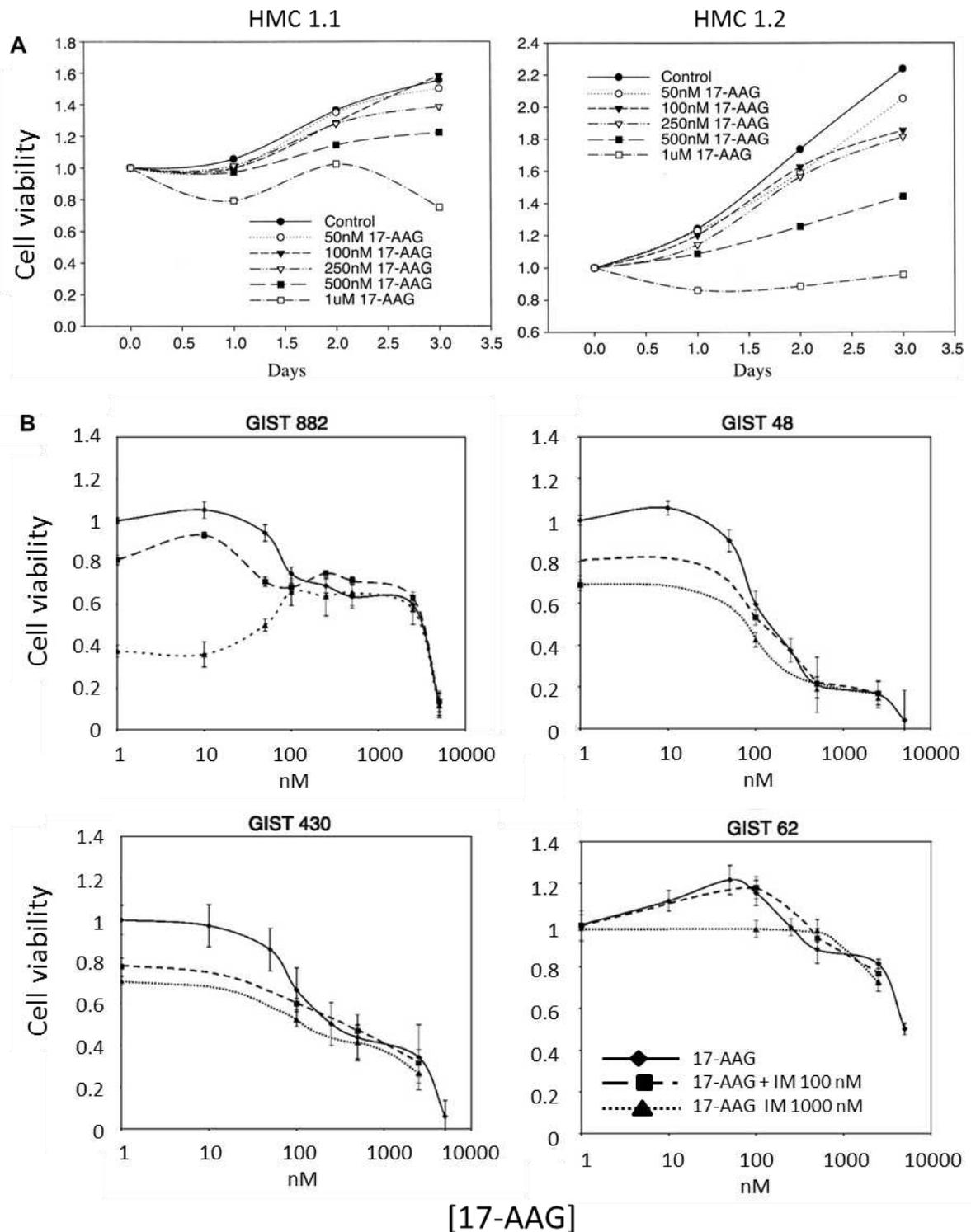


Figure 23 : inhibition de prolifération des lignées HMC1 et de GIST à différentes concentrations de 17-AAG.

A, le 17-AAG ralentit la croissance des lignées HMC 1.1 et 1.2 à partir d'un jour de traitement (Fumo et al., 2004). B, effet du 17-AAG en combinaison ou non avec l'imatinib sur différentes lignées de GIST à 3 jours. GIST 882 sensible à l'imatinib, GIST 48 et 430 résistantes à l'imatinib, GIST 62 indépendante de l'oncoprotéine KIT. Les lignées exprimant KIT sont plus sensibles au 17-AAG seul que la lignée indépendante de KIT. Pas d'effet additif de la combinaison 17-AAG + imatinib sur les lignées de GIST (Bauer et al., 2006a).

D'autres inhibiteurs de hsp90, comme IPI-504 et AT13387 ont montré des effets sur KIT mutant *in vivo* : ils diminuent la progression tumorale de xénogreffes de lignées de GIST sensibles et résistantes à l'imatinib ; de plus, l'effet de IPI-504 est plus important en association avec des ITK (Floris et al., 2011; Smyth et al., 2012).

3. Conclusion

Le développement de l'imatinib, une des premières thérapies ciblées, a révolutionné l'oncologie médicale et a ouvert la voie des thérapies ciblées. L'imatinib constitue la preuve de validité de ce ciblage de molécules spécifiques jouant un rôle dans la transformation néoplasique, permettant la conception de molécules thérapeutiques plus efficaces et moins toxiques. En plus de cibler Bcr-Abl, protéine pour laquelle il a été développé en premier lieu, l'imatinib cible également KIT, une oncoprotéine impliquée dans de nombreuses pathologies tumorales, notamment les GIST et les mastocytoses. Cependant, toutes les formes mutantes de KIT ne sont pas sensibles à l'imatinib ; en effet, les phénomènes de résistances des oncoprotéines aux ITK sont fréquents.

Le développement des ITK de 2^e génération (dasatinib, nilotinib...) a permis de surmonter certaines de ces résistances, le spectre d'action sur les différents mutants étant assez variable d'une molécule pharmacologique à l'autre. Il existe à ce jour 6 ITK en clinique qui ciblent KIT (table 3) dont l'utilisation a permis d'améliorer nettement la prise en charge des patients. Leurs activités vis-à-vis des différents mutants de KIT permettent de couvrir tous le spectre de mutations de KIT puisque chaque mutant de KIT est au moins inhibé par une de ces molécules (table 4).

L'utilisation d'ITK dans le traitement de patients atteints de cancer entraîne fréquemment, à plus ou moins long terme, un échappement de la tumeur par acquisition d'une résistance souvent consécutive à l'apparition de nouvelles mutations.

Une autre limite des ITK réside les effets secondaires qu'ils entraînent. Bien qu'elles soient considérées comme spécifiques comparé aux chimiothérapies, ces molécules inhibent presque systématiquement plusieurs kinases (table 3). Cela se traduit par des effets secondaires de sévérité modérée.

molécule	cibles	traitement
Imatinib (glivec) Novartis	KIT, Bcr-Abl, Abl, PDGFR, FIP1L1-PDGFR α , DDR1	LMC, GIST, LAL, syndrome hyperéosinophile idyopathique (+ mastocytose systémique aux USA)
Dasatinib (sprycel) Bristol-Myers Squibb	KIT, Bcr-Abl, PDGFR, SFK, Tek, Bek, EPHA2	LMC, LAL
Sunitinib (sutent) Pfizer	KIT, PDGFR, VEGFR, FLT3, Ret, CSF-1	GIST, cancer du rein métastatique, tumeur neuroendocrine du pancréas
Sorafenib (nexavar) Bayer	KIT, PDGFR, VEGFR, FLT3, Raf, Ret	Carcinome rénal, carcinome hépatocellulaire
Nilotinib (tasigna) Novartis	KIT, Bcr-Abl, PDGFR, Abl, DDR1	LMC
Regorafenib (stivarga) Bayer	KIT, PDGFR, VEGFR, Ret, Raf, FGFR, TIE-2, p38	Cancer du côlon métastatique (+ GIST en 3 ^e ligne aux USA)

Table 3 : récapitulatif des principaux ITK ciblant KIT utilisés en clinique.

	Exon 9	Exon 11	Exon 13 (V654A)	Exon 14 (T670I)	Exon 17
Imatinib	+	+	-	-	-
Dasatinib	+	+	-	-	+
Sunitinib	+	+	+	+	-
Sorafenib	+	+	+	+	+/-
Nilotinib	+	+	+	-	+/-
Regorafenib	ND	+	+	+	+

Table 4 : efficacité des inhibiteurs de KIT en clinique sur les différents types de mutants.

Le sorafenib inhibe les mutants de l'exon 17 à l'exception de ceux du codon 816. L'efficacité du nilotinib sur les mutants de l'exon 17 varie en fonction des études. L'efficacité du regorafenib n'a pas été évaluée sur les mutants de l'exon 9 (ND : non décrit).

Une approche différente dans la prise en charge des cancers est l'utilisation d'anticorps monoclonaux. Elle présente certains avantages par rapport aux thérapies par inhibiteurs pharmacologiques. Cette stratégie thérapeutique est détaillée dans la partie suivante.

4. Anticorps monoclonaux en oncologie

Les anticorps monoclonaux représentent une autre grande classe de molécules utilisées en thérapie ciblée. Il existe à ce jour 35 anticorps monoclonaux approuvés par la FDA, dont 15 en oncologie.

Les anticorps (Ac) ou immunoglobulines (Ig) sont des protéines N-glycosylées bi-fonctionnelles synthétisées par les lymphocytes B différenciés (ou plasmocytes) lors de la mise en place de l'immunité adaptative chez les vertébrés supérieurs. Les immunoglobulines sont généralement composées de deux chaînes lourdes (H pour heavy) identiques entre elles et de deux chaînes légères (L pour light) identiques entre elles maintenues par des ponts disulfures inter chaînes. L'une de leur fonction est la reconnaissance, avec une forte spécificité et une forte affinité, de structures moléculaires « étrangères » ou épitopes par leur site antigénique (ou paratope) porté par les régions dites variables (V) de l'anticorps ; l'autre fonction est le recrutement d'effecteurs immunitaires solubles (premier composant de la cascade du complément) ou cellulaires comme les cellules NK ou les macrophages, grâce à leur région constante (C) et plus spécifiquement le domaine Fc, c'est-à-dire le fragment cristallisable. La conséquence de cette bi-fonctionnalité est l'élimination des structures moléculaires reconnues.

a) Structure générale d'une IgG

Il existe plusieurs classes (ou isotypes) d'Ig. La classe d'une Ig est définie par le type de chaîne lourde qui la constitue. Les chaînes H de type μ , γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4 , ϵ , δ ou encore α_1 ou α_2 , définissent respectivement les isotypes IgM, IgG1 à IgG4, IgD, IgE, IgA1 et IgA2.

Les chaînes H et L des Ig sont composées de 2 (chaînes L) à 4 ou 5 (chaînes H) domaines dits domaines immunoglobulines composés de 110 AA formant deux feuillets β antiparallèles liés entre eux par un pont disulfure et d'un poids moléculaire de 12,5 kDa.

Les IgG1 sont les Ig les plus abondantes dans le sérum humain et sont composées de deux chaînes lourdes de 50 kDa (composées de 4 domaines Ig) et deux chaînes légères de 25 kDa (composées de 2 domaines Ig) (figure 24 gauche). Les domaines Ig N-ter des chaînes H et L présentent une grande variabilité de séquence d'une IgG1 à une autre au sein d'un individu et sont nommées régions VH et VL (figure 24 droite). Le rapprochement des régions VH et VL, et plus particulièrement des régions hypervariables ou CDR (complementarity determining région) de ces régions, forment le paratope, c'est-à-dire le site de liaison à l'antigène. Les régions constantes de l'anticorps (CH1, CH2-qui porte une N-glycosylation-, CH3 pour la chaîne H et C κ ou C λ pour la chaîne L), quant à elles, sont conservées au sein d'un individu et présentent peu de variabilité inter-espèce.

Les IgG1 sont efficaces pour la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) (cf 3.c) mécanismes d'action des anticorps monoclonaux).

A noter que chez les camélidés, il existe une classe particulière d'Ig composées uniquement de 2 chaînes lourdes identiques entre-elles. Ici, la spécificité antigénique est portée par une seule région VH dite VHH.

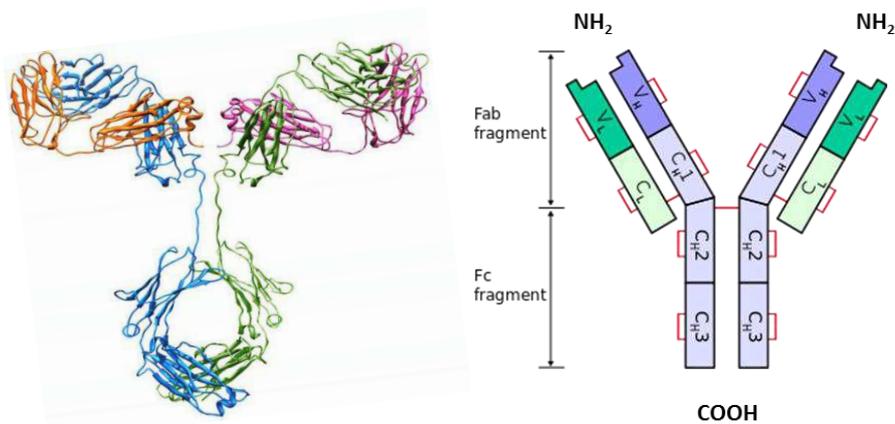


Figure 24 : structure d'une IgG.

Gauche, en bleu et vert, les chaînes lourdes, en orange et rose, les chaînes légères. Droite, représentation schématique d'un anticorps IgG. Chaîne légère en vert, chaîne lourde en mauve, ponts disulfures en rouge.

b) Généralités sur les anticorps thérapeutiques

Les anticorps développés en thérapeutique ont été initialement issus de la technologie des hybridomes (Köhler and Milstein, 1975) mise en place chez la souris ; grâce à la biotechnologie, les anticorps murins peuvent être chimérisés ou humanisés afin de limiter leur immunogénicité chez le patient (figure 25). Pour distinguer l'origine d'espèce de l'anticorps monoclonal, une nomenclature utilisant des suffixes a été mise en place : « omab » pour murin, « ximab » pour chimérique, « zumab » pour humanisé et « umab » pour humain.

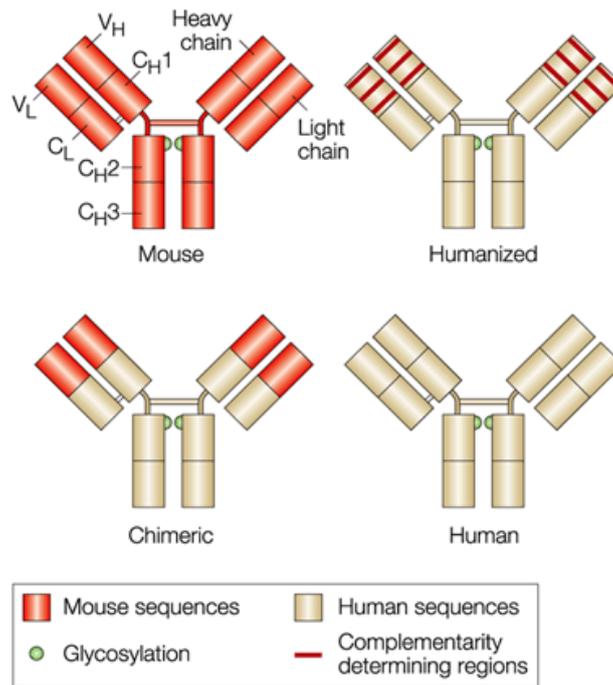


Figure 25 : les différents types d'anticorps (Carter, 2001).

Les anticorps thérapeutiques peuvent être couplés à des radio-éléments ou à des drogues, mais nous ne décrivons ici que quelques exemples des anticorps les plus étudiés :

Le premier anticorps monoclonal à avoir été approuvé par la FDA est le **muromonab** en 1986 ; c'est un anticorps murin dirigé contre CD3, une protéine membranaire située à la surface des LT, qui est utilisé pour éviter le rejet de greffes. Le **rituximab** (MabThera) est le premier anticorps à avoir été autorisé dans la prise en charge du cancer en 1997. Cet anticorps chimérique est dirigé contre CD20, situé à la surface des différents stades de différenciation des LB ainsi que des tumeurs dérivées des LB ; le rituximab est prescrit pour traiter les lymphomes non hodgkiniens et les leucémies lymphoïdes chroniques (LLC) dans lesquels il s'est avéré extrêmement utile pour stabiliser la maladie.

Un des autres grands succès des thérapies par anticorps est le **trastuzumab** (Herceptin) : c'est un anticorps humanisé ciblant le récepteur HER2. Il a été approuvé par la FDA en 1998 pour le traitement du cancer du sein métastatique surexprimant HER2 en association avec la chimiothérapie, ce qui a diminué le risque de décès sur un an de 20 % (Slamon et al., 2001). Aujourd'hui il est également indiqué dans le cancer du sein surexprimant HER2 en tant que thérapie adjuvante, ainsi que dans le traitement des cancers gastriques métastatiques surexprimant HER2 en combinaison avec la chimiothérapie (cisplatine + capecitabine ou fluorouracile (5-FU)).

Le **bevacizumab** (Avastin), quant à lui, est un anticorps humanisé dirigé contre un ligand et non un récepteur membranaire ; il cible le VEGF, ce qui empêche la liaison à son récepteur le VEGFR. Il inhibe ainsi l'action angiogénique de l'axe VEGF/VEGFR (figure 26). Aux Etats-Unis, le bevacizumab est indiqué dans le traitement du cancer colorectal métastatique, du cancer

bronchique non à petites cellules, du carcinome rénal métastatique et du glioblastome. Il y a cependant depuis récemment une remise en question de l'utilité de ce traitement.

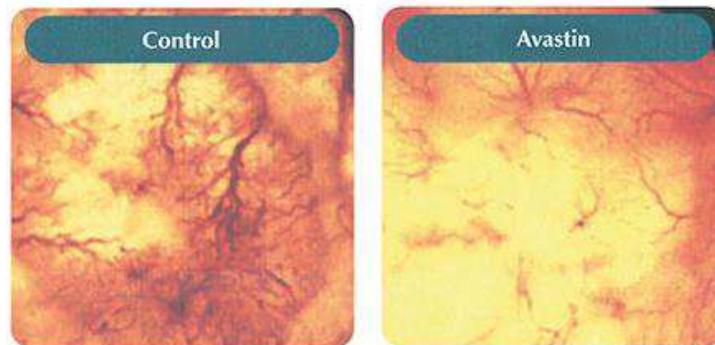


Figure 26 : réduction de la vascularisation d'une xénogreffe de cancer du côlon à 7 jours après traitement au bevacizumab (500 µg/mL) (Yuan et al., 1996).

Le **cetuximab** (Erbix) est un anticorps humanisé dirigé contre l'EGFR ; il agit en bloquant la liaison des ligands naturels au récepteur. Il est prescrit dans les cancers colorectaux et les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou.

Tous ces anticorps thérapeutiques sont des IgG, mais il en existe de plus en plus en développement sous d'autres formats moins classiques ; la moitié des essais cliniques de phase I mis en place aujourd'hui sont des anticorps couplés, des anticorps bispécifiques ou des fragments d'anticorps :

- Un anticorps bispécifique a été approuvé en Europe, le catumaxomab (Removab) qui est dirigé contre la molécule d'adhésion des cellules épithéliales (EpCam) (exprimé par les cellules tumorales) et CD3 (exprimé pas les LT) et indiqué dans le traitement des ascites malignes. Le but est de rapprocher les cellules effectrices immunes des cellules tumorales. De nombreux essais cliniques sont en cours pour évaluer l'efficacité d'anticorps bispécifiques.
- Etanercept est une protéine de fusion entre le domaine de liaison au ligand du récepteur au facteur de nécrose tumorale (TNFR) et un fragment Fc ; il est utilisé dans la prise en charge de différentes formes d'arthrite et de psoriasis, car le TNF est une cytokine prédominante dans les processus inflammatoires. Le principe de l'action est ici une inhibition par compétition.
- Les fragments d'anticorps sont aussi de plus en plus étudiés ; les fonctions effectrices et de liaison à l'antigène étant portées par deux domaines distincts, cela facilite le design de molécules plus petites, se limitant au domaine de reconnaissance antigénique lorsque le recrutement des effecteurs immunitaires n'est pas requis pour l'efficacité. A ce jour, 3 fragments de liaison à l'antigène (Fab) sont approuvés par la FDA, le certolizumab (anti-TNF), le ranibizumab (anti-VEGF) et l'abciximab (anti-glycoprotéine IIb/IIIa) (figure 27) (Nelson, 2010).

D'autres types de fragments d'anticorps ont été développés : les single-chain variable fragment (scFv) sont formés par les domaines variables des chaînes lourdes et légères, reliés par un peptide souple ; les VHH correspondent au domaine variable d'un type particulier d'anticorps présent chez les camélidés, formé uniquement par deux chaînes lourdes (Muyldermans, 2001). Ces deux types d'anticorps, parfois sous forme multimérique, ont été testés en essai clinique mais aucun n'a été approuvé à ce jour (figure 27) (Reichert and Dhimolea, 2012).

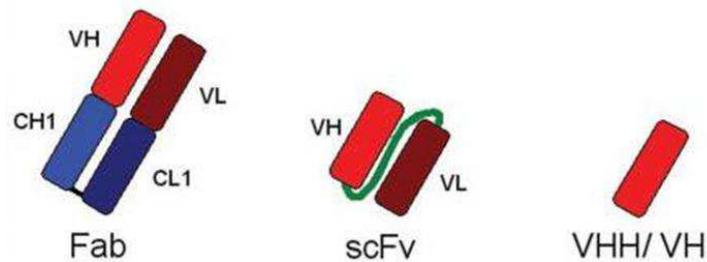


Figure 27 : différents formats de fragments d'anticorps.

Les fragments d'anticorps présentent certains avantages par rapport au format classique, notamment une meilleure pénétration du site tumoral grâce à leur petite taille ainsi que des facilités de production en termes de temps et de coût. Cependant, l'absence de fragment Fc diminue la demi-vie *in vivo* des anticorps qui sont éliminés plus vite. Par ailleurs, ils ne peuvent pas induire d'ADCC ni l'activation de la cascade du complément (CDC).

c) Mécanismes d'action des anticorps monoclonaux

Les anticorps thérapeutiques peuvent avoir différentes actions sur leurs cellules cibles : l'inhibition de la signalisation oncogénique qui induit souvent l'apoptose des cellules cibles (anti-HER2, EGFR), l'inhibition de l'angiogénèse (anti-VEGFR et VEGF), ou une action plus indirecte comme la modulation de la réponse immune (anti-CTLA4 ou programmed cell death-1 (PD-1)), (Scott et al., 2012).

Ils utilisent différents mécanismes pour exercer ces actions sur les cellules cibles :

- Dépendants du fragment Fab :

Certains anticorps induisent **l'internalisation du récepteur** en s'y fixant, comme le cetuximab et le trastuzumab : ce mécanisme est très important si l'anticorps **délivre une drogue** ou si le mécanisme d'action est basé sur la down-régulation du récepteur (Wei et al., 2003). Ces deux anticorps induisent également la **dégradation du récepteur** à la suite de leur internalisation (Vincenzi et al., 2008). Le trastuzumab qui est utilisé dans le cancer du sein notamment, entraîne donc une dégradation de HER2, ce qui prive les cellules cancéreuses de la forte activation de la voie PI3K/Akt qui les protège de l'apoptose. Cependant, l'internalisation doit être limitée si le mécanisme recherché est plutôt de l'ADCC ou de la CDC (voir plus loin).

Le domaine intracellulaire de HER2 est activé de façon constitutive par clivage protéolytique du domaine extracellulaire par la métalloprotéase ADAM7. Le trastuzumab **inhibe ce clivage enzymatique** et la signalisation oncogénique qui en découle (Liu et al., 2006).

Lorsque la cible est un récepteur membranaire, un mécanisme d'inhibition peut être le **blocage de la liaison du ligand** : c'est le cas du cetuximab qui empêche la fixation des ligands comme l'EGF, le transforming growth factor β (TGF β) et l'amphiréguline à leur récepteur l'EGFR (Li et al., 2005).

Le pertuzumab possède un mécanisme d'action particulier : il inhibe la dimérisation d'HER2 avec les autres membres de la famille HER (Metzger-Filho et al., 2013).

- Dépendants du fragment Fc :

En fonction de leur isotype, les anticorps ont une affinité variable pour le complément et les récepteurs au fragment Fc des cellules effectrices. Les IgG1 par exemple, sont capables de se lier aux deux et d'activer l'ADCC ainsi que la CDC.

ADCC : une fois que l'anticorps est fixé à sa cible, son fragment Fc peut se lier aux Fc γ R qui sont présents à la surface des cellules effectrices (NK, monocytes, macrophages et polynucléaires) et induire une lyse des cellules cancéreuses cibles (figure 28). De nombreux anticorps en clinique sont capables de médier l'ADCC comme le rituximab, le cetuximab et le trastuzumab dont c'est le principal mode d'action (Vincenzi et al., 2008; Rudnicka et al., 2013). Il faut noter qu'il existe un polymorphisme du Fc γ RIIIa présente sur les NK et qu'il est décrit une efficacité thérapeutique différentielle selon les allèles portés par les patients (Cartron et al., 2011).

CDC : certains anticorps comme le rituximab peuvent aussi se lier à la sous unité C1q du complément par leur fragment Fc, ce qui active la cascade du complément et entraîne également une lyse cellulaire (figure 28) (Bellosillo et al., 2001). La CDC ne dépend pas seulement de l'isotype mais aussi de la disposition et de la densité de l'antigène à la surface de la cellule cible (Sung et al., 1992).

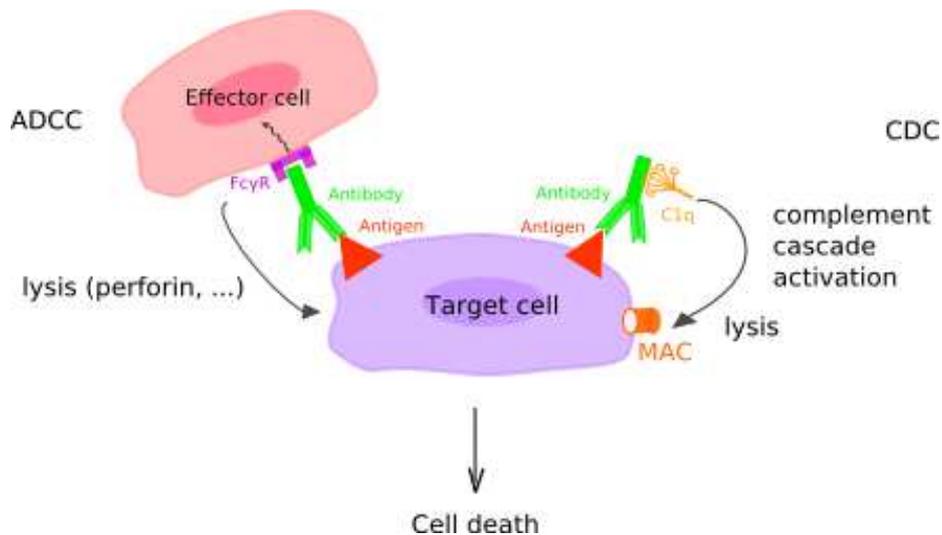


Figure 28 : mécanismes d'activation de l'ADCC et de la CDC.

Les macrophages peuvent également induire la **phagocytose** des cellules recouvertes d'anticorps (Richards et al., 2008; Golay and Introna, 2012).

d) Anticorps anti-KIT

Il n'existe actuellement aucun anticorps thérapeutique ciblant KIT en clinique, ni en essai clinique. Cependant, des études précliniques ont été réalisées sur divers anticorps anti-KIT développés depuis le début des années 90 :

Le **YB5.B8** est un anticorps murin non internalisant mais qui induit la phosphorylation de KIT humain ; c'est donc un agoniste de KIT. Le SCF empêche la liaison du YB5.B8 à KIT, en revanche le YB5/B8 n'a pas d'effet sur liaison du SCF ; il n'inhibe donc pas la prolifération induite par celui-ci (Ashman et al., 1994).

Le **17F11** est un anticorps murin qui présente la particularité d'augmenter sa liaison à KIT humain en présence de SCF. Il n'a pas d'effet sur liaison du SCF à KIT et n'inhibe donc pas l'internalisation de KIT induite par celui-ci. Sa liaison résulte en l'internalisation et la phosphorylation de KIT (Ashman et al., 1994).

Le **41A11** est un anticorps internalisant qui a fait ses preuves pour l'imagerie de xénogreffes de GIST chez la souris (Sogawa et al., 2010).

L'équipe du Dr Schlessinger a récemment développé un anticorps, **Fab79**, dirigé contre le domaine D4 de la portion extracellulaire de KIT. Ce Fab inhibe la phosphorylation de KIT induite par le SCF dans différentes lignées cellulaires ainsi que la croissance de lignées dépendantes de KIT wt et mutant (Reshetnyak et al., 2013).

Les anticorps anti-KIT testés en thérapie *in vivo* :

L'**ACK2** est un anticorps bloquant de rat (IgG2b K) spécifique de KIT murin, dont l'injection à des souris affecte le développement de nombreux lignages cellulaires : mélanocytes, lignages érythroïdes et granulocytaires, ICC, follicules ovariens (Nishikawa et al., 1991; Rico-Vargas et al., 1994; Yoshida et al., 1997; Torihashi et al., 1999). L'injection péritonéale d'ACK2 chez des souris immunocompétentes permet de supprimer les progéniteurs hématopoïétiques avant de réaliser une greffe de moelle, ce qui favorise une bonne prise des cellules transplantées (Xue et al., 2010). L'ACK2 est le premier anticorps anti-KIT dont l'efficacité a été évaluée en oncologie dans un modèle murin : les souris RET mutantes développent des mélanomes de façon spontanée ; l'injection d'ACK2 empêche la formation de mélanome chez ces souris (Kato et al., 2004) (figure 29).

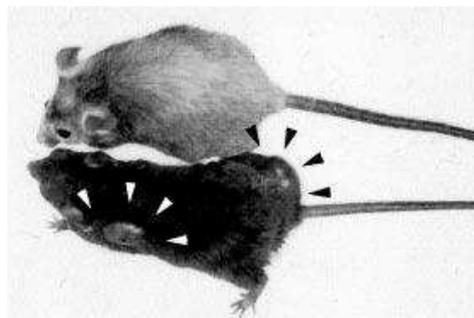


Figure 29 : souris RET-mutantes traitées (haut) ou non (bas) par l'anticorps anti-KIT ACK2 (Kato et al., 2004).

Le **12A8** (murin IgG1) et le **67A2** sont des anticorps internalisants de KIT humain ; leur efficacité *in vivo* a été testée en radio-immunothérapie : lorsqu'ils sont marqués à l'yttrium 90, ils diminuent la croissance de xénogreffes de SCLC (Yoshida et al., 2013).

Le **SR-1** est une IgG2a murine qui inhibe la liaison du SCF ainsi que l'internalisation de KIT humain et la prolifération qui en découlent (Ashman et al., 1994). Sa fixation à KIT entraîne l'internalisation du récepteur et inhibe la prolifération *in vitro* de lignées de GIST sensibles et résistantes à l'imatinib. Une fois fixé, il permet la phagocytose de ces cellules par les macrophages et inhibe leur croissance lorsqu'elles sont xénogreffées à des souris (Edris et al., 2013) (figure 30).

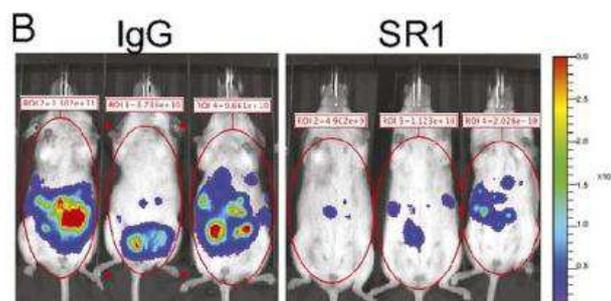


Figure 30 : SR-1 inhibe la croissance de xénogreffes de la lignée de GIST 430 résistante à l'imatinib après 8 semaines de traitement (Edris et al., 2013).

Il existe également deux brevets décrivant des anticorps dirigés contre KIT non publiés dans la littérature :

« c-Kit antibodies and uses thereof » US8552157 B2 (publié le 8 octobre 2013) : l'anticorps CK6, qui est une IgG humaine, inhibe la liaison du SCF et dégrade KIT dans différentes lignées tumorales ; de plus il inhibe la croissance tumorale de xénogreffes de mélanomes et SCLC (Lebron et al., 2013).

« Humanized c-kit antibody » US 7915391 B2 (publié le 29 mars 2011) : humanisation du SR-1. Les anticorps obtenus inhibent la phosphorylation et l'internalisation de KIT induite par le SCF dans plusieurs lignées cellulaires exprimant KIT.

5. Limites des thérapies ciblées

Le développement des ITK a permis de grands progrès dans la prise en charge de certaines pathologies tumorales ; en effet, ces molécules faciles à administrer et engendrant peu d'effets secondaires comparé aux chimiothérapies classiques, ont rallongé la médiane de survie de nombreux cancers. Cependant les ITK présentent certaines limites ; comme il l'a été décrit précédemment, tous les mutants de KIT ne sont pas sensibles à tous les ITK. Par exemple le mutant D816V, caractéristique des mastocytoses systémiques, est résistant à quasiment tous les ITK à part le dasatinib. Cependant, malgré des données in vitro prometteuses, les essais réalisés sur des patients atteints de mastocytose traités au dasatinib n'ont pas donné les résultats escomptés, possiblement à cause de faible concentration plasmatique de la molécule. En outre, des toxicités assez importantes ont été relevées.

De plus, les patients initialement répondeurs développent fréquemment des résistances secondaires. En effet, le génome des cellules tumorales est instable et présente une grande plasticité ; ces cellules, en constante évolution, choisissent les modifications qui améliorent leur capacité à survivre et à proliférer. Ce phénomène est observé lors de l'administration de traitement, ce qui induit une pression de sélection sur la tumeur. Les rares cellules portant les modifications nécessaires à la survie débutent alors une expansion clonale qui mène à une rechute tumorale. Ce mécanisme complique presque tous les types de thérapie en oncologie, où le succès clinique initial réduisant la population cellulaire cancéreuse est souvent suivi par la réémergence d'une nouvelle population cellulaire devenue réfractaire au traitement initial. Ces phénomènes sont très souvent observés lors de traitement aux ITK.

Bien que les effets secondaires induits par ITK soient moins prononcés que lors des chimiothérapies, on observe souvent des rashes cutanés, une grande fatigue, des symptômes gastro-intestinaux (nausées, vomissements, diarrhées) et une toxicité hématopoïétique.

La résistance aux anticorps est nettement moins décrite que celle aux ITK, mais on peut noter quelques exemples concernant le rituximab. Plusieurs mécanismes ont été observés, comme une diminution de l'expression de l'antigène ciblé (CD20) en surface ou encore un blocage de l'activation du complément (Rezvani and Maloney, 2011). Il existe sans doute moins de résistances aux anticorps qu'aux ITK car la thérapie par anticorps induit souvent l'élimination des cellules cibles, contrairement aux ITK qui sont plutôt cytostatiques.

Les pathologies liées à KIT nécessitent de nouveaux traitements de par les limites des ITK ciblant KIT et l'absence d'anticorps anti-KIT en clinique.

OBJECTIFS DE LA THESE

Comme décrit précédemment dans l'introduction, KIT est à l'origine de nombreux cancers par des mécanismes de surexpression ou de mutations activatrices. Il existe actuellement plusieurs types de molécules ciblant KIT en développement ; cependant, seuls les ITK sont à ce jour utilisés pour traiter les pathologies impliquant la signalisation KIT. Ces molécules pharmacologiques ont démontré une efficacité clinique certaine dans les GIST par exemple ; elles présentent cependant des limites puisqu'il existe des résistances primaires et acquises lors de traitement à long terme. En effet, certains types de mutant de KIT sont résistants à la plupart des ITK, comme le mutant D816V, caractéristique des mastocytoses systémiques.

Il existe donc un grand besoin de nouvelles molécules ciblant KIT. Au cours de mon travail de thèse nous avons exploré plusieurs voies pour proposer de nouvelles molécules et de nouvelles stratégies pour inhiber la signalisation KIT dans un contexte oncogénique.

Développement d'un test cellulaire de criblage fonctionnel d'inhibiteurs de KIT

Des travaux de thèse précédemment réalisés au LBPA ont montré que les mutants de KIT – exprimés en contexte hémizygote dans un modèle cellulaire d'ovaire de hamster chinois (CHO)- étaient principalement localisés au niveau intracellulaire (Bougherara et al., 2009). Cette observation a aussi été faite dans des tissus de patients, notamment dans des échantillons de GIST : les mutants hétérozygotes de KIT présentent une expression cytoplasmique partielle et plus prononcée dans les homozygotes (Tabone-Eglinger et al., 2008). Notre laboratoire a montré que le traitement d'un mutant par un ITK auquel il est sensible entraîne sa relocalisation membranaire. L'un des objectifs de cette thèse était d'exploiter l'existence de ce lien entre l'état d'activation de KIT mutant et sa localisation cellulaire afin de développer un test de criblage fonctionnel. Ce projet consistait dans un premier temps à mettre au point ce test pour sélectionner par cytométrie des molécules qui relocalisent KIT mutant à la membrane, et qui par conséquent l'inhibent potentiellement. Une fois le test mis au point à moyen débit sur des inhibiteurs validés, nous voulions cribler des chimiothèques afin de trouver de nouveaux inhibiteurs spécifiques de KIT.

Sélection d'intrabodies anti-KIT mutant

Le problème du ciblage des mutants de KIT vient du fait qu'ils sont, comme décrit précédemment, en partie localisés au niveau intracellulaire. Un deuxième axe du projet de thèse consistait à utiliser différentes stratégies de phage display pour sélectionner des anticorps au format scFv et VHH spécifiques du domaine intracellulaire du mutant D816V de KIT. Ce mutant, décrit comme en conformation active de manière constitutive pourrait avoir des épitopes distincts de la kinase WT en conformation active. Le but était d'obtenir des anticorps spécifiques de la forme active de la kinase et si possible des anticorps spécifiques de la forme active de la kinase mutée D816V. Ces fragments d'anticorps, une fois exprimés dans le cytosol –on parle alors d'intrabodies– peuvent inhiber la signalisation KIT oncogénique par deux mécanismes : soit ils inhibent directement l'activité kinase en se

fixant au niveau du site de liaison à l'ATP, soit ils empêchent le recrutement de molécules de signalisation et inhibent une voie en particulier. Ce dernier aspect pourrait être d'autant plus intéressant car les mutants de KIT activent préférentiellement certaines voies (Chian et al., 2001).

Ce projet consistait dans un deuxième temps à caractériser les effets biologiques de ces intrabodies puis à mettre au point un test de criblage par enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). En effet, les intrabodies ne sont pas adaptés à la thérapie en clinique, c'est pourquoi nous souhaitons les utiliser pour cribler des banques de molécules pharmacologiques ; le but étant de rechercher celles qui empêchent la liaison des intrabodies inhibiteurs à KIT mutant et qui ont donc potentiellement le même pouvoir inhibiteur sur celui-ci.

Sélection d'anticorps dirigés contre le domaine extracellulaire de KIT

De par leur grande spécificité, les anticorps monoclonaux représentent une approche prometteuse pour inactiver KIT. Le troisième volet de ma thèse a porté sur la caractérisation d'anticorps humains spécifiques du domaine extracellulaire du récepteur KIT. Ces anticorps ont été générés en utilisant la technique de phage display lors d'une précédente thèse au LBPA. Cette partie du projet portait sur la caractérisation fonctionnelle des anticorps sur différents variants de KIT ; l'un des objectifs était aussi d'évaluer leur efficacité en termes d'inhibition de prolifération sur des lignées cellulaires tumorales dépendantes de KIT de façon à isoler les candidats avec les propriétés anticancéreuses les plus intéressantes.

Par ces approches complémentaires, nous avons voulu développer de nouvelles molécules ciblant la signalisation KIT oncogénique pour élargir le panel d'outils thérapeutiques et outrepasser les résistances de certains mutants de KIT.

Dans un premier temps, je présenterai l'établissement d'un modèle cellulaire CHO exprimant différents variants de KIT puis son utilisation pour le développement du test de criblage de petites molécules. Dans un second temps, je développerai les différentes stratégies de sélection par phage display que nous avons utilisées afin de générer des anticorps intracellulaires dirigés contre le domaine intracellulaire de KIT. Enfin, je présenterai la caractérisation fonctionnelle d'anticorps humains dirigés contre la partie extracellulaire de KIT.

RESULTATS

I. DEVELOPPEMENT D'UN TEST DE CRIBLAGE FONCTIONNEL

1. Caractérisation des modèles cellulaires

Il est décrit depuis quelques années que certains RTK, comme FGFR3 et FLT3, présentent une localisation cellulaire altérée lorsqu'ils portent une mutation activatrice. Cette localisation intracellulaire s'accompagne d'une glycosylation immature des récepteurs ; ceux-ci initient une signalisation spécifique à partir du Golgi ou du RE (Gibbs and Legeai-Mallet, 2007; Choudhary et al., 2009).

Notre équipe a développé un modèle cellulaire dans le but d'étudier de façon fonctionnelle différents variants (WT ou mutant) de KIT en les fusionnant à l'enhanced green fluorescent protein (EGFP). Un modèle cellulaire CHO de transfection transitoire pour l'expression KIT humain a été établi : trois variants différents ont été construits, à savoir KIT WT, KIT V560G et KIT D816V, tous fusionnés à l'EGFP (Bougherara et al., 2009). Le mutant V560G fait partie des mutants du type régulateur, c'est-à-dire que la mutation est située au niveau domaine JM qui est décrite comme jouant un rôle d'auto-inhibiteur sur l'activité kinase de KIT (cf 1 – 2.a. Mutations de KIT) ; cette mutation est caractéristique des GIST. Le mutant D816V, de type catalytique, est très fréquemment retrouvé dans les mastocytoses systémiques ; la mutation est située au niveau de la boucle d'activation du domaine kinase de KIT. Ces deux mutants sont connus pour être constitutivement actifs. Un tag EGFP, qui permet de suivre la localisation cellulaire de KIT, a été inséré en N-terminal juste après la séquence signal de KIT, pour obtenir les variants WT, V560G et D816V en fusion avec l'EGFP (figure 31) (cf annexe 1). En effet, il a précédemment été décrit que l'insertion du tag EGFP en N-terminal est neutre fonctionnellement alors qu'une insertion en C-terminal entraîne une activation constitutive du récepteur WT (Jahn et al., 2002).

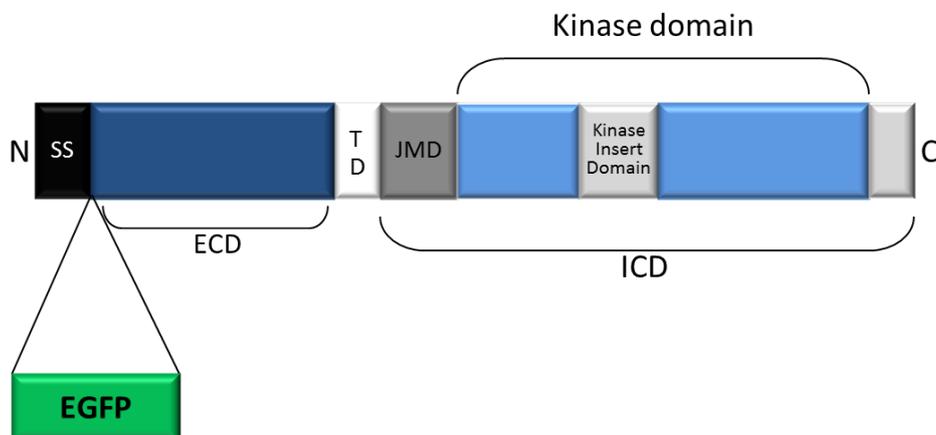


Figure 31 : représentation schématique de la protéine KIT fusionnée à l'EGFP.

SS séquence signal, ECD domaine extracellulaire, TD domaine transmembranaire, JMD domaine juxtamembranaire, ICD domaine intracellulaire.

De précédents travaux de l'équipe ont permis de montrer que comme dans le cas d'autres mutants de RTK, on retrouvait une localisation altérée des mutants de KIT : des analyses par immunofluorescence (IF) après transfection transitoire des constructions plasmidiques dans des cellules CHO ont montré qu'un marquage de KIT membranaire est retrouvé uniquement sur la forme WT de KIT et pas, ou très peu sur les deux mutants, qui sont essentiellement à localisation cytoplasmique. Cette altération de localisation est associée à un défaut de maturation des formes mutantes de KIT (Bougherara et al., 2009).

Lors de sa synthèse, KIT subit des modifications post-traductionnelles dont, entre autre, des N-glycosylations au niveau des asparagines des domaines Ig-like extracellulaires. Lors de son passage dans le RE, une glycosylation de type high-mannose est greffée ; puis lors de sa progression du RE au Golgi, il y a une modification des sucres qui aboutit à un pattern complexe de glycosylation, correspondant à la forme mature de KIT, alors envoyée à la surface cellulaire.

Ces travaux de l'équipe ont montré les formes mutantes de KIT fusionné à l'EGFP exprimées transitoirement en CHO présentent un défaut de maturation. Les mutants de KIT présentent un profil de glycosylation de type high-mannose, ce qui correspond à une forme immature de la protéine, caractéristique d'une localisation dans le RE (figure 32) (Bougherara et al., 2009).

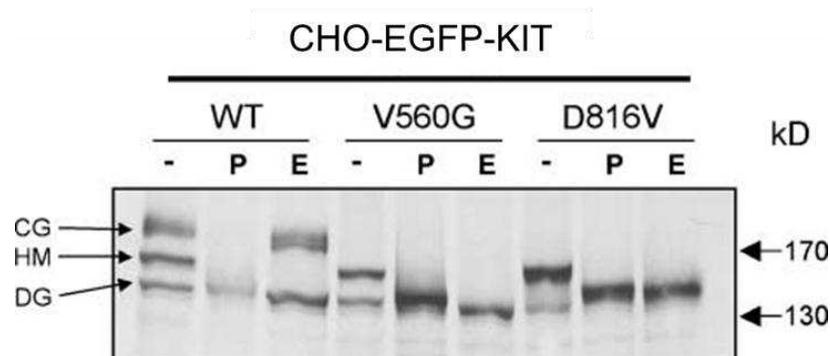


Figure 32 : analyse du statut de glycosylation des cellules CHO transfectées transitoirement par les 3 variants EGFP-KIT.

Les cellules CHO ont été transfectées transitoirement par les plasmides codant pour les variants de KIT fusionné à l'EGFP puis traitées par différentes glycosydases.

L'étude du pattern de glycosylation a été réalisée en traitant les cellules CHO transfectées transitoirement par l'EGFP-KIT avec différentes glycosydases. La peptide N-glycosidase (PGNase) hydrolyse tous les résidus sucrés liés en N, et la N-acetylglucosaminidase H (Endo H) hydrolyse spécifiquement les oligosaccharides N-liés de type high-mannose. La bande de bas poids moléculaire (130 kDa) correspond à une forme immature, non glycosylée, formée juste après la fin de la traduction. La bande de poids moléculaire intermédiaire (150 kDa) observée dans les 3 variants de KIT est sensible à l'hydrolyse par l'endo H, indiquant un pattern de glycosylation de type high-mannose. La forme de haut poids moléculaire observée pour KIT WT est résistante à l'endo-H, indiquant une N-glycosylation complexe de

type mature. Ces données indiquent que les variants mutants de KIT, qui sont constitutivement actifs, présentent un pattern de glycosylation de type high-mannose, caractéristique d'une localisation dans le RE.

Pour aller plus loin dans cette étude, des modèles de CHO exprimant de façon stable les différents variants de KIT fusionnés à l'EGFP ont été établis. L'ADNc codant pour KIT taggué a été introduit dans un vecteur rétroviral pLXSN. Les rétrovirus défectifs produits dans la lignée 293-T ont ensuite servi à l'infection de cellules CHO afin d'établir des clones CHO exprimant stablement les 3 variants de KIT.

L'expression des protéines de fusion a été validée en Western blot sur des extraits protéiques de CHO transfectées transitoirement par les différents variants de KIT fusionnés à l'EGFP (figure 33). Nous avons observé une bonne expression de la protéine de fusion EGFP-KIT WT, révélée par les 3 anticorps anti-KIT, KIT-ECD et GFP ; en revanche, l'expression est plus faible pour les 2 mutants de KIT. De plus, la forme WT de KIT présente 3 isoformes, correspondant à différents états de maturation de la protéine liés à des patterns de N-glycosylation différents. Les formes mutantes de KIT quant à elles, ne présentent que les 2 isoformes de plus bas poids moléculaire, indiquant une maturation incomplète de ces protéines, comme déjà observé sur les modèles d'expression transitoire (figure 32).

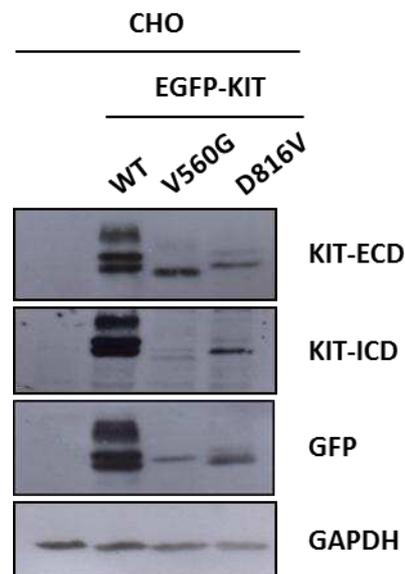


Figure 33 : analyse des lignées CHO stables par Western blot.

La membrane a été hybridée successivement avec des anticorps dirigés contre la GFP, le domaine intracellulaire de KIT (KIT-ICD) et le domaine extracellulaire de KIT (KIT-ECD).

Comme attendu, les cellules CHO exprimant les variants mutants de KIT (V560G et D816V) ont une prolifération plus rapide que les CHO non transfectées et les CHO-EGFP-KIT WT, démontrant bien un avantage prolifératif de ces 2 mutants de KIT, lié à leur activation constitutive (figure 34).

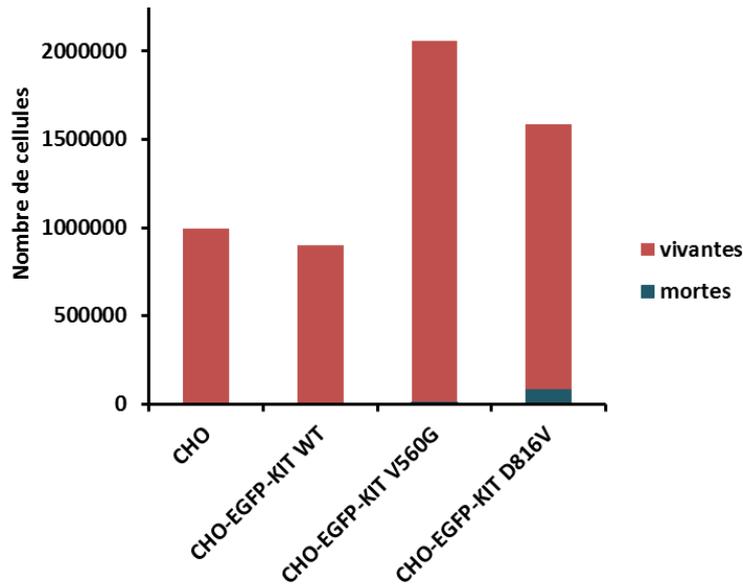


Figure 34 : numération des lignées CHO stables.

Les cellules ont été ensemencées à 150000 cellules/puits en milieu + sérum de veau fœtal (SVF) 10 % et ont été comptées à jour 3 +/- bleu trypan pour visualiser les cellules mortes.

Les mutants de KIT V560G et D816V sont décrits pour être constitutivement activés. Pour valider nos modèles CHO, nous avons étudié le statut de phosphorylation de KIT mutant et de KIT WT stimulé par le SCF ou non (figure 35).

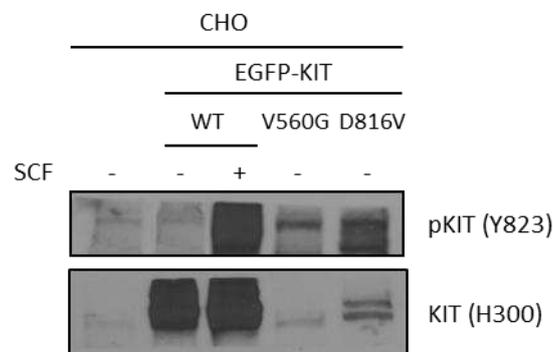


Figure 35 : analyse par Western blot de l'expression et de la phosphorylation de KIT dans les cellules CHO (lignée stables).

Les cellules CHO ont été déplétées sur la nuit et les CHO-EGFP-KIT WT ont ensuite été stimulées ou non au SCF pendant 5 min à 100 ng/mL.

Comme nous le pensions, les 2 mutants de KIT présentent une forte phosphorylation en l'absence de ligand, malgré une faible expression du récepteur. Le récepteur WT est exprimé fortement et la stimulation par le SCF induit sa phosphorylation.

Pour vérifier la fonctionnalité du récepteur KIT WT dans nos modèles, nous avons étudié son internalisation induite par le SCF par cytométrie de flux. L'incubation des cellules CHO-EGFP-KIT WT en présence de SCF (surnageant de la lignée CHO-KL, sécrétrice de SCF) à différents temps (de 1 minute à 1 heure) montre bien une internalisation de KIT WT en fonction du

temps (figure 36). Cela nous a permis de valider la fonctionnalité de nos modèles, qui permettent d'observer la distribution et les taux de KIT.

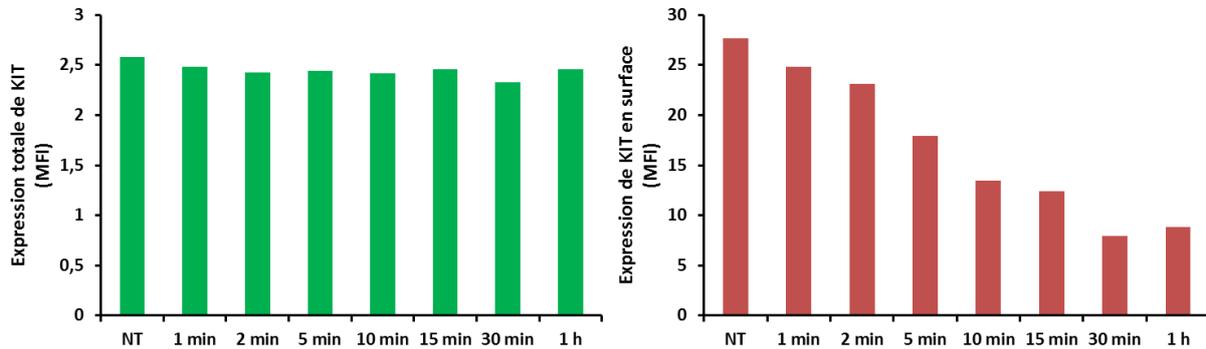


Figure 36 : analyse de l'expression totale et membranaire de KIT dans les CHO-EGFP-KIT WT en présence ou non de surnageant de CHO-KL.

Expression totale (vert, fluorescence du tag EGFP) et membranaire (rouge, détection avec l'anticorps 104D2 anti-KIT dont la liaison n'est pas modifiée par le SCF) de KIT dans les CHO-EGFP-KIT WT en présence ou non de surnageant de CHO-KL (surnageant de la lignée CHO-KL, sécrétrice de SCF). Résultats exprimés en intensités de fluorescence moyenne (MFI).

Toutefois, nous avons pu observer que les CHO exprimant stablement les formes mutantes de KIT fusionnées à l'EGFP émettaient très peu de signal GFP en cytométrie en flux (figure 37 gauche), alors que le tag GFP est bien détecté en Western blot (figure 33). Ceci est probablement lié à la sensibilité de l'intensité de fluorescence de la GFP aux variations de pH ; les mutants de KIT étant majoritairement localisés dans le cytoplasme de la cellule (figure 36 droite), et l'EGFP pouvant perdre sa fluorescence dans cet environnement acide (Llopis et al., 1998), le signal EGFP est très faible en cytométrie pour les mutants. La fusion à l'EGFP, qui avait été conçue à la fois pour localiser par microscopie et évaluer la quantité de KIT totale par cytométrie, présente donc un intérêt limité dans le cas des fusions à KIT mutant pour la quantification de KIT.

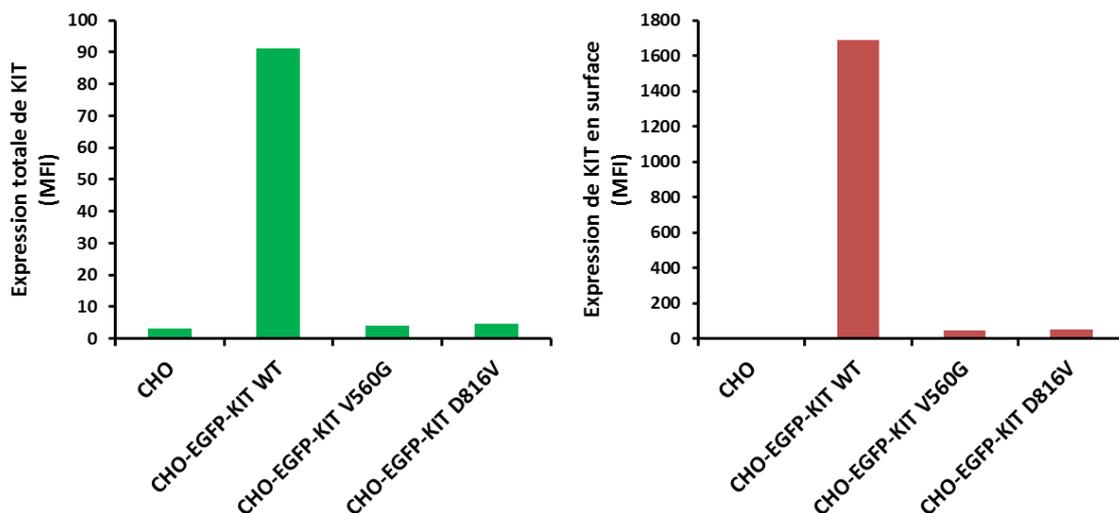


Figure 37 : analyse par cytométrie en flux de l'expression totale et membranaire de KIT dans les 4 lignées de CHO exprimant stablement EGFP-KIT ou non. On observe un faible signal pour la GFP et pour KIT membranaire (mesuré par l'anticorps anti-KIT 104D2 couplé au phycoerythrine-cyanine5 (PE/Cy5)) des CHO-EGFP-KIT mutantes par rapport aux CHO-EGFP KIT WT. Résultats exprimés en MFI.

Comme démontré en transfection transitoire, nos modèles CHO exprimant stablement KIT mutant présentent un faible taux de KIT à la surface cellulaire. La faible expression de KIT mutant observée en Western blot (figures 33 et 35) aurait pu expliquer le faible taux de KIT mutant en surface ; cependant, le ratio KIT surface/KIT total, obtenu en analysant par cytométrie en flux des cellules CHO-EGFP-KIT perméabilisées ou non et marquées à l'aide d'un anticorps anti-KIT, a confirmé 2 choses : KIT mutant est exprimé dans les CHO transfectées stablement et le faible taux de KIT mutant en surface cellulaire est dû à la présence majoritairement cytoplasmique de KIT mutant (figure 38).

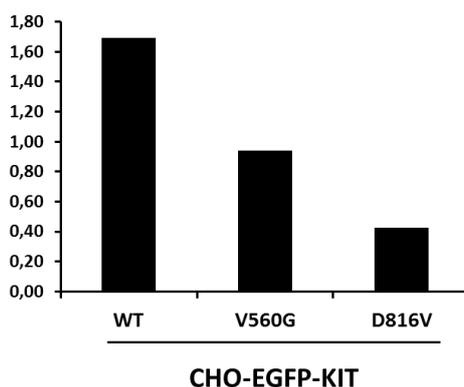


Figure 38 : ratio de l'expression en surface de KIT/l'expression totale de KIT dans les lignées CHO stables. Les cellules CHO-EGFP-KIT WT ou mutant ont été perméabilisées ou non avant d'être marquées par un anticorps anti-KIT couplé PE/Cy5 puis analysées au cytomètre en flux. Les résultats sont représentés en divisant la MFI obtenue avec l'anticorps 104D2 sur cellules non perméabilisées par la MFI obtenue avec le même anticorps sur cellules perméabilisées.

Les mêmes observations de localisation cellulaire altérée ont été observées en microscopie sur les deux lignées CHO KIT mutant stables (figure 39). Pour l'acquisition de ces images, nous avons dû augmenter l'intensité d'excitation pour les CHO-EGFP-KIT mutantes afin d'obtenir un signal détectable, puisque le signal GFP des mutants est très faible.

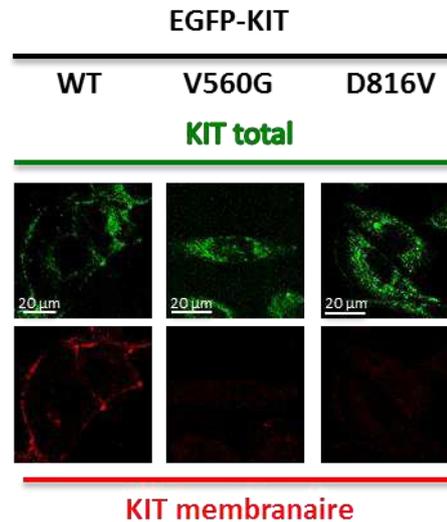


Figure 39 : analyse en IF par microscopie confocale de l'expression totale et membranaire de KIT dans les lignées de CHO stables.

L'expression totale de KIT (EGFP en vert) est observée dans les 3 lignées alors que l'expression membranaire de KIT (anticorps anti-KIT K44.2 murin puis anticorps secondaire anti-souris conjugué à l'alexa 594) n'est observée que dans les CHO-EGFP-KIT WT. Grossissement x630.

Des observations de localisation cytoplasmique des mutants de KIT ont également été décrites dans cellules de patients atteints de GIST (Tabone-Eglinger et al., 2008). Dans cette étude, il a été montré que chez les patients présentant une mutation activatrice homozygote de KIT, on retrouve plus fréquemment une expression de KIT paranucléaire que chez les formes hétérozygotes ou non mutées. Le mutant D816V a aussi été décrit à localisation intracellulaire chez les patients atteints de MS (Bougherara et al., 2013).

Ceci montre que les modèles d'étude développés au laboratoire sont représentatifs de la biologie des pathologies impliquant des mutants oncogéniques de KIT. Toutefois, un article récent a montré que le pattern de glycosylation de cellules hétérozygotes KIT WT/KIT mutant était plus proche des hémizygotés KIT que des hémizygotés mutantes, c'est-à-dire qui ne présentent qu'une copie du gène (Brahimi-Adouane et al., 2013). Nos modèles cellulaires d'étude sont hémizygotés et la majorité des GIST sont hétérozygotés pour KIT, portant un allèle WT et un allèle muté. Il est donc important de garder en tête ces différences entre KIT hétérozygote et hémizygoté lors de l'interprétation de nos résultats.

Il a été montré que l'expression du récepteur WT à la membrane dépendait d'une maturation qui a lieu au niveau du RE (Brahimi-Adouane et al., 2013). Il semble donc que l'activation précoce des récepteurs mutants, alors qu'ils sont encore situés dans le cytoplasme, ne leur laisse pas le temps d'être complètement glycosylés ; dès les premières

étapes de leur synthèse, ils seraient phosphorylés, signaliseraient et seraient dégradés sans avoir le temps d'atteindre la surface cellulaire.

2. Relocalisation des mutants de KIT par traitement aux ITK

Après avoir observé une localisation altérée des mutants de KIT, nous avons étudié l'effet de traitement aux ITK sur celle-ci. Nous avons observé par cytométrie que le traitement de nos modèles CHO par différents ITK (1 h – 1 μ M – 37°C) induisait la relocalisation membranaire de KIT mutant. L'imatinib, qui est actif sur les mutants régulateurs mais pas sur le D816V, n'entraîne la relocalisation que du mutant V560G. Le dasatinib, qui a un spectre d'action plus large, inhibant l'activité kinase des 2 types de mutants, relocalise le V560G et le D816V (figure 40). Aucun effet n'a été observé sur les CHO-EGFP-KIT WT dans les mêmes conditions (non montré).

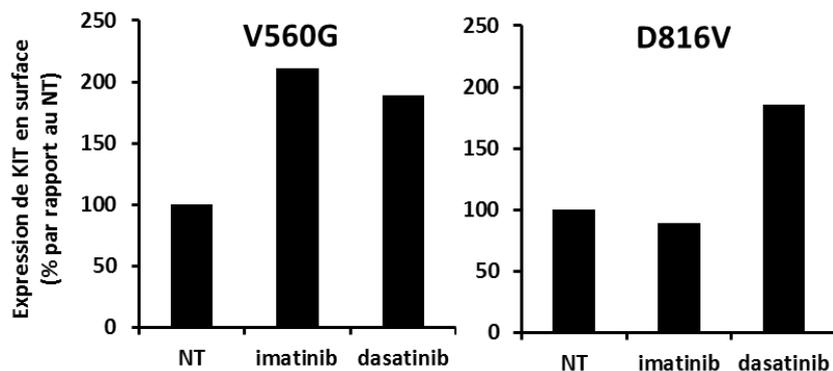


Figure 40 : analyse par cytométrie en flux de l'expression membranaire de KIT dans les lignées CHO stables après traitement aux ITK.

Les cellules CHO-EGFP-KIT ont été traitées 1 h à l'imatinib ou au dasatinib (1 μ M) puis l'expression de KIT à la surface a été mesurée grâce à l'anticorps 104D2 couplé à la PE/Cy5. Les résultats sont exprimés en % par rapport à la MFI des cellules non traitées (NT).

Ces observations ont été confirmées par une analyse en IF des 3 lignées CHO-EGFP-KIT traitées 2 h à 0,5 μ M d'imatinib ou dasatinib (figure 41). L'expression membranaire du mutant V560G est restaurée par les deux inhibiteurs, celle du mutant D816V par le dasatinib uniquement. Ceci suggère que la modulation de la localisation du mutant par un ITK dépend de sa sensibilité à celui-ci.

EGFP-KIT

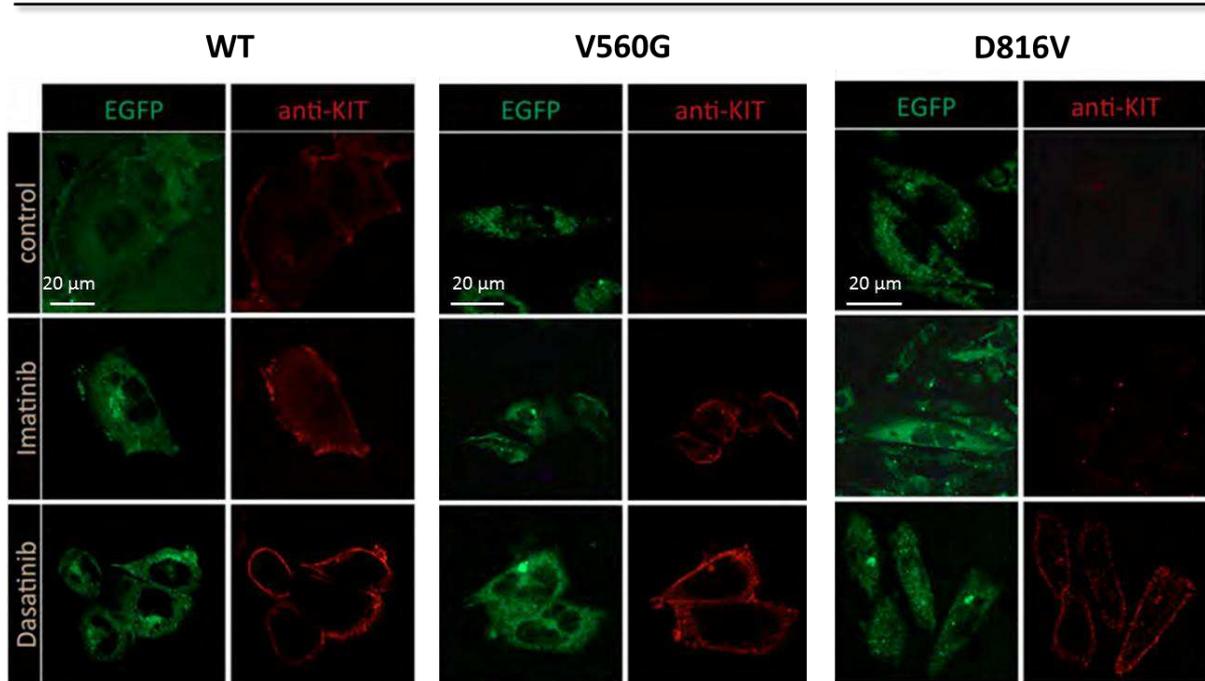


Figure 41 : analyse en IF par microscopie confocale de l'expression membranaire de KIT dans les lignées CHO stables après traitement aux ITK.

Traitement des cellules à l'imatinib ou au dasatinib (2 h à 0,5 µM). Expression de KIT total en vert (EGFP), expression membranaire de KIT en rouge (anticorps anti-KIT K44.2 puis anticorps anti-souris couplé à l'alexa 594). Contrôle : cellules non traitées. Grossissement x630.

Nous avons pu observer que cette relocalisation de KIT mutant induite par les ITK était associée à une déphosphorylation de celui-ci et des protéines de signalisation associées (figure 42). L'imatinib à 1 µM conduit à une déphosphorylation de KIT V560G, ainsi que d'Erk2. Le dasatinib est actif à de plus basses concentrations (à partir de 100 nM), il inhibe la phosphorylation de KIT V560G ainsi que de STAT5 et Erk2. Le mutant D816V, quant à lui, est résistant à l'imatinib qui n'a aucun effet sur la phosphorylation de KIT ni sur celles des protéines de la signalisation associée. En revanche, le dasatinib entraîne une forte diminution de la phosphorylation de KIT D816V, STAT5 et Akt à 1 µM. Ces résultats indiquent que le phénomène de relocalisation des mutants par les ITK est corrélé à l'inhibition de leur activité kinase. Nous avons donc émis l'hypothèse suivante : l'inhibition de l'activité kinase de KIT mutant entraînerait sa relocalisation à la membrane plasmique.

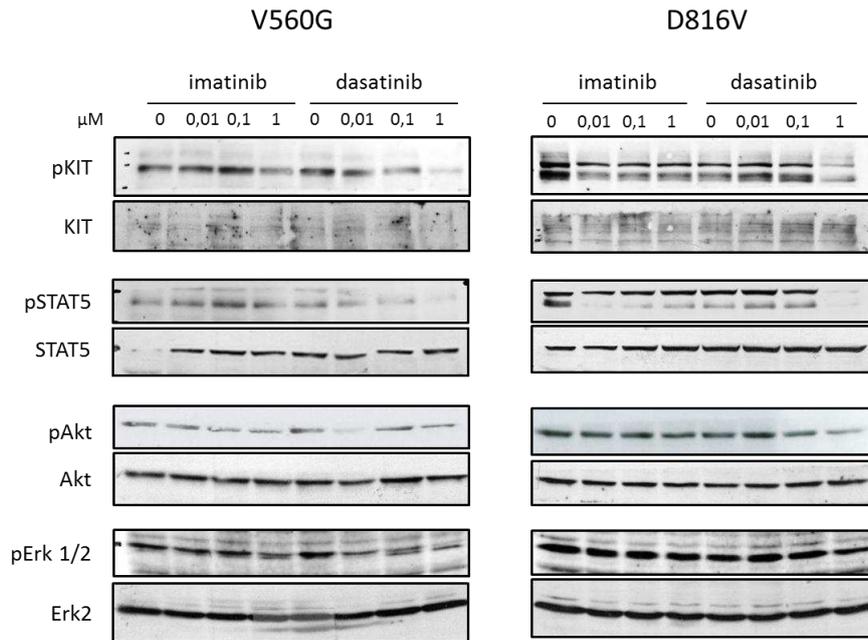


Figure 42 : analyse par Western blot de la signalisation des lignées CHO-EGFP-KIT mutant après traitement aux ITK.

Les cellules ont été traitées par de l'imatinib ou du dasatinib (concentrations en nM) pendant 2 h. Les extraits ont été réalisés sur des cellules déprivées pendant 12 h puis la phosphorylation des protéines KIT, STAT5, Akt et Erk2 a été évaluée à l'aide des anticorps correspondants. Les membranes ont ensuite été déshybridées puis incubées avec les anticorps anti-KIT, STAT5, Akt et Erk 1/2, permettant d'évaluer la quantité totale de ces protéines.

Nous avons réalisé la même expérience sur les cellules CHO-EGFP-KIT WT cultivées en présence de SCF (surnageant de la lignée CHO-KL sécrétrice de SCF). Le dasatinib diminue la phosphorylation induite par le SCF de KIT WT et des protéines de signalisation partenaires (STAT5, Akt et Erk) à partir de 100 nM. Un dépôt d'une quantité de protéines plus faible pour la condition traitée à l'imatinib à 1 μM ne permet pas de conclure sur ce point. En revanche, contrairement au dasatinib, à 100 nM, l'imatinib n'induit aucun effet sur la phosphorylation de KIT WT ni des protéines de signalisation en aval (figure 43). Ceci correspond aux données de la littérature démontrant que le dasatinib est actif à des concentrations plus faibles que l'imatinib.

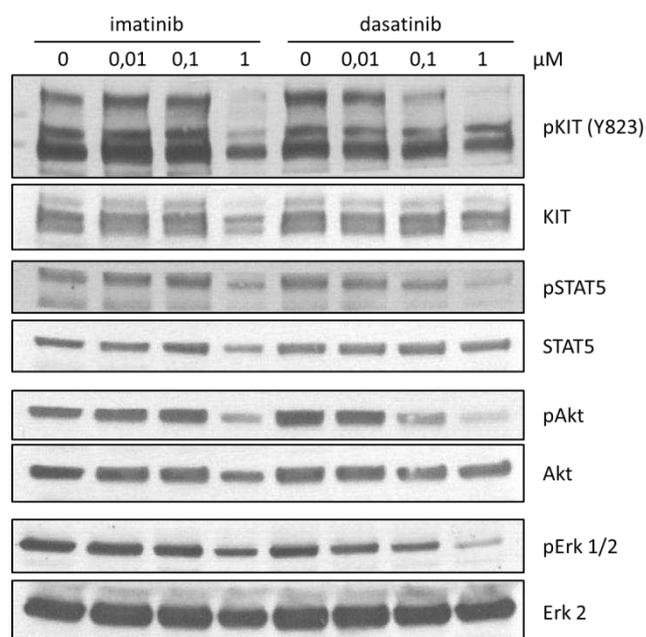


Figure 43 : analyse par Western blot de la signalisation de la lignée CHO-EGFP-KIT WT après traitement aux ITK.

Les cellules CHO-EGFP-KIT WT cultivées en présence de SCF ont été traitées par de l'imatinib ou du dasatinib (concentrations en nM) pendant 2 h. Les extraits ont été réalisés sur des cellules déprivées pendant 12 h puis la phosphorylation des protéines KIT, STAT5, Akt et Erk2 a été évaluée à l'aide des anticorps correspondants. Les membranes ont ensuite été déshybridées puis incubées avec les anticorps anti-KIT, STAT5, Akt et Erk 1/2, permettant d'évaluer la quantité totale de ces protéines.

Des travaux réalisés au LBPA ont montré que, tout comme dans nos modèles CHO, on pouvait observer une relocalisation de KIT mutant D816V à la membrane lors de traitement au dasatinib dans des échantillons de patients atteints de mastocytose systémique (Bougherara et al., 2013). Nos lignées CHO présentent donc des caractéristiques fonctionnelles communes avec des échantillons de patients, ce qui en fait un modèle d'étude relevant.

3. Mise au point d'un test de criblage fonctionnel

A partir de ces observations, nous avons souhaité exploiter cette propriété de relocalisation de KIT mutant pour mettre au point un test de criblage fonctionnel ; le but étant de cribler des chimiothèques par cytométrie et de sélectionner les molécules qui relocalisent un ou les 2 mutants. Les molécules sélectionnées seraient potentiellement inhibitrices de KIT mutant.

Pour cela, nous avons réalisé des études cinétiques et de dose-réponse avec des inhibiteurs décrits comme actifs sur certains mutants de KIT, afin de déterminer les conditions expérimentales optimales.

- Cinétique

Après avoir ensemencé les 3 lignées de CHO, nous les avons incubées avec l'imatinib ou le dasatinib (0,5 μ M) pendant différents temps : 15 min, 30 min, 1 h, 1,5 h, 2 h, 2,5 h, 3 h, 4 h et 8 h. A la fin du temps d'incubation, les cellules ont été trypsinées, lavées et marquées à l'aide de l'anticorps anti-KIT 104D2 PE/Cy5 (figure 44).

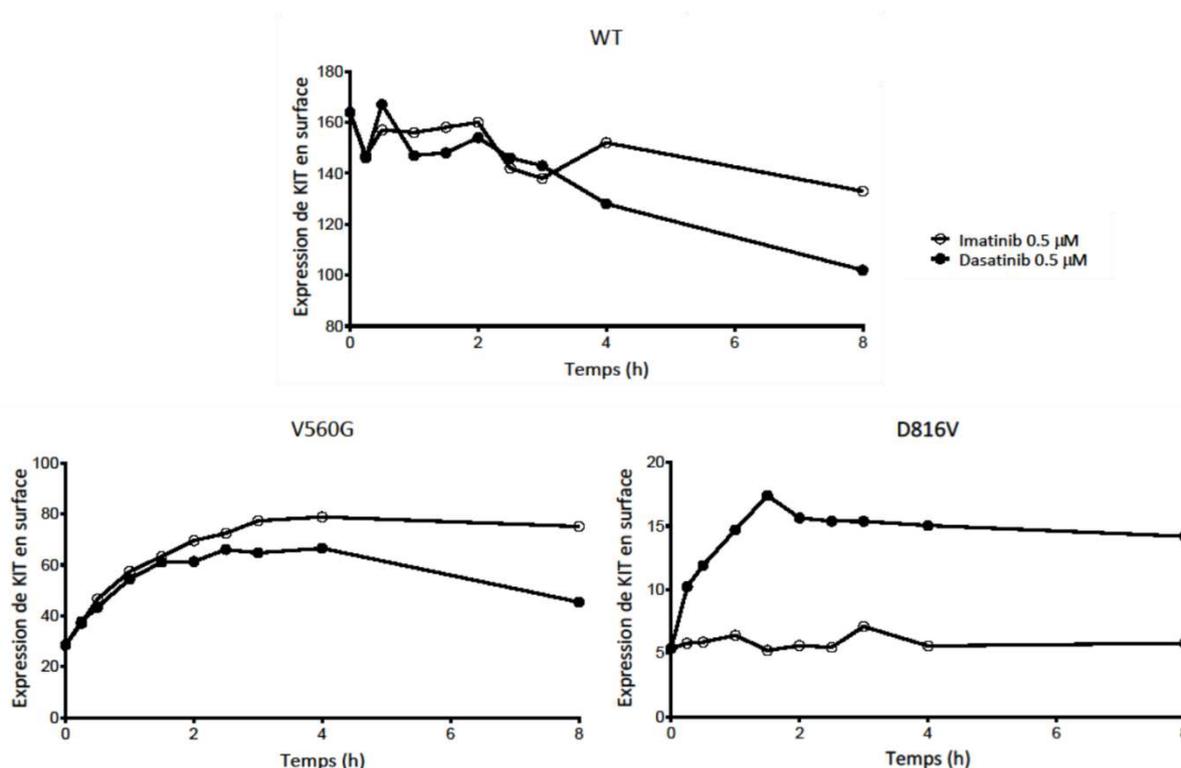


Figure 44 : étude cinétique de l'expression membranaire de KIT par cytométrie en flux après traitement aux ITK des lignées CHO stables.

Les 3 lignées stables CHO ont été traitées à l'imatinib (cercles vides) ou au dasatinib (cercles pleins) (0,5 μ M) pendant les temps indiqués. L'expression de KIT en surface a été évaluée par l'anticorps anti-KIT 104D2 –PE/Cy5. Les résultats sont exprimés en MFI.

Nous avons pu observer que le dasatinib entraîne une relocalisation membranaire des 2 mutants de KIT dès 15 min de traitement ; celle-ci est maximum à 2 h, temps auquel on atteint un plateau. L'imatinib relocalise uniquement le mutant V560G, avec une cinétique similaire à celle du dasatinib. On peut noter que le traitement des CHO-EGFP-KIT WT par les 2 ITK induit une diminution de l'expression en surface de KIT à partir de 2,5 h ; ce phénomène a été décrit récemment dans une étude qui a montré que le ciblage de la poche ATP par l'imatinib induisait l'internalisation et la dégradation de KIT WT sans stimulation au SCF (D'allard et al., 2013). Nous retrouvons ce phénomène avec le dasatinib également.

Cette étude cinétique nous a permis de déterminer le temps minimal d'incubation nécessaire pour induire la relocalisation maximale sur les 2 mutants. Les expériences suivantes ont donc été réalisées à 2 h d'incubation.

- Dose-réponse

Les 3 lignées CHO ont été incubées avec l'imatinib ou le dasatinib pendant 2 h à différentes concentrations : 1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 μ M ou 10 μ M. Comme précédemment, à la fin des 2 h d'incubation, les cellules ont été trypsinées, lavées et marquées à l'aide d'un anticorps anti-KIT (figure 45).

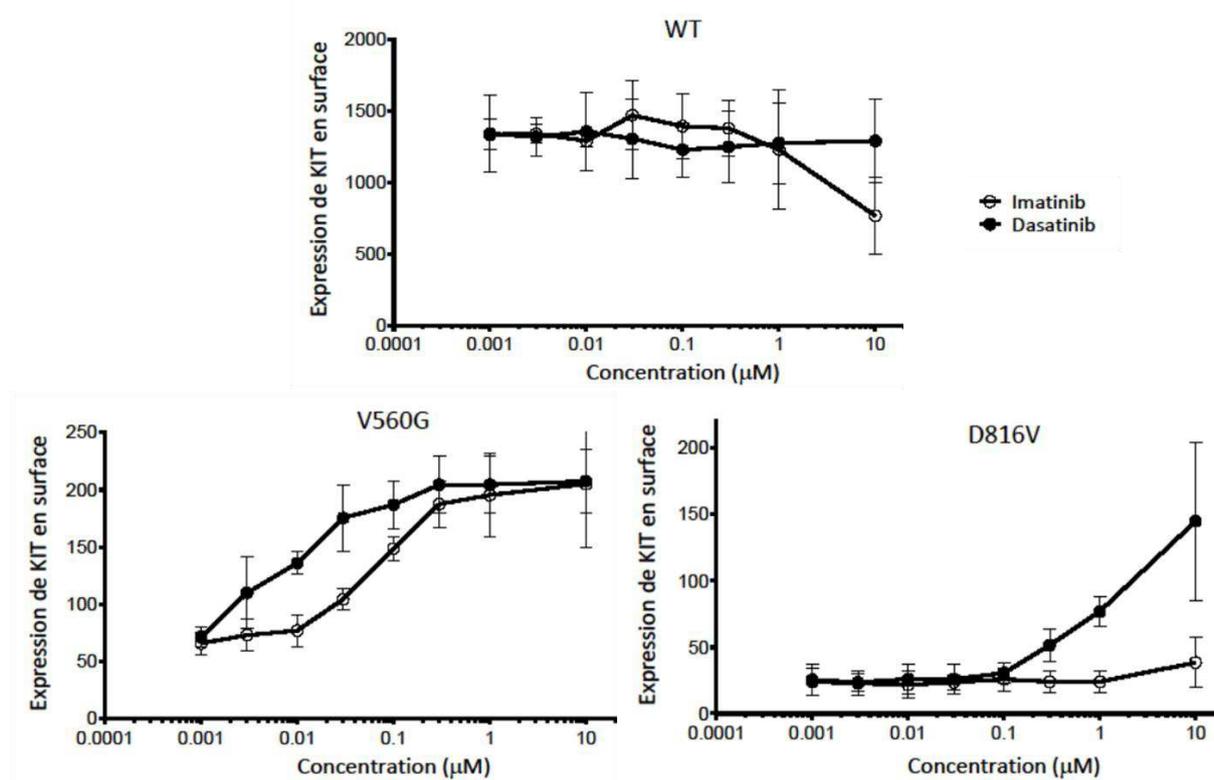


Figure 45 : analyse par cytométrie en flux de la relocalisation de KIT en surface après traitement à différentes concentrations d'ITK des lignées CHO stables.

Les 3 lignées CHO ont été traitées à l'imatinib ou au dasatinib pendant 2 h puis marquées à l'aide d'un anticorps anti-KIT couplé PE/Cy5. Les résultats sont exprimés en MFI.

Nous avons observé que le dasatinib relocalise les mutants de D816V et V560G à partir des concentrations 300 nM et 3 nM respectivement. Ces résultats sont en accord avec la littérature qui montre que le mutant D816V nécessite généralement des concentrations d'ITK plus élevées que les autres mutants pour être inhibé (table 5) (Schittenhelm et al., 2006). L'imatinib n'est actif que sur le mutant V560G qu'il relocalise à partir de 30 nM. Il a déjà été décrit que l'imatinib possède une IC50 plus élevée que le dasatinib en termes d'inhibition de l'activité kinase de KIT V560G (table 5). L'imatinib et le dasatinib entraînent une relocalisation maximale à 300 nM environ chez le mutant V560G. En revanche, nous n'avons pas atteint le plateau avec le mutant D816V, même à 10 μ M de dasatinib, ce qui indique une fois de plus la faible sensibilité du mutant D816V aux ITK compétiteurs de l'ATP. Ici encore on peut observer que l'imatinib à forte concentration (10 μ M) induit une internalisation de KIT WT, liée à l'occupation du site ATP.

	V560G	D816V
imatinib	10-100 nM	> 10 μ M
dasatinib	1-50 nM	100 nM

Table 5 : IC50 de l'imatinib et du dasatinib pour l'inhibition de l'activité kinase sur les mutants V560G et D816V de KIT (Schittenhelm et al., 2006).

Ces 2 expériences nous ont permis de définir le temps optimal (2 h) pour notre test de détection de relocalisation de KIT ainsi que de montrer que nos lignées KIT mutantes sont sensibles ou résistantes aux différents types d'ITK pour la modulation de la localisation de KIT à des concentrations corrélées à ce qui a été décrit dans de précédentes études sur l'activité des ITK sur KIT.

Il est important de noter que certains ITK sont colorés, comme le sunitinib par exemple dont la solution est orangée. Ces molécules colorées ont une fluorescence propre qui ne permet pas de mesurer KIT en surface à l'aide d'un anticorps fluorescent. En effet, la fluorescence de la molécule interfère avec celle de l'anticorps et biaise le résultat. Ces molécules sont donc à exclure de notre test afin d'éviter la sélection de faux positifs.

Nous avons par la suite essayé d'améliorer le test pour qu'il soit plus rapide et plus simple à réaliser pour tester un grand nombre de molécules à la fois. Jusque-là, nous travaillions sur cellules adhérentes en plaques 24 puits, ce qui impliquait d'ensemencer les cellules la veille et de les trypsiner à la fin du traitement. Nous avons testé un nouveau format utilisant des cellules en suspension : pour cela, nous trypsinons les cellules au début de l'expérience et en dispensons $2 \cdot 10^5$ par puits dans une plaque 96 puits à fond rond, avant incubation avec les drogues à 37°C. Les étapes de lavage, centrifugation et marquage se font directement dans les plaques 96 puits. Les cellules sont transvasées dans une plaque 96 puits à fond plat à la pipette multicanaux juste avant analyse au cytomètre (Cell Lab Quanta – Beckman Coulter).

Afin de valider ce format avec cellules en suspension, nous l'avons testé avec quelques ITK utilisés en clinique à savoir l'imatinib et le dasatinib comme précédemment, ainsi que le sorafenib et le nilotinib. Le sorafenib, tout comme l'imatinib, est actif sur les mutants de l'exon 11 comme le V560G, mais pas sur ceux du codon 816 (Heinrich et al., 2012). Le nilotinib quant à lui, est décrit pour être actif sur les mutants de l'exon 11 également et sur ceux de l'exon 17 dans certaines études (von Bubnoff et al., 2005; Gleixner et al., 2006).

L'imatinib et le nilotinib sont des dons du Dr Serge Roche (CRBM – Montpellier) et le dasatinib vient de chez Santa Cruz. Le sorafenib a été préparé à partir de comprimés destinés aux patients. Après broyage et pesée il a été dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) pour préparer la solution mère qui a ensuite été diluée comme les autres inhibiteurs afin de traiter les cellules. Les cellules ont été incubées 2 h à 37°C à différentes concentrations d'inhibiteurs : 10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM et 1 μ M (figure 46).

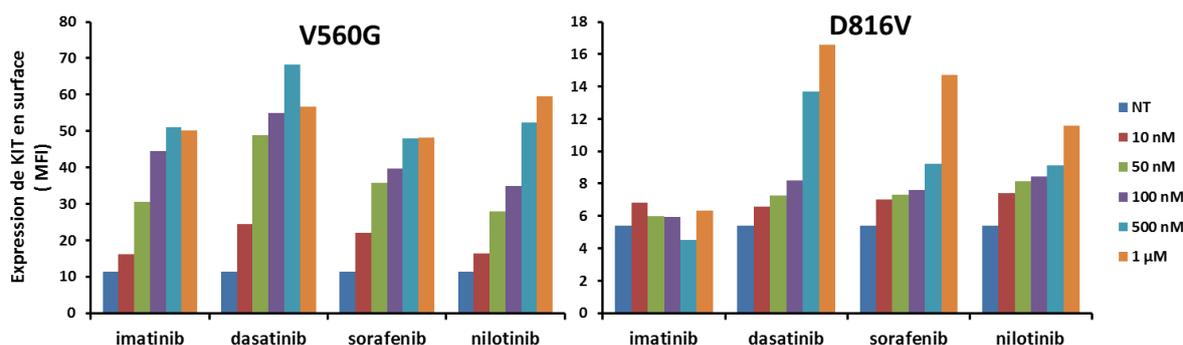


Figure 46 : analyse par cytométrie en flux de la relocalisation de KIT mutant en surface après traitement à différentes concentrations d'ITK des lignées CHO stables.

Les cellules CHO-EGFP-KIT V560G et D816V ont été traitées 2 h avec différents ITK aux concentrations indiquées puis marquées à l'aide de l'anticorps anti-KIT 104D2-PE/Cy5. Les résultats sont exprimés MFI. NT, non traité.

Comme attendu, dans ce format en suspension, l'imatinib et le dasatinib induisent une relocalisation de KIT V560G, mais seul le dasatinib relocalise le mutant D816V. La relocalisation du mutant V560G atteint un plateau avec l'imatinib, le dasatinib et le sorafenib à 100 nM, 50 nM et 500 nM respectivement. Le nilotinib et le sorafenib relocalisent les 2 mutants, dès 10 nM mais sans atteindre de plateau pour le mutant D816V : nous ne pouvons donc pas estimer d' IC_{50} ; le nilotinib a été montré comme inhibant la prolifération de lignée Ba/F3 KIT D814V à une IC_{50} de 750 nM (Ustun et al., 2011). Le sorafenib a été décrit comme inhibant la phosphorylation de KIT V560G dans un modèle CHO à une concentration inférieure à 100 nM et comme étant inactif sur le mutant D816V (Heinrich et al., 2012). Toutefois, dans notre modèle, nous observons une forte relocalisation membranaire du mutant D816V lors du traitement par le sorafenib à 1 µM.

Pour conclure, nous avons mis au point un test de criblage de molécules par cytométrie à moyen débit qui présente de nombreux avantages :

- Son format est simple d'utilisation et rapide puisque toutes les étapes (incubations, centrifugations, marquage) se font en directement en plaque 96 puits.
- C'est un test cellulaire qui évalue l'effet des molécules directement sur des cellules vivantes ; il est donc plus physiologique qu'un test réalisé sur kinase recombinante.
- Il est cible-spécifique, puisqu'il analyse l'effet du traitement directement sur KIT, au contraire d'un test basé sur une inhibition de prolifération cellulaire.

4. Criblage de la chimiothèque Screen-Well Kinase Inhibitor Library (Enzo Life Sciences)

Nos précédents résultats nous poussent à penser que les molécules qui induisent une relocalisation de KIT à la surface cellulaire agissent possiblement en inhibant son activité kinase. C'est pourquoi nous avons utilisé notre test pour cribler une chimiothèque d'inhibiteurs pharmacologiques afin d'identifier de nouvelles molécules agissant sur la localisation de KIT, potentiellement utilisables pour inhiber la signalisation KIT oncogénique.

Nous avons choisi de cribler la chimiothèque Screen-Well® Kinase Inhibitor Library (Enzo Life Sciences) composée de 80 inhibiteurs de kinases (cf annexe 2). Pour débiter les criblages avec notre test, nous avons choisi une chimiothèque de taille limitée, afin de pouvoir ajuster tous les paramètres lors de cette première expérience. Par la suite, nous souhaiterions passer au format 384 puits pour pouvoir cribler de plus larges chimiothèques. De plus, pour ce premier choix, nous avons choisi une chimiothèque orientée, qui ne contient que des inhibiteurs de kinases. Les inhibiteurs de kinases n'étant jamais totalement spécifiques d'une seule cible, nous pensons avoir une forte probabilité de sélectionner des molécules potentiellement inhibitrices de KIT dans ce type de chimiothèque.

La plaque mère qui contient les drogues à 10 mM en DMSO est stockée à -80°C ; nous l'avons aliquotée et diluée à différentes concentrations grâce à une plateforme robotisée de l'institut dans l'optique de réaliser plusieurs criblages dans différentes conditions.

Nous avons réalisé un criblage à 100 nM et un à 1 µM sur les 3 lignées CHO-EGFP-KIT. Nous avons choisi arbitrairement de sélectionner les drogues qui augmentent l'expression de KIT en surface de plus de 25 % par rapport aux cellules non traitées. Nous avons utilisé le DMSO dilué aux mêmes concentrations que les drogues comme contrôle négatif ; l'imatinib et le dasatinib nous ont servi de contrôle positif de relocalisation (figure 47).

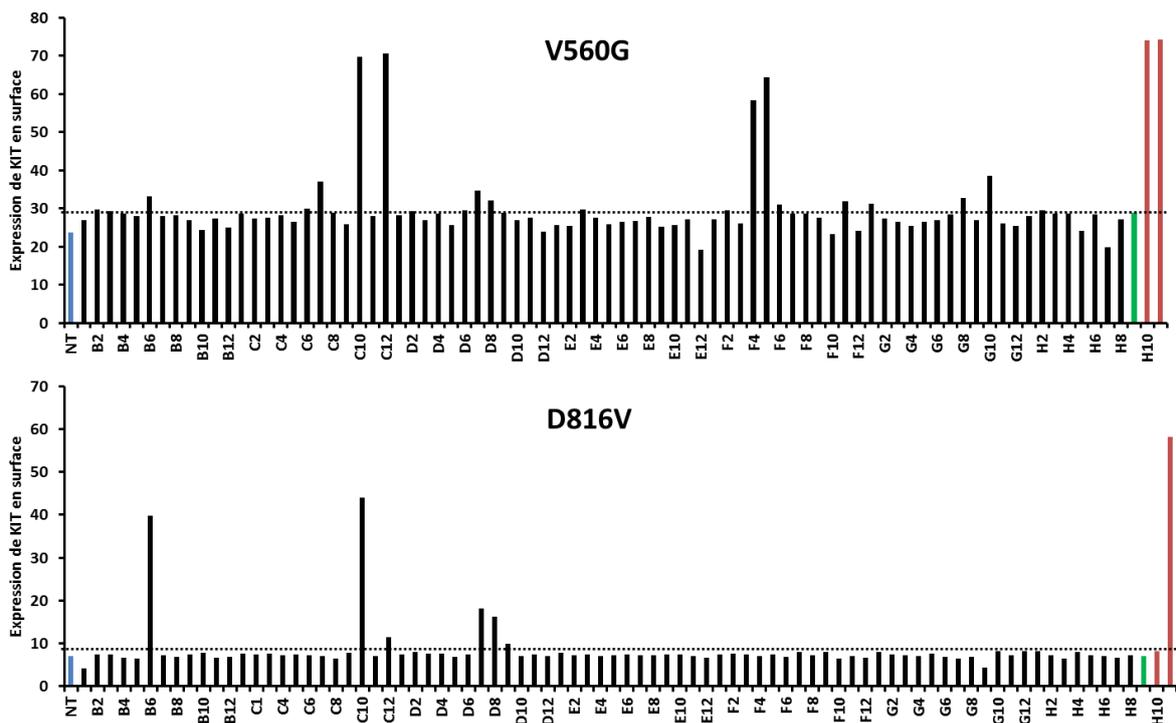


Figure 47 : analyse par cytométrie en flux de la relocalisation de KIT mutant en surface après traitement par la chimiothèque à 1 μ M des lignées CHO stables. Les cellules CHO-EGFP-KIT V560G et D816V ont été traitées par les drogues de la chimiothèque pendant 2 h à 1 μ M à 37°C puis marquées à l’aide de l’anticorps anti-KIT 104D2 couplé PE/Cy5. H9 DMSO en contrôle négatif (vert) ; H10 imatinib (rouge) ; H11 dasatinib (rouge) ; NT non traitées (bleu). Le seuil de positivité (pointillé) est fixé à 25 % de relocalisation par rapport aux cellules non traitées. Les résultats sont exprimés en MFI.

Le criblage de la chimiothèque à 1 μ M nous a permis de sélectionner 5 molécules relocalisant les 2 mutants. De plus, 10 inhibiteurs relocalisent le mutant V560G et une le mutant D816V (table 6). Le mutant de KIT D816V est décrit pour être plus difficile à inhiber, nécessitant souvent des concentrations d’inhibiteur plus importantes. Il paraît donc logique que nous ayons sélectionné moins d’inhibiteurs relocalisant le mutant D816V que le mutant V560G.

	V560G	D816V
staurosporine	+	+
PKC-412	+	+
PP1	+	+
PP2	+	-
tyrphostine AG 1478	+	-
tyrphostine AG 1295	+	-
GF 109203X	+	+
lavendustine C	+	-
ZM 336372	+	-
SU 4312	+	-
génistéine	+	-
analogue de l'erbstatine	+	-
hypericine	+	+
Ro 31-8220	-	+
SP 600125	+	-
indirubin-3'-monooxime	+	-

Table 6 : molécules de la chimiothèque relocalisant KIT mutant à la surface cellulaire à 1 μ M.

Le criblage de la chimiothèque sur les cellules CHO-EGFP-KIT WT dans les mêmes conditions indique que, comme précédemment observé lors de courts traitements à l'imatinib ou au dasatinib, l'expression de KIT WT en surface ne varie pas de façon significative (non montré). Nous avons réalisé la même expérience sur des cellules CHO-EGFP-KIT WT cultivées en présence de SCF 24 h avant le test. L'activation de KIT WT par le SCF induit son internalisation (figure 36) qui mène à sa dégradation. L'inhibition de l'activité kinase de récepteur WT entraîne une relocalisation, tout comme avec les mutants de KIT (figure 48). Le criblage de la chimiothèque sur KIT WT activé nous a permis de sélectionner 6 molécules le relocalisant : PD-98059, tyrphostine 46, staurosporine, PKC412, PP1 et ZM 336372. Ces 4 dernières molécules ont déjà été sélectionnées dans le criblage sur les mutants de KIT ; la staurosporine, le PKC412 et le PP1 relocalisent les 2 mutants et le ZM 336372 relocalise le mutant V560G.

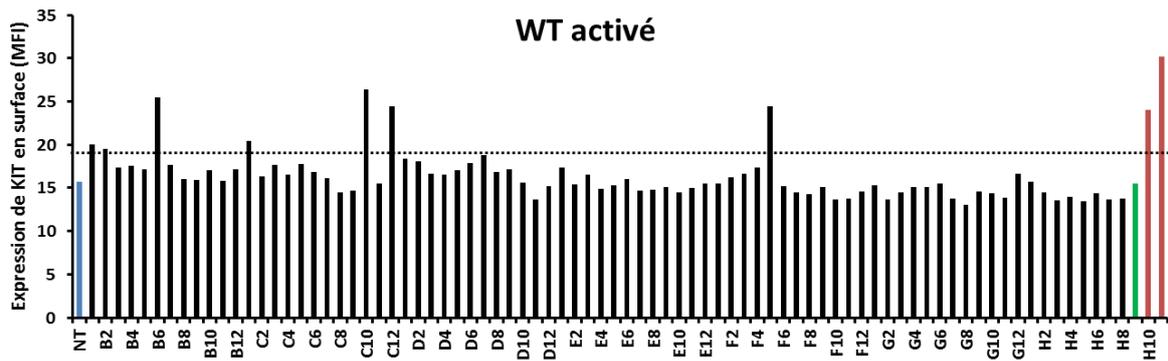


Figure 48 : analyse par cytométrie en flux de la relocalisation de KIT WT activé en surface après traitement par la chimiothèque à 1 μ M des lignées CHO stables. Les cellules CHO-EGFP-KIT WT ont été cultivées en présence de SCF et traitées par les drogues de la chimiothèque pendant 2 h à 1 μ M à 37°C puis marquées à l'aide de l'anticorps anti-KIT 104D2 couplé PE/Cy5. H9 DMSO en contrôle négatif (vert), H10 imatinib (rouge), H11 dasatinib (rouge), NT non traitées (bleu). Le seuil de positivité (pointillé) est fixé à 25 % de relocalisation par rapport aux cellules non traitées. Les résultats sont exprimés en MFI.

Dans le but de sélectionner des molécules ayant un effet spécifique sur KIT et également pouvant être administrées à de plus faibles concentrations chez le patient, le même protocole a été réalisé pour cribler la chimiothèque à 100 nM (figure 49).

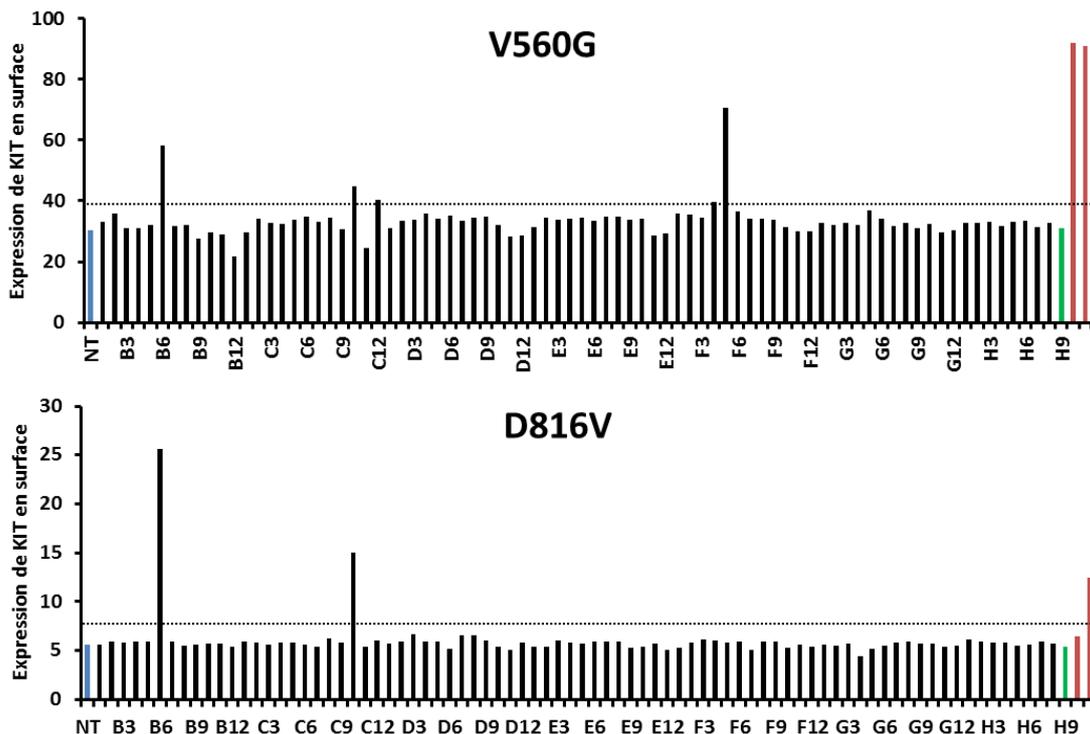


Figure 49 : analyse par cytométrie en flux de la relocalisation de KIT mutant en surface après traitement par la chimiothèque à 100 nM des lignées CHO stables. Les cellules CHO-EGFP-KIT V560G et D816V ont été traitées par les drogues de la chimiothèque pendant 2 h à 100 nM à 37°C puis marquées à l'aide de l'anticorps anti-KIT 104D2 couplé PE/Cy5. H9 DMSO en contrôle négatif (vert), H10 imatinib (rouge), H11 dasatinib (rouge), NT non traitées (bleu). Les résultats sont exprimés en MFI.

A 100 nM, nous n'avons retrouvé qu'un nombre limité d'inhibiteurs relocalisant les mutants de KIT. En effet, seuls la staurosporine et le PKC-412 sont actifs sur le mutant D816V. Ils sont également actifs sur le mutant V560G, tout comme les molécules PP1, PP2 et ZM 336372 (table 7).

	V560G	D816V
staurosporine	+	+
PKC-412	+	+
PP1	+	-
PP2	+	-
ZM 336372	+	-

Table 7 : molécules de la chimiothèque relocalisant les mutants de KIT à la surface cellulaire à 100 nM.

Parmi ces molécules que nous avons sélectionnées, plusieurs sont des solutions colorées : le GF 109203X, le SU 4312, l'hypericine, le SP 600125 et l'indirubine-3'-monooxime. Afin de vérifier la spécificité du test, les données ont systématiquement été répétées sur cellules Raji, une lignée issue d'un patient atteint de lymphome de Burkitt, non marquées avec l'anticorps anti-KIT. Ainsi, nous avons écarté le GF 109203X et l'hypericine qui augmentent la fluorescence des cellules indépendamment du marquage par l'anticorps anti-KIT (figure 50).

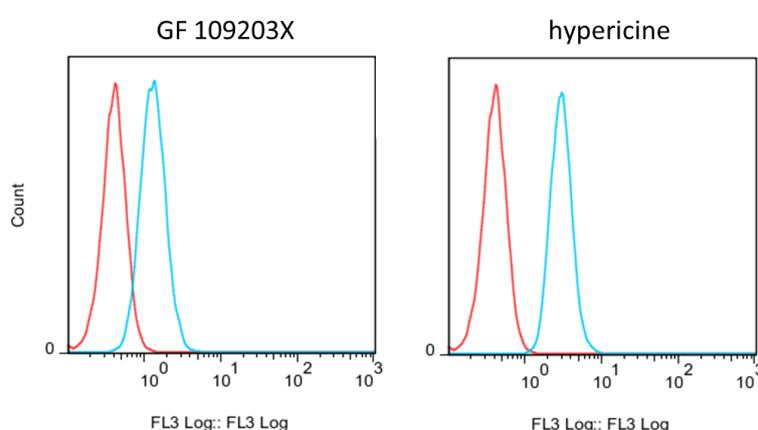


Figure 50 : analyse par cytométrie de l'effet du GF 109203X et de l'hypericine sur la fluorescence de cellules Raji.

Les cellules Raji ont été incubées 2 h à 37 °C avec du GF 109203X et de l'hypericine (1 µM). La fluorescence due aux drogues a été évaluée par mesure directe au cytomètre, sans marquage par anticorps. En rouge, contrôle non traité.

Les résultats du criblage par notre test sont parfois non-spécifiques pour les drogues colorées. Lors du futur criblage d'autres chimiothèques, il faudra prendre en compte cette limite du test. La chimiothèque devra d'abord être testée sur le modèle cellulaire avec une analyse en cytométrie en flux des cellules après incubation avec les drogues.

Les différents criblages de cette chimiothèque de 80 inhibiteurs de kinases nous ont permis de sélectionner 3 molécules relocalisant les 2 mutants, 10 relocalisant le mutant V560G

seulement et une qui, de manière tout à fait intéressante, relocalise le mutant D816V, impliqué dans les mastocytoses pour lesquelles il n'existe pas de traitement curatif (table 8).

	V560G		D816V	
	100 nM	1 µM	100 nM	1 µM
staurosporine	+	+	+	+
PKC-412	+	+	+	+
PP1	+	+	-	+
PP2	+	+	-	-
tyrphostine AG 1478	-	+	-	-
tyrphostine AG 1295	-	+	-	-
lavendustine C	-	+	-	-
ZM 336372	+	+	-	-
SU 4312	-	+	-	-
génistéine	-	+	-	-
analogue de l'erbstatine	-	+	-	-
Ro 31-8220	-	-	-	+
SP 600125	-	+	-	-
indirubin-3'-monooxime	-	+	-	-

Table 8 : récapitulatif des molécules de la chimiothèque relocalisant les mutants V560G et D816V.

Les molécules de la chimiothèque sont toutes des inhibiteurs de kinases qui ne sont pas encore approuvées en clinique.

- Les inhibiteurs sélectionnés par le test ont, pour 5 d'entre eux, déjà été décrits dans la littérature comme inhibant KIT :

La **staurosporine** est un composé à très large spectre d'action qui inhibe environ 80 % des kinases, ce qui limite son utilisation en clinique. Elle reste un outil très utile en recherche, où elle est utilisée pour induire l'apoptose. Le **PKC-412** (cf introduction partie II 1.a. Inhibiteurs de tyrosine kinase de type I) est un dérivé de la staurosporine qui a déjà été décrit comme inhibant plusieurs types de mutants de KIT (du domaine JM, de la boucle d'activation, gatekeeper). Toutefois, tout comme la staurosporine, il cible également de nombreuses kinases. L'efficacité de cette molécule a pourtant déjà été évaluée dans plus plusieurs essais cliniques, essentiellement dans des LAM où elle cible les mutants activateurs de FLT3 : ces études ont montré des taux de réponse encourageants et une toxicité acceptable de la molécule (Stone et al., 2005) (Fischer et al., 2010).

PP1 et **PP2** sont des inhibiteurs des SFK et ont été décrits comme inhibiteurs de KIT (Tatton et al., 2003). Dans ces travaux, il a été montré que les 2 molécules induisent une inhibition de l'activité kinase de KIT *in vitro* ; de plus, elles limitent la prolifération cellulaire SCF-dépendante de la lignée MO7E qui exprime KIT WT.

La **tyrphostine** (tyrosine phosphorylation inhibitor) **AG 1295** est une molécule dérivée de l'erbstatine qui inhibe le PDGFR et KIT (Kovalenko et al., 1994) mais qui est très peu décrite dans la littérature.

Ces 5 molécules déjà connues pour inhiber KIT, jouent le rôle de contrôle positif interne au test. Leur sélection par l'intermédiaire du test nous conforte dans l'idée que la relocalisation de KIT mutant observée par cytométrie correspond bien à une inhibition de son activité kinase.

- Nous avons également sélectionné 9 molécules non décrites comme inhibitrices de KIT dans la littérature :

La **tyrphostine AG 1478** dérive également de l'erbstatine ; elle est couramment utilisée en recherche *in vitro* pour ses propriétés inhibitrices de l'EGFR et a montré une activité anti-proliférative sur des lignées tumorales de différents types de cancer (Caja et al., 2011) (Han et al., 1997).

Les premiers inhibiteurs enzymatiques à avoir été découverts ont été isolés à partir de sources naturelles et présentent une faible sélectivité vis-à-vis des kinases. Nous en avons sélectionné 3 lors de notre criblage : la première, la **lavendustine C**, inhibe entre autre l'EGFR, les SFK et la Ca²⁺/calmoduline-dépendante protéine kinase II (CaMKII). Elle est utilisée *in vitro* principalement pour son rôle inhibiteur sur cette dernière kinase (Kobayashi et al., 2012) ; la CaMKII est une sérine/thréonine kinase dépendante du complexe Ca²⁺/calmoduline impliquée dans de nombreux mécanismes comme la signalisation calcique et le stress oxydatif. La seconde, un analogue de l'**erbstatine**, plus stable que la molécule d'origine, est à l'origine de la famille des tyrphostines. Cet inhibiteur d'EGFR et des SFK régule les canaux ioniques directement ou par l'intermédiaire de ses protéines cibles (Zhang et al., 2004). Enfin, la troisième, la **génistéine** est une isoflavone aux propriétés anti-oxydantes qui est extraite de nombreuses plantes, notamment du soja. Elle fut le premier composé naturel ayant montré une activité inhibitrice de l'activité kinase de l'EGFR en prenant la place de l'ATP. Cette molécule est un phytoœstrogène, elle interagit donc aussi avec le récepteur à l'œstrogène ce qui entraîne des effets endocriniens sur l'organisme. Il a été montré qu'elle possède des propriétés préventives sur les cancers du sein et de la prostate. De nombreux essais cliniques ont été menés pour tester cette molécule dans plusieurs types de cancers dont celui de la prostate (Lazarevic et al., 2011).

Le **Ro 31-8220** est un bisindolylmaleimide IX qui dérive de la staurosporine. Il inhibe les PKC et la glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) (Hers et al., 1999) et est décrit dans la littérature comme un fort inducteur de l'apoptose *in vitro* (Pajak et al., 2008) (Snowden et al., 2003). Il a été montré que Ro 31-8220 activait JNK et p38.

Le **ZM 336372** est un activateur de raf-1 et un inhibiteur de GSK-3, impliqué dans le métabolisme du glycogène. Son utilisation dans des cellules tumorales de pancréas a montré une induction de l'apoptose, due à l'inhibition de GSK-3 (Deming et al., 2010).

Le **SU 4312** est un inhibiteur de PDGFR et VEGFR, mais très peu de données sont disponibles dans la littérature.

Le **SP 600125** est un inhibiteur de JNK ; de nombreux travaux montrent une activité antiproliférative sur différents types de lignées cellulaires tumorales (Miyamoto-Yamasaki et al., 2007) (Rovida et al., 2006) (Kim et al., 2009).

L'**indirubine-3'-monooxime** est une molécule dérivée de l'indirubine qui est le composé actif d'une mixture composée d'herbes médicinales utilisée dans la médecine chinoise pour traiter les LMC (Hoessel et al., 1999) ; c'est un inhibiteur des CDK et de GSK-3 qui arrête le cycle et induit l'apoptose dans de nombreuses lignées tumorales (Lee et al., 2013). L'indirubine a été testé en Chine dans le traitement des LMC : 30 % des patients ont montré une rémission complète et 30 % une rémission partielle.

Grâce au criblage par notre test de relocalisation d'une chimiothèque orientée, nous avons sélectionné 14 molécules relocalisant un ou les 2 mutants de KIT, dont 9 non décrites dans la littérature comme inhibant KIT. Cette absence d'informations concernant leur action inhibitrice vis-à-vis de KIT vient peut-être simplement du fait qu'elles n'ont jamais été testées sur le récepteur. Le phénomène de relocalisation induit par le traitement aux inhibiteurs que nous observons est probablement lié à l'inhibition directe de l'activité tyrosine kinase de KIT. Cependant, des mécanismes alternatifs peuvent entrer en jeu dans la localisation cellulaire de KIT mutant. Nous avons observé ce même phénomène de relocalisation en traitant les cellules CHO-EGFP KIT mutant au MG132, un inhibiteur du protéasome. Il semble donc possible que des molécules modulant le trafic ou la dégradation de KIT mutant puissent être sélectionnées par ce test. Cela peut s'avérer une approche parallèle intéressante puisque les inhibiteurs de protéasome ont déjà démontré des effets inhibiteurs sur les HMC1 et des lignées de GIST (Aichberger et al., 2008; Bauer et al., 2010).

5. Validation des drogues sélectionnées

La validation des drogues sélectionnées par notre test est actuellement en cours. Nous avons choisi de tester leurs effets sur les lignées HMC1, plus « pertinentes » que les CHO au niveau physiopathologie car ce sont des cellules humaines et elles sont issues de patients. Nous avons commencé la caractérisation de 4 drogues sélectionnées, dont 3 non décrites comme inhibitrices de KIT dans la littérature : la génistéine, le ZM 336372 et le Ro 31-8220. De plus, nous utilisons le PKC412 comme contrôle positif. Nous avons tout d'abord testé l'effet de ces 4 molécules sur la prolifération des lignées HMC1.1 et HMC1.2 (figure 51).

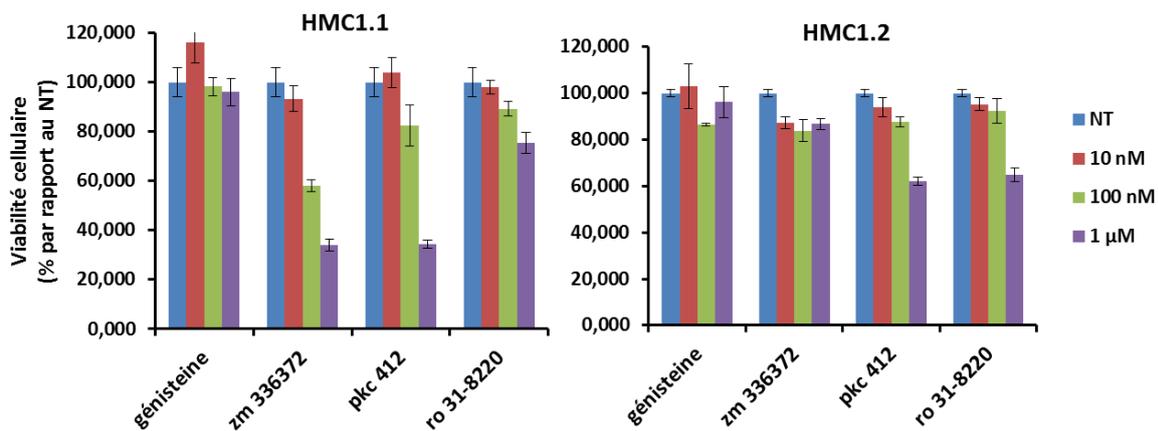


Figure 51 : étude de l'effet d'ITK sur la prolifération cellulaire des lignées HMC1 par MTS.

Les cellules HMC1.1 et HMC1.2 ont été ensemencées à 10000 cellules/puits et incubées 4 jours en milieu + 10 % SVF avec différentes drogues (génistéine, ZM 336372, PKC412 ou Ro 31-8220) aux concentrations indiquées. Les viabilités cellulaires sont exprimées en % par rapport aux cellules non traitées.

Nous avons pu observer dans ce test de prolifération que le PKC412 diminuait la prolifération des 2 lignées dès 100 nM. Le Ro 31-8220 est également actif sur les 2 lignées à 1 μM. Ce résultat est en accord avec ce que nous avons pu observer dans notre test pour le mutant D816V : ce mutant était relocalisé par le Ro 31-8220, il semble donc logique que la lignée HMC1.2, qui porte les 2 mutations V560G et D816V sur le même allèle, soit sensible à cet inhibiteur. En revanche, le Ro 31-8220 n'avait pas d'effet sur la localisation du mutant V560G dans notre test ; il est donc plus surprenant qu'il inhibe la prolifération de la lignée HMC1.1 qui porte uniquement la mutation V560G. Le ZM 336372 inhibe la croissance cellulaire de la lignée HMC1.1 dès 100 nM et n'a pas d'effet sur la lignée HMC1.2. Lors du test de criblage, cet inhibiteur agissait uniquement sur la localisation du mutant V560G ; le résultat de l'expérience de viabilité cellulaire corrèle avec celui du test. La génistéine en revanche n'a aucun effet sur la prolifération des 2 lignées. La relocalisation des mutants observée en cytométrie était peut-être liée à un effet non spécifique de la drogue ou encore à une métabolisation de la drogue par les lignées HMC1 non retrouvée dans les lignées CHO.

Pour poursuivre la validation des drogues, nous avons étudié l'effet de ces 4 inhibiteurs sur l'activation de KIT, c'est-à-dire sur sa phosphorylation (figure 52).

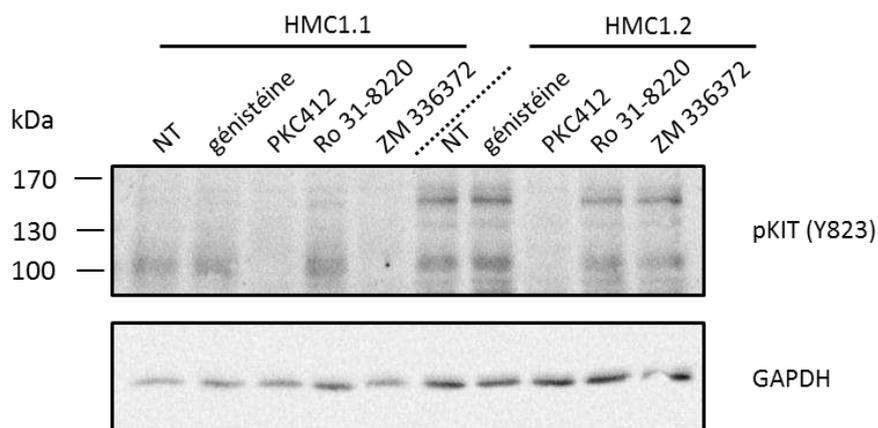


Figure 52 : analyse par Western blot de l'effet des drogues sur la phosphorylation de KIT dans les lignées HMC1.

Les cellules HMC1.1 et HMC1.2 ont été incubées 1h30 à 37°C avec les drogues indiquées à 1 µM. NT, non traitées.

Les mutations de KIT portées par les lignées HMC1 l'activent de façon constitutive, il est donc phosphorylé à l'état basal sans stimulation par le SCF. Ici encore nous avons pu observer un effet du PKC412 sur les 2 lignées : il inhibe la phosphorylation de KIT dans les 2 contextes mutationnels (V560G et V560G/D816V). Tout comme dans l'expérience de prolifération, le ZM 336372 n'est actif que dans la lignée HMC1.1. On note ici en Western blot qu'il inhibe la phosphorylation de KIT à 1h30. Les résultats obtenus avec la génistéine sont aussi concordants avec son absence d'effet sur la prolifération cellulaire puisqu'elle n'a aucun effet sur la phosphorylation de KIT dans ces lignées. Enfin, le Ro 31-8220 n'a aucun effet sur la phosphorylation de KIT dans les 2 lignées. La diminution de la prolifération observée sur ces cellules et la relocalisation observée sur la lignée CHO-EGFP-KIT D816V étaient peut-être dues à un effet non spécifique de KIT de cet inhibiteur, par exemple l'inhibition d'une autre kinase que KIT. Toutefois, la croissance de ces cellules est décrite comme dépendante de KIT ; au vu des données obtenues lors du test de criblage, on peut tout de même penser que le Ro 31-8220 a un effet inhibiteur sur KIT mutant D816V, peut-être de façon indirecte. Il peut par exemple déstabiliser le récepteur en régulant les protéines chaperonnes. En comparant les résultats des criblages sur KIT mutant et sur KIT WT activé, on peut noter qu'il y a plus d'inhibiteurs qui sont actifs sur les mutants que sur KIT WT. Cela est peut-être dû à la plus faible stabilité des formes oncogéniques qui nécessite une action importante des protéines chaperonnes. Si la molécule sélectionnée agit sur ces protéines chaperonnes, elle aura un effet indirect prononcé sur KIT mutant mais pas sur KIT WT. Une étude du taux total de KIT en Western blot pourrait être réalisée à des temps d'incubation plus longs pour vérifier cette hypothèse. Les drogues modulant les protéines chaperonnes induiraient une dégradation de KIT mutant à long terme mais pas de KIT WT.

6. Conclusion / perspectives

Pour conclure, nous avons sélectionné 14 drogues relocalisant un ou les 2 mutants oncogéniques (V560G et D816V) de KIT grâce au criblage d'une chimiothèque par notre test. Parmi ces molécules, 9 ne sont pas connues pour cibler KIT et représentent donc de nouveaux inhibiteurs potentiels. La caractérisation de ces molécules sur des lignées cellulaires issues de patients et mutées pour KIT est en cours. Nous avons déjà testé 3 de ces 9 molécules et validé le ZM 336372, qui inhibe la phosphorylation de KIT V560G ainsi que la croissance d'une lignée de leucémie à mastocytes dépendante de ce mutant de KIT. L'action potentiellement inhibitrice des 6 autres molécules reste à valider sur les lignées de leucémie à mastocytes HMC1. L'utilisation de lignées de GIST pourrait également nous aider à mieux caractériser ces molécules, surtout celles qui relocalisent le mutant V560G, caractéristique des GIST. Nous avons récemment obtenus les lignées de GIST 48 et 882, résistante et sensible à l'imatinib, respectivement, qui pourraient s'avérer être des modèles d'étude très intéressants (Tuveson et al., 2001; Bauer et al., 2006a).

Ce test de criblage pourra être testé sur d'autres lignées cellulaires exprimant KIT mutant comme les HMC1. Il pourrait aussi être adapté à d'autres RTK dont la localisation cellulaire est altérée lorsqu'ils sont mutés, comme par exemple le récepteur FLT3.

II. GENERATION D'INTRABODIES ANTI-KIT

Une des stratégies que nous avons adoptée pour cibler KIT est de générer des intrabodies, c'est-à-dire des anticorps intracellulaires ou mini-anticorps, capables de lier leur cible ou antigène au niveau intracellulaire, suite à l'introduction d'un gène codant pour l'anticorps dans la cellule d'étude. Nous avons utilisé la technique du phage display pour sélectionner des fragments d'anticorps aux formats scFv et VHH, spécifiques du domaine intracellulaire de KIT. L'objectif de cette approche est d'obtenir des intrabodies qui, une fois exprimés dans le cytoplasme des cellules, inhibent la signalisation KIT oncogénique. Deux mécanismes peuvent entrer en jeu pour parvenir à cette inhibition :

- L'intrabody pourrait se lier au site de fixation de l'ATP, et inhiber directement l'activité kinase de KIT.
- L'intrabody pourrait aussi inhiber l'interaction entre KIT et les protéines de signalisation qui lui sont associées ; ce type d'inhibition, plus indirect, permet de bloquer sélectivement certaines voies activées par le récepteur KIT oncogénique (figure 53). Une telle stratégie a déjà été reportée pour le ciblage par exemple de la spleen tyrosine kinase (Syk) impliquée dans des mécanismes d'allergie (Mazuc et al., 2008).

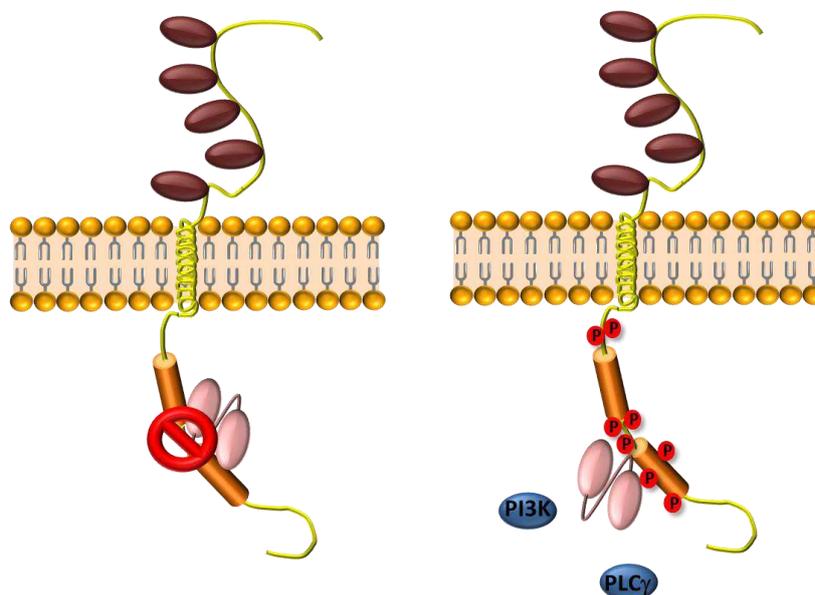


Figure 53 : représentation schématique des 2 modes d'action possibles des intrabodies inhibiteurs.

Gauche : L'intrabody (en rose) peut se fixer et inhiber directement l'activité kinase de KIT.

Droite : l'intrabody peut empêcher le recrutement de partenaires de signalisation (en bleu) sur les tyrosines phosphorylées (rouge) du domaine intracellulaire de KIT.

Les anticorps pourraient par ailleurs être spécifiques de la conformation active, ou inactive du domaine kinase de KIT. Il est possible aussi que le mutant D816V ait une conformation

dynamique spécifique, différente de la forme WT activée dans la mesure où il existe une déstabilisation permanente de la boucle d'activation chez le mutant. Dans l'absolu, le but du projet est de sélectionner un ou plusieurs fragments d'anticorps spécifiques du mutant D816V, ou au moins de la forme active phosphorylée de KIT. Ainsi, cet outil pourrait servir à designer de nouveaux inhibiteurs pharmacologiques actifs contre le mutant D816V et comme outils de diagnostic en immunohistochimie.

Dans un premier temps, nous avons travaillé avec une banque de phage scFv naïve (Sheets et al., 1998) puis, devant certains écueils, nous nous sommes rapprochés de l'équipe du Dr. Daniel Baty, spécialiste des anticorps de camélidés : nous avons eu accès à des banques immunes de VHH obtenues à partir du répertoire B de lamas immunisés par différents variants du domaine intracellulaire de KIT (KIT-ICD).

1. Production du domaine intracellulaire de KIT

Pour réaliser ces sélections, nous avons choisi d'utiliser des protéines recombinantes ; la partie intracellulaire de KIT est peu soluble lorsqu'elle est produite telle qu'elle (communication personnelle Dr. Laurent Gros, AB Sciences), elle a donc été fusionnée à la Maltose Binding Protein (MBP) grâce au plasmide pMAL-C2X (cf annexes 3 et 4). Cette fusion donne naissance à une protéine de 87 kDa dont la purification est facilitée grâce à la MBP fusionnée en N-terminal (figure 54).

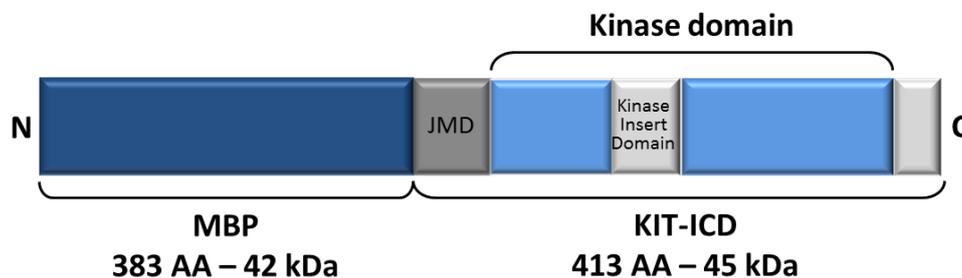


Figure 54 : représentation schématique de la protéine de fusion MBP-KIT-ICD. La MBP est insérée en N terminal du domaine juxtamembranaire (JMD).

La protéine de fusion MBP-KIT-ICD D816V, un don du Dr Laurent Gros (AB Science - Marseille), nous a permis de générer 2 autres variants de KIT à l'aide d'un kit de mutagenèse dirigée (Stratagene) : en révertant la mutation D816V, nous avons obtenu la forme WT ; la forme Kinase Dead (KD), correspondant à une conformation constitutivement inactive de la kinase, a été obtenue en substituant l'acide aspartique à la position 792 par une asparagine (D792N), par homologie avec la forme murine de KIT-KD (Tan et al., 1990).

La production des protéines recombinantes se fait comme suit :

- Transformation puis culture bactérienne en 200 mL pour la MBP, 500 mL pour MBP-KIT-ICD.

- Induction à l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 0,3 mM : 3 h à 37°C pour la MBP, 18 h à 4°C pour MBP-KIT-ICD.
- Centrifugation et reprise du culot bactérien puis sonication de celui-ci.
- Purification sur résine d'amylose – élution par une solution de maltose 10 mM.

Nous avons rencontré de nombreux problèmes de production (faibles rendements) et de conservation (dégradation) des 3 protéines de fusion MBP-KIT. Par la suite, nous avons adopté le protocole de production conseillé par Laurent Gros qui consiste à induire à l'IPTG durant 72 h à 4°C sur des cultures bactériennes de 5 L. Les lots de protéines ont été conservés en glycérol 30 % à -80°C.

La pureté des productions a été analysée par SDS-PAGE et la fonctionnalité des protéines produites, c'est-à-dire l'activité kinase induisant la phosphorylation, a été vérifiée en Western blot (figure 55) :

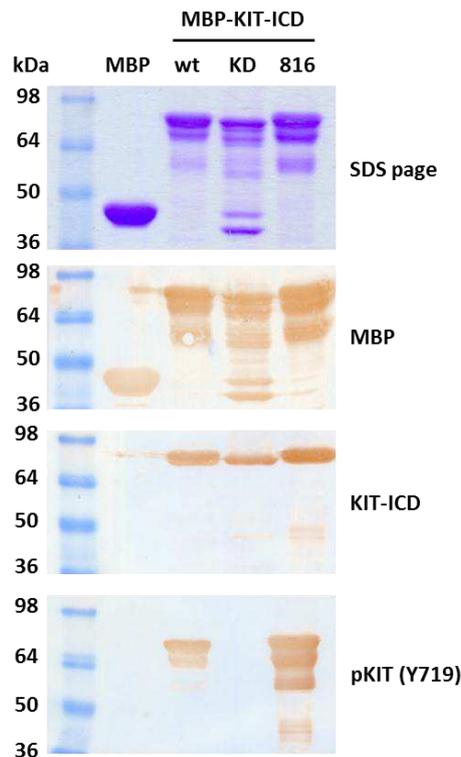


Figure 55 : analyse en gel SDS-PAGE et Western blot des différentes protéines recombinantes.

5 μ g de protéines ont été déposés sur gel SDS-PAGE puis transférés ou non sur membrane de nitrocellulose. Le SDS-PAGE est révélé par coloration au bleu de Coomassie. Les membranes ont été hybridées avec de anticorps anti-MBP, anti-KIT-ICD (C19, polyclonal de lapin) et anti-phospho-KIT (Y719) de lapin, puis avec des anticorps secondaires couplés à la HRP. Les membranes sont révélées avec une solution de diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB – Sigma).

L'analyse des protéines recombinantes par SDS-PAGE et Western blot confirme les bonnes productions et tailles des protéines issues des constructions (42 kDa pour la MBP et 87 kDa pour les fusions MBP-KIT-ICD). On peut noter toutefois une dégradation des protéines MBP-KIT-ICD en SDS-PAGE et en Western blot ; les bandes de plus bas poids moléculaire peuvent aussi correspondre à des impuretés car elles ne sont pas révélées par l'anticorps anti-KIT-ICD. Il est intéressant de noter que la protéine MBP-KIT-ICD WT est phosphorylée (mais moins que MBP-KIT-ICD-D816V). Ceci signifie qu'une partie au moins de la protéine est en conformation active, ce qui n'était pas attendu. Cette phosphorylation est peut-être due aux conditions de production/purification ou à la fusion à la MBP ; il a été montré que les protéines fusionnées à la glutathion S-transférase (GST) étaient parfois retrouvées sous forme dimérique (Vinckier et al., 2011). La fusion à la MBP conduit peut-être au même phénomène : KIT WT alors sous forme de dimère, se transphosphorylerait en absence de SCF.

C'est cette phosphorylation de KIT-ICD WT qui nous a conduit à construire le mutant KD, à priori toujours en conformation inactive ; en effet, le criblage des intrabodies après la sélection nécessite une forme inactive de KIT afin d'éliminer les intrabodies qui se lient aux 2 formes (phosphorylée et non phosphorylée) de KIT.

2. Sélection de scFv anti-KIT-ICD

Une première sélection a été réalisée sur une banque de scFv. Les scFv sont des fragments d'anticorps qui correspondent à ses parties variables. Les parties variables de la chaîne légère (VL) et de la chaîne lourde (VH) sont reliées par un polypeptide souple (figure 56).

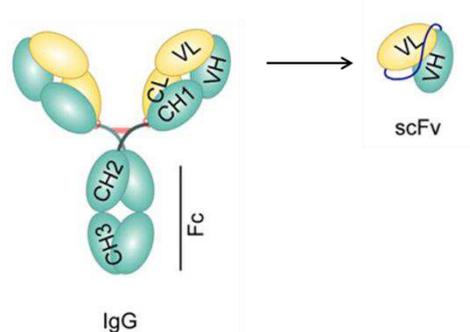


Figure 56 : représentation schématique d'un scFv.

Dans une IgG, les parties variables de la chaîne légère (VL) et de la chaîne lourde (VH) forment le paratope qui lie l'épitope. Le scFv est une molécule qui relie le VH et le VL par un peptide.

Nous avons utilisé la banque Sheets (Sheets et al., 1998), d'une diversité de 7.10^9 qui est une banque humaine naïve, c'est-à-dire construite à partir de LB d'individus non immunisés par la protéine d'intérêt.

Une déplétion sur la MBP a été réalisée puis 3 tours de sélection ont été faits sur la protéine recombinante MBP-KIT-ICD D816V immobilisée sur plaque maxisorp (table 9).

	input	output	output/input	enrichissement
Round 1	10^{11}	$2,2 \cdot 10^4$	$2,2 \cdot 10^{-7}$	1
Round 2	$5 \cdot 10^{10}$	$1,2 \cdot 10^5$	$2,4 \cdot 10^{-6}$	10
Round 3	10^{11}	$3 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^{-4}$	1363

Table 9 : titres phagiques et enrichissements des différents tours de sélection de la banque Sheets sur MBP-KIT-ICD D816V.

L'input et l'output correspondent à une estimation du nombre de phages avant et après sélection. L'enrichissement est le rapport des ratios (output/input) du tour n sur celui du tour 1.

Le criblage de la sélection a été réalisé par ELISA grâce au tag c-myc des scFv. Sur les 92 clones testés, 18 étaient positifs sur MBP-KIT-ICD et négatifs sur la MBP. 15 de ces clones sont issus du 2^e tour de sélection et 3 du 3^e tour. Le séquençage nous a permis d'isoler 11 séquences différentes parmi ces 18 clones (cf annexe 5). Le clone D11 a été dans un premier temps éliminé car il contient un codon ambre, ce qui empêche son expression en cellule eucaryote.

Nous avons donc sélectionnés 10 scFv et nous utilisons un scFv anti-NGF issu de la même banque comme contrôle négatif.

Pour permettre l'expression des scFv dans le cytoplasme de cellules eucaryotes, nous les avons sous-clonés dans le vecteur scFv-express-cyto (cf annexe 6) (Persic et al., 1997). En transfectant transitoirement des cellules CHO à l'aide de ces plasmides, nous avons observé une forte expression des intrabodies dans leur cytoplasme ; cependant, nous avons aussi constaté la formation d'agrégats, visibles sous la forme de ponctuations vertes en IF (figure 57). Ce problème de solubilité, déjà décrit dans la littérature, est dû au mauvais repliement des scFv dans l'environnement réducteur du cytoplasme qui ne permet pas la formation des ponts disulfures (Biocca et al., 1995).

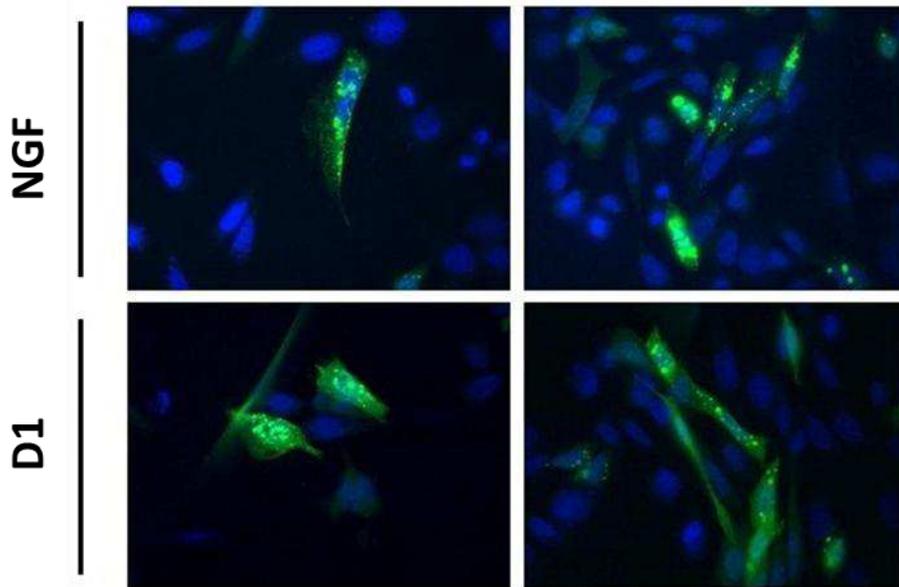


Figure 57 : analyse en IF par microscopie confocale de l'expression cytoplasmique des scFv.

Les cellules CHO ont été transfectées transitoirement (24 h) par le scFv anti-KIT D1 et le scFv contrôle anti-NGF. L'expression des scFv a été révélée par un anticorps anti-c-myc (9E10) puis un anticorps anti-souris couplé alexa 488 (vert). Les noyaux des cellules sont marqués au 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) (bleu).

Cette mauvaise solubilité des scFv a été confirmée par analyse d'extraits cellulaires de CHO transfectées transitoirement par les scFv. Le Western blot de la figure 58 indique que peu de scFv sont présents dans la fraction soluble (S), alors que l'on retrouve une forte expression dans la fraction insoluble, c'est-à-dire le culot des extraits cellulaires après centrifugation (C). Seuls les scFv D2 et D8 ont une bonne solubilité.

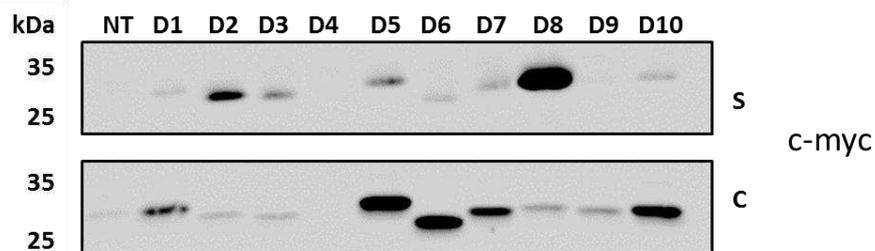


Figure 58 : analyse par Western blot de l'expression cytoplasmique des intrabodies.

Les cellules CHO ont été transfectées transitoirement (24 h) par les 10 scFv. Les fractions soluble (S) et insoluble (C), correspondant au culot après centrifugation des extraits protéiques, ont été analysées par Western blot. NT, CHO non transfectées.

Malgré ces problèmes de solubilité des scFv, nous avons tout de même essayé de mettre en évidence l'interaction *in cellulo* des scFv avec KIT par co-immunoprécipitation (co-IP). La mise au point de cette expérience nous a posé beaucoup de problèmes techniques. Nous avons montré qu'en transfection transitoire dans les CHO-EGFP-KIT WT, le scFv D8 se liait à

KIT (figure 59). Cela indique que le scFv D8 reconnaît bien KIT dans un contexte cellulaire, mais qu'il n'est pas spécifique du mutant D816V.

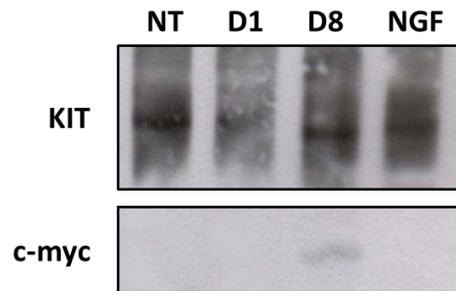


Figure 59 : analyse par Western blot de la co-IP de KIT et des scFv.

Les cellules CHO-EGFP-KIT WT ont été transfectées transitoirement (24 h) par les scFv, puis des extraits protéiques ont été réalisés. Nous avons immunoprécipité KIT avec l'anticorps anti-KIT-ECD de souris K44.2, déposé les IP sur gel, transféré sur membrane puis révélé les membranes avec un anticorps anti-KIT (H300) et un anticorps anti-c-myc (9E10).

Puisque les cellules CHO-EGFP-KIT WT n'ont pas été stimulées au SCF, KIT y est présent sous forme inactive et non phosphorylé ; le scFv D8 n'est donc ni spécifique de KIT D816V ni même d'une forme active phosphorylée du récepteur.

Les nombreuses difficultés techniques que nous avons rencontrées, liées à la mauvaise solubilité des scFv, nous ont poussé à nous tourner vers d'autres formats d'anticorps plus solubles.

3. Sélection de VHH anti-KIT-ICD

Dans le but d'obtenir des intrabodies ayant une meilleure solubilité, nous avons mis en place une collaboration avec la plateforme nanobodies dans l'équipe des Dr Daniel Baty et Patrick Chames ainsi qu'avec l'équipe Signalisation, Hématopoïèse et Mécanismes de l'Oncogenèse du Dr Patrice Dubreuil du CRCM à Marseille. La plateforme nanobodies a la particularité de générer des fragments d'anticorps issus de lamas. En effet, les camélidés possèdent une classe unique d'anticorps dénués de chaînes légères et dont la chaîne lourde ne possède que les fragments CH2 et CH3 (Hamers-Casterman et al., 1993) (figure 60). C'est l'absence de domaine CH1 sur la chaîne lourde qui empêche la liaison de la chaîne légère, puisque ce domaine est le site d'ancrage du domaine constant de la chaîne légère. De par l'absence de chaîne légère, l'anticorps se lie à l'antigène par un seul domaine variable, appelé VHH ou sdab. Les VHH sont les plus petits fragments d'anticorps dérivés d'Ig (environ 15 kDa).

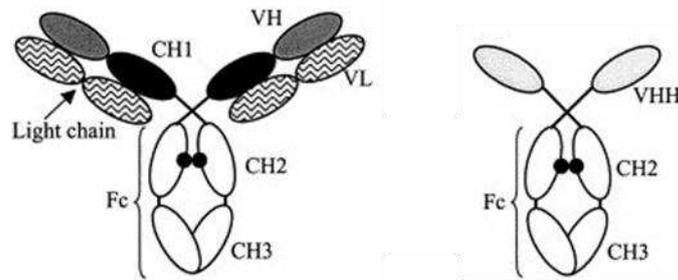


Figure 60 : représentation schématique d'IgG classique et d'IgG à chaîne lourde retrouvée uniquement chez les camélidés (Muyldermans, 2001).

L'IgG classique (gauche) possède 2 chaînes lourdes et 2 chaînes légères. Les chaînes légères sont formées d'un domaine variable (VL) et d'un domaine constant. Les chaînes lourdes sont formées d'un domaine variable (VH) et d'un domaine constant formé par CH1, CH2 et CH3. L'IgG à chaîne lourde (droite) est formée de 2 chaînes lourdes dépourvues de domaines CH1.

Dans les anticorps au format IgG classique, le fragment VH contient une région hydrophobe pour se lier au VL. Cette partie n'existe pas dans les VHH, qui sont donc plus hydrophiles et plus solubles. Leurs CDR3 sont également plus longs que dans les VH pour compenser l'absence de CDR du fragment VL. Il en résulte des spécificités de ces anticorps quant aux épitopes qu'ils reconnaissent : ce sont le plus souvent des épitopes plus enfouis que ceux reconnus par les anticorps classiques (Lauwereys et al., 1998).

Nous sommes partis de banques immunes de VHH construites à partir de lamas immunisés avec nos protéines d'intérêt. Pour réaliser ces travaux, la plateforme nanobodies a immunisé 2 lamas, un avec MBP-KIT-ICD WT et un avec MBP-KIT-ICD D816V, puis a construit les banques de phages-VHH à partir des LB des lamas.

J'ai effectué un séjour de 4 mois dans le Laboratoire de Daniel Baty pour effectuer les sélections. Nous avons réalisé 2 tours de sélection avec chaque banque sur l'antigène correspondant. Classiquement, l'antigène d'intérêt est immobilisé sur un support plastique type plaque maxisorp par adsorption ; cependant, ce type d'immobilisation engendre une modification de la conformation de l'antigène. Le protocole utilisé sur la plateforme nanobodies préconise de fixer l'antigène d'intérêt sur des billes époxy ; elles forment des liaisons covalentes avec les groupements amine, thiol et hydroxyl et maintiennent l'antigène dans sa conformation naturelle. Après préparation des billes, nous avons réalisé une déplétion des banques sur des billes-MBP. Les phages-VHH non liés aux billes-MBP ont ensuite été utilisés pour réaliser les sélections à proprement parler. Durant la sélection, nous avons ajouté un excès de MBP soluble afin de limiter au maximum l'obtention d'anticorps anti-MBP.

Nous avons criblé le 2^e tour de ces 2 premières sélections en ELISA contre les antigènes recombinants MBP, MBP-KIT-ICD WT, MBP-KIT-ICD KD et MBP-KIT-ICD D816V. Pour cela, nous avons utilisé des surnageants de production purs, contenant soit des VHH (induction par IPTG) soit des phages-VHH (infection par phage helper) (Even-Desrumeaux et al., 2010) ;

les VHH sont taggués avec 6 résidus histidines (6-his) ce qui permet leur détection par anticorps anti-6-his ainsi que leur purification sur colonne de cobalt.

- La sélection sur la banque KIT WT nous a permis d'obtenir 8 clones VHH de séquence différente qui se lient en ELISA à MBP-KIT-ICD WT et à MBP-KIT-ICD KD, mais pas à MBP-KIT-ICD D816V : ceci indique qu'ils seraient spécifiques de la conformation inactive de KIT (clones A12, B12, C1, C5, C8, G1, G6 et H5).
- La sélection sur la banque KIT D816V nous a permis d'obtenir un VHH qui se lie à MBP-KIT-ICD WT et MBP-KIT-ICD D816V lorsque l'on réalise le criblage sur plaque maxisorp. De façon très intéressante, ce clone ne reconnaît que MBP-KIT-ICD D816V lorsque que le criblage est réalisé sur antigène immobilisé sur billes. On peut penser que la conformation des différents variants activés de KIT (D816V et la partie phosphorylée de KIT WT) lorsqu'ils sont immobilisés sur maxisorp n'est pas très variable, alors que l'immobilisation par billes permet de maintenir les différences conformationnelles qui peuvent exister entre une forme KIT WT activée et une forme mutante de KIT constitutivement active (clone D10) (figure 61).

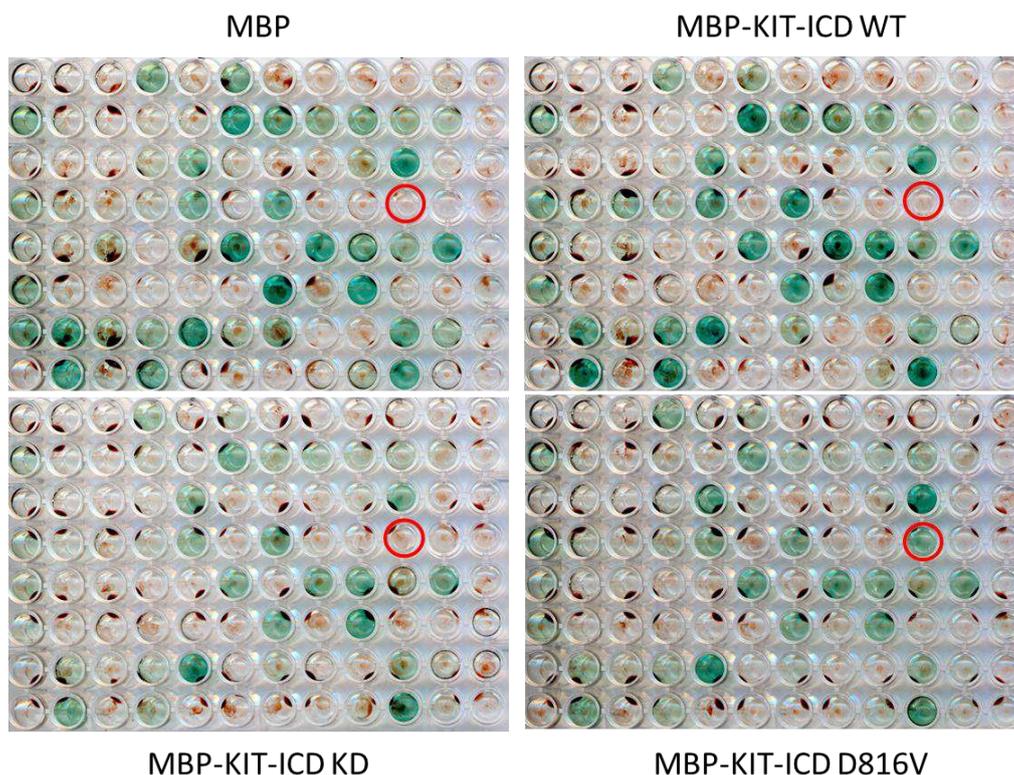


Figure 61 : criblage de la sélection MBP-KIT-ICD D816V sur billes époxy.

Une culture bactérienne réalisée à partir de la masterplate a été infectée par le phage helper KM13 puis incubée sur la nuit à 30°C. Les surnageants de production contenant les phages-VHH ont été utilisés directement pour le criblage sur billes. La révélation se fait à l'aide d'un anticorps anti-M13.

On peut noter que le criblage de cette sélection donne beaucoup de clones positifs sur la MBP (environ un tiers des clones criblés). La MBP représente la moitié de la protéine de

fusion utilisée pour immuniser les lamas (42 sur 87 kDa) ce qui explique sans doute pourquoi la déplétion et la sélection en présence d'excès de MBP ne suffit pas à dépléter la banque en anti-MBP. Ces clones peuvent également être dirigés contre les billes ; un premier tour de sélection sur antigènes immobilisés sur billes suivi d'un second tour sur antigènes immobilisés sur maxisorp permettrait de les éliminer.

Afin de contourner ce problème, nous avons réalisé une sélection masquée, une stratégie mise au point dans l'équipe des Dr Daniel Baty et Patrick Chames (Even-Desrumeaux et al., 2014) (figure 62). Cette stratégie offre également la possibilité théorique d'obtenir des VHH spécifiques de KIT-ICD D816V ne reconnaissant pas les autres formes de KIT.

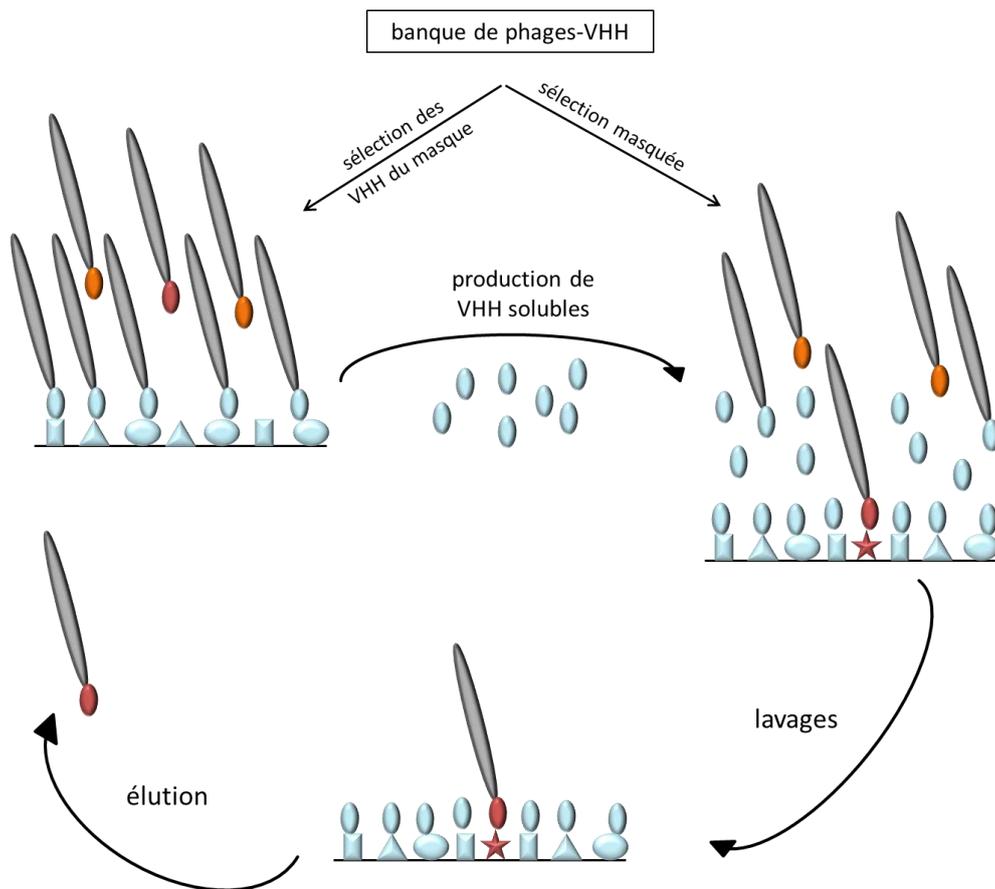


Figure 62 : schéma décrivant la sélection masquée.

Les antigènes non désirés (bleu) sont immobilisés sur une surface. La banque de phages-VHH est utilisée pour sélectionner des VHH contre les antigènes non désirés. Ces VHH sont produits, purifiés et ajoutés en excès durant la sélection à partir de la même banque contre l'antigène d'intérêt (étoile rose). Seul l'antigène d'intérêt est disponible pour la liaison aux VHH. VHH non liants en orange, VHH contre les épitopes non désirés en bleu, VHH contre les épitopes d'intérêt en rose (d'après la thèse de Klervi Even-Desrumeaux).

Cette technique consiste à masquer les épitopes non désirés à l'aide de VHH afin de favoriser la sélection de VHH contre les épitopes d'intérêt lors d'une sélection par phage display.

Dans notre cas, nous souhaitons isoler des clones spécifiques de KIT-ICD D816V qui ne reconnaissent pas les autres formes de KIT. Nous avons sélectionné des VHH anti-KIT-ICD KD, les avons produits en format soluble polyclonal, purifiés puis incubés avec la protéine d'intérêt (MBP-KIT-ICD D816V) pour masquer les épitopes communs à KIT KD et KIT D816V. Nous avons ensuite réalisé la sélection sur la protéine MBP-KIT-ICD D816V dont certains épitopes étaient masqués par les VHH polyclonaux anti KIT-ICD KD. Nous avons réalisé le premier tour de sélection sur antigènes immobilisés sur billes et le second sur antigènes immobilisés sur maxisorp afin de limiter l'obtention d'éventuels clones anti-billes.

Par cette technique, nous avons réussi à diminuer nettement le nombre de clones anti-MBP ou anti-billes sélectionnés (un 10^e des clones criblés ici contre 1/3 dans la sélection classique) (figure 63). De plus, nous avons isolé un clone (G3) qui ne reconnaît que MBP-KIT-ICD D816V et faiblement MBP-KIT-ICD WT. Ceci laisse à penser qu'il serait spécifique de la conformation active de KIT ; le plus faible signal obtenu sur MBP-KIT-ICD WT serait dû au fait que seule une partie de la protéine semble être active et phosphorylée.

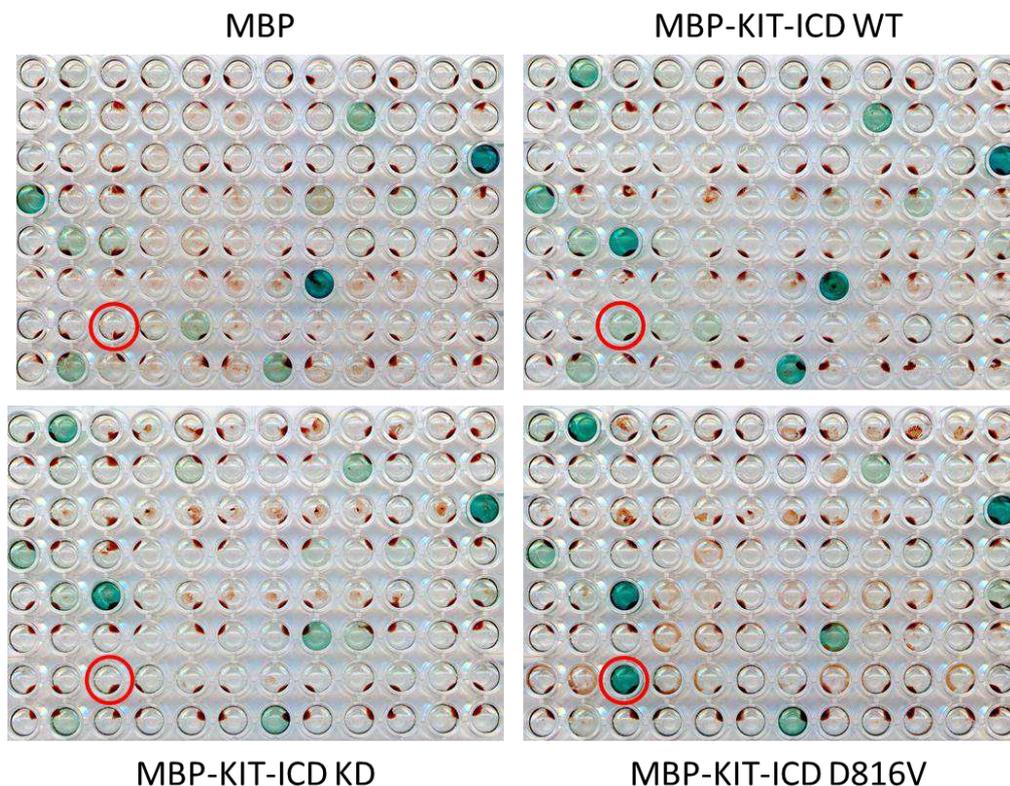


Figure 63 : criblage de la sélection MBP-KIT-ICD D816V masquée MBP-KIT-ICD KD sur billes époxy.

Une culture bactérienne réalisée à partir de la masterplate a été infectée par le phage helper KM13 puis incubée sur la nuit à 30°C. Les surnageants de production contenant les phages-VHH ont été utilisés directement pour le criblage sur billes. La révélation se fait à l'aide d'un anticorps anti-M13. Le puits A2 correspond au contrôle positif : les billes sont incubées avec un anticorps monoclonal de souris anti-KIT-ICD (C19).

Par ces différentes stratégies, nous avons donc sélectionné 8 VHH qui reconnaissent KIT WT et KIT KD (clones A12, B12, C1, C5, C8, G1, G6 et H5), un VHH qui reconnaît la conformation active de KIT WT et D816V (clone G3) et un clone spécifique du mutant KIT D816V (clone D10).

Ces précédentes étapes ont été réalisées avec des surnageants de culture bactérienne totaux, contenant les phages-VHH ou les VHH sécrétés par les bactéries. Pour mieux caractériser nos clones d'intérêt, nous les avons produits dans des larges volumes de culture et purifiés sur colonne de cobalt (Talon – Clontech) grâce à leur tag 6-his (figure 64).

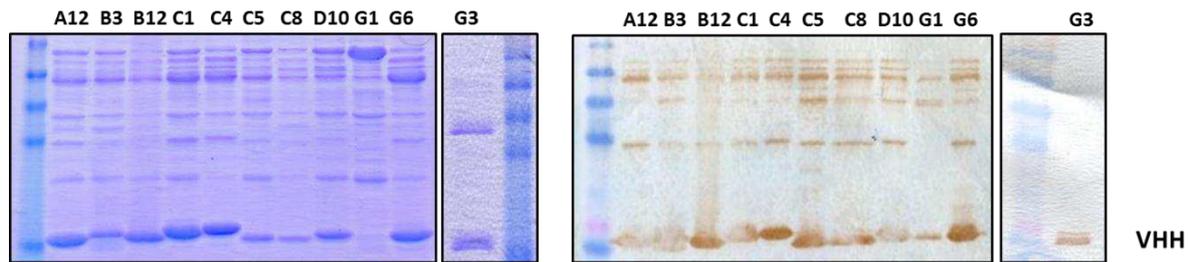


Figure 64 : analyse de la production en grand volume et purification des VHH.

Les 11 clones VHH ont été produits en culture bactérienne de 100 mL induite par l'IPTG sur la nuit à 30°C. Les culots bactériens ont été lysés au bugbuster (Novagen) et purifiés sur colonne de cobalt. 20 µL d'éluat en SDS-PAGE et 5 µg de protéines purifiées en Western blot, révélatrice par anti-6-his.

Les 11 VHH ont bien été produits mais on remarque des bandes minoritaires de plus haut poids moléculaires. Les productions de VHH ont été faites à partir de bactéries TG1-TR, qui sont *supE*. Ces souches possèdent des ARN de transfert capables d'insérer un acide glutamique à la place du codon ambre UAG ; on retrouve alors des fusions p3-VHH dans 20 % des cas. Les bandes minoritaires retrouvées à différentes tailles correspondent à ces fusions p3-VHH.

Nous avons voulu confirmer la liaison de nos clones d'intérêt au format VHH à des concentrations précises aux différentes protéines recombinantes. Pour cela, nous avons incubé les 11 VHH à 3 concentrations (0,3, 3 et 30 µg/mL) avec des billes couplées aux 4 protéines recombinantes. Les résultats de ces expériences sont discordants et nous avons observé une mauvaise affinité de nos VHH pour les antigènes recombinants. Cette mauvaise affinité n'a pas été anticipée dans les expériences précédentes car nous utilisons le format phage-VHH qui présente l'inconvénient d'amplifier les signaux de détection grâce à l'utilisation d'un anticorps anti-protéine p8 du phage M13, présente à 3000 copies sur la capsid.

Ces résultats nécessitent d'être reproduits pour confirmer la liaison des VHH à KIT.

Les sélections ont été réalisées à une concentration en antigène cible de 100 nM ; il serait intéressant d'utiliser des concentrations en MBP-KIT-ICD D816V plus faibles lors de la sélection, afin d'obtenir des clones de meilleure affinité pour notre cible.

4. Discussion et perspectives

Les différentes sélections sur la banque de phages-VHH MBP-KIT-ICD D816V nous ont permis de sélectionner très peu de clones positifs, alors que la sélection sur la banque MBP-KIT-ICD WT a donné de bons résultats (70 % de clones positifs sur MBP-KIT-ICD WT lors du criblage). Ces résultats nous mènent à penser que l'immunisation du lama avec la protéine MBP-KIT-ICD D816V n'a peut-être pas induit de réponse immunitaire très importante chez cet animal et que la banque MBP-KIT-ICD D816V obtenue est de mauvaise qualité. Il serait intéressant d'immuniser un second animal afin de produire une nouvelle banque de VHH MBP-KIT-ICD D816V. De plus, les clones anti-KIT isolés à travers ces sélections sont de mauvaise affinité pour leur cible. Les nouvelles sélections devront être réalisées sur moins d'antigène (< à 100 nM) pour obtenir des VHH plus affins pour KIT-ICD D816V.

La stratégie de sélection masquée a permis de limiter le nombre de clones non spécifiques de nos cibles, c'est-à-dire liant les billes ou la MBP. Lors du criblage de la sélection masquée, nous avons constaté qu'il persistait environ un 10^e de clones anti-MBP ou billes. Pour limiter ce phénomène, nous pourrions réaliser la sélection sur KIT-ICD fusionné à d'autres protéines, ce qui empêcherait la sélection de clones anti-MBP. La réalisation du premier tour de sélection sur antigène immobilisé sur billes puis du second sur antigène immobilisé sur maxisorp semble être une bonne solution visant à limiter la sélection de clones anti-billes.

A plus long terme, les intrabodies présentant une bonne spécificité vis-à-vis de KIT-ICD D816V seront exprimés dans un contexte cellulaire pour caractériser leurs effets sur KIT endogène (lignées HMC1 par exemple). Leur interaction avec KIT sera analysée par co-IP et leur effet sur la phosphorylation de KIT sera étudié par Western blot. Les intrabodies ayant un effet inhibiteur sur l'activité de KIT ou sur les voies de signalisation associées seront évalués en prolifération cellulaire.

L'objectif de cette approche est d'utiliser ces intrabodies inhibiteurs de la signalisation KIT oncogénique comme guides pour cribler des petites molécules chimiques. En effet, l'utilisation des intrabodies en clinique est limitée puisqu'ils ne peuvent pas pénétrer dans le cytoplasme des cellules. Nous sélectionnerons par ELISA des molécules chimiques qui inhibent l'interaction intrabody/KIT et qui auront donc potentiellement un effet mimétique de l'intrabody sur KIT D816V. Ce type d'approche a déjà montré son efficacité à l'IRCM (Mazuc et al., 2008).

III. CARACTERISATION D'ANTICORPS AU FORMAT SCFV-FC DIRIGES CONTRE LE DOMAINE EXTRACELLULAIRE DE KIT

1. Introduction

En parallèle de l'approche de ciblage de KIT par intrabodies, une sélection d'anticorps plus classique, dirigée contre KIT-ECD a été réalisée au laboratoire. KIT-ECD a été produit grâce à un système d'expression en cellules d'insecte étant donné que ce système offre des rendements satisfaisants et que cette technique a déjà été utilisée pour sélectionner des anticorps monoclonaux murins anti-KIT commerciaux.

L'ensemble de ces travaux fait l'objet d'un manuscrit présenté en fin de chapitre qui est sur le point d'être soumis. Les résultats principaux et les matériels et méthodes y sont indiqués. Un résumé de la méthode de sélection et de la caractérisation des anticorps obtenus est présenté ci-dessous.

2. Résumé

L'ADNc codant pour KIT-ECD taggué 6-his a été inséré dans un vecteur de transfert baculovirus. Les cellules d'insecte *Spodoptera frugiperda* (Sf9) ont été co-transfectées par ce vecteur et l'ADN de baculovirus. Les baculovirus recombinants ont été produits par plusieurs cycles d'infection des Sf9. Des cellules High five ont été infectées par ces baculovirus recombinants et le surnageant de culture, contenant KIT-ECD, a été dialysé puis purifié sur colonne de nickel. KIT-ECD purifié analysé en SDS-PAGE montre une bande de 60 kDa. Lorsque que KIT-ECD est produit en cellules de mammifères, sa taille est d'environ 105 kDa. Cette différence est liée à des variations de glycosylation entre les 2 types cellulaires.

La sélection a été réalisée sur la banque Sheets, c'est-à-dire la même que nous avons utilisé pour la sélection des scFv anti-KIT-ICD. Trois tours de sélection ont été réalisés sur KIT-ECD et 188 clones ont été criblés en ELISA : nous avons obtenus 20 scFv positifs qui, après séquençage, correspondent à 8 séquences différentes. Leur liaison à KIT endogène a été testée en cytométrie sur les cellules HMC1.2 : 5 des 8 scFv se lient aussi à KIT endogène.

Nous avons sous-cloné ces 5 scFv dans le vecteur permettant leur expression au format scFv-Fc. Ce format présente 2 avantages : la présence d'une région constante permet d'associer à la molécule les fonctions d'ADCC et de CDC, et le format bivalent permet d'augmenter l'avidité des anticorps pour KIT. Les scFv-Fc ont été produits en cellule HEK-T, purifiés sur protéine-A-agarose puis leur liaison à KIT-ECD a été validée en ELISA. Nous avons par la suite confirmé leur liaison à différentes lignées exprimant KIT et caractérisé leur liaison en présence du ligand : 2 scFv-Fc, 2D1 et 3G1 voient leur liaison à KIT fortement diminuée en présence de SCF.

L'étude de l'effet des scFv-Fc sur la signalisation KIT a été réalisée en Western blot. Aucun de 5 anticorps n'a d'effet agoniste sur KIT. En revanche, les anticorps 2A6, 2D1 et 3G1 inhibent la phosphorylation induite par le SCF et la signalisation qui en découle *in cellulo*. Le 2A6 ayant une mauvaise affinité, nous avons poursuivi notre étude en nous concentrant sur les anticorps 2D1 et 3G1. Nous avons démontré que l'inhibition de la signalisation était corrélée à une inhibition de la prolifération SCF-dépendante de cellules exprimant KIT WT.

L'étude des mécanismes d'action de nos anticorps a révélé qu'ils induisaient une forte internalisation de KIT, contexte WT (cellules érythroleucémiques UT-7) comme en contexte muté (lignées HMC1). Lorsque le récepteur est phosphorylé constitutivement (cas des mutants), l'internalisation est suivie d'une dégradation rapide du récepteur (visible dès 2 heures). La dégradation est limitée si le récepteur n'est pas activé et non visible après 24 heures de traitement, partielle après 72 heures. La diminution de KIT en surface en contexte WT limite donc l'accès du SCF au récepteur KIT. De plus, dans les lignées de leucémie à mastocytes HMC1 dépendantes de la signalisation oncogénique KIT, l'anticorps 2D1 induit une inhibition de prolifération. L'anticorps 3G1 quant à lui inhibe la croissance de la lignée HMC1.2.

Nos anticorps humains au format scFv-Fc représentent des outils thérapeutiques potentiels dans les pathologies impliquant KIT en inhibant la prolifération KIT-dépendante.

3. Article

Neutralization of KIT oncogenic signaling with scFv-Fc antibody formats

Marianne Le Gall^{1,2}, Ronan Crépin², Madeline Neiveyans¹, Martine Pugnère¹, Véronique Mersseman², Christine Legay², André Pèlerin¹, Christian Auclair² and Marie-Alix Poul^{1,2}.

¹ IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, Montpellier, F-34298, France ; INSERM, U896, Montpellier, F-34298, France ; Université Montpellier1, Montpellier, F-34298, France ; Institut régional du Cancer Montpellier, Montpellier, F-34298, France.

² Laboratoire de Biologie et Pharmacologie Appliquée, CNRS UMR8113, Ecole Normale Supérieure de Cachan, Cachan, France.

Running title: Anti-KIT inhibitory antibodies

Keywords: KIT/CD117, SCF, phage-display, single chain variable fragment, scFv-Fc, leukemia

¹corresponding author: IRCM, 208 rue des Apothicaires 34298 Montpellier cedex 5 FRANCE, marie-alix.poul@inserm.fr

MLG and RC were supported by a fellowship from the French Government, MLG was supported by LABEX MabImprove.

Abstract

KIT is a cell surface type III tyrosine kinase receptor implicated in cancer through overexpression or oncogenic mutations that renders the kinase constitutively active. KIT ligand, the stem cell factor (SCF), triggers receptor homodimerization and phosphorylation and activates downstream effector pathways involved in cell survival, proliferation, homing or differentiation, depending on the cell type. KIT oncogenic signaling is involved in leukemia and gastrointestinal stromal tumors (GIST). In GIST patients, the KIT tyrosine kinase inhibitor (TKI) imatinib has proven to have therapeutic effect, but patients frequently develop resistance after long-term treatment. In this work, we used an antibody phage display selection to isolate single chain variable antibody fragments (scFv) specific for recombinant KIT. Five KIT scFv were obtained and reformatted as dimeric scFv fused to the Fc fragment of a human IgG1, i.e. scFv-Fc. Two scFv-Fc interfered with SCF binding and consequently, inhibited SCF-dependent KIT phosphorylation and downstream signaling. These properties translated into a functional effect since these antibodies reduced the viability of the SCF-dependent WT KIT expressing erythroleukemic cell line UT-7/Epo, after 4 days of treatment. Interestingly, these anti-KIT scFv-Fc also reduced cell viability of two mast cell leukemia cell lines bearing activating KIT mutations, including the HMC1.1 imatinib sensitive cell line (with a V560G KIT activating mutation) and the HMC1.2 imatinib resistant cell line (with a V560G/D816V KIT activating mutation). This inhibition was due to intensive internalization and degradation of mutant KIT upon antibody treatment. These fully human antibody formats may represent therapeutic tools to target KIT signaling in leukemia or GIST, and to bypass TKI resistance of certain KIT mutants.

Introduction

KIT is a 145 kDa type III tyrosine kinase receptor that functions as a growth factor receptor (Roskoski 2005). Type III tyrosine kinase receptors are characterized by the presence of five N-glycosylated immunoglobulin (Ig) domains in the extra-cellular region and by a split tyrosine kinase intra-cellular domain. The three N-terminal extra-cellular domains are involved in the binding of KIT ligand, SCF (Lev, Blechman et al. 1993) while the fourth and fifth domains are implicated in receptor dimerization following SCF binding (Blechman and Yarden 1995). KIT intracellular region contains the catalytic domain composed of the ATP binding site and the phosphotransferase domain. KIT stimulation by SCF induces KIT dimerization and transphosphorylation which activates downstream effector proteins including phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT, phospholipase C γ , signal transducer and activator of transcription (STAT) and RAS/MAP-kinase pathways (Roskoski 2005). SCF is a major cytokine for self-renewal, proliferation and differentiation of hematopoietic lineage, germ cells, melanocytes, gut and central nervous system in embryo (Orr-Urtreger, Avivi et al. 1990). In adult mice KIT is expressed in a limited number of tissues and KIT defects induce impaired hematopoiesis, decreased number of tissue mast cells, decreased fertility and pigmentation, and defective development of interstitial cells of Cajal, which are responsible for intestinal pacemaker activity (for review see (Broudy 1997)).

Abnormal KIT signaling is observed in cancer due either to overexpression SCF and/or KIT itself or to activating mutations that render KIT signaling independent of SCF. These mutations of KIT are major oncogenic drivers in gastrointestinal stromal tumors (GIST) (Demetri, von Mehren et al. 2002), that derive from Cajal cells, and in subsets of acute myeloid leukemia (Core-binding factor acute myeloid leukemia CBF-AML) (Wang, Zhao et al. 2011) and melanoma (Hodi, Corless et al. 2013) and less frequently, in other cancers. Consequently, oncogenic KIT inhibition with tyrosine kinase inhibitors has proven successful in those pathologies (Lennartsson and Ronnstrand 2012)

KIT gain-of-function mutations can be classified in two main categories corresponding to distinct structural and functional locations (Roskoski 2005). The catalytic mutant category displays point mutations located in the kinase domain, mainly in the activation loop. The mutation D816V has been shown to keep the activation loop in an extended conformation corresponding to a constitutive phosphotransferase activity (Mol, Lim et al. 2003). Catalytic KIT mutants are found in acute myeloid leukemias of the CBF type (Wang, Zhao et al. 2011), in germ cell tumors (Kemmer, Corless et al. 2004) and mast cell tumors and mastocytosis

(Orfao, Garcia-Montero et al. 2007). The regulatory mutant category displays point mutations or short deletions in the juxtamembrane domain involved in the negative regulation of the wild-type receptor. The V560G mutation frequently found in GIST was shown to induce constitutive dimerization responsible for permanent phosphorylation and activation of the receptor (Kitayama, Kanakura et al. 1995). Tumors usually co-express both WT and mutated alleles (Bachet, Tabone-Eglinger et al. 2013).

Un-mutated KIT, is also involved in a number of malignant diseases derived from cell-types that generally expressed KIT transiently during embryogenesis (Bernex, De Sepulveda et al. 1996). The SCF/KIT axis works as an autocrine or paracrine loop sustaining cancer cells to proliferate and/or to migrate. Indeed, KIT is present on 50% of AML (Ikeda, Kanakura et al. 1991) and AML blasts frequently respond to SCF stimulation by increased proliferation (Pietsch, Kvas et al. 1992). Consistently, cases of AML patients, refractory to chemotherapy, can be cured by KIT inhibition by inhibitors of tyrosine kinase (TKI) (Schittenhelm, Aichele et al. 2003). A number of solid tumors also frequently express KIT and/or SCF including small cell lung cancer (SCLC), melanoma, seminoma (Went, Dirnhofer et al. 2004). Typically, seventy % of SCLC co-express SCF and KIT (Hibi, Takahashi et al. 1991; Rygaard, Nakamura et al. 1993; Krystal, Hines et al. 1996) and high KIT levels are associated with a poor prognosis (Micke, Basrai et al. 2003). Other solid tumors have been reported to express KIT including breast cancers (Hines, Organ et al. 1995), neuroblastomas (Cohen, Chan et al. 1994), colon cancers (Toyota, Hinoda et al. 1994), gynecological tumors (Inoue, Kyo et al. 1994) gliomas (Stanulla, Welte et al. 1995) and non small cell lung cancer (Lennartsson and Ronnstrand 2012).

Pharmacologic inhibition of KIT is a potential approach to treat malignancies that are partly or completely dependent on KIT signaling. ATP-competitive tyrosine kinase inhibitors like imatinib (Heinrich, Blanke et al. 2002) or dasatinib (Schittenhelm, Shiraga et al. 2006) inhibit KIT kinase activity and interfere with cell growth or survival. Unfortunately, most KIT mutations located in the activating loop exhibit resistance to imatinib in the clinic (Zermati, De Sepulveda et al. 2003; Ma, Mali et al. 2012) and initially Imatinib sensitive regulatory mutants accumulate secondary mutations leading to patient resistance to treatment (Antonescu, Besmer et al. 2005).

Because of their high specificity and affinity combined to their natural ability to recruit immune effectors or to their conjugation to toxic drugs or radio-isotopes, monoclonal antibodies (mAbs) (Adams and Weiner 2005) offer an attractive approach to target KIT. Therapeutic antibodies have long time proven efficient, for example in metastatic breast cancer patients with anti-ErbB2/Neu mAb (Emens 2005) and non-Hodgkin lymphomas with

anti-CD20 mAb (Grillo-Lopez, 2003). Independently of immune effector recruitment to KIT positive cells, inhibitory effect on KIT signaling with mAbs could be obtained by inhibition of SCF binding to KIT (by targeting domains D1 to D3), inhibition of KIT dimerization (targeting domains D4-D5) or induction of KIT degradation.

We report here the generation and characterization of a panel of fully human anti-KIT single-chain variable antibody fragment (scFv) selected by phage-display on a recombinant form of KIT-ECD produced in insect cells. Among the eight scFv obtained, five bound to endogenous KIT and were produced in fusion to the Fc fragment of a human IgG1 to form a dimeric scFv-Fc format (Moutel, El Marjou et al. 2009). Three scFv-Fc were shown to compete with SCF binding and 2 of them modulated efficiently SCF-dependent KIT downstream signaling in UT-7/Epo leukemia cells while inducing KIT rapid internalization without agonistic effects, leading to decrease cell viability *in vitro*. Most interestingly, an inhibitory effect was also observed on leukemia cells expressing oncogenic mutated forms of KIT.

Materials and Methods

Cells and cell culture conditions

Ba/F3, Ba/F3-KIT and TF-1 cell lines (a gift from Dr. Patrice Dubreuil, INSERM U891, Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France) were grown in RPMI (Gibco) containing 10 % fetal bovine serum (FBS; PAA) complemented with penicillin/streptomycin (Invitrogen). Ba/F3 and Ba/F3-KIT cells were supplemented with 0.1 % conditioned medium from X63-IL-3 (gift from Patrice Dubreuil) and TF-1 with GM-CSF (10 ng/mL) (Invitrogen). UT-7/Epo cell line, a subline of UT-7/Epo cells (a gift from Dr. Isabelle Dusanter-Fourt, INSERM U1016, Institut Cochin, Paris, France) were grown in IMDM containing FBS and antibiotics and supplemented either with Epo (2 U/mL, Abnova) or SCF. Recombinant human SCF (Cell Signaling) or CHO-KL (a CHO cell line modified to secrete mouse SCF) culture supernatant (a gift of Michel Arock, LBPA, ENS Cachan, Cachan, France) was used as a source of SCF. HMC1.1 and HMC1.2 cell lines, that bear a simple mutated V560G KIT allele or a double mutated V560G D816V KIT allele, respectively, are a gift of Michel Arock. HEK-T cell line was grown in DMEM - FBS 10 % - antibiotics supplemented with G418 (0.5 mg/mL) (Gibco). All these cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere enriched in CO₂ (5 %).

Insect cells Sf9 and High Five cells (Invitrogen) were grown at 27°C in respectively Grace medium - 10 % FBS - or Express Five medium (both from Fisher Scientific) supplemented with 20 mM of L-Glutamine (Invitrogen) and antibiotics.

Primary antibodies and pharmacological reagents

For Western blot analysis, anti-KIT-ECD (H300) and anti-Erk 2 antibodies were obtained from Santa Cruz, anti-phospho-Akt (Ser 473) and anti-phospho-Erk (Thr 202/Tyr 204) from Cell Signaling, anti-Akt and anti-GAPDH from Millipore and anti-phospho-KIT (Y823) from Invitrogen. PE/Cy5-conjugated anti-human KIT 104D2 (Biolegend) and allophycocyanin (APC)-conjugated 104D2 (BD Biosciences) were used for flow cytometry analysis. Anti-KIT 104D2 mAb does not inhibit SCF binding to KIT. Imatinib was a gift from Serge Roche (Centre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire – CNRS UMR 5237, Montpellier, France) and dasatinib was obtained from Santa Cruz.

Recombinant soluble KIT extra cellular domain (ECD) expression and purification

Soluble recombinant KIT-ECD was produced in the baculovirus/insect cells system. The KIT-ECD insert in fusion to a 6xHis tag was generated by polymerase chain reaction (PCR) amplification of plasmid pSKΔSapl c-Kit (a gift from Frédéric Subra, LBPA, ENS Cachan, Cachan, France) using 5'-AGG ATC CCC ATG AGA GGC GCT CGC GG-3' and 5'-T TCT AGA CTA ATG ATG ATG ATG ATG GGT GTG GGG ATG GAT TT-3'. The amplified product containing *BamH* I (5' end) and *Xba* I (3' end) restriction sites was cloned into the vector pGEM-T Easy (Promega) and analyzed by restriction analysis. Kit-ECD *BamH* I/*Xba* I was subcloned from pGEM-T Easy into the BD Baculogold™ transfer vector pVL1383 (Beckton Dickinson). Recombinant Kit-ECD baculoviruses were produced in Sf9 cells following the BD Baculogold™ protocol. To produce soluble recombinant KIT-ECD protein, High Five cells were seeded in serum free medium, infected with recombinant baculoviruses and grown during four days in serum free medium. The culture medium, containing the secreted 6His-tagged KIT-ECD was collected and dialyzed in phosphate buffered saline (PBS) before purification with Ni-NTA affinity chromatography (Qiagen). The eluted fraction (elution buffer PBS-Imidazole 250 mM) was concentrated using Amicon concentrator device (Millipore) and buffered into PBS. Total protein concentration was determined by the BCA assay protein quantitation kit (Interchim) and purified proteins analyzed by SDS-PAGE in reducing conditions before Coomassie blue staining.

Selection of KIT-ECD specific phage antibodies

One hundred μL of KIT-ECD at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were used to coat a well of a maxisorp 96-well plate (Nunc) at 4°C overnight. The well was saturated with PBS-2 % milk for 2 hrs at room temperature (RT) before adding 10^{11} cfu of the phage library (Sheets, Amersdorfer et al. 1998) diluted in PBS-2 % milk. After a 2 hr incubation at RT, the plate was washed 20 times with PBS-Tween 0.1 % and 10 times with PBS. Phages were eluted with triethylamine 100 mM and neutralized with a solution of Tris 1M pH 7. Input phages and output phages were tittered by infection of *Escherichia coli* TG1 to monitor the selection as described (Marks, Hoogenboom et al. 1991). Bound phages were amplified for another round of selection. Three rounds of selection were performed. After two and three rounds of selection, soluble scFv were expressed from single colonies grown in 96-well plates and induced with IPTG 1mM overnight as described (Marks, Hoogenboom et al. 1991). Crude culture supernatants, containing soluble scFv were tested by ELISA for their binding to recombinant KIT-ECD or bovine serum albumin (BSA) (Sigma) as described in (Schier, Bye et al. 1996). The diversity of positive clones on ELISA was determined by sequencing with the primer LMB3 5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3'.

Human scFv-Fc expression and purification

To express scFv in fusion with the Fc fragment of human Ig $\gamma 1$, scFv cDNA was *Nco I/Not I* digested from phagemid pHEN (Hoogenboom, Griffiths et al. 1991) and subcloned into pFUSE-hFc2(IL2ss) vector (Moutel, El Marjou et al. 2009), a gift from Frank Perez, CNRS-Institut Curie UMR144, Paris, France). Soluble 110 kDa scFv-Fc were produced after transient transfection of HEK-T cells cultivated into 150 cm^2 tissue culture dishes. When cells reached 80% confluence, culture medium was removed and replaced with DMEM - antibiotics. Transfection was performed using 30 μg of plasmid DNA and 200 μg of polyethylenimine (Polyscience). After 5 days at 37°C, cell supernatant was collected and scFv-Fc was purified with protein A-sepharose column (GE Healthcare). Eluted fractions were diluted in PBS and concentrated on Amicon ultra-4 centrifugal units. ScFv-Fc binding botulinum neurotoxin (Bot (Amersdorfer, Wong et al. 1997)) and CD71 (H7) (Crépin 2009) produced in the same conditions were used as irrelevant antibody fragment and anti-proliferative positive control, respectively.

Analysis of scFv-Fc binding to recombinant KIT-ECD by ELISA

A maxisorp 96-well plate was coated with KIT-ECD (or BSA) diluted at 5 µg/mL in PBS overnight at 4°C. Wells were saturated with 300 µL of PBS-BSA 1 % during 2 hrs at RT. ScFv-Fc were diluted in PBS-BSA 1 % and incubated 2 hrs at RT. The plate was washed twice with PBS-Tween 0.05 % and once with PBS before adding goat anti-human Fc fragment Ig conjugated to HRP (Sigma). The plate was revealed with a 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) solution (Roche). Fits and EC₅₀ were determined with GraphPad software.

Flow cytometry

Two hundred thousand of cells were resuspended in 100 µL of PBS-1 % FBS (FACS buffer) at 4°C. scFv (crude bacteria supernatant) and purified scFv-Fc binding (10 µg/mL) (2 hrs at 4°C) was detected using an anti-c-myc antibody (9E10; Sigma) followed by goat anti-mouse Ig conjugated to PE (Beckton Dickinson) or goat F(ab')₂ fragment anti-human Fc fragment conjugated to PE (Rockland) respectively. **For competition experiments**, cells were preincubated with SCF (1 µg/mL) during 40 min before adding the scFv-Fc. Fits and EC₅₀ were determined with GraphPad software. **For internalization experiments**, cells were seeded at 5.10⁵ in 700 µL per well and incubated with antibodies (2D1-Fc, 3G1-Fc or Bot-Fc) at 10 µg/mL for 1, 4, 24 or 72 hrs at 37°C. KIT cell surface expression was detected with PE/Cy5-conjugated anti-KIT 104D2. Cells were analyzed with a FACS Quanta (Beckman Coulter).

Western blot analysis

Cells were rapidly washed with stop buffer [150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 6.7), 1 mM EDTA, 2 mM Na₃VO₄, 7.5 mM, Na₄P₂O₇, 100 mM NaF] and lysed in stop buffer complemented with 1 mM PMSF, 0.25 % DOC, 1 % NP40 and protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostic). Lysates were incubated for 30 min on ice and cleared by centrifugation at 13 000 x g for 10 min at 4°C. Fresh lysates were quantified with BCA assay (Interchim). Thirty µg of proteins were combined in reducing loading buffer [2M Tris (pH 6.7), 4% SDS, 40 mM DTT, 40% glycerol, bromophenol blue], resolved by SDS-PAGE, and transferred onto a nitrocellulose membrane (Amersham Bioscience).

Proliferation assay

UT-7/Epo were seeded at 10^4 per well and treated for 4 days with 2D1-Fc, 3G1-Fc, H7-Fc or Bot-Fc irrelevant antibody used at 5 or 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in presence of Epo or CHO-KL supernatant diluted 500 times. HMC1.1 and 1.2 were treated the same but for 7 days and with 1 % FBS and without cytokines. Cell viability was estimated with MTS assay (Promega) as recommended by the manufacturer.

Results

Selection and initial characterization of KIT-ECD-specific single chain Fv antibodies

The goal of this study was to isolate fully human KIT-specific antibodies that could inhibit KIT signaling to interfere with cancer cell growth in KIT dependent tumors. We proceeded with an antibody phage-display selection against a recombinant form of human KIT-ECD (amino acid 26 to 509, P10721 UniProtKB/Swiss-Prot), that we produced in insect cells by baculovirus infection. The purified C-terminal 6His-tagged recombinant KIT-ECD was analyzed on a reducing SDS-PAGE gel (Fig. 1A) and showed a major protein of 60 kDa also detected by Western blot with an antibody directed against KIT-ECD (Fig. 1B) which validated the production.

For selections, phages were prepared from a 7.0×10^9 member human scFv phage naïve antibody library (Sheets, 1998). After 3 rounds of selection (Table 1), 94 clones from the second and third rounds were tested for binding to recombinant KIT-ECD by soluble scFv ELISA. Positive clones (7/94 for the second round; 13/94 for the third round) were sequenced and analyzed, identifying 8 different scFv that presented different frequency of selection, 2D1 being the most frequent (Fig. 1C). Five of these clones were present since the second round of selection (2D1, 2A3, 2B8, 2B12, 2A6), 3 appeared only after 3 rounds of selection (3G1, 3C12, 3A12). Because these clones had been selected for their affinity for a recombinant form of human KIT produced in insect cells, that have distinct N-glycosylation enzymatic machineries compared with mammalian cells (Shi and Jarvis 2007), we tested whether they could also bind to endogenous KIT using the highly expressing KIT human mastocytoma cell line HMC1.2. Five antibodies out of eight (2D1, 2A3, 3G1, 2B12, 2A6) in a scFv soluble format, were found to stain HMC1.2 cells -and therefore to detect endogenous KIT with enough sensitivity- (Fig. 1D) and processed for further analysis.

Conversion into a bivalent scFv-Fc formats

In order to increase the avidity for KIT, the 5 anti-KIT monovalent scFv were converted into a bivalent scFv-Fc format (Moutel *et al.*, 2009) consisting of a fusion at the C-terminal end of the scFv of the hinge domain and the 2 constant domains of the human γ 1 Ig isotype. Single chain Fv-Fc molecules were produced in HEK-T cells and purified using protein A affinity chromatography. SDS-PAGE analysis of recovered molecular species showed proteins with the expected 110 kDa molecular weight corresponding to covalently linked scFv-Fc homodimers (55 kDa each) (Fig. 2A). We next validated the 5 scFv-Fc by testing their binding to recombinant KIT-ECD by ELISA. K_d (apparent affinity constant or EC₅₀) (Table 2) were in the nmolar range except for 2A6-Fc, for which no saturation of the ELISA signal was obtained suggesting a poor binding capacity. Within the antibodies tested, 2D1-Fc displayed the lowest apparent K_d (EC₅₀ of 0,067 μ g/mL or 0.6 nM) (Fig. 2B). Therefore, reformatting from scFv to scFv-Fc and production in mammalian cells instead of bacteria conserved antibody specificity since all scFv-Fc bound to the receptor while Bot-Fc, an irrelevant antibody fragment of the same format produced in the same conditions, did not.

ScFv-Fc binding on cells and competition with SCF binding to KIT

We tested the binding of the 5 anti-KIT scFv-Fc to cell lines expressing different levels of surface KIT using the commercial 104D2 mouse mAb (Broudy, Lin *et al.* 1998) including the human HMC1.2 cell line (high levels of KIT), the human erythroleukemic cell line TF-1 (medium levels of KIT) and the murine pro-B Ba/F3 cell line modified to express human KIT (low levels of KIT) (Fig. 3A). The parental Ba/F3 cell line, that does not express endogenous mouse KIT, was used as a negative control. FACS analysis showed KIT detection on HMC1.2 cells using all 5 anti-KIT scFv-Fc (10 μ g/mL), 2A6-Fc showing lower staining, but only 2B12, 2D1 and 3G1-Fc stained Ba/F3-KIT cells, while staining was negative on the Ba/F3 cell line (Fig. 3B). Since, unexpectedly 2A3 scFv-Fc did not stain the Ba/F3 KIT cell line, we also tested its binding to TF-1 cells, that expresses endogenously KIT at medium levels (Fig. 3A). All anti-KIT scFv-Fc including 2A3 stained TF-1, 2A6 showing minor staining (Fig. 3B).

We tested then if the selected antibodies could block SCF binding to KIT. HMC1.2 cells were maintained at 4°C and incubated with SCF (1 μ g/mL) or not before adding the anti-KIT scFv-Fc (10 μ g/mL) and bound antibodies were detected by FACS (Fig. 3C). 2A6, 2D1 and 3G1 binding was significantly reduced by a pre-incubation with SCF suggesting that SCF and

antibodies bind overlapping sites on the receptor. Alternatively, SCF could induce a conformational change in KIT that prevents further binding of the anti-KIT antibodies.

Antibody interference with WT KIT signaling

Because KIT activation results from dimerization induced by SCF binding, anti-KIT scFv-Fc might activate KIT in an agonistic manner due to their dimeric format. We tested this hypothesis on the TF-1 cell line that displays 2 alleles of WT KIT. TF-1 cells were starved overnight before incubation with the scFv-Fc (10 µg/mL). Western blot analysis of crude protein extracts showed that none of the scFv-Fc induced KIT phosphorylation (data not shown). Alternatively, we tested whether the scFv-Fc could prevent KIT stimulation by SCF. Starved TF-1 cells were incubated with scFv-Fc (45 min) before stimulation with recombinant SCF (100 ng/mL, 5 min). Western blot revealed that 2A6, 2D1 and 3G1 inhibited SCF induced KIT phosphorylation on tyrosine 823 (Y823), 2D1 and 3G1 being the most effective while irrelevant antibody Bot-Fc did not (Fig. 4A). AKT phosphorylation was also reduced by the same antibodies, with stronger reduction with 2D1 and 3G1. In the rest of the study, we focused on 2D1 and 3G1 scFv-Fc formats.

To investigate if the antagonistic effect of 2D1 and 3G1 scFv-Fc antibody formats on SCF-dependent KIT signaling translated into functional effects, we used the UT-7/Epo cell line which is dependent on either Epo or SCF for its proliferation *in vitro* (Fig. S1: growth of UT-7/Epo in the presence of Epo or CHO-KL and effects on KIT levels) (Erickson-Miller, Pelus et al. 2000). UT-7/Epo cells were incubated 4 days with antibodies and the effect on cell viability was measured. 2D1-Fc and 3G1-Fc alone did not sustain the growth of the UT-7/Epo cell line (not shown) and had no effect on cells grown with Epo (Fig. 4B left). 2D1-Fc and 3G1-Fc decreased cell viability in a dose dependent manner when cells were cultivated with SCF (Fig. 4B right), while H7-Fc, an anti-TfR1 (transferring receptor 1) antibody in the same format, decreased cell viability both in Epo and SCF cultivated cells and irrelevant antibody Bot-Fc had no effect (Fig. 4B). Also, like in TF-1 cells, the anti-KIT antibodies inhibited downstream KIT signaling pathways (phosphorylation of KIT on Y823, phosphorylation of AKT and ERK1/2) and when used alone did not stimulate KIT signaling (Fig. 4C).

These results show that KIT specific 2D1 and 3G1 scFv-Fc antibodies inhibit SCF-dependent KIT signaling and cell viability in cells expressing WT KIT and that this effect is likely in part due to do the blockade of SCF binding to KIT. To complete the characterization of 2D1 and 3G1, their intrinsic affinity for KIT-ECD was determined by surface Plasmon resonance (173 and 66 nM, respectively) (Fig. S2).

Antibody modulation of KIT levels in a WT context

In a therapeutic orientated strategy, one way to reduce WT KIT signaling in cancer cells would be to decrease KIT levels at the cell surface in order to reduce its access to SCF.. SCF binding to KIT at the cell surface has been shown to rapidly induce internalization and degradation of KIT (Masson, Heiss et al. 2006) and reexpression at the cell surface required neosynthesis of KIT (Shimizu, Ashman et al. 1996). We wondered if the 2D1 and 3G1 anti-KIT scFv-Fc, despite not inducing KIT phosphorylation, would trigger KIT internalization and degradation like SCF and would have a long term effect on KIT levels at the cell surface. We analyzed the effect of antibody treatment on KIT surface level by FACS using the 104D2 anti-KIT mAb that does not interfere with 2D1 and 3G1 for KIT binding (Fig. S3).

First, we analyzed short term effect of anti-KIT antibodies compared to SCF treatment. Addition of 2D1 or 3G1 scFv-Fc formats to UT-7/Epo cultivated in the presence of Epo (and no SCF) rapidly initiated drastic KIT cell surface down-regulation (Fig. 5A) but did not affect total KIT levels (Fig. 5B). The kinetics of surface decrease were similar when cells were treated with SCF but lower maximal reduction was obtained with antibodies than with SCF (50 % versus 70 %, respectively). Cell surface down-regulation remained stable after 24 h, both in the presence of antibodies or ligand even though after 4 hrs of treatment, KIT surface levels started to increase slightly, due to increased neosynthesis (data not shown). Altogether these data show that both antibodies induced internalization of non phosphorylated KIT (Fig. 4C).

Then, we analyzed long term effect of mAb treatment in the same conditions (i.e. cells cultivated with Epo as a source of cytokine). We observed that KIT surface levels were maintained low with 2D1 or 3G1 scFv-Fc formats after 3 days of treatment (Fig. 5C) and accompanied this time with a slight decrease of KIT total levels (Fig. 5D), compared to non treated cells or cells treated with both Epo and SCF. In contrast, SCF treatment alone resulted in an upregulation of KIT surface and total levels, consistent with published data showing that the stimulation of the Epo/EpoR axis decreases KIT expression (Kosmider, Buet et al. 2009). Since in the same cell model, KIT TKI Imatinib was recently shown to decrease KIT levels (D'Allard, Gay et al. 2013), we tested a combination treatment of anti-KIT antibody and Imatinib. Interestingly, the combination had an additive effect to KIT surface level reduction (Fig. 5E). Therefore, the anti-KIT scFv are able to downregulate KIT levels at the cell surface when it is not stimulated and combination with Imatinib treatment increases this effect.

Antibody interference with oncogenic KIT signaling and surface levels

Mastocytoma HMC1.1 and HMC1.2 cell lines express constitutively active oncogenic KIT mutants (KIT V560G and KIT V560G D816V, respectively) and depend on KIT signaling for growth and survival (Shah, Lee et al. 2006). In these cell lines, KIT signaling is SCF-independent but since 3G1 and 2D1-Fc were able to induce KIT internalization in UT-7/Epo cells, we tested their effect on HMC1 cell lines. As expected, imatinib and dasatinib were toxic to HMC1.1 cells but only dasatinib was toxic to HMC1.2 cells due to the resistance of the D816V mutant to imatinib (Fig. S4). HMC1.1 and HMC1.2 cell lines were treated with the antibodies at 5 and 50 µg/mL for 7 days and cell viability was quantified. Only 2D1 antibody decreased the viability of HMC1.1 cell and both 2D1 and 3G1-Fc decreased the viability of HMC1.2 cells (Fig. 6A) while irrelevant antibody had no effect. Iron depriving anti-TfR1 H7 antibody (Crepin et al. 2010) decreased viability of HMC1.2 cells but had no effect on HMC1.1 cells which are less proliferative than HMC1.2 in these conditions (not shown), likely because iron metabolism is essential for more proliferating cells.

To understand the mechanism of inhibition of cell viability, surface level KIT modulation kinetics were analyzed like on UT-7/Epo cell line. In both mastocytoma cell lines, after 1 h, both 2D1 and 3G1 induced a strong decrease of KIT levels similar to SCF treatment (Fig. 6B left). Upon a 72 hr treatment, the down-regulation of KIT surface expression was maintained with the two antibodies on both HMC1 cell lines (Fig. 6C) and unlike in UT-7/Epo cells, surface down-regulation of KIT was associated with strong decrease of total KIT levels after 4 hrs (Fig. 6D) which was maintained after 72 hrs in both cell lines (Fig. 6E). On the contrary, SCF treatment induced only transient decrease of KIT surface levels and total KIT levels were not affected (Fig. 6C, D, E) due to rapid KIT neosynthesis since decrease was maintained in the presence of cycloheximide (not shown). Additionally, inhibition of kinase activity reversed KIT degradation (Fig. 6F, G).

Altogether these data show that, the 2D1 and 3G1-Fc inhibit viability of mastocytoma cell lines including HMC1.2 cells that are resistant to imatinib. On these cells that are dependent of oncogenic KIT signaling for their growth and survival, 2D1 and 3G1-Fc induce a strong KIT degradation, contributing to reducing oncogenic KIT downstream signaling. Moreover, mechanisms involved in reduced cell viability are different in WT and mutant backgrounds: 2D1 and 3G1-Fc affect UT-7/Epo growth by blocking SCF binding to KIT, decreasing KIT surface levels and inducing a slight KIT degradation. In mastocytoma cell lines, growth inhibition is due to a strong antibody induced KIT degradation dependent on KIT phosphorylation.

Discussion

Phage antibody libraries have become useful tools to isolate and develop antibodies suitable for diagnostic or therapeutic uses. Most of antibodies selected from combinatorial libraries expressed on phage have been isolated using purified antigens immobilized on artificial surfaces. This approach might select antibodies that recognize or not the native protein in a physiological context. In this work we generated 8 antibodies against the KIT-ECD produced in insect cells (Fig. 1). The antibody 2D1-Fc represented 40 % of the binders recovered in this selection. Three out of 8, when expressed as soluble monovalent scFv, did not detect endogenous KIT on HMC1.2 cells even though they bound recombinant KIT, maybe due to a low affinity for KIT or to the recognition a N-glycosylation specific to insect cells (Shi and Jarvis 2007). When reformatted into a bivalent scFv-Fc format and produced in mammalian cells, all 5 remaining antibodies bound to high KIT expressing HMC1.2 cells but 2 did not detect KIT on Ba/F3 cells transfected to express WT human KIT (Fig. 3B). This lack of binding is likely due to lower affinity for KIT in the case of 2A6 (Table 2) but the reason is unclear for 2A3 since its affinity for KIT (Table 2) and staining intensity of KIT on TF-1 and HMC1.2 cells (Fig. 3B) were in the same order of magnitude than the other 3 antibodies 2B12, 2D1 and 3G1 that indeed detect KIT on Ba/F3-KIT cells.

Wild type KIT dimerization induced by SCF is required to transphosphorylate its intracellular domain. Because of the scFv-Fc dimeric format we used, we expected a possible agonist activity of this format on KIT. Nevertheless, none of the 5 anti-KIT scFv-Fc induced KIT phosphorylation or were able to maintain the growth of SCF-dependent cell lines (TF-1, UT-7/Epo) in cytokine free medium (data not shown). On the contrary, 3 antibodies (2A6-Fc, 2D1-Fc and 3G1-Fc) inhibited SCF-dependent KIT phosphorylation likely by competing with SCF for binding to KIT. The best competitors (2D1 and 3G1) reduced cell viability of UT-7/Epo cells when grown in the presence of SCF as a source of cytokine but not in the presence of Epo, demonstrating that they specifically and efficiently inhibited KIT signaling. Therefore this strategy allowed the isolation of antibodies that block SCF access to KIT and WT KIT downstream signaling in the presence of SCF.

KIT level at the cell surface, independently of neosynthesis variations, depends on KIT catalytic activity since inhibition of KIT mutant activity with pharmacological drugs relocalizes KIT at the cell surface within minutes (Bougherara, Subra et al. 2009). In normal mast cells, upon SCF stimulation, KIT is rapidly degraded (within hours) and its surface expression totally renewed at the cell surface after 48 hrs exclusively by neosynthesis (Shimizu, Ashman et al. 1996). No recycling has been described for KIT. Receptor kinase activity is required for

SCF-induced efficient degradation of KIT which involves Cbl-dependent ubiquitinylation of KIT and both lysosomal and proteasomal pathways (Yee, Hsiau et al. 1994).

Oncogenic mutated forms of KIT display a modified subcellular localization compared to WT KIT with a substantial fraction of the protein being linked to intracellular vesicles and able to initiate signaling from inside the cell (Xiang, Kreisel et al. 2007). It is unclear if KIT mutant expression at the cell surface is required for oncogenic signaling *in vivo* and how mutated KIT interacts with co-expressed WT KIT in cancer cells (Bachet, Tabone-Eglinger et al. 2013), and influences WT KIT intracellular trafficking.

Since WT KIT was not activated (not phosphorylated on tyrosine823) by the anti-KIT antibodies 2D1 and 3G1 while binding to an overlapping epitope with SCF, we addressed the question of the modulation of KIT at the cell surface and its degradation upon antibody treatment. Interestingly, internalization of KIT was observed independently of a WT or mutated context (either catalytic or juxtamembrane mutant) but not degradation, which was much stronger in a mutant context (Fig. 5 and 6). Indeed, the degradation of KIT by 2D1 and 3G1 antibodies required that KIT is activated and phosphorylated since it only occurred on mutant KIT and was reversed by kinase inhibition by Dasatinib. Recently, D'allard *et al.* showed that the occupation of the KIT intracellular kinase domain ATP binding site by an TKI could induce KIT internalization and degradation, in the absence of stimulation by SCF (D'Allard, Gay et al. 2013). Interestingly, we observed on the same cell model that anti-KIT antibodies 2D1 and 3G1 but not SCF treatment associated with imatinib have an additive effect on KIT cell surface reduction (Fig. 5E).

Recently, a few studies using anti-KIT antibodies for cancer therapy have been reported. Edris and colleagues studied the effect of SCF competing anti-KIT antibody SR1 (Papayannopoulou, Brice et al. 1991) on GIST cell lines presenting various KIT mutant alleles but did not observed KIT degradation after long time treatment (Edris, Willingham et al. 2013), suggesting a different mechanism than 2D1 and 3G1 antibodies. In a mouse model, SR1 was reported to limit GIST progression by a macrophage-dependent mechanism (Edris, Willingham et al. 2013) It would be interesting to test KIT degrading 2D1 and 3G1 anti-KIT antibodies on GIST cell models with an expected increased inhibitory effect compared to SR1 antibody. An antibody able to inhibit KIT dimerization (targeting domains D4-D5) (Reshetnyak, Nelson et al. 2013) has also been described. The 2D1 and 3G1 display a specific mechanism of KIT inhibition compared to these antibodies. Finally, a radiolabelled anti-KIT antibody (12A8 mAb) was shown to decrease SCLC progression in a mouse model (Yoshida, Tsuji et al. 2013).

Compared to small inhibitors, antibody based immunotherapy of tumors have the advantage to recruit immune effectors through the Fc part of the antibody (Adams and Weiner 2005). Because the scFv we selected were engineered to have an Fc fragment, they can theoretically recruit immune effectors like NK cells for ADCC (antibody-dependent cell cytotoxicity) or mediate cell lysis through the complement cascade (CDC). Antigen level on target cells is one of the parameter that is involved in efficiency of effector functions of mAbs used for therapeutics. To our knowledge, of the blocking anti-KIT antibodies published or commercially available, of mouse (like ACK2 rat mAb (Ogawa, Matsuzaki et al. 1991)) or human (like 12A8 mouse mAb (Yoshida, Tsuji et al. 2013)) KIT specificity, none has been described to mediate ADCC or CDC. The SR1 antibody (a chimeric anti-human KIT antibody, of human gamma 1 isotype like 2D1 and 3G1 scFv-Fc of this study, and also competing with SCF for KIT binding) was shown to mediated phagocytosis by macrophages of mutant KIT expressing GIST cell lines *in vitro* (Edris, Willingham et al. 2013). We have not been able to observe scFv-Fc anti-KIT mediated ADCC and CDC using as targets the high KIT expressing HMC1.1 and HMC1.2 cells (unpublished data). High expression of the antigen on cells is not the only factor that is required for efficient ADCC, epitopes that retarget the antigen in lipid rafts, are required for optimum complement activity (Natsume, Niwa et al. 2009), that might not be the case for 2D1 and 3G1. The inability of anti-KIT antibodies to mediate ADCC or CDC are probably linked to their mild toxicity observed in animal models. In early studies, the SCF blocking rat anti mouse KIT ACK2 (devoided of ADCC and CDC functions) has been used as a tool to target KIT signaling dependent tissues (Ogawa, Matsuzaki et al. 1991). A treatment with 100 µg every day for 12 days inhibited totally spermatogenesis but only partially hematopoiesis and had no effect on oocytes showing distinct sensitivities to ACK2 of KIT-dependent tissues. In a more recent study, testing a combination of irradiation and KIT targeting for pretransplantation conditioning for bone marrow, ACK2 used alone induced a strong but reversible reduction of hematopoietic stem cells (HSC) number confirming that inhibition of KIT does not impair irreversibly HSC functional capacity (Xue, Pech et al. 2010). Together with the fact that in GIST patients, Imatinib does not induce profound hematological toxicity, these observations let anticipate that anti-KIT treatment using antibodies might not display strong side effects.

To conclude, we isolated the 2D1 and 3G1-Fc inhibiting cell viability of mastocytoma cell lines including cells that are resistant to imatinib due to the presence of the D816V mutation on KIT. On these cells, that are dependent on oncogenic KIT signaling for their growth and survival, 2D1 and 3G1-FC induce a strong and long term KIT degradation, reducing oncogenic downstream signaling. In leukemic cells dependent of KIT WT signaling for their survival, in addition to block SCF binding to KIT, anti-KIT antibodies induced KIT

internalization which contributed to decrease efficiently SCF-dependent KIT signaling. These fully human antibodies, that do not elicit immune effector function targeted to KIT expressing cells, therefore anticipating limited toxicity *in vivo*, represent promising molecules for targeting cancer cells depending on KIT signaling for their survival.

Bibliography

Adams, G. P. and L. M. Weiner (2005). "Monoclonal antibody therapy of cancer." *Nat Biotechnol* 23(9): 1147-1157.

Amersdorfer, P., C. Wong, et al. (1997). "Molecular characterization of murine humoral immune response to botulinum neurotoxin type A binding domain as assessed by using phage antibody libraries." *Infect Immun* 65(9): 3743-3752.

Antonescu, C. R., P. Besmer, et al. (2005). "Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumor occurs through secondary gene mutation." *Clin Cancer Res* 11(11): 4182-4190.

Bachet, J. B., S. Tabone-Eglinger, et al. (2013). "Gene expression patterns of hemizygous and heterozygous KIT mutations suggest distinct oncogenic pathways: a study in NIH3T3 cell lines and GIST samples." *PLoS One* 8(4): e61103.

Bernex, F., P. De Sepulveda, et al. (1996). "Spatial and temporal patterns of c-kit-expressing cells in *WlacZ/+* and *WlacZ/WlacZ* mouse embryos." *Development* 122(10): 3023-3033.

Blechman, J. M. and Y. Yarden (1995). "Structural aspects of receptor dimerization. c-kit as an example." *Ann N Y Acad Sci* 766: 344-362.

Bougherara, H., F. Subra, et al. (2009). "The aberrant localization of oncogenic kit tyrosine kinase receptor mutants is reversed on specific inhibitory treatment." *Mol Cancer Res* 7(9): 1525-1533.

Broudy, V. C. (1997). "Stem cell factor and hematopoiesis." *Blood* 90(4): 1345-1364.

Broudy, V. C., N. L. Lin, et al. (1998). "Analysis of c-kit receptor dimerization by fluorescence resonance energy transfer." *Blood* 91(3): 898-906.

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, 3465-3472." *Blood* 84: 3465-3472.

Crépin, R., Poul, M.-A., Marks, J. D. (2009). "ANTICORPS HUMAINS CYTOTOXIQUES CIBLANT LE RECEPTEUR DE LA TRANSFERRINE." 09/06090.

D'Allard, D., J. Gay, et al. (2013). "Tyrosine kinase inhibitors induce down-regulation of c-Kit by targeting the ATP pocket." *PLoS One* 8(4): e60961.

Demetri, G. D., M. von Mehren, et al. (2002). "Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors." *N Engl J Med* 347(7): 472-480.

Edris, B., S. B. Willingham, et al. (2013). "Anti-KIT monoclonal antibody inhibits imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor growth." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(9): 3501-3506.

Emens, L. A. (2005). "Trastuzumab: targeted therapy for the management of HER-2/neu-overexpressing metastatic breast cancer." *Am J Ther* 12(3): 243-253.

Erickson-Miller, C. L., L. M. Pelus, et al. (2000). "Signaling induced by erythropoietin and stem cell factor in UT-7/Epo cells: transient versus sustained proliferation." *Stem Cells* 18(5): 366-373.

Heinrich, M. C., C. D. Blanke, et al. (2002). "Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies." *J Clin Oncol* 20(6): 1692-1703.

Hibi, K., T. Takahashi, et al. (1991). "Coexpression of the stem cell factor and the c-kit genes in small-cell lung cancer." *Oncogene* 6(12): 2291-2296.

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: 769-779.

Hodi, F. S., C. L. Corless, et al. (2013). "Imatinib for melanomas harboring mutationally activated or amplified KIT arising on mucosal, acral, and chronically sun-damaged skin." *J Clin Oncol* 31(26): 3182-3190.

Hoogenboom, H. R., A. D. Griffiths, et al. (1991). "Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains." *Nucleic Acids Res* 19(15): 4133-4137.

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.

Inoue, M., S. Kyo, et al. (1994). "Coexpression of the c-kit receptor and the stem cell factor in gynecological tumors." *Cancer Res.* 54: 3049-3053.

Kemmer, K., C. L. Corless, et al. (2004). "KIT mutations are common in testicular seminomas." *Am J Pathol* 164(1): 305-313.

Kitayama, H., Y. Kanakura, et al. (1995). "Constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase confer factor-independent growth and tumorigenicity of factor-dependent hematopoietic cell lines." *Blood* 85(3): 790-798.

Kosmider, O., D. Buet, et al. (2009). "Erythropoietin down-regulates stem cell factor receptor (Kit) expression in the leukemic proerythroblast: role of Lyn kinase." *PLoS One* 4(5): e5721.

Krystal, G. W., S. J. Hines, et al. (1996). "Autocrine growth of small cell lung cancer mediated by coexpression of c-kit and stem cell factor." *Cancer Res* 56(2): 370-376.

Lennartsson, J. and L. Ronnstrand (2012). "Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications." *Physiol Rev* 92(4): 1619-1649.

Lev, S., J. Blechman, et al. (1993). "Interspecies molecular chimeras of kit help define the binding site of the stem cell factor." *Mol Cell Biol* 13(4): 2224-2234.

Ma, P., R. S. Mali, et al. (2012). "Role of intracellular tyrosines in activating KIT-induced myeloproliferative disease." *Leukemia* 26(7): 1499-1506.

Marks, J. D., H. R. Hoogenboom, et al. (1991). "By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage." *J Mol Biol* 222(3): 581-597.

Masson, K., E. Heiss, et al. (2006). "Direct binding of Cbl to Tyr568 and Tyr936 of the stem cell factor receptor/c-Kit is required for ligand-induced ubiquitination, internalization and degradation." *Biochem J* 399(1): 59-67.

Micke, P., M. Basrai, et al. (2003). "Characterization of c-kit expression in small cell lung cancer: prognostic and therapeutic implications." *Clin Cancer Res* 9(1): 188-194.

Mol, C. D., K. B. Lim, et al. (2003). "Structure of a c-kit product complex reveals the basis for kinase transactivation." *J Biol Chem* 278(34): 31461-31464.

Moutel, S., A. El Marjou, et al. (2009). "A multi-Fc-species system for recombinant antibody production." *BMC Biotechnol* 9: 14.

Natsume, A., R. Niwa, et al. (2009). "Improving effector functions of antibodies for cancer treatment: Enhancing ADCC and CDC." *Drug Des Devel Ther* 3: 7-16.

Ogawa, M., Y. Matsuzaki, et al. (1991). "Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells." *J Exp Med* 174(1): 63-71.

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.

Papayannopoulou, T., M. Brice, et al. (1991). "Isolation of c-kit receptor-expressing cells from bone marrow, peripheral blood, and fetal liver: functional properties and composite antigenic profile." *Blood* 78(6): 1403-1412.

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: 1199-1206.

Reshetnyak, A. V., B. Nelson, et al. (2013). "Structural basis for KIT receptor tyrosine kinase inhibition by antibodies targeting the D4 membrane-proximal region." *Proc Natl Acad Sci U S A*.

Roskoski, R., Jr. (2005). "Signaling by Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor." *Biochem Biophys Res Commun* 337(1): 1-13.

Roskoski, R., Jr. (2005). "Structure and regulation of Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor." *Biochem Biophys Res Commun* 338(3): 1307-1315.

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.

Schier, R., J. Bye, et al. (1996). "Isolation of high-affinity monomeric human anti-c-erbB-2 single chain Fv using affinity-driven selection." *J Mol Biol* 255(1): 28-43.

Schittenhelm, M., O. Aichele, et al. (2003). "Complete remission of third recurrence of acute myeloid leukemia after treatment with imatinib (STI-571)." *Leuk Lymphoma* 44(7): 1251-1253.

Schittenhelm, M. M., S. Shiraga, et al. (2006). "Dasatinib (BMS-354825), a dual SRC/ABL kinase inhibitor, inhibits the kinase activity of wild-type, juxtamembrane, and activation loop mutant KIT isoforms associated with human malignancies." *Cancer Res* 66(1): 473-481.

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.

Sheets, M. D., P. Amersdorfer, et al. (1998). "Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(11): 6157-6162.

Shi, X. and D. L. Jarvis (2007). "Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell system." *Curr Drug Targets* 8(10): 1116-1125.

Shimizu, Y., L. K. Ashman, et al. (1996). "Internalization of Kit together with stem cell factor on human fetal liver-derived mast cells: new protein and RNA synthesis are required for reappearance of Kit." *J Immunol* 156(9): 3443-3449.

Stanulla, M., K. Welte, et al. (1995). "Coexpression of stem cell factor and its receptor c-Kit in human malignant glioma cell line." *Acta Neuropathol.* 89, 158-165 89: 158-165.

Toyota, M., Y. Hinoda, et al. (1994). "Complementary DNA cloning and characterization of truncated form of c-kit in human colon carcinoma cells." *Cancer Res.* 54: 272-275.

Wang, Y. Y., L. J. Zhao, et al. (2011). "C-KIT mutation cooperates with full-length AML1-ETO to induce acute myeloid leukemia in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(6): 2450-2455.

Went, P. T., S. Dirnhofer, et al. (2004). "Prevalence of KIT expression in human tumors." *J Clin Oncol* 22(22): 4514-4522.

Xiang, Z., F. Kreisel, et al. (2007). "Neoplasia driven by mutant c-KIT is mediated by intracellular, not plasma membrane, receptor signaling." *Mol Cell Biol* 27(1): 267-282.

Xue, X., N. K. Pech, et al. (2010). "Antibody targeting KIT as pretransplantation conditioning in immunocompetent mice." *Blood* 116(24): 5419-5422.

Yee, N. S., C. W. Hsiao, et al. (1994). "Mechanism of down-regulation of c-kit receptor. Roles of receptor tyrosine kinase, phosphatidylinositol 3'-kinase, and protein kinase C." *J Biol Chem* 269(50): 31991-31998.

Yoshida, C., A. B. Tsuji, et al. (2013). "Therapeutic efficacy of c-kit-targeted radioimmunotherapy using ⁹⁰Y-labeled anti-c-kit antibodies in a mouse model of small cell lung cancer." *PLoS One* 8(3): e59248.

Zermati, Y., P. De Sepulveda, et al. (2003). "Effect of tyrosine kinase inhibitor STI571 on the kinase activity of wild-type and various mutated c-kit receptors found in mast cell neoplasms." *Oncogene* 22(5): 660-664.

Table 1: Monitoring of phage antibody selection by titration. Input and output are expressed in pfu (particle forming units).

	Round 1	Round 2	Round 3
input	1.2 10 ¹²	1.0 10 ¹²	2 10 ¹⁴
output	3.0 10 ⁴	1.86 10 ⁵	1.33 ⁸
output/input	2.5 10 ⁻⁸	1.86.10 ⁻⁷	6.65.10 ⁻⁷

Table 2: EC50 of the scFv-Fc binding to KIT-ECD by ELISA. Concentration (µg/mL) of scFv-Fc antibody format giving 50% of maximal OD at 405 nm. Fits and EC₅₀ were determined with GraphPad software. NA, non appropriate

2A3-Fc	2A6-Fc	2B12-Fc	2D1-Fc	3G1-Fc
0.150	NA	0.480	0.067	0.24

FIGURES LEGENDS

Figure 1: Selection and initial characterization of a panel of anti-KIT scFvs

A, SDS-PAGE analysis of KIT-ECD produced in High Five cells infected by a recombinant baculovirus and purified after Ni-NTA affinity chromatography. **B**, Western blot analysis of purified KIT-ECD with an anti-KIT N-terminal antibody. **C**, analysis of the phage antibody diversity obtained in the 2nd and 3rd rounds of selection. Clones of phage antibody that were positive on ELISA for binding to KIT-ECD were sequenced. **D**, FACS analysis of scFv binding to HMC1.2 cells. ScFvs were induced with IPTG from TG1 bacterias containing pHEN phagemid. Supernatant were collected, concentrated and incubated with HMC1.2 cells at 4°C. ScFv binding to cells was detected with an anti-c-myc antibody and PE-anti-mouse Ig. Fluorescence was measured by FACS. MFI signal greater than 9 (MFI obtained with non-specific Bot-Fc) was considered positive.

Figure 2: Conversion of the phage antibody format into a dimeric scFv-Fc format

A, SDS-PAGE analysis of the 5 anti-KIT-ECD scFv-Fc and the irrelevant scFv-Fc Bot-Fc in non-reducing condition, left panel versus reducing conditions, right panel. ScFv-Fcs are produced in HEK-T cells and purified on protein A-agarose. **B**, ELISA analysis of purified scFv-Fc binding to recombinant KIT-ECD (see [Table 1](#) for EC50 calculation).

Figure 3: FACS analysis of scFv-Fc binding to HMC1.2, TF-1, Ba/F3-KIT and Ba/F3 cell lines

A, Cells were resuspended in FACS buffer and were incubated for 15 min at 4°C with 104D2 anti-KIT antibody conjugated to APC to determine KIT cell surface expression (black lane), isotype control (shaded). **B**, Cells were resuspended in FACS buffer and were incubated scFv-Fc (10 µg/mL) for 2 hrs at 4°C. Antibody binding to cells (black line) was detected with anti-human Fc fragment coupled to PE. Negative control experiment with Bot-Fc (shaded). **C**, Cells were incubated with recombinant SCF (1 µg/mL) at 4°C before incubation with scFv-Fc (10 µg/mL) and revelation as in B. Dashed lane, secondary antibody only, shaded, scFv-Fc binding and black lane, scFv-binding with SCF pre-incubation.

Figure 4: Antibody interference with WT KIT signaling

A, TF-1 cells were starved overnight in serum-free medium and incubated with scFv-Fc (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) before 5 min stimulation with SCF (100 ng/mL). KIT and AKT phosphorylation were analyzed by Western blot with phospho-specific antibodies. Total KIT and AKT levels were visualized after stripping the membranes and reprobing with anti-KIT and anti-AKT antibodies. **B**, UT-7/Epo cells were incubated in Epo (left panel) or CHO-KL supernatant (right panel) in the presence of anti-KIT antibodies or control antibody as indicated at 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (dashed) or 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (grey). Cell viability was measured by MTS assay and is expressed in % compared to non-treated cells (black). **C**, UT-7/Epo cells were starved overnight in serum-free medium and incubated with scFv-Fc (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) before 5 min stimulation with SCF (100 ng/mL). KIT, AKT and ERK1/2 phosphorylation were analyzed by Western blot with phospho-specific antibodies. Total KIT and ERK2 levels were visualized after stripping the membranes and reprobing with anti-KIT, anti-AKT and anti-ERK2 antibodies.

Figure 5: Antibody modulation of WT KIT in UT7/EPO cell line

UT-7/Epo cells were incubated in IMDM 10% FCS and EPO and treated for (A, B) 1, 4, 24 hrs (C, D), 72 hrs or (E) 4 hrs with scFv-Fc antibodies (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), CHO-KL (diluted 500 times) and Imatinib (2 μM) as indicated. (A, C, E) KIT surface levels were estimated by FACS upon treatment. Results expressed in MFI (Mean fluorescence intensity). (B, D) Total KIT levels were determined by Western blot using KIT and GAPDH specific antibodies as indicated.

Figure 6: Antibody modulation of oncogenic KIT in HMC1 cell lines

A, HMC1 cell lines were incubated for 7 days in IMDM 1% FCS in presence of anti-KIT (2D1 and 3G1-Fc) or control scFv-Fc antibodies (H7- and Bot-Fc) at 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (dashed) or 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (grey). Cell viability is expressed in % compared to non-treated cells (black). (B-F) HMC1 cells were incubated in IMDM 10% FCS in presence of scFv-Fc antibodies (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), CHO-KL (diluted 500 times) and dasatinib (1 μM) as indicated for 1, 2 and 24 hrs (B, D), 72 hrs (C, E) or 4 hrs (F, G). Treated cells were analyzed by FACS using 104D2 anti-KIT antibody (B, C, G) or by Western blot using anti-KIT and GAPDH antibodies (D, E, F). Representative data of 3 independent experiments each time.

Supplemental Figures

S1: Characterization of UT-7/Epo cell line cytokines dependency

A, UT-7/Epo cells were seeded at 10^5 cells/mL in IMDM 10% FCS in Epo 2 U/mL or CHO-KL cell supernatant diluted 500 times. After 4 days cell viability was measured by MTS assay. **(B, C)** UT-7/Epo were grown as above for 3 days and analyzed for KIT surface expression by FACS **(B)** and KIT total expression by Western blot **(C)**.

S2: Analysis of scFv-Fc binding to recombinant KIT-ECD by SPR and determination of kinetics data

A, B, Kinetic measurements were performed by real time SPR analysis. Each scFv-Fc was injected at 20 μ g/mL over 3 min and followed by an injection of KIT-ECD at different concentrations (from 20 nM to 330 nM). An irrelevant scFv-Fc (Bot-Fc) was used as negative control. **A** 2D1-Fc and 3G1-Fc sensorgrams were fitted with a Langmuir 1:1 plot. **B**, Intrinsic affinity of 2D1 and 3G1 were of 173 nM and 66 nM, respectively.

S3: 2D1 and 3G1-Fc do not compete with 104D2 mAb binding to KIT

UT-7/Epo, HMC1.1 and HMC1.2 were incubated with 1 or 10 μ g/mL of 2D1 or 3G1-Fc at 4°C, or without antibodies (NT) before incubation with anti-KIT 104D2-PE/Cy7 antibody and FACS analysis. Staining was not modified by 2D1 or 3G1-incubation showing that 104D2 is a suitable tool to measure surface KIT in the presence of 2D1 or 3G1-Fc.

S4: Sensibility of HMC1. cell lines to TKI

HMC1.1 and HMC 1.2 were grown in IMDM 10% FCS with imatinib or dasatinib (1 μ M) for 5 days. Cell viability was measured by MTS assay.

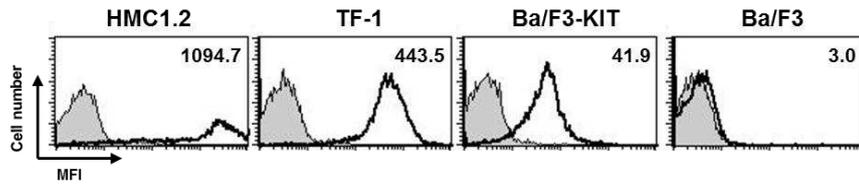
Supplemental Material and methods:

Analysis of scFv-Fc binding to recombinant KIT-ECD by SPR and determination of kinetics data

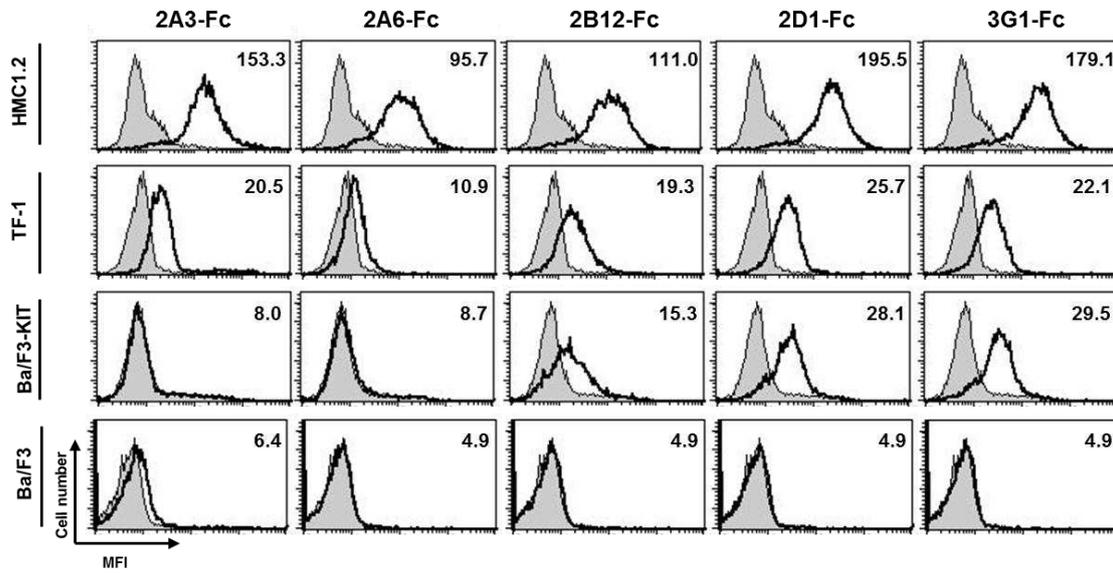
Kinetic measurements were performed by real time Surface Plasmon Resonance (SPR) analysis using a BIACORE 3000 apparatus (GE Healthcare, Biacore AB, Uppsala, Sweden). Anti-Human IgG (Fc) antibody was immobilized on a flow cell of a CM5 sensor chip following the anti-human capture kit protocol GEHealthcare. A reference flowcell was prepared with the same chemical treatment but without the antibody. All analysis were performed on the two flowcells, at 25 °C at a flow rate of 30 μ L/min using HBS-EP (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA and 0.005 % BiacoreTM surfactant) as running buffer. Each scFv-Fc was injected at 20 μ g/mL over 3 min and followed by an injection (90 μ L) of KIT-ECD at different concentrations (from 20 nM to 330 nM). After dissociation step of 400s, 3M MgCl₂ solution was used to regenerate the flowcell surfaces between each run. For each scFv a run with buffer instead of KIT-ECD was performed to correct the decaying surface effect. All sensorgrams were corrected by subtracting the signal of the reference flowcell and globally fitted using BIAevaluation 3.2 software.

Figure 3

A



B



C

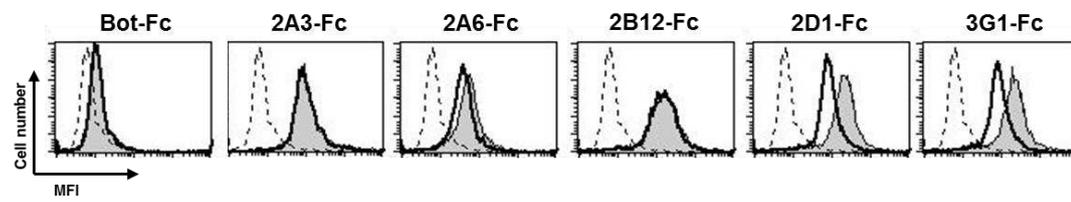


Figure 4

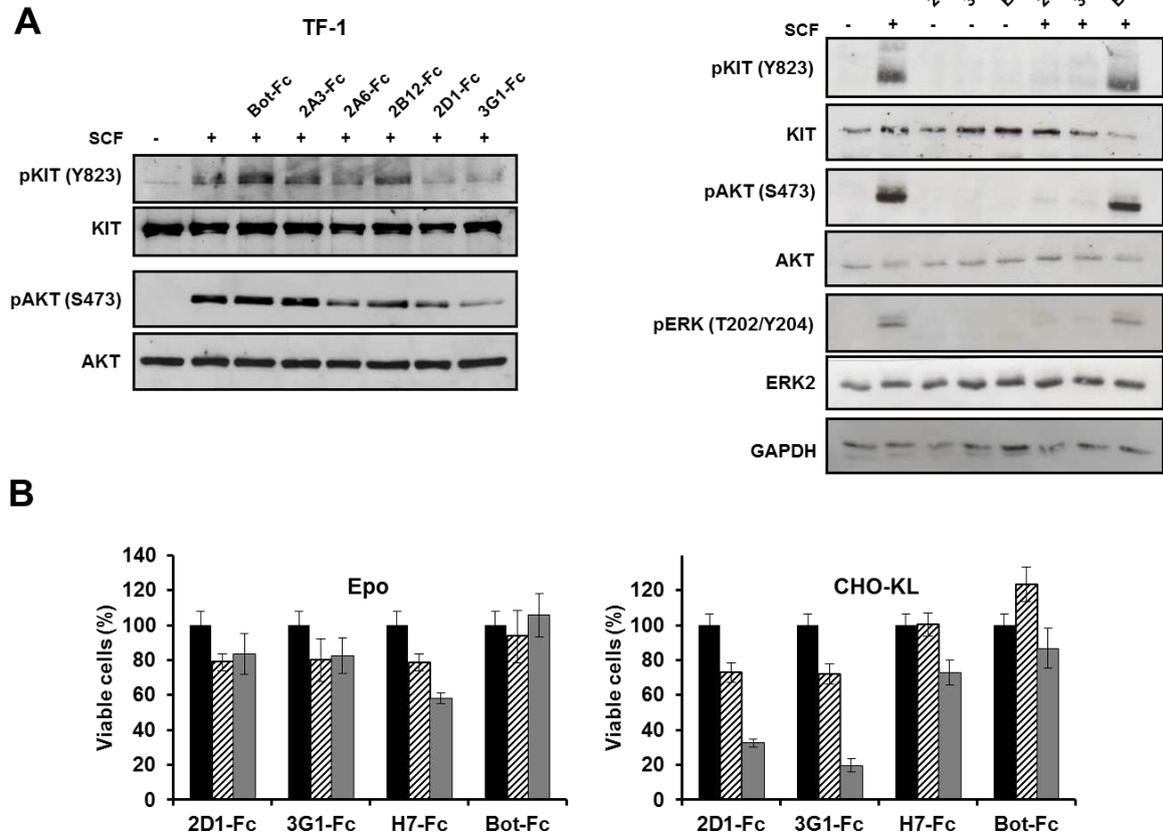


Figure 5

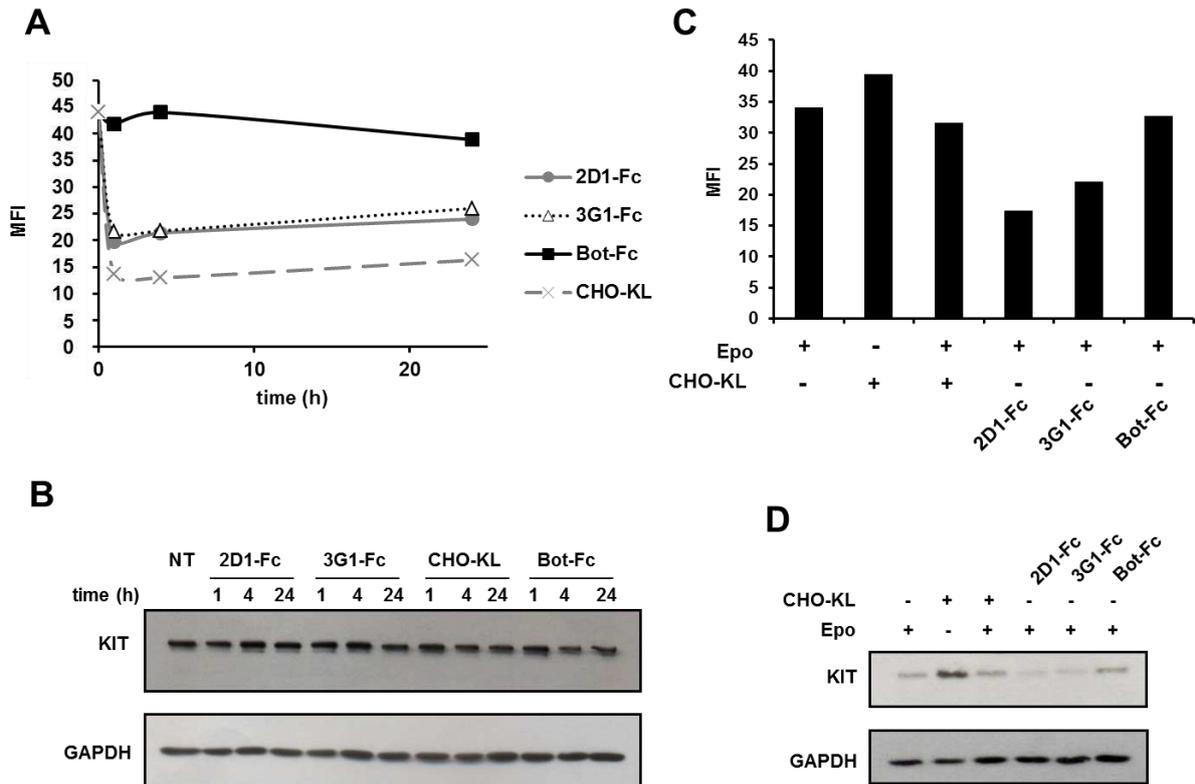


Figure 5

E

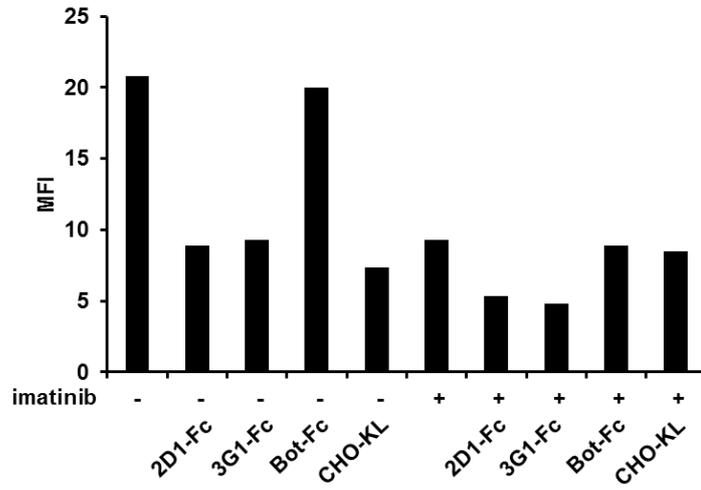
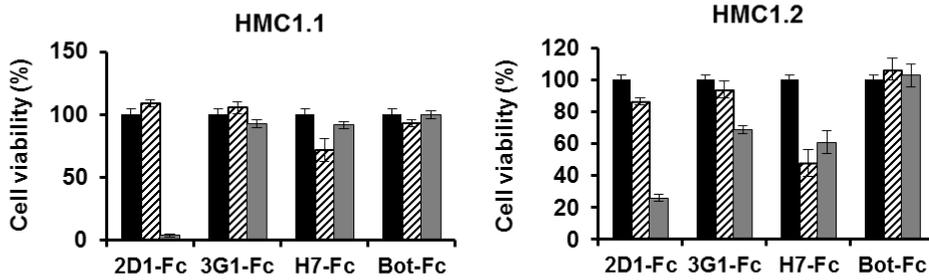
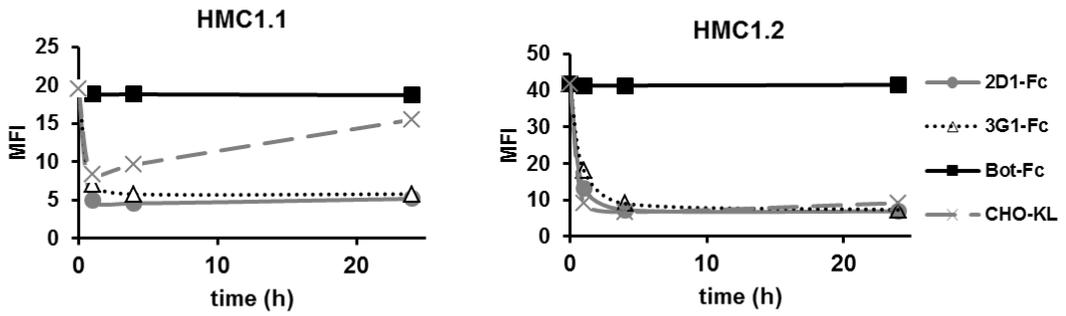


Figure 6

A



B



C

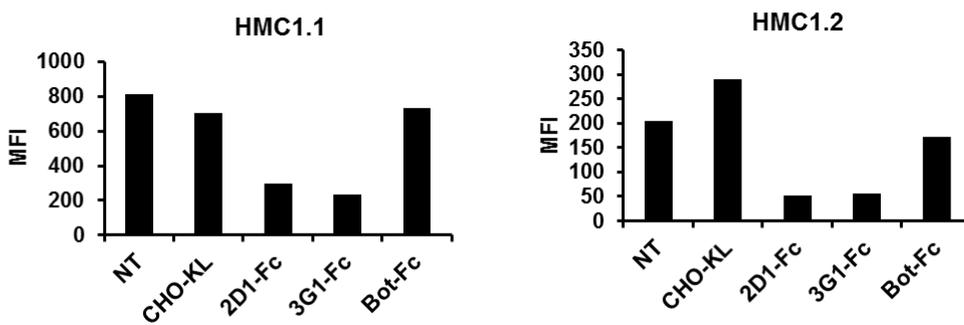


Figure 6

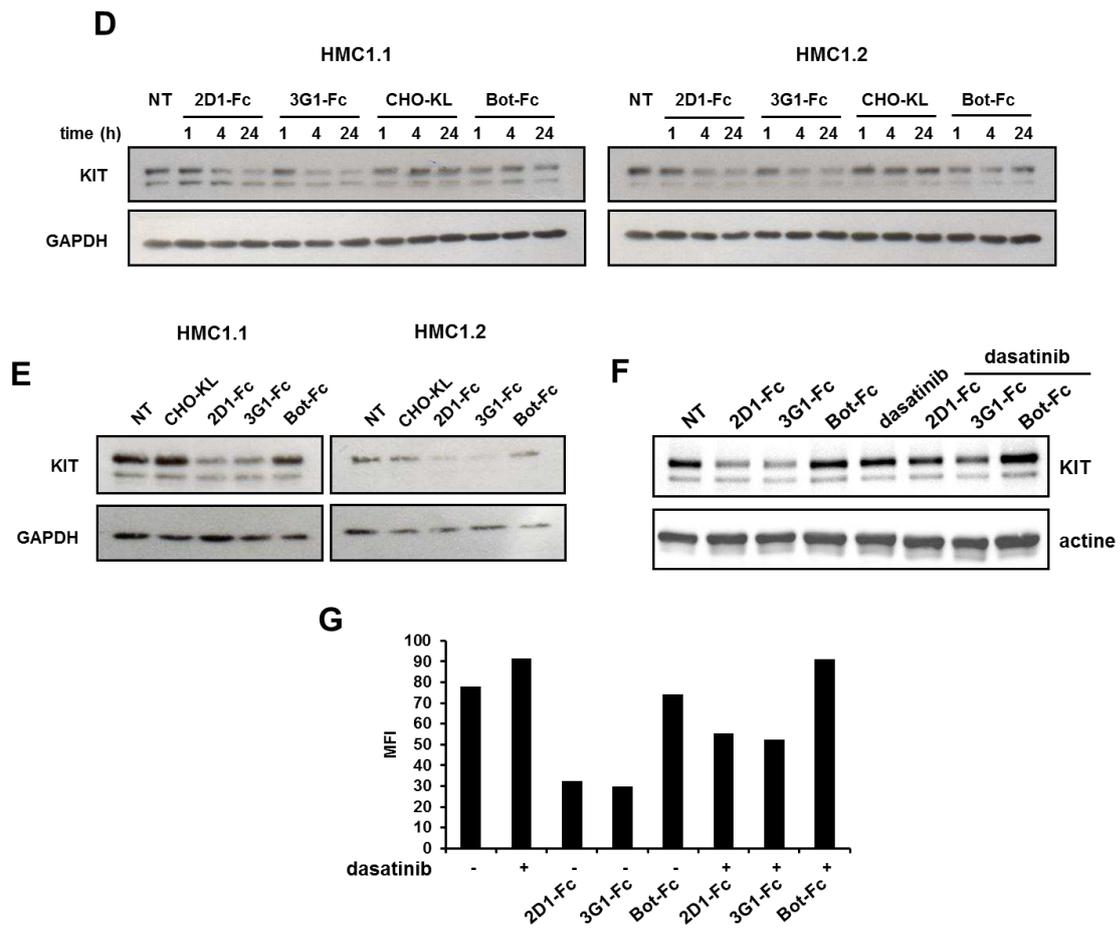


Figure S1

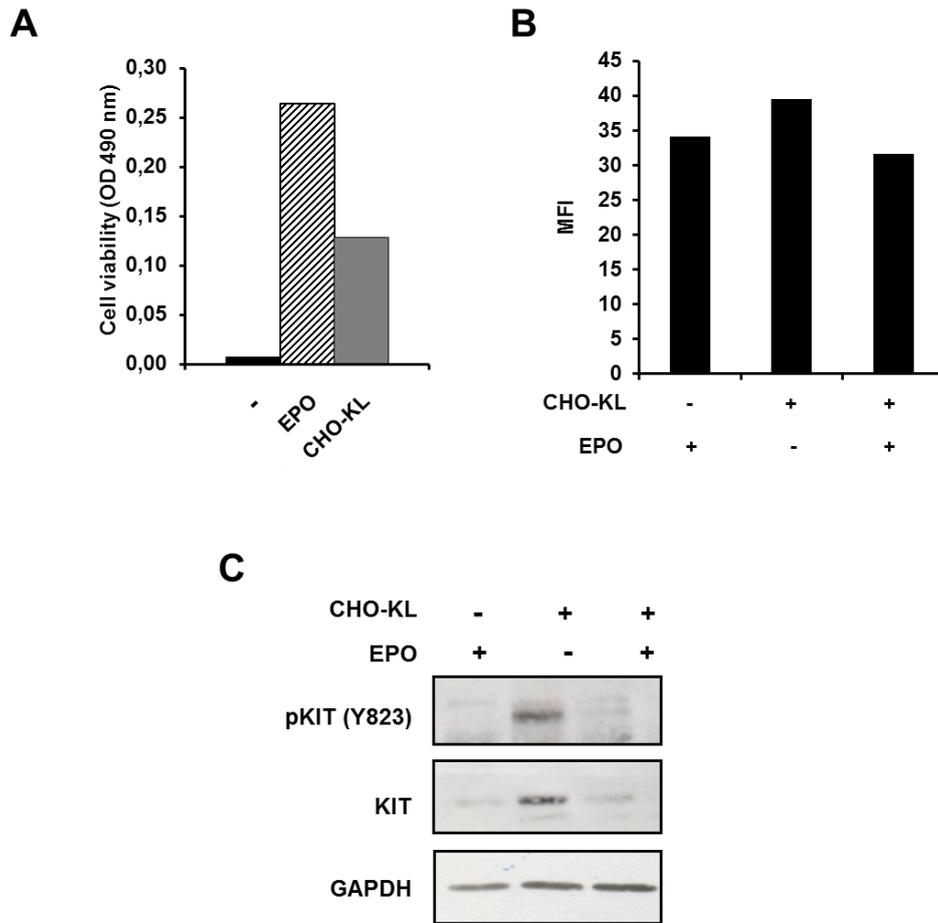


Figure S2

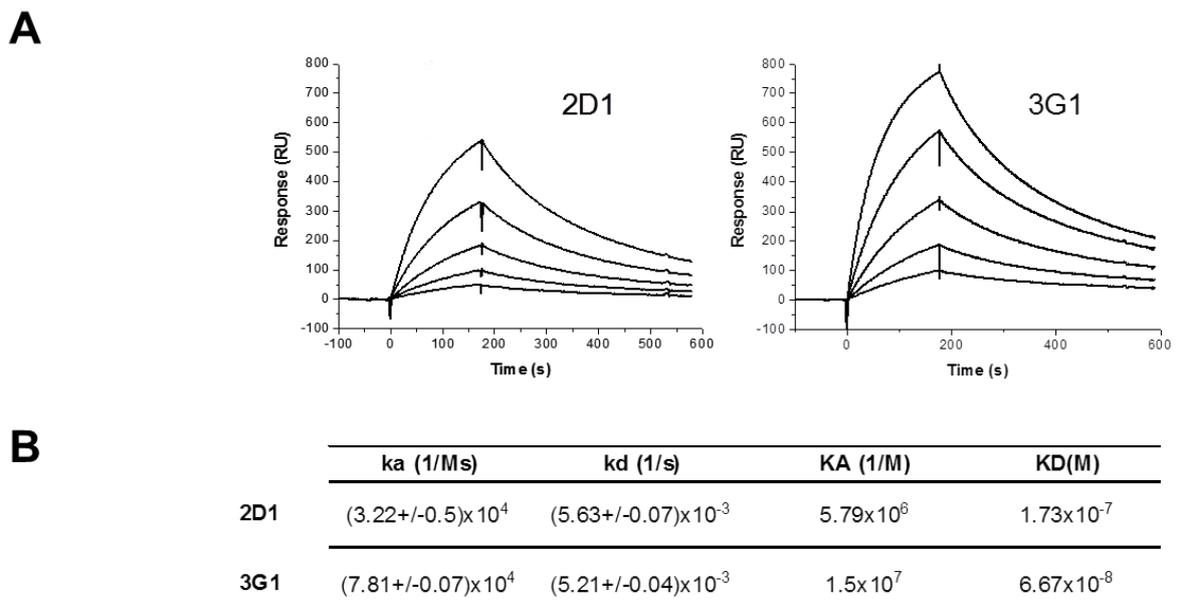


Figure S3

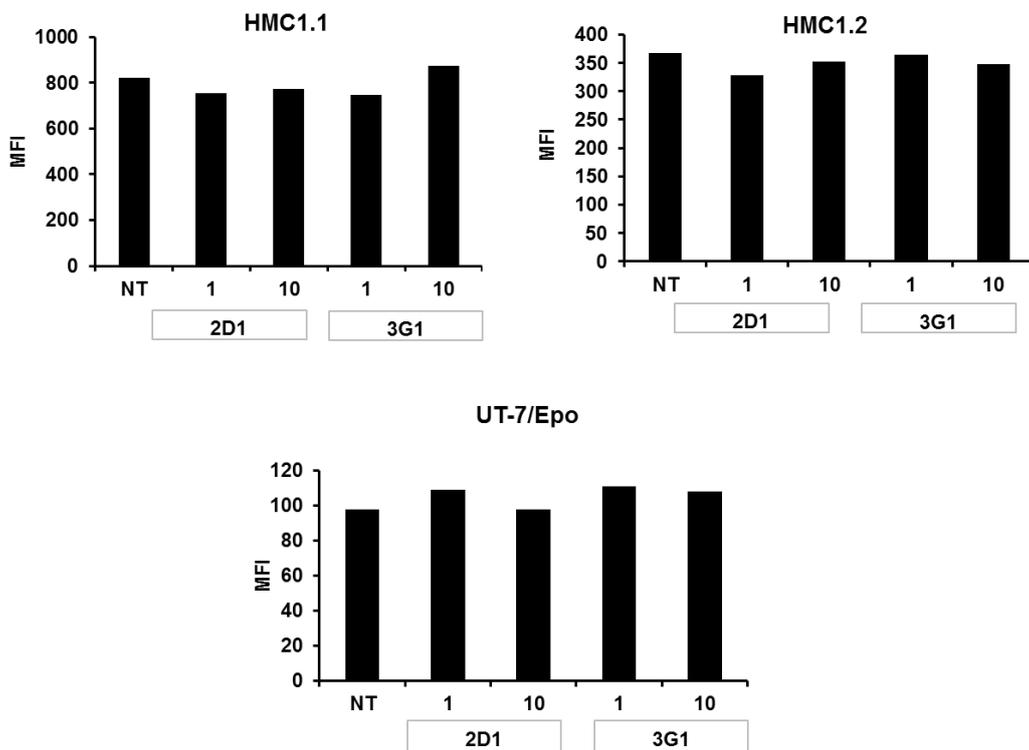
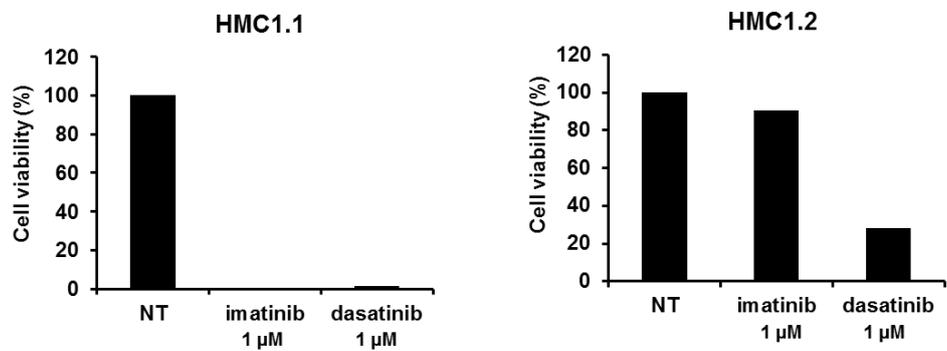


Figure S4



4. Résultats supplémentaires

a) Association des anticorps avec le dasatinib

Les associations d'ITK et d'anticorps monoclonaux ont déjà fait leurs preuves sur plusieurs cibles et dans plusieurs types de cancers. On peut citer par exemple la combinaison erlotinib et cetuximab qui ciblent tous 2 l'EGFR ; cette association a donné de bons résultats en phase clinique notamment dans cancer bronchique non à petites cellules (Wheler et al., 2013) et dans le cancer colorectal (Weickhardt et al., 2012). On peut également citer la combinaison lapatinib et trastuzumab qui a amélioré la réponse des patients atteints de cancer du sein HER2⁺ par rapport au traitement par trastuzumab seul (Baselga et al., 2012).

De la même façon, nous avons voulu tester l'association de nos anticorps avec le dasatinib dans le but de potentialiser leurs effets. Nous avons mesuré l'apoptose induite par les anticorps et le dasatinib, seuls ou en association sur la lignée HMC1.2. Pour cela, nous avons incubé les cellules pendant 48 h avec le dasatinib (500 nM) seul, les anticorps (10 µg/mL) seuls, ou l'association dasatinib + anticorps (figure 65).

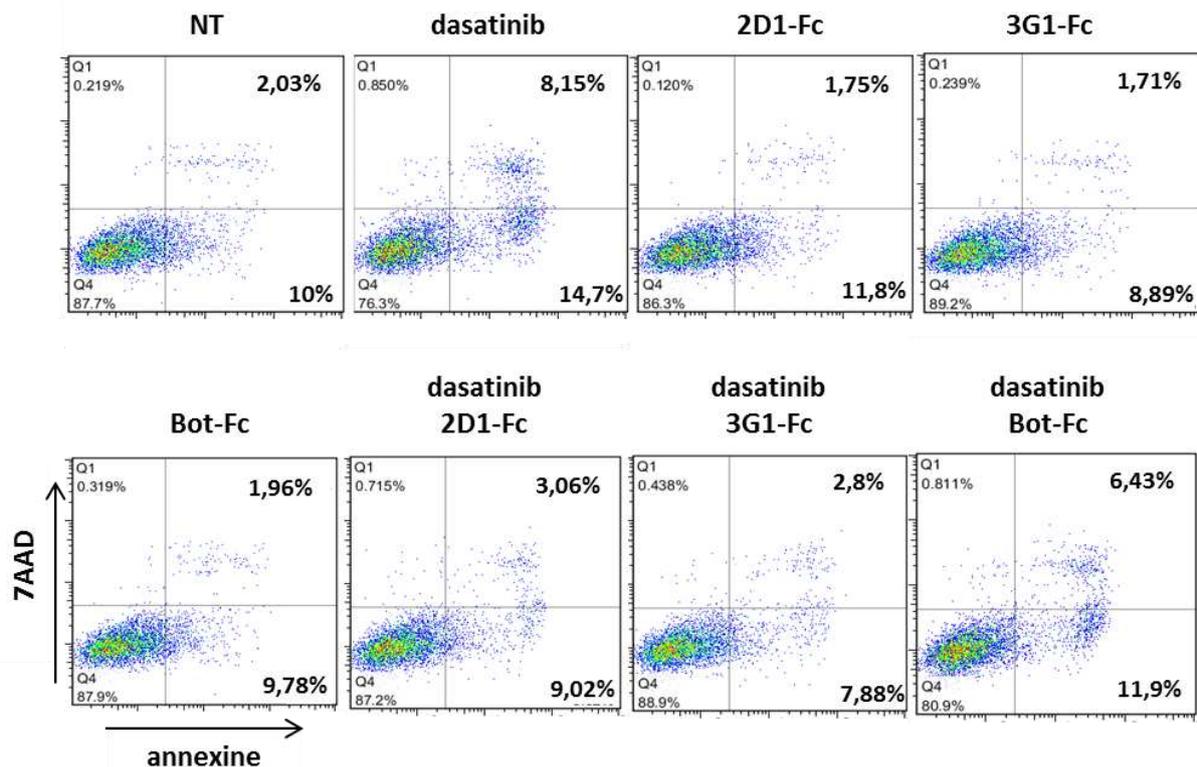


Figure 65 : étude de l'effet des anticorps sur l'apoptose des cellules HMC1.2.

Les cellules HMC1.2 ont été incubées en présence de dasatinib (500 nM) et/ou des anticorps (2D1-Fc, 3G1-Fc, Bot-Fc) à 10 µg/mL pendant 48 h. L'expérience a été révélée à l'aide d'un kit dans lequel l'apoptose précoce est détectée par un marquage à l'annexine et l'apoptose tardive par le 7AAD.

Nous avons confirmé que le dasatinib induit bien l'apoptose des cellules HMC1.2. Nos anticorps 2D1 et 3G1, qui inhibent par ailleurs la prolifération de cette même lignée (figure 6

de l'article) après 7 jours, ainsi que l'anticorps contrôle Bot, n'ont pas d'effet sur l'apoptose des cellules à 48 h, lorsqu'utilisés seuls. De manière surprenante, l'association du dasatinib aux anticorps anti-KIT annule son effet pro-apoptotique. Pour comprendre cet effet, nous avons analysé les taux de KIT et de KIT phosphorylé sur ces mêmes cellules après 4 heures de traitement. La figure 66 montre que le traitement par anticorps et le traitement par dasatinib diminuent tous deux le taux de KIT phosphorylé par cellule, avec une augmentation plus importante pour le traitement par dasatinib ; en revanche, l'association des deux ramène le niveau de KIT phosphorylé à celui des cellules non traitées, ce qui explique l'effet nul de cette association sur l'induction d'apoptose. Nous avons émis l'hypothèse que la fixation des anticorps à KIT entraîne une modification de sa conformation qui empêche la fixation du dasatinib sur celui-ci. Nous avons donc réalisé la même expérience en incubant les cellules 24 h avec le dasatinib afin d'induire de l'apoptose le premier jour puis en ajoutant les anticorps pendant 24 h. De façon très surprenante, des résultats similaires ont été obtenus.

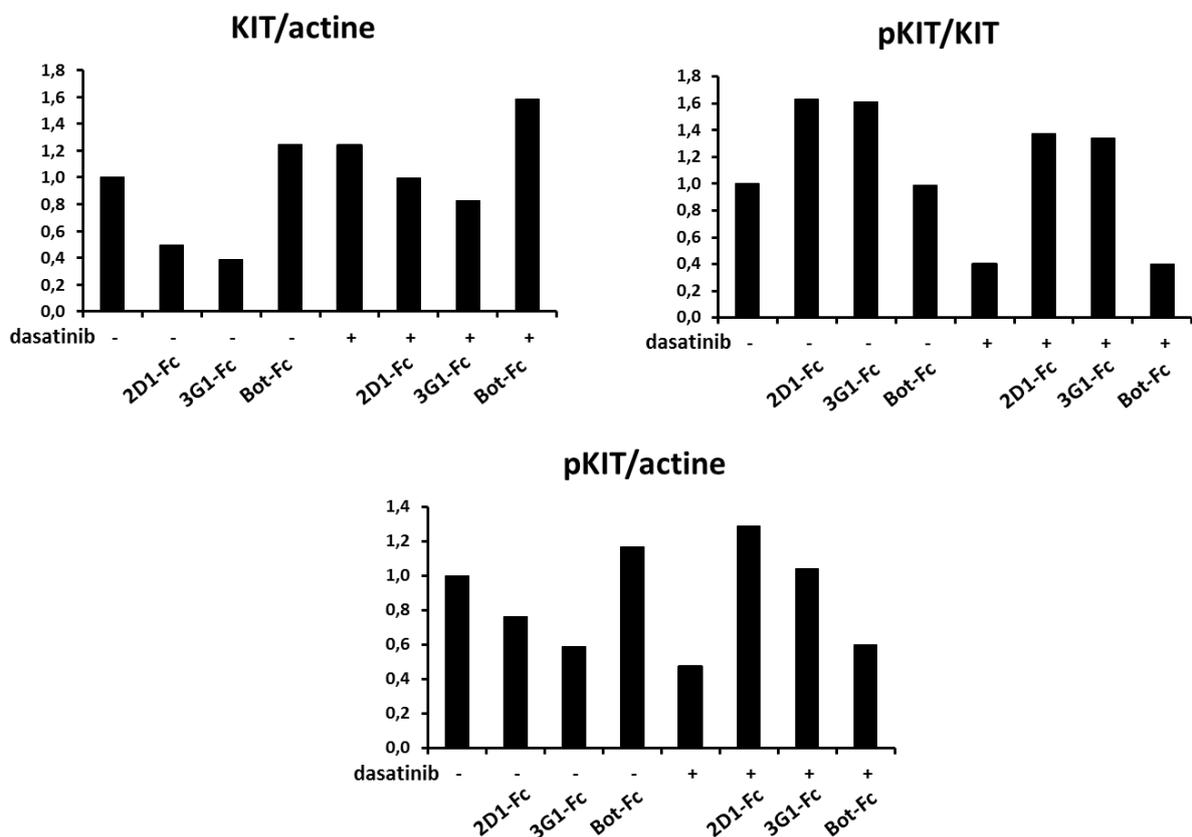


Figure 66 : quantification des signaux de Western blot.

Les cellules HMC1.2 ont été incubées 4 h en présence de dasatinib (1 μ M) et/ou des anticorps 2D1 et 3G1 (10 μ g/mL). Les extraits protéiques ont été déposés sur gel SDS-PAGE puis transférés sur membrane ; les signaux obtenus avec les différents anticorps ont été quantifiés avec le logiciel ImageJ.

b) Cross-réactivité

Nous avons étudié la liaison de nos anticorps anti-KIT à la lignée P815 de mastocytome murin exprimant KIT. La figure 67 indique que nos anticorps se fixent également à KIT murin, bien qu'on observe aussi un faible signal avec l'anticorps contrôle Bot-Fc, peut-être dû à la présence de récepteurs aux fragments Fc sur ces cellules.

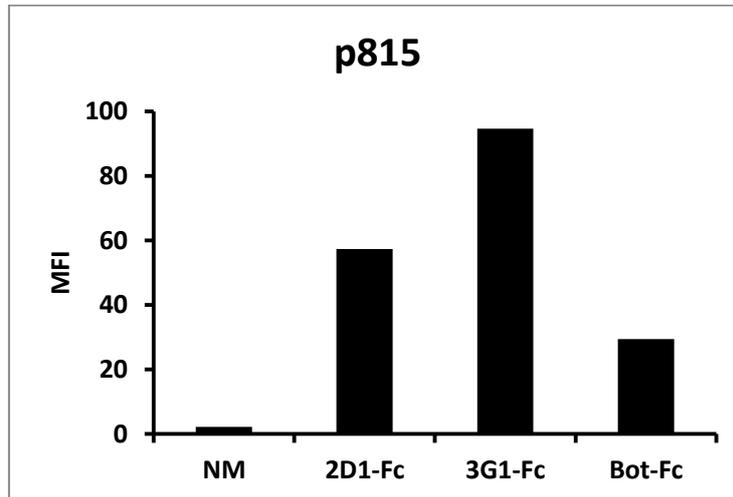


Figure 67 : analyse par cytométrie en flux de la liaison des anticorps à la lignée p815. Les cellules p815 ont été incubées 1 h à 37°C avec les anticorps 2D1, 3G1 et Bot-Fc à 20 µg/mL. La liaison des anticorps a été détectée par un anticorps secondaire anti-Fc humain couplé FITC. NM, marquage par l'anticorps secondaire.

La cross-réactivité de nos anticorps permettra d'évaluer leur toxicité *in vivo* lors des expériences de xénogreffes sur souris.

5. Perspectives

Pour tirer parti des propriétés de dégradation des anticorps, il serait intéressant de tester une association séquentielle, c'est-à-dire l'incubation avec les anticorps seuls puis l'ajout de dasatinib. Cela permettrait peut-être de dégrader tout d'abord une partie de KIT grâce aux anticorps pour sensibiliser les cellules à l'apoptose, puis de cibler la phosphorylation du peu de KIT restant avec le dasatinib.

Nous allons également tester l'association anticorps + ITK sur les cellules HMC1.1. Cette lignée nous permettra de tester, en plus du dasatinib, l'imatinib auquel les HMC1.2 sont résistantes. Nous pourrions ainsi voir si l'inhibition de l'apoptose induite par le dasatinib observée avec l'ajout des anticorps anti-KIT est spécifique d'une lignée ou d'un couple lignée/ITK.

DISCUSSION

Depuis sa découverte en 1986, KIT a largement été étudié et un nombre considérable de données à son sujet a été accumulé ; ceci a permis de comprendre sa structure, sa fonction de tyrosine kinase et le rôle physiologique et pathologique de la voie SCF/KIT. Il est notamment apparu que cette voie de signalisation pouvant conduire à la prolifération cellulaire jouait un rôle clé dans différents cancers.

Le début des années 2000 a connu l'essor de la thérapie ciblée avec le développement d'une nouvelle classe de petites molécules pharmacologiques, appelées inhibiteurs de tyrosine kinases. Ces drogues ont révolutionné le traitement des cancers en limitant les effets secondaires qui peuvent être observés avec les chimiothérapies classiques. Parmi ces inhibiteurs, plusieurs ont pour cible le récepteur KIT et ont nettement amélioré la prise en charge des GIST, pathologie dont l'élément précurseur est très fréquemment une mutation activatrice de KIT.

Malheureusement, les molécules actuellement utilisées en clinique présentent certaines limites. Les ITK n'étant jamais totalement spécifiques d'une seule kinase, des effets secondaires sont observés chez les patients. De plus, les patients initialement répondeurs finissent par développer presque systématiquement une résistance acquise au traitement par mutation secondaire. Enfin, certaines pathologies comme la mastocytose systémique liée à la mutation D816V de KIT, ne sont traitées que de façon symptomatique. En effet, l'inhibition du mutant D816V de KIT représente encore à ce jour un défi important.

C'est pourquoi nous avons axé ce projet de thèse sur le développement de plusieurs approches pour cibler la voie SCF/KIT oncogénique :

Tout d'abord, nous avons mis au point un test de criblage de nouvelles petites molécules inhibant potentiellement KIT mutant. Pour cette étude, nous avons établi un modèle cellulaire CHO exprimant 3 variants de KIT fusionnés à l'EGFP dans le but d'évaluer la dégradation et la localisation du récepteur grâce à la fluorescence des protéines de fusion. Toutefois, la localisation majoritairement intracellulaire des mutants de KIT nous a confrontés à la première limite majeure de notre modèle : l'EGFP étant sensible aux variations de pH, l'utilisation du tag EGFP dans les lignées CHO-EGFP-KIT mutant, où KIT est localisé dans le cytoplasme acide, pour estimer la quantité totale de KIT s'est avérée limitée. L'utilisation d'un tag fluorescent non sensible au pH pourrait être un outil utile dans le contexte KIT mutant.

Le criblage d'une chimiothèque d'inhibiteurs de kinases nous a permis, en mesurant la variation de KIT à la surface cellulaire, de sélectionner 14 molécules qui relocalisent un ou les 2 mutants de KIT. Parmi ces drogues, 9 n'ont jamais été décrites comme inhibant KIT et représentent par conséquent des nouveaux inhibiteurs potentiels du récepteur. Nous avons validé une de ces molécules, le ZM 336372 qui inhibe la phosphorylation de KIT V560G à 1 μ M dans la lignée de leucémie à mastocytes HMC1.1 ; il inhibe également la prolifération KIT

mutant V560G-dépendante de cette lignée dès 100 nM. Une autre molécule très intéressante a été isolée de la chimiothèque, le Ro 31-8220 qui relocalise uniquement le mutant D816V. De façon étrange, cette molécule n'inhibe pas la phosphorylation de KIT D816V dans la lignée HMC1.2 à 1 μ M mais inhibe sa prolifération. Les différences d'efficacité obtenues entre les résultats de criblage sur les CHO-EGFP-KIT D816V et les études de phosphorylation de KIT sur les HMC1.2 peuvent être attribuables à la présence d'une double mutation de KIT dans les HMC1.2. Ces cellules présentent un allèle doublement muté V560G et D816V, ce qui modifie peut-être la sensibilité de KIT à cette molécule comparé au simple mutant D816V.

Nous pouvons également penser que cette molécule agit de façon indirecte sur KIT D816V, par exemple en régulant des protéines chaperonnes comme hsp90. En effet, les oncoprotéines sont des molécules instables qui nécessitent d'être stabilisées par de nombreuses protéines chaperonnes. Les drogues qui inhibent ces protéines chaperonnes déstabilisent donc de façon indirecte les oncoprotéines associées.

D'autres mécanismes alternatifs peuvent entrer en jeu dans la localisation cellulaire de KIT mutant. Nous avons observé ce même phénomène de relocalisation en traitant les cellules CHO-EGFP KIT mutant au MG132, un inhibiteur du protéasome. Son action sur la localisation du récepteur est probablement indirecte. Des études ont déjà démontré des effets inhibiteurs du bortezomib, un autre inhibiteur du protéasome utilisé en clinique pour le traitement des myélomes multiples, sur les lignées HMC1 et différentes lignées de GIST sensibles et résistantes à l'imatinib. Les mécanismes de down-régulation de KIT par le bortezomib ne sont pas bien compris, mais il est suggéré que, dans les cas des lignées de GIST, il inhiberait sa transcription (Bauer et al., 2010). L'hypothèse proposée dans le cas de la lignée HMC1.2 est que KIT D816V diminue l'expression du facteur pro-apoptotique Bim ; le traitement au bortezomib induit une augmentation de la transcription de Bim dans ces cellules, ce qui restaure leur apoptose (Aichberger et al., 2009).

Si notre hypothèse selon laquelle les drogues sélectionnées par notre test n'agissent pas nécessairement directement sur KIT mutant est avérée, nous pourrions cribler des banques molécules moins ciblées. Pour l'instant, nous n'avons criblé qu'une chimiothèque orientée ne contenant que des inhibiteurs de kinases. Ce choix était le plus raisonnable pour un premier criblage lors duquel nous avons toutes les chances de sélectionner des molécules inhibant potentiellement KIT. Toutefois nous pourrions cribler des banques de molécules plus diverses afin de sélectionner des molécules qui n'inhibent pas directement l'activité kinase de KIT, mais qui pourraient d'une façon plus indirecte cibler sa stabilité ou sa dégradation.

La bonne utilisation de notre test implique de cribler des molécules qui n'émettent pas de fluorescence ; en effet le signal de fluorescence émis par une drogue est analysé par le cytomètre de la même façon que s'il provenait de l'anticorps de marquage. Les résultats obtenus avec ces drogues sont ininterprétables dans la mesure où l'on ne peut différencier

le signal provenant à la drogue de celui spécifique à l'anticorps de marquage. Il est important de réaliser systématiquement un criblage sur des cellules contrôles (par exemple les cellules CHO non transfectées) non marquées par l'anticorps anti-KIT afin d'éliminer les drogues émettant une fluorescence.

Il est important de garder en tête que les résultats des criblages sont obtenus à partir de lignées modèles CHO et non de lignées issues de patients. Malgré la validation fonctionnelle de ces lignées (activation et internalisation de KIT WT par le ligand, phosphorylation constitutive des mutants de KIT conduisant à un avantage prolifératif), nous avons pu observer certaines différences avec des lignées issues de patients. Par exemple, lors de la caractérisation des anticorps anti-KIT-ECD, nous avons réalisé les premières expériences d'internalisation sur les lignées CHO-EGFP-KIT WT ; l'incubation de ces cellules avec les anticorps 2D1-Fc et 3G1-Fc de 30 minutes à 24 h n'a entraîné aucune internalisation de KIT. Ceci indique qu'il existe des différences notables de comportement de KIT entre une expression endogène et un modèle cellulaire transfecté (ici la lignée CHO). Les données obtenues sur ces lignées modèles sont donc à prendre avec précaution et nécessitent une validation systématique sur des lignées de patients, plus pertinentes en termes de physiopathologie.

Une récente observation de l'internalisation de KIT WT lorsque sa poche ATP est occupée par l'imatinib a été faite dans les cellules UT-7 (D'allard et al., 2013). Nous pensons réaliser un criblage de la chimiothèque sur ces cellules ; l'internalisation du récepteur WT par des molécules peut être liée à leur fixation dans sa poche ATP, ce qui en fait des inhibiteurs potentiels de l'activité kinase de KIT. Toutefois, toutes les molécules ciblant le site de liaison à l'ATP de KIT WT ne sont pas actives sur les mutants de KIT. De plus, l'obtention de drogues inhibitrices par criblage sur les cellules UT-7 serait limitée à des drogues ciblant toutes les formes de KIT (WT et mutantes) et donc moins spécifiques. Notre test sur les modèles CHO présente l'avantage de pouvoir sélectionner des drogues inhibant spécifiquement un seul mutant de KIT.

Nous pensons également cribler la chimiothèque sur les cellules HMC1. La relocalisation de KIT par des drogues dans les HMC1.2 ne permettrait pas de distinguer si elles sont actives sur le mutant V560G, D816V ou le 2. Les HMC1.1 seraient donc plus adaptées à ce test pour isoler des molécules relocalisant spécifiquement le mutant V560G. Cependant, les lignées HMC1 expriment un fort taux de KIT à leur surface. Les différentes expériences de relocalisation que nous avons réalisées sur les HMC1 étaient plus difficilement exploitables ; en effet, la relocalisation induite par l'imatinib ou le dasatinib était de faible amplitude, due au fort taux d'expression basale de KIT en surface, ce qui rend le seuil de positivité plus difficile à fixer.

Le premier criblage sur la chimiothèque d'inhibiteurs de kinases a sélectionné 9 nouveaux inhibiteurs potentiels de KIT mutant. Nous avons commencé à valider l'effet de ces molécules sur les lignées de patients HMC1 : le ZM 336372 et le Ro 31-8220 semblent être

des candidats intéressants pour poursuivre les études. Nous allons finir la validation des dernières drogues sur les lignées HMC. Nous avons également mis au point la xénogreffe sous-cutanée de la lignée HMC1.2 sur souris nude ; les drogues validées en inhibition de prolifération cellulaire des HMC1 pourront être testées *in vivo*.

Dans un second temps, nous avons adopté une technique originale consistant à générer des anticorps intracellulaires inhibant l'activité kinase de KIT ou le recrutement de partenaires de signalisation sur le domaine intracellulaire de KIT. Le but de cette approche était de sélectionner, dans l'idéal, des intrabodies spécifiques du domaine intracellulaire de KIT mutant D816V. Cette stratégie est donc basée sur l'hypothèse selon laquelle il existe une conformation spécifique du mutant D816V, différente de la conformation active de KIT WT. Cependant, cette différence n'a jamais été démontrée clairement. En effet, les structures statiques de cristallographie des deux formes de KIT, WT et D816V, ne semblent pas présenter de différences notables. Mais l'existence d'une signalisation particulière associée au mutant D816V, ainsi qu'une déstabilisation permanente de la boucle d'activation de la kinase, laissent à penser qu'en contexte cellulaire, KIT WT et D816V ne sont pas identiques.

Si une telle différence n'est pas détectable par un anticorps, nous souhaitons au moins obtenir des anticorps spécifiques de la conformation active de KIT.

La première sélection par phage display a été réalisée à partir d'une banque humaine naïve de scFv (Sheets et al., 1998) sur antigène recombinant. Ce format d'anticorps présente l'inconvénient d'être peu soluble dans le cytoplasme cellulaire. Nous avons toutefois réussi à mettre en évidence l'interaction *in cellulo* entre un intrabody et KIT ; cependant cet anticorps est un anti-KIT global, reconnaissant les formes WT non activé et mutante D816V de KIT. En raison des nombreux problèmes techniques auxquels nous avons été confrontés, liés à la mauvaise solubilité des scFv issus de cette banque, nous nous sommes tournés vers une banque humaine synthétique de scFv hyperstables mise au point par l'équipe du Dr Pierre Martineau à l'IRCM (Philibert et al., 2007). Cette banque a été construite à partir d'une ossature soluble en dégénérant les CDR3. Nous avons réalisé une sélection sur MBP-KIT-ICD D816V mais les criblages de cette sélection n'étaient pas reproductibles, probablement liés à des problèmes de production, c'est pourquoi nous avons abandonné les sélections sur cette banque.

Suite à ces difficultés, nous nous sommes tournés vers l'équipe du Dr Daniel Baty, spécialisée dans les anticorps simple domaine issus de camélidés. Ce type d'anticorps a été décrit comme étant soluble en environnement réducteur et présentant une affinité particulière pour les cavités, zones rarement fixées par les anticorps classiques. En effet, les VHH issus de camélidés présentent un CDR3 plus long que ceux des domaines variables classiques, permettant de fixer des épitopes enfouis dans la molécule cible.

Malgré les précautions prises pour limiter le nombre d'anticorps anti-MBP (tag ajouté à KIT-ICD pour le rendre plus soluble et facilitant également sa purification), nous avons obtenu un certain nombre de clones reconnaissant la MBP. L'utilisation du masque MBP-KIT-ICD KD nous a permis de réduire nettement cette proportion, mais pour de prochaines sélections, la meilleure stratégie à adopter serait de réaliser les criblages sur KIT recombinant fusionné à d'autres protéines que la MBP car celle-ci s'avère assez « immunogène » *in vitro*.

Les anticorps VHH anti-KIT que nous avons obtenus après les différentes sélections présentent malheureusement une mauvaise affinité. Nous avons réalisé les sélections sur 100 nM d'antigène couplé aux billes époxy ; la diminution de cette concentration pour les prochaines sélections permettrait d'obtenir des clones plus affins pour l'antigène d'intérêt. De plus, un criblage directement en format VHH soluble, plutôt qu'en format phage-VHH, nous permettrait probablement d'éliminer les clones de mauvaise affinité. En effet, le criblage en format phage-VHH permet de s'affranchir des problèmes de production de VHH, mais il présente également l'inconvénient d'amplifier les signaux : la liaison des phages-VHH aux antigènes est détectée par un anticorps anti-protéine p8 du phage, présente à 3000 copies sur la capsid de celui-ci.

Les différentes sélections réalisées sur la banque MBP-KIT-ICD D816V donnaient peu de clones positifs lors des criblages ; on peut penser que l'immunisation du lama par MBP-KIT-ICD D816V n'a pas engendré de réponse immunitaire assez importante. Il serait donc intéressant d'immuniser un second lama avec MBP-KIT-ICD D816V pour produire une banque de phages-VHH de meilleure qualité.

La stratégie de sélection masquée semble être idéale pour notre approche : elle permet de masquer les épitopes communs à MBP-KIT-ICD KD et MBP-KIT-ICD D816V lors de la sélection afin d'isoler des VHH reconnaissant uniquement les épitopes spécifiques de la conformation KIT D816V. Cette stratégie pourra être appliquée après immunisation d'un nouveau lama avec la protéine MBP-KIT-ICD D816V.

Si nous arrivons à sélectionner un ou des intrabodies spécifiques de la conformation KIT D816V, leurs effets *in cellulo* seront caractérisés. Nous étudierons s'ils sont capables de déphosphoryler KIT mutant (intrabodies inhibant l'activité kinase) et/ou des protéines de signalisation associées (intrabodies inhibant le recrutement des partenaires protéiques). L'inhibition de la signalisation KIT oncogénique sera confirmée par test d'inhibition de prolifération sur des lignées dépendantes de cette signalisation (HMC1, GIST).

Les intrabodies inhibiteurs que nous obtiendrons seront, à plus long terme, utilisés comme guides pour cribler des banques de petites molécules chimiques. En effet, l'utilisation des intrabodies en clinique est limitée puisqu'ils ne peuvent pas pénétrer dans le cytoplasme des cellules. Le but est de cribler par ELISA des molécules qui inhibent l'interaction intrabody/KIT et qui auront donc potentiellement le même effet inhibiteur que l'intrabody.

De plus, l'obtention d'un tel VHH permettrait de détecter en IF la présence de KIT D816V avec des applications diagnostiques dans diverses pathologies. Il pourrait également être utilisé dans le suivi du trafic de la kinase active en le fusionnant à un tag fluorescent.

Pour conclure, le ciblage cytoplasmique d'interactions protéine-protéine a déjà montré son efficacité par exemple dans l'inhibition de la signalisation oncogénique impliquant Ras par un intrabody se fixant à la forme active de l'enzyme (Tanaka et al., 2007). Peu de molécules issues de cette stratégie existent pourtant en clinique car la zone où a lieu l'interaction protéique est souvent formée par une cavité et donc difficile à cibler. Dans de nombreux cas de signalisation oncogénique, l'interactome protéique s'organise de façon anormale autour de la kinase ; il en résulte une signalisation particulière différente de la signalisation WT. L'approche intrabodies représente un outil puissant pour caractériser et cibler ces interactions intracellulaires protéine-protéine et les kinases, particulièrement avec l'utilisation de VHH qui ont accès aux cavités. Elle reste cependant une technique très délicate à maîtriser.

La dernière stratégie que nous avons choisie pour le ciblage de KIT est une approche plus classique par anticorps monoclonal. C'est une stratégie simple, basée sur la sélection sur protéine recombinante de scFv par phage display comme utilisée précédemment pour les intrabodies. Nous avons choisi d'exprimer KIT-ECD en cellules d'insecte bien qu'elles possèdent une machinerie de N-glycosylation différente des cellules mammifères. Cette source d'antigène a déjà été utilisée avec succès puisque plusieurs anticorps anti-KIT commerciaux ont été isolés grâce à ce type de production de KIT-ECD. Nous avons généré 8 anticorps reconnaissant KIT-ECD immobilisé sur plastique, dont 5 se liaient aux cellules HMC1.2 exprimant un fort taux de KIT membranaire. Il est possible que les 3 anticorps ne se liant pas à KIT des HMC1.2 reconnaissent une forme glycosylée de KIT spécifique à la production en cellules d'insecte.

Ces 5 anticorps ont été sous-clonés dans le vecteur pFUSE-hFc2(IL2ss) permettant la production au format scFv-Fc. Ce reformatage ainsi que la production des scFv-Fc en cellules HEK-T ont été très simples à réaliser. En revanche, nous avons observé des problèmes de conservation des anticorps à long terme avec une certaine dégradation en fonction des lots produits.

Nous avons caractérisé 2 anticorps antagonistes du SCF, 2D1 et 3G1 capables d'inhiber la croissance de lignées dépendante du SCF pour leur prolifération et également capables de limiter la prolifération de lignées exprimant KIT mutant activé constitutivement et induisant sa dégradation dépendante de sa phosphorylation. Nous n'avons pas déterminé l'épitope exact ciblé par 2D1 et 3G1. Nous avons juste observé que la liaison du 2D1 et du 3G1 était déplacée par le SCF mais pas celle du 2A3 et 2B12. Pour aller plus loin dans notre étude, il serait intéressant de déterminer l'épitope précis reconnu par nos anticorps.

Nous avons testé ensuite différentes associations anticorps + ITK. Sur la lignée UT-7 exprimant KIT WT, l'association des anticorps anti-KIT à l'imatinib a un effet additif sur l'internalisation du récepteur. Seuls, les anticorps et l'imatinib internalisant KIT ; en association, ils diminuent de façon encore plus importante le taux de KIT en surface. Cette association pourrait être intéressante dans le traitement de pathologies impliquant des boucles auto ou paracrine SCF/KIT en limitant de façon importante l'accès du SCF à KIT en plus de l'effet inhibiteur induit sur la signalisation par la compétition entre les anticorps et le SCF.

Sur la lignée HMC1.2 mutée pour KIT, nous avons combiné les anticorps anti-KIT au dasatinib dans le but de potentialiser son effet pro-apoptotique. Contre toute attente, nous avons obtenus des résultats inverses à ceux attendus puisque les anticorps inhibent l'apoptose induite par le dasatinib. Il serait intéressant de déterminer si cette inhibition d'apoptose est liée à l'association des anticorps 2D1 et 3G1 uniquement au dasatinib ou à tous les ITK. Nous planifions également de tester la combinaison des anticorps à différents ITK sur la lignée HMC1.1. Nous pourrions ainsi déterminer si l'inhibition par les anticorps de l'apoptose induit par un ITK est spécifique d'une drogue, d'un mutant de KIT, de l'association d'une drogue à un mutant ou si cet effet est observé dans tous les cas.

Les différents anticorps anti-KIT décrits dans la littérature ne sont pas connus pour induire de l'ADCC ou de la CDC. Le seul anticorps connu pour activer une fonction effectrice immune est l'anticorps murin SR1, qui induit *in vitro* la phagocytose de lignées de GIST par l'intermédiaire des macrophages. Nous n'avons pas observé d'ADCC ni de CDC induites par nos anticorps sur les lignées HMC1. Ces différentes expériences sont à reproduire, mais si ces résultats préliminaires sont confirmés, la toxicité sur l'hématopoïèse et la gamétogenèse associée à l'utilisation de nos anticorps *in vivo* serait limitée.

Les 2 anticorps que nous avons choisis d'étudier plus en détail, 2D1-Fc et 3G1-Fc, présentent une affinité assez faible pour leur cible. Nous avons réalisé des expériences d'inhibition de prolifération sur les lignées UT-7/Epo et HMC1 avec l'anticorps commercial K44.2 murin dirigé contre KIT humain et inhibant la fixation du SCF à KIT (Sigma). Cet anticorps diminue la viabilité cellulaire des UT-7/Epo cultivées en présence de SCF de 80 % à 4 jours à une concentration de 0,05 µg/mL, c'est-à-dire 100 fois moins que nos anticorps. Il en est de même sur les lignées HMC1 sur lesquelles le K44.2 diminue la viabilité cellulaire de 70 % à 5 µg/mL à 7 jours.

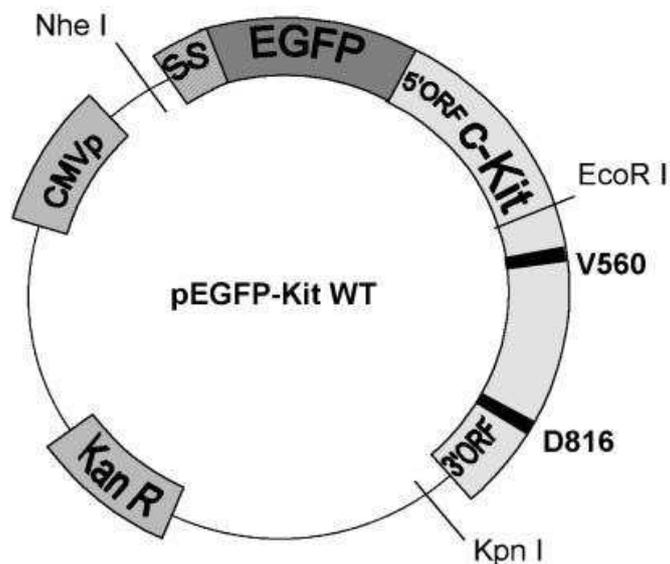
L'affinité de nos anticorps 2D1 et 3G1-Fc, qui sont d'origine humaine, contrairement au K44.2, peut être améliorée en mimant le processus naturel de maturation d'affinité des anticorps qui a lieu lors de la production d'anticorps *in vivo*. Cette technique consiste à générer des mutants de l'anticorps d'intérêt puis à sélectionner ce nouveau répertoire sur l'antigène cible (Hoogenboom and Chames, 2000). Cette technique a permis d'obtenir des anticorps avec des affinités pour leur cible de l'ordre du picomolaire (Luginbühl et al., 2006).

Nous n'avons réalisé la caractérisation fonctionnelle que de 2 anticorps des 5 validés après sélection. Nous ne continuerons pas les études sur le clone 2A6 qui a une mauvaise affinité, mais nous envisageons de reprendre la caractérisation des 2 autres clones. Ces anticorps, 2A3 et 2B12-Fc, n'inhibent pas la phosphorylation de KIT induite par la fixation du SCF. De plus, leur liaison aux cellules HMC1.2 n'est pas modifiée par le SCF. Ces anticorps peuvent tout de même s'avérer intéressants s'ils induisent une internalisation et une dégradation de KIT ou s'ils inhibent la dimérisation de KIT par exemple. Ils pourraient avoir un effet additif ou synergique avec les ITK, au contraire de l'effet antagoniste observé par l'association 2D1 ou 3G1 avec le dasatinib sur les cellules HMC1.2.

Pour conclure, les mécanismes liés à l'apparition d'une pathologie proliférative et à sa sensibilité vis-à-vis des traitements la ciblant sont de mieux en mieux compris. Ils impliquent très fréquemment des mutations activatrices de proto-oncogènes, dont KIT fait partie. Cette meilleure compréhension de la biologie moléculaire des tumeurs permet le développement de nouvelles stratégies de plus en plus spécifiques qui améliorent la prise en charge de ces pathologies et permettent d'outre-passer certaines résistances. Cependant, les thérapies disponibles actuellement présentent certaines limites, c'est pourquoi il est important encore aujourd'hui d'en développer de nouvelles ciblant spécifiquement les formes oncogéniques des protéines impliquées dans les pathologies tumorales.

ANNEXES

Annexe 1 : carte du plasmide codant pour KIT WT fusionné à l'EGFP



Annexe 2 : chimiothèque Screen-Well[®] Kinase Inhibitor Library (Enzo Life Sciences)

Screen-Well [®] Kinase Inhibitor Library						
BML-2832 Version 2.2						
Plate Location	Cat. No.	CAS #	Name	M.W.	Solvent	Conc.
B1	EI-360	167869-21-8	PD-98059	267,3	DMSO	10mM
B2	EI-282	109511-58-2	U-0126	380,5	DMSO	10mM
B3	EI-286	152121-47-6	SB-203580	377,4	DMSO	10mM
B4	EI-148	84477-87-2	H-7·2HCl	364,3	DMSO	10mM
B5	EI-195	116970-50-4	H-9·HCl	287,8	DMSO	10mM
B6	EI-156	62996-74-1	Staurosporine	466,5	DMSO	10mM

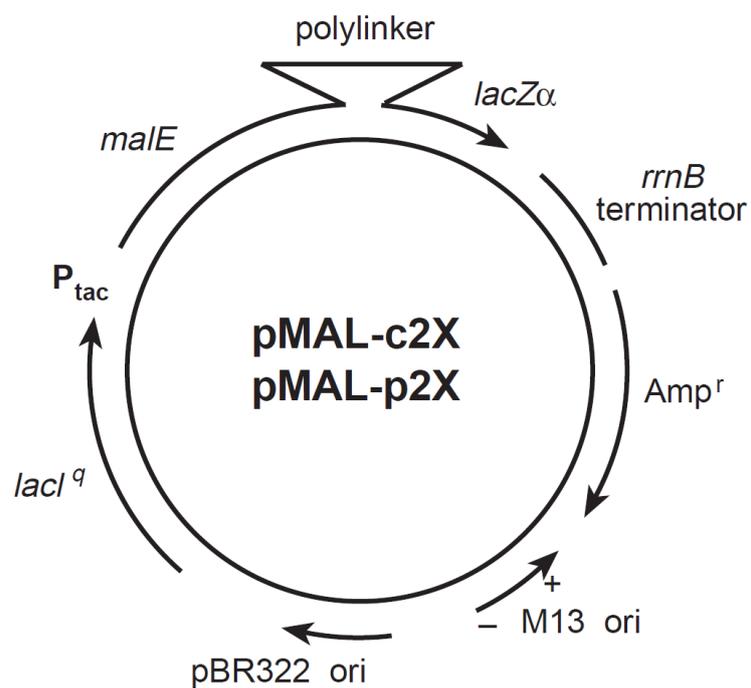
B7	EI-228	133550-35-3	AG-494	280,3	DMSO	10mM
B8	EI-267	149092-50-2	AG-825	397,5	DMSO	10mM
B9	EI-185	125697-92-9	Lavendustin A	381,4	DMSO	10mM
B10	EI-253	136831-49-7	RG-1462	275,1	DMSO	10mM
B11	EI-191	118409-57-7	Tyrphostin 23	186,2	DMSO	10mM
B12	EI-187	118409-58-8	Tyrphostin 25	202,2	DMSO	10mM
C1	EI-257	122520-85-8	Tyrphostin 46	204,2	DMSO	10mM
C2	EI-188	122520-86-9	Tyrphostin 47	220,2	DMSO	10mM
C3	EI-189	122520-90-5	Tyrphostin 51	268,2	DMSO	10mM
C4	EI-190	2826-26-8	Tyrphostin 1	184,2	DMSO	10mM
C5	EI-335	116313-73-6	Tyrphostin AG 1288	231,2	DMSO	10mM
C6	EI-277	175178-82-2	Tyrphostin AG 1478	315,8	DMSO	10mM
C7	AC-1133	71897-07-9	Tyrphostin AG 1295	234,3	DMSO	10mM
C8	EI-215	10537-47-0	Tyrphostin 9	282,4	DMSO	10mM
C9	EI-247		Hydroxy-2-naphthalenylmethylphosphonic acid	238,2	DMSO	10mM
C10	EI-370	120685-11-2	PKC-412	570,6	DMSO	10mM
C11	EI-271	10083-24-6	Piceatannol	244,2	DMSO	10mM
C12	EI-275	172889-26-8	PP1	281,4	DMSO	10mM
D1	EI-272	133550-30-8	AG-490	294,3	DMSO	10mM
D2	EI-263	118409-62-4	AG-126	215,2	DMSO	10mM
D3	EI-229	134036-53-6	AG-370	259,3	DMSO	10mM
D4	EI-258	148741-30-4	AG-879	316,5	DMSO	10mM
D5	ST-	154447-	LY 294002	307,3	DMSO	10mM

	420	36-6				
D6	ST-415	19545-26-7	Wortmannin	428,4	DMSO	10mM
D7	EI-246	133052-90-1	GF 109203X	412,5	DMSO	10mM
D8	EI-226	548-04-9	Hypericin	504,4	DMSO	10mM
D9	EI-283	138489-18-6	Ro 31-8220 mesylate	553,7	DMSO	10mM
D10	EI-155	123-78-4	D-erythro-Sphingosine	299,5	DMSO	10mM
D11	EI-196	127243-85-0	H-89·2HCl	519,3	DMSO	10mM
D12	EI-158	84478-11-5	H-8	265,3	DMSO	10mM
E1	EI-184	91742-10-8	HA-1004·2HCl	366,3	DMSO	10mM
E2	EI-233	103745-39-7	HA-1077·2HCl	364,3	DMSO	10mM
E3	EI-232	125697-93-0	2-Hydroxy-5-(2,5-dihydroxybenzylamino)benzoic acid	275,3	DMSO	10mM
E4	EI-230	127191-97-3	KN-62	721,8	DMSO	10mM
E5	EI-268	139298-40-1	KN-93	501,0	DMSO	10mM
E6	EI-197	109376-83-2	ML-7·HCl	452,7	DMSO	10mM
E7	EI-153	105637-50-1	ML-9·HCl	361,3	DMSO	10mM
E8	CC-100	452-06-2	2-Aminopurine	135,1	DMSO	10mM
E9	CC-202	158982-15-1	N9-isopropyl-olomoucine	326,4	DMSO	10mM
E10	CC-200	101622-51-9	Olomoucine	298,3	DMSO	10mM
E11	CC-201	101622-50-8	Iso-olomoucine	298,3	DMSO	10mM
E12	CC-205	186692-46-6	Roscovitine	354,4	DMSO	10mM
F1	EI-293	24386-93-4	5-Iodotubericidin	392,1	DMSO	10mM
F2	EI-295	62004-35-7	LFM-A13	360,0	DMSO	10mM
F3	EI-294	152121-30-7	SB-202190	331,3	DMSO	10mM

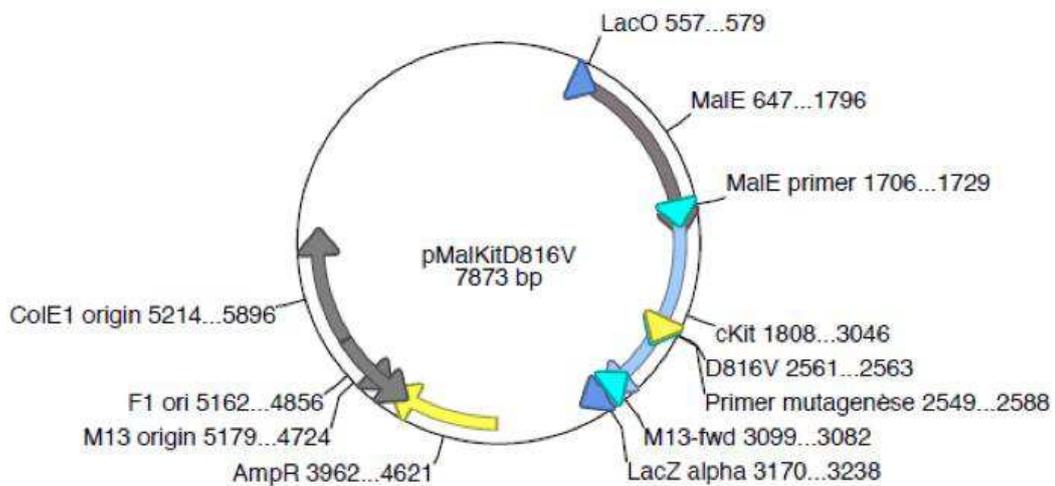
F4	EI-297	172889-27-9	PP2	301,8	DMSO	10mM
F5	EI-298	208260-29-1	ZM 336372	389,4	DMSO	10mM
F6	EI-306	5812-07-7	SU 4312	264,3	DMSO	10mM
F7	EI-303	146535-11-7	AG-1296	266,3	DMSO	10mM
F8	EI-307	220904-83-6	GW 5074	520,9	DMSO	10mM
F9	AC-1121	6865-14-1	Palmitoyl-DL-carnitine	436,1	DMSO	10mM
F10	EI-270	82-08-6	Rottlerin	516,5	DMSO	10mM
F11	EI-147	446-72-0	Genistein	270,2	DMSO	10mM
F12	ST-110	486-66-8	Daidzein	254,2	DMSO	10mM
G1	EI-146	63177-57-1	Erbstatin analog	194,2	DMSO	10mM
G2	AC-1142	6151-25-3	Quercetin·2H ₂ O	338,3	DMSO	10mM
G3	AC-1293		SU1498	390,5	DMSO	10mM
G4	EI-357	4452-06-6	ZM 449829	182,2	DMSO	10mM
G5	EI-278	195462-67-7	BAY 11-7082	207,2	DMSO	10mM
G6	EI-231	53-85-0	5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole	319,1	DMSO	10mM
G7	EI-273		2,2',3,3',4,4'-Hexahydroxy-1,1'-biphenyl-6,6'-dimethanol dimethyl ether	338,3	DMSO	10mM
G8	EI-305	129-56-6	SP 600125	220,2	DMSO	10mM
G9	CC-206	479-41-4	Indirubin	262,3	DMSO	10mM
G10	CC-207	160807-49-8	Indirubin-3'-monooxime	277,3	DMSO	10mM
G11	EI-299	146986-50-7	Y-27632·2HCl	320,3	DMSO	10mM
G12	EI-310	142273-20-9	Kenpaullone	327,2	DMSO	10mM
H1	EI-328	121-40-4	Terreic acid	154,1	DMSO	10mM
H2	EI-	35943-	Triciribine	320,3	DMSO	10mM

	332	35-2				
H3	EI-336	32387-96-5	BML-257	326,3	DMSO	10mM
H4	EI-343	354812-17-2	SC-514	224,3	DMSO	10mM
H5	EI-344	267654-00-2	BML-259	260,4	DMSO	10mM
H6	EI-345	520-36-5	Apigenin	270,2	DMSO	10mM
H7	EI-346		BML-265	305,3	DMSO	10mM
H8	A-275	53123-88-9	Rapamycin	914,2	DMSO	10mM

Annexe 3 : carte du plasmide pMal – C2X (New England Biolabs)



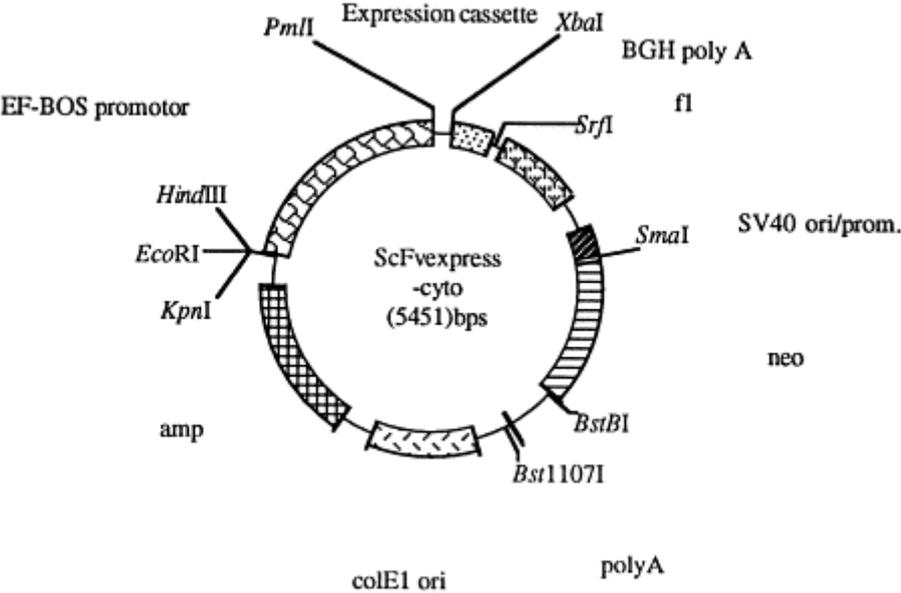
Annexe 4 : carte du plasmide pMAL-KIT-ICD D816V



Annexe 5 : séquences des CDR des 11 scFv anti-KIT-ICD

	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3
D1	SYAMH	VISYDGSNKYYADSVKG	RHMGRDSGGGMDV	QGDSLRSYYAS	GKNNRPL	NSRDSSSNPWV
D2	NYGMH	VISYDGSKIYYADSVKG	DPRRSGSYLDY	QGDLRITYAS	GKNNRPS	SSRDSSGNHPHWV
D3	SYWMS	NIKHDGGDKYFLDSVKG	DRGYFDL	QGDSLKSYAS	GKNNRPS	NSRDSSGNPRV
D4	SYGMH	VISYDGSNKYYADSVKG	MSLSSGFYD	RASEGIYHWLA	KASSLAS	QQYHTISRT
D5	NYWMS	IIKQDGSEKYYVDSVRG	AGIPLSGKGYFDS	QGDSLRSYYAS	NKNNRPS	NSRDSSSTHRGV
D6	SFAMS	AISGSGGSTYYADSVKG	EQGPITD	QGDSLRSYYAS	GKNNRPS	QAWDSSTSIV
D7	SYAMH	VISYDGSNKYYADSVKG	RLPGKGYFDY	RASQGISTWLA	TASSLQR	QQANSFPYT
D8	NYGLH	FIGRDGDNKYYADSVKG	DHYGGNKFNWYFDL	QGDSLRSYYAS	GENNRPS	NSRDNTGNHVV
D9	SYSMN	VISGSGGSTYYADSVKGR	RGWFGDPPIDY	QGDSLRSYYAS	ANTHRPS	NSRDNSGNHLV
D10	SYAMS	AISGSGASKYYADSVKGR	RGMASGVTGRHYFDY	QGDSLKSYAS	GENRRPS	NSRDSSGNRV
D11	NYGIH	VISYDGSYKYYTDFVKG	RGGTRYPEAFDI	TGTSSDVGGYNYVS	EVGKRPS	SSYTSTSTLVV

Annexe 6 : carte du plasmide d'expression eukaryote des scFv



BIBLIOGRAPHIE

Agrawal, M., Garg, R.J., Cortes, J., and Quintás-Cardama, A. (2010). Tyrosine kinase inhibitors: the first decade. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 5, 70–80.

Aichberger, K.J., Sperr, W.R., Gleixner, K.V., Kretschmer, A., and Valent, P. (2008). Treatment responses to cladribine and dasatinib in rapidly progressing aggressive mastocytosis. *Eur. J. Clin. Invest.* 38, 869–873.

Aichberger, K.J., Gleixner, K.V., Mirkina, I., Cerny-Reiterer, S., Peter, B., Ferenc, V., Kneidinger, M., Baumgartner, C., Mayerhofer, M., Gruze, A., et al. (2009). Identification of proapoptotic Bim as a tumor suppressor in neoplastic mast cells: role of KIT D816V and effects of various targeted drugs. *Blood* 114, 5342–5351.

Alluri, N., and Jimeno, A. (2013). Trametinib for the treatment of melanoma. *Drugs Today Barc. Spain* 1998 49, 491–498.

Arnold, K. (2001). After 30 Years of Laboratory Work, a Quick Approval for STI571. *J. Natl. Cancer Inst.* 93, 972–972.

Ascierto, P.A., Minor, D., Ribas, A., Lebbe, C., O'Hagan, A., Arya, N., Guckert, M., Schadendorf, D., Kefford, R.F., Grob, J.-J., et al. (2013). Phase II trial (BREAK-2) of the BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436) in patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 31, 3205–3211.

Ashman, L.K., and Griffith, R. (2013). Therapeutic targeting of c-KIT in cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs* 22, 103–115.

Ashman, L.K., Bühring, H.J., Aylett, G.W., Broudy, V.C., and Müller, C. (1994). Epitope mapping and functional studies with three monoclonal antibodies to the c-kit receptor tyrosine kinase, YB5.B8, 17F11, and SR-1. *J. Cell. Physiol.* 158, 545–554.

Baselga, J., Bradbury, I., Eidtmann, H., Di Cosimo, S., de Azambuja, E., Aura, C., Gómez, H., Dinh, P., Fauria, K., Van Dooren, V., et al. (2012). Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet* 379, 633–640.

Bauer, S., Yu, L.K., Demetri, G.D., and Fletcher, J.A. (2006). Heat shock protein 90 inhibition in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. *Cancer Res.* 66, 9153–9161.

Bauer, S., Parry, J.A., Mühlberg, T., Brown, M.F., Seneviratne, D., Chatterjee, P., Chin, A., Rubin, B.P., Kuan, S.-F., Fletcher, J.A., et al. (2010). Proapoptotic Activity of Bortezomib in Gastrointestinal Stromal Tumor Cells. *Cancer Res.* 70, 150–159.

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.

- Bayle, J., Letard, S., Frank, R., Dubreuil, P., and De Sepulveda, P. (2004). Suppressor of cytokine signaling 6 associates with KIT and regulates KIT receptor signaling. *J. Biol. Chem.* *279*, 12249–12259.
- Beadling, C., Jacobson-Dunlop, E., Hodi, F.S., Le, C., Warrick, A., Patterson, J., Town, A., Harlow, A., Cruz, F., Azar, S., et al. (2008). KIT Gene Mutations and Copy Number in Melanoma Subtypes. *Clin. Cancer Res.* *14*, 6821–6828.
- Bellone, G., Silvestri, S., Artusio, E., Tibaudi, D., Turletti, A., Geuna, M., Giachino, C., Valente, G., Emanuelli, G., and Rodeck, U. (1997). Growth stimulation of colorectal carcinoma cells via the c-kit receptor is inhibited by TGF- β 1. *J. Cell. Physiol.* *172*, 1–11.
- Bellosillo, B., Villamor, N., López-Guillermo, A., Marcé, S., Esteve, J., Campo, E., Colomer, D., and Montserrat, E. (2001). Complement-mediated cell death induced by rituximab in B-cell lymphoproliferative disorders is mediated in vitro by a caspase-independent mechanism involving the generation of reactive oxygen species. *Blood* *98*, 2771–2777.
- Beppu, K., Jaboine, J., Merchant, M.S., Mackall, C.L., and Thiele, C.J. (2004). Effect of imatinib mesylate on neuroblastoma tumorigenesis and vascular endothelial growth factor expression. *J. Natl. Cancer Inst.* *96*, 46–55.
- Besmer, P., Murphy, J.E., George, P.C., Qiu, F.H., Bergold, P.J., Lederman, L., Snyder, H.W., Jr, Brodeur, D., Zuckerman, E.E., and Hardy, W.D. (1986). A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family. *Nature* *320*, 415–421.
- Biocca, S., Ruberti, F., Tafani, M., Pierandrel-Amaldi, P., and Cattaneo, A. (1995). Redox State of Single Chain Fv Fragments Targeted to the Endoplasmic Reticulum, Cytosol and Mitochondria. *Nat. Biotechnol.* *13*, 1110–1115.
- Blanc, J., Geney, R., and Menet, C. (2013). Type II kinase inhibitors: an opportunity in cancer for rational design. *Anticancer Agents Med. Chem.* *13*, 731–747.
- Blay, J.-Y., Cesne, A.L., Cassier, P.A., and Ray-Coquard, I.L. (2012). Gastrointestinal Stromal Tumors (GIST): a Rare Entity, a Tumor Model for Personalized Therapy, and Yet Ten Different Molecular Subtypes. *Discov. Med.* *13*, 357–367.
- Blechman, J.M., Lev, S., Givol, D., and Yarden, Y. (1993). Structure-function analyses of the kit receptor for the steel factor. *Stem Cells Dayt. Ohio* *11 Suppl 2*, 12–21.
- Blume-Jensen, P., Rönstrand, L., Gout, I., Waterfield, M.D., and Heldin, C.H. (1994). Modulation of Kit/stem cell factor receptor-induced signaling by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* *269*, 21793–21802.
- Blume-Jensen, P., Wernstedt, C., Heldin, C.H., and Rönstrand, L. (1995). Identification of the major phosphorylation sites for protein kinase C in kit/stem cell factor receptor in vitro and in intact cells. *J. Biol. Chem.* *270*, 14192–14200.

- Bodemer, C., Hermine, O., Palmérini, F., Yang, Y., Grandpeix-Guyodo, C., Leventhal, P.S., Hadj-Rabia, S., Nasca, L., Georgin-Lavialle, S., Cohen-Akenine, A., et al. (2009). Pediatric Mastocytosis Is a Clonal Disease Associated with D816V and Other Activating c-KIT Mutations. *J. Invest. Dermatol.* *130*, 804–815.
- Boissan, M., Feger, F., Guillosson, J.J., and Arock, M. (2000). c-Kit and c-kit mutations in mastocytosis and other hematological diseases. *J. Leukoc. Biol.* *67*, 135–148.
- Boldrini, L., Ursino, S., Gisfredi, S., Faviana, P., Donati, V., Camacci, T., Lucchi, M., Mussi, A., Basolo, F., Pingitore, R., et al. (2004). Expression and Mutational Status of c-kit in Small-Cell Lung Cancer Prognostic Relevance. *Clin. Cancer Res.* *10*, 4101–4108.
- Borg, C., Terme, M., Taïeb, J., Ménard, C., Flament, C., Robert, C., Maruyama, K., Wakasugi, H., Angevin, E., Thielemans, K., et al. (2004). Novel mode of action of c-kit tyrosine kinase inhibitors leading to NK cell-dependent antitumor effects. *J. Clin. Invest.* *114*, 379–388.
- Bougherara, H., Subra, F., Crépin, R., Tauc, P., Auclair, C., and Poul, M.-A. (2009). The Aberrant Localization of Oncogenic Kit Tyrosine Kinase Receptor Mutants Is Reversed on Specific Inhibitory Treatment. *Mol. Cancer Res.* *7*, 1525–1533.
- Bougherara, H., Georgin-Lavialle, S., Damaj, G., Launay, J.-M., Lhermitte, L., Auclair, C., Arock, M., Dubreuil, P., Hermine, O., and Poul, M.-A. (2013). Relocalization of KIT D816V to cell surface after dasatinib treatment: potential clinical implications. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* *13*, 62–69.
- Brahimi-Adouane, S., Bachet, J.-B., Tabone-Eglinger, S., Subra, F., Capron, C., Blay, J.-Y., and Emile, J.-F. (2013). Effects of endoplasmic reticulum stressors on maturation and signaling of hemizygous and heterozygous wild-type and mutant forms of KIT. *Mol. Oncol.* *7*, 323–333.
- Brannan, C.I., Lyman, S.D., Williams, D.E., Eisenman, J., Anderson, D.M., Cosman, D., Bedell, M.A., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (1991). Steel-Dickie mutation encodes a c-kit ligand lacking transmembrane and cytoplasmic domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *88*, 4671–4674.
- Brizzi, M.F., Dentelli, P., Rosso, A., Yarden, Y., and Pegoraro, L. (1999). STAT protein recruitment and activation in c-Kit deletion mutants. *J. Biol. Chem.* *274*, 16965–16972.
- Broudy, V.C. (1997). Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood* *90*, 1345–1364.
- Von Bubnoff, N., Gorantla, S.H.P., Kanchar, R.K., Lordick, F., Peschel, C., and Duyster, J. (2005). The systemic mastocytosis-specific activating cKit mutation D816V can be inhibited by the tyrosine kinase inhibitor AMN107. *Leukemia* *19*, 1670–1671.
- Buchdunger, E., Zimmermann, J., Mett, H., Meyer, T., Müller, M., Druker, B.J., and Lydon, N.B. (1996). Inhibition of the Abl Protein-Tyrosine Kinase in Vitro and in Vivo by a 2-Phenylaminopyrimidine Derivative. *Cancer Res.* *56*, 100–104.
- Caja, L., Sancho, P., Bertran, E., Ortiz, C., Campbell, J.S., Fausto, N., and Fabregat, I. (2011). The tyrostatin AG1478 inhibits proliferation and induces death of liver tumor cells through

EGF receptor-dependent and independent mechanisms. *Biochem. Pharmacol.* 82, 1583–1592.

Calafiore, L., Amoroso, L., Della Casa Alberighi, O., Luksch, R., Zanazzo, G., Castellano, A., Podda, M., Dominici, C., Haupt, R., Corrias, M.V., et al. (2013). Two-stage phase II study of imatinib mesylate in subjects with refractory or relapsing neuroblastoma. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* 24, 1406–1413.

Care, R.S., Valk, P.J.M., Goodeve, A.C., Abu-Duhier, F.M., Geertsma-Kleinekoort, W.M.C., Wilson, G.A., Gari, M.A., Peake, I.R., Löwenberg, B., and Reilly, J.T. (2003). Incidence and prognosis of c-KIT and FLT3 mutations in core binding factor (CBF) acute myeloid leukaemias. *Br. J. Haematol.* 121, 775–777.

Cartron, G., Trappe, R.U., Solal-Céligny, P., and Hallek, M. (2011). Interindividual variability of response to rituximab: from biological origins to individualized therapies. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17, 19–30.

Carvajal RD, Antonescu CR, Wolchok JD, and et al (2011). KIt as a therapeutic target in metastatic melanoma. *JAMA* 305, 2327–2334.

Casteran, N., Sepulveda, P.D., 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.

Chabot, B., Stephenson, D.A., Chapman, V.M., Besmer, P., and Bernstein, A. (1988). The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. *Nature* 335, 88–89.

Chan, P.M., Ilangumaran, S., Rose, J.L., Chakrabartty, A., and Rottapel, R. (2003). Autoinhibition of the Kit Receptor Tyrosine Kinase by the Cytosolic Juxtamembrane Region. *Mol. Cell. Biol.* 23, 3067–3078.

Chau, W.K., Ip, C.K., Mak, A.S.C., Lai, H.-C., and Wong, A.S.T. (2012). c-Kit mediates chemoresistance and tumor-initiating capacity of ovarian cancer cells through activation of Wnt/ β -catenin–ATP-binding cassette G2 signaling. *Oncogene*.

Chen, H., Redelman, D., Ro, S., Ward, S.M., Ördög, T., and Sanders, K.M. (2007). Selective labeling and isolation of functional classes of interstitial cells of Cajal of human and murine small intestine. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 292, C497–C507.

Chian, R., Young, S., Danilkovitch-Miagkova, A., Rönstrand, L., Leonard, E., Ferrao, P., Ashman, L., and Linnekin, D. (2001). Phosphatidylinositol 3 kinase contributes to the transformation of hematopoietic cells by the D816V c-Kit mutant. *Blood* 98, 1365–1373.

Cho, J.H., Kim, K.M., Kwon, M., Kim, J.H., and Lee, J. (2012). Nilotinib in patients with metastatic melanoma harboring KIT gene aberration. *Invest. New Drugs* 30, 2008–2014.

Choi, Y., Seeliger, M.A., Panjarian, S.B., Kim, H., Deng, X., Sim, T., Couch, B., Koleske, A.J., Smithgall, T.E., and Gray, N.S. (2009). N-Myristoylated c-Abl Tyrosine Kinase Localizes to the

Endoplasmic Reticulum upon Binding to an Allosteric Inhibitor. *J. Biol. Chem.* *284*, 29005–29014.

Choudhary, C., Olsen, J.V., Brandts, C., Cox, J., Reddy, P.N.G., Böhmer, F.D., Gerke, V., Schmidt-Arras, D.-E., Berdel, W.E., Müller-Tidow, C., et al. (2009). Mislocalized Activation of Oncogenic RTKs Switches Downstream Signaling Outcomes. *Mol. Cell* *36*, 326–339.

Cohen, M.H., Farrell, A., Justice, R., and Pazdur, R. (2009). Approval Summary: Imatinib Mesylate in the Treatment of Metastatic and/or Unresectable Malignant Gastrointestinal Stromal Tumors. *The Oncologist* *14*, 174–180.

Cohen, P.S., Chan, J.P., Lipkuns kaya, M., Biedler, J.L., and Seeger, R.C. (1994). Expression of stem cell factor and c-kit in human neuroblastoma. The Children's Cancer Group. *Blood* *84*, 3465–3472.

Columbo, M., Horowitz, E.M., Botana, L.M., MacGlashan, D.W., Bochner, B.S., Gillis, S., Zsebo, K.M., Galli, S.J., and Lichtenstein, L.M. (1992). The human recombinant c-kit receptor ligand, rhSCF, induces mediator release from human cutaneous mast cells and enhances IgE-dependent mediator release from both skin mast cells and peripheral blood basophils. *J. Immunol.* *149*, 599–608.

Corless, C.L., Barnett, C.M., and Heinrich, M.C. (2011). Gastrointestinal stromal tumours: origin and molecular oncology. *Nat. Rev. Cancer* *11*, 865–878.

Costa, J.J., Demetri, G.D., Harrist, T.J., Dvorak, A.M., Hayes, D.F., Merica, E.A., Menchaca, D.M., Gringeri, A.J., Schwartz, L.B., and Galli, S.J. (1996). Recombinant human stem cell factor (kit ligand) promotes human mast cell and melanocyte hyperplasia and functional activation in vivo. *J. Exp. Med.* *183*, 2681–2686.

Curtin, J.A., Busam, K., Pinkel, D., and Bastian, B.C. (2006). Somatic Activation of KIT in Distinct Subtypes of Melanoma. *J. Clin. Oncol.* *24*, 4340–4346.

D'allard, D., Gay, J., Descarpentries, C., Frisan, E., Adam, K., Verdier, F., Floquet, C., Dubreuil, P., Lacombe, C., Fontenay, M., et al. (2013). Tyrosine Kinase Inhibitors Induce Down-Regulation of c-Kit by Targeting the ATP Pocket. *PLoS ONE* *8*, e60961.

Deberry, C., Mou, S., and Linnekin, D. (1997). Stat1 associates with c-kit and is activated in response to stem cell factor. *Biochem. J.* *327 (Pt 1)*, 73–80.

Debiec-Rychter, M., Cools, J., Dumez, H., Sciot, R., Stul, M., Mentens, N., Vranckx, H., Wasag, B., Prenen, H., Roesel, J., et al. (2005). Mechanisms of resistance to imatinib mesylate in gastrointestinal stromal tumors and activity of the PKC412 inhibitor against imatinib-resistant mutants. *Gastroenterology* *128*, 270–279.

DeMatteo, R.P., Ballman, K.V., Antonescu, C.R., Maki, R.G., Pisters, P.W., Demetri, G.D., Blackstein, M.E., Blanke, C.D., von Mehren, M., Brennan, M.F., et al. (2009). Adjuvant imatinib mesylate after resection of localised, primary gastrointestinal stromal tumour: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet* *373*, 1097–1104.

Demetri, G.D., von Mehren, M., Blanke, C.D., Van den Abbeele, A.D., Eisenberg, B., Roberts, P.J., Heinrich, M.C., Tuveson, D.A., Singer, S., Janicek, M., et al. (2002). Efficacy and Safety of Imatinib Mesylate in Advanced Gastrointestinal Stromal Tumors. *N. Engl. J. Med.* *347*, 472–480.

Deming, D., Geiger, P., Chen, H., Kunnimalaiyaan, M., and Holen, K. (2010). ZM336372 Induces Apoptosis Associated with Phosphorylation of GSK-3 β in Pancreatic Adenocarcinoma Cell Lines. *J. Surg. Res.* *161*, 28–32.

DiNitto, J.P., and Wu, J.C. (2011). Molecular mechanisms of drug resistance in tyrosine kinases cAbl and cKit. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *46*, 295–309.

Dubreuil, P., Letard, S., Ciufolini, M., Gros, L., Humbert, M., Castéran, N., Borge, L., Hajem, B., Lermet, A., Sippl, W., et al. (2009). Masitinib (AB1010), a Potent and Selective Tyrosine Kinase Inhibitor Targeting KIT. *PLoS ONE* *4*, e7258.

Dy, G.K., Miller, A.A., Mandrekar, S.J., Aubry, M.-C., Langdon, R.M., Jr, Morton, R.F., Schild, S.E., Jett, J.R., and Adjei, A.A. (2005). A phase II trial of imatinib (ST1571) in patients with c-kit expressing relapsed small-cell lung cancer: a CALGB and NCCTG study. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* *16*, 1811–1816.

Edris, B., Willingham, S.B., Weiskopf, K., Volkmer, A.K., Volkmer, J.-P., Mühlenberg, T., Montgomery, K.D., Contreras-Trujillo, H., Czechowicz, A., Fletcher, J.A., et al. (2013). Anti-KIT monoclonal antibody inhibits imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 3501–3506.

Even-Desrumeaux, K., Baty, D., and Chames, P. (2010). Strong and oriented immobilization of single domain antibodies from crude bacterial lysates for high-throughput compatible cost-effective antibody array generation. *Mol. Biosyst.* *6*, 2241.

Even-Desrumeaux, K., Nevoltris, D., Lavaut, M.N., Alim, K., Borg, J.-P., Audebert, S., Kerfelec, B., Baty, D., and Chames, P. (2014). Masked Selection: A Straightforward and Flexible Approach for the Selection of Binders Against Specific Epitopes and Differentially Expressed Proteins by Phage Display. *Mol. Cell. Proteomics* *13*, 653–665.

Fabbro, D., Manley, P.W., Jahnke, W., Liebetanz, J., Szyttenholm, A., Fendrich, G., Strauss, A., Zhang, J., Gray, N.S., Adrian, F., et al. (2010). Inhibitors of the Abl kinase directed at either the ATP- or myristate-binding site. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* *1804*, 454–462.

Falchook, G.S., Lewis, K.D., Infante, J.R., Gordon, M.S., Vogelzang, N.J., DeMarini, D.J., Sun, P., Moy, C., Szabo, S.A., Roadcap, L.T., et al. (2012). Activity of the oral MEK inhibitor trametinib in patients with advanced melanoma: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet Oncol.* *13*, 782–789.

Fischer, T., Stone, R.M., DeAngelo, D.J., Galinsky, I., Estey, E., Lanza, C., Fox, E., Ehninger, G., Feldman, E.J., Schiller, G.J., et al. (2010). Phase IIB Trial of Oral Midostaurin (PKC412), the FMS-Like Tyrosine Kinase 3 Receptor (FLT3) and Multi-Targeted Kinase Inhibitor, in Patients

With Acute Myeloid Leukemia and High-Risk Myelodysplastic Syndrome With Either Wild-Type or Mutated FLT3. *J. Clin. Oncol.* *28*, 4339–4345.

Floris, G., Sciot, R., Wozniak, A., Looy, T.V., Wellens, J., Faa, G., Normant, E., Debiec-Rychter, M., and Schöffski, P. (2011). The Novel HSP90 Inhibitor, IPI-493, Is Highly Effective in Human Gastrointestinal Stromal Tumor Xenografts Carrying Heterogeneous KIT Mutations. *Clin. Cancer Res.* *17*, 5604–5614.

Frost, M.J., Ferrao, P.T., Hughes, T.P., and Ashman, L.K. (2002). Juxtamembrane Mutant V560GKit Is More Sensitive to Imatinib (STI571) Compared with Wild-Type c-Kit Whereas the Kinase Domain Mutant D816VKit Is Resistant 1 Supported by a grant from the National Health and Medical Research Council of Australia (NHMRC). M. F. is recipient of an Australian Postgraduate Award. L. K. A. is a NHMRC Principal Research Fellow. Imatinib was provided by Novartis. *1. Mol. Cancer Ther.* *1*, 1115–1124.

Fumo, G., Akin, C., Metcalfe, D.D., and Neckers, L. (2004). 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) is effective in down-regulating mutated, constitutively activated KIT protein in human mast cells. *Blood* *103*, 1078–1084.

Gajiwala, K.S., Wu, J.C., Christensen, J., Deshmukh, G.D., Diehl, W., DiNitto, J.P., English, J.M., Greig, M.J., He, Y.-A., Jacques, S.L., et al. (2009). KIT kinase mutants show unique mechanisms of drug resistance to imatinib and sunitinib in gastrointestinal stromal tumor patients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 1542–1547.

Georgin-Lavialle, S., Barete, S., Suarez, F., Lepelletier, Y., Bodemer, C., Dubreuil, P., Lortholary, O., and Hermine, O. (2009). Actualités sur la compréhension et le traitement des mastocytoses systémiques. *Rev. Médecine Interne* *30*, 25–34.

Gibbs, L., and Legeai-Mallet, L. (2007). FGFR3 intracellular mutations induce tyrosine phosphorylation in the Golgi and defective glycosylation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1773*, 502–512.

Giles, F.J., O'Dwyer, M., and Swords, R. (2009). Class effects of tyrosine kinase inhibitors in the treatment of chronic myeloid. *Leukemia* *23*, 1698–1707.

Gleixner, K.V., Mayerhofer, M., Aichberger, K.J., Derdak, S., Sonneck, K., Böhm, A., Gruze, A., Samorapoompichit, P., Manley, P.W., Fabbro, D., et al. (2006). PKC412 inhibits in vitro growth of neoplastic human mast cells expressing the D816V-mutated variant of KIT: comparison with AMN107, imatinib, and cladribine (2CdA) and evaluation of cooperative drug effects. *Blood* *107*, 752–759.

Goemans, B.F., Zwaan, C.M., Miller, M., Zimmermann, M., Harlow, A., Meshinchi, S., Loonen, A.H., Hählen, K., Reinhardt, D., Creutzig, U., et al. (2005). Mutations in KIT and RAS are frequent events in pediatric core-binding factor acute myeloid. *Leukemia* *19*, 1536–1542.

Golay, J., and Introna, M. (2012). Mechanism of action of therapeutic monoclonal antibodies: Promises and pitfalls of in vitro and in vivo assays. *Arch. Biochem. Biophys.* *526*, 146–153.

Gommerman, J.L., Sittaro, D., Klebasz, N.Z., Williams, D.A., and Berger, S.A. (2000). Differential stimulation of c-Kit mutants by membrane-bound and soluble Steel Factor correlates with leukemic potential. *Blood* *96*, 3734–3742.

González, I., Andreu, E.J., Panizo, A., Inogés, S., Fontalba, A., Fernández-Luna, J.L., Gaboli, M., Sierrasesúmaga, L., Martín-Algarra, S., Pardo, J., et al. (2004). Imatinib Inhibits Proliferation of Ewing Tumor Cells Mediated by the Stem Cell Factor/KIT Receptor Pathway, and Sensitizes Cells to Vincristine and Doxorubicin-Induced Apoptosis. *Clin. Cancer Res.* *10*, 751–761.

Gotink, K.J., and Verheul, H.M.W. (2010). Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action? *Angiogenesis* *13*, 1–14.

Gotlib, J., Berubé, C., Growney, J.D., Chen, C.-C., George, T.I., Williams, C., Kajiguchi, T., Ruan, J., Lilleberg, S.L., Durocher, J.A., et al. (2005). Activity of the tyrosine kinase inhibitor PKC412 in a patient with mast cell leukemia with the D816V KIT mutation. *Blood* *106*, 2865–2870.

Gotlib, J., Pardanani, A., Akin, C., Reiter, A., George, T., Hermine, O., Kluin-Nelemans, H., Hartmann, K., Sperr, W.R., Brockow, K., et al. (2013). International Working Group-Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment (IWG-MRT) & European Competence Network on Mastocytosis (ECNM) consensus response criteria in advanced systemic mastocytosis. *Blood* *121*, 2393–2401.

Gotoh, A., Takahira, H., Mantel, C., Litz-Jackson, S., Boswell, H.S., and Broxmeyer, H.E. (1996). Steel factor induces serine phosphorylation of Stat3 in human growth factor-dependent myeloid cell lines. *Blood* *88*, 138–145.

Gramza, A.W., Corless, C.L., and Heinrich, M.C. (2009). Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Clin. Cancer Res.* *15*, 7510–7518.

Grothey, A., Cutsem, E.V., Sobrero, A., Siena, S., Falcone, A., Ychou, M., Humblet, Y., Bouché, O., Mineur, L., Barone, C., et al. (2013). Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet* *381*, 303–312.

Gueller, S., Gery, S., Nowak, V., Liu, L., Serve, H., and Koeffler, H.P. (2008). Adaptor protein Lnk associates with Tyr568 in c-Kit. *Biochem. J.* *415*, 241.

Guida, T., Anaganti, S., Provitera, L., Gedrich, R., Sullivan, E., Wilhelm, S.M., Santoro, M., and Carlomagno, F. (2007). Sorafenib Inhibits Imatinib-Resistant KIT and Platelet-Derived Growth Factor Receptor β Gatekeeper Mutants. *Clin. Cancer Res.* *13*, 3363–3369.

Gumireddy, K., Baker, S.J., Cosenza, S.C., John, P., Kang, A.D., Robell, K.A., Reddy, M.V.R., and Reddy, E.P. (2005). A non-ATP-competitive inhibitor of BCR-ABL overrides imatinib resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 1992–1997.

Guo, J., Si, L., Kong, Y., Flaherty, K.T., Xu, X., Zhu, Y., Corless, C.L., Li, L., Li, H., Sheng, X., et al. (2011). Phase II, Open-Label, Single-Arm Trial of Imatinib Mesylate in Patients With Metastatic Melanoma Harboring c-Kit Mutation or Amplification. *J. Clin. Oncol.* *29*, 2904–2909.

Guo, T., Agaram, N.P., Wong, G.C., Hom, G., D'Adamo, D., Maki, R.G., Schwartz, G.K., Veach, D., Clarkson, B.D., Singer, S., et al. (2007). Sorafenib Inhibits the Imatinib-Resistant KITT670I Gatekeeper Mutation in Gastrointestinal Stromal Tumor. *Clin. Cancer Res.* *13*, 4874–4881.

Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E.B., Bendahman, N., and Hamers, R. (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* *363*, 446–448.

Han, J., Luby-Phelps, K., Das, B., Shu, X., Xia, Y., Mosteller, R.D., Krishna, U.M., Falck, J.R., White, M.A., and Broek, D. (1998). Role of Substrates and Products of PI 3-kinase in Regulating Activation of Rac-Related Guanosine Triphosphatases by Vav. *Science* *279*, 558–560.

Han, Y., Caday, C.G., Umezawa, K., and Nanda, A. (1997). Preferential inhibition of glioblastoma cells with wild-type epidermal growth factor receptors by a novel tyrosine kinase inhibitor ethyl-2,5-dihydroxycinnamate. *Oncol. Res.* *9*, 581–587.

Heinrich, M.C., Maki, R.G., Corless, C.L., Antonescu, C.R., Harlow, A., Griffith, D., Town, A., Mckinley, A., Ou, W.-B., Fletcher, J.A., et al. (2008a). Primary and Secondary Kinase Genotypes Correlate With the Biological and Clinical Activity of Sunitinib in Imatinib-Resistant Gastrointestinal Stromal Tumor. *J. Clin. Oncol.* *26*, 5352–5359.

Heinrich, M.C., Owzar, K., Corless, C.L., Hollis, D., Borden, E.C., Fletcher, C.D.M., Ryan, C.W., Mehren, M. von, Blanke, C.D., Rankin, C., et al. (2008b). Correlation of Kinase Genotype and Clinical Outcome in the North American Intergroup Phase III Trial of Imatinib Mesylate for Treatment of Advanced Gastrointestinal Stromal Tumor: CALGB 150105 Study by Cancer and Leukemia Group B and Southwest Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* *26*, 5360–5367.

Heinrich, M.C., Marino-Enriquez, A., Presnell, A., Donsky, R.S., Griffith, D.J., McKinley, A., Patterson, J., Taguchi, T., Liang, C.-W., and Fletcher, J.A. (2012). Sorafenib Inhibits Many Kinase Mutations Associated with Drug-Resistant Gastrointestinal Stromal Tumors. *Mol. Cancer Ther.* *11*, 1770–1780.

Hers, I., Tavaré, J.M., and Denton, R.M. (1999). The protein kinase C inhibitors bisindolylmaleimide I (GF 109203x) and IX (Ro 31-8220) are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity. *FEBS Lett.* *460*, 433–436.

Hibi, K., Takahashi, T., Sekido, Y., Ueda, R., Hida, T., Ariyoshi, Y., Takagi, H., and Takahashi, T. (1991). Coexpression of the stem cell factor and the c-kit genes in small-cell lung cancer. *Oncogene* *6*, 2291–2296.

Higuchi, M., O'Brien, D., Kumaravelu, P., Lenny, N., Yeoh, E.-J., and Downing, J.R. (2002). Expression of a conditional AML1-ETO oncogene bypasses embryonic lethality and establishes a murine model of human t(8;21) acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* *1*, 63–74.

Hirata, T., Morii, E., Morimoto, M., Kasugai, T., Tsujimura, T., Hirota, S., Kanakura, Y., Nomura, S., and Kitamura, Y. (1993). Stem cell factor induces outgrowth of c-kit-positive neurites and supports the survival of c-kit-positive neurons in dorsal root ganglia of mouse embryos. *Development* *119*, 49–56.

- Hirota, S., Nishida, T., Isozaki, K., Taniguchi, M., Nakamura, J., Okazaki, T., and Kitamura, Y. (2001). Gain-of-function mutation at the extracellular domain of KIT in gastrointestinal stromal tumours. *J. Pathol.* *193*, 505–510.
- Hoei-Hansen, C.E., Kraggerud, S.M., Abeler, V.M., Kaern, J., Rajpert-De Meyts, E., and Lothe, R.A. (2007). Ovarian dysgerminomas are characterised by frequent KIT mutations and abundant expression of pluripotency markers. *Mol. Cancer* *6*, 12.
- Hoessel, R., Leclerc, S., Endicott, J.A., Nobel, M.E.M., Lawrie, A., Tunnah, P., Leost, M., Damiens, E., Marie, D., Marko, D., et al. (1999). Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. *Nat. Cell Biol.* *1*, 60–67.
- Hoogenboom, H.R., and Chames, P. (2000). Natural and designer binding sites made by phage display technology. *Immunol. Today* *21*, 371–378.
- Høyer, P.E., Byskov, A.G., and Møllgård, K. (2005). Stem cell factor and c-Kit in human primordial germ cells and fetal ovaries. *Mol. Cell. Endocrinol.* *234*, 1–10.
- Hsueh, Y.-S., Yen, C.-C., Shih, N.-Y., Chiang, N.-J., Li, C.-F., and Chen, L.-T. (2013a). Autophagy is involved in endogenous and NVP-AUY922-induced KIT degradation in gastrointestinal stromal tumors. *Autophagy* *9*, 220–233.
- Hsueh, Y.-S., Lin, C.-L., Chiang, N.-J., Yen, C.-C., Li, C.-F., Shan, Y.-S., Ko, C.-H., Shih, N.-Y., Wang, L.-M., Chen, T.-S., et al. (2013b). Selecting Tyrosine Kinase Inhibitors for Gastrointestinal Stromal Tumor with Secondary KIT Activation-Loop Domain Mutations. *PLoS ONE* *8*, e65762.
- Hu, M., and Zhang, K. (2013). The application of aptamers in cancer research: an up-to-date review. *Future Oncol.* *9*, 369–376.
- Huang, E.J., Nocka, K.H., Buck, J., and Besmer, P. (1992). Differential expression and processing of two cell associated forms of the kit-ligand: KL-1 and KL-2. *Mol. Biol. Cell* *3*, 349–362.
- Jahn, T., Seipel, P., Coutinho, S., Urschel, S., Schwarz, K., Miething, C., Serve, H., Peschel, C., and Duyster, J. (2002). Analysing c-kit internalization using a functional c-kit-EGFP chimera containing the fluorochrome within the extracellular domain. *Oncogene* *21*, 4508–4520.
- Jahn, T., Leifheit, E., Gooch, S., Sindhu, S., and Weinberg, K. (2007). Lipid rafts are required for Kit survival and proliferation signals. *Blood* *110*, 1739–1747.
- Jhaveri, K., and Modi, S. (2012). Chapter Fifteen - HSP90 Inhibitors for Cancer Therapy and Overcoming Drug Resistance. In *Advances in Pharmacology*, Keiran S.M. Smalley, ed. (Academic Press), pp. 471–517.
- Katafuchi, T., Li, A.-J., Hirota, S., Kitamura, Y., and Hori, T. (2000). Impairment of Spatial Learning and Hippocampal Synaptic Potentiation in c-kit Mutant Rats. *Learn. Mem.* *7*, 383–392.

Kato, M., Takeda, K., Kawamoto, Y., Tsuzuki, T., Hossain, K., Tamakoshi, A., Kunisada, T., Kambayashi, Y., Ogino, K., Suzuki, H., et al. (2004). c-Kit-targeting immunotherapy for hereditary melanoma in a mouse model. *Cancer Res.* *64*, 801–806.

Kemmer, K., Corless, C.L., Fletcher, J.A., McGreevey, L., Haley, A., Griffith, D., Cummings, O.W., Wait, C., Town, A., and Heinrich, M.C. (2004). KIT Mutations Are Common in Testicular Seminomas. *Am. J. Pathol.* *164*, 305–313.

Kerbel, R., and Folkman, J. (2002). Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 727–739.

Keshet, E., Lyman, S.D., Williams, D.E., Anderson, D.M., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., and Parada, L.F. (1991). Embryonic RNA expression patterns of the c-kit receptor and its cognate ligand suggest multiple functional roles in mouse development. *EMBO J.* *10*, 2425.

Kidder, B.L., Yang, J., and Palmer, S. (2008). Stat3 and c-Myc genome-wide promoter occupancy in embryonic stem cells. *PloS One* *3*, e3932.

Kim, E., Jung, Y., Choi, H., Yang, J., Suh, J.-S., Huh, Y.-M., Kim, K., and Haam, S. (2010). Prostate cancer cell death produced by the co-delivery of Bcl-xL shRNA and doxorubicin using an aptamer-conjugated polyplex. *Biomaterials* *31*, 4592–4599.

Kim, J.-H., Kim, T.H., Kang, H.S., Ro, J., Kim, H.S., and Yoon, S. (2009). SP600125, an inhibitor of Jnk pathway, reduces viability of relatively resistant cancer cells to doxorubicin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *387*, 450–455.

Kim, S.Y., Kang, J.J., Lee, H.H., Kang, J.J., Kim, B., Kim, C.-G., Park, T.-K., and Kang, H. (2011). Mechanism of activation of human c-KIT kinase by internal tandem duplications of the juxtamembrane domain and point mutations at aspartic acid 816. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *410*, 224–228.

Kitamura, Y., Go, S., and Hatanaka, K. (1978). Decrease of mast cells in W/W^v mice and their increase by bone marrow transplantation. *Blood* *52*, 447–452.

Kitayama, H., Kanakura, Y., Furitsu, T., Tsujimura, T., Oritani, K., Ikeda, H., Sugahara, H., Mitsui, H., Kanayama, Y., and Kitamura, Y. (1995). Constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase confer factor-independent growth and tumorigenicity of factor-dependent hematopoietic cell lines. *Blood* *85*, 790–798.

Kluger, H.M., Dudek, A.Z., McCann, C., Ritacco, J., Southard, N., Jilaveanu, L.B., Molinaro, A., and Sznol, M. (2011). A phase 2 trial of dasatinib in advanced melanoma. *Cancer* *117*, 2202–2208.

Kobayashi, T., Nemoto, S., Ishida, K., Taguchi, K., Matsumoto, T., and Kamata, K. (2012). Involvement of CaM kinase II in the impairment of endothelial function and eNOS activity in aortas of Type 2 diabetic rats. *Clin. Sci. Lond. Engl.* *1979* *123*, 375–386.

- Kocabas, C.N., Yavuz, A.S., Lipsky, P.E., Metcalfe, D.D., and Akin, C. (2005). Analysis of the lineage relationship between mast cells and basophils using the c-kit D816V mutation as a biologic signature. *J. Allergy Clin. Immunol.* *115*, 1155–1161.
- Köhler, G., and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* *256*, 495–497.
- Koketsu, R., Suzukawa, M., Kawakami, A., Komiya, A., Ra, C., Yamamoto, K., and Yamaguchi, M. (2008). Activation of basophils by stem cell factor: comparison with insulin-like growth factor-I. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* *18*, 293–299.
- Kovalenko, M., Gazit, A., Böhmer, A., Rorsman, C., Rönstrand, L., Heldin, C.-H., Waltenberger, J., Böhmer, F.-D., and Levitzki, A. (1994). Selective Platelet-derived Growth Factor Receptor Kinase Blockers Reverse sis-Transformation. *Cancer Res.* *54*, 6106–6114.
- Kozlowski, M., Larose, L., Lee, F., Le, D.M., Rottapel, R., and Siminovitch, K.A. (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*, 2089–2099.
- Krishnamoorthy, N., Oriss, T.B., Paglia, M., Fei, M., Yarlagadda, M., Vanhaesebroeck, B., Ray, A., and Ray, P. (2008). Activation of c-Kit in dendritic cells regulates T helper cell differentiation and allergic asthma. *Nat. Med.* *14*, 565–573.
- Laine, E., Chauvot de Beauchêne, I., Perahia, D., Auclair, C., and Tchertanov, L. (2011). Mutation D816V alters the internal structure and dynamics of c-KIT receptor cytoplasmic region: implications for dimerization and activation mechanisms. *PLoS Comput. Biol.* *7*, e1002068.
- Lam, L.P., Chow, R.Y., and Berger, S.A. (1999). A transforming mutation enhances the activity of the c-Kit soluble tyrosine kinase domain. *Biochem. J.* *338 (Pt 1)*, 131–138.
- Lange, M., Niedoszytko, M., Niedoszytko, B., Łata, J., Trzeciak, M., and Biernat, W. (2012). Diffuse cutaneous mastocytosis: analysis of 10 cases and a brief review of the literature. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* *26*, 1565–1571.
- Langley, K.E., Bennett, L.G., Wypych, J., Yancik, S.A., Liu, X.D., Westcott, K.R., Chang, D.G., Smith, K.A., and Zsebo, K.M. (1993). Soluble stem cell factor in human serum. *Blood* *81*, 656–660.
- Lauwereys, M., Arbabi Ghahroudi, M., Desmyter, A., Kinne, J., Hölzer, W., De Genst, E., Wyns, L., and Muyldermans, S. (1998). Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies. *EMBO J.* *17*, 3512–3520.
- Lazarevic, B., Boezelij, G., Diep, L.M., Kvernrod, K., Ogren, O., Ramberg, H., Moen, A., Wessel, N., Berg, R.E., Egge-Jacobsen, W., et al. (2011). Efficacy and safety of short-term genistein intervention in patients with localized prostate cancer prior to radical prostatectomy: a randomized, placebo-controlled, double-blind Phase 2 clinical trial. *Nutr. Cancer* *63*, 889–898.

Lebron, M., Brennan, L., Damoci, C., Prewett, M., Starodubtseva, M., Amatulli, M., Zhang, Y., Burtrum, D., Balderes, P., Persaud, K., et al. (2013). Abstract C159: A human monoclonal antibody targeting the stem cell factor receptor (c-Kit) blocks tumor cell signaling and inhibits tumor growth. *Mol. Cancer Ther.* *12*, C159–C159.

Lee, J.C.F., Thuneberg, L., Berezin, I., and Huizinga, J.D. (1999). Generation of slow waves in membrane potential is an intrinsic property of interstitial cells of Cajal. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* *277*, G409–G423.

Lee, M.-Y., Liu, Y.-W., Chen, M.-H., Wu, J.-Y., Ho, H.-Y., Wang, Q.-F., and Chuang, J.-J. (2013). Idirubin-3'-monoxime promotes autophagic and apoptotic death in JM1 human acute lymphoblastic leukemia cells and K562 human chronic myelogenous leukemia cells. *Oncol. Rep.* *29*, 2072–2078.

Lennartsson, J., and Rönstrand, L. (2012). Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications. *Physiol. Rev.* *92*, 1619–1649.

Lennartsson, J., Blume-Jensen, P., Hermanson, M., Pontén, E., Carlberg, M., and Rönstrand, L. (1999). Phosphorylation of Shc by Src family kinases is necessary for stem cell factor receptor/c-kit mediated activation of the Ras/MAP kinase pathway and c-fos induction. *Oncogene* *18*, 5546–5553.

Lennartsson, J., Wernstedt, C., Engström, U., Hellman, U., and Rönstrand, L. (2003). Identification of Tyr900 in the kinase domain of c-Kit as a Src-dependent phosphorylation site mediating interaction with c-Crk. *Exp. Cell Res.* *288*, 110–118.

Lennartsson, J., Jelacic, T., Linnekin, D., and Shivakrupa, R. (2005). Normal and Oncogenic Forms of the Receptor Tyrosine Kinase Kit. *STEM CELLS* *23*, 16–43.

Letard, S., Yang, Y., Hanssens, K., Palmérini, F., Leventhal, P.S., Guéry, S., Moussy, A., Kinet, J.-P., Hermine, O., and Dubreuil, P. (2008). Gain-of-Function Mutations in the Extracellular Domain of KIT Are Common in Canine Mast Cell Tumors. *Mol. Cancer Res.* *6*, 1137–1145.

Li, S., Schmitz, K.R., Jeffrey, P.D., Wiltzius, J.J.W., Kussie, P., and Ferguson, K.M. (2005). Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell* *7*, 301–311.

Liang, J. (2013). The C-Kit Receptor-Mediated Signal Transduction and Tumor-Related Diseases. *Int. J. Biol. Sci.* *9*, 435–443.

Liu, L.S., and Colegio, O.R. (2013). Molecularly targeted therapies for melanoma. *Int. J. Dermatol.* *52*, 523–530.

Liu, Y., and Gray, N.S. (2006). Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations. *Nat. Chem. Biol.* *2*, 358–364.

Liu, X., Fridman, J.S., Wang, Q., Caulder, E., Yang, G., Covington, M., Liu, C., Marando, C., Zhuo, J., Li, Y., et al. (2006). Selective inhibition of ADAM metalloproteases blocks HER-2

extracellular domain (ECD) cleavage and potentiates the anti-tumor effects of trastuzumab. *Cancer Biol. Ther.* *5*, 648–656.

Llopis, J., McCaffery, J.M., Miyawaki, A., Farquhar, M.G., and Tsien, R.Y. (1998). Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *95*, 6803–6808.

López, V., and Jordá, E. (2011). Piebaldism in a 2-year-old girl. *Dermatol. Online J.* *17*.

Lourenssen, S., Motro, B., Bernstein, A., and Diamond, J. (2000). Defects in sensory nerve numbers and growth in mutant Kit and Steel mice. [Miscellaneous Article]. *Neuroreport April 27 2000* *11*, 1159–1165.

Luginbühl, B., Kanyo, Z., Jones, R.M., Fletterick, R.J., Prusiner, S.B., Cohen, F.E., Williamson, R.A., Burton, D.R., and Plückthun, A. (2006). Directed evolution of an anti-prion protein scFv fragment to an affinity of 1 pM and its structural interpretation. *J. Mol. Biol.* *363*, 75–97.

Maddens, S., Charruyer, A., Plo, I., Dubreuil, P., Berger, S., Salles, B., Laurent, G., and Jaffrézou, J.-P. (2002). Kit signaling inhibits the sphingomyelin-ceramide pathway through PLC γ 1: implication in stem cell factor radioprotective effect. *Blood* *100*, 1294–1301.

Maddocks, K., and Blum, K.A. (2014). Ibrutinib in B-cell Lymphomas. *Curr. Treat. Options Oncol.*

Maekawa, T., Ashihara, E., and Kimura, S. (2007). The Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitor imatinib and promising new agents against Philadelphia chromosome-positive leukemias. *Int. J. Clin. Oncol.* *12*, 327–340.

Majumder, S., Brown, K., Qiu, F.H., and Besmer, P. (1988). c-kit protein, a transmembrane kinase: identification in tissues and characterization. *Mol. Cell. Biol.* *8*, 4896–4903.

Mali, R.S., Ma, P., Zeng, L.-F., Martin, H., Ramdas, B., He, Y., Sims, E., Nabinger, S., Ghosh, J., Sharma, N., et al. (2012). Role of SHP2 phosphatase in KIT-induced transformation: identification of SHP2 as a druggable target in diseases involving oncogenic KIT. *Blood* *120*, 2669–2678.

Masson, K., Heiss, E., Band, H., and Rönstrand, L. (2006). Direct binding of Cbl to Tyr568 and Tyr936 of the stem cell factor receptor/c-Kit is required for ligand-induced ubiquitination, internalization and degradation. *Biochem. J.* *399*, 59.

Matos, M.E., Schnier, G.S., Beecher, M.S., Ashman, L.K., William, D.E., and Caligiuri, M.A. (1993). Expression of a functional c-kit receptor on a subset of natural killer cells. *J. Exp. Med.* *178*, 1079–1084.

Matsui, Y., Zsebo, K.M., and Hogan, B.L.M. (1990). Embryonic expression of a haematopoietic growth factor encoded by the Sl locus and the ligand for c-kit. *Nature* *347*, 667–669.

Matthews, W., Jordan, C.T., Wiegand, G.W., Pardoll, D., and Lemischka, I.R. (1991). A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. *Cell* 65, 1143–1152.

Mauduit, C., Hamamah, S., and Benahmed, M. (1999). Stem cell factor/c-kit system in spermatogenesis. *Hum. Reprod. Update* 5, 535–545.

Mazuc, E., Villoutreix, B.O., Malbec, O., Roumier, T., Fleury, S., Leonetti, J.-P., Dombrowicz, D., Daëron, M., Martineau, P., and Dariavach, P. (2008). A novel druglike spleen tyrosine kinase binder prevents anaphylactic shock when administered orally. *J. Allergy Clin. Immunol.* 122, 188–194, 194.e1–3.

McArthur, G.A., Chapman, P.B., Robert, C., Larkin, J., Haanen, J.B., Dummer, R., Ribas, A., Hogg, D., Hamid, O., Ascierto, P.A., et al. (2014). Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *Lancet Oncol.* 15, 323–332.

MCCULLOCH, E.A., SIMINOVITCH, L., and TILL, J.E. (1964). SPLEEN-COLONY FORMATION IN ANEMIC MICE OF GENOTYPE WW. *Science* 144, 844–846.

McIntyre, A., Summersgill, B., Spendlove, H.E., Huddart, R., Houlston, R., and Shipley, J. (2005a). Activating mutations and/or expression levels of tyrosine kinase receptors GRB7, RAS, and BRAF in testicular germ cell tumors. *Neoplasia* N. Y. N 7, 1047–1052.

McIntyre, A., Summersgill, B., Grygalewicz, B., Gillis, A.J.M., Stoop, J., van Gurp, R.J.H.L.M., Dennis, N., Fisher, C., Huddart, R., Cooper, C., et al. (2005b). Amplification and overexpression of the KIT gene is associated with progression in the seminoma subtype of testicular germ cell tumors of adolescents and adults. *Cancer Res.* 65, 8085–8089.

Meininger, C.J., Yano, H., Rottapel, R., Bernstein, A., Zsebo, K.M., and Zetter, B.R. (1992). The c-kit receptor ligand functions as a mast cell chemoattractant. *Blood* 79, 958–963.

Metzger-Filho, O., Winer, E.P., and Krop, I. (2013). Pertuzumab: Optimizing HER2 Blockade. *Clin. Cancer Res.* 19, 5552–5556.

Miyamoto-Yamasaki, Y., Yamasaki, M., Tachibana, H., and Yamada, K. (2007). Induction of endoreduplication by a JNK inhibitor SP600125 in human lung carcinoma A 549 cells. *Cell Biol. Int.* 31, 1501–1506.

Mok, T.S., Wu, Y.-L., Thongprasert, S., Yang, C.-H., Chu, D.-T., Saijo, N., Sunpaweravong, P., Han, B., Margono, B., Ichinose, Y., et al. (2009). Gefitinib or Carboplatin–Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma. *N. Engl. J. Med.* 361, 947–957.

Mol, C.D., Lim, K.B., Sridhar, V., Zou, H., Chien, E.Y.T., Sang, B.-C., Nowakowski, J., Kassel, D.B., Cronin, C.N., and McRee, D.E. (2003). Structure of a c-Kit Product Complex Reveals the Basis for Kinase Transactivation. *J. Biol. Chem.* 278, 31461–31464.

- Mol, C.D., Dougan, D.R., Schneider, T.R., Skene, R.J., Kraus, M.L., Scheibe, D.N., Snell, G.P., Zou, H., Sang, B.-C., and Wilson, K.P. (2004). Structural Basis for the Autoinhibition and STI-571 Inhibition of c-Kit Tyrosine Kinase. *J. Biol. Chem.* *279*, 31655–31663.
- Morabito, A., Maio, E.D., Maio, M.D., Normanno, N., and Perrone, F. (2006). Tyrosine Kinase Inhibitors of Vascular Endothelial Growth Factor Receptors in Clinical Trials: Current Status and Future Directions. *The Oncologist* *11*, 753–764.
- Motro, B., Kooy, D. van der, Rossant, J., Reith, A., and Bernstein, A. (1991). Contiguous patterns of c-kit and steel expression: analysis of mutations at the W and Sl loci. *Development* *113*, 1207–1221.
- Moura, D.S., Sultan, S., Georgin-Lavialle, S., Pillet, N., Montestruc, F., Gineste, P., Barete, S., Damaj, G., Moussy, A., Lortholary, O., et al. (2011). Depression in patients with mastocytosis: prevalence, features and effects of masitinib therapy. *PLoS One* *6*, e26375.
- Müller, M.C., Cortes, J.E., Kim, D.-W., Druker, B.J., Erben, P., Pasquini, R., Branford, S., Hughes, T.P., Radich, J.P., Ploughman, L., et al. (2009). Dasatinib treatment of chronic-phase chronic myeloid leukemia: analysis of responses according to preexisting BCR-ABL mutations. *Blood* *114*, 4944–4953.
- Munugalavadla, V., and Kapur, R. (2005). Role of c-Kit and erythropoietin receptor in erythropoiesis. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *54*, 63–75.
- Muyldermans, S. (2001). Single domain camel antibodies: current status. *Rev. Mol. Biotechnol.* *74*, 277–302.
- Nelson, A.L. (2010). Antibody fragments. *mAbs* *2*, 77–83.
- Ning, Z.-Q., Li, J., and Arceci, R.J. (2001). Signal transducer and activator of transcription 3 activation is required for Asp816 mutant c-Kit-mediated cytokine-independent survival and proliferation in human leukemia cells. *Blood* *97*, 3559–3567.
- Nishikawa, S., Kusakabe, M., Yoshinaga, K., Ogawa, M., Hayashi, S., Kunisada, T., Era, T., Sakakura, T., and Nishikawa, S. (1991). In utero manipulation of coat color formation by a monoclonal anti-c-kit antibody: two distinct waves of c-kit-dependency during melanocyte development. *EMBO J.* *10*, 2111–2118.
- Oldenburg, J., Fosså, S.D., Nuver, J., Heidenreich, A., Schmoll, H.-J., Bokemeyer, C., Horwich, A., Beyer, J., and Kataja, V. (2013). Testicular seminoma and non-seminoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* *24*, vi125–vi132.
- Orr-Urtreger, A., Avivi, A., Zimmer, Y., Givol, D., Yarden, Y., and Lonai, P. (1990). Developmental expression of c-kit, a proto-oncogene encoded by the W locus. *Development* *109*, 911–923.
- Overton, L.C., and Heinrich, M.C. (2014). Regorafenib for treatment of advanced gastrointestinal stromal tumors. *Expert Opin. Pharmacother.* *1–10*.

- Pajak, B., Turowska, A., Orzechowski, A., and Gajkowska, B. (2008). Bisindolylmaleimide IX facilitates extrinsic and initiates intrinsic apoptosis in TNF-alpha-resistant human colon adenocarcinoma COLO 205 cells. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* *13*, 509–522.
- Pardanani, A. (2013). Systemic mastocytosis in adults: 2013 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am. J. Hematol.* *88*, 612–624.
- Persic, L., Righi, M., Roberts, A., Hoogenboom, H.R., Cattaneo, A., and Bradbury, A. (1997). Targeting vectors for intracellular immunisation. *Gene* *187*, 1–8.
- Philibert, P., Stoessel, A., Wang, W., Sibler, A.-P., Bec, N., Larroque, C., Saven, J.G., Courtête, J., Weiss, E., and Martineau, P. (2007). A focused antibody library for selecting scFvs expressed at high levels in the cytoplasm. *BMC Biotechnol.* *7*, 81.
- Piao, X., Paulson, R., van der Geer, P., Pawson, T., and Bernstein, A. (1996). Oncogenic mutation in the Kit receptor tyrosine kinase alters substrate specificity and induces degradation of the protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *93*, 14665–14669.
- Piessevaux, J., Lavens, D., Peelman, F., and Tavernier, J. (2008). The many faces of the SOCS box. *Cytokine Growth Factor Rev.* *19*, 371–381.
- Prenen, H., Cools, J., Mentens, N., Folens, C., Sciot, R., Schöffski, P., Van Oosterom, A., Marynen, P., and Debiec-Rychter, M. (2006). Efficacy of the kinase inhibitor SU11248 against gastrointestinal stromal tumor mutants refractory to imatinib mesylate. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *12*, 2622–2627.
- Price, D.J., Rivnay, B., Fu, Y., Jiang, S., Avraham, S., and Avraham, H. (1997). Direct association of Csk homologous kinase (CHK) with the diphosphorylated site Tyr568/570 of the activated c-KIT in megakaryocytes. *J. Biol. Chem.* *272*, 5915–5920.
- Price, D.J., Rivnay, B., and Avraham, H. (1999). CHK down-regulates SCF/KL-activated Lyn kinase activity in Mo7e megakaryocytic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *259*, 611–616.
- Prieto, P.A., Yang, J.C., Sherry, R.M., Hughes, M.S., Kammula, U.S., White, D.E., Levy, C.L., Rosenberg, S.A., and Phan, G.Q. (2012). CTLA-4 Blockade with Ipilimumab: Long-term Follow-up of 177 Patients with Metastatic Melanoma. *Clin. Cancer Res.* *18*, 2039–2047.
- Qiu, F.H., Ray, P., Brown, K., Barker, P.E., Jhanwar, S., Ruddle, F.H., and Besmer, P. (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*, 1003–1011.
- Ray, P., Krishnamoorthy, N., Oriss, T.B., and Ray, A. (2010). Signaling of c-kit in dendritic cells influences adaptive immunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1183*, 104–122.
- Reichert, J.M., and Dhimolea, E. (2012). The future of antibodies as cancer drugs. *Drug Discov. Today* *17*, 954–963.

Reith, A.D., Ellis, C., Lyman, S.D., Anderson, D.M., Williams, D.E., Bernstein, A., and Pawson, T. (1991). Signal transduction by normal isoforms and W mutant variants of the Kit receptor tyrosine kinase. *EMBO J.* 10, 2451–2459.

Reshetnyak, A.V., Nelson, B., Shi, X., Boggon, T.J., Pavlenco, A., Mandel-Bausch, E.M., Tome, F., Suzuki, Y., Sidhu, S.S., Lax, I., et al. (2013). Structural basis for KIT receptor tyrosine kinase inhibition by antibodies targeting the D4 membrane-proximal region. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201317118.

Rezvani, A.R., and Maloney, D.G. (2011). Rituximab resistance. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 24, 203–216.

Richards, J.O., Karki, S., Lazar, G.A., Chen, H., Dang, W., and Desjarlais, J.R. (2008). Optimization of antibody binding to FcγRIIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *Mol. Cancer Ther.* 7, 2517–2527.

Rico-Vargas, S.A., Weiskopf, B., Nishikawa, S., and Osmond, D.G. (1994). c-kit expression by B cell precursors in mouse bone marrow. Stimulation of B cell genesis by in vivo treatment with anti-c-kit antibody. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 152, 2845–2852.

Roberts, K.G., Odell, A.F., Byrnes, E.M., Baleato, R.M., Griffith, R., Lyons, A.B., and Ashman, L.K. (2007). Resistance to c-KIT kinase inhibitors conferred by V654A mutation. *Mol. Cancer Ther.* 6, 1159–1166.

Roskoski, R., Jr (2005). Signaling by Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 337, 1–13.

Roskoski Jr., R. (2005). Structure and regulation of Kit protein-tyrosine kinase—The stem cell factor receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 1307–1315.

Rossi, P., Dolci, S., Sette, C., and Geremia, R. (2003). Molecular mechanisms utilized by alternative c-kit gene products in the control of spermatogonial proliferation and sperm-mediated egg activation. *Andrologia* 35, 71–78.

Rovida, E., Gozzini, A., Barbetti, V., Giuntoli, S., Santini, V., and Dello Sbarba, P. (2006). The c-Jun-N-terminal-Kinase inhibitor SP600125 enhances the butyrate derivative D1-induced apoptosis via caspase 8 activation in Kasumi 1 t(8;21) acute myeloid leukaemia cells. *Br. J. Haematol.* 135, 653–659.

Rubin, B.P., and Duensing, A. (2006). Mechanisms of resistance to small molecule kinase inhibition in the treatment of solid tumors. *Lab. Invest.* 86, 981–986.

Rudnicka, D., Oszmiana, A., Finch, D.K., Strickland, I., Schofield, D.J., Lowe, D.C., Sleeman, M.A., and Davis, D.M. (2013). Rituximab causes a polarization of B cells that augments its therapeutic function in NK-cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Blood* 121, 4694–4702.

Russell, E.S. (1949). ANALYSIS OF PLEIOTROPISM AT THE W-LOCUS IN THE MOUSE: RELATIONSHIP BETWEEN THE EFFECTS OF W AND W_v SUBSTITUTION ON HAIR PIGMENTATION AND ON ERYTHROCYTES. *Genetics* 34, 708–723.

Sattler, M., Salgia, R., Shrikhande, G., Verma, S., Pisick, E., Prasad, K.V.S., and Griffin, J.D. (1997). Steel Factor Induces Tyrosine Phosphorylation of CRKL and Binding of CRKL to a Complex Containing c-Kit, Phosphatidylinositol 3-Kinase, and p120CBL. *J. Biol. Chem.* 272, 10248–10253.

Schittenhelm, M.M., Shiraga, S., Schroeder, A., Corbin, A.S., Griffith, D., Lee, F.Y., Bokemeyer, C., Deininger, M.W.N., Druker, B.J., and Heinrich, M.C. (2006). Dasatinib (BMS-354825), a Dual SRC/ABL Kinase Inhibitor, Inhibits the Kinase Activity of Wild-Type, Juxtamembrane, and Activation Loop Mutant KIT Isoforms Associated with Human Malignancies. *Cancer Res.* 66, 473–481.

Scott, A.M., Wolchok, J.D., and Old, L.J. (2012). Antibody therapy of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 12, 278–287.

Sen, B., and Johnson, F.M. (2011). Regulation of Src Family Kinases in Human Cancers. *J. Signal Transduct.* 2011.

Sepulveda, P.D., Okkenhaug, K., Rose, J.L., Hawley, R.G., Dubreuil, P., and Rottapel, R. (1999). Socs1 binds to multiple signalling proteins and suppresses Steel factor-dependent proliferation. *EMBO J.* 18, 904–915.

Sette, C., Dolci, S., Geremia, R., and Rossi, P. (2000). The role of stem cell factor and of alternative c-kit gene products in the establishment, maintenance and function of germ cells. *Int. J. Dev. Biol.* 44, 599–608.

Sever, M., Jones, T.D., Roth, L.M., Karim, F.W.A., Zheng, W., Michael, H., Hattab, E.M., Emerson, R.E., Baldrige, L.A., and Cheng, L. (2005). Expression of CD117 (c-kit) receptor in dysgerminoma of the ovary: diagnostic and therapeutic implications. *Mod. Pathol.* 18, 1411–1416.

Severinsson, L., Ek, B., Mellström, K., Claesson-Welsh, L., and Heldin, C.H. (1990). Deletion of the kinase insert sequence of the platelet-derived growth factor beta-receptor affects receptor kinase activity and signal transduction. *Mol. Cell. Biol.* 10, 801–809.

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.

Sheets, M.D., Amersdorfer, P., Finnern, R., Sargent, P., Lindquist, E., Schier, R., Hemingsen, G., Wong, C., Gerhart, J.C., Marks, J.D., et al. (1998). Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6157–6162.

Shivakrupa, R., and Linnekin, D. (2005). Lyn contributes to regulation of multiple Kit-dependent signaling pathways in murine bone marrow mast cells. *Cell. Signal.* 17, 103–109.

Da Silva, C.A., Reber, L., and Frossard, N. (2006). Stem cell factor expression, mast cells and inflammation in asthma. *Fundam. Clin. Pharmacol.* *20*, 21–39.

Sitnicka, E., Buza-Vidas, N., Larsson, S., Nygren, J.M., Liuba, K., and Jacobsen, S.E.W. (2003). Human CD34+ hematopoietic stem cells capable of multilineage engrafting NOD/SCID mice express flt3: distinct flt3 and c-kit expression and response patterns on mouse and candidate human hematopoietic stem cells. *Blood* *102*, 881–886.

Slamon, D.J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., et al. (2001). Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* *344*, 783–792.

Smyth, T., Van Looy, T., Curry, J.E., Rodriguez-Lopez, A.M., Wozniak, A., Zhu, M., Donsky, R., Morgan, J.G., Mayeda, M., Fletcher, J.A., et al. (2012). The HSP90 inhibitor, AT13387, is effective against imatinib-sensitive and -resistant gastrointestinal stromal tumor models. *Mol. Cancer Ther.* *11*, 1799–1808.

Snowden, R.T., Sun, X.-M., Dyer, M.J.S., and Cohen, G.M. (2003). Bisindolylmaleimide IX is a potent inducer of apoptosis in chronic lymphocytic leukaemic cells and activates cleavage of Mcl-1. *Leukemia* *17*, 1981–1989.

Sogawa, C., Tsuji, A.B., Sudo, H., Sugyo, A., Yoshida, C., Odaka, K., Uehara, T., Arano, Y., Koizumi, M., and Saga, T. (2010). C-kit-targeted imaging of gastrointestinal stromal tumor using radiolabeled anti-c-kit monoclonal antibody in a mouse tumor model. *Nucl. Med. Biol.* *37*, 179–187.

Solca, F., Dahl, G., Zoephel, A., Bader, G., Sanderson, M., Klein, C., Kraemer, O., Himmelsbach, F., Haaksma, E., and Adolf, G.R. (2012). Target Binding Properties and Cellular Activity of Afatinib (BIBW 2992), an Irreversible ErbB Family Blocker. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *343*, 342–350.

Stone, R.M., DeAngelo, D.J., Klimek, V., Galinsky, I., Estey, E., Nimer, S.D., Grandin, W., Lebwohl, D., Wang, Y., Cohen, P., et al. (2005). Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. *Blood* *105*, 54–60.

Sun, J., Pedersen, M., Bengtsson, S., and Rönstrand, L. (2007). Grb2 mediates negative regulation of stem cell factor receptor/c-Kit signaling by recruitment of Cbl. *Exp. Cell Res.* *313*, 3935–3942.

Sun, J., Pedersen, M., and Rönstrand, L. (2008). Gab2 Is Involved in Differential Phosphoinositide 3-Kinase Signaling by Two Splice Forms of c-Kit. *J. Biol. Chem.* *283*, 27444–27451.

Sun, L., Lee, J., and Fine, H.A. (2004). Neuronally expressed stem cell factor induces neural stem cell migration to areas of brain injury. *J. Clin. Invest.* *113*, 1364–1374.

Sung, C., Shockley, T.R., Morrison, P.F., Dvorak, H.F., Yarmush, M.L., and Dedrick, R.L. (1992). Predicted and Observed Effects of Antibody Affinity and Antigen Density on Monoclonal Antibody Uptake in Solid Tumors. *Cancer Res.* 52, 377–384.

Tabone-Eglinger, S., Subra, F., Sayadi, H.E., Alberti, L., Tabone, E., Michot, J.-P., Théou-Anton, N., Lemoine, A., Blay, J.-Y., and Emile, J.-F. (2008). KIT Mutations Induce Intracellular Retention and Activation of an Immature Form of the KIT Protein in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Clin. Cancer Res.* 14, 2285–2294.

Tamborini, E., Bonadiman, L., Greco, A., Albertini, V., Negri, T., Gronchi, A., Bertulli, R., Colecchia, M., Casali, P.G., Pierotti, M.A., et al. (2004). A new mutation in the KIT ATP pocket causes acquired resistance to imatinib in a gastrointestinal stromal tumor patient. *Gastroenterology* 127, 294–299.

Tan, J.C., Nocka, K., Ray, P., Traktman, P., and Besmer, P. (1990). The dominant W42 spotting phenotype results from a missense mutation in the c-kit receptor kinase. *Science* 247, 209–212.

Tanaka, T., Williams, R.L., and Rabbitts, T.H. (2007). Tumour prevention by a single antibody domain targeting the interaction of signal transduction proteins with RAS. *EMBO J.* 26, 3250–3259.

Tatton, L., Morley, G.M., Chopra, R., and Khwaja, A. (2003). The Src-selective Kinase Inhibitor PP1 Also Inhibits Kit and Bcr-Abl Tyrosine Kinases. *J. Biol. Chem.* 278, 4847–4853.

Tauchi, T., Feng, G.S., Marshall, M.S., Shen, R., Mantel, C., Pawson, T., and Broxmeyer, H.E. (1994). The ubiquitously expressed Syp phosphatase interacts with c-kit and Grb2 in hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* 269, 25206–25211.

Thiel, K.W., Hernandez, L.I., Dassie, J.P., Thiel, W.H., Liu, X., Stockdale, K.R., Rothman, A.M., Hernandez, F.J., McNamara, J.O., and Giangrande, P.H. (2012). Delivery of chemo-sensitizing siRNAs to HER2+ breast cancer cells using RNA aptamers. *Nucleic Acids Res.* 40, 6319–6337.

Thömmes, K., Lennartsson, J., Carlberg, M., and Rönstrand, L. (1999). Identification of Tyr-703 and Tyr-936 as the primary association sites for Grb2 and Grb7 in the c-Kit/stem cell factor receptor. *Biochem. J.* 341 (Pt 1), 211–216.

Torihashi, S., Nishi, K., Tokutomi, Y., Nishi, T., Ward, S., and Sanders, K.M. (1999). Blockade of kit signaling induces transdifferentiation of interstitial cells of cajal to a smooth muscle phenotype. *Gastroenterology* 117, 140–148.

Tsao, A.S., Kantarjian, H., Thomas, D., Giles, F., Cortes, J., Garcia-Manero, G., Huh, Y., Yang, Y., Shen, Y., Albitar, M., et al. (2004). C-kit receptor expression in acute leukemias—association with patient and disease characteristics and with outcome. *Leuk. Res.* 28, 373–378.

Tsuda, H., Tani, Y., Weisenberger, J., Kitada, S., Hasegawa, T., Murata, T., Tamai, S., Hirohashi, S., Matsubara, O., and Natori, T. (2005). Frequent KIT and epidermal growth

factor receptor overexpressions in undifferentiated-type breast carcinomas with “stem-cell-like” features. *Cancer Sci.* *96*, 333–339.

Tsujimura, T., Morimoto, M., Hashimoto, K., Moriyama, Y., Kitayama, H., Matsuzawa, Y., Kitamura, Y., and Kanakura, Y. (1996). Constitutive activation of c-kit in FMA3 murine mastocytoma cells caused by deletion of seven amino acids at the juxtamembrane domain. *Blood* *87*, 273–283.

Tsujimura, T., Hashimoto, K., Kitayama, H., Ikeda, H., Sugahara, H., Matsumura, I., Kaisho, T., Terada, N., Kitamura, Y., and Kanakura, Y. (1999). Activating Mutation in the Catalytic Domain of c-kit Elicits Hematopoietic Transformation by Receptor Self-Association Not at the Ligand-Induced Dimerization Site. *Blood* *93*, 1319–1329.

Tuveson, D.A., Willis, N.A., Jacks, T., Griffin, J.D., Singer, S., Fletcher, C.D., Fletcher, J.A., and Demetri, G.D. (2001). STI571 inactivation of the gastrointestinal stromal tumor c-KIT oncoprotein: biological and clinical implications. *Oncogene* *20*, 5054–5058.

Ustun, C., DeRemer, D.L., and Akin, C. (2011). Tyrosine kinase inhibitors in the treatment of systemic mastocytosis. *Leuk. Res.* *35*, 1143–1152.

Valent, P., Horny, H.-P., Escribano, L., Longley, B.J., Li, C.Y., Schwartz, L.B., Marone, G., Nuñez, R., Akin, C., Sotlar, K., et al. (2001). Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. *Leuk. Res.* *25*, 603–625.

Valent, P., Akin, C., Sperr, W.R., Escribano, L., Arock, M., Horny, H.-P., Bennett, J.M., and Metcalfe, D.D. (2003). Aggressive systemic mastocytosis and related mast cell disorders: current treatment options and proposed response criteria. *Leuk. Res.* *27*, 635–641.

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.

Verstovsek, S. (2013). Advanced systemic mastocytosis: the impact of KIT mutations in diagnosis, treatment, and progression. *Eur. J. Haematol.* *90*, 89–98.

Verstovsek, S., Tefferi, A., Cortes, J., O’Brien, S., Garcia-Manero, G., Pardanani, A., Akin, C., Faderl, S., Manshour, T., Thomas, D., et al. (2008). Phase II Study of Dasatinib in Philadelphia Chromosome–Negative Acute and Chronic Myeloid Diseases, Including Systemic Mastocytosis. *Clin. Cancer Res.* *14*, 3906–3915.

Vincenzi, B., Schiavon, G., Silletta, M., Santini, D., and Tonini, G. (2008). The biological properties of cetuximab. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *68*, 93–106.

Vinckier, N.K., Chworos, A., and Parsons, S.M. (2011). Improved isolation of proteins tagged with glutathione S-transferase. *Protein Expr. Purif.* *75*, 161–164.

Voehringer, D. (2013). Protective and pathological roles of mast cells and basophils. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 362–375.

Wang, W.-L., Conley, A., Reynoso, D., Nolden, L., Lazar, A.J., George, S., and Trent, J.C. (2011a). Mechanisms of resistance to imatinib and sunitinib in gastrointestinal stromal tumor. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *67 Suppl 1*, S15–24.

Wang, Y.-Y., Zhao, L.-J., Wu, C.-F., Liu, P., Shi, L., Liang, Y., Xiong, S.-M., Mi, J.-Q., Chen, Z., Ren, R., et al. (2011b). C-KIT mutation cooperates with full-length AML1-ETO to induce acute myeloid leukemia in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 2450–2455.

Ward, S.M., and Sanders, K.M. (2001). I. Functional development and plasticity of interstitial cells of Cajal networks. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* *281*, G602–G611.

Wehrle-Haller, B. (2003). The Role of Kit-Ligand in Melanocyte Development and Epidermal Homeostasis. *Pigment Cell Res.* *16*, 287–296.

Wei, Q., Kullberg, E.B., and Gedda, L. (2003). Trastuzumab-conjugated boron-containing liposomes for tumor-cell targeting; development and cellular studies. *Int. J. Oncol.* *23*, 1159–1165.

Weickhardt, A.J., Price, T.J., Chong, G., Gebiski, V., Pavlakakis, N., Johns, T.G., Azad, A., Skrinos, E., Fluck, K., Dobrovic, A., et al. (2012). Dual targeting of the epidermal growth factor receptor using the combination of cetuximab and erlotinib: preclinical evaluation and results of the phase II DUX study in chemotherapy-refractory, advanced colorectal cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *30*, 1505–1512.

Weiler, S.R., Mou, S., DeBerry, C.S., Keller, J.R., Ruscetti, F.W., Ferris, D.K., Longo, D.L., and Linnekin, D. (1996). JAK2 is associated with the c-kit proto-oncogene product and is phosphorylated in response to stem cell factor. *Blood* *87*, 3688–3693.

Wheler, J.J., Tsimberidou, A.M., Falchook, G.S., Zinner, R.G., Hong, D.S., Fok, J.Y., Fu, S., Piha-Paul, S.A., Naing, A., and Kurzrock, R. (2013). Combining erlotinib and cetuximab is associated with activity in patients with non-small cell lung cancer (including squamous cell carcinomas) and wild-type EGFR or resistant mutations. *Mol. Cancer Ther.* *12*, 2167–2175.

Wilhelm, S.M., Dumas, J., Adnane, L., Lynch, M., Carter, C.A., Schütz, G., Thierauch, K.-H., and Zopf, D. (2011). Regorafenib (BAY 73-4506): A new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity. *Int. J. Cancer* *129*, 245–255.

Wollberg, P., Lennartsson, J., Gottfridsson, E., Yoshimura, A., and Rnnstrand, L. (2003). The adapter protein APS associates with the multifunctional docking sites Tyr-568 and Tyr-936 in c-Kit. *Biochem. J.* *370*, 1033.

Xiang, Z., Kreisel, F., Cain, J., Colson, A., and Tomasson, M.H. (2007). Neoplasia Driven by Mutant c-KIT Is Mediated by Intracellular, Not Plasma Membrane, Receptor Signaling. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 267–282.

Xue, X., Pech, N.K., Shelley, W.C., Srour, E.F., Yoder, M.C., and Dinauer, M.C. (2010). Antibody targeting KIT as pretransplantation conditioning in immunocompetent mice. *Blood* *116*, 5419–5422.

- Yang, Y., Létard, 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.
- Yarden, Y., Kuang, W.J., Yang-Feng, T., Coussens, L., Munemitsu, S., Dull, T.J., Chen, E., Schlessinger, J., Francke, U., and Ullrich, A. (1987). Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J.* *6*, 3341.
- Yoshida, C., Tsuji, A.B., Sudo, H., Sugyo, A., Kikuchi, T., Koizumi, M., Arano, Y., and Saga, T. (2013). Therapeutic efficacy of c-kit-targeted radioimmunotherapy using ⁹⁰Y-labeled anti-c-kit antibodies in a mouse model of small cell lung cancer. *PLoS One* *8*, e59248.
- Yoshida, H., Takakura, N., Kataoka, H., Kunisada, T., Okamura, H., and Nishikawa, S.I. (1997). Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Dev. Biol.* *184*, 122–137.
- Yoshida, H., Kunisada, T., Grimm, T., Nishimura, E.K., Nishioka, E., and Nishikawa, S.-I. (2001). Review: Melanocyte Migration and Survival Controlled by SCF/c-kit Expression. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* *6*, 1–5.
- Yu, M., Luo, J., Yang, W., Wang, Y., Mizuki, M., Kanakura, Y., Besmer, P., Neel, B.G., and Gu, H. (2006a). The Scaffolding Adapter Gab2, via Shp-2, Regulates Kit-evoked Mast Cell Proliferation by Activating the Rac/JNK Pathway. *J. Biol. Chem.* *281*, 28615–28626.
- Yu, W., Rao, Q., Wang, M., Tian, Z., Lin, D., Liu, X., and Wang, J. (2006b). The Hsp90 inhibitor 17-allylamide-17-demethoxygeldanamycin induces apoptosis and differentiation of Kasumi-1 harboring the Asn822Lys KIT mutation and down-regulates KIT protein level. *Leuk. Res.* *30*, 575–582.
- Yuan, Q., Austen, K.F., Friend, D.S., Heidtman, M., and Boyce, J.A. (1997). Human peripheral blood eosinophils express a functional c-kit receptor for stem cell factor that stimulates very late antigen 4 (VLA-4)-mediated cell adhesion to fibronectin and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1). *J. Exp. Med.* *186*, 313–323.
- Yuzawa, S., Opatowsky, Y., Zhang, Z., Mandiyan, V., Lax, I., and Schlessinger, J. (2007). Structural Basis for Activation of the Receptor Tyrosine Kinase KIT by Stem Cell Factor. *Cell* *130*, 323–334.
- Zadjali, F., Pike, A.C.W., Vesterlund, M., Sun, J., Wu, C., Li, S.S.C., Rönstrand, L., Knapp, S., Bullock, A.N., and Flores-Morales, A. (2011). Structural Basis for c-KIT Inhibition by the Suppressor of Cytokine Signaling 6 (SOCS6) Ubiquitin Ligase. *J. Biol. Chem.* *286*, 480–490.
- Zeng, S., Xu, Z., Lipkowitz, S., and Longley, J.B. (2005). Regulation of stem cell factor receptor signaling by Cbl family proteins (Cbl-b/c-Cbl). *Blood* *105*, 226–232.
- Zhang, J., Adrián, F.J., Jahnke, W., Cowan-Jacob, S.W., Li, A.G., Iacob, R.E., Sim, T., Powers, J., Dierks, C., Sun, F., et al. (2010). Targeting Bcr–Abl by combining allosteric with ATP-binding-site inhibitors. *Nature* *463*, 501–506.

Zhang, Z.-H., Rhodes, K.J., Childers, W.E., Argentieri, T.M., and Wang, Q. (2004). Disinactivation of N-type inactivation of voltage-gated K channels by an erbstatin analogue. *J. Biol. Chem.* 279, 29226–29230.

Zhou, C., Wu, Y.-L., Chen, G., Feng, J., Liu, X.-Q., Wang, C., Zhang, S., Wang, J., Zhou, S., Ren, S., et al. (2011). Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol.* 12, 735–742.

Abstract :

When overexpressed or constitutively active by mutation, the tyrosine kinase receptor KIT is involved in some proliferative diseases such as gastro-intestinal stromal tumors (GIST), mastocytosis and some leukemia. Therefore, KIT signaling represents a major target in oncology. Development of a new therapeutic class called tyrosine kinase inhibitors is in full expansion. A major example of TKI is imatinib which targets KIT and is efficient in the majority of GIST cases. However, TKI treatment is often unpaired by primary or acquired resistance due to secondary mutations. That is why we aim to develop new compounds to target KIT or associated signaling pathways by three strategies.

We have recently shown that oncogenic KIT mutants are intracellularly localized whereas WT KIT is expressed at the cell surface. Kinase activity inhibition leads to membrane mutants' relocalization. Based on this finding, we developed and validated a screening assay measuring mutants' relocalization by cytometry. Chemicals library screening allows us to select new KIT signaling inhibitors active on KIT mutant cell lines.

We used phage display to generate scFv and VHH antibodies which are specific to KIT intracellular domain. When expressed in cytoplasm (they are called intrabodies), their binding on KIT inhibits kinase activity directly or signaling partners' recruitment. Selected intrabodies are specific to various KIT isoforms and their functional characterization is ongoing. KIT inhibitory intrabodies will be used to screen chemical libraries by ELISA for drugs that block intrabodies binding on KIT intracellular domain. We will then select molecules that potentially inhibit KIT oncogenicity.

We developed scFv-Fc antibodies by phage display that recognize KIT extracellular domain. Two selected antibodies inhibit SCF induced signaling. In WT KIT expressing leukemic cell lines, we showed that antibody treatment reduces cell viability. Moreover, they also diminish cell proliferation of 2 imatinib sensitive and resistant mast cell leukemia cell lines (HMC1.1 and HMC1.2, respectively). They represent potential therapeutic tools for treatment of KIT involved diseases and for bypass TKI resistance of some mutants.

Keywords: KIT – tyrosine kinase inhibitor – monoclonal antibody – phage display – intrabodies – gastro-intestinal stromal tumors – mastocytosis – leukemia

Résumé :

Lorsqu'il est surexprimé ou activé constitutivement par mutation, le récepteur tyrosine kinase KIT est impliqué dans le développement de pathologies prolifératives comme les mastocytoses, les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) et certaines leucémies. La voie de signalisation KIT représente donc une cible thérapeutique majeure en oncologie. Le développement d'une nouvelle classe de molécules pharmacologiques appelées inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) est en plein essor. Un exemple majeur d'ITK est l'imatinib qui cible, entre autre, KIT et est efficace dans la plupart des GIST. Cependant, le traitement aux ITK est souvent confronté au phénomène de résistance primaire ou acquise par mutation secondaire. C'est pourquoi nous cherchons à développer de nouveaux composés ciblant KIT ou les voies de transductions activées par ses formes oncogéniques, et ce par 3 approches.

Nous avons récemment montré que les mutants oncogéniques de KIT ont une localisation intracellulaire alors que KIT sauvage est exprimé à la membrane. L'inhibition de l'activité kinase des mutants restaure une localisation normale. A partir de cette observation, nous avons créé et validé un test de criblage par cytométrie mesurant la relocalisation de KIT muté à la surface cellulaire. Le criblage d'une chimiothèque nous a permis de sélectionner de nouveaux inhibiteurs de la signalisation KIT actifs sur des lignées cellulaires mutées pour KIT.

Nous avons utilisé la technique du phage display pour sélectionner des anticorps au format scFv et VHH spécifiques de la partie intracellulaire de KIT mutant. Lors de leur expression dans le cytosol (on parle alors d'intrabodies), leur fixation au niveau de KIT inhibe soit directement l'activité kinase, soit le recrutement de partenaires de signalisation. Nous avons obtenu des intrabodies de différentes spécificités vis-à-vis des formes de KIT dont la caractérisation fonctionnelle est en cours. Les intrabodies inhibiteurs seront utilisés pour cribler des chimiothèques par ELISA. Les molécules chimiques recherchées empêcheront la fixation des intrabodies sur la région intracellulaire de KIT. On sélectionnera donc des molécules inhibant potentiellement l'oncogénicité de KIT.

Nous avons développé des anticorps au format scFv-Fc par phage display qui reconnaissent le domaine extracellulaire de KIT. Deux des anticorps sélectionnés inhibent donc la signalisation induite par le SCF. Dans des lignées de leucémie exprimant KIT WT, nous avons montré que l'utilisation de ces anticorps entraîne une diminution de la viabilité cellulaire. De plus, ils diminuent également la prolifération de lignées de leucémie à mastocytes sensibles et résistantes à l'imatinib (HMC11 et HMC12, respectivement). Ils représentent donc des outils thérapeutiques potentiels pour le traitement des pathologies impliquant KIT ainsi que pour contourner la résistance aux ITK de certains mutants.

Mots-clés : KIT – inhibiteur de tyrosine kinase – anticorps monoclonal – phage display – intrabodies – tumeurs stromales gastro-intestinales – mastocytose – leucémie