



HAL
open science

Rôle de la kinésine-1 dans le sécrétions régulées des cellules immunitaires

Isabelle Munoz

► **To cite this version:**

Isabelle Munoz. Rôle de la kinésine-1 dans le sécrétions régulées des cellules immunitaires. Immunologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2017. Français. NNT : 2017USPCB014 . tel-02110828

HAL Id: tel-02110828

<https://theses.hal.science/tel-02110828>

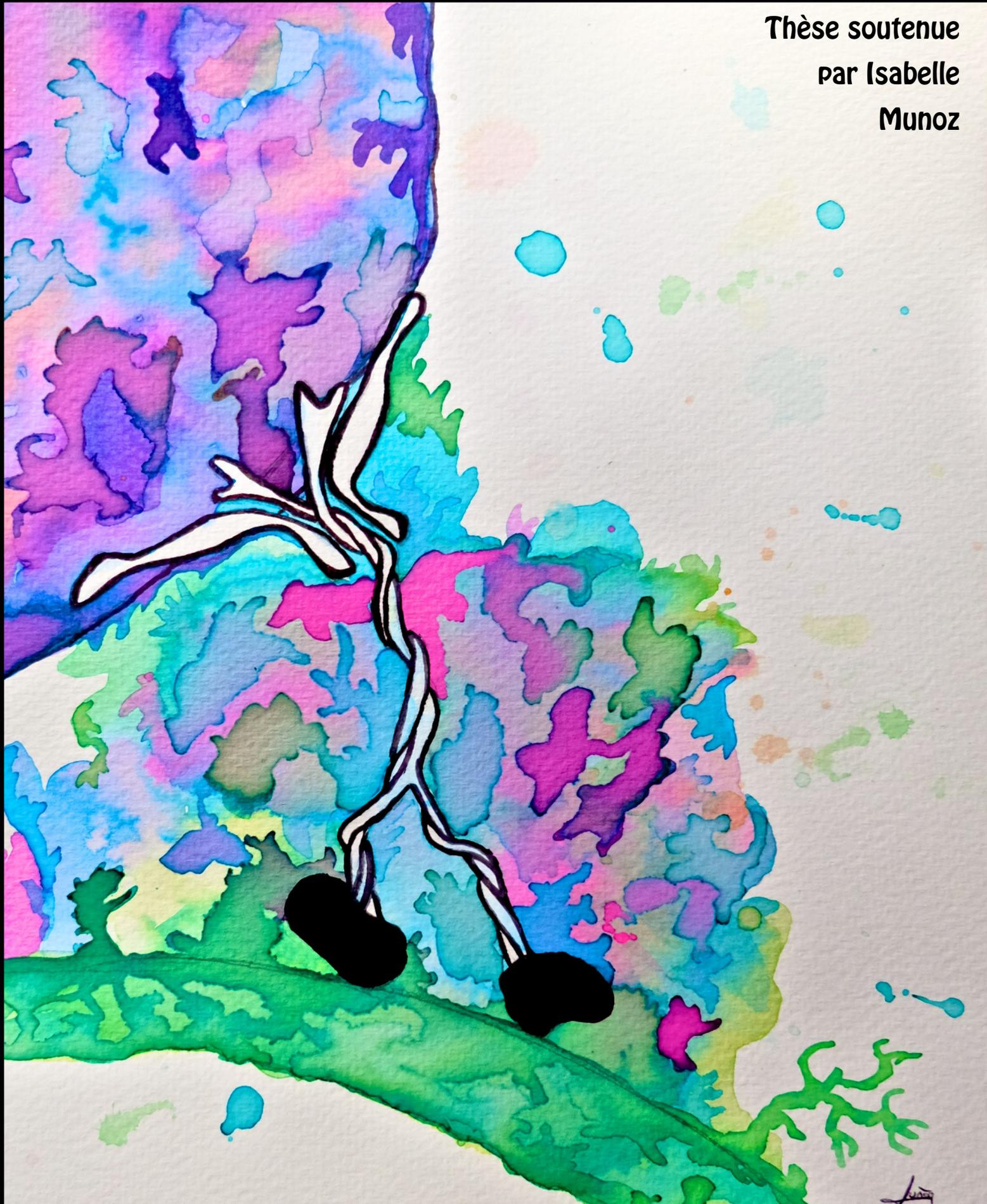
Submitted on 25 Apr 2019

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.

Rôle de la kinésine-1 dans les sécrétions régulées des cellules immunitaires

Thèse soutenue
par Isabelle
Munoz



Entre
Ce que je pense
Ce que je veux dire
Ce que je crois dire
Ce que je dis
Ce que vous avez envie d'entendre
Ce que vous croyez entendre
Ce que vous entendez
Ce que vous avez envie de comprendre
Ce que vous croyez comprendre
Ce que vous comprenez
Il y a dix possibilités qu'on ait des difficultés à communiquer.
Mais essayons quand même!
Bernard Weber



Thèse

Soumise en vue de l'obtention d'un doctorat en Immunologie
Délivré par l'Université Paris Descartes



Présentée et soutenue par:
Munoz Isabelle

le 06/09/2017



Rôle de la kinesine-1 dans les sécrétions régulées des cellules immunitaires

Ecole Doctorale: BioSPC - Spécialité Immunologie
Unité de recherche: U1163 INSERM
Institut Imagine / Equipe de Geneviève de Saint-Basile
Directrice de thèse: Gaël Ménasché

Jury:

Andres Alcover - Rapporteur
Michel Arock - Rapporteur
Olivier Hermine - Président
Ulrich Blank - Examineur
Cedric Delevoye - Examineur
Christian Poüs - Examineur
Joana VITTE - Examinatrice



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier tous les membres du jury qui ont volontiers accepté de m'accorder un peu de leur précieux temps afin d'évaluer mon travail de thèse.

Un grand merci à toi Ulrich et à toute ton équipe, en particulier Lucas, Julien et Iris avec qui nous avons pu écrire cette belle histoire mastocyte. Je vous remercie tous pour avoir accepté de nous transmettre sans hésitation votre expertise du monde mastocyte, mais aussi pour tous les sauvetages dont nous avons eu besoin après nos mésaventures avec les cultures des BMMC.

Je tiens maintenant à remercier tous les membres de l'équipe GSB. Commençons par le commencement, mon entrée dans le monde de la recherche s'est faite avec toi Gaël et toi Geneviève. Jusque là je ne savais pas encore manier la pipette et je n'aspirai qu'à devenir enseignante. Mais ce stage de licence a tout changé pour moi car je rejoignais une équipe en or. Je tiens tous à vous remercier, cette thèse est aussi finalement la vôtre car sans tout ce petit monde rien ne serait possible.

Merci à toi Geneviève pour ton accueil au sein de cette équipe et pour tous les encouragements que j'ai pu recevoir de ta part au cours de nos nombreuses réunions d'équipe. Merci à toi Gaël pour m'avoir fait confiance alors que je n'étais qu'une simple étudiante en licence, de m'avoir confié des projets toujours passionnants et notamment de m'avoir fait découvrir le merveilleux monde de la microscopie qui guidera maintenant mes choix de carrière. Cette thèse est passée par de nombreux rebondissements entre le phénotype des souris qui avait changé après le changement d'animalerie, les parties lymphocytes et dendritiques du projet qui ne donnaient pas les résultats escomptés. Mais malgré cela tu as toujours su très vite rebondir et me rediriger vers d'autres projets qui finalement nous ont permis de construire cette jolie histoire mastocyte. Je te remercie pour cet encadrement scientifique plus qu'efficace et pour m'avoir toujours dirigé vers les bonnes personnes. Un énorme merci à toi Mathieu qui m'a encadré alors que je faisais mes premiers pas dans un laboratoire. C'est avec toi que j'ai tout appris et découvert, merci pour ta patience et ta pédagogie tu es un excellent encadrant! C'est grâce à toi que j'ai maintenant pu prendre mon envol et je t'en serai éternellement reconnaissante. Je voudrai aussi remercier les autres membres de l'équipe, Fernando, Sophia, Marie-Thérèse, Alexandrine, Marine car vous n'avez jamais hésité un seul instant à partager vos connaissances avec moi et à m'encadrer quand il le fallait. Je vous remercie pour votre patience et ce bel esprit d'équipe!

Enfin je voudrai remercier Claire avec qui j'ai pu partager pleinement cette belle aventure de la thèse car nous avons tout partagé ensemble. Que ce soit le stage de M2 avec les galères BMDC, le concours de l'école doctorale où l'on s'est soutenu malgré le fait que nous étions en compétition, les hauts et les bas durant ces 4 années, mais aussi les pauses déjeuners au soleil, les soirées, les vacances au ski et tellement d'autres choses!! Mon seul regret sera de partir avant toi mais je ne serai pas loin pour te soutenir dans cette dernière ligne droite comme tu as pu le faire pour moi.

Je tiens aussi à remercier tout particulièrement les membres de l'association YR21 avec qui nous avons passé de sacrés moments! Hicham, Chiara, Rémy, Tommaso, Diana, Clarisse, Julien bref tous ces chercheurs en herbe qui font en sorte qu'il fait bon vivre à Imagine! Merci à toi Rémy de m'avoir mis à la direction des BeerClubs de l'institut car même si au début je pensais que tu m'avais piégé cela m'a permis de rencontrer et de tisser des liens d'amitié avec de nombreuses personnes présentes au sein de l'institut.

Bien sûr la thèse ne s'arrête pas aux portes de notre institut je tiens donc tout d'abord à remercier toute l'équipe pédagogique de la PACES de la faculté de pharmacie de Paris-Descartes qui m'a permis de faire mes premiers pas en tant qu'enseignante. Dès les premières minutes passées devant mes tous premiers étudiants je savais que l'enseignement était fait pour moi. Je me suis éclatée durant ces deux années à essayer de transmettre cette passion pour la biologie. Et même s'il fallait venir le weekend ou rester les soirs pour rattraper ces heures de pailasse perdues je ne regrette pas toutes ces heures passées en votre compagnie. Un grand merci à vous tous j'ai énormément appris à vos côtés!

Pour finir je remercierai bien entendu ma famille, mes amis et tout ce petit monde qui fait que la vie est si belle à Paris <3.

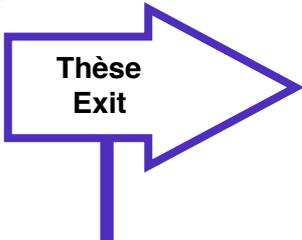


Table des matières

Introduction p13

Chapitre I: Trafic vésiculaire et sécrétion régulée p14

A- Les organites apparentés aux lysosomes: Une machinerie de transport et de sécrétion apparentée p14

- 1- Introduction: les LRO **p14**
- 2- Le transport des LRO en direction de la membrane plasmique: **p15**
 - a) Le réseau de microtubules et d'actine: **p15**
 - b) Les moteurs moléculaires liés aux microtubules: **p18**
 - c) Les moteurs moléculaires liés au réseau d'actine: **p21**
- 3- Les mécanismes d'arrimage, de fusion et de sécrétion des LRO: **p21**
 - a) Les protéines SNARE: la fusion des membranes **p22**
 - b) Les autres protéines impliquées dans la formation du complexe SNARE: **p23**
 - c) L'exemple de l'exocytose de la vésicule synaptique: **p23**
 - d) Les divers complexes SNARE: **p26**
- 4- L'implication des protéines Rab dans la régulation du trafic vésiculaire: **p27**
 - a) Généralités sur les Rab: **p27**
 - b) Les Rab impliquées dans le transport terminal et l'exocytose des LRO: **p29**
 - c) Rab27 un acteur commun dans la sécrétion des LRO: **p30**

B- Les organites apparentés aux lysosomes: Des voies de biogenèses variées p32

- 1- La biogenèse des granules lytiques des LTc: **p32**
- 2- La biogenèse des granules de sécrétion des mastocytes: **p33**

Chapitre II: Le mécanisme de sécrétion des LRO dans les LTc p35

A- Le mécanisme de sécrétion des granules lytiques: p35

- 1- Fonctionnalité des granules lytiques: **p35**
 - a) Description des granules lytiques: **p35**
 - b) Les agents lytiques: **p36**
- 2- La mise en place de la synapse immunologique: **p42**
 - a) La signalisation induite par la reconnaissance de l'antigène par le TCR: **p42**
 - b) Les différentes zones de la synapse immunologique: **p43**
 - c) Remaniement du réseau d'actine et de microtubules: **p44**
 - d) Le cSMAC: **p48**
 - e) Le pSMAC: **p52**
 - f) Le domaine de sécrétion des granules lytiques **p54**

B- Le syndrome hémophagocytaire: p56

- 1- Les différents syndromes hémophagocytaires découverts: **p55**
- 2- Le mécanisme de sécrétion des granules lytiques: **p57**
 - a) La formation des granules lytiques: implication de Lyst et Munc13-4 **p57**
 - b) Le transport terminal et l'arrimage des granules: Rab27a et Munc13-4? **p58**
 - c) La fusion des granules: Munc13-4, Munc18-2, STX11 **p59**
- 3- Un nouvel acteur dans la sécrétion des granules lytiques: la kinesine-1 **p61**
 - a) Structure moléculaire de la kinesine-1: **p61**
 - b) Implication de la kinesine-1 dans le transport terminal des granules lytiques: **p62**
 - c) Autres fonctions assurées par la kinesine-1: **p62**

Chapitre III: Le mécanisme de sécrétion des LRO dans les mastocytes p65

A- Généralités sur les mastocytes murins: p65

- 1- La différenciation des mastocytes: **p65**
 - a) Les mastocytes dérivent de progéniteurs hématopoïétiques : **p65**
 - b) Plusieurs théories pour expliquer l'origine des mastocytes: **p66**
 - c) Facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des mastocytes: **p66**
- 2- La migration des mastocytes: **p67**
- 3- Les médiateurs de l'inflammation: **p69**
 - a) Les médiateurs préformés: **p69**
 - b) Les médiateurs lipidiques: **p71**
- 4- La maturation des mastocytes: **p71**
- 5- Les mécanismes d'activation des mastocytes: **p72**
 - a) Les récepteurs impliqués dans l'activation des mastocytes: **p72**
 - b) Les voies de signalisation liées au récepteur FcεRI: **p74**

B- Les mécanismes de sécrétion des mastocytes: p79

- 1- Les mécanismes de sécrétion des granules mastocytaires: **p79**
 - a) Les différentes voies de sécrétion des granules mastocytaires: **p79**

- b) Le mécanisme de fusion des granules mastocytaires: **p81**
- c) L'implication du cytosquelette dans le processus de sécrétion: **p88**
- d) Sécrétion polarisée ou non polarisée?: **p91**
- e) Les voies de signalisations impliquées dans la dégranulation: **p91**
- 2- Le mécanisme de sécrétion des cytokines: **p95**
- a) Les cytokines et chimiokines présentes au sein des mastocytes: **p95**
- b) La machinerie de sécrétion des cytokines et chimiokines: **p96**

Résultats

Chapitre I: Kinésine-1 et modèle murin déficient **p99**

- A- Vérification du défaut d'expression de Kif5b dans la souris cKO^{Kif5b}: p99**
- B- Aspect général de la souris cKO^{Kif5b}: p100**
- C- Intégrité du système immunitaire dans la souris cKO^{Kif5b}: p100**

Chapitre II: Kinésine-1 et lymphocytes T cytotoxiques **p103**

- A- Analyse de la capacité d'activation et de prolifération des LTc cKO^{Kif5b}: p103**
- B- Analyse de la capacité de dégranulation des LTc cKO^{Kif5b} par cytométrie: p104**
- C- Analyse du comportement des granules lytiques par microscopie TIRF: p104**

Chapitre III: Kinésine-1 et sécrétion mastocytaire **p107**

- A- Validation du modèle murin déficient pour la kinesine-1 dans les mastocytes: p107**
 - 1- Vérification de l'absence de la chaîne lourde Kif5b et analyse de la chaîne légère KLC : **p107**
 - 2- Numération du nombre de mastocytes dans la souris cKO^{Kif5b}: **p108**
 - 3- Analyse de la capacité de différenciation des mastocytes cKO^{Kif5b}: **p109**
- B- Implication de la kinesine-1 dans le transport et la sécrétion des granules de sécrétion mastocytaires: p109**
 - 1- Analyse de la capacité de sécrétion des mastocytes: Test β -Hexosaminidase **p110**
 - 2- Analyse du recrutement des granules à la membrane: Microscopie confocale **p110**
 - 3- Analyse du comportement des granules mastocytaires: Microscopie TIRF **p111**
 - 4- Analyse de la capacité de sécrétion des mastocytes *in vivo* : Choc anaphylactique **p112**
- C- Implication de la kinesine-1 dans les voies de sécrétion des cytokines et d'activation via le récepteur Fc ϵ RI: p113**
 - 1- Analyse de la capacité de sécrétion des cytokines: **p113**
 - 2- Analyse de la signalisation induite par le récepteur Fc ϵ RI: **p114**
- D- Caractérisation du complexe moléculaire impliqué dans la sécrétion des granules de sécrétion: p115**
 - 1- Identification des protéines impliquées dans le complexe Rab27/kinesine-1: **p115**
 - 2- Expérience de dominant négatif et de complémentation: **p116**
 - 3- Etude de l'implication de Slp3: **p118**
 - 4- Etude de la localisation de Rab27b, Slp3 et kinesine-1 dans les mastocytes: **p119**
 - 5- Etude des interactions entre Rab27b, kinesine-1 et Slp3: **p122**
 - 6- Etude de la voie de signalisation impliquée dans la formation du complexe Rab27/Slp3/kinesine-1: **p124**
 - 7- Etude de la nécessité du réseau de microtubules dans la formation du complexe: **p126**
 - 8- Conclusion: modèle proposé **p127**

Discussion **p128**

Lymphocytes T cytotoxiques **p128**

- 1- Compensation par d'autres kinesines: p128**
- 2- Problèmes expérimentaux: stimulation et durée p130**
- 3- Infection par le LCMV p132**

Mastocytes **p135**

- 1- Comparaison des résultats entre les LTc et les mastocytes p135**
- 2- Défaut non total : les autres mécanismes de dégranulation p135**
- 3- La régulation de l'activité de la kinesine-1 p136**
- 4- Spectrométrie de masse: Screen de nouveaux acteurs impliqués dans la sécrétion des cytokines et granules de sécrétion p138**
- 5- Implication du complexe Rab27/Slp4/kinesine-1 dans la sécrétion des plaquettes p139**

Matériel et méthodes **p140**

Bibliographie **p148**

Annexe **p173**

Liste des figures

- Figure 1:** Structure et dynamique des microtubules (Akhmanova 2008)
- Figure 2:** Dynamique d'assemblage du réseau d'actine (Adapté de De la cruz 2001)
- Figure 3:** Schéma récapitulatif de la structure et du mécanisme qui conduit au mouvement de la dynéine.
- Figure 4:** Structure des différentes familles de kinesine (Verhey 2009)
- Figure 5:** Structure moléculaire de la myosine conventionnelle (Myosine II)
- Figure 6:** Formation d'un complexe trans-SNARE
- Figure 7:** Schéma du complexe SNARE formé lors de la sécrétion des vésicules synaptiques et des molécules associées
- Figure 8:** Schéma du complexe protéique qui médie le recrutement des canaux calciques et des vésicules synaptiques (Sudhof 2013)
- Figure 9:** Exemple de différentes associations de molécules SNARE retrouvées au sein d'une cellule de mammifère (Jahn 2006)
- Figure 10:** Les différents rôles assurés par les Rab-GTPases (Zhen 2015)
- Figure 11:** Cycle d'activation des Rab-GTPases (Stenmark 2009)
- Figure 12:** Distribution des différentes GTPases Rab dans la cellule eucaryote (Zhen 2015)
- Figure 13:** Résumé des différents LRO sécrétés par Rab27
- Figure 14:** Résumé du mécanisme de biogenèse des granules lytiques des LTc
- Figure 15:** Cryosection d'un granule de LTc
- Figure 16:** Structure moléculaire de la perforine
- Figure 17:** **A)** Podack 1985: Microscopie électronique de membranes d'érythrocytes lysés par le complexe perforine. **B)** Keefe 2005: Schéma récapitulatif de la théorie du gigantesme
- Figure 18:** Schéma récapitulatif du mode d'action du granzyme B
- Figure 19:** Schéma récapitulatif de la signalisation induite par le TCR
- Figure 20:** Microscopie d'une synapse
- Figure 21:** Schéma récapitulatif de l'organisation concentrique de la synapse immunologique
- Figure 22:** Immunofluorescence d'un LTc et de sa cible montrant la polarisation du MTOC en direction de la zone de contact (Geiger 1982)
- Figure 23:** Imagerie montrant la migration du centrosome (en rouge) suite à la déplétion de l'actine (en vert) du centre de la synapse (Ritter 2015)
- Figure 24:** Imagerie montrant la translocation des microclusters de TCR le long des microtubules (HashimotoTane 2011)
- Figure 25:** Schéma récapitulatif de la machinerie de transport du TCR
- Figure 26:** Schéma récapitulatif des différents syndromes hémophagocytaires découverts
- Figure 27:** Microscopie électronique montrant un arrimage normal des granules lytiques (LG) dans les CTL déficients en Munc18-2 (Gauche) et un défaut d'arrimage des granules lytiques dans les CTL déficients en Rab27a (Droite) (Feldmann 2003)
- Figure 28:** Schéma récapitulatif du mécanisme d'exocytose des granules lytiques
- Figure 29:** Schéma de la structure de la kinésine-1
- Figure 30:** **A)** Test de dégranulation (Shift de l'expression de CD107) dans des CTL transfectés avec la Kinesine-1 contrôle ou son dominant négatif (Kurowska 2012). **B)** Schéma récapitulatif du mécanisme de transport des granules lytiques à la synapse.
- Figure 31:** Schéma récapitulatif des différentes hypothèses concernant la voie de différenciation des mastocytes
- Figure 32:** Les différents récepteurs Fc aux IgE et IgG exprimés chez la souris (Johnson 2012)
- Figure 33:** Structure du récepteur FcεRI (Kraft 2007)
- Figure 34:** Schéma récapitulatif des différentes voies de signalisation induites par l'activation du récepteur FcεRI.
- Figure 35:** Etude morphologique de mastocytes par microscopie électronique.
- Figure 36:** Schéma récapitulatif des différentes voies de sécrétions observées chez le mastocyte
- Figure 37:** Schéma récapitulatif de la machinerie d'exocytose des granules mastocytaires
- Figure 38:** Organisation du réseau de microtubule à l'état basal (gauche) ou après activation du mastocyte (droite) (Hajkova 2011)
- Figure 39:** Schéma récapitulatif de l'implication du cytosquelette dans la machinerie d'exocytose des granules mastocytaires
- Figure 40:** Interaction entre un mastocyte et une cellule dendritique mettant en évidence la synapse mastocytaire (IgE anti-DNP en vert) (Caroll-Portillo 2012b)
- Figure 41:** Schéma récapitulatif des différentes voies impliquées dans le transport et la fusion des granules mastocytaires
- Figure 42:** Génération du modèle murin déficient pour Kif5b
- Figure 43:** Analyse par qRT-PCR de l'expression de l'ARNm de *Kif5a*, *Kif5b* et *Kif5c* au niveau des cellules extraites du cerveau dans les souris contrôles et cKO^{Kif5b}.
- Figure 44:** Analyse par qRT-PCR de l'expression de l'ARNm de *Kif5a*, *Kif5b* et *Kif5c* au niveau des des LTc, mastocytes et megakaryocytes (A) dans les souris contrôles et cKO^{Kif5b}. Analyse de l'expression de la protéine Kif5b par Western-Blot dans les souris contrôles et cKO^{Kif5b} (B).
- Figure 45:** Aspect général de la souris cKO^{Kif5b} (A) et mesure de son poids (B). Analyse de la structure des organes de la souris contrôle et cKO^{Kif5b} (C).
- Figure 46:** Analyse par cytométrie en flux du développement des LT au niveau du thymus (A) et des LB au niveau de la MO (B) dans les souris contrôles et cKO^{Kif5b}.
- Figure 47:** Analyse par cytométrie en flux des différentes populations immunitaires dans la souris contrôle et cKO^{Kif5b}.
- Figure 48:** LTc: Test de flux calcique (A) Test d'activation par cytométrie en flux (B) Test de prolifération (C)

Figure 49: Test de dégranulation des LTc issus de souris contrôles, Rab27a^{-/-} ou cKO^{Kif5b}.

Figure 50: Analyse par microscopie TIRF du comportement des granules lytiques à la synapse immunologique dans les souris contrôles, cKO^{Kif5b} et Rab27a^{-/-}.

Figure 51: Quantification relative de l'expression de KLC1, KLC2 et KLC3 par qRT-PCR dans des BMMC contrôles et cKO^{Kif5b}.

Figure 52: Quantification du nombre de mastocytes dans les souris contrôles et cKO^{Kif5b}.

Figure 53: Analyse de la capacité de différenciation des BMMC contrôles et cKO^{Kif5b}.

Figure 54: Analyse du relargage de la β -hexosaminidase dans les BMMC contrôles et cKO^{Kif5b}.

Figure 55: Analyse du recrutement des granules mastocytaires dans les BMMC contrôles et cKO^{Kif5b}.

Figure 56: Analyse du comportement des granules mastocytaires dans les BMMC contrôles et cKO^{Kif5b}.

Figure 57: Analyse de la dégranulation mastocytaire *in vivo* dans les souris contrôles et cKO^{Kif5b}.

Figure 58: Analyse de la sécrétion des cytokines mastocytaires dans les BMMC contrôles et cKO^{Kif5b}.

Figure 59: Analyse des capacités d'activation des BMMC contrôles et cKO^{Kif5b}.

Figure 60: Exemple de molécules adaptatrices liant Rab27 à la kinesine-1 dans les LTc et neurones.

Figure 61: Analyse de l'expression des potentielles molécules adaptatrices.

Figure 62: Analyse de la dégranulation des BMMC contrôles et cKO^{Kif5b} par cytométrie en flux.

Figure 63: Expérience de dominant négatif et de complémentation

Figure 64: Test siRNA anti-Slp3

Figure 65: Test siRNA anti-Slp3 par microscopie confocale

Figure 66: Analyse de la localisation de Rab27 et Slp3 par microscopie confocale.

Figure 67: Analyse de la localisation de la kinesine-1 et étude de l'intégrité du réseau de microtubules.

Figure 68: Expérience de co-immunoprécipitation dans les 293-T HEK.

Figure 69: Expérience de co-immunoprécipitation (Rab27b) en endogène.

Figure 70: Régulation de l'activité de la kinésine-1 par le signal d'activation

Figure 71: Voies de signalisations impliquées dans la translocation et dans la fusion des granules de sécrétion

Figure 72: Analyse des voies de signalisation impliquées dans la formation du complexe Rab27/Slp3/kinesine-1.

Figure 73: Analyse de l'implication du réseau de microtubules dans la formation du complexe Rab27/Slp3/kinesine-1.

Figure 74: Modèle proposé

Figure 75: Expression des différentes kinésines au sein des LTc (Graphe réalisé à partir de l'étude de Hukelmann 2016)

Figure 76: Analyse des paramètres cliniques et biochimiques des souris contrôles et cKO^{Kif5b} après une infection par le LCMV.

Figure 77: Analyse de la quantité de virus et de la sécrétion d'IFN- γ dans les souris contrôles et cKO^{Kif5b} après une infection par le LCMV.

Figure 78: Analyse par cytométrie en flux des différentes populations immunitaires dans la souris contrôle et cKO^{Kif5b} au niveau du foie après une infection par le LCMV (J19).

Figure 79: Expression des différentes kinésines au sein des LTc (Graphe réalisé à partir de l'étude de Hukelmann 2016) et des mastocytes (Spectrométrie de masse).

Figure 80: Conformation inactive et active de la kinesine-1 (Cai 2007)

Figure 81: Migration et coloration au bleu de colloïdale des lysats de BMMC contrôles et cKO^{Kif5b} co-immunoprécipités avec un anticorps anti-Kif5b.

Figure 82: Schéma récapitulatif des différentes étapes du screening.

Liste des abréviations et acronymes:

+TIPs: plus-end tracking proteins

ABP: Actin Binding Proteins

accessory protein receptors

ADAP: adhesion and degranulation promoting adaptor protein

AMPK: AMP-activated protein kinase

AP-1: activator protein 1

APAF1: apoptotic peptidase activating factor 1

APE1: the base excision repair enzyme apurinic/aprimidinic endonuclease 1

ARF1: ADP-ribosylation factor 1

Arl8b: ADP-ribosylation factor-like protein 8B

Arp2/3: Actin related protein 2/3

ATP: Adénosine triphosphate

BAK: Bcl2 antagonis/killer

BAX: Bcl2 associated X protein

Bid: BH3-interacting domain death agonist

BLT1: Leukotriene B4 receptor

BMCP: cellules progénitrices des mastocytes et basophiles

BMMC: Bone Marrow derive mast cells

BTK: Burton's tyrosin kinase

Kit: KIT Proto-Oncogene Receptor Tyrosine Kinase

C/EBP α : CCAAT/enhancer-binding protein alpha

CAD: caspase-activated DNase

CD2AP: CD2-associated protein

Cdc42: Cell division cycle 42

Cellules NK: natural killer cell

CLIP: Cytoplasmic linker protein

CMH: complexe majeur d'histocompatibilité

CMP: progéniteurs myéloïdes communs

CPA3: La carboxypeptidase A3

CRAC: Calcium release-activated channels

CRMP2: Collapsin respond mediator protein-2

CRTH2: chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells

cSMAC: central supramoléculaire activation complex

CTMC: connective tissue mast cell

DAG: diacylglycerol

DIA1: Deleted in autism protein A

Dlg1: Discs large scaffold protein 1

DNA-PK: DNA-dependent protein kinase

DOCK5: Deducator of cytokinesis 5

DPPI: Dipeptidyl Peptidase I

dSMAC: distal supramoléculaire activation complex

EB1: End binding 1

EEA1: Early endosome antigen 1

EGF: Epidermal growth factor

EndoG: endonucléase G

Eomes: Eomesodermin

ERC: endocytic recycling compartment

ESCRT: endosomal sorting complex required for transport

Fc γ RI: High-affinity receptor for the Fc region of immunoglobulin E

FEZ1: fasciculation and elongation protein zeta 1

FimH: Type 1 fimbrial adhesin

FMNL-1: Formin-like-1

FYCO1: Five and coiled-coil domain containing 1

Fyn: Fyn proto-oncogene, Src family tyrosine kinase

GABA $_A$: Gamma-aminobutyric acid type A

GABARAP: GABA $_A$ R-associated protein

GADS: Grb2-related adaptor downstream of Shc

GAP: GTPase activation protein

GATA-1: GATA Binding Protein 1

GDF: GDI displacement factor

GDI: GDP dissociation inhibitor

GDP: Guanosine diphosphate

GEF: guanine nucléotide exchange factor

GM: ganglions mésentériques

GMP: progéniteurs de granulocyte/monocyte

GP: ganglions périphériques

GRB2: Growth factor receptor-bound protein 2

GSK3: Glycogen synthase kinase 3

GSK3 β : Glycogen synthase kinase 3 beta

GTP: Guanosine triphosphate

HDAC6: Histone deacetylase 6

Hes-1: Hes family BHLH transcription factor

HLH: Lymphohistiocytose hémophagocytaire

HMG2: DNA-binding protein high-mobility group protein 2

HR: Histamine receptor

HS1: Hematopoietic lineage cell-specific protein-1

HSA: human serum albumin

HSC: cellules souches hématopoïétiques

HtrA: Serine Peptidase 2

ICAM-1: Intercellular adhesion molécule

ICE: Interleukin 1beta-converting enzyme like

IFN- γ : Interferon- γ

IFT: intraflagellar transport

IFT: Intraflagellar transport

INF2: Inverted formin-2

IP3: Inositol trisphosphate

IQGAP1: Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1

ITAMs: immunorecepteur tyrosine-based activation motifs

ITIM: Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif

ITK: interleukine-2 inducible T cell kinase

JIP1: c-Jun N-terminal kinase-interacting protein 1

KHC: Kinesin heavy chain

KLC: Kinesin light chain

KLRK1: Killer cell lectin like receptor K1

LAMP: Lysosome-associated membrane glycoprotein

LAT: Linker for activation of T cell

LBPA: lysobisphosphatidic acid

Lck: Lymphocyte cell-specific protein tyrosine kinase

LCMV: Lymphocytic choriomeningitis

LFA-1: Lymphocyte function-associated antigen 1

LPS: Lipopolysaccharide

LRO: organites apparentés aux lysosome

LTB4: leukotriene B4

LTC: lymphocytes T cytotoxiques

MACF: Microtubule-actin cross-linking factor

MACPF: membrane attack complex and perforin domain

MAdCAM-1: Mucosal addressin cell adhesion molécule-1

MAPK: Mitogen-activated protein kinase
MAPs: microtubule-associated protein
MCp: progéniteurs de mastocyte
MCPT-1: Mast cell specific protease-1
Miro: Mitochondrial Rho GTPase
MITF: melanogenesis transcription factor
MMC: mucosal mast cell
mMCP: mouse mast cell protéase
MPP: progéniteurs hématopoïétiques multipotent
MTOC: centre organisateur des microtubules
Munc: mammalian uncoordinated
MyRIP: Myosin Va-Rab interacting protein
NCK1: NCK adaptor protein 1
Nck2: NCK Adaptor Protein 2
NDUF3: NASH:Ubiquinone oxidoreductase complex assembly factor 3
NF-κB: nuclear factor-kappa B
NFAT: Nuclear factor of activated T-cells
NGF: Nerve growth factor
NM23-H1: NME/NM23 nucleoside diphosphate Kinase 1
NSF: N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein
PAF: Platelet-activating factor
Pak1: Serine/threonine-protein kinase PAK1
PAR-1: Protease-activated receptor-1
PAR-1B: Ser/Thr protein kinase PAR-1B
PAR2: Protease-activated receptor 2
PAR3: par-3 family cell polarity regulator
PARP: Poly ADP-Ribose Polymerase
PDK1: 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1
PGE2: prostaglandine E2
PI3K: phosphoinositide 3-kinase
PIP2: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKCδ: Protein Kinase C δ
PLCγ1: Phospholipase Cγ1
PP2A :Serine/threonine-protein phosphatase 2A
pp32: Acidic nuclear phosphoprotein 32 family member A
PRR: pattern recognition receptors
pSMAC: peripheral supramoléculaire activation complex
Rab: Ras-related protein in brain
RabGEF1: Raf effector protein acting as linker between gamma-adaptin
RabGGT: Rab géranylgéranyl transférase
Rac1: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RBL-2H3: rodent basophilic leukemia cells
REP: Rab escort protein
RGS123: Regulator of G protein signaling
RILP: Rab-interacting lysosomal protein
RIM: Rab3 interacting molecule
S1P: sphingosine-1 phosphate
SET: nucleosome-assembly protein
SH: syndrome hémophagocytaire
SHC: SH2-domain-containing transforming protein C
SHD: SLP homology domain
SHP-1: Protein tyrosine phosphatase SHP-1
shRNA: Short hairpin RNA
SIRT2: NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-2
SKIP: SKI-interacting protein
Slp: Synaptotagmin-like protein
SLP76: SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa
SNAP: Snaposome-associated protein
SNARE: soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor
SOS: Son of sevenless homologue
SPG10: paraplégie spastique 10
SphK: sphingosines kinases
Stat5: Signal transducers and activators of transcription
STIM1: Stromal interaction molecule 1
STOP: Stable Tubule-Only Peptide
STX: Syntaxine
SYK: Spleen tyrosine kinase
t-SNARE: target-membrane SNARE
TCR: T cell receptor
TIRF: Total internal reflexion fluorescence
TLR: Toll-like receptor
TNF-β: Tumor necrosis factor β
TPR: tetratricopeptide repeat
Trk: récepteurs à la neurotrophine
TrkA: Tropomyosin receptor kinase A
TSG101: Tumor susceptibility gene 101
Unc119: Uncoordinated 119
v-SNARE: vesicle-associated-SNARE
VAMP: vesicle associated membrane protéin
VAV1: Vav guanine nucleotide exchange factor 1
VEGF: Vascular endothelial growth factor
VPS4: vacuolar protein sorting 4
Vtib: Vesicle transport through t-SNARE Interaction
WASp: Wiskott-Aldrich syndrome protein
WAVE2: Verprolin-homologue protein-2
WGA: wheat germ agglutinin
XIAP: X chromosome-linked inhibitor of apoptosis
ZAP70: Zeta-chain associated protein kinase
α-SNAP: Soluble NSF attachment Protein
γ-TuRC: γTubulin ring complex

Résumé

La plupart des cellules du système immunitaire sont des cellules sécrétrices capables de libérer des molécules immuno-modulatrices en réponse à des stimuli variés. Cette sécrétion régulée qui permet l'orchestration de la réponse immunitaire et inflammatoire est assurée grâce aux organites apparentés aux lysosomes (LRO) qui vont contenir les molécules nécessaires à la fonctionnalité des cellules immunes. On retrouve par exemple les granules lytiques des lymphocytes T cytotoxiques qui permettent à ces cellules d'effectuer leurs fonctions lytiques ou encore les granules de sécrétion des mastocytes qui contiennent les médiateurs de l'inflammation. Le transport et l'exocytose des LRO impliquent une machinerie commune et conservée. C'est notamment le cas de la petite GTPase Rab27 qui joue un rôle central dans le transport et la sécrétion de ces LRO.

De précédentes études réalisées au sein de notre laboratoire ont pu mettre en évidence l'implication du complexe moléculaire Rab27a/Slp3/kinésine-1 dans le transport terminal des granules lytiques des lymphocytes T cytotoxiques chez l'homme. De plus, un modèle murin dont la chaîne lourde de la kinésine-1 est spécifiquement invalidée dans les cellules immunitaires a pu être généré. L'objectif de ma thèse a été dans un premier temps de caractériser le phénotype de ce modèle murin déficient pour la kinésine-1 puis d'analyser plus précisément l'impact de l'absence de la kinésine-1 sur la fonctionnalité des lymphocytes T cytotoxiques et mastocytes murins.

Dans un premier temps nous avons pu montrer que les souris déficientes pour la kinésine-1 ont un phénotype comparable à celui des souris contrôles à l'état basal. Nous avons ensuite montré que l'absence de la kinésine-1 au sein des lymphocytes T cytotoxiques murins n'induit pas de défauts d'activation et de sécrétion des granules lytiques *in vitro*. Cependant les comportements des granules lytiques à la synapse immunologique semblent anormaux. Néanmoins après un test d'infection au LCMV, qui ne révèle aucune différence entre les souris contrôles et déficientes en kinésine-1, nous en venons à la conclusion que des mécanismes compensateurs pourraient compenser l'absence de la kinésine-1 dans les lymphocytes T cytotoxiques chez la souris. Pour finir des études fonctionnelles réalisées au niveau des mastocytes murins nous ont permis de mettre en évidence l'implication de la kinésine-1 dans le mécanisme de transport des granules de sécrétion. En effet, l'absence de kinésine-1 conduit à des défauts de dégranulation des mastocytes *in vitro* mais aussi *in vivo* (souris moins sensibles aux chocs anaphylactiques). En revanche l'absence de kinésine-1 n'affecte pas les capacités d'activation et de sécrétion des cytokines des mastocytes. Enfin, nous avons pu caractériser le complexe moléculaire Rab27b/Slp3/kinésine-1 impliqué dans le transport des granules mastocytaires et avons pu constater que la formation de ce complexe était dépendante de la voie d'activation liée à la PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase).

Ce travail permet d'apporter de nouveaux éléments quand aux mécanismes gouvernant la sécrétion des granules mastocytaires et ouvre ainsi de nouvelles perspectives thérapeutiques pour le traitement des hypersensibilités de type 1 (dépendantes des IgE).

Mots clés: Trafic vésiculaire, LRO, Mastocytes, Lymphocytes, Kinésine-1, Rab27, Slp3, PI3K

Abstract

Most of immune cells are secretory cells capable of releasing immunomodulatory molecules in response to various stimuli. This regulated secretion, which allows the orchestration of the immune and inflammatory responses, is ensured by the lysosome-related organelles (LRO) which will contain the molecules necessary for the functionality of the immune cells. For example we found the lytic granules of cytotoxic T lymphocytes, which allow their lytic functions or the secretory granules of mast cells which contain the inflammatory mediators. The transport and exocytosis of LRO involves a common and conserved machinery. This is particularly the case of the small GTPase Rab27 which plays a central role in the transport and secretion of these LRO.

Previous studies carried out in our laboratory have highlighted the involvement of the molecular complex Rab27a / Slp3 / kinesin-1 in the terminal transport of lytic granules of cytotoxic T lymphocytes in humans. In addition, a murine model in which the heavy chain of kinesin-1 is specifically invalidated in immune cells has been generated. The objective of my thesis was first to characterize the phenotype of this murine model deficient for kinesin-1, then to analyze more precisely the impact of kinesin-1 absence on the cytotoxic T lymphocyte and mast cell functionality.

In a first step, we have been able to demonstrate that mice deficient for kinesin-1 have a phenotype comparable to the control mice in a basal state. We have then shown that the absence of kinesin-1 in murine cytotoxic T lymphocytes does not induce defects in activation and in lytic granules' secretion *in vitro*. However, the behavior of the lytic granules at the immunological synapse seems abnormal. Nevertheless, after an infection essay with LCMV, which revealed no differences between control and kinesin-1-deficient mice, we conclude that compensatory mechanisms may complement the absence of kinesin-1 in mice. Finally, functional studies carried out on murine mast cells have enabled us to demonstrate the involvement of kinesin-1 in the mechanism of granules' transport. Indeed, the absence of kinesin-1 leads to degranulation defects *in vitro* and also *in vivo* (mice were less sensitive to anaphylactic shocks). On the other hand, the absence of kinesin-1 does not affect the activation and cytokines secretion capacities of mast cells. Finally, we were able to characterize the molecular complex Rab27b / Slp3 / kinesin-1 involved in mastocytic granules' transport and found that this complex formation was dependent on the PI3K-related activation pathway (Phosphatidylinositol 3-kinase).

This work allows us to introduce new elements for the mechanisms governing the secretion of mast cell granules and thus opens new therapeutic perspectives for the treatment of type I hypersensitivity (IgE dependent).

Keywords: Vesicular Traffic, LRO, Mast cells, Lymphocytes, Kinesin-1, Rab27, Slp3, PI3K

Introduction

L'orchestration des réponses immunitaires est un mécanisme qui nécessite d'une part un dialogue entre les cellules immunitaires mais aussi un dialogue entre ces dernières et leur environnement. En effet, les cellules immunitaires selon le signal émis par l'environnement (arrivée d'un agent pathogène spécifique, déclenchement d'une inflammation, apparition d'une tumeur, etc...) doivent s'adapter et moduler leurs réponses afin d'assurer correctement leurs fonctions. Pour cela tout un trafic vésiculaire se met en place au sein de la cellule.

On parle d'une voie de sécrétion régulée des cellules immunitaires qui permet alors l'apport à la membrane de récepteurs et de molécules effectrices (d'adhésion, d'activation, ...) ainsi que le contenu de vésicules délivré précisément dans le temps et dans l'espace (cytokines, protéines lytiques, ...). La plupart des cellules du système immunitaire sont des cellules sécrétrices capables de libérer des molécules immuno-modulatrices en réponse à des stimuli variés. Ces sécrétions sont notamment assurées par le biais de compartiments vésiculaires que l'on appelle les LRO (lysosome-related organelles) et par diverses molécules régulatrices de ce trafic vésiculaire comme par exemple les protéines Rab.

Au cours de cette introduction nous étudierons tout d'abord la machinerie impliquée dans le trafic et la sécrétion des LRO. Nous nous attarderons notamment sur les réseaux concernés et moteurs moléculaires associés ainsi que sur les différentes familles de molécules qui régulent les étapes clés du trafic et de la fusion vésiculaire, comme les SNARE et les protéines Rab, en nous attardant plus particulièrement sur la petite GTPase Rab27 qui a fait l'objet de notre étude. Nous aborderons aussi les voies de biogenèse des deux types de LRO que nous avons étudié à savoir les granules lytiques des lymphocytes T cytotoxiques et les granules de sécrétion des mastocytes.

Dans une seconde partie, nous nous focaliserons plus précisément sur la sécrétion des granules lytiques des lymphocytes T cytotoxiques. Pour cela nous détaillerons les mécanismes impliqués dans la lyse des cellules cibles, dans la mise en place de la synapse immunologique et dans la sécrétion des granules lytiques. Une partie sera aussi consacrée à la description de la kinesine-1 impliquée dans ce processus.

Pour finir après une introduction généraliste sur les mastocytes, nous nous intéresserons aux voies d'activation et aux mécanismes qui conduisent à la sécrétion des granules de sécrétion. Enfin, nous étudierons également brièvement les mécanismes qui conduisent à la sécrétion des cytokines mastocytaires.

Chapitre I: Trafic vésiculaire et sécrétion régulée

A- Les organites apparentés aux lysosomes (LRO): Une machinerie de transport et de sécrétion apparentée

1- Introduction: les LRO

Il existe une catégorie de vésicules, que l'on appelle les organites apparentés aux lysosomes, présente au niveau de nombreux types cellulaires (cellules dendritiques, mastocytes, lymphocytes T, neutrophiles, plaquettes, mélanocytes, etc...) et qui permettent aux cellules d'assurer différentes fonctions par le biais de leur sécrétion. Ces LRO sont des compartiments intracellulaires qui partagent des caractéristiques communes avec les lysosomes et endosomes que ce soit en terme de morphologie, composition et structure. Néanmoins malgré leur origine commune, selon le type cellulaire étudié, les LRO vont contenir et transporter des molécules variées afin d'assurer leurs fonctions.

On retrouve donc différents types de LRO: **Les mélanosomes** des mélanocytes où se trouve les pigments de mélanine. **Les granules denses** des plaquettes qui assurent, entre autres, l'agrégation plaquettaire et la vasoconstriction. **Les granules lytiques** des lymphocytes T cytotoxiques (LTc) et cellules NK (natural killer) qui permettent à ces cellules d'effectuer leurs fonctions cytotoxiques. **Les granules sécrétoires** des mastocytes qui contiennent les médiateurs préformés. **Les corps de Weibel Palade** des cellules endothéliales qui permettent par exemple la sécrétion du facteur Von Willebrand important pour l'hémostase primaire. **Les granules azurophiles** des neutrophiles qui contiennent par exemple des substances anti-microbiennes ou encore **les vésicules synaptiques** des neurones.

Suite au signal d'activation de la cellule, les LRO seront transportés en direction de la périphérie pour fusionner avec la membrane plasmique afin de relarguer leur contenu dans le milieu extracellulaire. Lors de leur trajet, ces LRO vont également subir différentes étapes de maturation (événements de fusion entre divers compartiments) afin d'acquérir tous les éléments qui leur sont spécifiques et qui sont nécessaires à leur transport et à leur sécrétion. Ces mécanismes de biogenèse sont essentiels pour que chaque LRO puissent acquérir les éléments qui lui sont propre. Néanmoins, les mécanismes de transport et de fusion des LRO sont des processus qui semblent faire intervenir des acteurs moléculaires communs. Ainsi dans cette partie nous étudierons d'abord la machinerie de transport et de fusion commune à ces LRO. Puis nous étudierons les mécanismes de biogenèse propres à deux types de LRO: les granules lytiques des LTc et les granules de sécrétion des mastocytes.

2- Le transport des LRO en direction de la membrane plasmique:

Suite à l'activation de la cellule immunitaire, les LRO vont être transportés en direction de la membrane plasmique et ce transport sera assuré par différents moteurs moléculaires (dynéines, kinésines, myosines) qui se déplacent sur le cytosquelette de la cellule et notamment sur le réseau de microtubules et d'actine.

a) Le réseau de microtubules et d'actine:

Le réseau de microtubules:

Fonction du réseau: Le réseau de microtubules est impliqué dans le trafic intracellulaire des organites et vésicules qui lui sont associés. Ce réseau est aussi impliqué dans les processus de division cellulaire, en formant le fuseau mitotique indispensable à la ségrégation des chromosomes (Maiato 2004). Pour finir, il permet aux cellules de changer de morphologie afin qu'elles puissent par exemple phagocyter des pathogènes ou encore accomplir une migration.

Composition du réseau: Les filaments de microtubules sont des polymères cylindriques composés de tubuline α et β . Les dimères de tubuline α et β forment des protofilaments et l'association de 13 protofilaments conduit à la formation d'un microtubule d'un diamètre de 25 nm (Nogales 2006). Les microtubules sont polarisés avec une extrémité positive et une extrémité négative. L'extrémité négative, peu dynamique, expose des sous-unités de tubuline- α alors que l'extrémité positive, très dynamique, expose des sous-unités de tubuline- β . L'extrémité négative est le lieu où se déroule préférentiellement la dépolymérisation du microtubule alors que l'extrémité positive est l'endroit où l'on observe la polymérisation du microtubule. Typiquement les extrémités négatives des microtubules sont ancrées de manière stable au niveau du centre organisateur des microtubules (MTOC) alors que les extrémités positives, très dynamiques, se retrouvent vers la périphérie et « switch » entre des phases de croissance et de rétrécissement (Valiron 2007).

Formation du réseau: A proximité du MTOC on retrouve la tubuline- γ qui est associée au complexe protéique γ -TuRC (γ Tubulin ring complex). La tubuline- γ et le complexe γ -TuRC organisés en anneau, vont servir de matrice pour la nucléation des microtubules. La nucléation est l'étape où de courts protofilaments ou oligomères sont formés par l'assemblage des sous-unités de tubuline α et β afin de former un site d'initiation pour l'élongation (Oakely 1992)(Job 2003). Durant l'assemblage des sous-unités de tubuline, le GTP (Guanosine triphosphate) se lie aux deux sous-unités de tubuline α et β mais seule la tubuline β est capable d'hydrolyser le GTP en GDP (Guanosine diphosphate). En effet, le GTP de la tubuline α est non échangeable. Les dimères de tubulines libres, portant la molécule GTP, vont alors se rajouter aux extrémités des microtubules pour permettre leur élongation. Ainsi, un microtubule en phase de croissance porte « une coiffe » de tubulines chargées en GTP qui se révèle primordiale pour maintenir la stabilité du microtubule (Carlier 1991).

En effet, le GTP associé aux dimères de tubulines sera au fur et à mesure hydrolysé en GDP. Et si la vitesse de polymérisation est moins rapide que celle de l'hydrolyse, alors on perd cette coiffe car les dimères seront tous chargés en GDP. La perte de la coiffe conduit ensuite à la dépolymérisation du microtubule car les dimères de tubuline chargés en GDP induisent des liaisons plus faibles entre les dimères et des courbures qui déstabilisent les protofilaments. On parle alors d'évènement de catastrophe. Au contraire, une hydrolyse ralentie va favoriser la polymérisation du microtubule en permettant le maintien de cette coiffe par l'ajout des dimères de tubuline liés au GTP (Mitchison 1984; Nogales 2006)(Figure 1).

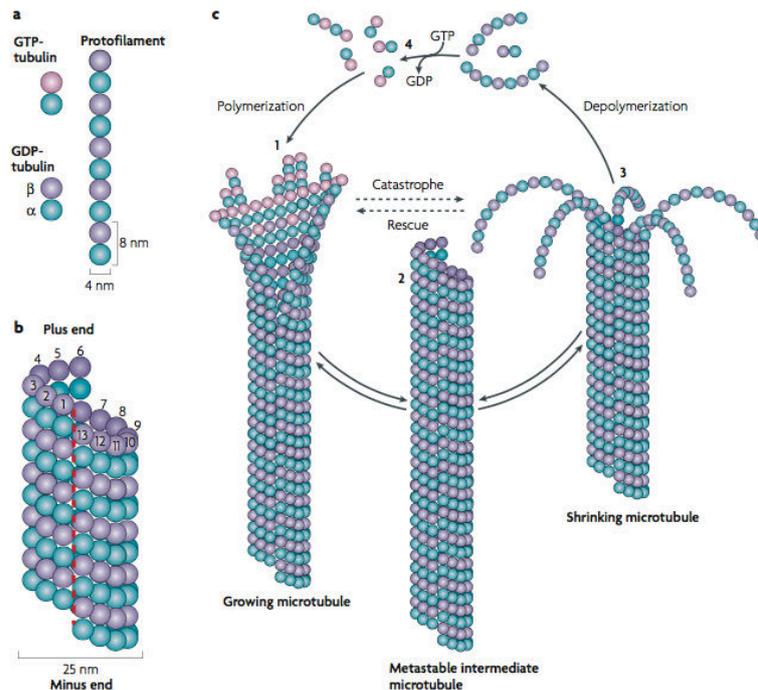


Figure 1: Structure et dynamique des microtubules (Akhmanova 2008)

La régulation du réseau de microtubules: Les propriétés des microtubules vont être régulées par des **modifications post-traductionnelles** des sous-unités de tubuline (Verhey 2007) ou par des protéines associées au réseau comme les protéines **+TIPs** (plus-end tracking proteins) (Akhmanova 2008) ou **MAPs** (microtubule-associated protein) (Amos 2005).

On retrouve plusieurs modifications post-traductionnelles des microtubules comme les **acétylations, détyrosinations, polyglutamylations, etc...** La tubuline- α est acétylée par une tubuline acétylase et désacétylée par deux histones désacétylases HDAC6 (Histone désacétylase 6) et SIRT2 (NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-2). La tubuline détyrosinase s'occupe de détyrosiner les microtubules et la tubuline glutamylase se charge de rajouter les glutamates. Ces modifications agissent comme un « code » qui sera reconnu et lu par les molécules associées aux microtubules ce qui modulera leur recrutement et ainsi contribuera à la régulation de la dynamique des microtubules (Verhey 2007). Par exemple, la détyrosination est connue pour stabiliser les microtubules. En régulant le recrutement des moteurs moléculaires, ces modifications pourront

également directement réguler les trafics vésiculaires. Par exemple, la kinesine-1 s'associe préférentiellement aux sous-unités de tubuline détyrosinées et acétylées (Reed 2006).

Concernant les +TIPs, elles s'accumulent préférentiellement au niveau de l'extrémité positive des microtubules pour réguler leur dynamique (Akhmanova 2005; Akhmanova 2008). Par exemple, la +TIPs **EB1** (End binding 1) stabilise les microtubules, stimule leur nucléation et empêche les évènements de catastrophe (Bu 2001). Concernant les +TIPs **CLIP** (Cytoplasmic linker protein), en plus de favoriser la nucléation et la stabilisation des microtubules, elles peuvent se lier aux vésicules endosomales pour faciliter leur trafic. De plus, elles permettent de lier le réseau de microtubules à celui de l'actine (Rickard 1996).

Parmi les MAPs, on retrouve des MAPs structurales et des MAPs motrices (Amos 2005). Les MAPs structurales vont permettre de réguler la formation et la dynamique des microtubules (Maiato 2004). On retrouve par exemple la protéine **STOP** (Stable Tubule-Only Peptide) qui inhibe leur dynamique en favorisant la détyrosination de la tubuline ce qui les stabilise (Bosc 2003). La protéine **MACF** (Microtubule-actin cross-linking factor) stabilise le réseau de microtubules mais permet aussi son interaction avec le réseau d'actine (Leung 1999). Concernant les MAPs motrices, on retrouve deux types de moteurs moléculaires: Les **dynéines** qui assurent un mouvement rétrograde vers le MTOC (extrémités négatives) et les **kinésines** qui assurent un mouvement antérograde vers la périphérie (extrémités positives). Ces deux moteurs vont ainsi permettre le trafic d'un grand nombre d'organites et de vésicules au sein de la cellule grâce au réseau de microtubules.

Le réseau d'actine:

Fonction: Le réseau d'actine permet de moduler la morphologie et la plasticité des cellules ce qui leur permet de pouvoir se mouvoir au sein des tissus et dans la circulation sanguine et lymphatique mais aussi de pouvoir interagir avec d'autres cellules. En effet, le réseau d'actine peut conduire à la formation de protrusions membranaires de type lamellipode ou filopode. Ces types de protrusions sont par exemple nécessaires à la formation de la synapse immunologique qui se forme entre un LTc et la cellule présentatrice d'antigène. Le réseau d'actine est aussi impliqué dans le trafic intracellulaire des organites et molécules *via* des moteurs moléculaires associés: les myosines (Pollard 2009).

Composition du réseau: Les microfilaments, d'un diamètre de 7 nm, sont formés de deux polymères hélicoïdaux bicaténaires composés de monomères d'actine-G. Ces monomères sont polarisés et leur orientation uniforme le long du polymère conduit à la polarisation du filament d'actine. L'extrémité qui possède une forte activité de croissance est appelée extrémité barbée et celle moins dynamique est appelée extrémité pointue (Milligan 1990). Les microfilaments peuvent ensuite s'organiser en faisceaux parallèles (formation des protrusions) ou en réseaux branchés.

Formation du réseau: Les monomères d'actine vont s'auto-assembler (nucléation) tout d'abord sous forme de dimères puis de trimères instables, pour finalement adopter une conformation hélicoïdale stable. Après cette étape de nucléation l'élongation du filament peut alors débuter. Au cours de l'assemblage de l'actine, la molécule d'ATP (Adénosine triphosphate) liée au monomère va être hydrolysée en ADP (Adénosine diphosphate). Ainsi les sous-unités d'actine présentes au sein du microfilament seront sous forme ADP. La plupart des microfilaments d'actine auront une extrémité barbée composée de sous-unités d'actine-ATP alors que leur extrémité pointue sera majoritairement composée d'actine-ADP. Cette hydrolyse différentielle de l'ATP conduit à une asymétrie supplémentaire pour le microfilament. En effet, à l'extrémité barbée on aura un phénomène de polymérisation alors qu'à l'extrémité pointue on aura plutôt un phénomène de dépolymérisation ce qui conduit à un mécanisme de « treadmilling » (tapis roulant) (Pollard 2000; De La Cruz 2001)(Figure 2).

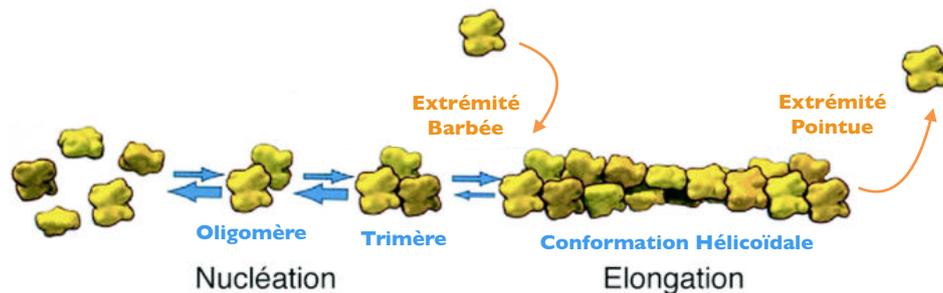


Figure 2: Dynamique d'assemblage du réseau d'actine (Adapté de De la cruz 2001)

La régulation du réseau: Les filaments vont ensuite s'organiser pour former un réseau complexe qui sera modulé selon les besoins de la cellule. Plus de 60 familles de protéines de liaison à l'actine ont pu être identifiées, on les appelle les ABP pour Actin Binding Proteins. Il s'agit de protéines agissant sur la polymérisation et la dépolymérisation de l'actine, des moteurs moléculaires de type myosine ou encore des protéines permettant la liaison de l'actine avec d'autres composants cellulaires comme le réseau de microtubules ou la membrane plasmique. On retrouve par exemple la **profiline** qui peut séquestrer les monomères d'actine, la **cofiline** qui induit la dépolymérisation du réseau et les **protéines de coiffe** (tropomoduline, CapZ) qui empêchent l'échange des monomères (association et/ou dissociation). Ont aussi été décrits, les **tropomyosines** qui stabilisent et empêchent la dépolymérisation du réseau (Inhibition de la cofiline), les facteurs de nucléation de l'actine comme le complexe **Arp2/3** (Actin related protein 2/3) ou encore les **formines** qui en s'associant aux profilines permettent l'assemblage de l'actine (La profiline a donc un double rôle) (Pollard 2000; Sagot 2002; Dos Remedios 2003).

b) Les moteurs moléculaires liés aux microtubules:

Les transports qui ont lieu au sein des cellules *via* le réseau de microtubules peuvent être assurés par deux types de moteurs moléculaires, les dynéines et les kinésines. Ces deux moteurs

se déplacent le long du réseau de microtubules soit en direction de la périphérie (Kinésine - transport antérograde) soit en direction du MTOC (Dynéine - transport rétrograde).

Les dynéines:

Fonction: La première dynéine a été décrite pour la première fois en 1965 par Gibbons et Rowe comme une protéine ATPase située au niveau des cils de *Tetrahymena pyriformis* et ayant des capacités motrices (Gibbons 1965). Ces fonctions motrices ont par la suite été confirmées grâce à la découverte d'une nouvelle dynéine cytosolique décrite comme assurant un transport rétrograde, c'est à dire en direction de l'extrémité négative des microtubules (Paschal 1987; Schroer 1989). On distingue plusieurs types de dynéines: Les dynéines **axonémales** qui permettent le battement des cils et flagelles en transportant les protéines le long des axonèmes et les dynéines **cytoplasmiques** qui transportent des cargos le long des microtubules.

Structure et mode d'action: Elles sont composées d'une chaîne lourde qui contient le domaine globulaire de fixation aux microtubules et le domaine moteur (6 domaines AAA ATPases). Elles possèdent aussi plusieurs chaînes légères et intermédiaires situées sur la queue de la dynéine (LIC, IC TCTEX, LC8, Roadblock) qui permettent le recrutement des cargos et l'oligomérisation de la dynéine. Après l'hydrolyse de l'ATP des changements conformationnels ont lieu notamment au niveau des domaines AAA et du linker. Le linker se replie et l'anneau subit une rotation (sous-unités AAA1/2/3) ce qui modifie l'angle de la tige coil-coiled. Ce changement d'angle permet alors le détachement du domaine moteur des microtubules. La libération de phosphatases permet ensuite un retour à la normale de la conformation du linker et des domaines AAA. Ces deux changements successifs de conformation permettent ainsi à la dynéine de se mouvoir (Carter 2011; Gennerich 2009) (**Figure 3**).

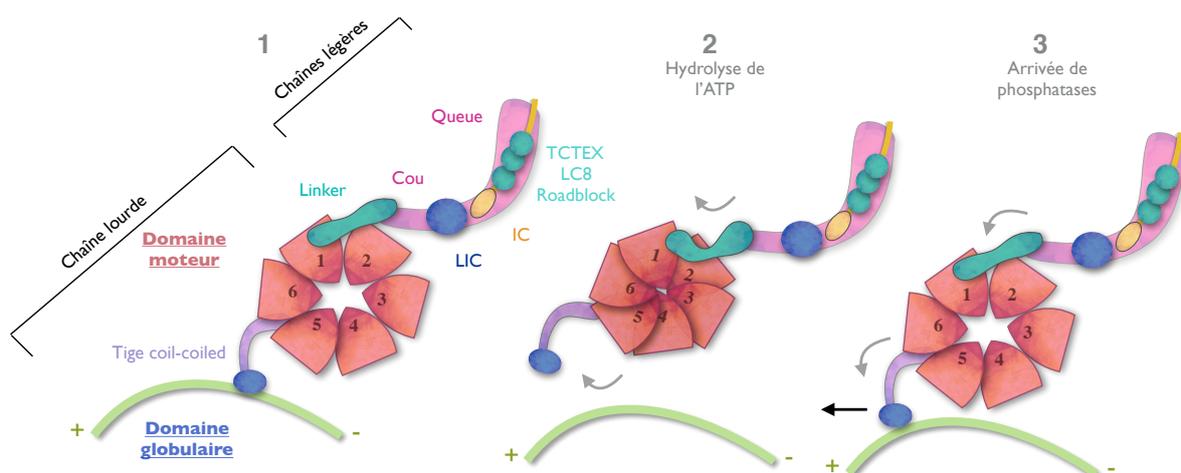


Figure 3: Schéma récapitulatif de la structure et du mécanisme qui conduit au mouvement de la dynéine.

Les kinésines:

La famille des kinésines: On doit la découverte des kinésines à l'équipe de Sheetz qui

identifiée pour la première fois, dans des axones de calamar géant, une protéine motrice capable de faire bouger des billes de latex et des organites le long des microtubules (Vale 1985). Par la suite des études phylogénétiques ont permis d'identifier 45 kinésines groupées en 14 familles différentes (Figure 4). Les kinésines sont impliquées dans la division cellulaire et dans le trafic des organites comme les lysosomes et mitochondries. Elles permettent aussi le transport antérograde des vésicules en direction de la périphérie ou le long des axones neuronaux mais également le transport des ARNm (Lawrence 2004; Miki 2005; Hirokawa 2009).

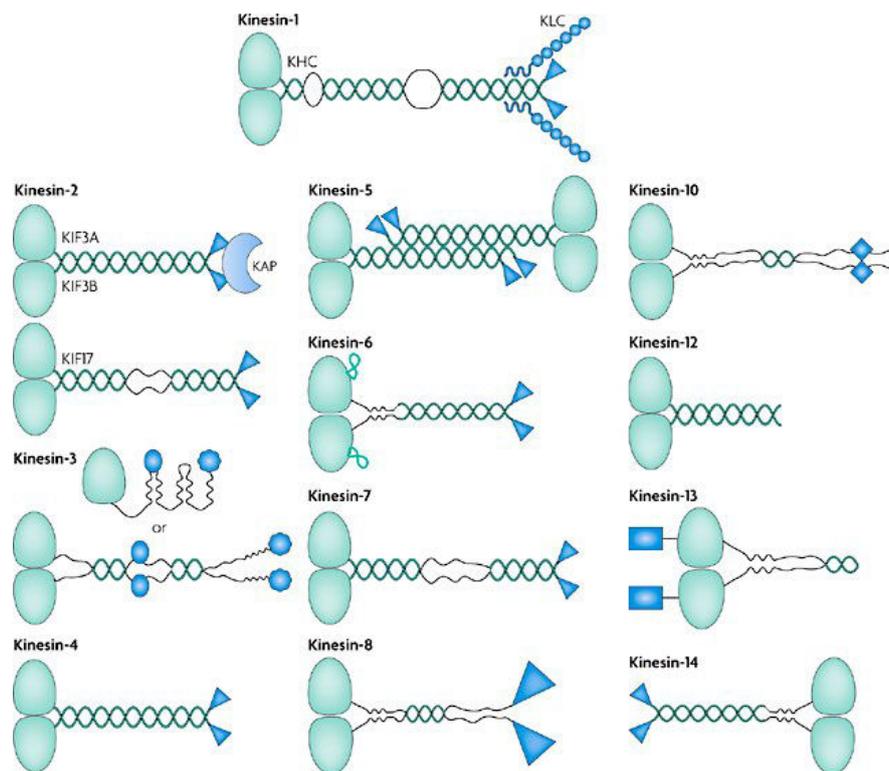


Figure 4: Structure des différentes familles de kinésines (Verhey 2009) En vert clair on retrouve les domaines moteurs, en vert foncé la tige coiled-coil et en bleu foncé les domaines non moteurs qui se lient aux cargoes.

Structure et mode d'action: La plupart des kinésines existent sous la forme d'un homodimère de chaînes lourdes. Chaque chaîne lourde est composée d'un domaine moteur globulaire, d'un cou, d'une tige et d'une queue globulaire. Le domaine moteur contient le site de fixation à l'ATP et le site d'ancrage aux microtubules. La tige, formée de domaines «coiled-coil», est nécessaire à la mise en place du mouvement et à la dimérisation des kinésines et la queue globulaire permet la fixation des cargoes mais aussi la régulation du domaine moteur (Woehlke 2000). La majorité des kinésines se déplacent le long des microtubules en direction de leur extrémité positive mais certaines peuvent aussi se déplacer en direction de l'extrémité négative.

Effectivement si le domaine moteur est en position N-ter, les kinésines vont vers l'extrémité positive mais si le moteur est en position C-ter (comme la kinésine 14), elles vont en direction de l'extrémité négative. Concernant la kinésine 13, qui possède un domaine moteur central, elle n'est pas impliquée dans le trafic mais plutôt dans la déstabilisation des microtubules (Verhey 2009).

c) Les moteurs moléculaires liés au réseau d'actine:

Les myosines:

Fonction: Les myosines sont des moteurs moléculaires associés au réseau d'actine. Il existe 20 classes de myosines qui permettent le transport des vésicules et organites, l'adhésion et la migration cellulaire mais aussi la contraction musculaire et la division cellulaire. On retrouve par exemple: La myosine IIA exprimée au niveau des LT qui est impliquée dans leur motilité (Jacobelli 2004). Mais aussi les myosines V (a/b/c), abondantes au niveau des cellules endocrines, qui sont impliquées dans le transport de nombreux organites tels que les mélanosomes, les vésicules synaptiques ou encore les endosomes de recyclage (Wu 2002; Fan 2004; Gramlich 2017).

Structure et mode d'action: Elles se déplacent pour la plupart en direction de l'extrémité barbée des filaments (extrémité +) excepté la myosine 6 (-) et 9b (+ et -). Elles sont composées de deux chaînes lourdes qui regroupent la queue (tige coiled-coiled), le cou qui sert de levier pour faciliter les mouvements et les têtes motrices qui contiennent l'activité ATPasique. On retrouve aussi 4 chaînes légères: deux essentielles et deux régulatrices. Les chaînes légères essentielles stabilisent la conformation des chaînes lourdes et les chaînes légères régulatrices permettent de réguler l'activité ATPasique des têtes motrices. En N-ter, la myosine se lie à l'actine grâce aux têtes motrices et en C-ter elle peut se lier aux différents cargos. Néanmoins même si toutes les myosines possèdent ces trois régions fonctionnelles, leur structure peut varier entre les différentes classes de myosines leur permettant ainsi d'acquérir leur spécificité. La queue située en C-ter est notamment la région qui varie le plus entre les différentes classes de myosine. Par exemple certaines myosines ne possèdent pas de tige coiled-coiled qui permettent de dimériser la protéine, ce qui conduit à des myosines qui ne possèdent qu'une seule tête motrice. La dimérisation peut aussi être partielle et les myosines peuvent posséder des domaines globulaires pour lier les cargos en C-ter (comme la myosine V) (Krendel 2005; Syamaladevi 2012)(Figure 5).

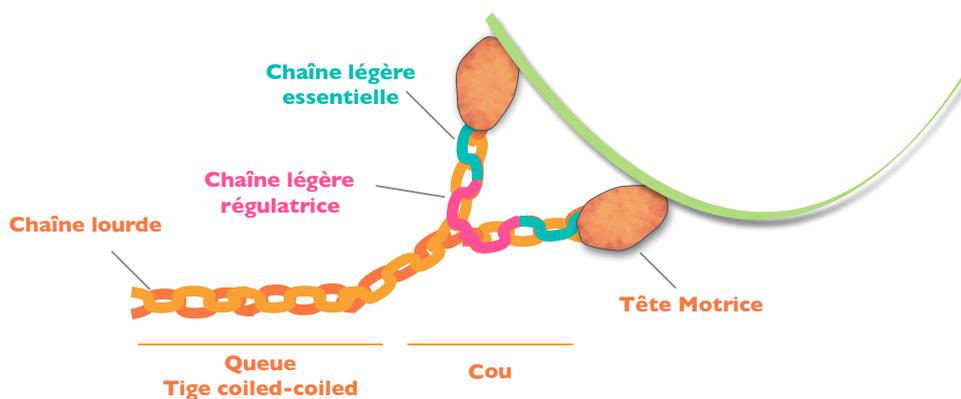


Figure 5: Structure moléculaire de la myosine conventionnelle (Myosine II)

3- Les mécanismes d'arrimage, de fusion et de sécrétion des LRO:

Suite à un signal d'activation de la cellule, les LRO vont devoir fusionner avec différents compartiments afin d'acquérir divers constituants (maturation). Ces LRO vont ensuite être recrutés au niveau de leur site de sécrétion pour venir fusionner avec avec la membrane plasmique et ainsi

relarguer leur contenu dans le milieu extracellulaire. Un certain nombre de molécules ont été impliquées dans les mécanismes qui aboutissent à la fusion et à l'exocytose des LRO.

a) Les protéines SNARE: la fusion des membranes

Les différentes SNARE: La famille des protéines SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor accessory protein receptors) est composée de 36 membres chez les mammifères (Jahn 2006). Au sein de cette famille, on retrouve trois grands groupes de protéines: les protéines **VAMP/**synaptobrévines (vesicle associated membrane protein), les **syntaxines** (STX) et les protéines **SNAP-25/23/29** (Snaptosome-associated protein).

Ces protéines sont impliquées dans la fusion des membranes grâce à l'interaction des v-SNARE (vesicle-associated-SNARE), présentes sur la membrane des vésicules, avec des t-SNARE (target-membrane SNARE), présentes sur les membranes cibles (Sollner 1993). Une deuxième classification plus robuste des SNARE a par la suite été faite après l'étude de leur structure. On parle de Q-SNARE ou R-SNARE selon la présence d'une glutamine ou arginine au niveau de leur domaine SNARE. En général les v-SNARE sont des R-SNARE et les t-SNARE des Q-SNARE.

Le domaine SNARE: Les protéines SNARE partagent un domaine commun de 60 à 70 acides aminés que l'on appelle domaine SNARE. Ce domaine formé d'une hélice- α permet aux protéines SNARE d'interagir entre elles par formation de structure coiled-coil (Poirier 1998).

Les STX sont des protéines transmembranaires composées d'un domaine de régulation en N-ter appelé Habc, d'un domaine SNARE appelé H3 et d'un domaine transmembranaire en C-ter. En N-ter on peut aussi retrouver sur certaines STX un petit peptide important pour les événements de fusion. Le domaine H3 des STX se fixe à la fois aux domaines SNARE des molécules VAMP et SNAP formant ainsi le coeur très stable du complexe SNARE. Les SNAP sont des protéines membranaires composées de deux domaines SNARE en N-ter et C-ter. Les VAMP sont des protéines transmembranaires composées d'un domaine SNARE en C-ter.

Formation du complexe SNARE: L'interaction créée entre ces protéines par le biais de leurs domaines SNARE permet la formation d'un complexe très stable appelé complexe trans-SNARE. Il est constitué de 4 hélices-alpha superenroulées qui permettent le rapprochement des membranes jusqu'à leur fusion par un mécanisme dit de fermeture éclair (de la partie N-ter vers la partie C-ter des hélices- α) (Poirier 1998)(**Figure 6**). Pour finir, c'est l'énergie libérée par la formation de cette super-hélice qui va permettre de déclencher la fusion des membranes (Wiederhold 2009). Des hémifusions transitoires des bicouches lipidiques vont avoir lieu conduisant à la déstabilisation puis réorganisation des membranes pour aboutir finalement à la formation d'un pore membranaire.

Désassemblage du complexe SNARE: Le complexe SNARE qui reste sur la membrane après les événements de fusion est appelé complexe cis-SNARE. Il sera désassemblé par une AAA-ATPase de type II la **NSF** (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) et son co-facteur **α -**

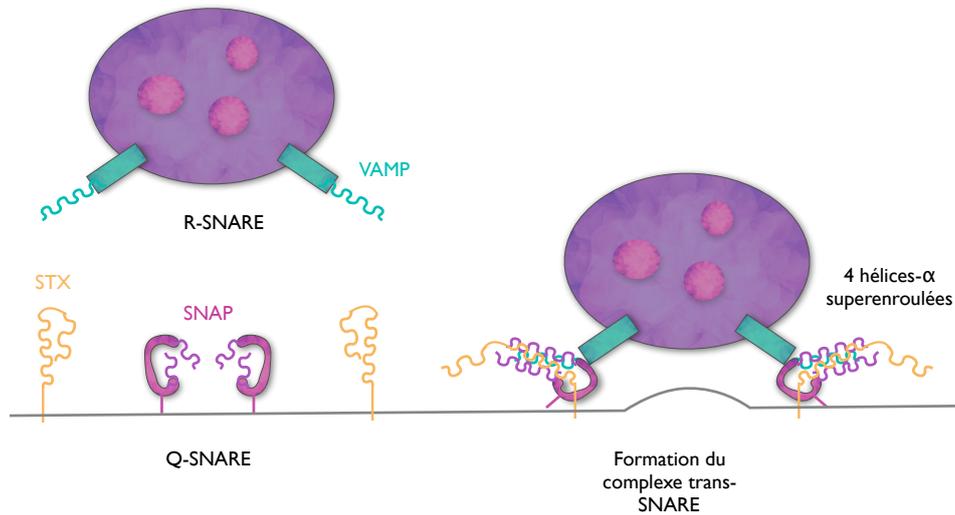


Figure 6: Formation d'un complexe trans-SNARE

SNAP (Soluble NSF attachment Protein). En effet, α -SNAP se lie d'abord au complexe SNARE puis recrute NSF qui va former un homohexamère cylindrique autour du complexe SNARE. Pour finir, NSF hydrolyse de l'ATP ce qui induit un changement de conformation du complexe (mouvement de haut en bas et de rotation du cylindre) conduisant au déenroulement de la superhélice- α (Hanson 1997; Chang 2012). Ainsi, les SNARE se dissocient et sont de nouveau disponibles pour assurer la formation de nouveaux complexes. A noter que les R-SNARE doivent suivre des voies de recyclage *via* des mécanismes d'endocytose pour être réadressées aux vésicules.

b) Les autres protéines impliquées dans la formation du complexe SNARE:

D'autres protéines vont intervenir dans la régulation du mécanisme de fusion comme par exemple les familles de protéines **Munc18** (mammalian uncoordinated) et **Munc13**. Ces protéines, et plus particulièrement Munc18-2 et Munc13-4, sont retrouvées au niveau des LTC et mastocytes et seraient impliquées dans les événements de fusion des LRO avec la membrane plasmique (voire partie II et III).

Les molécules Munc18: possèdent trois domaines D1, D2 et D3 qui forment une « arche » avec une cavité centrale et est capable d'interagir avec le domaine Habc N-ter des STX mais aussi avec le faisceau des 4 hélices- α (Hata 1993; Dulubova 2007).

Les molécules Munc13: possèdent un domaine central MUN qui permet un repliement autonome de la protéine et son interaction avec la STX en N-ter (comme Munc18) (Betz 1997; Ma 2011). Elles possèdent aussi deux domaines C2 cytoplasmiques qui leurs permettent de fixer le calcium. Ces molécules sont donc des senseurs calciques qui régulent la dynamique de formation des pores. Elles contrôlent ainsi les étapes finales de la fusion des membranes.

c) L'exemple de l'exocytose de la vésicule synaptique:

Les molécules SNARE impliquées:

Un des complexes SNARE le mieux caractérisé est celui nécessaire au relargage des vésicules synaptiques au niveau des neurones. Ce complexe serait composé des protéines SNARE: VAMP2, STX1 et SNAP25 (Sollner 1993). Cependant avant la formation du complexe SNARE la protéine STX1 doit au préalable changer de conformation.

Le rôle de Munc18-1: Effectivement, la STX1 se trouve en conformation fermée inactive ce qui l'empêche d'interagir avec les autres SNARE. Son extrémité N-ter Habc se retrouve liée à son domaine C-ter SNARE et cette conformation fermée est maintenue par l'intervention de la protéine chaperonne Munc18-1 qui interagit avec elle (Domaine Habc) (Chen 2008). En effet une mutation de Munc18-1, qui empêche sa fixation sur la STX1, conduit à la déstabilisation de la conformation fermée de STX1 qui peut alors s'associer aux autres SNARE (Dulubova 1999). La stabilisation de STX1 en conformation fermée semble donc entraver fortement la formation du complexe SNARE. Néanmoins différentes études ont pu démontrer que l'association de Munc18-1 et de STX1 en conformation fermée se révèle importante pour les mécanismes de fusion. En effet, la délétion de Munc18-1 conduit à un défaut total de sécrétion des vésicules synaptiques (Verhage 2000).

- ▶ La stabilisation du complexe pourrait par exemple empêcher la STX1 d'interagir avec d'autres SNARE en l'absence de vésicules synaptiques. Evitant ainsi la formation de complexes SNARE inutiles (Chen 2008).
- ▶ Comme Munc18-1 est aussi capable d'interagir avec le complexe Q-SNARE en plus de son interaction avec STX1 (en liant cette fois la STX1 sur son peptide N-ter), elle pourrait donc faire partie du complexe SNARE impliqué dans la fusion de la vésicule (Dulubova 2007). En effet, une étude réalisée en 2008 démontre que Munc18-1 stimulerait la fusion et permettrait le recrutement d'autres SNARE comme VAMP2. La mutation de VAMP2 diminuerait les capacités de Munc18-1 à stimuler la fusion. Ils proposent alors que Munc18-1 orchestrerait la formation du complexe SNARE en positionnant la STX1 dans une conformation qui faciliterait les interactions entre Q-SNARE et R-SNARE (Rodkley 2008)
- ▶ Pour finir, une étude de 2007 a pu démontrer que Munc18-1 stabiliserait STX1 et permettrait son trafic en direction de la membrane plasmique en empêchant la formation de complexes SNARE au cours de son transport (Medine 2007). De plus, l'inhibition de Munc18-1 conduit à une diminution de l'expression de STX1 de 50 à 70% et à une localisation périnucléaire anormale de cette dernière (Han 2009). Néanmoins ce mécanisme encore controversé ne serait observé que dans certains types cellulaires. Une étude réalisée en 2009 expliquerait ces différences de résultats par des mécanismes compensatoires mis en place par un autre isoforme de Munc18-1 (Munc18-2) dans certains types cellulaires (Han 2009).

Rôle de Munc13-1: La protéine Munc13-1 interviendrait pour déplacer Munc18-1 et ainsi permettre à la STX1 d'adopter une conformation ouverte active. En effet, la molécule Munc13-1 grâce à son domaine MUN interagit avec la partie N-ter Habc de STX1 (là où se fixe Munc18-1) (Betz 1997) et permet le passage de la STX1 d'une conformation fermée à ouverte (Ma 2011). La

STX1 une fois active peut alors aller interagir avec VAMP2 et SNAP25 pour former le complexe SNARE (**Figure 7**).

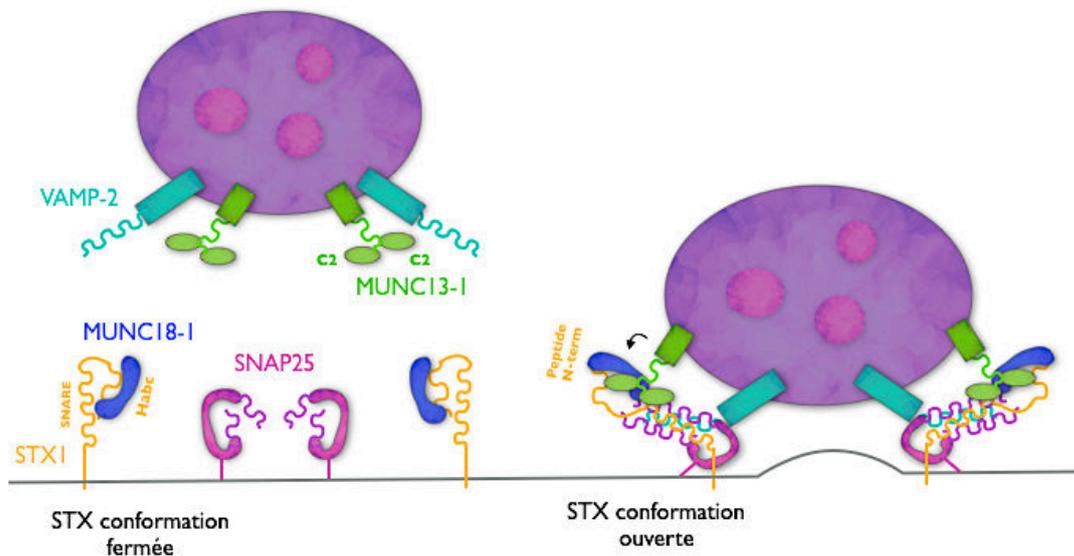


Figure 7: Schéma du complexe SNARE formé lors de la sécrétion des vésicules synaptiques et des molécules associées

L'importance du calcium dans l'arrimage de la vésicule:

Munc13-1 grâce à ces deux domaines C2 est un senseur calcique. Il a récemment été démontré que Munc13-1, *via* ces domaines C2, jouerait un rôle dans la plasticité synaptique en interagissant avec les canaux calciques et en contrôlant leur ouverture/fermeture suite aux impulsions nerveuses. Il régulerait ainsi l'influx calcique et modulerait l'exocytose des vésicules synaptiques (Calloway 2015).

La complexine est une autre protéine qui lie le calcium mais qui se lie aussi aux complexes SNARE partiellement assemblés pour les stabiliser (Chen 2002). Néanmoins, on ne sait pour le moment toujours pas si elle facilite et/ou empêche la formation du complexe SNARE. En effet, elle pourrait en se liant au complexe empêcher la progression de la « fermeture éclair » (Kummel 2011) ou au contraire promouvoir son initiation et sa progression. La fonction de cette protéine est encore très controversée et cette controverse serait en partie due au fait que la protéine s'est adaptée différemment selon les espèces. Ainsi elle assurerait différentes fonctions selon l'organisme étudié (Trimbuch 2016).

La synaptotagmine-1, une protéine qui possède des domaines C2, est capable de se lier au complexe SNARE. Cette protéine serait importante pour déplacer la complexine suite à l'arrivée de calcium et donc enlever ce clamp présent sur le complexe SNARE. En effet, la complexine et la synaptotagmine-1 interagissent au même endroit au niveau du complexe SNARE: les deux protéines entreraient donc en compétition (Tang 2006; Sudhof 2013).

Les protéines RIM (Rab3 interacting molecule) sont impliquées dans le recrutement des canaux calciques au niveau du site de sécrétion mais aussi dans le recrutement des vésicules synaptiques en se liant à Munc13-1 et Rab27b/Rab3 (Des Rab-GTPase qui seraient importantes

pour le transport et l'arrimage des vésicules (Yu 2008; Geppert 1997), description faite dans la prochaine partie). Ces protéines sont donc en charge de recruter les canaux calciques et vésicules de sécrétion au sein d'une même zone active pour permettre la transmission synaptique (Wang 1997; Kaeser 2011; Sudhof 2013).

Grâce à toutes ces molécules la transmission du signal est réalisée et peut être modulée en quelques microsecondes suite à l'entrée de calcium au niveau de la synapse (**Figure 8**).

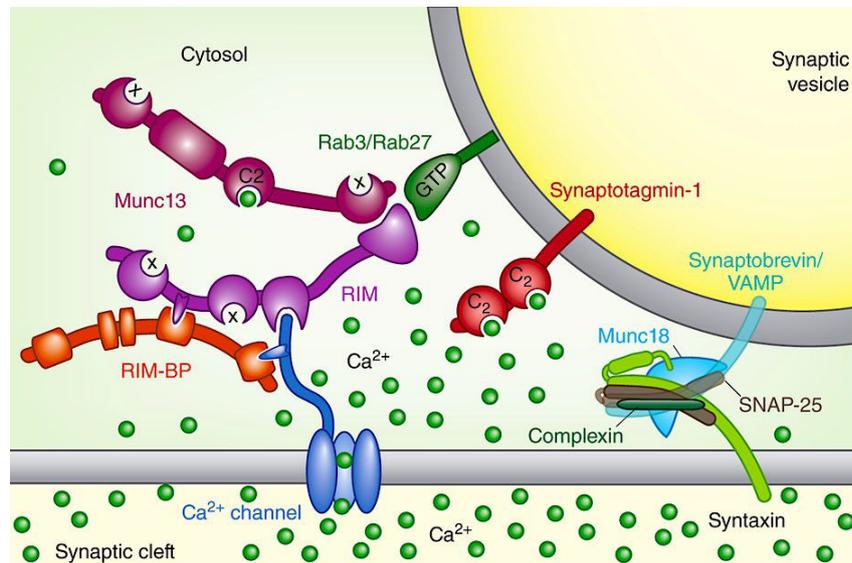


Figure 8: Schéma du complexe protéique qui médie le recrutement des canaux calciques et des vésicules synaptiques (Sudhof 2013)

d) Les divers complexes SNARE:

Les complexes SNARE qui sont amenés à se former sont souvent spécifiques d'un compartiment donné et conservé d'un type cellulaire à l'autre. Ainsi, seulement une douzaine de combinaisons possibles de protéines SNARE ont été impliquées dans des événements de fusion (Jahn 2006)(**Figure 9**). Nous verrons par la suite que la machinerie de sécrétion des LTC et des mastocytes partagent en effet la même mécanistique que celle décrite précédemment au niveau du neurone pour la sécrétion de leurs LRO.

La distribution des complexes SNARE: La distribution des protéines SNARE au niveau de la membrane plasmique n'est pas homogène. En effet, les SNARE sont organisées en nanodomains au niveau des « rafts » (radeaux) lipidiques et leur stabilité dépendrait du cholestérol présent en grande quantité dans ces zones. La formation de ces clusters permettrait le recrutement et la fusion des vésicules en des endroits bien spécifiques de la membrane plasmique définis par les rafts lipidiques. Cela faciliterait l'organisation spatiale du trafic vésiculaire afin d'améliorer la sécrétion des vésicules synaptiques. En effet, quand le niveau de cholestérol diminue dans les cellules (un composant important des rafts lipidiques), les clusters de SNARE se dispersent et l'exocytose des vésicules synaptiques est grandement diminuée (Chamberlain 2001; Lang 2001).

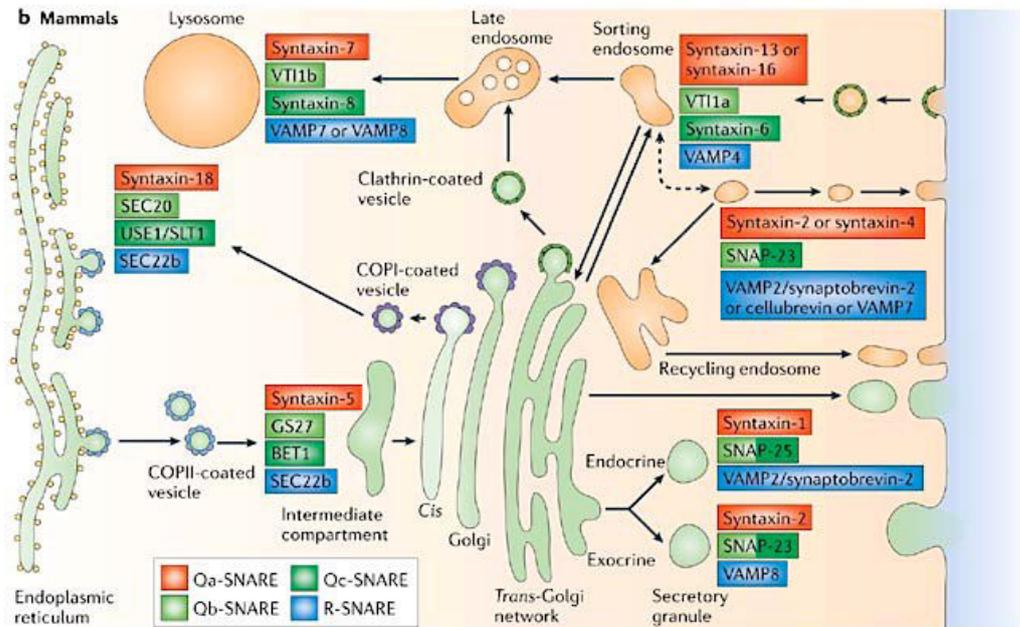


Figure 9: Exemple de différentes associations de molécules SNARE retrouvées au sein d'une cellule de mammifère (Jahn 2006)

4- L'implication des protéines Rab dans la régulation du trafic vésiculaire:

a) Généralités sur les Rab:

Fonction et généralités:

Les protéines Rab (Ras-related protein in brain) régulent la formation des vésicules à partir de compartiments donneurs, elles permettent le mouvement de ces vésicules entre les organites et pour finir leur fusion avec les compartiments accepteurs. Elles sont donc responsables du contrôle spatio-temporel des transports vésiculaires. Afin d'assurer leurs fonctions, les protéines Rab sont capables d'interagir avec un large répertoire de molécules effectrices comme les facteurs qui permettent la sélection des cargos et le bourgeonnement des vésicules (Sorting), les kinases et phosphatases qui modifient la composition membranaire (Uncoating), les moteurs moléculaires impliqués dans le trafic (Motility), les facteurs d'arrimage (Tethering) ou encore les protéines SNARE qui contrôlent la fusion des vésicules (Fusion) (Stenmark 2009; Zhen 2015)(Figure 10).

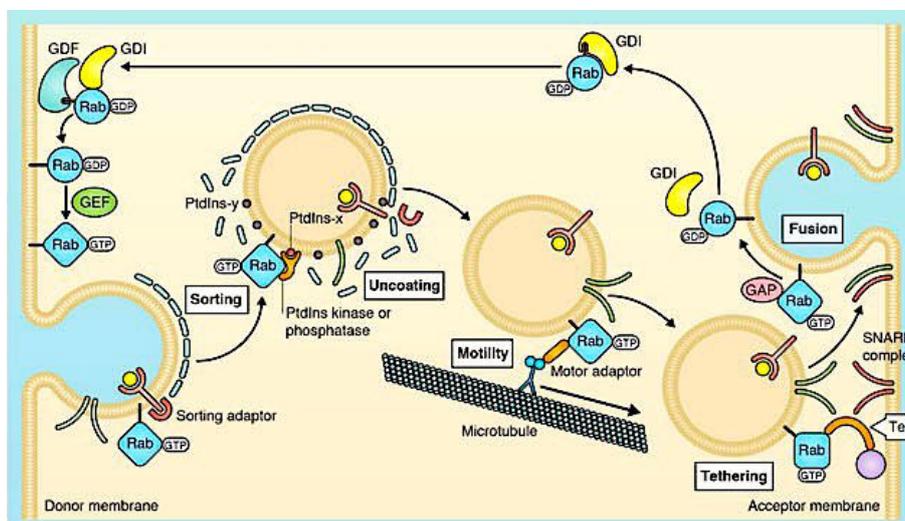


Figure 10: Les différents rôles assurés par les Rab-GTPases (Zhen 2015)

La famille des protéines Rab est constituée d'une soixantaine de membres dont l'expression est ubiquitaire. Néanmoins d'un type cellulaire à l'autre ou en fonction des besoins de la cellule, leur niveau d'expression peut varier. En effet, l'expression de Rab5 se retrouve par exemple augmentée en présence d'IFN- γ (Interferon- γ) dans les macrophages ou alors l'expression de Rab11 est diminuée dans les cellules épithéliales exposées au TNF- β (Tumor necrosis factor β). Ainsi la modulation de l'expression des Rab pourrait permettre de réguler le trafic vésiculaire (Stein 2003).

Le cycle des Rab-GTPases:

Chaque protéine Rab passe d'une conformation GDP inactive à une conformation GTP active. Cette modification est essentielle pour leur interaction avec les membranes biologiques mais aussi pour le recrutement des effecteurs au niveau des membranes leur permettant ainsi d'assurer leurs fonctions de régulateur du trafic.

Les Rab synthétisées sous forme inactive sont d'abord présentes dans le cytosol puis vont être prises en charge par des protéines chaperonnes REP (Rab escort protein). Cette protéine permet alors la mise en contact de Rab avec l'enzyme RabGGT (Rab géranylgeranyl transférase) qui lui transfère des groupements hydrophobes géranylgeranyl nécessaires pour son insertion dans les membranes biologiques. A l'état initial, la protéine Rab est maintenue inactivée par son interaction avec le facteur inhibiteur de la dissociation du GDP: le GDI (GDP dissociation inhibitor). Au niveau des membranes biologiques le facteur GDF (GDI displacement factor) déplace le GDI ce qui permet l'activation de Rab par le facteur d'échange GEF (guanine nucléotide exchange factor) en catalysant l'échange du GDP en GTP. Rab sous sa forme GTP peut alors s'insérer dans les membranes où elle peut recruter ses différents effecteurs. L'inactivation de Rab est assurée par la protéine GAP (GTPase activation protein) qui catalyse l'hydrolyse du GTP en GDP. GDI est alors recruté et détache Rab de la membrane et la séquestre sous forme inactive jusqu'au prochain cycle (Corbeel 2008; Stenmark 2009)(**Figure 11**).

La localisation des Rab:

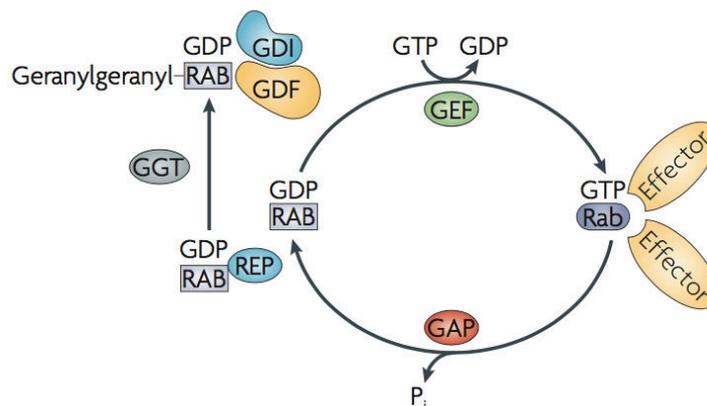


Figure 11: Cycle d'activation des Rab-GTPases (Stenmark 2009)

En plus de la grande variété de Rab qui existe, leur localisation est aussi extrêmement variée. En effet, elles se localisent sur la phase cytosolique de nombreux organites intracellulaires

ce qui leur permet d'assurer un grand nombre de fonctions. Néanmoins, chaque Rab possède une localisation préférentielle qui correspond à une étape particulière du transport des vésicules intracellulaires. Ainsi chaque compartiment aura une identité membranaire différente, assurée par l'expression différentielle de ses Rab qui réguleront les événements de transport et de fusion (Pfeffer 2013; Zhen 2015). Néanmoins plusieurs Rab peuvent être localisées sur le même compartiment en se regroupant au sein de microdomaines appelés « Rab domains ». Ainsi les endosomes de recyclage possèdent des domaines Rab4 et Rab11, les endosomes précoces des domaines Rab5 et Rab4 et les endosomes tardifs des domaines Rab7 et Rab9 (Zerial 2001; Stenmark 2009; Pfeffer 2013)(Figure 12).

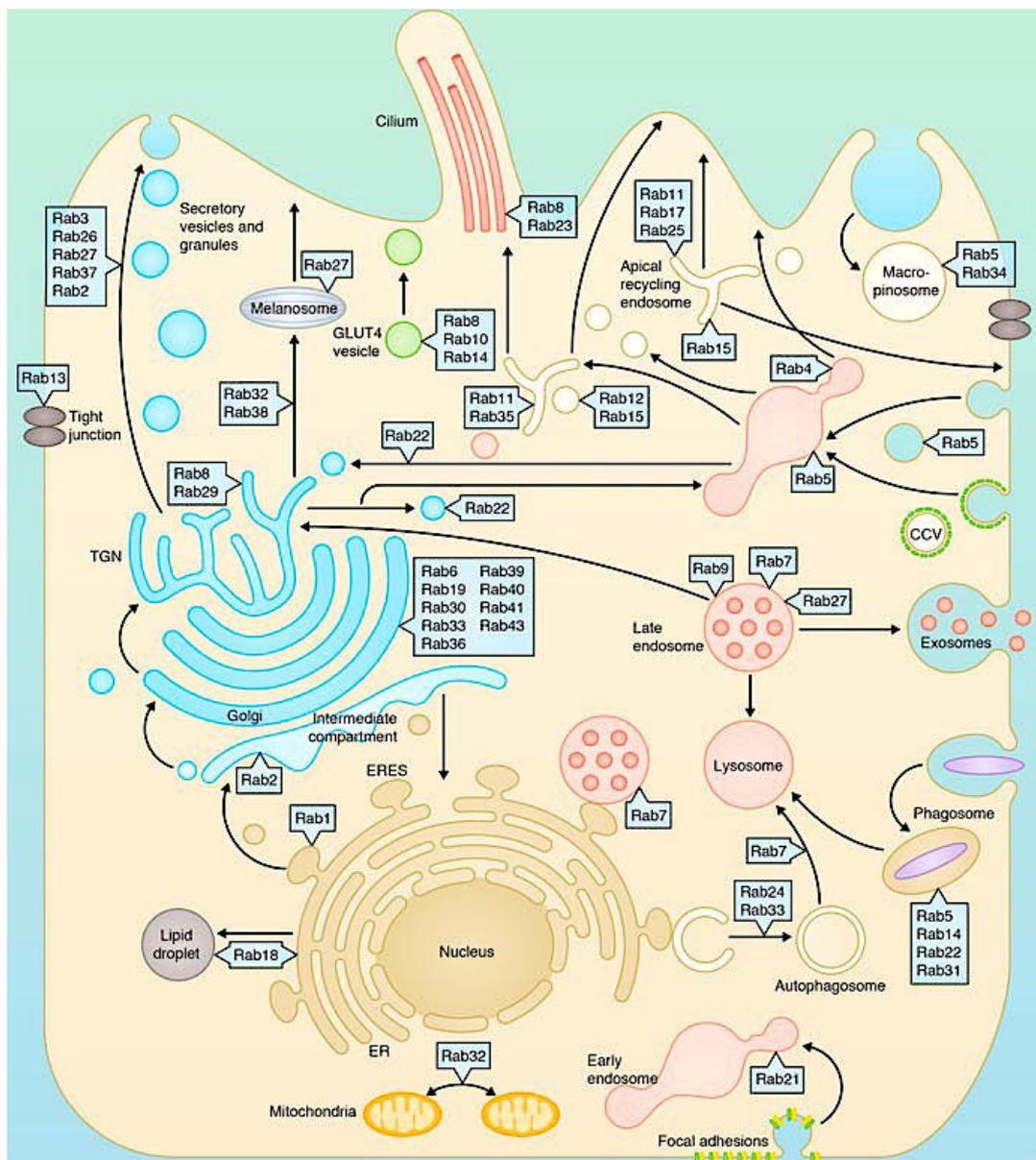


Figure 12: Distribution des différentes GTPases Rab dans la cellule eucaryote (Zhen 2015)

b) Les Rab impliquées dans le transport terminal et l'exocytose des LRO:

Les Rab impliquées dans le transport terminal et l'exocytose des LRO (que l'on appelle les « exocytic rab ») sont celles de la famille des **Rab3** (Rab3a/b/c/d), **Rab27** (Rab27a/b), **Rab37** et **Rab26** (Fukuda 2008). Nous verrons par exemple dans la partie III de cette introduction que

l'exocytose des granules des mastocytes implique 4 de ces « exocytic Rab »: Rab3d/Rab27a/Rab27b et Rab37. Concernant la sécrétion des vésicules synaptiques nous avons vu que Rab3 et Rab27b pourraient être impliquées (Yu 2008; Geppert 1997).

L'exemple de la vésicule synaptique: En effet, les protéines Rab3 et Rab27b sont impliquées dans les étapes terminales du transport et dans l'exocytose des vésicules synaptiques. La protéine **Rab3** serait nécessaire à l'arrimage et à la fusion des vésicules synaptiques (Geppert 1997). En effet, Rab3 interagirait avec la protéine RIM et Munc13-1 et ce complexe serait important pour l'arrimage des vésicules mais aussi pour réguler la plasticité synaptique (Dulubova 2005). Concernant la protéine **Rab27**, Yu et ses collègues démontrent en 2008 qu'elle serait nécessaire au transport et à la sécrétion des vésicules synaptiques (Yu 2008). Une étude réalisée en 2009 confirme l'importance de Rab27 au niveau des synapses en mettant en évidence une interaction entre Rab27b et la kinésine-1 par le biais de la protéine Slp1 (Synaptotagmin-like protein) et CRMP2 (Collapsin respond mediator protein-2). Cette interaction serait alors nécessaire pour le transport antérograde des vésicules exprimant les récepteurs à la neurotrophine le long des axones neuronaux (Arimura 2009).

c) Rab27 un acteur commun dans la sécrétion des LRO:

Il existe deux isoformes de la molécule Rab27, Rab27a et Rab27b, qui partagent 71% d'homologie et ces GTPase sont au coeur du mécanisme de sécrétion des LRO. Nous avons précédemment vu que Rab27 était importante pour le transport des vésicules synaptiques des neurones mais le rôle de Rab27 dans la sécrétion des LRO ne s'arrête pas là. En effet, son implication a été démontrée dans bien d'autres types cellulaires (**Figure 13**).

Les différents rôles de Rab27 dans la sécrétion des LRO:

La sécrétion des mélanosomes dans les mélanocytes: Les mélanosomes d'abord produits au niveau du noyau ont besoin de rejoindre la périphérie pour être sécrétés ou phagocytés au niveau des dendrites. Ce transport fait intervenir un complexe, composé de Rab27a, Slac-2a/Melanophiline et le moteur moléculaire Myosine-Va, qui permet un transport *via* le réseau d'actine des mélanosomes en direction de la périphérie (Wu 2002).

La sécrétion des corps de Weibel Palade dans les cellules endothéliales: En se liant à la protéine MyRIP (Myosin Va-Rab interacting protein), Rab27a serait capable d'interagir avec la myosin Va pour permettre l'ancrage des corps de Weibel Palade sur le réseau d'actine. Cet ancrage se révélerait nécessaire à leur maturation (Rojo 2011). De plus Rab27a en interagissant avec Slp4 serait alors capable de se lier à Munc18-1 pour réguler cette fois-ci l'exocytose des corps de Weibel Palade (Van Breevoort 2014).

La sécrétion des granules denses dans les plaquettes: La protéine Rab27b serait tout d'abord impliquée dans la formation des proplaquettes durant la maturation du mégakaryocyte. En

effet on retrouve moins de granules denses chargés dans ces proplaquettes (Tolmachova 2007). Mais Rab27b en interagissant avec Munc13-4 serait aussi impliquée dans la sécrétion des granules denses. Rab27b ne serait en revanche pas impliquée dans la sécrétion des granules- α plaquettaires (Shirakawa 2004).

La sécrétion des granules azurophiles dans les neutrophiles: La protéine Rab27a est capable d'interagir avec Slp1 pour permettre la sécrétion des granules azurophiles (Munafò 2007).

La sécrétion des granules lytiques dans les LTC: Nous verrons plus tard dans l'introduction que Rab27a est importante pour le transport terminal et l'arrimage des granules lytiques au niveau de la membrane plasmique (Menasche 2000).

La sécrétion des granules de sécrétion dans les mastocytes: Nous verrons également dans la suite de l'introduction que les protéines Rab27a et Rab27b ont été impliquées dans le mécanisme de sécrétion des granules mastocytaires (Singh 2013).

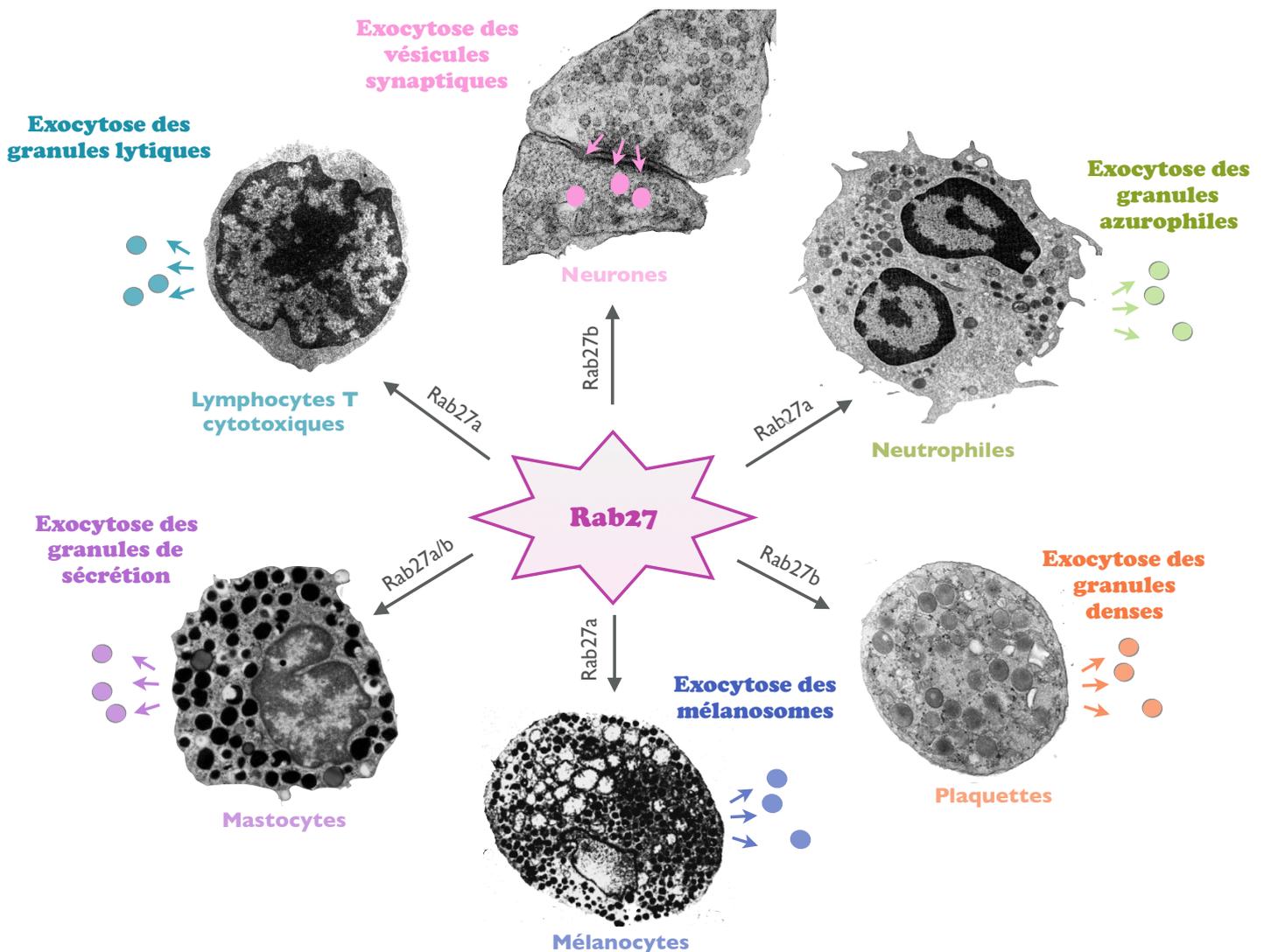


Figure 13: Résumé des différents LRO sécrétés *via* Rab27

B- Les organites apparentés aux lysosomes: Des voies de biogenèses variées

Malgré leur origine commune et des mécanismes de transport apparentés, les LROs doivent acquérir les cargos et les caractéristiques qui leurs sont propres selon le type cellulaire où ils se trouvent. L'acquisition de ses spécificités se fait lors de la maturation des LROs qui sera différente d'un type cellulaire à l'autre. Ici nous traiterons de la biogenèse des deux types de LRO qui ont fait l'objet de notre étude: les granules lytiques des LTc et les granules de sécrétion des mastocytes.

1- La biogenèse des granules lytiques des LTc: (Voir Figure Résumé 14)

Les LTc tout comme les cellules NK possèdent des LRO appelés granules lytiques qui leur permettent d'assurer leurs fonctions cytotoxiques. La première étape de la formation du granule lytique est la formation d'une structure intermédiaire que l'on appelle le **corps multivésiculaire**. C'est une structure qui va acquérir au fur et à mesure de sa maturation de nombreuses vésicules internes. On voit aussi en parallèle l'apparition de **lysosomes de sécrétions denses** qui contiennent les protéines lytiques (Stinchcombe 2000; De Saint-Basile 2010).

Formation des corps multivésiculaires: Les protéines issues de la membrane plasmique (comme LAMP (Lysosome-associated membrane glycoprotein)) et du réseau trans-golgien vont être adressées à des endosomes précoces par l'intermédiaire du complexe **ESCRT** (endosomal sorting complex required for transport) (Hurley 2008). La machinerie ESCRT va en effet reconnaître les protéines ubiquitinylées à la surface des endosomes précoces puis induire leur invagination pour former les corps multivésiculaires (Gruenberg 2001).

Apparition des lysosomes de sécrétion denses: Des lysosomes de sécrétion denses vont aussi se former et développer un **corps dense** qui contient des protéines comme la serglycine, les protéoglycanes et les protéines lytiques (granzyme, perforine). L'adressage des granzymes au corps dense se ferait par le biais d'une voie spécifique à partir du réseau trans-golgien. Effectivement, les granzymes vont être modifiés par l'ajout d'un mannose-6-phosphate ce qui permettra leur transport en direction du lysosome grâce au récepteur mannose-6-phosphate (Griffiths 1993). La voie qui conduit à l'adressage de la protéine lytique perforine est pour le moment encore inconnue. Le mode de fonctionnement de ces deux protéines lytiques sera abordé dans la suite de cette introduction.

Fusion des endosomes: Plusieurs événements de fusion vont ensuite avoir lieu afin d'aboutir à la formation du granule lytique mature. Effectivement, les corps multivésiculaires vont donner naissance aux endosomes tardifs identifiés par les protéines Rab7 et Rab27. Ces derniers vont ensuite fusionner avec des endosomes de recyclage Rab11 pour former des « vésicules d'exocytose ». Ces vésicules d'exocytose fusionneront ensuite avec les lysosomes de sécrétion

denses qui contiennent la perforine et les granzymes pour former le granule lytique mature. A noter que ce dernier évènement de fusion n'est observé que suite à l'activation du LTC. Ainsi après tous ces évènements de fusion et de maturation le granule lytique a pu acquérir toutes les protéines nécessaires à la lyse des cellules cibles (Menager 2007)(Figure 14). Nous verrons dans la deuxième partie de cette introduction que les protéines Munc13-4 et LYST sont aussi impliquées dans ces évènements de maturation.

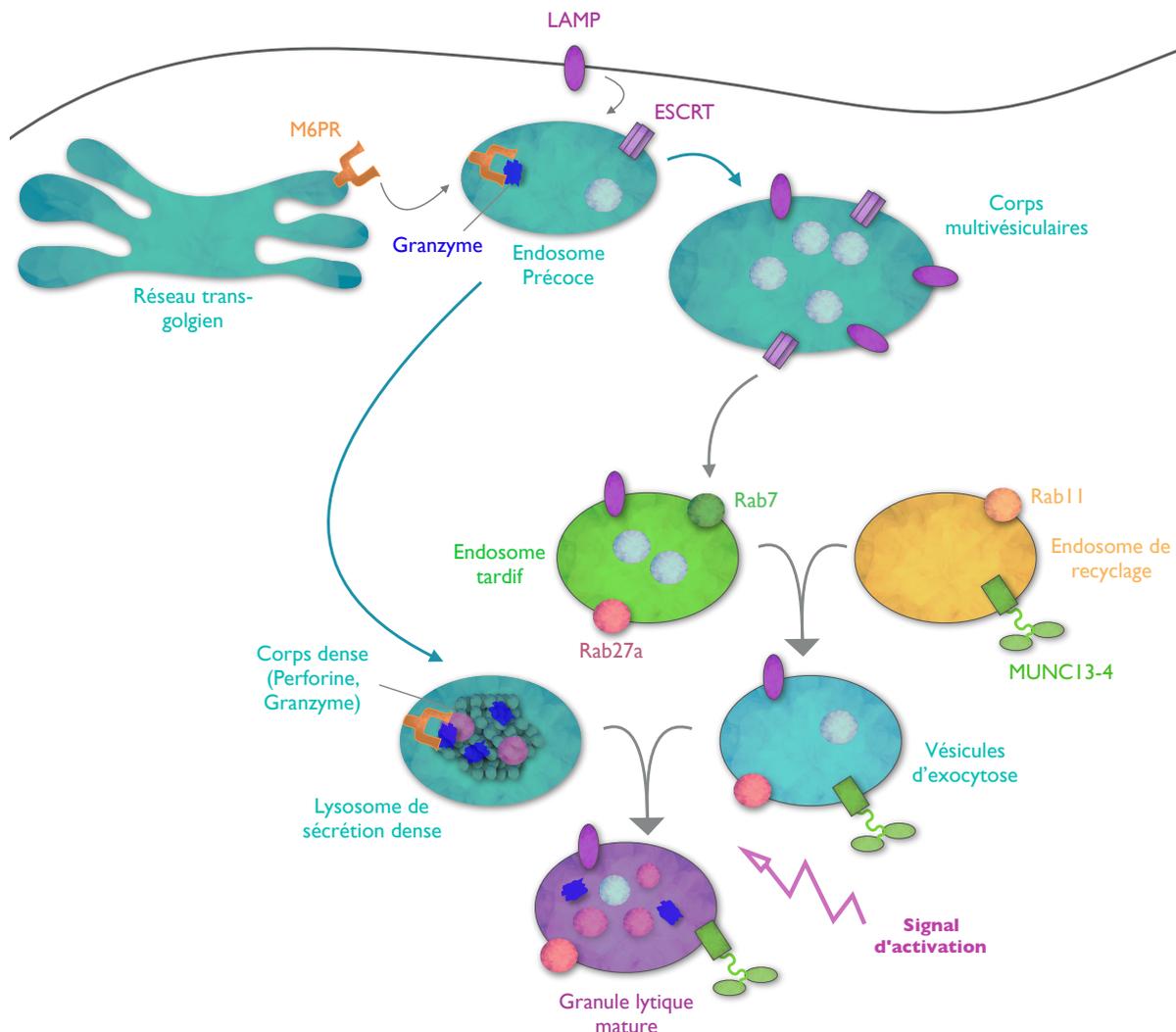


Figure 14: Résumé du mécanisme de biogenèse des granules lytiques des LTC

2- La biogenèse des granules de sécrétion des mastocytes:

Le mécanisme de biogenèse des granules mastocytaires est peu caractérisé. On sait cependant que leur développement commencerait au niveau du réseau trans-golgien où des « pro-granules » bourgeonneraient de ce compartiment (Hammel 1985). Ces pro-granules vont ensuite subir des phases de maturation durant lesquelles des évènements de fusion vont avoir lieu afin de permettre l'accumulation des médiateurs mastocytaires. Ainsi les pro-granules vont devenir de plus en plus gros et s'acidifier (grâce aux pompes V-ATPase) afin d'aboutir à des granules matures par le recrutement de nouveaux pro-granules qui viennent fusionner et s'ajouter à ceux pré-existants (Combs 1966; Wernersson 2014). Voici ci-dessous quelques exemples de protéines impliquées dans la biogenèse des granules mastocytaires.

Les protéines impliquées dans les évènements de fusion:

- ▶ La **secretogranine III**, une protéine appartenant à la famille des granines (dont on connaît peu la fonction), serait un inducteur de la formation des granules de sécrétion en se liant à son partenaire la chromogranine A. En effet, quand on surexprime la secretogranine III, on observe un nombre plus important de granules au sein des mastocytes et ce phénotype serait dépendant de son interaction avec la chromogranine A. Néanmoins on ne connaît pas encore la fonction exacte de ces protéines (Prasad 2008).
- ▶ La GTPase **Rab5** serait impliquée dans la biogenèse des granules lytiques. Effectivement, Rab5 serait nécessaire aux évènements de fusion entre les vésicules qui bourgeonnent du Golgi et les endosomes précoces (Rab27b+ CD63+). L'absence de Rab5 conduit à l'apparition d'un grand nombre de granules de petite taille alors que l'expression d'un mutant constitutivement actif de Rab5 conduit à la formation de granules géants. VAMP8 pourrait aussi être impliqué dans ces évènements de fusion (déjà démontré au niveau des cellules acineuses pancréatiques). En effet la surexpression de VAMP8 inhibe la formation de ce granule géant alors que les autres VAMP, VAMP2/3/7, n'ont pas d'effet. Ainsi, VAMP8 inhiberait les évènements de fusion médiés par Rab5. Pour finir, ces granules « géants » sont néanmoins toujours capables d'être sécrétés, Rab5 n'interviendrait donc pas dans les évènements de fusion avec la membrane plasmique (Azouz 2014). La maturation des granules de sécrétion se fait donc par des mécanismes de fusion entre les granules immatures fraîchement sortis du réseau trans-golgien mais aussi entre granules et endosomes permettant ainsi l'apport de tous les constituants nécessaires à leur sécrétion.

Les protéines impliquées dans l'adressage des médiateurs: Concernant les mécanismes qui permettent la sélection des médiateurs qui seront contenus dans les granules, deux modèles ont été proposés. Dans la théorie du « sorting-by-entry » chaque médiateur posséderait un signal de tri qui interagirait avec son récepteur au niveau de la membrane du réseau trans-golgien. Dans la théorie du « sorting-by-retention » les médiateurs seraient initialement présents dans les « pro-granules » et certains seraient retirés au cours de la maturation (Arvan 1998). Peu d'études ont été réalisées pour comprendre comment ce tri était fait, néanmoins on sait qu'il existe un lien entre les médiateurs qui permet de réguler leur adressage.

En effet, une étude réalisée en 2000 démontre que les **protéoglycanes** comme la protéine **serglycine** présente au sein des granules serait, en plus de son rôle dans la formation du corps dense, responsable de la rétention de certains médiateurs comme des tryptases, des chymases, la carboxypeptidase A3, l'histamine et la sérotonine (Henningsson 2006; Braga 2007). De plus, il a été démontré que l'absence d'**histamine** conduirait à la réduction des protéases et composants nécessaires à la formation des protéoglycanes (Ohtsu 2001; Nakazawa 2013). Il existerait donc des liens entre les médiateurs qui permettent d'assurer ou non la rétention de certains d'entre-eux au sein des granules. Ce lien pourrait être la conséquence d'une balance des charges au sein du

granule. En effet, quand on perdrait de la serglycine, qui est chargée négativement, on ne recruterait plus les médiateurs qui sont chargés positivement. A l'inverse quand on perdrait de l'histamine, qui est chargée positivement, on ne recruterait plus les médiateurs qui sont chargés négativement (Wernersson 2014).

Chapitre II: Le mécanisme de sécrétion des LRO dans les LTc

Les granules lytiques

Dans cette seconde partie, nous nous attarderons plus précisément sur la sécrétion des LRO associés aux LTc à savoir les granules lytiques. Pour cela nous détaillerons les mécanismes impliqués dans la lyse des cellules cibles et notamment le mode d'action des différents agents lytiques: perforine, granzymes. Nous étudierons ensuite les différents mécanismes qui conduisent à la mise en place de la synapse immunologique suite à la reconnaissance de la cellule cible par le LTc (signalisation, description des différentes régions SMAC, réorganisation du cytosquelette, transport des molécules indispensables, etc..). Enfin, nous détaillerons la machinerie de sécrétion des granules lytiques (SNARE, Rab, transport) pour terminer par une description de la kinésine-1 impliquée dans ce processus.

A- Le mécanisme de sécrétion des granules lytiques:

1- Fonctionnalité des granules lytiques:

a) Description des granules lytiques:

Les LTc et cellules NK exercent leur activité cytotoxique essentiellement *via* la sécrétion polarisée de granules renfermant des protéines lytiques: perforine, granzymes A et B. Les lymphocytes T naïfs ne possèdent pas de granules lytiques préformés, ce n'est qu'après une étape de maturation que les lymphocytes T deviennent des cellules effectrices et seront capables de tuer des cellules cibles comme des cellules infectées ou tumorales. Les LTc contiennent entre 15 et 25 granules de 700 nm, chacun entourés d'une bicouche lipidique.

La membrane des granules lytiques possède les mêmes molécules que celles retrouvées à la surface des endosomes et lysosomes comme Lamp-1, Lamp-2 et Lamp-3 (CD63). Ce qui confirme l'appartenance des granules lytiques à la famille des LRO (Peters 1991). A l'intérieur de ces granules on retrouve de multiples petites vésicules internes ainsi que des corps denses aux électrons (1 à 3) qui occupent la majorité de l'espace (Peters 1991) (Figure 15).

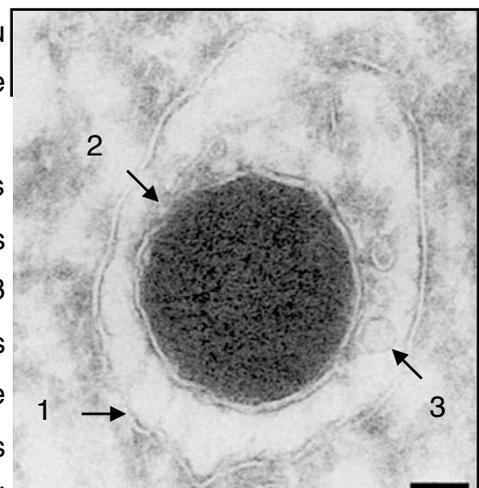


Figure 15: Cryosection d'un granule de LTc. 1. Bicouche lipidique. 2. Corps dense 3. Petites vésicules (Peter 1991)

b) Les agents lytiques:

La perforine et les granzymes sont les composants majoritaires des granules lytiques. Ces protéines sont plus précisément localisées au niveau des corps denses aux électrons des granules lytiques et permettent la lyse des cellules cibles.

La perforine:

Expression de la perforine: La perforine a été isolée et caractérisée pour la première fois en 1985 (Podack 1985). C'est une protéine de 67 kDa exprimée uniquement dans les LTc et cellules NK. Son expression est régulée au cours de l'activation et la différenciation des LT naïfs en LT effecteurs. En effet, suite aux signaux d'activation déclenchés par certains récepteurs (TCR (T cell receptor), KLRK1 (Killer cell lectin like receptor K1) ou certaines cytokines (IL-2, IL-15, IL-21) on observe la transcription du gène *Prf1* codant pour la perforine. C'est par exemple le cas de l'IL-2 qui induit *Prf1* grâce à la transcription du facteur STAT5 (Signal transducers and activators of transcription) et au recrutement des facteurs de transcription Stat5 et Eomes (Eomesodermin) dans les régions cis-régulatrices du gène *Prf1* (Lichtenheld 1988; Pikin 2010).

Structure de la perforine: La perforine partage des homologies de structure avec la protéine C9 du complexe d'attaque membranaire (Tschopp 1986; Lichtenheld 1988; Shinkai 1988). En effet, elle possède dans sa partie N-ter le même domaine MACPF (membrane attack complex and perforin domain) que l'on retrouve dans les protéines du complexe d'attaque membranaire (C6 à C9). Ce domaine permet la formation d'une hélice- α qui confère à la perforine la capacité de s'insérer au travers des membranes lipidiques (Peitsh 1990).

Elle possède ensuite un domaine EGF (Epidermal growth factor) et dans sa partie C-ter un domaine C2 qui permet le recrutement de trois Ca^{2+} . Le recrutement d'ions calciques au niveau de ce domaine induit un changement de conformation qui permet l'ancrage de la perforine à la membrane plasmique (Rizo 1998)(**Figure 16**).

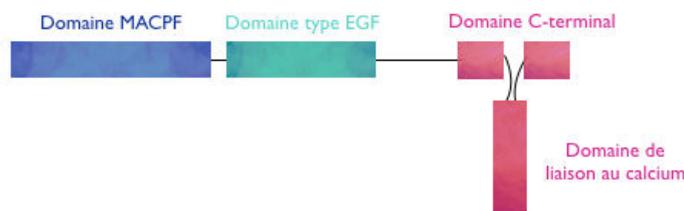


Figure 16: Structure moléculaire de la perforine

L'importance du calcium dans le processus d'oligomérisation de la perforine a déjà été démontrée en 1985 (Podack 1985). En effet, l'oligomérisation ne peut se faire qu'en présence de calcium et est inhibée par la présence de Zinc. Ainsi, en présence de calcium, on observe l'influx d'ions caractéristiques de la formation du pore de perforine (influx de Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) et la lyse des cellules cibles, alors qu'en l'absence de calcium ou en présence de zinc, cet influx n'est plus observé et la perforine n'est plus capable de lyser les cellules cibles.

Mode d'action de la perforine: La perforine s'insère et s'oligomérisse (± 20 monomères) dans la bicouche lipidique des cellules cibles en un pore de 16-22 nm de diamètre qui permettra par la suite l'entrée des granzymes A et B dans le cytosol des cellules visées. Néanmoins le mécanisme d'entrée des granzymes par les pores de perforine est encore controversé.

Si certaines équipes pensent que les granzymes peuvent traverser les pores de perforine à la surface des cellules (Podack 1985; Tshopp 1985; Sauer 1991) d'autres pensent qu'ils en sont incapables, seulement des ions (Ca^{2+} , Na^{2+}) le pourraient (Mektar 2002). En effet, l'équipe de Trapani a pu observer qu'à d'extrêmes concentrations (> 4000 U/ml) la perforine était en mesure de faire des pores assez larges mais qu'à faible concentration la taille des pores n'était pas suffisante (Browne 1999). L'endocytose serait alors un autre mécanisme envisagé. Même si les granzymes peuvent être endocytés sans perforine (Froelich 1996), la présence de perforine est requise pour augmenter l'efficacité de leur endocytose (Keefe 2005). La perforine et les granzymes seraient endocytés dans un endosome précoce suite au processus de réparation des membranes qui a lieu après l'influx de Ca^{2+} généré par les petits pores de perforine en surface. Cette endocytose dépendante de la clathrine et de la dynamine (Thiery 2010) serait suivie par des événements de fusion qui conduiraient à la formation d'un endosome géant EEA1+ (Early endosome antigen 1) (Thiery 2011). La perforine serait alors capable de former un pore assez large pour laisser passer les granzymes (Théorie du gigantesme) (Browne 1999; Keefe 2005) (Pipkin 2007; Thiery 2011) qui une fois relargués dans le cytoplasme seraient transloqués en direction du noyau (**Figure 17**).

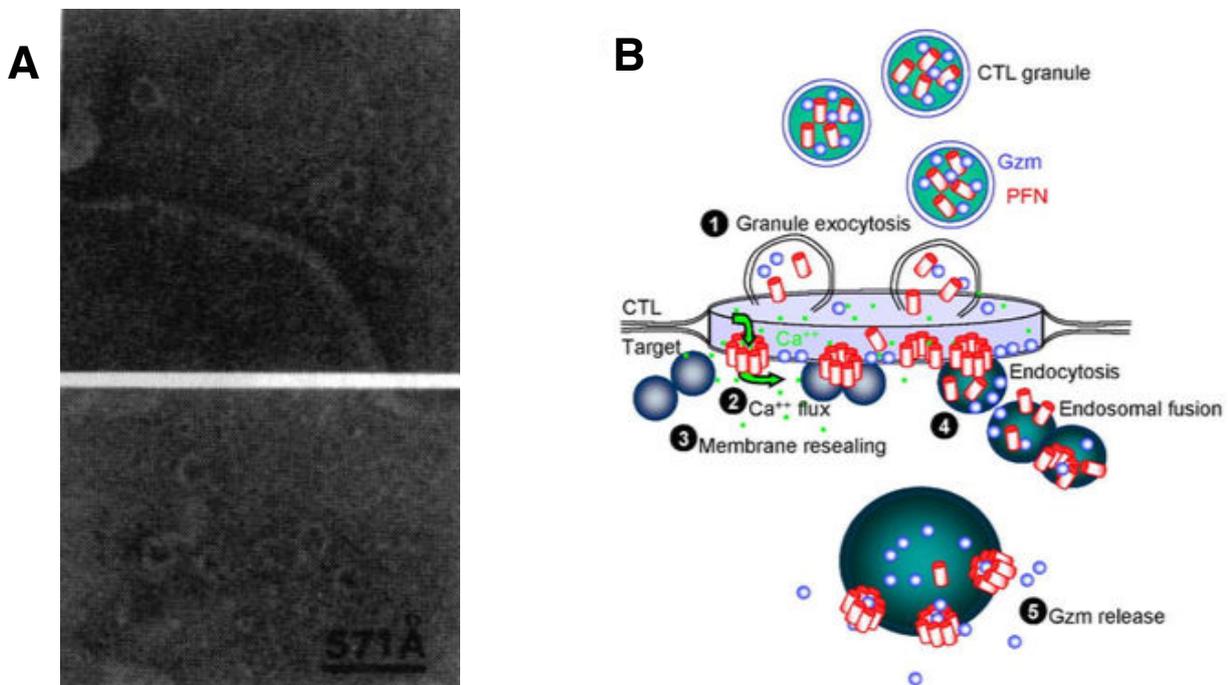


Figure 17: A) Podack 1985: Microscopie électronique de membranes d'érythrocytes lysés par le complexe perforine. B) Keefe 2005: Schéma récapitulatif de la théorie du gigantesme

Cependant, on pourrait penser que ce processus est impossible, car l'action de la perforine est inhibée à pH acide (dans l'endosome). Mais une étude récente a démontré que le processus

d'acidification qui a lieu dans les endosomes est absent du gigantesme. En effet, les pores créés par la perforine interfèreraient avec la mise en place du gradient de pH (Thiery 2011).

Protection intracellulaire contre l'action de la perforine: L'activité de la perforine doit être régulée afin qu'elle ne s'attaque pas aux membranes intracellulaires des LTc. Plusieurs mécanismes ont donc été mis en place par le LTc pour se protéger.

- ▶ Tout d'abord, la perforine est synthétisée sous la forme d'un précurseur inactif qui a besoin d'être clivé par une **cystéine protéase** pour être actif (Ullner 1997). Ce clivage protéolytique ne peut se faire qu'à pH acide, c'est à dire au sein des granules lytiques. Une fois clivée le domaine C2 de la perforine est libérée, ce qui permet à la perforine de se fixer aux membranes lipidiques.
- ▶ Cependant cette fixation ne peut uniquement se faire qu'à **pH neutre**, c'est à dire au niveau de la fente synaptique. En effet, à pH acide les résidus aspartates du domaine C2 sont protonés ce qui empêche la fixation des ions Ca^{2+} .
- ▶ Le **calcium** est donc aussi un paramètre limitant de la perforine. La concentration en calcium étant faible durant la synthèse et le transport de la perforine en direction de la membrane plasmique du LTc, cette dernière ne pourra donc pas se fixer aux membranes internes. (Podack 1985).
- ▶ La **calréticuline** présente dans les granules lytiques est aussi un inhibiteur de la perforine, néanmoins son mode d'action est encore inconnu (stabilisation des membranes? chelateur du calcium?) (Dupuis 1993; Fraser 2000).

Protection extracellulaire du LTc contre l'action de la perforine: Les mécanismes permettant aux LTc et cellules NK d'être résistants à la perforine, une fois que cette dernière est sécrétée, sont encore méconnus.

- ▶ Néanmoins, de récentes études émettent l'hypothèse qu'après le relargage des granules lytiques, les molécules **Lamp-1**, présentes initialement sur les granules puis sur la membrane plasmique une fois les granules sécrétés, auraient une fonction protectrice. En effet, elles empêcheraient la fixation de la perforine sur les LTc (Cohen 2013).
- ▶ Concernant la **cathepsine B**, une étude réalisée en 2002 lui accorde un rôle protecteur (Balaji 2002) alors que l'équipe de Trapani, grâce à des souris déficientes en cathepsine B, démontre qu'elle n'est pas impliquée dans la protection des LTc (Baran 2006). Son implication est donc encore controversée.

Les granzymes:

Les granzymes exprimés au niveau des LT et cellules NK, appartiennent à la famille des sérines protéases, on en retrouve 11 chez la souris notés de A à N. Néanmoins, les granzymes A et B sont ceux retrouvés majoritairement au niveau des LTc et cellules NK (Prendergast 1992) et ce sont ceux dont la fonction a été la mieux décrite jusqu'à présent. Les autres granzymes dit

« orphelins » ont été peu étudiés, leurs fonctions restent jusqu'alors pour la plupart inconnues (Jenne 1988; Grossman 2003). Les granzymes ont la propriété de cliver les protéines après les résidus aspartates excepté pour les granzymes A et K qui ont eux une activité de type tryptase et le granzyme K qui clive après des résidus leucine ou methionine.

Protection des LTc contre l'action des granzymes:

- ▶ Les granzymes synthétisés sous forme inactive ont besoin d'être clivés pour devenir actifs (Jenne 1988). En effet, ils possèdent une courte séquence propeptidique, de 2 à 3 acides aminés, qui sera clivée à leur entrée dans le granule lytique. Ce clivage est réalisé par l'**enzyme DPPI** (Dipeptidyl Peptidase I) que l'on appelle aussi cathepsine C (McGuire 1993). Néanmoins malgré ce clivage, les granzymes restent inactifs compte tenu du **pH** acide présent au sein du granule lytique. Ce n'est qu'une fois sécrétés qu'ils deviendront actifs lorsque le pH se trouve aux alentours de 7.
- ▶ Concernant le granzyme B un autre mécanisme de protection a été décrit: La **serpin B9** (serine protease inhibitor B9), présente en grande quantité dans le noyau et cytoplasme des LTc est sécrétée en même temps que les granzymes B et protège les LTc de l'autolyse. En effet, des cellules transfectées avec la serpin B9 deviennent résistantes à l'action des granzymes B et l'efficacité de la protection est corrélée à la quantité de serpin B9 contenue dans les cellules (Bird 1998). L'expression de la serpin B9 est induite en réponse à la production de granzyme B mais cette protéine est aussi retrouvée en plus petite quantité au sein d'autres cellules comme les cellules présentatrices d'antigène qui sont alors, elles aussi, protégées de l'action des granzymes B (Hirst 2003).

Mode d'action du granzyme B: (Voir Figure Résumé 18)

- ▶ Le granzyme B engendre la mort des cellules cibles par le biais du clivage de caspases (cystéines protéases pro-apoptotiques). En effet, il peut directement **cliver les caspases 3, 7, 8 et 10** pour induire la voie d'apoptose des cellules. Néanmoins, la caspase 3 reste la principale cible du granzyme B et conduit au clivage d'un grand nombre de substrats dont notamment d'autres caspases comme les caspases 2, 6 et 9. De plus, le clivage des caspases 8 et 10 par le granzyme B reste incomplet, la caspase 3 doit intervenir dans un second temps pour terminer l'activation de ces deux caspases. La caspase 3 est donc là pour disséminer le signal de mort délivré par le granzyme B (Adrain 2005).
- ▶ Le granzyme B est aussi capable de cibler directement l'intégrité de la mitochondrie. En effet, il peut **cliver la protéine pro-apoptotique Bid** (BH3-interacting domain death agonist) (Sutton 2000) ce qui induit l'oligomérisation des protéines BAX (Bcl2 associated X protein) et/ou BAK (Bcl2 antagonis/killer) en des pores perméabilisant la membrane mitochondriale extérieure (Heiben 2000). Cette destruction de la membrane mitochondriale conduit alors au relargage de cytochrome c, de EndoG (endonucléase G) et de HtrA2 (HtrA Serine Peptidase 2). La libération du **cytochrome c** permet la formation de l'apoptosome *via* son interaction avec

APAF1 (apoptotic peptidase activating factor 1) et la procaspase-9 et ainsi déclenche la voie d'apoptose mitochondriale. La libération de la **DNase EndoG** induit des dommages à l'ADN indépendamment de l'action des caspases (Li 2001) et **HtrA2** est une serine protéase qui bloque l'action de XIAP (X chromosome-linked inhibitor of apoptosis) un inhibiteur des caspases 3, 7 et 9. (Suzuki 2001).

- ▶ Le granzyme B, mais aussi la caspase-3 activée par ce dernier, sont capables d'induire la libération de la protéine CAD (caspase-activated DNase) en **clivant son inhibiteur ICAD** (Thomas 2000). La protéine **CAD** est une DNase qui va alors entrer dans le noyau pour induire des cassures de l'ADN (Enari 1998).
- ▶ Le granzyme B peut cibler les constituants du cytosquelette et ainsi perturber la dynamique du réseau de microtubules, du réseau d'actine et des filaments intermédiaires des cellules cibles. Il a été démontré que le granzyme B engendre le **clivage du domaine d'auto-inhibition en C-ter de l' α -tubuline**, ce qui conduit à l'apparition de microtubules plus long et d'un diamètre plus élevé (Adrain 2006). Il est aussi capable de cibler **la β -actine** (Bredemeyer 2004) et la **lamine B** qui compose les filaments intermédiaires de l'enveloppe nucléaire (Zhang 2001). La destruction de l'enveloppe nucléaire est essentielle à l'induction des dommages à l'ADN engendrés par les voies dépendantes ou indépendantes des caspases.
- ▶ Pour finir, il peut aussi cibler les mécanismes de réparation de l'ADN. En effet, le granzyme B peut soit cliver directement **PARP** (Poly ADP-Ribose Polymerase), un senseur des dommages à l'ADN, soit activer **les protéases ICE** (Interleukin 1beta-converting enzyme like) capables,

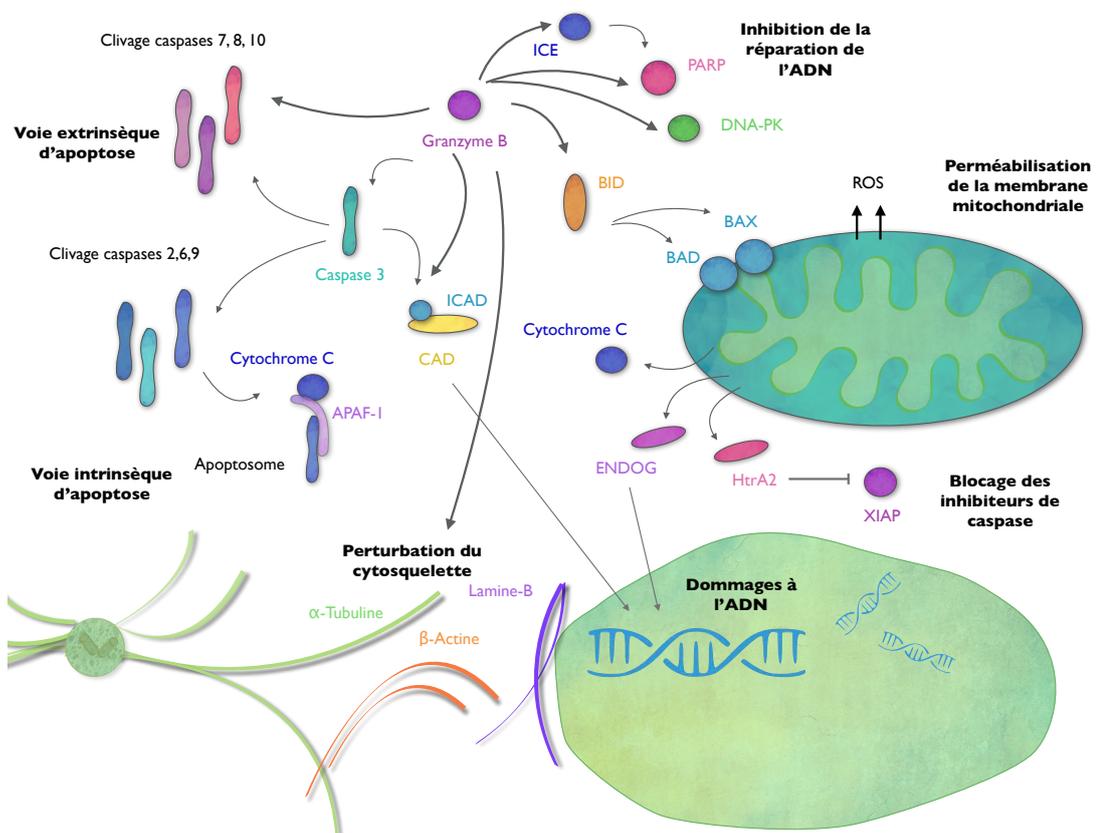


Figure 18: Schéma récapitulatif du mode d'action du granzyme B

elles aussi, de cliver PARP (Froelich 1996). Il peut aussi cliver la **DNA-PK** (DNA-dependent protein kinase) elle aussi impliquée dans la réparation des cassures double brins de l'ADN (Andrade 1998).

Mode d'action du granzyme A: Le granzyme A comparé au granzyme B n'induit pas l'activation des caspases ou le relargage de cytochrome c de la mitochondrie.

- ▶ Néanmoins, il conduit à la dépolarisation de la membrane mitochondriale ce qui la rend non fonctionnelle en **clivant NDUF3** (NASH:Ubiquinone oxidoreductase complex assembly factor 3 - protéine importante pour la chaîne de transport d'électron au niveau de la chaîne respiratoire) et ainsi induit la production d'espèces réactives de l'oxygène (Martinvalet 2008)
- ▶ Le granzyme A peut engendrer des lésions à l'ADN de type simple brin en ciblant le complexe SET qui contient la protéine suppresseur de tumeurs pp32 (Acidic nuclear phosphoprotein 32 family member A), la DNase NM23-H1 (NME/NM23 nucleoside diphosphate Kinase 1) ainsi que trois substrats du granzyme A: **SET** (nucleosome-assembly protein), **HMG2** (DNA-binding protein high-mobility group protein 2) et **APE1** (the base excision repair enzyme apurinic/aprimidinic endonuclease 1). Suite à l'augmentation des dérivés de l'oxygène présents dans la cellule, le complexe SET va entrer dans le noyau. Le granzyme A clive ensuite les protéines du complexe qui inhibaient **NM23-H1**. La DNase ainsi libérée est alors capable d'engendrer des cassures de l'ADN. (Fan 2003).
- ▶ Le granzyme A en **dégradant l'Histone H1** induit une décondensation de la chromatine qui devient plus accessible aux nucléases exogènes susceptibles de la dégrader (Zhang 2000).
- ▶ Tout comme le granzyme B, le granzyme A peut cliver la **laminine B** mais aussi la **laminine A et C** (Zhang 2001).
- ▶ Le granzyme A peut aussi agir en surface. Il peut par exemple activer la **cytokine pro-inflammatoire IL-1 β** en clivant son pro-peptide (Imler 1995) ou encore inhiber l'aggrégation plaquettaire en clivant le **récepteur à la thrombine** (Suidan 1996).

Mode d'action des granzymes orphelins (de C à N):

- ▶ **Le granzyme C** peut tuer les cellules cibles en engendrant une rapide dépolarisation mitochondriale (indépendante du clivage de Bid) et des dommages nucléaires par le biais de cassures simple brin de l'ADN. Les dommages engendrés au niveau de la membrane mitochondriale sont particulièrement marqués avec la formation de pores qui permettent la libération du cytochrome c. Mais étrangement le cytochrome c relargué ne conduit pas à l'activation des caspases. Les spécificités enzymatiques du granzyme C ainsi que le mécanisme qui conduit à l'apoptose sont encore méconnus (Johnson 2003).
- ▶ **Le granzyme F** n'induit pas le clivage de Bid ou SET mais on observe une dépolarisation de la membrane mitochondriale avec un relargage du cytochrome C sans activation des caspases (Shi 2009).

- ▶ **Le granzyme K** conduit à la libération de réactifs de l'oxygène, de cytochrome C, de EndoG par le biais du clivage de **Bid** mais n'active pas la voie des caspases (Zhao 2007). De plus, il engendre des cassures à l'ADN de type simple brin en clivant notamment le **complexe SET** pour libérer NM23-H1. Les voies qu'il utilise sont différentes de celles médiées par les granzymes B et C mais semblent partager des similarités avec celles médiées par le granzyme A. Néanmoins le granzyme K, contrairement au granzyme A, est capable de cliver la **tubuline- β** (Bovenschen 2009). D'autres fonctions non cytotoxiques ont aussi été attribuées au granzyme K. En effet, il est capable d'induire la sécrétion de cytokines (IL-6, IL-8, MCP-1) grâce à l'activation du récepteur **PAR-1** (Protease-activated receptor-1) (Cooper 2011).
- ▶ **L'implication du granzyme M** dans le mécanisme d'apoptose est encore controversée même si ses substrats comme **ICAD**, **PARP** et l' **α -tubuline** pourraient induire la mort des cellules. On lui associe aussi des fonctions non-cytotoxiques. Le granzyme M aurait la capacité d'inhiber la réplication virale, d'induire des réponses inflammatoires et de réguler la coagulation (clivage du facteur de Von Willebrand) (De Poot 2014).
- ▶ Les fonctions des autres granzymes orphelins restent inconnues.

Pour que les LTc puissent tuer les cellules cibles par le biais de leurs granules remplis de perforine et de granzymes, une structure très organisée dans le temps et dans l'espace doit se mettre en place: il s'agit de la synapse immunologique.

2- La mise en place de la synapse immunologique:

a) La signalisation induite par la reconnaissance de l'antigène par le TCR: (Voir Figure Résumé 19)

Toute une cascade de signalisation va se mettre en place suite à la reconnaissance du complexe peptide/CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) par le TCR. Tout d'abord on observe la déphosphorylation des kinases FYN (Fyn proto-oncogene, Src family tyrosine kinase) et LCK (Lymphocyte cell-specific protein tyrosine kinase) par des phosphatases régulatrices comme CD45. Ces deux kinases vont ensuite aller phosphoryler les motifs ITAMs (immunorecepteur tyrosine-based activation motifs) des molécules CD3 associées au TCR. Cette phosphorylation permet alors le recrutement de la kinase ZAP70 (Zeta-chain associated protein kinase) qui une fois phosphorylée par LCK peut recruter et phosphoryler à son tour d'autres protéines: LAT (Linker for activation of T cell) et SLP76 (SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa). LAT recrute un grand nombre de protéines de signalisation pour former un complexe multiprotéique appelé le signalosome. Le signalosome est composé des molécules comme VAV1 (Vav guanine nucleotide exchange factor 1), ADAP (adhesion and degranulation promoting adaptor protein), GADS (Grb2-related adaptor downstream of Shc), ITK (interleukine-2 inducible T cell kinase), GRB2 (Growth factor receptor-bound protein 2), NCK1 (NCK adaptor protein 1) et PLC γ 1 (Phospholipase C γ 1),

une phospholipase qui permet la conversion de PIP2 (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) en IP3 (Inositol trisphosphate) et DAG (diacylglycerol).

Le signalosome va ensuite permettre l'induction de trois voies de signalisation: la voie calcium dépendante, la voie des MAPK (Mitogen-activated protein kinase) et la voie NF- κ B (nuclear factor-kappa B) qui vont permettre la transcription des gènes importants pour la prolifération et différenciation des LTc. Pour finir, le signalosome va aussi jouer un rôle dans l'adhésion cellulaire mais aussi dans la réorganisation du cytosquelette (Brownlie 2013).

En effet, suite à l'activation du TCR on observe une complète réorganisation du cytosquelette du LTc: des évènements de polarisation successifs vont avoir lieu. D'abord du réseau d'actine puis du MTOC et enfin des granules lytiques en direction de la zone de contact formée entre les deux cellules que l'on appelle la synapse immunologique (**Figure 19**).

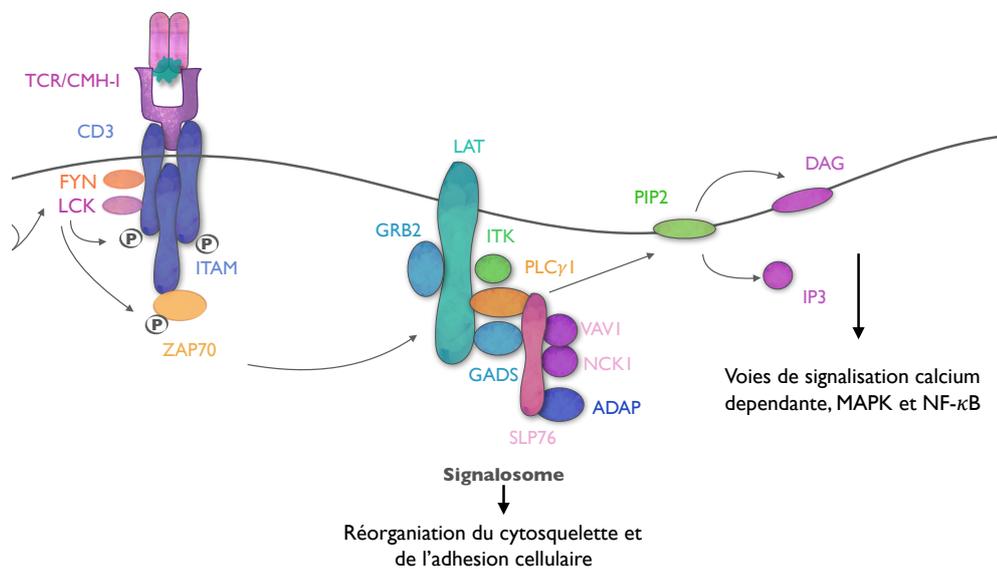


Figure 19: Schéma récapitulatif de la signalisation induite par le TCR

b) Les différentes zones de la synapse immunologique:

Une structure concentrique: La synapse immunologique a été décrite pour la première fois en 1998 lors d'un contact entre un LT CD4+ et une cellule présentatrice d'antigène (Monks 1998). Cette structure a ensuite été confirmée dans les LTc en 2001 (Stinchcombe 2001)(**Figure 20**). Suite à l'interaction entre un LTc et une cellule présentatrice d'antigène, on observe une complète réorganisation du site de contact en plusieurs zones distinctes. Le cSMAC (central supramoléculaire activation complex) qui contient le TCR et les protéines associées importantes pour la signalisation. Le pSMAC (peripheral supramoléculaire activation complex), qui contient les molécules d'adhésion comme LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen 1) et les molécules associées comme TALIN (Monks 1998). Le dSMAC (distal

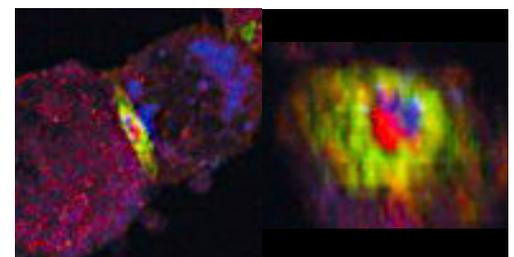


Figure 20: Microscopie d'une synapse: pSMAC en vert (LFA-1), cSMAC en rouge (LCK), domaine de sécrétion en bleu (cathepsine D) (Stinchcombe 2001)

supramoléculaire activation complex) qui contient l'actine ou les grosses molécules comme la phosphatase CD45. Et pour finir, un domaine de sécrétion, qui correspond au lieu de polarisation et d'exocytose des granules lytiques, dans la partie centrale de la synapse distincte du cSMAC (Stinchcombe 2001) (**Figure 21**).

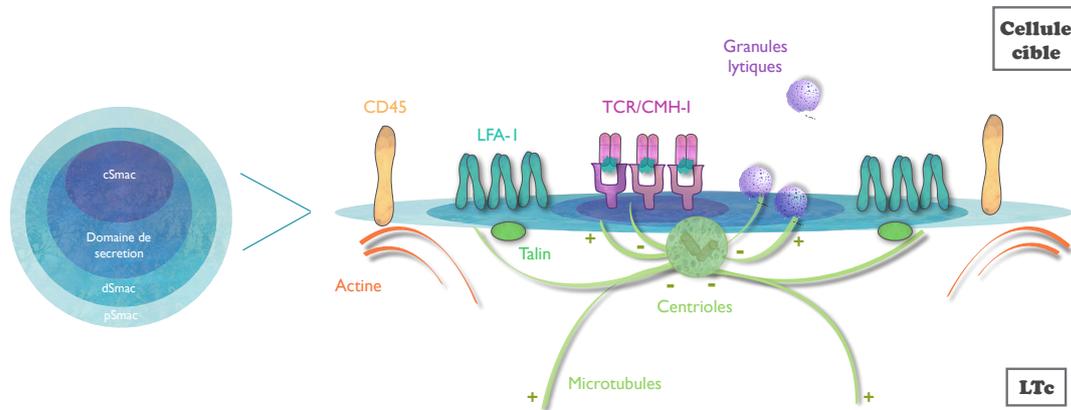


Figure 21: Schéma récapitulatif de l'organisation concentrique de la synapse immunologique

Cette synapse immunologique est une zone hautement dynamique où le réseau de microtubules et d'actine vont subir de profonds remaniements et où de nombreux processus d'endocytose et d'exocytose vont avoir lieu.

c) Remaniement du réseau d'actine et de microtubules:

Accumulation puis délocalisation des molécules d'actine:

Quelques secondes après la reconnaissance de l'antigène par le TCR, on observe tout d'abord une polymérisation et accumulation d'actine au niveau de la synapse (Ryser 1982). Puis quelques secondes plus tard, elle se délocalise vers la périphérie pour former le dSMAC (Stinchcombe 2006; Ritter 2015). Cette polymérisation puis relocalisation de l'actine, qui conduit à la l'apparition de protrusions sous forme de lamellipode, est importante pour former un contact stable entre le LTe et la cellule cible. Ce réseau est aussi important pour la réorganisation du réseau de microtubules et la signalisation induite par le TCR.

Molécules impliquées dans la polymérisation de l'actine au niveau de la synapse:

► Parmi les protéines découvertes comme importantes pour la polymérisation du réseau d'actine, on retrouve celles appartenant à la famille des protéines du syndrome de Wiskott-Aldrich comme **WAVE2** (Verprolin-homologue protein-2) (Nolz 2006) et **WASp** (Wiskott-Aldrich syndrome protein) (Kumari 2015), mais aussi les protéines qui servent à leur activation ou qui interagissent avec elles tel que PKC δ (Protein Kinase C δ) (Wei 2014), Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1), Cdc42 (Cell division cycle 42) (Kim 2000) et HS1 (Hematopoietic lineage cell-specific protein-1) (Kumari 2015). Les protéines WASp et WAVE2 sont connues pour réguler l'activation du **complexe Arp2/3** impliqué dans la polymérisation du réseau d'actine. La protéine HS1 intervient plutôt dans la stabilisation du réseau d'actine et les autres protéines comme PKC δ , RAC1 et Cdc42 interviennent dans la cascade qui conduit à

l'activation de WASp et WAVE2. Toutes ces protéines se retrouvent recrutées au niveau du TCR et conduisent à l'accumulation d'actine au niveau de la synapse immunologique. Le recrutement de WASp/WAVE2 se fait par l'intermédiaire la molécule NCK1 du signalosome (Barda-Saad 2005) et leur activation *via* l'activation des Rho GTPases RAC1 (Miletic 2009) et Cdc42 (Stowers 1995) par la RhoGEF VAV1. Les molécules de la signalisation du TCR comme LAT, SLP76, ZAP70 mais aussi celles du signalosome comme VAV1 et NCK1 jouent donc un rôle central dans la réorganisation du réseau d'actine en modulant l'action de WASp et WAVE2.

- ▶ La protéine **IQGAP1** (Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1) serait également impliquée dans la régulation de l'accumulation d'actine au niveau de la synapse. Effectivement en l'absence de IQGAP1, on observe une augmentation de l'accumulation d'actine. IQGAP1 agirait donc pour dépolymériser l'actine (Gorman 2012).
- ▶ Les **formines** sont des protéines impliquées dans la nucléation des filaments d'actine. Elles permettent l'ajout de sous-unités d'actine tout en empêchant les protéines de coiffe de mettre fin à la polymérisation. Les formines DIA1 (Deleted in autism protein A), FMNL-1 (Formin-like-1) et INF2 (Inverted formin-2) recrutées au niveau de la synapse immunologique n'ont néanmoins pas été impliquées dans la polymérisation de l'actine au niveau de la synapse. Ces formines auraient un rôle tout autre et agiraient au niveau du réseau de microtubules (voire partie polarisation MTOC) (Gomez 2007; Andrés-Delgado 2012).

Molécule impliquée dans la formation de l'anneau d'actine périphérique:

- ▶ L'accumulation de **PIP3** (Phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate) serait nécessaire à la formation de l'anneau d'actine périphérique. En effet, la présence de PIP3 uniquement en périphérie permet le recrutement de la protéine Dock2 qui induit alors la polymérisation d'actine périphérique en activant la Rho-GTPase RAC1 (Le Floc'h 2013).
- ▶ La délocalisation du réseau d'actine en périphérie serait dû à un changement de composition de la membrane plasmique. Effectivement, les phospholipides membranaires **PIP2** ne serait plus présent dans cette zone (cSMAC) (Ritter 2015) alors qu'il permettait le recrutement et l'activation de protéines nécessaires à la polymérisation de l'actine (Raucher 2000) comme WASp qui active le complexe Arp2/3 (Janmey 2004).

L'importance du réseau d'actine dans la signalisation: L'accumulation d'actine et des molécules associées seraient aussi importantes pour la signalisation induite par le TCR et donc participeraient à l'activation du LTc. En effet, plusieurs équipes ont pu démontrer que le blocage de cette accumulation d'actine conduit à des défauts de signalisation du TCR proximaux comme distaux (Valitutti 1995; Bunnell 2001; Varma 2006; Kumari 2015) mais aussi à des défauts de formation et de transport des microclusters de TCR (Campi 2005).

Hypothèse des multiples réseaux d'actine: Dans l'article de Kumari et al 2015 une idée émerge sur l'importance fonctionnelle des différents réseaux d'actine qui peuvent se mettre en

place au cours de la formation de la synapse immunologique. Pour exemple, les chercheurs démontrent que le réseau d'actine induit par WASP est important pour la phosphorylation de la PLC γ 1 nécessaire à la conversion de PIP2 en IP3 et DAG mais ne serait pas impliqué dans la signalisation proximale (activation de ZAP70) ni dans la formation des microclusters de TCR (Kumari 2015). Une autre équipe implique, elle, le réseau d'actine formé par WAVE2 dans l'import de calcium extracellulaire par les canaux CRAC (Calcium release-activated channels) et non dans la signalisation de PLC γ 1 (Nolz 2006). Ainsi différents réseaux d'actine seraient amenés à être formés et auraient des actions différentes sur la signalisation du LTc.

La polarisation du MTOC:

Le MTOC, appelé aussi centrosome, contient deux centrioles et c'est aussi l'endroit où l'on observe la formation des microtubules. La première observation de la polarisation du MTOC a été faite en 1982 (Geiger 1982)(**Figure 22**): Le MTOC, au début localisé près de la membrane nucléaire, va se déplacer en direction de la synapse immunologique. Le mouvement généré par le MTOC conduit alors à une réorganisation complète du réseau de microtubules et induit le mouvement d'autres organites associés, comme l'appareil de Golgi (Kupfer 1984), les centrioles et les compartiments de recyclage. De nombreuses études ont par la suite identifié les diverses molécules et mécanismes responsables de cette polarisation.

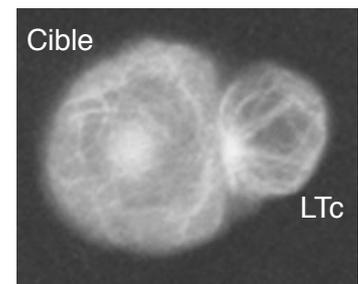


Figure 22: Immunofluorescence d'un LTc et de sa cible montrant la polarisation du MTOC en direction de la zone de contact (Geiger 1982)

Molécules impliquées dans la polarisation du MTOC:

- ▶ La polarisation du MTOC dépend de la **signalisation induite par le TCR**. En effet, les molécules de la signalisation proximale du TCR ont été impliquées dans ce processus comme les kinases LCK/FYN (Tsun 2011), ZAP70 (Blanchard 2002) et les adaptateurs SLP-76 (Kuhne 2003), LAT (Bunnel 2001). La polarisation du MTOC engendrée est aussi importante pour la signalisation du TCR, elle permettrait son maintien après la stimulation antigénique (Martin-Cofreces 2008).
- ▶ Des protéines comme **PAR3** (par-3 family cell polarity regulator) et **PAR-1B** (Ser/Thr protein kinase PAR-1B) (déjà impliquées dans la polarisation des cellules épithéliales) seraient transloquées vers la synapse immunologique des LTc et joueraient un rôle dans la polarisation des LTc grâce à la distribution asymétrique de molécules importantes pour la polarisation des LTc. Des défauts en PAR3 et PAR-1B conduisent en effet à des défauts de polarisation de la cellule et du MTOC (Ludford-Menting 2005; Lin 2009).
- ▶ Un autre composant de la signalisation du TCR important pour la polarisation du centrosome est l'accumulation de **DAG** au centre de la synapse. DAG est un second messenger lipidique généré par PLC γ 1 suite à l'activation du TCR et qui permettrait le recrutement de dynéines

nécessaires à la polarisation du MTOC grâce au recrutement et à l'activation de protéines kinases C (Quann 2009; Liu 2013). L'implication des **dynéines** dans le processus de translocation du MTOC a fait l'objet de nombreuses études. En effet, d'autres équipes ont pu démontrer que la protéine du signalosome **ADAP** est impliquée dans le recrutement des dynéines au niveau de la synapse et sans ADAP un défaut de polarisation du MTOC est observé (Comb 2006). Effectivement, les dynéines qui s'accumuleraient au niveau de la synapse génèreraient des tensions qui permettraient au MTOC de se polariser (Martin-Cofreces 2008).

- ▶ D'autres forces motrices ont été impliquées dans ce mécanisme de translocation et notamment la **myosine II** (non musculaire) qui est elle aussi recrutée par DAG. Ces mouvements seraient donc le fruit d'une collaboration entre ces deux moteurs: Les dynéines génèreraient un mouvement de traction du MTOC en direction de la synapse et les myosines, situées derrière le MTOC, le pousseraient par le biais des interactions existantes entre le réseau d'actine et de microtubules (Liu 2013).
- ▶ L'**EZRINE** serait impliquée dans la polarisation du MTOC et dans l'intégrité du réseau par le biais de son interaction avec Dlg1 (Discs large scaffold protein 1). En effet ces deux protéines seraient nécessaires au positionnement des microtubules en périphérie de la synapse ce qui conduirait au rapprochement du MTOC à la synapse. L'EZRIN ne serait en revanche pas impliquée dans le remodelage du réseau d'actine (Lasserre 2010).

Lien existant entre le remodelage du réseau d'actine et de microtubules:

- ▶ Plusieurs équipes démontrent **l'implication du réseau d'actine** dans la polarisation du centrosome. En effet, la polarisation du centrosome commence uniquement une fois la délocalisation de l'actine effectuée (Ritter 2015)(**Figure 23**).

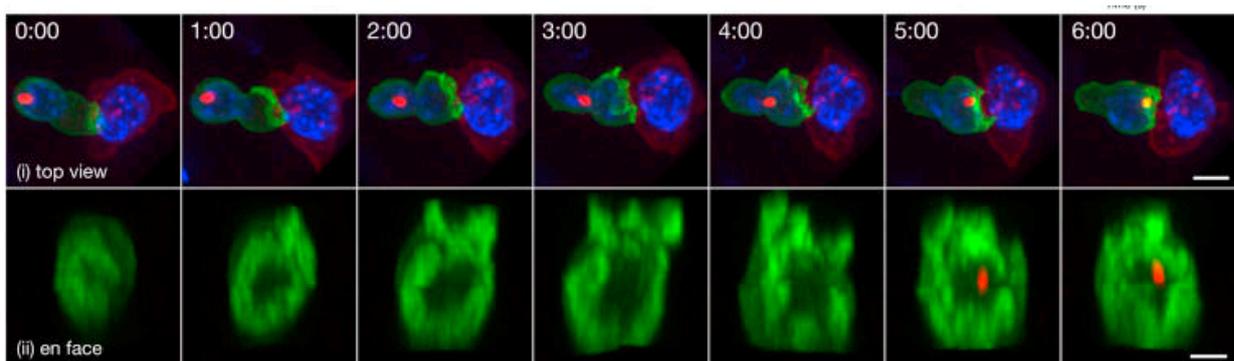


Figure 23: Imagerie montrant la migration du centrosome (en rouge) suite à la déplétion de l'actine (en vert) du centre de la synapse (Ritter 2015).

- ▶ Les protéines permettant la polymérisation du réseau d'actine ont aussi été impliquées dans la polarisation du réseau de microtubules. C'est par exemple le cas de la protéine du signalosome VAV1 (Ardouin 2003) qui active les Rho GTPases RAC1 (Miletic 2009) et Cdc42 (Stowers 1995) impliquées dans l'activation de WASp/WAVE2. Mais c'est aussi le cas des **formines** (protéines impliquées dans la nucléation des filaments d'actine) comme DIA1, FMNL1 (Gomez 2007) et INF2 (Andrés-Delgado 2012) qui sont activées par les Rho GTPases

RAC1 et Cdc42 (Andrès-Delgado 2013) et qui participent à la polarisation du MTOC en détyrosinant les microtubules. Effectivement la **détyrosination** des microtubules les rend plus résistants à la dépolymérisation ce qui conduit à une asymétrie du réseau de microtubules. Cette asymétrie pourrait aussi conduire à un recrutement différentiel de molécules se liant au réseau, ce qui permettrait la polarisation du MTOC. Pour exemple la kinesine-1 que nous avons étudiée interagit préférentiellement avec la tubuline détyrosinée (Dunn 2008).

▶ Des molécules faisant le lien entre le réseau de microtubules et d'actine ont aussi été impliquées. C'est par exemple le cas de la protéine **IQGAP1** qui s'associe aux extrémités positives des microtubules mais aussi à l'actine. Le réseau d'actine serait alors capable de tracter le réseau de microtubules lors de sa réorganisation (Stinchcombe 2006). En effet, la déplétion de IQGAP1 par shRNA (Short hairpin RNA) conduit à des défauts de polarisation du MTOC dans les cellules NK (Kanwar 2011). Néanmoins cette fonction de IQGAP1 reste controversée car une autre équipe montre que l'inhibition de IQGAP1 ne conduit pas à des défauts de polarisation du MTOC dans les LTc conjugués à des cellules présentatrices d'antigène (modèle murin déficient pour IQGAP1 / éventuelle compensation?) (Gorman 2012).

d) **Le cSMAC:**

Compte tenu du nombre de molécules de signalisation qui s'accumulent au niveau du cSMAC, comme les TCR, il a d'abord été suggéré que cette région était la zone d'induction de la signalisation. Mais des études récentes ont pu démontrer que l'induction de la signalisation se faisait plutôt en périphérie, au niveau du pSMAC, et que le cSMAC serait un lieu d'arrêt de la signalisation voir de « downrégulation » de cette dernière. Le cSMAC est aussi l'endroit où de nombreux processus d'endocytose et d'exocytose vont avoir lieu avec un flux permanent de molécules régulatrices ou de signalisation.

Mise en place d'une zone riche en évènements d'endocytose et d'exocytose:

La polarisation du MTOC va permettre l'arrivée d'autres compartiments au niveau de la synapse immunologique, comme l'appareil de Golgi ou des compartiments de recyclage, ce qui facilite l'apport de nouvelles protéines synthétisées ou le recyclage des molécules déjà présentes. Ainsi, une région riche en synthèses et échanges se crée au niveau de cette zone déjà très dynamique.

Le trafic des molécules de signalisation: La reconnaissance de l'antigène par le TCR déclenche une cascade de signalisation qui met en jeu de nombreuses molécules. Ces molécules de signalisation, au départ cytosoliques, ont besoin d'être recrutées au niveau de la synapse immunologique pour permettre l'activation du LTc. Ainsi, tout un trafic se met en place afin d'assurer l'apport des molécules de signalisation à la synapse grâce à un pool de vésicules intracellulaires.

La molécule LCK peut être transportée vers la synapse dans des endosomes de recyclage Rab11+. Ce transport serait régulé par la protéine **Unc119** (Uncoordinated 119) qui régule l'activation et l'interaction de Rab11 avec la myosin 5B présente sur le réseau d'actine (Gorska 2009). Le trafic de la molécule LCK en direction de la membrane plasmique est aussi orchestré par les protéines de transport **MAL** (MyD88-Adapter-Like) qui permettent tout comme Unc119 le transport de LCK du centrosome à la membrane plasmique (Anton 2011). Pour finir, la protéine **FIP3** (Rab11 family interacting protein 3) permet cette fois-ci le transport de LCK en direction du centrosome pour qu'elle puisse être adressée aux compartiments Rab11. En effet ce trafic serait médié par l'interaction de FIP3 avec Rab11 et les moteurs moléculaires de type dynéine (Bouchet 2017).

La Rho-GTPase RAC1 est aussi transportée au niveau de la synapse immunologique, afin de jouer son rôle de régulateur du réseau d'actine, *via* des endosomes de recyclage **Rab11** et ceci suite à l'intervention de **FIP3** (Bouchet 2016).

La molécule LAT est transportée au niveau de la synapse par le biais d'endosomes Rab27+Rab37+ et de la protéine R-SNARE **VAMP7**. Effectivement, en l'absence de VAMP7 on observe un défaut de recrutement de LAT et de sa phosphorylation (Larghi 2013).

Le trafic des molécules de TCR et la formation des microclusters: (Voir figure résumé 25)

Description des microclusters de TCR: Les microclusters de TCR ont été observés pour la première fois en 2000 grâce à la microscopie confocale (Krummel 2000). En effet, les molécules de TCR qui ont une faible affinité pour les complexes peptides/CMH se regroupent pour former des microclusters de TCR afin d'être plus sensibles aux faibles doses d'antigène (Schamel 2005). Ces microclusters, d'abord localisés en périphérie au niveau du dSMAC finissent par rejoindre le centre de la zone de contact et s'accumulent au niveau du cSMAC (Campi 2005).

Accumulation des molécules de TCR à la synapse: Les TCR sont recrutés au niveau du cSMAC en deux temps. Avant la polarisation du MTOC on observe une première vague de molécules de TCR en direction du cSMAC (translocation latérale au sein de la membrane plasmique). Puis une fois le centrosome transloqué, on observe une seconde vague de molécules de TCR apportée par un pool de vésicules intracellulaires (Ritter 2015). Cette deuxième vague de TCR serait alors médiée par un trafic vésiculaire impliquant les endosomes de recyclage. En effet, les molécules de TCR sont en permanence internalisées pour être recyclées et réadressées à la surface des cellules. Ainsi, lors d'un contact avec une cellule présentatrice d'antigène les TCR continuellement internalisés dans les endosomes de recyclage pourraient alors se polariser en direction de la synapse pour s'accumuler au niveau de la zone de contact (Das 2004). Les TCR recyclés peuvent emprunter deux voies: une boucle courte ou une boucle longue. En effet, les TCR recyclés sont adressés à des endosomes précoces Rab5 puis retournent soit directement à la membrane plasmique par l'intermédiaire de compartiments Rab4, soit transitent *via* ERC (endocytic recycling compartment: une série de tubules périnucléaires et de vésicules qui régulent

le recyclage de la membrane plasmique) et retournent en direction de la membrane plasmique par le biais d'endosomes de recyclage Rab11.

Les protéines impliquées dans la formation et le trafic des microclusters de TCR:

- ▶ **Le réseau de microtubules** est important pour le trafic des microclusters. D'abord il permet l'apport du pool de vésicules transportant de nouvelles molécules de TCR (Das 2004) puis permet le mouvement des microclusters de la périphérie vers le cSMAC (Lasserre 2010) grâce à des moteurs moléculaires de type dynéine (Hashimoto-Tane 2011) (**Figure 24**).

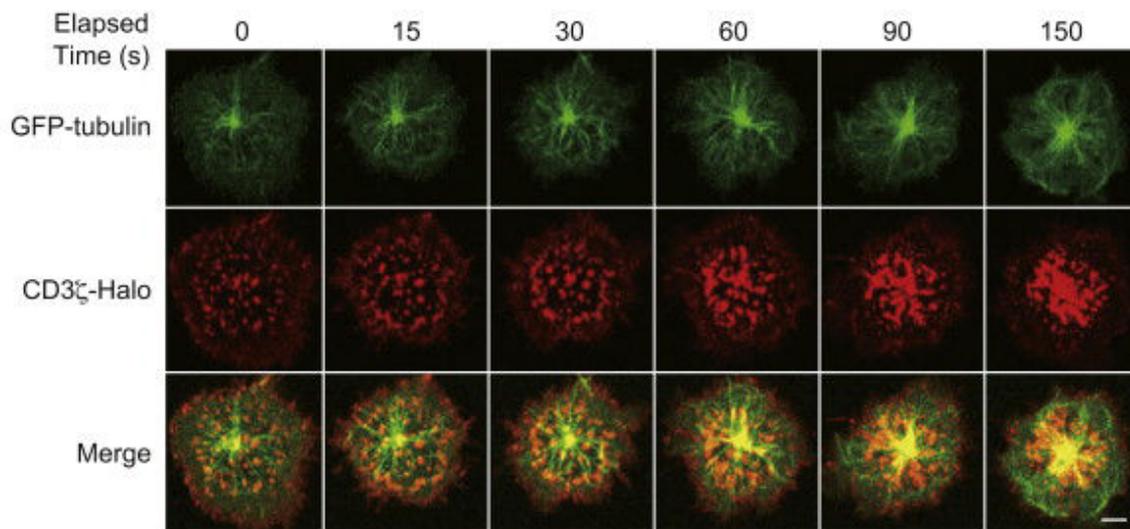


Figure 24: Imagerie montrant la translocation des microclusters de TCR le long des microtubules (HashimotoTane 2011)

- ▶ **Le réseau d'actine** est aussi impliqué dans le transport des TCR au niveau de la synapse. Ce n'est qu'après la délocalisation de l'actine en périphérie que l'on observe l'accumulation de microclusters de molécules de TCR qui se concentrent au niveau du cSMAC (zone où l'actine s'est dépolymérisée) (Beemiller 2012). Ainsi, quand on traite les cellules à la latrunculine-A, un agent qui dépolymérise le réseau d'actine, on observe l'inhibition de la formation des microclusters de TCR (Campi 2005; Kaizuka 2007) et leur transport (Kaizuka 2007; Yi 2012). Concernant la **myosine IIA**, son implication dans ce processus est encore controversée. Certaines études lui accordent une fonction dans le transport des microclusters de TCR (Yi 2012; Yu 2012) et d'autres non (Babich 2012; Beemiller 2012). Pour ces derniers seul le réseau d'actine serait impliqué dans ce processus.
- ▶ Il est évident que l'absence des molécules impliquées dans la réorganisation des réseaux d'actine et de microtubules va aussi conduire à des défauts de transport des microclusters compte-tenu du fait que ce transport est assuré par le biais de ces deux réseaux. C'est par exemple le cas de la protéine **EZRIN** impliquée dans le remodelage des microtubules et dont l'absence conduit à des défauts de relocalisation des microclusters. Effectivement, ces derniers s'agrègent en périphérie sans effectuer de mouvement centripète en direction du centre de la synapse (Lasserre 2010).

- Pour finir, le transport des TCR est régulé par des protéines importantes pour le trafic vésiculaire comme les protéines Rab et SNARE. La protéine **Rab35** colocalise avec les molécules de TCR (au niveau du MTOC) et participe à leur transport en direction de la synapse (Patino-Lopez 2008). La protéine **Rab29** en s'associant à Rab11 contrôlerait le trafic des molécules de TCR grâce à un recyclage dépendant des microtubules et des dynéines. En effet, Rab29 est capable d'interagir avec les dynéines pour permettre le transport des endosomes de recyclage en direction du MTOC (Onnis 2015). La protéine **VAMP7**, en plus de transporter LAT (Larghi 2013), serait aussi capable de transporter les TCR au niveau de la synapse (Soares 2013). La protéine **Rab8** contrôlerait les étapes d'arrimage et de fusion des vésicules contenant le TCR en recrutant la R-SNARE **VAMP-3** (Finetti 2015). Pour finir, le relargage des vésicules contenant les molécules de TCR et LAT serait aussi régulé par le senseur calcique **Synaptotagmine-7** (Soares 2013).
- Les protéines IFT (Intraflagellar transport) impliquées dans les transports au sein des cils seraient impliquées dans le transport des molécules de TCR. C'est notamment le cas de **IFT20** qui en formant un complexe avec Rab5 au niveau des endosomes précoces permettrait le trafic du TCR vers les endosomes de recyclage (Finetti 2014).

Ainsi les réseaux d'actine/microtubules et leurs protéines associées (moteurs moléculaires ou protéines régulatrices) mais aussi les protéines impliquées dans les trafics vésiculaires seraient nécessaires à l'accumulation des molécules de TCR au niveau de la synapse (**Figure 25**).

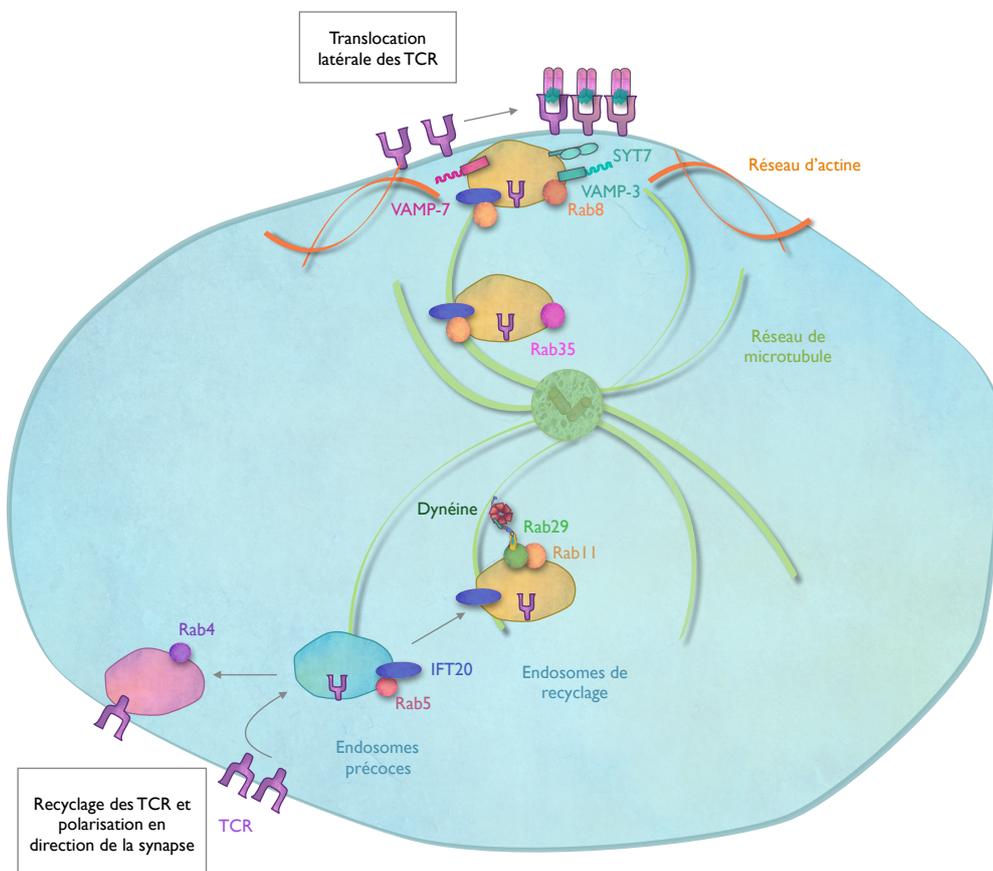


Figure 25: Schéma récapitulatif de la machinerie de transport du TCR

Le cSMAC: une zone importante pour la « downregulation » et le maintien de la signalisation et non pour son initiation

Le cSMAC ne serait pas le lieu où s'initie la signalisation. En effet, on observe une forte phosphorylation de LCK et ZAP-70 bien avant la formation du cSMAC. Ainsi l'activation du LTC commencerait bien avant la formation de la synapse immunologique (Lee 2002).

Le cSMAC jouerait alors un rôle dans la « downregulation » de la signalisation:

- ▶ Les molécules de TCR pourraient être dégradées au niveau du cSMAC. En effet, les TCR pourraient être ubiquitynylés puis pris en charge par une voie de dégradation lysosomale impliquant des corps multivesiculaires enrichis en lipide **LBPA** (lysobisphosphatidic acid). Effectivement, LBPA est nécessaire pour la dégradation de protéines membranaires (Matsuo 2004) et son accumulation est uniquement observée au niveau du cSMAC de la synapse immunologique (Varma 2006). De plus, l'ubiquitynylation des TCR se ferait grâce à l'intervention de la famille des ubiquitines ligases E3 **Cbl** (Lee 2003) et la reconnaissance des TCR ubiquitynylés pour leur adressage aux corps multivesiculaires par l'intermédiaire d'un membre de la machinerie ESCRT (complexe impliqué dans la biogenèse des granules): **TSG101** (Tumor susceptibility gene 101) (protéine importante pour le bourgeonnement et la scission de vésicules membranaires) (Vardhana 2010).
- ▶ La protéine **CD2AP** (CD2-associated protein) est une protéine connue pour se lier à l'actine et réguler l'endocytose des récepteurs en surface. Cette protéine pourrait donc induire l'endocytose puis la dégradation des molécules de TCR au niveau du cSMAC (Lee 2003).
- ▶ **TSG101** pourrait participer à un autre mécanisme de « downregulation ». En effet, les molécules de TCR s'accumuleraient au niveau du cSMAC dans des microvésicules. Ces microvésicules formées grâce à TSG101 bourgeonneraient du cSMAC et seraient capables d'être relarguées (*via* VPS4 (vacuolar protein sorting 4)) au niveau de la synapse. Ces microvésicules seraient alors capables d'aller reconnaître les complexes peptides/CMH (Choudhuri 2014).

Le cSMAC jouerait alors un rôle dans le maintien du signal d'activation:

Néanmoins le cSMAC semble aussi être une zone importante pour le maintien de la stimulation. En effet, les microclusters de TCR associés aux molécules de co-stimulation, comme CD28, sont transportés et s'accumulent au niveau du cSMAC. Une fois arrivés au niveau du cSMAC, les molécules de co-stimulation se détachent des microclusters de TCR pour aller former des « compartiments de co-stimulation ». Ces zones pourraient alors permettre le maintien de la stimulation dans le temps (Yokosuka 2008).

e) Le pSMAC:

Le pSMAC: une zone où se concentre les molécules d'adhésion

Le pSMAC est une zone où se concentrent des molécules d'adhésion qui vont permettre le rapprochement entre le LTc et sa cellule cible et ainsi délimiter une fente synaptique où seront sécrétés les granules lytiques. Les molécules d'adhésion d'abord présentes au niveau de toute la zone d'interaction vont se retrouver délocalisées en périphérie au niveau du pSMAC suite à la polarisation du MTOC pour permettre la délimitation de cette fente synaptique.

► En effet, suite au contact entre un LTc et une cellule présentatrice d'antigène, on observe un recrutement des protéines TALIN et intégrines LFA-1 au niveau de la zone d'interaction (Monks 1998). Puis après polarisation du MTOC, les protéines TALIN et LFA-1 migrent vers la périphérie pour former un anneau, le pSMAC (Stinchcombe 2001). Les molécules d'adhésion LFA-1 vont ensuite aller interagir avec les intégrines ICAM-1 présentes sur la cellule présentatrice d'antigène ce qui permet l'établissement et le maintien d'un contact stable entre le LTc et sa cible.

Le transport et l'activation des molécules d'adhésion: Le flux d'actine permet le maintien des molécules d'adhésion, comme LFA-1, en périphérie au niveau du pSMAC. Il se révèle aussi nécessaire à l'activation de LFA-1. En effet, LFA-1 peut interagir avec le réseau d'actine par le biais de protéines de liaison comme TALINE et les forces générées par le flux d'actine permettent de maintenir LFA-1 dans une conformation active (conformation allongée et ouverte) nécessaire à son interaction avec ICAM-1. L'immobilisation des molécules ICAM-1 est aussi nécessaire à ce changement de conformation par la génération de forces de résistances supplémentaires (Comrie 2015). Ainsi la cellule présentatrice d'antigène, en régulant la mobilité de ces molécules d'adhésion ICAM-1 via son cytosquelette, pourrait réguler la force d'interaction générée entre elle et le LTc. Pour finir, la **myosine II** serait aussi impliquée dans le recrutement en périphérie et l'activation de LFA-1 (Yi 2012; Comrie 2015). D'une manière générale les forces générées par ces flux d'actine pourraient conduire à l'activation des molécules mécanosensibles situées au niveau de la synapse.

Le pSMAC: une zone qui permet le maintien de la signalisation

Les molécules de signalisation comme ZAP70, LAT et SLP-76 colocalisent avec les microclusters de TCR pour former ce qu'on appelle des microclusters de signalisation. Ils sont générés en périphérie au niveau du pSMAC puis migrent vers le cSMAC où la signalisation s'arrête. A noter que toutes les protéines de signalisation associées ne suivent pas ce mouvement. En effet, on observe une progressive dissociation des molécules de signalisation, comme Zap70 et SLP-76, au cours de leur migration vers le cSMAC (mécanisme encore inconnu) (Yokosuka 2005) (Lasserre 2010). De plus, la formation et le transport vers le cSMAC de ces microclusters de signalisation ont lieu de manière continue afin de maintenir la signalisation du TCR (Yokosuka 2005).

f) Le domaine de sécrétion des granules lytiques

La polarisation des granules lytiques:

L'importance du **réseau de microtubules** dans la sécrétion des granules lytiques a été démontrée en 1984 où un traitement des LTC au nocodazole empêchait la polarisation et la sécrétion des granules lytiques (Kupfer 1984).

La polarisation des granules lytiques s'effectue en deux temps: Tout d'abord les granules viennent s'accumuler autour du centrosome suite à l'activation du TCR et ce premier mouvement rétrograde des granules serait assuré par des moteurs moléculaires de type **dynéine** (Mentlik 2010) qui interagiraient avec le complexe **Rab7/RILP** (Rab-interacting lysosomal protein). En effet, Rab7 et RILP sont colocalisés et interagissent au niveau des granules lytiques. De plus l'inhibition de Rab7 conduit à des défauts de sécrétion des granules lytiques et l'inhibition de RILP à des défauts de recrutement des dynéines au niveau des granules (Daniele 2011). Pour finir, les granules vont se polariser en direction de la synapse grâce au réseau de microtubules.

Le mécanisme de transport et de relargage des granules: un sujet à controverse:

- ▶ Une première théorie suppose que les granules sont délivrés à la membrane plasmique suite à la **polarisation du MTOC** et aux contacts transitoires qui s'établissent entre le MTOC et la membrane. Du fait de la proximité du MTOC avec la membrane plasmique les granules pourraient en effet être capables de fusionner directement avec la membrane (Stinchcombe 2006).
- ▶ Une deuxième théorie suppose que ce transport terminal du granule lytique se ferait grâce à des moteurs moléculaires de type **kinésine** (Burkhardt 1993; Kurowska et al, 2012). Cette seconde théorie, soutenue par notre laboratoire, sera traitée plus en détail dans la suite de l'introduction.

L'implication de la **polarisation du MTOC** dans le transport terminal des granules lytiques est un autre sujet de controverse. En effet, les processus de polarisation du MTOC et des granules lytiques emploient des mécanismes différents. Par exemple la polarisation du MTOC serait dépendante de DAG et indépendante de flux calcique (Quann 2009) alors que la polarisation des granules serait dépendante du calcium (De Saint-Basile 2010). De plus, plusieurs études démontrent que le relargage des granules lytiques peut avoir lieu en l'absence d'une polarisation du MTOC. En effet, une étude a pu démontrer que l'on observait une sécrétion des granules avant la polarisation du MTOC et que le blocage du MTOC n'inhibait pas les capacités de lyse des LTC (Bertrand 2013; Beal 2009). Ainsi, l'implication de la polarisation du MTOC dans le transport des granules lytiques est encore controversée.

Pour finir, plusieurs équipes démontrent que la voie de sécrétion empruntée par les granules lytiques serait dépendante de la force du signal induit par le TCR (Beal 2009; Jenkins 2009). En effet, deux voies pourraient être empruntées par les granules lytiques selon l'intensité du signal d'activation: une voie courte et une voie longue. Un fort signal conduirait à une polarisation

des granules au niveau du centrosome puis à une polarisation du MTOC en direction de la synapse, les granules seraient alors directement adressés au cSMAC (voie rapide). Alors qu'un faible signal serait capable d'induire la polarisation du MTOC mais incapable d'induire le recrutement des granules au niveau du centrosome. Les granules seraient en fait recrutés au niveau du pSMAC puis rejoindraient la zone de sécrétion (cSMAC) probablement *via* le réseau de microtubules (Voie longue). A noter que la voie courte conduirait à une lyse des cellules cibles plus efficace que la voie longue (Beal 2009).

Le mécanisme qui conduit au transport des granules lytiques est encore controversé. Néanmoins dans tous les cas, les granules vont être par la suite amenés à fusionner avec la membrane plasmique et être sécrétés dans une zone située entre le cSMAC et le pSMAC (région pauvre en actine) que l'on appelle le domaine de sécrétion (Stinchcombe 2001). Le relargage des granules dans la fente synaptique conduira finalement à la lyse de la cellule cible par l'action des protéines lytiques (perforine et granzymes). Toute la machinerie impliquée dans l'exocytose des granules lytiques sera présentée dans la partie B qui suit.

Les capacités de lyse des LTc:

Les LTc seraient capables de **lyser plusieurs cellules cibles**. En effet, les événements d'exocytose des granules lytiques ne perturberaient pas l'organisation de la synapse. Ainsi, la signalisation serait maintenue même après la sécrétion des granules, ce qui permettrait de synthétiser de nouvelles protéines lytiques pour recréer un pool de granules (Stinchcombe 2001). La synapse mature initialement créée serait même conservée une fois la cellule cible tuée pour entretenir l'activation du LTc afin qu'il soit prêt pour cibler d'autres cellules (Wiedmann 2006).

De plus, le LTc ne va pas relarguer tout son pool de granules sur une seule cible mais va distribuer et relarguer une quantité limitée de granules, suffisante pour tuer la cellule cible, et ainsi tuer plusieurs cellules (Stinchcombe 2001). Les LTc pourraient aussi être capables de tuer plusieurs cibles en même temps en adressant leurs granules vers différents sites de sécrétion (Wiedmann 2006). Cette dernière étude est en contradiction avec les études qui démontrent que la sécrétion des granules lytiques nécessiterait la mise en place d'une synapse avec tous les événements associés (polarisation du MTOC, dépolymérisation actine, etc...) Il existe donc peut-être plusieurs mécanismes de sécrétion l'un nécessitant la formation d'une synapse est l'autre permettant la sécrétion vers d'autres cellules cibles sans formation de synapse.

Concernant le choix de la cellule à cibler l'étude de Wiedmann de 2006 démontre que le LTc choisit une cible qui lui fournira la meilleure stimulation antigénique mais que les autres cellules qui viennent à son contact, même si elles ne présentent pas un fort potentiel antigénique, seront quand même lysées par le LTc. La lyse se ferait alors de manière non sélective. La synapse dit lytique et la synapse dit activatrice seraient alors dissociées (Wiedmann 2006). L'étude de Jenkins de 2009 au contraire propose que les LTc sonderaient les cellules cibles et ne

relargueraient leurs granules que face à une cellule cible qui présente un signal assez fort (Jenkins 2009). Il existe donc des controverses quand au mode de selection des cellules cibles par les LTc.

B- Le Syndrome hémophagocytaire: Découverte des acteurs clés de la machinerie d'exocytose des granules lytiques

1- Les différents syndromes hémophagocytaires découverts:

Chez l'homme, un défaut d'activité cytotoxique dépendante des granules lytiques est associé à différentes pathologies immunitaires d'origine héréditaire. Toutes ces affections sont caractérisées par l'apparition d'un **syndrome hémophagocytaire (SH)** dès les premières années de vie. Le SH souvent déclenché par une infection virale conduit à une réponse immune exagérée et mal contrôlée.

On observe une prolifération polyclonale et une hyper-activation des LT (surtout les LTc) qui sécrètent alors de grandes quantités d'IFN- γ . L'IFN- γ sécrété induit par la suite l'activation des macrophages qui commencent à phagocyter spontanément les cellules sanguines (hémophagocytose). Les LTc et macrophages activés prolifèrent et finissent par envahir progressivement les organes comme la rate, le foie, le système nerveux central ou la moelle osseuse. Ils sécrètent alors de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-1 β) ce qui conduit à une inflammation multisystémique qui aboutit à la nécrose des tissus et au décès des patients, si ces derniers ne sont pas traités par des immunosupresseurs.

L'identification des causes moléculaires conduisant à cette pathologie immunitaire a permis de caractériser les acteurs clés impliqués dans cette voie de sécrétion (**Figure 26**).

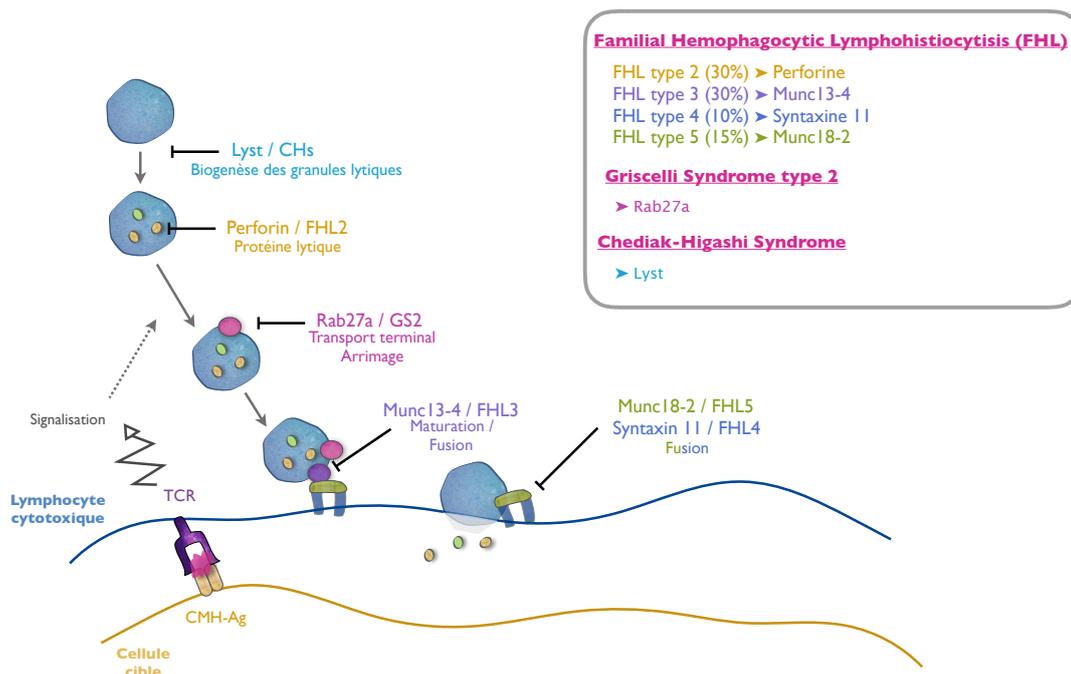


Figure 26: Schéma récapitulatif des différents syndromes hémophagocytaires découverts

La protéine Lyst (lysosomal trafficking regulator): Le syndrome de Chediak-Higashi dont la mutation touche le gène *Lyst* est caractérisé par un albinisme et un défaut de cytotoxicité des cellules LTc et NK (Barbaso 1997). La protéine Lyst serait impliquée dans la biogénèse des granules lytiques (Stinchcombe 2000).

La perforine: Le FHL de type 2 induit par la mutation de *Prf1* a été identifiée en 1999 (Stepp 1999). Les LTc et NK de ces patients ont un défaut total de cytotoxicité. Ce qui démontre encore une fois l'importance de la perforine dans le mécanisme de lyse des cellules cibles précédemment exposé.

La protéine Rab27a: Le syndrome de Griscelli, caractérisé par un albinisme et un défaut de cytotoxicité des cellules LTc et NK, est dû à une mutation dans le gène codant pour la protéine Rab27a (Menasche 2000). L'équivalent murin est le modèle de la souris *ashen*, un mutant naturel du gène codant pour Rab27a (Wilson 2000). La protéine Rab27a serait impliquée dans le transport des mélanosomes au niveau des mélanocytes (vu précédemment dans la partie I) mais aussi dans le transport terminal du granule lytique et dans son arrimage à la membrane plasmique (Stinchcombe 2001; Kurowska 2012).

La protéine Munc13-4: Le FHL de type 3 induit par la mutation de *Unc13-D*, qui code pour la protéine Munc13-4, a été identifiée dans des patients atteints de FHL en 2003 (Feldmann 2003). L'absence de Munc13-4 dans les LTc et cellules NK de patients conduit à un défaut de sécrétion des granules lytiques. Effectivement, les granules lytiques sont capables de se polariser et de s'ancrer à la membrane plasmique mais ne fusionnent pas avec cette dernière (Feldmann 2003).

La protéine syntaxine 11: Le FHL de type 4 découvert en 2005 est caractérisé par une mutation dans le gène *Stx11* (Zur Stadt 2005) et conduit à un défaut de sécrétion des granules lytiques (Brycesson 2007). En effet, STX11 interviendrait dans le mécanisme de fusion des granules lytiques avec la membrane plasmique (Muller 2014).

La protéine Munc18-2: Le FHL de type 5 découvert en 2009 est caractérisé par une mutation dans le gène *Munc18-2*. Munc18-2 en interagissant avec STX11 serait aussi impliqué dans le mécanisme de fusion des granules lytiques (Cote 2009; Zur Stadt 2009).

2- Le mécanisme de sécrétion des granules lytiques: (Voir figure résumé 28)

a) La formation des granules lytiques: implication de Lyst et Munc13-4

La protéine **Lyst** est une protéine cytoplasmique non associée aux membranes ou à d'autres compartiments. La mutation de *Lyst* conduit à la formation de lysosomes géants qui se « clusterisent » autour du noyau. Au contraire quand on surexprime Lyst, on observe des lysosomes anormalement petits qui se localisent à la périphérie des cellules. Lyst serait donc impliquée dans la régulation de la fission des lysosomes (Perou 1997). Dans les LTc, on observe la formation d'énormes granules lytiques (2 ou 3 granules géants) qui finissent par s'arrimer à la synapse immunologique de part leur grosseur mais qui ne seront pas sécrétés. La formation de

ces lysosomes géants est engendrée par des évènements de fusion entre les lysosomes de sécrétion. Ces évènements ont lieu continuellement au sein des cellules pour permettre des échanges entre ces compartiments. Cependant ici, il semblerait que les évènements de fission qui conduisent à leur séparation soient altérés, aboutissant ainsi à la formation de granules géants (Perou 1997; Stinchcombe 2000). De plus, une étude récente réalisée au sein de notre équipe a pu apporter des précisions quand à la nature de ces granules géants. Ces granules géants se seraient formés *via* la fusion d'endosomes de recyclage (Rab11) et d'endosomes tardifs (Rab7/Rab27) alors que les endosomes précoces (EEA1) ne fusionnent pas avec ce compartiment. Lyst interviendrait donc dans la maturation terminale du granule lytique. De plus, la formation de ce compartiment empêcherait les effecteurs de l'exocytose comme Munc13-4, Rab27a et Slp3 d'assurer leurs fonctions (leur localisation étant altérée) (Sepulveda 2015).

La protéine **Munc13-4** serait aussi impliquée dans la formation du granule lytique. Elle permettrait en effet la fusion entre les endosomes de recyclage et les endosomes tardifs conduisant à la formation d'une vésicule d'exocytose qui fusionnera avec les compartiments lysosomaux contenant la perforine (Menager 2007)(Voies de biogenèses décrites précédemment).

b) Le transport terminal et l'arrimage des granules: Rab27a et Munc13-4?

Les granules qui contiennent les enzymes lytiques perforine et granzymes vont se polariser en direction de la synapse immunologique puis s'ancrer à la membrane plasmique par le biais de la molécule **Rab27a**.

Le syndrome de Griscelli dû à la mutation de *Rab27a* chez l'homme (Menasche 2000) et la souris *ashen* (Wilson 2000) conduit à un albinisme et à un défaut de cytotoxicité des L_Tc et cellules NK. En effet, des études de microscopie électronique ont pu démontrer que les granules lytiques, en l'absence de Rab27a, étaient capables de se polariser en direction de la synapse mais en revanche n'étaient pas capables de s'arrimer à la membrane pour être sécrétés (Stinchcombe 2001; Feldmann 2003)(**Figure 27**).

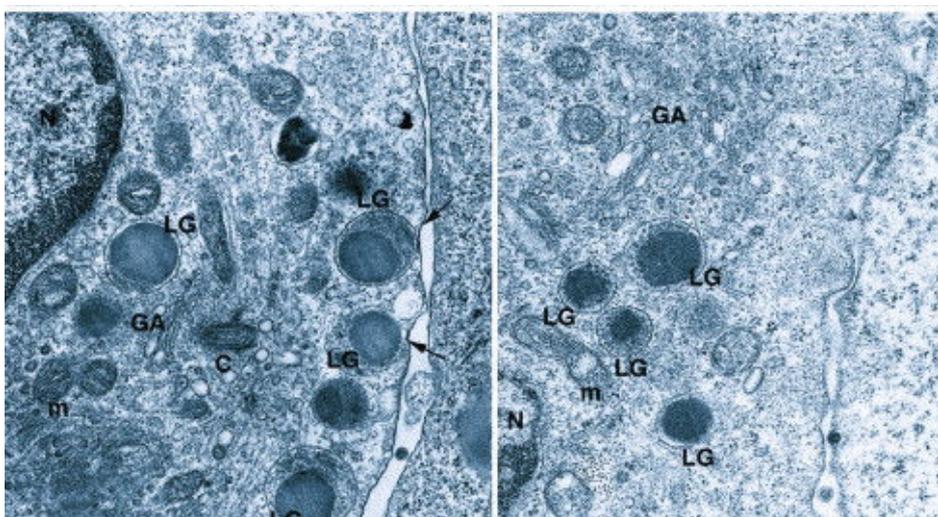


Figure 27: Microscopie électronique montrant un arrimage normal des granules lytiques (LG) dans les CTL déficients en Munc18-2 (Gauche) et un défaut d'arrimage des granules lytiques dans les CTL déficients en Rab27a (Droite) (Feldmann 2003)

Plusieurs familles de molécules interagissant avec Rab27a ont été décrites: les protéines Slp, la famille des protéines SLAC2 (Slp homolog lacking C2 domain) et les protéines RBD (Rab3 binding domain). Toutes ces protéines ont la particularité de posséder un domaine SHD (SLP homology domain) en N-ter impliqué dans leur interaction avec Rab27a (sous sa forme GTP) (Wang 1999; Fukuda 2001; Kuroda 2002). La protéine Munc13-4, qui n'appartient pas à ces familles de protéines, peut elle aussi interagir avec Rab27a grâce à sa partie N-ter (Menager 2007). Par le biais des interactions avec ces différentes protéines, Rab27a va alors pouvoir assurer des fonctions variées.

Rab27a serait d'abord impliquée dans le transport terminal du granule lytique grâce à **Slp3** et la **kinésine-1** (détails plus loin dans la partie 3b) (Kurowska 2012) puis dans l'ancrage à la membrane plasmique. Cet ancrage serait réalisé grâce différents membres de la famille Slp: **Slp1**, **Slp2a**, et **Slp3** qui possèdent des domaines C2 capables de fixer les phospholipides membranaires. En effet, l'inactivation de ces trois protéines conduit à des défauts d'arrimage et de sécrétion des granules lytiques. A noter que la compensation est possible entre ces partenaires (Ménasché 2008; Holt 2008). Selon une étude réalisée en 2003, la protéine **Munc13-4**, un autre partenaire de Rab27a, ne serait pas impliquée dans ces événements d'arrimage mais interviendrait dans le mécanisme de fusion des granules lytiques (Feldmann 2003)(**Figure 27**). Néanmoins une étude réalisée en 2011 indique le contraire, en démontrant que l'interaction entre Munc13-4 et Rab27a serait essentielle à l'arrimage des granules à la synapse (Elstak 2011). Son implication dans l'arrimage du granule est donc encore controversée.

c) La fusion des granules: **Munc13-4, Munc18-2, STX11**

La fusion des granules lytiques avec la membrane plasmique pourrait être médiée par la protéine **Munc13-4** en induisant l'activation de la molécule **STX11** (une t-SNARE). STX11 passerait d'une conformation dite fermée à une conformation dite ouverte grâce à l'action de Munc13-4 sur **Munc18-2**. En effet le mécanisme déjà décrit au niveau de la synapse du neurone (dans la partie I de l'introduction) pourrait s'appliquer ici au niveau des LTc. En effet, Munc13-4 est capable d'interagir avec les protéines SNARE, grâce à ses domaines C2A et C2B régulés par l'action du calcium, et de médier la formation du complexe SNARE nécessaire à la fusion des granules lytiques avec la membrane plasmique (Boswell 2012). La molécule Munc18-2 est, elle aussi, capable d'interagir avec le domaine Habc et le peptide N-ter de la molécule STX11 pour médier la fusion du granule avec la membrane plasmique (Hackmann 2013). Cette interaction entre Munc18-2 et STX11 serait aussi nécessaire à l'expression de STX11 (Cote 2009). En effet une mutation dans la partie Habc de STX11 qui induit une perte d'interaction entre Munc18-2 et STX11, conduit à un défaut de stabilité de la protéine STX11 et à des défauts de dégranulation (comme au niveau neuronal) (Muller 2014). STX11 serait ainsi la Q-SNARE importante pour les

mécanismes de fusion des granules lytiques. En effet, les granules lytiques sont transportés et fusionnent uniquement là où les clusters de STX11 se sont préalablement formés (Halimani 2014).

Concernant les autres SNARE qui interagissent avec STX11:

Aucune R-SNARE n'a pour le moment été clairement identifiée même si les protéines VAMP8, VAMP7, VAMP3, VAMP4 et VAMP2 sont des candidats potentiels. Néanmoins **VAMP7** étant déjà impliqué dans le transport de LAT et des TCR au niveau de la synapse (Larghi 2013; Soares 2013), le défaut de cytotoxicité observé en l'absence de VAMP7 pourrait s'expliquer par un défaut de signalisation et non par un défaut de formation du complexe SNARE. De même pour **VAMP3** qui a été impliqué dans le transport des TCR (Finetti 2015). **VAMP8** ne serait pas impliquée dans la formation du complexe SNARE même si sa délétion conduit à des défauts de cytotoxicité dans les LTc (Loo 2009) car elle n'interagit pas avec STX11 (Halimani 2014). Cependant, elle serait impliquée dans le transport de STX11 au niveau de la membrane plasmique. STX11 serait en effet localisée dans des endosomes de recyclage Rab11+ et VAMP8+ (comme CD3) et serait recrutée au niveau de la membrane plasmique pour former la plateforme d'arrimage des granules lytiques par le biais de ces endosomes (Halimani 2014; Marsahll 2015). Concernant **VAMP2** une étude réalisée en 2013 démontre que VAMP3, VAMP4 et VAMP7 ne colocaliseraient pas avec les granules lytiques (Granzyme B+). Dans les LTc seul VAMP2 serait associé aux granules lytiques (Matti 2013). Ces résultats sont en contradiction avec une étude de 2011 qui démontre que VAMP7 et VAMP4 (seulement sous-certaines conditions) colocalisent avec les granules lytiques (Perforine+) dans les cellules NK (Krzewski 2011). Néanmoins **VAMP4** est aussi impliquée dans la maturation des vésicules au niveau du réseau trans-golgien (Steggmaier 1999). VAMP4 pourrait donc intervenir dans les étapes de maturation du granule lytique, ce qui expliquerait les défauts de cytotoxicité observés. Un bon candidat en tant que R-SNARE pour la sécrétion des granules lytiques pourrait donc être VAMP2 (Matti 2013). Ceci est d'autant plus plausible qu'une interaction entre VAMP2 et STX11 a déjà été démontrée (Valdez 1999).

Dans cette même dernière étude les auteurs identifient la protéine **SNAP-23** comme une Q-SNARE capable d'interagir avec STX11 et qui pourrait donc être impliquée dans la formation de ce complexe SNARE (Valdez 1999).

Autres protéines impliquées: Les protéines Rab3 et complexine qui sont connues pour réguler la sécrétion des vésicules synaptiques (vu précédemment dans la partie I de l'introduction) n'ont pour le moment pas été impliquées dans la sécrétion des granules lytiques. Néanmoins concernant les Synaptotagmines, il semblerait que la **synaptotagmine-7**, qui est exprimée dans les LTc après activation, puisse réguler leur cytotoxicité. En effet, l'absence de cette synaptotagmine conduirait à des défauts de cytotoxicité des LTc *in vitro* et *in vivo* mais n'influencerait pas la prolifération, la production de cytokines et la polarisation des granules (Fowler 2007). A noter que la Synaptotagmine-7 est aussi importante pour le transport de LAT et des TCR au niveau de la synapse (Soares 2013). Il faudrait donc s'assurer que le défaut de

cytotoxicité observé ici ne soit pas dû à un défaut de signalisation du TCR mais bien à un défaut d'exocytose des granules lytiques (même s'il semblerait que la prolifération et sécrétion des cytokines ne soit pas affectée par l'absence de synaptotagmine-7)(Fowler 2007)(Figure 28).

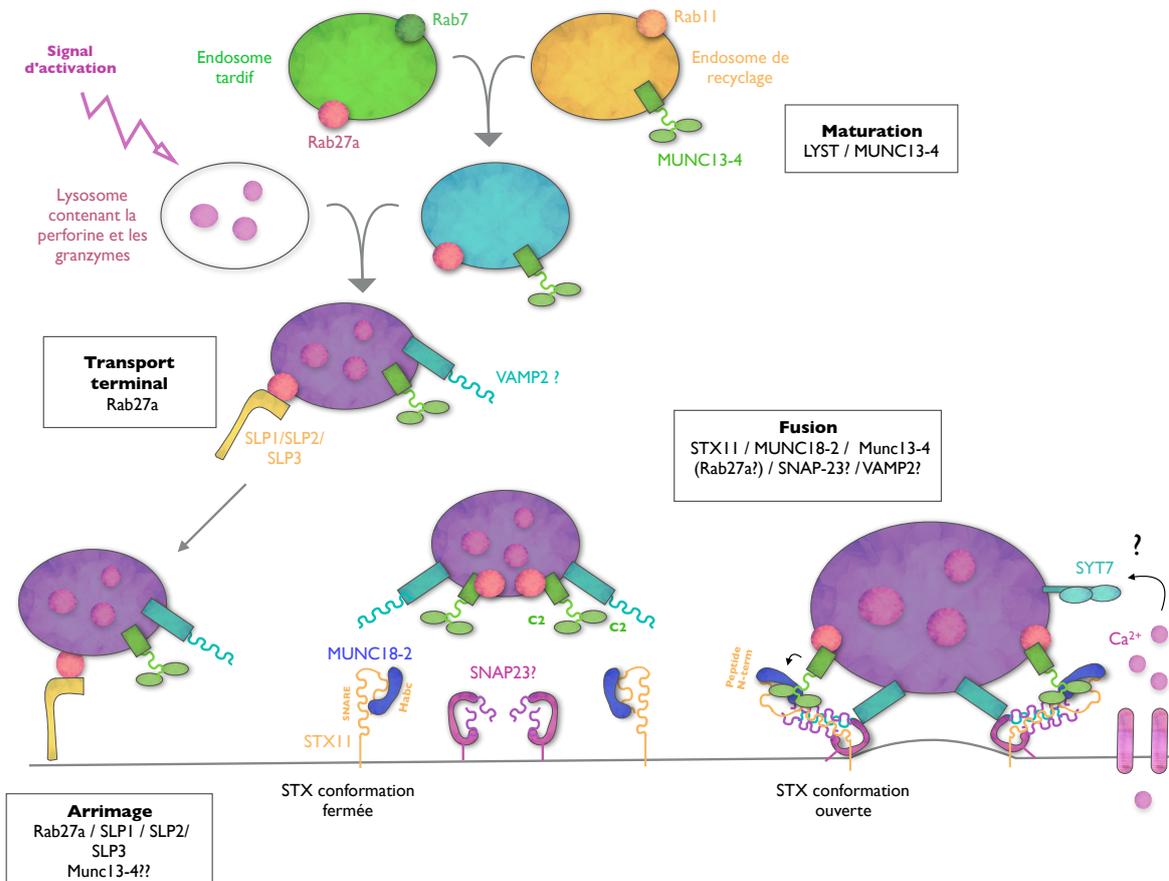


Figure 28: Schéma récapitulatif du mécanisme d'exocytose des granules lytiques

3- Un nouvel acteur dans la sécrétion des granules lytiques: la kinésine-1

Concernant le transport terminal du granule lytique en direction de la synapse, une étude réalisée par notre équipe a permis d'identifier la kinésine-1 (Kif5b, KLC1) comme moteur moléculaire capable de réguler ce transport terminal (Kurowska 2012).

a) Structure moléculaire de la kinésine-1:

La kinésine-1 est une protéine hétéro-tétramérique composée d'un homodimère de chaînes légères KLC (Kinesin light chain, 64 kDa) et d'un homodimère de chaînes lourdes KHC (Kinesin heavy chain, 120 kDa). Chez la souris la sous-unité KHC est codée par trois gènes *Kif5a*, *Kif5b* et *Kif5c*. Le gène *Kif5b* est exprimé de manière ubiquitaire (Gudkov 1994) alors que *Kif5a* et *Kif5c* sont retrouvés au niveau des cellules neuronales (Kanai 2000). La sous-unité KLC est codée par trois gènes *KLC1*, *KLC2* et *KLC3* mais *KLC1* est l'isoforme majoritaire exprimé au niveau des LTc (Kurowska 2012) et mastocytes (Munoz 2016).

La chaîne lourde de la kinésine-1 est composée d'un domaine moteur globulaire, d'un cou, d'une tige et d'une queue globulaire. Le domaine moteur contient le site de fixation à l'ATP et

le site d'ancrage aux microtubules. Ce domaine hydrolyse l'ATP, convertissant ainsi l'énergie chimique en énergie motrice. La tige formée de domaines «coiled-coil» est nécessaire à la mise en place du mouvement et à la dimérisation de la kinésine-1. La chaîne légère (KLC) est composée de deux domaines. Un domaine N-ter qui interagit avec la tige de la chaîne lourde et un domaine C-ter connu pour interagir avec les cargos grâce à son domaine TPR (tetratricopeptide repeat). La chaîne légère de la kinésine-1 est donc capable de recruter les cargos mais la queue globulaire de la chaîne lourde en est aussi capable (Skoufias 1994)(Figure 29).

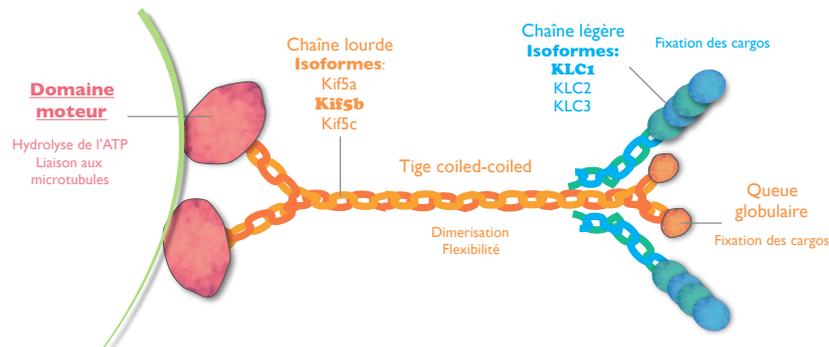


Figure 29: Schéma de la structure de la kinésine-1

b) Implication de la kinésine-1 dans le transport terminal des granules lytiques:

La kinésine-1 est capable de se lier à la GTPase Rab27. En effet une étude précédente réalisée en 2009 a permis de mettre en évidence une interaction entre Slp1/Rab27b et la kinésine-1 par le biais de la protéine CRMP2. Cette interaction serait nécessaire pour le transport antérograde des vésicules le long des axones neuronaux (Arimura 2009). Au niveau des LTc la kinésine-1 serait aussi capable de lier Rab27a par le biais cette fois-ci de la protéine Slp3. En effet Rab27a interagit avec Slp3 (Fukuda 2002) et ce complexe serait capable de recruter la kinésine-1 pour réaliser le transport terminal du granule lytique en direction de la synapse. Effectivement, l'inactivation de Kif5b (utilisation d'un mutant dominant négatif) et/ou de Slp3 induit des défauts de sécrétion des granules lytiques sans interférer dans la polarisation du MTOC et des granules au niveau du MTOC (Kurowska 2012) (Figure 30A).

Ainsi le transport terminal du granule serait réalisé en deux temps: les moteurs de type dynéine permettraient une première polarisation des granules en direction du MTOC, le MTOC se polariserait suite à l'activation du LTc puis la kinésine-1 interviendrait dans le transport terminal du granule pour son adressage à la synapse par l'intermédiaire de Rab27a/Slp3 (Figure 30B).

c) Autres fonctions assurées par la kinésine-1:

Néanmoins le rôle de la kinésine-1 ne se restreint pas au transport des granules lytiques au niveau des LTc. En effet, un grand nombre d'études s'intéressent au rôle de la kinésine-1 dans de nombreux types cellulaires. Ainsi cette protéine joue un rôle important dans le développement et la fonctionnalité des neurones, elle permet le transport de nombreux organites ou molécules. De plus, elle intervient dans les mécanismes d'autophagie, dans le trafic endosomal mais aussi dans le transport de pathogènes ou de virus comme le VIH. Voici donc ci-dessous une liste non

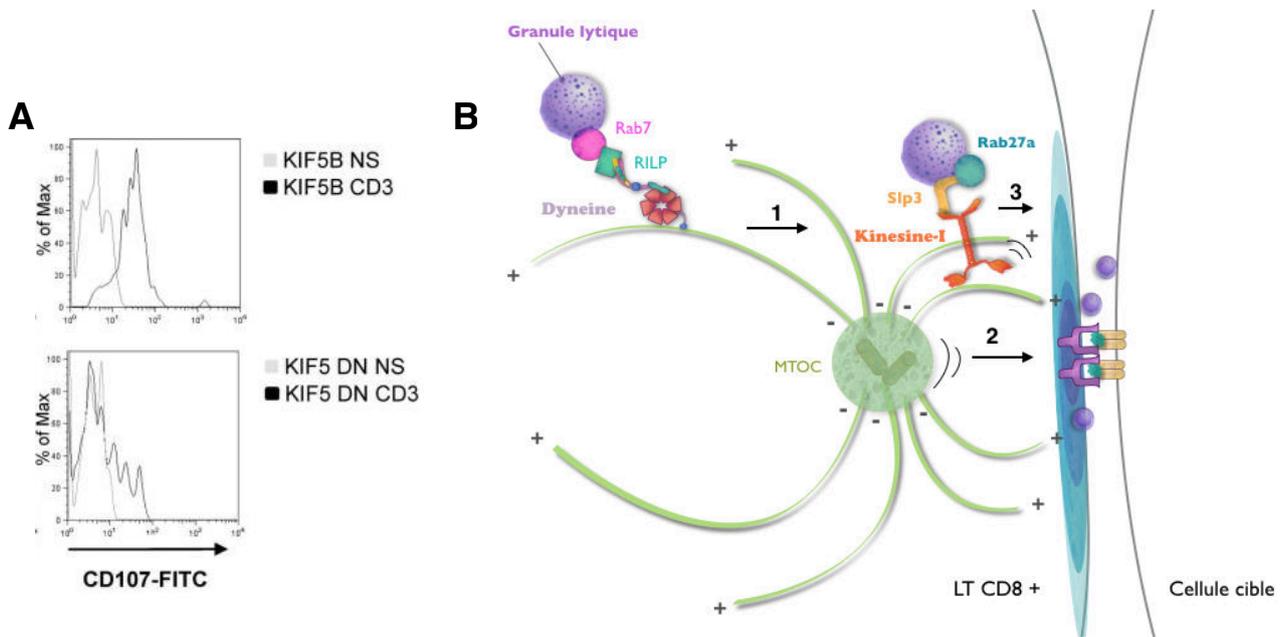


Figure 30: A) Test de dégranulation (Shift de l'expression de CD107) dans des LTc transfectés avec la kinésine-1 contrôle ou son dominant négatif (Kurowska 2012). B) Schéma récapitulatif du mécanisme de transport des granules lytiques à la synapse.

exhaustive des diverses fonctions de la kinésine-1.

La kinésine-1 intervient au niveau neuronal: Elle permet notamment le transport des **récepteurs GABA_A** (Gamma-aminobutyric acid type A) (des inhibiteurs de la neurotransmission) à la surface des neurones en interagissant avec la protéine **GABARAP** (GABA_AR-associated protein) (Nakajima 2012). Elle permet aussi le transport des **récepteurs à la neurotrophine (Trk)** impliqués dans la différenciation/élongation neuronale et dans la formation des axones. Le transport se fait *via* l'interaction entre la kinésine-1 et Trk par le biais du complexe **Slp1/Rab27b/CRMP2** (Arimura 2009). Elle intervient dans la mise en place de la polarisation du neurone. En effet, l'AMPK (AMP-activated protein kinase) est capable de phosphoryler la chaîne légère de la kinésine-1 pour induire la dissociation du complexe **kinésine-1/PI3K** (phosphoinositide 3-kinase). Cette localisation anormale de la PI3K induit alors des défauts de polarisation du neurone (Amato 2012).

En 1999, les premiers patients atteints d'une mutation dans le locus SP10 sont diagnostiqués et souffrent de paraplégie spastique 10 (SPG10) (Reid 1999). Un peu plus tard la même équipe découvre que la mutation touche le gène qui code pour la kinésine-1 (Kif5A) (Reid 2002). Les paraplégies spastiques sont des maladies neurodégénératives caractérisées par des troubles de la marche (raideurs musculaires = spasticité) avec une perte de force des membres inférieurs. La SPG10 est caractérisée notamment par une neuropathie sensorimotrice. En 2012 Karle et ses collègues, à l'aide de souris déficientes pour KIF5A, démontrent que la kinésine-1 serait impliquée dans la survie et le développement des axones et dendrites des neurones moteurs en régulant le transport axonal des mitochondries. Son absence conduirait alors aux défauts observés chez les patients, à savoir une dégénérescence axonale qui affecte

principalement les axones les plus longs responsables de l'innervation des neurones moteurs des membres inférieurs (Karle 2012).

La kinésine-1 intervient dans les mécanismes d'autophagie: L'autophagie est une voie de dégradation biologique qui permet la séquestration et la dégradation des composants du cytoplasme ou d'organites au sein d'un autophagosome. La kinésine-1 participerait à ce processus en transportant les **vacuoles autophagiques** en direction de la périphérie (Fader 2012).

La kinésine-1 permet le transport de molécules: La kinésine-1 permet le transport du **récepteur à la transferrine** en direction de la périphérie en interagissant avec la molécule **AP-1** (activator protein 1) présente sur les endosomes de recyclage (Maritzen 2010). Elle pourrait être impliquée dans le transport des molécules SNARE au niveau de la membrane plasmique. En effet, la kinésine-1 est capable de se lier à **SNAP-23** et **SNAP-25** et permet leur recrutement en périphérie (Diefenbach 2002; Morton 2010). Elle est aussi capable de transporter la **STX1** au niveau des axones neuronaux *via* son interaction avec **FEZ1** (Fasciculation and elongation protein zeta 1) (Chua 2012).

La kinésine-1 intervient dans le transport des organites: La kinésine-1 contrôle le positionnement des **mitochondries** en interagissant avec la protéine **Miro** (Mitochondrial Rho GTPase) par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice **Milton** (Wang 2009) et des **lysosomes** par le biais d'**Arl8b** (ADP-ribosylation factor-like protein 8B), **SKIP** (SKI-interacting protein) et **BORC** au sein des cellules (Tanaka 1998; Campbell 2014; Farias 2017). Elle est impliquée dans le trafic des **vésicules endosomales** issues du réseau trans-golgien (Schmidt 2009) et notamment celui des endosomes de recyclage *via* **AP-1** (Maritzen 2010) et des endosomes tardifs par le biais des protéines **FYCO1** (Five and coiled-coil domain containing 1) et **protrudine** (Raidborg 2016). La kinésine-1 régule également le transport des mélanosomes dans les mélanocytes grâce à **SKIP** qui interagit avec Rab1A (Ishida 2015). Elle est aussi capable de moduler la localisation des composants nécessaires à l'assemblage des **myofibrilles** au niveau des cellules musculaires en interagissant avec la **desmine** (Wang 2013). Pour finir, elle permet la sécrétion d'**insuline** en contrôlant le transport des vésicules qui en contiennent au niveau des cellules β -pancréatiques (Cui 2011).

La kinésine-1 intervient lors d'infections: La kinésine-1 permet la dissémination du pathogène intracellulaire **Salmonella** en permettant le transport des vésicules contenant la bactérie vers la périphérie de la cellule puis vers les cellules voisines grâce à la protéine **Arl8b** (Kanjuk 2011). Elle est impliquée dans l'infection au **VIH** en permettant l'import nucléaire du virus par le biais de son interaction avec **FEZ1** qui interagit avec la capsid virale (Malikov 2015). La kinésine-1 permet également l'export des virions du virus de la **Vaccin** *via* son interaction avec la **protéine virale F12** (Morgan 2010). Pour finir elle permet la dissémination du virus de **Herpes Simplex 1** en le transportant le long des axones neuronaux par l'intermédiaire d'une protéine de l'enveloppe virale **pUS9** (Diefenbach 2015).

Chapitre III: Le mécanisme de sécrétion des LRO dans les mastocytes

Les granules de secretion

Dans cette troisième et dernière partie nous commencerons tout d'abord par une introduction généraliste sur les mastocytes (Différenciation, migration, maturation, médiateurs inflammatoires) avec une analyse plus détaillée des mécanismes d'activation et notamment de la voie FcεRI. Puis nous nous intéresserons aux voies d'activation et aux mécanismes qui conduisent à la sécrétion des granules de sécrétion (Rab, SNARE, cytosquelette, protéines régulatrices). Nous étudierons également brièvement les mécanismes qui conduisent à la sécrétion des cytokines mastocytaires.

A- Généralités sur les mastocytes murins:

Les mastocytes ont un rôle prépondérant dans les réponses immunitaires innées / adaptatives, l'inflammation et les réactions allergiques. Ils sont notamment impliqués dans la protection contre certains virus, bactéries, parasites et permettent une protection anti-venin. Ils sont retrouvés au sein de la plupart des tissus, en particulier ceux en relation directe avec l'environnement extérieur comme la peau, l'intestin et les poumons. Ils sont donc idéalement situés pour assurer **la première ligne de défense de l'organisme**. Malheureusement les mastocytes sont également impliqués dans plusieurs processus délétères tel que l'asthme, l'allergie et les mastocytoses. La compréhension de leur développement, physiologie et fonctionnement est donc nécessaire à la résolution de ces pathologies.

1-La différenciation des mastocytes: (Voir figure résumé 31)

a) Les mastocytes dérivent de progéniteurs hématopoïétiques présents au sein de la moelle osseuse:

Le récepteur Kit fortement exprimé par les cellules souches hématopoïétiques joue un rôle majeur dans l'hématopoïèse la gamétogénèse et la mélanogénèse (Besmer 1993). Les souris déficientes pour Kit (KIT Proto-Oncogene Receptor Tyrosine Kinase) (lignée W/W^V - mutation de la région à activité tyrosine kinase du récepteur) constituent de bons modèles d'étude pour le développement mastocytaire *in vivo*. En effet, **la mutation de Kit conduit à l'absence de mastocytes en périphérie**: les souris W/W^V ne possèdent pas de mastocytes au niveau des poumons, des reins, de la peau, du thymus, du coeur, de la moelle osseuse, de la rate etc.. Cependant une transplantation de moelle osseuse contrôlée dans une souris W/W^V irradiée augmente le nombre de mastocytes en périphérie (peau, estomac, caecum ...) (Kitamura 1978).

Les mastocytes dérivent donc de progéniteurs hématopoïétiques multipotent (MPP) présents au sein de la moelle osseuse eux même dérivés de cellules souches hématopoïétiques (HSC).

Ces progéniteurs vont ensuite devenir des progéniteurs myéloïdes communs (CMP) puis des progéniteurs de granulocyte/monocyte (GMP) (Arinobu 2005) et enfin des progéniteurs de mastocyte (MCp). Ces MCp vont alors migrer en direction des tissus périphériques *via* la circulation sanguine sous forme de progéniteurs immatures $Lyn^- Sca-1^- Ly6c^- Kit^+ Fc\epsilon R1\alpha^-$ (Chen 2005).

Nous devons la découverte de ces MCp à l'équipe de Stephen J. Galli en 1996 (Rodewald 1996) qui la décrit comme une population de cellules exprimant fortement Kit mais n'exprimant pas encore le récepteur de haute affinité pour les IgE Fc ϵ RI (High-affinity receptor for the Fc region of immunoglobulin E) à leur surface. Ces progéniteurs n'ont, de plus, pas la capacité de générer les autres populations immunitaires comme les macrophages, granulocytes, érythrocytes et lymphocytes *in vitro*. Mais par l'ajout d'IL3 et de SCF, ces précurseurs aboutissent à la formation de colonies mastocytaires. De même, le transfert de ces progéniteurs au sein d'une souris W/WV irradiée conduit à la reconstitution du pool mastocytaire (Rodewald 1996; Chen 2005).

b) Plusieurs théories pour expliquer l'origine des mastocytes:

Cependant plusieurs théories s'affrontent quand à l'origine des mastocytes. L'équipe de Stephen J.Galli pense que les mastocytes dérivent des CMP puis des MCp mais selon eux ils ne dériveraient pas des GMP. (Chen 2005; Franco 2010).

A contrario, l'équipe de Akashi pense que les mastocytes et les basophiles sont issus des GMP. Ils décrivent de plus, une nouvelle population de cellules progénitrices des mastocytes et basophiles, les BMCP. Ces BMCP seraient présents au niveau de la rate (Arinobu 2005; Arinobu 2009). L'équipe de Galli en étudiant cette population a elle aussi démontré que les BMCP pouvaient se différencier en mastocyte mais pas en basophile (Mukai 2012).

L'équipe de Huang, quand à elle, identifie une nouvelle population de cellules progénitrices au niveau de la moelle et non au niveau de la rate. Cette nouvelle population serait une sous-population de GMP plus mature qui aurait des facilités pour se différencier en mastocyte et basophile. Ils appellent ces cellules les pré-BMP (Qi 2013) et proposent que les MCp dérivent de ces cellules.

Ainsi, le processus de différenciation des mastocytes reste un mécanisme encore controversé dont l'étude tend à être approfondie dans les années à venir (**Figure résumé 31**).

c) Facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des mastocytes:

Concernant les facteurs de transcription qui régulent la différenciation des HSC en mastocytes: on retrouve **Stat5**, **GATA-1** (GATA Binding Protein 1), **GATA-2**, **GATA-3**, **MITF**

(melanogenesis transcription factor), **Hes-1** (Hes family BHLH transcription factor) et **C/EBP α** (CCAAT/enhancer-binding protein alpha).

L'activation du facteur de transcription **Stat5** par le SCF semble être essentielle à la survie des mastocytes, à leur prolifération mais aussi à leur développement. En effet, les souris déficientes pour Stat5 ne possèdent pas de mastocytes au sein de leurs tissus (peau, rate, estomac...). De plus, des souris W/W^v irradiées puis transplantées avec de la moelle de souris déficientes pour Stat5 ne développent pas de mastocytes au niveau de leur cavité péritonéale après trois mois de reconstitution (Shelburne 2003). Stat5 est donc un composant essentiel de la signalisation SCF/Kit qui permet le développement mastocytaire.

Stat5 aurait de plus un rôle dans la régulation positive de l'expression d'un autre facteur de transcription, GATA-2, qui aurait besoin d'être surexprimé pour permettre la différenciation des mastocytes (Li 2015).

Concernant **GATA-2** et **C/EBP α** , Iwasaki et ses collègues ont démontré que pour induire le développement de mastocytes il fallait une « downregulation » de C/EBP α avant la surexpression de GATA-2 (Iwasaki 2006). Ainsi l'ordre dans lequel sont exprimés ou réprimés c'est différents facteurs dicte le devenir des cellules.

Hes-1 lui régule négativement la transcription de C/EBP α et donc participe à sa « downrégulation » (Sakata-Yanagimoto 2008).

L'équipe de Huang décrit elle aussi l'importance de la « downrégulation » de C/EBP α mais aussi du facteur **MITF** dans la différenciation des pré-BMP en mastocytes et basophiles. En effet, selon eux si le facteur C/EBP α est prépondérant (« downrégulation » de MITF) la cellule progénitrice se différencierait en basophile alors que si c'est le facteur MITF qui est prépondérant (« downrégulation » de C/EBP α) la cellule progénitrice se différencierait en mastocyte (Qi 2013)

GATA1 quand à lui permet la maturation des MCp en mastocytes matures (Migliaccio 2003)(Figure 31).

2- La migration des mastocytes:

La migration des mastocytes en direction de la périphérie se déroule de manière constitutive mais aussi lors de la réponse inflammatoire. Leur migration est permise grâce à l'attraction que peuvent avoir les mastocytes envers des molécules chimioattractives variées. Ces molécules sont retrouvées en circulation ou au niveau des sites de résidence / de recrutement des mastocytes et sont sécrétées par divers types cellulaires. La fixation de ces molécules sur les mastocytes au niveau de leurs récepteurs conduira à l'activation de différentes voies de signalisation qui permettront au mastocyte d'effectuer leur migration. Voici ci-dessous quelques exemples de molécules chimioattractives (les voies de signalisations associées ne seront ici pas abordées):

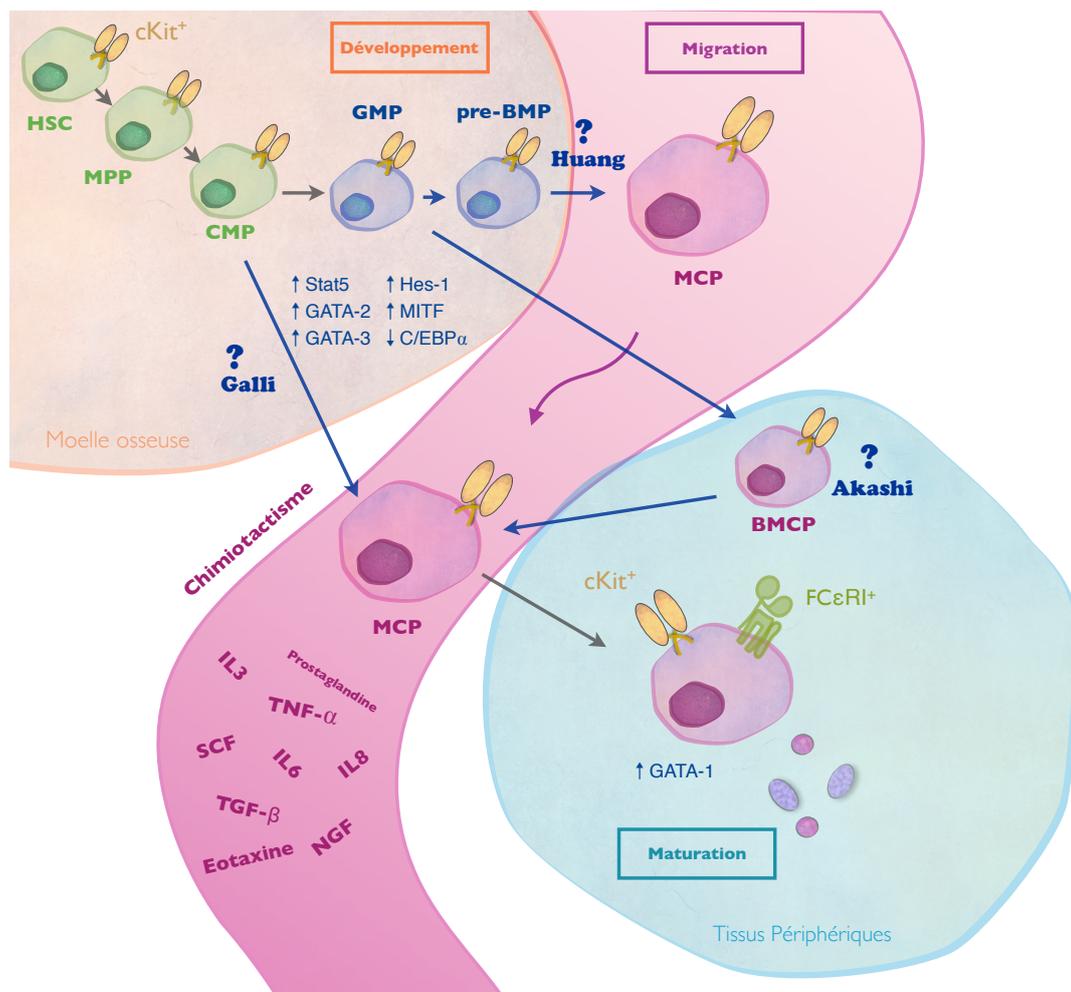


Figure 31: Schéma récapitulatif des différentes hypothèses concernant la voie de différenciation des mastocytes

Le **SCF** est un facteur de croissance des mastocytes qui permet leur différenciation, activation, prolifération et survie. De plus, c'est aussi un puissant chimioattractant sécrété par des types cellulaires variés comme les cellules endothéliales ou fibroblastes. En effet, en se fixant à son récepteur Kit, le **SCF** induit alors le recrutement des mastocytes en direction de la périphérie (Meininger 1992).

Les **cytokines**: comme l'**IL-3** connue pour booster la prolifération des mastocytes est également impliquée dans leur migration (Matsura 1989). C'est aussi le cas des cytokines **IL-9** (Eller 2011), **IL-8**, (Nilsson 1999) ou encore **TNF-α** (Brzezinska-Błaszczuk 2007) qui permettent le recrutement des mastocytes. Le **TGF-β** quant à lui, semble être l'un des plus puissant chimioattractant mastocytaire. Ainsi lors de pathologies induisant le relargage de TGF-β on observe une accumulation importante de mastocytes au sein des zones de sécrétion de la cytokine (Gruber 1994).

Les **chimiokines**: telles que **MPC-1/CCL2**, **MIP-1α/CCL3**, **RANTES/CCL5**, **CX3CL1** permettent le recrutement des mastocytes au sein des tissus (Taub 1995). Cette attraction est permise grâce à la présence des récepteurs aux chimiokines retrouvés à la surface des mastocytes comme CCR1/2/3/4/5, CXCR1/2, CXCR4, CX3CR1, etc...

Les IgE et allergènes: les mastocytes naïfs sont attirés par les **IgE** qui se fixent sur leur récepteurs FcεRI (en l'absence d'allergène) et une fois sensibilisés aux IgE ils deviennent alors sensibles à l'attraction par les **allergènes**. Cette caractéristique permet donc un recrutement massif des mastocytes dans les tissus où l'IgE a été accumulée, par exemple, suite à une allergie (Kitaura 2005).

Les intégrines: comme l'**α4β7** présente à la surface des mastocytes permet leur recrutement au niveau de l'intestin grêle en interagissant avec MAdCAM-1 (Mucosal addressin cell adhesion molecule-1) une glycoprotéine présente à la surface des cellules endothéliales de l'intestin grêle. En effet, la souris KO pour l'intégrine α4β7 ne possède quasiment pas de mastocytes au niveau de l'intestin grêle alors qu'ils sont encore présents au niveau de la rate, moelle osseuse, gros intestin et poumons (Gurish 2001).

D'autres molécules: le facteur de croissance **NGF** (Nerve growth factor) en se fixant à son récepteur TrkA (Tropomyosin receptor kinase A) (Sawada 2000) et l'**eotaxine** en se fixant sur CCR3 (Woo 2002) permettent le chimiotactisme des mastocytes.

Une seconde vague de recrutement autocrine: Les mastocytes activés suite à un processus inflammatoire peuvent à leur tour sécréter des molécules chimioattractives comme, la **sphingosine-1 phosphate (S1P)**, le **leucotriène B4 (LTB4)**, la **prostaglandine E2 (PGE2)** (Weller 2005; Weller 2007; Jolly 2004). Cette dernière caractéristique permet ainsi un recrutement autocrine et donc un renouvellement permanent du pool mastocytaire présent en périphérie lors de processus inflammatoires.

3- Les médiateurs de l'inflammation:

Les mastocytes une fois activés entreprennent un relargage massif du contenu de leurs nombreux granules afin d'initier la réponse inflammatoire. Une étude récente de protéomique a permis d'identifier environ 700 protéines différentes relarguées par les mastocytes après leur activation *via* le récepteur FcεRI (Shubin 2016). De manière simplifiée, on retrouve au sein des granules mastocytaires des médiateurs déjà préformés et des médiateurs lipidiques bioactifs qui seront synthétisés suite au signal d'activation. Voici une liste non exhaustive des principaux constituants retrouvés au sein des granules mastocytaires et quelques-unes de leurs fonctions.

a) Les médiateurs préformés:

Parmi les médiateurs préformés on retrouve des **amines biogènes** comme l'histamine, la sérotonine et la dopamine mais aussi des protéases comme la tryptase, chymase, carboxypeptidase A3, cathepsine G, caspase 3 active et le granzyme B. On retrouve également des **enzymes lysosomales** comme la β-hexosaminidase et les cathepsines B/C/D/E/L. Des **cytokines** et **facteurs de croissance** sont aussi contenus dans les granules comme le TNF, TGF-

β , l'IL-4 et les facteurs VEGF (Vascular endothelial growth factor) et NGF ainsi que des **protéoglycanes** comme l'héparine ou la serglycine.

Les protéoglycanes: Les protéoglycanes comme, l'**héparine** ou la **serglycine**, sont impliqués dans les mécanismes qui conduisent au « remplissage » des granules. Effectivement, ils vont permettre à certaines protéines (Protéases, amines biogènes) d'être adressées au niveau des granules (vu précédemment dans la partie I-B-2 de l'introduction). Ils peuvent aussi servir d'anti-coagulants (Héparine), réguler les propriétés enzymatiques des protéases et induire l'apoptose des mastocytes (Melo 2011; Ronnberg 2012).

Les amines biogènes: L'**histamine** sécrétée par les mastocytes (Riley 1953) est capable de réguler la bronchoconstriction, la vasodilatation et la perméabilité vasculaire (Ashina 2015). Cette molécule permet donc de réguler le recrutement des autres cellules immunitaires. Par exemple, l'histamine est capable en cas d'infection par *Escherichia Coli* de bloquer l'influx des phagocytes comme les neutrophiles et macrophages ce qui ralentit la clairance de la bactérie (Hori 2002). Elle est aussi impliquée dans le dialogue entre les mastocytes et les neurones (Bell 2015).

La sérotonine et la dopamine: La dopamine est un neurotransmetteur qui peut agir de manière autocrine pour diminuer la prolifération et induire l'apoptose des mastocytes (Freeman 2001). Elle permet aussi aux mastocytes d'avoir un rôle immunosuppresseur sur les lymphocytes (Morikawa 1994). La sérotonine, quand à elle, pourrait induire le recrutement autocrine des mastocytes sur le site de l'inflammation en se fixant à son récepteur présent à leur surface (Kushnir-Sukkov 2006).

Les protéases: Les **tryptases** sécrétées par les mastocytes (Glennier 1960) peuvent avoir un effet protecteur ou délétère dans l'inflammation. Les tryptases prédominantes chez la souris sont la mMCP6 (mouse mast cell protéase 6), la mMCP7 et la γ -tryptase. Elles sont notamment impliquées dans le recrutement des autres cellules immunitaires en clivant la molécule PAR2 (Protease-activated receptor 2) exprimée à la surface des cellules endothéliales (Lindner 2000). Au niveau des cellules épithéliales, elles augmentent la sécrétion d'IL-8 et l'expression de ICAM-1 (Intercellular adhesion molécule) ce qui permet un recrutement des neutrophiles et lymphocytes (Namazi 2005). Une fois le mastocyte activé et les tryptases sécrétées, elles peuvent alors induire la sécrétion des mastocytes présents aux alentours. Elles fournissent alors un signal d'amplification de la réponse inflammatoire (He 1998). Les **chymases** sécrétées par les mastocytes (Benditt 1959) peuvent aussi avoir un rôle protecteur ou délétère dans l'inflammation. Les chymases prédominantes chez la souris sont mMCP1, mMCP2, mMCP4 et mMCP5. Elles sont capables de cliver les protéines claudines et occludines (molécules importantes pour la formation des jonctions serrées) ce qui rend les épithéliums perméables (McDermott 2003). La chymase mMCP1 est par exemple capable de lutter contre le parasite *Trichinella spiralis* en rendant l'épithélium intestinal perméable ce qui facilite la clairance du parasite (Hnight 2000). Les chymases sont capables de dégrader les cytokines comme le TNF, l'IL-6, l'IL-13 (mMCP4) en les clivant (Piliponsky 2012; Nelissen 2013) ce qui permet d'induire une réponse anti-inflammatoire de

la part des chymases. Néanmoins, elles peuvent aussi être impliquées dans des clivages qui conduisent à la maturation des cytokines comme pour l'IL-1 β ou l'IL-18 (Mizutani 1991; Omoto 2006). **La carboxypeptidase A3 (CPA3)** est impliquée dans la protection contre les venins et toxines en dégradant par exemple la sarafotoxin 6b (Venin de serpent) (Schneider 2007). **La cathepsine G** sécrétée par les mastocytes (Schechter 1990) joue un rôle dans la lutte antibactérienne (Shafer 1991). **La caspase 3 active** est présente dans les granules mastocytaires (Garcia-Faroldi 2013) mais son rôle dans les mastocytes est encore inconnu. **Le granzyme B** possède le même effet pro-apoptotique que dans les LTc mais agit ici indépendamment de la perforine (Pardo 2007).

Les enzymes lysosomales: **La β -hexosaminidase** joue un rôle dans la lutte antibactérienne. En effet, la β -hexosaminidase serait capable d'inhiber la prolifération de la bactérie *Staphylococcus epidermidis* en dégradant les peptidoglycanes de la paroi bactérienne (Fukuishi 2014). **Les cathepsines B/C/D/E/L:** Les mastocytes sont capables de sécréter plusieurs types de cathepsines qui ont chacune des rôles distincts. Par exemple, les cathepsines B et L jouent un rôle dans la maturation de la pro-tryptase (Halangk 2000; Le 2011), la cathepsine C dans la maturation de la pro-chymase (Wolter 2001) et la cathepsine E dans la maturation de la carboxypeptidase A3 (Henningsson 2005).

Les cytokines et facteurs de croissance: **Les cytokines:** TNF, TGF- β , IL-4, IL-5 et IL-13 sont présentes au sein des granules de sécrétion (Gordon 1990; Bradding 1992; Lindstedt 2001) (Gali 2005). Les facteurs de croissance **VEGF** et **NGF** sont aussi contenus dans des granules mastocytaires (Boesiger 1998; Leon 1994).

b) Les médiateurs lipidiques:

L'activation des mastocytes conduit à la synthèse de **lipides bioactifs** contenus dans les granules mastocytaires et qui participent à l'homéostasie des tissus, aux réponses pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. On retrouve deux grandes familles: Les **prostaglandines** et les **leucotriènes**. Ces lipides jouent un rôle essentiel dans les phases précoces de l'inflammation en permettant le recrutement des cellules immunitaires. Les mastocytes sont par exemple capables de produire la prostaglandine D2 qui induit le recrutement des LT Th2 en se fixant sur le récepteur CRTH2 (chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells) (Gyles 2006). Ils sont aussi capables de sécréter le leucotriène B4 qui est un puissant chimioattractant des leucocytes *via* le récepteur BLT1 (Leukotriene B4 receptor) (Ohnishi 2008).

4- La maturation des mastocytes:

La maturation des mastocytes a lieu directement au niveau des tissus. En effet, aucun mastocyte mature n'est retrouvé au sein de la circulation sanguine. Ce n'est qu'une fois en périphérie que les progéniteurs immatures donnent naissance à différents types de mastocytes

sous l'influence du microenvironnement environnant. De façon simpliste on caractérise deux types de mastocytes: ceux dit **muqueux** (MMC) retrouvés dans la muqueuse du tube digestif et des bronches et ceux dit **conjonctifs** (CTMC) retrouvés dans les tissus conjonctifs et dans la cavité péritonéale. Les mastocytes des tissus conjonctifs se distinguent des muqueux par la prédominance d'héparine au sein de leurs granules. De plus, les mastocytes mucosaux possèderaient uniquement une activité chymase (mMCP1, mMCP2) alors que les mastocytes conjonctifs possèderaient une activité chymase (mMCP4, mMCP5) et tryptase (mMCP-7, mMCP6) (Wernersson 2014).

Néanmoins cette classification se révèle trop simpliste. En effet, selon le tissu où ils se trouvent ou la situation inflammatoire/pathogénique, les mastocytes vont acquérir des phénotypes variés caractérisés par des granules aux ultrastructures différentes et par une expression différentielle des protéases qu'ils contiennent (Gurish 1995). C'est par exemple le cas de mastocytes résidents du jéjunum qui au cours d'une infection par *Trichinelle Spiralis* vont changer de manière séquentielle l'expression de leurs chymases tout au long de l'infection (Friend 1996). Ainsi les mastocytes, sous l'influence de leur environnement, vont au cours de leur maturation **adapter le contenu de leurs granules** ce qui leur assure une grande capacité d'adaptation face aux diverses situations qu'ils sont amenés à rencontrer (normales ou pathologiques).

5- Les mécanismes d'activation des mastocytes:

Pour assurer leur rôle de sentinelle et de première ligne de défense, les mastocytes ont besoin de reconnaître de manière précise l'agent pathogène ou le contexte inflammatoire. Ils expriment donc à leur surface une multitude de récepteurs qui leurs permettent de déclencher une grande variété de voies d'activation. Ainsi, par le biais de ces différentes cascades, le mastocyte peut adapter ses réponses à la situation. Voici ci-dessous quelques exemples de récepteurs activateurs présents à la surface des mastocytes.

a) Les récepteurs impliqués dans l'activation des mastocytes:

Les récepteurs Fc: Ces récepteurs reconnaissent spécifiquement **les fragments constants des immunoglobulines**. Il en existe un grand nombre et tous sont spécifiques de l'anticorps qu'ils sont destinés à reconnaître. Ainsi, les récepteurs Fc aux IgG sont nommés FC γ R, ceux aux IgE Fc ϵ R, etc... De plus, ces récepteurs Fc peuvent être soit de haute affinité soit de faible affinité. Ceux de haute affinité peuvent lier directement des anticorps monomériques, qui reconnaîtront à leur tour l'antigène. Ceux de faible affinité sont eux capables de reconnaître les complexes immuns. La plupart de ces récepteurs sont de type activateur et possèdent des motifs ITAM intracytoplasmiques mais on en retrouve certains qui sont de type inhibiteurs avec cette fois-ci des motifs ITIM (Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) comme le récepteur FC γ RIIB

(Daeron 1997)(Figure 32). Concernant les mastocytes murins, ils expriment fortement les récepteurs activateurs FcεRI, FCγRIIA et inhibiteurs FCγRIIB (Benhamou 1990).

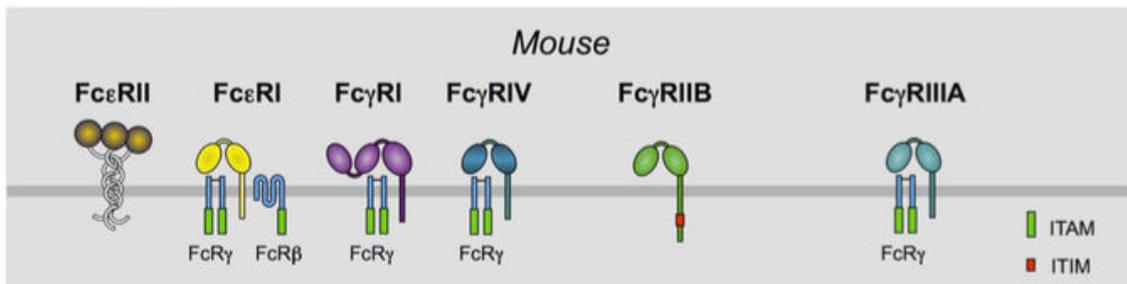


Figure 32: Les différents récepteurs FC aux IgE et IgG exprimés chez la souris (Johnson 2012)

Les récepteurs couplés aux protéines G: Les récepteurs couplés aux protéines G peuvent reconnaître différentes molécules. Ils peuvent, par exemple, reconnaître les neuropeptides sécrétés par les neurones ce qui permet un dialogue entre ces deux types cellulaires. Parmi ces neuropeptides on retrouve **la substance P** et **la neurotensine**, des molécules libérées suite, par exemple à un stress, et qui conduisent à la dégranulation des mastocytes. Ce qui par exemple dans le cas du psoriasis peut aggraver les symptômes de la peau car l'activation des mastocytes conduit au relargage de médiateurs de l'inflammation (Singh 1999). On retrouve aussi **le NGF**, **la calcitonine** et le polypeptide intestinal vasoactif **VIP**. Les récepteurs couplés aux protéines G peuvent aussi reconnaître les molécules du complément **C3a** et **C5a**. Néanmoins ces molécules ne sont capables d'activer que certains types de mastocytes. Les mastocytes mucosaux ne seraient par exemple pas sensibles à l'activation *via* C3a et C5a (Erdei 2004).

Les récepteurs CD48: Ces récepteurs permettent la détection d'espèces bactériennes comme *Escherichia coli* ou des bactéries exprimant l'adhésine FimH (Type 1 fimbrial adhesin). La reconnaissance de FimH conduit alors à l'activation des mastocytes et au relargage de TNF-α ce qui permet le recrutement des neutrophiles sur le site d'infection (Malaviya 1999).

Le récepteur de S1P (une molécule chimioattractive déjà citée): Ce récepteur, en se liant à son ligand S1P (qui a été préalablement sécrété par les mastocytes), permet l'activation des mastocytes de façon autocrine. Ainsi cette molécule permet le recrutement de nouveaux mastocytes mais aussi leur activation (Jolly 2004).

Les récepteurs aux amines: Les récepteurs aux amines comme les récepteurs à l'histamine (HR) et à la sérotonine (5HTRs) sont impliqués dans l'activation des mastocytes. C'est par exemple le cas du récepteur H4R qui serait important pour l'activation du mastocyte, la mobilisation du calcium, et la sécrétion de médiateurs qui conduisent notamment au recrutement des neutrophiles (LTB4) (Takeshita 2003).

Les récepteurs aux cytokines: Les mastocytes sont capables de reconnaître un grand nombre de cytokines comme **l'IL-1β**, **l'IL4**, **l'IL10**, **l'IL13**, **l'IL-15**, **l'IL-18**, **l'IL-33**, etc...(Migalovichsheikhet 2012). Par exemple, les mastocytes reconnaissent l'IL-33, produite par les cellules épithéliales et endothéliales en cas d'inflammation, grâce à leur récepteur ST2. Cette

reconnaissance conduit alors à leur activation puis au relargage de médiateurs de l'inflammation. Ce phénomène peut ainsi, entre autre, exacerber l'inflammation observée lors de psoriasis où l'IL-33 y est sécrétée en grande quantité (Hueber 2011).

Les récepteurs au facteur d'activation plaquettaire (PAF): Les mastocytes sont également capables de reconnaître le médiateur phospholipidique **PAF** responsable de l'activation des plaquettes mais aussi responsable de leur activation. De manière intéressante on constate que la concentration en molécule PAF dans le sérum de patients souffrant d'anaphylaxies est directement proportionnelle à la sévérité de ces anaphylaxies (Vadas 2008).

Les récepteurs Toll-like (TLR): Les TLR sont des récepteurs appartenant à la famille des PRR (pattern recognition receptors) identifiés pour la première fois chez la Drosophile. On en retrouve exprimés à la surface des cellules, pour la reconnaissance des signaux et pathogènes extracellulaires (TLR1/2/6/5/4), mais aussi des intracellulaires, pour l'identification des agents pathogènes internalisés (TLR3/7/8/9) (Medzhitov 2001). Les mastocytes ont le potentiel d'exprimer tous les types de TLR, néanmoins c'est l'influence de l'environnement extérieur qui permet de moduler leur expression. Ainsi selon le type de mastocyte, le tissu ou le contexte inflammatoire, les mastocytes n'exprimeront pas les mêmes types de TLR (Matsushima 2004). Les mastocytes peuvent reconnaître les **bactéries GRAM+** via le TLR2 (reconnaissance du peptidoglycane et de l'acide lipotéichoïque) et les **bactéries GRAM-** par le biais du TLR4 (reconnaissance du LPS (Lipopolysaccharide) (Supajatura 2002). Le TLR3 permet, lui, la détection des **ARN double brins** comme par exemple ceux du cytomégalovirus ce qui induit la sécrétion de CCL5 par les mastocytes puis le recrutement des LTc (Becker 2015). Pour finir les récepteurs TLR7 et TLR8 vont reconnaître les **ARN simple brins** et TLR9 les **îlots CpG non méthylés** de l'ADN (Matsushima 2004). Grâce à leurs TLR les mastocytes peuvent ainsi répondre à divers virus et bactéries et alors permettre le recrutement des autres cellules immunitaires en relarguant diverses combinaisons de médiateurs.

b) Les voies de signalisation liées au récepteur FcεRI: (Voir figure résumé 34)

Généralités sur le récepteur FcεRI:

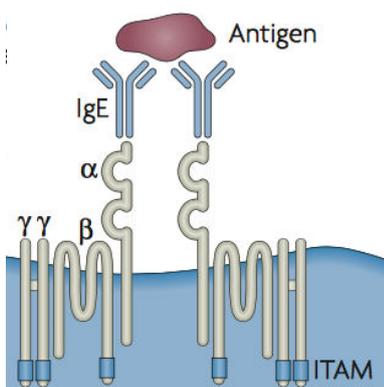


Figure 33: Structure du récepteur FcεRI (Kraft 2007)

Structure du récepteur: Le récepteur FcεRI mastocytaire est une molécule tétramérique constituée d'une chaîne α, β et d'un homodimère de chaînes γ reliées par des ponts disulfures (Blank 1989). Les sous-unités γ et β portent les motifs ITAM nécessaires à la transduction du signal, la sous-unité β sert d'amplificateur du signal et la sous-unité α permet la fixation des IgE (**Figure 33**).

Agrégation du récepteur: Pour initier la transduction du signal les récepteurs FcεRI ont besoin de s'agréger en se liant à des ligands multivalents (Fewtrell 1980). Effectivement, l'ajout en

excès de ligands monovalents compétiteurs amène à un blocage de l'activation des mastocytes (Weetall 1993). D'autre part, l'agrégation d'un faible nombre de récepteur est suffisante à l'induction de l'activation du mastocyte, ce qui lui permet de répondre simultanément à plusieurs antigènes en même temps.

Voies de signalisations induites par le récepteur FcεRI:

La formation du signalosome: Une fois les récepteurs agrégés, la tyrosine kinase de la famille SRC, **LYN**, est recrutée pour phosphoryler les motifs ITAM des sous-unités β et γ du récepteur FcεRI (Eiseman 1992). Une fois phosphorylé, le récepteur peut recruter en plus de LYN une seconde kinase **SYK** (Spleen tyrosine kinase) au niveau de sa sous-unité γ, qui va s'autophosphoryler et être phosphorylée par LYN. SYK et LYN activées vont alors pouvoir phosphoryler la molécule adaptatrice **LAT** qui est au coeur des événements de transduction du signal (Saitoh 2000). En effet comme dans les LTc, LAT va servir de plateforme de recrutement pour d'autres protéines comme SLP-76, GRB2, GADS, SHC (SH2-domain-containing transforming protein C), SOS (Son of sevenless homologue), VAV et PLCγ1 (Rivera 2002). L'interaction de ces protéines se fait soit directement (GADS, GRB2, PLCγ1) soit indirectement *via* GRB2 (SOS, SHC) et GADS (PLCγ1, SLP76). La formation de ce complexe macromoléculaire va ainsi permettre d'induire des voies de signalisation variées conduisant au relargage des différents médiateurs de l'inflammation.

Une seconde molécule LAT découverte: Néanmoins, l'inhibition de LAT ne conduit pas à un défaut total des fonctions mastocytaires. Effectivement, on observe toujours une activité résiduelle concernant la mobilisation calcique, la production de cytokine et la dégranulation (Saitoh 2000). Cela peut s'expliquer par la découverte d'une nouvelle molécule appelée NTAL puis **LAT2** qui serait en effet capable d'induire une autre voie de signalisation en parallèle de celle induite par LAT. En effet, la délétion de LAT2, tout comme celle de LAT, conduit à des défauts de dégranulation des mastocytes (Tkaczyk 2004) et LAT2 est aussi capable de lier un certain nombre de molécules comme par exemple GRB2, GADS, FYN, SHP1 (Protein tyrosine phosphatase SHP-1). Cependant elle ne peut pas se lier à PLCγ1 (Rivera 2005). Ainsi, le mastocyte pourra « jongler » entre ces deux voies en fonction des signaux d'activation reçus. En effet une étude réalisée en 2014 démontre que le mastocyte va favoriser une voie plutôt que l'autre selon l'intensité de la stimulation fournie. Les mastocytes activés par des stimulations de forte affinité engageraient plutôt la voie LAT alors que les stimulations de faible affinité induiraient la voie LAT2. De plus les réponses engendrées par ces deux voies seront différentes. Effectivement, dans cette étude ils démontrent que la voie LAT2 déclencherait une sécrétion des chimiokines plus importante qu'avec la voie LAT (Susuzi 2014).

Les signalisations induites par les signalosomes:

Le rôle de PLC γ 1, VAV et SOS: PLC γ 1 tout comme dans les LTc est une phospholipase qui permet la conversion de PIP2 en IP3 et DAG. L'IP3 générée va ensuite induire un premier influx de calcium en permettant le relargage des réserves calciques contenues dans le réticulum endoplasmique (fixation sur son récepteur IP3R) puis un second influx sera généré par la molécule STIM1 (Stromal interaction molecule 1) qui se relocalise à la membrane plasmique afin d'ouvrir de nouveaux canaux calciques (SOC channels-Ora1) (Baba 2008). Cette entrée massive de calcium va alors conduire à l'activation des facteurs de transcription NF-kB et NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) responsables de la transcription des gènes des cytokines (Hao 2003). DAG va lui aussi permettre l'activation des facteurs de transcription FOS et JUN en activant cette fois-ci des PKC (Razin 1994). Les voies de signalisation qui conduisent à la transcription des gènes qui codent pour les cytokines passeraient aussi par les adaptateurs VAV et SOS. En effet, ils permettraient le passage de la GTPase RAS de sa forme GDP (inactive) à GTP (active) (Jabril-Cuenod 1996) qui activerait ensuite la voie des MAPK (ERK1, ERK2, p38, JNK). Ces MAPK seraient alors capables d'activer divers facteurs de transcription comme FOS, JUN, NFAT et NF-kB. VAV serait aussi capable d'activer PLC γ 1 tout comme SYK (Law 1996; Tkaczyk 2003). Effectivement l'absence de VAV conduit à des défauts de dégranulation et de production de cytokines mais aussi à une perte de la phosphorylation de PLC γ 1 (Manetz 2001). Pour finir, VAV pourrait, tout comme dans les lymphocytes, activer les Rho GTPases RAC1 et Cdc42 pour permettre la réorganisation du réseau d'actine (Manetz 2001).

Une voie de signalisation secondaire a par la suite été découverte par le laboratoire de Juan Rivera. En effet, ils découvrent en 2002 qu'une autre kinase serait impliquée dans la signalisation du récepteur Fc ϵ RI en se fixant aux motifs ITAM de la sous-unité β . Il s'agirait de la kinase FYN qui serait impliquée dans la dégranulation mastocytaire mais aussi dans la sécrétion des cytokines (Parravicini 2002). De plus la voie qu'elle utiliserait serait différente de celle des deux autres kinases LYN et SYK déjà décrite. Effectivement, FYN serait capable de phosphoryler GAB2 recrutée par GRB2 au niveau de LAT2 (voie indépendante de LAT) ce qui permettrait l'activation de la PI3K (Gu 2001). La PI3K phosphorylerait alors les phosphoinositides présents au niveau de la membrane plasmique ce qui permettrait le démasquage des sites de liaisons pour d'autres protéines comme PLC γ 1, VAV et BTK (Burton's tyrosin kinase)(Gilfillan 2006).

Concernant le rôle de la PI3K dans l'influx calcique: la PI3K semblerait être importante pour la maintenance du flux calcique mais pas pour son initiation. Effectivement Tkaczyk et ses collègues démontrent que l'activation et la translocation de PLC γ 1 en direction de la membrane plasmique se fait avant l'activation de la voie PI3K et même en présence de son inhibiteur (Wortmannin). L'utilisation de l'inhibiteur de la PI3K ne conduit à aucune perturbation de l'influx calcique initialement déclenché par l'activation de PLC γ 1, néanmoins on peut observer des perturbations dans les réponses calciques plus tardives. Le premier influx calcique serait donc indépendant de la PI3K et pourrait impliquer d'autres activateurs de la PLC γ 1 comme SYK ou VAV

(Tkaczyk 2003; Manetz 2001). La PI3K aurait alors un rôle dans le maintien du flux calcique. En effet, ceci serait réalisé par le biais de la protéine **BTK** qui serait recrutée au niveau de la membrane afin d'activer la PLC γ 1 en la phosphorylant. PLC γ 1 transformerait alors PIP2 en DAG et IP3 pour induire l'influx calcique. La PI3K pourrait aussi activer des sphingosines kinases **SphK** qui convertissent la sphingosine en **S1P**, une protéine qui permet l'entrée de calcium dans la cellule en activant les canaux calciques présents à la membrane plasmique (Olivera 2007; Rivera 2008).

Concernant les autres rôles joués par la PI3K: la PI3K serait aussi impliquée dans la sécrétion des cytokines en recrutant la kinase **PDK1** (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1) qui phosphoryle et active la kinase **AKT** impliquée dans la régulation des facteurs de transcription NF-kB, NF-AT, FOS et JUN (Kitaura 2000; Kim 2008). La PDK1 est aussi capable d'activer une PKC. Il existe plusieurs types de PKC: des PKC dépendantes du calcium comme PKC- α et PKC- β et des PKC indépendantes du calcium comme la PKC- δ . Seulement deux de ces PKC ont été impliquées dans la sécrétion des mastocytes: **PKC- β** et **PKC- δ** (Osawa 1993). La PI3K serait, elle, capable d'activer la PKC- δ par l'intermédiaire de PDK1. Quand à la PKC- β qui dépend du calcium, elle pourra être activée grâce à la voie LYN/SYK/PLC γ 1/Ca $^{2+}$ (Paraviccini 2002). Par le biais de la **PLC γ 1**, la PI3K serait aussi capable de réguler la transcription des cytokines *via* l'activation des facteurs de transcription FOS, JUN, NFAT. Pour finir, la PI3K serait en mesure de déclencher la voie des **Rho-GTPases** par le biais de VAV1 et BTK qui les activeraient (Manetz 2001; Kuehn 2010)(Figure 34).

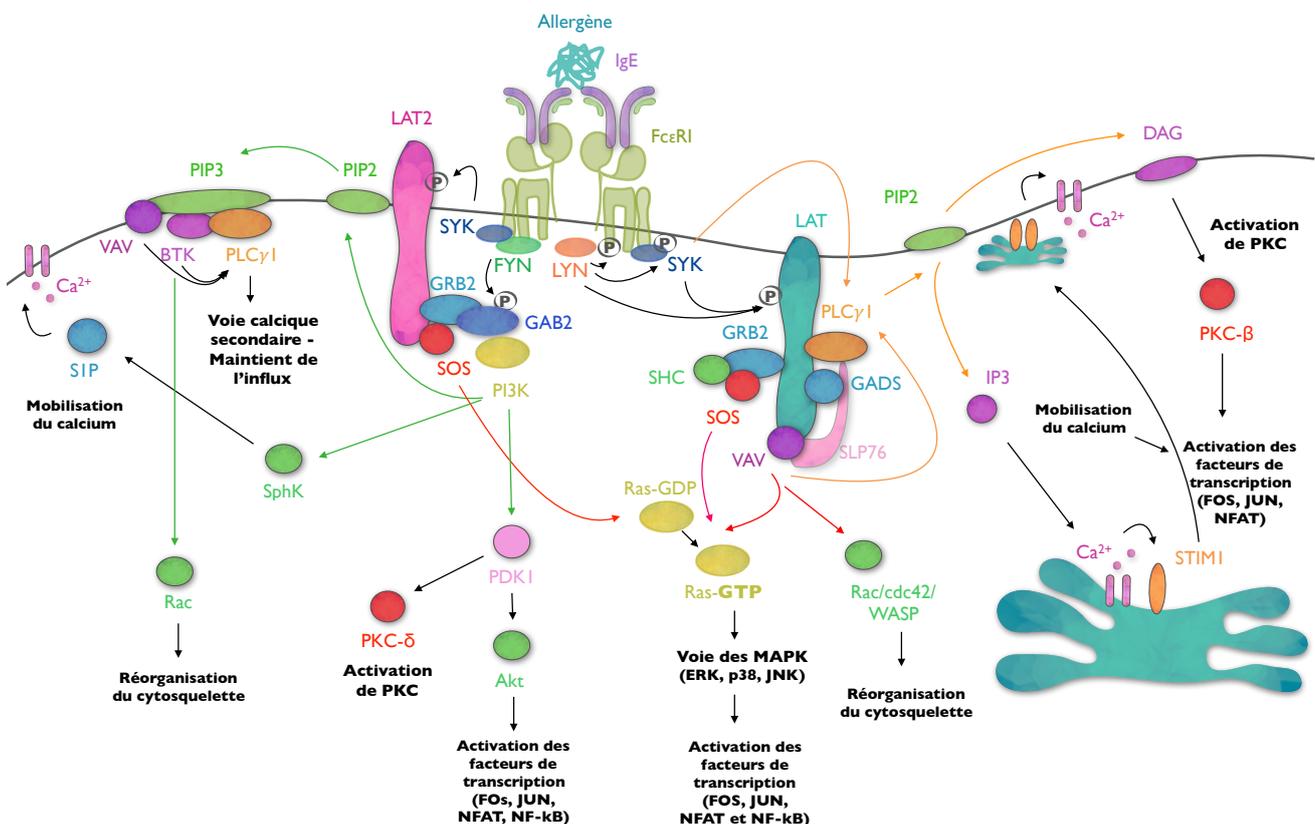


Figure 34: Schéma récapitulatif des différentes voies de signalisation induites par l'activation du récepteur Fc ϵ R1.

Il semblerait donc que l'on ait deux voies de signalisation complémentaires au sein du mastocyte. Une voie FYN/GAB2/PI3K et une voie LYN/SYK/PLC γ 1/Ca²⁺. Ces différentes voies de signalisation conduiront par la suite à la synthèse et sécrétion de cytokines mais aussi à la translocation et fusion des granules mastocytaires. L'implication de chacune de ces voies dans le mécanisme de dégranulation sera abordée plus en détail dans la prochaine partie de l'introduction.

Régulation positive et négative de la voie induite par le récepteur Fc ϵ RI:

La signalisation induite par le récepteur Fc ϵ RI va pouvoir ensuite être amplifiée ou au contraire éteinte grâce à d'autres récepteurs ou molécules impliqués dans la régulation de cette voie. Voici ci-dessous quelques exemples de régulateurs de la voie Fc ϵ RI.

Régulation positive du récepteur: Le **SCF** est capable d'accroître le signal d'activation de la voie Fc ϵ RI *via* son récepteur Kit. En effet, Kit partage de nombreuses voies de signalisation communes avec le récepteur Fc ϵ RI (Voie MAPK, PLC γ , PI3K). Néanmoins le SCF seul est incapable d'induire la dégranulation du mastocyte, probablement à cause de l'absence de phosphorylation de LAT et PKC (Hill 1996; Gilfillan 2006). L'**IL-33** en synergie avec le récepteur Fc ϵ RI conduit à intensifier l'activation du mastocyte. L'IL-33 augmenterait en effet les capacités de dégranulation et de sécrétion des cytokines (Sjober 2015). D'une manière générale les cytokines reconnues par les mastocytes comme l'**IL-1 β** , l'**IL-18**, l'**IL-3**, l'**IL4** et l'**IL5** sont aussi capables d'accentuer l'activation des mastocytes médiée par le récepteur Fc ϵ RI en amplifiant la dégranulation et/ou la sécrétion des médiateurs de l'inflammation (Ochi 2000; Gebbardt 2002). C'est le cas aussi pour les récepteurs aux **chimiokines**, les **TLR**, les récepteurs aux **molécules du complément** ou encore le récepteur de **S1P** (Miyazaki 2005; Jolly 2004). Toutes ces molécules permettent ainsi d'accroître le pouvoir inflammatoire des mastocytes.

Régulation négative du récepteur: La force du signal d'activation doit être contrôlée afin de se prémunir de possibles mécanismes délétères. Plusieurs molécules sont ainsi capables de réguler négativement le signal induit par le récepteur Fc ϵ RI. C'est par exemple le cas de la kinase **LYN** qui, en plus de son rôle d'inducteur de la voie Fc ϵ RI, peut réguler négativement la signalisation induite par l'activation de Fc ϵ RI (Odom 2004). De plus, il semblerait que le choix de l'activité de LYN soit dicté par la force du signal de stimulation. En effet, LYN régulerait positivement la voie d'activation quand les signaux d'activation seraient de faible intensité. En revanche, en présence de signaux de forte intensité LYN régulerait négativement la voie d'activation. Effectivement, LYN phosphorylerait et activerait des phosphatases SHP-1 qui permettraient l'extinction du signal d'activation du récepteur Fc ϵ RI en déphosphorylant les molécules importantes pour la signalisation comme les tyrosines kinases, ou VAV, Grb2, PI3K etc.. (Xiao 2005; Zang 2000).

Les protéines **RabGEF1** (Raf effector protein acting as linker between gamma-adaptin) ou **RGS123** (Regulator of G protein signaling), en ciblant les voies MAPK et PI3K respectivement, sont capables de réduire la signalisation FcεRI. En effet, RabGEF1 peut se lier à RAS afin d'empêcher son activation et donc de déclencher la voie des MAPK (Tam 2004) alors que RGS123 inhiberait l'activité de la PI3K en bloquant son association avec Gab2 (Bansal 2008).

Le récepteur **FCγRIIB** peut aussi délivrer un signal inhibiteur quand ce dernier est coagrégé avec le récepteur activateur FcεRI par le biais de complexes immuns (Daeron 1995). Sous ces conditions, le récepteur recrute alors des tyrosines kinases qui phosphorylent ses motifs ITIM ce qui permet le recrutement de molécules inhibitrices au niveau du signalosome comme la phosphatase SHP-1 (Kepley 2004; Daeron 2006).

B- Les mécanismes de sécrétion des mastocytes:

1- Les mécanismes de sécrétion des granules mastocytaires:

Une fois les mastocytes activés les mécanismes qui conduisent à la dégranulation vont se mettre en place. Les mastocytes peuvent sécréter un grand nombre de granules et sont capables de régénérer leur pool de granules en 72h afin d'effectuer de nouvelles dégranulations. Il existe plusieurs voies qui conduisent à la dégranulation des mastocytes: l'exocytose « conventionnelle », la « kiss-and-run exocytose », la « compound exocytose » et enfin la « piecemeal exocytose ».

a) Les différentes voies de sécrétion des granules mastocytaires:

L'exocytose « conventionnelle » des granules: Les granules mastocytaires peuvent, tout comme dans les LTC₄, être transportés en direction de la membrane plasmique puis fusionner avec cette dernière afin de relarguer l'intégralité de leur contenu. Néanmoins il existe aussi un mécanisme dit de **kiss-and-run exocytose** où seulement une partie du contenu du granule est relargué. En effet, durant la kiss-and-run exocytose le granule est capable de fusionner directement avec la membrane plasmique néanmoins il ne relargue qu'une partie de son contenu avant de se refermer. Ces événements de fusion partielle sont très fréquents chez les mastocytes et représentent 60% des événements de fusion entre granules et membrane plasmique. Les fusions totales ne représenteraient que 40% (Williams 2000). Le choix entre fusion partielle ou complète sera fait en fonction du nombre de SNARE disponibles ou du flux calcique généré après l'activation. En effet une stimulation modérée conduira à des dégranulations de type « kiss-and-run » alors qu'une stimulation prolongée et donc un flux calcique important, conduira à des fusions complètes (Elhamdani 2006).

La compound exocytose: La compound exocytose que l'on appelle aussi AND (anaphylactic degranulation) est caractérisée par des événements de fusion entre les granules qui précèdent la fusion des granules avec la membrane plasmique. Elle peut être séquentielle, un

granule fusionne avec la membrane plasmique puis les autres granules viennent fusionner avec ce granule, ou multivésiculaire, les granules fusionnent d'abord entre eux avant de fusionner avec la membrane plasmique (Alvarez de Toledo 1990; Pickett 2006; Lorentz 2012).

La piecemeal exocytose: La piecemeal exocytose se caractérise par des pertes de contenu des granules par un processus de bourgeonnement. En effet, des vésicules bourgeonneraient à la surface des granules et seraient ensuite transportées (sans événements de fusion) en direction de la membrane plasmique pour être sécrétées. Une conséquence visible de cette dégranulation est la présence de granules vidés, qui ont perdus leur contenu, au sein du cytoplasme (Dvorak 1994). Ce mécanisme se ferait par le biais de vésicules endosomales qui assureraient les navettes entre les granules et la membrane plasmique « Shuttling vesicles hypothesis »(Crivellato 2003; Dvorak 2005). Ce mécanisme conduit à un relargage lent des médiateurs (comparé à la compound exocytosis qui est rapide et « brutale » (Figure 35)) qui permet le maintien de la réponse sur plusieurs heures voir plusieurs jours ce qui peut être nécessaire en cas d'inflammation chronique ou de tumeur (Crivellato 2003). Ces vésicules sont difficiles à étudier, néanmoins on sait que l'IL-4 serait impliquée dans l'exacerbation de ce phénomène. En effet, les mastocytes présents au sein d'un modèle murin qui surexprime l'IL-4 réalisent leur dégranulation principalement par la piecemeal exocytose (Dvorak 1994).

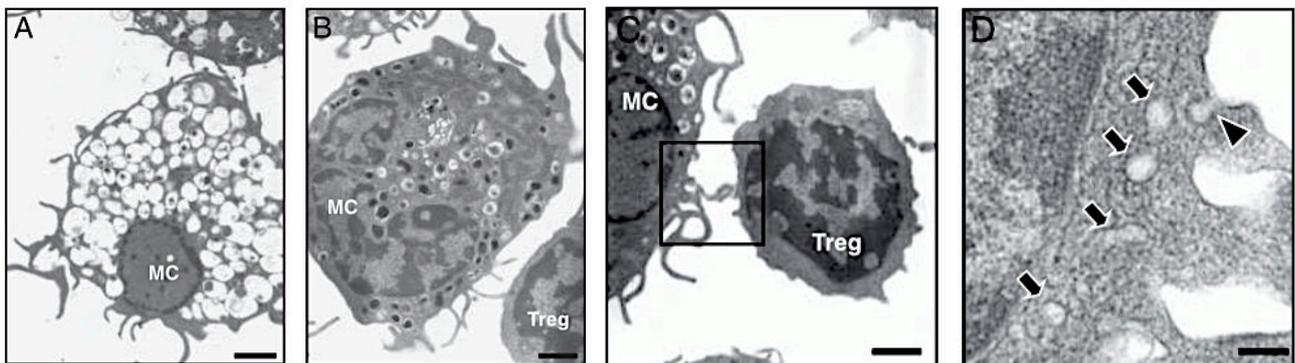


Figure 35: Etude morphologique de mastocytes par microscopie électronique. **A)** Image représentant un mastocyte après une dégranulation massive de type « compound exocytosis ». **B)** Image représentant un mastocyte après une dégranulation de type « piecemeal exocytosis » (présence de granules vidés). **C)** Connection entre un mastocyte et un Treg. **D)** Vésicules présentes dans le cytoplasme des mastocytes qui rejoignent le Treg (Piecemeal exocytosis) (Frossi 2011).

Pour finir, ce mécanisme de sécrétion semble être important pour assurer le dialogue entre les mastocytes et les autres cellules environnantes. C'est par exemple le cas des LT régulateurs qui en rentrant en contact avec les mastocytes bloquent leurs voies classiques d'exocytose (compound exocytosis) mais ces derniers seraient toujours capables de leur délivrer certains médiateurs *via* la piecemeal exocytosis et un réseau de structure tubulaire (Frossi 2011)(Figure 35)(Figure 36).

Des signalisations qui n'induisent pas les mêmes mécanismes de sécrétion: une étude récente de 2016 démontre que selon la molécule stimulatrice, les mécanismes de dégranulation

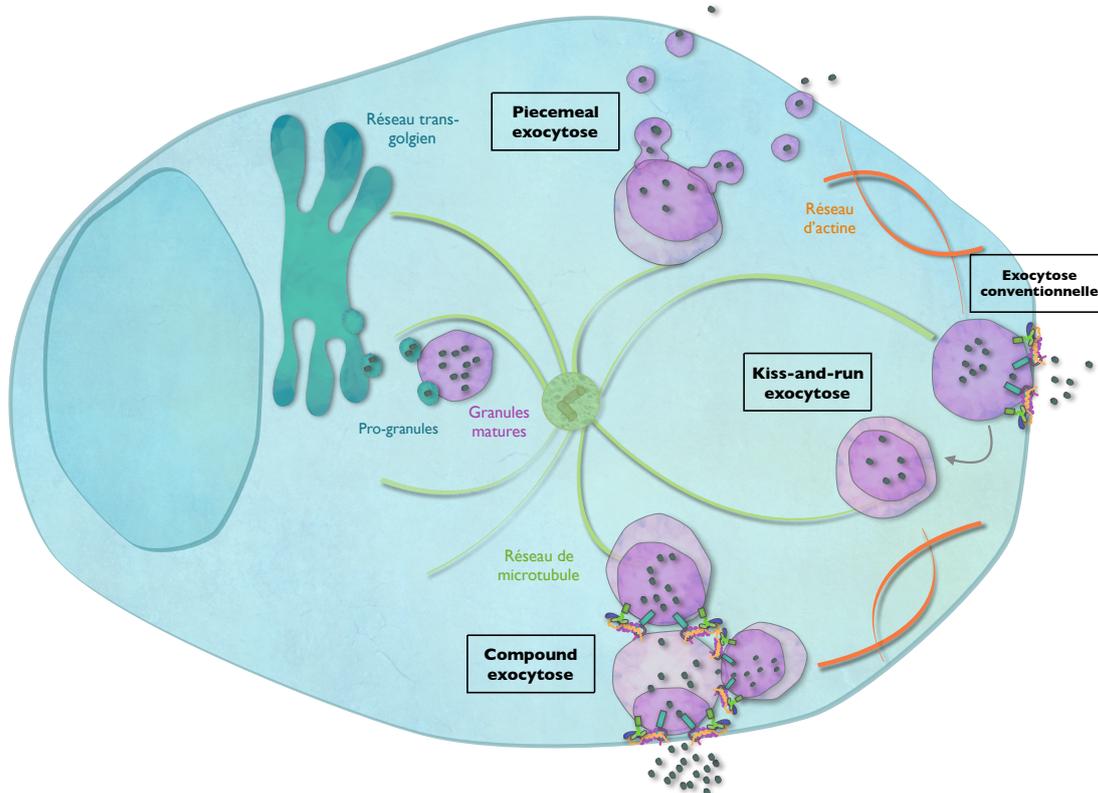


Figure 36: Schéma récapitulatif des différentes voies de sécrétion observées chez le mastocyte seront différents. Ainsi des stimulations par la substance P ou les molécules du complément C3a et C5a induisent de rapides évènements de « docking » de granules uniques associés à des élévations transitoires de l'influx calcique. Alors que la stimulation par le récepteur FcεRI induit une forte élévation du calcium qui perdure dans le temps et permet la fusion entre granules avant leur fusion avec la membrane plasmique (Compound exocytosis) (Gaudenzio 2016). Ainsi les mécanismes d'exocytose des granules sécrétoires seront différents selon la molécule stimulatrice qui a permis d'activer le mastocyte.

L'endocytose: Les granules ne se dissocient pas entièrement une fois sécrétés. Effectivement 60% des granules sont recapturés pour être recyclés. On parle de « compound endocytosis » quand le mastocyte endocyte la cavité générée à partir de la fusion de plusieurs granules. Puis on distingue la « kiss and run endocytosis » quand il s'agit de l'endocytose d'un granule qui a subi une sécrétion de type « kiss and run » ou de cavapture quand le granule fusionne et relargue tout son contenu (Cabeza 2013)(Balseiro-Gomez 2017). Ainsi les mastocytes peuvent effectuer des cycles de dégranulation/regranulation, ce qui leur permet d'assurer sur le long terme leurs fonctions (mécanisme important pour les inflammations de type chronique).

b) Le mécanisme de fusion des granules mastocytaires: (Voir figure résumé 37)

Les molécules impliquées dans la machinerie de fusion des granules mastocytaires:

Les mastocytes expriment un grand nombre de SNARE comme STX2/3/4/6, VAMP2/3/7/8 et SNAP-23. Mais seulement certaines d'entre-elles ont été impliquées dans le mécanisme d'exocytose des granules sécrétoires.

Concernant les Q-SNARE: la STX3, STX4 et SNAP-23 ont été impliquées.

La Q-SNARE SNAP-23: En effet SNAP-23, qui est localisée uniquement au niveau de la membrane plasmique des mastocytes et non au niveau des granules, serait impliquée dans leur sécrétion. Effectivement, l'utilisation d'anticorps bloquant SNAP-23 conduit à des défauts de dégranulation et de relocalisation de la protéine elle-même. SNAP-23 se concentre normalement dans des zones bien définies de la membrane plasmique là où les granules sont amenés à être sécrétés et pourrait même se relocaliser à la surface des granules (Guo 1998). D'autre part, la phosphorylation de SNAP-23 serait nécessaire à la régulation du processus de dégranulation. En effet, suite au signal d'activation du mastocyte les kinases PKC phosphoryleraient SNAP-23 et seules les SNAP-23 phosphorylées seraient en mesure de former des complexes SNARE. Ainsi, les mutations de SNAP-23 qui perturbent ces événements de phosphorylation conduisent à des défauts de sécrétion (Hepp 2005).

Les Q-SNARE STX: la STX3 est exprimée au niveau de la membrane plasmique et des granules alors que STX4 est localisée uniquement au niveau de la membrane plasmique (Guo 1998). L'inhibition de **STX3** conduit à des défauts de dégranulation (Brochetta 2014). Ainsi, compte tenu de sa double localisation, elle pourrait réguler les deux types de fusion: granule/granule et granule/membrane plasmique (Tadokoro 2007). Cependant, alors que STX4 est capable de se lier fortement à SNAP23, une étude réalisée en 2000 montre qu'on ne retrouve qu'une très faible interaction entre STX3 et SNAP-23 (Paumet 2000). Néanmoins d'autres études démontrent une interaction possible entre SNAP23 et STX3 (Veale 2010). Ainsi comme SNAP23 se relocalise à la surface des granules suite à l'activation des mastocytes, on pourrait alors trouver des complexes STX3/SNAP23 à la surface des granules pour assurer les fusions granules-granules. **STX4**, quand à elle, régulerait la fusion des granules avec la membrane plasmique en se liant à SNAP-23. En effet, les neutralisations de STX4 et SNAP23 par des anticorps bloquants induisent des défauts de sécrétion d'histamine (Paumet 2000). De plus, ces deux SNARE co-localisent au niveau de la membrane plasmique après activation du mastocyte (Sander 2008).

Néanmoins une étude récente démontre que la délétion de STX3 conduit à des défauts plus prononcés que STX4 sur la dégranulation et que leurs effets ne sont pas additifs. Ces STX joueraient donc des rôles distincts. Ainsi STX4 pourrait réguler des événements de fusion à la membrane et STX3 des événements de fusions granule/granule puis granule/membrane en se relocalisant sur la membrane plasmique (ce qui expliquerait les défauts plus prononcés) (Brochetta 2014).

Concernant les R-SNARE: il semblerait que VAMP-8 et VAMP-7 soient de bons candidats. En effet une étude réalisée par Paumet et ses collègues démontre que VAMP8 est présent au niveau des granules de sécrétion de la lignée RBL-2H3 (rodent basophilic leukemia cells) (Paumet 2000). Cette observation a été par la suite confirmée au niveau de mastocytes primaires humains par l'équipe d'Axel Lorentz qui détecte la présence de VAMP-7 et VAMP-8 au niveau des granules

mastocytaires. De plus, ses R-SNARE se relocaliseraient au niveau de la membrane plasmique suite à l'activation des mastocytes pour interagir et former un complexe avec SNAP-23 et STX4. Toutes ces SNARE semblent donc former un complexe stable important pour la sécrétion des granules mastocytaires au niveau de la membrane plasmique. En effet, les délétions de SNAP-23, STX4, VAMP-7 et VAMP-8 conduisent à des défauts de sécrétion d'histamine. Quand aux SNARE VAMP-2, VAMP-3, et STX6, elles ne seraient pas impliquées dans ce mécanisme de sécrétion (Sander 2008).

La R-SNARE VAMP2: L'implication de VAMP2 est encore controversée. En effet, Hepp et ses collègues lui accorde un rôle dans la sécrétion (Hepp 2004) alors que d'autres études démontrent que VAMP-2 ne serait pas impliquée, bien qu'elle soit présente au niveau des granules (Sander 2008; Puri 2008). Cependant, une étude de 2008 démontre qu'en temps normal VAMP-2 ne s'associe que faiblement à SNAP-23. Néanmoins, quand VAMP-8 est absente, cette association deviendrait plus fréquente. Ainsi, VAMP-2 pourrait donc compenser l'absence de VAMP-8 (Tiwari 2008).

La R-SNARE VAMP8: l'équipe de Ulrich Blank a pu démontrer que l'absence de VAMP-8 conduit à un défaut de sécrétion de β -hexosaminidase sans affecter la sécrétion des cytokines. La voie de sécrétion des granules et celle des cytokines seraient donc indépendantes (Tiwari 2008). VAMP8 formerait un complexe stable avec ses partenaires STX4 et SNAP23 pour permettre la fusion des granules avec la membrane plasmique. Elle ne serait en revanche pas capable de s'associer à STX3 (Paumet 2000).

La R-SNARE VAMP7: Une étude démontre que cette VAMP n'interagirait pas avec SNAP23 (alors que VAMP8 le pourrait) (Paumet 2000). Néanmoins une autre étude démontre la formation de complexes VAMP8/STX4/SNAP23 mais aussi de complexes VAMP7/STX4/SNAP23. VAMP7 serait donc capable d'interagir avec SNAP23 pour former des complexes SNARE (Sander 2008). De plus, VAMP7 serait aussi capable d'interagir avec STX3 au niveau des granules afin de réguler des évènements de fusion granule-granule en formant des complexes VAMP7/STX3/SNAP23 (Puri 2003).

Concernant les régulateurs de la formation du complexe SNARE: on retrouve, comme pour la sécrétion des vésicules synaptiques, des molécules MUNC13, MUNC18, Rab, complexine et synaptotagmine.

La protéine Munc13-4: La surexpression de Munc13-4 augmente les capacités de dégranulation des mastocytes. Ainsi Munc13-4 serait un régulateur positif de la sécrétion.

► En effet, Munc13-4 et Rab27, présents au niveau des granules, interagiraient afin de réguler positivement la dégranulation (Neef 2005). On pourrait alors imaginer que le complexe Rab27/Munc13-4 jouerait un rôle dans l'arrimage des granules, comme vu précédemment dans les neurones et LTc (Partie I et II de l'introduction).

- ▶ De plus, Munc13-4 est capable d'interagir avec STX4 (mais pas STX3) pour réguler la formation des complexes SNARE. Ainsi Munc13-4, comme au niveau neuronal, pourrait réguler la formation du complexe SNARE en libérant la STX de sa conformation fermée dans les mastocytes (Boswell 2012).
- ▶ Munc13-4 est aussi capable d'interagir avec la protéine Doc2α et l'inhibition de leur interaction conduit à des défauts de dégranulation. Munc13-4 agirait en partenariat avec Doc2α afin de réguler la formation du complexe SNARE et cette régulation serait dépendante du flux calcique (ces deux molécules étant des senseurs calciques) (Higashio 2008).
- ▶ Pour finir, Munc13-4 jouerait aussi un rôle dans la compound exocytose en intervenant dans les nombreux évènements de fusion qui vont avoir lieu pour conduire à la formation d'organites multivésiculaires. En effet, tout comme dans les lymphocytes Munc13-4 va permettre la fusion de différents compartiments endosomaux. Woo et ses collègues démontrent que Munc13-4 est effectivement capable de médier la fusion d'endosomes tardifs Rab7+/Munc13-4+ (correspondant à des granules de sécrétion), d'abord entre eux, puis avec des endosomes de recyclage Rab11+. De plus, cette fusion serait dépendante de l'influx calcique et d'un complexe SNARE, appelé LE SNARE (late endosome SNARE), composé de VAMP8, STX7/STX8, et Vtib (Vesicle transport through t-SNARE Interaction). Dans ce complexe SNARE, qui régule les fusions intracellulaires entre endosomes, Vtib et STX8 correspondent respectivement à la partie N-ter et Cter de SNAP (Wolfram 2000). Ainsi Munc13-4 régulerait la formation de ces compartiments multivésiculaires et leur fusion avec la membrane plasmique pour permettre leur exocytose (Woo 2017).

Les protéines Munc18-2: Munc18-2 et Munc18-3 sont exprimées dans les mastocytes (Martin-verdeaux 2003). De plus, Munc18-2 est localisée au niveau des granules de sécrétion avec son partenaire STX3 alors que Munc18-3 est localisée au niveau de la membrane plasmique comme STX4 avec qui elle interagit. Concernant leur rôle dans la sécrétion, l'inhibition de Munc18-2 induit bien des défauts de dégranulation, néanmoins **Munc18-3** ne semble pas être impliquée dans ce processus. Ces résultats semblent étonnants sachant qu'on sait que son partenaire STX4 est impliqué. **Munc18-2** en interagissant avec STX3 (pas d'interaction avec STX4) jouerait donc un rôle dans la sécrétion des granules mastocytaires (Martin-verdeaux 2003). Une étude réalisée en 2007 confirme ces résultats et démontre de plus que l'absence de Munc18-2 n'induit pas la diminution de l'expression des STX, à la différence de que l'on pouvait observer dans les LTc. Ils confirment de plus l'interaction de Munc18-2 avec STX3 et non avec STX4 *in vivo* et cette interaction est retrouvée au niveau des granules et de la membrane plasmique (Tadokoro 2007). L'inhibition de Munc18-2 et STX3 induit des défauts de dégranulation plus importants que lorsqu'ils étaient inhibés séparément. Ces deux protéines pourraient donc jouer des rôles distincts dans le mécanisme de dégranulation. En effet Munc18-2 serait important pour la translocation des granules en direction de la périphérie le long du réseau de microtubule et

STX3 serait important pour la fusion des granules. En l'absence de Munc18-2, les granules bougent aléatoirement dans le cytoplasme et ont une vitesse réduite alors que l'absence de SXT3 conduit plutôt à des défauts de fusion des granules même si ces derniers sont proches de la membrane plasmique (Brochetta 2014).

Plusieurs complexes SNARE: Diverses études démontrent que différentes associations de protéines SNARE réguleraient la sécrétion de différents médiateurs. Ainsi chaque complexe SNARE serait en charge de son type de sécrétion. Par exemple Munc18-2 serait nécessaire à la sécrétion des granules de sécrétion mais non nécessaire à la sécrétion des chimiokines CCL2 (Brochetta 2014). Concernant VAMP8 une étude réalisée en 2008 démontre que sa localisation serait spécifique à certains granules. VAMP8 régulerait la sécrétion de la sérotonine, cathepsine-D, β -hexosaminidase mais ne contrôlerait pas la sécrétion de l'histamine (Puri 2008). Néanmoins ces résultats sont contradictoires avec d'autres études qui démontrent l'implication de VAMP8 dans la sécrétion de l'histamine et qui n'observent pas cette ségrégation (Sander 2008). Concernant la sécrétion des chimiokines ces dernières seraient aussi sécrétées par différents complexes SNARE. Effectivement, alors que SNAP-23 et STX3 seraient importantes pour la sécrétion des chimiokines CXCL8, CCL2, CCL3 et CCL4, STX4 et VAMP-8 ne seraient nécessaires qu'à la sécrétion de CXCL8 (Frank 2011).

Compte tenu de la diversité des granules présents au sein des mastocytes, de la diversité des SNARE présentes au niveau des granules et de la diversité des évènements de fusion qui peuvent avoir lieu: le mécanisme de sécrétion des granules mastocytaires est une machinerie complexe à comprendre. A cela se rajoute le répertoire des molécules et mécanismes de transports qui régulent ces mécanismes de fusion ainsi que les différentes voies d'activation qui conduisent à des sécrétions variées selon les stimuli.

Les senseurs calciques complexine-2 et synaptotagmine-2: sont aussi importants pour réguler la dégranulation mastocytaire. Effectivement, une étude de 2005 démontre que la délétion de la **complexine-2** induit des défauts de dégranulation. De plus, la complexine-2, d'abord cytoplasmique, rejoindrait la membrane plasmique après activation du mastocyte pour augmenter la sensibilité au calcium du complexe SNARE (Tadokoro 2005). Ainsi la complexine-2 serait un régulateur positif de la dégranulation. La **synaptotagmine-2 (SYT2)** serait aussi impliquée dans la sécrétion des granules du fait de ses capacités de senseur calcique. Effectivement, les souris déficientes pour SYT2 ont des défauts de sécrétion de β -hexosaminidase et d'histamine, ce qui les rend plus résistantes aux chocs anaphylactiques. Néanmoins sa fonction exacte n'a pas encore été décrite. La complexine étant un régulateur positif (augmente la sensibilité au calcium) on peut imaginer qu'elle stabilise le complexe SNARE de façon à ce qu'il soit ciblé par la SYT2. La fusion serait ainsi déclenchée suite à la coopération de ces deux effecteurs (Melikoff 2009).

Les molécules Rab: Plusieurs Rab ont été impliquées dans la régulation de l'exocytose des granules mastocytaires. Une équipe publie même en 2012 un screen de 30 Rab afin d'analyser leur impact sur l'exocytose (Azouz 2012). Néanmoins ces données doivent être confirmées par d'autres analyses plus ciblées, Rab par Rab, afin de connaître leur fonction exacte (C'est d'ailleurs ce qu'ils ont fait pour Rab5, vu dans la partie biogénèse, et Rab12 détaillée plus bas). Voici donc ci-dessous les Rab qui ont fait l'objet d'études approfondies.

- ▶ Comme déjà décrit dans l'introduction, la petite GTPase **Rab27** est impliquée dans le processus de dégranulation des mastocytes. En effet, Rab27a et Rab27b sont toutes les deux présentes au niveau des granules de sécrétion mais seule l'inhibition de Rab27b conduit à des défauts de sécrétion de β -hexosaminidase. L'inhibition de Rab27a conduit, elle, à une augmentation de la dégranulation (Mizuno 2007). Malgré leur 70% d'homologie, ces deux isoformes auraient donc des fonctions bien distinctes. Effectivement, **Rab27b** agirait comme un régulateur positif de la dégranulation grâce à son partenaire Munc13-4 et régulerait la translocation des granules lytiques (connection avec le cytosquelette) (Mizuno 2007) alors que **Rab27a** agirait comme un régulateur négatif en maintenant l'intégrité du réseau d'actine probablement *via* ses partenaires: la mélanophiline et myosine Va (Interaction déjà démontrée dans d'autres types cellulaires). En effet, les phénotypes des souris déficientes en mélanophiline ou myosine Va sont similaires au phénotype des souris déficientes en Rab27a (localisation irrégulière de l'actine), alors que le phénotype des souris déficientes en Rab27b est similaire à celles déficientes en Munc13-4 (Singh 2013). L'importance de l'actine dans le mécanisme de dégranulation sera traitée dans la suite de l'introduction.
- ▶ **Rab37**, présente au niveau des granules, serait un régulateur négatif de la dégranulation. En effet, son inhibition conduit à l'augmentation des événements de sécrétion et cette augmentation est contrecarrée par l'inhibition de Rab27a/Rab27b ou Munc13-4. De plus, Rab37 est capable d'interagir avec Munc13-4 et donc de former un complexe avec Rab27/Munc13-4. Rab37 pourrait donc réguler négativement la dégranulation en agissant sur le complexe Rab27b/Munc13-4 (A noter que l'interaction entre Rab27 et Munc13-4 n'est pas affectée par Rab37) (Higashio 2016).
- ▶ **Rab3D**, présente au niveau des granules, serait un régulateur négatif de la formation des complexes SNARE présents au niveau des granules. Effectivement, sa surexpression conduit à l'inhibition de la dégranulation (Roa 1997). Le mode d'action de la GTPase Rab3D est calcium dépendant et serait lié à l'action de la kinase Rak3D qui s'associe à elle. L'activité de Rak3D est maximale dans les cellules non stimulées et diminue au cours de l'activation du mastocyte. Rak3D a pour cible STX4 qu'elle phosphoryle en N-ter (mais n'agit pas sur les autres SNARE) et cette phosphorylation diminue les capacités d'interaction entre STX4 et SNAP-23. Ainsi le calcium, grâce à Rab3D, peut moduler la formation du complexe SNARE composé de STX4 (Pombo 2001).

► La GTPase **Rab12** serait impliquée dans la régulation négative du processus de dégranulation car l'expression de son mutant constitutivement actif conduit à une inhibition de la sécrétion (Les granules s'accumulent au niveau périnucléaire) (Azouz 2012; Efergan 2016). En effet, Rab12 agirait sur le transport rétrograde des granules par le biais de son interaction avec le complexe RILP/dynéine. Effectivement, nous savons que les granules peuvent subir des mouvements rétrogrades, c'est par exemple le cas lors de la « kiss-and-run exocytosis » ou les granules après avoir libéré une partie de leur contenu font « demi-tour ». Dans cette étude les auteurs montrent ainsi que Rab12 serait capable d'effectuer ce transport le long du réseau de microtubules grâce à une nouvelle interaction décrite entre Rab12 et la molécule RILP qui se lie à la dynéine (même interaction que l'on observe avec Rab7 dans les LTC). Ainsi Rab12 pourrait réguler négativement le processus de dégranulation (Efergan 2016)(**Figure 37**).

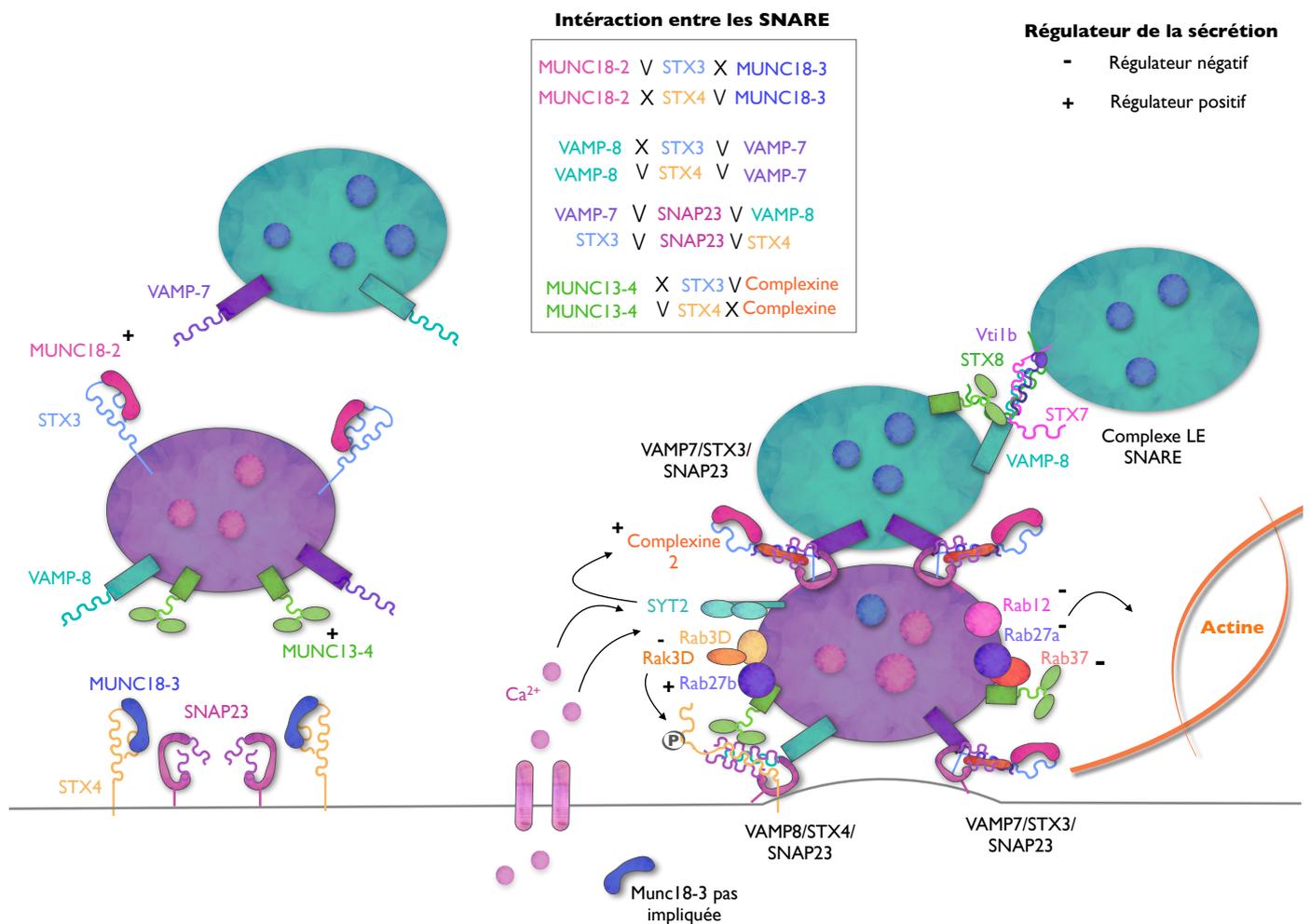


Figure 37: Schéma récapitulatif de la machinerie d'exocytose des granules mastocytaires

Le désassemblage des complexes SNARE: se fait *via* la **machinerie NSF**, comme celle observée au niveau des vésicules synaptiques. Ces mécanismes de recyclage sont primordiaux. En effet, l'inhibition de la machinerie NSF conduit à la perte du désassemblage des SNARE ce qui inhibe drastiquement l'exocytose des mastocytes (Puri 2003).

Questionnement: Etrangement, la protéine Munc18-3 n'est pas impliquée dans la dégranulation alors que son partenaire STX4 le serait. En effet, on observe le complexe STX4/VAMP8/SNAP23 régulé par Munc13-4 à la membrane. On observe la présence de complexes STX3/VAMP7/SNAP23 au niveau de la membrane et des granules mais Munc13-4 ne régulerait pas ce complexe (pas d'association avec STX3) mais Munc18-2 le pourrait (comment la STX3 serait-elle libérée de sa forme inactive?) Ce complexe a-t-il une action au niveau de la membrane plasmique et/ou au niveau du granule? On observe l'existence d'un complexe LE SNARE régulé par Munc13-4 qui régulerait les fusions intracellulaires des granules. Ce complexe pourrait-il remplacer les complexes STX3/VAMP7/SNAP23 ou agiraient-ils séparément ?

c) L'implication du cytosquelette dans le processus de sécrétion: (Figure résumé 39)

Implication du réseau de microtubules:

Le cytosquelette est essentiel au relargage des granules mastocytaires. En effet, une étude réalisée en 2002 démontre que la dynamique du réseau de microtubules est indispensable pour la sécrétion des granules. L'utilisation de nocodazole conduit à l'inhibition de la dégranulation et à la dispersion des granules au sein du cytoplasme alors que ces derniers sont normalement reliés au réseau de microtubules. Ainsi le réseau de microtubules serait nécessaire pour le positionnement et le trafic des granules de sécrétion (Martin-verdeaux 2003; Nishida 2005). La réorganisation des microtubules se manifeste notamment par la formation de protrusions à la surface des cellules suite au signal d'activation. De plus, ces protrusions sont nécessaires à la sécrétion des granules: on observe une corrélation entre la formation de ces protrusions et les événements de dégranulation (Hajkova 2011)(Figure 38).

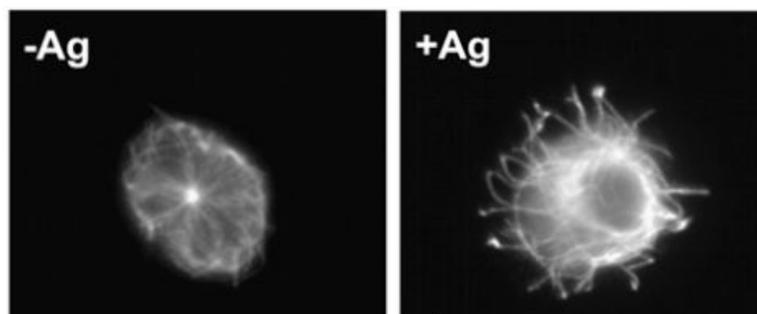


Figure 38: Organisation du réseau de microtubule à l'état basal (gauche) ou après activation du mastocyte (droite) (Hajkova 2011)

Lien entre Munc18-2 et le réseau de microtubules: Le rôle de **Munc18-2** dans la translocation des granules mastocytaires est encore controversé. En effet, une étude de 2007 démontre que l'inhibition de Munc18-2 ne modifie pas la distribution des granules (Takodoro 2007) alors qu'une autre équipe suggérait quelques années plus tôt le contraire (Martin-verdeaux 2003). Une étude de 2014 analyse une nouvelle fois le rôle de Munc18-2: les auteurs démontrent ainsi que Munc18-2 est bien impliquée dans la sécrétion des granules en intervenant dans la translocation des granules. Effectivement, l'absence de Munc18-2 (qui interagissait avec la

tubuline) conduit à la dispersion des granules dans le cytoplasme le long du réseau de microtubules alors que ces derniers devraient normalement se polariser en direction de la membrane plasmique suite à l'activation du mastocyte (Brochetta 2014).

Lien entre les Rab et le réseau de microtubules: Nous avons vu précédemment que la GTPase **Rab12** était importante pour la régulation négative de la sécrétion *via* un transport rétrograde des granules par le biais du complexe RILP/dynéine (Efergan 2016). Le réseau de microtubules serait donc nécessaire à la régulation négative de la sécrétion. Néanmoins, le réseau de microtubules est aussi nécessaire au transport des granules en direction de la périphérie (Martin-verdeaux 2003). Ce transport antérograde pourrait être assuré par la protéine **Rab27b**. Effectivement, l'absence de Rab27b conduit à une localisation périnucléaire des granules de sécrétion (Mizuno 2007). Ainsi Rab27b pourrait être impliquée dans le transport antérograde des granules, peut-être grâce à des moteurs moléculaires de type kinésine, comme dans les LTC. Cette hypothèse a notamment fait l'objet de nos recherches et les résultats seront exposés dans cette thèse.

Les régulateurs du réseau de microtubules:

La protéine **STIM1** induit la réorganisation du réseau de microtubules dans les mastocytes activés. STIM1 est normalement localisée au niveau du réticulum endoplasmique, mais suite à l'activation du mastocyte et donc au relargage de calcium intracellulaire, la protéine se relocalise près de la membrane plasmique pour y activer de nouveaux canaux calciques. L'absence de STIM1 conduit à une baisse de la concentration en calcium intracellulaire et à une perte de la formation des protrusions conduisant ainsi à des défauts de dégranulation (Hajkova 2011). Le rôle de STIM1 dans la nucléation des microtubules a en effet déjà été démontré. STIM1 s'associerait avec la +TIPS EB1 pour induire la formation de protrusions (Grigoriev 2008). Néanmoins ces résultats s'opposent à ceux de Nishida et ses collègues publiés en 2005 (Explications plus loin).

La molécule **DOCK5** serait aussi importante pour réguler la dynamique du réseau de microtubules nécessaire à la sécrétion des granules. En effet, en s'associant à Nck2 (NCK Adaptor Protein 2) et Akt, DOCK5 (Dedicator of cytokinesis 5) inactiverait la sérine/thréonine kinase GSK3 β (Glycogen synthase kinase 3 beta) (phosphorylation par Akt) qui régulait négativement la dynamique des microtubules. Effectivement, on observe en l'absence de DOCK5 une diminution de la dynamique de croissance des microtubules ce qui conduit à de sévères défauts de dégranulation de β -hexosaminidase et d'histamine. Cependant, la sécrétion de l'IL-6, de l'IL-13 et des médiateurs lipidiques n'est pas affectée par l'absence de DOCK5 (Ogawa 2014).

Implication du réseau d'actine:

De plus, tout comme dans les LTC, la dépolymérisation de l'actine au niveau du site de sécrétion se révèle primordiale, non pas pour la polarisation des granules, mais pour les évènements de fusion. Effectivement, l'utilisation de cytochalasine D qui dépolymérise l'actine

conduit à une augmentation de la sécrétion sans affecter la polarisation des granules sur le réseau de microtubules. La dépolymérisation de l'actine est donc nécessaire au relargage des granules dans les mastocytes (comme précédemment observé dans les LTC) (Martin-verdeaux 2003; Nishida 2005). En effet, Deng et ses collègues ont pu observer qu'avant l'activation des mastocytes, l'actine formait une barrière physique qui rend la membrane plasmique inaccessible aux granules de sécrétion. De plus, ils ont pu observer que l'actine se réorganisait après l'activation des mastocytes et que la fusion des granules ne se faisait qu'au niveau de zones dépourvues en actine (Deng 2009). L'actine a donc besoin de subir des réarrangements suite au signal d'activation du mastocyte.

Molécules impliquées dans la réorganisation du réseau d'actine:

Nous avons vu précédemment que **Rab27a** est un régulateur négatif de la sécrétion en maintenant l'intégrité du réseau d'actine, probablement par l'intermédiaire de ses partenaires la mélanophiline et la myosine Va. Effectivement, en l'absence de Rab27a on observe une organisation irrégulière de l'actine (Avec Rab27a la répartition était homogène le long de la membrane plasmique) et les granules sont plus proches de la membrane plasmique: augmentation de l'accessibilité à la membrane (Singh 2013). Rab27a participe donc au maintien de cette « barrière » d'actine.

Les protéines **coronine 1A** et **1B** seraient des régulateurs négatifs de la dégranulation. Effectivement l'absence de coronine 1A conduit à l'augmentation du relargage de β -hexosaminidase. L'absence de coronine 1B, quand à elle, ne conduit pas à une augmentation de la dégranulation, cependant le double KO coronine 1A et 1B exacerbe l'hyperdégranulation observée en l'absence de coronine 1A seule. coronine 1B pourrait donc avoir un rôle secondaire compensatoire. Concernant la sécrétion des cytokines, l'absence de coronine 1A conduit à une diminution de la sécrétion des cytokines IL-6 et TNF et la coronine 1B ne semble pas être impliquée. Ainsi, encore une fois, il semble que la sécrétion des cytokines et des granules de sécrétion empruntent des voies différentes. Le mode d'action des coronines est le suivant: les coronines se localisent à l'état basal au niveau de l'anneau d'actine mais après l'activation des mastocytes ces deux protéines sont phosphorylées puis se relocalisent dans le cytoplasme. Ces protéines, en se liant à l'actine, seraient importantes pour stabiliser le réseau, empêchant ainsi la dégranulation (Foger 2011).

La kinase Pak1 (Serine/threonine-protein kinase PAK1 activée par Ras et les Rho-GTPase Rac1/2 et Cdc42) et la phosphatase PP2A (Serine/threonine-protein phosphatase 2A) sont aussi impliquées dans le mécanisme de dégranulation. En effet Pak1 active PP2A qui déphosphoryle les molécules ERM (Erzin/Radixin/moesin) connues pour réguler la dynamique du réseau d'actine. Ainsi, le complexe **Pak1-PP2A-ERM** régule les réarrangements du réseau d'actine en induisant sa dépolymérisation. L'absence de Pak1 conduit à la persistance du réseau d'actine et donc à des défauts de dégranulation (Staser 2012)(Figure 39).

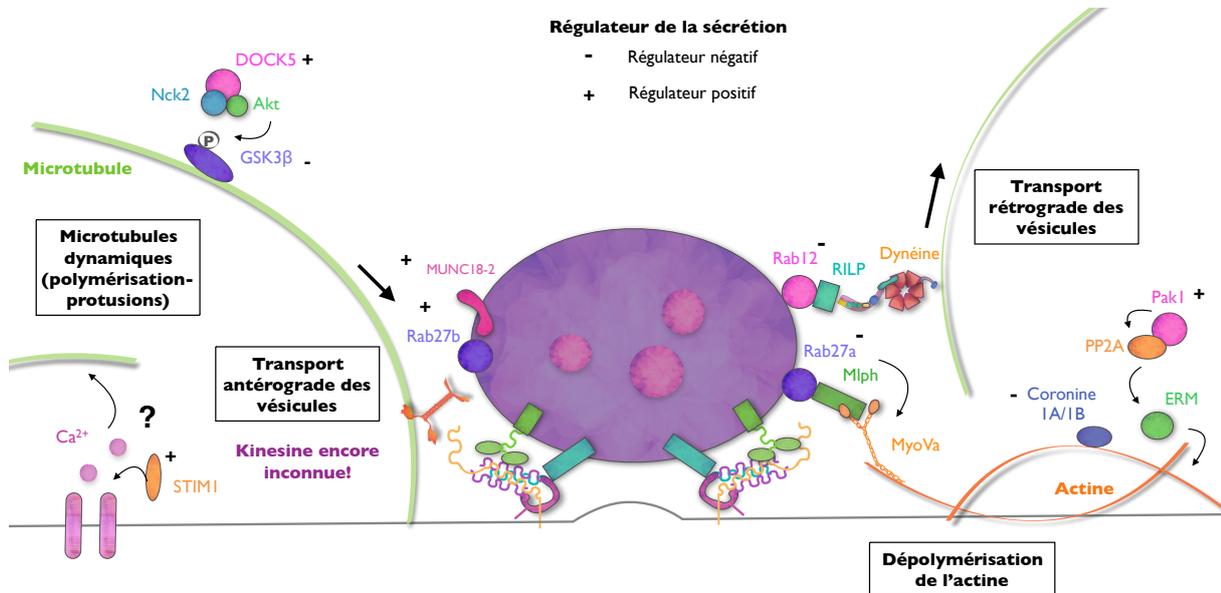


Figure 39: Schéma récapitulatif de l'implication du cytosquelette dans la machinerie d'exocytose des granules mastocytaires

d) Sécrétion polarisée ou non polarisée?:

La sécrétion des granules mastocytaires se fait-elle de manière polarisée comme dans les LTc? On aurait tout d'abord tendance à penser que les mastocytes réalisent des sécrétions non polarisées compte tenu du nombre de granules et du relargage massif d'un grand nombre de granules lors des évènements de sécrétion. Néanmoins, il a été démontré en 1978 par microscopie électronique que les mastocytes pouvaient effectuer les deux types de sécrétion. En effet, quand ils étaient stimulés avec des billes « coatées » en concanavalin A la sécrétion était polarisée alors que quand la concanavalin A était administrée de façon soluble la sécrétion était alors non-directionnelle (Lawson 1978). Des études plus récentes ont pu confirmer ces résultats en montrant qu'une synapse pouvait se mettre en place quand le mastocyte était stimulé par des ligands immobilisés sur une bicouche lipidique. Effectivement, on observe comme pour les synapses des LTc, une concentration des récepteurs FcεRI au centre de la zone de contact et une réorganisation de l'actine en périphérie. Ainsi les mastocytes pourraient former ce genre de synapse afin de tuer des cibles parasites ou encore de communiquer avec d'autres types cellulaires (Caroll-Portillo 2012a; Caroll-Portillo 2012b)(Figure 40).

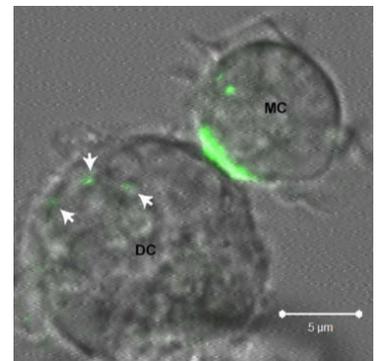


Figure 40: Interaction entre un mastocyte et une cellule dendritique mettant en évidence la synapse mastocytaire (IgE anti-DNP en vert) (Caroll-Portillo 2012b)

e) Les voies de signalisation impliquées dans la dégranulation: (Figure résumé 41)

L'activation des mastocytes, *via* l'aggrégation du récepteur FcεRI, conduit au relargage des médiateurs de l'inflammation préalablement stockés au sein de granules comme les protéases, protéoglycanes et amines biogènes, par un processus de dégranulation. Cette activation conduit aussi à la sécrétion de médiateurs qui nécessitent une synthèse *de novo*, sans activation des facteurs de transcription comme les leucotriènes / prostaglandines ou avec activation des facteurs

de transcription comme les cytokines / facteurs de croissance. Ainsi plusieurs voies de signalisation vont être mises en place afin de réguler ces diverses sécrétions. Ici nous nous intéresserons à la signalisation nécessaire au relargage des granules de sécrétion.

Les molécules régulatrices de cette voie d'activation:

Nous avons vu précédemment qu'un grand nombre de protéines de signalisation ont été impliquées dans le processus de dégranulation des granules mastocytaires. Il s'agit par exemple des protéines kinases FYN et SYK mais aussi des molécules adaptatrices Gab2, SLP-76 et LAT. En effet, les souris déficientes pour SYK, FYN, Gab2, LAT et SLP-76 sont résistantes aux chocs anaphylactiques (Parravicini 2002; Costello 1996; Gu 2001). De plus, les protéines impliquées dans les voies de signalisation en aval de ces molécules adaptatrices sont aussi impliquées dans le processus de dégranulation des mastocytes comme VAV1 (Manetz 2001), PI3K (Nishida 2011), STIM1 (Baba 2008), BTK (Iwaki 2005), etc...

Précédemment, nous avons pu voir qu'il existait deux voies de signalisation complémentaires au sein du mastocyte: Une voie FYN/Gab2/PI3K et une voie LYN/SYK/PLC γ 1/Ca $^{2+}$. Ces différentes voies de signalisation vont conduire par la suite à la synthèse et sécrétion de cytokines mais aussi à la translocation et fusion des granules mastocytaires. Néanmoins de récentes études ont pu démontrer que ces deux voies avaient des rôles distincts concernant leur implication dans la sécrétion des granules mastocytaires. En effet la voie FYN/GAB2/PI3K serait plutôt impliquée dans la translocation des granules alors que la voie LYN/SYK/PLC γ 1/Ca $^{2+}$ permettrait la fusion des granules avec la membrane plasmique (Nishida 2005).

Signalisation impliquée dans la translocation des granules:

Nishida et ses collègues démontrent en 2005 que la voie de signalisation **FYN/Gab2/PI3K** serait importante pour la réorganisation du réseau de microtubules et donc pour la translocation des granules. Effectivement, nous avons précédemment vu que le réseau de microtubules est indispensable à la translocation des granules en direction de la membrane plasmique (Martin-verdeaux 2003). Cette translocation serait de plus indépendante du calcium contrairement aux événements de fusion qui nécessitent un influx calcique. En effet, l'utilisation de drogues inhibant l'influx calcique ne perturbe pas la translocation des granules à la membrane plasmique alors qu'une drogue inhibant le réseau de microtubules conduit à un défaut de translocation des granules. De plus l'inhibition de FYN et Gab2 conduit à une diminution de la polymérisation des microtubules nécessaires à la dégranulation alors que l'inhibition de LYN et SLP-76 n'induit aucun changement sur le réseau de microtubules (Nishida 2005). La voie d'activation qui conduit à la translocation des granules mastocytaires par le biais du réseau de microtubules serait donc dépendante de **FYN/Gab2/PI3K** mais indépendante de la voie calcique.

Concernant les acteurs en aval de cette voie Fyn/Gab2/PI3K:

La **PI3K** est nécessaire à la translocation des granules à la membrane plasmique (Nishida 2011). En effet, la PI3K pourrait induire des voies de signalisation qui conduiraient à la réorganisation du réseau de microtubules. Par exemple, nous avons vu précédemment que les molécules VAV et BTK, recrutées après l'activation de la PI3K, pouvaient activer des Rho-GTPases comme Rac et Cdc42 impliquées dans la réorganisation du réseau de microtubules (Manetz 2001; Kuehn 2010). La PI3K est aussi capable d'activer Akt et on a vu précédemment que **DOCK5**, qui en s'associant avec **Nck2** et **Akt**, inactive la sérine/thréonine kinase **GSK3β**, qui régulaît négativement la dynamique des microtubules, en facilitant sa phosphorylation par Akt. Ainsi PI3K par le biais de DOCK5 et Akt inactive GSK3β et permet alors la croissance dynamique des microtubules nécessaire à la translocation des granules (Ogawa 2014). La PI3K serait aussi en mesure de se lier et d'activer la GTPase **ARF1** (ADP-ribosylation factor 1) qui serait nécessaire à la translocation des granules mais pas à la sécrétion des cytokines (Nishida 2011).

Concernant la molécule **STIM1**, son implication est encore controversée. En effet, nous avons précédemment vu que STIM1 serait importante pour la formation des protrusions des microtubules. En effet, la perte de STIM1 conduit à une baisse de la concentration en calcium intracellulaire et à une perte de la formation des protrusions conduisant ainsi à des défauts de dégranulation (Hajkova 2011). Néanmoins ces résultats sont contradictoires avec ceux de l'étude de Nishida et ses collègues qui démontrent que l'utilisation d'inhibiteurs de l'influx calcique ne perturbe pas la formation des microtubules (Nishida 2005). Ces différences pourraient s'expliquer par des variations dans les méthodes d'activation (+/- Integrine) ou de préparation des échantillons. On pourrait aussi imaginer que les premières étapes de formation du réseau de microtubules et de translocation des granules se fassent en l'absence de calcium, alors que les étapes plus tardives de formation de protrusions se feraient en présence de calcium (Draber 2012).

Signalisation impliquée dans la fusion des granules:

La fusion des granules est dépendante de la voie LYN/SYK/PLCγ1/Ca²⁺ (Nishida 2005) qui permet un important influx calcique et l'activation de la PKC-β. En effet, l'influx de calcium et l'activation des PKC-β seraient essentiels pour la régulation de la formation des complexes SNARE nécessaires à la fusion des granules.

Le calcium: Comme vu précédemment, le calcium peut influencer tous les senseurs calciques (grâce à leurs domaines C2) qui régulent la formation des complexes SNARE comme **Munc13-4** et **Doc2a** (Higashio 2008) mais aussi la **complexine II** (Tadokoro 2005), la **synaptotagmine II** (Melikoff 2009) ou encore la kinase associée à Rab3D: **Rak3D** (Pombo 2001). Ainsi la voie LYN/SYK/PLCγ1/Ca²⁺, déclenchée par l'activation du récepteur FcεRI régule la formation des complexes SNARE et donc les événements de fusion par l'influx calcique qu'elle génère. De plus, le calcium est aussi nécessaire à la dépolymérisation de l'anneau d'actine au

niveau de la membrane plasmique qui faisait barrière aux granules mastocytaires (Nishida 2005). Les voies conduisant à la dépolymérisation de l'actine seront abordées plus bas.

Les PKC sont essentielles à la régulation des évènements de fusion: Deux PKC ont été impliquées dans la sécrétion des mastocytes: **PKC β** qui dépend du calcium et **PKC δ** qui ne dépend pas du calcium (Osawa 1993; Parravicini 2002). En l'absence de PKC β la dégranulation serait drastiquement réduite (Osawa 1993; Nechushtan 2000). Le rôle de PKC δ est lui encore controversé. En effet, certaines équipes démontrent que son absence conduit à une diminution de la dégranulation (Osawa 1993) alors que d'autres montrent que son absence augmenterait la dégranulation (régulateur négatif *via* SHIP) (Leitges 2002).

Quels sont les rôles que peuvent jouer les PKC?

Les PKC sont connues pour réguler les dernières étapes de l'exocytose en agissant sur les protéines SNARE et les molécules qui régulent la formation de ce complexe. En effet, l'utilisation d'inhibiteur anti-PKC conduit au blocage de la sécrétion des plaquettes et à l'inhibition de la phosphorylation de **STX4**. Effectivement, la PKC en phosphorylant STX4, empêcherait son interaction avec SNAP23 ce qui conduirait au désassemblage des complexes SNARE (Chung 2000). Ces désassemblages sont indispensables pour pouvoir recycler les protéines SNARE après les évènements de fusion et permettre la formation de nouveaux complexes.

Ces PKC pourraient aussi phosphoryler les molécules **Munc18** pour empêcher leur interaction avec les STX. Effectivement, une étude réalisée en 1996 dans les neurones et une autre réalisée en 1999 dans les plaquettes démontrent que les PKC sont capable de phosphoryler Munc18, ce qui empêche son interaction avec la STX. Ainsi la STX libérée de Munc18 (qui maintenait STX en conformation fermée) peut maintenant aller interagir avec SNAP-25 et VAMP. Les PKC faciliteraient donc aussi l'assemblage des complexes SNARE (Fujita 1996; Reed 1999).

De plus, les PKC seraient capables de phosphoryler les **synaptotagmines**. Effectivement Hilfiker et ses collègues démontrent en 1999 que la PKC est capable de phosphoryler la synaptotagmine I au niveau des vésicules synaptiques pour réguler ces fonctions régulatrices (Hilfiker 1999). Ainsi les PKC sont importantes pour réguler la formation des complexes SNARE nécessaires aux évènements de fusion. Néanmoins ces fonctions doivent être vérifiées au niveau des mastocytes.

Pour finir, les PKC vont aussi être importantes pour réguler la dépolymérisation du réseau d'actine indispensable à l'exocytose des granules.

La dépolymérisation de l'actine: Le calcium est indispensable à la dépolymérisation de l'anneau d'actine, présent au niveau de la membrane plasmique, qui faisait barrière aux granules mastocytaires (Nishida 2005). La dépolymérisation de l'actine qui a lieu seulement en présence de calcium pourrait tout d'abord être dépendante des PKC calciques. En effet, il a été démontré dans les plaquettes que les PKC seraient capables de phosphoryler la chaîne lourde et légère de la myosine (Kawamoto 1989). Ces résultats ont par la suite été confirmés en 2006 dans les

mastocytes ou la PKC-β phosphorylerait la myosine IIA afin de réguler la dégranulation *via* le réseau d'actine (Ludowyke 2006). Les myosines sont en effet connues pour réguler la dynamique du réseau d'actine: L'inactivation des kinases associées à la myosine II seraient par exemple capables d'empêcher le désassemblage de l'actine (Sullivan 2000). Ainsi la phosphorylation de la myosine II par les PKC-β pourrait être nécessaire à la dépolymérisation de l'actine.

D'autres PKC ont par la suite été caractérisées et notamment la PKCα (calcium dépendante) qui serait un régulateur négatif de la dégranulation en phosphorylant la cofiline ce qui inhiberait la dépolymérisation de l'actine (Sakuma 2012).

Pour finir, nous avons aussi précédemment vu que les protéines Ras et Rho-GTPase Rac1/2 et Cdc42 activent la kinase Pak1 qui active à son tour la phosphatase PP2A qui déphosphoryle les molécules ERM (Erzin/Radixin/moesin) connues pour réguler la dynamique du réseau d'actine. Ainsi, le complexe **Pak1-PP2A-ERM** induirait la dépolymérisation de l'actine (Staser 2012). Les voies de signalisation qui conduisent donc à l'activation de Ras ou des Rho-GTPase peuvent donc être impliquées dans la dépolymérisation de l'actine. Il s'agirait par exemple des voies déclenchées par VAV et SOS (**Figure 41**).

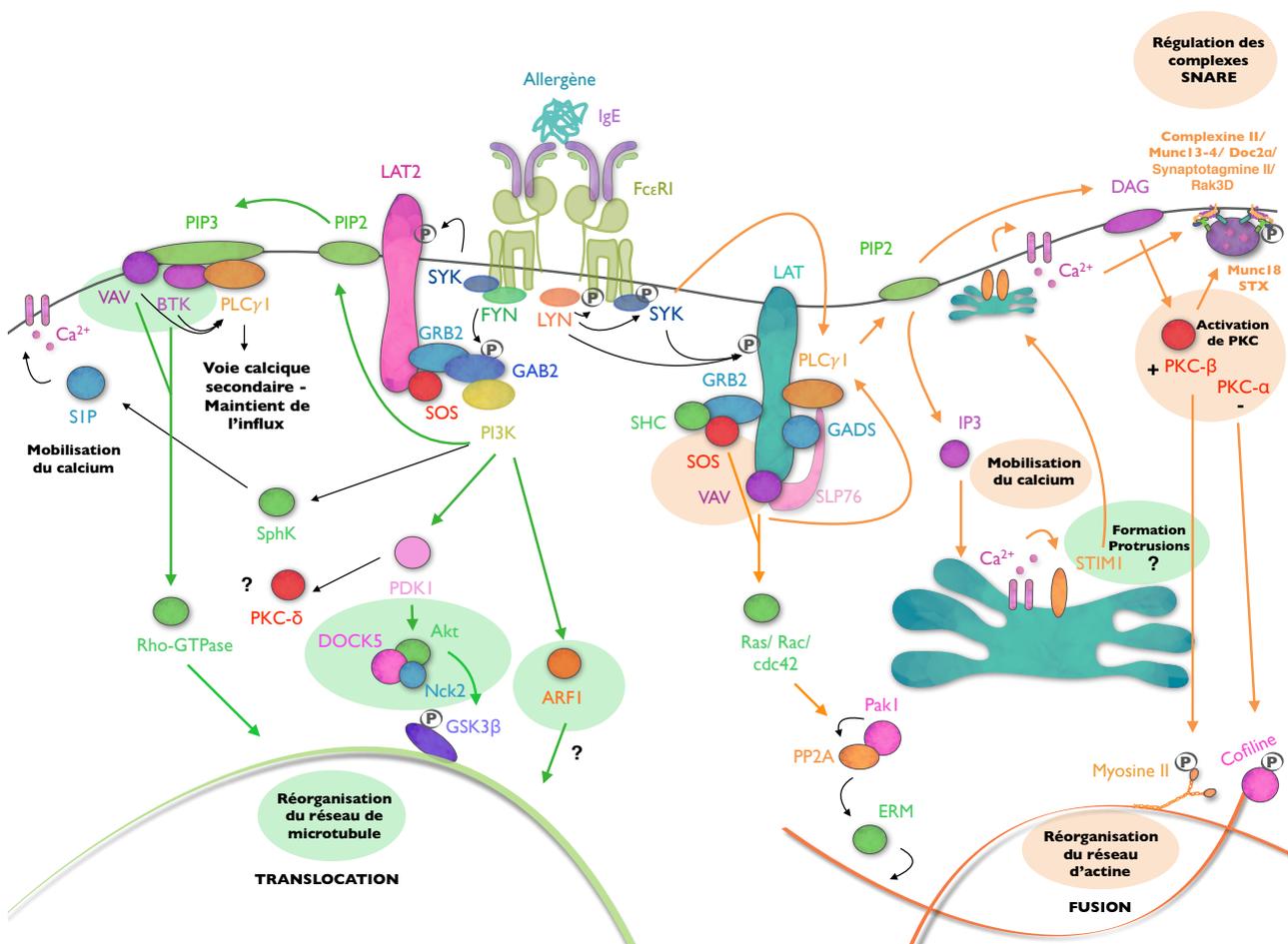


Figure 41: Schéma récapitulatif des différentes voies impliquées dans le transport et la fusion des granules mastocytaires

2- Le mécanisme de sécrétion des cytokines:

a) Les cytokines et chimiokines présentes au sein des mastocytes:

Les mastocytes sont capables de sécréter un grand nombre de chimiokines et cytokines après leur activation *via* le récepteur FcεRI. On retrouve par exemple chez la souris les chimiokines CCL1/2/3/4/5/7/17/22, CXCL1/2/10 et XCL1 mais aussi les cytokines: IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16 IL-22, TNF-α, GM-CSF, IFN-γ, TGF-β, etc...(Gali 2005). La sécrétion des cytokines et chimiokines n'emprunterait pas une unique voie mais engagerait une machinerie complexe composée d'une multitude de voies différentes. Une partie des cytokines mastocytaires sont pré-stockées dans des granules comme par exemple la cytokine TNF (Pelletier 1998) ou encore les cytokines IL-4, IL-5, IL-13 (Gali 2005). Mais suite à l'activation des mastocytes, on observe aussi une sécrétion constitutive de cytokines générées par de nouvelles transcriptions. Effectivement, les différentes voies de signalisation précédemment détaillées (PKC/VAV/SOS/PI3K/Akt/etc...) permettent l'activation des facteurs de transcription NF-κB, NF-AT, FOS et JUN qui permettent la synthèse de nouvelles cytokines et chimiokines. Dans cette dernière partie nous ne détaillerons pas les différentes voies de signalisation qui conduisent à la sécrétion de ces diverses cytokines et chimiokines. Car selon les cytokines et chimiokines étudiées, les mécanismes et voies de signalisations peuvent varier. Ici nous nous intéresserons plutôt à la machinerie de transport qui pourrait permettre leur sécrétion.

b) Machinerie de sécrétion des cytokines et chimiokines:

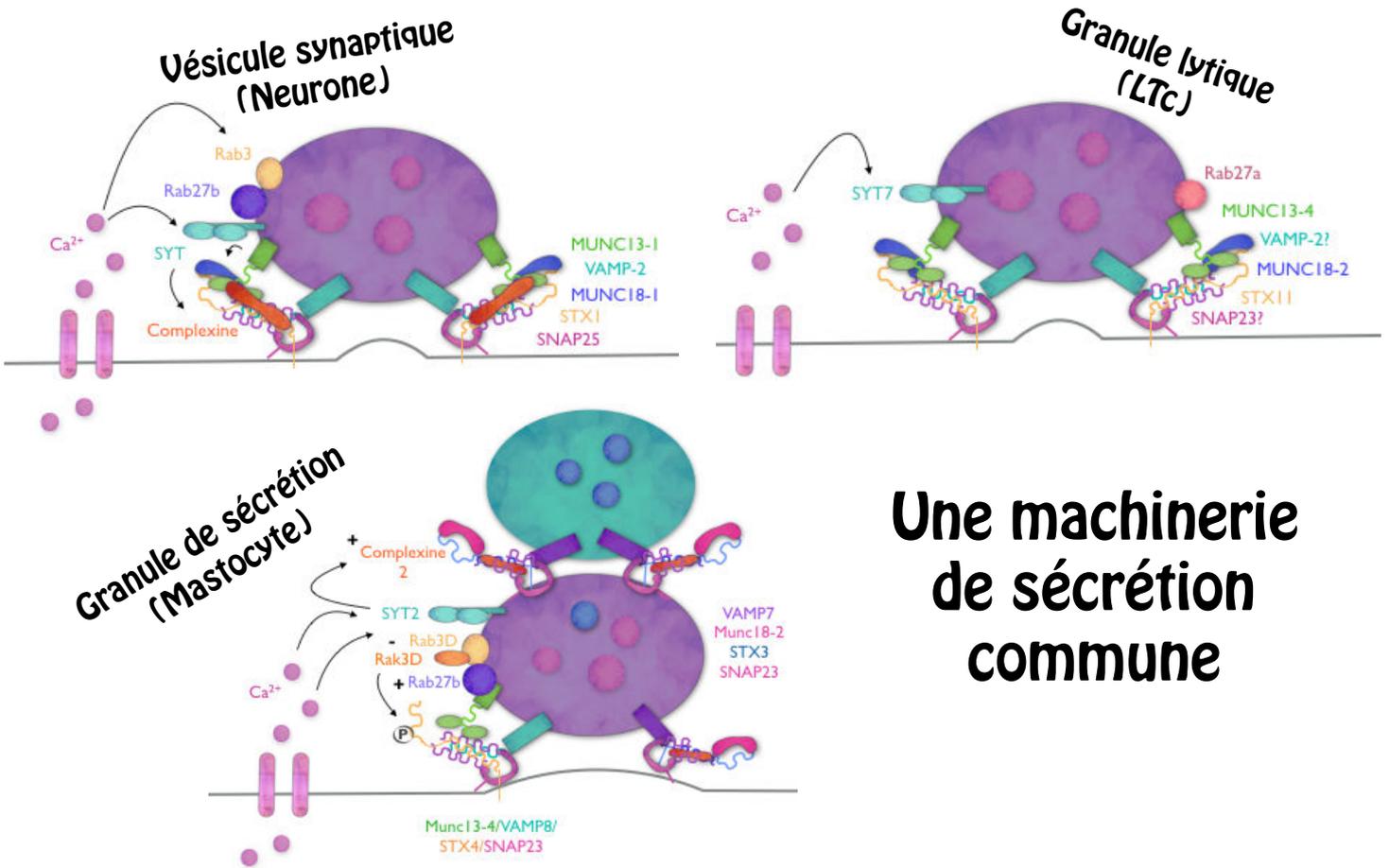
Les mécanismes impliqués dans l'exocytose des granules de sécrétion ont fait l'objet de nombreuses études alors que le mécanisme du trafic vésiculaire des cytokines a été très peu décrit. Le problème est qu'il est difficile de suivre le trafic de ces molécules quand on sait qu'elles peuvent être sécrétées durant plusieurs heures.

Concernant la sécrétion du TNF: L'absence de VAMP8, mais pas celle de VAMP3, conduit à des défauts d'exocytose des granules de sécrétion (β-hexosaminidase, cathepsine-D, etc...). Néanmoins, l'absence de VAMP8 ne perturberait pas la sécrétion des cytokines MIP-1α, IL-6 et TNF (Tiwari 2008; Puri 2008). En effet, le TNF ne colocaliserait pas avec des vésicules positives pour VAMP8 mais plutôt avec des vésicules positives pour **VAMP3** (Tiwari 2008). Le trafic du TNF pourrait donc se faire par l'intermédiaire de ces compartiments VAMP3 comme cela a déjà été observé dans les macrophages (Murray 2005).

Concernant la sécrétion des chimiokines: Une étude réalisée dans des mastocytes humains démontrent que le blocage de **SNAP-23** et **STX3** inhiberait le relargage des chimiokines CXCL8, CCL2, CCL3 et CCL4. **STX4** et **VAMP8** contrôleraient eux la sécrétion de CXCL8. Pour finir, **STX6** permettrait le relargage des chimiokines CXCL8/CCL2 et **VAMP-7** la sécrétion de la chimiokine CCL3. Concernant les SNARE STX2 et VAMP3, elles ne seraient pas impliquées dans le relargage de ces chimiokines (Franck 2011).

Il semblerait donc que la sécrétion des diverses cytokines et chimiokines mastocytaires implique un grand nombre de complexes SNARE différents.

POUR RESUMER



Une machinerie de sécrétion commune

Mais aussi une Rab commune



Démarche Scientifique

Comme nous l'avons vu au cours de cette introduction, de nombreux acteurs de l'immunité innée et adaptative exercent leurs fonctions protectrices par la sécrétion de vésicules dérivées des lysosomes que l'on appelle les LRO. C'est par exemple le cas des lymphocytes T cytotoxiques par le biais de la sécrétion de granules lytiques et des mastocytes par l'intermédiaire de la sécrétion des granules de sécrétion.

Il semblerait de plus que la machinerie moléculaire impliquée dans la sécrétion de ces LRO soit relativement bien conservée entre ces différents types cellulaires. Ainsi l'absence de la protéine Rab27 conduit à un défaut de sécrétion dans les LTc mais aussi dans les mastocytes.

Le laboratoire que j'ai rejoint a longtemps travaillé sur le mécanisme de dégranulation des LTc et a ainsi pu mettre en évidence le complexe moléculaire impliqué dans le transport terminal du granule lytique chez l'homme. En effet, ce transport terminal serait assuré par un complexe moléculaire composé de Rab27a, Slp3 et la kinésine-1.

La génération dans le laboratoire d'un modèle murin déficient pour la kinésine-1 dans toutes les cellules immunitaires nous a donc amené à développer le projet de thèse suivant: **Etudier le rôle de la kinésine-1 dans les sécrétions régulées des cellules immunitaires.**

Hypothèse de travail:

Compte-tenu du lien existant entre Rab27 et la kinésine-1: la kinésine-1 est-elle impliquée dans la sécrétion des LRO tout comme Rab27?

Questionnement progressif:

Chapitre I: Kinésine-I et modèle murin

Est-ce que la souris déficiente pour la kinésine-1 développe un phénotype particulier?

Chapitre II: Kinésine-I et lymphocytes T cytotoxiques

Observe-t-on un défaut de sécrétion dans les LTc murins déficients en kinésine-1, comme précédemment observé chez l'homme?

Chapitre III: Kinésine-I et mastocytes

Y-a-t-il un défaut de sécrétion dans les mastocytes murins déficients en kinésine-1?

Quel est le complexe impliqué dans la dégranulation mastocytaire?

Quelle voie de signalisation est impliquée dans la formation du complexe?

Résultats

Chapitre I:

Kinésine-1 et modèle murin déficient

Pour une meilleure compréhension du rôle de la kinésine-1 dans les sécrétions régulées des cellules du système immunitaire, un modèle murin invalidé pour la chaîne lourde Kif5b spécifiquement dans les cellules hématopoïétiques (Kif5b^{fl/-};VAV1-CRE mice) a été généré. Le modèle conditionnel est ici nécessaire car la souris totalement invalidée pour Kif5b est létale au stade embryonnaire (Tanaka et al, 1998). La souris transgénique exprimant la recombinaise CRE sous le promoteur VAV1 (exprimée seulement dans les lignées hématopoïétiques (Georgiades et al, 2002)) a été croisée avec la souris Kif5b^{+/-} (Cui et al, 2011) afin de générer la souris Kif5b^{+/-} ; VAV1-CRE. La souris Kif5b^{+/-} ; VAV1-CRE a ensuite été croisée avec la souris Kif5b^{fl/fl} (Cui et al, 2011) afin de générer les souris d'intérêts cKif5b^{fl/-} (Kif5b^{fl/-} ; VAV1-CRE)(Figure 42).

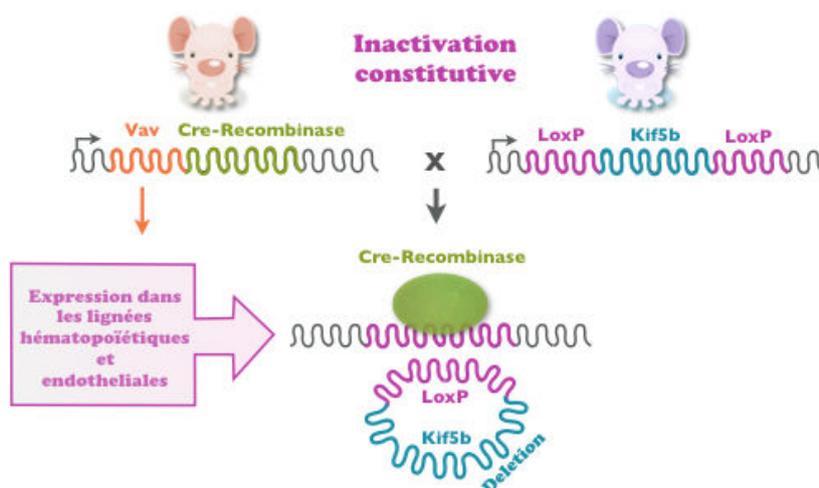


Figure 42: Génération du modèle murin déficient pour Kif5b

A- Vérification du défaut d'expression de Kif5b dans la souris cKO^{Kif5b}:

Une première étape a consisté à vérifier l'absence du gène floxé *Kif5b* au niveau transcriptionnel puis au niveau protéique dans le modèle murin cKO^{Kif5b}. Pour s'assurer du bon fonctionnement des sondes utilisées, une première expérience de qRT-PCR a été réalisée sur le cerveau des souris contrôles et cKO^{Kif5b}. Au niveau du cerveau, les trois isoformes sont exprimées avec une nette prédominance pour l'isoforme *Kif5a* (Kanai et al, 2000). Comme attendu, les mêmes profils d'expression sont observés au niveau du cerveau chez le contrôle et la souris cKO^{Kif5b} (Figure 43). On peut constater que l'extinction du gène *Kif5b* chez la souris cKO^{Kif5b} est bien restreinte aux lignées hématopoïétiques testées (Lymphocytes T / Mastocytes / Mégacaryocytes), ce qui confirme la validité du modèle VavCre^{+/+} utilisé. Les autres isoformes

Kif5a et *Kif5c* sont quand à eux absents des cellules immunitaires testées. De plus, aucune surexpression des autres isoformes n'est observée quand l'isoforme *Kif5b* est absent (**Figure 44A**). L'expression de la protéine Kif5b est retrouvée dans les lymphocytes T, mastocytes et plaquettes de la souris contrôle. Dans ceux de la souris cKO^{Kif5b} la protéine Kif5b est, quand à elle, bien absente (**Figure 44B**).

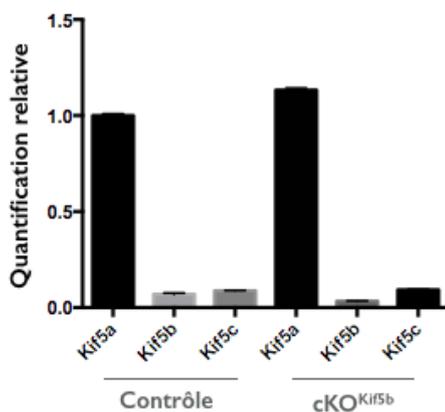


Figure 43: Analyse par qRT-PCR de l'expression de l'ARNm de *Kif5a*, *Kif5b* et *Kif5c* au niveau des cellules extraites du cerveau dans les souris contrôles et cKO^{Kif5b} . L'extraction d'ARN et la Reverse Transcription sont réalisées sur 1.10^6 cellules directement extraites du cerveau. L'expression de chaque gène a été normalisée en utilisant comme valeur de référence l'expression de l'ARN18s. Les résultats correspondent à la moyenne (+ SEM) de 3 expériences. Test statistique utilisé: ANOVA (Prism).

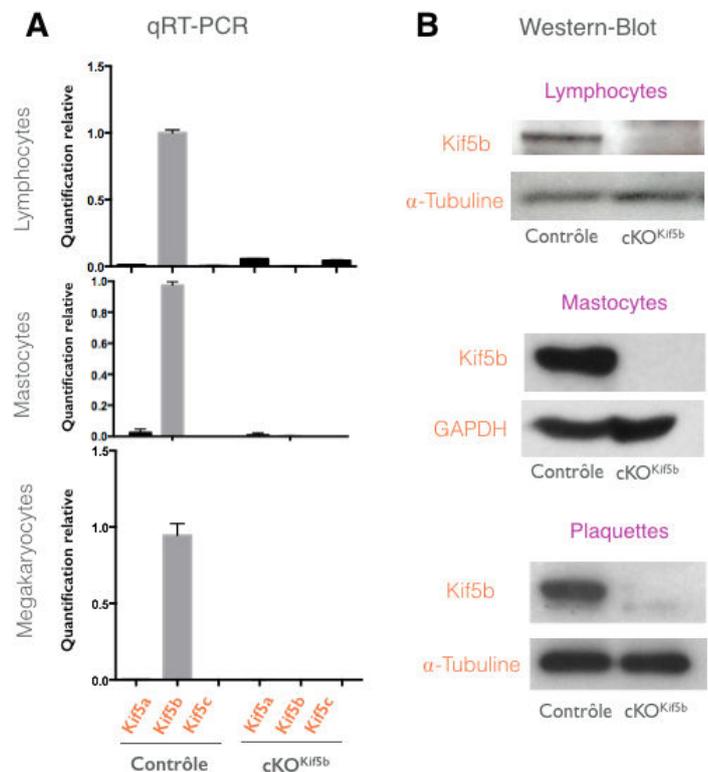


Figure 44: Analyse par qRT-PCR de l'expression de l'ARNm de *Kif5a*, *Kif5b* et *Kif5c* au niveau des des LTC, mastocytes et megakaryocytes (A) dans les souris contrôles et cKO^{Kif5b} . L'extraction d'ARN et la Reverse Transcription sont réalisées sur 1.10^6 cellules. L'expression de chaque gène a été normalisée en utilisant comme valeur de référence l'expression de l'ARN18s. L'expression à ensuite été normalisé par rapport au gène le plus fortement exprimé. Les résultats correspondent à la moyenne (+ SEM) de 3 expériences. Test statistique utilisé: ANOVA (Prism). **Analyse de l'expression de la protéine Kif5b par Western-Blot dans les souris contrôles et cKO^{Kif5b} (B).** L'extraction des protéines est réalisée sur 10.10^6 . $40 \mu\text{g}$ de protéine sont déposés par puits. La révélation des protéines est réalisée grâce aux anticorps primaires anti-Kif5b, anti- β -actine et anti-GAPDH puis secondaire HRP. Le résultat est représentatif des 3 expériences réalisées.

B- Aspect général de la souris cKO^{Kif5b} :

La souris déficiente pour la kinésine-1 présente un développement similaire à celui d'une souris c57/b6 ordinaire. Son apparence externe ainsi que son poids sont identiques à une souris contrôle (environ 20g) (**Figure 45A et 45B**).

Concernant la structure des différents organes de cette souris, la rate, le ganglion mésentérique, le foie et les poumons ne présentent aucune infiltration ou signe d'inflammation (**Figure 45C**). A l'état basal, dans un contexte exempt d'organismes pathogènes, cette souris semble donc tout à fait normale.

C- Intégrité du système immunitaire dans la souris cKO^{Kif5b} :

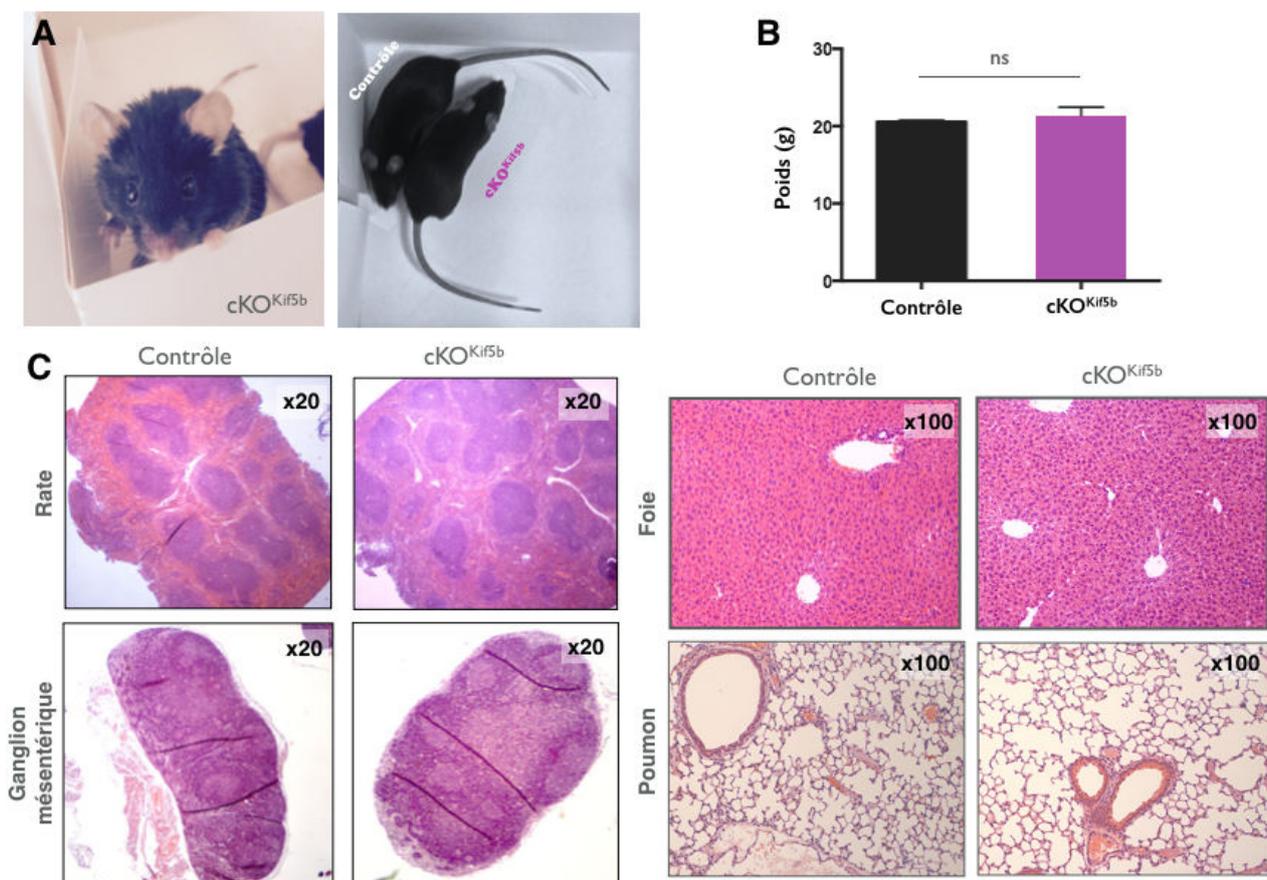


Figure 45: Aspect général de la souris cKO^{Kif5b} (A) et mesure de son poids (B) comparé à une souris contrôle. Les résultats correspondent à la moyenne (+ SEM) de 10 expériences. Test statistique utilisé: ANOVA (Prism). **Analyse de la structure des organes de la souris contrôle et cKO^{Kif5b} (C).** Les organes de la souris contrôle et cKO^{Kif5b} ont été prélevés, rincés et fixés sur la nuit dans du paraformaldehyde 4%. Après fixation les organes ont été inclus en paraffine puis marqué à l'hématoxyline et à l'éosine. Ces résultats sont représentatifs de 10 expériences indépendantes.

En ce qui concerne l'intégrité du système immunitaire, nos résultats montrent que le développement des LT au niveau du thymus et des LB au niveau de la MO des souris cKO^{Kif5b} ne semble pas être affecté par l'absence de kinésine-1. Le nombre de thymocytes (Thy1.2+) CD8+, CD4+, Double Positif (DP) et Double Négatif (DN) est le même entre la souris contrôle et cKO^{Kif5b}. Les stades DN1, DN2, DN3, DN4 identifiés par l'expression des marqueurs CD25 et CD44 sont ici normaux (Figure 46A). Au niveau de la MO le pourcentage de cellules CD19+ est identique entre les deux souris, la proportion de cellules au sein des différents stades de développement B (Pré-Pro B, LB immatures et LB matures) est aussi conservée (Figure 46B). La kinésine-1 ne semble donc pas impliquée dans les étapes de développement des LT et LB.

En périphérie, comme au niveau de la rate et du ganglion mésentérique, le nombre d'éosinophiles (CD19- / CD11b+ / SSC-A high / Ly6g-), de neutrophiles (CD19- / CD11b+ / SSC-A int / Ly6g+), de macrophages (CD19- / CD11b+ / SSC-A low / Ly6g-), de cellules dendritiques (CD19- / CD11c+ / CMH-II+), de LT (CD19- / CD3+ / CD4+ ou CD8+) et de LB (CD19+ / B220+) est inchangé entre la souris contrôle et cKO^{Kif5b} (Figure 47). La kinésine-1 ne semble donc pas être impliquée dans la différenciation et la distribution des cellules immunitaires.

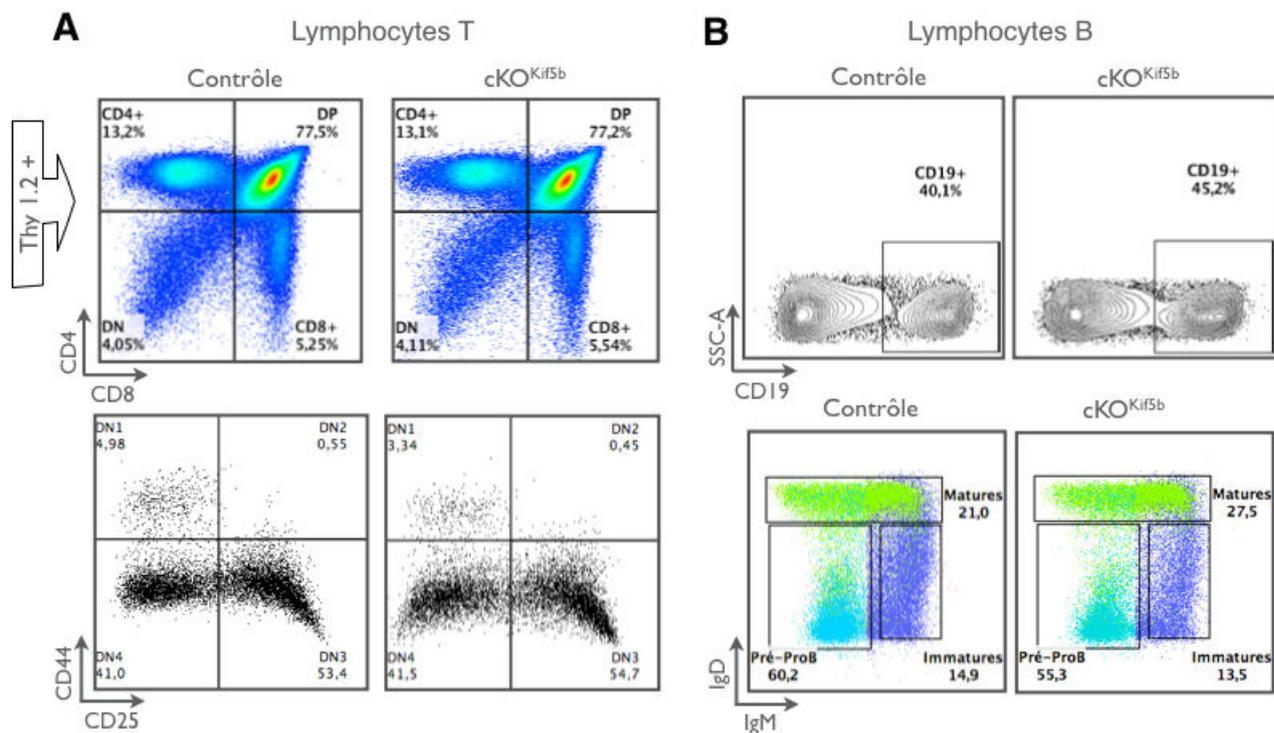


Figure 46: Analyse par cytométrie en flux du développement des LT au niveau du thymus (A) et des LB au niveau de la MO (B) dans les souris contrôles et cKO^{Kif5b}. Le marquage est réalisé sur 1.10⁶ cellules extraites des souris contrôles et cKO^{Kif5b}. Au niveau du thymus, les thymocytes sont marqués par les anticorps Thy1.2 (CD90.2) PE, CD8 PB, CD4 PE-Cy7, CD25 PerCP-Cy5-5, CD44 VG. Au niveau de la moelle osseuse les LB sont marqués par les anticorps CD19 PE-Cy7, IgD PE, IgM PE-Cy5. Le résultat est représentatif des 3 expériences réalisées.

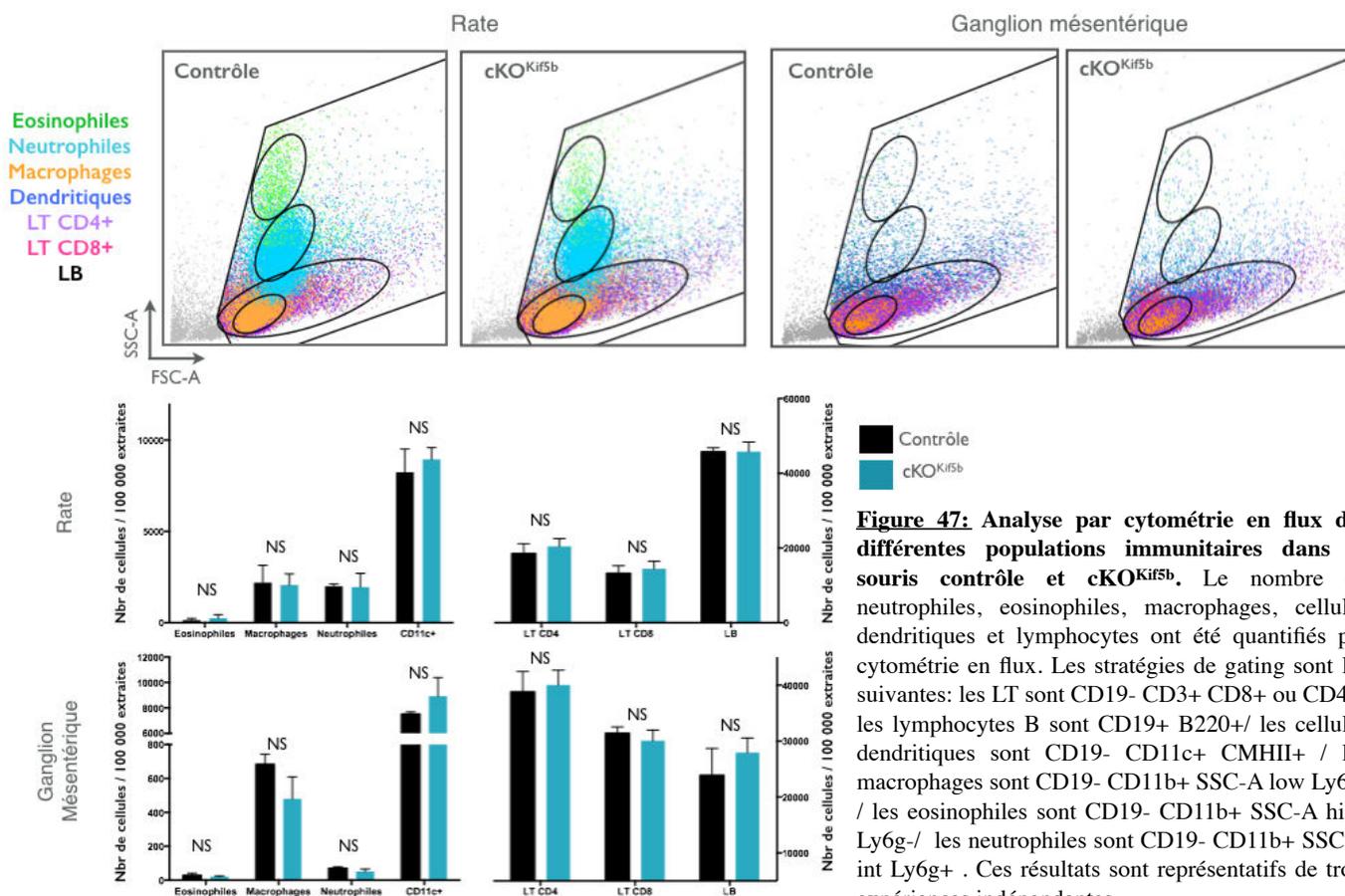


Figure 47: Analyse par cytométrie en flux des différentes populations immunitaires dans la souris contrôles et cKO^{Kif5b}. Le nombre de neutrophiles, eosinophiles, macrophages, cellules dendritiques et lymphocytes ont été quantifiés par cytométrie en flux. Les stratégies de gating sont les suivantes: les LT sont CD19- CD3+ CD8+ ou CD4+ / les lymphocytes B sont CD19+ B220+ / les cellules dendritiques sont CD19- CD11c+ CMHII+ / les macrophages sont CD19- CD11b+ SSC-A low Ly6g- / les eosinophiles sont CD19- CD11b+ SSC-A high Ly6g- / les neutrophiles sont CD19- CD11b+ SSC-A int Ly6g+ . Ces résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

Chapitre II:

Kinésine-1 et lymphocytes T cytotoxiques

A- Analyse de la capacité d'activation et de prolifération des LTc cKO^{Kif5b}:

Une étude du flux calcique est réalisée sur les LTc extraits et purifiés de la rate de souris contrôles et cKO^{Kif5b} afin d'étudier leur capacité d'activation. Par l'ajout d'un anticorps anti-CD3 de type IgG de hamster puis leur regroupement par l'apport d'un anticorps anti-IgG de hamster, la voie de signalisation du TCR est alors induite. Les variations de flux calcique qui en résultent peuvent alors être mesurées afin d'évaluer les capacités d'activation des LTc. On peut ainsi constater que dans ce contexte, les LTc des souris contrôles et cKO^{Kif5b} possèdent les mêmes capacités d'activation *via* la voie du TCR (Figure 48A).

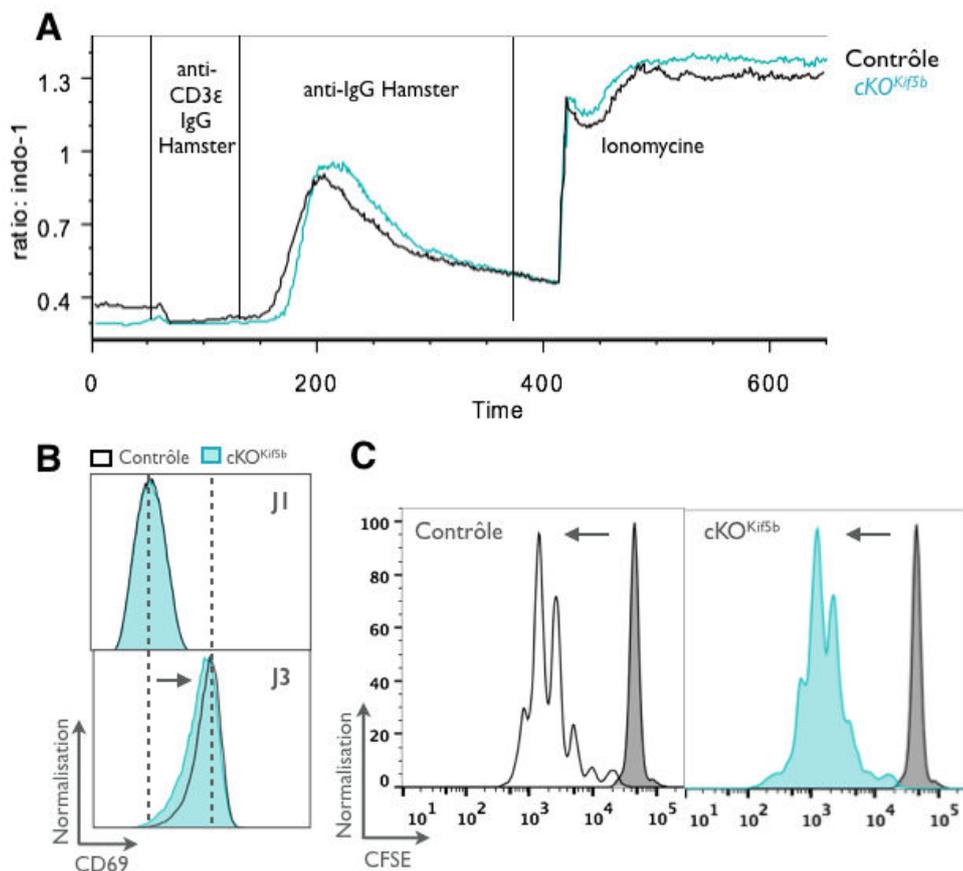


Figure 48: Test de flux calcique (A): Le marquage est réalisé sur 1.10^6 LTc extraits et purifiés des souris contrôles et cKO^{Kif5b}. Les LTc sont marqués tout d'abord par le traceur calcique Indo-1 puis par les anticorps TCR β PE et CD8 PB. Les cellules sont d'abord seules durant 1 min puis l'anticorps anti-CD3 (IgG de hamster) est ajouté durant 1 min. Après ce délais, l'anticorps anti-IgG de hamster est ajouté aux cellules pour induire le signal TCR durant 5 min et la ionomycine (ouverture de tous les canaux calciques) est finalement rajoutée durant 5 min. Le résultat est représentatif des 2 expériences réalisées. **Test d'activation par cytométrie en flux (B):** Les LTc contrôles et cKO^{Kif5b} sont cultivés durant 5 jours dans du milieu complet avec de l'IL-2 et du CD3 coâté CD28 soluble. Au jour 1 et 3 les cellules sont récupérées, lavées puis marquées avec un anticorps anti-CD69, un marqueur d'activation des LTc. Les cellules sont ensuite analysées par cytométrie en flux. Le résultat est représentatif des 3 expériences réalisées. **Test de prolifération (C):** Les LTc contrôles et cKO^{Kif5b} sont purifiés de la rate puis marqués au CFSE. Ils sont ensuite cultivés durant 3 jours dans du milieu complet avec de l'IL-2 et du CD3 coâté CD28 soluble. A J1 et J3 les cellules sont marquées avec un anti-CD8 puis analysées en cytométrie pour le marqueur CFSE. Le résultat est représentatif des 2 expériences réalisées.

La capacité d'activation des LTc peut aussi être évaluée au cours de la culture grâce au marqueur CD69, ce dernier augmentant au cours de l'activation et donc de la culture. On peut ainsi observer un schiff du marquage CD69 par cytométrie en flux entre le premier jour et le troisième jours de culture. Ainsi, nous constatons que les LTc contrôles et déficients adoptent les mêmes capacités d'activation au cours de la culture (**Figure 48B**). Concernant les capacités de prolifération des LTc, après analyse du marquage CFSE suite aux 3 jours de culture, on ne remarque pas de différences entre la souris contrôle et cKO^{Kif5b} sur leurs capacités prolifératives (**Figure 48C**). Les capacités d'activation et de prolifération des LTc ne semblent donc pas être affectées par l'absence de kinésine-1.

B- Analyse de la capacité de dégranulation des LTc cKO^{Kif5b} par cytométrie:

Chez l'homme, de précédents test *in vitro* (siRNA, mutant dominant négatif) ont permis de mettre en évidence l'implication de la kinésine-1 dans le mécanisme de sécrétion des granules lytiques des LTc (Kurowska 2012). Nous avons ici procédé à de nouveaux tests dans le modèle murin cKO^{Kif5b} dans le but de confirmer ces résultats.

La capacité des LTc à sécréter les granules lytiques est testée *in vitro* par la mise en contact des LTc avec une plaque recouverte d'anticorps anti-CD3ε. L'expression de Lamp1/2 à la surface est ensuite analysée par cytométrie en flux. Ce test est d'abord réalisé sur des souris contrôles (Contrôle positif) et des souris Rab27a^{-/-} ayant un défaut de sécrétion des granules cytotoxiques (Contrôle négatif) (**Figure 49A**). Comme attendu les LTc de la souris contrôle dégranulent normalement, l'expression de Lamp1/2 à la surface est augmentée de 49% par rapport à la condition non stimulée, alors que les LTc de la souris Rab27a^{-/-} ne dégranulent que très peu (8%).

En comparant les capacités de dégranulation de ces deux souris à notre modèle cKO^{Kif5b}, on observe que les souris conditionnelles déficientes pour la kinésine-1 sont capables de relarguer leurs granules lytiques. Le pourcentage de recrutement de Lamp1/2 à la membrane plasmique est comparable à celui observé dans le contrôle (**Figure 49B**). Ces différents tests de dégranulation ont été réalisés après 3h d'incubation à 37°C. Afin de s'assurer que le défaut ne soit pas un évènement précoce compensé après 3h d'activation, une cinétique de dégranulation a été réalisée. Nos résultats montrent que même après de courtes durées d'incubation à 37°C, les LTc de souris cKO^{Kif5b} ont les mêmes pourcentages de dégranulation que ceux des souris contrôles (**Figure 49C**).

C- Analyse du comportement des granules lytiques par microscopie TIRF:

Afin de s'assurer que les granules lytiques libérés ont le même comportement que ceux des souris contrôles, des expériences de microscopie TIRF (Total internal reflexion fluorescence) ont

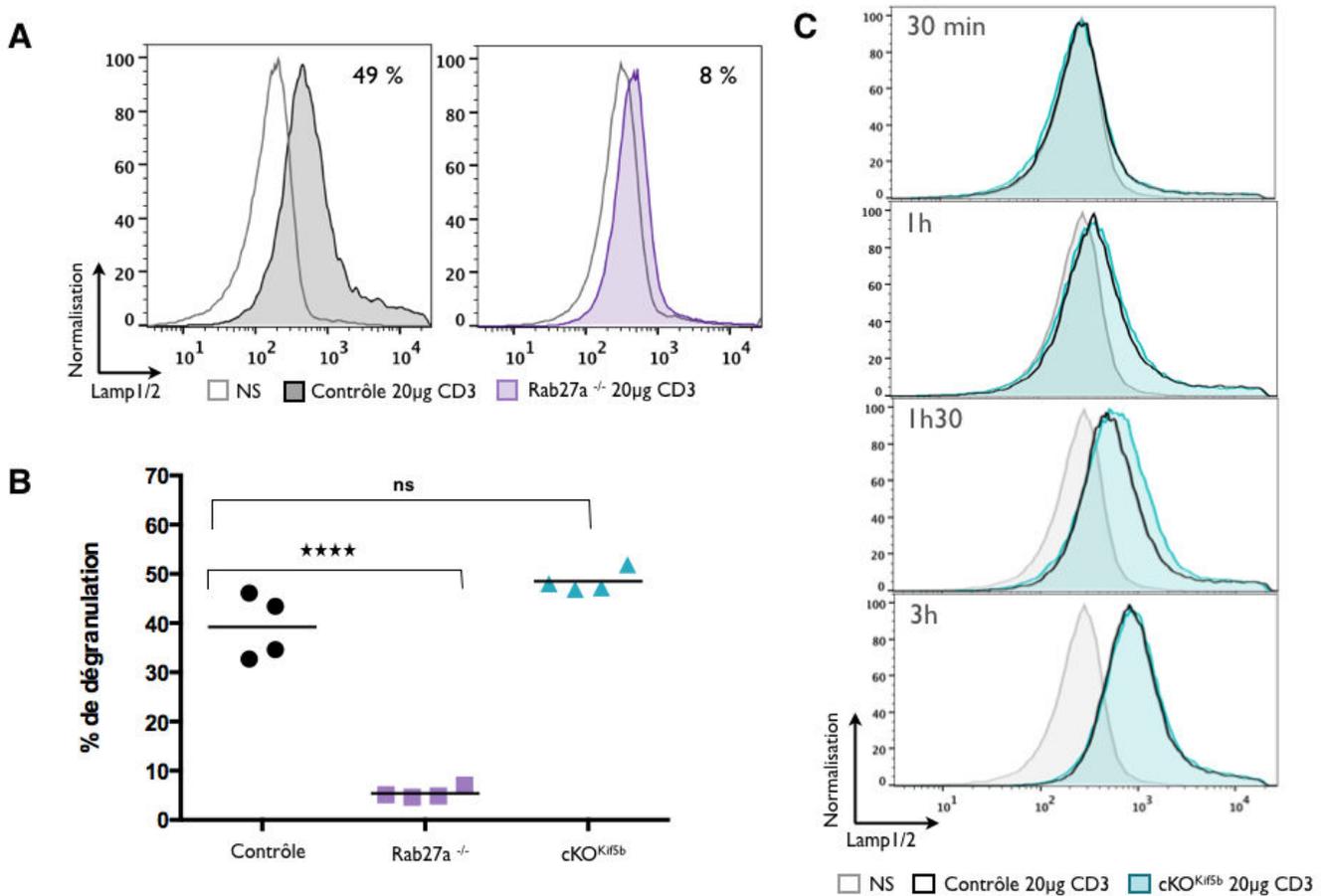


Figure 49: Test de dégranulation des LTc issus de souris contrôles, Rab27a^{-/-} ou cKO^{Kif5b}. Les LTc (3.10^5 / condition) une fois extraits de la rate des souris puis cultivés durant 5 jours sont déposés sur une plaque recouverte ou non (condition non stimulée) d'anti-CD3ε ($20\mu\text{g} / \text{ml}$). Les cellules sont ensuite mises à 37°C sous 5% de CO_2 durant différents temps (30 min, 1h, 1h30, 3h) (C) ou seulement durant 3h (A et B). Durant l'incubation, les cellules sont marquées avec des anticorps anti-CD107a FITC et anti-CD107b FITC. Un second marquage est ensuite effectué avec un anticorps anti-CD8α APC. Les résultats A et B sont représentatifs des 4 expériences réalisées. Le résultat C est représentatif des 2 expériences réalisées. Test statistique utilisé: ANOVA (Prism). (A) Test de dégranulation dans les LTc issus de souris contrôles ou déficientes en Rab27a. (B) Synthèse de toutes les expériences de dégranulation menées dans les LTc issus de souris contrôles, Rab27a^{-/-} ou cKO^{Kif5b}. (C) Cinétique de dégranulation dans les souris contrôles et cKO^{Kif5b}.

été réalisées. La microscopie TIRF permet l'excitation sélective d'une partie de l'échantillon. En effet, le faisceau laser d'excitation frappe la surface de l'échantillon avec un angle qui induit une totale réflexion du faisceau, permettant ainsi une excitation de la surface de l'échantillon en contact avec la lamelle inférieure à 100 nm. La fluorescence provenant des autres niveaux étant alors éliminée, on peut observer sélectivement ce qui se passe au niveau de la membrane plasmique des cellules et notamment les comportements des granules lytiques au niveau de la membrane plasmique.

En regardant le trajet effectué par les granules, on constate que dans la souris contrôle celui-ci est très précis et organisé, ciblant l'intégralité de la zone durant toute la durée de l'acquisition. En ce qui concerne les granules des LTc cKO^{Kif5b}, leur comportement est très similaire à celui des granules lytiques des LTc déficients pour Rab27a^{-/-} (Ashen). A savoir que les granules ont des mouvements désorganisés plus rapides, les trajets effectués sont beaucoup plus longs et

seulement une partie de la zone est balayée par les granules à un moment donné de l'acquisition (Figure 50A).

Afin de mieux comprendre leur comportement, les granules sont classés en 4 catégories correspondant à la durée durant laquelle ils sont présents sur la vidéo: durée du tracking. On constate alors que la souris contrôle possède une majorité de granules restant entre 0 et 4 sec au niveau de la synapse alors que la majorité des granules dans les LTc *cKO^{Kif5b}* et *Rab27a^{-/-}* restent entre 4 et 20 sec. Ces granules sont aussi plus rapides et par conséquent parcourent beaucoup plus de distance. Pour finir, on observe une population de granules fixes qui restent présents et statiques durant toute la durée de l'acquisition dans la souris contrôle. Ces granules statiques sont quasiment absents des LTc issus de souris *cKO^{Kif5b}* et *Rab27a^{-/-}* (Figure 50B).

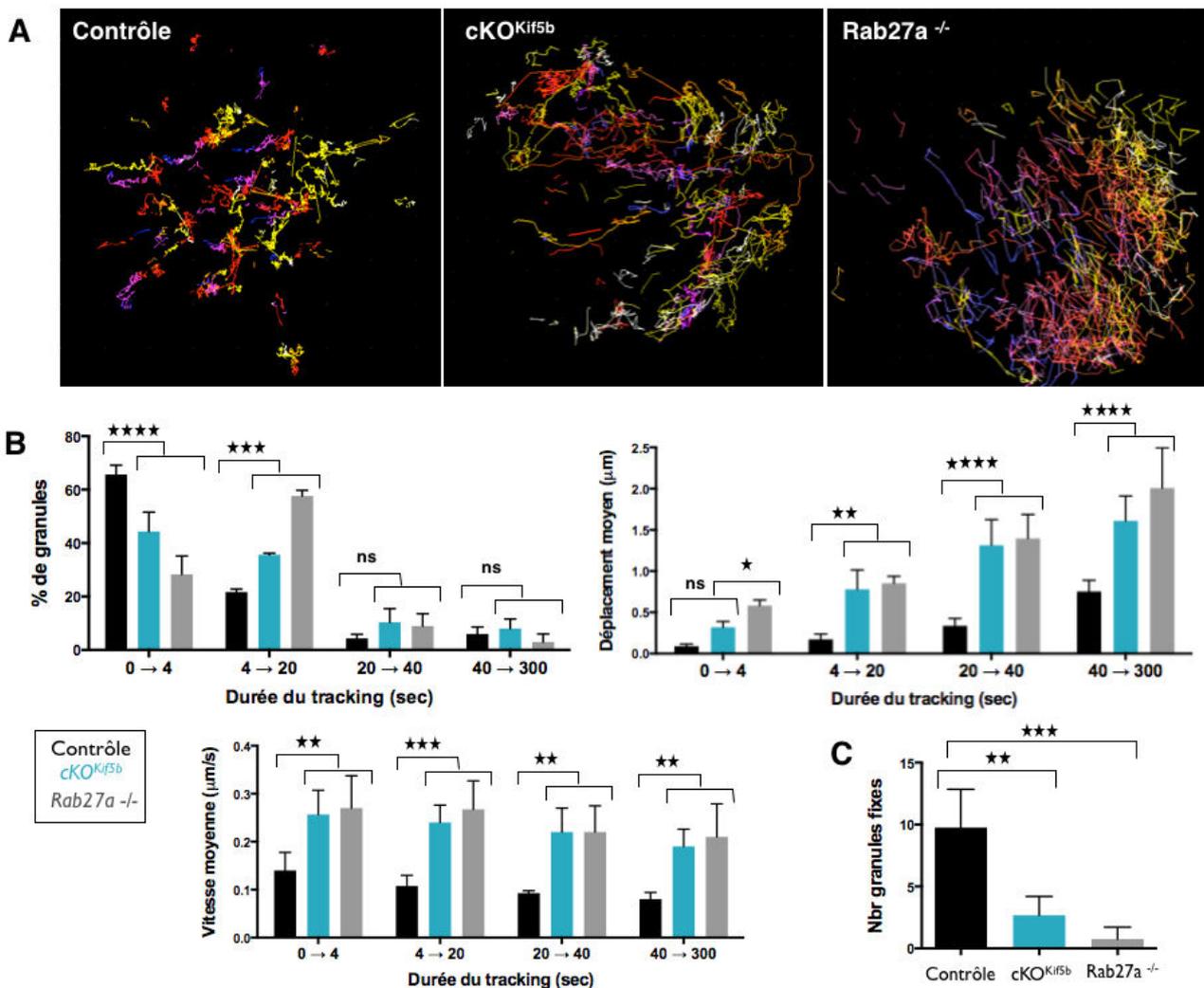


Figure 50: Analyse par microscopie TIRF du comportement des granules lytiques à la synapse immunologique dans les souris contrôles, *cKO^{Kif5b}* et *Rab27a^{-/-}*. Les LTc (1.10^6 /condition) une fois extraits de la rate des souris puis cultivés durant 5 jours sont marqués au WGA 488. Les LTc sont ensuite déposés sur une lamelle préalablement recouverte avec des anticorps α -CD3 et α -CD28 maintenue à 37°C. L'acquisition est réalisée tout de suite après le dépôt des cellules durant 5 min dans le plan TIRF. Les résultats correspondent à la moyenne (+ SEM) de 4 acquisitions/conditions. Le résultat A est représentatif des 4 acquisitions réalisées. Test statistique utilisé: ANOVA (Prism). (A) Tracé du chemin effectué par les granules au cours de l'acquisition. (B) Analyse du nombre de granules, de leur capacité de déplacement et de leur vitesse. (C) Analyse du nombre de granules fixes (statiques) observés.

En conclusion, contrairement à ce qui a été observé chez l'homme, le modèle murin déficient pour la kinésine-1 possède la capacité de relarguer des granules lytiques. Cependant leur comportement semble altéré au niveau de la synapse immunologique et de manière intéressante le comportement observé en l'absence de Kif5b est très similaire à celui observé en l'absence de Rab27a.

Chapitre III:

Kinésine-1 et sécrétion mastocytaire

A- Validation du modèle murin déficient pour la kinésine-1 dans les mastocytes:

Pour étudier la machinerie moléculaire impliquée dans le transport et la sécrétion des granules sécrétoires au sein des mastocytes *in vitro* et *in vivo*, nous travaillons à partir de souris cKO^{Kif5b} générée au sein de notre laboratoire et de cultures primaires issues de cette souris. En effet, nous travaillons sur des BMMC (Bone Marrow derived mast cells) différenciés à partir de cellules souches de la moelle osseuse de souris contrôles ou cKO^{Kif5b}. Les BMMC se différencient et deviennent matures après 5 semaines de culture sous SCF et IL-3.

1- Vérification de l'absence de la chaîne lourde Kif5b et analyse de la chaîne légère KLC :

Afin de valider ce modèle, la délétion de la chaîne lourde de la kinésine-1, Kif5b, a été vérifiée par qRT-PCR et Western Blot dans les mastocytes (vu précédemment, **Figure 44A/B**). Nous constatons qu'au niveau transcriptionnel et protéique Kif5b n'est pas exprimée. De plus, nous n'observons aucune surexpression de Kif5a et Kif5c (les isoformes neuronaux de la kinésine-1).

La kinésine-1 est une protéine tétramérique constituée de deux chaînes légères et de deux chaînes lourdes. Nous avons pu constater que Kif5b est l'isoforme majoritaire de la chaîne lourde, quand est-il de la chaîne légère? Par qRT-PCR, on peut observer que KLC1 est l'isoforme de la chaîne légère exprimée majoritairement dans les mastocytes. KLC2 et KLC3 sont quand à eux faiblement exprimées (**Figure 51**).

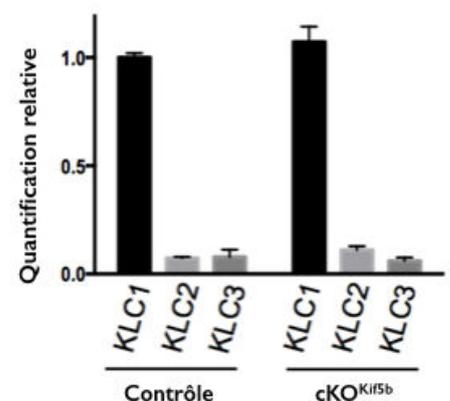


Figure 51: Quantification relative de l'expression de KLC1, KLC2 et KLC3 par qRT-PCR dans des BMMC contrôles et cKO^{Kif5b}. L'extraction d'ARN et la Reverse Transcription sont réalisées sur 1.10⁶ de cellules. L'expression de chaque gène a été normalisée en utilisant comme valeur de référence l'expression de l'ARN18s. L'expression a ensuite été normalisée par rapport au gène le plus fortement exprimé. Les résultats correspondent à la moyenne (+ SEM) de 3 expériences. Test statistique utilisé: ANOVA (Prism).

2- Numération du nombre de mastocytes dans la souris cKO^{Kif5b}:

Pour pouvoir procéder aux études *in vivo*, le nombre de mastocytes dans la souris cKO^{Kif5b} à l'état basal a tout d'abord été contrôlé. Pour cela des coupes histologiques de peau de souris contrôles et déficientes pour la kinésine-1 ainsi qu'un marquage au bleu de toluidine, qui met en évidence les mastocytes (coloration de l'héparine présente au sein des granules des mastocytes conjonctifs), ont été réalisés. Après numération des mastocytes dans la peau, nous n'observons aucune différence entre la souris contrôle et cKO^{Kif5b} (Figure 52 A/B).

Le nombre de mastocytes présents au sein de la cavité péritonéale des souris contrôles et déficientes pour la kinésine-1 a aussi été analysé. Pour cela, des lavages au PBS de la cavité péritonéale ainsi qu'un marquage des récepteurs FcεRI et Kit pour l'identification des mastocytes (FcεRI+/ Kit+) par cytométrie en flux sont réalisés. Après numération, on constate que le pourcentage de mastocytes présents dans la cavité péritonéale est le même entre la souris contrôle et cKO^{Kif5b} (Figure 52 C).

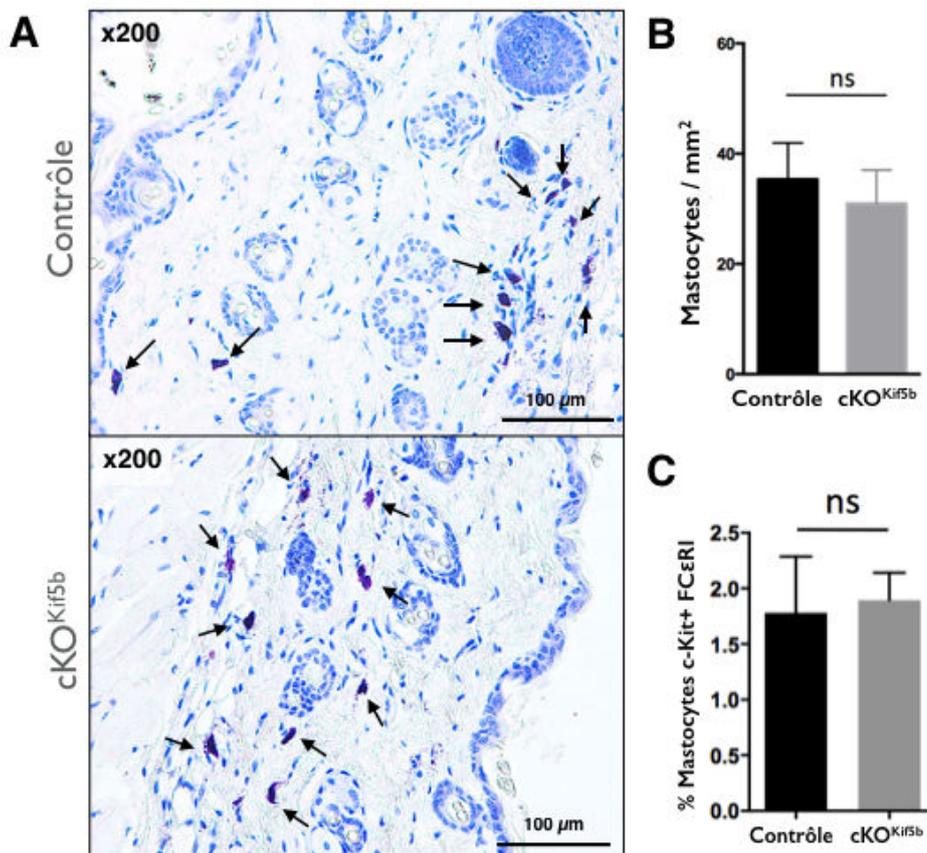


Figure 52: Quantification du nombre de mastocytes dans les souris contrôles et cKO^{Kif5b}. (A) Coupes histologiques de la peau de souris contrôles et cKO^{Kif5b} marquées au bleu de toluidine. Les flèches indiquent les mastocytes. (B) Quantification des coupes histologiques de peau en nombre absolu de mastocytes / mm². (C) Analyse par cytométrie en flux du nombre de mastocytes (FcεRI+, Kit+) présents dans la cavité péritonéale des souris contrôles et cKO^{Kif5b} après des lavages successifs de la cavité péritonéale. Les résultats correspondent à la moyenne (+ SEM) de 3 expériences pour le peau et de 5 expériences pour la cavité péritonéale.

3- Analyse de la capacité de différenciation des mastocytes cKO^{Kif5b}:

Avant toute étude fonctionnelle, la capacité de ces BMMC à se différencier *in vitro* a été analysée. Pour cela après les 5 semaines de culture, les BMMC sont lavés puis marqués avec les marqueurs de différenciation Kit et FcεRI pour les différencier des progéniteurs hématopoïétiques (Kit⁻ FcεRI⁻) et des progéniteurs immatures (Kit⁺ FcεRI⁻). Les mastocytes mûrent expriment quand à eux fortement le récepteur Kit et FcεRI à leur surface. La quantification est ensuite réalisée par cytométrie en flux. On constate que la différenciation des mastocytes *in vitro* n'est pas affectée par l'absence de kinésine-1. En effet, les BMMC cKO^{Kif5b} expriment à leur surface la même quantité de récepteurs Kit et FcεRI comparé à une souris contrôle (**Figure 53**).

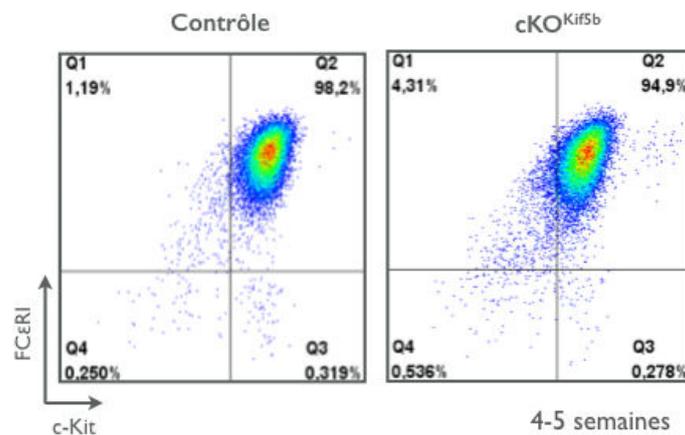


Figure 53: Analyse de la capacité de différenciation des BMMC contrôles et cKO^{Kif5b}. Les BMMC contrôles et cKO^{Kif5b} ont été marqués par les anticorps anti FcεRI et Kit après 5 semaines de culture puis analysés par cytométrie en flux. Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences réalisées.

Ces différents résultats indiquent que la kinésine-1 n'est pas nécessaire au développement *in vitro* (**Figure 53**) et *in vivo* (**Figure 52**) des mastocytes. De plus elle ne semble pas être impliquée dans la migration des mastocytes en direction des tissus périphériques (**Figure 52**).

B- Implication de la kinésine-1 dans le transport et la sécrétion des granules de sécrétion mastocytaires:

Le processus de transport des granules de sécrétion au sein des mastocytes est peu connu, cependant il est déjà clairement établi que ce processus nécessite l'intervention de la GTPase Rab27b (Mizuno 2007) et du réseau de microtubules (Nishida 2005). Etant donné le lien moléculaire existant entre Rab27b et la kinésine-1, nous supposons que la kinésine-1 pourrait être le moteur moléculaire qui permettrait la translocation des granules jusqu'à la membrane plasmique suite à une interaction avec Rab27b initialement présent sur les granules.

1- Analyse de la capacité de sécrétion des mastocytes: Test de la libération de β -Hexosaminidase

Afin de déterminer l'implication de la kinésine-1 dans la sécrétion des granules de sécrétion mastocytaires, le relargage de β -hexosaminidase après activation des mastocytes (Voie Fc ϵ RI) dans le surnageant a été quantifié au cours du temps par ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Pour cela, les BMMC contrôles et cKO^{kif5b} ont été sensibilisés sur la nuit avec un anticorps IgE anti-DNP puis activés par l'administration de l'allergène DNP-human serum albumin (HSA) sur des durées allant de 0,5 min à 30 min). On peut ainsi observer que la quantité de β -hexosaminidase relarguée au cours du temps est moindre dans la souris cKO^{kif5b} comparé à la souris contrôle. L'écart semble néanmoins s'amoinrir aux temps 10 min et 30 min, ce qui s'expliquerait par l'épuisement des BMMC contrôles qui ont fini de dégranuler (**Figure 54**).

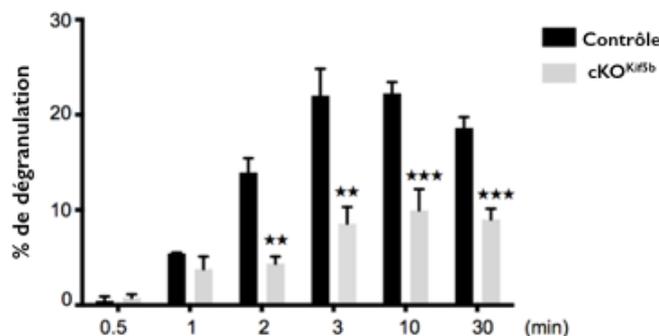


Figure 54: Analyse du relargage de la β -hexosaminidase dans les BMMC contrôles et cKO^{kif5b}. Les BMMC contrôles et cKO^{kif5b} sont sensibilisés avec les IgE anti-DNP puis activés par l'allergène DNP-HSA (20 ng/ml) sur une durée de 0,5/1/2/3/10 ou 30 min. Les résultats correspondent à la moyenne (+ SEM) de 10 expériences. Test statistique utilisé: t test (Prism).

2- Analyse du recrutement des granules à la membrane: microscopie confocale

Pour confirmer ces résultats, des expériences d'immunofluorescence ont été menées afin d'analyser la cinétique de recrutement des granules de sécrétion. Ainsi les BMMC contrôles et cKO^{kif5b} ont été sensibilisés sur la nuit avec un anticorps IgE anti-DNP puis activés par l'administration de l'allergène DNP-HSA durant 10 min ou 30 min. Pour suivre la localisation des granules au cours du temps ces derniers ont été marqués à l'aide d'un anticorps anti-STX3 (La syntaxine présente sur la membrane des granules (Guo 1998)).

En condition non stimulée, les granules sont répartis de manière homogène dans les BMMC contrôles et déficients. Cependant, 10 min après activation, alors que 80% des BMMC contrôles expriment un marquage STX3 membranaire, indiquant des événements de translocation et de fusion des granules, seulement 15% des cellules cKO^{kif5b} ont un marquage périphérique. Après 30 min d'activation, la proportion de BMMC cKO^{kif5b} qui possède un marquage STX3 périphérique augmente jusqu'à 50% mais reste néanmoins significativement plus bas que dans les BMMC contrôles. L'absence de kinésine-1 affecte donc les mastocytes dans leur capacité à transloquer et sécréter leurs granules (**Figure 55**).

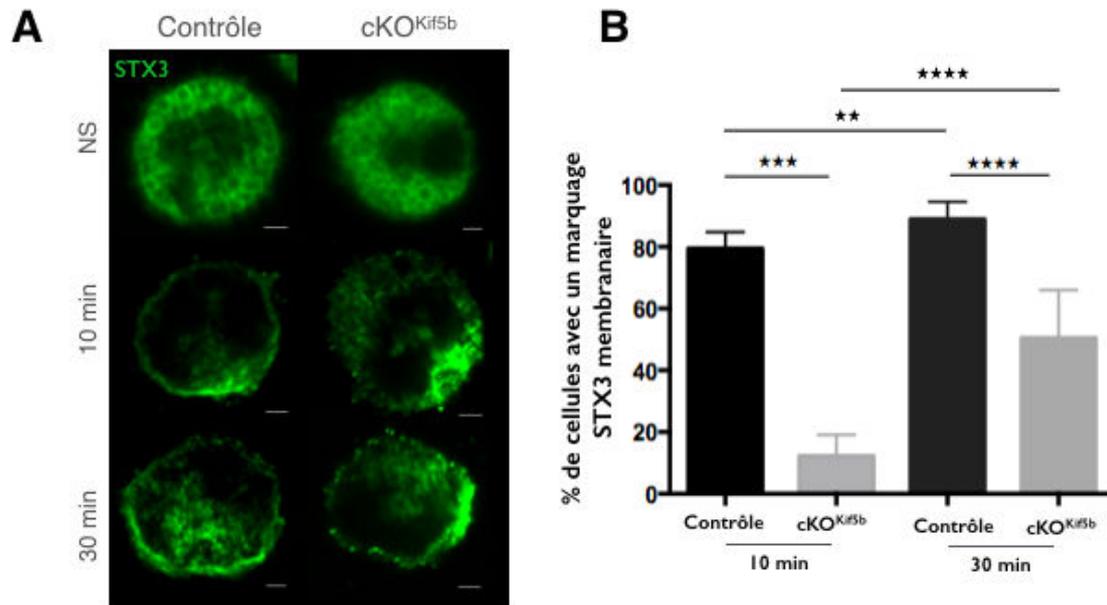


Figure 55: Analyse du recrutement des granules mastocytaires dans les BMMC contrôles et cKO^{Kif5b}. (A) Les BMMC contrôles et cKO^{Kif5b} une fois adhérents aux lamelles coatées en fibronectine sont sensibilisés avec les IgE anti-DNP puis activés par l'allergène DNP-HSA (20 ng/ml) sur une durée de 10 ou 30 min. Une condition non stimulée est aussi réalisée. Les cellules sont ensuite fixées, perméabilisées, marquées avec l'anticorps anti-STX3 puis analysées au microscope confocal. La barre d'échelle représente 2 μ m. (B) Le nombre de cellules qui possédaient un marquage STX3 membranaire à ensuite été quantifié. Ces expériences ont été réalisées 3 fois et plus de 100 cellules distribuées à des endroits différents de la lamelle ont été analysées à chaque expérience. Les résultats correspondent à la moyenne (+ SEM) de 3 expériences. Test statistique utilisé: t test (Prism).

3- Analyse du comportement des granules mastocytaires: microscopie TIRF

Le comportement de ces granules au cours du temps a été étudié par microscopie TIRF. Les événements de translocation et de fusion qui se déroulent à la membrane plasmique peuvent ainsi être observés.

Afin de suivre les granules sécrétoires en temps réel par microscopie TIRF, il a fallu tout d'abord trouver un marqueur adéquat. Ainsi, nous avons pu constater que le marqueur wheat germ agglutinin (WGA) précédemment utilisé pour marquer les granules cytotoxiques dans les LTC (Sepulveda 2015) constitue un bon marqueur des granules de sécrétion des mastocytes. En effet, après un marquage au WGA conjugué à l'Alexa-488 puis après une chasse de 18h, on peut constater que le marquage WGA se retrouve dans le lumen des granules marquées au STX3 (Figure 56A). De plus, nous avons pu vérifier préalablement que le marquage WGA a été internalisé de la même façon entre les deux conditions par cytométrie en flux. La même quantification du marqueur WGA est ainsi observée (Figure 56B).

Une fois le marqueur des granules sécrétoires identifié, les BMMC marqués au WGA ont été sensibilisés sur la nuit avec un anticorps IgE anti-DNP puis placés sur des lamelles coatées avec de la fibronectine. Directement après l'ajout de l'allergène, et ce durant 15 min, les cellules sont enregistrées et les événements de transport terminal/ fusion dit de *docking* sont quantifiés.

On constate que, chez le contrôle, les évènements de docking deviennent détectables à partir de 8 min et ce jusqu'à la fin de l'acquisition. Concernant les BMMC cKO^{Kif5b}, très peu d'évènements de docking sont détectés et les quelques évènements qui peuvent apparaître ne le font qu'à partir de 13 min. En l'absence de kinésine-1 nous avons donc un délai dans le processus de sécrétion des granules de sécrétion mais aussi une réduction de la quantité de granules sécrétés (Figure 56C/D), ce qui confirme les précédents résultats observés dans les expériences de relargage de β -hexosaminidase et de microscopie confocale.

La kinésine-1 semble donc être directement impliquée dans le processus de translocation et de sécrétion des granules sécrétoires au sein des mastocytes *in vitro*.

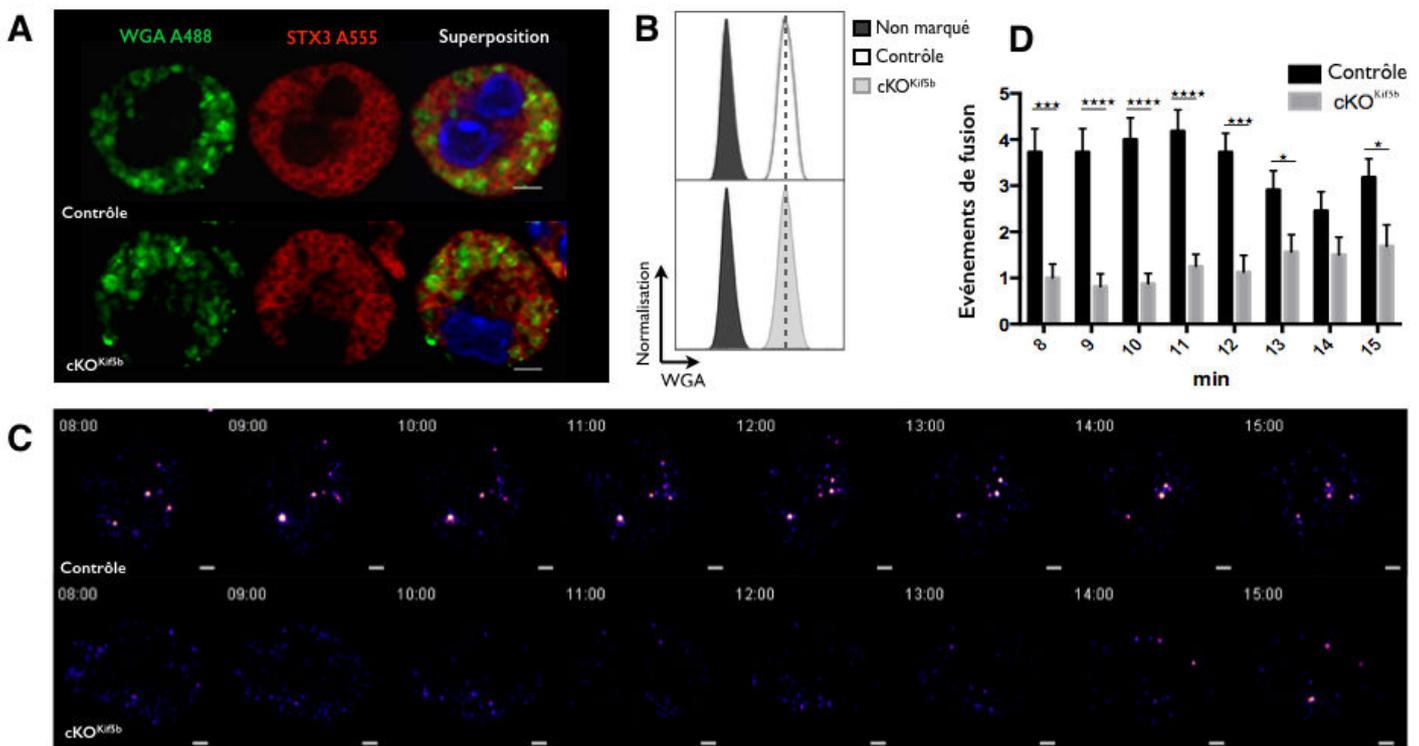


Figure 56: Analyse du comportement des granules mastocytaires dans les BMMC contrôles et cKO^{Kif5b}. (A) Les BMMC contrôles et cKO^{Kif5b} sont marqués au WGA couplé à l'Alexa-488 puis un chase de 18h est réalisée. Les BMMC sont ensuite mis en contact avec les lamelles coatées en fibronectine, puis une fois adhérents les BMMC sont fixés, perméabilisés et enfin marqués avec un anticorps anti-STX3. L'analyse est réalisée au microscope confocale (B) Les BMMC contrôles et cKO^{Kif5b} sont marqués au WGA couplé à l'Alexa-488 puis un chase de 18h est réalisée. La quantification du marquage est réalisée par cytométrie en flux. (C) Les BMMC contrôles et cKO^{Kif5b} sont marqués au WGA couplé à l'Alexa-488 puis un chase de 18h est réalisée. Les BMMC sont ensuite mis en contact avec les lamelles coatées en fibronectine, puis une fois adhérents les BMMC sont ensuite sensibilisés avec les IgE anti-DNP puis activés par l'allergène DNP-HSA (20 ng/ml). Les évènements de docking sont enregistrés durant 15 min après l'ajout de l'allergène au microscope TIRF. (D) Quantification des évènements de docking observés pendant les expériences de TIRF. Les résultats correspondent à la moyenne (+ SEM) de 3 expériences pour les figures A et B. 20 cellules sont analysées par conditions sur 4 expériences indépendantes pour les résultats du TIRF. Test statistique utilisé: t test (Prism). La barre d'échelle représente 2 μ m.

4- Analyse de la capacité de sécrétion des mastocytes *in vivo* : choc anaphylactique

Pour étudier le rôle de la kinésine-1 *in vivo*, des expériences de choc anaphylactique ont été réalisées sur les souris contrôles et cKO^{Kif5b}. Pour cela les souris ont été sensibilisées durant 24h avec un anticorps IgE anti-DNP puis traitées avec l'allergène DNP-HSA par des injections en

intraveineuse. Suite à ces administrations, les mastocytes relarguent massivement le contenu de leurs granules, ce qui conduit au choc anaphylactique caractérisé par une baisse soudaine de la température. La température des souris ainsi que le relargage de MCPT-1 (Mast cell specific protease-1) dans le serum ont été monitorés afin de caractériser la sévérité du choc anaphylactique.

On peut ainsi constater que durant les phases précoces du choc anaphylactique les souris déficientes pour la kinésine-1 et les souris contrôles se comportent de la même façon. Par contre, durant les phases plus tardives du choc anaphylactique la diminution de température est moins importante dans les souris cKO^{Kif5b} comparé aux souris contrôles (Figure 57A). Concernant le relargage de MCPT-1, on peut observer une diminution de la quantité de MCPT-1 dans le sérum des souris cKO^{Kif5b} comparé aux souris contrôles, ce qui traduit un défaut de dégranulation *in vivo* (Figure 57B). Ainsi les souris déficientes en kinésine-1 sont plus résistantes aux chocs anaphylactiques.

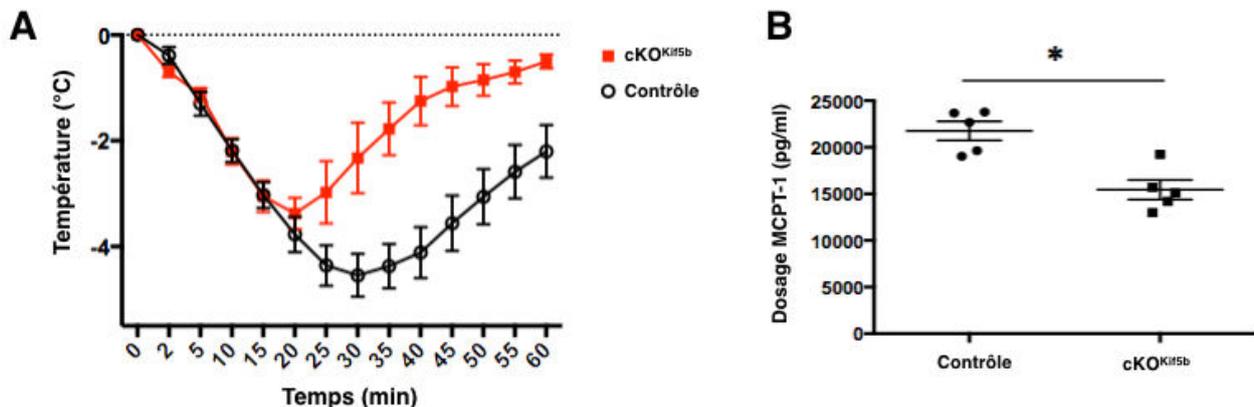


Figure 57: Analyse de la dégranulation mastocytaire *in vivo* dans les souris contrôles et cKO^{Kif5b}. (A) 5 souris contrôles et 5 souris cKO^{Kif5b} sont sensibilisées avec les IgE anti-DNP (1 µg/g) puis 24h après l'allergène DNP-HSA (500 µg) est administré aux souris. (A) Suivi de la température des souris au cours du choc anaphylactique. (B) Mesure de la quantité de MCPT-1 relarguée 1h après l'ajout de l'allergène. Test statistique utilisé: t test (Prism).

C- Implication de la kinésine-1 dans les voies de sécrétion des cytokines et d'activation *via* le récepteur FcεRI:

1- Analyse de la capacité de sécrétion des cytokines:

La voie de signalisation induite par l'activation du récepteur FcεRI, en plus de déclencher la sécrétion des granules sécrétoires, conduit à la synthèse et sécrétion de diverses cytokines importantes pour les réponses inflammatoires comme le TNF-α, l'IL-6 ou le MCP1 (CCL2). Nous voulions donc savoir si la kinésine-1 pouvait être impliquée dans la sécrétion de ces cytokines. Pour cela les BMMC contrôles et cKO^{Kif5b} ont été stimulés durant 3h *via* le récepteur FcεRI et la quantité de cytokine sécrétée dans le surnageant à ensuite été dosée. On peut ainsi constater que la quantité de cytokine sécrétée, que ce soit pour le TNF-α, l'IL-6 ou le MCP1, est comparable entre la souris contrôle et cKO^{Kif5b} (Figure 58). La kinésine-1 ne semble donc pas être impliquée dans la sécrétion des cytokines.

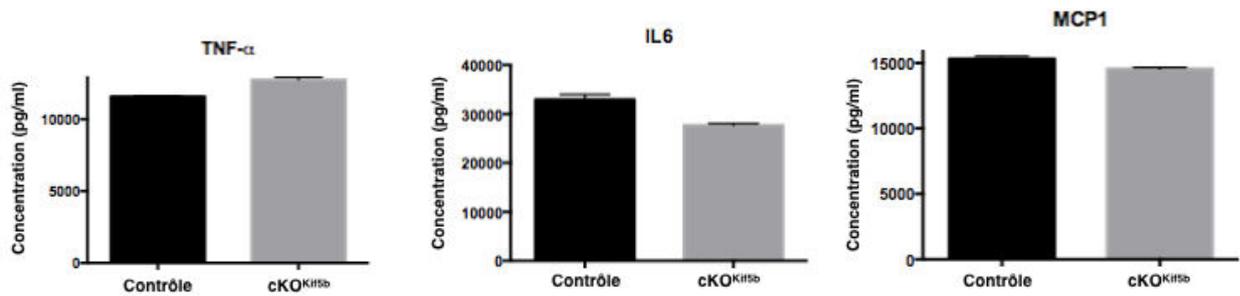


Figure 58: Analyse de la sécrétion des cytokines mastocytaires dans les BMMC contrôles et cKO^{Kif5b}. Les BMMC contrôles et cKO^{Kif5b} sont sensibilisés avec les IgE anti-DNP puis stimulés avec l'allergène DNP-HSA (20ng/ml). 3h après l'activation les cytokines TNF- α , IL-6 et MCP1 sont dosées dans le surnageant par Elisa. Les résultats correspondent à la moyenne (+ SEM) de 2 expériences.

2- Analyse de la signalisation induite par le récepteur Fc ϵ RI:

Dans un second temps nous voulions savoir si la voie de signalisation en aval du récepteur Fc ϵ RI pouvait être affectée par l'absence de kinésine-1, altérant ainsi directement les capacités d'activation des mastocytes. Pour cela les capacités de phosphorylation des acteurs de cette voie de signalisation ont été étudiées suite à l'activation du récepteur Fc ϵ RI après une sensibilisation par les IgE puis par l'allergène DNP-HSA. Nous avons ainsi pu constater que la phosphorylation des protéines AKT et ERK n'était pas affectée par l'absence de kinésine-1. En effet la cinétique de phosphorylation est la même entre les mastocytes contrôles et cKO^{Kif5b} (**Figure 59A**). Enfin un test de flux calcique a été réalisé sur les mastocytes afin de confirmer cette première expérience d'activation mastocytaire. Les mastocytes sont donc marqués à l'indo-1 puis sensibilisés avec les IgE et l'allergène DNP-HSA. Les variations de flux calcique au sein des mastocytes sont ensuite enregistrées. Suite à cette expérience nous avons pu confirmer que les mastocytes, en l'absence de kinésine-1, conservaient leurs capacités d'activation. Aucune différence n'a été observée entre les mastocytes contrôles et cKO^{Kif5b} concernant les variations de flux calcique induites suite à l'activation du récepteur Fc ϵ RI (**Figure 59B**).

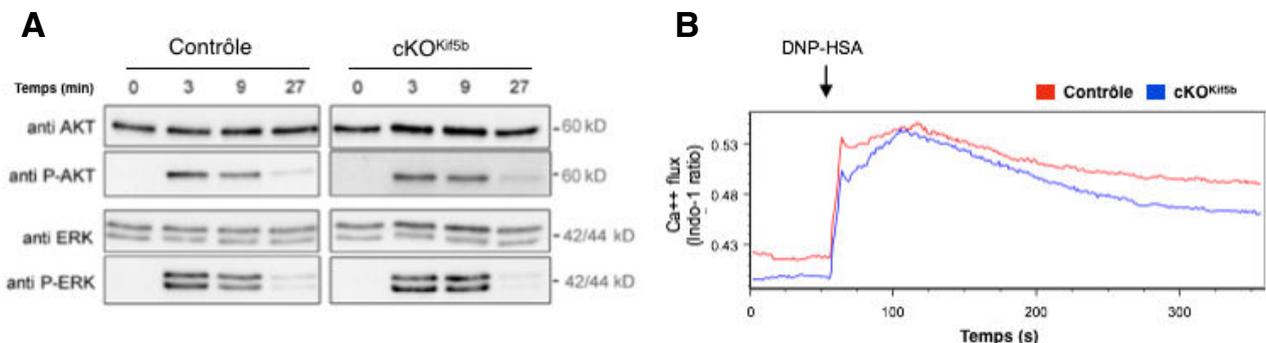


Figure 59: Analyse des capacités d'activation des BMMC contrôles et cKO^{Kif5b}. (A) Les BMMC contrôles et cKO^{Kif5b} sont sensibilisés avec les IgE anti-DNP puis stimulés avec l'allergène DNP-HSA (20ng/ml) durant différents temps. Les cellules sont ensuite lysées puis un Western Blot est réalisé afin de quantifier la phosphorylation de AKT et ERK. Les résultats sont représentatifs de 2 expériences indépendantes. (B) Les BMMC contrôles et cKO^{Kif5b} sont sensibilisés avec les IgE anti-DNP, marqués à l'indo-1 puis stimulés avec l'allergène DNP-HSA. Les variations de flux calcique sont ensuite analysées en cytométrie. Les résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

On peut donc conclure que la kinésine-1 n'est pas impliquée dans le processus d'activation mastocytaire. Ainsi le défaut de dégranulation observé en l'absence de kinésine-1 ne serait pas dû à un défaut d'activation. C'est donc bien le mécanisme de dégranulation qui est en cause ici.

D- Caractérisation du complexe moléculaire impliqué dans la sécrétion des granules de sécrétion:

La machinerie moléculaire impliquée dans le mécanisme de sécrétion des granules reste encore inconnue. Les précédentes expériences nous ont permis de mettre en évidence l'implication de la kinésine-1 dans ce processus. Nous savons de plus, que la petite GTPase Rab27b est impliquée dans ce mécanisme (Mizuno 2007). Nous savons qu'il existe un lien moléculaire entre Rab27 et la kinésine-1. En effet, ce lien a déjà été décrit dans plusieurs modèles et selon le type cellulaire les molécules liant Rab27 à la kinésine-1 varient. Ainsi dans les LTc, la kinésine-1 se lie à Rab27a par l'intermédiaire de la molécule Slp3 et dans les neurones *via* les molécules Slp1 et CRMP2. Maintenant il nous reste à découvrir: quelle molécule permet de lier la kinésine-1 à Rab27 dans les mastocytes.

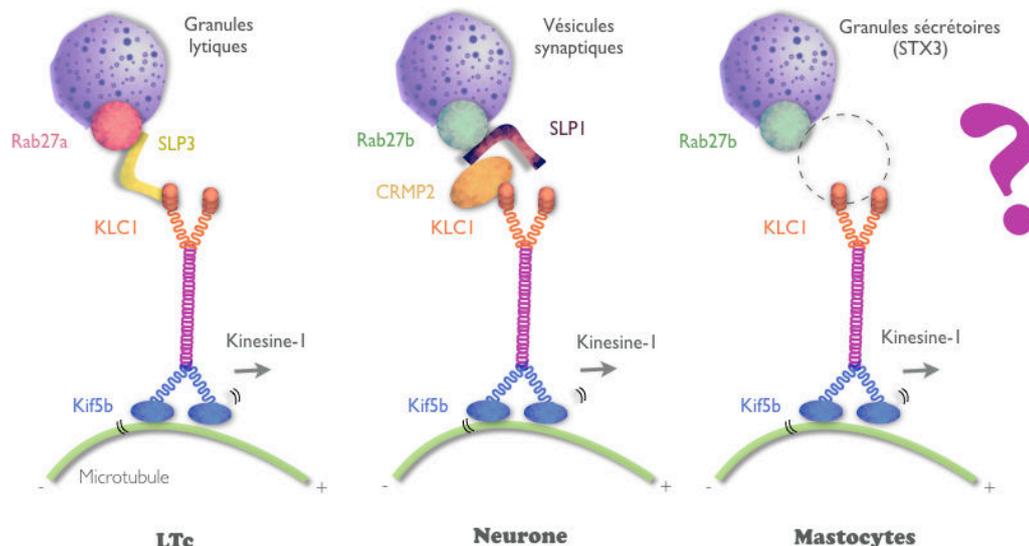


Figure 60: Exemple de molécules adaptatrices liant Rab27 à la kinésine-1 dans les LTc et neurones.

1- Identification des protéines impliquées dans le complexe Rab27/kinésine-1:

Afin d'identifier les protéines impliquées dans le complexe Rab27/kinésine-1 des expériences de qRT-PCR ont été réalisées. On peut tout d'abord constater que l'expression de Rab27a est minoritaire comparée à celle de Rab27b. Rab27b est donc l'isoforme prépondérante retrouvée dans les mastocytes. Nous avons ensuite regardé l'expression des protéines appartenant à la famille des Slp, connues pour interagir avec Rab27 mais aussi avec la kinésine-1 (Kurowska 2012). Nous constatons alors que Slp3 et Slp2 semblent être les deux représentants de la famille

des Slp au sein des mastocytes. Néanmoins l'expression de Slp2 est très minoritaire comparé à celle de Slp3 (**Figure 61A**).

Ce dernier résultat se confirme quand on étudie la présence des protéines Slp2 et Slp3 dans un lysat de mastocyte par Western Blot. En effet alors que la protéine Slp3 est facilement détectable dans les mastocytes, la protéines Slp2 n'est, elle, pas détectée (**Figure 61B**).

Il semblerait donc que Slp3 soit le meilleur candidat éligible au rôle de protéine assurant le lien entre Rab27b et la kinésine-1 dans les mastocytes. Nous focaliserons donc nos futures études dans l'analyse de ce complexe.

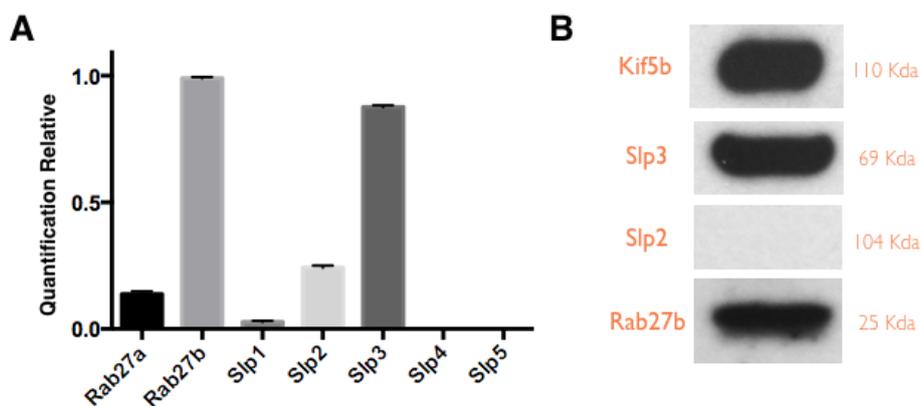


Figure 61: Analyse de l'expression des molécules adaptatrices potentielles. (A) Quantification de l'expression de Rab27a, Rab27b, Slp1, Slp2, Slp2, Slp4 et Slp5. L'extraction d'ARN et la Reverse Transcription sont réalisées sur 1.10^6 de cellules. L'expression de chaque gène a été normalisée en utilisant comme valeur de référence l'expression de l'ARN18s. L'expression à ensuite été normalisé par rapport au gène le plus fortement exprimé. Les résultats correspondent à la moyenne (+ SEM) de 3 expériences. (B) Analyse de l'expression des protéines Kif5b, Slp3, Slp2 et Rab27b par Western Blot. L'extraction des protéines est réalisée sur 10.10^6 . $40 \mu\text{g}$ de protéine sont déposées par puits. La révélation des protéines est réalisée grâce aux anticorps primaires anti-Kif5b, anti-Slp3, anti-Slp2, anti-Rab27b puis secondaire HRP. Le résultat est représentatif des 3 expériences réalisées.

2- Expérience de dominant négatif et de complémentation:

Pour faciliter la quantification de l'efficacité de dégranulation, l'analyse est réalisée par cytométrie en flux en suivant le recrutement de CD63 (Lamp3) à la surface des cellules. En effet CD63 se trouvant sur la membrane des granules, il se retrouve à la surface des cellules suite au processus de dégranulation. C'est ainsi que l'on a pu de nouveau confirmer le défaut de dégranulation observé dans les mastocytes $\text{cKO}^{\text{Kif5b}}$. En effet, les mastocytes contrôles ont un pourcentage de dégranulation de 62,3% alors que les mastocytes $\text{cKO}^{\text{Kif5b}}$ ont un pourcentage de dégranulation de seulement 13% (**Figure 62**).

Afin de confirmer l'implication de la kinésine-1 dans le processus de dégranulation des mastocytes, des expériences de dominant négatif et de complémentation ont été réalisées. Des mastocytes contrôles ont ainsi été transfectés à l'aide d'un dominant négatif de la chaîne lourde de la kinésine-1 (Kurowska 2012) et testés pour leur capacité de dégranulation. Des BMMC sont aussi transfectés avec une construction GFP comme contrôle et seulement les cellules GFP+ sont

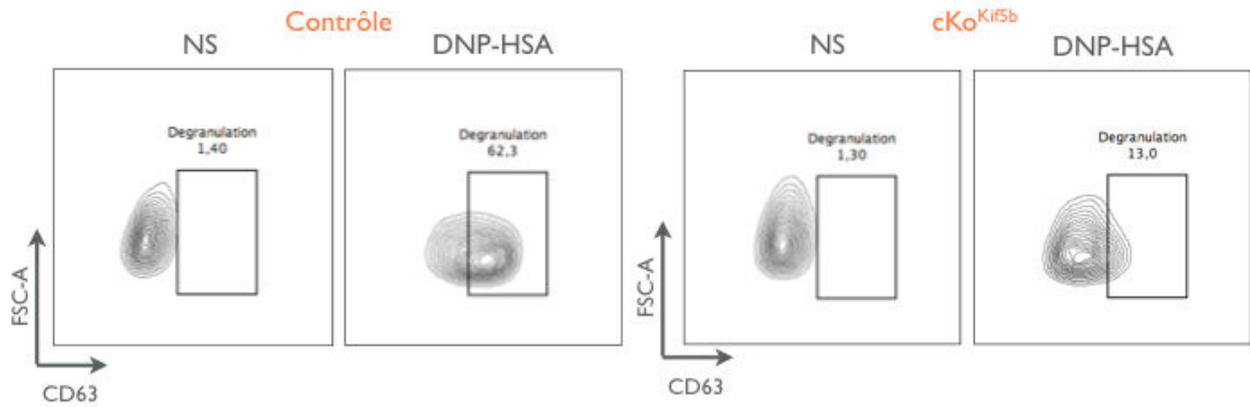


Figure 62: Analyse de la dégranulation des BMMC contrôles et cKO^{Kif5b} par cytométrie en flux. Les BMMC contrôles et cKO^{Kif5b} sont sensibilisés avec les IgE anti-DNP puis stimulés avec l'allergène DNP-HSA (20ng/ml) durant 10 min. Une condition non stimulée est aussi réalisée. Après une fixation puis un marquage au CD63, les BMMC GFP+ sont analysés pour leur expression de CD63 à la surface des cellules par cytométrie en flux. Le résultat est représentatif des 5 expériences réalisées.

analysées pour calculer le pourcentage de dégranulation. Nous avons alors pu observer que les mastocytes contrôles, qui dégranulaient à hauteur de 61%, n'ont plus que 26% de dégranulation quand on les transfecte avec la construction du dominant négatif de Kif5b (**Figure 63A**).

Par ailleurs, quand on réexprime la kinésine-1 dans des mastocytes cKO^{Kif5b} avec la construction Kif5b, on passe d'une dégranulation de 14,5% à 57%. Il y a donc eu une restauration de la capacité de dégranulation des mastocytes après réintroduction de la kinésine-1 (**Figure 63B**). Ces expériences de complémentation et de dominant négatif nous confortent donc dans l'idée que la kinésine-1 est essentielle au processus de translocation des granules de sécrétion en direction de la membrane plasmique.

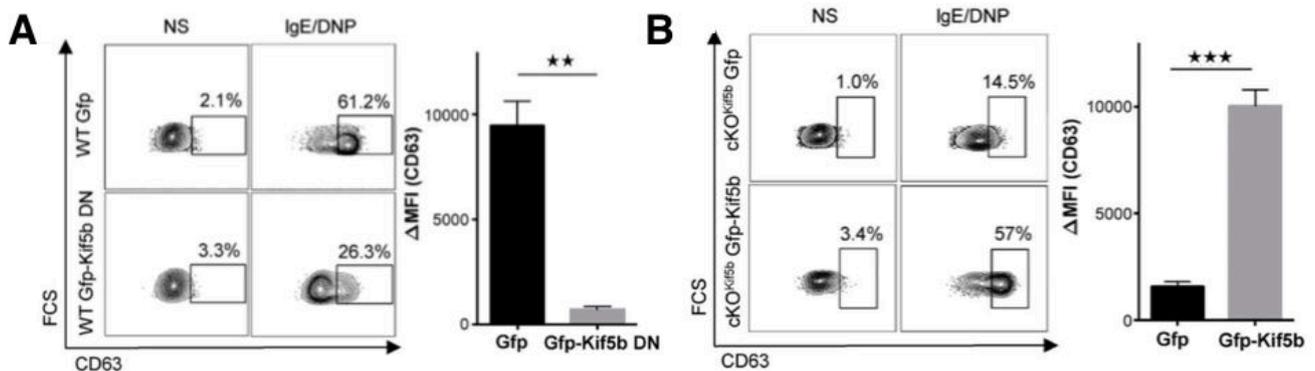


Figure 63: Expérience de dominant négatif et de complémentation (A) Les BMMC contrôles sont transfectés avec la construction GFP (Contrôle) ou GFP-Kif5b DN. Puis 48h après les BMMC sont sensibilisés avec les IgE anti-DNP puis stimulés avec l'allergène DNP-HSA (20ng/ml) durant 10 min. Une condition non stimulée est aussi réalisée. Après une fixation puis un marquage au CD63, les BMMC GFP+ sont ensuite analysés pour leur expression de CD63 à la surface des cellules par cytométrie en flux. L'expression est quantifiée en analysant la delta MFI. Le résultat est représentatif des 3 expériences réalisées. **(B)** Même expérience qu'en A sauf que ce sont des BMMC cKO^{Kif5b} transfectées avec la construction GFP-Kif5b. Test statistique utilisé: t test (Prism).

3- Etude de l'implication de Slp3:

L'implication de Slp3 a ensuite été mise en évidence par des expériences de siRNA. Pour cela les mastocytes ont été transfectés avec des siRNA dirigés contre Slp3 ou un siRNA contrôle et un plasmide codant pour la GFP. Des tests de dégranulation sont ensuite réalisés (48h après) en ne prenant en compte que les cellules transfectés GFP+ pour l'analyse.

Nous avons ainsi pu démontrer dans un premier temps l'efficacité des siRNA utilisés par Western Blot. On observe bien une diminution de la quantité de protéine Slp3 dans les mastocytes (**Figure 64A**). Il convient de noter que le Western Blot n'a pas été réalisé sur des cellules transfectés GFP+ triées mais sur l'ensemble des cellules (transfectées et non transfectées). Ainsi même si l'efficacité de transfection est d'environ 50% on s'attendrait à avoir des résultats encore plus flagrants sur des cellules GFP+ triées.

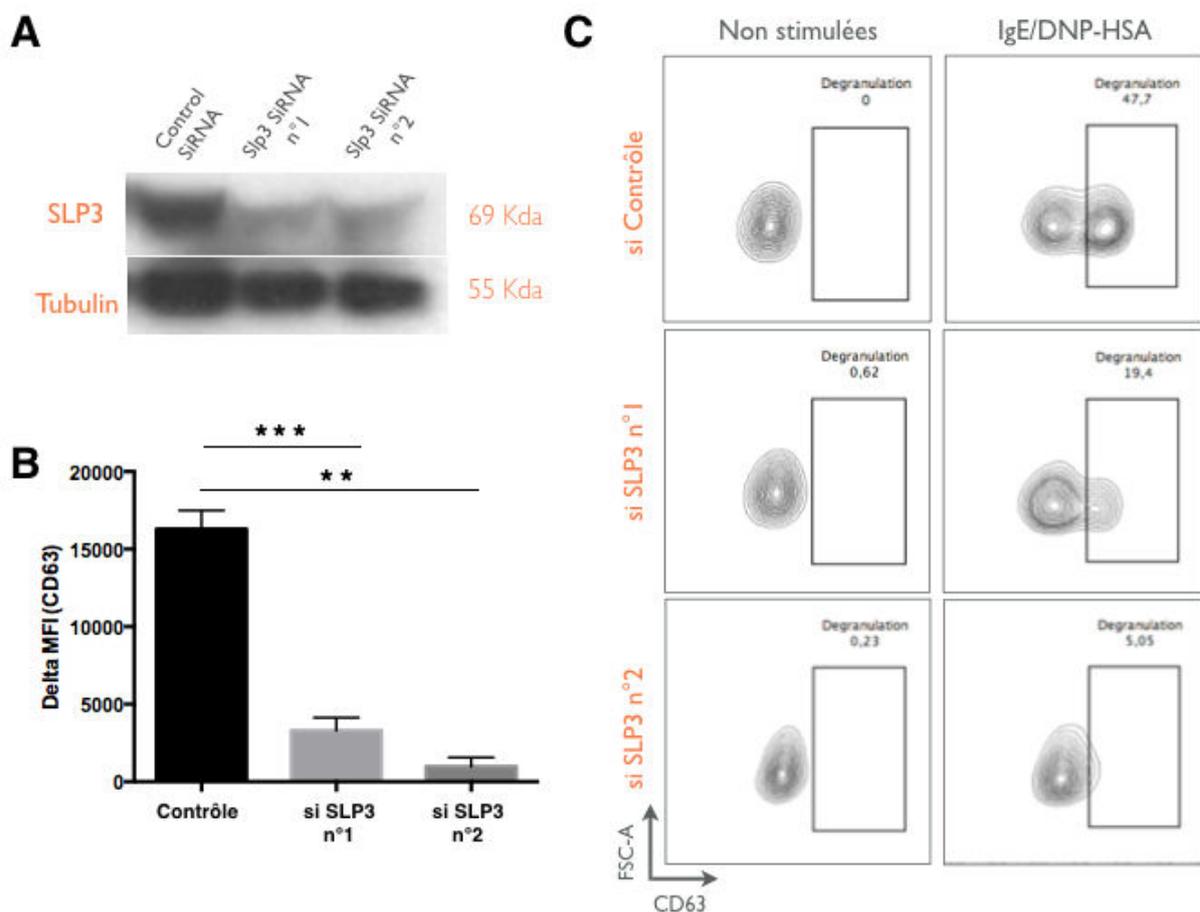


Figure 64: Test siRNA anti-Slp3 (A) Analyse de l'expression des protéines Slp3 et Tubuline par Western Blot. L'extraction des protéines est réalisée sur 4.10^6 de BMMC transfectés avec les siRNA contrôles ou siSlp3. $40 \mu\text{g}$ de protéine sont déposées par puits. La révélation des protéines est réalisée grâce aux anticorps primaires anti-Slp3 et anti-Tubuline puis avec le secondaire HRP. (B et C) Les BMMC contrôles sont transfectés avec la construction GFP et siContrôle ou siSlp3. Puis 48h après les BMMC sont sensibilisés avec les IgE anti-DNP puis stimulés avec l'allergène DNP-HSA (20ng/ml) durant 10 min. Une condition non stimulée est aussi réalisée. Après une fixation puis un marquage au CD63, les BMMC GFP+ sont ensuite analysés pour leur expression de CD63 à la surface des cellules par cytométrie en flux. L'expression est quantifiée en analysant la delta MFI. Le résultat est représentatif des 3 expériences réalisées. Test statistique utilisé: t test (Prism).

Les analyses de dégranulation par cytométrie ont ensuite été réalisées sur les mastocytes transfectés avec les siRNA anti-Slp3 et contrôle. Suite à ces expériences, nous observons un défaut de dégranulation quand Slp3 se retrouve neutralisé par les siRNA. On passe de 47,7% de dégranulation pour le siRNA contrôle à 19,4% et 5,05% pour les siRNA anti-Slp3 (**Figure 64B et C**).

Ces résultats ont ensuite été confirmés par microscopie confocale. Après une sensibilisation des mastocytes transfectés aux IgE/DNP-HSA (10 et 30 min) le processus de dégranulation a été suivi grâce au marqueur STX3 précédemment utilisé. A noter que seules les cellules GFP+ ont été prises en considération pour cette analyse.

Nous constatons une fois de plus ici que les mastocytes transfectés avec le siRNA contrôle sont capables d'assurer une dégranulation normale alors que les mastocytes transfectés avec les siRNA Slp3 ont un défaut de dégranulation important à 10 et 30 min (**Figure 65A et B**).

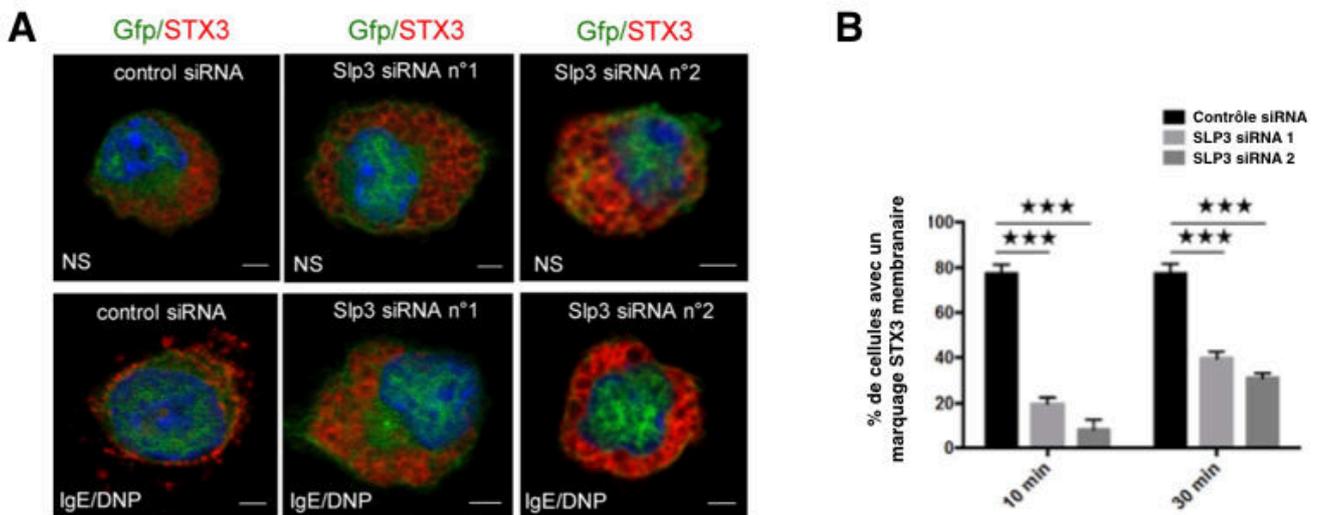


Figure 65: Test siRNA anti-Slp3 par microscopie confocale. (A et B) Les BMMC contrôles sont transfectés avec la construction GFP et siContrôle ou siSlp3. Puis 48h après les BMMC une fois adhérents aux lamelles coatées en fibronectine sont sensibilisés avec les IgE anti-DNP puis activés par l'allergène DNP-HSA (20 ng/ml) sur une durée de 10 min ou 30 min. Une condition non stimulée est aussi réalisée. Les cellules sont ensuite fixées, perméabilisées, marquées avec l'anticorps anti-STX3 puis analysées au microscope confocal. La barre d'échelle représente 2 μ m. Les résultats correspondent à la moyenne (+ SEM) de 2 expériences plus de 30 cellules ont été analysées par expérience sur des zones distinctes. Test statistique utilisé: t test (Prism).

Pour conclure, ces expériences de siRNA nous indiquent que Slp3 est, lui aussi, impliqué dans le processus de dégranulation et donc ferait partie de la machinerie moléculaire concernée, tout comme Rab27b et la kinésine-1.

4- Etude de la localisation de Rab27b, Slp3 et kinésine-1 dans les mastocytes:

Avant d'étudier les interactions possibles entre Rab27b, Slp3 et la kinésine-1 il est important de savoir où ils se trouvent au sein du mastocyte et cela avant et après le processus de dégranulation. Pour cela les mastocytes contrôles et cKO^{Kif5b} ont été transfectés avec les

constructions Rab27b-GFP et Slp3-Dsred. Deux jours après, les mastocytes sont sensibilisés ou non avec l'IgE/DNP-HSA pour induire une dégranulation. Un marquage STX3 est ensuite réalisé pour suivre l'efficacité de dégranulation.

Ce que l'on peut tout d'abord observer, c'est que Rab27b et Slp3 colocalisent dans les mastocytes contrôles (Slp3/Rab27b 73,90% ± 2,54% de colocalisation) en condition non stimulée. De plus, ces deux protéines colocalisent aussi avec le marqueur STX3 (STX3/ Rab27b-Slp3 73,22% ± 5,56% de colocalisation), ce qui veut dire que ces deux protéines se situent au niveau des granules de sécrétion. Par ailleurs, quand on observe la localisation de ces protéines après dégranulation, on remarque que Rab27b, Slp3 et STX3 ont été recrutées au niveau de la membrane plasmique mais que ces protéines colocalisent toujours (STX3/Rab27b-Slp3 70,9% ± 4,7% de colocalisation).

Concernant les mastocytes cKO^{Kif5b} on observe toujours la colocalisation entre Rab27b, Slp3 et STX3 mais le complexe n'est pas recruté en périphérie suite à l'activation des mastocytes. En effet, on observe encore une fois un défaut de dégranulation: Rab27b, Slp3 et STX3 ne sont pas recrutés à la membrane plasmique car les granules sont restés contenus dans le cytoplasme des mastocytes avec Rab27b, Slp3 et STX3 à leur surface (**Figure 66**).

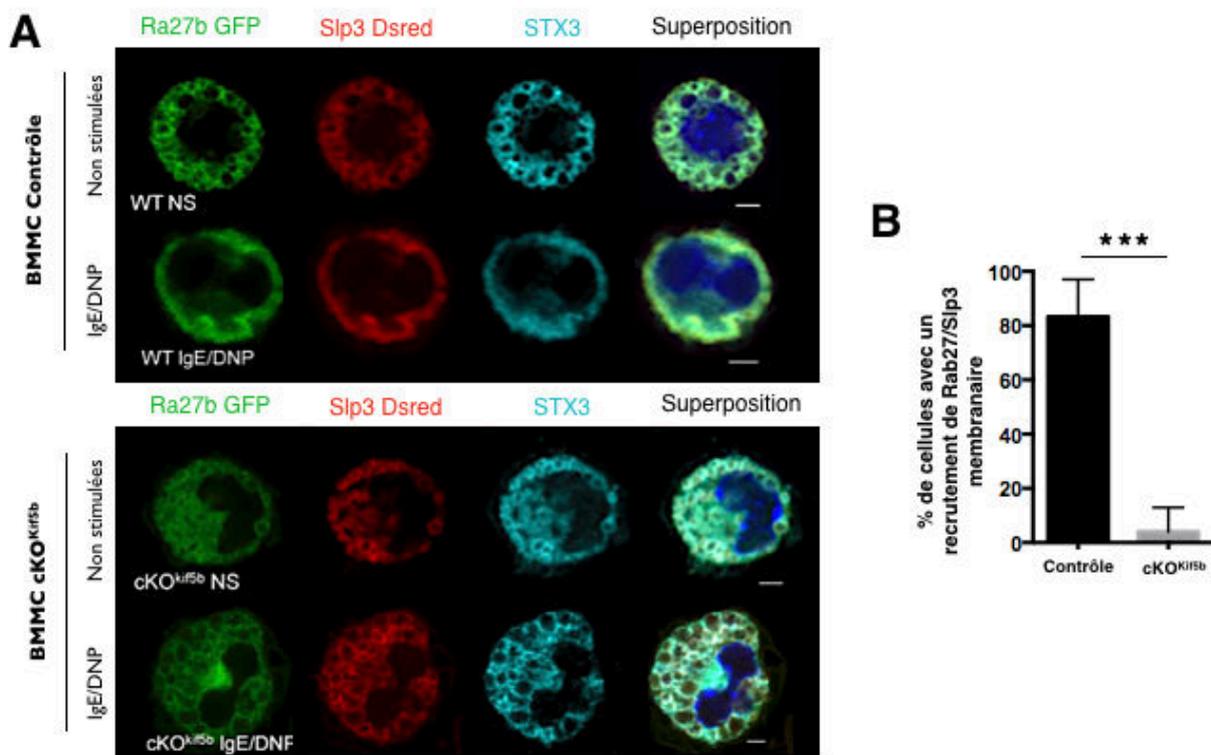


Figure 66: Analyse de la localisation de Rab27 et Slp3 par microscopie confocale. Les BMMC contrôles et cKO^{Kif5b} sont transfectés avec les constructions Rab27b-GFP ou Slp3-Dsred. Puis 48h après les BMMC une fois adhérents aux lamelles revêtues de fibronectine sont sensibilisés avec les IgE anti-DNP puis activés par l'allergène DNP-HSA (20 ng/ml) sur une durée de 10 min. Une condition non stimulée est aussi réalisée. Les cellules sont ensuite fixées, perméabilisées, marquées avec l'anticorps anti-STX3 puis analysées au microscope confocal. La barre d'échelle représente 2 μm. Les résultats correspondent à la moyenne (+ SEM) de 2 expériences plus de 30 cellules ont été analysées par expérience sur des zones distinctes. Test statistique utilisé: t test (Prism).

En ce qui concerne la localisation de la kinésine-1, les mastocytes contrôles et cKO^{Kif5b} ont été marqués à l'aide d'un anticorps anti-Kif5b et anti-tubuline puis stimulés (IgE/DNP-HSA) ou non pour induire la dégranulation. En condition contrôle non stimulée, le marquage de la kinésine-1 colocalise avec celui de la tubuline. En effet la kinésine-1 est surtout retrouvée le long de la membrane plasmique et autour du centre organisateur des microtubules, comme le marquage tubuline, ce qui semble logique car la kinésine-1 parcourt le réseau de microtubules pour assurer ses fonctions. Dans la condition cKO^{Kif5b} aucun marquage kinésine-1 n'est détecté ce qui confirme la spécificité de l'anticorps car dans ce modèle la kinésine-1 est absente. Une fois les mastocytes activés et suite à la dégranulation, la kinésine-1 est recrutée au niveau de la membrane plasmique au niveau de zones enrichies en tubuline que l'on appelle des protrusions (Figure 67A).

Dans un second temps nous nous sommes posés la question de l'importance de la kinésine-1 dans la réorganisation du cytosquelette. En observant la localisation du marquage de la tubuline dans les mastocytes cKO^{Kif5b} nous en sommes venus à la conclusion que l'absence de kinésine-1 n'affectait pas le processus de réorganisation des microtubules qui pouvait avoir lieu lors de la dégranulation. En effet, en condition non stimulée la tubuline se retrouve bien en majorité au niveau de la membrane plasmique et du centre organisateur des microtubules. Puis suite à l'activation des mastocytes, la tubuline se relocalise au niveau de la membrane plasmique et on voit apparaître les protrusions caractéristiques de la dégranulation des mastocytes (Figure 67B).

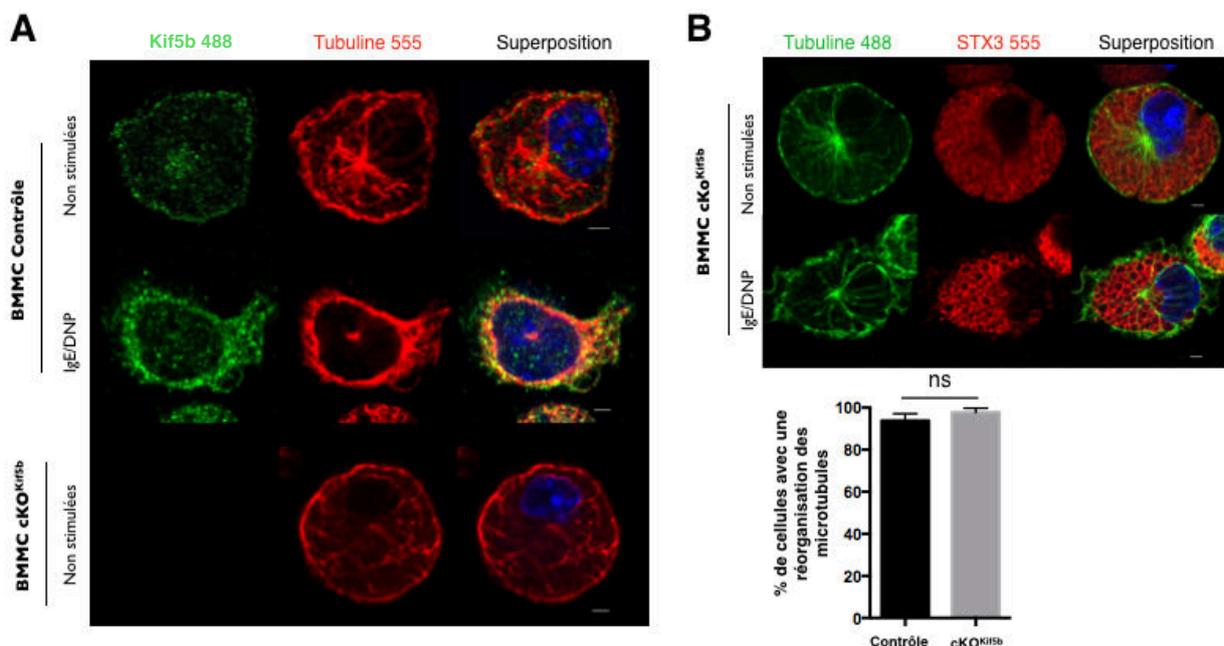


Figure 67: Analyse de la localisation de la kinésine-1 et étude de l'intégrité du réseau de microtubules. Les BMCM contrôles et cKO^{Kif5b} une fois adhérents aux lamelles revêtues de fibronectine sont sensibilisés avec les IgE anti-DNP puis activés par l'allergène DNP-HSA (20 ng/ml) sur une durée de 10 min. Une condition non stimulée est aussi réalisée. Les cellules sont ensuite fixées, perméabilisées, marquées avec l'anticorps anti-tubuline et anti-Kif5b ou anti-tubuline et anti-STX3 puis analysées au microscope confocal. La barre d'échelle représente 2 μ m. Les résultats correspondent à la moyenne (+ SEM) de 2 expériences plus de 30 cellules ont été analysées par expérience sur des zones distinctes. Test statistique utilisé: t test (Prism).

De nouvelles expériences de co-immunoprécipitation endogènes ont ensuite été réalisées dans des mastocytes activés (IgE/DNP-HSA) ou non grâce à un anticorps anti-Rab27b. En condition non stimulée et stimulée on observe comme précédemment une interaction entre Slp3 et Rab27b. Néanmoins concernant la kinésine-1, en condition non stimulée la kinésine-1 n'interagit pas avec le complexe Rab27b/Slp3. C'est seulement une fois les mastocytes activés que l'on voit le complexe Rab27b/Slp3/kinésine-1 se former (**Figure 69**). On en déduit donc que, comparé à ce qu'on observe dans les 293T HEK, le complexe Rab27b/slp3/kinésine-1 à besoin d'un signal d'activation pour se former.



Figure 69: Expérience de co-immunoprécipitation (Rab27b) en endogène. Les BMMC ($50 \cdot 10^6$) ont été sensibilisés avec les IgE anti-DNP puis activés ou non par l'allergène DNP-HSA (20 ng/ml) sur une durée de 15 min. Les cellules sont ensuite lysées et co-immunoprécipitées avec un anticorps anti-Rab27b et séparées par SDS-PAGE. La révélation se fait avec des anticorps anti-Kif5b, anti-Slp3 et anti-Rab27b. Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

Effectivement, il a déjà été décrit dans la littérature que l'activité de la kinésine-1 est régulée pour éviter les hydrolyses d'ATP inutiles. Ainsi la kinésine-1 peut adopter une conformation inactive, compactée, où ses chaînes légères se retrouvent coincées entre les domaines moteurs évitant ainsi toute fixation de cargos et tout mouvement de la kinésine-1. Ainsi, c'est suite à un signal d'activation que la kinésine-1 adopterait une conformation active linéaire et serait ainsi capable de déplacer les cargos qu'elle fixerait (Voir discussion).

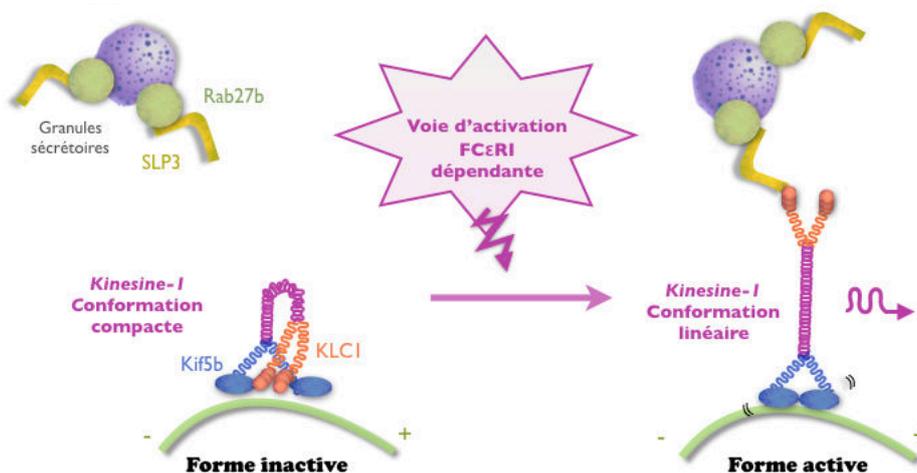


Figure 70: Régulation de l'activité de la kinésine-1 par le signal d'activation

C'est l'hypothèse que nous émettons concernant notre modèle. Rab27b et Slp3 seraient présents au niveau des granules sécrétoires. La kinésine-1 serait, elle, présente sur les microtubules. Puis suite à l'activation induite *via* le récepteur FcεRI, la kinésine-1 changerait de conformation et serait alors capable de recruter le complexe Rab27b/Slp3.

6- Etude de la voie de signalisation impliquée dans la formation du complexe Rab27/Slp3/kinésine-1:

Nous avons vu précédemment dans l'introduction que deux voies de signalisation ont été décrites comme impliquées dans le mécanisme de dégranulation. Une première voie impliquant la PI3K qui serait importante pour la translocation des granules et une seconde impliquant la mobilisation de calcium, importante pour la fusion des granules avec la membrane plasmique (Figure 71).

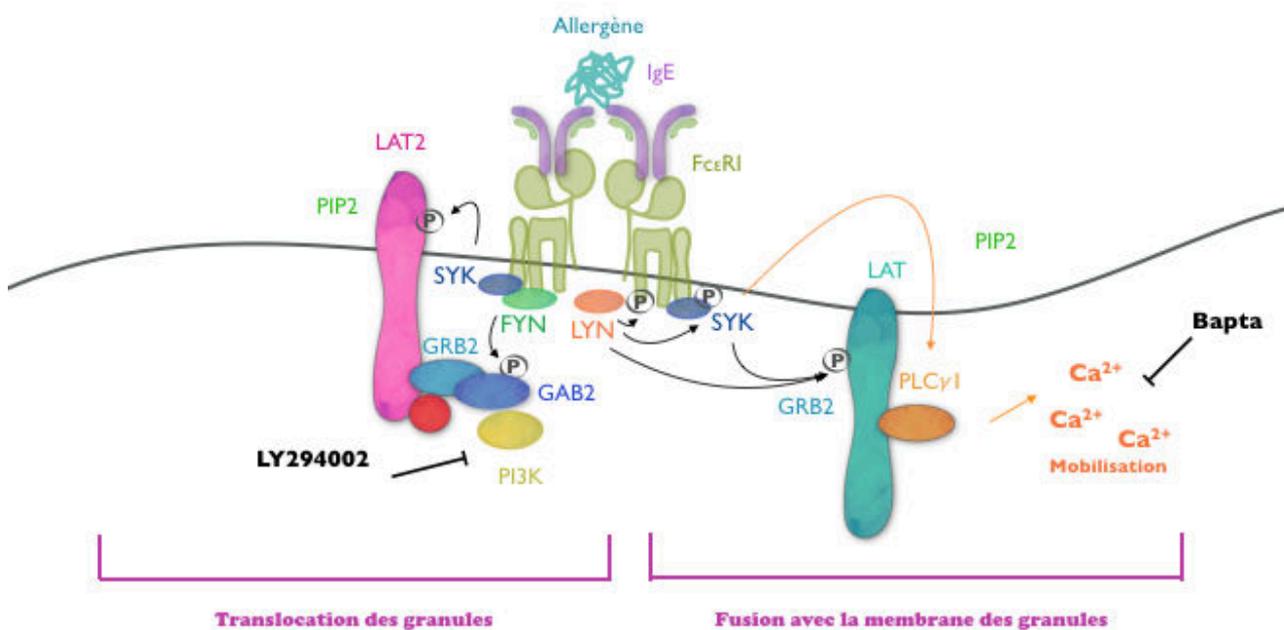


Figure 71: Voies de signalisation impliquées dans la translocation et dans la fusion des granules de sécrétion

Etant donné que la kinésine-1 serait plutôt impliquée dans le processus de translocation des granules à la membrane plasmique, nous émettons donc l'hypothèse que la voie de signalisation qui serait impliquée dans la formation du complexe Rab27b/Slp3/kinésine-1 serait plutôt dépendante de la voie PI3K. Pour tester cette hypothèse nous avons donc traité les mastocytes avec deux drogues différentes: le LY2940022 (un inhibiteur de la PI3K) et Bapta (un chélateur intracellulaire).

Nous avons dans un premier temps vérifié par cytométrie que ces deux drogues conduisaient bien à un défaut de dégranulation dans les mastocytes. Et en effet, nous observons bien une altération des capacités de dégranulation dans les mastocytes traités avec le LY2940022 ou par le chélateur Bapta. On passe de 59,9% de dégranulation en condition contrôle à 1,39% et 5,04% pour les conditions LY2940022 et Bapta respectivement (Figure 72A). Concernant la

formation du complexe Rab27b/Slp3/kinésine-1, on constate que le complexe est en mesure de se former dans la condition contrôle et avec le chelateur Bapta. Cependant la kinésine-1 ne se lie pas à Rab27b/Slp3 en présence de l'inhibiteur de la PI3K (LY2940022) (**Figure 72B**). De plus, quand on observe par imagerie la localisation des granules de sécrétions grâce au marqueur STX3, on remarque qu'en présence de bapta les granules ont été capables d'effectuer une translocation en direction de la membrane plasmique. Néanmoins avec le LY2940022 les granules n'ont subi aucun mouvement de translocation.

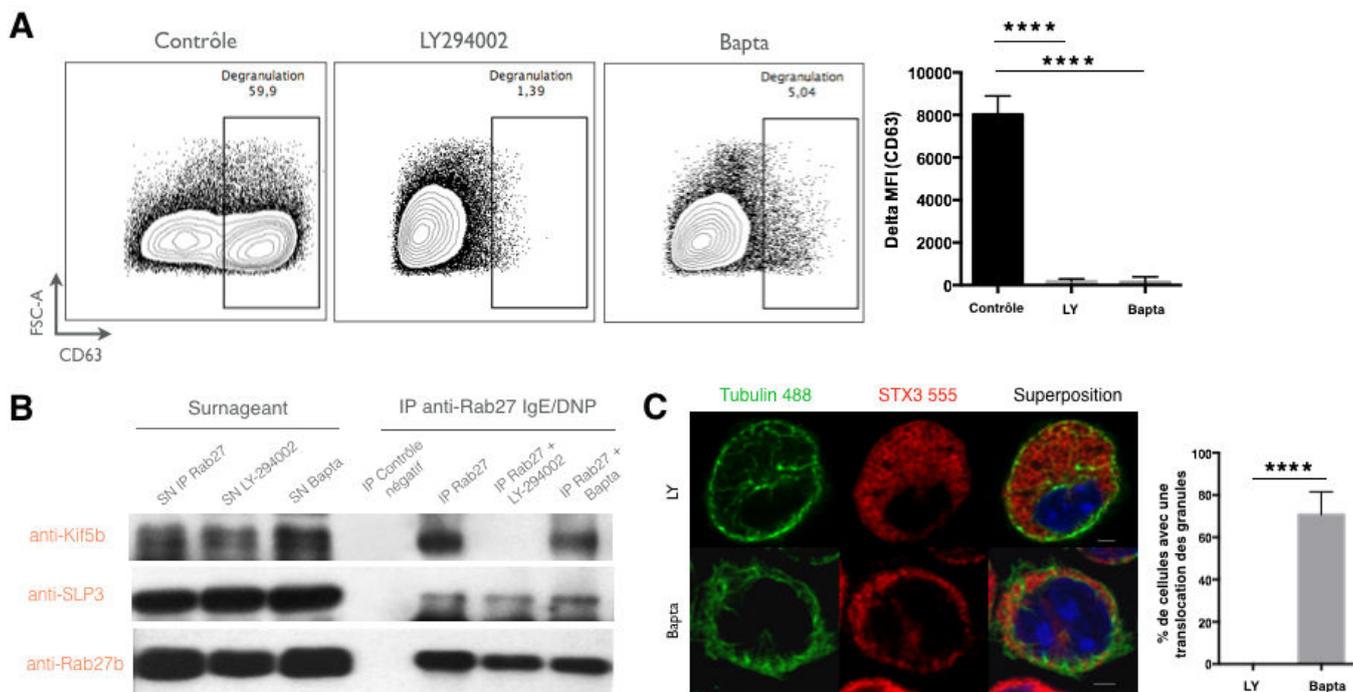


Figure 72: Analyse des voies de signalisation impliquées dans la formation du complexe Rab27/Slp3/kinésine-1. (A) Les BMMC sont incubées avec soit du DMSO (contrôle), du LY-294002 (100 μ M) ou du Bapta (20 mM). Les BMMC sont ensuite sensibilisés avec les IgE anti-DNP puis stimulés avec l'allergène DNP-HSA (20ng/ml) durant 10 min. Une condition non stimulée est aussi réalisée. Après une fixation puis un marquage au CD63, les BMMC sont analysés pour leur expression de CD63 à la surface des cellules par cytométrie en flux. Le résultat est représentatif des 3 expériences réalisées. L'expression est quantifiée en analysant la delta MFI. Test statistique utilisé: t test (Prism) (B) Après une pré-incubation avec les différentes drogues (comme en A) les BMMC (50.10%) ont été sensibilisés avec les IgE anti-DNP puis activés par l'allergène DNP-HSA (20 ng/ml) sur une durée de 15 min. Les cellules sont ensuite lysées et co-immunoprécipitées avec un anticorps anti-Rab27b et séparées par SDS-PAGE. La révélation se fait avec des anticorps anti-Kif5b, anti-Slp3 et anti-Rab27b. Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes. (C) Après une pré-incubation avec les différentes drogues (comme en A), les BMMC une fois adhérents aux lamelles coatées en fibronectine sont sensibilisés avec les IgE anti-DNP puis activés par l'allergène DNP-HSA (20 ng/ml) sur une durée de 10 min. Les cellules sont ensuite fixées, perméabilisées, marquées avec l'anticorps anti-tubuline et anti-STX3 puis analysées au microscope confocal. La barre d'échelle représente 2 μ m. Les résultats correspondent à la moyenne (+ SEM) de 2 expériences plus de 100 cellules ont été analysées par expérience sur des zones distinctes. Test statistique utilisé: t test (Prism).

En conclusion, ces résultats vont de paire avec les résultats déjà publiés par les autres équipes (Nishida 2005). En effet, la voie dépendante du calcium ne serait pas impliquée dans le mécanisme de translocation des granules de sécrétion. En présence de Bapta, on voit bien une translocation des granules en direction de la membrane plasmique et la formation du complexe Rab27b/Slp3/kinésine-1 responsable de ce transport. La voie PI3K, quand à elle, serait impliquée dans le mécanisme de translocation des granules de sécrétion. En effet, en présence de LY2940022, on observe un défaut dans le processus de transport des granules et le complexe Rab27b/Slp3/kinésine-1 n'est plus en mesure de se former.

7- Etude de la nécessité du réseau de microtubules dans la formation du complexe:

Une dernière question qui se pose est la nécessité l'intégrité du réseau de microtubules pour la mise en place du complexe Rab27b/Slp3/kinésine-1? Pour répondre à cette question, nous avons donc traité nos cellules avec le nocodazole, un agent dépolymérisant des microtubules. Tout d'abord comme attendu, en induisant la dépolymérisation des microtubules on induit un défaut de dégranulation des mastocytes (Nishida 2005). On passe de 50% de dégranulation à 9,43% en présence de nocodazole (**Figure 73A**) et ce résultat est confirmé par les expériences de microscopie confocale où l'on n'observe aucune translocation des granules de sécrétion en l'absence des microtubules (**Figure 73C**). Concernant la formation du complexe, on remarque par co-immunoprécipitation que la kinésine-1 est capable d'interagir avec Rab27b/Slp3 même quand le réseau de microtubules est altéré. La formation du complexe se ferait donc de manière indépendante par rapport au réseau de microtubules (**Figure 73B**).

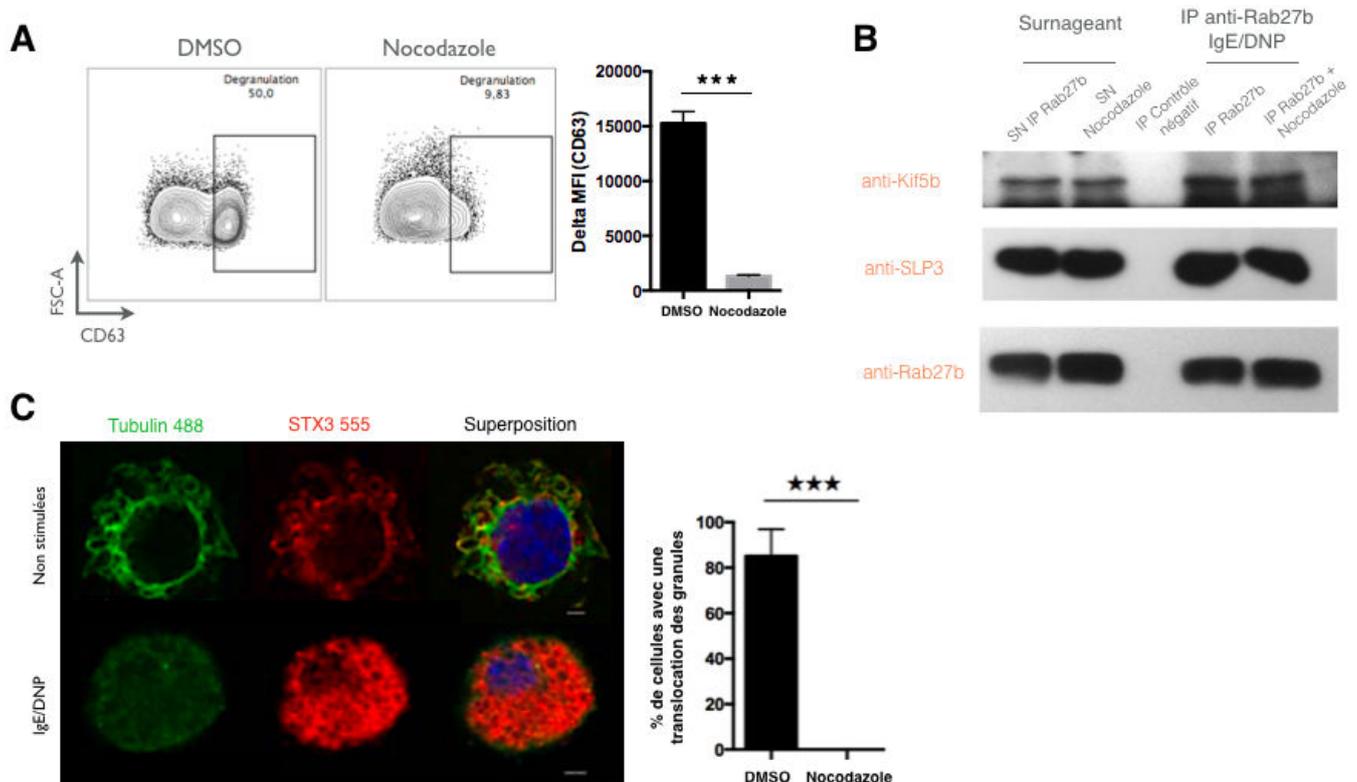


Figure 73: Analyse de l'implication du réseau de microtubules dans la formation du complexe Rab27/Slp3/kinésine-1. (A) Les BMMC sont incubées avec soit du DMSO (contrôle) ou du Nocodazole (20 μ M). Les BMMC sont ensuite sensibilisés avec les IgE anti-DNP puis stimulés avec l'allergène DNP-HSA (20ng/ml) durant 10 min. Une condition non stimulée est aussi réalisée. Après une fixation puis un marquage au CD63, les BMMC sont analysés pour leur expression de CD63 à la surface des cellules par cytométrie en flux. Le résultat est représentatif des 3 expériences réalisées. L'expression est quantifiée en analysant la delta MFI. Test statistique utilisé: t test (Prism) (B) Après une pré-incubation avec soit le DMSO soit le nocodazole, les BMMC (50.10⁶) ont été sensibilisés avec les IgE anti-DNP puis activés par l'allergène DNP-HSA (20 ng/ml) sur une durée de 15 min. Les cellules sont ensuite lysées et co-immunoprécipitées avec un anticorps anti-Rab27b et séparées par SDS-PAGE. La révélation se fait avec des anticorps anti-Kif5b, anti-Slp3 et anti-Rab27b. Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes. (C) Après une pré-incubation avec soit le DMSO soit le nocodazole, les BMMC une fois adhérents aux lamelles coatées en fibronectine sont sensibilisés avec les IgE anti-DNP puis activés par l'allergène DNP-HSA (20 ng/ml) sur une durée de 10 min. Les cellules sont ensuite fixées, perméabilisées, marquées avec l'anticorps anti-tubuline et anti-STX3 puis analysées au microscope confocal. La barre d'échelle représente 2 μ m. Les résultats correspondent à la moyenne (+ SEM) de 2 expériences plus de 100 cellules ont été analysées par expérience sur des zones distinctes. Test statistique utilisé: t test (Prism).

8- Conclusion: modèle proposé

A l'état basal, la protéine Rab27b associée à Slp3 serait présente au niveau des granules de sécrétion et la kinésine-1 serait localisée au niveau du réseau de microtubules mais sous une conformation inactive. Le mastocyte une fois activé *via* son récepteur FcεRI déclencherait la voie PI3K qui permettrait l'activation de la kinésine-1. La kinésine-1 passerait alors d'une conformation compacte, où les chaînes légères sont coincées entre les domaines moteurs, à une conformation linéaire active. La kinésine-1 serait alors en mesure d'interagir avec le complexe Rab27b/Slp3 et pourrait ainsi permettre la translocation des granules de sécrétion en direction de la membrane plasmique.

Les granules, une fois proche de la membrane plasmique, seraient alors finalement pris en charge par d'autres complexes moléculaires spécialisés, eux, dans la fusion et le relargage des granules vers le milieu extérieur (Vu dans l'introduction) (Figure 74).

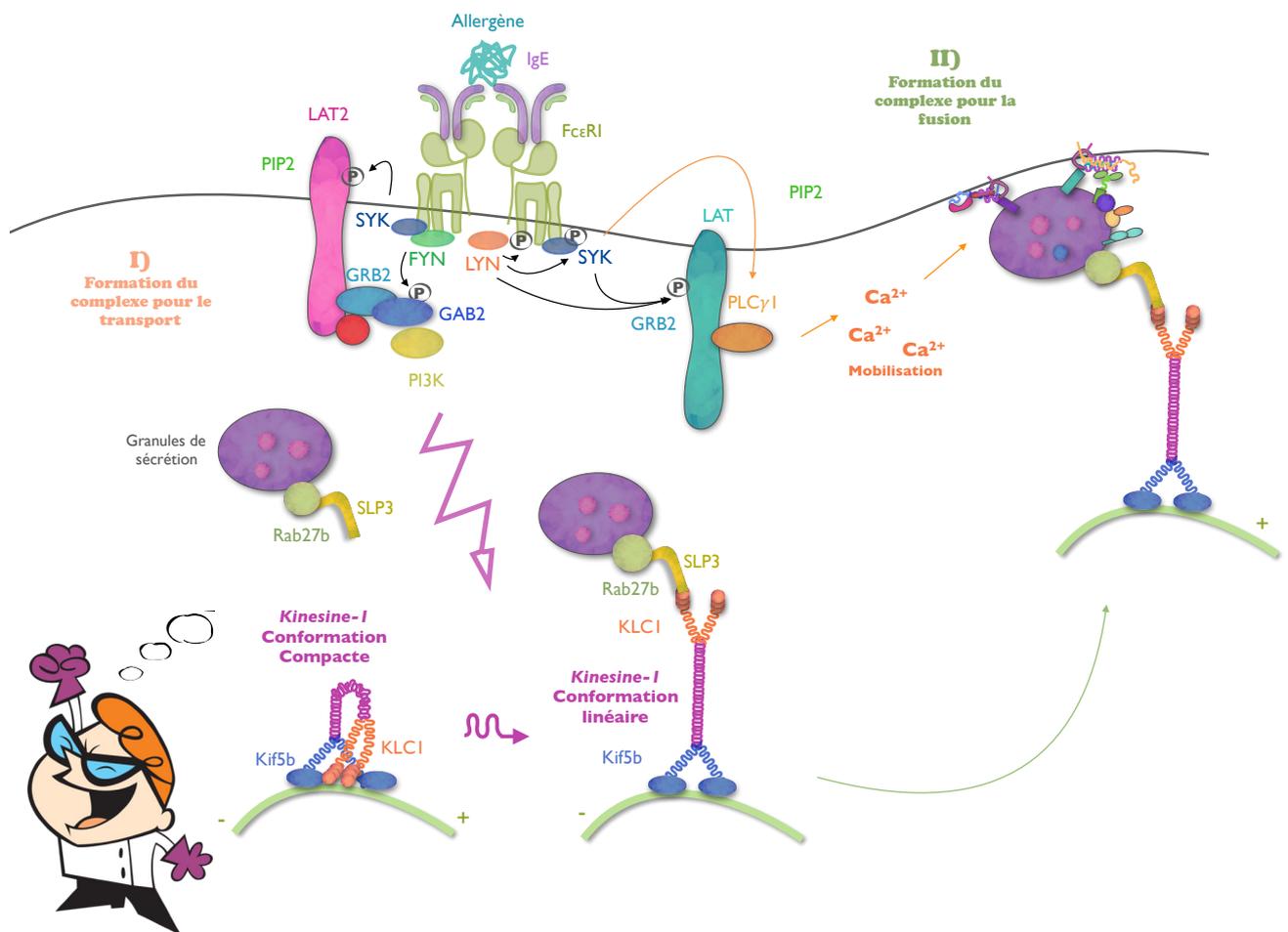


Figure 74: Modèle proposé

Discussion

Lymphocytes T cytotoxiques

Contrairement au défaut de sécrétion des granules lytiques observé chez les LTc humains *in vitro*, notre modèle déficient pour la chaîne lourde de la kinésine-1 Kif5b est capable de relarguer ses granules cytotoxiques. Deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer l'absence de défaut de sécrétion des granules lytiques dans les LTc de la souris cKO^{Kif5b}:

1- Compensation par d'autres kinésines:

Les différences observées entre l'homme et la souris pourraient être le fait de phénomènes de compensation par d'autres kinésines. En effet, chez l'homme les compensations n'ont peut-être pas le temps de se mettre en place lors des expériences de siRNA, alors que chez les souris inactivées constitutivement des phénomènes de compensation pourraient avoir lieu.

On peut imaginer que les granules soient pris en charge par une ou plusieurs kinésines, autres que la kinésine-1, qui n'interagiraient pas seulement avec le granule lytique en recrutant Rab27a pour le transporter mais pourraient aussi interagir avec d'autres molécules comme d'autres Rab. Ces phénomènes de compensation sont très fréquents dans les modèles murins constitutivement inactivés, surtout si les protéines visées possèdent d'autres isoformes capables de prendre le relais. Dans notre cas, il ne s'agirait pas des autres isoformes de la kinésine-1, Kif5a et Kif5b, car ces derniers ne sont pas surexprimés (résultats de qRT-PCR). Mais il s'agirait sûrement d'une autre kinésine capable de prendre en charge les compartiments endosomaux.

Les autres kinésines exprimées au niveau des LTc:

Voici ci-dessous (**Figure 75**) un graphe réalisé à partir d'une étude de protéomique mise en ligne en 2016 et menée par Hukelmann et ses collègues sur les LTc (Hukelmann 2016).

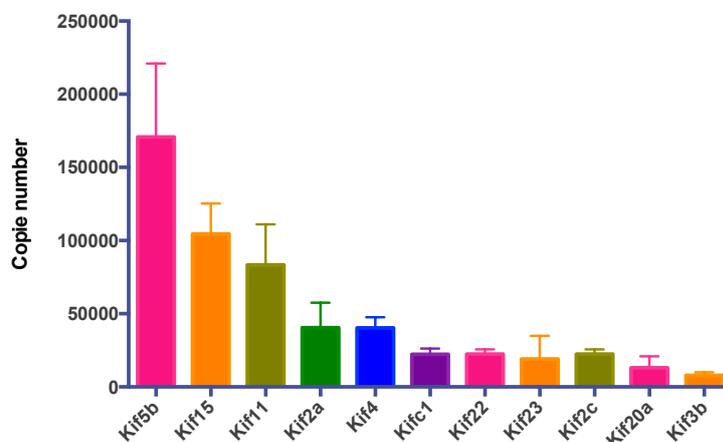


Figure 75: Expression des différentes kinésines au sein des LTc (Graphe réalisé à partir de l'étude de Hukelmann 2016)

On se rend alors compte que la kinésine-1 est bien l'isoforme majoritairement exprimée dans les LTc mais que d'autres kinésines sont clairement bien présentes. Les compensations sont donc envisageables soit directement ou après surexpression des autres kinésines.

Les différents rôles assurés par les autres kinésines présentes dans les LTc:

Voici quelques exemples de fonctions assurées par ces kinésines au niveau du trafic endosomal et lysosomal.

Kif15 possède des fonctions redondantes avec **Kif11** (aussi appelée Eg-5): elles sont notamment importantes pour les événements de mitose en permettant la séparation des centrosomes (Tanenbaum 2009). Mais ces kinésines peuvent aussi être impliquées dans le trafic endosomal. En effet Kif11 est capable de transporter des vésicules de sécrétion issues du réseau trans-golgien vers la membrane plasmique (transport de CARTS) (Wanaka 2013). Kif15, elle, est impliquée dans le transport endosomal des molécules Dab2 de la région périnucléaire vers la membrane plasmique (Eskova 2014).

Kif2a et Kif2c La kinésine Kif2 peut redistribuer les lysosomes en direction de la périphérie *via* Arl8 tout comme la kinésine-1 (Korolchuk 2011).

Kif4: elle est impliquée dans le transport antérograde des organites qui contiennent la protéine L1 (une molécule d'adhésion importante pour l'élongation des neurones). Kif4 est donc nécessaire au développement neuronal tout comme la kinésine-1 (Peretti 2000).

KifC1: Cette kinésine ne pourrait pas réaliser le transport des granules lytiques en direction de la synapse car elle fait partie de la famille des kinésines-14 qui s'occupent des transports rétrogrades des vésicules (vers l'extrémité -). Ainsi il a été démontré que KifC1 et Kif5b pouvaient interagir et réguler la motilité et la fission des endosomes précoces. KifC1 s'occuperait des mouvements rétrogrades et Kif5b des mouvements antérogrades (Nath 2007).

Kif20a: appelée MKLP2 est une kinésine qui colocalise avec les chromosomes mitotiques et qui peut se lier à l'ADN. Elle est importante pour le mouvement des chromosomes lors de la mitose (Kitagawa 2014). Mais cette kinésine mitotique a aussi été impliquée dans le transport de vésicules en interagissant avec Rab6 (transport rétrograde du Golgi au RE) (Majeed 2014). Néanmoins, tout comme KifC1, elle s'occupe des transports rétrogrades des vésicules et non antérogrades. Elle ne pourrait donc pas être impliquée dans le transport terminal des granules lytiques en direction de la synapse.

Kif3b: Kif3b, tout comme la kinésine-1, est capable de transporter la molécule MT1-MMP (matrix metalloproteinase) contenue dans des vésicules dérivées du golgi vers la périphérie des cellules (macrophages) (Wiesner 2010).

Pour finir on retrouve des kinésines mitotiques qui n'ont pas encore d'implication dans le trafic endosomal: **Kif22 et Kif23**.

Ainsi ces kinésines sont aussi capables d'interagir avec les mêmes compartiments que la kinésine-1 et parfois à l'aide des mêmes adaptateurs (Exemple Arl8). Une certaine redondance est observée dans ces différents transports. On voit ainsi que Kif3b et la kinésine-1 peuvent transporter la molécule MT1-MMP mais aussi que Kif2 et la kinésine-1 sont capables de transporter les lysosomes en direction de la périphérie. Ainsi des phénomènes de compensation pourraient être envisageables.

2- Problèmes expérimentaux: stimulation et durée

Une stimulation inappropriée:

La stimulation des LTc par les anticorps CD3 et CD28 est une stimulation très forte, peu physiologique, qui peut compenser les possibles défauts de dégranulation des LTc déficients en Kif5b. En effet, de telles compensations ont déjà été observées. Par exemple, les LTc déficient pour la synaptotagmine-7 ont des défauts de cytotoxicité quand ils sont stimulés *via* un antigène mais n'ont pas de défaut de cytotoxicité quand ils sont stimulés avec un anti-CD3 (Fowler 2007). Ainsi sachant qu'il existe en plus des compensations possibles par les autres kinésines, les défauts peut être partiels induits par l'absence de kinésine-1 pourraient alors être « by-passés » par une stimulation non physiologique.

L'importance de la force du signal induit par le TCR dans le transport des granules lytiques a déjà été démontrée. En effet, plusieurs études démontrent que l'intensité du signal induit par le TCR conduit à des voies de trafic des granules lytiques différentes. Un signal fort conduirait à une polarisation des granules au niveau du centrosome puis à une polarisation du MTOC en direction de la synapse, les granules seraient alors directement adressés au cSMAC (voie rapide). Alors qu'un signal faible serait capable d'induire la polarisation du MTOC mais incapable d'induire le recrutement des granules au niveau du centrosome. Les granules seraient en fait recrutés au niveau du pSMAC (détour) puis rejoindraient la zone de sécrétion (cSMAC) probablement par l'intermédiaire du réseau de microtubules à l'aide de moteurs moléculaires (voie longue)(Beal 2009). Dans nos conditions on peut donc imaginer que la force du signal est telle que les granules sont directement adressés au niveau du cSMAC grâce à la polarisation du MTOC et qu'il n'y aurait pas besoin d'un transport par les moteurs moléculaires comme la kinésine. Cette explication rejoindrait la théorie émise par Stinchcombe et ses collègues en 2001 (Stinchcombe 2001).

Différences observées entre l'expérience de TIRF et de cytométrie:

Néanmoins le comportement des granules, observé en microscopie TIRF au niveau de la synapse immunologique, est différent entre la souris contrôle et cKO^{Kif5b}. De plus, les modifications de comportement observées en l'absence de Kif5b sont les mêmes que dans la souris déficiente pour Rab27a. En effet, dans les LTc de ces deux souris les granules se déplacent plus rapidement,

parcourent de plus longues distances et restent plus longtemps au niveau de la synapse. D'une manière générale leur comportement semble moins organisé et plus aléatoire.

Les granules ne sont pas sécrétés dans l'expérience de TIRF: Le comportement des granules est l'élément qui nous fait dire que ces derniers ne sont pas sécrétés dans les conditions déficientes en kinésine-1 et Rab27a. En effet, une étude a pu étudier le comportement des granules lytiques à la synapse avant et après sécrétion. Cette étude a pu conclure que les granules lytiques qui allaient être sécrétés effectuaient des mouvements aléatoires, très dynamiques pour sonder toute la zone de sécrétion alors que ceux qui ont été sécrétés ont une vitesse diminuée et des déplacements réduits (Mace 2012). Ainsi dans les conditions déficientes en kinésine-1 et en Rab27a les granules ne seraient pas sécrétés et continueraient de sonder la zone de sécrétion en effectuant des mouvements désorganisés prolongés et rapides.

Maintenant comment expliquer qu'un défaut de comportement des granules lytiques est ici observé alors que la sécrétion semblait normale en cytométrie?

Première hypothèse: On pourrait expliquer ces différences par la durée durant laquelle ces expériences ont été réalisées, ainsi les sécrétions observées ne seraient peut être pas les mêmes. En effet l'expérience de TIRF est réalisée durant 5 min alors que la sécrétion des granules lytiques est analysée durant 30min voir plusieurs heures après l'induction du signal. Dans le cas de l'expérience TIRF, on peut imaginer que la sécrétion que l'on voit est celle qui précède la polarisation du MTOC que certaines équipes ont pu décrire (Bertrand 2013). En effet, dans l'article de Ritter 2015, il a été décrit que le MTOC prenait 6 min pour rejoindre la synapse (Ritter 2015). Ainsi dans l'expérience TIRF nous serions peut être en train d'analyser ces premiers évènements de sécrétion indépendants du MTOC et qui pourraient être seulement dépendants des moteurs moléculaires par exemple de type kinésine, ce qui expliquerait ces défauts de sécrétion. Ensuite quand on attend plus longtemps (comme pour la cytométrie) le MTOC serait alors polarisé et les granules seraient sécrétés cette fois-ci indépendamment de la kinésine compte-tenu du signal très fort délivré aux cellules (théorie de Stinchombe et de l'influence de la force du signal vue précédemment).

Deuxième hypothèse: Si on admet qu'une autre kinésine est capable de prendre le relais de la kinésine-1 on peut alors imaginer que ces kinésines ne soient pas aussi efficaces et donc induisent des variations dans le comportement des granules lytiques. Néanmoins ces variations n'empêcheraient pas la sécrétion des granules lytiques sur des temps longs (expérience de cytométrie). A noter que la kinésine-1 a aussi été impliquée dans les transport des SNARE au niveau de la synapse. En effet, la kinésine-1 est capable de se lier à SNAP-23 et SNAP-25 et permet leur recrutement en périphérie (Diefenbach 2002; Morton 2010). On peut donc imaginer que les autres kinésines auraient aussi besoin de compenser l'apport de ces SNARE avant de

permettre une possible dégranulation (ce qui expliquerait des défauts précoces de dégranulation dans l'expérience TIRF).

3- Infection par le LCMV

Pou finir on peut se demander si cette sécrétion altérée, peut être seulement précocement, pourrait conduire à la clairance d'un agent pathogène?

Un premier test d'infection au LCMV (Lymphocytic choriomeningitis) a donc été réalisé pour analyser l'efficacité de la cytotoxicité des LTc face à un agent pathogène et ainsi évaluer si le changement de comportement des granules lytiques observé affecte réellement leur fonctionnalité. En effet, si les granules ne sont pas polarisés et sécrétés spécifiquement au niveau de la synapse immunologique, un défaut de cytotoxicité peut apparaître et ainsi être une des causes de la susceptibilité aux infections suspectée. Pour tester cette hypothèse, nous avons infecté des souris contrôles et déficientes pour la kinésine-1 avec le virus LCMV et suivi la réponse immunitaire engendré ainsi que l'évolution du virus au sein de ces souris. Le virus LCMV est un virus où la composante LT CD8+ est primordiale. En effet, un défaut de cytotoxicité des LTc lors d'une infection par le LCMV conduit à l'apparition d'un HLH (Hemophagocytic lymphohistiocytosis).

Nous avons ainsi pu constater que les souris cKO^{Kif5b} ne développent pas de HLH après une infection par le LCMV. Les paramètres sanguins (figure 76B), le poids et la taille des organes (Figure 76C) sont normaux. Le suivi de la température et du poids des souris ne révèle aussi

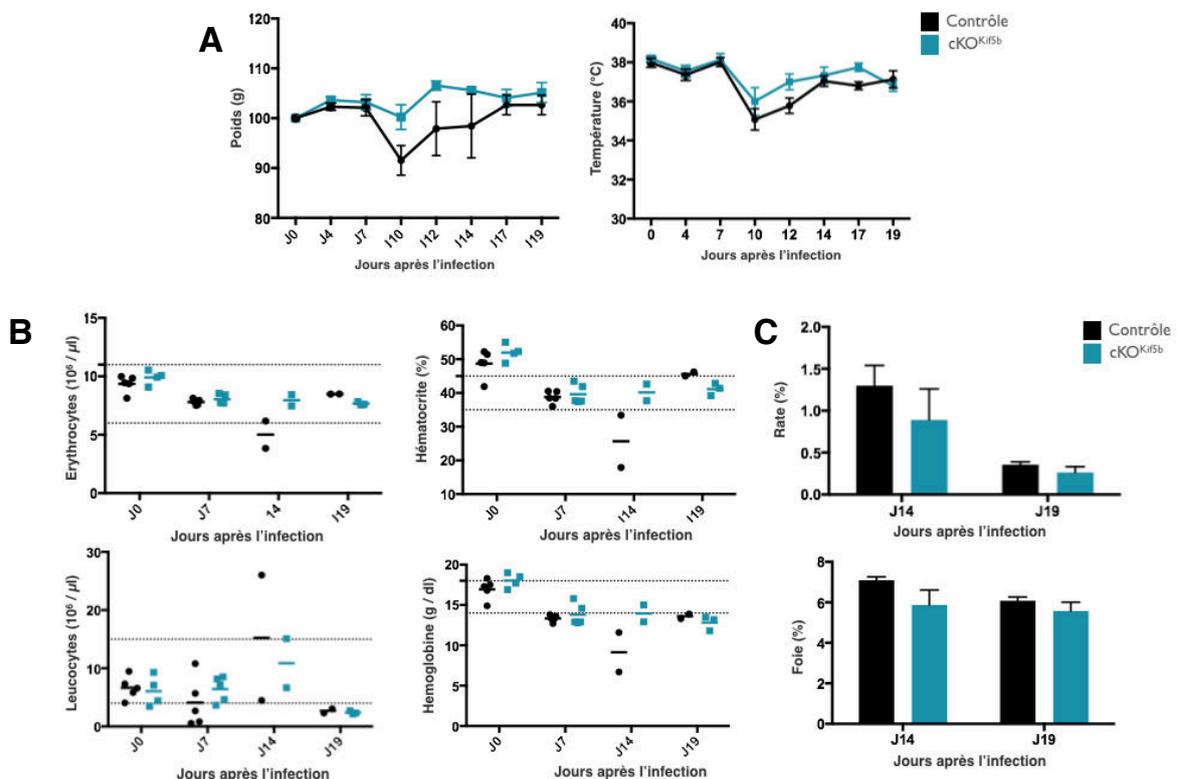


Figure 76: Analyse des paramètres cliniques et biochimiques des souris contrôles et cKO^{Kif5b} après une infection par le LCMV. (A) Suivi du poids et de la température des souris. (B) Analyse des paramètres sanguins (Erythrocytes, Hématocrite, Leucocytes, Hémoglobines) des souris à J0, J7, J14 et J19. (C) Taille de la rate et du foie exprimée en fonction du poids total de la souris. L'expérience a été réalisée une fois sur des groupes de 5 souris contrôles et cKO^{Kif5b}.

aucune différence de réponse face au virus entre les souris contrôles et cKO^{Kif5b} (Au contraire les souris cKO^{Kif5b} ont l'air de mieux s'en sortir) (**figure 76A**).

De plus la quantité de virus présente dans le foie et la rate ainsi que la quantité d'IFN- γ sécrétée par les cellules immunitaires pour neutraliser l'infection sont équivalentes entre les souris contrôles et cKO^{Kif5b} (**Figure 77A et B**).

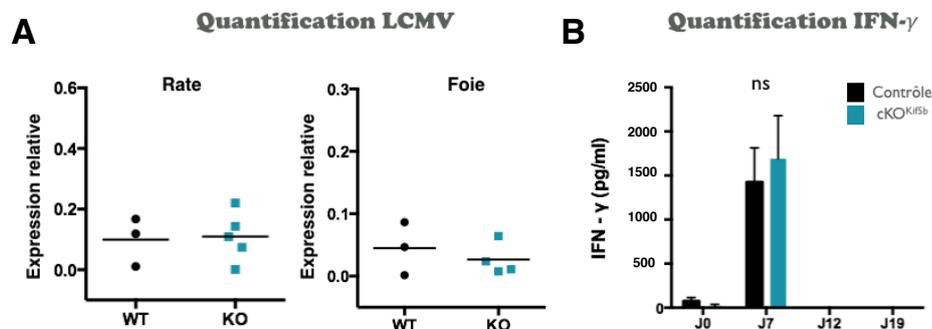


Figure 77: Analyse de la quantité de virus et de la sécrétion d'IFN- γ dans les souris contrôles et cKO^{Kif5b} après une infection par le LCMV. (A) 18 jours après l'infection le LCMV est titré par qRT-PCR dans la rate et le foie des souris contrôles et cKO^{Kif5b}. L'expression de chaque gène a été normalisée en utilisant comme valeur de référence l'expression de l'actine. (B) Analyse de la sécrétion d'IFN- γ à J0, J7, J12 et J19 dans le serum des souris par ELISA. L'expérience a été réalisée une fois sur des groupes de 5 souris contrôles et cKO^{Kif5b}.

Enfin, quand on évalue de manière générale le nombre de cellules immunitaires et leur état d'activation à J19 au niveau du foie, on constate que la réponse immunitaire mise en place face au virus LCMV est quasi identique entre les souris contrôles et cKO^{Kif5b}. On observe l'augmentation des LT CD8+ qui sont de phénotype activé mais aussi la diminution des cellules présentatrices (LB, DC) ou des macrophages. Pour finir les LT CD4+ ne voient pas leur nombre varier au cours de l'infection (**Figure 78**).

En conclusion, il semblerait donc que les LTc soient effectifs dans les souris déficientes en kinésine-1 et arrivent à gérer une infection au LCMV comme le ferait une souris contrôle. Cette expérience reste néanmoins à être répétée plusieurs fois pour s'assurer de la véracité de ces résultats.

On peut donc pour le moment conclure que des défauts précoces de comportement des granules lytiques sont observés en l'absence de kinésine-1 mais que, néanmoins, ces LTc arrivent à sécréter leurs granules lytiques et à contrôler une infection de type LCMV. Les différences observées entre l'homme et la souris nous conduisent à penser que soit chez la souris la sécrétion des granules lytiques serait indépendante de l'action des kinésines (MTOC?) ou qu'il existerait des mécanismes de compensation efficaces réalisés par d'autres kinésines.

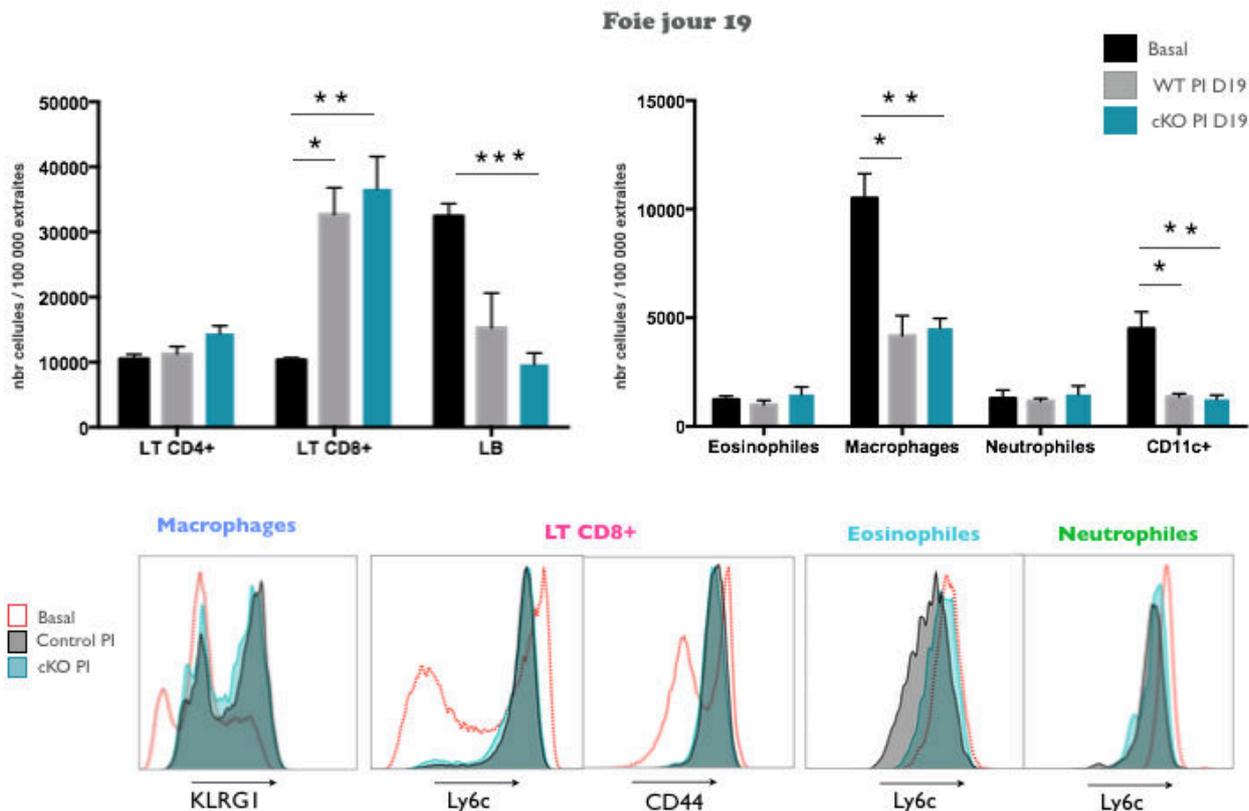


Figure 78: Analyse par cytométrie en flux des différentes populations immunitaires dans la souris contrôle et cKO^{Kif5b} au niveau du foie après une infection par le LCMV (J19). Le nombre de neutrophiles, eosinophiles, macrophages, cellules dendritiques et lymphocytes ont été quantifiés par cytométrie en flux. Les stratégies de gating sont les suivantes: les LT sont CD19- CD3+ CD8+ ou CD4+ / les lymphocytes B sont CD19+ B220+ / les cellules dendritiques sont CD19- CD11c+ CMHII+ / les macrophages sont CD19- CD11b+ SSC-A low Ly6g- / les eosinophiles sont CD19- CD11b+ SSC-A high Ly6g- / les neutrophiles sont CD19- CD11b+ SSC-A int Ly6g+ . Les marqueurs d'activation Ly6C, KLRG1, CD44, Ly6c ont aussi été regardés dans ces populations immunitaires.

Perspectives

Afin d'éclaircir ces différentes interrogations plusieurs expériences pourraient être effectuées:

L'expérience d'infection au LCMV nous amène à penser que même une activation physiologique avec un antigène conduit à une dégranulation normale des LTc. Mais pour s'assurer que les conditions d'activation ne « by-pass » pas les défauts, des expériences de dégranulation avec des souris OT1 déficientes en kinésine-1 pourraient être envisagées.

Pour détecter une possible compensation par d'autres kinésines on pourrait par exemple effectuer de la spectrométrie de masse sur des lysats de LTc contrôles et déficients en kinésine-1 pour analyser l'expression des différentes kinésines exprimées dans ces cellules. De possibles surexpressions pourraient alors être détectées puis, par siRNA, on pourrait venir inactiver ces kinésines compensatoires.

Pour compléter l'expérience de TIRF, on pourrait analyser la dynamique du réseau de microtubule en même temps que celle des granules et sur des temps plus longs. Si un jour un anticorps ou une construction le permet nous pourrions aussi analyser la localisation de la kinésine-1 lors de ces événements.

Mastocytes

1- Comparaison des résultats entre les LTc et les mastocytes

Nous avons constaté que l'absence de kinésine-1 ne conduisait pas à un défaut de dégranulation dans les LTc mais affectait bien la dégranulation mastocytaire. Comment expliquer ces différences? On peut imaginer que dans les mastocytes le phénomène de compensation par les autres kinésines soit moins prononcé. En effet, quand on regarde les kinésines exprimées dans les mastocytes comparé au lymphocytes (résultat de la spectrométrie de masse qui sera abordée dans la suite de cette introduction), on observe certaines variations. Tout d'abord la kinésine-1 est bien la kinésine la plus exprimée dans les deux types cellulaires. Néanmoins quand on évalue les autres types de kinésines on remarque que les lymphocytes possèdent une plus grande variété de kinésines et que ces dernières ont l'air d'être plus fortement exprimées au niveau des lymphocytes. Par exemple les kinésines Kif15 et Kif11 sont fortement exprimées dans les lymphocytes alors qu'elles semblent absentes des mastocytes. Les kinésines Kif4 et Kif2c sont aussi exprimées dans les lymphocytes et absentes des mastocytes. Ainsi on peut imaginer que les mécanismes de compensations (par exemple par Kif15 ou Kif2a) seraient moins importants dans les mastocytes, ce qui permettrait la détection de défauts de dégranulation dans ce type cellulaire (Figure 79).

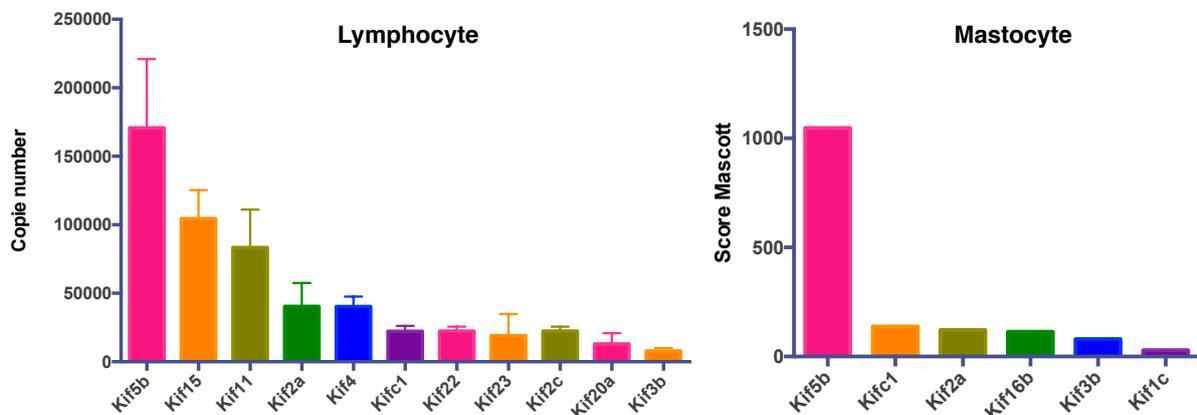


Figure 79: Expression des différentes kinésines au sein des LTc (Graphe réalisé à partir de l'étude de Hukelmann 2016) et des mastocytes (Spectrométrie de masse).

2- Défaut non total : les autres mécanismes de dégranulation

Nous avons en effet constaté un défaut de sécrétion des granules mastocytaire avec un délai de la réponse mais aussi moins de granules sécrétés. **Comment expliquer la sécrétion résiduelle de la dégranulation mastocytaire en l'absence de kinésine-1?**

Première hypothèse: La présence d'une dégranulation résiduelle pourrait être la conséquence des autres mécanismes de sécrétion. En effet nous avons vu que dans les mastocytes il existait différents types de sécrétion comme la « compound exocytose », la

« piecemeal exocytose » et la « kiss-and-run exocytose ». Ainsi, de la compound exocytose pourrait se réaliser en l'absence de kinésine-1 car elle ne nécessiterait pas de mécanisme de transport. En effet l'exocytose des granules proches de la membrane se ferait sans transport mais par des réactions de fusion en chaîne. **Deuxième hypothèse:** Une autre kinésine pourrait venir compenser en partie l'absence de la kinésine-1 et induire cette sécrétion résiduelle. Néanmoins elle ne serait pas capable de compenser totalement son absence comme ce que l'on imagine dans les LTc.

Comment expliquer le délai de la dégranulation mastocytaire en l'absence de kinésine-1?

On observe un délai dans le mécanisme de dégranulation par microscopie vidéo TIRF. Ainsi les granules déjà proches de la membrane plasmique qui pourraient potentiellement directement fusionner avec la membrane plasmique sans transport ne fusionnent pas tout de suite avec cette dernière. **Première hypothèse:** Si on imagine que la sécrétion résiduelle n'est due qu'à une compensation par une autre kinésine, on peut alors imaginer que cette kinésine ne serait pas aussi efficace et rapide ce qui conduirait à un délai dans la réponse. **Deuxième hypothèse:** comme la kinésine-1 est importante pour le recrutement des SNARE, alors peut-être que les SNARE ne sont pas présentes en quantité suffisante ce qui perturberait les mécanismes de fusion et d'exocytose des granules qui sont proches de la membrane. En effet, la kinésine-1 est capable de se lier à SNAP-23 et SNAP-25 et permet leur recrutement en périphérie (Diefenback 2002)(Morton 2010).

3- La régulation de l'activité de la kinésine-1

Nous avons vu que le complexe Rab27b/Slp3/kinésine-1 ne se formait qu'après activation des mastocytes par le récepteur FcεRI. Nous avons alors supposé que cette activation était nécessaire au passage de la kinésine-1 d'une forme inactive à une forme active qui peut alors lier ses cargos. On peut alors se demander comment l'activité de la kinésine-1 est régulée?

Régulation de l'activité de la kinésine-1:

Une conformation active et inactive: Pour éviter une hydrolyse inutile de l'ATP, la kinésine-1 est maintenue dans le cytoplasme sous une forme inactive où l'activité ATPasique est non fonctionnelle (Coy 1999). La conformation de la kinésine-1 est alors une conformation compacte où les chaînes légères se retrouvent entre les domaines moteurs et ainsi les séparent (**Figure 80**). Les deux régions qui sont impliquées dans l'inhibition de la kinésine-1 sont les régions IAK (région constituée d'une alanine, isoleucine et lysine) de la chaîne lourde et la région TPR de la chaîne légère qui interagissent ensemble. Cette conformation compacte empêche

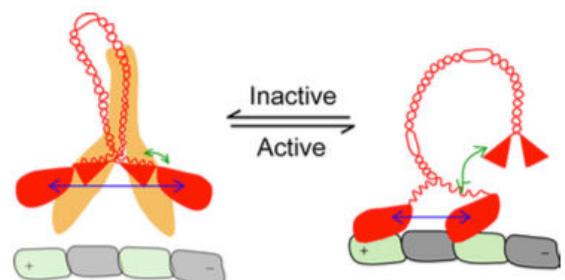


Figure 80: Conformation inactive et active de la kinésine-1 (Cai 2007)

alors l'interaction des domaines moteurs avec les microtubules et l'échange d'ADP en ATP (Hackney 2008; Cai 2007; Dietrich 2008).

L'auto-inhibition de la kinésine-1 peut s'arrêter quand des cargos se fixent à cette kinésine: Les domaines IAK et TPR impliqués dans l'inhibition de l'activité de la kinésine-1 sont aussi impliqués dans le recrutement de cargos. Ainsi une étude de 2007 a pu démontrer que quand FEZ1 (fasciculation and elongation protein zeta 1) se liait à KHC et que JIP1 (c-Jun N-terminal kinase-interacting protein 1) se fixait à KLC alors la kinésine-1 pouvait se lier aux microtubules et retrouver son activité ATPasique. Ces protéines, en se liant à la kinésine-1, coopèrent ainsi pour activer la kinésine-1 (Blasius 2007). Ainsi, la fixation des protéines cargos pourrait être un mécanisme général de régulation de l'activité des moteurs moléculaires.

Les mécanismes de phosphorylation et déphosphorylation: Les phosphorylations et déphosphorylations de la kinésine-1 peuvent aussi avoir un rôle dans la régulation de son activité. En effet une étude de 2013 démontre par exemple que la phosphorylation du domaine moteur par la kinase JNK3 sur la sérine 175 de Kif5 permet l'inactivation de l'activité motrice de la kinésine-1 et la stabilisation de la conformation inactive (DeBerg 2013). La chaîne légère de la kinésine-1 peut aussi être phosphorylée par exemple par GSK3 (Glycogen synthase kinase 3) ce qui conduit à l'inhibition des transports antérogrades en provoquant le détachement des cargos (Morfini 2002).

Spectrométrie de masse sur la kinésine-1:

Il serait donc intéressant d'étudier plus précisément les mécanismes qui régulent l'activité de cette kinésine afin de pouvoir trouver de nouvelles cibles thérapeutiques comme les kinases et phosphatases impliquées dans ces mécanismes. Nous essayons donc au laboratoire de réaliser de la spectrométrie de masse sur des lysats de BMMC, activés ou non activés, co-immunoprécipités avec un anticorps anti-Kif5b. Ceci nous permettrait d'une part d'identifier les phosphorylations/déphosphorylations de la kinésine-1 en découpant directement la bande correspondante à la kinésine-1 (**Figure 81**) ou alors d'identifier les interactants de la kinésine-1 en réalisant une low migration sur quelques mm.

Néanmoins après deux essais et même après optimisation de la technique nous ne sommes pas en mesure de détecter les interactants de la kinésine-1 en endogène. En effet nous arrivons à co-immunoprécipiter Kif5b et donc à la détecter mais les interactants ne dépassent pas les seuils de détection. Ainsi il semblerait qu'en endogène même sur 100 millions de cellules nous n'arrivons pas à co-immunoprécipiter une quantité suffisante d'interactant. Concernant les phosphorylations/déphosphorylations de la kinésine-1 nous n'avons été capables de détecter qu'une déphosphorylation encore inconnue de la chaîne lourde de la kinésine-1. En endogène la détection des interactants et des phosphorylations semble compliquée. Il faudrait donc envisager par la suite un système de surexpression afin d'augmenter la quantité de kinésine-1 présente dans les cellules même si bien-entendu nous serons dans des conditions moins physiologiques.

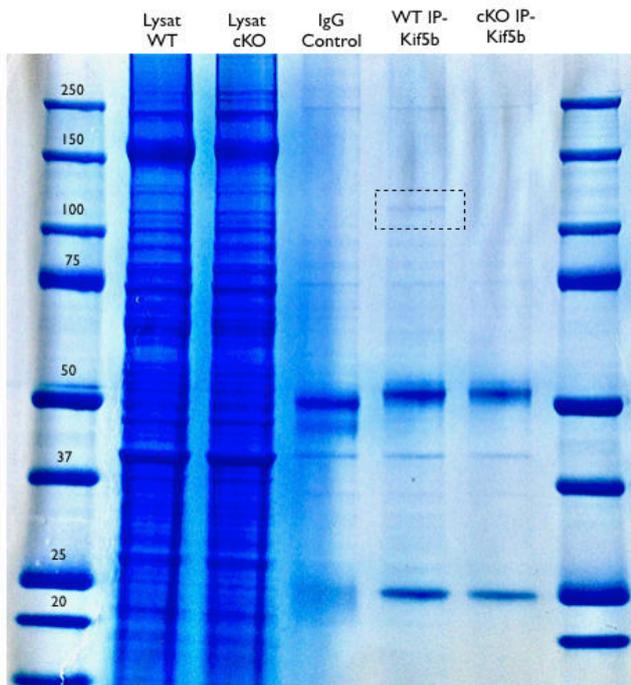


Figure 81: Migration et coloration au bleu de colloïdale des lysats de BMMC contrôles et cKO^{Kif5B} co-immunoprécipités avec un anticorps anti-Kif5b. Une condition avec les IgG contrôles et aussi réalisée. La bande encadrée correspond à Kif5b et c'est cette bande qui a été découpée pour l'analyse des phosphorylations/déphosphorylations.

4- Spectrométrie de masse: Détection de nouveaux acteurs impliqués dans la sécrétion des cytokines et granules de sécrétion

Concernant les perspectives de ce projet, nous avons réalisé une spectrométrie de masse sur un lysat total de BMMC contrôle dans le but d'identifier de nouvelles protéines impliquées dans la sécrétion des granules mastocytaires ou dans la sécrétion des cytokines (Figure 82).

Sélection des protéines d'intérêt:

Cette spectrométrie de masse nous a permis d'identifier 3877 protéines exprimées dans les BMMC. Nous avons ensuite trié ces protéines grâce à différentes plateformes comme Gene Ontology, DAVID, Uniprot. Nous avons ainsi pu identifier 570 protéines impliquées dans le trafic

et dans la signalisation mastocytaire. Après une bibliographie réalisée sur Pubmed nous avons décidé de sélectionner 53 protéines qui n'avaient pas encore été étudiées dans les mastocytes et qui nous semblaient pertinentes. Ainsi, parmi ces 53 protéines, 32 sont impliquées dans le trafic, 14 dans la réorganisation du réseau d'actine, 2 dans la réorganisation des microtubules et 5 dans la signalisation.

Méthode utilisée pour le screening :

Nous avons décidé d'effectuer le screening de ces 53 protéines à l'aide de siRNA. Pour cela 3 siRNA seront testés par gène. Dans un premier temps nous réaliserons des qRT-PCR afin de valider l'efficacité de ces siRNA puis nous passerons aux tests fonctionnels. Nous analyserons la dégranulation, la sécrétion des cytokines et l'activation des mastocytes par cytométrie. Pour la dégranulation nous quantifierons l'expression de CD63 à la surface des cellules, pour la sécrétion des cytokines se sera la quantité d'IL-6 intracellulaire qui sera mesurée et pour l'activation nous analyserons le niveau de phosphorylation d'AKT. Nous espérons ainsi pouvoir mettre en évidence de nouvelles protéines impliquées dans le mécanisme de sécrétion des granules et cytokines mastocytaires.

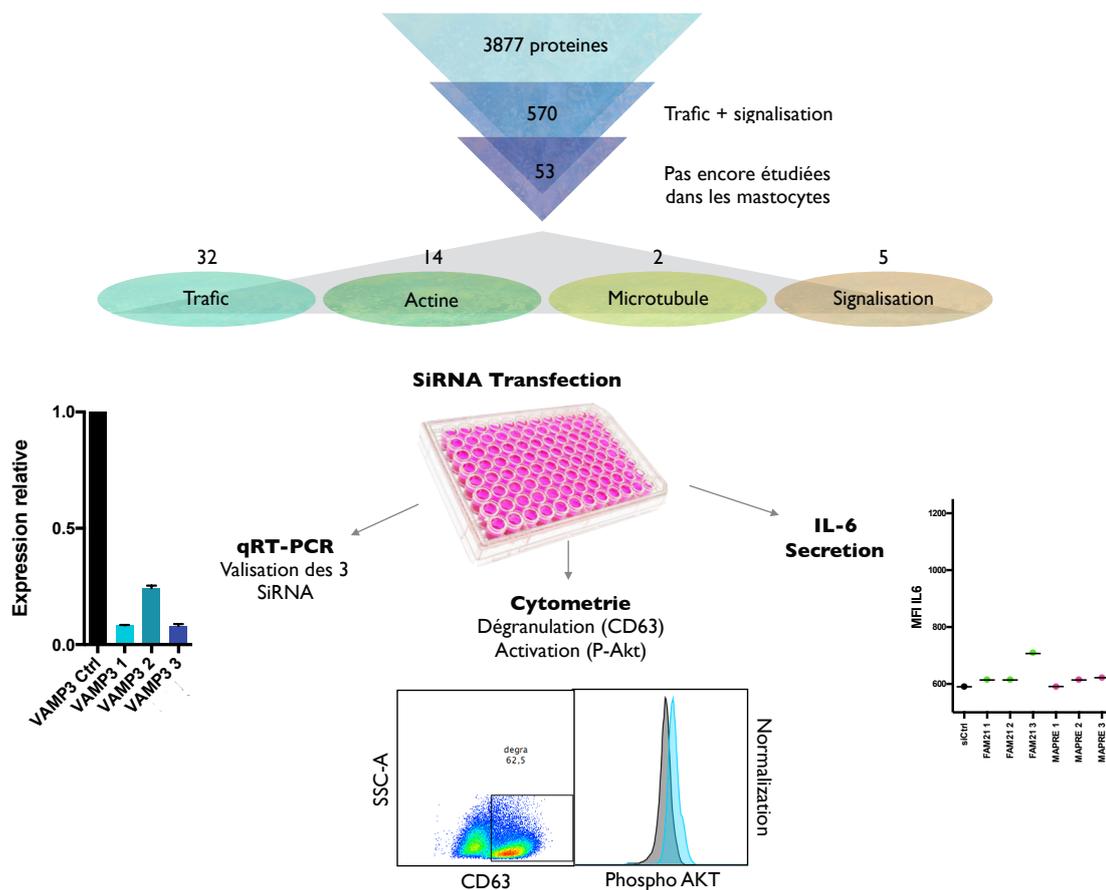


Figure 82: Schéma récapitulatif des différentes étapes du screening.

5- Implication du complexe Rab27/Slp4/kinésine-1 dans la sécrétion des plaquettes

En parallèle de l'étude que j'ai pu menée dans les LTc et mastocytes, j'ai aussi pu participer à un autre projet lancé par notre équipe en collaboration avec Frédéric Adam qui fait partie de l'équipe U1176 Hémostase/Inflammation/Thrombose située au Kremlin Bicêtre. Ce projet s'intéressait à l'implication de la kinésine-1 dans le mécanisme de sécrétion des plaquettes et a fait l'objet d'un manuscrit qui est actuellement en cours de soumission. Au cours de cette étude nous avons pu démontrer que la kinésine-1 était nécessaire à la sécrétion des granules denses et α au sein des plaquettes. En effet, l'absence de kinésine-1 conduit à un défaut d'agrégation plaquettaire, à une hémostase instable et à une instabilité du thrombus. Pour finir nous avons pu caractériser le complexe moléculaire impliqué dans ce processus. En effet, la kinésine-1 est capable de se lier à Rab27b par l'intermédiaire de la molécule adaptatrice Slp4 et la formation de ce complexe serait indépendante du signal d'activation plaquettaire.

Cette étude sur les mécanismes de sécrétion plaquettaires nous démontre encore une fois que les mécanismes de sécrétion des LRO sont des processus conservés qui font intervenir une machinerie de sécrétion commune. Ainsi la kinésine-1 pourrait être un bon candidat « au poste » de moteur moléculaire nécessaire à leur transport par le biais de son interaction avec la GTPase Rab27 *via* les molécules Slp ou d'autres protéines adaptatrices.

Matériel et méthodes

Chapitre I:

A- Phénotypage:

Après prélèvement des différents organes (thymus, rate, ganglions mésentériques (GM) et périphériques (GP)) les cellules sont extraites par broyage des tissus. Une lyse des globules rouges est ensuite effectuée (rate, sang, GM) en resuspendant les cellules dans 1ml de RBC Lysis Buffer 1X (eBioscience) durant 1 min. Un lavage au tampon MACS (PBS, 5% BSA, 2mM EDTA) permet d'arrêter la réaction. Les cellules [$1 \cdot 10^6$] sont incubées avec [$0,5 \mu\text{g} / \text{ml}$] d'anticorps couplés à des fluorochromes dans du tampon MACS pendant 1h à 4°C et à l'obscurité (Plaque 96 puits coniques). Pour finir, deux lavages dans du tampon MACS sont effectués avant le passage au cytomètre. L'analyse a été réalisée sur le cytomètre Fortessa (BD Biosciences). Les compensations de fluorescence ont été réglées à l'aide d'échantillons marqués avec un seul fluorochrome. Les données ont été acquises à l'aide du logiciel Diva (Fortessa) et analysées à l'aide du logiciel FlowJo.

B- Quantification en temps réel de l'expression de gènes par qRT-PCR:

L'extraction d'ARN a été réalisée grâce au kit RNeasy Micro Kit (Qiagen) à partir de $5 \cdot 10^5$ cellules. La reverse transcription a ensuite été effectuée sur la totalité de l'ARN extrait à l'aide du kit QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen). La quantification est réalisée à partir d'ADNc qui ont été dilués de manière à avoir 5ng /puits. Pour ces différents gènes, ainsi que pour le gène endogène ARN 18S, des primers prédéfinis («Taqman Gene Expression Assay», Applied Biosystems) reconnaissant spécifiquement les ARN messagers et non l'ADN génomique sont utilisés. L'amplification est réalisée à l'aide de «Taqman Gene Expression Master Mix» (Applied Biosystems) sur l'appareil ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Life Technologies). Pour chaque gène, l'échantillon est testé en triplicats et 40 cycles sont réalisés. L'expression de chaque gène est calculée selon la méthode comparative du $\Delta\Delta\text{Ct}$. Seuls les échantillons pour lesquels les Ct étaient inférieures à 37 sont utilisés pour la quantification.

C- Western Blot:

Les cellules ($10 \cdot 10^6$) sont lavées deux fois dans du PBS 1X puis incubées dans du tampon de lyse (20ml eau milieu Q, 2 pastilles EDTA free anti-protéases, 200 anti-phosphatases 2 et 3) à raison de $100 \mu\text{l}$ de tampon pour $10 \cdot 10^6$ cellules durant 10 min à 4°C. Les cellules sont centrifugées 10 min à 15 000 rpm, le surnageant est récupéré puis dosé (technique de Bradford). Les protéines ($40 \mu\text{g} / \text{puits}$) sont déposées sur un gel polyacrylamide et la migration est réalisée durant 1h30 à 170 volts dans du tampon de migration Tris Glycine 1X SDS. Le transfert est effectué sur une

membrane PVDF (Pall corporation) durant 2 heures à 30 volts dans du tampon de transfert Tris Glycine 1X + méthanol. La membrane est laissée à l'air libre sur la nuit. Le lendemain elle est réactivée par des bains successifs de méthanol, eau osmosée, TBS-0,5%Tween 5% BSA puis saturée durant 1h dans du TBS-0,5%Tween 5% BSA. Trois lavages de 10 min dans du TBS-0,5% Tween sont ensuite effectués avant l'incubation sur la nuit avec l'anticorps primaire. Le lendemain trois lavages dans du TBS-0,5% Tween sont effectués avant le marquage avec l'anticorps secondaire couplé à la horseradish peroxydase 1/10 000 (GE healthcare) durant 1 heure. Les protéines sont révélées par ECL WestFemto (Thermoscientific) qui fournit le substrat à la peroxydase. Des films autoradiographiques (GE Healthcare) permettent de capturer la fluorescence émise par les protéines à différents temps.

Chapitre II:

A- Extraction, purification et mise en culture des LTc:

Après dissection de la souris et prélèvement de la rate, les cellules sont récupérées par injection de 10 ml de PBS (Life technologies) à l'aide d'une seringue et par pression de l'organe grâce à une pince plate. Une lyse des globules rouges est ensuite effectuée en resuspendant les cellules dans 1ml de RBC Lysis Buffer 1X (eBioscience) durant 1 min. Un lavage en tampon MACS (PBS, 5% BSA, 2mM EDTA) permet d'arrêter la réaction. La purification des LTc par déplétion est réalisée grâce au kit Mouse CD8+ T Cell Isolation (Stemcell) par incubation avec le cocktail d'anticorps (10 min à 20°C) puis avec les billes magnétiques (5 min à 20°C). Le tri des LTc est ensuite effectué grâce à un aimant (EasySep Magnet). Les LTc récupérés sont filtrés et mis en présence d'antibiotiques avant d'être mis en culture. Ils sont ensuite cultivés en milieu DMEM (Life technologies) contenant 10% de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté, 5% de pénicilline, streptomycine, acides-aminés non essentiels et pyruvate, 10mM HEPES et 50 μ M 2- β mercaptoéthanol (milieu Mouse complet) à 37°C sous 5% de CO₂. Les cellules sont cultivées en plaque 24 puits [10⁶] /ml et stimulées par l'ajout de billes recouvertes de CD3 ϵ et de CD28 à raison de 10 μ l /ml et de 10 μ l d'IL-2 [10²] /ml.

B-Test de dégranulation:

Principe: Lors de la dégranulation des LTc les protéines Lamp1 et Lamp2 présentes sur les granules lytiques se retrouvent exprimées au niveau de la membrane plasmique. Ainsi, la quantification de ces protéines à la surface des cellules permet d'évaluer le pourcentage de dégranulation. *Protocole:* Les cellules (3.10⁵ /puits) sont resuspendues dans du milieu Mouse complet puis distribuées dans une plaque 96 puits (100 μ l /puits) contenant du PBS (condition non stimulée) ou préalablement recouverte avec de l'anti-CD3 ϵ souris (BD Biosciences) à 20 μ g /ml.

Les cellules sont ensuite incubées avec la solution d'anticorps anti-CD107a (Lamp1) FITC souris [25 µg /ml] (BD Biosciences) et anti-CD107b (Lamp2) FITC souris [25 µg /ml] (BD Biosciences) durant différents temps (30 min, 1h, 1h30, 3h) à 37°C sous 5% de CO₂, puis deux lavages au tampon MACS sont réalisés. Un second marquage est effectué avec un anticorps anti-souris CD8α-APC [0,5µg /ml] (BD Biosciences) durant 1h à 4°C. Pour finir, les cellules sont lavées et resuspendues dans 200µl de tampon MACS puis analysées sur un cytomètre MACSQuant® Analyser (Miltenyl Biotec). Les données sont analysées à l'aide du logiciel FlowJo.

C-Microscopie TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence)

Principe: L'avantage de la microscopie TIRF est l'excitation sélective de l'échantillon. En effet, le faisceau laser d'excitation frappe la surface de l'échantillon avec un angle qui induit une totale réflexion du faisceau. Permettant ainsi une excitation de la surface de l'échantillon en contact avec la lamelle inférieure à 100 nm. La fluorescence provenant des autres niveaux alors éliminée, on peut observer sélectivement ce qui se passe au niveau de la membrane plasmique des cellules.

Protocole: La lame TIRF ibidi (Biovalley) est nettoyée à l'alcool à 90° puis recouverte avec des anticorps α-CD3 (BD Pharmingen) et α-CD28 (BD Pharmingen) [0,01mg /ml] à 4°C sur la nuit. Les LTc (1.10⁶) sont incubés avec une lectine provenant du blé (WGA) conjuguée à l'Alexa fluor 488 [1µg /ml] (un marqueur des granules lytiques - Molecular Probes) dans du milieu HBSS (Invitrogen) durant 20 min à 37°C sous 5% de CO₂. Les cellules sont centrifugées 5 min à 1500 rpm, lavées 2 fois dans du milieu HBSS puis resuspendues dans du milieu Mouse complet à 37°C. Le lendemain la lame est lavée avec du milieu Mouse complet. Dans chaque chambre de la lamelle du milieu Mouse complet à 37°C est ajouté. Une fois devant le microscope 2.10⁵ cellules sont ajoutées par chambre. L'acquisition est réalisée sur l'appareil Nikon Eclipse Ti-E TIRF imaging system dans le plan TIRF durant 5 min.

D-Test de flux calcique

Principe: La capacité d'activation des LTc est évaluée en mesurant la quantité de calcium libérée après stimulation de leurs TCR. Pour cela, un premier anticorps anti-souris CD3ε (IgG Hamster) vient se fixer à la surface des cellules. Un second anticorps anti IgG de Hamster est ensuite ajouté de manière à agglomérer les CD3ε et activer la voie de signalisation du TCR. Le signal induit l'ouverture de canaux calciques présents au niveau du réticulum endoplasmique et de certains canaux présents à la surface (CRAC). La ionomycine (un ionophore calcique) permet l'ouverture de tous les canaux calciques de la cellule et peut ainsi servir de contrôle. Le calcium est détecté par l'ajout d'un traceur calcique perméant (Indo-1) dans les cellules. *Protocole:* Les cellules (5.10⁵) sont lavées dans du tampon A (RPMI, 0,1 % HEPES) puis incubées dans 2ml de tampon A contenant du powerLoad [10X](Invitrogen) et de l'Indo-1 AM [10µg] (Invitrogen) durant 30 min à 37°C sous 5% de CO₂. Ensuite, 2 ml de tampon B (RPMI, 0,1 % HEPES, 5% SVF) sont rajoutés

aux cellules durant 30 min à 37°C sous 5% de CO₂. Deux lavages sont effectués dans du tampon C (RPMI, 5% SVF) puis les cellules sont marquées avec les anticorps TCRβ PE (BD Pharmingen) [0,5μg /ml] CD8α-APC (BD Biosciences) [0,5μg /ml] durant 10 min à température ambiante. Les cellules sont lavées et resuspendues dans 500μl de tampon C. Le test de flux calcique est réalisé sur le cytomètre ARIA II (BD Biosciences). Les cellules sont analysées seules durant 1 min puis en présence d'anticorps anti-CD3ε (IgG Hamster-BD Pharmingen) [5μg /ml] durant 1 min. Pour finir l'anticorps anti-IgG de Hamster (Thermoscientific)[15μg /ml] et la ionomycine [2μl, 10⁻³ M] (Sigma) sont ajoutés chacun à leur tour durant 5 min. Les données sont analysées à l'aide du logiciel FlowJo.

Chapitre III:

A-Extraction, purification et mise en culture des BMMC:

Après prélèvement des fémurs et tibias, les os sont plongés dans l'éthanol puis rincés au PBS 1X en condition stérile. Les extrémités des os sont sectionnés et les cellules de la moelle osseuse (MO) sont récupérées à l'aide d'une seringue (25G) et de 10 ml de PBS 1X. *Culture des BMMC:* Les cellules sont cultivées en milieu IMDM + glutamax (Life technologies) contenant 15% de SVF décomplémenté (Gibco), 1% de pénicilline/streptomycine, 1% d'acide-aminés non essentiels, 1% de sodium pyruvate, 0,1% de 2-βmercaptoéthanol (milieu BMMC complet) à 37°C sous 5% de CO₂ à une concentration de [0.8.10⁶] / ml. Les passages sont réalisés tous les deux jours et de l'IL-3 [10 ng/ml]f (Sigma SRP3208) et du SCF [10 ng/ml]f (Sigma SRP3234) sont ajoutés à chaque passage. Les test fonctionnels peuvent être réalisés après 5 semaines de culture quand les mastocytes sont arrivés à maturation.

B-Quantification en temps réel de l'expression de gènes par qRT-PCR:

L'extraction d'ARN a été réalisée grâce au kit RNeasy Micro Kit (Qiagen) à partir de 5. 10⁵ cellules. La reverse transcription a ensuite été effectuée sur la totalité de l'ARN extrait à l'aide du kit QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen). La quantification est réalisée à partir d'ADNc qui ont été dilués de manière à avoir 5ng /puits. Pour ces différents gènes, ainsi que pour le gène endogène ARN 18S, des amorces prédéfinies («Taqman Gene Expression Assay», Applied Biosystems) reconnaissant spécifiquement les ARN messagers et non l'ADN génomique sont utilisées. L'amplification est réalisée à l'aide de «Taqman Gene Expression Master Mix» (Applied Biosystems) sur l'appareil ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Life Technologies). Pour chaque gène, l'échantillon est testé en triplicats et 40 cycles sont réalisés. L'expression de chaque gène est calculée selon la méthode comparative du ΔΔCt. Seuls les échantillons pour lesquels les Ct étaient inférieures à 37 sont utilisés pour la quantification.

Primers utilisés *KIF5A*: Mm00515265_m1; *KIF5B*: Mm00515276_m1; *KIF5C*: Mm00500464_m1; *RAB27A*: Mm00469997_m1; *KLC1*: Mm00492936_m1; *KLC2*: Mm00492945_m1; *KLC3*:

Mm00461422_m1; *RAB27B*: Mm00472653_m1; *SYTL1*: Mm00473300_m1; *SYTL2*: Mm01317927_m1; *SYTL3*: Mm00473333_m1; *SYTL4*: Mm00489110_m1; *SYTL5*: Mm00624760_m1; and *18S*: Mm03928990_g1 (Applied Biosystems).

C-Test de libération de la β -hexosaminidase:

Les mastocytes [1.10^6]/ml sont sensibilisés sur la nuit avec des IgE anti-DNP [$1 \mu\text{g/ml}$]finale dans du milieu complet contenant de l'IL-3 et du SCF. Le lendemain les cellules sont lavées dans du tampon Tyrode* à 37°C (centri 4 min à 1300 rpm), mises à une concentration de [2.10^6]/ml puis stimulées avec du DNP-HSA [20 ng/ml]finale durant 0.5, 1, 2, 3, 10, ou 30 min à 37°C. A la fin des temps d'incubation la réaction est stoppée en mettant les cellules dans la glace puis après une centrifugation de 4 min à 1300 rpm à 4°C les surnageants sont récupérés dans une plaque. 15 μl de surnageant sont prélevés et mis en contact avec 50 μl de pNAG* pendant 1h00 à 37°C. La réaction est ensuite stoppée par l'ajout de 125 μl /puits de tampon glycine*. La DO est ensuite lue à 405 nm. Dans cette expérience un puit avec du triton-X-100 (triton 0,625%) est réalisé afin de déterminer la DO équivalente à 100% de dégranulation. Les autres valeurs de DO seront donc rapportées à cette valeur après soustraction du bruit de fond (puits sans surnageant).

Composition Tampon Tyrode: HEPES pH 7,2 20mM + NaCl 137mM + KCl 5mM + MgCl₂ 1mM + CaCl₂ 1,8 mM + Glucose 5,6 mM + BSA 0,5 mg/ml + eau milliQ QSP 100ml. Ajuster le pH à 7,6. Conservation deux semaines maximum à 4°C.

pNAG: 65 mg de pNAG (para-nitrophényl-N-acétyl- β -D-glucosaminidase Sigma) dans 50 ml de tampon citrate. Vortexer plusieurs fois et chauffer à 37°C pour bien le dissoudre.

Tampon citrate 0,05M: 5,25g acide citrique dans 250ml d'H₂O et 7,35g citrate de sodium dans 250ml d'H₂O à mélanger volume à volume. pH 4,5 à stocker à 4°C.

Tampon glycine 0,2M: 15,01g de glycine dans 900ml d'H₂O ajuster le pH à 10,7.

D-Test de dégranulation par cytométrie en flux:

Les mastocytes [1.10^6]/ml sont sensibilisés sur la nuit avec des IgE anti-DNP [$1 \mu\text{g/ml}$]finale dans du milieu complet contenant de l'IL-3 et du SCF. Le lendemain les cellules sont lavées dans du tampon Tyrode à 37°C (centri 4 min à 1300 rpm), concentrées à une concentration de [2.10^6]/ml puis stimulées avec du DNP-HSA [20 ng/ml]finale ou non durant 10 min à 37°C. A la fin des 10 min la réaction est stoppée en mettant les cellules dans la glace. Les cellules sont ensuite lavées (centrifugation de 4 min à 1300 rpm à 4°C) et fixées dans de la PFA 4% (15 min TA) puis resuspendues dans du tampon MACS (PBS, 5% BSA, 2mM EDTA) pour un second lavage. Les cellules sont alors marquées d'abord avec un anticorps anti-CD63 (1/200^e 1h à 4°C) (MBL D263-3) puis avec un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de rat Alexa Fluor 647 (1/200^e 30 min à 4°C) (Thermo Fisher Scientific A21247). Un lavage est réalisé puis l'analyse est effectuée sur le cytomètre Fortessa (BD).

E-Immunofluorescence:

Les mastocytes [1.10^6]/ml sont sensibilisés sur la nuit avec des IgE anti-DNP [$1 \mu\text{g/ml}$] finale dans du milieu complet contenant de l'IL-3 et du SCF. Des lamelles coatées en fibronectine sont aussi préparées la veille: incubation des lamelles avec [$10 \mu\text{g/ml}$] finale de fibronectine pendant 1h à 37°C puis laisser les lamelles dans du PBS1X à 4°C . Le lendemain les cellules sont lavées dans du milieu complet à 37°C et 1.10^6 cellules sont déposées par lamelle dans du milieu complet contenant du MgCl_2 1mM puis incubées 1h à 37°C . Les cellules sont ensuite stimulées avec du DNP-HSA [40 ng/ml] f ou non durant 10 min/30min à 37°C . La réaction est arrêtée avec de la PFA 4% (15 min TA) et la PFA est par la suite neutralisée par du NH_4Cl (10min TA). Un lavage dans du PBS 5% BSA 0,5% Saponine est effectué avant le blocking dans de la solution de blocking de chez Dako (30min TA). Les cellules sont lavées deux fois dans du PBS 5% BSA 0,5% Saponine puis marquées dans un premier temps avec un anticorps primaire 2h à TA (anti-STX3 1/100^e ou anti-Kif5b 1/100^e) puis avec un anticorps secondaire 1/200^e 1h à 4°C . Après un dernier lavage dans du PBS 5% BSA 0,5% Saponine les cellules sont montées entre lame et lamelle dans du Prolong gold antifade avec DAPI. Les images ont ensuite été prises sur un microscope confocal LSM 700 (ZEISS) Objectif 63x NA 1.4. Les images sont analysées à l'aide du logiciel ImageJ et Imaris.

Quantification du recrutement à la membrane des granules de sécrétion: Deux profils ont été quantifiés: absence de translocation ou translocation en périphérie (définie par un marquage de la membrane plasmique par STX3 sur plus des 2/3 de toute la surface de la membrane). Concernant la réorganisation des microtubules deux profils ont été quantifiés: absence de réorganisation des microtubules caractérisé par un anneau périphérique de tubuline et réorganisation des microtubules caractérisé par la présence d'extensions de type filopodes. Ces quantifications ont été réalisées par l'observation d'images prises sur différents champs des lamelles et sur 3 expériences indépendantes grâce au logiciel ImageJ en comptant le nombre de cellules ayant subies une translocation ou non.

Calcul du pourcentage de co-localisation: Les pourcentages de co-localisation ont été calculé grâce au logiciel Imaris (% calculé par le logiciel).

F-Microscopie TIRF:

La lame TIRF ibidi (Biovalley) est nettoyée à l'alcool à 90° puis coatée avec de la fibronectine [$10 \mu\text{g/ml}$] f. Les mastocytes (1.10^6) sont marqués avec une lectine provenant du blé WGA (Wheat Germ Agglutinin) conjugué à l'Alexa fluor 488 [$1 \mu\text{g/ml}$] (un marqueur des granules lytiques - Molecular Probes) puis incubés avec des IgE anti-DNP [$1 \mu\text{g/ml}$] f sur la nuit à 37°C . Le lendemain la lame est rincée avec du milieu complet. Les cellules (2.10^5) sont ensuite ajoutées aux chambres pour qu'elles puissent adhérer aux lamelles. Devant le microscope les cellules sont stimulées avec

le DNP-HSA [20 ng/ml]finale. L'acquisition est réalisée sur l'appareil Nikon Eclipse Ti-E TIRF imaging system dans le plan TIRF durant 15 min (temps d'exposition 200ms). La camera utilisée est une QuantEM 512 SC - Roper Technologies. Le logiciel utilisé est le NIS-Elements AR software version 3.1 Nikon. Les images sont ensuite analysées sur le logiciel Imaris en considérant qu'un granule mesure au minimum 3x3 pixels (1 pixel = 0,16 μ m).

G-Test Elisa:

Les mastocytes [1.10^6]/ml sont sensibilisés sur la nuit avec des IgE anti-DNP [1 μ g/ml]finale dans du milieu complet contenant de l'IL-3 et du SCF. Le lendemain les cellules sont lavées puis stimulées avec du DNP-HSA [20 ng/ml]finale pendant 3h. Les surnageants sont ensuite récupérés et des tests Elisa sont réalisés grâce à des kits commerciaux de eBioscience pour le dosage de l'IL-6, du TNF α et de MCP-1.

H-Flux calcique:

Les mastocytes [5.10^5] préalablement sensibilisés avec les IgE anti-DNP [1 μ g/ml]finale sont lavées dans du tampon A (RPMI, 0,1 % HEPES) puis incubées dans 2ml de tampon A contenant du powerLoad [10X](Invitrogen) et de l'Indo-1 AM [5 μ g] (Invitrogen) durant 30 min à 37°C sous 5% de CO₂. Ensuite, 2 ml de tampon B (RPMI, 0,1 % HEPES, 5% SVF) sont rajoutés aux cellules durant 30 min à 37°C sous 5% de CO₂. Deux lavages sont effectués dans du tampon C (RPMI, 5% SVF). Le test de flux calcique est réalisé sur le cytomètre ARIA II (BD Biosciences). Les cellules sont analysées seules durant 1 min puis en présence de DNP-HSA [20 ng/ml]finale. Les données sont analysées à l'aide du logiciel FlowJo.

I-Choc anaphylactique:

Les souris contrôles et cKO^{Kif5b} sont sensibilisées avec une injection en intraveineuse d'IgE anti-DNP [1 μ g/g]finale (H1- ϵ -26). Après 24h, les souris sont stimulées par une injection en intraveineuse de 500 μ g de DNP-HSA (Sigma). La température est ensuite enregistrée toutes les 5min pendant 1h00 en utilisant les implants de chez Bio Medic Data Systems qui permettent de collecter les données de température par wifi (DAS-7007S; Bio Medic Data Systems). A la fin des relevés, des échantillons de sang sont collectés pour doser dans le serum la concentration en MCPT-1 par Elisa (eBioscience).

J-Test siRNA / Dominant négatif / Complémentation:

La transfection des mastocytes est réalisée grâce à l'électroporateur NEPA21 avec les paramètres suivants: 275/3/50/2/10/+ // 20/50/50/5/40/+-. Les cellules sont lavées dans du milieu Opti-MEM, 1.10^6 cellules sont ensuite déposées par cuve d'électroporation dans un volume de 80 μ l en présence de 20 μ l de plasmides à 25 μ M. Après électroporation les cellules sont mises en culture

dans du milieu complet avec de l'IL-3 et du SCF. Quarante-huit heures après transfection les cellules sont utilisées pour les tests fonctionnels. Référence des siRNA utilisées: siRNA Slp3 n°1 SI02899750, siRNA Slp3 n°2 SI02899743, siRNA contrôle 1027310 (QIAGEN). Le dominant négatif et clone Kif5b (Papier Kurowska 2012).

K- Western Blot:

Les cellules $10 \cdot 10^6$ sont lavées deux fois dans du PBS 1X puis incubées dans du tampon de lyse à raison de $100 \mu\text{l}$ de tampon pour $10 \cdot 10^6$ cellules durant 10 min à 4°C . Les cellules sont centrifugées 10 min à 15 000 rpm, le surnageant est récupéré puis dosé (Technique de Bradford). Les protéines ($40 \mu\text{g}$ /puits) sont déposées sur un gel polyacrylamide et la migration est réalisée durant 1h30 à 160 volts dans du tampon de migration Tris Glycine 1X SDS. Le transfert est effectué sur une membrane PVDF (Pall corporation) durant 2 heures à 30 volts dans du tampon de transfert Tris Glycine 1X + méthanol. La membrane est laissée à l'air libre pendant une nuit. Le lendemain, elle est réactivée par des bains successifs de méthanol, eau osmosée, TBS-0,5%Tween 5% BSA puis saturée durant 1h dans du TBS-0,5%Tween 5% BSA. Trois lavages de 10 min dans du TBS-0,5% Tween sont ensuite effectués avant l'incubation sur la nuit avec l'anticorps primaire. Le lendemain trois lavages dans du TBS-0,5% Tween sont effectués avant le marquage avec l'anticorps secondaire couplé à la horseradish peroxydase 1/10 000 (GE healthcare) durant 1 heure. Les protéines sont révélées par ECL WestFemto (Thermoscientific) qui fournit le substrat à la peroxydase. Des films autoradiographiques (GE Healthcare) permettent de capturer la fluorescence émise par les protéines à différents temps.

Composition du tampon de lyse pH7,2: Hepes 50mM pH7,2 + NaCl 150 mM + MgCl_2 1mM + CaCl_2 1mM + 1% Triton-x-100 + 10% Glycérol + anti-protéases et anti-phosphatases. QSP eau milliQ.

L-Co-immunoprécipitation:

50 millions de mastocytes sont utilisés pour réaliser les expériences de co-immunoprécipitation. Les cellules sont sensibilisées sur la nuit avec des IgE anti-DNP [$1 \mu\text{g}/\text{ml}$] dans du milieu complet contenant de l'IL-3 et du SCF. Le lendemain les cellules sont lavées dans du tampon Tyrode à 37°C (centrifugation 4 min à 1300 rpm), puis stimulées ou non avec du DNP-HSA [$40 \text{ ng}/\text{ml}$] finale durant 15 min à 37°C . A la fin des 15 min la réaction est stoppée en mettant les cellules dans la glace. Les cellules sont ensuite lavées (centrifugation de 4 min à 1300 rpm à 4°C) et lysées dans du tampon de lyse ($400 \mu\text{l}$ du même tampon que pour le Western Blot) durant 10 min à 4°C . Les cellules sont centrifugées 10 min à 15 000 rpm, le surnageant est récupéré puis dosé (technique de Bradford). Quatre milligrammes de protéines sont nécessaires par condition. Les surnageants sont mis en contact avec les billes d'agarose (protéines A et G - $40 \mu\text{l}$ par condition) durant 30 min sur une roue à 4°C pour un pré-clearing. Les billes sont ensuite

centrifugées 2 min à 300 rpm. Le surnageant est récupéré et remis en contact avec 40 μ l de billes d'agarose + 4 μ g d'anticorps durant 3h sur une roue à 4°C. Après les 3h d'incubation les billes sont lavées trois fois dans du tampon de lyse (2 min à 300 rpm). Au dernier lavage, elles sont resuspendues dans du rose de dépôt puis chauffées 10 min à 100°C. Un western-Blot est ensuite réalisé.

Concernant les Co-immunoprécipitations réalisées avec les drogues, les cellules ont été préincubées 1h avec les drogues avant d'être stimulées avec le DNP-HSA. Concentration des drogues utilisées: LY-294002 [100 μ M]finale / Bapta [20 mM]finale / Nocodazole [20 μ M]finale.

Bibliographie

Chapitre I: Trafic vésiculaire et sécrétion régulée

Les LRO: Une machinerie de transport et de sécrétion apparentée

Le transport des LROs en direction de la membrane plasmique:

Le réseau de microtubule:

Akhmanova A, Hoogenraad CC. Microtubule plus-end-tracking proteins: mechanisms and functions. *Curr Opin Cell Biol.* 2005 Feb;17(1):47-54.

Akhmanova A, Steinmetz MO. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Apr;9(4):309-22.

Amos LA, Schlieper D. Microtubules and maps. *Adv Protein Chem.* 2005;71:257-98.

Bosc C, Andrieux A, Job D. STOP proteins. *Biochemistry.* 2003 Oct 28;42(42):12125-32.

Bu W, Su LK. Regulation of microtubule assembly by human EB1 family proteins. *Oncogene.* 2001 May 31;20(25):3185-92.

Carlier MF. Nucleotide hydrolysis in cytoskeletal assembly. *Curr Opin Cell Biol.* 1991 Feb;3(1):12-7.

Job D, Valiron O, Oakley B. Microtubule nucleation. *Curr Opin Cell Biol.* 2003 Feb;15(1):111-7.

Leung CL, Sun D, Zheng M, Knowles DR, Liem RK. Microtubule actin cross-linking factor (MACF): a hybrid of dystonin and dystrophin that can interact with the actin and microtubule cytoskeletons. *J Cell Biol.* 1999 Dec 13;147(6):1275-86.

Maiato H, Sampaio P, Sunkel CE. Microtubule-associated proteins and their essential roles during mitosis. *Int Rev Cytol.* 2004;241:53-153.

Mitchison T, Kirschner M. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature.* 1984 Nov 15-21;312(5991):237-42.

Nogales E, Wang HW. Structural mechanisms underlying nucleotide-dependent self-assembly of tubulin and its relatives. *Curr Opin Struct Biol.* 2006 Apr;16(2):221-9.

Oakley BR. Gamma-tubulin: the microtubule organizer? *Trends Cell Biol.* 1992 Jan;2(1):1-5.

Rickard JE, Kreis TE. CLIPs for organelle-microtubule interactions. *Trends Cell Biol.* 1996 May;6(5):178-83.

Reed NA, Cai D, Blasius TL, Jih GT, Meyhofer E, Gaertig J, Verhey KJ. Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr Biol* 2006; 16:2166-72

Valiron O, Caudron N, Job D. Microtubule dynamics. *Cell Mol Life Sci.* 2001 Dec;58(14):2069-84.

Verhey KJ, Gaertig J. The tubulin code. *Cell Cycle.* 2007 Sep 1;6(17):2152-60. Epub 2007 Jun 26.

Le réseau d'actine:

De La Cruz EM, Pollard TD. Structural biology. Actin' up. *Science.* 2001 Jul 27;293(5530):616-8.

Dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, Nosworthy NJ. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev.* 2003 Apr;83(2):433-73.

Milligan RA, Whittaker M, Safer D. Molecular structure of F-actin and location of surface binding sites. *Nature.* 1990 Nov 15;348(6298):217-21.

Pollard TD, Blanchoin L, Mullins RD. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2000;29:545-76.

Pollard TD, Cooper JA. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science.* 2009 Nov 27;326(5957):1208-12.

Sagot I, Rodal AA, Moseley J, Goode BL, Pellman D. An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nat Cell Biol.* 2002 Aug;4(8):626-31.

Les dynéines:

Carter AP, Cho C, Jin L, Vale RD. Crystal structure of the dynein motor domain. *Science.* 2011 Mar 4;331(6021):1159-65.

Gennerich A, Vale RD. Walking the walk: how kinesin and dynein coordinate their steps. *Curr Opin Cell Biol.* 2009 Feb;21(1):59-67.

Gibbons IR, Rowe AJ. Dynein: A Protein with Adenosine Triphosphatase Activity from Cilia. *Science.* 1965 Jul 23;149(3682):424-6.

Paschal BM, Shpetner HS, Vallee RB. MAP 1C is a microtubule-activated ATPase which translocates microtubules *in vitro* and has dynein-like properties. *J Cell Biol.* 1987 Sep;105(3):1273-82.

Schroer TA, Steuer ER, Sheetz MP. Cytoplasmic dynein is a minus end-directed motor for membranous organelles. *Cell.* 1989 Mar 24;56(6):937-46.

Les kinesines:

Hirokawa N, Noda Y, Tanaka Y, Niwa S. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Oct;10(10):682-96.

Lawrence CJ, Dawe RK, Christie KR, Cleveland DW, Dawson SC, Endow SA, Goldstein LS, Goodson HV, Hirokawa N, Howard J, Malmberg RL, McIntosh JR, Miki H, Mitchison TJ, Okada Y, Reddy AS, Saxton WM, Schliwa M, Scholey JM, Vale RD, Walczak CE, Wordeman L. A standardized kinesin nomenclature. *J Cell Biol.* 2004 Oct 11;167(1):19-22.

Miki H, Okada Y, Hirokawa N. Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function. *Trends Cell Biol.* 2005 Sep;15(9):467-76.

Vale RD, Reese TS, Sheetz MP. Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell.* 1985 Aug;42(1):39-50.

Verhey KJ, Hammond JW. Traffic control: regulation of kinesin motors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Nov;10(11):765-77.

Woehlke G, Schliwa M. Walking on two heads: the many talents of kinesin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000 Oct;1(1):50-8.

Les myosines:

Fan GH, Lapierre LA, Goldenring JR, Sai J, Richmond A. Rab11-family interacting protein 2 and myosin Vb are required for CXCR2 recycling and receptor-mediated chemotaxis. *Mol Biol Cell.* 2004 May; 15(5):2456-69.

Gramlich MW, Klyachko VA. Actin/Myosin-V- and Activity-Dependent Inter-synaptic Vesicle Exchange in Central Neurons. *Cell Rep.* 2017 Feb 28;18(9):2096-2104.

Jacobelli J, Chmura SA, Buxton DB, Davis MM, Krummel MF. A single class II myosin modulates T cell motility and stopping, but not synapse formation. *Nat Immunol.* 2004 May;5(5):531-8.

Krendel M, Mooseker MS. Myosins: tails (and heads) of functional diversity. *Physiology (Bethesda).* 2005 Aug;20:239-51.

Syamaladevi DP, Spudich JA, Sowdhamini R. Structural and functional insights on the Myosin superfamily. *Bioinform Biol Insights.* 2012; 6:11-21.

Wu XS, Rao K, Zhang H, Wang F, Sellers JR, Matesic LE, Copeland NG, Jenkins NA, Hammer JA 3rd. Identification of an organelle receptor for myosin-Va. *Nat Cell Biol.* 2002 Apr;4(4):271-8.

Les mécanismes d'arrimage, de fusion et de sécrétion des LRO:

Betz A, Okamoto M, Benseler F, Brose N. Direct interaction of the rat unc-13 homologue Munc13-1 with the N terminus of syntaxin. *J Biol Chem.* 1997 Jan 24;272(4):2520-6

Bonifacino JS, Glick BS. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell.* 2004 Jan 23;116(2): 153-66

Calloway N, Gouzer G, Xue M, Ryan TA. The active-zone protein Munc13 controls the use-dependence of presynaptic voltage-gated calcium channels. *Elife.* 2015 Jul 21;4.

Chamberlain LH, Burgoyne RD, Gould GW. SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 May 8;98(10):5619-24.

Chang LF, Chen S, Liu CC, Pan X, Jiang J, Bai XC, Xie X, Wang HW, Sui SF. Structural characterization of full-length NSF and 20S particles. *Nat Struct Mol Biol*. 2012 Feb 5;19(3):268-75.

Chen X, Tomchick DR, Kovrigin E, Araç D, Machius M, Südhof TC, Rizo J. Three-dimensional structure of the complexin/SNARE complex. *Neuron*. 2002 Jan 31;33(3):397-409.

Chen X, Lu J, Dulubova I, Rizo J. NMR analysis of the closed conformation of syntaxin-1. *J Biomol NMR*. 2008 May;41(1):43-54.

Dulubova I, Sugita S, Hill S, Hosaka M, Fernandez I, Südhof TC, Rizo J. A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. *EMBO J*. 1999 Aug 16;18(16):4372-82.

Dulubova I, Khvotchev M, Liu S, Huryeva I, Südhof TC, Rizo J. Munc18-1 binds directly to the neuronal SNARE complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Feb 20;104(8):2697-702.

Han L, Jiang T, Han GA, Malintan NT, Xie L, Wang L, Tse FW, Gaisano HY, Collins BM, Meunier FA, Sugita S. Rescue of Munc18-1 and -2 double knockdown reveals the essential functions of interaction between Munc18 and closed syntaxin in PC12 cells. *Mol Biol Cell*. 2009 Dec;20(23):4962-75.

Hanson PI, Roth R, Morisaki H, Jahn R, Heuser JE. Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell*. 1997 Aug 8;90(3):523-35.

Hata Y, Slaughter CA, Südhof TC. Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin. *Nature*. 1993 Nov 25;366(6453):347-51.

Hong W, Lev S. Tethering the assembly of SNARE complexes. *Trends Cell Biol*. 2014 Jan;24(1):35-43.

Jahn R, Scheller RH. SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Sep;7(9):631-43.

Jahn R, Fasshauer D. Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature*. 2012 Oct 11;490(7419):201-7.

Kaesler PS, Deng L, Wang Y, Dulubova I, Liu X, Rizo J, Südhof TC. RIM proteins tether Ca²⁺ channels to presynaptic active zones *via* a direct PDZ-domain interaction. *Cell*. 2011 Jan 21;144(2):282-95.

Kümmel D, Krishnakumar SS, Radoff DT, Li F, Giraudo CG, Pincet F, Rothman JE, Reinisch KM. Complexin cross-links prefusion SNAREs into a zigzag array. *Nat Struct Mol Biol*. 2011 Jul 24;18(8):927-33.

Lang T, Bruns D, Wenzel D, Riedel D, Holroyd P, Thiele C, Jahn R. SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *EMBO J*. 2001 May 1;20(9):2202-13.

Ma C, Li W, Xu Y, Rizo J. Munc13 mediates the transition from the closed syntaxin-Munc18 complex to the SNARE complex. *Nat Struct Mol Biol*. 2011 May;18(5):542-9.

Medine CN, Rickman C, Chamberlain LH, Duncan RR. Munc18-1 prevents the formation of ectopic SNARE complexes in living cells. *J Cell Sci*. 2007 Dec 15;120(Pt 24):4407-15.

Poirier MA, Xiao W, Macosko JC, Chan C, Shin YK, Bennett MK. The synaptic SNARE complex is a parallel four-stranded helical bundle. *Nat Struct Biol*. 1998 Sep;5(9):765-9.

Rizo J, Südhof TC. Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nat Rev Neurosci*. 2002 Aug;3(8):641-53.

Rizo J, Südhof TC. The membrane fusion enigma: SNAREs, Sec1/Munc18 proteins, and their accomplices--guilty as charged? *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2012;28:279-308.

Rizo J. Synaptotagmin-SNARE coupling enlightened. *Nat Struct Mol Biol*. 2010 Mar;17(3):260-2.

Rodkey, T.L. et al. (2008) Munc18a scaffolds SNARE assembly to promote membrane fusion. *Mol. Biol. Cell* 19, 5422–5434

Siksou L, Triller A, Marty S. Ultrastructural organization of presynaptic terminals. *Curr Opin Neurobiol*. 2011 Apr;21(2):261-8.

Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*. 1993 Mar 25;362(6418):318-24.

Südhof TC, Rothman JE. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science*. 2009 Jan 23;323(5913):474-7.

Südhof TC. A molecular machine for neurotransmitter release: synaptotagmin and beyond. *Nat Med*. 2013 Oct;19(10):1227-31.

Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*. 1998 Sep 24;395(6700):347-53.

Tang J, Maximov A, Shin OH, Dai H, Rizo J, Südhof TC. A complexin/synaptotagmin 1 switch controls fast synaptic vesicle exocytosis. *Cell*. 2006 Sep 22;126(6):1175-87.

Trimbuch T, Rosenmund C. Should I stop or should I go? The role of complexin in neurotransmitter release. *Nat Rev Neurosci.* 2016 Feb;17(2):118-25.

Verhage M, Maia AS, Plomp JJ, Brussaard AB, Heeroma JH, Vermeer H, Toonen RF, Hammer RE, van den Berg TK, Missler M, Geuze HJ, Südhof TC. Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science.* 2000 Feb 4;287(5454):864-9.

Wang Y, Okamoto M, Schmitz F, Hofmann K, Südhof TC. Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature.* 1997 Aug 7;388(6642):593-8.

Wiederhold K, Fasshauer D. Is assembly of the SNARE complex enough to fuel membrane fusion? *J Biol Chem.* 2009 May 8;284(19):13143-52.

Yu E, Kanno E, Choi S, Sugimori M, Moreira JE, Llinas RR, et al. Role of Rab27 in synaptic transmission at the squid giant synapse. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:16003–16008.

L'implication des protéines Rabs dans la régulation du trafic vésiculaire:

Arimura N, Kimura T, Nakamuta S, Taya S, Funahashi Y, Hattori A, Shimada A, Ménager C, Kawabata S, Fujii K, Iwamatsu A, Segal RA, Fukuda M, Kaibuchi K. Anterograde transport of TrkB in axons is mediated by direct interaction with Slp1 and Rab27. *Dev Cell.* 2009 May;16(5):675-86.

Corbeel L, Freson K. Rab proteins and Rab-associated proteins: major actors in the mechanism of protein-trafficking disorders. *Eur J Pediatr.* 2008 Jul;167(7):723-9.

Dulubova I, Lou X, Lu J, Huryeva I, Alam A, Schneggenburger R, Südhof TC, Rizo J. A Munc13/RIM/Rab3 tripartite complex: from priming to plasticity? *EMBO J.* 2005 Aug 17;24(16):2839-50.

Fukuda M. Regulation of secretory vesicle traffic by Rab small GTPases. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Sep; 65(18):2801-13.

Geppert M, Goda Y, Stevens CF, Südhof TC. The small GTP-binding protein Rab3A regulates a late step in synaptic vesicle fusion. *Nature.* 1997 Jun 19;387(6635):810-4.

Ménasché G, Pastural E, Feldmann J, Certain S, Ersoy F, Dupuis S, Wulffraat N, Bianchi D, Fischer A, Le Deist F, de Saint Basile G. Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat Genet.* 2000 Jun;25(2):173-6.

Munafò DB, Johnson JL, Ellis BA, Rutschmann S, Beutler B, Catz SD. Rab27a is a key component of the secretory machinery of azurophilic granules in granulocytes. *Biochem J* 2007; 402:229-239

Pfeffer SR. Rab GTPase regulation of membrane identity. *Curr Opin Cell Biol.* 2013 Aug;25(4): 414-9.

Rojo Pulido I, Nightingale TD, Darchen F, Seabra MC, Cutler DF, Gerke V. Myosin Va acts in concert with Rab27a and MyRIP to regulate acute von-Willebrand factor release from endothelial cells. *Traffic.* 2011;12(10):1371-1382.

Singh RK, Mizuno K, Wasmeier C, Wavre-Shapton ST, Recchi C, Catz SD, Futter C, Tolmachova T, Hume AN, Seabra MC. Distinct and opposing roles for Rab27a/MyoVa and Rab27b/Munc13-4 in mast cell secretion. *FEBS J.* 2013 Feb;280(3):892-903.

Shirakawa R, Higashi T, Tabuchi A, Yoshioka A, Nishioka H, Fukuda M, Kita T, Horiuchi H. Munc13-4 is a GTP-Rab27-binding protein regulating dense core granule secretion in platelets. *J Biol Chem.* 2004 Mar 12;279(11):10730-7.

Stein MP, Dong J, Wandinger-Ness A. Rab proteins and endocytic trafficking: potential targets for therapeutic intervention. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003 Nov 14;55(11):1421-37.

Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Aug;10(8): 513-25.

Tolmachova T, Abrink M, Futter CE, Authi KS, Seabra MC. Rab27b regulates number and secretion of platelet dense granules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Apr 3;104(14):5872-7.

Van Breevoort D, Snijders AP, Hellen N, Weckhuysen S, van Hooren KW, Eikenboom J, Valentijn K, Fernandez-Borja M, Ceulemans B, De Jonghe P, Voorberg J, Hannah M, Carter T, Bierings R. STXBP1 promotes Weibel-Palade body exocytosis through its interaction with the Rab27A effector Slp4-a. *Blood.* 2014 May 15;123(20):3185-94.

Wu XS, Rao K, Zhang H, Wang F, Sellers JR, Matesic LE, Copeland NG, Jenkins NA, Hammer JA 3rd. Identification of an organelle receptor for myosin-Va. *Nat Cell Biol.* 2002 Apr;4(4):271-8.

Yu E, Kanno E, Choi S, Sugimori M, Moreira JE, Llinas RR, et al. Role of Rab27 in synaptic transmission at the squid giant synapse. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:16003–16008.

Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Feb;2(2): 107-17. Review. Erratum in: *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001 Mar;2(3):216.

Zhen Y, Stenmark H. Cellular functions of Rab GTPases at a glance. *J Cell Sci.* 2015 Sep 1;128(17): 3171-6.

Les LRO: Des Voies de biogenèses variées

La biogenèse des granules lytiques

Bossi, G. and G.M. Griffiths, CTL secretory lysosomes: biogenesis and secretion of a harmful organelle. *Semin Immunol*, 2005. 17(1): p. 87-94.

De Saint Basile G, Menasche G, Fischer A. Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nat Rev Immunol*, 2010. 10:568–79.

Griffiths GM, Isaaz S. Granzymes A and B are targeted to the lytic granules of lymphocytes by the mannose-6-phosphate receptor. *J Cell Biol.* 1993 Feb;120(4):885-96.

Gruenberg J. The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Oct;2(10): 721-30.

Hurley JH. ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Curr Opin Cell Biol.* 2008 Feb;20(1):4-11.

Ménager MM, Ménasché G, Romao M, Knapnougel P, Ho CH, Garfa M, Raposo G, Feldmann J, Fischer A, de Saint Basile G. Secretory cytotoxic granule maturation and exocytosis require the effector protein hMunc13-4. *Nat Immunol.* 2007 Mar;8(3):257-67.

Stinchcombe JC, Page LJ, Griffiths GM. Secretory lysosome biogenesis in cytotoxic T lymphocytes from normal and Chediak Higashi syndrome patients. *Traffic.* 2000 May;1(5):435-44.

La biogenèse des granules de sécrétion des mastocytes

Arvan P, Castle D. Sorting and storage during secretory granule biogenesis: looking backward and looking forward. *Biochem J.* 1998 Jun 15;332 (Pt 3):593-610.

Azouz NP, Zur N, Efergan A, Ohbayashi N, Fukuda M, Amihai D, Hammel I, Rothenberg ME, Sagi-Eisenberg R: Rab5 is a novel regulator of mast cell secretory granules: impact on size, cargo, and exocytosis. *J Immunol* 2014, 192:4043-4053.

Braga T, Grujic M, Lukinius A, Hellman L, Abrink M, Pejler G: Serglycin proteoglycan is required for secretory granule integrity in mucosal mast cells. *Biochem J* 2007, 403:49-57.

Combs JW: Maturation of rat mast cells. An electron microscope study. *J Cell Biol* 1966, 31:563-575.

Hammel I, Dvorak AM, Peters SP, Schulman ES, Dvorak HF, Lichtenstein LM, Galli SJ. Differences in the volume distributions of human lung mast cell granules and lipid bodies: evidence that the size of these organelles is regulated by distinct mechanisms. *J Cell Biol.* 1985 May;100(5):1488-92.

Henningsson F, Hergeth S, Cortelius R, Abrink M, Pejler G. A role for serglycin proteoglycan in granular retention and processing of mast cell secretory granule components. *FEBS J.* 2006 Nov;273(21): 4901-12.

Nakazawa S, Sakanaka M, Furuta K, Natsuhara M, Takano H, Tsuchiya S, Okuno Y, Ohtsu H, Nishibori M, Thurmond RL, Hirasawa N, Nakayama K, Ichikawa A, Sugimoto Y, Tanaka S. Histamine synthesis is required for granule maturation in murine mast cells. *Eur J Immunol.* 2014 Jan;44(1):204-14.

Ohtsu H, Tanaka S, Terui T, Hori Y, Makabe-Kobayashi Y, Pejler G, Tchougounova E, Hellman L, Gertsenstein M, Hirasawa N, Sakurai E, Buzás E, Kovács P, Csaba G, Kittel A, Okada M, Hara M, Mar L, Numayama-Tsuruta K, Ishigaki-Suzuki S, Ohuchi K, Ichikawa A, Falus A, Watanabe T, Nagy A. Mice lacking histidine decarboxylase exhibit abnormal mast cells. *FEBS Lett.* 2001 Jul 27;502(1-2):53-6.

Prasad P, Yanagihara AA, Small-Howard AL, Turner H, Stokes AJ: Secretogranin III directs secretory vesicle biogenesis in mast cells in a manner dependent upon interaction with chromogranin A. *J Immunol* 2008, 181:5024-5034.

Wernersson S, Pejler G: Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nat Rev Immunol* 2014, 14:478-494.

Chapitre II: Le mécanisme de sécrétion des LROs dans le LTc

A- Le mécanisme de sécrétion des granules lytiques:

1- Fonctionnalité des granules lytiques:

Peters, P.J., J. Borst, V. Oorschot, M. Fukuda, O. Krahenbuhl, J. Tschopp, J.W. Slot, and H.J. Geuze, Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med*, 1991. 173(5): p. 1099-109.

La perforine:

- Balaji** KN, Schaschke N, Machleidt W, Catalfamo M, Henkart PA: Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *J Exp Med* 2002, 196:493-503.
- Baran** K, Ciccone A, Peters C, Yagita H, Bird PI, Villadangos JA, Trapani JA: Cytotoxic T lymphocytes from cathepsin B-deficient mice survive normally in vitro and in vivo after encountering and killing target cells. *J Biol Chem* 2006, 281:30485-30491.
- Browne** KA, Blink E, Sutton VR, Froelich CJ, Jans DA, Trapani JA. Cytosolic delivery of granzyme B by bacterial toxins: evidence that endosomal disruption, in addition to transmembrane pore formation, is an important function of perforin. *Mol Cell Biol.* 1999 Dec;19(12):8604-15.
- Cohnen** A, Chiang SC, Stojanovic A, Schmidt H, Claus M, Saftig P, Janßen O, Cerwenka A, Bryceson YT, Watzl C. Surface CD107a/LAMP-1 protects natural killer cells from degranulation-associated damage. *Blood.* 2013 Aug 22;122(8):1411-8.
- Dupuis** M, Schaerer E, Krause KH, Tschopp J: The calcium-binding protein calreticulin is a major constituent of lytic granules in cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 1993, 177:1-7.
- Fraser**, S.A., R. Karimi, M. Michalak, and D. Hudig, Perforin lytic activity is controlled by calreticulin. *J Immunol*, 2000. 164(8): p. 4150-5.
- Froelich** CJ, Orth K, Turbov J, Seth P, Gottlieb R, Babior B, Shah GM, Bleackley RC, Dixit VM, Hanna W. New paradigm for lymphocyte granule-mediated cytotoxicity. Target cells bind and internalize granzyme B, but an endosomolytic agent is necessary for cytosolic delivery and subsequent apoptosis. *J Biol Chem.* 1996 Nov 15;271(46):29073-9.
- Keefe** D, Shi L, Feske S, Massol R, Navarro F, Kirchhausen T, Lieberman J. Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. *Immunity.* 2005 Sep;23(3): 249-62.
- Lichtenheld**, M.G., K.J. Olsen, P. Lu, D.M. Lowrey, A. Hameed, H. Hengartner, and E.R. Podack, Structure and function of human perforin. *Nature*, 1988. 335(6189): p. 448-51.
- Metkar** SS, Wang B, Aguilar-Santelises M, Raja SM, Uhlin-Hansen L, Podack E, Trapani JA, Froelich CJ. Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. *Immunity.* 2002 Mar;16(3):417-28.
- Peitsch** MC, Amiguet P, Guy R, Brunner J, Maizel JV Jr, Tschopp J: Localization and molecular modelling of the membrane-inserted domain of the ninth component of human complement and perforin. *Mol Immunol* 1990, 27:589-602.
- Pipkin** ME, Rao A, Lichtenheld MG. The transcriptional control of the perforin locus. *Immunol Rev.* 2010 May;235(1):55-72.
- Pipkin**, M.E. and J. Lieberman, Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Curr Opin Immunol*, 2007. 19(3): p. 301-8.
- Podack** ER, Young JD, Cohn ZA. Isolation and biochemical and functional characterization of perforin 1 from cytolytic T-cell granules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 Dec;82(24):8629-33.
- Rizo** J, Sudhof TC: C2-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain. *J Biol Chem* 1998, 273:15879-15882.
- Sauer**, H., L. Pratsch, J. Tschopp, S. Bhakdi, and R. Peters, Functional size of complement and perforin pores compared by confocal laser scanning microscopy and fluorescence microphotolysis. *Biochim Biophys Acta*, 1991. 1063(1): p. 137-46.
- Shinkai** Y, Takio K, Okumura K. Homology of perforin to the ninth component of complement (C9). *Nature.* 1988 Aug 11;334(6182):525-7.
- Thiery** J, Keefe D, Saffarian S, Martinvalet D, Walch M, Boucrot E, Kirchhausen T, Lieberman J. Perforin activates clathrin- and dynamin-dependent endocytosis, which is required for plasma membrane repair and delivery of granzyme B for granzyme-mediated apoptosis. *Blood.* 2010 Feb 25;115(8):1582-93.
- Thiery** J, Keefe D, Boulant S, Boucrot E, Walch M, Martinvalet D, Goping IS, Bleackley RC, Kirchhausen T, Lieberman J. Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells. *Nat Immunol.* 2011 Jun 19;12(8):770-7.
- Tschopp**, J., D. Masson, and K.K. Stanley, Structural/functional similarity between proteins involved in complement and cytotoxic T-lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Nature*, 1986. 322(6082): p. 831-4.
- Uellner**, R., M.J. Zvelebil, J. Hopkins, J. Jones, L.K. MacDougall, B.P. Morgan, E. Podack, M.D. Waterfield, and G.M. Griffiths, Perforin is activated by a proteolytic cleavage during biosynthesis which reveals a phospholipid-binding C2 domain. *Embo J*, 1997. 16(24): p 7287-96.
- Voskoboinik** I, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol.* 2015 Jun;15(6):388-400.

Les granzymes:

- Adrain**, C., B.M. Murphy, and S.J. Martin, Molecular ordering of the caspase activation cascade initiated by the cytotoxic T lymphocyte/natural killer (CTL/NK) protease granzyme B. *J Biol Chem*, 2005. 280(6): p. 4663-73.
- Adrain**, C., P.J. Duriez, G. Brumatti, P. Delivani, and S.J. Martin, The cytotoxic lymphocyte protease, granzyme B, targets the cytoskeleton and perturbs microtubule polymerization dynamics. *J Biol Chem*, 2006. 281(12): p. 8118-25.
- Andrade**, F., S. Roy, N. Thornberry, A. Rosen, and L. Casciola-Rosen. Granzyme B directly and efficiently cleaves several downstream caspase substrates: implications for CTL-induced apoptosis. *Immunity* 1998, 8:451–460.
- Bovenschen** N, Quadir R, van den Berg AL, Brenkman AB, Vandenberghe I, Devreese. Granzyme K displays highly restricted substrate specificity that only partially overlaps with granzyme A. *J Biol Chem*. 2009 Feb 6;284(6):3504-12.
- Bredemeyer** AJ, Lewis RM, Malone JP, Davis AE, Gross J, Townsend RR, Ley TJ. A proteomic approach for the discovery of protease substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Aug 10;101(32):11785-90.
- Cullen**, S.P. and S.J. Martin, Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death Differ*, 2008. 15(2): p. 251-62.
- Cooper** DM, Pechkovsky DV, Hackett TL, Knight DA, Granville DJ. Granzyme K activates protease-activated receptor-1. *PLoS One*. 2011;6(6):e21484.
- De Poot** SA, Bovenschen N. Granzyme M: behind enemy lines. *Cell Death Differ*. 2014 Mar;21(3):359-68.
- Enari** M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*. 1998 Jan 1;391(6662):43-50.
- Fan** Z, Beresford PJ, Oh DY, Zhang D, Lieberman J. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell*. 2003 Mar 7;112(5):659-72.
- Froelich** CJ, Hanna WL, Poirier GG, Duriez PJ, D'Amours D, Salvesen GS, Alnemri ES, Earnshaw WC, Shah GM. Granzyme B/perforin-mediated apoptosis of Jurkat cells results in cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase to the 89-kDa apoptotic fragment and less abundant 64-kDa fragment. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Oct 23;227(3):658-65.
- Grossman** WJ, Revell PA, Lu ZH, Johnson H, Bredemeyer AJ, Ley TJ. The orphan granzymes of humans and mice. *Curr Opin Immunol*. 2003 Oct;15(5):544-52. Review. Erratum in: *Curr Opin Immunol*. 2003 Dec;15(6):731.
- Heibein**, J.A., I.S. Goping, M. Barry, M.J. Pinkoski, G.C. Shore, D.R. Green, and R.C. Bleackley, Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bid and Bax. *J Exp Med*, 2000. 192(10): p. 1391-402.
- Hirst** CE, Buzza MS, Bird CH, et al. The intracellular granzyme B inhibitor, proteinase inhibitor 9, is up-regulated during accessory cell maturation and effector cell degranulation, and its overexpression enhances CTL potency. *J Immunol*. 2003;170(2):805-815.
- Irmiler** M, Hertig S, MacDonald HR, Sadoul R, Becherer JD, Proudfoot A, Solari R, Tschopp J. Granzyme A is an interleukin 1 beta-converting enzyme. *J Exp Med*. 1995 May 1;181(5):1917-22.
- Jenne** DE, Tschopp J. Granzymes, a family of serine proteases released from granules of cytolytic T lymphocytes upon T cell receptor stimulation. *Immunol Rev*. 1988 Mar;103:53-71.
- Johnson** H, Scorrano L, Korsmeyer SJ, Ley TJ: Cell death induced by granzyme C. *Blood* 2003, 101:3093-3101.
- Li** LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*. 2001 Jul 5;412(6842):95-9.
- Lieberman** J: The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 2003, 3:1-12.
- Lieberman** J, Fan Z: Nuclear war: the granzyme A-bomb. *Curr Opin Immunol* 2003, 15:553-559.
- Lord** SJ, Rajotte RV, Korbitt GS, Bleackley RC: Granzyme B: a natural born killer. *Immunol Rev* 2003, 193:31-38.
- Martinvalet**, D., D.M. Dykxhoorn, R. Ferrini, and J. Lieberman, Granzyme A cleaves a mitochondrial complex I protein to initiate caspase-independent cell death. *Cell*, 2008. 133(4): p. 681-92.
- McGuire** MJ, Lipsky PE, Thiele DL. Generation of active myeloid and lymphoid granule serine proteases requires processing by the granule thiol protease dipeptidyl peptidase I. *J Biol Chem*. 1993 Feb 5;268(4):2458-67.
- Prendergast**, J.A, Helgason C.D, Bleackley, R.C, Quantitative polymerase chain reaction analysis of cytotoxic cell proteinase gene transcripts in T cells. Pattern of expression is dependent on the nature of the stimulus. *J Biol. Chem*. 267, 1992, 5090-5095.

Suidan HS, Clemetson KJ, Brown-Luedi M, Niclou SP, Clemetson JM, Tschopp J, Monard D. The serine protease granzyme A does not induce platelet aggregation but inhibits responses triggered by thrombin. *Biochem J*. 1996 May 1;315 (Pt 3):939-45.

Shi, L. Wu, L. Wang, S. Fan, Z., Granzyme F induces a novel death pathway characterized by Bid-independent cytochrome c release without caspase activation. *Cell Death Differ*. 2009 Dec; 16(12):1694-706.

Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* 2001;8:613–621.

Sutton VR, Davis JE, Cancilla M, Johnstone RW, Ruefli AA, Sedelies K, Browne KA, Trapani JA. Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. *J Exp Med*. 2000 Nov 20;192(10):1403-14.

Thomas DA, Du C, Xu M, Wang X, Ley TJ. DFF45/ICAD can be directly processed by granzyme B during the induction of apoptosis. *Immunity*. 2000 Jun;12(6):621-32.

Zhang D, Beresford PJ, Greenberg AH, Lieberman J. Granzymes A and B directly cleave lamins and disrupt the nuclear lamina during granule-mediated cytolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 May 8;98(10): 5746-51.

Zhang D, Pasternack MS, Beresford PJ, Wagner L, Greenberg AH, Lieberman J. Induction of rapid histone degradation by the cytotoxic T lymphocyte protease Granzyme A. *J Biol Chem*. 2001 Feb 2;276(5): 3683-90.

Zhao T, Zhang H, Guo Y, Fan Z. Granzyme K directly processes bid to release cytochrome c and endonuclease G leading to mitochondria-dependent cell death. *J Biol Chem*. 2007 Apr 20;282(16):12104-11.

2- La mise en place de la synapse immunologique:

Andrés-Delgado L, Antón OM, Bartolini F, Ruiz-Sáenz A, Correas I, Gundersen GG, Alonso MA. INF2 promotes the formation of detyrosinated microtubules necessary for centrosome reorientation in T cells. *J Cell Biol*. 2012 Sep 17;198(6):1025-37.

Andrés-Delgado L, Antón OM, Alonso MA. Centrosome polarization in T cells: a task for formins. *Front Immunol*. 2013 Jul 11;4:191.

Antón OM, Andrés-Delgado L, Reglero-Real N, Batista A, Alonso MA. MAL protein controls protein sorting at the supramolecular activation cluster of human T lymphocytes. *J Immunol*. 2011 Jun 1;186(11): 6345-56.

Ardouin L, Bracke M, Mathiot A, Pagakis SN, Norton T, Hogg N, Tybulewicz VL. Vav1 transduces TCR signals required for LFA-1 function and cell polarization at the immunological synapse. *Eur J Immunol*. 2003 Mar;33(3):790-7.

Babich A, Li S, O'Connor RS, Milone MC, Freedman BD, Burkhardt JK. F-actin polymerization and retrograde flow drive sustained PLC γ 1 signaling during T cell activation. *J Cell Biol*. 2012 Jun 11;197(6): 775-87.

Barda-Saad M, Braiman A, Titerence R, Bunnell SC, Barr VA, Samelson LE. Dynamic molecular interactions linking the T cell antigen receptor to the actin cytoskeleton. *Nat Immunol*. 2005 Jan;6(1):80-9.

Beal AM, Anikeeva N, Varma R, Cameron TO, Vasiliver-Shamis G, Norris PJ, Dustin ML, Sykulev Y. Kinetics of early T cell receptor signaling regulate the pathway of lytic granule delivery to the secretory domain. *Immunity*. 2009 Oct 16;31(4):632-42.

Beemiller P, Jacobelli J, Krummel MF. Integration of the movement of signaling microclusters with cellular motility in immunological synapses. *Nat Immunol*. 2012 Jul 1;13(8):787-95.

Bertrand F, Müller S, Roh KH, Laurent C, Dupré L, Valitutti S. An initial and rapid step of lytic granule secretion precedes microtubule organizing center polarization at the cytotoxic T lymphocyte/target cell synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Apr 9;110(15):6073-8.

Blanchard N, Di Bartolo V, Hivroz C. In the immune synapse, ZAP-70 controls T cell polarization and recruitment of signaling proteins but not formation of the synaptic pattern. *Immunity*. 2002 Oct;17(4): 389-99.

Bouchet J, Del Río-Iñiguez I, Lasserre R, Agüera-Gonzalez S, Cuche C, Danckaert A, McCaffrey MW, Di Bartolo V, Alcover A. Rac1-Rab11-FIP3 regulatory hub coordinates vesicle traffic with actin remodeling and T-cell activation. *EMBO J*. 2016 Jun 1;35(11):1160-74.

Bouchet J, Del Río-Iñiguez I, Vázquez-Chávez E, Lasserre R, Agüera-González S, Cuche C, McCaffrey MW, Di Bartolo V, Alcover A. Rab11-FIP3 Regulation of Lck Endosomal Traffic Controls TCR Signal Transduction. *J Immunol*. 2017 Apr 1;198(7):2967-2978.

Brownlie RJ, Zamoyska R. T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded. *Nat Rev Immunol*. 2013 Apr;13(4):257-69.

Bunnell SC, Kapoor V, Triple RP, Zhang W, Samelson LE. Dynamic actin polymerization drives T cell receptor-induced spreading: a role for the signal transduction adaptor LAT. *Immunity*. 2001 Mar;14(3): 315-29.

- Burkhardt JK, McIlvain JM Jr, Sheetz MP, Argon Y.** Lytic granules from cytotoxic T cells exhibit kinesin-dependent motility on microtubules in vitro. *J Cell Sci.* 1993 Jan;104 (Pt 1):151-62.
- Campi G, Varma R, Dustin ML.** Actin and agonist MHC-peptide complex-dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling. *J Exp Med.* 2005, 202, 1031–1036.
- Choudhuri K, Llodra J, Roth EW, Tsai J, Gordo S, Wucherpfennig KW, Kam LC, Stokes DL, Dustin ML.** Polarized release of T-cell-receptor-enriched microvesicles at the immunological synapse. *Nature* . 2014, 507:118–123.
- Combs J, Kim SJ, Tan S, Ligon LA, Holzbaur EL, Kuhn J, Poenie M.** Recruitment of dynein to the Jurkat immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Oct 3;103(40):14883-8.
- Comrie WA, Babich A, Burkhardt JK.** F-actin flow drives affinity maturation and spatial organization of LFA-1 at the immunological synapse. *J Cell Biol.* 2015 Feb 16;208(4):475-91.
- Das V, Nal B, Dujeancourt A, Thoulouze MI, Galli T, Roux P, Dautry-Varsat A, Alcover A.** Activation-induced polarized recycling targets T cell antigen receptors to the immunological synapse; involvement of SNARE complexes. *Immunity.* 2004 May;20(5):577-88.
- Daniele T, Y. Hackmann, A. T. Ritter, M. Wenham, S. Booth, G. Bossi, M. Schintler, M. Auer-Grumbach, and G. M. Griffiths.** A role for Rab7 in the movement of secretory granules in cytotoxic T lymphocytes. *Traffic.* 2011, 12: 902–911
- De Saint Basile, G., G. Menasche, and A. Fischer.** Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nature reviews. Immunology.* 2010, 10:568-579.
- Dunn S, Morrison EE, Liverpool TB, Molina-París C, Cross RA, Alonso MC, Peckham M.** Differential trafficking of Kif5c on tyrosinated and detyrosinated microtubules in live cells. *J Cell Sci.* 2008 Apr 1;121(Pt 7):1085-95.
- Dustin ML, Long EO.** Cytotoxic immunological synapses. *Immunol Rev.* 2010 May;235(1):24-34.
- Finetti F, Patrussi L, Masi G, Onnis A, Galgano D, Lucherini OM, Pazour GJ, Baldari CT.** Specific recycling receptors are targeted to the immune synapse by the intraflagellar transport system. *J Cell Sci.* 2014 May 1;127(Pt 9):1924-37.
- Finetti F, Patrussi L, Galgano D, Cassioli C, Perinetti G, Pazour GJ, Baldari CT.** The small GTPase Rab8 interacts with VAMP-3 to regulate the delivery of recycling T-cell receptors to the immune synapse. *J Cell Sci.* 2015 Jul 15;128(14):2541-52.
- Fowler KT, Andrews NW, Huleatt JW.** Expression and function of synaptotagmin VII in CTLs. *J Immunol.* 2007 Feb 1;178(3):1498-504.
- Geiger B, Rosen D, Berke G.** Spatial relationships of microtubule-organizing centers and the contact area of cytotoxic T lymphocytes and target cells. *J Cell Biol.* 1982 Oct;95(1):137-43.
- Gomez TS, Kumar K, Medeiros RB, Shimizu Y, Leibson PJ, Billadeau DD.** Formins regulate the actin-related protein 2/3 complex-independent polarization of the centrosome to the immunological synapse. *Immunity.* 2007 Feb;26(2):177-90.
- Gorman JA, Babich A, Dick CJ, Schoon RA, Koenig A, Gomez TS, Burkhardt JK, Billadeau DD.** The cytoskeletal adaptor protein IQGAP1 regulates TCR-mediated signaling and filamentous actin dynamics. *J Immunol.* 2012 Jun 15;188(12):6135-44.
- Gorska MM, Liang Q, Karim Z, Alam R.** Uncoordinated 119 protein controls trafficking of Lck via the Rab11 endosome and is critical for immunological synapse formation. *J Immunol.* 2009 Aug 1;183(3): 1675-84.
- Hashimoto-Tane A, Yokosuka T, Sakata-Sogawa K, Sakuma M, Ishihara C, Tokunaga M, Saito T.** Dynein-driven transport of T cell receptor microclusters regulates immune synapse formation and T cell activation. *Immunity.* 2011 Jun 24;34(6):919-31.
- Janmey PA, Lindberg U.** Cytoskeletal regulation: rich in lipids. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004 Aug;5(8): 658-66.
- Jenkins MR, Tsun A, Stinchcombe JC, Griffiths GM.** The strength of T cell receptor signal controls the polarization of cytotoxic machinery to the immunological synapse. *Immunity.* 2009 Oct 16;31(4):621-31.
- Kaizuka Y, Douglass AD, Varma R, Dustin ML, Vale RD.** Mechanisms for segregating T cell receptor and adhesion molecules during immunological synapse formation in Jurkat T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Dec 18;104(51):20296-301.
- Kanwar N, Wilkins JA.** IQGAP1 involvement in MTOC and granule polarization in NK-cell cytotoxicity. *Eur J Immunol.* 2011 Sep;41(9):2763-73.
- Kim AS, Kakalis LT, Abdul-Manan N, Liu GA, Rosen MK.** Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott–Aldrich syndrome protein. *Nature.* 2000;404:151–158.
- Krummel MF, Sjaastad MD, Wülfing C, Davis MM.** Differential clustering of CD4 and CD3zeta during T cell recognition. *Science.* 2000 Aug 25;289(5483):1349-52.
- Kuhne, M.R., J. Lin, D. Yablonski, M.N. Mollenauer, L.I. Ehrlich, J. Huppa, M.M. Davis, and A. Weiss,** Linker for activation of T cells, zeta-associated protein-70, and Src homology 2 domain-containing

leukocyte protein-76 are required for TCR- induced microtubule-organizing center polarization. *J Immunol*. 2003. 171(2): p. 860- 6.

Kumari S, Depoil D, Martinelli R, Judokusumo E, Carmona G, Gertler FB, Kam LC, Carman CV, Burkhardt JK, Irvine DJ, Dustin ML. Actin foci facilitate activation of the phospholipase C- γ in primary T lymphocytes via the WASP pathway. *Elife*. 2015 Mar 11;4.

Kupfer A, Dennert G. Reorientation of the microtubule-organizing center and the Golgi apparatus in cloned cytotoxic lymphocytes triggered by binding to lysable target cells. *J Immunol*. 1984 Nov;133(5): 2762-6.

Laguerre K, Carisey A, Oszmiana A, Kennedy PR, Williamson DJ, Cartwright A, Barthen C, Davis DM. The central role of the cytoskeleton in mechanisms and functions of the NK cell immune synapse. *Immunol Rev*. 2013 Nov;256(1):203-21.

Larghi P, Williamson DJ, Carpier JM, Dogniaux S, Chemin K, Bohineust A, Danglot L, Gaus K, Galli T, Hivroz C. VAMP7 controls T cell activation by regulating the recruitment and phosphorylation of vesicular Lat at TCR-activation sites. *Nat Immunol*. 2013 Jul;14(7):723-31.

Lasserre R, Charrin S, Cuhe C, Danckaert A, Thoulouze MI, de Chaumont F, Duong T, Perrault N, Varin-Blank N, Olivo-Marin JC, Etienne-Manneville S, Arpin M, Di Bartolo V, Alcover A. Ezrin tunes T-cell activation by controlling Dlg1 and microtubule positioning at the immunological synapse. *EMBO J*. 2010 Jul 21;29(14):2301-14.

Le Floch A, Tanaka Y, Bantilan NS, Voisinne G, Altan-Bonnet G, Fukui Y, Huse M. Annular PIP3 accumulation controls actin architecture and modulates cytotoxicity at the immunological synapse. *J Exp Med*. 2013 Nov 18;210(12):2721-37.

Lee KH, Holdorf AD, Dustin ML, Chan AC, Allen PM, Shaw AS. T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science*. 2002 Feb 22;295(5559):1539-42.

Lee KH, Dinner AR, Tu C, Campi G, Raychaudhuri S, Varma R, Sims TN, Burack WR, Wu H, Wang J, Kanagawa O, Markiewicz M, Allen PM, Dustin ML, Chakraborty AK, Shaw AS. The immunological synapse balances T cell receptor signaling and degradation. *Science*. 2003 Nov 14;302(5648):1218-22.

Lin J, Hou KK, Piwnicka-Worms H, Shaw AS. The polarity protein Par1b/EMK/MARK2 regulates T cell receptor-induced microtubule-organizing center polarization. *J Immunol*. 2009 Jul 15;183(2):1215-21.

Liu X, Kapoor TM, Chen JK, Huse M. Diacylglycerol promotes centrosome polarization in T cells via reciprocal localization of dynein and myosin II. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jul 16;110(29):11976-81.

Ludford-Menting MJ, Oliaro J, Sacirbegovic F, Cheah ET, Pedersen N, Thomas SJ, Pasam A, Iazzolino R, **Dow LE**, Waterhouse NJ, Murphy A, Ellis S, Smyth MJ, Kershaw MH, Darcy PK, Humbert PO, Russell SM. A network of PDZ-containing proteins regulates T cell polarity and morphology during migration and immunological synapse formation. *Immunity*. 2005 Jun;22(6):737-48.

Martín-Cófreces NB, Robles-Valero J, Cabrero JR, Mittelbrunn M, Gordón-Alonso M, Sung CH, Alarcón B, Vázquez J, Sánchez-Madrid F. MTOC translocation modulates IS formation and controls sustained T cell signaling. *J Cell Biol*. 2008 Sep 8;182(5):951-62.

Matsuo H, Chevallier J, Mayran N, Le Blanc I, Ferguson C, Fauré J, Blanc NS, Matile S, Dubochet J, Sadoul R, Parton RG, Vilbois F, Gruenberg J. Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science*. 2004 Jan 23;303(5657):531-4.

Mentlik AN, Sanborn KB, Holzbaur EL, Orange JS. Rapid lytic granule convergence to the MTOC in natural killer cells is dependent on dynein but not cytolytic commitment. *Mol Biol Cell*. 2010 Jul 1;21(13): 2241-56.

Miletic AV, Graham DB, Sakata-Sogawa K, Hiroshima M, Hamann MJ, Cemerski S, Kloeppe T, Billadeau DD, Kanagawa O, Tokunaga M, Swat W. Vav links the T cell antigen receptor to the actin cytoskeleton and T cell activation independently of intrinsic Guanine nucleotide exchange activity. *PLoS One*. 2009 Aug 12;4(8):e6599.

Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A. Pillars article: Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*. 1998. 395: 82-86.

Nolz JC, Gomez TS, Zhu P, Li S, Medeiros RB, Shimizu Y, Burkhardt JK, Freedman BD, Billadeau DD. The WAVE2 complex regulates actin cytoskeletal reorganization and CRAC-mediated calcium entry during T cell activation. *Current Biology*. 2006, 16:24–34.

Onnis A, Finetti F, Patrussi L, Gottardo M, Cassioli C, Spanò S, et al. The small GTPase Rab29 is a common regulator of immune synapse assembly and ciliogenesis. *Cell Death Differ*. 2015, 22:1687–99.

Patino-Lopez G, Dong X, Ben-Aissa K, Bernot KM, Itoh T, Fukuda M, Kruhlak MJ, Samelson LE, Shaw S. Rab35 and its GAP EPI64C in T cells regulate receptor recycling and immunological synapse formation. *J Biol Chem*. 2008 Jun 27;283(26):18323-30.

Quann EJ, Merino E, Furuta T, Huse M. Localized diacylglycerol drives the polarization of the microtubule-organizing center in T cells. *Nat Immunol*. 2009 Jun;10(6):627-35.

Raucher D, Stauffer T, Chen W, Shen K, Guo S, York JD, Sheetz MP, Meyer T. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate functions as a second messenger that regulates cytoskeleton-plasma membrane adhesion. *Cell*. 2000 Jan 21;100(2):221-8.

Ritter AT, Angus KL, Griffiths GM. The role of the cytoskeleton at the immunological synapse. *Immunol Rev*. 2013 Nov;256(1):107-17.

Ritter AT, Asano Y, Stinchcombe JC, Dieckmann NM, Chen BC, Gawden-Bone C, van Engelenburg S, Legant W, Gao L, Davidson MW, Betzig E, Lippincott-Schwartz J, Griffiths GM. Actin depletion initiates events leading to granule secretion at the immunological synapse. *Immunity*. 2015 May 19;42(5):864-76.

Ryser JE, Rungger-Brändle E, Chaponnier C, Gabbiani G, Vassalli P. The area of attachment of cytotoxic T lymphocytes to their target cells shows high motility and polarization of actin, but not myosin. *J Immunol*. 1982 Mar;128(3):1159-62.

Schamel WW, Arechaga I, Risueño RM, van Santen HM, Cabezas P, Risco C, Valpuesta JM, Alarcón B. Coexistence of multivalent and monovalent TCRs explains high sensitivity and wide range of response. *J Exp Med*. 2005 Aug 15;202(4):493-503.

Soares H, Henriques R, Sachse M, Ventimiglia L, Alonso MA, Zimmer C, Thoulouze MI, Alcover A. Regulated vesicle fusion generates signaling nanoterritories that control T cell activation at the immunological synapse. *J Exp Med*. 2013 Oct 21;210(11):2415-33.

Stinchcombe JC, Bossi G, Booth S, Griffiths GM. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity*. 2001 Nov;15(5):751-61.

Stinchcombe JC, Majorovits E, Bossi G, Fuller S, Griffiths GM. Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature*. 2006 Sep 28;443(7110):462-5.

Stowers L, D. Yelon, L.J. Berg, and J. Chant, Regulation of the polarization of T cells toward antigen-presenting cells by Ras-related GTPase CDC42. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(11): p. 5027-31.

Tsun A, Qureshi I, Stinchcombe JC, Jenkins MR, de la Roche M, Kleczkowska J, Zamoyska R, Griffiths GM. Centrosome docking at the immunological synapse is controlled by Lck signaling. *J Cell Biol*. 2011 Feb 21;192(4):663-74.

Valitutti S, Dessing M, Aktories K, Gallati H, Lanzavecchia A. Sustained signaling leading to T cell activation results from prolonged T cell receptor occupancy. Role of T cell actin cytoskeleton. *J Exp Med*. 1995 Feb 1;181(2):577-84.

Vardhana S, Choudhuri K, Varma R, Dustin ML. Essential role of ubiquitin and TSG101 protein in formation and function of the central supramolecular activation cluster. *Immunity*. 2010 Apr 23;32(4):531-40.

Varma R, Campi G, Yokosuka T, Saito T, Dustin ML. T cell receptor-proximal signals are sustained in peripheral microclusters and terminated in the central supramolecular activation cluster. *Immunity*. 2006 Jul;25(1):117-27.

Wei SY, Lin TE, Wang WL, Lee PL, Tsai MC, Chiu JJ. Protein kinase C- δ and - β coordinate flow-induced directionality and deformation of migratory human blood T-lymphocytes. *J Mol Cell Biol*. 2014 Dec;6(6):458-72.

Wiedemann A, Depoil D, Faroudi M, Valitutti S. Cytotoxic T lymphocytes kill multiple targets simultaneously via spatiotemporal uncoupling of lytic and stimulatory synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jul 18;103(29):10985-90.

Yi J, Wu XS, Crites T, Hammer JA 3rd. Actin retrograde flow and actomyosin II arc contraction drive receptor cluster dynamics at the immunological synapse in Jurkat T cells. *Mol Biol Cell*. 2012 Mar;23(5):834-52.

Yokosuka T, Sakata-Sogawa K, Kobayashi W, Hiroshima M, Hashimoto-Tane A, Tokunaga M, Dustin ML, Saito T. Newly generated T cell receptor microclusters initiate and sustain T cell activation by recruitment of Zap70 and SLP-76. *Nat Immunol*. 2005 Dec;6(12):1253-62.

Yokosuka T, Kobayashi W, Sakata-Sogawa K, Takamatsu M, Hashimoto-Tane A, Dustin ML, Tokunaga M, Saito T. Spatiotemporal regulation of T cell costimulation by TCR-CD28 microclusters and protein kinase C theta translocation. *Immunity*. 2008 Oct 17;29(4):589-601.

Yu Y, Fay NC, Smoligovets AA, Wu HJ, Groves JT. Myosin IIA modulates T cell receptor transport and CasL phosphorylation during early immunological synapse formation. *PLoS One*. 2012;7(2):e30704.

B- Le syndrome hémophagocytaire (SH): Découverte des acteurs clés de la machinerie d'exocytose des granules lytiques

Syndrome hémophagocytaire / mécanisme de sécrétion des granules lytiques:

Barbosa MD, Barrat FJ, Tchernev VT, Nguyen QA, Mishra VS, Colman SD, Pastural E, Dufourcq-Lagelouse R, Fischer A, Holcombe RF, Wallace MR, Brandt SJ, de Saint Basile G, Kingsmore SF.

Identification of mutations in two major mRNA isoforms of the Chediak-Higashi syndrome gene in human and mouse. *Hum Mol Genet.* 1997 Jul;6(7):1091-8.

Boswell KL, James DJ, Esquibel JM, Bruinsma S, Shirakawa R, Horiuchi H, Martin TF. Munc13-4 reconstitutes calcium-dependent SNARE-mediated membrane fusion. *J Cell Biol.* 2012 Apr 16;197(2):301-12.

Bryceson YT, Rudd E, Zheng C, Edner J, Ma D, Wood SM, Bechensteen AG, Boelens JJ, Celkan T, Farah RA, Hultenby K, Winiarski J, Roche PA, Nordenskjöld M, Henter JI, Long EO, Ljunggren HG. Defective cytotoxic lymphocyte degranulation in syntaxin-11 deficient familial hemophagocytic lymphohistiocytosis 4 (FHL4) patients. *Blood.* 2007 Sep 15;110(6):1906-15.

Côte M, Ménager MM, Burgess A, Mahlaoui N, Picard C, Schaffner C, Al-Manjomi F, Al-Harbi M, Alangari A, Le Deist F, Gennery AR, Prince N, Cariou A, Nitschke P, Blank U, El-Ghazali G, Ménasché G, Latour S, Fischer A, de Saint Basile G. Munc18-2 deficiency causes familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 5 and impairs cytotoxic granule exocytosis in patient NK cells. *J Clin Invest.* 2009 Dec;119(12):3765-73.

Elstak ED, Neeft M, Nehme NT, Voortman J, Cheung M, Goodarzifard M, Gerritsen HC, van Bergen En Henegouwen PM, Callebaut I, de Saint Basile G, van der Sluijs P. The munc13-4-rab27 complex is specifically required for tethering secretory lysosomes at the plasma membrane. *Blood.* 2011 Aug 11;118(6):1570-8.

Feldmann J, Callebaut I, Raposo G, Certain S, Bacq D, Dumont C, Lambert N, Ouachée-Chardin M, Chedeville G, Tamary H, Minard-Colin V, Vilmer E, Blanche S, Le Deist F, Fischer A, de Saint Basile G. Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell.* 2003 Nov 14;115(4):461-73.

Fowler KT, Andrews NW, Huleatt JW. Expression and function of synaptotagmin VII in CTLs. *J Immunol.* 2007 Feb 1;178(3):1498-504

Fukuda M, Saegusa C, Mikoshiba K. Novel splicing isoforms of synaptotagmin-like proteins 2 and 3: identification of the Slp homology domain. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 283:513-519.

Fukuda M. The C2A domain of synaptotagmin-like protein 3 (Slp3) is an atypical calcium-dependent phospholipid-binding machine: comparison with the C2A domain of synaptotagmin I. *Biochem J.* 2002 Sep 1;366(Pt 2):681-7.

Hackmann Y, Graham SC, Ehl S, Höning S, Lehmborg K, Aricò M, Owen DJ, Griffiths GM. Syntaxin binding mechanism and disease-causing mutations in Munc18-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Nov 19;110(47):E4482-91.

Halimani M, Pattu V, Marshall MR, Chang HF, Matti U, Jung M, Becherer U, Krause E, Hoth M, Schwarz EC, Rettig J. Syntaxin11 serves as a t-SNARE for the fusion of lytic granules in human cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 2014 Feb;44(2):573-84.

Holt O, Kanno E, Bossi G, Booth S, Daniele T, Santoro A, Arico M, Saegusa C, Fukuda M, Griffiths GM. Slp1 and Slp2-a localize to the plasma membrane of CTL and contribute to secretion from the immunological synapse. *Traffic.* 2008 Apr;9(4):446-57.

Kuroda TS, Fukuda M, Ariga H, Mikoshiba K. The Slp homology domain of synaptotagmin-like proteins 1-4 and Slac2 functions as a novel Rab27A binding domain. *J Biol Chem.* 2002;277:9212- 9218.

Kurowska M, Goudin N, Nehme NT, Court M, Garin J, Fischer A, de Saint Basile G, Ménasché G. Terminal transport of lytic granules to the immune synapse is mediated by the kinesin-1/Slp3/Rab27a complex. *Blood.* 2012 Apr 26;119(17):3879-89.

Krzewski K, Gil-Krzewska A, Watts J, Stern JN, Strominger JL. VAMP4- and VAMP7-expressing vesicles are both required for cytotoxic granule exocytosis in NK cells. *Eur J Immunol.* 2011 Nov;41(11):3323-9.

Loo LS, Hwang LA, Ong YM, Tay HS, Wang CC, Hong W. A role for endobrevin/VAMP8 in CTL lytic granule exocytosis. *Eur J Immunol.* 2009 Dec;39(12):3520-8.

Marshall MR, Pattu V, Halimani M, Maier-Peuschel M, Müller ML, Becherer U, Hong W, Hoth M, Tschernig T, Bryceson YT, Rettig J. VAMP8-dependent fusion of recycling endosomes with the plasma membrane facilitates T lymphocyte cytotoxicity. *J Cell Biol.* 2015 Jul 6;210(1):135-51.

Matti U, Pattu V, Halimani M, Schirra C, Krause E, Liu Y, Weins L, Chang HF, Guzman R, Olausson J, Freichel M, Schmitz F, Pasche M, Becherer U, Bruns D, Rettig J. Synaptobrevin2 is the v-SNARE required for cytotoxic T-lymphocyte lytic granule fusion. *Nat Commun.* 2013;4:1439.

Ménager MM, Ménasché G, Romao M, Knapnougel P, Ho CH, Garfa M, Raposo G, Feldmann J, Fischer A, de Saint Basile G. Secretory cytotoxic granule maturation and exocytosis require the effector protein hMunc13-4. *Nat Immunol.* 2007 Mar;8(3):257-67.

Ménasché G, Pastural E, Feldmann J, Certain S, Ersoy F, Dupuis S, Wulffraat N, Bianchi D, Fischer A, Le Deist F, de Saint Basile G. Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat Genet.* 2000 Jun;25(2):173-6.

Menasche, G., J. Feldmann, A. Fischer, and G. de Saint Basile, Primary hemophagocytic syndromes point to a direct link between lymphocyte cytotoxicity and homeostasis. *Immunol Rev*, 2005. 203: p. 165-79.

Ménasché G, Ménager MM, Lefebvre JM, Deutsch E, Athman R, Lambert N, Mahlaoui N, Court M, Garin J, Fischer A, de Saint Basile G. A newly identified isoform of Slp2a associates with Rab27a in cytotoxic T cells and participates to cytotoxic granule secretion. *Blood.* 2008 Dec 15;112(13):5052-62.

Müller ML, Chiang SC, Meeths M, Tesi B, Entesarian M, Nilsson D, Wood SM, Nordenskjöld M, Henter JI, Naqvi A, Bryceson YT. An N-Terminal Missense Mutation in STX11 Causative of FHL4 Abrogates Syntaxin-11 Binding to Munc18-2. *Front Immunol.* 2014 Jan 14;4:515.

Perou CM, Leslie JD, Green W, Li L, Ward DM, Kaplan J. The Beige/Chediak-Higashi syndrome gene encodes a widely expressed cytosolic protein. *J Biol Chem.* 1997 Nov 21;272(47):29790-4.

Sepulveda FE, Burgess A, Heiligenstein X, Goudin N, Ménager MM, Romao M, Côte M, Mahlaoui N, Fischer A, Raposo G, Ménasché G, de Saint Basile G. LYST controls the biogenesis of the endosomal compartment required for secretory lysosome function. *Traffic.* 2015 Feb;16(2):191-203.

Stepp SE, Dufourcq-Lagelouse R, Le Deist F, Bhawan S, Certain S, Mathew PA, Henter JI, Bennett M, Fischer A, de Saint Basile G, Kumar V. Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Science.* 1999 Dec 3;286(5446):1957-9.

Steegmaier, M., Klumperman, J., Foletti, D. L., Yoo, J. S. and Scheller, R. H., Vesicle-associated membrane protein 4 is implicated in trans-Golgi network vesicle trafficking. *Mol. Biol. Cell* 1999. 10: 1957–1972.

Stinchcombe JC, Barral DC, Mules EH, Booth S, Hume AN, Machesky LM, Seabra MC, Griffiths GM. Rab27a is required for regulated secretion in cytotoxic T lymphocytes. *J Cell Biol.* 2001 Feb 19;152(4):825-34.

Stinchcombe JC, Page LJ, Griffiths GM. Secretory lysosome biogenesis in cytotoxic T lymphocytes from normal and Chediak-Higashi syndrome patients. *Traffic* 2000;1:435–444.

Valdez AC, Cabaniols JP, Brown MJ, Roche PA. Syntaxin 11 is associated with SNAP-23 on late endosomes and the trans-Golgi network. *J Cell Sci.* 1999 Mar;112 (Pt 6):845-54.

Van der Sluijs P, Zibouche M, van Kerkhof P. Late steps in secretory lysosome exocytosis in cytotoxic lymphocytes. *Front Immunol.* 2013 Nov 18;4:359.

Wang J, Takeuchi T, Yokota H, Izumi T. Novel rabphilin-3-like protein associates with insulin-containing granules in pancreatic beta cells. *J Biol Chem.* 1999;274:28542-28548.

Wilson SM, Yip R, Swing DA, O'Sullivan TN, Zhang Y, Novak EK, Swank RT, Russell LB, Copeland NG, Jenkins NA. A mutation in Rab27a causes the vesicle transport defects observed in ashen mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jul 5;97(14):7933-8.

Zur Stadt U, Schmidt S, Kasper B, Beutel K, Diler AS, Henter JI, Kabisch H, Schneppenheim R, Nürnberg P, Janka G, Hennies HC. Linkage of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) type-4 to chromosome 6q24 and identification of mutations in syntaxin 11. *Hum Mol Genet.* 2005 Mar 15;14(6):827-34.

Zur Stadt U, Rohr J, Seifert W, Koch F, Grieve S, Pagel J, Strauss J, Kasper B, Nürnberg G, Becker C, Maul-Pavicic A, Beutel K, Janka G, Griffiths G, Ehl S, Hennies HC. Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 5 (FHL-5) is caused by mutations in Munc18-2 and impaired binding to syntaxin 11. *Am J Hum Genet.* 2009 Oct;85(4):482-92.

La kinésine-1:

Amato S, Man HY. AMPK signaling in neuronal polarization: Putting the brakes on axonal traffic of PI3-Kinase. *Commun Integr Biol.* 2012 Mar 1;5(2):152-5.

Arimura N, Kimura T, Nakamuta S, Taya S, Funahashi Y, Hattori A, Shimada A, Ménager C, Kawabata S, Fujii K, Iwamatsu A, Segal RA, Fukuda M, Kaibuchi K. Anterograde transport of TrkB in axons is mediated by direct interaction with Slp1 and Rab27. *Dev Cell.* 2009 May;16(5):675-86.

Campbell PD, Shen K, Sapio MR, Glenn TD, Talbot WS, Marlow FL. Unique function of Kinesin Kif5A in localization of mitochondria in axons. *J Neurosci.* 2014 Oct 29;34(44):14717-32.

Chua JJ, Butkevich E, Worseck JM, Kittelmann M, Grønborg M, Behrmann E, Stelzl U, Pavlos NJ, Lalowski MM, Eimer S, Wanker EE, Klopfenstein DR, Jahn R. Phosphorylation-regulated axonal dependent transport of syntaxin 1 is mediated by a Kinesin-1 adapter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Apr 10;109(15):5862-7.

Cui J, Wang Z, Cheng Q, Lin R, Zhang XM, Leung PS, Copeland NG, Jenkins NA, Yao KM, Huang JD. Targeted inactivation of kinesin-1 in pancreatic β -cells in vivo leads to insulin secretory deficiency. *Diabetes.* 2011 Jan;60(1):320-30.

Diefenbach RJ, Diefenbach E, Douglas MW, Cunningham AL. The heavy chain of conventional kinesin interacts with the SNARE proteins SNAP25 and SNAP23. *Biochemistry*. 2002 Dec 17;41(50):14906-15.

Diefenbach RJ, Davis A, Miranda-Saksena M, Fernandez MA, Kelly BJ, Jones CA, LaVail JH, Xue J, Lai J, Cunningham AL. The Basic Domain of Herpes Simplex Virus 1 pUS9 Recruits Kinesin-1 To Facilitate Egress from Neurons. *J Virol*. 2015 Dec 9;90(4):2102-11.

Fader CM, Aguilera MO, Colombo MI. ATP is released from autophagic vesicles to the extracellular space in a VAMP7-dependent manner. *Autophagy*. 2012 Dec;8(12):1741-56.

Farías GG, Guardia CM, De Pace R, Britt DJ, Bonifacino JS. BORC/kinesin-1 ensemble drives polarized transport of lysosomes into the axon. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Apr 4;114(14):E2955-E2964.

Fukuda M, Saegusa C, Mikoshiba K. Novel splicing isoforms of synaptotagmin-like proteins 2 and 3: identification of the Slp homology domain. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 283:513-519.

Gudkov AV, Kazarov AR, Thimmapaya R, Axenovich SA, Mazo IA, Roninson IB. Cloning mammalian genes by expression selection of genetic suppressor elements: association of kinesin with drug resistance and cell immortalization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Apr 26;91(9):3744-8.

Ishida M, Ohbayashi N, Fukuda M. Rab1A regulates anterograde melanosome transport by recruiting kinesin-1 to melanosomes through interaction with SKIP. *Sci Rep*. 2015 Feb 4;5:8238.

Kanai Y, Okada Y, Tanaka Y, Harada A, Terada S, Hirokawa N. KIF5C, a novel neuronal kinesin enriched in motor neurons. *J Neurosci*. 2000 Sep 1;20(17):6374-84.

Kaniuk NA, Canadien V, Bagshaw RD, Bakowski M, Braun V, Landekic M, Mitra S, Huang J, Heo WD, Meyer T, Pelletier L, Andrews-Polymeris H, McClelland M, Pawson T, Grinstein S, Brumell JH. Salmonella exploits Arl8B-directed kinesin activity to promote endosome tubulation and cell-to-cell transfer. *Cell Microbiol*. 2011 Nov;13(11):1812-23.

Karle KN, Möckel D, Reid E, Schöls L. Axonal transport deficit in a KIF5A(-/-) mouse model. *Neurogenetics*. 2012 May;13(2):169-79.

Kurowska M, Goudin N, Nehme NT, Court M, Garin J, Fischer A, de Saint Basile G, Ménasché G. Terminal transport of lytic granules to the immune synapse is mediated by the kinesin-1/Slp3/Rab27a complex. *Blood*. 2012 Apr 26;119(17):3879-89.

Malikov V, da Silva ES, Jovasevic V, Bennett G, de Souza Aranha Vieira DA, Schulte B, Diaz-Griffero F, Walsh D, Naghavi MH. HIV-1 capsids bind and exploit the kinesin-1 adaptor FEZ1 for inward movement to the nucleus. *Nat Commun*. 2015 Mar 30;6:6660.

Maritzen T, Haucke V. Gadkin: A novel link between endosomal vesicles and microtubule tracks. *Commun Integr Biol*. 2010 Jul;3(4):299-302.

Morgan GW, Hollinshead M, Ferguson BJ, Murphy BJ, Carpentier DC, Smith GL. Vaccinia protein F12 has structural similarity to kinesin light chain and contains a motor binding motif required for virion export. *PLoS Pathog*. 2010 Feb 26;6(2):e1000785.

Morton AM, Cunningham AL, Diefenbach RJ. Kinesin-1 plays a role in transport of SNAP-25 to the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Jan 1;391(1):388-93.

Munoz I, Danelli L, Claver J, Goudin N, Kurowska M, Madera-Salcedo IK, Huang JD, Fischer A, González-Espinosa C, de Saint Basile G, Blank U, Ménasché G. Kinesin-1 controls mast cell degranulation and anaphylaxis through PI3K-dependent recruitment to the granular Slp3/Rab27b complex. *J Cell Biol*. 2016 Oct 24;215(2):203-216.

Nakajima K, Yin X, Takei Y, Seog DH, Homma N, Hirokawa N. Molecular motor KIF5A is essential for GABA(A) receptor transport, and KIF5A deletion causes epilepsy. *Neuron*. 2012 Dec 6;76(5):945-61.

Raiborg C, Wenzel EM, Pedersen NM, Stenmark H. ER-endosome contact sites in endosome positioning and protrusion outgrowth. *Biochem Soc Trans*. 2016 Apr 15;44(2):441-6.

Reid E, Dearlove AM, Rhodes M, Rubinsztein DC. A new locus for autosomal dominant "pure" hereditary spastic paraplegia mapping to chromosome 12q13, and evidence for further genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet*. 1999 Sep;65(3):757-63.

Reid E, Kloos M, Ashley-Koch A, Hughes L, Bevan S, Svenson IK, Graham FL, Gaskell PC, Dearlove A, Pericak-Vance MA, Rubinsztein DC, Marchuk DA. A kinesin heavy chain (KIF5A) mutation in hereditary spastic paraplegia (SPG10). *Am J Hum Genet*. 2002 Nov;71(5):1189-94.

Schmidt MR, Maritzen T, Kukhtina V, Higman VA, Doglio L, Barak NN, Strauss H, Oschkinat H, Dotti CG, Haucke V. Regulation of endosomal membrane traffic by a Gadkin/AP-1/kinesin KIF5 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Sep 8;106(36):15344-9.

Skoufias DA, Cole DG, Wedaman KP, Scholey JM. The carboxyl-terminal domain of kinesin heavy chain is important for membrane binding. *J Biol Chem*. 1994 Jan 14;269(2):1477-85.

Tanaka Y, Kanai Y, Okada Y, Nonaka S, Takeda S, Harada A, Hirokawa N. Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain, kif5B, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria. *Cell*. 1998 Jun 26;93(7):1147-58.

Wang X, Schwarz TL. The mechanism of Ca²⁺-dependent regulation of kinesin-mediated mitochondrial motility. *Cell*. 2009 Jan 9;136(1):163-74.

Wang Z, Cui J, Wong WM, Li X, Xue W, Lin R, Wang J, Wang P, Tanner JA, Cheah KS, Wu W, Huang JD. Kif5b controls the localization of myofibril components for their assembly and linkage to the myotendinous junctions. *Development*. 2013 Feb 1;140(3):617-26.

Chapitre III: Le mécanisme de sécrétion des mastocytes

A- Généralités sur les mastocytes murins:

1-La différenciation des mastocytes:

Arinobu Y, Iwasaki H, Gurish MF, Mizuno S, Shigematsu H, Ozawa H, Tenen DG, Austen KF, Akashi K. Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Dec 13;102(50):18105-10.

Arinobu Y, Iwasaki H, Akashi K. Origin of basophils and mast cells. *Allergol Int*. 2009 Mar;58(1):21-8.

Besmer P, Manova K, Duttlinger R, Huang EJ, Packer A, Gyssler C, Bachvarova RF. The kit-ligand (steel factor) and its receptor c-kit/W: pleiotropic roles in gametogenesis and melanogenesis. *Dev Suppl* 1993: 125–137.

Chen CC, Grimbaldston MA, Tsai M, Weissman IL, Galli SJ. Identification of mast cell progenitors in adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Aug 9;102(32):11408-13.

Franco CB, Chen CC, Drukker M, Weissman IL, Galli SJ. Distinguishing mast cell and granulocyte differentiation at the single-cell level. *Cell stem cell*. 2010;6:361–368.

Iwasaki H, Mizuno S, Arinobu Y, Ozawa H, Mori Y, Shigematsu H, Takatsu K, Tenen DG, Akashi K. The order of expression of transcription factors directs hierarchical specification of hematopoietic lineages. *Genes Dev*. 2006 Nov 1;20(21):3010-21.

Kitamura Y, Go S, Hatanaka K. Decrease of mast cells in W/W^v mice and their increase by bone marrow transplantation. *Blood*. 1978 Aug;52(2):447-52.

Li Y, Qi X, Liu B, Huang H. The STAT5-GATA2 pathway is critical in basophil and mast cell differentiation and maintenance. *J Immunol*. 2015 May 1;194(9):4328-38.

Migliaccio AR, Rana RA, Sanchez M, Lorenzini R, Centurione L, Bianchi L, Vannucchi AM, Migliaccio G, Orkin SH. GATA-1 as a regulator of mast cell differentiation revealed by the phenotype of the GATA-1^{low} mouse mutant. *J Exp Med*. 2003 Feb 3;197(3):281-96.

Mukai, K., BenBarak, M.J., Tachibana, M., Nishida, K., Karasuyama, H., Taniuchi, I., and Galli, S.J. Critical role of P1-Runx1 in mouse basophil development. *Blood*. 2012, 120, 76–85.

Qi X, Hong J, Chaves L, Zhuang Y, Chen Y, Wang D, Chabon J, Graham B, Ohmori K, Li Y, Huang H. Antagonistic regulation by the transcription factors C/EBP α and MITF specifies basophil and mast cell fates. *Immunity*. 2013;39:97–110.

Rodewald HR, Dessing M, Dvorak AM, Galli SJ. Identification of a committed precursor for the mast cell lineage. *Science*. 1996 Feb 9;271(5250):818-22.

Sakata-Yanagimoto M, Nakagami-Yamaguchi E, Saito T, Kumano K, Yasutomo K, Ogawa S, Kurokawa M, Chiba S. Coordinated regulation of transcription factors through Notch2 is an important mediator of mast cell fate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jun 3;105(22):7839-44.

Shelburne CP, McCoy ME, Piekorz R, Sexl V, Roh KH, Jacobs-Helber SM, Gillespie SR, Bailey DP, Mirmonsef P, Mann MN, Kashyap M, Wright HV, Chong HJ, Bouton LA, Barnstein B, Ramirez CD, Bunting KD, Sawyer S, Lantz CS, Ryan JJ. Stat5 expression is critical for mast cell development and survival. *Blood*. 2003 Aug 15;102(4):1290-7.

2- La migration des mastocytes:

Brzezińska-Błaszczyk E, Pietrzak A, Misiak-Tłoczek AH. Tumor necrosis factor (TNF) is a potent rat mast cell chemoattractant. *J Interferon Cytokine Res*. 2007 Nov;27(11):911-9.

Eller K, Wolf D, Huber JM, Metz M, Mayer G, McKenzie AN, Maurer M, Rosenkranz AR, Wolf AM: IL-9 production by regulatory T cells recruits mast cells that are essential for regulatory T cell-induced immune suppression. *J Immunol* 2011, 186:83-91.

Gruber BL, Marchese MJ, Kew RR. Transforming growth factor-beta 1 mediates mast cell chemotaxis. *J Immunol*. 1994 Jun 15;152(12):5860-7.

Gurish MF, Tao H, Abonia JP, Arya A, Friend DS, Parker CM, Austen KF. Intestinal mast cell progenitors require CD49beta7 (alpha4beta7 integrin) for tissue-specific homing. *J Exp Med*. 2001 Nov 5;194(9):1243-52.

Halova I, Draberova L, Draber P. Mast cell chemotaxis - chemoattractants and signaling pathways. *Front Immunol*. 2012 May 25;3:119.

Jolly PS, Bektas M, Olivera A, Gonzalez-Espinosa C, Proia RL, Rivera J, Milstien S, Spiegel S. Transactivation of sphingosine-1-phosphate receptors by FcepsilonRI triggering is required for normal mast cell degranulation and chemotaxis. *J Exp Med*. 2004 Apr 5;199(7):959-70.

Kitaura J, Kinoshita T, Matsumoto M, Chung S, Kawakami Y, Leitges M, Wu D, Lowell CA, Kawakami T. IgE- and IgE+Ag-mediated mast cell migration in an autocrine/paracrine fashion. *Blood*. 2005 Apr 15;105(8):3222-9.

Matsuura N, Zetter BR. Stimulation of mast cell chemotaxis by interleukin 3. *J Exp Med*. 1989 Oct 1;170(4):1421-6.

Meininger CJ, Yano H, Rottapel R, Bernstein A, Zsebo KM, Zetter BR. The c-kit receptor ligand functions as a mast cell chemoattractant. *Blood*. 1992 Feb 15;79(4):958-63.

Nilsson G, Mikovits JA, Metcalfe DD, Taub DD. Mast cell migratory response to interleukin-8 is mediated through interaction with chemokine receptor CXCR2/Interleukin-8RB. *Blood* 1999;93: 2791–2797.

Sawada J, Itakura A, Tanaka A, Furusaka T, Matsuda H. Nerve growth factor functions as a chemoattractant for mast cells through both mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathways. *Blood*. 2000 Mar 15;95(6):2052-8.

Taub D, Dastych J, Inamura N, Upton J, Kelvin D, Metcalfe D, Oppenheim J. Bone marrow-derived murine mast cells migrate, but do not degranulate, in response to chemokines. *J Immunol*. 1995 Mar 1;154(5):2393-402.

Weller CL, Collington SJ, Hartnell A, Conroy DM, Kaise T, Barker JE, Wilson MS, Taylor GW, Jose PJ, Williams TJ. Chemotactic action of prostaglandin E2 on mouse mast cells acting via the PGE2 receptor 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jul 10;104(28):11712-7.

Weller CL, Collington SJ, Brown JK, Miller HR, Al-Kashi A, Clark P, Jose PJ, Hartnell A, Williams TJ. Leukotriene B4, an activation product of mast cells, is a chemoattractant for their progenitors. *J Exp Med*. 2005 Jun 20;201(12):1961-71.

Woo CH, Jeong DT, Yoon SB, Kim KS, Chung IY, Saeki T, Kim JH. Eotaxin induces migration of RBL-2H3 mast cells via a Rac-ERK-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Nov 1;298(3):392-7.

3- La maturation des mastocytes:

Gurish MF, Pear WS, Stevens RL, Scott ML, Sokol K, Ghildyal N, Webster MJ, Hu X, Austen KF, Baltimore D, et al. Tissue-regulated differentiation and maturation of a v-abl-immortalized mast cell-committed progenitor. *Immunity*. 1995 Aug;3(2):175-86.

Wernersson S, Pejler G. Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nat Rev Immunol*. 2014 Jul; 14(7):478-94.

Friend DS, Ghildyal N, Austen KF, Gurish MF, Matsumoto R, Stevens RL. Mast cells that reside at different locations in the jejunum of mice infected with *Trichinella spiralis* exhibit sequential changes in their granule ultrastructure and chymase phenotype. *J Cell Biol*. 1996 Oct;135(1):279-90

4- Les médiateurs de l'inflammation:

Ashina K, Tsubosaka Y, Nakamura T, Omori K, Kobayashi K, Hori M, Ozaki H, Murata T. Histamine Induces Vascular Hyperpermeability by Increasing Blood Flow and Endothelial Barrier Disruption In vivo. *PLoS One*. 2015 Jul 9;10(7):e0132367.

Bell A, Althaus M, Diener M. Communication between mast cells and rat submucosal neurons. *Pflugers Arch*. 2015 Aug;467(8):1809-23.

Benditt EP, Arase M: An enzyme in mast cells with properties like chymotrypsin. *J Exp Med* 1959, 110:451-460.

Boesiger J, Tsai M, Maurer M, Yamaguchi M, Brown LF, Claffey KP, Dvorak HF, Galli SJ. Mast cells can secrete vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor and exhibit enhanced release after immunoglobulin E-dependent upregulation of fc epsilon receptor I expression. *J Exp Med*. 1998 Sep 21;188(6):1135-45.

Bradding P, Feather IH, Howarth PH, Mueller R, Roberts JA, Britten K, Bews JP, Hunt TC, Okayama Y, Heusser CH, et al. Interleukin 4 is localized to and released by human mast cells. *J Exp Med*. 1992 Nov 1;176(5):1381-6.

- Freeman** JG, Ryan JJ, Shelburne CP, Bailey DP, Bouton LA, Narasimhachari N, Domen J, Siméon N, Couderc F, Stewart JK. Catecholamines in murine bone marrow derived mast cells. *J Neuroimmunol.* 2001 Oct 1;119(2):231-8.
- Fukuishi** N, Murakami S, Ohno A, Yamanaka N, Matsui N, Fukutsuji K, Yamada S, Itoh K, Akagi M. Does β -hexosaminidase function only as a degranulation indicator in mast cells? The primary role of β -hexosaminidase in mast cell granules. *J Immunol.* 2014 Aug 15;193(4):1886-94.
- Galli** SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2005 Feb;6(2):135-42.
- Garcia-Faroldi** G, Melo FR, Ronnberg E, Grujic M, Pejler G: Active caspase-3 is stored within secretory compartments of viable mast cells. *J Immunol* 2013, 191:1445-1452.
- Glenner** GG, Cohen LA: Histochemical demonstration of a species-specific trypsin-like enzyme in mast cells. *Nature* 1960, 185:846-847.
- Gordon** JR, Galli SJ: Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF- α /cachectin. *Nature* 1990, 346:274-276.
- Gyles** SL, Xue L, Townsend ER, Wetley F, Pettipher R: A dominant role for chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on T helper type 2 (Th2) cells (CRTH2) in mediating chemotaxis of CRTH2+ CD4+ Th2 lymphocytes in response to mast cell supernatants. *Immunology* 2006, 119:362-368.
- Halangk** W, Lerch MM, Brandt-Nedelev B, Roth W, Ruthenbueger M, Reinheckel T, Domschke W, Lippert H, Peters C, Deussing J. Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis. *J Clin Invest.* 2000 Sep;106(6):773-81.
- He** S, Gaça MD, Walls AF. A role for tryptase in the activation of human mast cells: modulation of histamine release by tryptase and inhibitors of tryptase. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998 Jul;286(1):289-97.
- Henningsson** F, Yamamoto K, Saftig P, Reinheckel T, Peters C, Knight SD, Pejler G: A role for cathepsin E in the processing of mast-cell carboxypeptidase A. *J Cell Sci* 2005, 118:2035-2042.
- Hori** Y, Nihei Y, Kurokawa Y, Kuramasu A, Makabe-Kobayashi Y, Terui T, Doi H, Satomi S, Sakurai E, Nagy A, et al.: Accelerated clearance of *Escherichia coli* in experimental peritonitis of histamine-deficient mice. *J Immunol* 2002, 169:1978-1983.
- Knight** PA, Wright SH, Lawrence CE, Paterson YY, Miller HR: Delayed expulsion of the nematode *Trichinella spiralis* in mice lacking the mucosal mast cell-specific granule chymase, mouse mast cell protease-1. *J Exp Med* 2000, 192:1849-1856.
- Kushnir-Sukhov** NM, Gilfillan AM, Coleman JW, Brown JM, Bruening S, Toth M, Metcalfe DD: 5-hydroxytryptamine induces mast cell adhesion and migration. *J Immunol* 2006, 177:6422-6432.
- Le** QT, Gomez G, Zhao W, Hu J, Xia HZ, Fukuoka Y, Katunuma N, Schwartz LB. Processing of human protryptase in mast cells involves cathepsins L, B, and C. *J Immunol.* 2011 Aug 15;187(4):1912-8.
- Leon** A, Buriani A, Dal Toso R, Fabris M, Romanello S, Aloe L, Levi-Montalcini R: Mast cells synthesize, store, and release nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91:3739-3743.
- Lindner** JR, Kahn ML, Coughlin SR, Sambrano GR, Schauble E, Bernstein D, Foy D, Hafezi-Moghadam A, Ley K: Delayed onset of inflammation in protease-activated receptor- 2-deficient mice. *J Immunol* 2000, 165:6504-6510.
- Lindstedt** KA, Wang Y, Shiota N, Saarinen J, Hyytiainen M, Kokkonen JO, Keski-Oja J, Kovanen PT: Activation of paracrine TGF- β 1 signaling upon stimulation and degranulation of rat serosal mast cells: a novel function for chymase. *FASEB J* 2001, 15:1377-1388.
- McDermott** JR, Bartram RE, Knight PA, Miller HR, Garrod DR, Grecis RK: Mast cells disrupt epithelial barrier function during enteric nematode infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100:7761-7766.
- Melo** FR, Waern I, Rönnerberg E, Åbrink M, Lee DM, Schlenner SM, Feyerabend TB, Rodewald HR, Turk B, Wernersson S, Pejler G. A role for serglycin proteoglycan in mast cell apoptosis induced by a secretory granule-mediated pathway. *J Biol Chem.* 2011 Feb 18;286(7):5423-33.
- Mizutani** H, Schechter N, Lazarus G, Black RA, Kupper TS: Rapid and specific conversion of precursor interleukin 1 beta (IL-1 beta) to an active IL-1 species by human mast cell chymase. *J Exp Med* 1991, 174:821-825.
- Moon** TC, Befus AD, Kulka M. Mast cell mediators: their differential release and the secretory pathways involved. *Front Immunol.* 2014 Nov 14;5:569.
- Morikawa** K, Oseko F, Morikawa S. Immunosuppressive activity of bromocriptine on human T lymphocyte function in vitro. *Clin Exp Immunol.* 1994 Mar;95(3):514-8.
- Namazi** MR. Possible molecular mechanisms to account for the involvement of tryptase in the pathogenesis of psoriasis. *Autoimmunity.* 2005 Sep;38(6):449-52.
- Nelissen** S, Vanganswinkel T, Geurts N, Geboes L, Lemmens E, Vidal PM, Lemmens S, Willems L, Boato F, Dooley D, Pehl D, Pejler G, Maurer M, Metz M, Hendrix S. Mast cells protect from post-traumatic spinal cord damage in mice by degrading inflammation-associated cytokines via mouse mast cell protease 4. *Neurobiol Dis.* 2014 Feb;62:260-72.

Omoto Y, Tokime K, Yamanaka K, Habe K, Morioka T, Kurokawa I, Tsutsui H, Yamanishi K, Nakanishi K, Mizutani H: Human mast cell chymase cleaves pro-IL-18 and generates a novel and biologically active IL-18 fragment. *J Immunol* 2006, 177:8315- 8319.

Pardo J, Wallich R, Ebnet K, Iden S, Zentgraf H, Martin P, Ekiciler A, Prins A, Mullbacher A, Huber M, et al.: Granzyme B is expressed in mouse mast cells in vivo and in vitro and causes delayed cell death independent of perforin. *Cell Death Differ* 2007, 14:1768-1779.

Piliponsky AM, Chen CC, Rios EJ, Treuting PM, Lahiri A, Abrink M, Pejler G, Tsai M, Galli SJ. The chymase mouse mast cell protease 4 degrades TNF, limits inflammation, and promotes survival in a model of sepsis. *Am J Pathol.* 2012 Sep;181(3):875-86.

Riley JF: Histamine in tissue mast cells. *Science* 1953, 118:332.

Rönnberg E, Melo FR, Pejler G. Mast cell proteoglycans. *J Histochem Cytochem.* 2012 Dec;60(12): 950-62.

Shafer WM, Pohl J, Onunka VC, Bangalore N, Travis J. Human lysosomal cathepsin G and granzyme B share a functionally conserved broad spectrum antibacterial peptide. *J Biol Chem.* 1991 Jan 5;266(1):112-6.

Schechter NM, Irani AM, Sprows JL, Abernethy J, Wintroub B, Schwartz LB: Identification of a cathepsin G-like proteinase in the MCTC type of human mast cell. *J Immunol* 1990, 145:2652-2661.

Schneider LA, Schlenner SM, Feyerabend TB, Wunderlin M, Rodewald HR: Molecular mechanism of mast cell mediated innate defense against endothelin and snake venom sarafotoxin. *J Exp Med* 2007, 204:2629-2639.

Shubin NJ, Glukhova VA, Clauson M, Truong P, Abrink M, Pejler G, White NJ, Deutsch GH, Reeves SR, Vaisar T, James RG, Piliponsky AM. Proteome analysis of mast cell releasates reveals a role for chymase in the regulation of coagulation factor XIIIa levels via proteolytic degradation. *J Allergy Clin Immunol.* 2017 Jan;139(1):323-334.

Wolters PJ, Pham CT, Mulenburg DJ, Ley TJ, Caughey GH. Dipeptidyl peptidase I is essential for activation of mast cell chymases, but not tryptases, in mice. *J Biol Chem.* 2001 May 25;276(21):18551-6.

5- Les mécanismes d'activation des mastocytes:

Baba, Y., Nishida, K., Fujii, Y., Hirano, T., Hikida, M. and Kurosaki, T., Essential function for the calcium sensor STIM1 in mast cell activation and anaphylactic responses. *Nat. Immunol.* 2008. 9: 81–88.

Bansal G, Xie Z, Rao S, Nocka KH, Druey KM: Suppression of immunoglobulin E- mediated allergic responses by regulator of G protein signaling 13. *Nat Immunol* 2008, 9:73-80.

Becker M, Lemmermann NA, Ebert S, Baars P, Renzaho A, Podlech J, Stassen M, Reddehase MJ: Mast cells as rapid innate sensors of cytomegalovirus by TLR3/TRIF signaling-dependent and-independent mechanisms. *Cell Mol Immunol* 2015, 12:192-201.

Benhamou M, Bonnerot C, Fridman WH, Daëron M. Molecular heterogeneity of murine mast cell Fc gamma receptors. *J Immunol.* 1990 Apr 15;144(8):3071-7.

Blank U, Ra C, Miller L, White K, Metzger H, Kinet JP: Complete structure and expression in transfected cells of high affinity IgE receptor. *Nature* 1989, 337:187- 189.

Bulfone-Paus S, Nilsson G, Draber P, Blank U, Levi-Schaffer F. Positive and Negative Signals in Mast Cell Activation. *Trends Immunol.* 2017 Feb 18. pii: S1471-4906(17)30022-4.

Daeron M, Malbec O, Latour S, Arock M, Fridman WH: Regulation of high-affinity IgE receptor-mediated mast cell activation by murine low-affinity IgG receptors. *J Clin Invest* 1995, 95:577-585.

Daeron M: Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol* 1997, 15:203-234

Daëron M, Lesourne R. Negative signaling in Fc receptor complexes. *Adv Immunol.* 2006;89:39-86

Erdei A, Andrásfalvy M, Péterfy H, Tóth G, Pecht I. Regulation of mast cell activation by complement-derived peptides. *Immunol Lett.* 2004 Mar 29;92(1-2):39-42.

Eiseman E, Bolen JB: Engagement of the high-affinity IgE receptor activates src protein-related tyrosine kinases. *Nature* 1992, 355:78-80.

Fewtrell C, Metzger H: Larger oligomers of IgE are more effective than dimers in stimulating rat basophilic leukemia cells. *J Immunol* 1980, 125:701-710.

Gebhardt T, Sellge G, Lorentz A, Raab R, Manns MP, Bischoff SC: Cultured human intestinal mast cells express functional IL-3 receptors and respond to IL-3 by enhancing growth and IgE receptor-dependent mediator release. *Eur J Immunol* 2002, 32:2308-2316.

Gilfillan AM, Tkaczyk C: Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat Rev Immunol* 2006, 6:218-230.

Gu H, Saito K, Klamann LD, Shen J, Fleming T, Wang Y, Pratt JC, Lin G, Lim B, Kinet JP, Neel BG. Essential role for Gab2 in the allergic response. *Nature.* 2001 Jul 12;412(6843):186-90.

Hao S, Kurosaki T, August A. Differential regulation of NFAT and SRF by the B cell receptor via a PLCgamma-Ca(2+)-dependent pathway. *EMBO J.* 2003 Aug 15;22(16):4166-77.

Hill PB, MacDonald AJ, Thornton EM, Newlands GF, Galli SJ, Miller HR. Stem cell factor enhances immunoglobulin E-dependent mediator release from cultured rat bone marrow-derived mast cells: activation of previously unresponsive cells demonstrated by a novel ELISPOT assay. *Immunology*. 1996;87:326–333

Hueber AJ, Alves-Filho JC, Asquith DL, Michels C, Millar NL, Reilly JH, Graham GJ, Liew FY, Miller AM, McInnes IB. IL-33 induces skin inflammation with mast cell and neutrophil activation. *Eur J Immunol*. 2011 Aug;41(8):2229-37.

Jabril-Cuenod B, Zhang C, Scharenberg AM, Paolini R, Numerof R, Beaven MA, Kinet JP. Syk-dependent phosphorylation of Shc. A potential link between FcεRI and the Ras/mitogen-activated protein kinase signaling pathway through SOS and Grb2. *J Biol Chem*. 1996 Jul 5;271(27):16268-72.

Jolly PS, Bektas M, Olivera A, Gonzalez-Espinosa C, Proia RL, Rivera J, Milstien S, Spiegel S. Transactivation of sphingosine-1-phosphate receptors by FcεRI triggering is required for normal mast cell degranulation and chemotaxis. *J Exp Med*. 2004 Apr 5;199(7):959-70.

Jonsson F, Daeron M: Mast cells and company. *Front Immunol* 2012, 3:16.

Kuehn HS, Rådinger M, Brown JM, Ali K, Vanhaesebroeck B, Beaven MA, Metcalfe DD, Gilfillan AM. Btk-dependent Rac activation and actin rearrangement following FcεRI aggregation promotes enhanced chemotactic responses of mast cells. *J Cell Sci*. 2010 Aug 1;123(Pt 15):2576-85.

Kepley CL, Taghavi S, Mackay G, Zhu D, Morel PA, Zhang K, Ryan JJ, Satin LS, Zhang M, Pandolfi PP, Saxon A. Co-aggregation of FcγRII with FcεRI on human mast cells inhibits antigen-induced secretion and involves SHIP-Grb2-Dok complexes. *J Biol Chem*. 2004 Aug 20;279(34):35139-49.

Kim MS, Rådinger M, Gilfillan AM. The multiple roles of phosphoinositide 3-kinase in mast cell biology. *Trends Immunol*. 2008 Oct;29(10):493-501.

Kitaura J, Asai K, Maeda-Yamamoto M, Kawakami Y, Kikkawa U, Kawakami T. Akt-dependent cytokine production in mast cells. *J Exp Med*. 2000 Sep 4;192(5):729-40.

Kraft S, Kinet JP: New developments in FcεRI regulation, function and inhibition. *Nat Rev Immunol* 2007, 7:365-378.

Law CL, Chandran KA, Sidorenko SP, Clark EA. Phospholipase C-γ1 interacts with conserved phosphotyrosyl residues in the linker region of Syk and is a substrate for Syk. *Mol Cell Biol*. 1996 Apr;16(4):1305-15.

Malaviya R, Gao Z, Thankavel K, van der Merwe PA, Abraham SN: The mast cell tumor necrosis factor alpha response to FimH-expressing *Escherichia coli* is mediated by the glycosylphosphatidylinositol-anchored molecule CD48. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96:8110-8115.

Manetz TS, Gonzalez-Espinosa C, Arudchandran R, Xirasagar S, Tybulewicz V, Rivera J. Vav1 regulates phospholipase Cγ activation and calcium responses in mast cells. *Mol Cell Biol*. 2001 Jun; 21(11):3763-74.

Matsushima H, Yamada N, Matsue H, Shimada S: TLR3-, TLR7-, and TLR9-mediated production of proinflammatory cytokines and chemokines from murine connective tissue type skin-derived mast cells but not from bone marrow-derived mast cells. *J Immunol* 2004, 173:531-541.

Medzhitov R: Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001, 1:135-145.

Migalovich-Sheikhet, H., Friedman, S., Mankuta, D. and Levi-Schaffer, F., Novel identified receptors on mast cells. *Front. Immunol*. 2012. 3: 238.

Miyazaki D, Nakamura T, Toda M, Cheung-Chau KW, Richardson RM, Ono SJ. Macrophage inflammatory protein-1α as a costimulatory signal for mast cell-mediated immediate hypersensitivity reactions. *J Clin Invest*. 2005 Feb;115(2):434-42.

Ochi H, De Jesus NH, Hsieh FH, Austen KF, Boyce JA: IL-4 and -5 prime human mast cells for different profiles of IgE-dependent cytokine production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97:10509-10513.

Odom S, Gomez G, Kovarova M, Furumoto Y, Ryan JJ, Wright HV, Gonzalez-Espinosa C, Hibbs ML, Harder KW, Rivera J: Negative regulation of immunoglobulin E-dependent allergic responses by Lyn kinase. *J Exp Med* 2004, 199:1491-1502.

Olivera A, Mizugishi K, Tikhonova A, Ciaccia L, Odom S, Proia RL, Rivera J. The sphingosine kinase-sphingosine-1-phosphate axis is a determinant of mast cell function and anaphylaxis. *Immunity*. 2007 Mar;26(3):287-97.

Ozawa K, Szallasi Z, Kazanietz MG, Blumberg PM, Mischak H, Mushinski JF, Beaven MA. Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent isozymes of protein kinase C mediate exocytosis in antigen-stimulated rat basophilic RBL-2H3 cells. Reconstitution of secretory responses with Ca²⁺ and purified isozymes in washed permeabilized cells. *J Biol Chem*. 1993 Jan 25;268(3):1749-56.

Parravicini V, Gadina M, Kovarova M, Odom S, Gonzalez-Espinosa C, Furumoto Y, Saitoh S, Samelson LE, O'Shea JJ, Rivera J: Fyn kinase initiates complementary signals required for IgE-dependent mast cell degranulation. *Nat Immunol* 2002, 3:741-748.

Razin E, Szallasi Z, Kazanietz MG, Blumberg PM, Rivera J. Protein kinases C-beta and C-epsilon link the mast cell high-affinity receptor for IgE to the expression of c-fos and c-jun. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Aug 2;91(16):7722-6.

Rivera J: Molecular adapters in Fc(epsilon)RI signaling and the allergic response. *Curr Opin Immunol* 2002, 14:688-693.

Rivera J. NTAL/LAB and LAT: a balancing act in mast-cell activation and function. *Trends Immunol*. 2005 Mar;26(3):119-22.

Rivera J, Fierro NA, Olivera A, Suzuki R. New insights on mast cell activation *via* the high affinity receptor for IgE. *Adv Immunol*. 2008;98:85-120.

Saitoh S, Arudchandran R, Manetz TS, Zhang W, Sommers CL, Love PE, Rivera J, Samelson LE: LAT is essential for Fc(epsilon)RI-mediated mast cell activation. *Immunity* 2000, 12:525-535.

Singh LK, Pang X, Alexacos N, Letourneau R, Theoharides TC: Acute immobilization stress triggers skin mast cell degranulation *via* corticotropin releasing hormone, neurotensin, and substance P: A link to neurogenic skin disorders. *Brain Behav Immun* 1999, 13:225-239.

Sjoberg LC, Gregory JA, Dahlen SE, Nilsson GP, Adner M: Interleukin-33 exacerbates allergic bronchoconstriction in the mice *via* activation of mast cells. *Allergy* 2015, 70:514-521.

Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Akira S, Okumura K, Ra C, Ogawa H: Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J Clin Invest* 2002, 109:1351-1359.

Suzuki R, Leach S, Liu W, Ralston E, Scheffel J, Zhang W, Lowell CA, Rivera J: Molecular editing of cellular responses by the high-affinity receptor for IgE. *Science* 2014, 343:1021-1025.

Takeshita K, Sakai K, Bacon KB, Gantner F. Critical role of histamine H4 receptor in leukotriene B4 production and mast cell-dependent neutrophil recruitment induced by zymosan *in vivo*. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Dec;307(3):1072-8.

Tam SY, Tsai M, Snouwaert JN, Kalesnikoff J, Scherrer D, Nakae S, Chatterjea D, Bouley DM, Galli SJ: RabGEF1 is a negative regulator of mast cell activation and skin inflammation. *Nat Immunol* 2004, 5:844-852.

Tkaczyk C., Beaven, M. A., Brachman, S. M., Metcalfe, D. D. & Gilfillan, A. M. The phospholipase C γ -dependent pathway of Fc ϵ RI-mediated mast cell activation is regulated independently of phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 278, 48474–48484 (2003).

Tkaczyk C, Horejsi V, Iwaki S, Draber P, Samelson LE, Satterthwaite AB, Nahm DH, Metcalfe DD, Gilfillan AM: NTAL phosphorylation is a pivotal link between the signaling cascades leading to human mast cell degranulation following Kit activation and Fc epsilon RI aggregation. *Blood* 2004, 104:207-214.

Vadas P, Gold M, Perelman B, Liss GM, Lack G, Blyth T, Simons FE, Simons KJ, Cass D, Yeung J: Platelet-activating factor, PAF acetylhydrolase, and severe anaphylaxis. *N Engl J Med* 2008, 358:28-35.

Weetall M, Holowka D, Baird B: Heterologous desensitization of the high affinity receptor for IgE (Fc epsilon R1) on RBL cells. *J Immunol* 1993, 150:4072-4083.

Xiao W, Nishimoto H, Hong H, Kitaura J, Nunomura S, Maeda-Yamamoto M, Kawakami Y, Lowell CA, Ra C, Kawakami T. Positive and negative regulation of mast cell activation by Lyn *via* the FcepsilonRI. *J Immunol*. 2005 Nov 15;175(10):6885-92.

Zhang J, Somani AK, Siminovitich KA. Roles of the SHP-1 tyrosine phosphatase in the negative regulation of cell signalling. *Semin Immunol*. 2000 Aug;12(4):361-78.

B- Les mécanismes de sécrétion des mastocytes:

1- La différentes voies de sécrétion des mastocytes:

Alvarez de Toledo G, Fernandez JM. Compound versus multigranular exocytosis in peritoneal mast cells. *J Gen Physiol*. 1990 Mar;95(3):397-409.

Antonin W, Holroyd C, Fasshauer D, Pabst S, Von Mollard GF, Jahn R. A SNARE complex mediating fusion of late endosomes defines conserved properties of SNARE structure and function. *EMBO J*. 2000 Dec 1;19(23):6453-64.

Azouz NP, Matsui T, Fukuda M, Sagi-Eisenberg R. Decoding the regulation of mast cell exocytosis by networks of Rab GTPases. *J Immunol*. 2012 Sep 1;189(5):2169-80.

Azouz NP, Zur N, Efergan A, Ohbayashi N, Fukuda M, Amihai D, Hammel I, Rothenberg ME, Sagi-Eisenberg R. Rab5 is a novel regulator of mast cell secretory granules: impact on size, cargo, and exocytosis. *J Immunol*. 2014 May 1;192(9):4043-53.

Balseiro-Gomez S, Flores JA, Acosta J, Ramirez-Ponce MP, Ales E. Transient fusion ensures granule replenishment to enable repeated release after IgE-mediated mast cell degranulation. *J Cell Sci*. 2016 Nov 1;129(21):3989-4000.

Benhamou M, Blank U. Stimulus-secretion coupling by high-affinity IgE receptor: new developments. *FEBS Lett*. 2010 Dec 15;584(24):4941-8.

Blank U, Cyprien B, Martin-Verdeaux S, Paumet F, Pombo I, Rivera J, Roa M, Varin-Blank N. SNAREs and associated regulators in the control of exocytosis in the RBL-2H3 mast cell line. *Mol Immunol.* 2002 Sep;38(16-18):1341-5.

Blank U, Rivera J. The ins and outs of IgE-dependent mast-cell exocytosis. *Trends Immunol.* 2004 May;25(5):266-73.

Brochetta C, Suzuki R, Vita F, Soranzo MR, Claver J, Madjene LC, Attout T, Vitte J, Varin-Blank N, Zabucchi G, Rivera J, Blank U. Munc18-2 and syntaxin 3 control distinct essential steps in mast cell degranulation. *J Immunol.* 2014 Jan 1;192(1):41-51.

Boswell KL, James DJ, Esquibel JM, Bruinsma S, Shirakawa R, Horiuchi H, Martin TF. Munc13-4 reconstitutes calcium-dependent SNARE-mediated membrane fusion. *J Cell Biol.* 2012 Apr 16;197(2):301-12.

Cabeza JM, Acosta J, Ales E: Mechanisms of granule membrane recapture following exocytosis in intact mast cells. *J Biol Chem* 2013, 288:20293-20305.

Carroll-Portillo A, Spendier K, Pfeiffer J, Griffiths G, Li H, Lidke KA, Oliver JM, Lidke DS, Thomas JL, Wilson BS, et al.: Formation of a mast cell synapse: Fc epsilon RI membrane dynamics upon binding mobile or immobilized ligands on surfaces. *J Immunol* 2012a, 184:1328-1338.

Carroll-Portillo A, Surviladze Z, Cambi A, Lidke DS, Wilson BS. Mast cell synapses and exosomes: membrane contacts for information exchange. *Front Immunol.* 2012b Mar 15;3:46.

Crivellato E, Nico B, Mallardi F, Beltrami CA, Ribatti D. Piecemeal degranulation as a general secretory mechanism? *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2003 Sep;274(1):778-84.

Deng Z, Zink T, Chen HY, Walters D, Liu FT, Liu GY: Impact of actin rearrangement and degranulation on the membrane structure of primary mast cells: a combined atomic force and laser scanning confocal microscopy investigation. *Biophys J* 2009, 96:1629-1639.

Dvorak AM, Massey W, Warner J, Kissell S, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM: IgE-mediated anaphylactic degranulation of isolated human skin mast cells. *Blood* 1991, 77:569-578.

Dvorak AM, Tepper RI, Weller PF, Morgan ES, Estrella P, Monahan-Earley RA, Galli SJ: Piecemeal degranulation of mast cells in the inflammatory eyelid lesions of interleukin-4 transgenic mice. Evidence of mast cell histamine release in vivo by diamine oxidase-gold enzyme-affinity ultrastructural cytochemistry. *Blood* 1994, 83:3600-3612.

Dvorak AM: Piecemeal degranulation of basophils and mast cells is effected by vesicular transport of stored secretory granule contents. *Chem Immunol Allergy* 2005, 85:135-184.

Efergan A, Azouz NP, Klein O, Noguchi K, Rothenberg ME, Fukuda M, Sagi-Eisenberg R. Rab12 Regulates Retrograde Transport of Mast Cell Secretory Granules by Interacting with the RILP-Dynein Complex. *J Immunol.* 2016 Feb 1;196(3):1091-101.

Elhamdani A, Azizi F, Artalejo CR: Double patch clamp reveals that transient fusion (kiss-and-run) is a major mechanism of secretion in calf adrenal chromaffin cells: high calcium shifts the mechanism from kiss-and-run to complete fusion. *J Neurosci* 2006, 26:3030-3036.

Foger N, Jenckel A, Orinska Z, Lee KH, Chan AC, Bulfone-Paus S: Differential regulation of mast cell degranulation versus cytokine secretion by the actin regulatory proteins Coronin1a and Coronin1b. *J Exp Med* 2011, 208:1777-1787.

Frank SP, Thon KP, Bischoff SC, Lorentz A. SNAP-23 and syntaxin-3 are required for chemokine release by mature human mast cells. *Mol Immunol.* 2011 Oct;49(1-2):353-8.

Frossi B, D'Inca F, Crivellato E, Sibilano R, Gri G, Mongillo M, Danelli L, Maggi L, Pucillo CE. Single-cell dynamics of mast cell-CD4+ CD25+ regulatory T cell interactions. *Eur J Immunol.* 2011 Jul;41(7):1872-82.

Gaudenzio N, Sibilano R, Marichal T, Starkl P, Reber LL, Cenac N, McNeil BD, Dong X, Hernandez JD, Sagi-Eisenberg R, Hammel I, Roers A, Valitutti S, Tsai M, Espinosa E, Galli SJ. Different activation signals induce distinct mast cell degranulation strategies. *J Clin Invest.* 2016 Oct 3;126(10):3981-3998.

Grigoriev I, Gouveia SM, van der Vaart B, Demmers J, Smyth JT, Honnappa S, Splinter D, Steinmetz MO, Putney JW Jr, Hoogenraad CC, Akhmanova A. STIM1 is a MT-plus-end-tracking protein involved in remodeling of the ER. *Curr Biol.* 2008 Feb 12;18(3):177-82.

Guo Z, Turner C, Castle D. Relocation of the t-SNARE SNAP-23 from lamellipodia-like cell surface projections regulates compound exocytosis in mast cells. *Cell.* 1998 Aug 21;94(4):537-48.

Hájková Z, Bugajev V, Dráberová E, Vinopal S, Dráberová L, Janáček J, Dráber P, Dráber P. STIM1-directed reorganization of microtubules in activated mast cells. *J Immunol.* 2011 Jan 15;186(2):913-23.

Hepp R, Puri N, Hohenstein A C, Crawford G L, Whiteheart S W, and Roche P A., Phosphorylation of SNAP-23 regulates exocytosis from mast cells. *J. Biol. Chem.* 2005. 280: 6610–6620.

Higashio H, Nishimura N, Ishizaki H, Miyoshi J, Orita S, Sakane A, Sasaki T. Doc2 alpha and Munc13-4 regulate Ca(2+) -dependent secretory lysosome exocytosis in mast cells. *J Immunol.* 2008 Apr 1;180(7):4774-84.

Higashio H, Satoh Y, Saino T. Mast cell degranulation is negatively regulated by the Munc13-4-binding small-guanosine triphosphatase Rab37. *Sci Rep*. 2016 Mar 2;6:22539.

Krystel-Whitemore M, Dileepan KN, Wood JG. Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Front Immunol*. 2016 Jan 6;6:620.

Lawson D, Fewtrell C, Raff MC: Localized mast cell degranulation induced by concanavalin A-sepharose beads. Implications for the Ca²⁺ hypothesis of stimulus-secretion coupling. *J Cell Biol* 1978, 79:394-400.

Lorentz A, Baumann A, Vitte J, Blank U: The SNARE Machinery in Mast Cell Secretion. *Front Immunol* 2012, 3:143.

Martin-Verdeaux S, Pombo I, Iannascoli B, Roa M, Varin-Blank N, Rivera J, Blank U. Evidence of a role for Munc18-2 and microtubules in mast cell granule exocytosis. *J Cell Sci*. 2003 Jan 15;116(Pt 2):325-34.

Melicoff E, Sansores-Garcia L, Gomez A, Moreira DC, Datta P, Thakur P, Petrova Y, Siddiqi T, Murthy JN, Dickey BF, et al.: Synaptotagmin-2 controls regulated exocytosis but not other secretory responses of mast cells. *J Biol Chem* 2009, 284:19445-19451.

Mizuno K, Tolmachova T, Ushakov DS, Romao M, Abrink M, Ferenczi MA, Raposo G, Seabra MC: Rab27b regulates mast cell granule dynamics and secretion. *Traffic* 2007, 8:883-892.

Neeft M, Wieffer M, de Jong AS, Negroiu G, Metz CH, van Loon A, Griffith J, Krijgsveld J, Wulffraat N, Koch H, Heck AJ, Brose N, Kleijmeer M, van der Sluijs P. Munc13-4 is an effector of rab27a and controls secretion of lysosomes in hematopoietic cells. *Mol Biol Cell*. 2005 Feb;16(2):731-41.

Nishida K, Yamasaki S, Ito Y, Kabu K, Hattori K, Tezuka T, Nishizumi H, Kitamura D, Goitsuka R, Geha RS, et al.: Fc{epsilon}RI-mediated mast cell degranulation requires calcium-independent microtubule-dependent translocation of granules to the plasma membrane. *J Cell Biol* 2005, 170:115-126.

Ogawa K, Tanaka Y, Uruno T, Duan X, Harada Y, Sanematsu F, Yamamura K, Terasawa M, Nishikimi A, Côté JF, Fukui Y. DOCK5 functions as a key signaling adaptor that links FcεRI signals to microtubule dynamics during mast cell degranulation. *J Exp Med*. 2014 Jun 30;211(7):1407-19.

Paumet F, Le Mao J, Martin S, Galli T, David B, Blank U, Roa M: Soluble NSF attachment protein receptors (SNAREs) in RBL-2H3 mast cells: functional role of syntaxin 4 in exocytosis and identification of a vesicle-associated membrane protein 8- containing secretory compartment. *J Immunol* 2000, 164:5850-5857.

Pickett JA, Edwardson JM. Compound exocytosis: mechanisms and functional significance. *Traffic*. 2006 Feb;7(2):109-16.

Pombo I, Martin-Verdeaux S, Iannascoli B, Le Mao J, Deriano L, Rivera J, Blank U. IgE receptor type I-dependent regulation of a Rab3D-associated kinase: a possible link in the calcium-dependent assembly of SNARE complexes. *J Biol Chem*. 2001 Nov 16;276(46):42893-900.

Puri N, Kruhlak MJ, Whiteheart SW, Roche PA. Mast cell degranulation requires N-ethylmaleimide-sensitive factor-mediated SNARE disassembly. *J Immunol*. 2003 Nov 15;171(10):5345-52.

Puri N, Roche PA. Mast cells possess distinct secretory granule subsets whose exocytosis is regulated by different SNARE isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Feb 19;105(7):2580-5.

Roa M, Paumet F, Le Mao J, David B, Blank U. Involvement of the ras-like GTPase rab3d in RBL-2H3 mast cell exocytosis following stimulation via high affinity IgE receptors (Fc epsilonRI). *J Immunol*. 1997 Sep 15;159(6):2815-23.

Sander LE, Frank SP, Bolat S, Blank U, Galli T, Bigalke H, Bischoff SC, Lorentz A: Vesicle associated membrane protein (VAMP)-7 and VAMP-8, but not VAMP-2 or VAMP-3, are required for activation-induced degranulation of mature human mast cells. *Eur J Immunol* 2008, 38:855-863.

Singh RK, Mizuno K, Wasmeier C, Wavre-Shapton ST, Recchi C, Catz SD, Futter C, Tolmachova T, Hume AN, Seabra MC. Distinct and opposing roles for Rab27a/Mlph/MyoVa and Rab27b/Munc13-4 in mast cell secretion. *FEBS J*. 2013 Feb;280(3):892-903.

Staser K, Shew MA, Michels EG, Mwanthi MM, Yang FC, Clapp DW, Park SJ. A Pak1-PP2A-ERM signaling axis mediates F-actin rearrangement and degranulation in mast cells. *Exp Hematol*. 2013 Jan; 41(1):56-66.e2.

Tadokoro S, Nakanishi M, Hirashima N: Complexin II facilitates exocytotic release in mast cells by enhancing Ca²⁺ sensitivity of the fusion process. *J Cell Sci* 2005, 118:2239-2246

Tadokoro S, Kurimoto T, Nakanishi M, Hirashima N. Munc18-2 regulates exocytotic membrane fusion positively interacting with syntaxin-3 in RBL-2H3 cells. *Mol Immunol*. 2007 Jul;44(13):3427-33.

Tiwari N, Wang CC, Brochetta C, Ke G, Vita F, Qi Z, Rivera J, Soranzo MR, Zabucchi G, Hong W, et al.: VAMP-8 segregates mast cell-preformed mediator exocytosis from cytokine trafficking pathways. *Blood* 2008, 111:3665-3674.

Veale KJ, Offenhäuser C, Whittaker SP, Estrella RP, Murray RZ. Recycling endosome membrane incorporation into the leading edge regulates lamellipodia formation and macrophage migration. *Traffic*. 2010 Oct;11(10):1370-9.

Vukman KV, Försönits A, Oszvald Á, Tóth EÁ, Buzás EI. Mast cell secretome: Soluble and vesicular components. *Semin Cell Dev Biol*. 2017 Feb 9. pii: S1084-9521(17)30107-6.

Wernersson S, Pejler G: Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nat Rev Immunol* 2014, 14:478-494.

Williams RM, Webb WW: Single granule pH cycling in antigen-induced mast cell secretion. *J Cell Sci* 2000, 113 Pt 21:3839-3850.

Woo SS, James DJ, Martin TF. Munc13-4 functions as a Ca(2+) sensor for homotypic secretory granule fusion to generate endosomal exocytic vacuoles. *Mol Biol Cell*. 2017 Mar 15;28(6):792-808.

2- Les voies de signalisation impliquées dans la sécrétion des mastocytes

Baba, Y., Nishida, K., Fujii, Y., Hirano, T., Hikida, M. and Kurosaki, T., Essential function for the calcium sensor STIM1 in mast cell activation and anaphylactic responses. *Nat. Immunol*. 2008. 9: 81–88.

Blank U, Madera-Salcedo IK, Danelli L, Claver J, Tiwari N, Sánchez-Miranda E, Vázquez-Victorio G, Ramírez-Valadez KA, Macias-Silva M, González-Espinosa C. Vesicular trafficking and signaling for cytokine and chemokine secretion in mast cells. *Front Immunol*. 2014 Sep 22;5:453.

Chung SH, Polgar J, Reed GL. Protein kinase C phosphorylation of syntaxin 4 in thrombin-activated human platelets. *J Biol Chem*. 2000 Aug 18;275(33):25286-91.

Costello PS, Turner M, Walters AE, Cunningham CN, Bauer PH, Downward J, Tybulewicz VL. Critical role for the tyrosine kinase Syk in signalling through the high affinity IgE receptor of mast cells. *Oncogene*. 1996 Dec 19;13(12):2595-605.

Dráber P, Sulimenko V, Dráberová E. Cytoskeleton in mast cell signaling. *Front Immunol*. 2012 May 25;3:130.

Frank SP, Thon KP, Bischoff SC, Lorentz A. SNAP-23 and syntaxin-3 are required for chemokine release by mature human mast cells. *Mol Immunol*. 2011 Oct;49(1-2):353-8.

Fujita Y, Sasaki T, Fukui K, Kotani H, Kimura T, Hata Y, Südhof TC, Scheller RH, Takai Y. Phosphorylation of Munc-18/n-Sec1/rbSec1 by protein kinase C: its implication in regulating the interaction of Munc-18/n-Sec1/rbSec1 with syntaxin. *J Biol Chem*. 1996 Mar 29;271(13):7265-8.

Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2005 Feb;6(2):135-42.

Gu H, Saito K, Klamann LD, Shen J, Fleming T, Wang Y, Pratt JC, Lin G, Lim B, Kinet JP, Neel BG. Essential role for Gab2 in the allergic response. *Nature*. 2001 Jul 12;412(6843):186-90

Higashio H, Nishimura N, Ishizaki H, Miyoshi J, Orita S, Sakane A, Sasaki T. Doc2 alpha and Munc13-4 regulate Ca(2+) -dependent secretory lysosome exocytosis in mast cells. *J Immunol*. 2008 Apr 1;180(7):4774-84.

Hilfiker S, Pieribone VA, Nordstedt C, Greengard P, Czernik AJ. Regulation of synaptotagmin I phosphorylation by multiple protein kinases. *J Neurochem*. 1999 Sep;73(3):921-32.

Iwaki S, Tkaczyk C, Satterthwaite AB, Halcomb K, Beaven MA, Metcalfe DD, Gilfillan AM. Btk plays a crucial role in the amplification of Fc epsilonRI-mediated mast cell activation by kit. *J Biol Chem*. 2005 Dec 2;280(48):40261-70.

Kawamoto S, Bengur AR, Sellers JR, Adelstein RS. In situ phosphorylation of human platelet myosin heavy and light chains by protein kinase C. *J Biol Chem*. 1989 Feb 5;264(4):2258-65.

Kuehn HS, Rådinger M, Brown JM, Ali K, Vanhaesebroeck B, Beaven MA, Metcalfe DD, Gilfillan AM. Btk-dependent Rac activation and actin rearrangement following FcepsilonRI aggregation promotes enhanced chemotactic responses of mast cells. *J Cell Sci*. 2010 Aug 1;123(Pt 15):2576-85.

Leitges M, Gimborn K, Elis W, Kalesnikoff J, Hughes MR, Krystal G, Huber M. Protein kinase C-delta is a negative regulator of antigen-induced mast cell degranulation. *Mol Cell Biol*. 2002 Jun;22(12):3970-80.

Ludowyke RI, Elgundi Z, Kranenburg T, Stehn JR, Schmitz-Peiffer C, Hughes WE, Biden TJ. Phosphorylation of nonmuscle myosin heavy chain IIA on Ser1917 is mediated by protein kinase C beta II and coincides with the onset of stimulated degranulation of RBL-2H3 mast cells. *J Immunol*. 2006 Aug 1;177(3):1492-9.

Manetz TS, Gonzalez-Espinosa C, Arudchandran R, Xirasagar S, Tybulewicz V, Rivera J. Vav1 regulates phospholipase cgamma activation and calcium responses in mast cells. *Mol Cell Biol*. 2001 Jun; 21(11):3763-74.

Martin-Verdeaux S, Pombo I, Iannascoli B, Roa M, Varin-Blank N, Rivera J, Blank U. Evidence of a role for Munc18-2 and microtubules in mast cell granule exocytosis. *J Cell Sci*. 2003 Jan 15;116(Pt 2): 325-34.

Melicoff E, Sansores-Garcia L, Gomez A, Moreira DC, Datta P, Thakur P, Petrova Y, Siddiqi T, Murthy JN, Dickey BF, Heidelberger R, Adachi R. Synaptotagmin-2 controls regulated exocytosis but not other secretory responses of mast cells. *J Biol Chem*. 2009 Jul 17;284(29):19445-51.

Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiol Rev*. 1997 Oct;77(4):1033-79.

Murray RZ, Kay JG, Sangermani DG, Stow JL. A role for the phagosome in cytokine secretion. *Science*. 2005 Dec 2;310(5753):1492-5.

Nechushtan H, Leitges M, Cohen C, Kay G, Razin E. Inhibition of degranulation and interleukin-6 production in mast cells derived from mice deficient in protein kinase C β . *Blood*. 2000 Mar 1;95(5):1752-7.

Nishida K, Yamasaki S, Ito Y, Kabu K, Hattori K, Tezuka T, Nishizumi H, Kitamura D, Goitsuka R, Geha RS, et al.: Fc ϵ RI-mediated mast cell degranulation requires calcium-independent microtubule-dependent translocation of granules to the plasma membrane. *J Cell Biol* 2005, 170:115-126.

Nishida K, Yamasaki S, Hasegawa A, Iwamatsu A, Koseki H, Hirano T. Gab2, via PI-3K, regulates ARF1 in Fc ϵ RI-mediated granule translocation and mast cell degranulation. *J Immunol*. 2011 Jul 15;187(2):932-41.

Ogawa K, Tanaka Y, Uruno T, Duan X, Harada Y, Sanematsu F, Yamamura K, Terasawa M, Nishikimi A, Côté JF, Fukui Y. DOCK5 functions as a key signaling adaptor that links Fc ϵ RI signals to microtubule dynamics during mast cell degranulation. *J Exp Med*. 2014 Jun 30;211(7):1407-19.

Ozawa K, Szallasi Z, Kazanietz MG, Blumberg PM, Mischak H, Mushinski JF, Beaven MA. Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent isozymes of protein kinase C mediate exocytosis in antigen-stimulated rat basophilic RBL-2H3 cells. Reconstitution of secretory responses with Ca²⁺ and purified isozymes in washed permeabilized cells. *J Biol Chem*. 1993 Jan 25;268(3):1749-56.

Parravicini V, Gadina M, Kovarova M, Odom S, Gonzalez-Espinosa C, Furumoto Y, Saitoh S, Samelson LE, O'Shea JJ, Rivera J. Fyn kinase initiates complementary signals required for IgE-dependent mast cell degranulation. *Nat Immunol*. 2002 Aug;3(8):741-8.

Pelletier C, Guérin-Marchand C, Iannascoli B, Marchand F, David B, Weyer A, Blank U. Specific signaling pathways in the regulation of TNF- α mRNA synthesis and TNF- α secretion in RBL-2H3 mast cells stimulated through the high affinity IgE receptor. *Inflamm Res*. 1998 Dec;47(12):493-500.

Pombo I, Martin-Verdeaux S, Iannascoli B, Le Mao J, Deriano L, Rivera J, Blank U. IgE receptor type I-dependent regulation of a Rab3D-associated kinase: a possible link in the calcium-dependent assembly of SNARE complexes. *J Biol Chem*. 2001 Nov 16;276(46):42893-900.

Puri N, Roche PA. Mast cells possess distinct secretory granule subsets whose exocytosis is regulated by different SNARE isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Feb 19;105(7):2580-5.

Reed GL, Hough AK, Fitzgerald ML. Human platelets contain SNARE proteins and a Sec1p homologue that interacts with syntaxin 4 and is phosphorylated after thrombin activation: implications for platelet secretion. *Blood*. 1999 Apr 15;93(8):2617-26.

Sakuma M, Shirai Y, Yoshino K, Kuramasu M, Nakamura T, Yanagita T, Mizuno K, Hide I, Nakata Y, Saito N. Novel PKC α -mediated phosphorylation site(s) on cofilin and their potential role in terminating histamine release. *Mol Biol Cell*. 2012 Sep;23(18):3707-21.

Sullivan R, Burnham M, Török K, Koffer A. Calmodulin regulates the disassembly of cortical F-actin in mast cells but is not required for secretion. *Cell Calcium*. 2000 Jul;28(1):33-46.

Tadokoro S, Nakanishi M, Hirashima N: Complexin II facilitates exocytotic release in mast cells by enhancing Ca²⁺ sensitivity of the fusion process. *J Cell Sci* 2005, 118:2239-2246

Tiwari N, Wang CC, Brochetta C, Ke G, Vita F, Qi Z, Rivera J, Soranzo MR, Zabucchi G, Hong W, et al.: VAMP-8 segregates mast cell-preformed mediator exocytosis from cytokine trafficking pathways. *Blood* 2008, 111:3665-3674.

Résultats et discussion

Lymphocytes T cytotoxiques

Beal AM, Anikeeva N, Varma R, Cameron TO, Vasiliver-Shamis G, Norris PJ, Dustin ML, Sykulev Y. Kinetics of early T cell receptor signaling regulate the pathway of lytic granule delivery to the secretory domain. *Immunity*. 2009 Oct 16;31(4):632-42.

Bertrand F, Müller S, Roh KH, Laurent C, Dupré L, Valitutti S. An initial and rapid step of lytic granule secretion precedes microtubule organizing center polarization at the cytotoxic T lymphocyte/target cell synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Apr 9;110(15):6073-8.

Diefenbach RJ, Diefenbach E, Douglas MW, Cunningham AL. The heavy chain of conventional kinesin interacts with the SNARE proteins SNAP25 and SNAP23. *Biochemistry*. 2002 Dec 17;41(50):14906-15.

Eskova A, Knapp B, Matelska D, Reusing S, Arjonen A, Lisauskas T, Pepperkok R, Russell R, Eils R, Ivaska J, Kaderali L, Erfle H, Starkuviene V. An RNAi screen identifies KIF15 as a novel regulator of the endocytic trafficking of integrin. *J Cell Sci.* 2014 Jun 1;127(Pt 11):2433-47.

Fowler KT, Andrews NW, Huleatt JW. Expression and function of synaptotagmin VII in CTLs. *J Immunol.* 2007 Feb 1;178(3):1498-504.

Hukelmann JL, Anderson KE, Sinclair LV, Grzes KM, Murillo AB, Hawkins PT, Stephens LR, Lamond AI, Cantrell DA. The cytotoxic T cell proteome and its shaping by the kinase mTOR. *Nat Immunol.* 2016 Jan;17(1):104-12.

Kitagawa M, Fung SY, Hameed UF, Goto H, Inagaki M, Lee SH. Cdk1 coordinates timely activation of MKlp2 kinesin with relocation of the chromosome passenger complex for cytokinesis. *Cell Rep.* 2014 Apr 10;7(1):166-79.

Korolchuk VI, Saiki S, Lichtenberg M, Siddiqi FH, Roberts EA, Imarisio S, Jahreiss L, Sarkar S, Futter M, Menzies FM, O'Kane CJ, Deretic V, Rubinsztein DC. Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses. *Nat Cell Biol.* 2011 Apr;13(4):453-60.

Mace EM, Wu WW, Ho T, Mann SS, Hsu HT, Orange JS. NK cell lytic granules are highly motile at the immunological synapse and require F-actin for post-degranulation persistence. *J Immunol.* 2012 Nov 15;189(10):4870-80.

Majeed W, Liu S, Storrie B. Distinct sets of Rab6 effectors contribute to ZW10--and COG-dependent Golgi homeostasis. *Traffic.* 2014 Jun;15(6):630-47.

Morton AM, Cunningham AL, Diefenbach RJ. Kinesin-1 plays a role in transport of SNAP-25 to the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Jan 1;391(1):388-93.

Nath S, Bananis E, Sarkar S, Stockert RJ, Sperry AO, Murray JW, Wolkoff AW. Kif5B and Kifc1 interact and are required for motility and fission of early endocytic vesicles in mouse liver. *Mol Biol Cell.* 2007 May;18(5):1839-49.

Peretti D, Peris L, Rosso S, Quiroga S, Cáceres A. Evidence for the involvement of KIF4 in the anterograde transport of L1-containing vesicles. *J Cell Biol.* 2000 Apr 3;149(1):141-52.

Ritter AT, Asano Y, Stinchcombe JC, Dieckmann NM, Chen BC, Gawden-Bone C, van Engelenburg S, Legant W, Gao L, Davidson MW, Betzig E, Lippincott-Schwartz J, Griffiths GM. Actin depletion initiates events leading to granule secretion at the immunological synapse. *Immunity.* 2015 May 19;42(5):864-76.

Stinchcombe JC, Barral DC, Mules EH, Booth S, Hume AN, Machesky LM, Seabra MC, Griffiths GM. Rab27a is required for regulated secretion in cytotoxic T lymphocytes. *J Cell Biol.* 2001 Feb 19;152(4):825-34.

Tanenbaum ME, Macûrek L, Janssen A, Geers EF, Alvarez-Fernández M, Medema RH. Kif15 cooperates with eg5 to promote bipolar spindle assembly. *Curr Biol.* 2009 Nov 3;19(20):1703-11.

Wakana Y, Villeneuve J, van Galen J, Cruz-Garcia D, Tagaya M, Malhotra V. Kinesin-5/Eg5 is important for transport of CARTS from the trans-Golgi network to the cell surface. *J Cell Biol.* 2013 Jul 22;202(2):241-50.

Wiesner C, Faix J, Himmel M, Bentzien F, Linder S. KIF5B and KIF3A/KIF3B kinesins drive MT1-MMP surface exposure, CD44 shedding, and extracellular matrix degradation in primary macrophages. *Blood.* 2010 Sep 2;116(9):1559-69.

Mastocytes

Blasius TL, Cai D, Jih GT, Toret CP, Verhey KJ. Two binding partners cooperate to activate the molecular motor Kinesin-1. *J Cell Biol.* 2007 Jan 1;176(1):11-7.

Cai D, Hoppe AD, Swanson JA, Verhey KJ. Kinesin-1 structural organization and conformational changes revealed by FRET stoichiometry in live cells. *J Cell Biol.* 2007 Jan 1;176(1):51-63.

Coy DL, Hancock WO, Wagenbach M, Howard J. Kinesin's tail domain is an inhibitory regulator of the motor domain. *Nat Cell Biol.* 1999 Sep;1(5):288-92.

DeBerg HA, Blehm BH, Sheung J, Thompson AR, Bookwalter CS, Torabi SF, Schroer TA, Berger CL, Lu Y, Trybus KM, Selvin PR. Motor domain phosphorylation modulates kinesin-1 transport. *J Biol Chem.* 2013 Nov 8;288(45):32612-21.

Diefenbach RJ, Diefenbach E, Douglas MW, Cunningham AL. The heavy chain of conventional kinesin interacts with the SNARE proteins SNAP25 and SNAP23. *Biochemistry.* 2002 Dec 17;41(50):14906-15.

Dietrich KA, Sindelar CV, Brewer PD, Downing KH, Cremo CR, Rice SE. The kinesin-1 motor protein is regulated by a direct interaction of its head and tail. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Jul 1;105(26):8938-43.

Hackney, D.D., J.D. Levitt, and J. Suhan, Kinesin undergoes a 9 S to 6 S conformational transition. *J Biol Chem*, 1992. 267(12): p. 8696-701.

Hackney DD, Stock MF. Kinesin tail domains and Mg²⁺ directly inhibit release of ADP from head domains in the absence of microtubules. *Biochemistry.* 2008 Jul 22;47(29):7770-8.

Hukelmann JL, Anderson KE, Sinclair LV, Grzes KM, Murillo AB, Hawkins PT, Stephens LR, Lamond AI, Cantrell DA. The cytotoxic T cell proteome and its shaping by the kinase mTOR. *Nat Immunol*. 2016 Jan; 17(1):104-12.

Morfini G, Szebenyi G, Elluru R, Ratner N, Brady ST. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates kinesin light chains and negatively regulates kinesin-based motility. *EMBO J*. 2002 Feb 1;21(3):281-93.

Morton AM, Cunningham AL, Diefenbach RJ. Kinesin-1 plays a role in transport of SNAP-25 to the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Jan 1;391(1):388-93.

Annexe

Kinesin-1 controls mast cell degranulation and anaphylaxis through PI3K-dependent recruitment to the granular Slp3/Rab27b complex

Isabelle Munoz,^{1,2} Luca Danelli,³ Julien Claver,³ Nicolas Goudin,⁴ Mathieu Kurowska,^{1,2} Iris Karina Madera-Salcedo,³ Jian-Dong Huang,⁵ Alain Fischer,^{1,2,6,7} Claudia González-Espinosa,⁸ Geneviève de Saint Basile,^{1,2} Ulrich Blank,^{3*} and Gaël Ménasché^{1,2*}

¹Laboratory of Normal and Pathological Homeostasis of the Immune System, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR1163, F-75015 Paris, France

²Imagine Institute, Paris Descartes University-Sorbonne Paris Cité, F-75015 Paris, France

³Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche 1149; Centre de Recherche sur l'Inflammation, Centre National de la Recherche Scientifique, Equipe de Recherche Labelisé 8252; Inflamex Laboratory of Excellence, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine, Site Xavier Bichat, F-75018 Paris, France

⁴Cell Imaging Facility, Imagine Institute, Paris Descartes University-Sorbonne Paris Cité, F-75015 Paris, France

⁵School of Biomedical Sciences, Li Ka Shing Faculty of Medicine, The University of Hong Kong, Hong Kong

⁶Immunology and Pediatric Hematology Department, Necker Children's Hospital, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, F-75015 Paris, France

⁷Collège de France, F-75005 Paris, France

⁸Departamento de Farmacobiología, Cinvestav, Sede Sur, 14330 Mexico City, Mexico

Cross-linking of mast cell (MC) IgE receptors (FcεRI) triggers degranulation of secretory granules (SGs) and the release of many allergic and inflammatory mediators. Although degranulation depends crucially on microtubule dynamics, the molecular machinery that couples SGs to microtubule-dependent transport is poorly understood. In this study, we demonstrate that mice lacking Kif5b (the heavy chain of kinesin-1) in hematopoietic cells are less sensitive to IgE-mediated, passive, systemic anaphylaxis. After IgE-induced stimulation, bone marrow-derived MCs from Kif5b knockout mice exhibited a marked reduction in SG translocation toward the secretion site. In contrast, a lack of Kif5b did not affect cytokine secretion, early FcεRI-initiated signaling pathways, or microtubule reorganization upon FcεRI stimulation. We identified Slp3 as the critical effector linking kinesin-1 to Rab27b-associated SGs. Kinesin-1 recruitment to the Slp3/Rab27b effector complex was independent of microtubule reorganization but occurred only upon stimulation requiring phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) activity. Our findings demonstrate that PI3K-dependent formation of a kinesin-1/Slp3/Rab27b complex is critical for the microtubule-dependent movement of SGs required for MC degranulation.

Introduction

Mast cells (MCs) are granulated cells of hematopoietic lineage that house most tissues in the body. These cells are present in especially large numbers under epithelial and mucosal surfaces exposed to the external environment (such as the skin, the airways, and the intestine). Although MCs are key effectors in innate immunity, they also play a harmful role in allergies—the most serious manifestation of which is anaphylaxis (Galli et al., 2005a,b).

MCs express several receptors on their surface, including the high-affinity IgE receptor (FcεRI) responsible for allergic triggering (Beghdadi et al., 2011). Within minutes of the cross-linking of receptor-bound IgE by a specific, multivalent

antigen or allergen, the MCs' stored secretory granules (SGs) degranulate and release a variety of inflammatory mediators (including proteases, proteoglycans, lysosomal enzymes such as β-hexosaminidase, and biogenic amines such as histamine and serotonin). This is followed (within 15–30 min) by the synthesis of lipid mediators, such as leukotrienes and prostaglandins, and (after several hours) by the de novo synthesis and secretion of cytokines and chemokines that mediate the inflammatory response (Blank and Rivera, 2004; Blank et al., 2014; Wernersson and Pejler, 2014).

Degranulation is accompanied by the extensive reorganization of the cytoskeleton associated with membrane ruffling and spreading (Dráber and Dráber, 2015). The degranulation process also involves the anterograde movement of SGs toward

*U. Blank and G. Ménasché contributed equally to this paper.

Correspondence to Gaël Ménasché: gael.menasche@inserm.fr

Abbreviations used: BMDC, bone marrow-derived MC; cKO, conditional knockout; CTL, cytotoxic T lymphocyte; DN, dominant-negative; HSA, human serum albumin; KLC, kinesin light chain; MC, mast cell; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; SG, secretory granule; TIRF, total internal reflection fluorescence; WT, wild type.

© 2016 Munoz et al. This article is distributed under the terms of an Attribution-NonCommercial-Share Alike-No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms>). After six months it is available under a Creative Commons License [Attribution-NonCommercial-Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>].

Supplemental Material can be found at:
/content/suppl/2016/10/13/jcb.201605073.DC1.html



the plasma membrane, where they fuse to release their contents. It has been shown that the FcεRI-mediated anterograde movement of SGs depends on microtubule dynamics (Nishida et al., 2005). This involves the activation of a Fyn/Gab2/RhoA signaling pathway but is independent of calcium influx (Nishida et al., 2005, 2011). Further studies have highlighted a role for ARF1 after activation by Fyn and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K; recruited via Gab2; Nishida et al., 2011). More recently, DOCK5, Nck2, and Akt (a downstream effector of PI3K) have been shown to regulate microtubule dynamics in MCs (Ogawa et al., 2014). This involved the Akt-mediated inactivation of glycogen synthase kinase 3 β (GSK3β), which promotes microtubule assembly. However, the molecular machinery that links the trafficking of SGs to microtubule dynamics in MCs has yet to be well characterized.

There are some data on the mechanism that controls the fusion between SGs and the plasma membrane in MCs. It includes SNAREs (such as syntaxin 3 [STX3], STX4, SNAP-23, and VAMP8) and the accessory molecule Munc18-2 (Tiwari et al., 2008; Lorentz et al., 2012; Brochetta et al., 2014). The small GTPases Rab27a and (especially) Rab27b are also involved in MC degranulation (Mizuno et al., 2007). It has been shown that the GTP-bound forms of Rab27a and Rab27b recruit effectors of the synaptotagmin-like protein family (Slp1/JFC1, Slp2a, Slp3, Slp4/granuphilin, and Slp5), which are involved in the trafficking and docking of secretory vesicles in various cell types (Fukuda et al., 2002; Kuroda et al., 2002; Ménasché et al., 2008). Members of the Slp family share an N-terminal Rab27-binding Slp homology domain and a C-terminal phospholipid binding tandem C2 domain.

In cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and in neurons, we and others have reported that the plus end movement of cytotoxic granules and synaptic vesicles, respectively, is mediated by the microtubule-dependent motor protein kinesin-1 (Arimura et al., 2009; Kurowska et al., 2012). A Rab27a/Slp3/kinesin-1 complex was shown to regulate cytotoxic granule transport in CTLs, whereas a Rab27b/Slp1/CRMP-2/kinesin-1 molecular complex is involved in the anterograde transport of synaptic vesicles in neurons (Arimura et al., 2009; Kurowska et al., 2012). Kinesin-1 (the archetypal member of the kinesin superfamily) is a tetrameric protein composed of two heavy chains (KIF5A, KIF5B, or KIF5C) and two kinesin light chains (KLCs; KLC1, KLC2, KLC3, or KLC4; Hirokawa, 1998). KIF5B and KLC1 are ubiquitously distributed and mediate the plus end-directed, microtubule-dependent transport of cargoes. The targeted inactivation of Kif5b in pancreatic β cells revealed a key role for kinesin-1 in insulin secretion (Cui et al., 2011). The study of another mouse model in which Kif5b had been specifically inactivated in myogenic cells revealed that kinesin-1 has an important role in the anterograde transport of key elements required for myofibril assembly (including α-sarcomeric actin, myosin IIB, nestin, and desmin; Wang et al., 2013).

To characterize the function of kinesin-1 in MC degranulation, we crossed the *Kif5b*^{fl/fl} mouse (Cui et al., 2011) with the VAV1-Cre mouse. The *Kif5b*^{fl/fl};VAV1-CRE conditional knockout (cKO^{Kif5b}) offspring lack *Kif5b* in all their hematopoietic lineages, including MCs. These mice display no obvious abnormal development of the lymphoid and myeloid lineages. Here, we demonstrate that kinesin-1 regulates FcεRI-mediated MC degranulation both in vitro and in vivo. We further identify the molecular complex and a signaling pathway downstream of PI3K that enable SGs to be recruited to kinesin-1.

Results

Kif5b is expressed in MCs and is not required for MC differentiation

To explore the molecular machinery involved in the anterograde transport of SGs during MC degranulation, we focused on *Kif5b* (the gene coding for the major heavy chain isoform of kinesin-1 expressed in murine MCs; Fig. 1 A). We generated the cKO^{Kif5b} mouse model, which lacks *Kif5b* in all hematopoietic cell lineages. In the absence of *Kif5b*, bone marrow progenitors differentiated normally into MCs in the presence of IL-3 and stem cell factor. Expression levels of the MC-specific markers FcεRI and c-Kit were similar when comparing wild-type (WT) and cKO^{Kif5b} bone marrow-derived MCs (BMMCs; Fig. 1 B). We confirmed that *Kif5b* was absent in cKO^{Kif5b} BMMCs, and we did not observe compensatory up-regulation of the other isoforms (Fig. 1 A). As kinesin-1 is a tetramer composed of two heavy chains and two light chains, we analyzed light chain expression in BMMCs. Quantitative real-time PCR assays of the three KLCs (KLC1, KLC2, and KLC3) showed that KLC1 was the main isoform present in BMMCs (Fig. 1 C). We next confirmed the absence of *Kif5b* protein in cKO^{Kif5b} BMMCs (Fig. 1 D). In vivo, WT and cKO^{Kif5b} samples did not differ significantly in terms of the MC counts in the skin of the back (in a toluidine blue staining; Fig. 1, E and F) or in the peritoneal cavity (detected using flow cytometry; Fig. 1 G). This finding indicates that kinesin-1 is not essential for MC survival or tissue targeting. Collectively, these results show that *Kif5b* deficiency does not affect MC development in vitro or in vivo.

Kinesin-1 regulates SG degranulation in MCs in vitro and in vivo

To determine the role of kinesin-1 in stimulus-secretion coupling in MCs, WT and cKO^{Kif5b} BMMCs were sensitized with anti-DNP-IgE antibody before stimulation with DNP-human serum albumin (HSA). Time course experiments showed that within minutes, FcεRI-mediated BMMC activation induced degranulation (as measured by the release of β-hexosaminidase from SGs). *Kif5b*-deficient BMMCs exhibited a markedly impaired ability to degranulate upon FcεRI activation (Fig. 2 A). Likewise, when degranulation was assessed by measuring the exposure of CD63 at the cell surface upon IgE/Ag stimulation as described previously (Brochetta et al., 2014), we confirmed that *Kif5b*-deficient BMMCs expressed much lower levels than WT cells (Fig. 2 B). We also performed rescue experiments by reexpression of *Kif5b* in mutant BMMCs. As expected, reintroduction of *Kif5b* corrected the defective degranulation in *Kif5b*-deficient BMMCs (Fig. 2 C). Conversely, expression of a dominant-negative (DN) mutant of *Kif5b* (GFP-Kif5b DN; Kimura et al., 2005) lacking the kinesin ATPase motor domain of kinesin heavy chain in WT BMMCs inhibited IgE/Ag-stimulated secretion (Fig. 2 D).

To assess kinesin-1's role in MC degranulation in vivo, we performed passive systemic anaphylaxis experiments. 24 h after sensitization with anti-DNP IgE antibody, WT and cKO^{Kif5b} mice were challenged with DNP-HSA. The body temperature was recorded, and the serum level of MC-specific protease-1 (MCPT-1) was assayed as an index of the severity of the anaphylactic response. As shown in Fig. 2 E, the body temperature drop was less pronounced in cKO^{Kif5b} mice than in WT mice (notably during the later phases). Likewise, cKO^{Kif5b} mice had lower serum levels of MCPT-1 at 60 min (relative to WT mice),

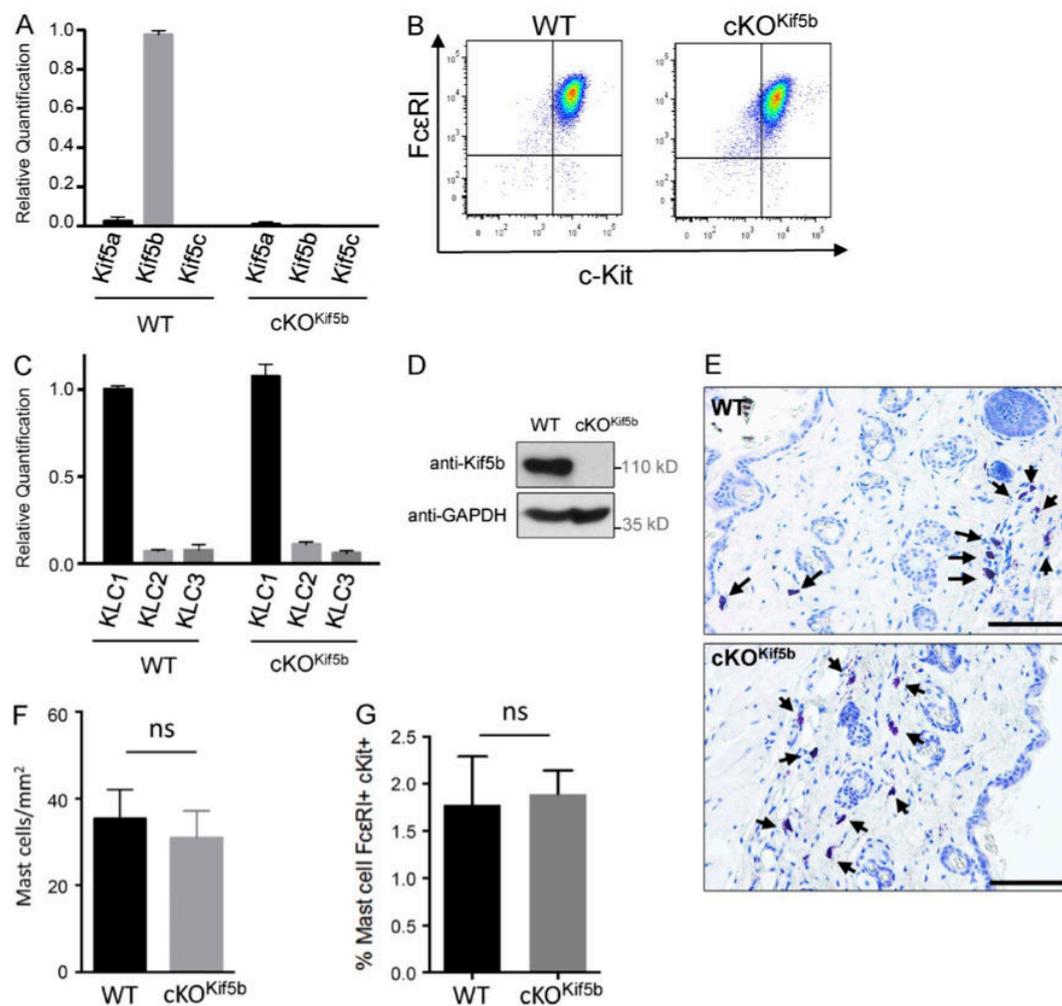


Figure 1. Kif5 expression in BMMCs and cKO^{Kif5b} MC maturation. (A) Relative quantification of Kif5a, Kif5b, and Kif5c transcripts by real-time PCR in BMMCs from WT and cKO^{Kif5b} mice. Transcript levels for each sample were expressed as a proportion of the mean value for Kif5b. The data are representative of three independent experiments performed in triplicate. (B) Expression of FcεRI and c-Kit on BMMCs from WT and cKO^{Kif5b} mice, as determined by flow cytometry. (C) Relative quantification of KLC1, KLC2, and KLC3 transcripts by real-time PCR in BMMCs from cKO^{Kif5b} and WT mice. Transcript levels for each sample were expressed as a proportion of the mean value for KLC1. The data are representative of three independent experiments performed in triplicate. (D) WT and cKO^{Kif5b} BMMC lysates were separated by SDS-PAGE and were immunoblotted with anti-Kif5b and anti-GAPDH antibodies. The blots are representative of three independent experiments. (E) Toluidine blue staining of MCs in the back skin of WT and cKO^{Kif5b} mice. Arrows indicate MCs. Bars, 100 μm. (F) The corresponding absolute MC counts per millimeter squared (mean ± SD). Three histological sections per animal were analyzed for WT (n = 3) and cKO^{Kif5b} (n = 3) mice. (G) Flow cytometry determination of the proportion of c-Kit⁻ and FcεRI⁻ expressing peritoneal MCs obtained from WT (n = 5) and cKO^{Kif5b} (n = 5) mice. Error bars represent SD. ns, not significant.

indicating that Kif5b-deficient MCs were impaired in their capacity to degranulate *in vivo* (Fig. 2 F).

To explore whether or not the absence of kinesin-1 in BMMCs affected SG translocation, we compared the distribution of SGs in resting cells and stimulated cells (at 10 and 30 min) using an anti-STX3 antibody. In resting BMMCs, there was no difference in the SG distribution between WT and cKO^{Kif5b} samples (Fig. 2 G). In stimulated BMMCs, however, we observed a marked difference. 10 min after stimulation through FcεRI, at least 80% of STX3 was located at the cell periphery in WT BMMCs (indicating significant SG translocation and fusion with the plasma membrane), whereas only 15% of STX3 was found at the cell periphery in cKO^{Kif5b} BMMCs (Fig. 2 G). After 30 min of activation, the proportion of cKO^{Kif5b} BMMCs in which SGs had reached the cell periphery had risen to 50%, but

was still lower than in WT BMMCs (Fig. 2 G). These results indicate that kinesin-1 is the molecular motor that enables SGs to translocate to the plasma membrane and secrete their contents.

To confirm and extend these findings, we used live cell imaging with total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy to analyze the time course of SG recruitment to the plasma membrane upon FcεRI activation. We found that after a brief period of endocytosis, WGA (previously used to label cytotoxic granules in CTLs; Sepulveda et al., 2015) constitutes a valuable marker of SGs in live BMMCs. The BMMCs were pulsed for 20 min with Alexa Fluor 488 (green)-conjugated WGA and then chased for 18 h (Fig. 3 A). WGA uptake was similar in WT and cKO^{Kif5b} BMMCs (Fig. 3 B). The WGA was present in the lumen of STX3-positive SGs (Fig. 3 C) and so probably labeled intraluminal vesicles (as previously shown for

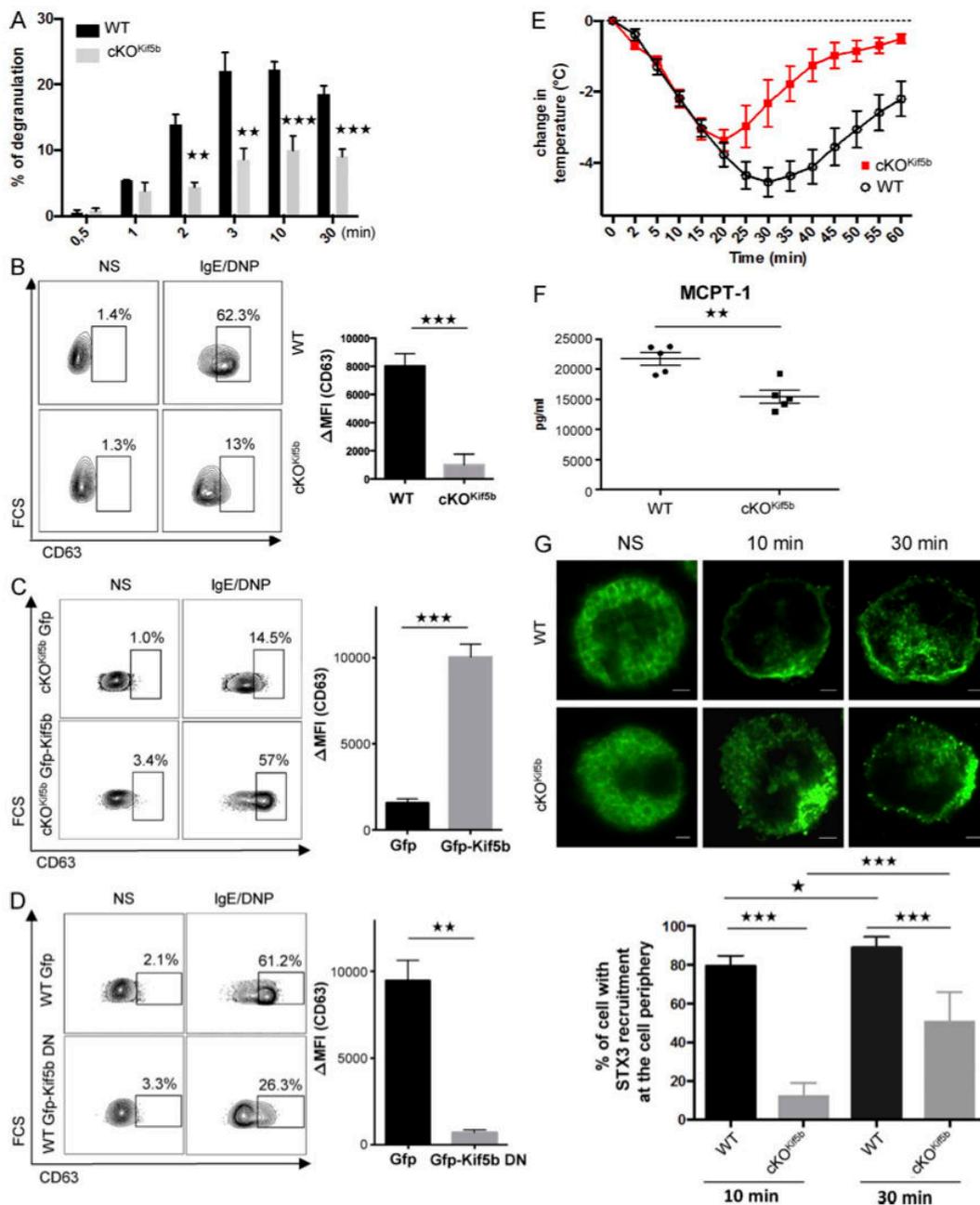


Figure 2. The absence of Kif5b impairs MC degranulation in vitro and in vivo. (A) Release of β -hexosaminidase from IgE-sensitized WT and cKO^{Kif5b} BMMCs, as induced by 20 ng/ml DNP-HSA and determined at the indicated time points. Results are quoted as the mean \pm SD of 10 experiments. (B) IgE-sensitized WT and cKO^{Kif5b} BMMCs were either not stimulated or were stimulated with 20 ng/ml DNP-HSA for 10 min. Cells were fixed, and the cell surface expression of CD63 (as a surrogate marker of degranulation) was determined by flow cytometry (left) and quantified (Δ MFI CD63⁺; right). (C) GFP or GFP-Kif5b was transfected in Kif5b-deficient BMMCs. GFP⁺ BMMCs were then assessed for CD63 expression using flow cytometry (left), and expression was quantified (Δ MFI CD63⁺; right). (D) GFP or GFP-Kif5b DN was transfected in WT BMMCs. GFP⁺ BMMCs were then assessed for CD63 expression using flow cytometry (left), and expression was quantified (Δ MFI CD63⁺; right). (E) WT ($n = 5$) and cKO^{Kif5b} ($n = 5$) mice were passively sensitized with 1 μ g/g anti-DNP IgE antibody. 24 h later, mice were challenged with (500 μ g) DNP-HSA. Systemic anaphylaxis was determined from the change in body temperature. (F) Serum MCPT-1 levels in WT ($n = 5$) and cKO^{Kif5b} ($n = 5$) mice, measured 60 min after the DNP-HSA challenge. (G, top) IgE-sensitized WT and cKO^{Kif5b} BMMCs were plated on fibronectin-coated glass coverslips and then stimulated by the addition of 20 ng/ml DNP-HSA for the indicated times. NS, nonstimulated. Cells were then fixed, permeabilized, and stained with anti-STX3. Bars, 2 μ m. (Bottom) The percentage of cells with STX3 recruitment to the periphery of the cell. In each individual experiment in the nonstimulated condition ($n = 3$), stimulated condition for 10 min ($n = 3$), and stimulated condition for 30 min ($n = 3$), >100 cells distributed in different areas of the glass coverslip were counted. Statistical analyses were performed using unpaired t tests. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$; ***, $P < 0.0001$.

cytotoxic granules; Sepulveda et al., 2015). Upon WGA loading, BMMCs were sensitized with anti-DNP-IgE antibody and placed on fibronectin-coated glass coverslips. Immediately after the addition of DNP-HSA, TIRF microscopy images were acquired for 15 min. In WT BMMCs, SG docking events were first viewed 8 min after stimulation and continued until the end of the acquisition (Video 1 and Fig. 3, D and E). In contrast, very few SG docking events were detectable in cKO^{Kif5b} BMMCs until 13 min after stimulation. However, the number of docking events in cKO^{Kif5b} BMMCs was much lower than in WT BMMCs (Video 2 and Fig. 3, D and E). These results indicate that kinesin-1 controls translocation of SGs to the secretion site.

Kinesin-1 is not essential for early signaling and cytokine secretion upon FcεRI stimulation

We next looked at whether functional kinesin-1 was required for early signaling pathways. WT and Kif5b-deficient BMMCs did not differ significantly in terms of Erk and Akt phosphorylation (Fig. 4 A) or calcium influx (Fig. 4 B). These results indicate that the degranulation defect observed in the Kif5b-deficient BMMCs is not caused by impaired signaling downstream of FcεRI activation.

Because FcεRI receptor aggregation also leads to de novo synthesis and secretion of cytokines, we next sought to determine whether or not Kif5b-deficient BMMCs could produce and secrete proinflammatory cytokines such as TNF, IL-6, and CCL2 (also known as MCP1). After 3 h of stimulation through FcεRI, there were no apparent differences in cytokine secretion between WT and Kif5b-deficient BMMCs (Fig. 4 C). These results indicate that kinesin-1 is not essential for cytokine secretion upon FcεRI activation.

Characterization of the kinesin-1-dependent transport machinery in MCs

Given that kinesin-1 has been shown to regulate the transport of Rab27/Slp-associated vesicles on microtubules, and that Rab27b is involved in MC degranulation (Mizuno et al., 2007; Arimura et al., 2009; Kurowska et al., 2012), we further explored the molecular machinery of kinesin-1-dependent SG transport in MCs. In line with literature data on defective secretion by MCs in Rab27b mice but not in Rab27a knockout mice (Mizuno et al., 2007), we found that Rab27b was the main Rab27 family member expressed in BMMCs, whereas Rab27a was only expressed at low levels (Fig. 5 A). When the expression of the five members of the Slp family was analyzed, only Slp3 was found to be highly expressed in BMMCs; Slp2 was expressed to a much lesser extent (Fig. 5 A). Because Slp2 protein could not be detected in BMMC lysate (Fig. 5 B), we investigated Slp3's contribution to the kinesin-1-dependent transport machinery. Fig. 5 C shows that Slp3 coimmunoprecipitated with Rab27b in both unstimulated and FcεRI-stimulated cells. Interestingly, Kif5b coimmunoprecipitated with Rab27b strongly in stimulated cells but not at all in unstimulated cells (Fig. 5 C).

To understand which proteins in the complex were able to interact with each other, we overexpressed different combinations of tagged proteins in HEK 293T cells. The strong interactions between Rab27b and Slp3 and between Slp3 and KLC1 were confirmed (Fig. 5, D and E). No interaction between Rab27b and the kinesin-1 light or heavy chains was observed (Fig. 5, E and F). In contrast, Kif5b and Slp3 showed a weak interaction (Fig. 5 F), although it was not clear whether

this occurred directly or required endogenous KLC1 expressed in HEK 293T cells. In contrast to the results in MCs (Fig. 5 C), activation of HEK 293T by PMA/ionomycin did not modulate the interaction between Slp3 and kinesin-1 (Fig. 5, E and F). These data suggest that the interaction between Slp3 and kinesin-1 does not require additional modifications. Because MC activation promotes Slp3/Kif5b complex formation, this determines kinesin-1's ability to access Slp3 (Fig. 5 G).

We next investigated the subcellular localization of the kinesin-1-dependent transport machinery. To this end, we engineered BMMCs to coexpress GFP-Rab27b and Dsred-Slp3. In WT BMMCs, strong overlap of the two fluorescence signals (Dsred-Slp3/GFP-Rab27b; $73.90 \pm 2.54\%$ overlap) was observed for the SGs labeled by STX3 (STX3/(GFP-Rab27b/Dsred-Slp3); $73.22 \pm 5.56\%$ overlap; Fig. 6 A). Upon FcεRI activation, the Rab27b/Slp3 complexes (DRed-Slp3/GFP-Rab27b; $80.92 \pm 2.6\%$ overlap) were recruited to the cell periphery and colocalized with STX3 (STX3/(GFP-Rab27b/Dsred-Slp3); $70.9 \pm 4.7\%$ overlap; Fig. 6 B). In Kif5b-deficient BMMCs, translocation of the Rab27b/Slp3 complex to the cell periphery was dramatically impaired upon activation (Fig. 6, C–E), as had been observed for STX3 (Fig. 2 D). This finding further supports the critical role of kinesin-1 in the transport of Rab27b/Slp3-associated SGs to the cell periphery.

The endogenous Kif5b was mainly distributed along the microtubules, with strong labeling beneath the plasma membrane and (to a lesser extent) in the cytosol and around the microtubule-organizing center (Fig. 6 F). The Kif5b-deficient MCs did not display any Kif5b labeling, confirming the antibody's specificity (Fig. 6 G). Upon FcεRI activation, Kif5b in WT cells was predominantly recruited to the peripheral tubulin ring beneath the plasma membrane (an area of the cell that is rich in newly formed microtubules leading to filopodia-like extensions; Fig. 6 H). Microtubule organization did not seem to be affected by the absence of Kif5b in either unstimulated or stimulated cells (Fig. 6, G and I–K), and microtubules formed normally upon FcεRI activation (Fig. 6, J and K).

Because our results indicated that Slp3 links Rab27b-associated SGs to kinesin-1 upon FcεRI activation, we further analyzed Slp3's involvement in SG secretion by using siRNAs to specifically knock down Slp3 in BMMCs. The high efficacy of Slp3 knockdown was confirmed by Western blotting (Fig. 7 A). The BMMCs' ability to degranulate after Slp3 knockdown was assessed by measuring the membrane expression of CD63. Likewise, Slp3 silencing substantially impaired SG secretion (Fig. 7 B). We next looked at whether the secretion defect resulting from Slp3 silencing was also associated with a defect in SG translocation. In unstimulated Slp3-silenced BMMCs, STX3's localization was essentially the same as in BMMCs expressing control siRNA (Fig. 7 C). In contrast, Slp3-silenced BMMCs were unable to translocate their STX3-containing SGs to the plasma membrane upon stimulation through FcεRI, whereas translocation did occur in BMMCs expressing control siRNA (Fig. 7 C). These data demonstrate that Slp3 is part of the molecular machinery that couples microtubule dynamics and SG translocation to the plasma membrane upon FcεRI activation.

The formation of kinesin-1-dependent transport machinery is regulated by PI3K

The results described previously suggested the existence of an active mechanism for recruitment of the kinesin-1-dependent transport machinery to SGs. To identify possible signaling path-

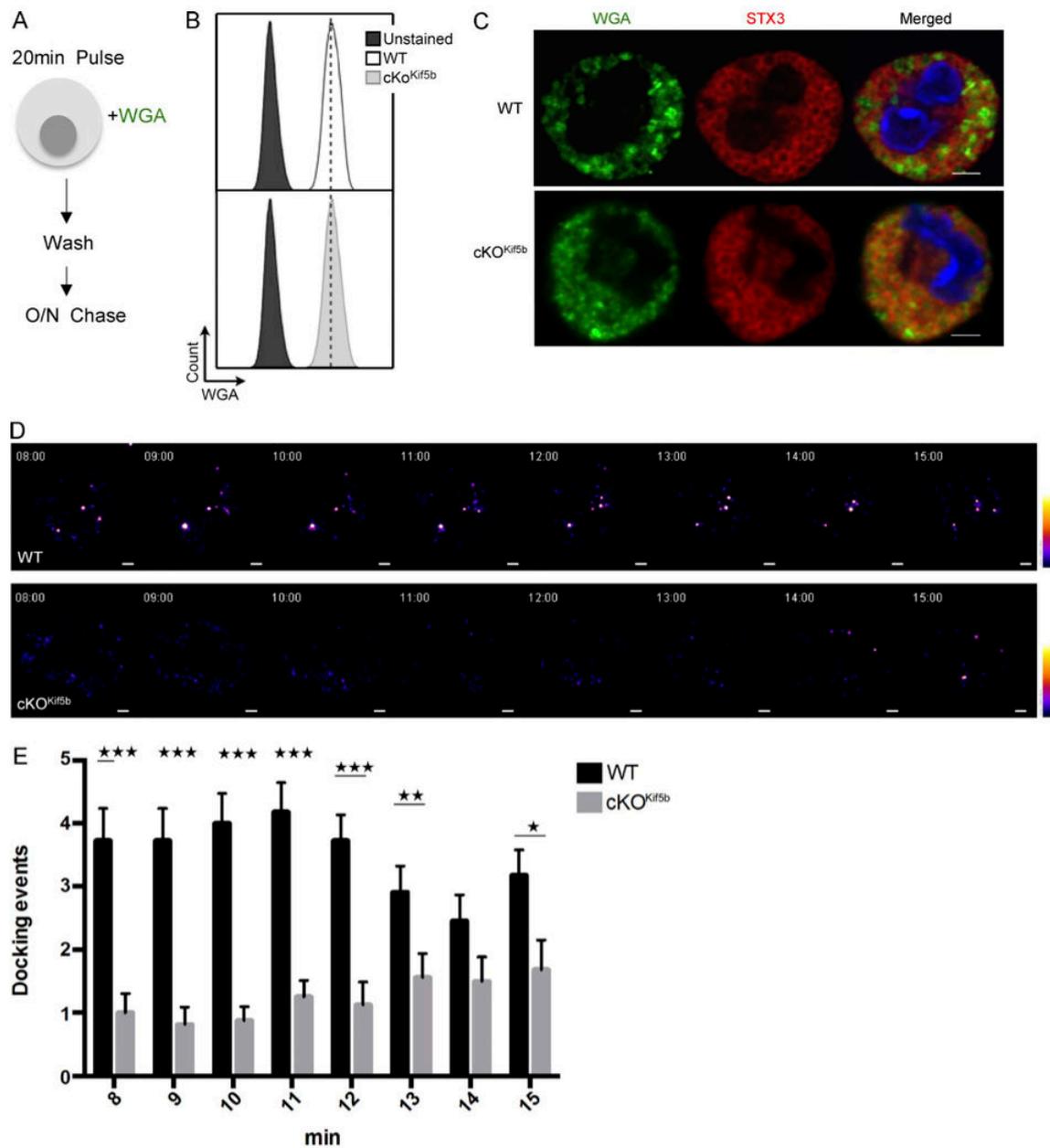


Figure 3. The dynamic recruitment of SGs to the plasma membrane upon FcεRI activation is impaired in the absence of Kif5b. (A) Schematic representation of the WGA labeling protocol for BMMCs. WT and cKO^{Kif5b} BMMCs were pulsed with Alexa Fluor 488–conjugated WGA and washed. An 18-h chase was then performed. (B) According to flow cytometry, WGA uptake was equivalent in WT and cKO^{Kif5b} BMMCs. (C) WT and cKO^{Kif5b} BMMCs were labeled with WGA-488 and plated on fibronectin-coated glass coverslips. Cells were then fixed, permeabilized, and stained with anti-STX3. (D) TIRF video microscopy was performed on IgE-sensitized WT and cKO^{Kif5b} BMMCs labeled with WGA-488 (green) and then plated on fibronectin-coated glass coverslips. The addition of 20 ng/ml DNP-HSA represents *t* = 0 of the acquisition. Representative series of images are shown every minute, from 8 to 15 min. A pseudocolor scale from blue (very weak intensity) to white (highest intensity) was used to indicate the intensity of TIRF staining. A WGA-containing granule was defined by a minimum of a square of 3 × 3 pixels (1 pixel = 0.16 μm) of strong intensity signal (orange to white intensity). Also see Videos 1 and 2. (E) The number of docking events per cell acquired with TIRF microscopy, from 8 min to 15 min of the acquisition. Statistical analyses were performed using unpaired *t* tests. *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.005; ***, *P* < 0.0001. 20 cells were analyzed for each condition in a total of four independent experiments. Error bars represent mean ± SD. Bars, 2 μm.

ways, we performed experiments with two specific inhibitors of PI3K and intracellular calcium flux (LY-294002 and BAPTA; Nishida et al., 2005, 2011). Both drugs severely impaired degranulation (Fig. 8 A). When assessing Kif5b recruitment to the granular Slp3/Rab27b effector complex upon FcεRI activation,

we found that BAPTA had no effect; in contrast, treatment with LY-294002 completely disrupted Kif5b/Slp3 complex formation (Fig. 8 B). To determine whether PI3K blockade affects the coupling of SGs to microtubule-dependent translocation, we analyzed the drugs' effect on the relocation of SG-associated

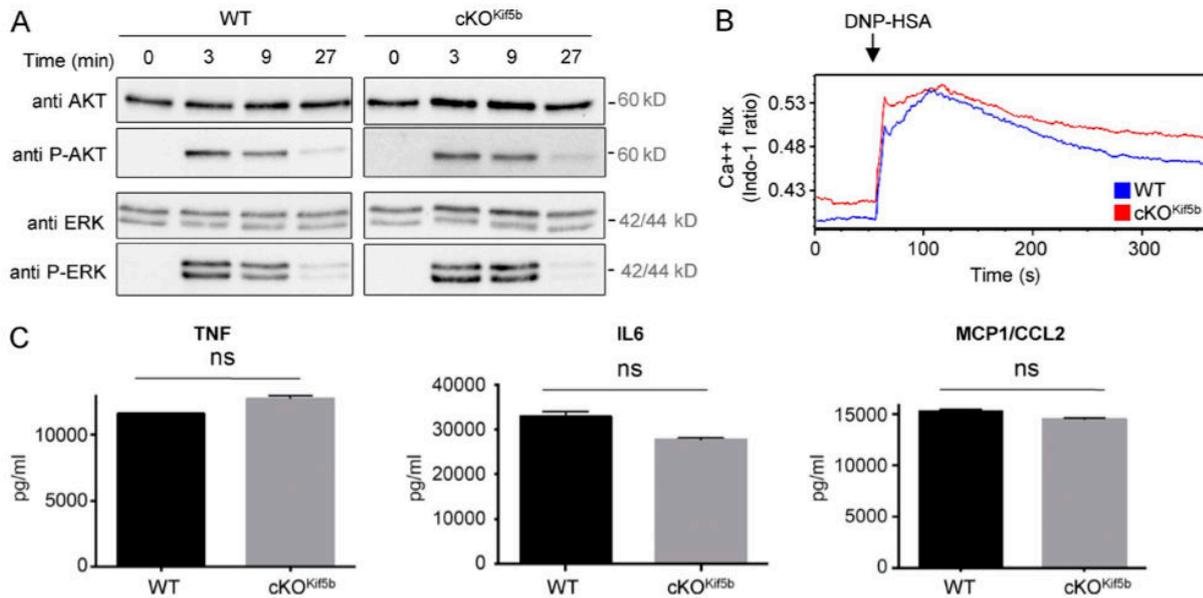


Figure 4. Proximal signaling and cytokine secretion upon FcεRI activation is not affected in Kif5b-deficient BMMCs. (A) IgE-sensitized WT and cKO^{Kif5b} BMMCs were stimulated with DNP-HSA for the indicated times, lysed, and then assayed for total and phosphorylated Akt and Erk by Western blotting. Data are representative of two independent experiments. (B) IgE-sensitized WT and cKO^{Kif5b} BMMCs were loaded with indo-1 and stimulated with DNP-HSA. The fluorescence emission ratio for Ca²⁺-bound/Ca²⁺-free indo-1 was measured for the indicated period of time. Similar results were obtained in three independent experiments. (C) TNF, IL-6, and CCL2 (MCP1) secretion were determined in ELISA. Data are expressed as the mean ± SD of triplicate samples and are representative of two independent experiments. ns, not significant.

STX3 to the plasma membrane upon FcεRI activation. In agreement with the uncoupling observed previously, LY-294002 dramatically impaired SG translocation to the plasma membrane, but BAPTA had no effect (Fig. 8 C; Nishida et al., 2005). As it had previously been shown that PI3K controls microtubule formation (Nishida et al., 2005), we looked at whether recruitment of kinesin-1 to the transport machinery required microtubule formation. To this end, we disrupted microtubule formation using nocodazole. As expected, nocodazole strongly impaired SG secretion (Fig. 8 D) and the translocation of SG-associated STX3 to the plasma membrane (Fig. 8 E). Interestingly, treatment with nocodazole had no effect on Kif5b/Slp3 complex formation after stimulation via FcεRI (Fig. 8 F). Taken as a whole, these results indicate that the coupling between kinesin-1 and its granular effector complex is independent of the microtubule network but does require PI3K activity.

Discussion

MC activation by IgE and antigens triggers the release of SGs containing the preformed mediators responsible for anaphylactic responses. Although microtubule dynamics are known to have a critical role in SG movement (Nishida et al., 2005, 2011; Ogawa et al., 2014), little is known about the molecular machinery that couples SGs to the microtubule cytoskeleton and drives the granules toward the secretion site after MC activation. Here, we provide evidence that the Kif5b heavy chain isoform of kinesin-1 is the key motor protein regulating the translocation of SGs to the plasma membrane upon FcεRI activation (and thus enabling anaphylactic degranulation) in vitro and in vivo. In contrast, Kif5b is not essential for the activation of proximal signaling pathways or the secretion of cytokines upon FcεRI stimulation. We further demonstrated that the kinesin-1 motor

protein links microtubules to SGs through a newly characterized molecular machinery (composed of granule-associated Rab27b and the Slp3 adapter protein). We found that formation of this complex is highly regulated in MCs and requires stimulation through a PI3K-dependent pathway.

Several lines of evidence suggest that Kif5b is critical for SG secretion upon FcεRI activation. A lack of Kif5b dramatically impaired (a) the release of β-hexosaminidase enzyme stored in SGs, (b) the degranulation ability of BMMCs (as quantified by cell surface CD63 expression), (c) the subcellular translocation of granule-associated STX3 to the cell periphery, (d) the dynamic recruitment of SGs to the plasma membrane, and (e) the anaphylactic response in in vivo passive systemic anaphylaxis experiments. In contrast, calcium influx, proximal signaling pathways, microtubule reorganization, and cytokine secretion were independent of Kif5b function.

It is noteworthy that in the absence of Kif5b, the release of granule contents was only partially impaired in vitro and in vivo. This partial impairment may be caused by the particular type of secretion that occurs in MCs. Indeed, MCs use a degranulation process called compound or multivesicular exocytosis, during which granules undergo fusion with each other before reaching the plasma membrane (Röhlich et al., 1971). These sequential fusion events may facilitate the release of the contents of several SGs by limiting vesicle trafficking before fusion with the plasma membrane. Degranulation in MCs also occurs through SGs that have already docked at the plasma membrane and thus may not require active movement. Furthermore, we cannot rule out the possibility that kinesin family members other than kinesin-1 may regulate SG transport in MCs or partially compensate for the loss of kinesin-1.

MC activation also leads to the synthesis and secretion of cytokines and chemokines. Our data show that the secretion of TNF, IL-6, and MCP1 was not affected in Kif5b-deficient

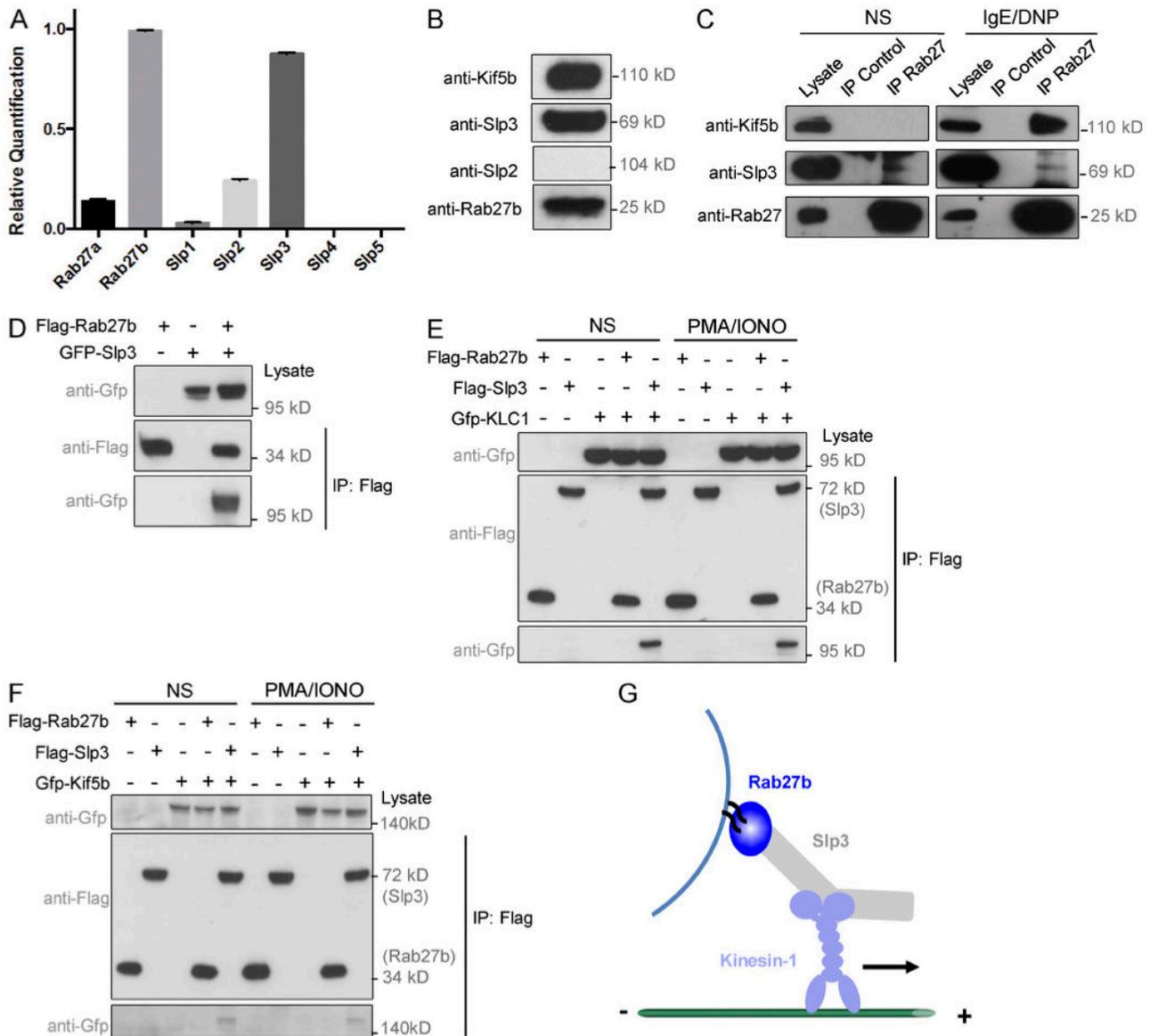


Figure 5. Characterization of the kinesin-1-dependent transport machinery in MCs. (A) Relative quantification of Rab27a, Rab27b, Slp1, Slp2, Slp3, Slp4, and Slp5 transcripts in BMMCs, using real-time PCRs. Transcript levels for each sample were expressed as a proportion of the mean value for Rab27b. (B) BMMCs were lysed and then analyzed by Western blotting with anti-Kif5b, anti-Slp2, anti-Slp3, and anti-Rab27 antibodies. (C) IgE-sensitized WT BMMCs were either not stimulated (NS) or were stimulated with 20 ng/ml DNP-HSA for 10 min and then lysed. Cell lysates were immunoprecipitated (IP) with a polyclonal anti-Rab27 antibody or with an isotype control antibody. The immunoblots were analyzed using anti-Kif5b, anti-Slp3, and anti-Rab27 antibodies. (D) Flag-Rab27b and GFP-Slp3 were coexpressed in HEK 293T cells. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-Flag antibody (M2 beads) and then separated by SDS-PAGE. Coprecipitated Rab27b and Slp3 were immunoblotted with anti-Flag and anti-GFP. (E) Flag-Rab27b, -Slp3, and GFP-KLC1 were coexpressed in HEK 293T cells. Cells were either not stimulated or were stimulated with PMA/ionomycin, and then cell lysates were immunoprecipitated with anti-Flag antibody (M2 beads) and separated by SDS-PAGE. Coprecipitated Rab27b or Slp3 and KLC1 were immunoblotted with anti-Flag and anti-GFP. (F) Flag-Rab27b, -Slp3, and GFP-Kif5b were coexpressed into HEK 293T cells. Cells were either not stimulated or were stimulated with PMA/ionomycin, and then cell lysates were immunoprecipitated with anti-Flag antibody (M2 beads) and separated by SDS-PAGE. Coprecipitated Rab27b or Slp3 and Kif5b were immunoblotted with anti-Flag and anti-GFP antibodies. Data in C–F are representative of three independent experiments. (G) Schematic diagram of the heterotrimeric protein transport complex involved in the translocation of SGs upon activation.

BMMCs. When considered together with data on SNARE proteins, SNARE accessory proteins, and actin regulatory proteins (such as VAMP8, Munc18-2, and Coronin1b; Tiwari et al., 2008; Föger et al., 2011; Brochetta et al., 2014), our results emphasize that cytokine secretion and SG secretion in MCs use different vesicle trafficking pathways.

To more precisely characterize the SG transport machinery, we focused on effectors of granule-localized Rab27b. This

protein has previously been reported to affect MC degranulation and was also shown to link to proteins interacting with kinesins, notably through Slp adapters (Mizuno et al., 2007; Arimura et al., 2009; Kurowska et al., 2012). Among the various Slp members endogenously expressed in MCs, Slp3 was the most highly expressed. Slp3 interacted with Rab27b, and both proteins colocalized on SGs and were translocated to the plasma membrane of MCs upon FcεRI-mediated stimulation. The critical

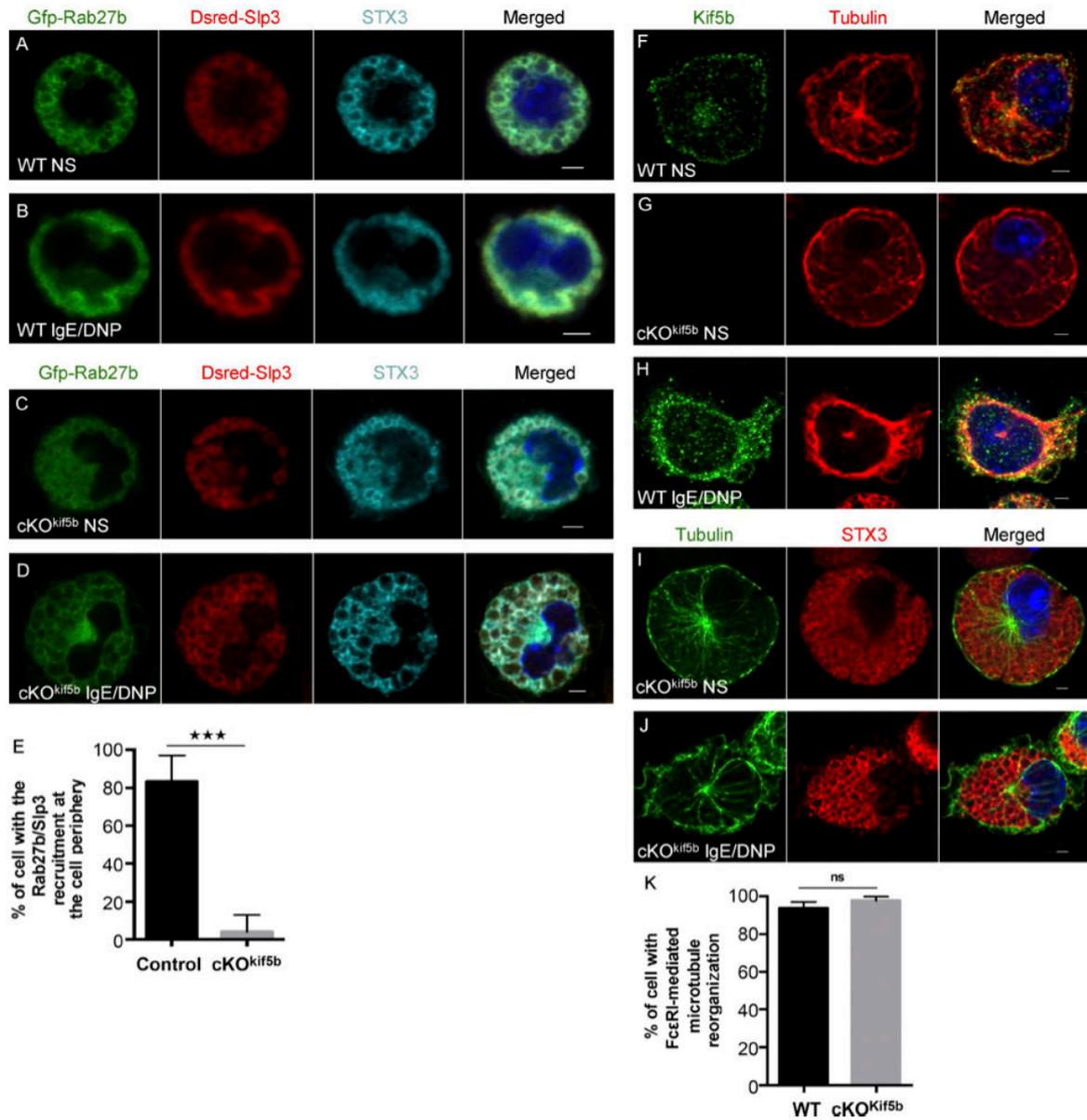


Figure 6. Subcellular localization of the kinesin-1–dependent transport machinery in MCs. (A–D) Confocal microscopy of WT or Kif5b-deficient BMMCs transfected with GFP-Rab27b and Dsred-Slp3 and labeled with anti-STX3 antibody in resting cells (A and C) or in cells stimulated by the addition of 20 ng/ml DNP-HSA for 10 min (B and D). (E) The statistical analysis of experiments in B and D was performed using an unpaired *t* test. ***, $P < 0.0001$. More than 30 cells were counted per setting. (F–J) IgE-sensitized WT (F and H) and cKO^{kif5b} (G, I, and J) BMMCs were plated on fibronectin-coated glass coverslips and either were not stimulated (F, G, and I) or were stimulated by the addition of 20 ng/ml DNP-HSA for 10 min (H and J). Cells were then fixed, permeabilized, and stained with an anti-tubulin antibody and an anti-Kif5b or anti-STX3 antibody. Bars, 2 μ m. All images of single cells are representative of >100 cells observed over at least three independent experiments. (K) Statistical analysis of microtubule reorganization at the plasma membrane identified by filopodia-like extension shape in experiments in H and J was performed using an unpaired *t* test. More than 100 cells were counted per setting. NS, not stimulated.

role of Slp3 in SG secretion was further demonstrated by the drastic impairment of SG secretion in Slp3-silenced cells, which resulted from a defect in SG translocation (closely mimicking the Kif5b deficiency). These data strongly suggest that Slp3 has a critical functional role in the translocation of SGs during MC degranulation.

Most interestingly, the Rab27b/Slp3 complexes in resting MCs localized to SGs labeled by STX3 but did not interact with kinesin-1. Furthermore, the recruitment of kinesin-1 to the

Rab27b/Slp3 complex required MC activation. The molecular mechanism underlying kinesin-1's interaction with the cargo receptor molecule Slp3 has not been described. Previous studies have revealed an autoinhibitory conformational mechanism used by a variety of kinesin motors, including kinesin-1 (Verhey and Hammond, 2009). The motor protein adopts a folded conformation in which nonmotor domains come into contact with the motor domain, thus blocking binding to and movement on microtubules (Verhey and Hammond, 2009). The release of

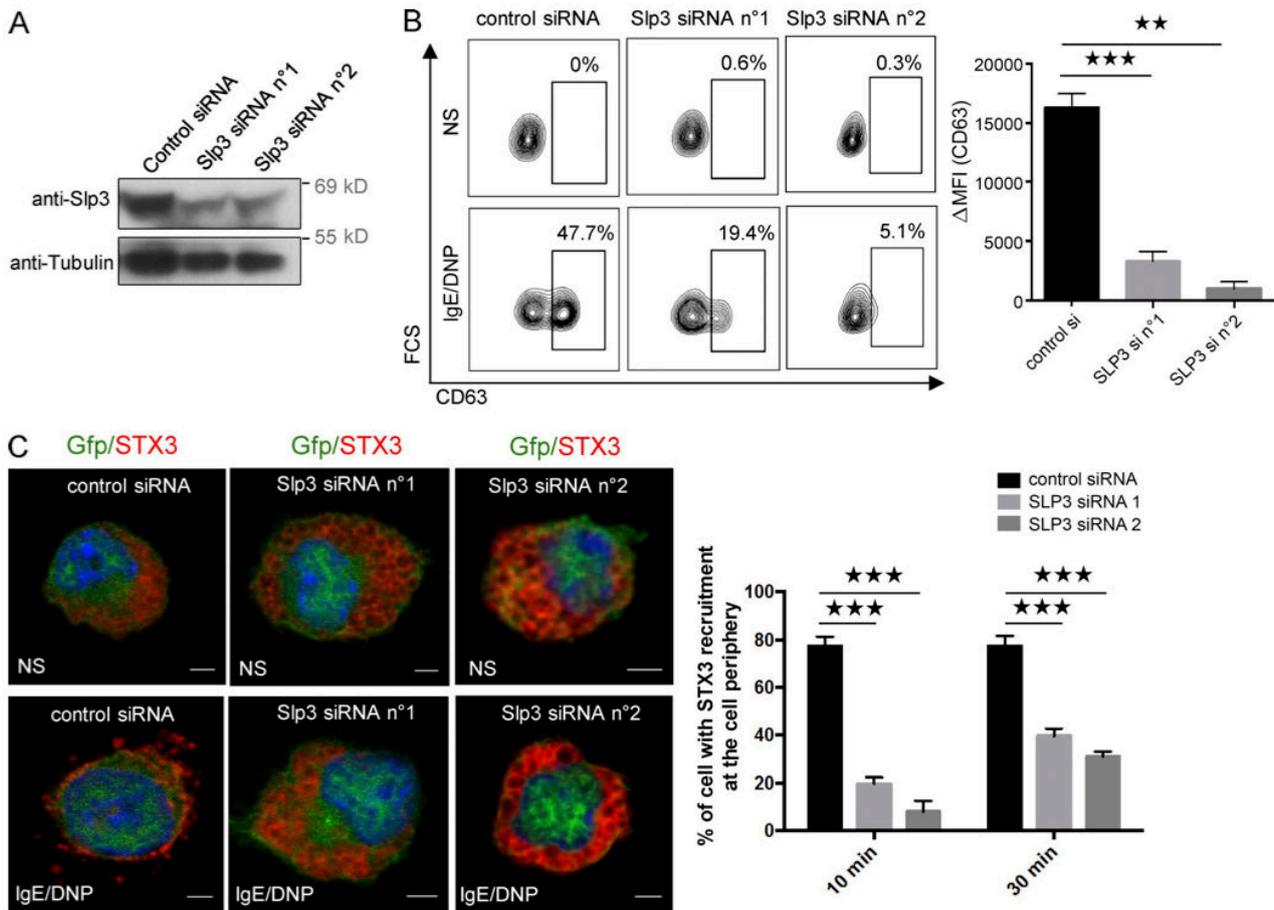


Figure 7. Role of Slp3 in SG degranulation. (A) BMMCs were electroporated with siRNAs targeting Slp3 (n°1 or n°2) or with control siRNA. Transfected BMMCs were lysed and analyzed by Western blotting using anti-Slp3 and antitubulin as a loading control. (B) Control or Slp3 siRNA n°1 or Slp3 siRNA n°2 was cotransfected with GFP alone. GFP+ BMMCs were then assessed for CD63 expression using flow cytometry (left), and expression was quantified (Δ MFI CD63+; right). (C, left) BMMCs were electroporated with siRNAs targeting Slp3 (n°1 or n°2) or with control siRNA, along with GFP. IgE-sensitized electroporated BMMCs were either not stimulated, or were stimulated with 20 ng/ml DNP-HSA for 10 min. Cells were fixed, permeabilized, and stained with anti-STX3 antibody. Bars, 2 μ m. (Right) In each individual experiment in the nonstimulated condition ($n = 2$), stimulated condition for 10 min ($n = 2$), and stimulated condition for 30 min ($n = 2$), >30 cells distributed in different areas of the glass coverslip were counted. Statistical analyses were performed using unpaired *t* tests. **, $P < 0.005$; ***, $P < 0.0001$. MFI, mean fluorescence intensity.

autoinhibition involves cargo binding and cellular activation, which change the molecular motor's phosphorylation status (Donelan et al., 2002; Verhey and Hammond, 2009). It has been reported that fasciculation and elongation protein- ζ 1 and Jun N-terminal kinase-interacting protein 1 regulate kinesin-1 microtubule mobility by binding to inhibitory regions of kinesin-1 (Blasius et al., 2007). Similarly, phosphorylation during cell division has been shown to remove the conformational autoinhibition of members of the kinesin-5 and -7 families (Cahu et al., 2008; Espeut et al., 2008). In pancreatic β cells, elevated intracellular calcium levels induce the dephosphorylation of Kif5b by calcineurin, which thus promotes insulin secretion (Donelan et al., 2002). Overexpression of Slp3, KLC1, or Kif5b in HEK 293T cells showed that Slp3 interacts with kinesin-1 through an activation-independent mechanism. One can reasonably hypothesize that kinesin-1 adopts an autoinhibitory conformation in resting MCs, making it inaccessible for Slp3.

To identify possible signaling effectors for the formation of the kinesin-1-dependent transport complex machinery, we used specific inhibitor compounds to disrupt PI3K activation or

calcium flux in response to MC activation through Fc ϵ RI. Our results show that Slp3/Kif5b complexes were not formed in the absence of PI3K activity. In contrast, complex formation was independent of intracellular calcium elevation. Our results are in agreement with a previous study showing that SG translocation to the plasma membrane is independent of calcium but depends on the dynamic reorganization of microtubules (Nishida et al., 2005). However, calcium is required for the release of SGs and controls the fusion between the SGs and the plasma membrane. Previous studies have shown that PI3K (through recruitment to the Gab2 adapter protein) has an important role in the regulation of microtubule dynamics and SG translocation in IgE-stimulated MCs (Nishida et al., 2011; Ogawa et al., 2014). This process involved the regulation of microtubule dynamics via phosphorylation and inactivation of GSK3 β through Akt (a downstream effector of PI3K and ARF1; Ogawa et al., 2014). Interestingly, a previous study indicated that active GSK3 inhibited anterograde transport in neurons through the phosphorylation of KLC2 (Morfini et al., 2002). However, further studies are now required to identify which of the signaling molecules downstream of

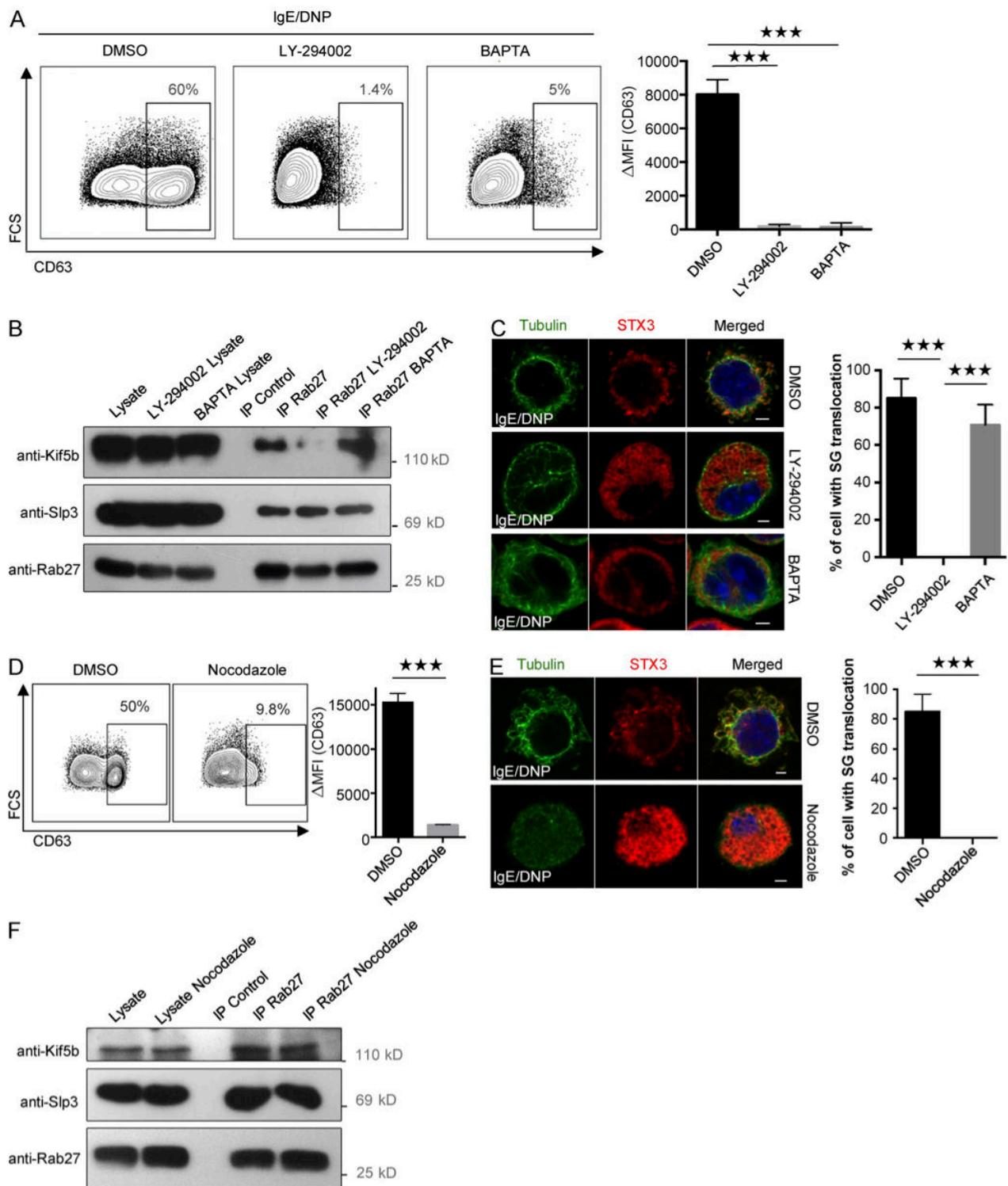


Figure 8. Kinesin-1-dependent transport machinery formation requires the activation of PI3K. (A) IgE-sensitized BMMCs were preincubated in normal medium containing DMSO (control), 100 μ M PI3K inhibitor LY-294002, or 20 mM intracellular calcium chelator BAPTA, and then stimulated with 20 ng/ml DNP-HSA for 10 min. Cells were fixed and incubated with anti-CD63 antibody before flow cytometry analysis (left), and expression was quantified (Δ MFI CD63⁺; right). (B) IgE-sensitized BMMCs were preincubated in normal medium containing DMSO, LY-294002, or BAPTA. BMMCs were stimulated with 20 ng/ml DNP-HSA for 10 min and then lysed. Cell lysates were immunoprecipitated (IP) with a polyclonal anti-Rab27 antibody or with isotype control antibody. The immunoblots were analyzed using anti-Kif5b, anti-Slp3, and anti-Rab27 antibodies. Data are representative of three independent experiments. (C, left) IgE-sensitized BMMCs were preincubated in medium containing DMSO, 100 μ M LY-294002, or 20 mM BAPTA. BMMCs were stimulated with 20 ng/ml DNP-HSA for 10 min. Cells were fixed, permeabilized, and stained with anti-STX3 and antitubulin antibodies. (Right) More than 100 cells

PI3K regulate kinesin-1's accessibility to cargo receptors like Slp3. This may require investigation of kinesin-1's phosphorylation status under unstimulated and stimulated conditions to establish whether this posttranslational modification modulates kinesin-1's access to its cargo receptor (as has been shown for kinesin-5 and -7 families; Cahu et al., 2008; Espeut et al., 2008).

Because *Kif5b* deficiency did not affect microtubule organization and microtubule formation upon FcεRI-mediated stimulation, we conclude that the impairment in SG translocation is solely due to defective mobility. Interestingly, disruption of the microtubule network by nocodazole did not abolish formation of the kinesin-1-dependent transport machinery upon FcεRI-mediated stimulation, suggesting that the *Kif5b*/Slp3 complex forms downstream of PI3K activity but is completely independent of concomitant microtubule reorganization.

In conclusion, we used a murine cKO model (lacking *Kif5b* in all hematopoietic lineages) to demonstrate that kinesin-1 regulates SG transport upon FcεRI activation of MCs through the recruitment of Rab27b/Slp3 complexes. This process is regulated by PI3K after IgE-mediated stimulation. The fact that cKO^{Kif5b} mice exhibited very low levels of passive, systemic anaphylaxis suggests that kinesin-1 could be a valuable target for new therapeutic approaches for controlling IgE-mediated type I immediate hypersensitivity reactions (independent of chemokine/cytokine secretion).

Materials and methods

Reagents and antibodies

Rabbit anti-STX3 and mouse monoclonal anti-DNP-IgE antibodies have been described previously (Brochetta et al., 2014). Anti-c-Kit-allophycocyanin and anti-FcεRI-FITC were purchased from eBioscience. Rabbit Akt antibody (Cell Signaling Technology), rabbit P-Akt antibody (Cell Signaling Technology), rabbit Erk1/2 antibody (Cell Signaling Technology), rabbit P-Erk1/2 antibody (Cell Signaling Technology), mouse monoclonal *Kif5b* antibody (BioLegend), rabbit polyclonal *Kif5b* (Proteintech), rabbit polyclonal Rab27 antibody (Synaptic Systems), rabbit polyclonal Slp3 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), mouse monoclonal α-tubulin (Abcam), mouse GAPDH antibody (EMD Millipore), purified rabbit anti-α-tubulin (Rockland), goat Alexa Fluor 555-conjugated anti-mouse IgG F(ab')₂ secondary antibodies (Invitrogen), donkey Alexa Fluor 555-conjugated anti-rabbit IgG (H+L; Invitrogen), and goat Alexa Fluor 647-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibodies were used. The polyclonal rabbit antibody anti-Slp2 has been described previously (Ménasché et al., 2008). Alexa Fluor 488 WGA was purchased from Invitrogen. LY-294002, BAPTA, and nocodazole were purchased from Sigma-Aldrich.

Mice

VAV-Cre transgenic mice (The Jackson Laboratory) were first crossed with *Kif5b*^{+/-} to generate *Kif5b*^{+/-};VAV-Cre mice. Next, *Kif*

5b^{+/-};VAV-Cre mice were bred with *Kif5b*^{fl/fl} mice to generate *Kif5b*^{fl/-};VAV-Cre (cKO^{Kif5b}) mutant mice and control (WT) *Kif5b*^{fl/+} littermates. Mice were genotyped by PCR using the primers described by Cui et al. (2011). Mice were maintained in pathogen-free conditions and handled according to national and institutional guidelines.

Cell culture and transfection

Bone marrow was isolated from femurs and tibias of 8–12-wk-old mice. Cells were then cultured in Iscove's modified Dulbecco's medium (Invitrogen) supplemented with 15% heat-inactivated FCS, 1% nonessential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 50 μM 2-ME, 100 U/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin, 10 ng/ml IL-3, and 10 ng/ml stem cell factor (Miltenyi Biotec). After four weeks of culture, maturation of the BMMCs (c-Kit and FcεRI expression) was checked by flow cytometry. BMMCs were transfected using the NEPA21 system (Nepagen), according to the manufacturer's protocols.

Histology

Sections from back skin were fixed in PFA, embedded in paraffin (according to routine histology laboratory techniques), and then stained with 0.1% toluidine blue solution.

Quantitative PCR

cDNA was prepared from BMMC mRNA using Superscript II and random primers (Invitrogen). Levels of *KIF5A*, *KIF5B*, *KIF5C*, *KLC1*, *KLC2*, *KLC3*, *RAB27A*, *RAB27B*, *SYTL1*, *SYTL2*, *SYTL3*, *SYTL4*, and *SYTL5* transcripts were determined in quantitative PCR assays using TaqMan Gene Expression Master Mix primer (*KIF5A*: Mm00515265_m1; *KIF5B*: Mm00515276_m1; *KIF5C*: Mm00500464_m1; *RAB27A*: Mm00469997_m1; *KLC1*: Mm00492936_m1; *KLC2*: Mm00492945_m1; *KLC3*: Mm00461422_m1; *RAB27B*: Mm00472653_m1; *SYTL1*: Mm00473300_m1; *SYTL2*: Mm01317927_m1; *SYTL3*: Mm00473333_m1; *SYTL4*: Mm00489110_m1; *SYTL5*: Mm00624760_m1; and *18S*: Mm03928990_g1; Applied Biosystems) and cDNA. Each sample was amplified in triplicate on a real-time PCR cyclor (ABI 7900) and analyzed with Sequence Detection Systems software (version 2.2.2; Applied Biosystems). The relative mRNA levels were quantified using the comparative C_t method and normalized against the mean values of *ACTB* as an endogenous control. Levels of *KIF5A*, *KIF5B*, and *KIF5C* transcripts were then expressed as a proportion of the mean value for *KIF5B*. Levels of *RAB27A*, *RAB27B*, *SYTL1*, *SYTL2*, *SYTL3*, *SYTL4*, and *SYTL5* transcripts were expressed as a proportion of the mean value of the gene showing the highest level of expression (arbitrarily set to 1 U).

Plasmid constructs

Mouse Rab27b was cloned into pCRII-TOPO using the primers Rab27b forward (5'-CGTCCAATTCTATGACTGATGGAGACTATG ATT-3') and reverse (5'-CGGGATCCCTAGCAGGCACATTTCTTT TC-3'). These constructs were then subcloned into pEGFP-C1 (Takara Bio Inc.). Cloning of Slp3, *Kif5b*, and *Kif5b*-DN has been previously reported (Ménasché et al., 2008; Kurowska et al., 2012).

were counted per setting. (D) IgE-sensitized BMMCs were preincubated in normal medium containing DMSO (control) or 20 μM nocodazole and then stimulated with 20 ng/ml DNP-HSA for 10 min. Cells were fixed and incubated with anti-CD63 antibody before flow cytometry analysis (left), and expression was quantified (ΔMFI CD63⁺; right). (E) IgE-sensitized BMMCs were preincubated in medium containing DMSO or nocodazole. BMMCs were stimulated with 20 ng/ml DNP-HSA for 10 min. Cells were fixed, permeabilized, and stained with anti-STX3 and antitubulin antibodies (left). Bars, 2 μm. (Right) More than 100 cells were counted per setting. Statistical analyses were performed using unpaired *t* tests. ***, *P* < 0.0001. (F) IgE-sensitized BMMCs were preincubated in normal medium containing DMSO or 20 μM nocodazole. BMMCs were stimulated with 20 ng/ml DNP-HSA for 10 min before lysis. Cell lysates were immunoprecipitated with a polyclonal anti-Rab27 antibody or with isotype control antibody. The immunoblots were analyzed using anti-*Kif5b*, anti-Slp3, and anti-Rab27 antibodies. Data are representative of three independent experiments. Error bars represent mean ± SD. MFI, mean fluorescence intensity.

Degranulation assays

Release of SG contents was determined in a β -hexosaminidase assay. In brief, BMMCs were sensitized overnight with an anti-DNP-specific IgE. IgE-sensitized BMMCs were stimulated with 20 ng/ml DNP-HSA for the indicated time at 37°C. Cells were centrifuged at 4°C, and supernatants were incubated in citrate buffer with *p*-nitrophenyl-*N*-acetyl- β -D-glucosaminide for 60 min at 37°C. The reaction was quenched in carbonate buffer for 15 min, and the OD was determined at 405 nm. Specific release was calculated as the percentage of total β -hexosaminidase content in a Triton X-100 cell lysate, after subtraction of baseline degranulation in nontriggered cells. Degranulation of BMMCs was also evaluated by surface expression CD63 using flow cytometry. IgE-sensitized BMMCs were either not stimulated or were stimulated with 20 ng/ml DNP-HSA for 10 min. Cells were fixed in 3.7% PFA, incubated with anti-CD63 antibody (MLB International) at 4°C, and then incubated with Alexa Fluor 647-conjugated anti-rat IgG (Thermo Fisher Scientific) before flow cytometry analysis with a Fortessa system (BD).

ELISAs of IL-6, TNF, and MCP-1

BMMCs were sensitized with DNP-specific IgE overnight, washed, and then incubated for 3 h in culture medium containing 20 ng/ml DNP-HSA. Commercial ELISA kits for IL-6, TNF, and MCP-1 (eBioscience) were used according to the manufacturer's protocols.

Immunofluorescence

BMMCs were sensitized with DNP-specific IgE overnight, plated onto fibronectin-coated glass coverslips (10 μ g/ml, Sigma Aldrich) for 45 min at 37°C with 1 mM MnCl₂, and then activated with 20 ng/ml DNP-HSA for the indicated times. BMMCs were fixed by incubation for 15 min on ice in 3.7% wt/vol PFA and then for a further 10 min in NH₄Cl (50 mM in PBS). The cells were then incubated for 1 h with specific primary antibodies in permeabilization buffer (PBS with 1 mg/ml bovine serum albumin and 0.05% wt/vol saponin; Sigma-Aldrich), washed twice, and incubated for another hour with fluorescent-conjugated secondary antibody in permeabilization buffer. Lastly, the cells were mounted on slides in Prolong gold antifade reagent in the presence or absence of DAPI (Invitrogen). Confocal microscopy was performed with an LSM 700 system (ZEISS) and 63 \times NA 1.4 objective. The images were processed with the LSM Image Browser (ZEISS) and ImageJ software (version 1.43; National Institutes of Health).

Immunofluorescence analysis

BMMCs were stained for STX3 to assess the translocation of the SG upon activation. Two profiles were quantified: absence of translocation, and translocation to the cell periphery (defined by more than two thirds of the cell periphery where positive for STX3 labeling). BMMCs were stained for tubulin to assess the microtubule reorganization upon activation. Two profiles were quantified: absence of microtubule reorganization (tubulin shapes adopt a peripheral ring), and microtubule reorganization (observation of at least two filopodia-like extensions per cell were considered to be microtubule reorganization).

TIRF

The TIRF assay was performed using WGA-488-loaded BMMCs sensitized with DNP-specific IgE overnight. Cells were allowed to attach to fibronectin-coated glass coverslips (10 μ g/ml; Sigma-Aldrich) before stimulation with 20 ng/ml DNP-HSA. TIRF images were then acquired for 15 min (exposure time of 200 ms). During the observation, the cells were cultured at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Fluorescence data were acquired with a TIRF imaging system (Eclipse Ti-E; Nikon). Images were acquired with a QuantEM 512 SC camera (Roper Technologies) and NIS-Elements AR software (version 3.1; Nikon). Image sets were

processed with ImageJ software. A WGA-containing granule was defined by a minimum of a square of 3 \times 3 pixels (1 pixel = 0.16 μ m) of strong intensity signal, orange to white intensity from the pseudocolor scale.

Calcium flux

5 \times 10⁶ IgE-sensitized BMMCs were loaded with 5 μ g indo-1 (Thermo Fisher Scientific) in RPMI medium supplemented with 10 mM HEPES, pH 7.0, for 30 min at 37°C. RPMI medium supplemented with 10 mM HEPES, pH 7.0, and 5% FCS was then added for 30 min at 37°C. Cells were washed and resuspended in RPMI medium supplemented with 5% FCS before the addition of 20 ng/ml DNP-HSA (to induce calcium flux). Calcium flux was measured by using a FACSAria flow cytometer (BD) to monitor the fluorescent emission ratio (405 nm/475 nm). Time course analyses were performed using the FlowJo software package (Tree Star).

Passive systemic anaphylaxis

A temperature probe (Bio Medic Data Systems) was implanted into the subcutaneous tissue on the back of 8-wk-old WT and cKO mice. On the next day, mice were passively sensitized i.v. using 1 μ g/g anti-DNP mouse IgE antibody (H1-e-26). 24 h later, mice were challenged by the i.v. administration of 500 μ g DNP-HSA (Sigma-Aldrich). The body temperature was recorded every 5 min for 60 min using a wireless reader (DAS-7007S; Bio Medic Data Systems). At the end of the recording, blood samples were collected and the serum concentration of MCPT-1 was measured with an ELISA kit (eBioscience).

Immunoblotting and immunoprecipitation

For proximal signaling, 10⁷ IgE-sensitized WT or cKO^{Kif5b} BMMCs stimulated with 20 ng/ml DNP-HSA for the indicated times were lysed in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, and 0.5% Triton X-100) supplemented with an EDTA-free protease inhibitor cocktail tablet (Roche). For the immunoprecipitation assay, 40 \times 10⁶ IgE-sensitized WT BMMCs were either not stimulated or were stimulated with 20 ng/ml DNP-HSA for 10 min. Cells were lysed in lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, and 10% glycerol) supplemented with one EDTA-free protease inhibitor cocktail tablet and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich). Immunoprecipitation was performed with polyclonal rabbit Rab27 antibody (Synaptic Systems). Anti-Slp3, anti-Rab27, and anti-Kif5b antibodies were used to develop the Western blots.

siRNA

Specific duplex siRNA targeting Slp3 was purchased from QIAGEN (references: n^o1 = SI02899750, and n^o2 = SI02899743).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with Prism software (version 6; GraphPad Software) using a two-tailed, unpaired *t* test.

Online supplemental material

Video 1 shows TIRF video microscopy of WGA-488 (green)-labeled WT BMMCs for the 15 min immediately after Fc ϵ RI activation. Video 2 shows TIRF video microscopy of WGA-488 (green)-labeled cKO^{Kif5b} BMMCs for the 15 min immediately after Fc ϵ RI activation.

Acknowledgments

The authors thank the staff in Imagine Institute's animal facility for their assistance.

This work was funded by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the French National Research Agency (ANR-12-

BSV1-0020-01 and ANR HLH-cytotox), an International collaboration grant from l'Agence Nationale de la Recherche France (grant ANR-12-1SVY3-0006-01) and Conacyt Mexico (Conacyt-ANR188565), the ARC Foundation (grant PJA20131200047), the European Research Council (PIDImm, grant 249816), and Société Française d'Allergologie 2014 and 2016 (grant SFA-D.A. Moneret-Vautrin) to U. Blank and G. Ménasché. This research project has also received funding from the Investissements d'Avenir program (grant ANR-11-IDEX-0005-02, Sorbonne Paris Cite, Laboratoire d'excellence INF LAMEx). I. Munoz received a doctoral fellowship from the Ministère de l'Education Nationale de la Recherche et de la Technologie. Core facilities were partly funded by the Imagine Foundation and the French government's Investissement d'Avenir program (grant ANR-10-IAHU-01).

The authors declare no competing financial interests.

Submitted: 19 May 2016

Accepted: 12 September 2016

References

- Arimura, N., T. Kimura, S. Nakamura, S. Taya, Y. Funahashi, A. Hattori, A. Shimada, C. Ménager, S. Kawabata, K. Fujii, et al. 2009. Anterograde transport of TrkB in axons is mediated by direct interaction with Slp1 and Rab27. *Dev. Cell.* 16:675–686. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2009.03.005>
- Beghdadi, W., L.C. Madjene, M. Benhamou, N. Charles, G. Gautier, P. Launay, and U. Blank. 2011. Mast cells as cellular sensors in inflammation and immunity. *Front. Immunol.* 2:37. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2011.00037>
- Blank, U., and J. Rivera. 2004. The ins and outs of IgE-dependent mast-cell exocytosis. *Trends Immunol.* 25:266–273. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2004.03.005>
- Blank, U., I.K. Madera-Salcedo, L. Danelli, J. Claver, N. Tiwari, E. Sánchez-Miranda, G. Vázquez-Victorio, K.A. Ramírez-Valadez, M. Macias-Silva, and C. González-Espinosa. 2014. Vesicular trafficking and signaling for cytokine and chemokine secretion in mast cells. *Front. Immunol.* 5:453. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00453>
- Blasius, T.L., D. Cai, G.T. Jih, C.P. Toret, and K.J. Verhey. 2007. Two binding partners cooperate to activate the molecular motor Kinesin-1. *J. Cell Biol.* 176:11–17. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200605099>
- Brochetta, C., R. Suzuki, F. Vita, M.R. Soranzo, J. Claver, L.C. Madjene, T. Attout, J. Vitte, N. Varin-Blank, G. Zabucchi, et al. 2014. Munc18-2 and syntaxin 3 control distinct essential steps in mast cell degranulation. *J. Immunol.* 192:41–51. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1301277>
- Cahu, J., A. Olichon, C. Hentrich, H. Schek, J. Drinjakovic, C. Zhang, A. Doherty-Kirby, G. Lajoie, and T. Surrey. 2008. Phosphorylation by Cdk1 increases the binding of Eg5 to microtubules *in vitro* and in *Xenopus* egg extract spindles. *PLoS One.* 3:e3936. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0003936>
- Cui, J., Z. Wang, Q. Cheng, R. Lin, X.M. Zhang, P.S. Leung, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, K.M. Yao, and J.D. Huang. 2011. Targeted inactivation of kinesin-1 in pancreatic β -cells *in vivo* leads to insulin secretory deficiency. *Diabetes.* 60:320–330. <http://dx.doi.org/10.2337/db09-1078>
- Donelan, M.J., G. Morfini, R. Julyan, S. Sommers, L. Hays, H. Kajio, I. Briaud, R.A. Easom, J.D. Molkenin, S.T. Brady, and C.J. Rhodes. 2002. Ca²⁺-dependent dephosphorylation of kinesin heavy chain on β -granules in pancreatic β -cells: Implications for regulated b-granule transport and insulin exocytosis. *J. Biol. Chem.* 277:24232–24242. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M203345200>
- Dräber, P., and P. Dräber. 2015. Membrane-cytoskeleton dynamics in the course of mast cell activation. *Methods Mol. Biol.* 1220:219–237. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-1568-2_14
- Espeut, J., A. Gaussen, P. Bieling, V. Morin, S. Prieto, D. Fesquet, T. Surrey, and A. Abrieu. 2008. Phosphorylation relieves autoinhibition of the kinetochore motor Cenp-E. *Mol. Cell.* 29:637–643. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2008.01.004>
- Föger, N., A. Jenckel, Z. Orinska, K.H. Lee, A.C. Chan, and S. Bulfone-Paus. 2011. Differential regulation of mast cell degranulation versus cytokine secretion by the actin regulatory proteins Coronin1a and Coronin1b. *J. Exp. Med.* 208:1777–1787. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20101757>
- Fukuda, M., E. Kanno, C. Saegusa, Y. Ogata, and T.S. Kuroda. 2002. Slp4-a/granophilin-a regulates dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 277:39673–39678. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M205349200>
- Galli, S.J., J. Kalesnikoff, M.A. Grimaldeston, A.M. Piliponsky, C.M. Williams, and M. Tsai. 2005a. Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory cells: Recent advances. *Annu. Rev. Immunol.* 23:749–786. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141025>
- Galli, S.J., S. Nakae, and M. Tsai. 2005b. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 6:135–142. <http://dx.doi.org/10.1038/ni1158>
- Hirokawa, N. 1998. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science.* 279:519–526. <http://dx.doi.org/10.1126/science.279.5350.519>
- Kimura, T., H. Watanabe, A. Iwamatsu, and K. Kaibuchi. 2005. Tubulin and CRMP-2 complex is transported via Kinesin-1. *J. Neurochem.* 93:1371–1382. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03063.x>
- Kuroda, T.S., M. Fukuda, H. Ariga, and K. Mikoshiba. 2002. The Slp homology domain of synaptotagmin-like proteins 1–4 and Slac2 functions as a novel Rab27A binding domain. *J. Biol. Chem.* 277:9212–9218. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112414200>
- Kurowska, M., N. Goudin, N.T. Nehme, M. Court, J. Garin, A. Fischer, G. de Saint Basile, and G. Ménasché. 2012. Terminal transport of lytic granules to the immune synapse is mediated by the kinesin-1/Slp3/Rab27a complex. *Blood.* 119:3879–3889. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-09-382556>
- Lorentz, A., A. Baumann, J. Vitte, and U. Blank. 2012. The SNARE machinery in mast cell secretion. *Front. Immunol.* 3:143. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2012.00143>
- Ménasché, G., M.M. Ménager, J.M. Lefebvre, E. Deutsch, R. Athman, N. Lambert, N. Mahlaoui, M. Court, J. Garin, A. Fischer, and G. de Saint Basile. 2008. A newly identified isoform of Slp2a associates with Rab27a in cytotoxic T cells and participates to cytotoxic granule secretion. *Blood.* 112:5052–5062. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-02-141069>
- Mizuno, K., T. Tolmachova, D.S. Ushakov, M. Romao, M. Abrink, M.A. Ferenczi, G. Raposo, and M.C. Seabra. 2007. Rab27b regulates mast cell granule dynamics and secretion. *Traffic.* 8:883–892. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00571.x>
- Morfini, G., S. Zebenyi, R. Elluru, N. Ratner, and S.T. Brady. 2002. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates kinesin light chains and negatively regulates kinesin-based motility. *EMBO J.* 21:281–293. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/21.3.281>
- Nishida, K., S. Yamasaki, Y. Ito, K. Kabu, K. Hattori, T. Tezuka, H. Nishizumi, D. Kitamura, R. Goitsuka, R.S. Geha, et al. 2005. Fc ϵ RI-mediated mast cell degranulation requires calcium-independent microtubule-dependent translocation of granules to the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 170:115–126. (published erratum appears in *J. Cell Biol.* 2005. 170:115–126) <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200501111>
- Nishida, K., S. Yamasaki, A. Hasegawa, A. Iwamatsu, H. Koseki, and T. Hirano. 2011. Gab2, via PI-3K, regulates ARF1 in Fc ϵ RI-mediated granule translocation and mast cell degranulation. *J. Immunol.* 187:932–941. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1100360>
- Ogawa, K., Y. Tanaka, T. Uruno, X. Duan, Y. Harada, F. Sanematsu, K. Yamamura, M. Terasawa, A. Nishikimi, J.F. Côté, and Y. Fukui. 2014. DOCK5 functions as a key signaling adaptor that links Fc ϵ RI signals to microtubule dynamics during mast cell degranulation. *J. Exp. Med.* 211:1407–1419. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20131926>
- Röhlich, P., P. Anderson, and B. Uvnäs. 1971. Electron microscope observations on compounds 48/80-induced degranulation in rat mast cells. *J. Cell Biol.* 51:465–483. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.51.2.465>
- Sepulveda, F.E., A. Burgess, X. Heiligenstein, N. Goudin, M.M. Ménager, M. Romao, M. Côte, N. Mahlaoui, A. Fischer, G. Raposo, et al. 2015. LYST controls the biogenesis of the endosomal compartment required for secretory lysosome function. *Traffic.* 16:191–203. <http://dx.doi.org/10.1111/tra.12244>
- Tiwari, N., C.C. Wang, C. Brochetta, G. Ke, F. Vita, Z. Qi, J. Rivera, M.R. Soranzo, G. Zabucchi, W. Hong, and U. Blank. 2008. VAMP-8 segregates mast cell-preformed mediator exocytosis from cytokine trafficking pathways. *Blood.* 111:3665–3674. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2007-07-103309>
- Verhey, K.J., and J.W. Hammond. 2009. Traffic control: regulation of kinesin motors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10:765–777. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2782>
- Wang, Z., J. Cui, W.M. Wong, X. Li, W. Xue, R. Lin, J. Wang, P. Wang, J.A. Tanner, K.S. Cheah, et al. 2013. Kif5b controls the localization of myofibril components for their assembly and linkage to the myotendinous junctions. *Development.* 140:617–626. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.085969>
- Wernersson, S., and G. Pejler. 2014. Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nat. Rev. Immunol.* 14:478–494. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3690>

Abstract

Most of immune cells are secretory cells capable of releasing immunomodulatory molecules in response to various stimuli. This regulated secretion, which allows the orchestration of the immune and inflammatory responses, is ensured by the lysosome-related organelles (LRO) which will contain the molecules necessary for the functionality of the immune cells. For example we found the lytic granules of cytotoxic T lymphocytes, which allow their lytic functions or the secretory granules of mast cells which contain the inflammatory mediators. The transport and exocytosis of LRO involves a common and conserved machinery. This is particularly the case of the small GTPase Rab27 which plays a central role in the transport and secretion of these LRO.

Previous studies carried out in our laboratory have highlighted the involvement of the molecular complex Rab27a / Slp3 / kinesin-1 in the terminal transport of lytic granules of cytotoxic T lymphocytes in humans. In addition, a murine model in which the heavy chain of kinesin-1 is specifically invalidated in immune cells has been generated. The objective of my thesis was first to characterize the phenotype of this murine model deficient for kinesin-1, then to analyze more precisely the impact of kinesin-1 absence on the cytotoxic T lymphocyte and mast cell functionality.

In a first step, we have been able to demonstrate that mice deficient for kinesin-1 have a phenotype comparable to the control mice in a basal state. We have then shown that the absence of kinesin-1 in murine cytotoxic T lymphocytes does not induce defects in activation and in lytic granules' secretion *in vitro*. However, the behavior of the lytic granules at the immunological synapse seems abnormal. Nevertheless, after an infection essay with LCMV, which revealed no differences between control and kinesin-1-deficient mice, we conclude that compensatory mechanisms may complement the absence of kinesin-1 in mice. Finally, functional studies carried out on murine mast cells have enabled us to demonstrate the involvement of kinesin-1 in the mechanism of granules' transport. Indeed, the absence of kinesin-1 leads to degranulation defects *in vitro* and also *in vivo* (mice were less sensitive to anaphylactic shocks). On the other hand, the absence of kinesin-1 does not affect the activation and cytokines secretion capacities of mast cells. Finally, we were able to characterize the molecular complex Rab27b / Slp3 / kinesin-1 involved in mastocytic granules' transport and found that this complex formation was dependent on the PI3K-related activation pathway (Phosphatidylinositol 3-kinase).

This work allows us to introduce new elements for the mechanisms governing the secretion of mast cell granules and thus opens new therapeutic perspectives for the treatment of type I hypersensitivity (IgE dependent).

Keywords: Vesicular Trafic, LRO, Mast cells, Lymphocytes, Kinesin-1, Rab27, Slp3, PI3K

Résumé

La plupart des cellules du système immunitaire sont des cellules sécrétrices capables de libérer des molécules immuno-modulatrices en réponse à des stimuli variés. Cette sécrétion régulée qui permet l'orchestration de la réponse immunitaire et inflammatoire est assurée grâce aux organites apparentés aux lysosomes (LRO) qui vont contenir les molécules nécessaires à la fonctionnalité des cellules immunes. On retrouve par exemple les granules lytiques des lymphocytes T cytotoxiques qui permettent à ces cellules d'effectuer leurs fonctions lytiques ou encore les granules de sécrétion des mastocytes qui contiennent les médiateurs de l'inflammation. Le transport et l'exocytose des LRO impliquent une machinerie commune et conservée. C'est notamment le cas de la petite GTPase Rab27 qui joue un rôle central dans le transport et la sécrétion de ces LRO.

De précédentes études réalisées au sein de notre laboratoire ont pu mettre en évidence l'implication du complexe moléculaire Rab27a/Slp3/kinésine-1 dans le transport terminal des granules lytiques des lymphocytes T cytotoxiques chez l'homme. De plus, un modèle murin dont la chaîne lourde de la kinésine-1 est spécifiquement invalidée dans les cellules immunitaires a pu être généré. L'objectif de ma thèse a été dans un premier temps de caractériser le phénotype de ce modèle murin déficient pour la kinésine-1 puis d'analyser plus précisément l'impact de l'absence de la kinésine-1 sur la fonctionnalité des lymphocytes T cytotoxiques et mastocytes murins.

Dans un premier temps nous avons pu montrer que les souris déficientes pour la kinésine-1 ont un phénotype comparable à celui des souris contrôles à l'état basal. Nous avons ensuite montré que l'absence de la kinésine-1 au sein des lymphocytes T cytotoxiques murins n'induit pas de défauts d'activation et de sécrétion des granules lytiques *in vitro*. Cependant les comportements des granules lytiques à la synapse immunologique semblent anormaux. Néanmoins après un test d'infection au LCMV, qui ne révèle aucune différence entre les souris contrôles et déficientes en kinésine-1, nous en venons à la conclusion que des mécanismes compensateurs pourraient compenser l'absence de la kinésine-1 dans les lymphocytes T cytotoxiques chez la souris. Pour finir des études fonctionnelles réalisées au niveau des mastocytes murins nous ont permis de mettre en évidence l'implication de la kinésine-1 dans le mécanisme de transport des granules de sécrétion. En effet, l'absence de kinésine-1 conduit à des défauts de dégranulation des mastocytes *in vitro* mais aussi *in vivo* (souris moins sensibles aux chocs anaphylactiques). En revanche l'absence de kinésine-1 n'affecte pas les capacités d'activation et de sécrétion des cytokines des mastocytes. Enfin, nous avons pu caractériser le complexe moléculaire Rab27b/Slp3/kinésine-1 impliqué dans le transport des granules mastocytaires et avons pu constater que la formation de ce complexe était dépendante de la voie d'activation liée à la PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase).

Ce travail permet d'apporter de nouveaux éléments quand aux mécanismes gouvernant la sécrétion des granules mastocytaires et ouvre ainsi de nouvelles perspectives thérapeutiques pour le traitement des hypersensibilités de type 1 (dépendantes des IgE).

Mots clés: Trafic vésiculaire, LRO, Mastocytes, Lymphocytes, Kinésine-1, Rab27, Slp3, PI3K