



HAL
open science

Implication de la voie Hedgehog dans la mastocytose : apport de l'étude génétique de formes rares de mastocytoses à début pédiatrique

Laura Polivka

► **To cite this version:**

Laura Polivka. Implication de la voie Hedgehog dans la mastocytose : apport de l'étude génétique de formes rares de mastocytoses à début pédiatrique. Immunologie. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASS056 . tel-03462628

HAL Id: tel-03462628

<https://theses.hal.science/tel-03462628v1>

Submitted on 2 Dec 2021

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.

Implication de la voie Hedgehog dans la mastocytose :
apport de l'étude génétique de formes rares
de mastocytoses à début pédiatrique

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 582, Cancérologie, Biologie, Médecine, Santé
Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé
Unité de recherche : Laboratoire des mécanismes moléculaires des troubles
hématologiques et implications thérapeutiques
Référent : Faculté de Médecine

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 4 mars 2020, par

Laura POLIVKA

Composition du Jury

Professeur Christine BODEMER Hôpital Necker-Enfants Malades	Présidente
Professeur Sophie GEORGIN-LAVIALLE Hôpital Tenon	Rapporteuse
Professeur Jérôme TAMBURINI Institut Cochin	Rapporteur
Professeur Hugues DE THÉ Collège de France	Examineur
Docteur Patrice DUBREUIL Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille	Examineur
Docteur Thomas MERCHER Institut Gustave Roussy	Examineur
Professeur Olivier Hermine Institut IMAGINE	Directeur de thèse
Docteur Leïla MAOUCHE-CHRÉTIEN Institut IMAGINE	Co-directrice de thèse

Mes sincères remerciements

Mes premiers remerciements s'adressent :

À Monsieur le Professeur Olivier Hermine qui m'a fait l'honneur de me confier ce travail, de me transmettre sa passion pour la recherche et notamment pour le mastocyte. Je le remercie pour sa confiance passée et à venir. Le début a été extrêmement enthousiasmant et intéressant et je suis persuadée que le futur de cette aventure scientifique n'en sera pas moins passionnant !

À Madame le Docteur Leïla-Maouche Chrétien qui a co-dirigé ce travail avec énergie et rigueur. Je la remercie pour tout son soutien, sa disponibilité, son expérience et les encouragements qu'elle m'a prodigués.

Aux membres du Jury :

À Madame le Professeur Christine Bodemer qui me fait l'honneur de présider cette thèse. Je n'ai pas de mot pour vous témoigner ma gratitude. Je vous remercie pour tout votre soutien, votre écoute et votre humanisme. Vous êtes pour moi un modèle de réussite sur le plan professionnel et humain, un modèle que j'aspire un jour à atteindre.

À Madame le Professeur Sophie Georgin-Lavialle et à Monsieur le Professeur Jérôme Tamburini pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être rapporteurs de cette thèse.

À Monsieur le Professeur Hugues de Thé et au Docteur Thomas Mercher qui me font l'honneur d'être examinateurs de cette thèse.

À Monsieur le Docteur Patrice Dubreuil qui me fait l'honneur de participer au jury. Je le remercie pour tout ce qu'il a apporté à ce travail.

Je remercie également le Dr Erinn Soucié et Mme Véronique Parietti pour toutes l'aide qu'elles ont apportée sur les modèles murins.

Je remercie les locataires du laboratoire d'Olivier :

À Flavia et Lucile, de collègues... elles sont devenues amies.

À ma petite Elia, ma collègue de bureau, pour sa joie de vivre, sa force de travail. Ce petit rayon de soleil qui vous fait commencer votre journée du bon côté.

À Elisa pour toute l'aide qu'elle a apportée à ce travail avec rigueur et bonne humeur.

À Rachel pour sa disponibilité et l'aide qu'elle a apportée à ce travail.

À mes étudiants, Margot, Matthieu et Antoine pour leur contribution.

A tous les autres locataires du laboratoire, c'est un plaisir de travailler avec vous au quotidien !

Je remercie également chaleureusement le Professeur Smaïl Hadj-Rabia pour son soutien indéfectible, sa confiance, son savoir, tant sur le plan médical que culturel. Je souhaite lui exprimer toute ma gratitude pour les travaux réalisés ensemble mais aussi et surtout pour ceux à venir.

Je tiens à remercier particulièrement certains médecins qui m'ont profondément marquée pendant mon parcours médical et contribué à forger ma vocation de médecin : le Docteur Brigitte Bader-Meunier, le Docteur Philippe Blanche, le Docteur Nathalie Franck et le Docteur Nora Kramkimel, qui m'ont transmis leur passion pour la médecine avec une amitié profonde.

À Elodie qui m'a tant appris sur le plan scientifique.

À Lilia, ma collègue, mon amie, ma confidente.

À ma secrétaire adorée, Brigitte, que je n'ai cessé de solliciter pendant ces 3 années.

À tous les autres professionnels de santé et scientifiques qui, tout au long de mon parcours, m'ont tant transmis, accompagnée et soutenue.

À mes amis du Vésinet, de la faculté et de l'internat, et aux « bons » qui se reconnaîtront, je les remercie pour leur amitié et tout ce que nous partageons.

Un dernier mot pour mes proches,

À mes parents, mon frère et mes sœurs qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de ce parcours médical puis scientifique. Merci pour leurs conseils et encouragements.

À Pierre, mon futur époux, pour tout son amour et son soutien inconditionnel depuis ma deuxième année de médecine. Sans ta présence, ta confiance en moi, je n'aurais pu faire le quart de tout ce que j'ai entrepris. Merci d'avoir été compréhensif et patient dans les moments les plus difficiles de ce parcours médical et scientifique. Merci de m'avoir activement soutenue pour réaliser cette deuxième thèse. Je te promets les études, c'est enfin fini !

A mes deux enfants, mes deux plus belles réussites, Victor et Eva...

Aux confins de la différence qui éclaire le commun...

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION	9
1.1 LE MASTOCYTE.....	9
1.1.1 <i>Hématopoïèse et mastocyte</i>	9
1.1.2 <i>Ontogénie des mastocytes</i>	10
1.1.2.1 Modèle murin.....	10
1.1.2.2 Différenciation mastocytaire <i>in vitro</i>	11
1.1.3 <i>Classification, répartition et distribution tissulaire des mastocytes</i>	12
1.1.4 <i>Médiateurs mastocytaires</i>	13
1.1.4.1 Médiateurs préformés.....	13
1.1.4.1.1 Histamine.....	13
1.1.4.1.2 Protéases neutres et autres enzymes.....	14
1.1.4.1.3 Protéoglycanes.....	14
1.1.4.2 Médiateurs néoformés et synthétisés.....	15
1.1.5 <i>Principaux récepteurs</i>	15
1.1.5.1 FcεR1.....	17
1.1.5.2 Récepteur KIT.....	21
1.1.5.2.1 Structure du récepteur KIT.....	21
1.1.5.2.2 Voie de signalisation KIT.....	23
1.1.5.2.3 KIT et pathogénie.....	24
1.2 LES MASTOCYTOSES.....	25
1.2.1 <i>Manifestations cliniques</i>	25
1.2.2 <i>Classification</i>	25
1.2.3 <i>Critères diagnostiques</i>	26
1.2.4 <i>Deux présentations cliniques distinctes : mastocytose de l'enfant/adulte</i>	28
1.2.5 <i>Pathogénie</i>	28
1.2.5.1 Mutations somatiques gain-de-fonction dans le gène <i>KIT</i>	28
1.2.5.2 Autres mutations somatiques.....	30
1.2.5.3 Modèles murins.....	31
1.2.5.3.1 Souris Kit D814V / KIT D816V.....	31
1.2.5.3.2 Souris ROSA Gluc D816V.....	32
1.2.6 <i>Traitement</i>	33
1.3 VOIE DE SIGNALISATION HEDGEHOG.....	37
1.3.1 <i>La voie Hedgehog canonique</i>	37
1.3.2 <i>Principaux gènes cibles de la voie Hedgehog</i>	39
1.3.3 <i>Les voies Hedgehog non canoniques</i>	40
1.3.3.1 La voie Hedgehog non-canonique de type I induite par PTCH1.....	40
1.3.3.2 La voie Hedgehog non canonique de type II induite par SMO.....	41
1.3.3.3 Les voies Hedgehog non canoniques activant les GLI indépendamment de PTCH1 et de SMO.....	42
1.3.4 <i>Modèles d'activation Hedgehog et cancer</i>	43
1.3.5 <i>Voie Hedgehog et hémopathies</i>	43
1.3.5.1 Voie Hedgehog et hématopoïèse.....	43
1.3.5.2 La voie Hedgehog dans les hémopathies myéloïdes.....	44
1.3.5.3 Voie Hedgehog et hémopathies lymphoïdes.....	45
1.3.5.4 Modifications épigénétiques de la voie Hedgehog et hémopathies.....	45
1.3.5.5 Voie Hedgehog et mastocytose.....	46
1.3.6 <i>Inhibiteurs de la voie Hedgehog et cancer, exemple des hémopathies</i>	46
1.3.7 <i>Le syndrome de céphalopolysyndactylie de Greig (GCPS)</i>	47
1.3.7.1 Chez l'homme.....	47
1.3.7.2 Modèles murins.....	49
2. OBJECTIFS	50
3. RÉSULTATS	51
ARTICLE 1 – PEDIATRIC MASTOCYTOSIS: A LONG-TERM FOLLOW-UP AND CRITERIA OF REGRESSION	51
ARTICLE 2 – THE ASSOCIATION OF GREIG CEPHALOPOLYSYNDACTYLY SYNDROME AND MASTOCYTOSIS IN CHILDREN REVEALS THE HEDGEHOG SIGNALING PATHWAY'S INVOLVEMENT IN MASTOCYTOSIS	99

4. DISCUSSION	138
4.1 RÉSUMÉ, DISCUSSION ET PERSPECTIVES DE L'ARTICLE 1 : PEDIATRIC MASTOCYTOSIS : A LONG-TERM FOLLOW-UP AND CRITERIA OF REGRESSION.....	138
4.1.1 <i>Résumé de l'article 1</i>	138
4.1.2 <i>L'origine embryonnaire des mastocytes mutés et régression de la mastocytose chez l'enfant..</i>	139
4.1.2.1 Une origine embryonnaire double	139
4.1.2.2 Nouvelles hypothèses pour expliquer la régression de la mastocytose chez l'enfant.....	141
4.1.3 <i>Corrélation évolution SAMa vs. Lésions cutanées</i>	142
4.1.4 <i>Perspectives</i>	143
4.1.4.1 Analyser les mastocytes de lésions cutanées d'enfant vs adulte.....	143
4.1.4.2 Poursuivre l'étude de cohorte	143
4.2 RÉSUMÉ, DISCUSSION ET PERSPECTIVES DE L'ARTICLE 2 : THE ASSOCIATION OF GREIG CEPHALOPOLYSYNDACTYLY SYNDROME AND MASTOCYTOSIS IN CHILDREN REVEALS THE HEDGEHOG SIGNALING PATHWAY'S INVOLVEMENT IN MASTOCYTOSIS.....	144
4.2.1 <i>Résumé de l'article 2</i>	144
4.2.2 <i>Coopération oncogénique voie Hedgehog et KIT</i>	145
4.2.3 <i>Implication de la voie Hedgehog au cours des formes sporadiques de mastocytose.....</i>	148
4.2.4 <i>Perspectives Article 2 – Poursuite des travaux.....</i>	150
4.2.4.1 Nouveau modèle murin de mastocytose B6. <i>Gli3Xt^{+/-};Mx1^{cre};KitD814V^{fllox}</i>	150
4.2.4.2 Essai thérapeutique chez l'homme	151
4.3 AUTRES PERSPECTIVES : IDENTIFICATION DE NOUVEAUX GENES / NOUVELLES VOIES CANDIDAT(E)S IMPLIQUE(E)S DANS LA MASTOCYTOSE	152
4.3.1 <i>SLC26A2 et mastocytose :</i>	152
4.3.2 <i>EZH2 et mastocytose.....</i>	155
5. CONCLUSION.....	157
6. RÉFÉRENCES	158
7. ANNEXES.....	173
ANNEXE 1 - RECENT ADVANCES IN THE UNDERSTANDING AND THERAPEUTIC MANAGEMENT OF MASTOCYTOSIS.....	173
ANNEXE 2 - EPITHELIAL BARRIER DYSFUNCTION IN DESMOGLEIN-1 DEFICIENCY - ARTICLE MASTER 2 (REVISION PENDANT LA THESE)	187

ABRÉVIATIONS

AGM : l'aorte-gonade-mésonephros

ASM : mastocytoses systémiques agressives

BMCP : basophils/mast cells progenitors

CBC : carcinome basocellulaire

CEREMAST : centre national de référence des mastocytoses

CSH : cellules souches hématopoïétiques

CSL : cellules souches leucémiques

CTL : contrôle

CTMC : mastocytes du tissu conjonctif

DEM : dysplasie épiphysaire multiple

DHH : Desert Hedgehog

EZH2 : enhancer of zeste homolog 2

FLT3 : FMS like tyrosine kinase 3

GADS : GRB2-related adaptor protein

GCPS : syndrome de céphalopolysyndactylie de Greig

GIST : tumeurs stromales gastro-interstinales

GLI2L ou GLI2FL : GLI2-full length

GLI3L ou GLI3FL : GLI3-full length

GLI3R : GLI3-represseur

GLIS : GLI-similar protéines

Gluc : gaussia luciferase

Grb2 : growth-factor-receptor-bound protein 2

Hh : Hedgehog

IHH : Indian Hedgehog

IL-3 : interleukine-3

IL-6 : interleukine-6

Ig : immunoglobuline

IFN γ : interferon- γ

IPS : cellules souches pluripotentes

ITAM : immunoreceptor tyrosine based activation motif

ITD : duplications en tandem internes

ITIM : immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif

iTK : inhibiteurs de tyrosine kinase

IVIS : système d'imagerie *in vivo*

JAK : janus kinase

KID : KIT insert domain

LAM : leucémie aiguë myéloïde

LAT : Linker for Activation of T cells

LMC : leucémie myéloïde chronique

LMPP : lymphoid-primed multipotent progenitor

LTC : leucotriènes

MAPK : mitogen-activated protein kinase

MC : mastocytoses cutanées

MCD : mastocytose cutanée diffuse

MCL : leucémies à mastocytes

MCMP : mastocytose cutanée maculo-papuleuse

MCP : progéniteurs des mastocytes

MCPT5 : mast cell protease 5

MC_{TC} : mastocytes stockant tryptase / chymase

MC_T : mastocytes stockant uniquement la tryptase

MMC : mastocytes muqueux

MS : mastocytoses systémiques

MSI : mastocytoses systémiques indolentes

NRP1 : neuropiline 1

PAF : platelet activating factor

PBMC : peripheral blood mononuclear cells

PDGF-R : plated derived growth factor receptor

PDK1 : 3-phosphoinositide- dependent protein kinase

PEM : progéniteurs érythro-myéloïdes

PGD : prostaglandine

PHS : syndrome de Pallister-Hall

PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase

PI(3,4)P2 : phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate

PKC : protéine kinase C

pl:C : polyinosine-polycytidylrique

PLCy1 : phospholipase Cy1

PTCH1 : PATCHED-1

PTEN : Phosphatase and TENsin homolog

RH : récepteur à l'histamine

SAMa : signes d'activation mastocytaire

S/A/R : SRSF2, ASXL1, RUNX1

SCF : Stem Cell Factor

SCID : severe combined immunodeficiency

SH2 : domaine d'homologie Src2

SHC : SH2-domain-containing transforming protein C

SHH : Sonic Hedgehog

SLP76 : SH2-domain-containing leukocyte protein of 65 kDa

SMD : syndrome myélodysplasique

SMO : SMOOTHENED

SOS : son of sevenless homologue

STAT : signal transducer and activator of transcription

SUFU : suppresseur de Fused

SYK : Spleen Tyrosine Kinase

TK : tyrosine kinase

WT : Wild Type

1. INTRODUCTION

1.1 LE MASTOCYTE

Les mastocytes ont été mis en évidence pour la première fois en 1878, par un scientifique allemand, Paul Ehrlich, alors qu'il étudiait les propriétés histologiques du bleu d'aniline. Il observa dans le tissu conjonctif cutané des cellules présentant de multiples granules colorés, qu'il appela « Mastzellen » (du grec mastos, qui signifie mamelle) car il pensait que ces cellules nourrissaient le tissu conjonctif environnant par ses granules. Les mastocytes sont des cellules exclusivement tissulaires en situation homéostasique, caractérisées par un contenu cytoplasmique riche en granules sécrétoires permettant de les identifier aisément par un marquage au bleu de toluidine.

1.1.1 HÉMATOPOÏÈSE ET MASTOCYTE

L'hématopoïèse est l'ensemble des phénomènes qui concourent à la production et au remplacement continu et régulé des cellules sanguines. Elle est classiquement représentée selon une structure arborescente, avec les cellules souches hématopoïétiques comme la tige de l'arbre, les progéniteurs intermédiaires lymphoïdes et myéloïdes comme les branches et les cellules matures comme les feuilles (Figure 1A).^{1,2} D'autres progéniteurs ont été décrits dans l'hématopoïèse murine, notamment les lymphoid-primed multipotent progenitor (LMPP). Dans ce modèle alternatif, le progéniteur myéloïde commun n'a pas de place appropriée et le LMPP doit donner lieu à tous les progéniteurs granulocytes/monocytes et à tous les progéniteurs lymphoïdes communs, alors que les progéniteurs mégacaryocytaires/érythrocytaires doivent se développer directement à partir d'étapes multipotentes (Figure 1B).³ Taghon et coll. ont montré que la surexpression de GATA-3 dans des thymocytes fœtaux au stade double négatif précoce entraîne la génération de mastocytes par une " reprogrammation " transcriptionnelle directe confortant l'existence d'un LMPP.^{4,5} Ainsi, selon le modèle utilisé, les mastocytes dériveraient directement des progéniteurs communs myéloïdes, ou des progéniteurs multipotents LMPP.

Par ailleurs, en évaluant l'expression de l'intégrine beta7, une molécule nécessaire à la sélection des progéniteurs des mastocytes (MCP) à la périphérie, Arinobu. et coll. ont identifié des progéniteurs bipotents (BMCP) capables de se différencier en mastocytes ou en basophiles dans la rate de souris (Figure 1C).⁶

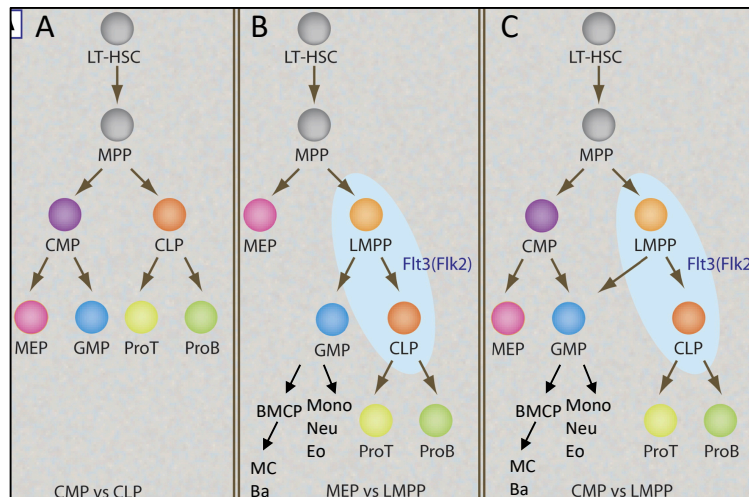


Figure 1. Modèles de différenciation hématopoïétiques (adaptée d'Iwasaki. et coll).¹ A. Modèle classique. B. Modèle alternatif avec LMPP et BMCP. Ba, basophils ; BMCP, basophils/mast cells progenitors ; MC, mast cells; Mono, monocytes; Neu, neutrophils; Eo, eosinophils; CMP, common myeloid progenitor; CLP, common lymphoid progenitor; MEP, megakaryocyte-erythrocyte progenitor; MPP, multipotential progenitor; GMP, granulocyte-monocyte progenitor et LMPP, lymphoid-primed multipotent progenitor.

1.1.2 ONTOGENIE DES MASTOCYTES

1.1.2.1 Modèle murin

Les cellules sanguines se forment par vagues distinctes au cours de l'embryogenèse murine. Le sac vitellin produit des progéniteurs érythroïdes primitifs suivis des progéniteurs érythromyéloïdes précoces, tandis que l'aorte-gonade-mésonephros (AGM) est la première source de cellules souches hématopoïétiques (CSH), qui colonisent ensuite le foie fœtal et la moelle osseuse. Des progéniteurs capables de former des mastocytes sont également générés dans le sac vitellin.^{7,8} Des études récentes suggèrent que ces progéniteurs donnent naissance aux premiers mastocytes de peau de l'embryon.⁹ Ces mastocytes de peau sont ensuite remplacés progressivement par des mastocytes dérivés de l'AGM. Il reste à déterminer si la différenciation en 2 vagues est spécifique des mastocytes du tissu conjonctif et non des mastocytes muqueux (Figure 2).

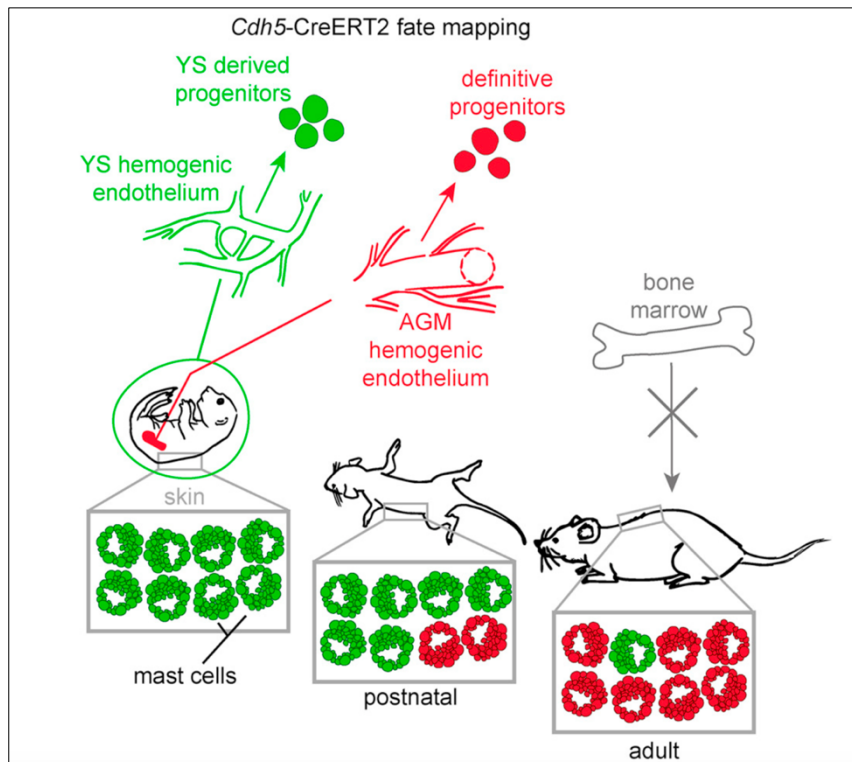


Figure 2. Ontogénie des mastocytes – une double origine embryologique. Adapté de Gentek et coll.⁹

Bien qu'une compréhension claire de la différenciation des mastocytes murins émerge rapidement, il reste encore beaucoup à faire chez l'humain, ce qui est entravé par le faible potentiel de prolifération *in vitro* des progéniteurs mastocytaires.

La différenciation de mastocytes à partir de cellules souches pluripotentes (IPS) constitue un outil de travail intéressant permettant de palier à ce faible potentiel de prolifération *in vitro* des progéniteurs mastocytaires. Un modèle *in vitro* de mastocytes du tissu conjonctif (CTMC, cf paragraphe 1.1.3) a ainsi pu être créé permettant d'investiguer plus facilement leurs fonctions.¹⁰ L'enrichissement d'IPS avec un rapporteur GATA-2 permet d'obtenir en moins de 14 jours des mastocytes et des progéniteurs capables de s'auto-renouveler.¹¹ Le génération d'IPS à partir de mastocytes portant la mutation *KIT* D816V d'un patient atteint de mastocytose permet d'obtenir une lignée pluripotente sans gène exogène, présentant un caryotype normal, exprimant des marqueurs de pluripotence avec un potentiel de différenciation et constitue là encore un outil de travail intéressant.¹² Ainsi, à partir du même fond génétique, on peut ajouter n'importe quelle mutation, et étudier l'effet exact et spécifique de la mutation sur le phénotype cellulaire.

1.1.2.2 Différenciation mastocytaire *in vitro*

Les facteurs de croissance requis pour produire des mastocytes humains étaient inconnus jusqu'au début des années 1990. Alors que l'interleukine-3 (IL-3) seul suffit pour induire la différenciation et la prolifération des mastocytes à partir de moelle osseuse totale chez la souris, les tentatives de dérivation

de mastocytes humains avec de l'IL-3 seules se sont avérées infructueuses chez l'homme.¹³ La mise en évidence et le clonage du Stem Cell Factor (SCF), ligand du récepteur à activité tyrosine kinase KIT (détaillé dans le paragraphe 1.1.5.2), stimulant fortement la production de mastocytes humains *in vitro*, a révolutionné le champ de la culture des mastocytes.¹⁴

In vitro, les mastocytes peuvent être produits à partir de cellules progénitrices de diverses origines, notamment la moelle osseuse, le sang périphérique, le foie fœtal et le sang de cordon ombilical.¹⁵⁻¹⁸ Dans ces différents cas de figures, le SCF est suffisant pour induire la génération de mastocytes dans les cultures *in vitro*. Cependant, l'interleukine-6 (IL-6) est fréquemment incluse dans le milieu de culture tout au long de la période de culture pour favoriser la prolifération et la maturation des mastocytes dépendants du SCF.¹⁹ Certains protocoles utilisent de l'IL-3 en supplément du SCF et de l'IL-6 en début de culture.²⁰

1.1.3 CLASSIFICATION, REPARTITION ET DISTRIBUTION TISSULAIRE DES MASTOCYTES

Les mastocytes ont une distribution tissulaire étendue et se trouvent principalement dans les tissus à interface avec l'environnement extérieur tels que la peau, et le tractus gastro-intestinal et à moindre niveau les muqueuses respiratoires. Ils sont également présents dans d'autres tissus tels que le système nerveux central. Contrairement aux autres cellules hématopoïétiques, qui se différencient et mûrissent dans la moelle osseuse avant d'être libérées dans le sang, les mastocytes migrent en tant que cellules progénitrices immatures dans le sang vers les tissus périphériques où elles terminent leur maturation.²¹ Les progéniteurs des mastocytes sont identifiés comme étant des cellules exprimant le CD34, le récepteur au SCF, KIT (CD117), et le récepteur de haute affinité aux IgE, le FcεRI, et n'ayant pas l'expression des marqueurs des autres lignées.²² Chez la souris, au niveau médullaire, les lignées KIT+ non différenciées expriment d'abord le FcγRII à leur surface avant d'exprimer le FcεRI et FcγRIII. Lorsque l'expression du FcεRI apparaît, celui-ci est contemporain de la formation de granules métachromatiques dans les mastocytes.²³ La maturation complète des progéniteurs des mastocytes a lieu dans les organes périphériques ; par conséquent, les mastocytes matures sont pratiquement indétectables dans le sang dans des conditions normales.^{24,25}

Le maintien des mastocytes dans le tube digestif se fait par le biais d'un homing constitutif qui dépend de la liaison de l'intégrine α4β7, exprimée sur les mastocytes, avec leurs molécules d'adhésion correspondantes MadCam-1 (mucosal addressin cell adhesion molecule-1) et VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1).²⁶

Différents sous-types de mastocytes matures ont été décrits en fonction de leurs localisations et de leurs caractéristiques fonctionnelles, structurelles et biochimiques :

- Deux sous-types de mastocytes matures ont été décrits chez les rongeurs : les mastocytes muqueux (MMC) et les mastocytes du tissu conjonctif (CTMC). Les CTMC sont présents dans le tissu conjonctif de nombreux organes, dans le derme, dans le péritoine alors que les MMC sont présents dans les muqueuses notamment du tube digestif.
- Chez l'homme, les mastocytes matures ont été aussi divisés en deux grands sous-types en fonction de leur teneur en protéase : 1- les mastocytes tryptase / chymase (MC_{TC}) qui stockent la tryptase, la chymase et la carboxypeptidase dans leurs granules, et 2- les mastocytes MC_T qui ne contiennent que la tryptase. Les MC_T sont essentiellement prédominants dans la muqueuse intestinale et pulmonaire, près des lymphocytes T, tandis que le MC_{TC} se trouvent dans la peau et les ganglions lymphatiques, en plus du poumon et de la sous-muqueuse intestinale.²⁷ Les MC_{TC} matures de la peau et du poumon, mais pas dans le MC_T mature du poumon, expriment le récepteur C5aR au complément C5a. En situation homéostatique, des MC_{TC} sont retrouvés dans la moelle osseuse (médiane : 8/mm²), alors que dans le cadre des syndromes myélodysplasiques ou de la mastocytose systémique l'infiltrat mastocytaire médullaire est constitué quasi-exclusivement de MC_T.²⁸ Un troisième type de mastocytes exprimant la tryptase et la carboxipeptidase A3, mais pas la chymase, a été plus récemment décrit dans l'épithélium des voies respiratoires chez des patients asthmatiques et dans des échantillons œsophagiens de patients atteints d'œsophagite à éosinophile.²⁹⁻³¹

1.1.4 MEDIATEURS MASTOCYTAIRES

L'activation mastocytaire peut entraîner la libération de trois classes distinctes de médiateurs :

- les **médiateurs préformés**, qui sont stockés dans des granules cytoplasmiques des mastocytes ;
- les **médiateurs néoformés ou lipidiques**, qui sont dérivés de lipides membranaires ;
- et les **médiateurs néosynthésés**, qui sont produits après activation transcriptionnelle et dont la régulation dépend de la nature du stimulus et du récepteur impliqué.

1.1.4.1 Médiateurs préformés

1.1.4.1.1 Histamine

L'histamine est une amine biogène et est l'un des premiers médiateurs mastocytaires à avoir été décrit. Elle est le produit de la décarboxylation de la L-histidine par l'histidine décarboxylase, qui est exprimée en quantité croissante pendant la maturation des mastocytes. Parmi les divers effets de l'histamine, mentionnons la vasodilatation, la bronchoconstriction, l'augmentation de la perméabilité capillaire et la contraction des muscles lisses, qui sont généralement associés aux réactions allergiques et inflammatoires.³² Elle est rapidement dégradée après sa libération, par l'histamine-N-méthyltransférase et par l'histaminase, d'où son activité locale et brève. Deux récepteurs à l'histamine sont largement

décrits : RH1 et RH2. Les récepteurs H1 (RH1) sont exprimés dans les muscles lisses vasculaires et respiratoires, le cerveau, les chondrocytes, les hépatocytes, les cellules endothéliales, les cellules dendritiques, les monocytes, les neutrophiles, les cellules T et B. Ainsi en se liant à RH1 sur les cellules endothéliales, l'histamine va induire une augmentation de la perméabilité capillaire avec libération de substance bio-active telle que le monoxyde d'azote et une vasodilatation (à l'origine d'un érythème, d'œdème etc.). Largement exprimés dans le cerveau et l'estomac, les récepteurs H2 (RH2) jouent un rôle dans la régulation des fonctions gastriques et neuronales.^{33,34} Les antagonistes des RH2, tels que la ranitidine, la cimétidine ou la famotidine, initialement prescrits pour leur action d'inhibiteur de la sécrétion d'acide au niveau gastrique, sont de plus en plus testés dans des pathologies neuropsychiatriques telles que la schizophrénie avec des résultats surprenants.³⁵ La pharmacologie de l'histamine a connu une renaissance au cours des dernières décennies, avec l'identification et le clonage des récepteurs H3 (RH3) et H4 (RH4) de l'histamine, qui double les membres de la famille des récepteurs de l'histamine. Le RH3 largement exprimé dans le cerveau, notamment sur les synapses neuronales, jouerait un rôle dans la neurotransmission. Il agit comme auto-récepteur en assurant la régulation de la synthèse et le relargage d'histamine. Il pourrait jouer un rôle dans la mémoire et le sommeil. Le RH4 semblerait quant à lui exprimé essentiellement sur les cellules immunes, en jouant un rôle dans le chimiotactisme.³⁶

D'autres amines biogènes tels que la dopamine et la sérotonine sont aussi contenues dans les granules mastocytaire.³⁷

1.1.4.1.2 Protéases neutres et autres enzymes

Les protéases neutres : chymase, tryptase et la carboxypeptidase A sont exclusivement exprimées par les mastocytes. La tryptase, l'enzyme la plus abondamment représentée dans les granules sécrétoires mastocytaires, est largement exprimée par tous les mastocytes, elle joue un rôle notamment dans la coagulation avec son lien étroit avec l'héparine, dans le remaniement des tissus conjonctifs en activant les procollagénases en collagénases, mais elle potentialise aussi les effets de l'histamine et active le complément.³⁸ La tryptase est actuellement le seul marqueur biologique disponible reflétant l'activation mais surtout le taux de mastocytes dans l'organisme. La carboxypeptidase en dégradant certaines toxines réduirait la toxicité du venin de certains animaux.³⁹

Les granules mastocytaires contiennent 4 types d'hydrolases acides habituellement retrouvées dans les lysosomes sécrétoires (la β -glucuronidase, la β -galactosidase, l'arylsulfatase et la β -hexosaminidase).⁴⁰

1.1.4.1.3 Protéoglycanes

Les deux types de protéoglycanes mastocytaires sont l'héparine et le chondroïtine sulfate. Ils contribuent à la morphologie et à la capacité de stockage des granules sécrétoires. Les protéoglycanes forment des complexes avec l'histamine, les protéases et les hydrolases acides dans les granules mastocytaires, et assurent un relargage lent et contrôlé du contenu des granules mastocytaires.

L'héparine est exclusivement synthétisée par les mastocytes chez l'homme. Elle agit comme anti-coagulant en se liant à l'anti-thrombine.

1.1.4.2 Médiateurs néoformés et synthétisés

Médiateurs néoformés - L'activation des mastocytes induit l'activation de la phospholipase A2 (PLA2) qui va générer du lyso-PAF (lyso-platelet activating factor) et de l'acide arachidonique (AA). Le PAF peut entraîner une réaction inflammatoire aigüe lors de l'activation mastocytaire pouvant aboutir à un choc anaphylactique (hypotension et bronchospasme aigu). Il induit également l'agrégation plaquettaire. L'AA va être, en partie, métabolisée par 1- la voie des cyclo-oxygénases (COX) entraînant la formation de prostaglandine (essentiellement PGD2) et de thromboxane ou 2- la voie de la lipoxygénase conduisant à la formation des leucotriènes LTC4 (molécules à l'origine de tous leucotriènes cystéinylés). Les prostaglandines contribuent à augmenter la perméabilité vasculaire, le recrutement des leucocytes, la production de mucus et l'activation des cellules nerveuses.^{41,42} Le LTC4 est sécrété en petite quantité par les mastocytes activés et joue un rôle important dans le recrutement des neutrophiles, des éosinophiles et des lymphocytes T effecteurs en favorisant leur roulement sur l'endothélium vasculaire. De façon générale, les eicosanoïdes (PGD2 et LTC4) libérés par les mastocytes participent à la régulation de la perméabilité vasculaire, à la contraction des muscles lisses, au recrutement de cellules effectrices immunitaires.⁴³

Médiateurs synthétisés – Les mastocytes sont une source extrêmement importante de cytokines, de chimiokines et de facteurs de croissance. Leur régulation dépend du type de stimuli ainsi que du récepteur spécifique impliqué dans l'activation. Les cytokines et les chimiokines sont libérées quelques heures après l'activation des mastocytes. Les mastocytes synthétisent et libèrent des cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires (TGF- β et IL-10). Les cytokines pro-inflammatoires comprennent les cytokines associées aux réponses Th2, telles que l'IL-4, IL-5, IL-6 et IL-1, et les cytokines associées aux réponses Th1, notamment l'interféron-gamma (IFN- γ), IL-2, IL-3, IL-12, IL-18 et TNF- α . Les chimiokines CCL5 et CXCL8 sont également synthétisées par les mastocytes et recrutent des cellules immunitaires aux sites d'infection.^{44,45} La prise de conscience que les mastocytes représentent une source potentielle de cytokines, de chimiokines et de facteurs de croissance extrêmement variés est une idée relativement récente.

1.1.5 PRINCIPAUX RECEPTEURS

Les principaux récepteurs des mastocytes humains sont :

- Les récepteurs aux immunoglobulines (Ig)⁴⁶ :
 - o Le récepteur de haute affinité aux IgE : le Fc ϵ RI

- Le récepteur de faible affinité aux IgE : le FcεRII ou CD23. Le CD23 a une expression cellulaire plus ubiquitaire que le FcεRI. Il présente une affinité plus faible aux IgE, et n'est capable de se lier qu'aux IgE déjà couplées à l'antigène, contrairement au FcεRI.
- Des récepteurs de faible affinité aux IgG :
 - Le FcγRIIB, récepteur au fragment constant qui va induire un signal inhibiteur sur le FcεRI, dont l'expression est encore controversée dans le mastocyte humain.⁴⁷ Lors de la différenciation mastocytaire murine il est exprimé avant le FcεRI et le FcγRIIIA.
 - Le FcγRIIA, récepteur activateur de faible affinité aux IgG, capable d'induire l'activation mastocytaire *in vitro* ;⁴⁸
 - Le FcγRIIIA ou CD16 : récepteur activateur de faible affinité aux IgG, également capable d'induire l'activation mastocytaire. Il est exprimé uniquement sur les mastocytes murins ;
- Le récepteur de haute affinité aux IgG dont l'expression peut être induite par l'interferon-γ (IFNγ) ;⁴⁹
- Le récepteur au SCF : récepteur à activité tyrosine kinase KIT ou CD117 ;
- De nombreux autres récepteurs aux cytokines, aux chimiokines et au complément : faisant du mastocyte une cellule clé en immunologie. L'IL-3 et donc le récepteur à l'IL-3 permet chez la souris d'obtenir une population pure de mastocytes à partir de moelle totale. Chez l'homme son rôle est plus controversé, lorsque l'on différencie des mastocytes à partir du sang ou de la moelle, l'IL-3 est utilisé dans la première semaine de culture pour permettre une amplification plus importante des progéniteurs mastocytaires au départ.²⁰ L'IL-6 et donc son récepteur sont également importants chez l'homme tout au long de la période de culture pour favoriser la prolifération et la maturation des mastocytes dépendants du SCF.¹⁹

La Figure 3 résume les principaux récepteurs présents à la surface des mastocytes.

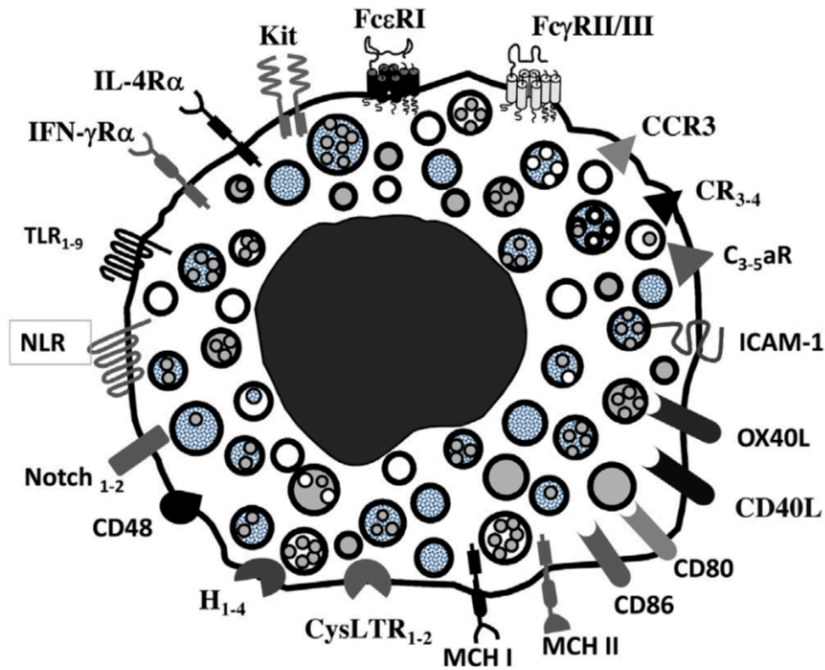


Figure 3. Principaux récepteurs exprimés sur les mastocytes.⁵⁰ Les mastocytes expriment de multiples récepteurs impliqués dans la reconnaissance des antigènes bactériens, viraux et fongiques, des récepteurs pour les immunoglobulines et le complément ainsi que des récepteurs pour plusieurs cytokines et chimiokines. Ces récepteurs sont essentiels pour le recrutement des mastocytes dans les tissus périphériques et pour assurer leur activation appropriée pendant les infections. Les mastocytes expriment également des molécules co-stimulatrices qui servent de médiateurs dans les interactions avec les cellules de l'immunité adaptative dans les organes lymphoïdes périphériques. C3-5AR: C3-5 anaphylatoxin-chemotactic receptor; CCR3: C-C chemokine receptor type 3; CR3-4 : Complement receptor type 3-4; CysLTR: Cys- teinyl leukotriene receptor; H: Histamine receptor; MHC: Major Histocompatibility Complex; NLR: NOD-like receptors; TLR: Toll-like receptors.

Nous détaillerons ici seulement les principaux récepteurs aux Ig et le récepteur KIT.

1.1.5.1 FcεR1

Le FcεR1 est le récepteur de haute affinité aux IgE fortement exprimé à la surface des mastocytes mais aussi des basophiles. Ce récepteur heterotétramérique ($\alpha\beta\gamma_2$) appartient à la superfamille des récepteurs aux immunoglobulines (Ig) tels que le BCR (lymphocytes B) ou le TCR (lymphocytes T). Il est composé d'une chaîne α de liaison à l'IgE, d'une sous-unité β avec 4 domaines transmembranaires qui sert d'amplificateur du signal médié par les IgE et de deux sous-unités γ reliées par un pont disulfure qui assurent la transduction du signal *via* les motifs ITAMS (Immunoreceptor Tyrosine based Activation Motif).⁵¹ Chez l'homme, la forme trimérique $\alpha\gamma_2$ du FcεR1 peut aussi être exprimée sur d'autres cellules que les mastocytes, tels que les éosinophiles, les cellules dendritiques et les monocytes. L'agrégation du FcεR1 induite par la fixation du complexe IgE/antigène va entraîner la phosphorylation des deux résidus tyrosines dans les ITAM des sous-unités γ du récepteur, par la tyrosine kinase, LYN, qui va ensuite permettre le recrutement de SYK (Spleen Tyrosine Kinase, par son domaine SH2 (domaine d'homologie Src2) de reconnaissance aux ITAMS phosphorylés).⁵² La fixation de SYK permet la trans- et l'autophosphorylation de son domaine catalytique, ainsi que la phosphorylation par LYN, augmentant

ainsi son activité catalytique. La protéine adaptatrice transmembranaire LAT (Linker for Activation of T cells) va ensuite être phosphorylée par SYK, point crucial pour la coordination des voies de signalisation en aval nécessaire à la libération des différents médiateurs pro-inflammatoires.^{53,54} La phosphorylation de LAT entraîne le recrutement de plusieurs types de molécules: des molécules adaptatrices cytosoliques, telles que Grb2 (growth-factor-receptor-bound protein 2), GADS (Grb2-related adaptor protein), SHC (SH2-domain-containing transforming protein C) et SLP76 (SH2-domain-containing leukocyte protein of 65 kDa); des facteurs d'échange guanine-nucléotide et des molécules adaptatrices, telles que SOS (son of sevenless homologue) et VAV; et des enzymes de signalisation, telles que la phospholipase $C\gamma 1$ (PLC $\gamma 1$). La phosphorylation de LAT entraîne ainsi la formation d'un complexe de signalisation macromoléculaire, permettant la diversification de la signalisation en aval nécessaire à la libération des différents médiateurs pro-inflammatoires (Figure 4).⁵⁵ Les quatre résidus tyrosine de LAT (Y132, Y171, Y191 et Y226) sont essentiels et suffisants pour permettre à LAT de réguler la signalisation et la dégranulation par les mastocytes.⁵⁴ Lorsqu'elle est activée, la PLC γ catalyse l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂) dans la membrane plasmique. Les produits résultants, l'inositol-1,4,5-trisphosphate (InsP₃) et le diacylglycérol (DAG) induisent la mobilisation du calcium cytosolique et l'activation de la protéine kinase C (PKC), respectivement, qui vont permettre la dégranulation mastocytaire. L'activation de Grb2 et SOS va conduire aussi à l'activation des RAS conduisant à l'activation des MAPK (mitogen-activated protein kinase), l'activation de ces dernières aboutissant à la production d'eicosanoïdes par PLA2 (Figure 4). L'activation des mastocytes induite par le complexe Fc ϵ RI/IgE/antigène va aussi induire l'expression d'un grand nombre de cytokines et de chimiokines notamment *via* l'activation de PKC et la mobilisation du calcium mais aussi *via* les MAPK, conférant aux mastocytes un rôle clé et central dans l'immunologie.^{45,56}

La réponse mastocytaire secondaire à l'agrégation du Fc ϵ R1 induite par la fixation du complexe IgE/antigène s'effectue en deux temps : une libération immédiate de médiateurs préformés, tels que l'histamine, les protéoglycanes, la sérotonine, les protéases neutres (chymase et tryptase), les médiateurs lipidiques (PGD₂, LTC et PAF) et les cytokines pré-stockées, tels que le TNF- α , suivi d'une sécrétion plus lente de médiateurs nouvellement synthétisés, notamment des cytokines (IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL 10, IL-13, GM-CSF, TGF- β), des chimiokines (CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL2) et des facteurs de croissance et angiogéniques. Les médiateurs libérés par le mastocyte peuvent agir à différents niveaux de la cascade inflammatoire : ils peuvent réguler le flux et la perméabilité vasculaire (médiateurs histaminiques et lipidiques), favoriser le recrutement de cellules immunitaires sur le site d'inflammation (TNF), libérer des produits ayant une activité lytique de certains pathogènes (cathelicidine). Dans certaines circonstances, les mastocytes peuvent également inhiber les réponses inflammatoires en libérant de l'IL-10 et du TGF- β qui rétablissent l'homéostasie et limitent les lésions

tissulaires.⁵⁰ Les différents médiateurs sécrétés dépendent des tissus dans lesquels sont localisés les mastocytes.

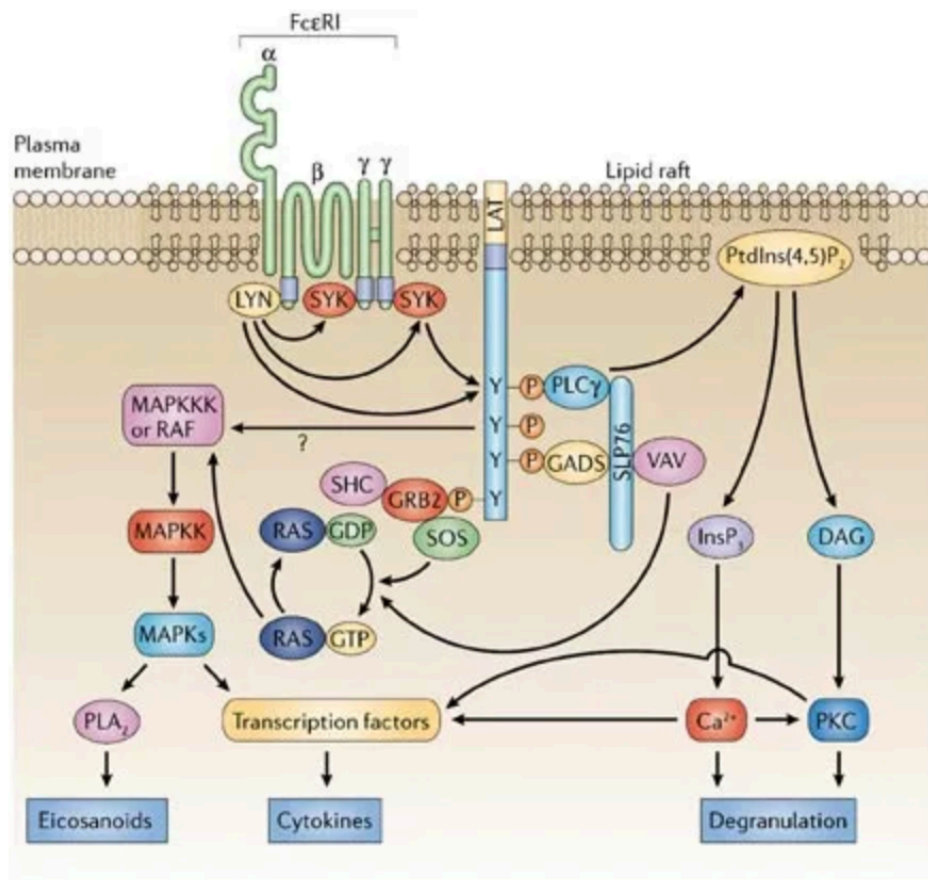


Figure 4. Les molécules de transduction du signal recrutées et/ou activées par le FcεRI.⁵⁵

Voie de signalisation complémentaire : axe FYN-GAB2-PI3K. Le concept d'un signal d'amplification pour l'activation des mastocytes médiée par FcεRI a été initialement déduit d'études montrant que l'activation des mastocytes dépendant de FcεRI n'était que partiellement réduite en l'absence de la chaîne β de FcεRI, alors qu'elle est complètement abolie en l'absence de chaînes γ. Dans cette voie, FYN est recrutée (en plus de LYN), et conduit à un complexe d'activation composé de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), de la molécule adaptatrice GAB2, et de Grb2. L'activation de la PI3K conduit au recrutement membranaire de PDK1 (3-phosphoinositide- dépendent protein kinase) qui active alors la PKCδ, conduisant finalement à la dégranulation (Figure 5).⁵⁷

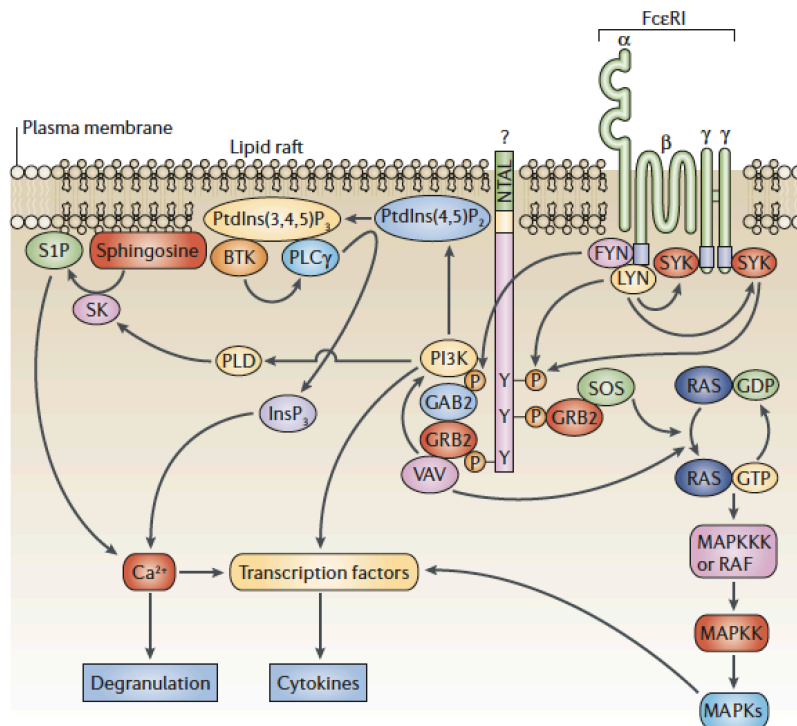


Figure 5. La voie de signalisation « complémentaire » FYN-GAB2-PI3K dans les mastocytes activés *via* le FcεRI.⁵⁵

Régulation négative du FcεRI. L'agrégation de FcεRI active de nombreuses protéines qui régulent négativement les voies de signalisation positives activées en aval de ce récepteur. Par exemple, LYN, qui initie des signaux à la fois activateurs et inhibiteurs, régule négativement l'activité de FYN et donc la phosphorylation de GAB2. Les autres régulateurs négatifs incluent c-Cbl (qui facilite l'ubiquitination de FcεRI, LYN, SYK mais aussi de KIT), la tyrosine phosphatase SHP-1 (qui déphosphoryle SYK), les lipides phosphatases SHIP (catalysant l'hydrolyse de la phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate en phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate (PI(3,4)P2)) et PTEN (Phosphatase and TENSin homolog, qui catalyse l'hydrolyse du phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate en phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate(PI)P2), les RasGAP tels que la neurofibromin 1 (qui inhibe RAS en augmentant son activité GTPase intrinsèque), Rabex-5 (qui améliore l'internalisation du FcεRI et peut se lier à RAS lié au GTP) et RGS13 (qui se lie à la sous-unité p85a de PI3K et interrompt l'association avec GAB2 et Grb2). L'agrégation induite par l'antigène de FcεRI avec FcγRIIB inhibe les événements de signalisation induits par FcεRI et l'activation des mastocytes par la phosphorylation des ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) du FcγRIIB induite par LYN et le recrutement ultérieur de SHIP et de la protéine d'accueil DOK1.⁵⁶

1.1.5.2 Récepteur KIT

1.1.5.2.1 Structure du récepteur KIT

CD117 ou KIT est un récepteur à activité tyrosine kinase (TK) de type III qui a été mis en évidence pour la première fois par Besmer et coll. en 1986 dans des rétrovirus responsables de fibrosarcome félin.⁵⁸ Il existe 20 sous-familles de récepteurs humains à activité TK, KIT appartient à la sous-famille du PDGF-R (plated derived growth factor receptor, Figure 6).^{59,60}

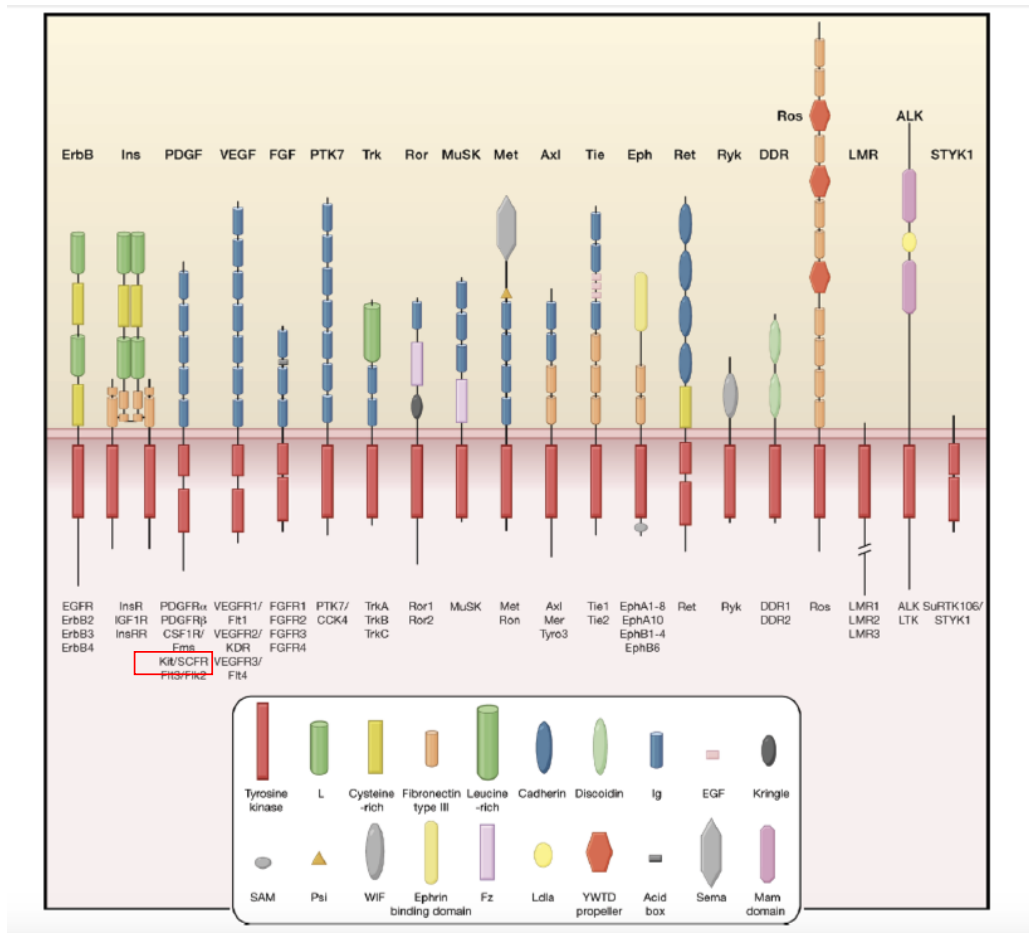


Figure 6. Principaux récepteurs à activité tyrosine kinase chez l'homme.⁶⁰

Chez l'homme, le gène *KIT* est situé sur le chromosome 4q12, dans la région péri-centromérique du bras long du chromosome 4, adjacent à son homologue *PDGFRA*.^{61,62} L'ADN génomique de *KIT* couvre environ 89 kb et contient 21 exons qui sont transcrits puis traduits en un récepteur de TK de type III, comportant 976 acides aminés, avec un poids moléculaire de 145 kDa.⁶³ Les principales régions du récepteur KIT sont : 1- la région extracellulaire, composée de cinq domaines Ig codée par les exons 1 à 9 (acides aminés: 23 à 520) ; 2-la région transmembranaire hydrophobe, qui permet l'ancrage du récepteur dans la membrane plasmique, codée par l'exon 10 (acides aminés: 521 à 543) et 3- la région intracellulaire composée de la région juxta-membranaire auto-inhibitrice codée par l'exon 11 (acides aminés : 544-

581) et de la région TK codée par les exons 13-21 (acides aminés : 582-937). Les trois premiers domaines Ig forment le site de liaison du SCF (autrement appelé ligand de KIT), alors que les 4^{ème} et 5^{ème} domaines Ig ont un rôle dans la stabilisation du dimère de KIT induit par le SCF; de plus, le 5^{ème} domaine Ig inclut un site de clivage protéolytique de KIT à la surface de la cellule.^{64,65} La portion « kinase » de KIT est composée de deux domaines séparés par une région KID (KIT insert domain): 1-le domaine TK1 est constitué par le petit lobe N-terminal qui se dilate à partir des acides aminés 582 à 684 et contient le site de liaison à l'ATP; 2- le domaine TK2 est formé par le grand lobe C-terminal contenant le site phosphotransférase et la boucle d'activation (acides aminés: 810 à 839). Le domaine catalytique de KIT est ainsi constitué de ces deux régions TK1 et TK2, qui séparément n'ont pas d'activité tyrosine kinase. Les différentes tyrosines phosphorylables situées dans les domaines juxta-membranaire, KID et TK2 sont représentées dans la Figure 7.

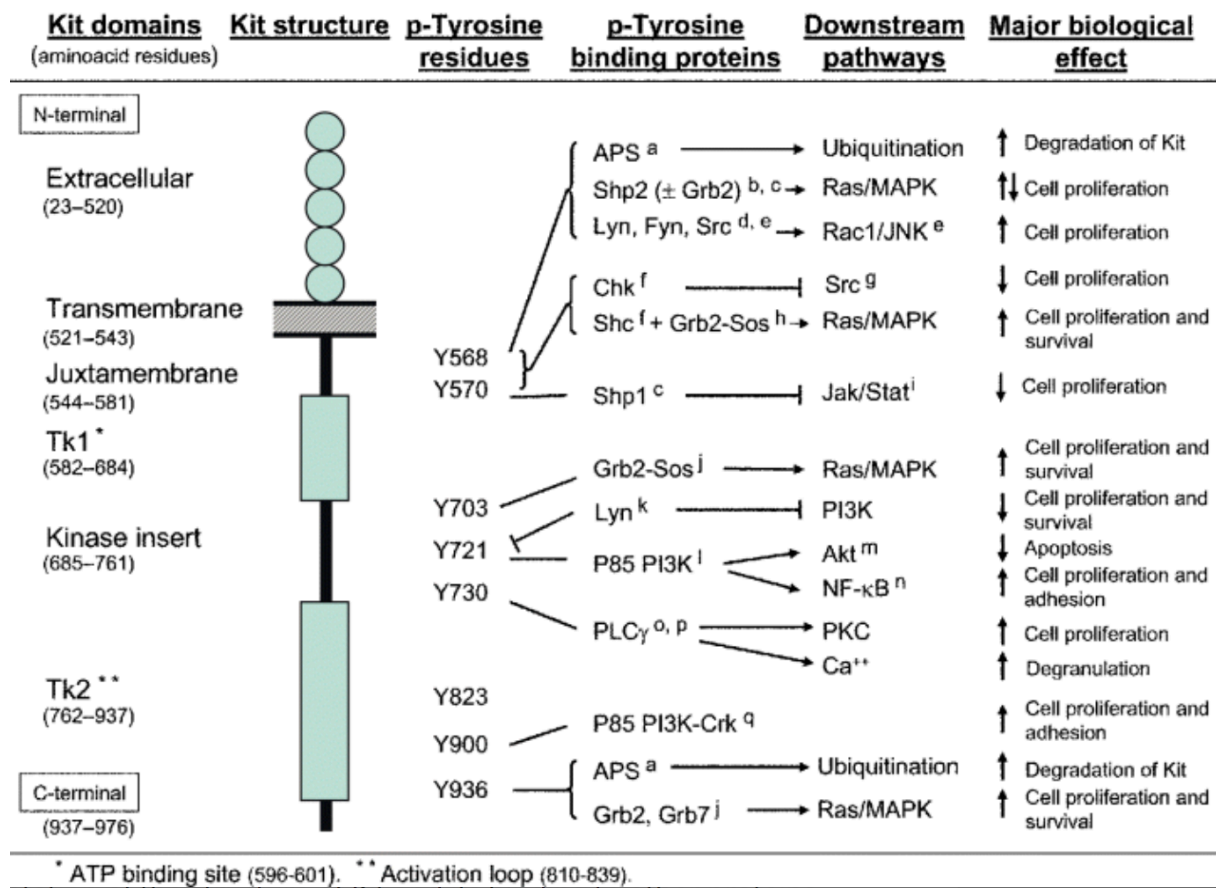


Figure 7. Représentation schématique de la structure de KIT et de sa liaison à d'autres protéines et adaptateurs *via* les résidus de tyrosine phosphorylés de KIT.⁶⁵ Un résumé des voies en aval activées par ces interactions et de leurs principaux effets biologiques est également fourni dans les deux colonnes de droite. Les lignes simples (—) représentent le site d'accueil hypothétique ; les flèches (→) indiquent l'activation, tandis que les lignes croisées (⊥) indiquent les effets inhibiteurs. Les flèches verticales indiquent des effets accrus (↑) et diminués (↓) sur différentes fonctions cellulaires.

1.1.5.2.2 Voie de signalisation KIT

En situation homéostatique, le récepteur KIT est activé (phosphorylé) par liaison de son ligand, le SCF, ce qui conduit à une cascade de phosphorylation activant finalement divers facteurs de transcription. Cette activation régule notamment l'apoptose, la différenciation cellulaire, la prolifération, la survie, la maturation, le chimiotactisme et l'adhésion cellulaire.

Lors de la liaison non covalente d'un dimère de SCF aux deuxième et troisième domaines Ig de KIT, celui-ci subit une dimérisation, suivie de la transphosphorylation de deux résidus tyrosine de la région juxta-membranaire auto-inhibitrice (Y568 et Y570).^{66,67} Ces changements moléculaires conduisent à une modification conformationnelle de la boucle d'activation, suivie de la transphosphorylation de la tyrosine 823 qui stabilise l'enzyme dans sa forme la plus active (Figure 8). À son tour, l'activité TK intrinsèque de KIT conduit à une auto-phosphorylation des autres résidus tyrosine qui servent de sites d'ancrage pour les molécules de transduction de signal contenant les domaines SH2 et d'autres domaines de liaison à la phospho-tyrosine. Les protéines adaptatrices possédant des domaines SH2 (Grb2, SHC) et PI3K sont alors recrutées et induisent la transduction de plusieurs voies de signalisation dont les acteurs principaux sont les PI3K, la PLC γ , les membres de la famille Src (tyrosine kinase du Sarcome de Rous), la voie Ras-Raf-MAPK et la voie JAK (Janus Kinase)/STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription, Figure 8). Parmi les différentes molécules JAK et STAT, la voie JAK2-STAT5 est considérée comme la plus importante pour la croissance et la survie des mastocytes.^{68,69} JAK3, et notamment STAT3 semblent jouer un rôle important dans la dégranulation mastocytaire.^{70,71}

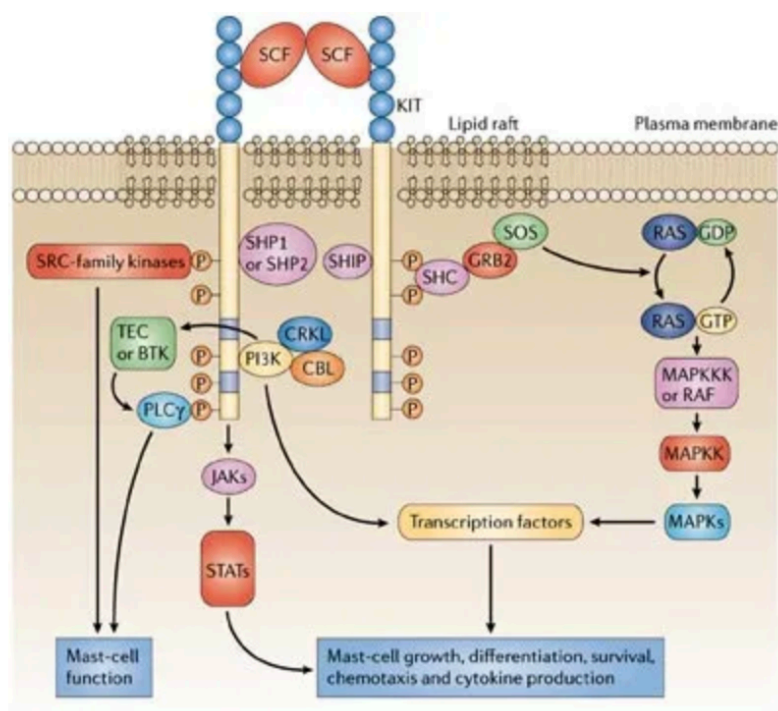


Figure 8. Les molécules de transduction du signal recrutées et/ou activées par KIT.⁷²

1.1.5.2.3 *KIT* et pathogénie

Les cellules dépendantes du récepteur KIT sont en plus des mastocytes, les cellules souches hématopoïétiques, d'autres cellules souches multipotentes non hématopoïétiques (du cœur, de la prostate et neuronales notamment)⁷³, les cellules germinales, les mélanocytes et les cellules interstitielles de Cajal du tractus gastro-intestinal. L'expression du récepteur KIT est régulée négativement lors de la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques en cellules matures dans toutes les lignées, à l'exception des mastocytes qui conservent des niveaux élevés d'expression de KIT à la surface des cellules. KIT joue ainsi un rôle dans développement normal des mastocytes,^{74,75} l'hématopoïèse (dans la différenciation des précurseurs érythroïde, lymphoïde, mégacaryocytaire et myéloïde),⁷⁶ la gamétogenèse,⁷⁷ la mélanogenèse^{76,78} et la régulation du péristaltisme du tube digestif.^{65,79}

Une activation aberrante de la voie de signalisation KIT est retrouvée dans de nombreux cancers. Des mutations activatrices gain-de-fonction dans le gène *KIT* ont été mises en évidence dans les mastocytoses mais aussi d'autres hémopathies malignes tels que les leucémies aiguës myéloïdes, certaines maladies myéloprolifératives ou les lymphomes NK/T extra-ganglionnaire de type nasal ; les tumeurs stromales gastro-interstinales (GIST) ; des tumeurs germinales et les mélanomes (Table 1).⁸⁰

	Fréquence	Localisation des mutations <i>KIT</i>
KIT et Hémopathies		
Mastocytose	85-90%	Exon 17 (D816V) > Exon 11 : adultes Exons 8, 9, 11, 13 et 17 : enfants
Leucémies aiguës myéloblastiques	4-5%	
LAM-CBF [t(8;21) et inv(16) ou t(16;16)] ⁸¹	30-45%	Exon 17 (D816 et/ou N822Y) >> autres exons (<5%des cas) Mutation D816 = mauvais pronostic
Lymphomes NK/T extra-ganglionnaire de type nasal ^{82,83}	10-71.4% (selon origine des patients) mais non confirmé dans les dernières études de NGS	Exons 11 et 17
Syndromes myélodysplasiques (SMD) ⁸⁴	6 (leucémie myélomonocytaire chronique) -19% (SMD-LAM)	Exon 17 (codon 816) > Exon 11
KIT et GIST ⁷⁹	60-70%	Exon 11 > Exon 9 > Exons 17 et 13
KIT et mélanome ⁸⁵	1.7% Mélanomes cutanés 7.7% Mélanomes de la conjonctive 15.6% Mélanomes muqueux 23% Mélanome accral	Exons 11 et 13 (L576P and K642E dans plus de 55% des cas) > Exons 17 et 18 (10.5% des cas)
Séminomes ⁷⁹	30%	Exon 17 (D816V/H/Y) > Exon 11

Table 1. Principales néoplasies associées à des mutations dans le gène *KIT*.

1.2 LES MASTOCYTOSES

Les mastocytoses sont un groupe hétérogènes de néoplasies caractérisées par une expansion et une accumulation clonale de mastocytes dans un ou plusieurs organes, tels que la peau (atteinte la plus fréquente), la moelle osseuse, la rate, les ganglions lymphatiques et le tractus gastro-intestinal, à l'origine de manifestations cliniques variées.^{86,87} Les manifestations cliniques résultent à la fois de l'accumulation des mastocytes dans le ou les différent(s) organe(s) atteints et du relargage de médiateurs pro-inflammatoires et vaso-actifs lors de la dégranulation mastocytaire à l'origine des signes d'activation mastocytaire (SAMa).

1.2.1 MANIFESTATIONS CLINIQUES

Les manifestations cliniques liées à l'accumulation des mastocytes sont essentiellement⁸⁸ :

- Cutanées, avec la présence chez l'adulte de lésions pigmentées monomorphes de petite taille (5mm), en nombre variable (d'une dizaine à plusieurs centaines) et de couleur allant du rouge-violacé au brun-beige. Cette variante clinique est appelée mastocytose cutanée maculopapuleuse ou MCMP (anciennement appelée urticaire pigmentaire). Il existe d'autres manifestations cutanées possibles détaillées dans le paragraphe 1.2.3. L'atteinte cutanée est la plus fréquente et peut-être présente dans toutes les formes de mastocytoses.
- Osseuses. Les localisations osseuses sont souvent asymptomatiques (ostéoporose) et se révèlent surtout par des complications (fractures des os longs ou tassements vertébraux).
- Digestives, se manifestant par une malabsorption avec un amaigrissement et des diarrhées pouvant être glairo-sanglantes dans les cas de mastocytoses agressives digestives.
- Hépatiques, avec une hépatomégalie +/- associée à une insuffisance hépatique avec cytolyse et/ou cholestase signant une mastocytose agressive. Elle est souvent associée à une splénomégalie.
- Ganglionnaires périphériques ou profondes, souvent notées dans les formes agressives ou associées à des hémopathies.
- Médullaires avec des possibles cytopénies dans les formes agressives.

Les principaux SAMa sont le prurit, les flushs, l'urticaire, les œdèmes localisés et diffus, les douleurs abdominales, les nausées, les troubles du transit, l'asthénie, les malaises, les épisodes d'hypotension, les chocs anaphylactiques, les douleurs articulaires et osseuses, la pollakiurie etc.

1.2.2 CLASSIFICATION

La classification OMS de 2016 distingue trois groupes de mastocytoses : les mastocytoses cutanées (MC), les mastocytoses systémiques (MS) et les sarcomes mastocytaires (Table 2).⁸⁸ Deux grands sous-types de MS sont définis : les MS indolentes (MSI) et les MS avancées comprenant les MS smoldering,

les MS avec une néoplasie hématologique associée (SM-AHN), les MS agressives (ASM) et les leucémies à mastocytes (MCL). Alors que dans les MS avancées, le traitement vise à augmenter l'espérance de vie, dans la MSI et la MC, la principale préoccupation des médecins est d'améliorer les signes de SAMa.

- **Cutaneous mastocytosis**

Maculopapular cutaneous mastocytosis, diffuse cutaneous mastocytosis, mastocytoma of skin

- **Systemic mastocytosis**

- Indolent systemic mastocytosis (ISM)*
- Smoldering systemic mastocytosis (SSM)*
- Systemic mastocytosis with an associated hematological neoplasm (SM-AHN)†
- Aggressive systemic mastocytosis (ASM)*
- Mast cell leukemia (MCL)

- **Mast cell sarcoma (MCS)**

* For a full diagnosis of these subtypes, information on B and C findings is required but may not be available at the time of the initial tissue diagnosis.

†This category is equivalent to the previously described “systemic mastocytosis with an associated clonal hematologic non-mast cell lineage disease.”

AHNMD and AHN can be used synonymously.

Table 2. Classification des mastocytoses selon l’OMS 2016.⁸⁸

1.2.3 CRITERES DIAGNOSTIQUES

Les critères diagnostiques de mastocytoses systémiques sont cités dans la Table 3. Pour établir le diagnostic de mastocytose systémique il faut au moins 1 critère majeur et 1 critère mineur ou 3 critères mineurs.

Major SM criterion	Multifocal dense infiltrates of MCs (≥ 15 MCs in aggregates) in BM biopsies and/or in sections of other extracutaneous organ(s)
Minor SM criteria	<ol style="list-style-type: none"> >25% of all MCs are atypical cells (type I or type II) on BM smears or are spindle-shaped in MC infiltrates detected on sections of visceral organs <i>KIT</i> point mutation at codon 816 in the BM or another extracutaneous organ MCs in BM or blood or another extracutaneous organ exhibit CD2 and/or CD25 Baseline serum tryptase level >20 ng/mL (in case of an unrelated myeloid neoplasm, item d is not valid as an SM criterion)

Table 3. Critères de mastocytoses systémiques selon les classifications OMS de 2008 et de 2016.^{88,89}

Le diagnostic de MC repose, selon les critères de l'OMS, sur la présence de lésions cutanées typiques ou atypiques combinées à un signe de Darier positif (correspondant à une turgescence des lésions après 1 à 2 minutes d'une friction volontaire) et à l'exclusion d'autres maladies cutanées, associées à l'un de ces deux critères mineurs : 1- présence d'agrégats de mastocytes (> 15 mastocytes/cluster ou infiltrat monomorphe avec >20 mastocytes par champ de haute résolution) et/ou 2-détection d'une mutation ponctuelle dans le codon 816 du gène *KIT* dans la peau lésée.^{88,89} Les lésions cutanées sont divisées en MC maculo-papuleuse (MCMP) - elle-même subdivisée en MCMP-large avec des lésions de taille polymorphe dont au moins une de plus de 1cm et en MCMP-small avec des lésions monomorphes de petites tailles < 5mm - en mastocytome et en mastocytose cutanée diffuse (MCD). Bien que des lésions de MC soient présentes dans les MC et les MS à tous les âges, les MCMP-large, les mastocytomes et les MCD sont retrouvés de façon beaucoup plus fréquente chez les MC à début pédiatrique.

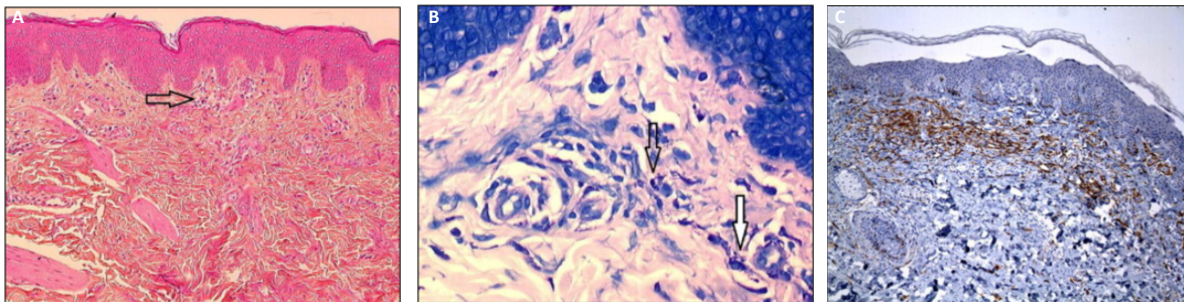


Figure 9. Histologie d'une lésion cutanée de mastocytose (MCMP-small, anciennement appelé urticaire pigmentaire). **A**, Aspect en histologie standard retrouvant un agrégat de mastocytes dans le derme (hématoxyline-éosine, x20). **B**, Histologie d'une urticaire pigmentaire au bleu de toluidine avec mastocytes périvasculaires (flèche blanche) et interstitiels (flèche noire, x40). **C**, Marquage CD117 des mastocytes (x20) en immuno-histochimie.⁹⁰

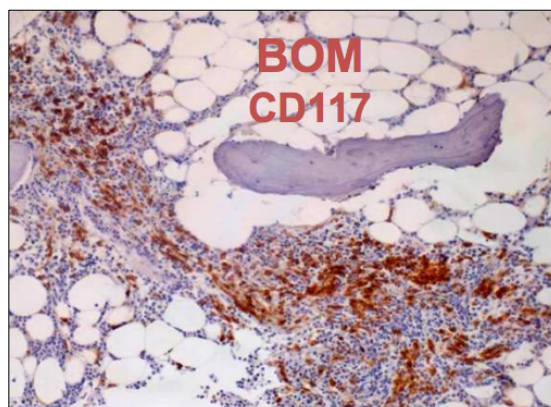


Figure 10. Marquage CD117 sur une biopsie ostéo-médullaire de patient atteint de mastocytose systémique (image prise par le Dr Canoni, anatomo-pathologiste – Hôpital Necker-Enfants Malades).

1.2.4 DEUX PRESENTATIONS CLINIQUES DISTINCTES : MASTOCYTOSE DE L'ENFANT/ADULTE

Ainsi, on distingue différents types de mastocytoses selon l'âge de début de la maladie : la mastocytose à début pédiatrique qui est le plus souvent cutanée pure et régressive chez plus de 70% des patients et la mastocytose débutant à l'âge adulte qui est le plus souvent systémique, indolente ou plus rarement avancée, mais persistante.⁹¹⁻⁹⁸

1.2.5 PATHOGENIE

1.2.5.1 Mutations somatiques gain-de-fonction dans le gène *KIT*

La physiopathologie de la mastocytose reste mal connue. Elle est fortement associée aux mutations somatiques gain-de-fonction du gène *KIT* codant pour le récepteur à activité tyrosine kinase KIT.^{99,100} En effet, une mutation dans le gène *KIT* est retrouvée dans la majorité des cas de MS adulte (>85%), quel que soit le sous-type de MS de l'OMS.^{101,102} Chez l'adulte, la mutation la plus largement rencontrée est la mutation *KIT* D816V, substitution d'un acide aspartique en valine en position 816 dans le domaine tyrosine kinase de KIT (>80%). Les autres mutations somatiques de *KIT* identifiées dans les MS de l'adulte sont les mutations V560G^{103,104}, D815K¹⁰⁵, D816Y^{101,105-107}, insVI815-816¹⁰¹, D816F^{105,106}, D816H¹⁰⁸ et D820G¹⁰⁹. Des études plus récentes ont confirmé que la mastocytose à début pédiatrique était également de nature clonale et associée à des mutations du gène *KIT*.¹¹⁰⁻¹¹² Bodemer et coll. ont montré que la mutation *KIT* D816V était retrouvée chez seulement 42% des patients atteints de mastocytose pédiatrique; dans 44% des cas, les mutations se situaient dans les exons 8 et 9 qui codent pour le cinquième domaine Ig (D5) et la région extracellulaire proche du domaine transmembranaire de c-KIT.¹¹⁰ La figure 11 illustre les principales mutations *KIT* identifiées à ce jour. Certaines de ces mutations (A533D, M541L, Del419D, S451C, K509I, V559A, R634W or N822I) ont été retrouvées de façon germinales dans des mastocytoses familiales ségrégant selon un mode mendélien autosomique dominant +/- associées à des tumeurs stromales gastro-intestinales (Figure 12).¹¹³⁻¹²³

Ces mutations dans le gène *KIT* vont aboutir à une activation spontanée constitutive de KIT et donc à une augmentation de la prolifération, de la survie et de l'activation mastocytaire.^{107,110}

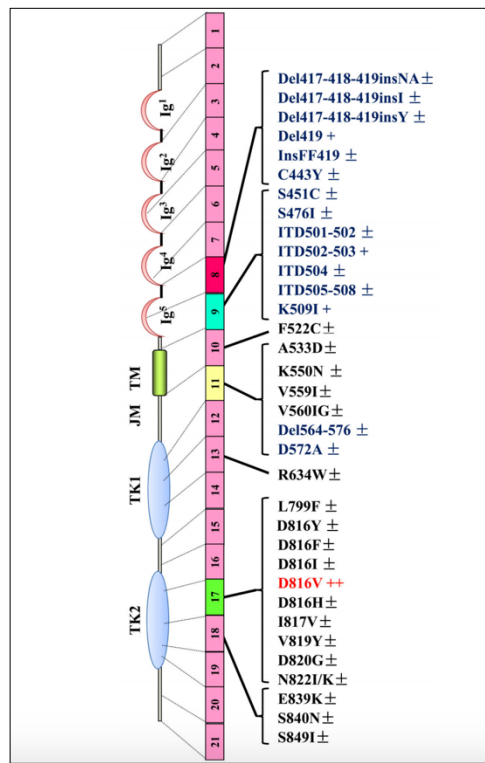


Figure 11. Représentation de la structure de KIT, illustrant la localisation des mutations les plus fréquemment observées chez les patients pédiatriques et adultes atteints de mastocytose.¹²⁴

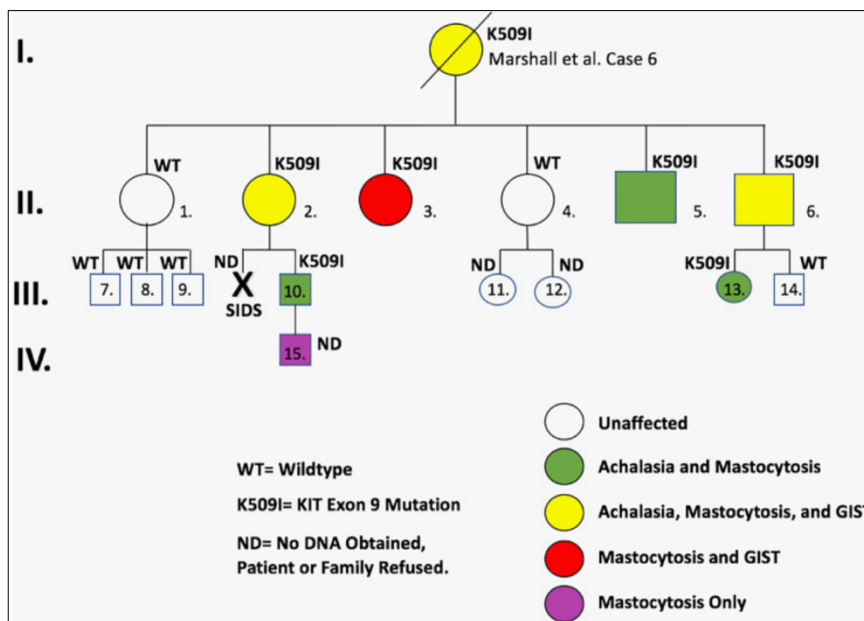


Figure 12. Exemple d'une famille présentant une mutation germinale dans *KIT*. Pedigree d'une famille présentant une mastocytose +/- GIST +/- achalasia de transmission autosomique dominante avec la mutation germinale K509I dans le gène *KIT*.¹²⁵

Plusieurs arguments suggèrent que la mutation de *KIT* n'explique pas seule, les différents phénotypes et l'expansion clonale de mastocytes. Des patients avec la même mutation de *KIT* peuvent avoir un phénotype clinique très différente, une même mutation de *KIT* peut être retrouvée dans une mastocytose cutanée pure de l'enfant et dans une leucémie à mastocytes. Pour les mastocytoses pédiatriques, en dépit des mutations de *KIT*, une rémission spontanée complète est observée chez une

majorité de patients. Une centaine de mastocytoses familiales ségrégant selon un mode mendélien a été rapportée. Seulement 13 d'entre elles ont une mutation germinale dans le gène *KIT*.¹¹³⁻¹²³ Les souris transgéniques surexprimant *KIT* D816V présentent une expansion lente et une accumulation indolente de mastocytes dans les tissus, et développent rarement une mastocytose agressive.¹²⁶ Enfin, l'expression conditionnelle de *KIT* D816V ne favorise pas la prolifération des lignées BaF3 par rapport aux lignées BaF3 sauvages ou Wild Type (WT).¹²⁷

Ceci suggère l'implication d'une ou plusieurs mutations supplémentaires, sans doute germinale(s) chez l'enfant et somatique(s) chez l'adulte, qui agirai(en)t en synergie avec la mutation de *KIT* pour induire l'expression phénotypique.

1.2.5.2 Autres mutations somatiques

D'ores-et-déjà des mutations somatiques dans d'autres gènes (notamment des gènes régulateurs épigénétiques, tels que *SRSF2*, *ASXL1*, *RUNX1*, *NRAS*, *EZH2* et *TET2*)¹²⁸⁻¹³³ ont été décrites dans les MS de l'adulte, et sont fréquemment observées chez des patients présentant un néoplasie myéloïde associée. Ces mutations expliquent, du moins dans une certaine mesure, les différentes entités cliniques de mastocytose systémique.

Plusieurs études ont étudié l'impact pronostique de ces mutations additionnelles. La plupart des mutations ont été découvertes chez des patients atteints de MS avancées, et la présence et le nombre de mutations dans les gènes *SRSF2*, *ASXL1* et *RUNX1* sont associés à un mauvais pronostic (Figure 13).^{131,134} Des études *in vitro* suggèrent que ces mutations agissent en synergie avec le signal induit par la protéine *KIT* anormale pour induire la survie et la prolifération des mastocytes. Jawhar et coll. en analysant l'architecture clonale de mastocytoses systémiques +/- associées à hémopathies myéloïdes, ont montré que les mutations associées dans *SRSF2*, *ASXL1*, *RUNX1*, *NRAS*, *EZH2* et *TET2* précédaient les mutations dans *KIT*. Cependant, les mécanismes moléculaires sous-jacents restent à caractériser.

Ainsi, au moins deux nouvelles caractéristiques moléculaires ont maintenant été identifiées comme impliquées dans le phénotype, la progression et le pronostic des patients adultes atteints de MS: 1-la présence de la mutation *KIT* D816V dans plusieurs lignées (en plus de la lignée mastocytaire) et 2-l'association d'autres mutations somatiques en plus de *KIT* D816V.¹³⁵ La diversité clinique et morphologique de la MS devrait donc résulter de schémas mutationnels complexes qualitativement et quantitativement dans différents sous-clones et lignées myéloïdes, ce qui est également cohérent avec le modèle des sous-clones de l'évolution des cellules souches cancéreuses.¹³⁶

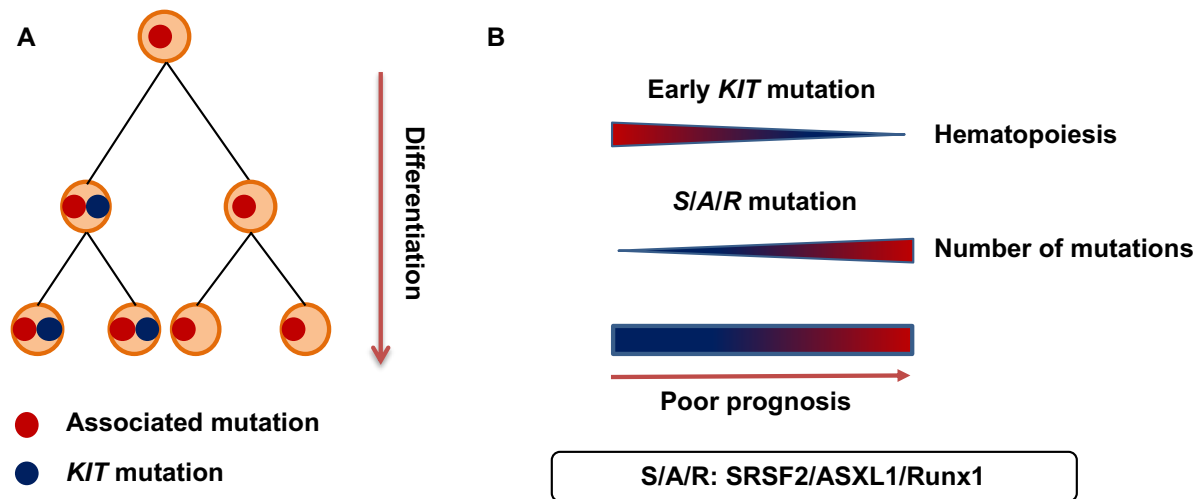


Figure 13. Mastocytose systémique avancée : architecture clonale et pronostic.¹³⁷ **A**, Représentation de l'architecture clonale du compartiment hématopoïétique dans la mastocytose avancée. Les mutations associées se produisent avant la mutation *KIT*. **B**, La survenue précoce de la mutation *KIT* D816V dans le compartiment progéniteur hématopoïétique et la présence de mutations *SRSF2*, *ASXL1*, *RUNX1* (S/A/R) sont associées à un mauvais pronostic.

1.2.5.3 Modèles murins

1.2.5.3.1 Souris *Kit* D814V / *KIT* D816V

Pour évaluer directement si la mutation *KIT* D816V est liée de manière causale au développement de la mastocytose *in vivo*, Zappulla et coll. ont généré des souris transgéniques exprimant un transgène de fusion constitué du promoteur du gène codant pour la chymase (*mcpt5*) et de l'ADNc humain du proto-oncogène *KIT* D816V.¹²⁶ La mutation *KIT* D816V était donc exprimée uniquement dans les mastocytes matures de ces souris exprimant MCPT5 (Mast cell protease 5). A peine 30% des souris (8 sur 28) ont développé une mastocytose indolente (certaines avec une maladie limitée à la peau) à un âge avancé (12-18 mois). Seulement une souris présentait une MS avancée avec une importante tumeur intestinale et un infiltrat mastocytaire splénique et hépatique. Bien que les mastocytes dérivés de la moelle osseuse de ces souris transgéniques deviennent finalement indépendants du SCF et peuvent être maintenus à long terme en culture, la pénétrance incomplète de la maladie dans ce modèle suggère que des mutations somatiques supplémentaires sont nécessaires pour une transformation complète des mastocytes. Xiang et coll. montrent aussi que le trafic intracellulaire de la protéine *KIT* D816V humaine est anormal dans les cellules murines résultant de problèmes inter-espèces et pourrait expliquer ces formes très frustrées observées de mastocytose.¹³⁸

Gerbaulet et coll. ont généré un autre modèle de souris transgénique permettant l'expression conditionnelle de *Kit* D814V (l'homologue de *KIT* D816V humain) sous le promoteur de *KIT*, selon le système de recombinaison Cre-lox.¹³⁹ Ainsi, pour imiter expérimentalement les mutations somatiques associées à la mastocytose humaine, ils ont croisé des souris *Kit*^{D814Vfloxed} avec des souris mx1-Cre, qui exprime la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur du gène *mx1* inductible par l'interféron de type I. Mx1 a une expression plus ubiquitaire dans le système hématopoïétique que MCPT5.

L'expression de Cre a été induite par 3 injections de 250 µg d'acide polyinosine-polycytidylique (pI: C) tous les deux jours afin d'activer l'expression du *Kit* transgénique D814V chez des souris *Kit*^{D814VfloX} Mx1-Cre âgées de 4 à 10 semaines. L'expression de *Kit* mutant chez des souris adultes, notamment dans des précurseurs hématopoïétiques, entraîne une mastocytose agressive avec une pénétrance complète associée à une mortalité entre 18 et 52 semaines. La mastocytose touchait essentiellement la peau, la rate, les ganglions et le foie mais aucune atteinte médullaire n'a été observée. Environ la moitié des souris ont développé une hémopathie non mastocytaire, le plus souvent une leucémie lymphoblastique B (CD19+/B220+). Les souris ont également développé une colite inflammatoire focale sévère associée à un infiltrat massif de mastocytes. En revanche, lorsque l'expression de *kit* mutant dans ce modèle était limitée à un mastocyte plus mature (souris *Kit*^{D814VfloX} Mcpt5-Cre), l'expression de la maladie était significativement atténuée, retardée et de progression plus lente ; seulement la moitié des souris ont développé des tumeurs mastocytaires et des lésions cutanées érosives mais toutes ont développé une colite sévère.

Bien que ces deux modèles murins transgéniques susmentionnés soient imparfaits (traitement / trafic intracellulaire anormal du KIT D816V humain, entraînant une faible oncogénicité dans le premier et une faible expression du transgène dans le second), ils suggèrent que les effets de la signalisation constitutive de KIT dépendent du stade de développement de la cellule ciblée par la mutation gain-de-fonction. Des mutations ciblant des progéniteurs non différenciés entraînent une atteinte de plusieurs lignées et l'expression d'un phénotype de maladie systémique grave. Au contraire, les mutations qui ciblent les progéniteurs de mastocytes engagés ou les mastocytes matures entraînent des formes plus bénignes de la maladie.¹⁰¹

Par ailleurs, deux modèles de souris xéno greffes ont été décrits : l'une consistait en l'injection de la lignée cellulaire leucémique HMC-1.2 chez des souris SCID (severe combined immunodeficiency), donnant lieu à des tumeurs solides,¹⁴⁰ tandis que le second consistait à injecter des lignées de cellules de mastocytome P815 à des souris DBA-2. Dans ce dernier modèle, une mortalité en lien avec une leucémie à mastocytes avec une leucocytose majeure a été observée très précocement, dans les 9 jours chez les animaux injectés.¹⁴¹

Ces modèles sont donc peu utiles pour réaliser des études précliniques car non représentatifs de la maladie chez l'homme (faible incidence de la maladie et/ou cinétique de l'apparition et de la progression de la maladie, qui est très courte ou trop longue). Aucun modèle *in vivo* pertinent de mastocytose systémique avancée KIT D816V+ n'est disponible.

1.2.5.3.2 Souris ROSA Gluc D816V

Plus récemment, Bibi et coll. ont décrit un nouveau modèle *in vivo* de mastocytose systémique avancée KIT D816V + en greffant des lignées de mastocytes humaines ROSA KIT D816V-Gluc dans des souris NOD-SCID-IL2Rg^{-/-}, en utilisant le principe de la Gaussia luciférase en tant que gène rapporteur.¹⁴²

L'injection intraveineuse des lignées ROSA *KIT* D816V-Gluc a conduit, en 4 semaines, à une prise de greffe chez toutes les souris injectées. Les cellules greffées ont été retrouvées à des concentrations élevées dans la moelle osseuse et à des concentrations plus faibles dans la rate, le foie et le sang périphérique (Figure 14). La progression de la maladie était facilement surveillée par la mesure répétée de l'activité de la Gaussia luciférase dans le sang périphérique. Bien que ce modèle soit particulièrement pertinent pour surveiller la progression de la maladie en temps réel *via* la mesure de l'activité Gaussia luciférase dans le sang des souris, il est plus représentatif de forme sévère exceptionnelle de leucémies à mastocyte humaine que de mastocytoses agressives. Il reste néanmoins un bon outil pour tester l'efficacité de différentes drogues *in vivo*.

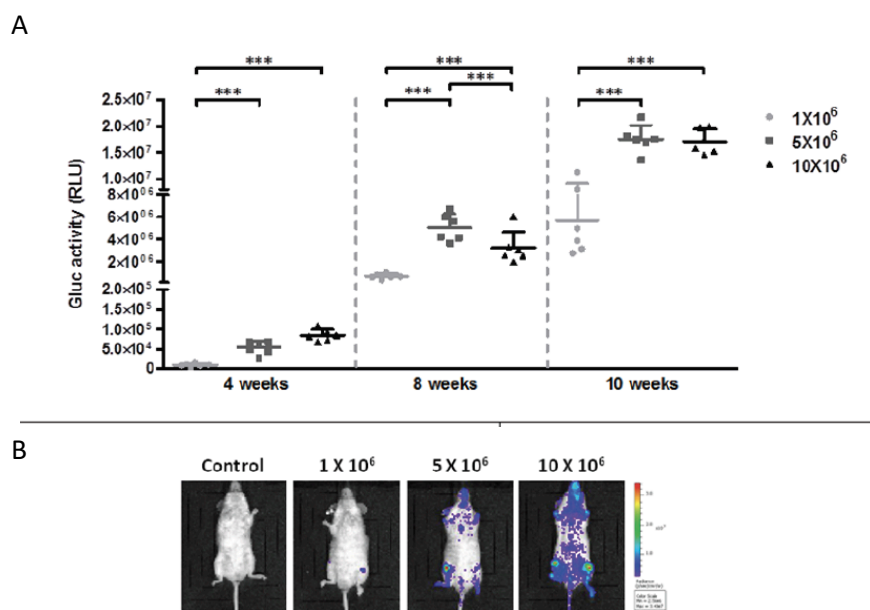


Figure 14. Surveillance de la greffe de cellules ROSA^{KIT} D816V-Gluc chez des souris par mesure de l'activité de la Gaussia luciférase (Gluc) dans le sang et par un système d'imagerie *in vivo* (IVIS). Adaptée de Bibi et coll.¹⁴² **A**, Mesure de l'activité Gluc dans le plasma de souris à 4, 8 et 10 semaines de la greffe. 1×10^6 (●), 5×10^6 (■) et 10×10^6 (▲) de ROSA *KIT* D816V-Gluc ont été injectées par voie intraveineuse à des souris. Chaque point représente une souris individuelle. **B**, IVIS montrant la localisation de Gluc chez des souris à 10 semaine de la greffe. Les ROSA *KIT* D816V-Gluc ont été injectées par voie intraveineuse chez des souris. Les unités dans les échelles de couleur arc-en-ciel sont exprimées en photons par seconde par cm² par stéradian (p/sec/cm²/sr). Les résultats présentés proviennent d'une souris représentative pour chaque groupe.

1.2.6 TRAITEMENT

La prise en charge thérapeutique de la mastocytose reste un défi pour le médecin. Pour les patients atteints de MC ou de MSI, l'objectif du traitement est de réduire les symptômes liés à l'activation des mastocytes et d'améliorer ainsi la qualité de vie. Néanmoins, le traitement doit être bien toléré et, si

possible, exempt d'effets secondaires à court et à long terme. Dans MS avancées, l'objectif principal du traitement est de prolonger la survie des patients.

La Table 4 résume les principaux essais thérapeutiques et les études rétrospectives réalisés dans les MS avancées.

Auteurs (Journal)	Traitement	Patients	Type d'étude	Effets secondaires non hématologiques (grade III/IV)	Réponse	Durée médiane de réponse	Survie globale
Lim (Am J Hematol.)	Interferon α	30	Rétrospective	Asthénie, Dépression	ORR: 50%	12 mois (avec ISM)	ND
Kluin-Nelemens (Blood)	Cladribine	6	Phase II	Infection, toxidermie	ORR: 100% CR: 0%	ND	ND
Barete (Blood)	Cladribine	32	Rétrospective	Infection	ORR: 50% CR: 0%	ASM: 30 mois SM-AHN: 57 mois	Médiane: ASM: 2,4 ans SM-AHN: 6,5 ans
Vega-Ruiz (Leukemia Research)	Imatinib	9	Phase II	Ascite, diarrhée, asthénie, douleurs, rash	ORR: 11% CR: 11%	ND	ND
Lim (Am J Hematol.)	Imatinib	19	Rétrospective	Diarrhée, œdème	ORR: 20% CR: 0%	19 mois (avec ISM)	ND
Pagano (Int J Hematol.)	Imatinib	17	Rétrospective	ND	ORR: 29% CR: 5%	ND	ND
Verstovsek (Clin Cancer Res)	Dasatinib	15	Phase II	Pleurésie, douleurs, nausée, asthénie	ORR: 13% CR: 13%	12 mois	Médiane: 13 mois
Gotlib (NEJM)	Midostaurine	116	Phase II	Nausée, diarrhée, asthénie	ORR: 60% CR: 0%	24.1 mois	Médiane: 33.9 mois
Ustun (JCO)	ASCT: MAC: 63% Geno-identique: 60%	57	Rétrospective	Mortalité sans rechute à 1an : 20%	ORR 70% CR: 28%	20 mois	Survie globale à 3 ans: 57%

Table 4. Résumé des principaux essais thérapeutiques et des études rétrospectives réalisés dans les MS avancées. Adapté de L.Polivka*, J.Rossignol* et coll. (revue située en Annexe 1).¹³⁷ ASCT: allogeneic stem cell transplantation, CR = complete response, ISM = indolent systemic mastocytosis, MAC = myeloablative conditioning, ND: non disponible, ORR = overall response rate.

Compte tenu des conséquences de l'activité constitutive du récepteur à activité tyrosine kinase KIT dans la physiopathologie de la mastocytose, plusieurs médicaments utilisés pour bloquer à la fois BCR-ABL et KIT dans les cas de leucémie myéloïde chronique ont également été évalués chez des patients atteints de MS. Les résultats des essais cliniques utilisant l'imatinib ou le dasatinib sont décevants étant donné que la protéine KIT D816V confère une résistance à ces drogues. L'indication est donc réservée aux rares cas de MS n'ayant pas de mutation dans l'exon 17 de *KIT*.^{143,144} L'efficacité de la Midostaurine (originellement appelée PKC412), inhibiteur de tyrosine kinase à plus large spectre, inhibant aussi la protéine KIT D816V, a été démontrée récemment, et induit une réponse globale de 60% dans les MS avancées.¹⁴⁵ La midostaurine, initialement décrit comme inhibiteur de la protéine kinase C, est un inhibiteur de TK à large spectre et est actif sur les formes WT et mutées de KIT, PDGFR, FLT3 et FES notamment (Table 5).¹⁴⁶ La midostaurine bloque aussi l'activation des mastocytes IgE-médiée. Elle bloque ainsi l'expansion et l'activation des mastocytes. Cependant les réponses complètes sont rares

dans les MS avancées et la durée de réponse est très variable, ceci pourrait être expliqué par le fait que les inhibiteurs de TK inhibent et induisent la mort des mastocytes matures mais pas de leurs progéniteurs. Dahlin et coll. ont en effet montré que la perturbation de la signalisation KIT n'affecte pas la fréquence des progéniteurs des mastocytes *in vivo* et que la signalisation SCF/KIT n'est pas indispensable pour la survie, la prolifération et la maturation des progéniteurs des mastocytes *in vitro*.²⁰ Leurs travaux montrent que le récepteur à l'IL3 pourrait être une bonne cible thérapeutique pour les progéniteurs mastocytaires. La SL-401, une protéine de fusion contenant un domaine de la toxine diphtérique et un domaine de l'IL-3, fait actuellement l'objet d'essais cliniques dans le traitement de la mastocytose systémique (NCT02268253).

Molecular target ^a	Major target cell populations and disorders
KIT wt	Mast cells, AML blasts, GIST cells
KIT D816V	Mast cells in SM, AML blasts, GIST cells
KIT V560G	Mast cells in SM, GIST cells
KIT K509I	Mast cells in CM
FES	Mast cells in KIT D816V+ SM (KIT D816V-downstream-signaling)
FLT3 wt	Myeloid (progenitor) cells
FLT3 ITD	AML blasts
FLT3 D835H	AML blasts
FLT3 D835Y	AML blasts
FLT3 N841I	AML blasts
PDGFRA wt	Fibroblasts, mesenchymal stem cells
FIP1L1-PDGFRA (F/P)	Eosinophils, CEL, MPN-eo
F/P mutant forms	Eosinophils, CEL, MPN-eo
PDGFRB wt	Fibroblasts, mesenchymal stem cells
PDGFRB mutant forms	Eosinophils, CEL, MPN-eo
JAK2	Myeloid cells, MPN cells
JAK3	Various immune cells
AAK1	Notch adaptor in neoplastic cells
SYK	IgE-R+ cells, IgE-R-downstream signaling
AURKA	Mitosis regulator in various neoplastic cells
AURKB	Mitosis regulator in various neoplastic cells
MARK3	Oncogenic molecule in hepatocellular cancer
PKN1	Wnt/ β -catenin repressor in cancer cells
FGFR3	B cells, multiple myeloma cells
FGFR3 TDII (K650E)	B cell lymphoma cells, multiple myeloma cells
TEL-FGFR3	T cell lymphoma cells, MPN, AML blasts

Table 5. Cibles cliniques de la midostaurine.¹⁴⁶ wt, wild-type; AML, acute myeloid leukemia; GIST, gastrointestinal stroma cell tumor; SM, systemic mastocytosis; CM, cutaneous mastocytosis; CEL, chronic eosinophilic leukemia; MPN, myeloproliferative neoplasm; IgE, immunoglobulin E; JAK, Janus kinase; AURK, Aurora kinase.

Malgré les nouvelles avancées thérapeutiques avec le développement de thérapie ciblée dans les mastocytoses KIT D816V+ avec la midostaurine, la prise en charge des MS avancées reste un vrai défi car l'espérance de vie des patients atteints reste diminuée par la maladie. D'autres inhibiteurs de tyrosine kinase sont actuellement en cours de développement (essai de Phase I ou II, cf Annexe 1 revue L.Polivka et coll.). L'objectif dans l'avenir est de combiner ces inhibiteurs de tyrosine kinase avec d'autres thérapies ciblant d'autres voies de signalisation qui sera possible seulement après une meilleure compréhension de la physiopathologie des mastocytoses et des autres voies impliquées, en plus de la voie de signalisation KIT.

La majeure partie de mon travail de thèse était d'identifier de nouvelles voies physiopathologiques impliquées dans la mastocytose, afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et d'améliorer la prise en charge des patients. A travers l'identification de mutation dans le gène *GLI3*, principal répresseur de la voie de signalisation Hedgehog, chez 3 patients issus de deux familles indépendantes qui présentait l'association d'un syndrome polymalformatif de Greig (associé à des mutations perte de fonction dans le gène *GLI3*) et une mastocytose congénitale, nous avons étudié le rôle de la voie Hedgehog dans la physiologie du mastocyte et dans la physiopathologie des mastocytoses, et des formes sporadiques notamment.

1.3 VOIE DE SIGNALISATION HEDGEHOG

La voie de signalisation Hedgehog (Hh) est une voie clé impliquée 1- dans le développement embryonnaire en assurant le maintien de la polarité des tissus et 2- dans le maintien de l'homéostasie des cellules souches en contribuant à leur régulation et leur renouvellement. Des altérations de cette voie vont conduire à des anomalies du développement et une activation aberrante de cette voie est retrouvée dans de nombreux cancers.

Le gène *Hedgehog* a été identifié pour la première fois chez la Drosophile en 1980 par Nüsslein-Volhard et coll. nommé ainsi de par la ressemblance entre les embryons mutés aux denticules pointues d'un hérisson.¹⁴⁷

1.3.1 LA VOIE HEDGEHOG CANONIQUE

L'activation canonique de la voie Hh est initiée par la liaison de ligands Hh au récepteur transmembranaire PATCHED (PTCH1), qui réside dans le cil primaire, une structure non mobile qui fonctionne comme un capteur et un centre de coordination pour la signalisation Hh.^{148,149} Les principaux ligands de la voie Hh chez l'homme sont Sonic Hedgehog (SHH), Indian Hedgehog (IHH) et Desert Hedgehog (DHH). Alors que l'expression de DHH est restreinte aux gonades (cellules de Sertoli dans les testicules chez l'homme et cellules de la granulosa des ovaires chez la femme) et celle d'IHH à l'endoderme primitif, aux cellules stromales médullaires, à l'intestin et aux chondrocytes, l'expression de SHH est beaucoup plus ubiquitaire. En effet, celui-ci intervient dans le développement de la majorité des tissus épithéliaux et dans le maintien des cellules souches de différents organes notamment la peau et le cerveau.¹⁵⁰⁻¹⁵² Les ligands Hh sont des molécules sécrétées, fonctionnant à la fois sur des cellules proches et à distance dans des tissus en développement.¹⁵³

Deux homologues de Patched sont décrits : PTCH1 et PTCH2, PTCH1 étant le mieux caractérisé.¹⁵⁴ PTCH1 est une protéine à 12 domaines transmembranaires, avec deux grands segments extracellulaires requis pour la liaison du ligand Hh.^{155,156} La liaison du ligand Hh avec PTCH1 permet de lever l'inhibition qu'exerce PTCH1 sur le récepteur couplé aux protéines G, à 7 domaines transmembranaire, SMOOTHENED (SMO). SMO va se déplacer dans la pointe du cil entraînant ainsi une cascade de signalisation intracellulaire en libérant les formes activatrices des facteurs de transcription GLI1, GLI2 et GLI3 de SUFU (suppresseur de Fused). GLI1 et GLI2 agissent tous deux comme principaux médiateurs de la signalisation de Hh dans le cancer en contrôlant l'expression des gènes cibles.¹⁵⁴ Les GLI transloquent dans le noyau et induisent la transcription des gènes cibles de la voie Hh, comprenant notamment GLI1.

En l'absence de ligand Hh, PTCH1 séquestre SMO dans des vésicules intracellulaires empêchant ainsi sa translocation au niveau du cil primaire. Les GLI sont séquestrés par SUFU, et vont être phosphorylés par

les protéines kinases CK1, GSK-3 β et PKA créant ainsi des sites de liaison pour l'ubiquitine ligase E3 β -TrCP. GLI1 phosphorylé va être dégradé par le protéasome. GLI3, et à moindre niveau GLI2, ne va être que partiellement dégradé par le protéasome conduisant à la formation des formes répressives GLI2R et GLI3R qui vont transloquer dans le noyau et agir comme facteur de transcription répresseur, inhibant la transcription des principaux gènes cibles de la voie Hh. GLI1 ne subit aucun clivage et agit uniquement comme activateur de la voie Hh (Figure 15).¹⁵⁷ En présence de ligand Hh, les formes longues (full length – FL) de GLI2 et GLI3 ne sont pas clivées et agissent comme facteurs de transcription activateurs (GLI2-FL et GLI3-FL) de la voie Hh.

La localisation intracellulaire de GLI1 est étroitement contrôlée. La localisation nucléaire de GLI1 est observée lors de la stimulation de Hh et est en corrélation avec une activité transcriptionnelle élevée, alors qu'en l'absence d'activation de la voie Hh, GLI1 est retenue dans le cytoplasme et dégradée par le protéasome.

GLI3 agit principalement comme un répresseur sous sa forme clivée C-terminale.¹⁵⁸ Néanmoins, dans sa forme longue non clivée, GLI3 peut induire la transcription de GLI1 lors de la stimulation par SHH en interagissant avec l'activateur transcriptionnel CBP.¹⁵⁹ Le traitement de GLI3 est similaire à celui de GLI2 : en l'absence de ligands Hh, GLI3 et GLI2 sont séquentiellement phosphorylés par PKA dans leur domaine C-terminal. Ces modifications entraînent des phosphorylations successives par CK1 et GSK3 β , permettant le recrutement de l'ubiquitine ligase β -TrCP, induisant ainsi le clivage de GLI2 et GLI3.^{160–162} La répression transcriptionnelle dépendante de GLI3 implique le co-represseur Ski, qui interagit avec GLI3 et recrute les répresseurs mSin3A, N-CoR / SMRT conduisant au silençage génique.¹⁶³ Le rapport GLI3R/GLI3L contrôle plusieurs processus au cours de l'organogenèse, tels que le nombre de doigts.¹⁶⁴ Bien que le processing de GLI2 soit très variable et dépend du tissu impliqué, celui de GLI3 est complet dans la plupart des tissus et sert donc quasiment exclusivement de répresseur puissant des gènes cibles de la voie Hh. L'absence de GLI3R est suffisante pour activer la voie indépendamment des ligands Hh ou SMO.^{164–166} Du fait que les formes activatrices et les formes répressives des GLI partagent les mêmes motifs de liaison à l'ADN, les protéines se font concurrence pour accéder aux sites de liaison de GLI au niveau des gènes cibles; ainsi, le rendement global de la voie Hh est dicté par un équilibre entre l'activité transcriptionnelle des formes activatrice et répressive des protéines GLI.¹⁶⁷

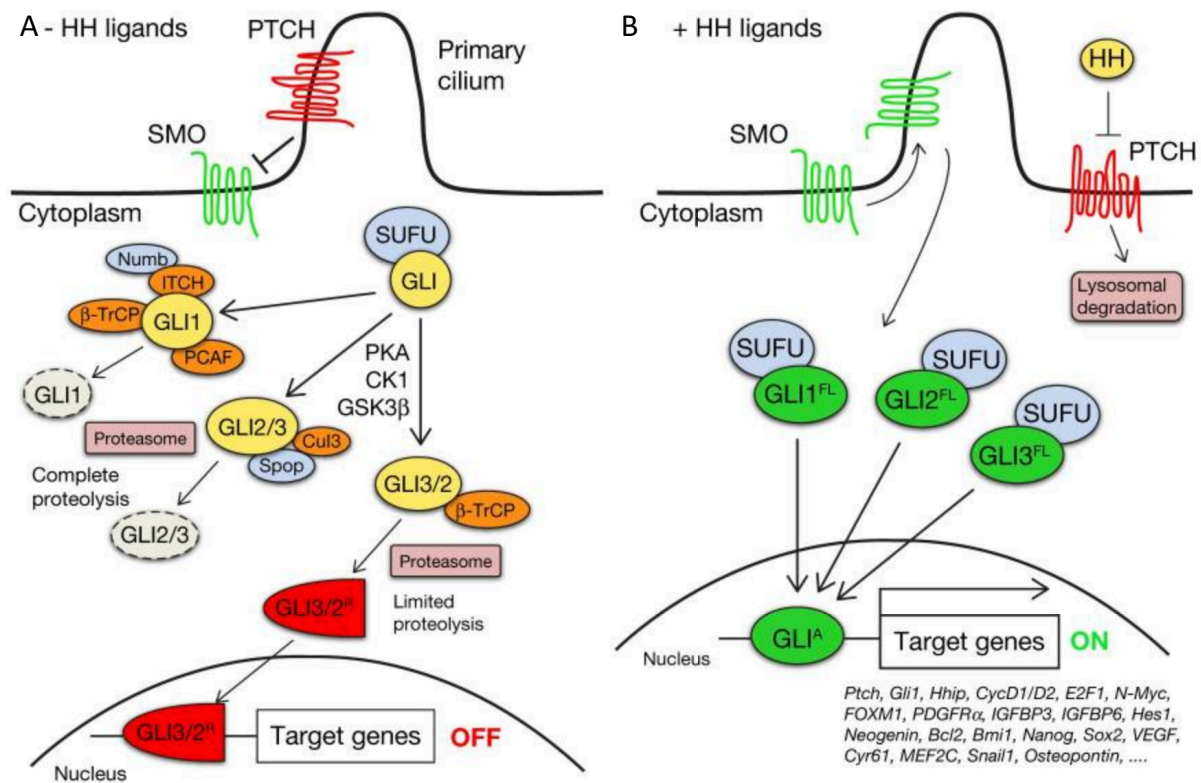


Figure 15. Les principaux constituants de la voie de signalisation Hedgehog.¹⁵⁷ **A**, En l'absence de ligands Hh, PTCH1 inhibe le SMO en empêchant son recrutement dans le cil primaire. Les protéines GLI sont phosphorylées par PKA, GSK3β et CK1, qui créent des sites de liaison pour l'ubiquitine kinase E3 β-TrCP. GLI1, et dans une moindre mesure GLI2, subissent une dégradation partielle du protéasome, conduisant à la formation de formes répressives (GLI3/2R, rouge), qui transloquent dans le noyau où elles inhibent la transcription des gènes cibles Hh. Ce processus peut être médié par Spop and Cullin 3-based E3 ligase pour GLI2 et GLI3, tandis que GLI1 peut être dégradé par le β-TrCP, par Numb-activated Itch E3 ubiquitin ligase et par PCAF. **B**, Lors de la liaison du ligand HH, PTCH est déplacé du cil primaire, permettant l'accumulation et l'activation de SMO. SMO active une cascade de signalisation qui conduit finalement à la translocation de formes activées de GLI « full length » (FL) (vert) dans le noyau, où elles induisent la transcription des gènes cibles Hh.

CK1, casein kinase 1; GSK3β, glycogen synthase kinase 3β; HH, Hedgehog; PCAF, p300/CREB-binding protein (CBP)-associated factor; PKA, protein kinase A; PTCH, Patched; SMO, Smoothened; Spop, speckle-type POZ protein; SUFU, Suppressor of Fused; β-TrCP, β-transducin repeat-containing protein

1.3.2 PRINCIPAUX GENES CIBLES DE LA VOIE HEDGEHOG

Les gènes cibles Hh incluent *GLI1*, qui induit une boucle d'amplification de la signalisation Hh au niveau transcriptionnel et, par conséquent, *GLI1* représente une lecture fiable et robuste d'une voie Hh active.¹⁶⁸ Les autres gènes cibles Hh sont, les deux inhibiteurs de la voie canonique Hh, *PTCH1* et *Hh interacting protein (HHIP1)*, qui induisent ainsi un rétrocontrôle négatif en limitant l'étendue de la signalisation Hh.¹⁶⁹ Bien qu'ils puissent varier en fonction du type cellulaire, les principaux gènes cibles de la voie Hedgehog sont impliqués dans i- la prolifération et la différenciation cellulaire (Cyclin D1 and D2, E2F1, N-Myc, FOXM1, PDGFRα, IGFBP3 and IGFBP6, Hes1, Neogenin) ; ii- la survie cellulaire (Bcl2) ; iii- l'autorenouvellement (Bmi1, Nanog, Sox2) ; iv- l'angiogenèse (VEGF, CYR61) et 5- la transition épithélio-mésenchymateuse (Snail1, Sip1, Elk1 and Msx2, Figure 16).¹⁷⁰ De nombreux autres gènes cibles ont été décrits dans les 10 dernières années.

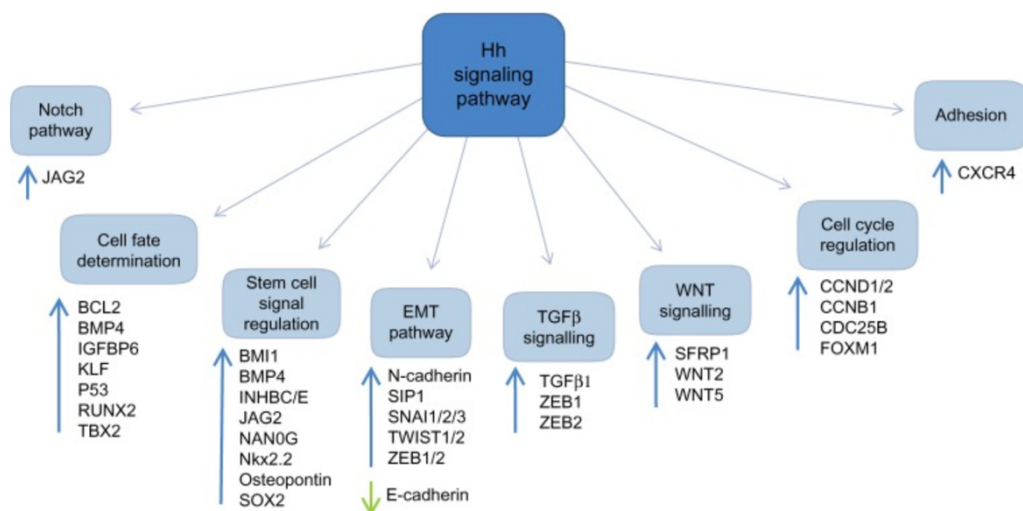


Figure 16. Principaux gènes cibles de la voie Hedgehog.¹⁷¹ EMT : Epithelial-Mesenchymal transition

1.3.3 LES VOIES HEDGEHOG NON CANONIQUES

1.3.3.1 La voie Hedgehog non-canonique de type I induite par PTCH1

En l'absence de ligand Hh, PTCH1 interagit avec la cycline B1, impliquée dans la transition des phases G2-M, et la séquestre dans le cytoplasme à l'extérieur du noyau.¹⁷²

Par ailleurs, PTCH1 est capable d'induire l'apoptose via la Caspase-9 en interagissant avec le complexe pro-apoptotique qui comprend la caspase-9, la protéine TUCAN-1 contenant le domaine CARD (domaine de recrutement associé à la caspase) et la protéine adaptatrice DRAL. PTCH1 contient un motif C-terminal qui est clivé par les caspases au niveau d'un acide aspartique conservé (Asp¹³⁹²) en l'absence de SHH, pour exposer son domaine proapoptotique.^{173,174}

PTCH1 agit ainsi comme un « récepteur à dépendance » défini par le fait que la survie de la cellule dépend de la fixation du ligand à son récepteur, ici un ligand Hh sur PTCH1. En l'absence du ligand Hh, PTCH1 empêche la progression du cycle cellulaire et induit l'apoptose (Figure 17). La surexpression de PTCH1 induit l'apoptose dans divers tests *ex vivo* et *in vitro*.¹⁷⁴

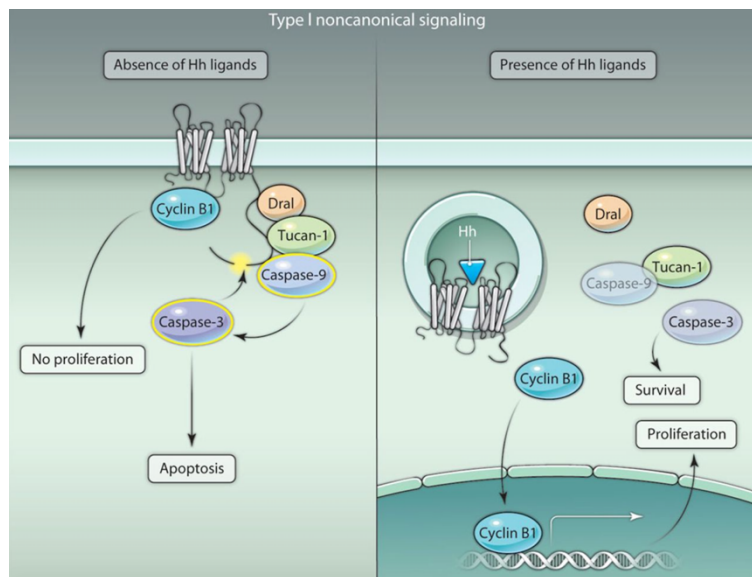


Figure 17. Voie Hedgehog non canonique de type I.¹⁷⁵ Les formes de caspases surlignées et ombrées en jaune indiquent respectivement les caspases actives et inactives.

1.3.3.2 La voie Hedgehog non canonique de type II induite par SMO

Un grand nombre d'études ont impliqué une voie de signalisation Hh non canonique dans la régulation du cytosquelette d'actine par l'activation de la famille des petites GTPases Rho, telles que RhoA et Rac1, directement médiée par SMO en présence de ligand Hh (Figure 18). Cette régulation se produit, à travers les protéines Gi et PI3K dans les fibroblastes, et à travers Tiam1 ou à travers des membres de la famille des Src kinases (SFK), Src et FYN, dans les neurones. De plus, SMO stimule la libération de calcium du réticulum endoplasmique (ER) dans les neurones rachidiens grâce à la génération d'inositol triphosphate IP₃ au niveau du cil primaire neuronal. La rapidité de ces réponses, l'absence de détection d'activité transcriptionnelle dépendante des GLI et l'incapacité de GLI3R à empêcher ces réponses suggèrent qu'il s'agit d'une voie de signalisation Hh indépendante de GLI.¹⁷⁵

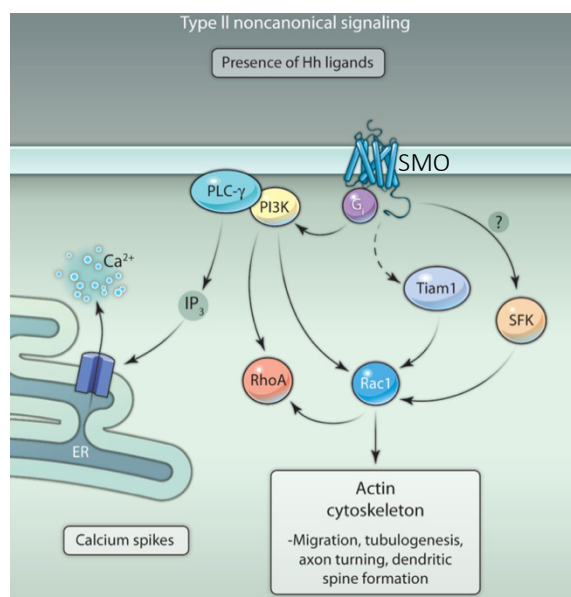


Figure 18. Voie Hedgehog non canonique de type II.¹⁷⁵

1.3.3.3 Les voies Hedgehog non canoniques activent les GLI indépendamment de PTCH1 et de SMO.

De multiples voies oncogéniques ainsi que des régulateurs de l'épigénétique peuvent induire les GLI de façon indépendante de PTCH1 et de SMO. La voie Hh interagit ainsi avec de nombreuses autres voies oncogéniques telles que la voie Wnt/ β -catenin, la voie du TGF- β et la voie des RAS-MAP kinases (Figure 19).^{176,177}

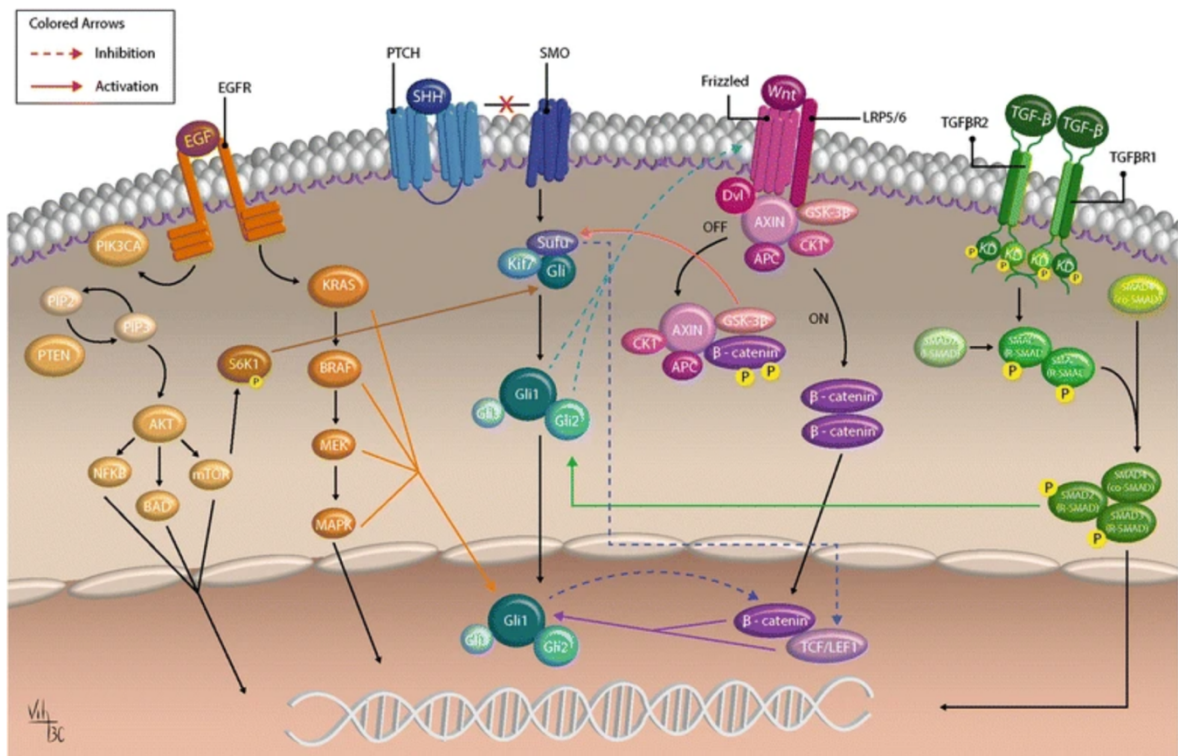


Figure 19. Interaction entre la voie Hedgehog et d'autres voies oncogéniques.¹⁷⁶

Voici quelques exemples d'interaction :

- β -caténine peut activer la transcription de *GLI1* via *TCF/LEF1* ;¹⁷⁸
- La voie des Ras-MAPK (*KRAS*) via *RAF/MEK/MAPK* stabilise et augmente l'activité de *GLI1* et *GLI2* ;¹⁷⁹
- *AKT* régule positivement la signalisation Hh en contrôlant l'inactivation de *GLI* médiée par *PKA*.¹⁸⁰ *AKT* régulerait l'accessibilité de *PKA* sur *GLI2*, mais les mécanismes exactes sont encore mal connus ;
- *TGF- β* induit l'expression de *GLI1* et *GLI2* via *SMAD3* ;
- La voie *mTOR* activée par le *TNF* induit l'activation des *GLI* de manière indépendante de *SMO* à travers la phosphorylation de *GLI1* ;
- Les complexes de remodelage de la chromatine, tel que le complexe *SWI-SNF* régulent directement l'expression de *GLI1*.

1.3.4 MODELES D'ACTIVATION HEDGEHOG ET CANCER

Le rôle de la voie Hh dans le cancer a été initialement fourni par des études sur le syndrome de Gorlin, maladie autosomique dominante caractérisée par des anomalies cranio-faciales et squelettiques et un risque accru de carcinome basocellulaire avancé (CBC) et de médulloblastome. La découverte de mutations dans le gène *PTCH1* associées au syndrome de Gorlin a suggéré qu'une activité dérégulée de la voie Hh était responsable du développement de ces cancers.^{181,182} Ces résultats ont été renforcés par l'identification de mutations somatiques dans les gènes *PTCH1*, *SMO* et dans une moindre mesure *SUFU* dans environ 90% et 15 à 30% des CBC et médulloblastomes respectivement.^{183,184}

L'activité aberrante de la voie Hh est également retrouvée dans de nombreux autres cancers humains. Bien que des mutations activatrices dans les composants de la voie Hh soient rares, d'autres mécanismes conduisant à une activation aberrante de la voie ont été décrits¹⁸⁵ :

- Une activation dite « ligand-dépendante » : une action autocrine et juxtacrine, dans laquelle les cellules tumorales sécrètent et répondent aux ligands Hh, a été retrouvée dans de nombreux cancers, notamment les cancers du poumon à petites cellules, du pancréas, colorectal et de la prostate ainsi que dans le mélanome et le glioblastome.¹⁸⁶⁻¹⁹¹ Une action paracrine dans laquelle les cellules sécrétant des ligands Hh sont distinctes de celles répondant à l'activation de la voie a également été décrite dans le lymphome et le myélome multiple : les ligands Hh sont produits par les cellules stromales du microenvironnement local tumoral et induisent une activité de voie Hh dans les cellules tumorales ;^{185,192}
- Une activation des voies non canoniques Hh tels que décrit dans le paragraphe 1.3.3.3.

1.3.5 VOIE HEDGEHOG ET HEMOPATHIES

1.3.5.1 Voie Hedgehog et hématopoïèse

Récemment, Singh et coll. ont montré que les cellules du sang, les cellules mononucléées ont un cil primaire qui participe à la voie de signalisation Hh.¹⁹³ Chez les vertébrés, l'hématopoïèse est largement divisée en deux phases principales, primitive (embryonnaire) et définitive. La voie de signalisation Hh a un rôle complexe dans l'hématopoïèse embryonnaire et adulte. Ce rôle semble dépendre du stade de développement et de la lignée cellulaire. Bien que la voie Hh semble importante pour l'hématopoïèse primitive,¹⁹⁴ il subsiste une controverse sur son rôle dans l'hématopoïèse normale dans les organismes adultes.^{171,195,196} La perte de signalisation canonique Hh par suppression conditionnelle de *SMO* dans le compartiment hématopoïétique adulte murin n'aurait aucun effet apparent sur l'hématopoïèse adulte, y compris sur la numération formule sanguine périphérique, le nombre ou l'état du cycle cellulaire des cellules souches ou progénitrices ou le potentiel de formation de colonies hématopoïétiques.^{197,198} McIntyre et coll. ont montré que l'inactivation de la voie Hh, *via* l'expression de *GLI3R* serait suffisante

et nécessaire pour induire la transition de l'hématopoïèse primitive à adulte dans des cellules souches pluripotentes humaines.¹⁹⁹

1.3.5.2 La voie Hedgehog dans les hémopathies myéloïdes

Dans les tumeurs malignes myéloïdes, la signalisation Hh s'est révélée être importante dans le maintien et l'expansion des cellules souches leucémiques (CSL), notamment en jouant un rôle dans la survie et la prolifération.^{200,201}

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une maladie myéloproliférative clonale liée à la présence du chromosome de Philadelphie qui correspond au remaniement des chromosomes 9 et 22 créant ainsi un gène de fusion *BCR-ABL* conduisant à une activité dérégulée et accrue de la tyrosine kinase ABL. Bien que les inhibiteurs de tyrosine kinase (iTK) aient révolutionné la prise en charge de la LMC, il peut exister une résistance aux iTK dans les CSL à l'origine de la persistance et de l'expansion des CSL. Une hyperactivation de la voie Hh semble étroitement impliquée dans ce mécanisme de résistance.^{200,202–204}

La greffe de cellules KLSF ($\text{Lin}^- \text{Sca-1}^- \text{c-Kit}^+ \text{CD34}^- \text{Fc}\gamma\text{R III/II}^+$) provenant de souris déficientes en SMO ($\text{Smo}^{-/-}$, souris *Vav-Cre;Smo^{loxP/loxP}*, *vav* étant exprimé dans la majorité des cellules hématopoïétiques), infectées avec BCR-ABL, dans des souris receveuses était associée à une augmentation de la latence et à une diminution de l'incidence des LAM par rapport aux souris greffées avec des KLSF $\text{Smo}^{+/+}$ (issus de souris *Smo^{loxP/loxP}*), y compris lors de transplantations à des receveurs secondaires.^{200,203} Dans ce sens, Irvine et coll. ont montré que la combinaison d'un inhibiteur de Hedgehog (LDE-225 ou Sonidegib) avec le nilotinib, était une stratégie thérapeutique potentiellement efficace pour améliorer les réponses dans la LMC en phase chronique en ciblant à la fois les cellules souches et progénitrices.²⁰⁵

De plus en plus d'arguments montrent que la voie Hh est dérégulée dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM).²⁰⁶ Les lignées cellulaires leucémiques et les cellules primaires de LAM expriment les composants de la voie Hh, SHH et GLI1.²⁰⁷ Le gène *FLT3* (FMS like tyrosine kinase 3) est fréquemment altéré dans la LAM et est associé à un pronostic défavorable.²⁰⁸ Les mutations de *FLT3* sont principalement des répétitions en tandem de séquences codantes de la portion intracellulaire du récepteur, majoritairement du domaine juxta-membranaire, appelées ITD pour internal tandem duplications. Ces mutations FLT3-ITD conduisent à une activation constitutive du récepteur et des voies de signalisation en aval, avec pour conséquence une augmentation de la prolifération cellulaire et une inhibition de l'apoptose. Lim et coll. ont montré que les LAM FLT3-ITD surexpriment le gène *GLI2* ainsi que son gène cible *Bcl2*, par rapport aux LAM sans mutation dans *FLT3* et aux cellules hématopoïétiques immatures normales. Ils ont généré un modèle murin permettant l'expression conditionnelle de FLT3-ITD et *SmoM2*, un mutant SMO constitutivement actif, dans le système hématopoïétique et ils observent que, alors que GLI1 et GLI2 ne sont pas exprimés chez les souris contrôles, GLI2 est exprimé chez les souris *SmoM2*, chez les souris FLT3-ITD et chez les souris FLT3-ITD / *SmoM2*. Alors que les souris FLT3-ITD développent une maladie myéloproliférative chronique, les souris FLT3-ITD / *SmoM2* ont une survie

réduite et développent une LAM avec accumulation de cellules myéloïdes immatures, infiltration d'organes extra-hématopoïétiques et cytopénie. L'activation aberrante de Hh permettrait le développement des LAM notamment *via* l'augmentation de l'activité de STAT5. La stimulation par le SHH, l'un des trois ligands Hh, induit l'expression de GLI1 dans les cellules FLT3-ITD mais pas dans les cellules de moelle osseuse normales, suggérant que l'expression de GLI2 dans les cellules FLT3-ITD permet à ces cellules de répondre aux ligands Hh. De plus, l'inhibition combinée des voies FLT3 et Hh limite la croissance leucémique *in vitro* et *in vivo*.^{209,210} Récemment, Chaudhry et coll. ont confirmé que la signalisation Hh est bien active dans les LAM, mais que celle-ci est largement indépendante de SMO. Ils ont également montré que GLI3 se comporte comme un suppresseur de tumeur dans les LAM en jouant un rôle de régulateur négatif clé de l'expression des gènes cibles Hh, en particulier d'AKT. Ainsi, en prédisant l'efficacité des inhibiteurs de SMO, GLI3R pourrait représenter un biomarqueur pour la sélection et/ou la réponse des patients dans les essais cliniques utilisant les inhibiteurs de SMO.²¹¹

Le rôle de la voie Hh dans les syndromes myélodysplasiques (SMD) n'est pas encore clairement élucidé. Toutefois, Lau et coll. ont montré *via* l'utilisation d'un modèle murin de SMD que l'activation constitutive Hh/GLI1 accélérerait la transformation leucémique et diminuait la survie globale des souris. Ils suggèrent ainsi que l'activation de GLI1 est fréquente dans le SMD pendant la progression de la maladie et l'inhibition de GLI1 semble être une cible thérapeutique attrayante pour une sous-population de patients.²¹²

A noter que plus récemment ont été décrits les GLI-similar protéines ou GLIS, un groupe de facteurs de transcription en doigt de zinc de type Krüppel, étroitement lié à la famille des protéines GLI. GLIS2, initialement impliqué dans des pathologies rénales, a récemment été impliqué dans la leucémogénèse par son potentiel à repeupler les CSH. Un transcrite de fusion CBFA2T3-GLIS2, entraînant une activité ectopique de GLIS2, est rapporté dans des leucémies aiguës myéloïdes pédiatriques.²¹³

1.3.5.3 Voie Hedgehog et hémopathies lymphoïdes

Il est à présent bien établi qu'une activation aberrante de la voie Hh est aussi retrouvée dans les hémopathies lymphoïdes tels que le myélome multiple ou les leucémies lymphoïdes chroniques.^{214,215} Par exemple, dans la leucémie lymphoïde chronique les composantes de la voie Hh (GLI1, GLI2 et SUFU) et leurs gènes cibles à activité oncogénique comme Bcl2 ou Bcl-xL ont une expression augmentée et sont corrélés à l'évolution défavorable de la maladie.²¹⁵

1.3.5.4 Modifications épigénétiques de la voie Hedgehog et hémopathies

Les composants de la voie Hh subissent également une régulation épigénétique. Les travaux se sont principalement concentrés sur le tissu neural et le médulloblastome, trouvant que les facteurs de transcription, GLI1 et GLI2, mais pas GLI3, peuvent être acétylés, et ainsi inhiber leur activité transcriptionnelle. GLI1 est acétylé sur une seule tyrosine (K518) qui est conservée dans GLI2 mais pas

dans GLI3.²¹⁶ Dans les LAM, l'expression de GLI3R est augmentée lors de traitements hypométhylants, permettant ainsi de lever la résistance aux inhibiteurs de SMO dans cette pathologie.²¹¹

1.3.5.5 Voie Hedgehog et mastocytose

A notre connaissance, la voie Hh n'a pas été étudiée dans la physiologie du mastocyte et plus précisément dans la physiopathologie de la mastocytose.

1.3.6 INHIBITEURS DE LA VOIE HEDGEHOG ET CANCER, EXEMPLE DES HEMOPATHIES

A l'heure actuelle, les seuls inhibiteurs de la voie Hedgehog disponibles en clinique sont les antagonistes de SMO c'est-à-dire des inhibiteurs de la voie canonique Hh. Plusieurs antagonistes de SMO ont été identifiés grâce à des criblages de petites molécules, et 2 de ces agents, le vismodegib (GDC-0449, Erivedge®) et le sonidegib (LDE-225, Odomzo®), sont actuellement approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) pour le traitement des carcinomes basocellulaires avancés avec une efficacité spectaculaire.^{217,218} Le glasdegib (PF-04449913, Daurismo®) a obtenu très récemment l'approbation de la FDA en novembre 2018 dans le traitement des LAM chez les patients de 75ans ou plus ou présentant des comorbidités (empêchant la réalisation d'une chimiothérapie d'induction intensive, Table 5).²¹⁹ Ces inhibiteurs de SMO sont actuellement à l'étude dans diverses tumeurs malignes hématologiques.

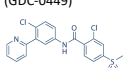
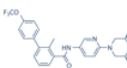
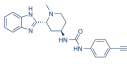
	Indication	Posologie	Efficacité	Effets secondaires	Références
Vismodegib, Erivedge® (GDC-0449) 	CBB localement avancé ou métastatique	150mg/jour soit 1 cpr/jour per os	Taux de réponse globale = 60%	Spasme musculaire, alopecie, dysgueusie, amaigrissement, anorexie, asthenie, nausees, diarrhees, arthralgies, constipation, cephalées, anémie (par ordre de fréquence)	Von Hoff et coll. (NEJM) Basset-Deguin et coll. (European Journal of Cancer)
Sonidegib, Odomzo® (LDE-225) 	CBB localement avancé ou métastatique	200mg/jour soit 1 cpr/jour per os	Taux de réponse globale = 36%	Spasme musculaire, élévation des CPK, alopecie, dysgueusie, amaigrissement, anorexie, asthenie, nausees, diarrhees, arthralgies, constipation, cephalées, anémie	Midgen et coll. (Lancet)
Glasdegib, Daurismo® (PF-04449913) 	LAM chez les patients de 75ans ou plus ou présentant des comorbidités	100mg/jour soit 1 cpr/jour per os en association avec de faibles doses de cytarabine (FDC)	Survie globale médiane = 8,8 [6,9-9,9] mois avec le glasdegib + FDC et de 4,9 [3,5-6,0] mois avec FDC (HR = 0,51; 80% IC, 0,39-0,67, p= 0,0004). 15 (17,0%) et 1 (2,3%) patients dans les bras glasdegib/FDC et FDC, respectivement, ont obtenu une rémission complète (p<0,05).	anémie, fatigue, hémorragie, neutropénie fébrile, douleurs musculo-squelettiques, nausées, œdème, thrombocytopenie, dyspnée, diminution de l'appétit, dysgueusie, mucite, constipation et éruption cutanée	Cortes et coll. (Leukemia)

Table 5. Inhibiteurs de la voie Hedgehog approuvés par la FDA.

Un inhibiteur direct de GLI1 et GLI2, le GANT61 est largement utilisé dans les études *in vitro*, mais ne peut faire l'objet d'études *in vivo* en raison d'une toxicité probablement majeure.

1.3.7 LE SYNDROME DE CEPHALOPOLYSYNDACTYLIE DE GREIG (GCPS)

1.3.7.1 Chez l'homme

Des mutations germinales dans le gène *GLI3* conduisent à plusieurs phénotypes cliniques, notamment le syndrome de céphalopolysyndactylie de Greig (GCPS; MIM#175700) et le syndrome de Pallister-Hall (PHS; MIM#146510).^{220,221} D'autres phénotypes liés à des mutations dans le gène *GLI3* ont été rapportés notamment la polydactylie post-axiale de type A1 et la polydactylie pre-axiale de type IV. Le PHS décrit pour la première fois en 1980 par Hall comme une condition mortelle en période néonatale associée principalement un hamartome hypothalamique, une polydactylie post-axiale, une épiglote bifide et un anus imperforé.²²² En réalité, les PHS forment un spectre allant des cas très légers avec une polydactylie d'insertion subtile aux cas graves mortels.²²³ Le GCPS typique est caractérisé par une polysyndactylie des mains et/ou des pieds, des anomalies cranio-faciales, telles qu'une macrocéphalie et un hypertélorisme, et un retard de développement chez les individus avec de grandes délétions de *GLI3*.²²⁴ Les mutations tronquantes dans le tiers moyen du gène provoquent généralement un PHS, résultant en une protéine répressive constitutive (GLI3R). En revanche, l'haploinsuffisance résultante de réarrangements chromosomiques, mais aussi de mutations faux-sens, d'épissage ou tronquantes ailleurs dans le gène provoquent un GCPS par perte de la capacité de liaison à l'ADN ou par désintégration de l'ARNm induite par des non-sens, ou par la formation d'une protéine instable ou mal localisée.^{225–228} La Figure 20 reporte les principales mutations retrouvées dans le gène *GLI3* à partir d'une cohorte de 76 individus issus de 55 familles présentant des mutations dans le gène *GLI3*.²²⁹

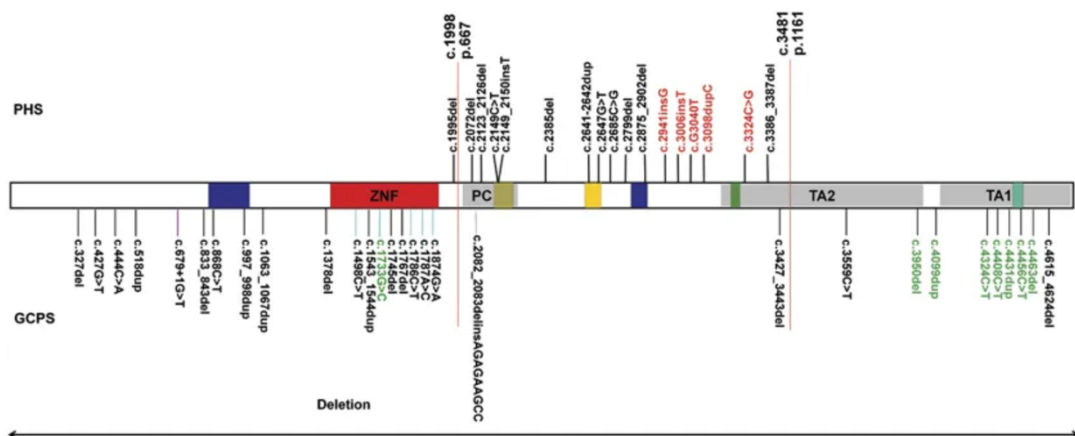


Figure 20. Représentation schématique des mutations dans le gène *GLI3* rapportées dans l'étude de Démurger et coll.²²⁹ Les barres rouges verticales aux nucléotides 1998 et 3481 divisent le gène en trois segments, limitant la région PHS comme décrit ci-dessus. Les cases colorées dans *GLI3* représentent les sept régions de similitude entre les protéines GLI humaines définies à l'origine par Ruppert et coll.²³⁰ ZNF: zinc-finger domain (aa 462–645), PC: site de clivage protéolytique, TA1 (aa 1376–1580) et TA2 (aa 1044–1322): deux domaines de transactivation indépendants tels que décrits par Kalff-Suske et coll.²²⁵

Le gène *GLI3* (GLI-Kruppel Family member 3) est localisé sur le chromosome 7p14.1, il contient 15 exons couvrant 250kDa. Il existe 9 transcrits de *GLI3* mais un seul est codant pour une protéine de 1580 acides aminés (ENST00000395925.8). Le facteur de transcription GLI3 contient plusieurs motifs à doigts de zinc (zinc finger) et peut être divisé en 3 parties: le domaine « Zinc-finger » ou ZNF contenant 5 motifs à doigts de zinc en tandem hautement conservés (2 cystéine et 2 histidine, C2H2) avec une affinité pour des séquences d'ADN spécifique, le domaine cyclique de liaison aux protéines (CBPD) et les domaines de transactivation 1 et 2 (TA1 et 2).²²¹ Comme décrit dans le paragraphe 1.3.1, GLI3 est un acteur clé de la voie Hh. Il existe deux isoformes de GLI3 : GLI3A ou L (forme longue activatrice de 190kDa) qui joue un rôle d'activateur de la voie Hh et GLI3R (forme tronquée de sa partie 5', répressive de 80kDa, ne contenant plus les parties activatrices) qui agit comme le principal répresseur de cette voie. GLI3 joue un rôle majeur dans le développement embryonnaire : GLI3R est présent à des niveaux élevés dans le bourgeon des membres antérieurs en développement et à des niveaux bas dans les membres postérieurs des souris. Le gradient intracellulaire de Gli3R, qui s'oppose au gradient extracellulaire de SHH, contrôle la configuration antéro-postérieure des membres chez la souris. Il a été proposé que le gradient d'un rapport GLI3R/GLI3A détermine notamment le nombre de doigts.¹⁶⁰

La suite de l'exposé traitera uniquement du syndrome de Greig. La Figure 20 montre les principales anomalies cliniques retrouvées dans le syndrome de Greig. La pénétrance est complète mais l'expression de la maladie peut varier d'une simple polydactylie non syndromique au tableau polymalformatif complet. L'incidence de la maladie est rare mais difficile à évaluer du fait de ce continuum phénotypique, il peut être beaucoup plus répandu qu'il n'y paraît. Les auteurs estiment que l'incidence se situe entre 1 et 9/1 000 000.

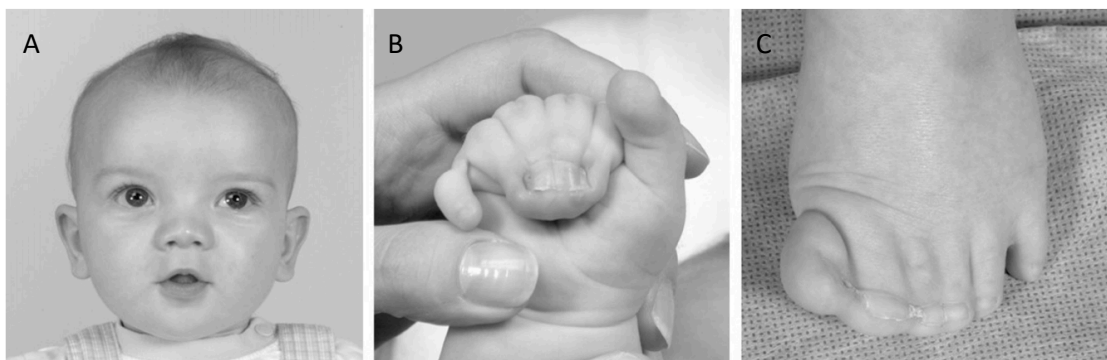


Figure 20. Un patient atteint du syndrome de céphalopolysyndactylie de Greig.²²⁴ **A**, Vue du patient de face. Notez l'hypertélorisme et la macrocéphalie. **B**, La main de ce patient présente un pouce large, une syndactylie cutanée complète des doigts 2 à 5 avec fusion des ongles et un doigt surnuméraire postaxial. **C**, Le pied de ce patient présente un hallux partiellement dupliqué avec syndactylie cutanée de plusieurs doigts.

À ce jour, il n'a pas été rapporté de risque accru de cancer chez les patients atteints de syndrome de Greig.

1.3.7.2 Modèles murins

Johnson et coll. en 1967 puis Hui et coll. en 1993 ont décrit des souris appelées *Xt^J* pour « extra-toes » présentant spontanément un phénotype comparable au syndrome GCPS chez l'homme, associée à une délétion de 51,5 kb dans le domaine 3' (jusqu'à l'exon 9) du gène *Gli3*.^{182,231} Cette délétion entraîne un transcrit anormalement tronqué dans le premier domaine Zinc finger empêchant toute liaison spécifique à l'ADN entraînant une perte-de-fonction de GLI3.²³² Les souris hétérozygotes *Xt^{J/+}* présentent une polydactylie pré-axiale non syndromique, alors que les embryons homozygotes *Xt^{J/-}* meurent peu après la naissance, présentant des anomalies cranio-faciales et cérébrales graves (exencéphalie) associées à une polydactylie pouvant aller jusqu'à 9 doigts. Les souris hétérozygotes pour *Gli3* (*Gli3Xt^{J/+}*) expriment 50% de la protéine GLI3 (diminution de GLI3L et GLI3R) alors que les souris homozygotes (*Gli3Xt^{J/-}*) n'expriment pas GLI3 (Figure 21).²³³

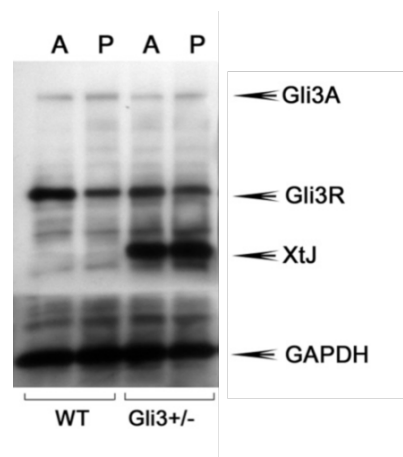


Figure 21. Niveau d'expression de Gli3A et de Gli3R à partir d'extraits protéiques de bourgeons de membres antérieurs (A) et de bourgeon de membres postérieurs (P) chez des souris *Gli3* WT versus *Gli3 Xt^{J/+}*. XtJ représente la protéine *Gli3* mutée et donc tronquée. Adaptée de Quinn et coll.²³³

Les souris *Gli3Xt* sont fournies par The Jackson Laboratory dans la majorité des publications sur un fond génétique C57BL/6J.

D'autres mutations hétérozygotes ont été décrites chez la souris : souris *Gli3Xt^H*,²³⁴ et Polydactyly Nagoya (Pdn)²³⁵. La seule mutation récessive (*add*) est causée par une insertion de transgène dans la région du promoteur *GLI3*.²³⁶ Tous ces mutants présentent des phénotypes similaires avec une polydactylie +/- associée à d'autres malformations notamment cranio-faciales.

2. OBJECTIFS

Objectif 1 :

On distingue différents types de mastocytoses selon l'âge de début de la maladie : la mastocytose à début pédiatrique qui est le plus souvent cutanée pure et régressive chez la majorité des patients et la mastocytose débutant à l'âge adulte qui est le plus souvent systémique, indolente ou plus rarement avancée, mais persistante. Les mécanismes physiopathologiques expliquant ces différences phénotypiques entre ces deux populations sont encore inconnus. Certains auteurs suggèrent que les différences mutationnelles dans le gène *KIT* observées entre ces deux populations sont à l'origine de la régression de la mastocytose chez l'enfant. Nous avons donc étudié à partir d'une large cohorte d'enfants atteint de mastocytose les facteurs cliniques, biologiques et moléculaires (séquençage *KIT*) associées à la régression de la mastocytose chez l'enfant (cf **article 1, en révision dans le Journal of Allergy and Clinical Immunology**).

Objectif 2 :

Plusieurs arguments suggèrent que la mutation de *KIT* n'explique pas seule, les différents phénotypes de la mastocytose et l'expansion clonale de mastocytes. Ceci suggère l'implication d'une ou plusieurs mutations supplémentaires, sans doute germinale(s) chez l'enfant ou somatique(s) chez l'adulte, qui impliquerai(en)t une autre voie de signalisation agissant en synergie avec la voie KIT activée pour induire l'expression phénotypique. A travers l'association de 2 maladies rares, un syndrome de Greig lié à des mutations perte-de-fonction dans le gène *GLI3* et une mastocytose, chez 3 patients issus de deux familles indépendantes, nous avons étudié, pour la première fois, le rôle de la voie de signalisation Hedgehog dans la physiologie du mastocyte et dans la physiopathologie de la mastocytose (cf **article 2, manuscrit en cours de préparation**).

3. RÉSULTATS

ARTICLE 1 – PEDIATRIC MASTOCYTOSIS: A LONG-TERM FOLLOW-UP AND CRITERIA OF REGRESSION

Dans le cadre du centre national de référence des mastocytoses (CEREMAST, Hôpital Necker-Enfants Malades), co-coordonné par le Pr Hermine (pour les adultes), et le Pr Bodemer (pour les enfants), nous suivons plus de 2500 patients atteints de mastocytose dont un peu plus de 600 enfants.

Les manifestations cliniques de la mastocytose résultent de deux évènements : i- de l'accumulation clonale de mastocytes dans un ou plusieurs organes et ii- du relargage de médiateurs pro-inflammatoires et vaso-actifs lors de l'activation mastocytaire à l'origine des symptômes d'activation mastocytaire (SAMA, tels que l'urticaire, le flush, les douleurs abdominales, les troubles du transit, les douleurs osseuses, la fatigue, les troubles du comportement...). Dans les MSI et la MC, les symptômes résultent essentiellement d'une activation excessive des mastocytes, alors que dans les MS agressives les symptômes sont plus liés à l'infiltration mastocytaire clonale diffuse multi-tissulaire qu'à l'activation mastocytaire excessive. Chez l'enfant, contrairement à l'adulte, la mastocytose est le plus souvent cutané pure et régressive dans la majorité des cas. Mais à notre connaissance, l'évolution des SAMA au cours du temps chez l'enfant atteint de mastocytose n'était pas décrite dans la littérature. Dans notre expérience au sein du CEREMAST, nous avons remarqué que certains enfants présentaient une amélioration voire même une guérison des lésions cutanées de la mastocytose alors que de façon surprenante les signes d'activation mastocytaire persistaient ou s'aggravaient au cours du temps.

Les objectifs de cette étude étaient :

- De décrire sur le plan clinique et moléculaire la plus grosse cohorte de mastocytose à début pédiatrique ;
- D'étudier les facteurs cliniques, biologiques (tryptase plasmatique) et moléculaires (séquençage du gène *KIT*) associés à la régression de la mastocytose ;
- Et d'étudier la corrélation entre l'évolution des lésions cutanées et l'évolution des SAMA au cours du temps chez l'enfant.

Pour répondre à ces objectifs, nous avons réalisé une étude de cohorte longitudinale. Nous avons inclus l'ensemble des patients ayant consulté dans le service de Dermatologie de l'hôpital Necker-Enfants Malades ou au CEREMAST pour une mastocytose à début pédiatrique. Les patients ont été recrutés soit par la base de données du CEREMAST soit en interrogeant la base de données warehouse de l'hôpital Necker-Enfants malades avec les termes suivant : « mastocytose », « urticaire pigmentaire », « mastocytome » et « mastocytose cutanée diffuse ». Au total 610 patients présentaient une

mastocytose à début pédiatrique et 272 d'entre eux ont été inclus pour les analyses de suivi car présentaient une mastocytose évoluant depuis au moins 8 ans.

The Journal of Allergy and Clinical Immunology

Pediatric mastocytosis: a long-term follow-up and criteria of regression

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	JACI-D-20-00032
Article Type:	Original Article
Section/Category:	Anaphylaxis, drug allergy, urticaria, and angioedema
Keywords:	Childhood mastocytosis; cutaneous mastocytosis; mast cell; mast cell activation symptom; KIT mutation; tryptase; prognosis
Corresponding Author:	Laura Polivka, M.D Institut Imagine Paris, FRANCE
First Author:	Laura Polivka, M.D
Order of Authors:	Laura Polivka, M.D Julien Rossignol Antoine Neuraz Djiba Condé Julie Agopian Cécile Méni Nicolas Garcelon Patrice Dubreuil Leïla Maouche-Chrétien Smaïl Hadj-Rabia Olivier Hermine Christine Bodemer
Manuscript Region of Origin:	FRANCE
Abstract:	<p>Background</p> <p>Mastocytosis is a neoplastic condition characterized by the accumulation of mast cells (MCs) in one or more organs. Adults tend to have persistent, systemic mastocytosis (SM), whereas MC infiltration in children is usually limited to the skin and classically regresses after several years. Both adults and children could display MC activation symptoms (MCAs) due to MC mediator release. In more than 85% of both adult and pediatric cases, KIT mutations are present, the KIT D816V mutation being present in most affected adults but in only half of affected children. Objective</p> <p>To identify the clinical, biological and molecular factors associated with the regression of cutaneous mastocytosis (CM) in children, and to assess the correlation between MCAs and CM regression. Methods</p> <p>All patients having suffered from pediatric-onset mastocytosis for at least 8 years were included in a longitudinal cohort study. Clinical data, the baseline serum tryptase level, KIT sequence, and the progression of MCAs and CM were recorded. Results</p> <p>Among the 272 included patients, CM regressed in 210 (77.2%; mean time to regression: 6.10 years). The rare cases of aggressive SM were symptomatic from the onset. Congenital mastocytosis and the KIT D816V mutation were associated with CM regression [OR=0.48 (p=0.031) and 0.173 (p=0.031), respectively]. Aggravation of MCAs over time was correlated with the persistence of skin lesions. However, the MCAs continued to worsen in 19% of patients with MCAs at baseline and CM regression - justifying long-term follow-up in these patients. Conclusion</p>

These results open up new hypotheses with regard to the spontaneous regression of CM in pediatric patients.

Pediatric mastocytosis: a long-term follow-up and criteria of regression

2

3 Laura Polivka, MD-MSc^{1-3*}, Julien Rossignol, MD-PhD^{2-4*}, Antoine Neuraz, MD-MSc⁵,
4 Djiba Condé, MSc¹, Julie Agopian, MSc^{3,6,7}, Cécile Méni, MD¹, Nicolas Garcelon, MD-PhD⁵,
5 Patrice Dubreuil, PhD^{3,6}, Leïla Maouche-Chrétien, PhD², Smail Hadj-Rabia, MD-PhD¹, Olivier
6 Hermine, MD-PhD^{2-4*}, Christine Bodemer, MD-PhD^{1*}

7 *Equal contribution

8

9 1. Department of Dermatology, Reference Center for Genodermatoses (MAGEC), Necker-
10 Enfants Malades Hospital (AP-HP5), Paris-Centre University, Imagine Institute, INSERM
11 U1163, Paris, France.

12 2. Laboratory of Molecular Mechanisms of Hematologic Disorders and Therapeutic
13 Implications, Necker Branch, INSERM U1163 and CNRS ERL 8654, Necker-Enfants Malades
14 Hospital (AP-HP), Paris-Centre University, Imagine Institute, Paris, France.

15 3. CEREMAST, Imagine Institute, INSERM U1163, Paris, France.

16 4. Department of Hematology, Necker-Enfants Malades Hospital (AP-HP5), Paris-Centre
17 University, Imagine Institute, Paris, France.

18 5. Department of Bioinformatics, Necker Branch, Necker-Enfants Malades Hospital (AP-HP5),
19 Paris-Centre University, Imagine Institute, INSERM U1163, Paris, France.

20 6. Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, équipe Labellisée Ligue nationale contre
21 le Cancer, INSERM U1068, Marseille, France.

22 7. Association Française pour les Initiatives de Recherche sur le Mastocyte et les
23 Mastocytoses (AFIRMM), France.

24

25 Performed on behalf of the French Reference Center for Mastocytosis (CEREMAST) study
26 group

27

28 **Corresponding authors:**

29 Christine Bodemer, Department of Dermatology and Referral Center for Genodermatoses
30 (MAGEC), Imagine Institute, Necker-Enfants Malades Hospital, APHP5 and Paris Centre
31 University, 149 rue de Sèvres, F-75743 Paris cedex 15, France. christine.bodemer@aphp.fr;
32 tel.: +33-144-494-672; fax: +33-144-494-660

33 and

34 Laura Polivka, Imagine Institute, INSERM U1163, 24 boulevard Montparnasse, F-75015 Paris,
35 France. laura.polivka@institutimagine.org; tel.: +33-142-754-278; fax: +33-142-754-217

36

37 **Word count for text:** 3675

38 **Figure:** 1

39 **Tables:** 7

40 **Essential Figures:** 4

41 **Essential Tables:** 2

42 **Funding sources:** This research did not receive any specific funding from agencies or
43 organizations in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

44 **Conflict of Interest:** the authors declare no conflicts of interest for this study.

45

46 **Abstract**

47 **Background.** Mastocytosis is a neoplastic condition characterized by the accumulation of mast
48 cells (MCs) in one or more organs. Adults tend to have persistent, systemic mastocytosis (SM),
49 whereas MC infiltration in children is usually limited to the skin and classically regresses after
50 several years. Both adults and children could display MC activation symptoms (MCAs) due to
51 MC mediator release. In more than 85% of both adult and pediatric cases, *KIT* mutations are
52 present, the *KIT* D816V mutation being present in most affected adults but in only half of
53 affected children.

54 **Objective.** To identify the clinical, biological and molecular factors associated with the
55 regression of cutaneous mastocytosis (CM) in children, and to assess the correlation between
56 MCAs and CM regression.

57 **Methods.** All patients having suffered from pediatric-onset mastocytosis for at least 8 years
58 were included in a longitudinal cohort study. Clinical data, the baseline serum tryptase
59 level, *KIT* sequence, and the progression of MCAs and CM were recorded.

60 **Results.** Among the 272 included patients, CM regressed in 210 (77.2%; mean time to
61 regression: 6.10 years). The rare cases of aggressive SM were symptomatic from the
62 onset. Congenital mastocytosis and the *KIT* D816V mutation were associated with CM
63 regression [OR=0.48 (p=0.031) and 0.173 (p=0.031), respectively]. Aggravation of MCAs over
64 time was correlated with the persistence of skin lesions. However, the MCAs continued to
65 worsen in 19% of patients with MCAs at baseline and CM regression - justifying long-term
66 follow-up in these patients.

67 **Conclusion.** These results open up new hypotheses with regard to the spontaneous regression
68 of CM in pediatric patients.

69 **Clinical implications**

70

71 Aggressive forms of pediatric-onset mastocytosis were rare and were symptomatic from the
72 outset. Long-term follow-up is mandatory for children with mastocytosis and symptoms of mast
73 cell activation.

74

75

76 **Capsule summary**

77 In pediatric-onset mastocytosis, we identified factors associated with the regression or
78 aggravation of mast cell activation symptoms and cutaneous mastocytosis. Congenital disease
79 and the *KIT* D816V mutation were associated with the regression of cutaneous mastocytosis.

80

81

82 **Keywords**

83 Childhood mastocytosis – cutaneous mastocytosis – mast cell - mast cell activation symptom –

84 *KIT* mutation – tryptase – prognosis

85

86 **Abbreviations**

87 ASM: aggressive systemic mastocytosis

88 CI: 95% confidence interval

89 CM: cutaneous mastocytosis

90 DCM: diffuse cutaneous mastocytosis

91 MCs: mast cells

92 MCAs: mast cell activation symptoms

93 MPCM: maculopapular cutaneous mastocytosis

94 OR: odds ratio

95 SM: systemic mastocytosis

96 WHO: World Health Organization

97 WT: wild type

98

99 **Introduction**

100 Mastocytosis corresponds to a heterogeneous group of neoplastic conditions characterized
101 by the expansion and accumulation of mast cells (MCs) in one or more organs (such as the skin,
102 bone marrow, spleen, lymph nodes, and gastrointestinal tract).¹⁻³ Disease can appear in
103 childhood or in adulthood. Pediatric patients generally exhibit cutaneous mastocytosis (CM),
104 in which MC infiltrates are limited to the skin and the resulting skin lesions spontaneously
105 recede after several years in most patients.⁴⁻¹⁰ Congenital mastocytosis are defined by the
106 presence of lesions from birth. Clinical manifestations are related to the clonal accumulation of
107 MCs (depending on which tissues are involved) and the effects of mediators released from the
108 MCs' granules. In fact, over 200 mediators with a role in various physiological and pathological
109 conditions have been identified in MC granules, including heparin and proteases like tryptase
110 and chymase.¹¹ Hence, as in cases of adult-onset mastocytosis, most of cases of pediatric
111 mastocytosis feature various symptoms of mast cell activation (MCAs, due to MC mediator
112 release) in addition to skin involvement.^{12,13} Somatic gain-of-function mutations in the *KIT*
113 gene are found in over 80% of patients with mastocytosis. In adults (where mastocytosis is
114 usually persistent and systemic), the *KIT* D816V mutation (in exon 17) is the most frequent,
115 and is detected in more than 85% of cases.^{14,15} In children, a mutation in exon 17 is found in
116 43% of cases - the same prevalence as for mutations affecting exons 8, 9, 10 or 11.^{16,17} Although
117 it has been hypothesized that the mutational differences observed between pediatric and adult
118 cases may explain (at least in part) the regression of CM, the underlying mechanisms have not
119 been yet identified.^{3,18,19} Nevertheless, some clinical factors appeared to be associated with
120 spontaneous disease improvement; they include early disease onset (within 12 months of birth)
121 or the type of lesion (maculopapular cutaneous mastocytosis (MPCM) with large lesions).^{17,20}
122 The often prominent, severe worsening of MCAs can significantly impact the patient's quality
123 of life and trigger sometimes life-threatening complications; however, the relationship between

124 the regression of MCAs and the regression of skin lesions in pediatric-onset mastocytosis has
125 not been clearly elucidated.

126 In a longitudinal study of the largest yet cohort of patients with pediatric-onset mastocytosis
127 characterized and followed up for at least 8 years, by the same experts, we showed that (i)
128 congenital mastocytosis but also *KIT*D816V were associated with spontaneous CM regression,
129 and (ii) even though the worsening of MCAs was correlated with the worsening of CM, MCAs
130 continued to worsen into adulthood in a subset of patients with CM regression – suggesting that
131 different mechanisms are involved in the accumulation and the activation of MCs and justifying
132 long-term follow-up in these pediatric patients.

133

134

135

136

137 **Material and Methods**

138 **Study population**

139 We performed a longitudinal cohort study in the dermatology department at Necker Children’s
140 Hospital (Paris, France), which coordinates the pediatric branch of the CEREMAST national
141 reference center for mastocytosis. This was an observational study; laboratory analyses (*KIT*
142 gene sequencing and blood chemistry tests) were only performed when they were expected to
143 improve patient care or when they were performed as a part of a physiopathological study (see
144 below). Accordingly, all patients with pediatric-onset mastocytosis who had consulted or been
145 hospitalized between January 1st, 1996, and December 31st, 2018, were considered for
146 eligibility in the study. Mastocytosis was defined and classified according to the World Health
147 Organization (WHO) criteria (see Supplemental Methods). In most cases, the diagnosis of CM
148 was based solely on clear clinical signs (major criteria), and a skin biopsy (to screen for minor
149 criteria) was not performed for ethical reasons. Patients were selected from the CEREMAST
150 national cohort, which was set up as part of a physiopathological study of mastocytosis in which
151 information is stored in electronic medical records. The study protocol was approved by the
152 local investigational review board “CPPRB Groupe Hospitalier de Paris Necker”, Paris, France,
153 n°03-01-05, 07/07/2003. In this protocol, *KIT* sequencing on skin biopsy was carried out
154 systematically regardless of the type of mastocytosis. The information extracted from the
155 CEREMAST was supplemented with information from Necker Children’s Hospital’s data
156 warehouse, which integrates free text data (hospitalization, consultation and prescription
157 reports, etc.) and coded data (laboratory results).²¹ The data warehouse was queried with the
158 following diagnostic codes: “mastocytosis”, “cutaneous mastocytosis”, “diffuse cutaneous
159 mastocytosis”, “mastocytoma”, and “urticaria pigmentosum”. We next analyzed the
160 characteristics of individual patients by referring to their electronic medical records; erroneous
161 diagnoses, cases of adult-onset mastocytosis, and cases of mastocytosis diagnosed less than 8

162 years previously were all excluded. Hence, all the included patients presented with confirmed
163 pediatric-onset mastocytosis diagnosed at least 8 years previously. We analyzed the patient's
164 electronic and paper medical records, and pictures of their skin.

165 **Data collection**

166 The study variables were assessed twice: at disease onset (during a consultation) and at a study
167 visit (a 'phone interview' or a clinical examination) by the same team of experts at the
168 CEREMAST, using an electronic case report form. For all identified patients, the following
169 items of data were collected: sex; age at onset; age at diagnosis; family history of mastocytosis;
170 type of cutaneous mastocytosis (MPCM, mastocytoma, or diffuse cutaneous mastocytosis
171 (DCM)), the presence of one or more symptoms of MCA: pruritus, flushes, urticaria, diarrhea,
172 abdominal pain, epigastric pain, food reactions, anorexia, nausea, vomiting, loss of
173 consciousness, hypotension, episodes of pallor, drained feeling, asthenia, headaches,
174 nightmares, sleep disorders, dyspnea, muscle/joint/bone pain, palpitations, pollakiuria,
175 emotional disturbance or behavioral disorders, the baseline serum tryptase level, *KIT* gene
176 sequencing data, and the change over time in MCAs and skin lesions. Congenital mastocytosis
177 was defined by the presence of lesions from birth in the newborn. The change over time in skin
178 lesions was classified as complete regression (i.e. the healing of lesions, with the absence of
179 Darier's sign), partial regression (a decrease in the number of lesions, and/or lightening of the
180 lesions), or stabilization. The presence or absence of the 26 above-mentioned MCAs was rated
181 (with one point for each symptom) at baseline and at last follow-up. The change over time in
182 MCAs was classified as complete regression, partial regression (a decrease of at least one
183 point), stabilization, or aggravation (an increase of at least one point).

184 **Screening for *KIT* mutations**

185 A skin biopsy was collected for *KIT* mutation analysis using a highly sensitive technique
186 (described in the Supplemental Methods) but only if the patient's parents or legal guardian had
187 given his/her informed consent for genetic screening or if the patient had systemic mastocytosis
188 (SM) requiring specific treatment. Three categories of *KIT* mutation were defined: a point
189 mutation at codon 816, a mutation outside codon 816, and the wild type (WT).

190 **Statistical analyses** are described in the Supplemental Methods.

191 **Results**

192 **Characteristics of the study population**

193 Between January 1st, 1996, and December 31st, 2018, a total of 687 patients consulted for
194 pediatric-onset mastocytosis at the French National Reference Center. Seventy-seven patients
195 were excluded because of an incorrect diagnosis, and so 610 patients with pediatric-onset
196 mastocytosis were included. The main characteristics of this population are summarized in
197 Table 1. There were five cases of SM (according to the WHO criteria): three of the five had
198 *KIT*-D816V-positive, congenital, aggressive systemic mastocytosis (ASM) from the onset with
199 DCM, MC infiltration of the bone marrow, liver, spleen and digestive tract, and the remaining
200 two had acute myeloid leukemia in which a t(8;21) or (1;17) translocation was associated with
201 a *KIT* D816V or N822Y mutation, respectively.¹ Overall, 272 of the 610 patients had suffered
202 from pediatric-onset mastocytosis for at least 8 years, and so were selected for long term follow-
203 up (Figure E1). Twelve patients were lost to follow-up (the changes in CM and MCAs were not
204 documented) and so were excluded from analyses of the regression of CM and MCAs. The
205 main characteristics of the study population (n=272) are summarized in Table 2. The male-to-
206 female ratio was 1.23, and 115 patients (42.3%) had congenital mastocytosis. Twenty-three
207 patients (8.5%) had familial mastocytosis (i.e. at least one first-degree parent with
208 mastocytosis). The mean (range) disease duration at the end of our study was 12.93 years (8.1
209 – 31.7). We observed 211 (77.6%) patients with MPCM, 46 (16.9%) with mastocytoma, and
210 15 (5.5%) with DCM. The frequency of congenital forms was higher in patients with
211 mastocytoma (54.3%) or DCM (53.3%) than in patients with MPCM (38.9%), although the
212 intergroup differences were not statistically significant (p=0.069 and p=0.29, respectively). One
213 hundred and ninety-five patients (71.7%) presented with MCAs at diagnosis, with a mean
214 (range) of 2.04 signs (1 – 11). There were no significant differences between the three groups
215 (MPCM, mastocytoma, and DCM) with regard to the number of MCAs at baseline, except that

216 cutaneous signs of MCA (pruritus, flushes and/or urticaria) were significantly more frequent in
217 the DCM group (73.3%) than in the MPCM group (41.7%; $p=0.028$, Table 3 and Figure E2).
218 The *KIT* gene was sequenced (using a skin biopsy sample) in 66 of the 211 patients (24.3%):
219 28 of these 66 (42.4%) carried a mutation in codon 816 (exon 17), 28 (42.4%) carried a *KIT*
220 mutation outside codon 816, and 10 (15.2%) had a WT *KIT* gene. Fifty of the 66 patients have
221 already been described by Bodemer et al.¹⁶ The different types of *KIT* mutation are shown in
222 Table E1. No genotype-phenotype correlations were apparent (data not shown). The mean
223 serum tryptase level at baseline was $7.52 \mu\text{g.L}^{-1}$ [1 – 60] in the 121 assayed patients. As
224 expected, the mean (range) tryptase level was significantly higher in the DCM group [23.99 (2
225 - 60) $\mu\text{g.L}^{-1}$] than in the MPCM group [7.36 (1 - 45.2) $\mu\text{g.L}^{-1}$; $p<0.0001$] and significantly
226 higher in the MPCM group than in the mastocytoma group [$4.32 \mu\text{g.L}^{-1}$, (1.3 – 11.5), $p=0.045$]
227 (Figure E2). Apart from the tryptase level, the MPCM, mastocytoma and DCM groups did not
228 differ significantly (data not shown) with regard to the main characteristics summarized in
229 Table 1.

230 Within the MPCM group, 85 patients (40.3%) had at least one large (>1 cm) or polymorphic
231 lesion (forming the MPCM-large subgroup), 78 (37%) had small (<5 mm) lesions (forming the
232 MPCM-small subgroup) and 48 patients (22.7%) had non-classified MPCM (forming the
233 MPCM non-classified subgroup). The frequency of familial mastocytosis was significantly
234 higher in the MPCM-small subgroup (17.9%) than in the MPCM-large subgroup (5.9%,
235 $p=0.026$), whereas the frequency of congenital mastocytosis was higher in the MPCM-large
236 group (48.2% vs. 37.5%, $p=0.016$). Nineteen patients had disease onset after the age of 2 and
237 all of them belonged to the MPCM-small or –non-classified subgroup. The distribution of the
238 *KIT* mutation was not significantly different in these groups (Table 2).

239 The main differences between patients for whom mastocytosis was congenital or appeared
240 within one month of birth (the congenital group) and those for whom mastocytosis appeared

241 later than a month after birth (the non-congenital group) are summarized in Table 4. We found
242 that MPCM was significantly more common in the non-congenital group (83.4%) than in the
243 congenital group (70.9%, $p=0.019$). Mastocytoma and DCM were more common (but not
244 significantly) in the congenital group. The distribution of *KIT* mutations (notably the frequency
245 of *KIT* point mutations in codon 816) was similar in the two groups (Figure E3). The
246 distribution of the *KIT* mutations regarding the age of onset are represented in Figure E3.

247 **Changes over time in CM**

248 Two hundred and ten of the 272 patients (80.8%) showed complete ($n=18$) or partial ($n=192$)
249 regression of CM at last follow-up. The mean time to regression was 6.1 years (1.48-21.9).
250 Forty-one patients were stable at the last examination, and 9 patients had a greater number of
251 lesions (i.e. worsening). The clinical, biological and molecular variables associated with
252 changes in CM are summarized in Table 5. Congenital mastocytosis was associated with CM
253 regression (odds ratio (OR)=0.476, 95% confidence interval (CI)=[0.236 – 0.917], $p=0.031$).
254 The presence of one or more MCAs at baseline was a prognostic factor for CM progression
255 (OR=2.20, 95%CI=[1.05 – 5.06], $p=0.047$). However, each individual MCAs (digestive
256 symptoms, pain, drained feeling etc.) was not significantly associated with changes over time
257 in CM (data not shown), except for the presence of pruritus or flushes at baseline; surprisingly,
258 these were associated with CM regression (OR=0.19, 95%CI=[0.072 – 0.43], $p=0.000$; and
259 OR=0.3, 95%CI=[0.128 – 0.663], $p=0.004$, respectively). Aggravation or stabilization of
260 MCAs was significantly correlated with worsening CM (OR=3.36, 95%CI=[1.28 – 9.13],
261 $p=0.015$). Sex, familial mastocytosis, the type of CM, the different types of MPCM and the
262 serum tryptase level at baseline were not significantly associated with the disease outcome.
263 The presence of a *KIT* point mutation in codon 816 was significantly associated with CM
264 regression (OR=0.173, 95%CI=[0.025 – 0.719], $p=0.031$). In contrast, a WT *KIT* genotype was
265 associated (albeit not significantly) with the aggravation of skin lesions (OR=3, 95%CI=[0.666

266 – 12.6], $p=0.135$). Of the 50 stable ($n=41$) or worsening ($n=9$) patients, 14 patients (12 stable,
267 and 2 worsening) were sequenced: two patients presented with a *KIT* point mutation at codon
268 816, 8 patients presented with other *KIT* mutations and 4 patients were WT (notably the 2
269 worsening patients). Two patients developed extracutaneous disease features. A *KIT*
270 D816V+patient in the MPCM-small subgroup with MCAs from the age of 1 developed one
271 small but painful osteolytic bone lesion with MC infiltrates at puberty without meeting the
272 criteria for ASM. Another *KIT* D816Y+ patient with MPCM-large congenital mastocytosis
273 developed hepatomegaly. No liver biopsy was performed. In both cases, a bone marrow aspirate
274 confirmed the presence of MC infiltrates. None of the 272 patients had developed ASM.

275 **Changes over time in MCA symptoms**

276 Seventy-seven patients (29.6%) were free of MCAs throughout the study. Of the remaining 183
277 patients, 144 (78.7%) showed complete ($n=85$) or partial ($n=59$) regression of the MCAs.
278 Twenty-two (12%) patients were classified as stable at the last examination, and the number of
279 MCAs increased in 17 (9.3%) patients (i.e. worsening). The clinical, biological and molecular
280 markers associated with an increase in the number of MCAs are summarized in Table 6. The
281 number of MCAs (and especially the presence of urticaria) at baseline was a prognostic factor
282 for the worsening of MCAs ($OR=653$, $95\%CI=[1.18.10^2-1.24.10^4]$, $p=0.000$ and $OR=4.97$,
283 $95\%CI=[1.05-26.2]$, $p=0.041$, respectively). Taken individually, the other types of MCAs
284 (digestive symptoms, pain, drained feeling etc.) were not significantly associated with
285 worsening of MCAs (data not shown). Sex, congenital mastocytosis, familial mastocytosis, the
286 type of CM, the different types of MPCM and the type of *KIT* mutation were not significantly
287 associated with the course of the MCAs. The serum tryptase level at baseline was not
288 significantly associated with the course of the MCAs ($OR=1.05$, $95\%CI=[0.973 - 1.17]$,
289 $p=0.341$). In a multivariate analysis, a *KIT* point mutation in exon 816 became significantly
290 associated with the regression of MCAs (Table E2).

291 **The correlation between changes in MCAs and CM**

292 Aggravation/stability of MCAs was significantly correlated with worsening/stability of CM
293 (OR=3.36, $p=0.015$). However, MCAs persisted or even worsened in 27 patients with these
294 symptoms at baseline and a favorable CM outcome (Figure 1). Only the number of MCAs at
295 baseline, and especially the presence of cutaneous symptoms (pruritus and flushing), was
296 significantly higher in patients with regression of both MCAs and CM than in patients not showing
297 this correlation (2.5 and 1.97 respectively, $p=0.0002$, Table 7).

298 **Cluster analysis of the different MCAs at diagnosis and changes in CM/MCAs**

299 A cluster analysis of the different MCAs identified four clusters of patients (Figure E4).
300 Clinically, cluster 1 was characterized by isolated food intolerance, cluster 2 was not highly
301 specific, cluster 3 was characterized mainly by flushes and pruritus, fatigue with drained
302 feeling, abdominal pain and intestinal transit disorders, and cluster 4 was characterized by
303 pruritus (but not flushes), abdominal pain, and intestinal transit disorders. The changes over
304 time in each group are depicted in Figure E4. There were no significant intergroup differences
305 with regard to changes over time in CM. Patients in cluster 3 were significantly more likely to
306 experience a decrease in MCAs outcome than patients in cluster 1 (taken as a reference) were
307 ($p=0.008$, Figure E4). The same association was seen for cluster 4 but was not statistically
308 significant ($p=0.08$).

309

310 **Discussion:**

311 Here, we analyzed a large cohort of patients with pediatric-onset mastocytosis (n=610)
312 and defined prognosis factors through a followed up for at least 8 years (mean duration of
313 disease: 12.93 years) in 272 patients. We showed that a spontaneous CM regression was
314 statistically associated with a congenital onset, but also and surprisingly with a *KIT* D816V
315 mutation. Moreover, even though the worsening of MCAs was correlated with the worsening
316 of CM, MCAs continued to worsen into adulthood in a subset of patients with CM regression.
317 Sex and familial mastocytosis were not associated with changes in CM.

318 The demographic characteristics of our study population were similar to those reported
319 in the literature, namely slight male predominance (male/female ratio: 1.23), an early mean age
320 at disease onset (301.2 days), a relatively high frequency of congenital forms (42.3%), a
321 predominance of MPCM (77.6%) relative to mastocytoma (16.9 %) and DCM (5.5%), and a
322 mean time to CM regression of 6.1 years (Table 2).⁴ Although aggressive forms of SM were
323 rare (n=5 out of 610, 0.82%), the fact that they were always clinically apparent at disease onset
324 meant that we did not systematically have to obtain bone marrow aspirates in children lacking
325 obvious clinical signs of ASM (organomegaly with impaired organ function, pancytopenia,
326 etc.).

327 As expected, a large minority (42.4%) of the patients presented with a *KIT* point mutation in
328 codon 816.¹⁶ The present report is the first to show that this mutation is (like congenital CM)
329 significantly associated with CM regression (OR=0.173, p=0.031, Table 5) in pediatric-onset
330 mastocytosis. In contrast, the *KIT* D816V mutation is associated with disease persistence in
331 adult forms of mastocytosis.²² In our study, mutations outside codon 816 do not seem to be
332 significantly associated with the evolution of CM, probably due to a too short follow-up period
333 of patients.

334

335 We did not find a *KIT* mutation in two patients with worsening of cutaneous lesions. As in adult
336 forms of ASM, the absence of a *KIT* mutation suggests the causal presence of one of more other
337 gene mutations. In our study, this appeared to be associated with worsening of CM (OR=3,
338 95%CI=[0.666 – 12.6], p=0.135, Table 5).²³ The distribution of the *KIT* mutations (notably the
339 *KIT* point mutation in codon 816) was similar in congenital and non-congenital forms of
340 mastocytosis (Figure E3). Thus, the mutational differences between children and adults with
341 mastocytosis (especially the high prevalence of *KIT* D816V mutation in adults) cannot alone
342 explain the outcome of CM. Starting from Gentek et al.'s research on the ontogeny of MCs, we
343 suggested a new explanation for the regression of pediatric-onset mastocytosis.²⁴ Gentek et al.
344 showed that in the embryonic mouse, MCs have two hematopoietic origins: the yolk sac and
345 the bone marrow. The two lineages of MC differ phenotypically and have a distinct gene
346 expression pattern. Interestingly, embryonic skin MCs derived from the yolk sac persist after
347 birth and are then gradually replaced by the definitive adult MCs. We therefore hypothesized
348 that regardless of the nature of the *KIT* gene mutation, mastocytosis will regress over time if
349 the mutation occurs in senescent yolk-sac MCs. Here, we did not find any correlations between
350 the *KIT* genotype and the patient phenotype; hence, the *KIT* mutation alone does not explain
351 the heterogeneous symptoms observed in all kinds of mastocytosis. This observation strongly
352 suggests that one or more mutations in one or several genes are involved – perhaps in synergy
353 with a *KIT* mutation - in the development of mastocytosis.^{25,26}

354 The aggravation of MCAs was significantly correlated with the worsening of CM (OR=3.36,
355 p=0.015, Table 5). Interestingly, MCAs persisted or even worsened in 19% (n=27 out of 142)
356 of the patients with these symptoms at baseline and a favorable CM outcome (Figure 1) -
357 suggesting that long-term follow-up of these patients might nevertheless be necessary. Thus,
358 we identified two subgroups of patients with CM regression: (i) those in whom both CM and
359 MCAs regressed (n=115), and (ii) those in whom CM regressed despite the worsening or

360 persistence of MCAs (n=27, subgroup 2). The only significant difference between these two groups
361 was the number of MCAs at baseline, and especially the presence of skin symptoms (pruritus and
362 flushing). These two symptoms were surprisingly more frequent in the first subgroup than in the
363 second subgroup (number of MCAs: 2.5 and 1.97 respectively, p=0.0002, Table 7), probably
364 because they are more associated with the number of pathological MCs than of MC activation itself.
365 The difference between these groups might be related to the presence of one or more mutations or
366 polymorphisms in one or more of the genes involved in MCA; however, addressing this question
367 would require extensive molecular investigations.

368 The present study is the first to have reported on such a large number of cases and to have
369 specified the various MCAs and their changes over time. Symptoms of MCA were frequent in
370 patients with CM (71.7%) and appeared not to be related to the extent of skin involvement
371 (except for pruritus and flushing, Table 3 and Figure E2). Thus, the type and the number of
372 MCAs appear to be more related to a qualitative defect in diseased MCs than to the high MC
373 count *per se*. Of all the individual MCAs, only the presence of urticaria at diagnosis was
374 significantly associated with a worsening of MCAs in general.

375 Our cluster analysis of the MCAs at baseline distinguished between four clusters of patients
376 (Figure E4). Two clusters (presenting with pruritus and flushes or pruritus without flushes at
377 baseline), displayed a reduction in MCAs over time. The validation of these findings would
378 require a study with greater statistical power.

379 **Conclusion**

380 Aggressive forms of pediatric-onset mastocytosis were rare and were symptomatic from the
381 onset - thus avoiding the systematic use of invasive bone marrow aspiration. Around 20% of
382 children with MCAs on diagnosis and CM regression will experience a worsening of the MCAs
383 into adulthood - justifying long-term follow-up in these patients. The observation that
384 congenital disease and the presence of a *KIT* gene mutation in exon 816 were associated with

385 CM regression in patients with pediatric-onset mastocytosis opens up new hypotheses with
386 regard to the spontaneous, favorable regression of CM often seen in pediatric patients.

387

388

389

390 **Acknowledgements**

391 The authors acknowledge the contribution and participation of the pediatric mastocytosis study
392 group: Pr. Sébastien Barbarot, Dr. Nathalie Beneton, Dr. Benoît Catteau, Dr. Karine Despontin,
393 Dr. Jean Donadieu, Dr. Catherine Eschard, Dr. Marion Gillibert-Yvert, Dr. Anne Hoppe, Dr.
394 Catherine Humiliere, Pr. Gisele Kanny, Dr. Laurence Lion, Pr. Ludovic Martin, Pr. Annabel
395 Maruani, Dr. Guy Molitor, Dr. Alice Phan, Dr. Jean-Louis Salomon, Dr. Beatrice Sans, Dr.
396 Francois Skowron, Dr. Jean-Francois Stadler, Dr. Christine Labreze, Dr. Stéphane Barete, Dr.
397 Benoit Catteau, Dr. François Skowron and Dr. Yves Turc (data collection). Laura Polivka,
398 Chief Resident-Inserm-Bettencourt position, benefits from the support of the Bettencourt
399 Schueller Foundation, sponsor of the program.

400

401 **References**

- 402 1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Beau MML, et al. The 2016
403 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute
404 leukemia. *Blood*. 2016;127:2391–405.
- 405 2. Valent P, Akin C, Metcalfe DD. Mastocytosis: 2016 updated WHO classification and
406 novel emerging treatment concepts. *Blood*. 2017;129:1420–7.
- 407 3. Hartmann K, Escribano L, Grattan C, Brockow K, Carter MC, Alvarez-Twose I, et al.
408 Cutaneous manifestations in patients with mastocytosis: Consensus report of the European
409 Competence Network on Mastocytosis; the American Academy of Allergy, Asthma &
410 Immunology; and the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *J*
411 *Allergy Clin Immunol*. 2016;137:35–45.
- 412 4. Méni C, Bruneau J, Georgin-Lavialle S, Le Saché de Peufeilhoux L, Damaj G, Hadj-Rabia
413 S, et al. Paediatric mastocytosis: a systematic review of 1747 cases. *Br J Dermatol*.
414 2015;172:642–51.
- 415 5. Lange M, Niedoszytko M, Renke J, Gleń J, Nedoszytko B. Clinical aspects of paediatric
416 mastocytosis: a review of 101 cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. 2013;27:97–
417 102.
- 418 6. Ben-Amitai D, Metzker A, Cohen HA. Pediatric cutaneous mastocytosis: a review of 180
419 patients. *Isr Med Assoc J IMAJ*. 2005;7:320–2.
- 420 7. Güneş Bilgili S, Karadağ AS, Takci Z, Çalka Ö, Kösem M. Comparison of cutaneous
421 mastocytosis with onset in children and adults. *Turk J Med Sci*. 2014;44:504–10.
- 422 8. Kiszewski AE, Durán-Mckinster C, Orozco-Covarrubias L, Gutiérrez-Castrellón P, Ruiz-
423 Maldonado R. Cutaneous mastocytosis in children: a clinical analysis of 71 cases. *J Eur*
424 *Acad Dermatol Venereol JEADV*. 2004;18:285–90.
- 425 9. Hannaford R, Rogers M. Presentation of cutaneous mastocytosis in 173 children.
426 *Australas J Dermatol*. 2001;42:15–21.
- 427 10. Azaña JM, Torrelo A, Mediero IG, Zambrano A. Urticaria pigmentosa: a review of 67
428 pediatric cases. *Pediatr Dermatol*. 1994;11:102–6.
- 429 11. Mukai K, Tsai M, Saito H, Galli SJ. Mast cells as sources of cytokines, chemokines, and
430 growth factors. *Immunol Rev*. 2018;282:121–50.
- 431 12. Valent P, Akin C, Arock M, Brockow K, Butterfield JH, Carter MC, et al. Definitions,
432 criteria and global classification of mast cell disorders with special reference to mast cell
433 activation syndromes: a consensus proposal. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012;157:215–
434 25.
- 435 13. Valent P, Akin C, Bonadonna P, Hartmann K, Brockow K, Niedoszytko M, et al. Proposed
436 Diagnostic Algorithm for Patients with Suspected Mast Cell Activation Syndrome. *J*
437 *Allergy Clin Immunol Pract*. 2019;7:1125-1133.e1.

- 438 14. Longley BJ, Metcalfe DD, Tharp M, Wang X, Tyrrell L, Lu SZ, et al. Activating and
439 dominant inactivating c-KIT catalytic domain mutations in distinct clinical forms of
440 human mastocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:1609–14.
- 441 15. Arock M, Wedeh G, Hoermann G, Bibi S, Akin C, Peter B, et al. Preclinical human models
442 and emerging therapeutics for advanced systemic mastocytosis. *Haematologica*.
443 2018;103:1760–71.
- 444 16. Bodemer C, Hermine O, Palmérini F, Yang Y, Grandpeix-Guyodo C, Leventhal PS, et al.
445 Pediatric mastocytosis is a clonal disease associated with D816V and other activating c-
446 KIT mutations. *J Invest Dermatol*. 2010;130:804–15.
- 447 17. Meni C, Georgin-Lavialle S, Le Saché de Peuffeilhoux L, Jais JP, Hadj-Rabia S, Bruneau
448 J, et al. Paediatric mastocytosis: long-term follow-up of 53 patients with whole sequencing
449 of KIT. A prospective study. *Br J Dermatol*. 2018;179:925–32.
- 450 18. Yanagihori H, Oyama N, Nakamura K, Kaneko F. c-kit Mutations in patients with
451 childhood-onset mastocytosis and genotype-phenotype correlation. *J Mol Diagn JMD*.
452 2005;7:252–7.
- 453 19. Lanternier F, Cohen-Akenine A, Palmerini F, Feger F, Yang Y, Zermati Y, et al.
454 Phenotypic and genotypic characteristics of mastocytosis according to the age of onset.
455 *PloS One*. 2008;3:e1906.
- 456 20. Wiechers T, Rabenhorst A, Schick T, Preussner LM, Förster A, Valent P, et al. Large
457 maculopapular cutaneous lesions are associated with favorable outcome in childhood-
458 onset mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136:1581-1590.e1-3.
- 459 21. Garcelon N, Neuraz A, Salomon R, Faour H, Benoit V, Delapalme A, et al. A clinician
460 friendly data warehouse oriented toward narrative reports: Dr. Warehouse. *J Biomed*
461 *Inform*. 2018;80:52–63.
- 462 22. Arock M, Sotlar K, Akin C, Broesby-Olsen S, Hoermann G, Escribano L, et al. KIT
463 mutation analysis in mast cell neoplasms: recommendations of the European Competence
464 Network on Mastocytosis. *Leukemia*. 2015;29:1223–32.
- 465 23. Molderings GJ. The genetic basis of mast cell activation disease - looking through a glass
466 darkly. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2015;93:75–89.
- 467 24. Gentek R, Ghigo C, Hoeffel G, Bulle MJ, Msallam R, Gautier G, et al. Hemogenic
468 Endothelial Fate Mapping Reveals Dual Developmental Origin of Mast Cells. *Immunity*.
469 2018;48:1160-1171.e5.
- 470 25. Zappulla JP, Dubreuil P, Desbois S, Létard S, Hamouda NB, Daéron M, et al.
471 Mastocytosis in mice expressing human Kit receptor with the activating Asp816Val
472 mutation. *J Exp Med*. 2005;202:1635–41.
- 473 26. Mayerhofer M, Gleixner KV, Hoelbl A, Florian S, Hoermann G, Aichberger KJ, et al.
474 Unique effects of KIT D816V in BaF3 cells: induction of cluster formation, histamine
475 synthesis, and early mast cell differentiation antigens. *J Immunol Baltim Md 1950*.
476 2008;180:5466–76.

477 **Table and figure legends**

478

479 **Table 1.** Main characteristics of the whole cohort and those of the study population

480 AML2: type 2 acute myeloid leukemia, ASM: aggressive systemic mastocytosis, DCM: diffuse
481 cutaneous mastocytosis, F: female, M: male, MPCM: maculopapular cutaneous mastocytosis,
482 NC: non-classified, WT: wild type.

483 **Table 2.** Main characteristics of the study population and the different cutaneous mastocytosis
484 subtypes.

485 DCM: diffuse cutaneous mastocytosis, F: female, M: male, MCAs: mast cell activation
486 symptoms, MPCM: maculopapular cutaneous mastocytosis, NC: non-classified.

487 * $p < .05$

488 **Table 3.** Main mast cell activation symptoms at baseline, as a function of the type of cutaneous
489 mastocytosis

490 DCM: diffuse cutaneous mastocytosis, MPCM: maculopapular cutaneous mastocytosis.

491 * $p < .05$

492 **Table 4.** Congenital vs. non-congenital mastocytosis

493 DCM: diffuse cutaneous mastocytosis, F: female, M: male, MPCM: maculopapular cutaneous
494 mastocytosis, NC: non-classified.

495 * $p < .05$

496 **Table 5.** Univariate analysis – clinical, biological and molecular markers associated with the
497 progression of cutaneous mastocytosis

498 MCAs: mast cell activation symptoms, MPCM: maculopapular cutaneous mastocytosis.

499 * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$

500

501 ¹ Other types of MCAs (digestive symptoms, pain, drained feeling etc.) were not significantly
502 associated with changes in CM (data not shown)

503 **Table 6.** Univariate analysis – clinical, biological and molecular markers associated with the
504 progression of MCAs.

505 CM: cutaneous mastocytosis, MCAs: mast cell activation symptoms, MPCM: maculopapular
506 cutaneous mastocytosis.

507 *p<.05, ***p<.001

508 ¹ Other types of MCAs (digestive symptoms, pain, drained feeling etc.) were not significantly
509 associated with the overall progression of MCAs (data not shown)

510 **Table 7.** A comparison of clinical, biological and molecular markers in patient group 1 (a
511 correlation between CM and MCAs regression) and patient group 2 (no correlation).

512 CM: cutaneous mastocytosis, DCM: diffuse cutaneous mastocytosis, F: female, M: male,
513 MCAs: mast cell activation symptoms, NC: non-classified.

514 *p<.05, ***p<.001

515

516 **Figure 1.** Correlation between CM regression and changes over time in MCAs.

517 CM: cutaneous mastocytosis, MCAs: mast cell activation symptoms, MPCM: maculopapular
518 cutaneous mastocytosis.

519

520

Tables and Figures

L. Polivka, J. Rossignol, A. Neuraz. Pediatric mastocytosis: a long-term follow-up and criteria of regression.

- **Table 1.** Main characteristics of the whole cohort and those of the study population
- **Table 2.** Main characteristics of the study population and the different cutaneous mastocytosis subtypes.
- **Table 3.** Main mast cell activation symptoms at baseline, as a function of the type of cutaneous mastocytosis
- **Table 4.** Congenital vs. non-congenital mastocytosis
- **Table 5.** Univariate analysis – clinical, biological and molecular markers associated with the progression of cutaneous mastocytosis
- **Table 6.** Univariate analysis – clinical, biological and molecular markers associated with the progression of MCAs
- **Table 7.** A comparison of clinical, biological and molecular markers in patient group 1 (a correlation between CM and MCAs regression) and patient group 2 (no correlation)
- **Figure 1.** Correlation between CM regression and changes over time in MCAs

Table 1. Main characteristics of the whole cohort and those of the study population

Characteristics	Whole cohort, n = 610 (n/total%)	Study population (with a duration of disease > 8years), n = 272 (n/total%)
Clinical		
Females	270	122
Males	340	150
Sex ratio (M/F)	1.26	1.23
Mean age at onset	271.6	301.23
Familial mastocytosis	41 (6.7)	23 (8.5)
Congenital mastocytosis	253 (41.5)	115 (42.3)
Confirmed systemic mastocytosis	7 (1.1)	2 (0.74)
• At onset	5	0
Congenital ASM	3	0
Associated with AML2 [t(8;21) or t(1;17)]	2	0
• During the evolution	2	2
MPCM	422 (69.2)	211 (77.6)
• Large (polymorphic lesions)	126 (29.9)	85 (40.3)
• Small (<0.5cm)	189 (44.8)	78 (37)
• NC	87 (20.6)	48 (22.7)
Mastocytoma	153 (25.1)	46 (16.9)
DCM	35 (5.7)	15 (5.5)
Molecular – Sequencing of <i>KIT</i> gene		
<i>KIT</i> point mutation at codon 816	39 (43.3)	28 (42.4)
Other <i>KIT</i> mutations	37 (41.1)	28 (42.4)
<i>KIT</i> WT	14 (15.6)	10 (15.2)

Table 2. Main characteristics of the study population and the different cutaneous mastocytosis subtypes

Characteristics	Population n = 272 (n/total%)	MPCM n = 211 (n/total%)	MPCM-large n = 85	MPCM-small n = 78	p.value (MPCM-large vs MPCM- small)	MPCM-NC n = 48	Mastocytoma n = 46 (n/total%)	DCM n = 15 (n/total%)
Clinical								
Females	122	93	37	36	-	20	22	7
Males	150	118	48	42	-	28	24	8
Sex ratio (M/F)	1.23	1.27	1.43	1.17	0.75	1.4	1.09	1.14
Mean age at diagnosis (days)	1308.5	1319	1369.3	1348.6	-	1184.5	1263,2	1302
Mean age at onset (days)	301.23	302.22	305.93	302.22	-	305.05	300,87	329,82
Congenital	115 (42.3)	82 (38.9)	41 (48.2)	23 (29.5)	0.016*	18 (37.5)	25 (54.3)	8 (53.3)
Familial mastocytosis	23 (8.5)	22 (10.4)	5 (5.9)	14 (17.9)	0.026*	3 (6.25)	1 (2.2)	0 (0)
Number of MCAs at diagnosis (mean)	2.04	2.09	2.09	2.19	0.75	1.52	1.85	1.93
Absence of MCAs	77 (28.3)	59 (28)	23 (27.1)	15 (19.2)	0,27	21 (43.8)	16 (34.8)	2 ((13.3)
Molecular – Sequencing of <i>KIT</i> gene	66	58	23	26		9	4	4
<i>KIT</i> point mutation at codon 816	28 (42.4)	28 (48.3)	11 (47.8)	12 (46.2)	1	5 (55.6)	0 (0)	0 (0)
Other <i>KIT</i> mutations	28 (42.4)	22 (37.9)	9 (39.2)	10 (38.5)	1	3 (33.3)	3 (75)	3 (75)
<i>KIT</i> WT	10 (15.2)	8 (13.8)	3 (13)	4 (15.4)	1	1 (11.1)	1 (25)	1 (25)
Biological								
Level of baseline tryptase [mean ($\mu\text{g.L}^{-1}$), range, number of patients]	7.52 [1 – 60] (n=121)	7.36 [1-45.2] (n=101)	7.23 [1.5-23.1] (n=48)	7.55 [1-45.2] (n=42)	0.82	7.60 [2.9-18.3] (n=11)	4.32 [1.3 – 11.5] (n=16)	23.99 [2-60] (n=4)

Table 3. Main mast cell activation symptoms at baseline, as a function of the type of cutaneous mastocytosis

	MPCM (n/total %) n = 211	Mastocytoma (n/total %) n = 46	DCM (n/total %) n = 15	p.value (MPCM vs Mastocytoma)	p.value (MPCM vs DCM)
Cutaneous signs: Pruritus/Flushes/Urticaria	88 (41.7)	22 (47.8)	11 (73.3)	0.63	0.028*
Digestive symptoms : anorexia, abdominal pain, diarrhea , nausea and /or vomiting	72 (34.1)	11 (23.9)	4 (26.7)	0.22	0.78
Food reactions	32 (15.2)	7 (15.2)	1 (6.7)	1	0.70
Loss of consciousness, drained feeling and/or episodes of pallor	44 (20.9)	7 (15.2)	2 (13.3)	0.54	0.74
Sleep disorders and/or nightmares	17 (8.1)	3 (6.5)	1 (6.7)	1	1
Muscle/joint/bone pain(s)	18 (8.5)	3 (6.5)	2 (13.3)	1	0.63
Emotional disturbance or behavioral disorders	2 (0.9)	1 (2.2)	0 (0)	0.45	1
Pollakiuria	5 (2.4)	1 (2.2)	0 (0)	1	1

Table 4. Congenital vs. non-congenital mastocytosis

Characteristics	Congenital group n = 127 (n/total %)	Non-congenital group n = 145 (n/total %)	p.value
Clinical			
Females	52 (40.9)	70 (48.3)	0.271
Males	75 (59.1)	75 (51.7)	
Sex ratio (M/F)	1.4	1.07	
Mean age at diagnosis (days)	1237.3	1371.3	0.544 (t test)
Familial mastocytosis	8 (6.3)	15 (10.3)	0.28
MPCM	90 (70.9)	121 (83.4)	0.019 *
-Large (polymorphic lesions)	44 (48.9)	41 (33.9)	0.033*
-Small (<0.5cm)	27 (30)	51 (42.1)	0.084
-NC	19 (21.1)	29 (24)	0.34
Mastocytoma	27 (21.3)	19 (12.9)	0.26
DCM	10 (7.9)	5 (3.4)	0.12
Molecular – Sequencing of <i>KIT</i> gene			
<i>KIT</i> point mutation at codon 816	12 (41.4)	16 (43.2)	0.93
Other <i>KIT</i> mutations	13 (44.8)	15 (40.5)	0.804
<i>KIT</i> WT	4 (13.8)	6 (16.2)	1
Biological			
Level of baseline tryptase [mean ($\mu\text{g.L}^{-1}$), range, number of patients]	8.92 [1-60] (n=52)	6.53 [1.1-28.2] (n=69)	0.1

Table 5. Univariate analysis – clinical, biological and molecular markers associated with the progression of cutaneous mastocytosis

Variables	Odds Ratio	95%CI	p.value
Clinical			
Sexe	1.46	[0.786-2.72]	0.230
Age at onset	1.18	[0.374-3.14]	0.833
Congenital mastocytosis	0.476	[0.236-0.917]	0.031*
Familial mastocytosis	1.18	[0.374-3.14]	0.757
Mastocytoma	0.594	[0.215-1.40]	0.268
MPCM	1.03	[0.502-2.25]	0.941
Number of MCAs at diagnosis	1.12	[0.997-12.6]	0.051
Presence of MCAs at diagnosis	2.20	[1.05-5.06]	0.047*
¹ Pruritus	0.19	[0.072-0.43]	0.000***
Flush	0.3	[0.128-0.663]	0.004**
Aggravation/Stability of MCAs	3.36	[1.28-9.13]	0.015*
Regression/healing of MCAs	1.92	[8.88 × 10 ⁻¹ -4.53]	0.112
Biological			
Tryptase	1.01	[0.958-1.07]	0.566
Molecular – Sequencing of <i>KIT</i> gene			
<i>KIT</i> point mutation at codon 816	0.173	[0.025-0.719]	0.031*
Other <i>KIT</i> mutation	2.07	[0.627-7.15]	0.235
<i>KIT</i> WT	3.00	[0.666-12.6]	0.135

¹ Other types of MCA symptoms (digestive symptoms, pain, drained feeling etc.) were not significantly associated with changes in CM (data not shown)

Table 6. Univariate analysis – clinical, biological and molecular markers associated with the progression of MCAs

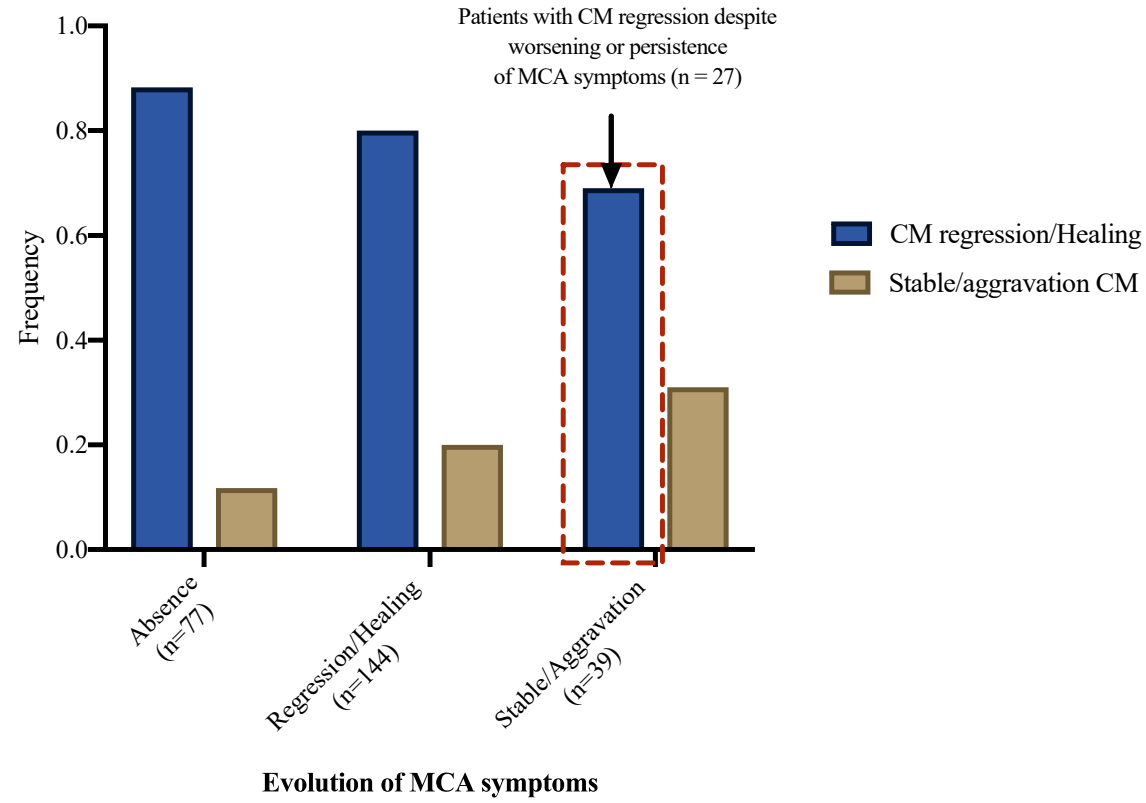
Variables	Odds Ratio	95%CI	p.value
Clinical			
Sexe	1.03	[0.601-1.76]	0.923
Age at onset	1.00	[1.00-1.00]	0.142
Congenital mastocytosis	0.815	[0.476-1.400]	0.454
Familial mastocytosis	3.03	[0.998-1.31]	0.081
Mastocytoma	0.718	[0.368-1.44]	0.339
MPCM	1.09	[0.569-2.03]	0.788
Number of MCAs at diagnosis	653	[1.18.10²-1.24.10⁴]	0.000***
¹ Urticaria	4.97	[1.05-26.2]	0.041*
Aggravation/Stability of CM	2.20	[1.05-5.06]	0.047*
Biological			
Tryptase	1.05	[0.973-1.17]	0.341
Molecular – Sequencing of <i>KIT</i> gene			
<i>KIT</i> point mutation at codon 816	1.53	[0.427-6.33]	0.525
Other <i>KIT</i> mutation	0.469	[0.124-1.66]	0.243
<i>KIT</i> WT	2.25	[0.363-4.37]	0.464

¹Other types of MCAs (digestive symptoms, pain, drained feeling etc.) were not significantly associated with the overall progression of MCAs (data not shown)

Table 7. A comparison of clinical, biological and molecular markers in patient group 1 (a correlation between CM and MCAs regression) and patient group 2 (no correlation)

N = 142 patients with CM regression and changes in MCAs	Groupe 1 n= 115 (n/total %)	Groupe 2 n = 27 (n/total %)	p.value
Clinical			
Sex ratio (M/F)	1.25	1.45	0.83
Familial mastocytosis	14 (12.2)	1 (3.7)	0.0097
Congenital mastocytosis	48 (41.7)	12 (44)	0.34
MPCM	89 (77.4)	23 (85.2)	0.44
Large	38	6	0.16
Small	37	10	1
NC	14	7	0.13
Mastocytoma	20 (17.4)	3 (13)	0.57
DCM	6 (5.2)	1 (3.7)	1
Number of MCAs at diagnosis	2.5 [1– 11]	1,97 [0 - 4]	0.0002***
Cutaneous signs:	81 (70.4)	12 (44.4)	0.014*
Pruritus/Flushes/Urticaria			
Digestive symptoms : anorexia, abdominal pain, diarrhea , nausea and /or vomiting	58 (50.4)	10 (37.0)	0.28
Discomfort, loss of consciousness, drained feeling and/or episodes of pallor	35 (30.4)	4 (14.8)	0.15
Food reaction	28 (24.3)	4 (14.8)	0.44
Bone, joint and/or muscular pain(s)	15 (13)	0 (0)	0.074
Biological			
Level of baseline tryptase [mean (α g.L ⁻¹), range, number of patients]	7.54 [1 - 45.2] (n=64)	7.75 [1.5-28.2] (n=11)	0.379
Molecular – Sequencing of <i>KIT</i> gene	n=36	n=6	-
Other <i>KIT</i> mutations	13 (36.1)	3 (50)	-
<i>KIT</i> point mutation at codon 816	18 (50)	3 (50)	-
<i>KIT</i> WT	5 (13.4)	0 (0)	-

Figure 1. Correlation between CM regression and changes over time in MCAs



For 12 patients, cutaneous and MCA symptoms evolutions were unknown (patients lost to follow-up)

Essential Figures and supplemental Methods

L. Polivka, J. Rossignol, A. Neuraz. Pediatric mastocytosis: a long-term follow-up and criteria of regression.

- **Table E1.** Types of *KIT* mutation identified
- **Table E2.** Multivariate analysis – clinical and molecular markers associated with the progression of mast cell activation symptoms (MCAs)
- **Figure E1.** Study flow chart
- **Figure E2.** The number of mast cell activation symptoms (A) and the serum tryptase level (B) at baseline in the groups of patients with cutaneous mastocytosis
- **Figure E3.** Distribution of the *KIT* mutations in cases of congenital vs. non-congenital mastocytosis (A) and distribution of the *KIT* mutations regarding the age of onset (B)
- **Figure E4.** Cluster analysis: the main characteristics of the four clusters
- **Supplemental Methods**

Table E1. Types of *KIT* mutation identified

	Type of <i>KIT</i> mutation
Exon 8	p.Asp419del (n = 15); p.Thr417_Asp419delinsAsn ;
Exon 9	p.Ser476Ile; p.Ser476_Asn505delinsLeuSer; p.Ser501_Ala502dup(n = 2); p.Ala502_Tyr503dup (n = 2); p.Tyr503_Phe504insSerTyr; p.Lys509Ile (n = 2); p.[Asn505Tyr(;)Phe506_Phe508dup]; p.Lys509Leu
Exon 11	p.Asn564_Leu576del
Exon 17	p.Asp816Ile (n = 2) ; p.Asp816Val (n = 25); p.Asp816Tyr

Table E2. Multivariate analysis – clinical and molecular markers associated with the progression of mast cell activation symptoms (MCAs)

Variables	Odds Ratio	95%CI	p.value
Clinical			
Familial mastocytosis	1.19	[0.150-6.77]	0.852
Number of MCAs at diagnosis	1.14	[0.911-1.44]	0.252
Molecular – Sequencing of <i>KIT</i> gene			
<i>KIT</i> point mutation at codon 816	0.171	[0.0235-0.778]	0.039*

Figure E1. Study flow chart

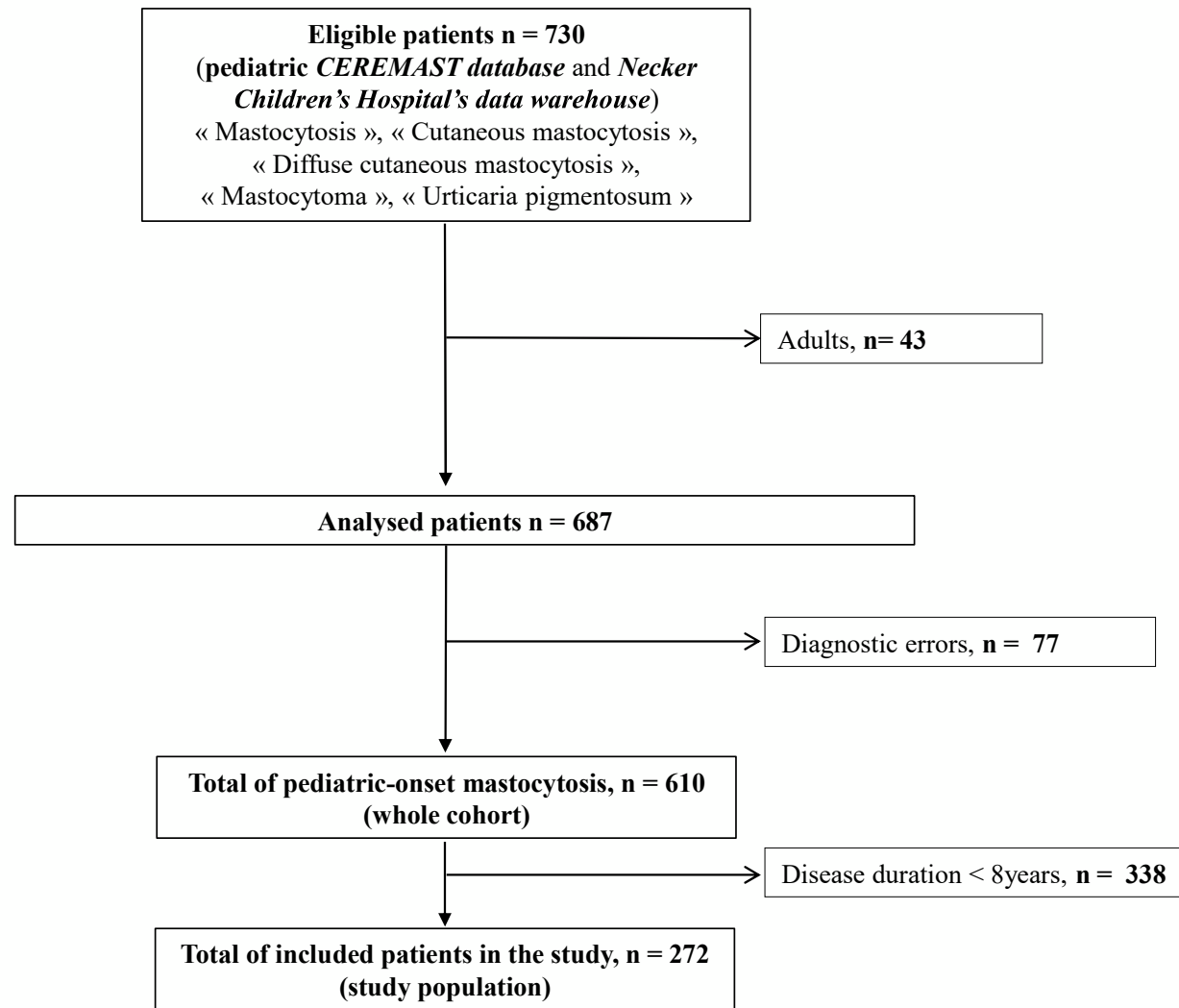
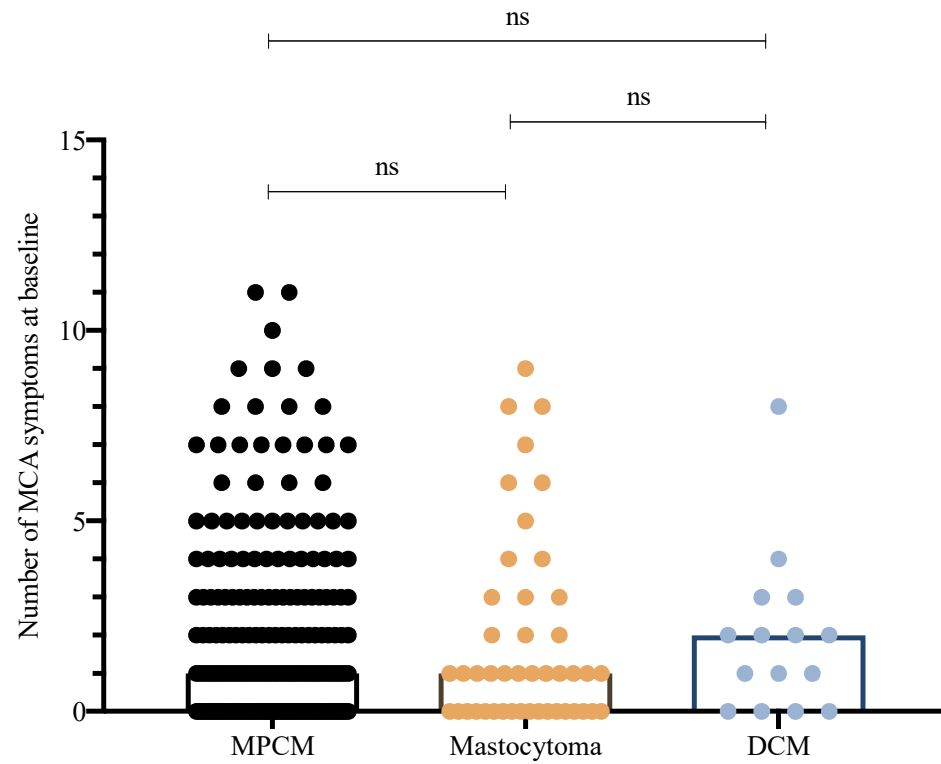
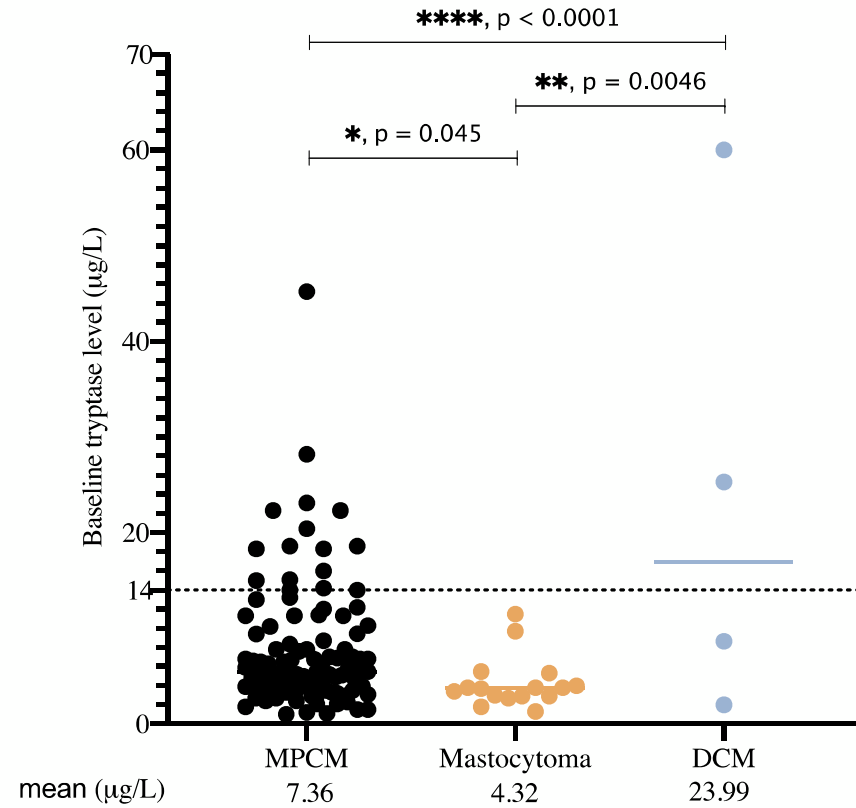


Figure E2. The number of mast cell activation symptoms (A) and the serum tryptase level (B) at baseline in the groups of patients with cutaneous mastocytosis

A.



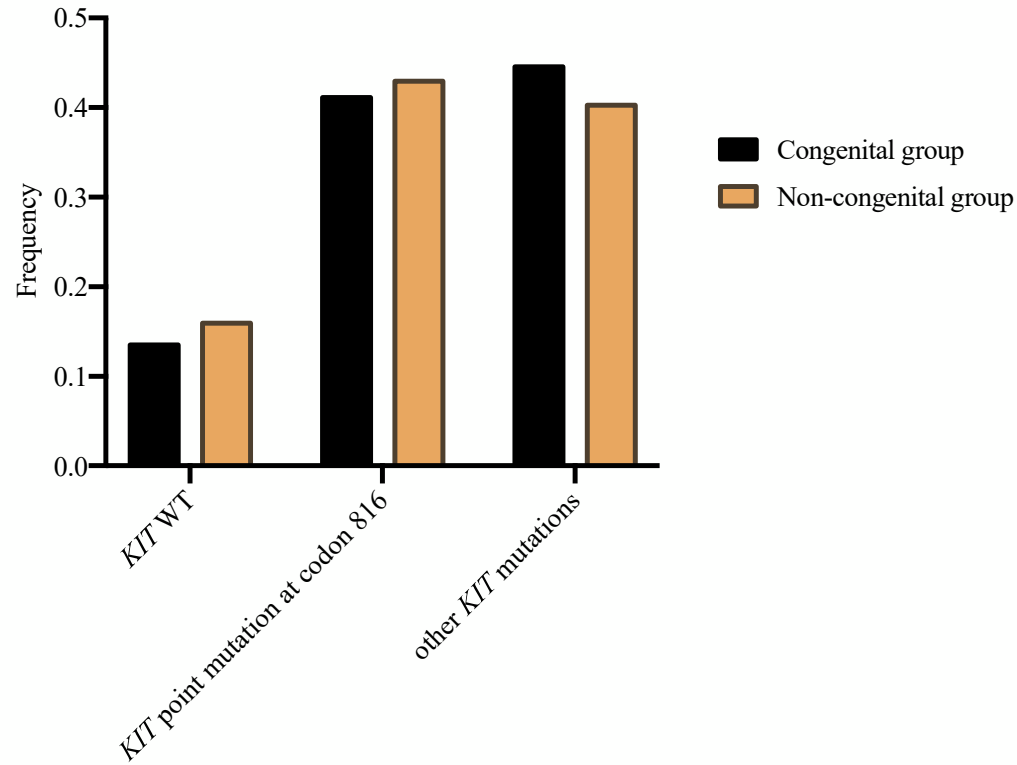
B.



* $p < .05$, ** $p < .01$, **** $p < .0001$, NS = not significant.

Figure E3. Distribution of the *KIT* mutations in cases of congenital vs. non-congenital mastocytosis (A) and distribution of the *KIT* mutations regarding the age of onset (B)

A.

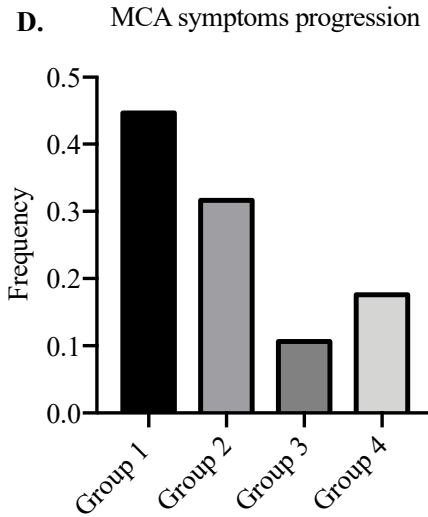
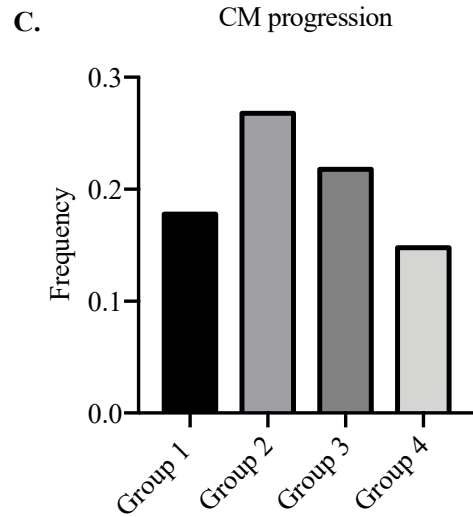
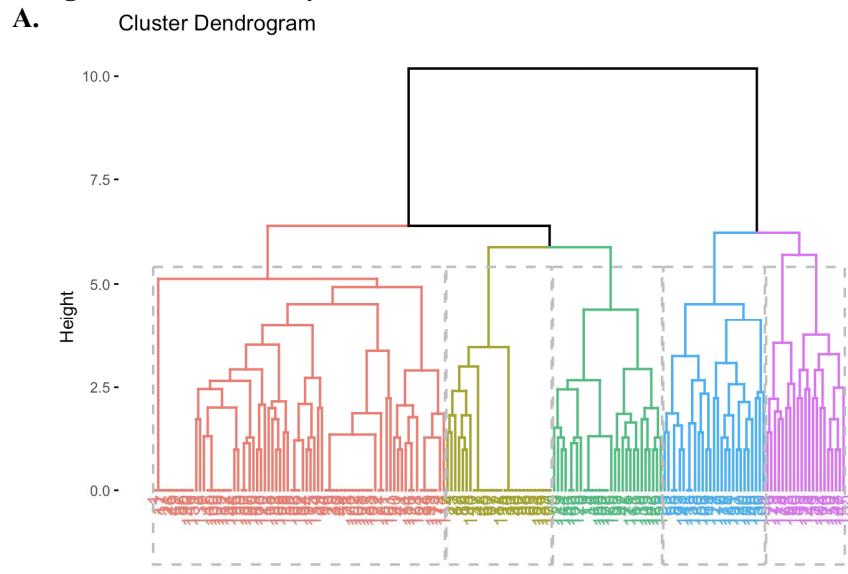


B.

Age at onset	<i>KIT</i> WT	<i>KIT</i> point mutation at codon 816	Other <i>KIT</i> mutations
Congenital (n=29)	4	12	13
>1month-1yo (n=22)	0	10	12
1-2yo (n=7)	2	3	2
2-5yo (n=5)	4	1	0
>10 yo (n=3)	0	2	1 (11 yo)

WT: wild type, yo: years old.

Figure E4. Cluster analysis: the main characteristics of the four clusters



B. Patients with MCAs at diagnosis (n = 182)

	Group 1 n=11 (n/total %)	Group 2 n=59 (n/total %)	Group 3 n=79	Group 4 n=33 (n/total %)
Pruritus	0	3 (5.08)	48 (60.76)	33 (100)
Flush	0	2 (3.39)	78 (98.73)	0 (0)
Loss of consciousness	0	4 (6.78)	15 (18.99)	2 (6.06)
Drained feeling	0	10 (16.95)	28 (35.44)	3 (9.09)
Episodes of pallor	0	1 (1.69)	1 (1.27)	0 (0)
Food reactions	11 (100)	4 (6.78)	23 (29.11)	1 (3.03)
Anorexia	0	0 (0)	4 (5.06)	0 (0)
Abdominal pain	0	22 (37.29)	27 (34.18)	9 (27.27)
Diarrhea	0	19 (32.2)	21 (26.58)	7 (21.21)
Epigastric pain	0	4 (6.78)	4 (5.06)	1 (3.03)
Urticaria	0	5 (8.47)	1 (1.27)	1 (3.03)
Nausea/vomiting	0	9 (15.25)	10 (12.66)	2 (6.06)
Asthenia	0	14 (23.73)	21 (26.58)	1 (3.03)
Nightmares	0	4 (6.78)	5 (6.33)	0 (0)
Headaches	0	12 (20.34)	18 (22.78)	3 (9.09)
Sleep disorders	0	7 (11.86)	6 (2.53)	3 (9.09)
Muscle pain	0	5 (8.47)	4 (5.06)	0 (0)
Joint pain	0	2 (3.39)	1 (1.27)	1 (3.03)
Bone pain	0	9 (15.25)	4 (5.06)	1 (3.03)
Palpitation	0	3 (5.08)	4 (5.06)	0 (0)
Pollakiuria	0	2 (3.39)	3 (3.80)	1 (3.03)
Unrest	0	3 (5.08)	0 (0)	0 (0)

E. Evolution of MCAs according to groups – Statistical analysis :

Variables	Odds Ratio	IC95%	p.value
Group 2	0.57	[0.153-2.20]	0.399
Group 3	0.154	[0.0381-0.628]	0.008**
Group 4	0.267	[0.0583-1.19]	0.080

CM: cutaneous mastocytosis, MCAs: mast cell activation symptoms, **p<.01.

Supplemental methods

Supplemental Methods (1)

- **Study population**

The World Health Organization (WHO) classified mastocytosis in three main groups: cutaneous mastocytosis (CM), in which no systemic involvement is found, systemic variants including indolent, smoldering, aggressive and associated with hematological malignancies mastocytosis, and localized mast cell (MC) tumors. The WHO classification divides CM into maculopapular cutaneous mastocytosis (MPCM), itself divided in two distinct forms: a variant characterized by monomorphic small-sized lesions (MPCM-small) and a second variant defined by polymorphic (often larger) lesions (MPCM-large); diffuse cutaneous mastocytosis (DCM), and localized mastocytoma. Diagnosis of cutaneous mastocytosis was established according to the WHO criteria that is typical skin lesions or atypical lesions combined with a positive Darriers' sign and exclusion of other skin diseases, and by one of these two minor criteria : 1- presence of MC aggregates of >15 MC/cluster or monomorphic infiltrate with > 20MC per high-power field and/or 2- detection of a *KIT* point mutation at codon 816 in lesional skin.

- **Screening for *KIT* mutations** (updated protocol from Lanternier et al.)¹

Total RNA was extracted from cutaneous biopsy or bone marrow aspirate using the RNeasy Mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). RNA was reverse transcribed into cDNA using the AffinityScript Multiple Temperature cDNA Synthesis kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), with random primers and oligodT as recommended by the manufacturer. To detect specifically the codon 816 mutation into exon 17, the *KIT* coding sequence was amplified in two independent PCR using the Phire Hot Start DNA Polymerase (Finnzymes, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) and the primers U2 and L1 listed in the supplementary Table bellow. PCR reaction was performed with 35 cycles at 98°C for 5 seconds, 60°C for 5 seconds, and 72°C for 5 seconds. One of the PCR products was directly sequenced, whereas the second was submitted to a second step in order to improve the sensitivity of the mutation detection. Briefly, BsmI restriction enzyme was added to this two-steps sample in order to digest the wild-type form of *KIT*. The digested PCR product (thus enriched either in D816V or other D816X mutated sequences) was amplified through a nested PCR using the 2365S and 2600AS primers. In addition, nested reaction was performed in the presence of a PNA816 oligonucleotide specific for the wild-type (WT) sequence to block amplification of any residual WT sequence.

The two independent PCR products were then purified using the Illustra ExoProStar kit (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA) and were sequenced using the BigDye Terminator v1.1 kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) either with the U2 and SeqL primers for the one step PCR amplification or the 2365S and 2600AS primers for the two steps nested PCR products. Then, the sequencing products were purified using the Sephadex G-50 (GE Healthcare) and a Multiscreen HTS plate (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) and run on an ABI Prism 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The sequences were analyzed using the SeqScape software (Applied Biosystems) by comparison with the NM_000222.2 GeneBank reference sequence (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

To note, in an experiment mixing a HMC1.1 cell line (carrying the D816V mutation) diluted in a *KIT* WT expressing cell line (TF1 cells), the sensitivity of the two-steps nested PCR amplification procedure was 0.1% for the D816V mutation detection. Using the NB4 non-*KIT* expressing cell line as dilution cell line, the sensitivity was improved to 0.01%, justifying the use of RNA as nucleic acids starting sample.

The whole *KIT* coding region corresponding to exons 8 to 13 was sequenced from a PCR amplification using the 1197S and 2029AS primers for 40 cycles at 98°C for 5 seconds, 60°C for 5 seconds, and 72°C for 10 seconds. Then, direct sequencing reactions were performed using the 1197S, 1678AS, 1595S and 2029AS primers.

Supplemental Methods (2)

Primers used for *KIT* mutation screening :

Primer	Nucleotide Sequence (5'-3')	Position (NM_000222.2)
U2	GGATGACGAGTTGGCCCTAGA	2274 to 2294
L1	GTAGAACTTAGAATCGACCGGCA	2640 to 2618
SeqL	TCGACCGGCATTCCAGGATAGGG	2627 to 2605
2365S	ATTCACAGAGACTTGGCAGC	2365 to 2384
2600AS	CTTCCTAAAGAGAA <u>S</u> AGCTCC	2600 to 2580
1197S	CCTAGTGTCCAATTCTGACG	1176 to 1195
1678AS	CCTTCCACTGTACTTCAT	1675 to 1658
1595S	TGCTGATTGGTTTCGTAATCG	1574 to 1594
2029AS	CACCATAGCAACAATATTCTG	2029 to 2009
PNA816	TCTAGCCAGAG7 ^m 5 ^m 8 ^m CATCAAGAATGATT	2436 to 2461

Modifications PNA816 :
7^m : C6-carboxylinker 178.12
5^m : PNA A 275.4
8^m : PNA amine C6 117.2

• Statistical analysis :

For the descriptive analyses, statistical significance was determined by using unpaired 2-sample t tests (equal variance) for numerical variables and fisher's exact test for binary and categorical variables. P-values < 0.05 were considered statistically significant. To determine the factors associated with regression of CM or MCA symptoms, we used logistic regressions. At first, bivariate regressions were performed one covariate at once. Then, all covariates with a p-value < 0.2 in the bivariate analysis were included in a multivariate logistic regression. We present the resulting odds-ratios with their 95% confidence intervals. All the analyses were realized using R statistical software v.3.5.1.

The aim of the cluster analysis is to group patients according to their basal clinical profile depending on the type of MCA symptoms only. Based on these clinical signs, we calculate a similarity between patients. Then, we try to find groups of "homogeneous" patients based on this metric using a non-supersized clustering algorithm. Thus, it gives us groups of patients who are supposed to look like each other based only on their initial clinical data, regardless of their evolutive profile. We considered the baseline clinical variables of the patients as binary variables. Therefore, we used the Jaccard measure to compute the distance between patients.² We performed the clustering on the resulting distance matrix using a hierarchical clustering.³ We chose the number of clusters using the elbow method. Number of clusters tested: 2 to 6. The final number of clusters selected was 4.

• References

1. Lanternier, F. *et al.* Phenotypic and genotypic characteristics of mastocytosis according to the age of onset. *PLoS One* 3, e1906 (2008).
2. Hancock, J. M., Zvelebil, M. J. and Hancock, J. M. (2014). Jaccard Distance (Jaccard Index, Jaccard Similarity Coefficient). In *Dictionary of Bioinformatics and Computational Biology* (eds J. M. Hancock and M. J. Zvelebil).
3. Rokach, L. and Maimon, O. (2005) Clustering Methods. In: Maimon, O. and Rokach, L., Eds., *Data Mining and Knowledge Discovery Handbook*, Springer, Berlin, 321-352.

ARTICLE 2 – THE ASSOCIATION OF GREIG CEPHALOPOLYSYNDACTYLY SYNDROME AND MASTOCYTOSIS IN CHILDREN REVEALS THE HEDGEHOG SIGNALING PATHWAY'S INVOLVEMENT IN MASTOCYTOSIS

L'activation constitutive de la voie de signalisation KIT, liée aux mutations somatiques gain-de-fonction dans le gène *KIT*, n'explique pas à elle seule les différents phénotypes de mastocytose, comme en témoigne les résultats de l'article 1. Une ou plusieurs voies dérégulées par le biais de mutations somatiques chez l'adulte et, sans doute, germinales chez l'enfant (ou dans les formes familiales) agirai(en)t en synergie avec l'activation constitutive de la voie KIT. Certaines mutations somatiques dans des gènes régulateurs épigénétiques, tels que *SRSF2*, *ASXL1*, *RUNX1*, *NRAS* et *TET2* (cf. paragraphe 1.2.4.2 de l'introduction) ont déjà été identifiées dans les mastocytoses notamment avancées de l'adulte.

Afin d'identifier des événements génétiques primitifs, nous nous sommes concentrés au sein de notre cohorte de mastocytose pédiatrique sur les patients qui présentaient des phénotypes « extrêmes » de mastocytose tel qu'une mastocytose agressive congénitale (n=3/610) et sur les formes familiales pour lesquelles la maladie ségrège selon un mode mendélien. Nous avons ainsi été interpellé par 3 patients qui présentaient l'association d'une mastocytose et d'une polydactylie (duplication du premier rayon des pieds et 5^{ème} rayon des doigts). Le premier patient (Patient#1), unique enfant issu d'un couple non apparenté, présentait une mastocytose agressive congénitale associée à la mutation *KIT* D816V et un syndrome de polysyndactylie de Greig (associant macrocéphalie et polydactylie). Les deux autres enfants (Patients #2 et #3) étaient issus de la même fratrie et présentaient une mastocytose indolente *a priori* cutanée pure (statut mutationnel pour *KIT* non connu) et une polydactylie. Le séquençage direct de *GLI3* a permis de mettre en évidence des mutations hétérozygotes. La co-existence de ces deux événements rares – le syndrome de Greig et la mastocytose – chez nos trois patients suggérait fortement l'implication des mutations du gène *GLI3* et du dysfonctionnement de la voie Hh qui en résulte dans le développement de la mastocytose. A notre connaissance, la voie Hh n'avait jamais été étudiée dans la mastocytose, et le mastocyte en général. Ainsi, nous avons étudié le rôle de la voie de signalisation Hh dans la physiologie du mastocyte et plus particulièrement dans la physiopathologie de la mastocytose.

Nous n'avons pas pu dériver de mastocytes à partir du sang total des patients et ils n'ont pas eu de myélogramme pendant toute la durée du travail (pas d'indication médicale). Nous avons pu réaliser une biopsie cutanée avec séquençage du gène *KIT* et analyses histologiques uniquement pour le Patient #1. Les parents des patients #2 et #3 n'ont pas souhaité réaliser d'examen complémentaires.

**The association of Greig cephalopolysyndactyly syndrome and mastocytosis in children
reveals the hedgehog signaling pathway's involvement in mastocytosis**

L. Polivka¹⁻³, V. Parietti⁴, E. Soucié⁵, E. Bayard², R. Rignault², D. Canioni⁶, S. Fraitag⁶, L. Lhermitte⁷, M. Tissandier², J. Rossignol^{2,3}, C. Gougoula⁸, B. Bader-Meunier⁹, M. Arock^{3,10,11}, S. Hadj-Rabia¹, U. Rütter¹², P. Dubreuil⁵, C. Bodemer¹, O. Hermine^{2,3,13*}, L. Maouche-Chrétien^{2,3*}

*Equal contributions

1. Department of Dermatology, Reference Center for Genodermatoses (MAGEC), Necker-Enfants Malades Hospital (AP-HP5), Paris-Centre University, Imagine Institute INSERM U1163, Paris, France.
2. Laboratory of Molecular Mechanisms of Hematologic Disorders and Therapeutic Implications, Necker Branch, INSERM U1163, Necker-Enfants Malades Hospital (AP-HP5), Paris-Centre University, Imagine Institute, Paris, France.
3. CEREMAST, Imagine Institute, INSERM U1163, Paris, France.
4. Department of animal experimentations, Institut Universitaire d'Hématologie, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.
5. Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, équipe Labellisée Ligue nationale contre le Cancer, INSERM U1068, Marseille, France.
6. Department of Pathology, Necker-Enfants Malades Hospital (AP-HP5), Paris-Centre University, Paris, France.
7. Laboratory of Onco-Hematology, Institut National de Recherche Médicale U1151, Necker-Enfants Malades Hospital (AP-HP5), Paris-Centre University, Paris, France.
8. Central Unit for Animal Research and Animal Welfare Affairs (ZETT), Heinrich-Heine-University of Düsseldorf, Düsseldorf, Germany.

9. Department of Pediatric Immunology and Hematology, Necker-Enfants Malades Hospital (AP-HP5), Paris-Centre University, Imagine Institute INSERM U1163, Paris, France.
10. INSERM UMRS1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France.
11. Laboratory of Hematology, Pitié-Salpêtrière Hospital, AP-HP Sorbonne Université, Paris, France.
12. Institute of Animal Developmental and Molecular Biology, Heinrich Heine University, Düsseldorf, Germany.
13. Department of Hematology, Necker-Enfants Malades Hospital (AP-HP5), Paris-Centre University, Imagine Institute, Paris, France.

Performed on behalf of the French Reference Center for Mastocytosis (CEREMAST) study group

Corresponding authors:

Leïla Maouche-Chrétien, Imagine Institute, INSERM U1163, 24 boulevard Montparnasse, F-75015 Paris, France. leila.maouche@inserm.fr; tel.: +33-142-754-278; fax: +33-142-754-217

and

Laura Polivka, Imagine Institute, INSERM U1163, 24 boulevard Montparnasse, F-75015 Paris, France. laura.polivka@institutimagine.org; tel.: +33-142-754-278; fax: +33-142-754-217

Word count for text:

Figures: 6

Supplemental Figures: 8

Conflict of Interest: the authors declare no conflicts of interest for this study.

Abstract

Mastocytosis is a clonal, heterogeneous disease characterized (in ~85% of affected patients) by the expression of an activated receptor tyrosine kinase KIT in neoplastic mast cells (MCs) due to a *KIT* mutation (D816V, in most cases). However, all attempts to demonstrate the oncogenic effect of the D816V mutation alone have failed – suggesting that other pathogenic factors cooperate with *KIT* in the context of mastocytosis. We studied three patients from two unrelated families presenting with Greig cephalopolysyndactyly syndrome (a rare syndrome characterized by macrocephaly and/or polysyndactyly due to haploinsufficiency of *GLI3*) and congenital mastocytosis. The *GLI3* gene codes for GLI3R, the main repressive transcription factor in the Hedgehog signaling pathway. This rare association prompted us to wonder whether the Hedgehog pathway had been involved in the onset of mastocytosis in the three patients and, more generally, might be involved in the sporadic form of mastocytosis. We showed for the first time that the Hedgehog pathway is active in normal primary MCs and overactive in neoplastic MCs from patients with aggressive systemic mastocytosis (ASM) and in all MC lines tested. Hedgehog pathway inhibitors suppressed MC proliferation, induced the apoptosis of neoplastic MCs, and significantly extended the survival time of mice with ASM. We used the *Gli3Xt*^{+/-} mouse model of Greig cephalopolysyndactyly syndrome to evaluate the role of GLI3 haploinsufficiency in tumorigenesis. Bone marrow mast cells derived from this mouse model and transduced with the *KIT*-D816V vector proliferated much more than controls - confirming the synergistic tumorigenic effects of *GLI3* and *KIT* mutations on the onset of mastocytosis. Ectopic expression of GLI3R induced the death of MCs within a few days - highlighting the protein's tumor suppressor activity and therapeutic potential in mastocytosis. Thus, our study of rare mastocytosis phenotypes in a specific germline syndrome revealed a novel pathophysiologic mechanism and a new therapeutic target in ASM.

Keywords

Childhood mastocytosis – cutaneous mastocytosis – systemic mastocytosis - mast cell – *KIT* mutation
– *GLI3* mutation – Greig cephalopolysyndactyly syndrome – Hedgehog signaling pathway

Abbreviations

AML: acute myeloid leukemia

ASM: aggressive systemic mastocytosis

BM: bone marrow

BMMC: bone marrow mast cell

CM: cutaneous mastocytosis

FDA: Food and Drug Administration

Fib: fibroblast

GCPS: Greig cephalopolysyndactyly syndrome

GLI3L: full-length GLI3

GLI3R: transcriptional repressor GLI3

iTK: tyrosine kinase inhibitor

MC: mast cell

MCL: mast cell leukemia

SCF: stem cell factor

SHH: sonic hedgehog

SMO: Smoothened

TF: transcription factor

WBM: whole bone marrow

WT: wild type

Mastocytosis is a rare, heterogeneous, hematological neoplasia characterized by the clonal accumulation of mast cells (MCs) in one or several organs.^{1,2} While pediatric cases generally consist of cutaneous mastocytosis (CM) and regress at puberty, adult cases often have systemic mastocytosis (SM) and persist throughout life.^{3,4} Gain-of-function somatic mutations in the *KIT* gene have been identified in 85% of patients.⁵ The most common mutation (D816V) is associated with constitutive activation of the receptor tyrosine kinase KIT (also referred to as CD117) in MCs. Since *KIT* gene mutations cannot fully account for the phenotypic heterogeneity observed in patients with mastocytosis (pediatric vs. adult, indolent vs. aggressive, regressive vs. persistent, etc.), we focused our research on rare cases of pediatric familial or congenital aggressive systemic mastocytosis (ASM) with a view to identifying one or more novel genes involved in this disease. We identified and studied three children from two unrelated families. In addition to mastocytosis, the children presented with macrocephaly and/or polysyndactyly that was strongly suggestive of Greig cephalopolysyndactyly syndrome (GCPS; MIM#175700). This condition results from haploinsufficient, heterozygous mutations in the *GLI3* gene coding for a key Hedgehog transcription factor (TF).^{6,7} Sanger sequencing confirmed the presence of germline *GLI3* mutations in all three patients. Exome analysis did not identify any other candidate genes in these patients. Patient #1 presented with a *KIT* D816V mutation and congenital ASM infiltrating the bone marrow (BM), liver, digestive tract and skin (diffuse CM), macrocephaly, a duplication with syndactyly of the distal phalanx of the first toe, and duplication of the fifth finger (Fig. 1A and supplementary Fig.1). Patients #2 and #3 are siblings and presented with congenital maculopapular CM with small lesions (formerly referred to as urticaria pigmentosum) and duplication of the fifth finger. The *KIT* status of patients #2 and #3 was unknown, they did not show any signs of ASM, and a bone marrow (BM) biopsy had not been performed. Patient #1 carried a *GLI3* gene mutation (4677dup/p.G1559WfsX6) in exon 15, which codes for the protein's C-terminal domain. Patients #2 and #3 carried an insertion (c.2082_2083insAGAGAAGCC / p.V695EfsX45) in exon 13, which codes for the proteolytic cleavage site (Figs. 1B and 1C).

The Hedgehog signaling pathway is essential for cell fate determination, normal embryonic development, cell growth, differentiation, and stem cell homeostasis in the adult. Aberrant activation of this pathway in adult tissues is detrimental; it leads either directly to basal cell carcinoma and medulloblastoma (*via* loss of function of the repressive receptor Patched-1 or gain of function of Smoothened (SMO))⁸⁻¹⁰ or indirectly to gastrointestinal and pancreatic cancers or melanoma (*via* ectopic positive regulation of Hedgehog ligands or deregulation of the GLI TFs through non-canonical Hedgehog pathways).^{11,12} The Hedgehog GLI family of TFs comprises GLI1, GLI2 and GLI3. The N-terminal region of GLI TFs contains a zinc finger DNA-binding domain, whereas the C-terminal region contains a transcriptional activator domain. Signaling through the canonical Hedgehog pathway involves a complex network of proteins; Hedgehog ligands (especially sonic hedgehog, SHH) bind to the receptor Patched-1 and thus prevent it from inhibiting the transmembrane protein SMO. Consequently, active SMO translocates to the primary cilia, activates an intracellular signaling cascade, and thus leads to the production of activated GLI1, GLI2 and full-length GLI3 (GLI3L). The GLIs then translocate to the nucleus, where they activate a plethora of target genes involved in cell proliferation, survival and self-renewal (e.g. AKT, Bcl2, c-Myc, CyclinD1, Nanog, Bmi1, and SOX2). In the absence of Hedgehog pathway ligands, GLI2 and GLI3 are phosphorylated, ubiquitinated and partially proteolysed in the proteasome – generating inhibitory C-terminally truncated forms (GLI2R and GLI3R) that translocate to the nucleus and repress the target genes. GLI1 and GLI2 are the main TF activators, while GLI3 acts essentially as a repressor of its truncated form GLI3R.¹³

We noticed that primary fibroblasts from a skin biopsy from Patient #1 (Fib-P#1) expanded much more rapidly than primary fibroblasts from healthy control biopsies (Fib-CTL1 and Fib-CTL2, data not shown). While control fibroblasts stopped proliferating at passages 14-16, Fib-P#1 grew faster, required greater factor dilutions between passages, and did not show any signs of senescence before passage 35; these observations suggested that the *GLI3* mutation in Patient #1 accelerated cell

proliferation, inhibited apoptosis and thus promoted cancer (Supplementary Fig. 2). An immunohistochemical analysis of Patient #1's skin sections showed strong expression of CD117 and thus marked infiltration by MCs. The cells expressed high levels of SHH and GLI1, moderate levels of GLI2, and low levels of GLI3 - confirming the Hedgehog signaling pathway's activation in this patient (Fig. 1D). The strong expression of SHH by MCs is suggestive of autocrine activation of the canonical Hedgehog pathway (Fig. 1D).¹⁴ As expected (due to the presence of a haploinsufficient mutation), Fib-P#1 showed low levels of GLI3L and GLI3R expression. Furthermore, the GLI3R/GLI3L ratio was significantly lower in Fib-P#1 than in control fibroblasts ($p=0.011$), which is in line with the observed cell proliferation and survival (Fig. 1E).

To the best of our knowledge, the Hedgehog pathway has not previously been studied in MCs. Hence, we assessed the protein expression of Hedgehog pathway components in primary MCs derived from CD34+ cord blood cells and in MCs sorted from two patients with a sporadic form of MC leukemia (MCL). When compared with established MC lines, primary MCs barely expressed GLI1, GLI2L and GLI3L and weakly expressed GLI2R and GLI3R repressors; this is consistent with the known low proliferation rate of primary MCs *in vitro* (Fig. 2A). In contrast, the MCL cells expressed much higher levels of *GLI1* and *GLI2* than primary MCs did (Fig. 2A); this is consistent with the Hedgehog gene expression profile in cancer cells.¹³ Interestingly, there was a marked difference in the level of *GLI3* between the two MCL cultures (Fig. 2A). To gain mechanistic insights into the Hedgehog pathway's action in mastocytosis, we performed most of the subsequent molecular studies on human MC lines. This was necessary because it is impossible to predict when neoplastic cells can be obtained from a given patient. The ROSA *KIT* D816V and ROSA *KIT* Delta 417-419 InsY cell lines (carrying adult and pediatric *KIT* mutations, respectively) expressed GLI1, GLI2 and GLI3L more strongly than ROSA *KIT* wild type (WT) cells did – suggesting that the constitutive activation of *KIT* increases the expression of activated forms of GLI TFs (Fig. 2B). In agreement with these results, we found that stimulation with stem cell factor (SCF) after cell starvation was associated with stronger

expression of GLI1, GLI3 and also Bcl2 (one of the major GLI target genes) in ROSA *KIT* WT cells (Fig. 2C)

Taken as a whole, these results indicate that SCF's binding to its receptor activates *GLI* genes and that *KIT*D816V or *KIT*Delta 417-419 InsY mutations are potent activators of the Hedgehog signaling pathway. However, not all *KIT* mutations similarly activated the expression of GLI TFs; indeed, levels of GLI TFs were lower in HMC1.1 lines (carrying a V560G mutation in the *KIT* juxta-membrane domain) than in HMC1.2 lines carrying both V560G and D816V mutations (Fig. 2B). A comparison of GLI3R/GLI3L ratios in the various cell lines suggested that the D816V and del 417-419 mutations activated the Hedgehog pathway most effectively (Fig. 2D). Moreover, GLI1 expression appeared to be inversely correlated with GLI3R expression (Fig. 2D).

Since the Hedgehog signaling pathway is abnormally active in neoplastic MCs, we next evaluated the effect of Hedgehog antagonists (such as sonidegib and GANT61) on aberrant MCs. The SMO antagonist sonidegib is a canonical Hedgehog pathway inhibitor that has been approved by the US Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of basal cell carcinoma, whereas GANT61 directly inhibits GLI1 and GLI2.^{15,16} Treatment with 20 μ M sonidegib markedly suppressed the proliferation of HMC1.1 and HMC1.2 (by up to 70%) and promoted cell death (by up to 15%) (Figs. 3A and 3B). These effects involved the downregulation of GLI1, a relative increase in the GLI3R/GLI3L ratio (known to promote cell proliferation), a relative decrease in phosphorylation of the signaling molecule STAT3 (S727) downstream of *KIT*, and slight (but not statistically significant) downregulation of Bcl2 ($p=0.066$) (Figs. 3C and 3D). It is noteworthy that exposure to 20 μ M sonidegib had less of an effect on the HMC1.1 line than it did on the HMC1.2 line; this was possibly because of the absence of the *KIT*D816V mutation in the former cells. Exposure to 20 μ M sonidegib inhibited cell proliferation and apoptosis slightly less in ROSA lines than it did in HMC lines (Supplementary Fig. 3). Exposure to GANT61 totally inhibited the proliferation of HMC cell lines (from a dose of 10 μ M upwards) and ROSA cell lines (from 20 μ M upwards; Supplementary Fig. 4).

In a molecular analysis, GANT61's dramatic effect was found to be dose-dependently correlated with lower expression of *GLI1*, the target genes *AKT*, *Bcl2* and *c-MYC*, and *BCL-xL*, and greater expression of caspase 3 (Supplementary Fig. 5). Interestingly, exposure to 20 μM sonidegib totally suppressed proliferation of primary MCs sorted from a patient with *KIT* D816V ASM and killed around 20% of the cells (Fig. 3E). *GLI1*, *GLI3* and *Bcl2* expression was low, while the *GLI3R/GLI3L* ratio was consistently higher (Fig. 3F). GANT61 very efficiently repressed the proliferation of primary MCs sorted from a patient with *KIT* WT MCL - even at 10 μM - and killed 40% of the cells at 30 μM ; this indicates that GLI TFs (and thus their target genes) were activated by both canonical and non-canonical Hedgehog pathways in the patient's neoplastic cells (Supplementary Fig. 6). We also found that another SMO antagonist (vismodegib) inhibited the proliferation of MC lines and of the primary MCs sorted from the patient with *KIT* WT MCL (Supplementary Figs. 7 and 8).

These findings clearly demonstrate the involvement of Hedgehog factors in the tumorigenic process in mastocytosis; hence, we wondered whether a combination of Hedgehog pathway inhibitors and tyrosine kinase inhibitors (iTKs) could be used to effectively treat mastocytosis. To this end, we first tested the *in vitro* efficacy of midostaurin (PKC412, a iTK approved by the FDA in an indication of advanced SM) and sonidegib. The combination of 20 μM sonidegib and 200 nM PKC inhibited proliferation of HMC1.1 and HMC1.2 cells in an additive manner (Fig. 3G). Interestingly, our results with patient cells were even more striking at lower concentrations (10 μM sonidegib and 150 nM PKC), with the total suppression of proliferation within 3 days (Fig. 3H).

To confirm the therapeutic efficacy of Hedgehog pathway antagonists *in vivo*, we studied the only available mouse model of ASM/MCL (created by injecting luciferase-expressing ROSA-D816V cells into NSG immunodeficient mice).¹⁷ The experimental design is described in the Methods section. Seven weeks after reconstitution, xenografted mice were randomly assigned according to their level of secreted luciferase (data not shown) to 8 weeks of treatment with 80 mg/kg/day sonidegib (n=33) or buffer (controls, n=33). As shown in Fig. 4, death induced by tumor invasion occurred significantly

later in the sonidegib-treated group (mean: 68.8 days; median; 67 days) than in the control group (mean: 53.7 days, $p=0.0027$; median: 55.5 days, $p=0.0052$). This *in vivo* result (i) confirmed the therapeutic efficacy of Hedgehog pathway inhibitors in a context of mastocytosis and (ii) emphasized the value of better understanding the molecular mechanisms involved in this effect.

Hence, in order to unequivocally establish whether GLI3 haploinsufficiency indeed contributes to tumorigenesis in mastocytosis, we studied a mouse model of GCPS ($GLI3Xt^{+/-}$, kindly donated by Professor U. Hüther).¹⁸ Bone marrow samples from $Gli3Xt^{+/-}$ and $Gli3WT$ mice were cultured in MC differentiation media supplemented with SCF and IL-3 or with IL-3 alone; after 14 days of differentiation, more than 95% of the cells displayed the $Fc\epsilon RI^+ CD117^+$ MC phenotype under both conditions. Although all cell types proliferated more in the presence of SCF, $Gli3Xt^{+/-}$ bone marrow MCs (BMMCs) proliferated especially strongly (Fig. 5A). This result clearly demonstrated that the combination of GLI3 haploinsufficiency and a low GLI3R/GLI3L ratio contributes to the excessive proliferation of MCs (Fig. 5B) and corroborated the high level of proliferation observed with Fib-P#1. Consistently, $Gli3Xt^{+/-}$ BMMCs expressed more P-AKT and less p21 factor than $Gli3WT$ BMMCs did (Fig. 5C). In order to replicate patient #1's genotype in the $GLI3Xt^{+/-}$ mice, we transduced $Gli3Xt^{+/-}$ BMMCs and $Gli3WT$ BMMCs with lentiviral vectors expressing KIT-D816V, or KIT-WT in the presence of SCF and IL-3. As shown in Fig. 5D, KIT-D816V/ $Gli3Xt^{+/-}$ BMMCs proliferated much faster than the other BMMCs, which suggests that *GLI3* and *KIT* mutations have a synergistic tumorigenic effect in MCs. Similar results were obtained when whole BM was transduced with KIT-WT or KIT-D816V vectors prior to MC differentiation; this indicates that the MCs' outcome (the development of neoplastic properties) is not altered by the time at which the *KIT* mutation occurs (Fig. 5E). In contrast, KIT-D816V/ $Gli3Xt^{+/-}$ BMMCs and KIT-WT/ $Gli3Xt^{+/-}$ BMMCs tended to resist senescence better than their counterparts (KIT-D816V/ $Gli3WT$ BMMCs and KIT-WT/ $Gli3WT$ BMMCs, respectively; Fig. 5F). This finding indicates that the combination of GLI3 haploinsufficiency and a low GLI3R/GLI3L ratio helps to inhibit apoptosis – especially when

the *KIT* gene is mutated. Thus, GLI3R appears to be an antitumorigenic factor in over-proliferating MCs, as has already been demonstrated in the context of acute myeloid leukemia (AML).¹⁹

To functionally assess GLI3R's anti-proliferative effect in MCs, we ectopically overexpressed the protein by transducing HMC1.2 cells with lentiviral vectors expressing a GLI3R-dTomato or a CTL-dTomato construct. GLI3R-dTomato expression totally blocked HMC1.2 proliferation, whereas the control vector had no effect (Fig. 6A). Furthermore, 90% of the GLI3R-dTomato cells and 40% of the CTL-dTomato cells died within 10 days (Fig. 6B). We next investigated the expression of Hedgehog target genes in GLI3R-dTomato-HMC1.2 cells; the results were fully consistent with cell growth arrest and apoptosis. Indeed, we observed significantly lower expression levels of the pro-apoptotic factor Bcl2, the pro-proliferative factors c-MYC and AKT, and GLI1 itself. Conversely, we observed much higher levels of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 (Figs. 6C and 6D). In order to obtain a clear picture of the signaling pathways and molecular changes related to GLI3R expression, we carried out an RNA sequencing analysis of GLI3R-dTomato-HMC1.2 *vs.* CTL-dTomato-HMC1.2. The results highlighted strong upregulation of key genes involved in cell death (3.18-fold), necrosis (2.2-fold), apoptosis (1.68-fold), and downregulation of genes involved in cell viability (2.84-fold), survival (2.13-fold), cell proliferation (2.16-fold) and DNA replication (2.5-fold), and thus confirmed the potential therapeutic effect of the truncated GLI3 protein (Fig. 6E).

In summary, we identified three patients presenting with an extremely rare combination of (i) GCPS caused by GLI3 haploinsufficiency and (ii) congenital mastocytosis. Since the normal functions of several pathways (such as Notch, Wnt, TGF β , and Hedgehog) are usurped during carcinogenesis, we hypothesized and then we showed that the Hedgehog pathway was involved in the onset of mastocytosis in the three patients and, more generally, in sporadic forms of mastocytosis. By assessing this pathway in MCs, we showed for the first time that the Hedgehog pathway is overactivated in neoplastic MCs. Our *in vitro* experiments demonstrated that treatment with Hedgehog pathway inhibitors (i) suppressed the proliferation of abnormal MCs and induced apoptosis

in vitro, and (ii) was significantly associated with a longer survival time in a mouse model of ASM *in vivo*. By using the *GLI3Xt^{+/-}* mouse strain, we clearly showed that GLI3 haploinsufficiency promoted tumors by acting in synergy with the *KIT-D816V* mutation; this result strongly suggests that the Hedgehog signaling pathway was involved in the development of mastocytosis in our three patients. We also showed that by increasing the GLI3R/GLI3L ratio, ectopic expression of GLI3R induced MC death within a few days; this is consistent with GLI3R's known anti-proliferative role and demonstrating its potential as a treatment target in mastocytosis.

Taken as a whole, our results extend the list of hematopoietic factors that activate the Hedgehog pathway during tumorigenesis (AML, chronic lymphocytic leukemia, chronic myeloid leukemia and diffuse large B-cell lymphoma).²⁰⁻²⁴ Thus, our results provide the first molecular and functional evidence of the synergistic tumorigenic effects of abnormal Hedgehog and tyrosine kinase signaling pathways in MCs, and highlight a novel therapeutic target in mastocytosis. The Hedgehog pathway has been implicated in the survival and drug resistance of AML; indeed, most (but not all) AML cell lines express GLI1 and GLI2, although some do not respond to GLI inhibitors.^{19,25} The combination of rapamycin or cytarabine with Hedgehog pathway inhibitors can result in greater treatment efficacy in AML.²² The combination of Hedgehog pathway inhibitors with iTKs like sonidegib and midostaurin warrants investigation in a clinical study of patients with mastocytosis. Since overexpression of GLI3R induced cell death by repressing the anti-apoptotic factor Bcl2 (Fig. 6C), a multidrug treatment approach (i.e. with the addition of Bcl2 inhibitors) could be considered in the most severe cases.

In conclusion, our study of rare mastocytosis phenotypes in the context of a specific germline syndrome revealed a new pathophysiologic mechanism and a novel therapeutic target in ASM.

Acknowledgements

The authors thank Sylvie Frabrega for assisting with virus production. We thank the families involved in the study and the following physicians for their collaboration: Brigitte Bader-Meunier (Paris, France) and Cécile Méni (Paris, France).

This research was funded by grants from the French Society of Dermatology (SFD), ARC Cancer Research Foundation, Laurette Fugain Association, and the MARIH rare immunohematologic disease network. Laura Polivka (senior resident and INSERM staff researcher) was funded by the Bettencourt Schueller Foundation.

References

1. Arber, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127**, 2391–2405 (2016).
2. Valent, P., Akin, C. & Metcalfe, D. D. Mastocytosis: 2016 updated WHO classification and novel emerging treatment concepts. *Blood* **129**, 1420–1427 (2017).
3. Hartmann, K. *et al.* Cutaneous manifestations in patients with mastocytosis: Consensus report of the European Competence Network on Mastocytosis; the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology; and the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *J. Allergy Clin. Immunol.* **137**, 35–45 (2016).
4. Méni, C. *et al.* Paediatric mastocytosis: a systematic review of 1747 cases. *Br. J. Dermatol.* **172**, 642–651 (2015).
5. Longley, B. J. *et al.* Activating and dominant inactivating c-KIT catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 1609–1614 (1999).
6. Vortkamp, A., Franz, T., Gessler, M. & Grzeschik, K. H. Deletion of GLI3 supports the homology of the human Greig cephalopolysyndactyly syndrome (GCPS) and the mouse mutant extra toes (Xt). *Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc.* **3**, 461–463 (1992).
7. Démurger, F. *et al.* New insights into genotype-phenotype correlation for GLI3 mutations. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* **23**, 92–102 (2015).
8. Epstein, E. H. Basal cell carcinomas: attack of the hedgehog. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 743–754 (2008).
9. Kool, M. *et al.* Integrated genomics identifies five medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features. *PLoS One* **3**, e3088 (2008).
10. Teglund, S. & Toftgård, R. Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **1805**, 181–208 (2010).
11. Stecca, B. *et al.* Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions

between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 5895–5900 (2007).

12. Ji, Z., Mei, F. C., Xie, J. & Cheng, X. Oncogenic KRAS activates hedgehog signaling pathway in pancreatic cancer cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 14048–14055 (2007).

13. Pandolfi, S. & Stecca, B. Cooperative integration between HEDGEHOG-GLI signalling and other oncogenic pathways: implications for cancer therapy. *Expert Rev. Mol. Med.* **17**, e5 (2015).

14. McMillan, R. & Matsui, W. Molecular pathways: the hedgehog signaling pathway in cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **18**, 4883–4888 (2012).

15. Migden, M. R. *et al.* Treatment with two different doses of sonidegib in patients with locally advanced or metastatic basal cell carcinoma (BOLT): a multicentre, randomised, double-blind phase 2 trial. *Lancet Oncol.* **16**, 716–728 (2015).

16. Calcaterra, A. *et al.* Chemical, computational and functional insights into the chemical stability of the Hedgehog pathway inhibitor GANT61. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **33**, 349–358 (2018).

17. Bibi, S. *et al.* A new humanized in vivo model of KIT D816V+ advanced systemic mastocytosis monitored using a secreted luciferase. *Oncotarget* **7**, 82985–83000 (2016).

18. Hui, C. C. & Joyner, A. L. A mouse model of greig cephalopolysyndactyly syndrome: the extra-toesJ mutation contains an intragenic deletion of the Gli3 gene. *Nat. Genet.* **3**, 241–246 (1993).

19. Chaudhry, P., Singh, M., Triche, T. J., Guzman, M. & Merchant, A. A. GLI3 repressor determines Hedgehog pathway activation and is required for response to SMO antagonist glasdegib in AML. *Blood* **129**, 3465–3475 (2017).

20. Zhao, C. *et al.* Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature* **458**, 776–779 (2009).

21. Dierks, C. *et al.* Expansion of Bcr-Abl-positive leukemic stem cells is dependent on Hedgehog pathway activation. *Cancer Cell* **14**, 238–249 (2008).

22. Kobune, M. *et al.* Drug resistance is dramatically restored by hedgehog inhibitors in CD34+

leukemic cells. *Cancer Sci.* **100**, 948–955 (2009).

23. Pan, D. *et al.* Gli inhibitor GANT61 causes apoptosis in myeloid leukemia cells and acts in synergy with rapamycin. *Leuk. Res.* **36**, 742–748 (2012).

24. Aberger, F., Kern, D., Greil, R. & Hartmann, T. N. Chapter two - Canonical and Noncanonical Hedgehog/GLI Signaling in Hematological Malignancies. in *Vitamins & Hormones* (ed. Litwack, G.) vol. 88 25–54 (Academic Press, 2012).

25. Aberger, F., Hutterer, E., Sternberg, C., del Burgo, P. J. & Hartmann, T. N. Acute myeloid leukemia – strategies and challenges for targeting oncogenic Hedgehog/GLI signaling. *Cell Commun. Signal. CCS* **15**, (2017).

26. Saleh, R. *et al.* A new human mast cell line expressing a functional IgE receptor converts to tumorigenic growth by KIT D816V transfection. *Blood* **124**, 111–120 (2014).

27. Sundström, M. *et al.* Functional and phenotypic studies of two variants of a human mast cell line with a distinct set of mutations in the c-kit proto-oncogene. *Immunology* **108**, 89–97 (2003).

Figures and Figure legends

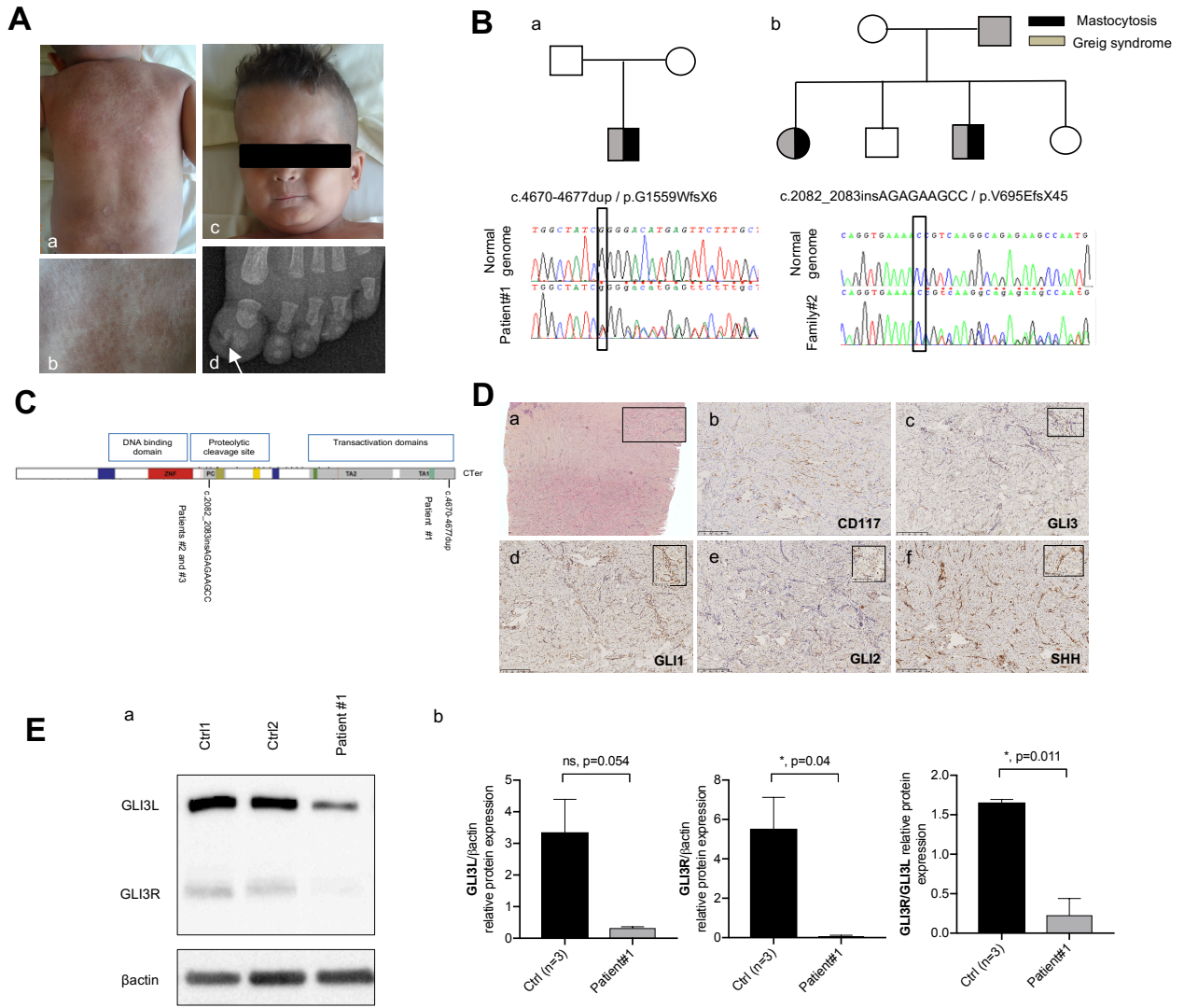


Figure 1.

Figure 1. Clinical, molecular and histopathological features of patients #1 and #2

A. The clinical phenotype of patient #1: erythroderma with skin infiltration (a, b), macrocephaly (c) and duplication of the distal phalanx of the first toe (d). **B.** Pedigrees and sequencing electropherograms for patient #1 (mutation: c.4670-4677dup, a) and patient #2 (mutation: c.2082_2083insAGAGAAGCC, b). **C.** Schematic representation of GLI3, showing the three main regions (the DNA binding domain, the proteolytic cleavage domain, and the transactivation domains) and the respective locations of the two mutations. The figure was adapted from Démurger et al.⁷ **D.** A skin histology assessment (patient #1), showing diffuse MC infiltration throughout the dermis (a). An immunohistochemical analysis of a skin section from patient #1, showing that dermal cell infiltrates are positive for CD117 (b), negative or weakly positive for GLI3 (c), positive for GLI1 (notably in the nucleus, d), weakly positive for GLI2 (e) and strongly positive for SHH (f, x10 magnification for Figure 1D and x30 magnification for the insets). **E.** Immunoblots of GLI1, 2 and 3 in fibroblasts from patient #1 and two healthy controls (a) and quantification of relative protein expression levels of GLI3L, Gli3R and GLI3R/L. The data are representative of three independent experiments. *p<0.05

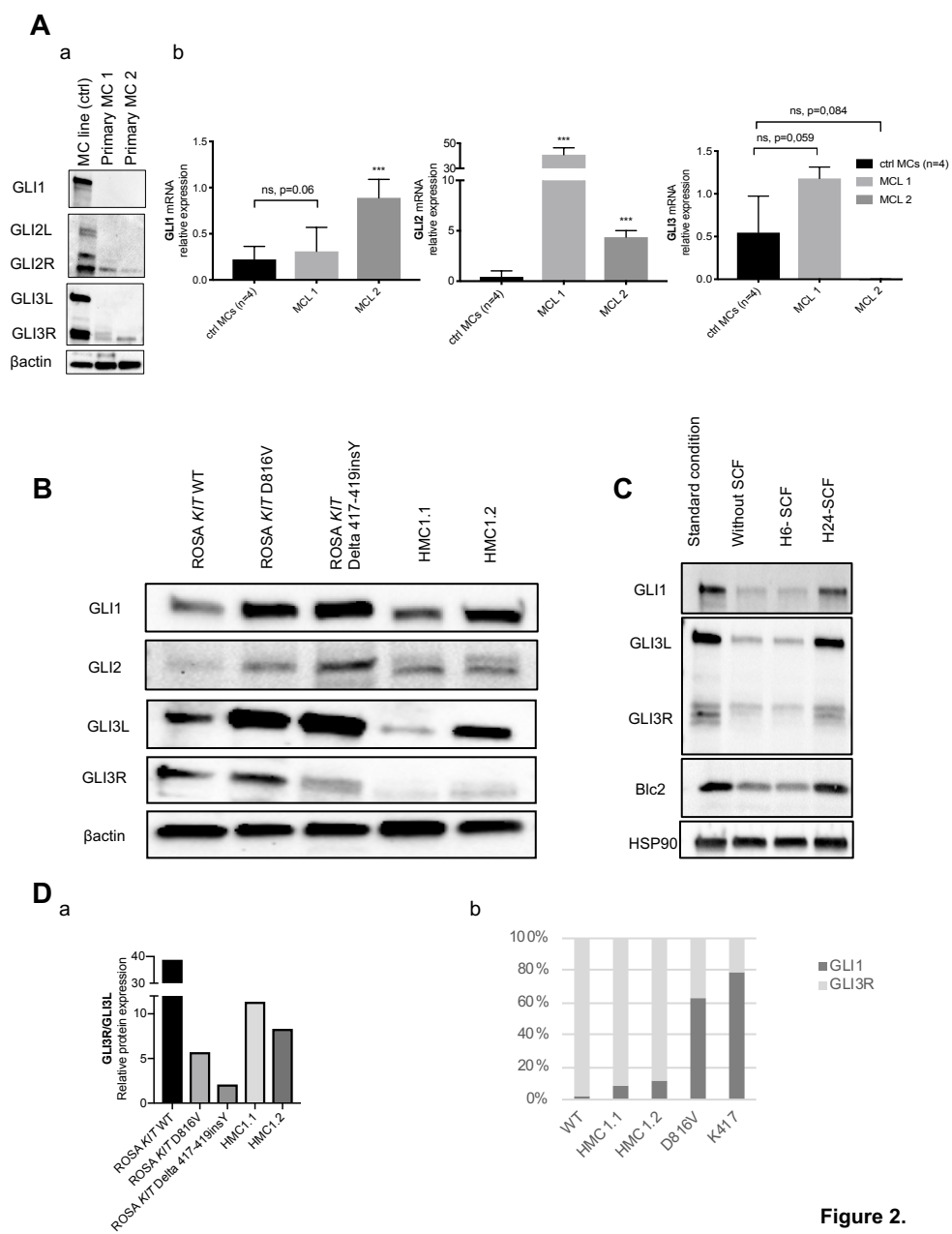


Figure 2.

Figure 2. The Hedgehog signaling pathway is active in MC lines and in primary MCs from patients with MCL.

A. Immunoblots of GLI1, 2, 3 in primary MCs from healthy control cord blood vs. to an MC line (a), and relative mRNA expression levels of GLI1, 2 and 3 in primary MCs sorted from patients with *KIT* WT MCL (MCL1) or *KIT* D816V MCL (MCL2) and in primary MCs from cord blood (n=4, b). **B.** Immunoblots of GLI1, 2 and 3 in ROSA and HMC1 lines. **C.** Immunoblots of GLI1, GLI3 and Bcl2 in ROSA *KIT* WT cell lines in a standard condition or in a starved condition before and after stimulation with SCF. **D.** Quantification of GLI3R/GLI3L relative protein expression (a) and correlation between GLI1 and GLI3R levels in MC lines (b). ***p<.001

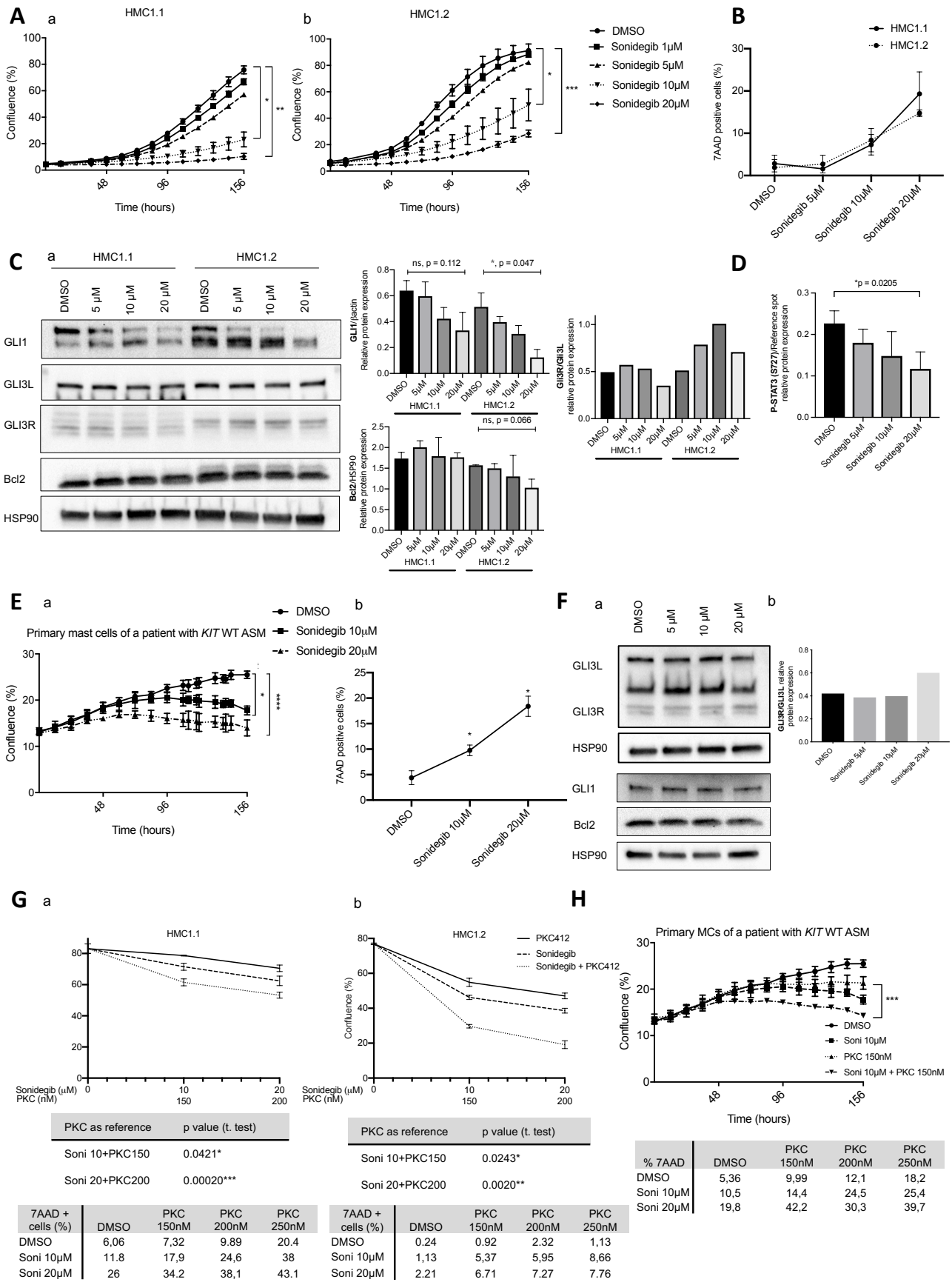


Figure 3.

Figure 3. The Hedgehog pathway is required for MC proliferation.

A. Time course of the proliferation of HMC1.1 (a) and HMC1.2 (b) lines treated with increasing concentrations of sonidegib or with DMSO. Cell confluence was measured during growth in a controlled environment, using live-cell imaging (IncuCyte). Proliferation (percentage confluence) is plotted against time (in hours) for HMC1. **B.** Death of HMC1.1 and HMC1.2 lines treated with increasing concentrations of sonidegib or with DMSO for 48hours. **C.** Immunoblots of GLI1, GLI3 and Bcl2 in HMC1.1 and HMC1.2 lines treated with increasing concentrations of sonidegib or with DMSO (a), and the corresponding protein expression levels for GLI1 (b), Bcl2 (c) and GLI3L/GLI3R (d). **D.** Quantification of P-STAT3 in the HMC1.2 line treated with increasing concentrations of sonidegib or with DMSO, using a phosphokinase array. **E.** Time course of proliferation (a) and death (b) of primary MCs sorted from a patient with *KIT* D816V ASM treated with increasing concentrations of sonidegib or with DMSO. **F.** Immunoblots of GLI3, GLI1 and Bcl2 in primary MCs sorted from a patient with *KIT* D816V ASM with increasing concentrations of sonidegib or with DMSO (a) and the corresponding quantification of GLI3L/GLI3R (b) relative protein expression. **G.** Proliferation (as the percentage confluence) and death of HMC1.1 (a) and HMC1.2 (b) after 156 hours of treatment with sonidegib and/or PKC412. **H.** Proliferation (percentage confluence) and death of primary MCs sorted from a patient with *KIT* D816V ASM after 156 hours of treatment with sonidegib and/or PKC412. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

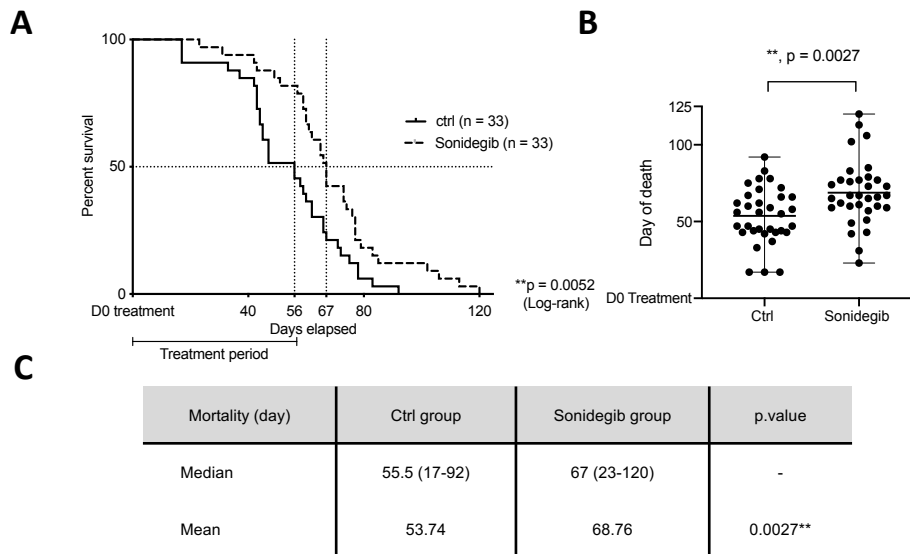


Figure 4.

Figure 4. Sonidegib is associated with a relative increase in the survival time of a humanized *in vivo* mouse model of KIT D816V+ ASM.

A. Survival analyses of NSG mice treated with sonidegib (n=33, 80 mg/kg/day) or placebo (ctrl, n=33) for 8 weeks, starting 7 weeks after being grafted with ROSA KIT D816V-Gluc. **B.** Mean survival time in NSG mice treated with sonidegib (80 mg/kg/day for 8 weeks). **C.** Mean and median death in ctrl vs. sonidegib groups. The data are representative of two independent experiments.

**p<.01.

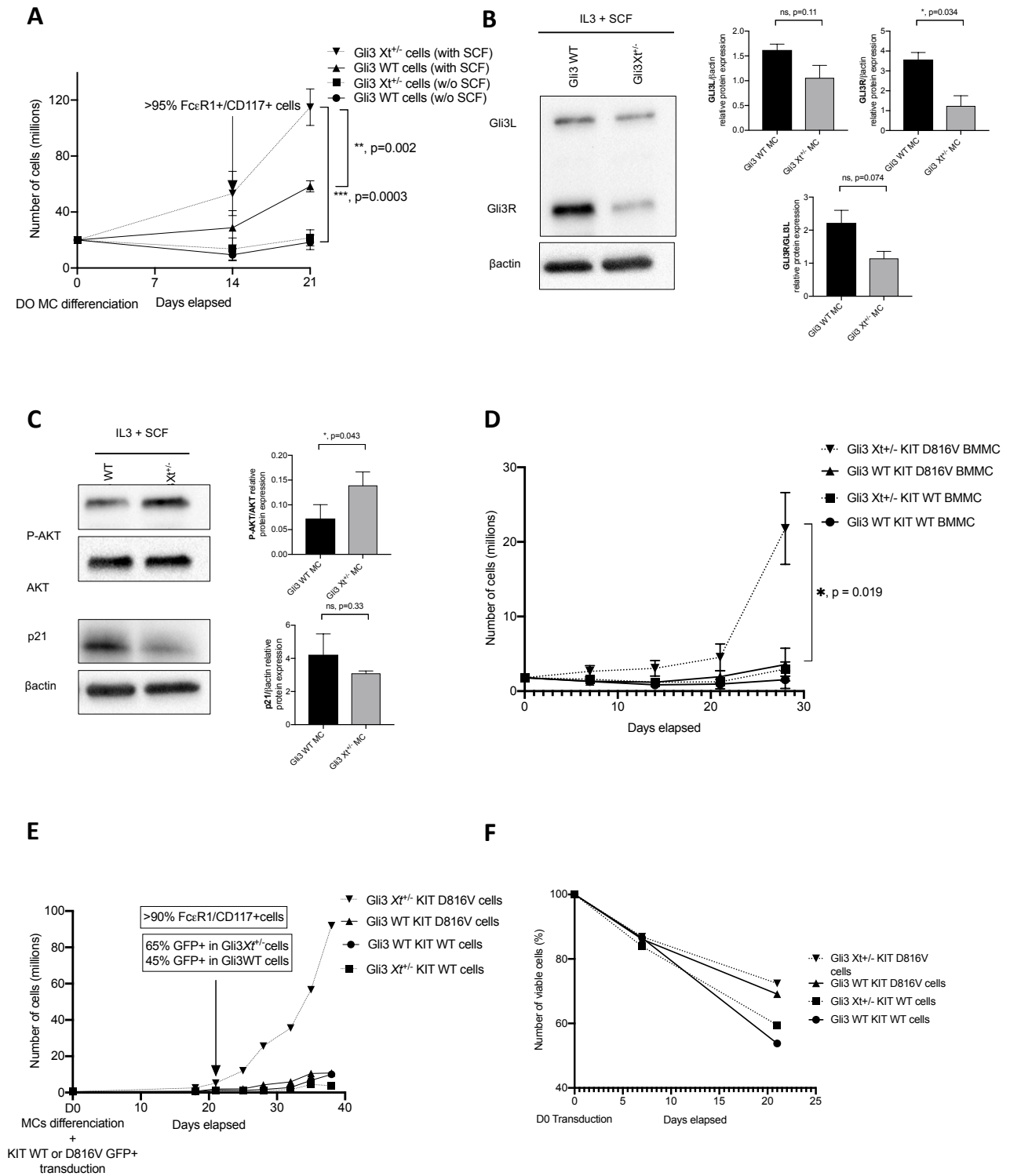


Figure 5.

Figure 5. Mutated GLI3 and KIT D816V act synergistically.

A. Whole bone marrow (WBM) proliferation for *Gli3*WT vs. *Gli3*Xt^{+/-} mice, and differentiation into MCs during growth in a controlled environment containing IL3 in the presence or absence of murine SCF. P-values were calculated at day 21. The data are representative of three independent experiments. **B.** Immunoblots of GLI3 in BMMCs from *Gli3*WT or *Gli3*Xt^{+/-} mice. **C.** Immunoblots of P-AKT, AKT and p21 in GLI3 in BMMCs from *Gli3*WT or *Gli3*Xt^{+/-} mice. **D.** Time course of the proliferation of BMMCs from *Gli3*WT or *Gli3*Xt^{+/-} mice after transduction with a lentivirus expressing KIT D816V-GFP or KIT WT-GFP. Cell proliferation was measured during growth in a controlled environment, using a Trypan Blue stain kit. The data are representative of three independent experiments. **E.** Whole BM proliferation for *Gli3*WT vs. *Gli3*Xt^{+/-} mice and differentiation into MCs after transduction with a lentivirus expressing KIT D816V-GFP or KIT WT-GFP. The data are representative of two independent experiments. **F.** Viability of MCs derived from whole BM *Gli3* WT or *Gli3*Xt^{+/-} mice after transduction with a lentivirus expressing KIT D816V-GFP or KIT WT-GFP. Cell viability was measured during growth in a controlled environment, using a 7AAD flow cytometry assay. *p<0.05, **p<.01, ***p<.001.

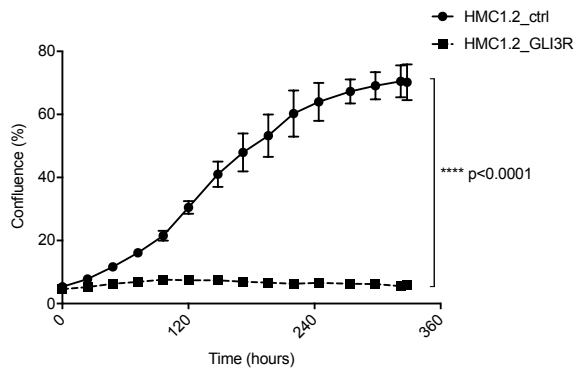
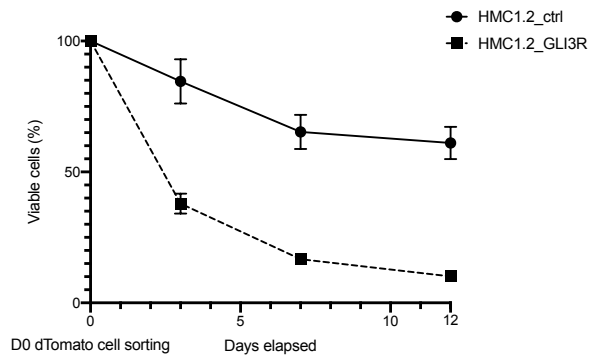
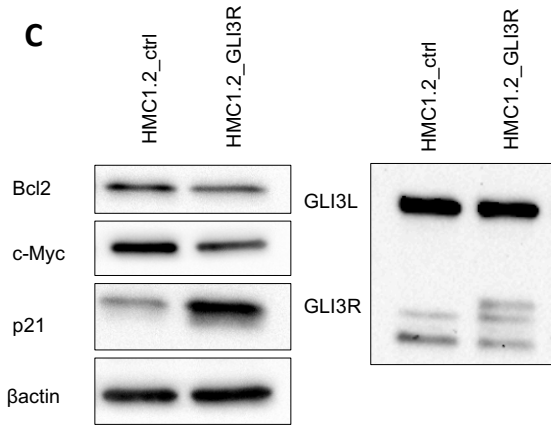
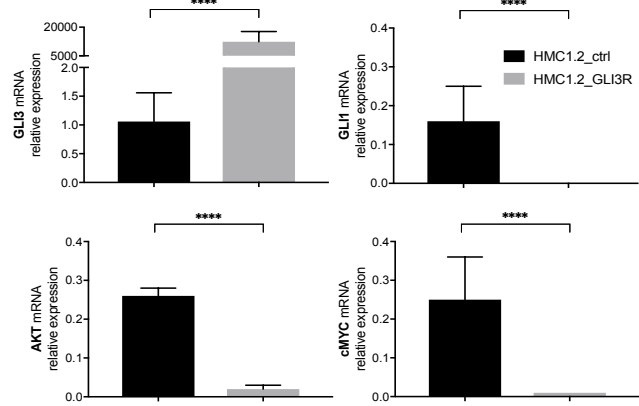
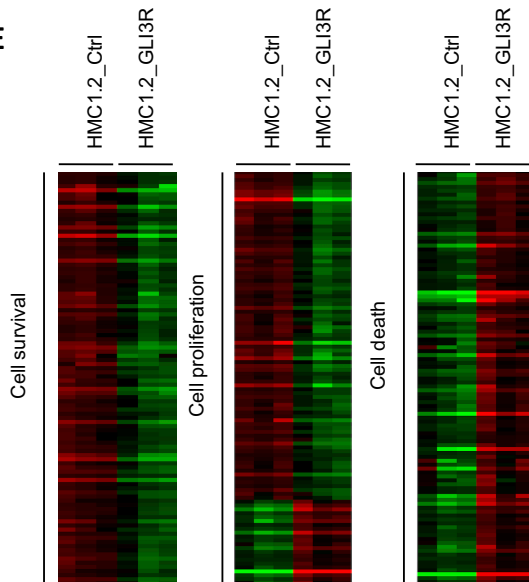
A**B****C****D****E****Figure 6.**

Figure 6. GLI3R behaves as a tumor suppressor in the HMC1.2 line.

A. Time course of proliferation of the HMC1.2 line infected with a lentivirus expressing dTomato-GLI3R or dTomato-control. Cell confluence was measured during growth in a controlled environment, using live-cell imaging (IncuCyte). Proliferation (percentage confluence) was plotted against time (in hours) for the HMC1.2 line infected with a lentivirus expressing GLI3R or control.

B. Time course of viability for the HMC1.2 line infected with a lentivirus expressing GLI3R vs. control. Cell viability was measured during growth in a controlled environment, using a flow cytometry assay of cell shape. **C.** Immunoblot analyses of Bcl2, c-Myc and p21 in the HMC1.2 line

infected with a lentivirus expressing GLI3R, vs. a control. **D.** Relative mRNA expression of GLI3, GLI1, AKT and c-Myc in the HMC1.2 line infected with a lentivirus expressing GLI3R, vs. a control.

E. Transcriptome analyses of the HMC1.2 line infected with a lentivirus expressing GLI3R, vs. a control. The heat maps show genes deregulated in the HMC1.2 line infected with a lentivirus expressing GLI3R vs. a control, as determined in the transcriptome analyses (see Methods).

***p<.0001

Online Methods

Molecular genetics

DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes by using the Nucleon BACC3 DNA extraction kit (GE Healthcare, Piscataway, NJ), according to the manufacturer's instructions. The suspected *GLI3* variants were confirmed by using Sanger sequencing. The PCR products were sequenced by using the Sanger method and a BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (version 3.1; Applied Biosystems, Foster City, Calif) and then analyzed with SeqScape software (version 3.0; Applied Biosystems). Samples of genomic DNA (1 µg) from Patient #1 and his parents, and from patients #2 and #3 and his parents underwent whole-exome sequencing. The exons were captured with an in-solution enrichment technique (Sure-Select Human All Exon Kits Version 3; Agilent, Massy, France) based on a biotinylated oligonucleotide probe library (Human All Exon v3 50 Mb; Agilent). Each genomic DNA fragment was sequenced by using the paired-end strategy and an average read length of 75 bases (Illumina HISEQ Sequencer; Illumina, San Diego, Calif). Image analysis and base calling were performed with the Illumina Real-Time Analysis pipeline (version 1.9, Illumina) by using its default parameters. Sequences were aligned with the Human Genome Project reference sequence (hg19 assembly), and single nucleotide polymorphisms were called on the basis of allele calls and read depth by using the Consensus Assessment of Sequence and Variation pipeline (version 1.8; Illumina). Genetic variations were annotated by using an in-house pipeline (IntegraGen, Evry, France), and the results for each sample were made available online for analysis with ERIS (<http://eris.integragen.com/>).

Primary fibroblast culture

Primary human fibroblasts were obtained from 4-mm punch biopsy specimens from Patient #1 and 3 healthy control subjects. Fibroblasts were cultured with Dulbecco's Modified Eagle Medium (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA).

Human mast cell lines

We routinely used *KIT* D816V⁺ neoplastic mast cell (MC) line ROSA *KIT* D816V, *KIT* Delta417-419InsY neoplastic MC line ROSA *KIT* Delta417-419InsY and *KIT* WT MC line ROSA *KIT* WT. ROSA *KIT* D816V and ROSA *KIT* Delta417-419InsY are stem cell factor (SCF)-independent cell lines. Briefly, ROSA *KIT* WT cell line was established from a CD34⁺ fraction of normal umbilical cord blood cells and was transduced with different *KIT* lentiviral vectors: *KIT* D816V⁺ and *KIT* Delta417-419InsY.²⁶ Another MC line called HMC1, SCF-independent, established from a patient with mast cell leukemia, was used. The two sublines of HMC1 are: i-HMC1.1 spontaneously containing the *KIT* G560V mutation and ii-HMC1.2 spontaneously containing two *KIT* mutations: G560V and D816V.²⁷ All mast cell lines were cultured in Iscove modified Dulbecco medium (IMDM, Thermo Fisher Scientific), supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (PAA Laboratories, Velizy Villacoublay, France) and other reagents, as previously described.²⁶ ROSA^{KIT D816V-Gluc} cells expressing the secreted *Gaussia princeps* luciferase (Gluc) were a gift from Michel Arock (INSERM UMRS1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France) and were cultured in the same medium.¹⁷

Primary mast cells

We generated human primary MCs derived from cord blood: CD34⁺ hematopoietic stem cells were isolated from cord blood using the BD FACS AriaTM II flow cytometer (BS Biosciences, San Jose, CA,

US) and were cultured in IMDM with SCF (100ng/ml, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and IL6 (50ng/ml, Miltenyi Biotec) throughout cultivation and IL3 (1ng/ml, Miltenyi Biotec) during the first week of culture, supplemented with 1% Bovine Serum Albumine (BSA, Merck, Darmstadt, Germany) and other reagents, as previously described. We sorted primary MCs from the peripheral blood of one patient with *KIT* WT mast cell leukemia (MCL) and from the bone marrow of one patient with *KIT* D816V+ aggressive systemic mastocytosis (ASM), using the BD FACS Aria™ II flow cytometer and using FcεR1 antibody eFluor 450 (48-5899-42, eBioscience™, Thermo Fisher Scientific) and CD117 antibody APC (17-1178-42, eBioscience™, Thermo Fisher Scientific). Flow cytometers were analyzed using FlowJo software v.7.2.5. All primary MCs were cultured in the same medium with SCF and IL6.

***In vitro* measurement of proliferation**

Time-course proliferation was measured: i-on MC lines (HMC1.1, HMC1.2, ROSA *KIT* WT/D816V/Delta417-419InsY) and on primary MCs sorted from a patient with *KIT* D816V ASM treated with increasing doses of sonidegib (S2151, Selleckchem, Houston, TX, USA - 5, 10 and 20μM +/- 1 and 40μM) or DMSO ; ii- on HMC1.1, HMC1.2 and primary MCs sorted from a patient with *KIT* D816V ASM treated with sonidegib (10 or 20μM) +/- PKC412 (S8064, Selleckchem - 150 or 200nM) and iii-on the same MC lines and on primary MCs sorted from a patient with *KIT* WT MCL treated with increasing doses of GANT61 (S8075, Selleckchem - 5, 10 and 20μM) or vismodegib (S1082, Selleckchem - 5, 10 and 20μM +/- 40μM). Time-course of proliferation was also performed on HMC1.2 infected with lentivirus expressing dTomato-GLI3R or dTomato-control (after cells sorted with dTomato). Cell confluence was measured during growth in a controlled environment, using live-cell imaging (IncuCyte; Essen BioScience, Welwyn Garden City, UK). Proliferation (as the percentage confluence) is plotted against time (in hours). Samples were monitored twice a day over six days. All the data are representative of 3 independent experiments.

Assessment of death *in vitro*

Flow cytometry of death was measured by 7-AAD staining (00-6993-50, eBioscience™, Thermo Fisher Scientific). Death was expressed as a percentage of 7AAD positive cells. Death of HMC1.1, HMC1.2, ROSA *KIT* WT/D816V/Delta417-419InsY, primary MCs sorted from a patient with *KIT* WT MCL and primary MCs sorted from a patient with *KIT* D816V ASM treated with increasing doses of sonidegib or GANT61 was measured after 48hours of treatment. All the data are representative of 3 independent experiments.

Immunoblotting analysis

HMC1.1 and HMC1.2 MC lines and primary MCs sorted from a patient with *KIT* D816V ASM were treated with increasing doses of sonidegib (5, 10 and 20μM) or DMSO for 48 hours. Cells were then lysed in RIPA buffer (150 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, and 50 mmol/L Tris-HCl [pH 8]) with protease inhibitors (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Western blotting was performed by using mouse anti-GLI1 antibody (diluted 1:1000, sc-515751, Santa Cruz, Biotechnology, Heidelberg, Germany) rabbit anti-GLI2 antibody (diluted 1:1000, HPA074275, Sigma-Aldrich, St Louis, Mo, US), rabbit anti-GLI3 (diluted 1:1000, PA5-28029, Thermo Fisher Scientific) and mouse anti-Bcl2 antibody (diluted 1:1000, IR61461-2, Agilent Dako, Santa Clara, CA, US). Bound antibodies were visualized with horseradish peroxidase-conjugated antibodies against rabbit or mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology) and an Enhanced Chemiluminescence kit (SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate; Thermo Fisher Scientific). Western blotting was performed on ROSA *KIT* WT and ROSA *KIT* D816V cell lines, treated with increasing doses of GANT61 (5, 10 and 20μM) or DMSO for 48 hours, with a mouse anti-panAKT antibody (diluted 1:2000, #2920, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, US), a

rabbit anti-mTOR antibody (diluted 1:1000, #2972, Cell Signaling Technology), a mouse anti-c-Myc antibody (diluted 1:1000, VPA00575, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), a mouse anti-Caspase 3 antibody (diluted 1:1000, sc-7272, Santa Cruz), a mouse anti-Bclxl antibody (diluted 1:1000, sc-56021, Santa Cruz) and anti-Bcl2. Western blotting was also performed on starved ROSA KIT WT stimulated with 100ng/ml SCF for 6 and 24 hours with anti-GLI1, anti-GLI3 and anti-Bcl2 antibodies.

Human phospho-kinase array

We performed a human phospho-kinase array (#ARY003C, RnD systems, Minneapolis, MN, USA) on HMC1.2 cells treating with increasing doses of sonidegib (5, 10, and 20 μ M) compared to DMSO, according to the company protocol. This phospho-kinase array detects the relative levels of phosphorylation of 37 kinase phosphorylation sites and 2 related total proteins. Data are representative of 3 independent experiments.

RNA extraction, RT-PCR, and real-time PCR

Total RNA was isolated from primary mast cells derived from cord blood, ROSA and HMC1 MC lines, HMC1.2 infected with lentivirus expressing dTomato-GLI3R or dTomato-control, and cultured fibroblasts by using the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. RNA samples were reverse transcribed into cDNA by using the High Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, US). Real-time PCR was carried out with the Fast SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) on an ABI Prism 7000 (PE Applied Biosystems). Quantitative RT-PCR primers were designed by using the sequences available in Ensembl and spanned an intron-exon boundary. Amounts of the various mRNAs were normalized against the amount of ACTB RNA in each sample (measured by using quantitative RT-PCR). Results were analyzed with DataAssist (version 3.01; Applied Biosystems), which uses the comparative cycle threshold (ddCt) method. All experiments were performed in triplicates. All data are expressed as the means \pm SDs. Values were calculated by using an unpaired t test as follows.

Lentiviral vector production

pLenti-KIT WT and pLenti-KIT D816V were a gift from Patrice Dubreuil (CRCM, Marseille, France). pLenti-GLI3R-dTomato and pLenti-control-dTomato were a gift from James Briscoe (The Francis Crick Institute, London, UK). For virus preparation, pRetro-DSG1 or blank vector was cotransfected with jetPRIME reagent (Polyplus Transfection) and packaging vectors pGag/Pol and pVSVG into HEK293T cells. Infectious retroviruses were harvested at 24, 48, and 72 hours after transfection and filtered through 0.8- μ m-pore cellulose acetate filters. Recombinant retroviruses were concentrated by means of ultracentrifugation (2 hours at 20,000g) and resuspended in Hank balanced salt solution. Viral aliquots were frozen and stored.

Lentiviral transduction

HMC1.2 were seeded into 6-well plates (2 million of cells/well) and were infected twice with dTomato lentivirus containing (or not) GLI3R RNA at H0 (multiplicity of infection (MOI) = 2) and H12 (MOI=2). Seventy-two hours after, infected HMC1.2 were sorted using dTomato staining. Whole bone marrow from Gli3WT vs. Gli3Xt \pm mice (1 million of cells for each) and sorted MCs derived from WBM Gli3 WT or Gli3Xt \pm mice (2 million cells for each) were seeded into 12 or 6-well plated respectively and were infected twice with a lentivirus expressing KITD816V-GFP or KITWT-GFP at H0 (MOI=1.5) and H12 (MOI=1.5) after transduction with a lentivirus expressing

KITD816V-GFP or KITWT-GFP. Seventy-two hours after, we performed a flow cytometer using GFP staining to assess the infection rate.

Transcriptomic analyses

Microarray experiments were performed on Affymetrix GeneChip® Human Transcriptome Array 2.0 (a genome wide array with 70523 probe sets). Raw data CEL files were imported in R/Bioconductor using the Oligo package. Expression levels were calculated using the RMA algorithm from the affy package and flags were computed using a custom algorithm within R. Assuming that a maximum of 80% of genes are expressed, we selected the 20% lowest values for each microarray as background. A threshold was fixed at two standard deviations over the mean of the background. All probes which normalized intensity measures were lower than the computed threshold, were flagged 0 instead of 1. An unsupervised analysis step was done by clustering prior to any supervised statistical comparison to unveil natural groups among the tested samples and detect potential outliers. For each comparison, the list was created, filtering probes flagged as « background » for at the most half of the samples according to flagged measurement in the relevant chips. Group comparisons were done using Student's t test and lists were filtered at p.values \leq 5% and fold change \geq 1.2. Heat maps analysis have been created using custom R script and the Java TreeView software. Functional analyses of the resulting lists of genes were performed with Ingenuity Pathway Analysis (<http://www.ingenuity.com>).

Gli3WT and Gli3Xt^{+/-} mice

C57BL/6J Gli3WT and Gli3Xt^{+/-} mice were a gift from Professor Ulrich R  ther (Institute of Animal Developmental and Molecular Biology, Heinrich Heine University, D  sseldorf, Germany).

Murine bone-marrow-derived mast cells (BMMC)

BMMC were obtained by culturing bone marrow cells from the femurs and tibias of Gli3WT and Gli3Xt^{+/-} mice in IMDM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Thermo Fisher Scientific), 1% glutamine, 1% penicillin/streptomycin (Life Technologies) containing recombinant murine IL-3 at 10 ng/ml (Miltenyi Biotec) +/- recombinant murine SCF at 10ng/ml (Miltenyi Biotec). To assess the rate of MCs, we performed a flow cytometer using mouse anti-Fc  R1 PE (12-5898-82, eBioscienceTM, Thermo Fisher Scientific) and mouse anti-CD117 APC eFluorTM 780 (47-1171-82, eBioscienceTM, Thermo Fisher Scientific) stainings. In another experiment, whole bone marrow was infected with a lentivirus expressing KITD816V-GFP or KITWT-GFP and were cultured in the same medium than for BMMCs with mouse IL-3 (10ng/ml) + SCF (10ng/ml)

Light microscopy

Skin biopsy specimens were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, and processed by using standard procedures. Three-micrometer-thick sections were stained with hematoxylin and eosin reagent and examined under LEICA DFC280 light microscopy (Leica, Buffalo Grove, Ill) at different magnifications. Images were acquired with Leica Application Suite Software.

Immunohistochemical analysis of skin and esophageal biopsy specimens

Immunohistochemistry of skin biopsy was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded sections. After the deparaffination steps, reactions were carried out according to the automatized system Bond (A. Menarini Diagnosis system, Firenze, Italy). Staining was performed with the Menarini refine

detection kit. Anti-CD117 (Abcam), anti-SHH (EP1190Y, Abcam, Cambridge, MA, USA), anti-GLI1 (ab151796, Abcam), anti-GLI2 (GTX46056, Euromedex, Souffelweyersheim, France) and anti-GLI3 (HPA005534, Atlas antibodies, Stockholm, Sweden) antibodies were used.

Xenogeneic transplantation of ROSA *KIT* D816V-Gluc cells in NOD-SCID IL-2R $\gamma^{-/-}$ mice

NOD-SCID γ mice were bred and maintained under specific pathogen-free conditions at the animal facility of the Saint Louis Hospital, Paris, France. Animal experiments were performed in accordance with guidelines established by the Institutional Animal Committee. Ten million cells of ROSA *KIT* D816V-Gluc were injected in the tail vein of immune-deficient NOD-SCID γ mice 24 hours ($n = 33$ per group) after 2.5 Gy X-ray irradiation of the mice. Seven weeks after reconstitution, xenografted mice were randomly assigned into 2 groups according to their level of secreted luciferase for treatment, as follows: a group of 33 mice treated with sonidegib at 8mg/kg/mouse/day, 5 days a week and a group of 33 mice treated with placebo (water). Duration of treatment was 8 weeks.

Measurement of Gluc activity *ex vivo* in peripheral blood

Grafting was controlled by measuring luciferase activity in the peripheral blood of mice, weekly (data not shown). Blood samples were collected in EDTA-precoated vials (Thermo Fisher Scientific). Gluc activity was determined in a 10- μ L sample of plasma by adding 100 μ L water-soluble Gluc substrate coelenterazine (50 μ g/mL), followed by the immediate acquisition of photon counts, using a luminometer.

Other Reagents

Mouse anti-p21 (diluted 1:1000, sc-6246, Santa Cruz), rabbit anti-PAKT (diluted 1:1000, #4060, Cell Signaling Technology), mouse anti- β -actin (diluted 1:5000, sc-1031-05, Santa Cruz) and mouse anti-HSP90 antibodies were used.

Study approval

Clinical investigations were conducted according to Declaration of Helsinki principles and approved by the local ethics committee. Written informed consent was provided for a picture of the Patient #1 appearing in the article. All patients, parents, and control subjects provided informed consent for genetic studies.

Statistical analysis

Results were expressed as the means \pm SDs. Statistical significance was determined by using unpaired 2-sample t tests (equal variance). All data were normally distributed, and variance was similar in groups that were compared in statistical tests. The threshold for statistical significance was set at a P value of less than .05. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Supplementary Figures

L. Polivka, V. Parietti, E. Soucie, et al. The association of Greig cephalopolysyndactyly syndrome and mastocytosis in children reveals the hedgehog signaling pathway's involvement in mastocytosis

- **Figure S1.** Bone marrow (BM) biopsy of Patient #1.
- **Figure S2.** Patient #1 fibroblast survival.
- **Figure S3.** Efficacy of sonidegib on ROSA proliferation and death.
- **Figure S4.** Efficacy of GANT61 on HMC1 and ROSA proliferation and death.
- **Figure S5.** Immunoblots of GLI1, mTOR, AKT, c-MYC, Caspase3, Bcl-x1 and Bcl2 ROSA *KIT* WT and ROSA *KIT* D816V treated with increasing doses of GANT61 or DMSO.
- **Figure S6.** Efficacy of GANT61 on proliferation and death of primary MCs sorted from a patient with *KIT* WT MCL.
- **Figure S7.** Efficacy of vismodegib in MC lines.
- **Figure S8.** Efficacy of vismodegib in primary MCs sorted from a patient with *KIT* WT MCL.

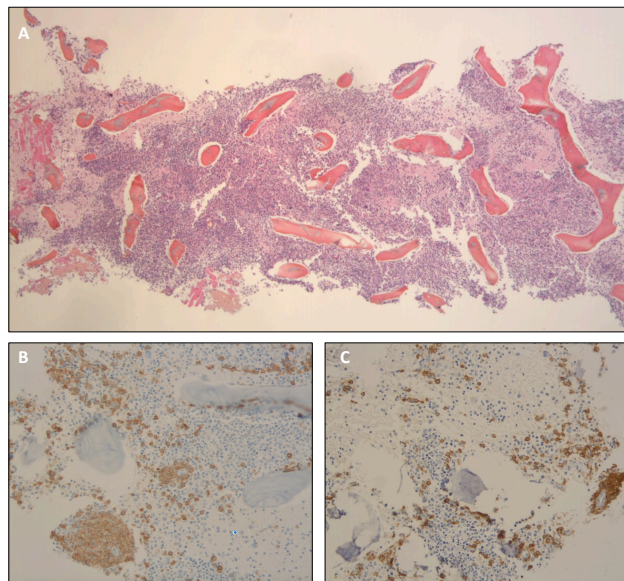


Fig. S1. Bone marrow (BM) biopsy of Patient #1. BM histology showing multifocal dense mast cell infiltration through the bone marrow (A). Immunohistochemical analysis of BM section showing that cell infiltrates are CD117 (B) positive and CD25 positive (C), x 50 magnification for A and x 200 magnification for B and C).

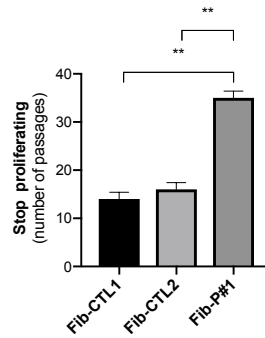


Fig. S2. Patient #1 fibroblast survival. Patient #1 fibroblasts (Fib-P#1) stopped proliferating at passage 35 (mean) while Control 1 and 2 fibroblasts (Fib-CTL1 and Fib-CTL2) stopped proliferating at passages 14 and 16, respectively. Data are representative of 2 experiments. ** $p < .01$

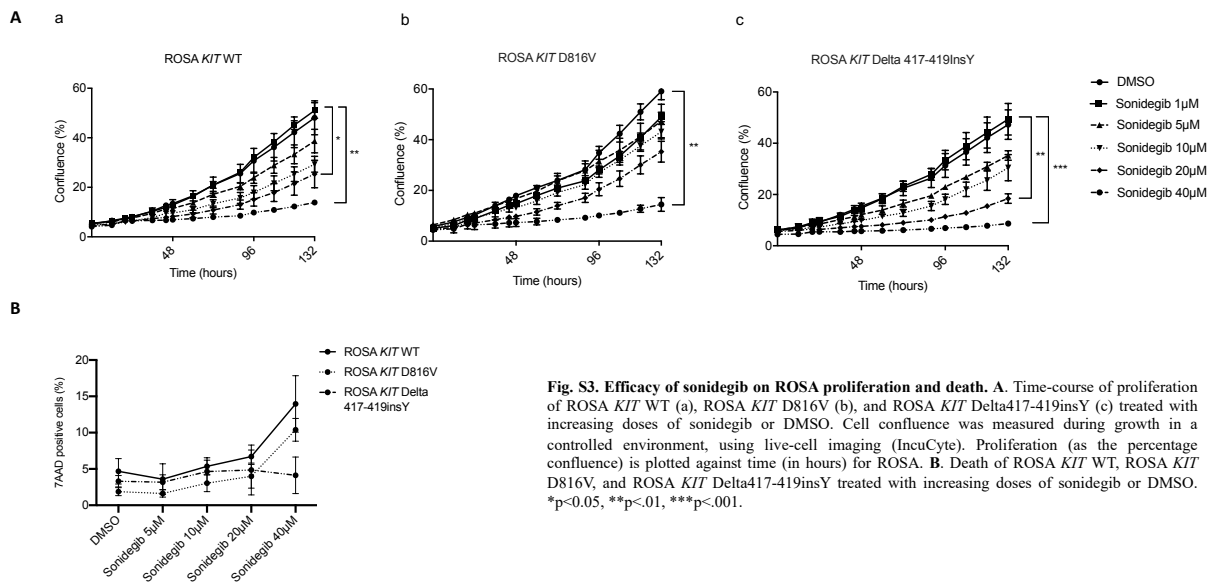


Fig. S3. Efficacy of sonidegib on ROSA proliferation and death. **A.** Time-course of proliferation of ROSA *KIT* WT (a), ROSA *KIT* D816V (b), and ROSA *KIT* Delta417-419insY (c) treated with increasing doses of sonidegib or DMSO. Cell confluence was measured during growth in a controlled environment, using live-cell imaging (IncuCyte). Proliferation (as the percentage confluence) is plotted against time (in hours) for ROSA. **B.** Death of ROSA *KIT* WT, ROSA *KIT* D816V, and ROSA *KIT* Delta417-419insY treated with increasing doses of sonidegib or DMSO. * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$.

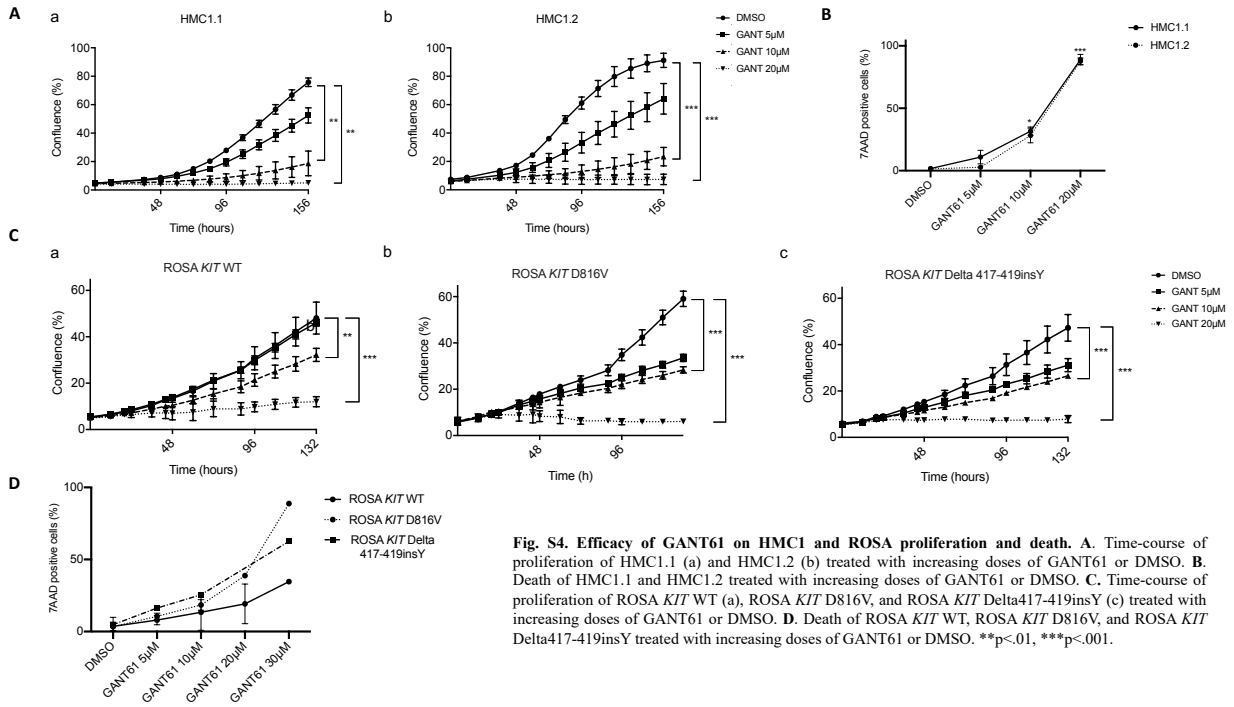


Fig. S4. Efficacy of GANT61 on HMC1 and ROSA proliferation and death. A. Time-course of proliferation of HMC1.1 (a) and HMC1.2 (b) treated with increasing doses of GANT61 or DMSO. B. Death of HMC1.1 and HMC1.2 treated with increasing doses of GANT61 or DMSO. C. Time-course of proliferation of ROSA *KIT* WT (a), ROSA *KIT* D816V, and ROSA *KIT* Delta417-419insY (c) treated with increasing doses of GANT61 or DMSO. D. Death of ROSA *KIT* WT, ROSA *KIT* D816V, and ROSA *KIT* Delta417-419insY treated with increasing doses of GANT61 or DMSO. ** $p < .01$, *** $p < .001$.

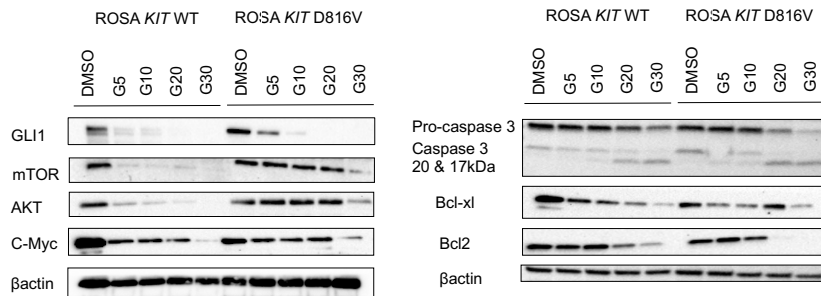


Fig. S5. Immunoblots of GLI1, mTOR, AKT, c-MYC, Caspase3, Bcl-xl and Bcl2 ROSA *KIT* WT and ROSA *KIT* D816V treated with increasing doses of GANT61 or DMSO.

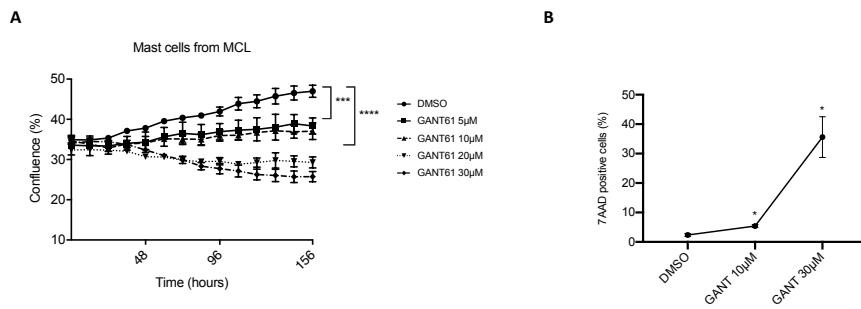


Fig. S6. Efficacy of GANT61 on proliferation and death of primary MCs sorted from a patient with KIT WT MCL. Time-course of proliferation (A) and death (B) of primary MCs sorted from a patient with KIT WT MCL treated with increasing doses of GANT61 or DMSO. ** $p < .01$, *** $p < .001$, **** $p < .0001$.

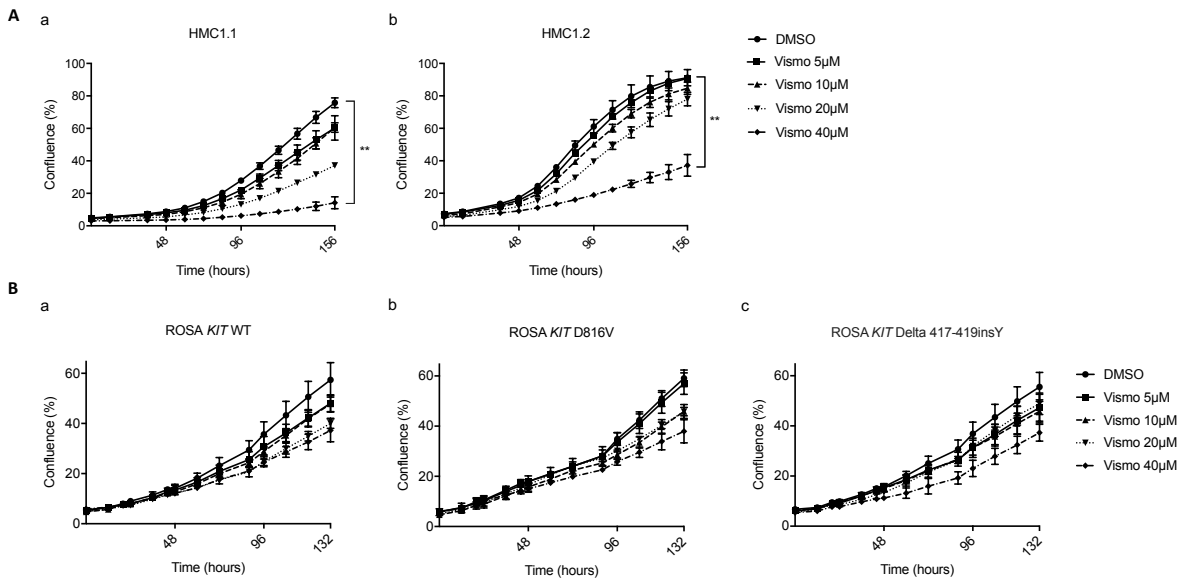


Fig. S7. Efficacy of vismodegib in MC lines. A. Time-course of proliferation of HMC1.1 (a) and HMC1.2 (b) treated with increasing doses of vismodegib or DMSO. Cell confluence was measured during growth in a controlled environment, using live-cell imaging (IncuCyte). Proliferation (as the percentage confluence) is plotted against time (in hours) for ROSA. B. Time-course of proliferation of ROSA KIT WT (a), ROSA KIT D816V, and ROSA KIT Delta417-419insY (c) treated with increasing doses of vismodegib or DMSO. ** $p < .01$.

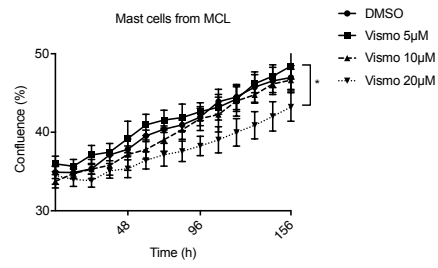


Fig. S8. Efficacy of vismodegib in primary MCs sorted from a patient with *KIT* WT MCL. Time-course of proliferation of primary MCs sorted from a patient with *KIT* WT MCL treated with increasing doses of vismodegib or DMSO. * $p < 0.05$

4. DISCUSSION

4.1 RÉSUMÉ, DISCUSSION ET PERSPECTIVES DE L'ARTICLE 1 : PEDIATRIC MASTOCYTOSIS : A LONG-TERM FOLLOW-UP AND CRITERIA OF REGRESSION

4.1.1 RESUME DE L'ARTICLE 1

Nous avons analysé une large cohorte de patients atteints de mastocytose pédiatrique (n=610) et défini des facteurs pronostiques associés à la régression de la mastocytose à travers l'analyse de 272 patients suivis depuis au moins 8 ans (durée moyenne de la maladie : 12,93 ans). Les caractéristiques démographiques de la population étudiée étaient similaires à celles rapportées dans la littérature, à savoir une légère prédominance masculine (rapport homme/femme : 1,23), un âge moyen précoce au début de la maladie (301,2 jours), une fréquence relativement élevée de formes congénitales (42,3 %), une prédominance des mastocytoses cutanées maculo-papuleuses (77,6 %) par rapport au mastocytome (16,9 %) et au mastocytose cutanée diffuse (5,5 %), et un temps moyen de régression des lésions cutanées de 6,1 ans (Article 1, Tableau 2). Une grande minorité des patients (42,4 %) présentait une mutation ponctuelle dans le gène *KIT* sur le codon 816. Dans la même proportion (42,4%) les patients présentaient des mutations dites « pédiatriques » dans le domaine extramembranaire ou transmembranaire de *KIT*. Aucune corrélation génotype-phénotype n'a été retrouvée.

Nous avons montré, pour la première fois, qu'une régression spontanée des lésions cutanées étaient statistiquement associée au caractère congénital de la mastocytose, mais aussi et de façon surprenante à la mutation *KIT* D816V. Ainsi, la mutation *KIT* D816V alors qu'elle est associée à une maladie persistante chez l'adulte, elle est associée de façon significative à la régression de la mastocytose chez l'enfant. Les différences mutationnelles dans le gène *KIT* n'expliquent donc pas à elles seules les différences phénotypiques observées entre ces deux populations.

La présente étude est la première à avoir porté sur un aussi grand nombre de cas et à avoir précisé les différents symptômes d'activation mastocytaire (SAMa) et leur évolution dans le temps. Les SAMa étaient fréquents chez les patients atteints de mastocytose cutanée (71,7 %) et ne semblaient pas liés à l'étendue de l'atteinte cutanée (Article 1, Tableau 3 et Figure E2). Ainsi, le type et le nombre de SAMa semblent être davantage liés à un défaut qualitatif des mastocytes malades qu'au nombre de mastocytes pathologiques impliqués.

De plus, bien que la régression des SAMa soit corrélée significativement à la régression des lésions cutanées, les symptômes de MCA ont continué à s'aggraver à l'âge adulte chez un sous-ensemble de

patients (19%) présentant une régression des lésions cutanées. La régression cutanée était clinique, aucune biopsie n'a été réalisée pour confirmer la régression ou la guérison histologique.

4.1.2 *L'ORIGINE EMBRYONNAIRE DES MASTOCYTES MUTES ET REGRESSION DE LA MASTOCYTOSE CHEZ L'ENFANT*

4.1.2.1 **Une origine embryonnaire double**

Jusqu'à très récemment, on ignorait si l'hématopoïèse primitive dérivée du sac vitellin – indépendante des CSH adultes - générait d'autres lignées hématopoïétiques que des érythrocytes, des mégacaryocytes et des macrophages.

Ginhoux et coll. ont montré pour la première fois en 2010 que les macrophages murins résidents du système nerveux central (ou microglie) étaient originaire de progéniteurs « pre-macrophages » du sac vitellin et non de CSH adultes.²³⁷ Plus récemment, il a été montré chez la souris qu'une partie des macrophages adultes résidant dans le foie (cellules de Kupffer), l'épiderme (cellules de Langerhans) et les poumons (macrophages alvéolaires), proviennent également de progéniteurs érythro-myéloïdes (PEM) distincts des CSH. Les PEM se développent dans le sac vitellin à 8,5 jours de vie embryonnaire, migrent et colonisent le foie foetal et donnent naissance à des érythrocytes, macrophages, granulocytes et monocytes foetaux jusqu'à au moins 16,5 jours. Par la suite, les cellules dérivées des CSH (localisées dans la moelle osseuse) remplacent les érythrocytes, les granulocytes et les monocytes. Les cellules de Kupffer, les cellules de Langerhans mais surtout la microglie ne sont que marginalement remplacées chez les souris âgées d'un an, tandis que les macrophages alvéolaires sont progressivement remplacés par des monocytes dérivés de CSH chez les souris vieillissantes.²³⁸⁻²⁴⁰ Ainsi, bien que classées en cellules hématopoïétiques, les macrophages résidents des tissus embryonnaires proviennent de précurseurs embryonnaires quiensemencent les tissus avant la naissance pour générer une population capable de s'auto-renouveler, qui se maintient indépendamment de l'hématopoïèse adulte (Figure 22).

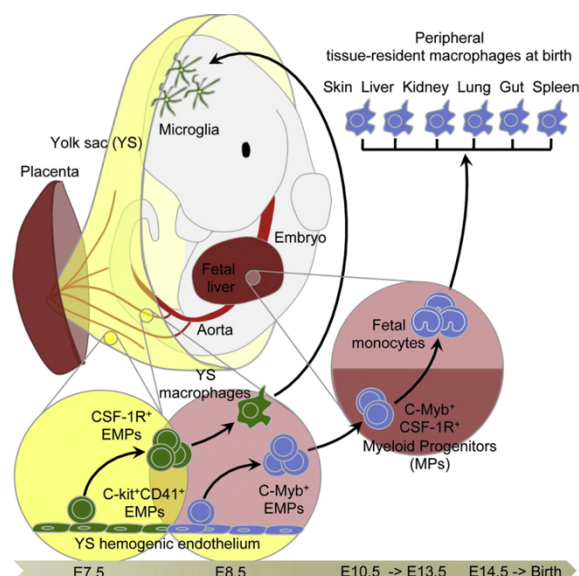


Figure 22. Deux origines aux macrophages résidents des tissus, d’après Hoeffel et coll.²⁴⁰

Gentek et coll. ont ensuite montré que les mastocytes murins, à l’image des macrophages, ont également une double origine embryonnaire : i- les mastocytes dérivés de précurseurs - indépendant des CSH - du sac vitellin qui sont recrutés dans la peau des embryons et ii- les mastocytes dérivés des CSH adultes (hématopoïèse définitive).⁹ Ainsi, ils ont montré que les mastocytes de la peau proviennent initialement du sac vitellin mais sont progressivement remplacés par des mastocytes dits « définitifs » dérivés de CSH chez l’adulte. Ces cinétiques de développement récapitulent globalement celles des macrophages résidant dans les tissus. Les mastocytes cutanés embryonnaires dérivés du sac vitellin présentaient un profil transcriptomique très différent des mastocytes adultes (Figure 23). En effet les mastocytes du sac vitellin n’expriment pas le FcεR1, mais expriment plus de gènes impliqués dans le développement embryonnaire (voie Wnt, Hedgehog, Notch1) suggérant que ces mastocytes exercent des fonctions de développement spécifique dans la peau embryonnaire. Les mastocytes définitifs expriment spécifiquement des gènes impliqués dans les systèmes nerveux et vasculaire, tels que ceux codant pour le récepteur cannabinoïde 1 (Cnr1), la neuropiline 1 (Nrp1), la vasorine (Vasn), le récepteur adrénergique β2 (Adrb2) et le Vegfc.

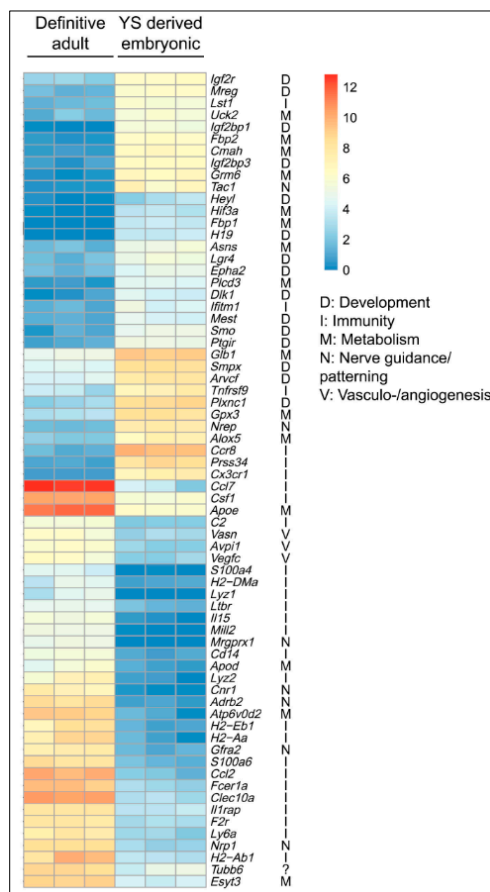


Figure 23. Heatmap montrant les principaux gènes différentiellement exprimés (avec un rapport d'au moins 3) entre les mastocytes issus du sac vitellin et ceux de l'adulte.⁹

4.1.2.2 Nouvelles hypothèses pour expliquer la régression de la mastocytose chez l'enfant

Bien que ces données n'aient pas encore été confirmées chez l'homme, à partir de cette étude, les différences phénotypiques observées entre les deux populations (enfants vs. adultes) c'est-à-dire la régression des lésions observées chez l'enfant et le caractère cutané pur des mastocytoses de l'enfant pourraient s'expliquer aussi par l'origine embryonnaire des mastocytes mutés et non uniquement par le type de mutation identifiée. Ainsi, si la mutation somatique dans le gène *KIT* s'effectue très précocement dans des mastocytes du sac vitellin, elle serait associée à une mastocytose régressive alors que si elle survient sur des mastocytes un peu plus tardifs issus du foie fœtal ou de la moelle osseuse totale, elle serait associée à une maladie persistante.

Au sein du laboratoire d'autres travaux ont été menés parallèlement par J. Bruneau, S. Georgin-Lavialle et coll. pour expliquer la régression de la mastocytose chez l'enfant (*manuscrit en préparation*). Ils ont émis l'hypothèse que les différences mutationnelles dans le gène *KIT* pourraient expliquer au moins en partie la régression chez les enfants par le maintien différentiel des télomères. Ils ont ainsi montré : i- *in vivo*, que la longueur des télomères des mastocytes des patients était significativement réduite chez les enfants porteurs de mutations *KIT* non 816 par rapport aux patients porteurs de mutations dans le codon 816 de *KIT* ; ii- *in vitro*, que les modèles cellulaires présentant une mutation *KIT* non 816 avaient

une plus grande sénescence et présentaient des télomères plus courts que les mutants *KIT* 816 ; iii- que le maintien des télomères n'était pas lié à une expression différentielle significative de hTERT (human telomerase reverse transcriptase), mais qu'il était corrélé à la localisation différentielle de TRF2, une protéine participant à la protection des télomères, qui était mal localisé dans les télomères de cellules ne présentant pas de mutation *KIT* 816 et iii- qu'une modification post-traductionnelle de TRF2 impliquant la voie p38 MAP-kinase était responsable de la transduction différentielle du signal dans les cellules mutées *KIT* non 816.

Probablement que ces deux hypothèses ne sont pas exclusives et possiblement intriquées. Il est nécessaire de poursuivre les investigations pour mieux comprendre la régression de la mastocytose chez l'enfant.

4.1.3 CORRELATION EVOLUTION SAMa VS. LESIONS CUTANÉES

Dans notre étude, l'aggravation des symptômes d'activation mastocytaire était significativement corrélée à la persistance ou à l'aggravation des lésions cutanées (OR=3.36, p=0.015). Mais malgré cette corrélation, 19% des patients qui présentaient des SAMa initialement et une régression des lésions cutanées, ont des SAMa qui persistent voir même qui s'aggravent au cours du temps. Cette observation témoigne d'une autonomisation des SAMa comme s'ils étaient plus dépendant d'un défaut qualitatif du mastocyte (défaut de régulation/contrôle de l'activation mastocytaire par exemple) que d'un défaut quantitatif (malgré une diminution du nombre de mastocytes pathologiques, aggravation des SAMa).

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette autonomisation des SAMa :

- la présence d'une ou plusieurs mutation(s) ou polymorphisme(s) dans un ou plusieurs gène(s) impliqué(s) dans l'activation mastocytaire dans le sous-groupe de patients sans corrélation ;
- des modifications épigénétiques ;
- ou encore le rôle de l'environnement, avec la présence de facteurs environnementaux qui seraient « responsables » de la persistance des SAMa au cours du temps.

Pour résoudre ces questions, il faudrait effectuer des recherches moléculaires plus approfondies en comparant notamment le groupe de patients qui corrélient (régression des lésions cutanées et des SAMa) et le groupe de patients qui ne corrélient pas (persistance des SAMa malgré la régression cutanée).

4.1.4 PERSPECTIVES

4.1.4.1 Analyser les mastocytes de lésions cutanées d'enfant vs adulte

Pour étayer notre hypothèse sur la régression des lésions cutanées chez l'enfant, nous allons comparer les mastocytes pathologiques de lésions cutanées de mastocytose congénitale (exemple mastocytome congénital) et ceux de lésions apparues à l'âge adulte (exemple mastocytose cutanée maculo-papuleuse débutant après 18 ans).

Cette comparaison sera :

- Transcriptomique : nous comptons donc réaliser un séquençage à haut débit du transcriptome de 10 lésions cutanées de mastocytoses néonatales que nous comparerons à 10 lésions cutanées de mastocytoses ayant débuté à l'âge adulte, après extraction des mastocytes.
- Histologique en collaboration avec le Dr Sylvie Fraitag, anatomo-pathologiste à l'hôpital Necker-Enfants Malades. En se basant sur l'étude de Gentek et coll., nous étudierons dans un premier temps l'expression du FcεR1 et de Nrp1 sur 10 biopsies de mastocytoses néonatales et sur 10 biopsies de mastocytose débutant à l'âge adulte. Les autres protéines étudiées dépendront des résultats du transcriptome.

4.1.4.2 Poursuivre l'étude de cohorte

Nous poursuivons l'étude de cohorte des 610 patients, afin d'identifier de nouveaux facteurs cliniques, biologiques et moléculaires associés à la régression de la mastocytose cutanée chez l'enfant, dans les prochaines années.

4.2 RÉSUMÉ, DISCUSSION ET PERSPECTIVES DE L'ARTICLE 2 : THE ASSOCIATION OF GREIG CEPHALOPOLYSYNDACTYLY SYNDROME AND MASTOCYTOSIS IN CHILDREN REVEALS THE HEDGEHOG SIGNALING PATHWAY'S INVOLVEMENT IN MASTOCYTOSIS

4.2.1 RESUME DE L'ARTICLE 2

Nous avons identifié chez 3 patients issus de 2 familles indépendantes qui présentaient l'association : i- d'une mastocytose congénitale et ii- d'un syndrome de céphalopolysyndactylie de Greig des mutations hétérozygotes perte de fonction dans le gène *GLI3* codant pour le principal répresseur de la voie Hedgehog. Nous avons montré i- que les principaux facteurs de transcription de la voie Hh (*GLI1*, *GLI2*, et *GLI3*) étaient exprimés dans les différentes lignées de mastocytes et dans les mastocytes primaires issus de patients atteints de formes sporadiques de mastocytoses agressives et ii- que l'expression des activateurs de la voie Hh *GLI1*, *GLI2L* et *GLI3L* étaient plus importantes dans les lignées ayant la mutation *KIT* D816V que dans les lignées *KIT* WT et dans les mastocytes issus de patients ayant une leucémie à mastocytes que dans les mastocytes dérivés de sujets sains (expression très faible); le niveau d'expression de *GLI3R* était inversement proportionnel à celui de *GLI1* dans ces différents types cellulaires et était corrélé à la prolifération. La stimulation par SCF des lignées ROSA *KIT* WT entraînait une nette augmentation de l'expression de *GLI1*, *GLI3* et *BCL2*, un des principaux gènes cibles de *GLI*. Ensemble, ces résultats indiquent que l'activation du récepteur *KIT* soit par la liaison du SCF soit par la présence de mutations activatrices est associée à une activation de la voie de signalisation Hh. Puis, nous avons montré que l'expression ectopique de *GLI3R* dans les lignées mastocytaires induisait rapidement la mort cellulaire montrant son rôle de suppresseur de tumeur dans les mastocytes. Afin de confirmer la capacité de l'haploinsuffisance de *GLI3* à induire les tumeurs, nous avons utilisé des souris *Gli3Xt^{+/-}*, modèle murin du syndrome de Greig, et nous avons montré que les mastocytes dérivés de la moelle osseuse de ces souris et transduits avec le vecteur *KIT*-D816V avaient un fort potentiel prolifératif par rapport aux témoins, confirmant la coopération oncogénique entre les voies Hh et *KIT*. Nous avons ensuite montré l'efficacité des inhibiteurs de la voie Hh, notamment le sonidegib, essentiellement sur la prolifération et à moindre degré sur l'induction de la mort des mastocytes néoplasiques de patients et des lignées mastocytaires *in vitro*, et sur la survie de modèles murins extrêmement agressifs de leucémie à mastocytes, *in vivo*. Nous avons aussi montré l'intérêt d'une association thérapeutique, sonidegib et inhibiteur de tyrosine kinase (midostaurin) *in vitro*. Ainsi, à partir de phénotypes rares de mastocytoses dans des contextes syndromiques germinaux particuliers, nous avons pu mettre en évidence un nouveau mécanisme impliqué dans la physiopathologie des mastocytoses agressives en général et identifier une nouvelle cible thérapeutique pour cette pathologie.

4.2.2 COOPERATION ONCOGENIQUE VOIE HEDGEHOG ET KIT

La transduction du lentivirus KIT D816V dans des mastocytes murins matures *Gli3Xt^{+/-}* entraîne un net pouvoir prolifératif par rapport aux mastocytes *Gli3Xt^{+/-}* transduits avec un lentivirus KIT WT ou par rapport aux mastocytes *Gli3WT* transduits avec un lentivirus KIT D816V (Figure 5D, article 2). De même, la transduction du lentivirus KIT D816V dans des moelles totales de souris *Gli3WT* vs. *Gli3Xt^{+/-}* à J0 de la différenciation mastocytaire, induit là encore une prolifération accrue de la population de mastocytes doublement mutée *Gli3Xt^{+/-}-KITD816V* par rapport aux moelles *Gli3WT-KITD816V* ou *Gli3Xt^{+/-}-KITWT* (Figure 5E, article 2). L'activation de la voie KIT par du SCF, lors de la différenciation mastocytaire, entraîne également un excès de prolifération des mastocytes doublement mutés *Gli3Xt^{+/-}-KITD816V* par rapport aux moelles *Gli3WT-KITD816V* ou *Gli3Xt^{+/-}-KITWT*.

Ces résultats témoignent de l'existence d'une coopération oncogénique entre les deux voies de signalisation, Hedgehog et KIT, qui va amplifier la survie, la prolifération et possiblement l'activation des mastocytes.

La coopération oncogénique entre ces deux voies semble s'opérer dans les deux sens :

- **L'activation de la voie KIT entraîne une activation des voies non canoniques Hedgehog** (Figure 24) : l'activation du récepteur KIT soit par la liaison du SCF soit par la présence de mutations activatrices est associée à une activation de la voie de signalisation Hh (Figures 2B et 2C, article 2). La Figure 24 schématise cette coopération. Dans le cadre de la mastocytose, l'activation aberrante de la voie KIT par le biais de mutation activatrice gain-de-fonction dans le gène *KIT* entraîne une activation des voies sous-jacentes et notamment de la voie PI3K-AKT-mTOR mais aussi des RAS-MAP kinases. Des études ont montré que ERK favorisait la translocation nucléaire du facteur de transcription activateur GLI1 et qu'AKT inhibait PKA empêchant ainsi la dégradation des GLI par le protéasome.^{179,180} Les mécanismes exacts d'interaction ne sont pas encore connus, et sont en cours d'étude dans le laboratoire.

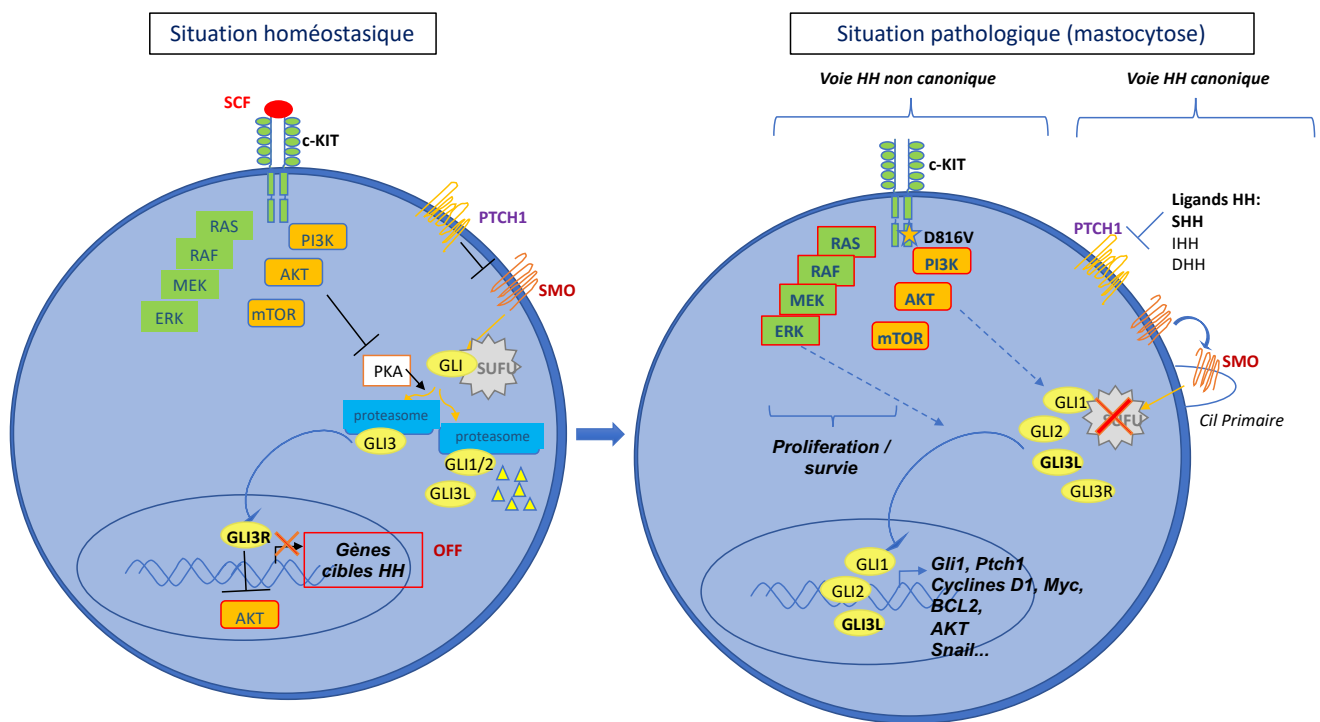


Figure 24. Mécanisme d'activation de la voie Hedgehog par la voie KIT.

- *L'activation de la voie de signalisation Hedgehog active la voie de signalisation KIT, à l'origine d'une boucle d'amplification.* Nous avons élucidé quelques mécanismes d'interaction via l'inhibition de la voie de signalisation Hh. L'inhibition de la voie canonique Hh dans les lignées mastocytaires HMC1.2 par le sonidegib entraîne :
 - o Une diminution de la phosphorylation de KIT. Ainsi l'inhibition d'un ou plusieurs gène(s) cible(s) Hh entraînerait une diminution de la phosphorylation de KIT (Figure 25).

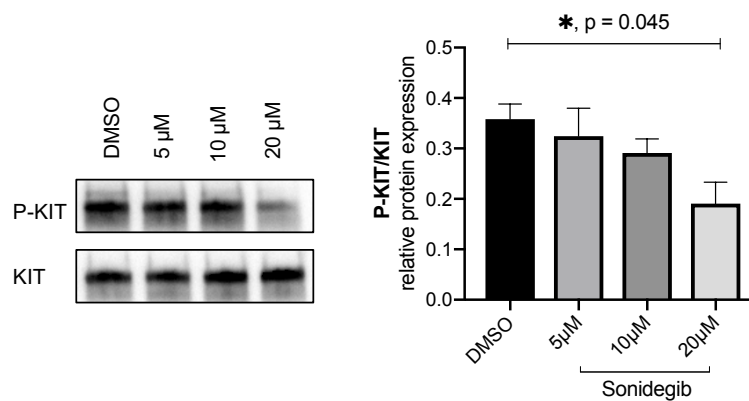


Figure 25. Western-Blot de P-KIT et KIT à partir de lignées HMC1.2 traitées par des doses croissantes de sonidegib versus DMSO. Ces résultats étant très préliminaires, nous avons le fais le choix de ne pas les montrer dans le manuscrit en préparation dans un premier temps.

- o Une diminution de la phosphorylation de la serine 727 de STAT3 comme en témoigne les résultats du phosphokinase array de la Figure 3D de l'article 2. La phosphorylation de STAT3 sur le résidu serine 727 peut s'opérer *via* différentes kinases : ERK, CDK1, ATM et ATR.^{241,242} A ce jour, il est suggéré que la phosphorylation de Ser727 pourrait être essentielle pour l'activité transcriptionnelle maximale de STAT3 phosphorylée sur la tyrosine 705, bien que l'impact réel de la phosphorylation de la serine 727 demeure quelque peu controversé. En utilisant des lignées tumorales de cancer de prostate (LNCaP) présentant une mutation activatrice S727E sur *STAT3* ou une allèle *STAT3* sauvage, Qin et coll. ont montré que la mutation S727E était associée à un avantage prolifératif notable dans un milieu de culture pauvre en facteurs de croissance, à une augmentation du nombre de colonies sur gel d'agarose, et à une tumorigénicité accrue chez les souris immunodéficientes (NOD/SCID), possiblement par activation directe des proto-oncogènes en aval c-Myc, Mcl-1, et Survivin (ceci indépendamment de la phosphorylation de Tyr705).²⁴³ A noter que *CDK1*, et possiblement *ATR*, sont des gènes cibles potentiels des GLI, ce qui pourrait, au moins en partie, expliquer la diminution de la phosphorylation de STAT3 induite par le sonidegib.^{244,245} Par ailleurs, il a été récemment montré que GLI1 et STAT3 étaient surexprimés dans le cancer du sein triple négatif, et que cette expression était associée à un mauvais pronostic.²⁴⁶ STAT3 peut se fixer sur les promoteurs des gènes cibles de GLI1 (*GLI1* et *PTCH1* notamment) et GLI1 peut aussi se fixer sur les sites de liaison à l'ADN de STAT3, témoignant de l'interaction étroite entre ces deux protéines. GLI1 et STAT3 forment aussi un complexe nucléaire permettant l'activation des gènes R-Ras2, Cep70, et UPF3A dans des lignées de cancer du sein. L'expression élevée de ces gènes est associée à une moins bonne survie sans métastases.²⁴⁶ Ces résultats témoignent de l'interaction directe entre STAT3 et GLI1.

Quelques auteurs ont déjà montré l'existence d'une interaction entre ces deux voies de signalisation. Premièrement, Cain et coll. ont démontré que GLI3 réprime l'expression de l'ARNm de *KIT* dans les cellules urétérales murines.²⁴⁷ Plus récemment, Tang et coll. ont montré qu'il existait une interaction entre les voies KIT et Hedgehog dans les GIST. En effet, l'expression de GLI3, est inversement corrélée avec les taux d'ARNm de *KIT* dans les cellules de GIST et l'inhibition de la voie Hh par le GANT61 diminue l'expression de de l'ARNm de *KIT*.²⁴⁸ Dans notre étude, l'analyse du RNAseq comparant les HMC1.2 GLI3R vs. HMC1.2 CTL (Figure 6E, article 2) n'a pas retrouvé de différence significative dans l'expression de *KIT* mais l'expression était extrêmement élevée dans les deux cas (en raison de la lignée cellulaire étudiée ici qui exprime fortement KIT D816V). La très forte expression de KIT peut masquer une éventuelle différence.

4.2.3 IMPLICATION DE LA VOIE HEDGEHOG AU COURS DES FORMES SPORADIQUES DE MASTOCYTOSE

Bien qu'il soit évident que chez nos 3 patients, avec ce contexte syndromique germinal particulier, l'activation de la voie Hedgehog est directement liée aux mutations perte de fonction (par haploinsuffisance) dans le gène *GLI3*, les mécanismes à l'origine de l'activation aberrante de cette voie retrouvée dans les mastocytes tumoraux de formes sporadiques (Figure 2, article 2) ne sont pas encore élucidés. Plusieurs hypothèses sur lesquelles nous travaillons sont envisageables :

- *L'association d'un ou plusieurs polymorphisme(s) dans le gène GLI3 qui serai(en)t responsable(s) d'une perte, au moins partielle, de fonction de GLI3 et notamment GLI3R, par haploinsuffisance ;*

Nous avons retrouvé chez plusieurs patients la présence de plusieurs polymorphismes (très fréquents) dans le gène *GLI3*. Par exemple, chez un patient présentant une mastocytose agressive congénitale avec deux polymorphismes dans le gène *GLI3* [c.A632G / p.T183A (exon 5) et c.C3078T / p.P998L (exon 15), fréquence estimée à 54.5% et 43.4%, respectivement, dans la population générale], nous avons montré qu'il existait une diminution d'expression de *GLI3*, et notamment *GLI3R*, dans ses fibroblastes primaires comparés à 3 témoins (Figure 26).

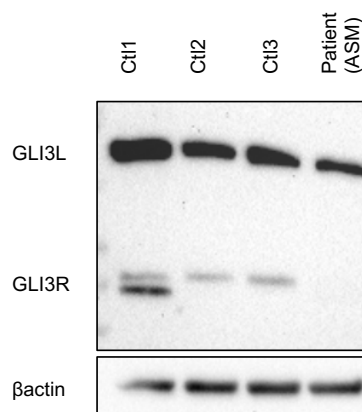


Figure 26. Expression de *GLI3L* et de *GLI3R* par Western Blot dans les fibroblastes d'un patient présentant une mastocytose agressive congénitale par rapport à des fibroblastes de contrôles sains (n=3).

- *La présence de mutations somatiques soit gain-de-fonction dans les gènes activateurs soit perte-de-fonction dans les gènes répresseurs de la voie Hedgehog notamment GLI3. Hypothèse non testée au laboratoire ;*
- *Des modifications épigénétiques entraînant des modifications d'expression des gènes cibles ou des principaux facteurs de transcription de la voie Hedgehog. Dans les LAM par exemple, Chaudhry et coll. ont montré que *GLI3* était hyperméthylé dans une cohorte de patients atteints de LAM.²¹¹ L'association de la decitabine permettait de rendre ainsi sensible des lignées de LAM à un inhibiteur de Hh, le glasdégib, en réactivant l'expression de *GLI3*. Dans le cadre de la mastocytose, il a été montré qu'environ 20-40% des formes agressives présentaient des*

mutations perte-de-fonction dans le gène *TET2*, gène suppresseur de tumeur impliqué dans la déméthylation de l'ADN.^{130,249} Nous pouvons faire l'hypothèse que *GLI3* soit une cible déméthylée par *TET2*, ces mutations dans *TET2* seraient ainsi associées à une hyperméthylation de *GLI3*. Les premiers résultats sur les RNAseq de mastocytes de patients mutés *TET2* vs. *TET2* WT (préalablement réalisés dans le laboratoire du Docteur Patrice Dubreuil au CRCM de Marseille) ne vont pas dans le sens de cette hypothèse car *GLI3* semble très peu exprimé dans les deux cas.

Nous prévoyons de tester cette hypothèse en analysant notamment les signatures transcriptomiques des mastocytes de patients mutés *TET2* vs. non mutés *TET2* et de regarder l'expression des gènes cibles de la voie Hedgehog.

- Une activation accrue de la voie canonique Hedgehog en situation pathologique (mastocytose) pouvant s'expliquer par deux mécanismes : i- les cellules stromales du micro-environnement tumoral local (médullaire) secrèteraient davantage de ligands Hh comme cela a été décrit dans d'autres cancers (action paracrine) ou ii- les mastocytes tumoraux eux-mêmes secrèteraient plus de ligands Hh (action autocrine, paragraphe 1.3.4 de l'introduction). A l'état basal (non stimulé), les lignées *ROSA KIT D816V* expriment le ligand Hh, *SHH*, alors que les *ROSA KIT WT* n'en expriment pas (Figure 27). De plus, l'IHC *SHH* réalisée sur les biopsies de peau du Patient#1 (Figure 1, article 2) confirme une forte expression du *SHH* par les mastocytes pathologiques du patient. Ces résultats sont en faveur d'une action autocrine des mastocytes pathologiques participant à l'activation de la voie canonique Hedgehog. Cette activation autocrine pouvant être expliqué, au moins en partie, par la mutation *KIT*, témoignant là encore d'une coopération entre la voie *KIT* et Hedgehog.

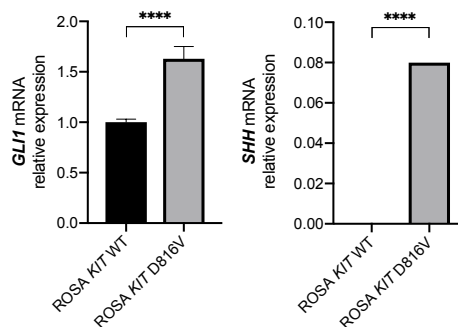


Figure 27. Expression de *SHH* et *GLI1* par RT-qPCR dans les lignées *ROSA KIT WT* comparée aux lignées *ROSA KIT D816V*.

- Une expression de *tGLI1* dans les mastocytes néoplasiques qui résulte d'un épissage alternatif de *GLI1*. *tGLI1* présente une délétion de 41 acides aminés par rapport à *GLI1* mais conserve tous ses domaines fonctionnels, et est aussi activé par l'axe de signalisation *SHH-PTCH1-SMO*. *tGLI1*

a la capacité de réguler les gènes cibles de GLI1, mais acquiert la capacité d'augmenter l'expression de sept autres gènes qui ne sont pas régulés par GLI1 : VEGF-A, VEGF-C, VEGFR2, TEM7, HPSE, CD24 et CD44, favorisant la croissance, l'angiogenèse, la migration et l'invasion des cellules de gliome *in vivo* et des cellules de cancer du sein *in vitro*.^{246,250} Il a été montré que tGLI1 est exprimé uniquement dans les cellules tumorales de carcinome hépato-cellulaires ou de cancer du sein, et non dans les tissus sains correspondants.^{251,252} D'autre part, une augmentation du rapport tGLI1/GLI1 est observé dans les ganglions tumoraux de cancers du sein avec métastases cérébrales comparés aux ganglions tumoraux de cancers du sein sans métastases cérébrales, confirmant son rôle dans la migration et l'invasion tumorale.²⁵⁰ Nous n'avons pas encore testé l'expression de tGLI1/GLI1 sur les mastocytes néoplasiques de patients.

Quel que soit le mécanisme impliqué, un déséquilibre de la balance GLI3R(répresseur)/GLI3L(activateur) participe au déclenchement du processus tumoral (Figure 28).

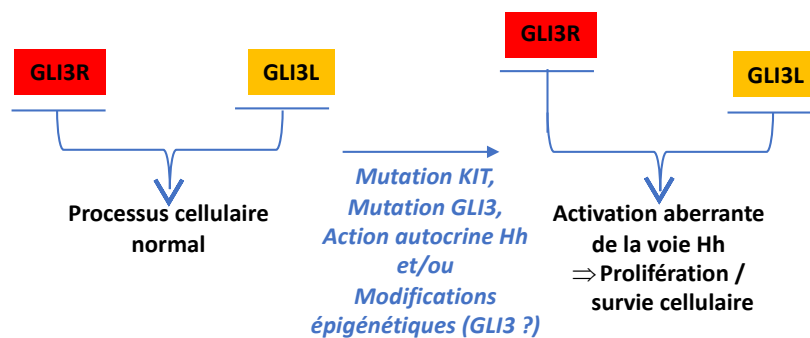


Figure 28. Déséquilibre de la balance GLI3R/GLI3L participant au processus tumoral dans la mastocytose. Résumé des principales hypothèses à l'origine de l'activation aberrante de la voie Hedgehog dans la mastocytose.

4.2.4 PERSPECTIVES ARTICLE 2 – POURSUITE DES TRAVAUX

4.2.4.1 Nouveau modèle murin de mastocytose B6.*Gli3Xt^{+/-};Mx1^{cre};KitD814V^{flox}*

Comme discuté en introduction, il n'existe pas à ce jour de modèles murins de mastocytose agressive représentative de la maladie chez l'homme. A partir des résultats prometteurs sur les mastocytes de souris *Gli3Xt^{+/-}* *in vitro*, nous sommes en train de croiser, en collaboration avec l'équipe du Dr Dubreuil au CRCM, des souris B6. *Gli3Xt^{+/-}* avec des souris B6 portant *KitD814V* sous le contrôle du promoteur *Mctp5* (activation constitutive dans les mastocytes matures) et avec des souris portant *KitD814V* sous le contrôle de *Mx1* (expression plus ubiquiste), selon le système de recombinaison Cre-Lox (Figure 29). Les triples croisements viennent d'être obtenus pour *Mx1* et nous venons de débuter une cohorte de souris *Gli3Xt^{+/-};Mx1^{cre};KitD814V^{flox}* (n=10), que nous comparons aux souris *Gli3Xt^{+/-};Mx1^{cre}* (n=5) et *KitD814V^{flox}*;

$Mx1^{cre}$ (n=14). Nous étudierons la survie globale, les phénotypes clinique, biologique (tryptase plasmatique, pourcentage de mastocytes CD117/FcεR1 + dans le sang périphérique...), histologique de ces souris pour caractériser le type de mastocytose obtenue (indolente, agressive ou leucémique...). Nous prévoyons de mettre en culture les moelles totales des souris et de comparer leur différenciation mastocytaire (délai de différenciation, prolifération...). Les souris $Mx1^{cre};KitD814V^{flox}$ développent fréquemment une hémopathie B maligne rapidement létale (cf paragraphe 1.2.4.3.1 de l'Introduction), qui pourraient gêner notre analyse. Selon les résultats obtenus, nous réaliserons les mêmes expériences sur les souris $Mcpt5^{cre};KitD814V^{flox}$ et $Gli3Xt^{+/-};Mcpt5^{cre};KitD814V^{flox}$ pour palier à ce problème.

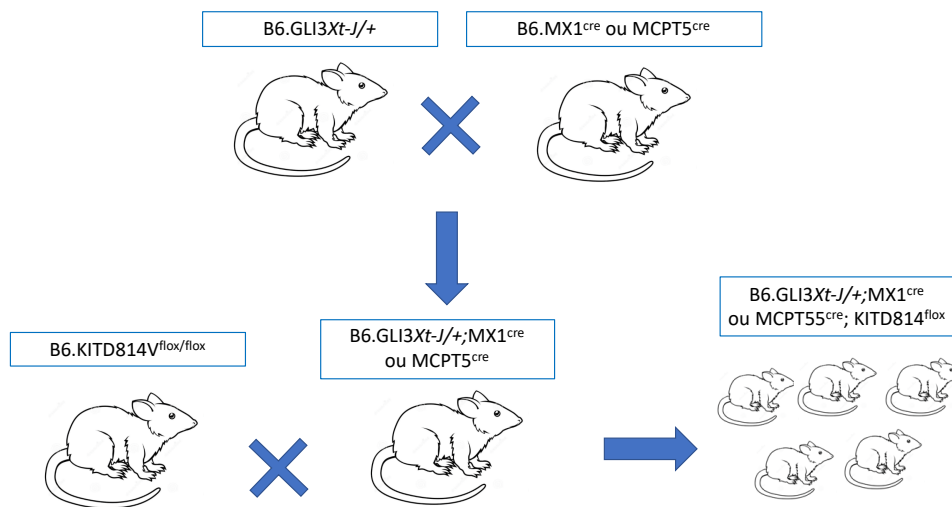


Figure 29. Schéma représentant les différents croisements de souris en cours.

En cas de difficultés rencontrées avec ces modèles, l'autre stratégie sera de transduire des moelles osseuses de souris $Gli3Xt^{+/-}$ et $Gli3WT$ avec un lentivirus KITD816V et de les greffer dans ces souris $Gli3Xt^{+/-}$ et $Gli3WT$ (respectivement) préalablement sub-létalement irradiées.

4.2.4.2 Essai thérapeutique chez l'homme

Nous avons montré que l'utilisation d'inhibiteurs de la voie de signalisation Hh, notamment le sonidegib, inhibe la prolifération et induit (à moindre niveau) l'apoptose des mastocytes néoplasiques primaires issus de patients, et retarde significativement la mort chez les souris présentant une leucémie à mastocyte KITD816V+ (Figures 3A-F). De plus, l'association du sonidegib et du PKC412 *in vitro*, semble avoir un effet additif sur l'inhibition de la prolifération et l'induction de l'apoptose des mastocytes tumoraux ou des lignées mastocytaires (Figures 3G et 3H, article 2). Le sonidegib, ou Odomzo®, a déjà l'AMM dans le carcinome baso-cellulaire non localement avancé.

Ces résultats préliminaires, *in vitro* et *in vivo*, nous permettent d'envisager un essai thérapeutique comparant la midostaurine seule à l'association midostaurine/sonidegib dans les mastocytoses avancées.

Nos résultats (article 2) ont fait l'objet d'un dépôt de brevet.

4.3 AUTRES PERSPECTIVES : IDENTIFICATION DE NOUVEAUX GENES / NOUVELLES VOIES CANDIDAT(E)S IMPLIQUE(E)S DANS LA MASTOCYTOSE

Parallèlement à ces deux projets, nous avons réalisé des exomes dans d'autres formes rares de mastocytoses agressives congénitales et nous avons ainsi identifié deux autres gènes candidats.

4.3.1 *SLC26A2* ET MASTOCYTOSE :

Nous suivons un autre patient, 4^{ème} enfant d'un couple non apparenté, sans antécédent familial notable, qui présente l'association i- d'une mastocytose agressive congénitale avec une atteinte multisystémique (cutanée, hépatique, splénique et médullaire) associée à la mutation *KIT* D816V ainsi que de nombreuses réactions anaphylactiques sévères (témoignant d'une activation mastocytaire aberrante inhabituelle) et ii- d'une petite taille avec des membres courts. Ce patient maintenant âgé de 35ans, est traité par midostaurine permettant un contrôle de la maladie avec une rémission partielle. L'analyse d'exome nous a permis de mettre en évidence une mutation récessive homozygote dans le gène *SLC26A2* (c.C835T/p.Arg279Trp, Solute Carrier Family 26 Member 2) retrouvée dans des formes exceptionnelles de dysplasie épiphysaire multiple (DEM). Ce diagnostic a été ensuite confirmé par l'équipe de génétique d'Imagine avec l'aide de radiographies osseuses. Aucun autre gène candidat n'a été retrouvé, et la mutation dans *SLC26A2* ségrège avec la mastocytose dans la famille (Figure 30).

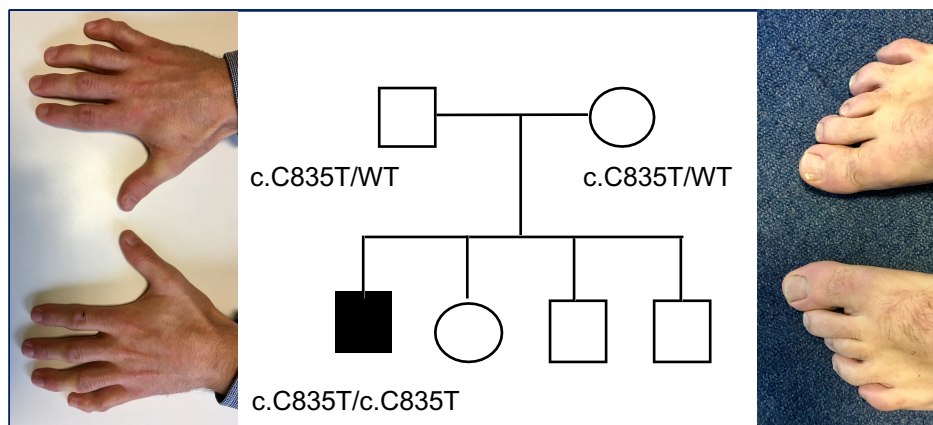


Figure 30. Caractéristiques cliniques et moléculaires du patient présentant la mutation dans le gène *SLC26A2*. On peut noter la brachydactylie (doigts/orteils courts et déformés).

SLC26A2 est une protéine transmembranaire qui assure le transport du sulfate et qui participe ainsi à la sulfatation des protéoglycanes en transportant le sulfate dans la matrice cartilagineuse.²⁵³ Ces mutations, à l'état homozygote, seraient responsables d'une perte de fonction du transporteur de sulfate.²⁵⁴ La Figure 31 représente les principales mutations *SLC26A2* associées au DEM rapportées dans la littérature. Le variant Arg279Trp est le variant *SLC26A2* le plus commun trouvé en dehors de la

Finlande (45% des allèles).²⁵⁵ Le variant pathogène c.-26+2T>C est parfois appelée le variant "finlandais", car il est beaucoup plus fréquent en Finlande que dans le reste de la population mondiale. Il produit de faibles niveaux d'ARNm correctement épissé et entraîne une DEM à l'état homozygote.²⁵⁵ L'expression tissulaire connue de SLC26A2 concerne essentiellement le tube digestif (notamment le colon), les tissus endocriniens et le cartilage.²⁵⁶

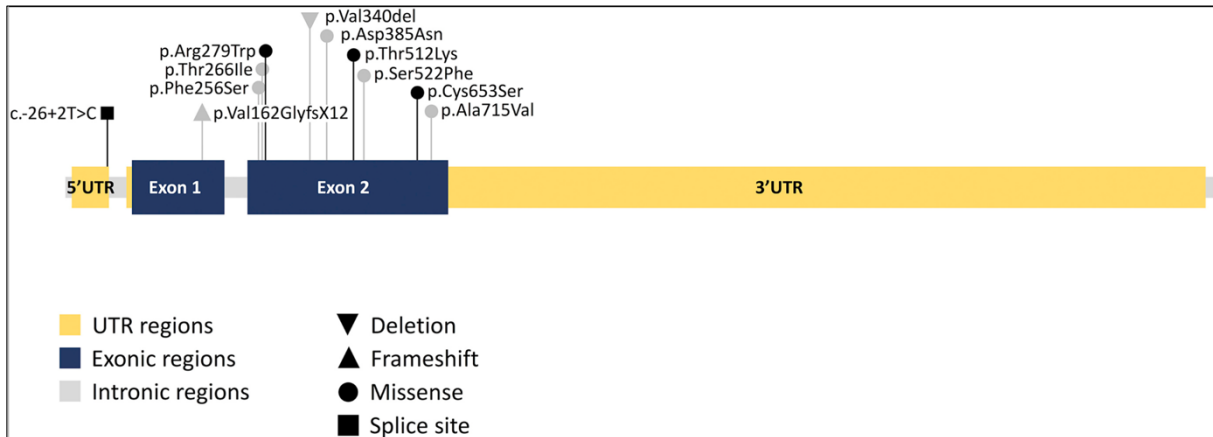


Figure 31. Représentation schématique des mutations SLC26A2 associées au DEM rapportées dans la littérature.²⁵⁷

Il est connu que des protéoglycanes sulfatés notamment les chondroïtines sulfates sont stockés dans les granules mastocytaires et assurent le stockage, le relargage lent et le contrôle de l'activité des médiateurs mastocytaires (tels que les protéases et l'histamine, Figure 32).²⁵⁸

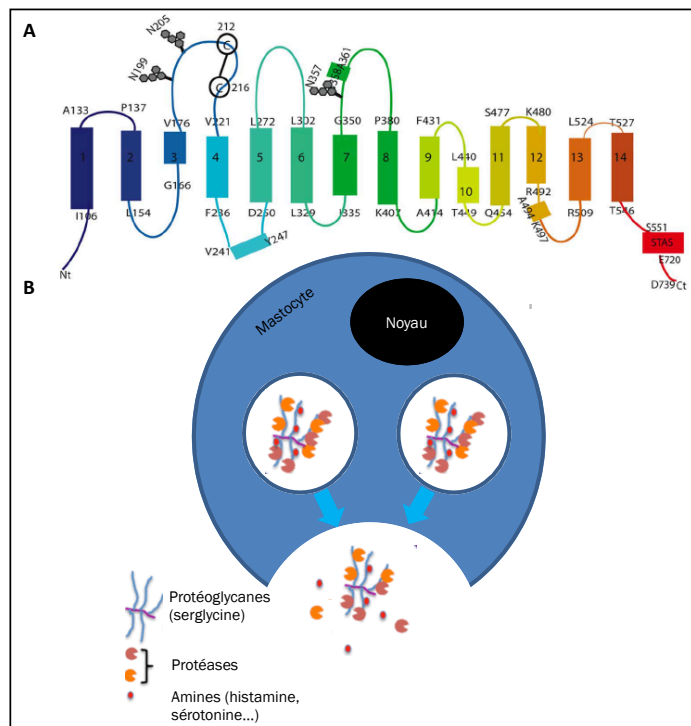


Figure 32. Représentation schématique de la protéine SCL26A2 avec ses 14 domaines transmembranaires (A) et du rôle des protéoglycans dans les granules mastocytaires (B).

A notre connaissance l'expression et le rôle de SLC26A2 n'ont jamais été étudiés dans le mastocyte. Chez les quelques autres cas décrits de DEM associés à cette mutation dans *SLC26A2* il ne semble pas y avoir de mastocytose rapportée, *a priori*. Par ailleurs, Dimberg et coll. ont montré que SLC26A2 régulait négativement les récepteurs de TRAIL (récepteur de mort cellulaire), DR4 et DR5, et cette régulation négative est associée à la résistance de TRAIL en cancérologie.²⁵⁹ Dans le cancer du sein, l'expression de SLC26A2 est associée à une diminution significative de la survie sans récurrence. Ces éléments suggèrent le rôle des mutants *SLC26A2* dans le développement de la mastocytose et/ou l'activation des mastocytes particulièrement importante et inhabituelle chez ce patient, et nous ont plus largement poussé à étudier le rôle de SLC26A2 dans la physiologie du mastocyte et la physiopathologie de la mastocytose. Une expérience préliminaire montre que l'expression de l'ARNm de *SLC26A2* augmente après stimulation de lignées mastocytaires humaines par la PMA/ionomycine ce qui témoigne tout d'abord de l'expression de SLC26A2 dans ces lignées et que celle-ci est au moins régulée par l'activation du FcεR1 (Figure 33).

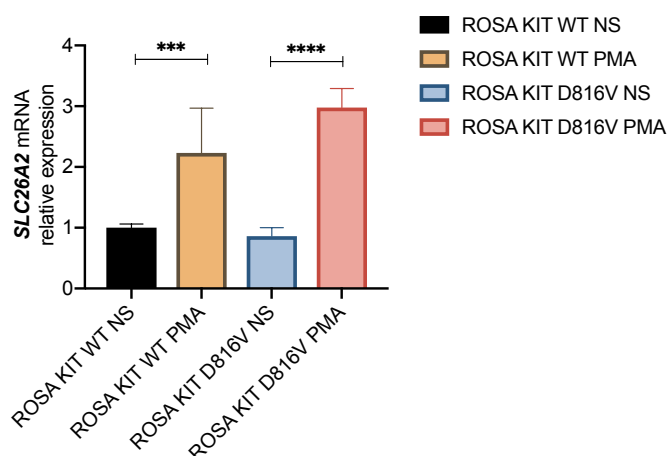


Figure 33. Expression de *SLC26A2* dans des lignées ROSA, régulée par l'activation mastocytaire.

Les prochaines étapes sont 1- d'étudier l'expression et la localisation de *SLC26A2* et d'étudier l'activation mastocytaire dans les mastocytes primaires du patient (que nous avons obtenus) par rapport à des mastocytes contrôles ; 2- d'étudier le rôle de *SLC26A2* sur la prolifération, l'activité et la survie des mastocytes en travaillant sur des lignées mastocytaires KO pour *SLC26A2* versus WT; 3- de restaurer le phénotype dans les mastocytes du patient en réintroduisant *SLC26A2* en cas d'un phénotype mastocytaire particulier observé. Les expériences complémentaires seront prévues en fonction de ces premiers résultats observés.

4.3.2 *EZH2* ET MASTOCYTOSE

Nous suivons un autre patient qui présente une mastocytose systémique agressive congénitale *KIT* D816V+ et une macrocéphalie. L'analyse d'exome a permis de mettre en évidence une nouvelle mutation germinale hétérozygote *de novo* dans le gène régulateur épigénétique *EZH2* (Enhancer of Zeste homolog 2, c.G541C/p.G181R, non retrouvée dans notre base de 15800 exomes de l'Institut Imagine). Des mutations hétérozygotes dans le gène *EZH2* sont associées au syndrome de Weaver (MIM # 277590), syndrome associant notamment un gigantisme avec une avance d'âge osseux, des anomalies cranio-faciales (macrocéphalie et hypertélorisme) et une susceptibilité aux cancers (notamment hémopathies).^{260,261} L'expressivité est très variable et la pénétrance semble incomplète. *EZH2* code une histone méthyltransférase impliquée dans la modélisation de la chromatine et la répression transcriptionnelle. En combinaison avec les protéines EED (Embryonic Ectoderm Development protein) et SUZ12 (Suppressor of Zeste 12), ils forment le complexe PCR2 (polycomb repressive complex 2) qui catalyse la méthylation du résidu lysine 27 de l'histone 3 (H3K27) entraînant un compactage de la chromatine et une répression de la transcription.²⁶² Des mutations mono- et bi-alléliques somatiques activatrices et perte-de-fonction dans *EZH2* ont été identifiées dans de multiples hémopathies malignes. Dans le cadre des hémopathies myéloïdes, il s'agit de mutations inactivatrices.²⁶³ Les mécanismes moléculaires par lesquels les mutations dans le gène *EZH2* entraînent le syndrome de Weaver sont

méconnus et la grande variabilité des manifestations cliniques associées aux mutations germinales et somatiques *EZH2* reste intrigante. Récemment, Muñoz-González et coll. ont montré que des mutations somatiques dans *EZH2* étaient présentes dans des mastocytoses systémiques et associées à un mauvais pronostic, tout comme cela est observé avec les mutations dans les gènes *SRSF2*, *ASXL1* et *RUNX1*.²⁶⁴ A notre connaissance, il s'agit ici du premier cas décrit de mutation germinale dans *EZH2* associée à une mastocytose agressive congénitale KITD816V+.

5. CONCLUSION

Les manifestations cliniques de la mastocytose résultent d'une accumulation et d'une activation excessive de mastocytes dans au moins un tissu ou organe. La mastocytose est une maladie clonale fortement associée à des mutations somatiques gain-de-fonction dans le gène *KIT*. Malgré l'importance de cette association, il est maintenant clair que ces mutations n'expliquent pas à elles seules l'hétérogénéité de la maladie.

L'analyse d'une cohorte d'enfants atteints de mastocytose (n=272) a permis de montrer que le caractère congénital de la mastocytose et la présence de la mutation *KIT* D816V (alors qu'elle est associée à une maladie persistante chez l'adulte) étaient significativement associés à la régression de la mastocytose chez l'enfant. Les différences mutationnelles observées dans le gène *KIT* entre les enfants et les adultes atteints de mastocytose n'expliquent pas à elles seules les différences phénotypiques observées entre ces deux populations. Il a été récemment rapporté que les mastocytes ont une double origine hématopoïétique (1-sac vitellin, condamnés à rentrer en sénescence après la naissance et 2-moelle osseuse adulte). Ces résultats suggèrent que la régression des lésions observées chez l'enfant pourrait s'expliquer plus par le type de mastocyte dans lequel se trouve la mutation, que par le type de mutation elle-même.

L'observation de phénotypes rares de mastocytoses dans des contextes syndromiques germinaux particuliers a permis de montrer pour la première fois l'implication de la voie de signalisation Hedgehog dans la physiologie du mastocyte et dans la physiopathologie de la mastocytose en général. Nous avons montré que l'utilisation d'inhibiteurs de la voie de signalisation Hh inhibait la prolifération et induisait l'apoptose des mastocytes néoplasiques issus de patients, et retardait significativement la mort chez les souris présentant une mastocytose agressive *KIT*D816V+. Ces résultats soulignent un nouveau mécanisme impliqué dans la physiopathologie des mastocytoses agressives et ont permis d'identifier une nouvelle cible thérapeutique essentielle pour cette pathologie qui devrait aboutir à la mise en place de nouveaux essais thérapeutiques chez l'homme.

La poursuite des analyses d'exomes de formes rares de mastocytoses associées à d'autres syndromes germinaux particuliers a permis de mettre en évidence d'autres gènes candidats, et donc d'autres voies potentiellement dérégulées dans cette maladie. De par son rôle possible dans la sulfatation des protéoglycanes stockés dans les granules mastocytaires, l'étude de *SLC26A2* pourrait participer à une meilleure compréhension des mécanismes à l'origine de l'activation excessive des mastocytes observées dans la mastocytose mais aussi dans le syndrome d'activation mastocytaire et ainsi constituer une nouvelle cible thérapeutique innovante dans ces pathologies.

6. RÉFÉRENCES

1. Iwasaki H, Akashi K. Myeloid Lineage Commitment from the Hematopoietic Stem Cell. *Immunity*. 2007;26:726–40.
2. Grootens J, Ungerstedt JS, Nilsson G, Dahlin JS. Deciphering the differentiation trajectory from hematopoietic stem cells to mast cells. *Blood Adv*. 2018;2:2273–81.
3. Akashi K, Traver D, Zon LI. The Complex Cartography of Stem Cell Commitment. *Cell*. 2005;121:160–2.
4. Taghon T, Yui MA, Rothenberg EV. Mast cell lineage diversion of T lineage precursors by the essential T cell transcription factor GATA-3. *Nat Immunol*. 2007;8:845–55.
5. Dedhia P, Kambayashi T, Pear WS. Notch2 paves the way to mast cells by Hes1 and Gata3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:7629–30.
6. Arinobu Y, Iwasaki H, Gurish MF, Mizuno S, Shigematsu H, Ozawa H, et al. Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:18105–10.
7. Sonoda T, Hayashi C, Kitamura Y. Presence of mast cell precursors in the yolk sac of mice. *Dev Biol*. 1983;97:89–94.
8. Tsai F-Y, Orkin SH. Transcription Factor GATA-2 Is Required for Proliferation/Survival of Early Hematopoietic Cells and Mast Cell Formation, But Not for Erythroid and Myeloid Terminal Differentiation. :8.
9. Gentek R, Ghigo C, Hoeffel G, Bulle MJ, Msallam R, Gautier G, et al. Hemogenic Endothelial Fate Mapping Reveals Dual Developmental Origin of Mast Cells. *Immunity*. 2018;48:1160-1171.e5.
10. Yamaguchi T, Tashiro K, Tanaka S, Katayama S, Ishida W, Fukuda K, et al. Two-step differentiation of mast cells from induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev*. 2013;22:726–34.
11. Kauts M-L, De Leo B, Rodríguez-Seoane C, Ronn R, Glykofrydis F, Maglitto A, et al. Rapid Mast Cell Generation from Gata2 Reporter Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rep*. 2018;11:1009–20.
12. Zhang H, Ma Y, Yan B, Yang X, Li Y, Guan J, et al. Establishment of a human induced pluripotent stem cell line (SDQLCHi005-A) from a patient with mastocytosis carrying heterozygous mutation in KIT gene. *Stem Cell Res*. 2019;40:101565.
13. Razin E, Ihle JN, Seldin D, Mencia-Huerta JM, Katz HR, LeBlanc PA, et al. Interleukin 3: A differentiation and growth factor for the mouse mast cell that contains chondroitin sulfate E proteoglycan. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1984;132:1479–86.
14. Anderson DM, Lyman SD, Baird A, Wignall JM, Eisenman J, Rauch C, et al. Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. *Cell*. 1990;63:235–43.
15. Irani AM, Nilsson G, Miettinen U, Craig SS, Ashman LK, Ishizaka T, et al. Recombinant human stem cell factor stimulates differentiation of mast cells from dispersed human fetal liver cells. *Blood*. 1992;80:3009–21.
16. Valent P, Spanblöchl E, Sperr WR, Sillaber C, Zsebo KM, Agis H, et al. Induction of differentiation of human mast cells from bone marrow and peripheral blood mononuclear cells by recombinant human stem cell factor/kit-ligand in long-term culture. *Blood*. 1992;80:2237–45.
17. Kirshenbaum AS, Goff JP, Kessler SW, Mican JM, Zsebo KM, Metcalfe DD. Effect of IL-3 and stem cell factor on the appearance of human basophils and mast cells from CD34+

pluripotent progenitor cells. *J Immunol*. 1992;148:772–7.

18. Mitsui H, Furitsu T, Dvorak AM, Irani AM, Schwartz LB, Inagaki N, et al. Development of human mast cells from umbilical cord blood cells by recombinant human and murine c-kit ligand. *Proc Natl Acad Sci*. 1993;90:735–9.

19. Desai A, Jung M-Y, Olivera A, Gilfillan AM, Prussin C, Kirshenbaum AS, et al. IL-6 promotes an increase in human mast cell numbers and reactivity through suppression of suppressor of cytokine signaling 3. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137:1863-1871.e6.

20. Dahlin JS, Ekoff M, Grootens J, Löf L, Amini R-M, Hagberg H, et al. KIT signaling is dispensable for human mast cell progenitor development. *Blood*. 2017;130:1785–94.

21. Hallgren J, Gurish MF. Pathways of murine mast cell development and trafficking: tracking the roots and routes of the mast cell. *Immunol Rev*. 2007;217:8–18.

22. Dahlin JS, Malinovsky A, Öhrvik H, Sandelin M, Janson C, Alving K, et al. Lin⁻ CD34^{hi} CD117^{int}/hi FcεRI⁺ cells in human blood constitute a rare population of mast cell progenitors. *Blood*. 2016;127:383–91.

23. Lantz CS, Huff TF. Murine KIT⁺ lineage- bone marrow progenitors express Fc gamma-RII but do not express Fc epsilon-RI until mast cell granule formation. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1995;154:355–62.

24. Dahlin JS, Hallgren J. Mast cell progenitors: origin, development and migration to tissues. *Mol Immunol*. 2015;63:9–17.

25. Dahlin JS, Ungerstedt JS, Grootens J, Sander B, Gülen T, Hägglund H, et al. Detection of circulating mast cells in advanced systemic mastocytosis. *Leukemia*. 2016;30:1953–6.

26. Gurish MF, Boyce JA. Mast cells: Ontogeny, homing, and recruitment of a unique innate effector cell. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117:1285–91.

27. Schwartz LB. Analysis of MC(T) and MC(TC) mast cells in tissue. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2006;315:53–62.

28. Horny H-P, Greschniok A, Jordan J-H, Menke DM, Valent P. Chymase expressing bone marrow mast cells in mastocytosis and myelodysplastic syndromes: an immunohistochemical and morphometric study. *J Clin Pathol*. 2003;56:103–6.

29. Dougherty RH, Sidhu SS, Raman K, Solon M, Solberg OD, Caughey GH, et al. Accumulation of intraepithelial mast cells with a unique protease phenotype in T(H)2-high asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125:1046-1053.e8.

30. Abonia JP, Blanchard C, Butz BB, Rainey HF, Collins MH, Stringer K, et al. Involvement of mast cells in eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126:140–9.

31. Irani AA, Schechter NM, Craig SS, DeBlois G, Schwartz LB. Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83:4464–8.

32. Lundquist A, Pejler G. Biological implications of preformed mast cell mediators. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2011;68:965–75.

33. Haas HL, Panula P. Histamine receptors. *Neuropharmacology*. 2016;106:1–2.

34. Jutel M, Akdis M, Akdis CA. Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 2009;39:1786–800.

35. Meskanen K, Ekelund H, Laitinen J, Neuvonen PJ, Haukka J, Panula P, et al. A randomized clinical trial of histamine 2 receptor antagonism in treatment-resistant schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol*. 2013;33:472–8.

36. Hofstra CL, Desai PJ, Thurmond RL, Fung-Leung W-P. Histamine H₄ Receptor Mediates Chemotaxis and Calcium Mobilization of Mast Cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;305:1212–21.

37. da Silva EZM, Jamur MC, Oliver C. Mast Cell Function. *J Histochem Cytochem*. 2014;62:698–738.

38. Vitte J. Human mast cell tryptase in biology and medicine. *Mol Immunol*. 2015;63:18–24.
39. Metz M, Piliponsky AM, Chen C-C, Lammel V, Abrink M, Pejler G, et al. Mast cells can enhance resistance to snake and honeybee venoms. *Science*. 2006;313:526–30.
40. Schwartz LB, Lewis RA, Seldin D, Austen KF. Acid hydrolases and tryptase from secretory granules of dispersed human lung mast cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1981;126:1290–4.
41. Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2005;6:135–42.
42. Galli SJ, Tsai M. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med*. 2012;18:693–704.
43. Boyce JA. Eicosanoid mediators of mast cells: receptors, regulation of synthesis, and pathobiologic implications. *Chem Immunol Allergy*. 2005;87:59–79.
44. Marshall JS. Mast-cell responses to pathogens. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:787–99.
45. Mukai K, Tsai M, Saito H, Galli SJ. Mast cells as sources of cytokines, chemokines, and growth factors. *Immunol Rev*. 2018;282:121–50.
46. Malbec O, Daëron M. The mast cell IgG receptors and their roles in tissue inflammation. *Immunol Rev*. 2007;217:206–21.
47. Daëron M, Latour S, Malbec O, Espinosa E, Pina P, Pasmans S, et al. The same tyrosine-based inhibition motif, in the intracytoplasmic domain of Fc gamma RIIB, regulates negatively BCR-, TCR-, and FcR-dependent cell activation. *Immunity*. 1995;3:635–46.
48. Jönsson F, Mancardi DA, Zhao W, Kita Y, Iannascoli B, Khun H, et al. Human FcγRIIA induces anaphylactic and allergic reactions. *Blood*. 2012;119:2533–44.
49. Okayama Y, Kirshenbaum AS, Metcalfe DD. Expression of a functional high-affinity IgG receptor, Fc gamma RI, on human mast cells: Up-regulation by IFN-gamma. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2000;164:4332–9.
50. Cardamone C, Parente R, Feo GD, Triggiani M. Mast cells as effector cells of innate immunity and regulators of adaptive immunity. *Immunol Lett*. 2016;178:10–4.
51. Turner H, Kinet J-P. Signalling through the high-affinity IgE receptor FcεRI. 1999;402:7.
52. Siraganian RP, de Castro RO, Barbu EA, Zhang J. Mast cell signaling: the role of protein tyrosine kinase Syk, its activation and screening methods for new pathway participants. *FEBS Lett*. 2010;584:4933–40.
53. Saitoh S, Arudchandran R, Manetz TS, Zhang W, Sommers CL, Love PE, et al. LAT Is Essential for FcεRI-Mediated Mast Cell Activation. *Immunity*. 2000;12:525–35.
54. Saitoh S, Odom S, Gomez G, Sommers CL, Young HA, Rivera J, et al. The four distal tyrosines are required for LAT-dependent signaling in FcεRI-mediated mast cell activation. *J Exp Med*. 2003;198:831–43.
55. Gilfillan AM, Tkaczyk C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:218–30.
56. Kalesnikoff J, Galli SJ. New developments in mast cell biology. *Nat Immunol*. 2008;9:1215–23.
57. Gu H, Saito K, Klamann LD, Shen J, Fleming T, Wang Y, et al. Essential role for Gab2 in the allergic response. *Nature*. 2001;412:186–90.
58. Besmer P, Murphy JE, George PC, Qiu FH, Bergold PJ, Lederman L, et al. A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family. *Nature*. 1986;320:415–21.
59. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature*. 2001;411:355–65.
60. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell*. 2010;141:1117–34.

61. Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ, et al. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J.* 1987;6:3341–51.
62. Spritz RA, Strunk KM, Lee ST, Lu-Kuo JM, Ward DC, Le Paslier D, et al. A YAC contig spanning a cluster of human type III receptor protein tyrosine kinase genes (PDGFRA-KIT-KDR) in chromosome segment 4q12. *Genomics.* 1994;22:431–6.
63. Giebel LB, Strunk KM, Holmes SA, Spritz RA. Organization and nucleotide sequence of the human KIT (mast/stem cell growth factor receptor) proto-oncogene. *Oncogene.* 1992;7:2207–17.
64. Broudy VC, Lin NL, Sabath DF. THE FIFTH IMMUNOGLOBULIN-LIKE DOMAIN OF THE KIT RECEPTOR IS REQUIRED FOR PROTEOLYTIC CLEAVAGE FROM THE CELL SURFACE. *Cytokine.* 2001;15:188–95.
65. Orfao A, Garcia-Montero AC, Sanchez L, Escribano L, REMA. Recent advances in the understanding of mastocytosis: the role of KIT mutations. *Br J Haematol.* 2007;138:12–30.
66. Blume-Jensen P, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Zsebo KM, Westermark B, Heldin CH. Activation of the human c-kit product by ligand-induced dimerization mediates circular actin reorganization and chemotaxis. *EMBO J.* 1991;10:4121–8.
67. Zhang Z, Zhang R, Joachimiak A, Schlessinger J, Kong XP. Crystal structure of human stem cell factor: implication for stem cell factor receptor dimerization and activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:7732–7.
68. Morales J, Falanga Y, Depczynski A, Fernando J, Ryan J. Mast cell homeostasis and the JAK–STAT pathway. *Genes Immun.* 2010;11:599–608.
69. Hermans MAW, Schrijver B, Holten-Neelen CCPA van, Wijk RG van, Hagen PM van, Daele PLA van, et al. The JAK1/JAK2- inhibitor ruxolitinib inhibits mast cell degranulation and cytokine release. *Clin Exp Allergy.* 2018;48:1412–20.
70. Malaviya R, Zhu D, Dibirdik I, Uckun FM. Targeting Janus Kinase 3 in Mast Cells Prevents Immediate Hypersensitivity Reactions and Anaphylaxis. *J Biol Chem.* 1999;274:27028–38.
71. Siegel AM, Stone KD, Cruse G, Lawrence MG, Olivera A, Jung M, et al. Diminished allergic disease in patients with STAT3 mutations reveals a role for STAT3 signaling in mast cell degranulation. *J Allergy Clin Immunol [Internet].* 2013 [cited 2020 Feb 12];132. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3881191/>
72. Gilfillan AM, Tkaczyk C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:218–30.
73. Vicinanza C, Aquila I, Scalise M, Cristiano F, Marino F, Cianflone E, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and robustly myogenic: c-kit expression is necessary but not sufficient for their identification. *Cell Death Differ.* 2017;24:2101–16.
74. Metcalfe DD. Regulation of normal and neoplastic human mast cell development in mastocytosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2005;116:185–203; discussion 203-204.
75. Valent P, Akin C, Sperr WR, Mayerhofer M, Födinger M, Fritsche-Polanz R, et al. Mastocytosis: pathology, genetics, and current options for therapy. *Leuk Lymphoma.* 2005;46:35–48.
76. Nocka K, Majumder S, Chabot B, Ray P, Cervone M, Bernstein A, et al. Expression of c-kit gene products in known cellular targets of W mutations in normal and W mutant mice--evidence for an impaired c-kit kinase in mutant mice. *Genes Dev.* 1989;3:816–26.
77. Kissel H, Timokhina I, Hardy MP, Rothschild G, Tajima Y, Soares V, et al. Point mutation in kit receptor tyrosine kinase reveals essential roles for kit signaling in spermatogenesis and oogenesis without affecting other kit responses. *EMBO J.* 2000;19:1312–26.

78. Halaban R, Tyrrell L, Longley J, Yarden Y, Rubin J. Pigmentation and proliferation of human melanocytes and the effects of melanocyte-stimulating hormone and ultraviolet B light. *Ann N Y Acad Sci.* 1993;680:290–301.
79. Miettinen M, Lasota J. KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM.* 2005;13:205–20.
80. Abbaspour Babaei M, Kamalidehghan B, Saleem M, Huri HZ, Ahmadipour F. Receptor tyrosine kinase (c-Kit) inhibitors: a potential therapeutic target in cancer cells. *Drug Des Devel Ther.* 2016;10:2443–59.
81. Chen W, Xie H, Wang H, Chen L, Sun Y, Chen Z, et al. Prognostic Significance of KIT Mutations in Core-Binding Factor Acute Myeloid Leukemia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE.* 2016;11:e0146614.
82. Aozasa K, Takakuwa T, Hongyo T, Yang W-I. Nasal NK/T-cell lymphoma: epidemiology and pathogenesis. *Int J Hematol.* 2008;87:110–7.
83. Montes-Mojarro IA, Chen B-J, Ramirez-Ibarguen AF, Quezada-Fiallos CM, Pérez-Báez WB, Dueñas D, et al. Mutational profile and EBV strains of extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type in Latin America. *Mod Pathol.* 2019;1–11.
84. Craig JW, Hasserjian RP, Kim AS, Aster JC, Pinkus GS, Hornick JL, et al. Detection of the KIT D816V mutation in myelodysplastic and/or myeloproliferative neoplasms and acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes predicts concurrent systemic mastocytosis. *Mod Pathol.* 2020;1–11.
85. Beadling C, Jacobson-Dunlop E, Hodi FS, Le C, Warrick A, Patterson J, et al. KIT Gene Mutations and Copy Number in Melanoma Subtypes. *Clin Cancer Res.* 2008;14:6821–8.
86. Valent P, Escribano L, Broesby-Olsen S, Hartmann K, Grattan C, Brockow K, et al. Proposed diagnostic algorithm for patients with suspected mastocytosis: a proposal of the European Competence Network on Mastocytosis. *Allergy.* 2014;69:1267–74.
87. Pardanani A, Tefferi A. Proposal for a revised classification of systemic mastocytosis. *Blood.* 2010;115:2720–1.
88. Valent P, Akin C, Metcalfe DD. Mastocytosis: 2016 updated WHO classification and novel emerging treatment concepts. *Blood.* 2017;129:1420–7.
89. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood.* 2011;117:5019–32.
90. Barete S. Les mastocytoses. /data/revues/01519638/v141i11/S0151963814005997/ [Internet]. 2014 [cited 2020 Jan 10]; Available from: <https://www.em-consulte.com/en/article/935590>
91. Meni C, Georgin-Lavialle S, Le Saché de Peufeilhoux L, Jais JP, Hadj-Rabia S, Bruneau J, et al. Paediatric mastocytosis: long-term follow-up of 53 patients with whole sequencing of KIT. A prospective study. *Br J Dermatol.* 2018;179:925–32.
92. Méni C, Bruneau J, Georgin-Lavialle S, Le Saché de Peufeilhoux L, Damaj G, Hadj-Rabia S, et al. Paediatric mastocytosis: a systematic review of 1747 cases. *Br J Dermatol.* 2015;172:642–51.
93. Ben-Amitai D, Metzker A, Cohen HA. Pediatric cutaneous mastocytosis: a review of 180 patients. *Isr Med Assoc J IMAJ.* 2005;7:320–2.
94. Kiszewski AE, Durán-Mckinster C, Orozco-Covarrubias L, Gutiérrez-Castrellón P, Ruiz-Maldonado R. Cutaneous mastocytosis in children: a clinical analysis of 71 cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV.* 2004;18:285–90.

95. Lange M, Niedoszytko M, Renke J, Gleń J, Nedoszytko B. Clinical aspects of paediatric mastocytosis: a review of 101 cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. 2013;27:97–102.
96. Güneş Bilgili S, Karadağ AS, Takci Z, Çalka Ö, Kösem M. Comparison of cutaneous mastocytosis with onset in children and adults. *Turk J Med Sci*. 2014;44:504–10.
97. Hannaford R, Rogers M. Presentation of cutaneous mastocytosis in 173 children. *Australas J Dermatol*. 2001;42:15–21.
98. Azaña JM, Torrelo A, Mediero IG, Zambrano A. Urticaria pigmentosa: a review of 67 pediatric cases. *Pediatr Dermatol*. 1994;11:102–6.
99. Pardanani A. Systemic mastocytosis in adults: 2017 update on diagnosis, risk stratification and management. *Am J Hematol*. 2016;91:1146–59.
100. Longley BJ, Metcalfe DD, Tharp M, Wang X, Tyrrell L, Lu SZ, et al. Activating and dominant inactivating c-KIT catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:1609–14.
101. Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sanchez ML, Nunez R, Prados A, et al. KIT mutation in mast cells and other bone marrow hematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood*. 2006;108:2366–72.
102. Lim K-H, Tefferi A, Lasho TL, Finke C, Patnaik M, Butterfield JH, et al. Systemic mastocytosis in 342 consecutive adults: survival studies and prognostic factors. *Blood*. 2009;113:5727–36.
103. Furitsu T, Tsujimura T, Tono T, Ikeda H, Kitayama H, Koshimizu U, et al. Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J Clin Invest*. 1993;92:1736–44.
104. Büttner C, Henz BM, Welker P, Sepp NT, Grabbe J. Identification of Activating c-kit Mutations in Adult-, but not in Childhood-Onset Indolent Mastocytosis: A Possible Explanation for Divergent Clinical Behavior. *J Invest Dermatol*. 1998;111:1227–31.
105. Sotlar K, Escribano L, Landt O, Möhrle S, Herrero S, Torrelo A, et al. One-step detection of c-kit point mutations using peptide nucleic acid-mediated polymerase chain reaction clamping and hybridization probes. *Am J Pathol*. 2003;162:737–46.
106. Beghini A, Cairoli R, Morra E, Larizza L. In vivo differentiation of mast cells from acute myeloid leukemia blasts carrying a novel activating ligand-independent C-kit mutation. *Blood Cells Mol Dis*. 1998;24:262–70.
107. Longley BJ, Metcalfe DD, Tharp M, Wang X, Tyrrell L, Lu S, et al. Activating and dominant inactivating c-KIT catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:1609–14.
108. Pullarkat VA, Pullarkat ST, Calverley DC, Brynes RK. Mast cell disease associated with acute myeloid leukemia: detection of a new c-kit mutation Asp816His. *Am J Hematol*. 2000;65:307–9.
109. Pignon JM, Giraudier S, Duquesnoy P, Jouault H, Imbert M, Vainchenker W, et al. A new c-kit mutation in a case of aggressive mast cell disease. *Br J Haematol*. 1997;96:374–6.
110. Bodemer C, Hermine O, Palmérini F, Yang Y, Grandpeix-Guyodo C, Leventhal PS, et al. Pediatric mastocytosis is a clonal disease associated with D816V and other activating c-KIT mutations. *J Invest Dermatol*. 2010;130:804–15.
111. Yanagihori H, Oyama N, Nakamura K, Kaneko F. c-kit Mutations in patients with childhood-onset mastocytosis and genotype-phenotype correlation. *J Mol Diagn JMD*. 2005;7:252–7.
112. Verzijl A, Heide R, Oranje AP, Schaik RHN van. C-kit Asp-816-Val Mutation Analysis in

Patients with Mastocytosis. *Dermatology*. 2007;214:15–20.

113. Hartmann K, Wardelmann E, Ma Y, Merkelbach-Bruse S, Preussner LM, Woolery C, et al. Novel germline mutation of KIT associated with familial gastrointestinal stromal tumors and mastocytosis. *Gastroenterology*. 2005;129:1042–6.

114. Zhang LY, Smith ML, Schultheis B, Fitzgibbon J, Lister TA, Melo JV, et al. A novel K509I mutation of KIT identified in familial mastocytosis-in vitro and in vivo responsiveness to imatinib therapy. *Leuk Res*. 2006;30:373–8.

115. Speight RA, Nicolle A, Needham SJ, Verrill MW, Bryon J, Panter S. Rare, germline mutation of KIT with imatinib-resistant multiple GI stromal tumors and mastocytosis. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2013;31:e245-247.

116. Chan EC, Bai Y, Kirshenbaum AS, Fischer ER, Simakova O, Bandara G, et al. Mastocytosis associated with a rare germline KIT K509I mutation displays a well-differentiated mast cell phenotype. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134:178–87.

117. Tang X, Boxer M, Drummond A, Ogston P, Hodgins M, Burden AD. A germline mutation in KIT in familial diffuse cutaneous mastocytosis. *J Med Genet*. 2004;41:e88.

118. Foster R, Byrnes E, Meldrum C, Griffith R, Ross G, Upjohn E, et al. Association of paediatric mastocytosis with a polymorphism resulting in an amino acid substitution (M541L) in the transmembrane domain of c-KIT. *Br J Dermatol*. 2008;159:1160–9.

119. Beghini A, Tibiletti MG, Roversi G, Chiaravalli AM, Serio G, Capella C, et al. Germline mutation in the juxtamembrane domain of the kit gene in a family with gastrointestinal stromal tumors and urticaria pigmentosa. *Cancer*. 2001;92:657–62.

120. Li FP, Fletcher JA, Heinrich MC, Garber JE, Sallan SE, Curiel-Lewandrowski C, et al. Familial gastrointestinal stromal tumor syndrome: phenotypic and molecular features in a kindred. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2005;23:2735–43.

121. Pollard WL, Beachkofsky TM, Kobayashi TT. Novel R634W c-kit mutation identified in familial mastocytosis. *Pediatr Dermatol*. 2015;32:267–70.

122. Wasag B, Niedozytko M, Piskorz A, Lange M, Renke J, Jassem E, et al. Novel, activating KIT-N822I mutation in familial cutaneous mastocytosis. *Exp Hematol*. 2011;39:859-865.e2.

123. de Melo Campos P, Machado-Neto JA, Scopim-Ribeiro R, Visconte V, Tabarrok A, Duarte ASS, et al. Familial systemic mastocytosis with germline KIT K509I mutation is sensitive to treatment with imatinib, dasatinib and PKC412. *Leuk Res*. 2014;38:1245–51.

124. Arock M, Sotlar K, Akin C, Broesby-Olsen S, Hoermann G, Escribano L, et al. KIT mutation analysis in mast cell neoplasms: recommendations of the European Competence Network on Mastocytosis. *Leukemia*. 2015;29:1223–32.

125. Halpern AL, Torphy RJ, McCarter MD, Sciotto CG, Glode LM, Robinson WA. A familial germline mutation in KIT associated with achalasia, mastocytosis and gastrointestinal stromal tumors shows response to kinase inhibitors. *Cancer Genet*. 2019;233–234:1–6.

126. Zappulla JP, Dubreuil P, Desbois S, Létard S, Hamouda NB, Daëron M, et al. Mastocytosis in mice expressing human Kit receptor with the activating Asp816Val mutation. *J Exp Med*. 2005;202:1635–41.

127. Mayerhofer M, Gleixner KV, Hoelbl A, Florian S, Hoermann G, Aichberger KJ, et al. Unique effects of KIT D816V in BaF3 cells: induction of cluster formation, histamine synthesis, and early mast cell differentiation antigens. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2008;180:5466–76.

128. Wilson TM, Maric I, Simakova O, Bai Y, Chan EC, Olivares N, et al. Clonal analysis of NRAS activating mutations in KIT-D816V systemic mastocytosis. *Haematologica*. 2011;96:459–63.

129. Tefferi A, Levine RL, Lim K-H, Abdel-Wahab O, Lasho TL, Patel J, et al. Frequent TET2 mutations in systemic mastocytosis: clinical, KITD816V and FIP1L1-PDGFR α correlates.

Leukemia. 2009;23:900–4.

130. Soucie E, Hanssens K, Mercher T, Georgin-Lavialle S, Damaj G, Livideanu C, et al. In aggressive forms of mastocytosis, TET2 loss cooperates with c-KITD816V to transform mast cells. *Blood*. 2012;120:4846–9.

131. Jawhar M, Schwaab J, Schnittger S, Meggendorfer M, Pfirrmann M, Sotlar K, et al. Additional mutations in SRSF2, ASXL1 and/or RUNX1 identify a high-risk group of patients with KIT D816V(+) advanced systemic mastocytosis. *Leukemia*. 2016;30:136–43.

132. Pardanani A, Lasho T, Elala Y, Wassie E, Finke C, Reichard KK, et al. Next-generation sequencing in systemic mastocytosis: Derivation of a mutation-augmented clinical prognostic model for survival. *Am J Hematol*. 2016;91:888–93.

133. Schwaab J, Schnittger S, Sotlar K, Walz C, Fabarius A, Pfirrmann M, et al. Comprehensive mutational profiling in advanced systemic mastocytosis. *Blood*. 2013;122:2460–6.

134. Jawhar M, Schwaab J, Schnittger S, Sotlar K, Horny H-P, Metzgeroth G, et al. Molecular profiling of myeloid progenitor cells in multi-mutated advanced systemic mastocytosis identifies KIT D816V as a distinct and late event. *Leukemia*. 2015;29:1115–22.

135. Teodosio C, García-Montero AC, Jara-Acevedo M, Álvarez-Twose I, Sánchez-Muñoz L, Almeida J, et al. An immature immunophenotype of bone marrow mast cells predicts for multilineage D816V KIT mutation in systemic mastocytosis. *Leukemia*. 2012;26:951–8.

136. Valent P, Bonnet D, De Maria R, Lapidot T, Copland M, Melo JV, et al. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:767–75.

137. Rossignol J, Polivka L, Maouche-Chrétien L, Frenzel L, Dubreuil P, Hermine O. Recent advances in the understanding and therapeutic management of mastocytosis. *F1000Research*. 2019;8:1961.

138. Xiang Z, Kreisel F, Cain J, Colson A, Tomasson MH. Neoplasia driven by mutant c-KIT is mediated by intracellular, not plasma membrane, receptor signaling. *Mol Cell Biol*. 2007;27:267–82.

139. Gerbaulet A, Wickenhauser C, Scholten J, Peschke K, Drube S, Horny H-P, et al. Mast cell hyperplasia, B-cell malignancy, and intestinal inflammation in mice with conditional expression of a constitutively active kit. *Blood*. 2011;117:2012–21.

140. Schumacher U, van Damme EJ, Peumans WJ, Butterfield JH, Mitchell BS. Lectin histochemistry of human leukaemic mast cells (HMC-1) transplanted into severe combined immunodeficient (scid) mice. *Acta Histochem*. 1998;100:1–9.

141. Demehri S, Corbin A, Loriaux M, Druker BJ, Deininger MW. Establishment of a murine model of aggressive systemic mastocytosis/mast cell leukemia. *Exp Hematol*. 2006;34:284–8.

142. Bibi S, Zhang Y, Hugonin C, Mangan MD, He L, Wedeh G, et al. A new humanized in vivo model of KIT D816V+ advanced systemic mastocytosis monitored using a secreted luciferase. *Oncotarget*. 2016;7:82985–3000.

143. Vega-Ruiz A, Cortes JE, Sever M, Manshoury T, Quintás-Cardama A, Luthra R, et al. Phase II study of imatinib mesylate as therapy for patients with systemic mastocytosis. *Leuk Res*. 2009;33:1481–4.

144. Verstovsek S, Tefferi A, Cortes J, O'Brien S, Garcia-Manero G, Pardanani A, et al. Phase II study of dasatinib in Philadelphia chromosome-negative acute and chronic myeloid diseases, including systemic mastocytosis. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2008;14:3906–15.

145. Gotlib J, Kluin-Nelemans HC, George TI, Akin C, Sotlar K, Hermine O, et al. Efficacy and Safety of Midostaurin in Advanced Systemic Mastocytosis. *N Engl J Med*. 2016;374:2530–41.

146. Valent P, Akin C, Hartmann K, George TI, Sotlar K, Peter B, et al. Midostaurin: a magic bullet that blocks mast cell expansion and activation. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*.

2017;28:2367–76.

147. Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*. 1980;287:795–801.

148. Eggenchwil JT, Anderson KV. Cilia and developmental signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007;23:345–73.

149. Wong SY, Reiter JF. The primary cilium at the crossroads of mammalian hedgehog signaling. *Curr Top Dev Biol*. 2008;85:225–60.

150. Oro AE, Higgins K. Hair cycle regulation of Hedgehog signal reception. *Dev Biol*. 2003;255:238–48.

151. Brownell I, Guevara E, Bai CB, Loomis CA, Joyner AL. Nerve-derived sonic hedgehog defines a niche for hair follicle stem cells capable of becoming epidermal stem cells. *Cell Stem Cell*. 2011;8:552–65.

152. Faigle R, Song H. Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830:2435–48.

153. Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev*. 2001;15:3059–87.

154. Taipale J, Cooper MK, Maiti T, Beachy PA. Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothed. *Nature*. 2002;418:892–7.

155. Marigo V, Davey RA, Zuo Y, Cunningham JM, Tabin CJ. Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor. *Nature*. 1996;384:176–9.

156. Stone DM, Hynes M, Armanini M, Swanson TA, Gu Q, Johnson RL, et al. The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature*. 1996;384:129–34.

157. Pandolfi S, Stecca B. Cooperative integration between HEDGEHOG-GLI signalling and other oncogenic pathways: implications for cancer therapy. *Expert Rev Mol Med*. 2015;17:e5.

158. Altaba AR. Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease. *Development*. 1999;126:3205–16.

159. Dai P, Akimaru H, Tanaka Y, Maekawa T, Nakafuku M, Ishii S. Sonic Hedgehog-induced activation of the Gli1 promoter is mediated by GLI3. *J Biol Chem*. 1999;274:8143–52.

160. Wang B, Fallon JF, Beachy PA. Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell*. 2000;100:423–34.

161. Wang B, Li Y. Evidence for the direct involvement of β TrCP in Gli3 protein processing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:33–8.

162. Niewiadowski P, Kong JH, Ahrends R, Ma Y, Humke EW, Khan S, et al. Gli Protein Activity Is Controlled by Multisite Phosphorylation in Vertebrate Hedgehog Signaling. *Cell Rep*. 2014;6:168–81.

163. Dai P, Shinagawa T, Nomura T, Harada J, Kaul SC, Wadhwa R, et al. Ski is involved in transcriptional regulation by the repressor and full-length forms of Gli3. *Genes Dev*. 2002;16:2843–8.

164. Litingtung Y, Dahn RD, Li Y, Fallon JF, Chiang C. Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. *Nature*. 2002;418:979–83.

165. Wang C, Pan Y, Wang B. Suppressor of fused and Spop regulate the stability, processing and function of Gli2 and Gli3 full-length activators but not their repressors. *Development*. 2010;137:2001–9.

166. Wang C, R ther U, Wang B. The Shh-independent activator function of the full-length Gli3 protein and its role in vertebrate limb digit patterning. *Dev Biol*. 2007;305:460–9.

167. Ruiz i Altaba A, Mas C, Stecca B. The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer. *Trends Cell Biol.* 2007;17:438–47.
168. Lee J, Platt KA, Censullo P, Ruiz i Altaba A. Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Dev Camb Engl.* 1997;124:2537–52.
169. Pasca di Magliano M, Hebrok M. Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:903–11.
170. Milla LA, González-Ramírez CN, Palma V. Sonic Hedgehog in cancer stem cells: a novel link with autophagy. *Biol Res.* 2012;45:223–30.
171. Campbell V, Copland M. Hedgehog signaling in cancer stem cells: a focus on hematological cancers. *Stem Cells Cloning Adv Appl.* 2015;8:27–38.
172. Barnes EA, Kong M, Ollendorff V, Donoghue DJ. Patched1 interacts with cyclin B1 to regulate cell cycle progression. *EMBO J.* 2001;20:2214–23.
173. Kagawa H, Shino Y, Kobayashi D, Demizu S, Shimada M, Ariga H, et al. A Novel Signaling Pathway Mediated by the Nuclear Targeting of C-Terminal Fragments of Mammalian Patched 1. *PLOS ONE.* 2011;6:e18638.
174. Thibert C, Teillet M-A, Lapointe F, Mazelin L, Douarin NML, Mehlen P. Inhibition of Neuroepithelial Patched-Induced Apoptosis by Sonic Hedgehog. *Science.* 2003;301:843–6.
175. Robbins DJ, Fei DL, Riobo NA. The Hedgehog signal transduction network. *Sci Signal.* 2012;5:re6.
176. Carballo GB, Honorato JR, de Lopes GPF, Spohr TCL de SE. A highlight on Sonic hedgehog pathway. *Cell Commun Signal CCS.* 2018;16:11.
177. Götschel F, Berg D, Gruber W, Bender C, Eberl M, Friedel M, et al. Synergism between Hedgehog-Gli and EGFR Signaling in Hedgehog-Responsive Human Medulloblastoma Cells Induces Downregulation of Canonical Hedgehog-Target Genes and Stabilized Expression of Gli1. *PLOS ONE.* 2013;8:e65403.
178. Maeda O, Kondo M, Fujita T, Usami N, Fukui T, Shimokata K, et al. Enhancement of Gli1-transcriptional activity by beta-catenin in human cancer cells. *Oncol Rep.* 2006;16:91–6.
179. Ji Z, Mei FC, Xie J, Cheng X. Oncogenic KRAS activates hedgehog signaling pathway in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem.* 2007;282:14048–55.
180. Riobo NA, Lu K, Ai X, Haines GM, Emerson CP. Phosphoinositide 3-kinase and Akt are essential for Sonic Hedgehog signaling. *Proc Natl Acad Sci.* 2006;103:4505–10.
181. Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Gailani MR, Shanley S, Chidambaram A, et al. Mutations of the Human Homolog of Drosophila patched in the Nevroid Basal Cell Carcinoma Syndrome. *Cell.* 1996;85:841–51.
182. Johnson RL, Rothman AL, Xie J, Goodrich LV, Bare JW, Bonifas JM, et al. Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science.* 1996;272:1668–71.
183. Epstein EH. Basal cell carcinomas: attack of the hedgehog. *Nat Rev Cancer.* 2008;8:743–54.
184. Kool M, Koster J, Bunt J, Hasselt NE, Lakeman A, van Sluis P, et al. Integrated genomics identifies five medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features. *PloS One.* 2008;3:e3088.
185. McMillan R, Matsui W. Molecular pathways: the hedgehog signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2012;18:4883–8.
186. Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA, Baylin SB. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature.* 2003;422:313–7.
187. Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, Montes de Oca R, Gerstenblith MR, Briggs K, et al.

Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature*. 2003;425:846–51.

188. Varnat F, Duquet A, Malerba M, Zbinden M, Mas C, Gervaz P, et al. Human colon cancer epithelial cells harbour active HEDGEHOG-GLI signalling that is essential for tumour growth, recurrence, metastasis and stem cell survival and expansion. *EMBO Mol Med*. 2009;1:338–51.

189. Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, et al. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature*. 2004;431:707–12.

190. Stecca B, Mas C, Clement V, Zbinden M, Correa R, Piguet V, et al. Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:5895–900.

191. Bar EE, Chaudhry A, Lin A, Fan X, Schreck K, Matsui W, et al. Cyclopamine-Mediated Hedgehog Pathway Inhibition Depletes Stem-Like Cancer Cells in Glioblastoma. *STEM CELLS*. 2007;25:2524–33.

192. Dierks C, Grbic J, Zirlik K, Beigi R, Englund NP, Guo G-R, et al. Essential role of stromally induced hedgehog signaling in B-cell malignancies. *Nat Med*. 2007;13:944–51.

193. Singh M, Chaudhry P, Merchant AA. Primary cilia are present on human blood and bone marrow cells and mediate Hedgehog signaling. *Exp Hematol*. 2016;44:1181-1187.e2.

194. Cridland SO, Keys JR, Papathanasiou P, Perkins AC. Indian hedgehog supports definitive erythropoiesis. *Blood Cells Mol Dis*. 2009;43:149–55.

195. Crisan M, Solaimani Kartalaei P, Neagu A, Karkanpouna S, Yamada-Inagawa T, Purini C, et al. BMP and Hedgehog Regulate Distinct AGM Hematopoietic Stem Cells Ex Vivo. *Stem Cell Rep*. 2016;6:383–95.

196. Cooper CL, Hardy RR, Reth M, Desiderio S. Non-cell-autonomous hedgehog signaling promotes murine B lymphopoiesis from hematopoietic progenitors. *Blood*. 2012;119:5438–48.

197. Gao J, Graves S, Koch U, Liu S, Jankovic V, Buonamici S, et al. Hedgehog Signaling Is Dispensable for Adult Hematopoietic Stem Cell Function. *Cell Stem Cell*. 2009;4:548–58.

198. Hofmann I, Stover EH, Cullen DE, Mao J, Morgan KJ, Lee BH, et al. Hedgehog Signaling Is Dispensable for Adult Murine Hematopoietic Stem Cell Function and Hematopoiesis. *Cell Stem Cell*. 2009;4:559–67.

199. McIntyre BAS, Ramos-Mejia V, Rampalli S, Mechael R, Lee J-H, Alev C, et al. Gli3-mediated hedgehog inhibition in human pluripotent stem cells initiates and augments developmental programming of adult hematopoiesis. *Blood*. 2013;121:1543–52.

200. Zhao C, Chen A, Jamieson CH, Fereshteh M, Abrahamsson A, Blum J, et al. Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature*. 2009;458:776–9.

201. Kobune M, Takimoto R, Murase K, Iyama S, Sato T, Kikuchi S, et al. Drug resistance is dramatically restored by hedgehog inhibitors in CD34+ leukemic cells. *Cancer Sci*. 2009;100:948–55.

202. Irvine DA, Copland M. Targeting hedgehog in hematologic malignancy. *Blood*. 2012;119:2196–204.

203. Dierks C, Beigi R, Guo G-R, Zirlik K, Stegert MR, Manley P, et al. Expansion of Bcr-Abl-Positive Leukemic Stem Cells Is Dependent on Hedgehog Pathway Activation. *Cancer Cell*. 2008;14:238–49.

204. Long B, Zhu H, Zhu C, Liu T, Meng W. Activation of the Hedgehog pathway in chronic myelogenous leukemia patients. *J Exp Clin Cancer Res CR*. 2011;30:8.

205. Irvine DA, Zhang B, Kinstrie R, Tarafdar A, Morrison H, Campbell VL, et al. Deregulated hedgehog pathway signaling is inhibited by the smoothed antagonist LDE225 (Sonidegib) in

- chronic phase chronic myeloid leukaemia. *Sci Rep*. 2016;6:25476.
206. Wellbrock J, Latuske E, Köhler J, Wagner K, Stamm H, Vettorazzi E, et al. Expression of Hedgehog Pathway Mediator GLI Represents a Negative Prognostic Marker in Human Acute Myeloid Leukemia and Its Inhibition Exerts Antileukemic Effects. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2015;21:2388–98.
207. Bai L-Y, Chiu C-F, Lin C-W, Hsu N-Y, Lin C-L, Lo W-J, et al. Differential expression of Sonic hedgehog and Gli1 in hematological malignancies. *Leukemia*. 2008;22:226–8.
208. Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schäkel U, Platzbecker U, et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*. 2002;99:4326–35.
209. Lim Y, Gondek L, Li L, Wang Q, Ma H, Chang E, et al. Integration of Hedgehog and mutant FLT3 signaling in myeloid leukemia. *Sci Transl Med*. 2015;7:291ra96-291ra96.
210. Bouscary D. Rational for targeting the hedgehog signalling pathway in acute myeloid leukemia with FLT3 mutation. *Ann Transl Med [Internet]*. 2016 [cited 2019 Dec 11];4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5104592/>
211. Chaudhry P, Singh M, Triche TJ, Guzman M, Merchant AA. GLI3 repressor determines Hedgehog pathway activation and is required for response to SMO antagonist glasdegib in AML. *Blood*. 2017;129:3465–75.
212. Lau BW, Huh K, Madero-Marroquin R, De Marchi F, Lim Y, Wang Q, et al. Hedgehog/GLI1 activation leads to leukemic transformation of myelodysplastic syndrome in vivo and GLI1 inhibition results in antitumor activity. *Oncogene*. 2019;38:687–98.
213. Masetti R, Bertuccio SN, Pession A, Locatelli F. CBFA2T3-GLIS2-positive acute myeloid leukaemia. A peculiar paediatric entity. *Br J Haematol*. 2019;184:337–47.
214. Peacock CD, Wang Q, Gesell GS, Corcoran-Schwartz IM, Jones E, Kim J, et al. Hedgehog signaling maintains a tumor stem cell compartment in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104:4048–53.
215. Hegde GV, Peterson KJ, Emanuel K, Mittal AK, Joshi AD, Dickinson JD, et al. Hedgehog-Induced Survival of B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Cells in a Stromal Cell Microenvironment: A Potential New Therapeutic Target. *Mol Cancer Res*. 2008;6:1928–36.
216. Canettieri G, Di Marcotullio L, Coni S, Greco A, Gulino A. Turning off the switch in medulloblastoma: the inhibitory acetylation of an oncogene. *Cell Cycle Georget Tex*. 2010;9:2047–8.
217. Migden MR, Guminski A, Gutzmer R, Dirix L, Lewis KD, Combemale P, et al. Treatment with two different doses of sonidegib in patients with locally advanced or metastatic basal cell carcinoma (BOLT): a multicentre, randomised, double-blind phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2015;16:716–28.
218. Von Hoff DD, LoRusso PM, Rudin CM, Reddy JC, Yauch RL, Tibes R, et al. Inhibition of the Hedgehog Pathway in Advanced Basal-Cell Carcinoma [Internet]. <http://dx.doi.org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1056/NEJMoa0905360>. 2009 [cited 2019 Dec 11]. Available from: https://www.nejm-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/10.1056/NEJMoa0905360?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dwww.ncbi.nlm.nih.gov
219. Cortes JE, Heidel FH, Hellmann A, Fiedler W, Smith BD, Robak T, et al. Randomized comparison of low dose cytarabine with or without glasdegib in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome. *Leukemia*. 2019;33:379–89.
220. Vortkamp A, Franz T, Gessler M, Grzeschik KH. Deletion of GLI3 supports the homology of the human Greig cephalopolysyndactyly syndrome (GCPS) and the mouse mutant extra toes

- (Xt). *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc.* 1992;3:461–3.
221. Kang S, Rosenberg M, Ko VD, Biesecker LG. Gene structure and allelic expression assay of the human GLI3 gene. *Hum Genet.* 1997;101:154–7.
222. Hall JG, Pallister PD, Clarren SK, Beckwith JB, Wiglesworth FW, Fraser FC, et al. Congenital hypothalamic hamartoblastoma, hypopituitarism, imperforate anus and postaxial polydactyly--a new syndrome? Part I: clinical, causal, and pathogenetic considerations. *Am J Med Genet.* 1980;7:47–74.
223. Biesecker LG, Johnston J. Syndromic and non-syndromic GLI3 phenotypes. *Clin Genet.* 2005;68:284–284.
224. Biesecker LG. The Greig cephalopolysyndactyly syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2008;3:10.
225. Kalff-Suske M, Wild A, Topp J, Wessling M, Jacobsen EM, Bornholdt D, et al. Point mutations throughout the GLI3 gene cause Greig cephalopolysyndactyly syndrome. *Hum Mol Genet.* 1999;8:1769–77.
226. Furniss D, Critchley P, Giele H, Wilkie AOM. Nonsense-mediated decay and the molecular pathogenesis of mutations in SALL1 and GLI3. *Am J Med Genet A.* 2007;143A:3150–60.
227. Shin SH, Kogerman P, Lindström E, Toftgård R, Biesecker LG. GLI3 mutations in human disorders mimic *Drosophila cubitus interruptus* protein functions and localization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:2880–4.
228. Krauß S, So J, Hambrock M, Köhler A, Kunath M, Scharff C, et al. Point Mutations in GLI3 Lead to Misregulation of its Subcellular Localization. *PLOS ONE.* 2009;4:e7471.
229. Démurger F, Ichkou A, Mougou-Zerelli S, Le Merrer M, Goudefroye G, Delezoide A-L, et al. New insights into genotype-phenotype correlation for GLI3 mutations. *Eur J Hum Genet EJHG.* 2015;23:92–102.
230. Ruppert JM, Vogelstein B, Arheden K, Kinzler KW. GLI3 encodes a 190-kilodalton protein with multiple regions of GLI similarity. *Mol Cell Biol.* 1990;10:5408–15.
231. Johnson DR. Extra-toes: a new mutant gene causing multiple abnormalities in the mouse. *Development.* 1967;17:543–81.
232. Büscher D, Grotewold L, Rütger U. The XtJ allele generates a Gli3 fusion transcript. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc.* 1998;9:676–8.
233. Quinn ME, Haaning A, Ware SM. Preaxial polydactyly caused by Gli3 haploinsufficiency is rescued by Zic3 loss of function in mice. *Hum Mol Genet.* 2012;21:1888–96.
234. Schimmang T, Lemaistre M, Vortkamp A, Rütger U. Expression of the zinc finger gene Gli3 is affected in the morphogenetic mouse mutant extra-toes (Xt). *Dev Camb Engl.* 1992;116:799–804.
235. Hayasaka I, Nakatsuka T, Fujii T, Naruse I, Oda S. Polydactyly Nagoya, Pdn: A new mutant gene in the mouse. *Jikken Dobutsu.* 1980;29:391–5.
236. Pohl TM, Mattei MG, Rütger U. Evidence for allelism of the recessive insertional mutation add and the dominant mouse mutation extra-toes (Xt). *Dev Camb Engl.* 1990;110:1153–7.
237. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science.* 2010;330:841–5.
238. Yona S, Kim K-W, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, et al. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity.* 2013;38:79–91.
239. Perdiguer EG, Klapproth K, Schulz C, Busch K, Azzoni E, Crozet L, et al. Tissue-resident

macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature*. 2015;518:547–51.

240. Hoeffel G, Chen J, Lavin Y, Low D, Almeida FF, See P, et al. C-Myb⁺ Erythro-Myeloid Progenitor-Derived Fetal Monocytes Give Rise to Adult Tissue-Resident Macrophages. *Immunity*. 2015;42:665–78.

241. Wen Z, Darnell JE. Mapping of Stat3 serine phosphorylation to a single residue (727) and evidence that serine phosphorylation has no influence on DNA binding of Stat1 and Stat3. *Nucleic Acids Res*. 1997;25:2062–7.

242. Carpenter RL, Lo H-W. STAT3 Target Genes Relevant to Human Cancers. *Cancers*. 2014;6:897–925.

243. Qin HR, Kim H-J, Kim J-Y, Hurt EM, Klarmann GJ, Kawasaki BT, et al. Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 through a Phosphomimetic Serine 727 Promotes Prostate Tumorigenesis Independent of Tyrosine 705 Phosphorylation. *Cancer Res*. 2008;68:7736–41.

244. Shi T, Mazumdar T, Devecchio J, Duan Z-H, Agyeman A, Aziz M, et al. cDNA microarray gene expression profiling of hedgehog signaling pathway inhibition in human colon cancer cells. *PLoS One*. 2010;5.

245. Tripathi K, Mani C, Barnett R, Nalluri S, Bachaboina L, Rocconi RP, et al. Gli1 Protein Regulates the S-phase Checkpoint in Tumor Cells via Bid Protein, and Its Inhibition Sensitizes to DNA Topoisomerase 1 Inhibitors. *J Biol Chem*. 2014;289:31513–25.

246. Sirkisoon SR, Carpenter RL, Rimkus T, Anderson A, Harrison A, Lange AM, et al. Interaction between STAT3 and GLI1/tGLI1 oncogenic transcription factors promotes the aggressiveness of triple-negative and HER2-enriched breast cancers. *Oncogene*. 2018;37:2502–14.

247. Cain JE, Islam E, Haxho F, Blake J, Rosenblum ND. GLI3 repressor controls functional development of the mouse ureter. *J Clin Invest*. 2011;121:1199–206.

248. Tang C-M, Lee TE, Syed SA, Burgoyne AM, Leonard SY, Gao F, et al. Hedgehog pathway dysregulation contributes to the pathogenesis of human gastrointestinal stromal tumors via GLI-mediated activation of KIT expression. *Oncotarget*. 2016;7:78226–41.

249. Ustun C, Arock M, Kluin-Nelemans HC, Reiter A, Sperr WR, George T, et al. Advanced systemic mastocytosis: from molecular and genetic progress to clinical practice. *Haematologica*. 2016;101:1133–43.

250. Sirkisoon SR, Carpenter RL, Rimkus T, Doheny D, Zhu D, Aguayo NR, et al. TGLI1 transcription factor mediates breast cancer brain metastasis via activating metastasis-initiating cancer stem cells and astrocytes in the tumor microenvironment. *Oncogene*. 2020;39:64–78.

251. Cao X, Geradts J, Dewhirst M, Lo H-W. Upregulation of VEGF-A and CD24 Gene Expression by the tGLI1 Transcription Factor Contributes to the Aggressive Behavior of Breast Cancer Cells. *Oncogene*. 2012;31:104–15.

252. Fan Y-H, Ding J, Nguyen S, Liu X-J, Xu G, Zhou H-Y, et al. Aberrant hedgehog signaling is responsible for the highly invasive behavior of a subpopulation of hepatoma cells. *Oncogene*. 2016;35:116–24.

253. Superti-Furga A, Hästbacka J, Rossi A, van der Harten JJ, Wilcox WR, Cohn DH, et al. A family of chondrodysplasias caused by mutations in the diastrophic dysplasia sulfate transporter gene and associated with impaired sulfation of proteoglycans. *Ann N Y Acad Sci*. 1996;785:195–201.

254. Forlino A, Piazza R, Tiveron C, Della Torre S, Tatangelo L, Bonafè L, et al. A diastrophic dysplasia sulfate transporter (SLC26A2) mutant mouse: morphological and biochemical

- characterization of the resulting chondrodysplasia phenotype. *Hum Mol Genet.* 2005;14:859–71.
255. Bonafé L, Mittaz-Crettol L, Ballhausen D, Superti-Furga A. Diastrophic Dysplasia. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Stephens K, et al., editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cited 2020 Jan 16]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1350/>
256. Haila S, Hästbacka J, Böhling T, Karjalainen–Lindsberg M-L, Kere J, Saarialho–Kere U. SLC26A2 (Diastrophic Dysplasia Sulfate Transporter) is Expressed in Developing and Mature Cartilage But Also in Other Tissues and Cell Types. *J Histochem Cytochem.* 2001;49:973–82.
257. Kausar M, Mäkitie RE, Toiviainen-Salo S, Ignatius J, Anees M, Mäkitie O. Recessive multiple epiphyseal dysplasia – Clinical characteristics caused by rare compound heterozygous SLC26A2 genotypes. *Eur J Med Genet.* 2019;62:103573.
258. Rönnerberg E, Melo FR, Pejler G. Mast cell proteoglycans. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc.* 2012;60:950–62.
259. Dimberg LY, Towers CG, Behbakht K, Hotz TJ, Kim J, Fosmire S, et al. A Genome-Wide Loss-of-Function Screen Identifies SLC26A2 as a Novel Mediator of TRAIL Resistance. *Mol Cancer Res MCR.* 2017;15:382–94.
260. Tatton-Brown K, Hanks S, Ruark E, Zachariou A, Duarte SDV, Ramsay E, et al. Germline mutations in the oncogene EZH2 cause Weaver syndrome and increased human height. *Oncotarget.* 2011;2:1127–33.
261. Tatton-Brown K, Murray A, Hanks S, Douglas J, Armstrong R, Banka S, et al. Weaver syndrome and EZH2 mutations: Clarifying the clinical phenotype. *Am J Med Genet A.* 2013;161A:2972–80.
262. Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, et al. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science.* 2002;298:1039–43.
263. Ernst T, Chase AJ, Score J, Hidalgo-Curtis CE, Bryant C, Jones AV, et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet.* 2010;42:722–6.
264. Muñoz-González JI, Jara-Acevedo M, Alvarez-Twose I, Merker JD, Teodosio C, Hou Y, et al. Impact of somatic and germline mutations on the outcome of systemic mastocytosis. *Blood Adv.* 2018;2:2814–28.

7. ANNEXES


ANNEXE 1 - RECENT ADVANCES IN THE UNDERSTANDING AND THERAPEUTIC MANAGEMENT OF MASTOCYTOSIS

Nous avons écrit une revue sur les avancées récentes au cours de ces dernières années sur la prise en charge diagnostique et thérapeutique de la mastocytose et sur les derniers travaux physiopathologiques publiés dans cette maladie.



REVIEW

Recent advances in the understanding and therapeutic management of mastocytosis [version 1; peer review: 4 approved]

Julien Rossignol^{1-3*}, Laura Polivka^{1,3,4*}, Leila Maouche-Chrétien^{1,3}, Laurent Frenzel^{1,3,5}, Patrice Dubreuil^{1,6}, Olivier Hermine ^{1,3,5}

¹French Reference Center for Mastocytosis (CEREMAST), Necker Children's Hospital, APHP, Paris, France

²Department of Hematology, Gustave Roussy Institute, Paris-Saclay University, Villejuif, France

³Imagine Institute, Paris University, INSERM U 1183, Paris, France

⁴Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Inserm U1068, Marseille, France

⁵Department of Hematology, Necker Children's Hospital, APHP, Paris, France

⁶Department of Dermatology, Necker Children's Hospital, APHP, Paris, France

* Equal contributors

v1 **First published:** 22 Nov 2019, 8(F1000 Faculty Rev):1961 (<https://doi.org/10.12688/f1000research.19463.1>)
Latest published: 22 Nov 2019, 8(F1000 Faculty Rev):1961 (<https://doi.org/10.12688/f1000research.19463.1>)

Abstract

Mastocytosis is a rare disease due to the abnormal accumulation of mast cells in various tissues. Its clinical presentation is heterogeneous depending on mast cell infiltration and mediators release. In some cases, it is associated with hematological malignancies. Prognosis varies from very good with a life expectancy similar to the general population in indolent forms of the disease to a survival time of just a few months in mast cell leukemia. Although in most cases a somatic *KIT* D816V mutation is found in tumor mast cells, the physiopathology of the disease is not yet fully understood. Additional germline and somatic mutations may explain this heterogeneity. Treatments aim at blocking effect of mast cell mediators, reducing mast cell activation and tumor burden. New drugs mainly directed against the tyrosine kinase activity of KIT have dramatically changed the quality of life and prognosis of mast cell diseases. Present and future therapeutic strategies are discussed in this review.

Keywords

Mastocytosis, physiopathology, treatment, management, leukemia, mast cell

Open Peer Review

Reviewer Status 

	Invited Reviewers			
	1	2	3	4
version 1 published 22 Nov 2019				

F1000 Faculty Reviews are written by members of the prestigious F1000 Faculty. They are commissioned and are peer reviewed before publication to ensure that the final, published version is comprehensive and accessible. The reviewers who approved the final version are listed with their names and affiliations.

- 1 **Uma Borate**, Oregon Health & Science University, Portland, USA
Luke Fletcher, Oregon Health & Science University, Portland, USA
- 2 **Stefan Wöhrl**, Floridsdorf Allergy Center (FAZ), Pius-Parsch-Platz 1/3, Vienna, Austria

3 **Yoseph A Mekori**, Tel Aviv University, Kfar Saba, Israel

4 **Paul LA van Daele**, Erasmus University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands

Any comments on the article can be found at the end of the article.

Corresponding author: Olivier Hermine (ohermine@gmail.com)

Author roles: **Rossignol J:** Conceptualization, Writing – Original Draft Preparation; **Polivka L:** Conceptualization, Writing – Original Draft Preparation; **Maouche-Chrétien L:** Writing – Review & Editing; **Frenzel L:** Writing – Review & Editing; **Dubreuil P:** Writing – Review & Editing; **Hermine O:** Conceptualization, Writing – Original Draft Preparation, Writing – Review & Editing

Competing interests: Julien Rossignol serves on an advisory board for Novartis, and Olivier Hermine and Patrice Dubreuil serve on an advisory board for AB science. All other authors declare that they have no competing interests.

Grant information: The author(s) declared that no grants were involved in supporting this work.

Copyright: © 2019 Rossignol J *et al.* This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

How to cite this article: Rossignol J, Polivka L, Maouche-Chrétien L *et al.* **Recent advances in the understanding and therapeutic management of mastocytosis [version 1; peer review: 4 approved]** F1000Research 2019, 8(F1000 Faculty Rev):1961 (<https://doi.org/10.12688/f1000research.19463.1>)

First published: 22 Nov 2019, 8(F1000 Faculty Rev):1961 (<https://doi.org/10.12688/f1000research.19463.1>)

Introduction

Mastocytosis covers a spectrum of disease characterized by the clonal expansion and accumulation of mast cells (MCs) in the skin and in various internal organs, including the bone marrow (BM), spleen, lymph nodes, and gastrointestinal tract^{1,2}. The disease presentation is heterogeneous and ranges from cutaneous mastocytosis (CM), which often resolves spontaneously in children, to acute MC leukemia (MCL), with a survival time of just a few months.

In 2016, the World Health Organization (WHO) classified types of mastocytosis into three main groups: CM, with involvement limited to the skin, systemic mastocytosis (SM), with the additional infiltration of tissues other than the skin, and MC sarcoma³. SM is then subdivided into indolent SM (ISM) and, if organ infiltration leads to organ dysfunction, advanced SM (AdvSM). CM and ISM are by far the most frequent subtypes. Although patients with CM or ISM have a normal life expectancy, their quality of life may be impaired by symptoms related to MC activation⁴. In contrast, AdvSM is associated with a decrease in life expectancy in the vast majority of patients; this is because of abnormal infiltration of MCs into various organs and thus impairment of the latter's physiological functions (Table 1).

Mastocytosis is strongly linked to somatic mutations in the *KIT* gene (and especially the *KIT* D816V mutation) coding for the tyrosine kinase receptor KIT, which lead to constitutive activation⁵. However, it is now accepted that the *KIT* D816V mutation does not fully explain the spectrum of mastocytosis diseases. Recent studies of AdvSM have shown that other somatic genetic determinants (typically involving epigenetic regulators) can explain the disease's heterogeneity. Most of these variants are associated with myeloid neoplasms and may worsen the prognosis^{6,7}. In other cases in which *KIT* mutations are not found, the disease's physiopathology has yet to be characterized.

Table 1. The 2016 revision of the World Health Organization classification of mastocytosis⁸.

- **Cutaneous mastocytosis**
Urticaria pigmentosa, maculopapular cutaneous mastocytosis, diffuse cutaneous mastocytosis, mastocytoma of skin
- **Systemic mastocytosis**
 - a. Indolent systemic mastocytosis (ISM)*
 - b. Smoldering systemic mastocytosis (SSM)*
 - c. Systemic mastocytosis with an associated hematological neoplasm (SM-AHN)†
 - d. Aggressive systemic mastocytosis (ASM)*
 - e. Mast cell leukemia (MCL)
- **Mast cell sarcoma (MCS)**

*For a full diagnosis of these subtypes, information on B and C findings is required but may not be available at the time of the initial tissue diagnosis.

†This category is equivalent to the previously described "systemic mastocytosis with an associated clonal hematologic non-mast cell lineage disease". AHNMD and AHN can be used synonymously.

The therapeutic management of mastocytosis is still a challenge for the physician⁸. For patients with ISM, the treatment objective is to decrease the severity of MC activation and thus improve quality of life. Nevertheless, the treatment must be well tolerated and, if possible, devoid of short- and long-term side effects. In AdvSM, the main treatment goal is to prolong survival in patients with comorbidities and poor general status.

Here, we will review new insights into the diagnosis, pathogenesis, and therapeutic management of mastocytosis and cover perspectives for research into this complex disease.

Diagnosis

Mastocytosis can potentially affect all of the organs and can cause a wide variety of clinical manifestations¹. The clinical signs are categorized into two types: those directly related to MC infiltration (skin, spleen, bone, etc.) and those related to MC activation.

Since skin involvement is easy to see, most cases of mastocytosis are revealed by the cutaneous manifestations like flushes, pruritus, and specific lesions. Alternatively, mastocytosis may be diagnosed after patients present with various non-specific symptoms that mimic conditions such as irritable/inflammatory bowel disease, chronic fatigue syndrome, fibromyalgia, and osteoarthritis. Constitutional symptoms (such as fatigue, pain, and neurologic and psychiatric symptoms) are also frequent but may not prompt a diagnosis of mastocytosis in the absence of skin involvement. Recurrent, severe, idiopathic anaphylaxis is more frequent in patients with mastocytosis and is especially associated with Hymenoptera stings, food allergy, exercise, and adverse drug reactions. The REMA score that includes gender, tryptase level, and clinical signs like syncope might be a useful decision-support tool, i.e. for deciding whether or not to perform the full diagnostic work-up for mastocytosis in patients with anaphylaxis, particularly in idiopathic cases or following Hymenoptera stings^{9,10}. Recently, Carter *et al.* have reported the "NIH Idiopathic Clonal Anaphylaxis Score" using the aforementioned criteria with allele-specific quantitative PCR for the *KIT* D816V mutation. Interestingly, this score has better positive and negative predictive value than the REMA score¹¹.

Early onset osteoporosis is a classical manifestation of mastocytosis and typically involves trabecular bones. Less frequently, the disease is diagnosed during investigations of an associated hematologic neoplasm, such as a myeloproliferative disorder, myelodysplastic disease, or acute myeloid leukemia.

Lesions associated with MC infiltration are secondary to increased proliferation and survival of pathological MCs. On the other hand, the signs related to MC activation are secondary to the release of intracellular mediators after activation of the MC. Schematically, three phases succeed each other during this activation¹². First, MC degranulation of prestored mediators occurs a few seconds after triggering activation. These mediators include histamine, tryptase, proteoglycan, and cytokines. This first

step is followed by the second phase characterized by the release of neo-synthesized mediators such as prostaglandin (PGD₂), leukotrienes, and platelet-activating factor. Early mediators (histamine, PGD₂, and leukotrienes) contribute to most of the signs of MC activation (pruritus, urticaria, flushing, hypotension, anaphylactic shock, edema, abdominal pain, and diarrhea). Finally, MCs secrete pro-inflammatory cytokines (TNF α , IL-1, and IL-6), pro-TH2 cytokines (IL-5 and IL-13), and other cytokines (TGF β , VEGF, and FGF) that may participate in tissue lesions.

Classification

Owing to the heterogeneity of the disease, and in order to better evaluate the prognosis and define treatment goals and endpoints, the WHO defined mastocytosis as a specific entity. Hence, because of its unique clinical and pathologic features, mastocytosis is no longer considered a subgroup of myeloproliferative neoplasms. Mastocytosis is classified into three main groups: CM (i.e. involving only the skin), SM (involving organs other than the skin), and MC sarcoma³. Five major variants of SM have been defined: ISM, smoldering SM (SSM), SM with an associated hematologic neoplasm (SM-AHN), aggressive SM (ASM), and MCL (Table 1).

CM requires a histologic confirmation of MC infiltration into the skin and the absence of any other organ involvement (and especially not the BM)¹³. Cutaneous lesions are then divided into maculopapular CM (MPCM, also known as urticaria pigmentosa), diffuse CM, and localized mastocytoma of the skin. Telangiectasia macularis eruptiva perstans is a controversial clinical entity and was not recognized by the WHO. Although CM lesions are present in CM and SM at all ages, they are especially visible in all pediatric cases and less frequent in older adults. Therefore, CM is by far the most common form of mastocytosis in childhood, whereas AdvSM is extremely rare. However, the frequency of isolated CM is difficult to evaluate because BM aspirates and biopsies are rarely collected in children. Mastocytoma (a hemispheric, firm nodule) is the most common cutaneous manifestation of mastocytosis observed before the age of 3 months. Two distinct forms of MPCM have been recognized in children: a variant characterized by monomorphic, small lesions (formerly called urticaria pigmentosa) and one characterized by polymorphic (often large) lesions; these are now referred to as MPCM-small lesions and MPCM-large lesions, respectively¹⁴. Diffuse CM is a rare variant that generally presents during the neonatal period. It is characterized by generalized erythema and is usually associated with pachydermia. In adult-onset mastocytosis, MPCM-small lesions are by far the most common cutaneous manifestations; other forms are very rare.

When the mastocytosis develops in adulthood, it is usually systemic. However, it is likely that some of these cases will be diagnosed as CM if high-sensitivity techniques are not used to detect systemic MC involvement. Nevertheless, in a trial of masitinib's efficacy, the clinical response was better in cases with documented systemic involvement, suggesting that CM and SM are indeed distinct entities¹⁵. A diagnosis of SM requires the documentation of mastocytosis away from the skin. The BM and the gastrointestinal tract are frequently involved, although MC

infiltration can be found in other organ systems (bones, the liver, etc.).

To further characterize the disease, its severity must be characterized (Figure 1)³. The disease features are referred to as "B findings" if a high MC burden and an expansion of the neoplastic process into multiple hematopoietic lineages are present, with no obvious impairments in organ function, and "C findings" if the MC infiltration has produced organ dysfunction (Table 2)^{3,16}. Both ISM and ASM can be associated with a hematologic neoplasm (i.e. SM-AHN). Most hematologic malignancies associated with mastocytosis are of myeloid origin (myelodysplastic syndrome, acute myeloid leukemia, and myeloproliferative neoplasm). In order to define the best therapeutic strategy in cases of SM-AHN, it is essential to assess whether C findings are due to the SM or the AHN.

MCL is characterized by the presence of an abnormally high proportion of MCs (>20%) on BM aspirate smears. Although MCL is very rare, cases can be subclassified as acute MCL with C findings. Some patients with MCL do not exhibit C findings and present a protracted course. Although not included in the WHO classification, we may describe these patients as having chronic MCL with no C findings. Expression of the cell proliferation marker KI67 may distinguish between these two entities (personal communications).

At the French Reference Center for Mastocytosis (CERE-MAST, Paris, France), the work-up for suspected mastocytosis includes diagnostic tests for mastocytosis, screening for B and C findings and osteoporosis, and an extensive evaluation of the functional impairments associated with MC activation. We always perform a BM aspirate and biopsy and investigate exon 17 *KIT* mutations in BM cells and the atypical CD2 and CD25 expression on MCs. If AdvSM is suspected (i.e. with the presence of C findings), we perform next-generation sequencing on BM cells and screen for any additional mutations that are characteristic of myelodysplastic or myeloproliferative disorders and have prognostic and therapeutic value. In routine clinical practice, any further investigations (imaging or skin, intestinal tract, or liver biopsies, etc.) are usually prompted by abnormal clinical and laboratory features. In children, we perform only a BM aspirate and biopsy when AdvSM is suspected and the tryptase level is abnormally elevated (>200 ng/ml). In view of the high frequency of mutations in *KIT* exons 8 to 13 and 17, this gene is always sequenced in suspected cases of childhood-onset mastocytosis.

Pathogenesis

New insights into mast cell ontogeny

Recently, Gentek *et al.* reported that, like macrophages, MCs have two hematopoietic origins in the mouse¹⁷. Unlike MCs in other organs, MCs in the embryonic skin are derived from the yolk sac. These MCs persist after birth before being gradually replaced by the definitive adult MCs. Yolk-sac-derived MCs differ phenotypically from their BM-derived counterparts and have a distinct gene expression pattern. These newly discovered differences might explain the complete, spontaneous remission observed in more than 70% of cases of childhood-onset mastocytosis.

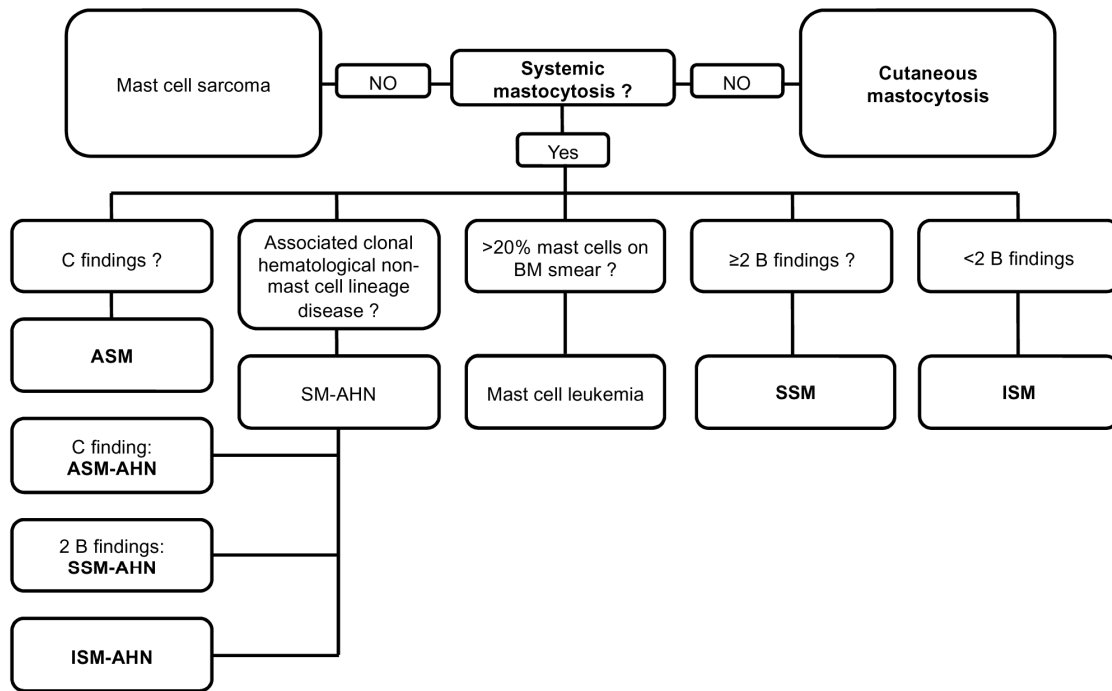


Figure 1. Diagnostic flow chart for mastocytosis. AHN, associated hematologic neoplasm; ASM-AHN, aggressive systemic mastocytosis with an associated hematologic neoplasm; BM, bone marrow; ISM, indolent systemic mastocytosis; MCL, mast cell leukemia; SM-AHN, systemic mastocytosis with an associated hematologic neoplasm; SSM, smoldering systemic mastocytosis; SSM-AHN, smoldering systemic mastocytosis with an associated hematologic neoplasm.

Table 2. B and C findings for the diagnosis of systemic mastocytosis.

B-findings	C-findings
(1) High MC burden : Infiltration grade (MC) in BM > 30% in histology and serum tryptase 200 ng/ml	Organopathy (with impaired organ function) : (1) Bone marrow: cytopenia(s) ANC < 1000/ μ l Hemoglobin < 10g/dl Platelet < 100 000/ μ l
(2) Dysmyelopoiesis with normal blood counts or slight persisting deviation without progression	(2) Liver: palpable hepatomegaly with ascites, abnormal liver function tests and/or portal hypertension
(3) Organomegaly (without impaired organ function) : Palpable hepatomegaly or/and lymphadenopathy palpable or visceral lymph node-enlargement found in US or CT (>2cm) or/and palpable splenomegaly.	(3) Spleen: palpable splenomegaly with hypersplenism
	(4) GI tract: malabsorption with hypoalbuminemia and weight loss
	(5) Skeleton: bone lesions with large osteolyses or/and severe osteoporosis with pathologic fractures

ANC, absolute neutrophil count; BM, bone marrow; CT, computed tomography; GI, gastrointestinal; Hb, hemoglobin; LN, lymph node; MC, mast cell; Plt, platelet; US, ultrasound. Adapted from Valent *et al.*¹⁶

KIT mutations do not account for all mastocytosis phenotypes

More than 85% of patients with adult-onset mastocytosis present a somatic gain-of-function mutation in the *KIT* gene coding for the KIT transmembrane tyrosine kinase receptor¹⁸. The most frequently detected mutation leads to the substitution of an aspartic acid by a valine (D816V) in the second catalytic

domain, resulting in constitutive kinase activity. In turn, this promotes MC activation, survival, and proliferation independently of KIT's ligand (stem cell factor [SCF]). Under physiological conditions, SCF is critical for MC proliferation, differentiation, survival, and migration. Stimulation (by IgE or otherwise) enhances MC activation through the Ras-MAP kinase, SRC, STAT,

and PI3K/AKT pathways. A somatic *KIT* mutation is present in around 80% of cases of childhood-onset mastocytosis. However, in contrast to adult cases, only 42% of the children present a mutation in codon 816 (exon 17); 44% of cases have a mutation outside exon 17 (mostly in the fifth Ig loop of the *KIT* extracellular domain, encoded by exons 8 and 9)¹⁹. Although all of these *KIT* mutations cause the constitutive activation of kinase activity, they cannot fully explain the clonal expansion of MCs and the heterogeneous symptoms observed in different types of mastocytosis. Patients harboring the same mutation can present with very different clinical pictures. In childhood-onset mastocytosis, complete spontaneous remission is typically observed at puberty, despite the presence of *KIT*-activating mutations, including the D816V mutation. Transgenic mice overexpressing *KIT* D816V exhibit slow expansion and indolent accumulation of MCs in the tissues, with incomplete penetrance, and they rarely develop aggressive mastocytosis²⁰. Although most patients with mastocytosis did not have a family history of MC disease, around 100 familial cases worldwide have been reported in the literature. However, only 13 of these presented with germline *KIT* mutations (A533D, M541L, Del419D, S451C, K509I, V559A, R634W, or N822I)^{21–31}. In the mastocytosis cohort at the CEREMAST, familial forms appear to be more prevalent than in the literature. Indeed, about 7% of our patients have a first- or second-degree relative with mastocytosis. The majority of these relatives do not have a mutation in the *KIT* gene (unpublished data). Thus, *KIT* mutations do not account for all familial forms of the disease. Lastly, BaF3 cells overexpressing *KIT* D816V do not display a transformed phenotype and are even driven towards maturation by the mutation³².

Taken as a whole, these observations strongly suggest the additional involvement of one or more germline or somatic mutations or polymorphisms in genes other than *KIT*; these would act synergistically with *KIT* mutations in the development of mastocytosis.

Associated somatic mutations

Somatic mutations in other genes (notably epigenetic regulator genes, such as *SRSF2*, *ASXL1*, *RUNX1*, and *TET2*) have been described in ASM and are often found in patients with a myeloid neoplasm. These mutations account for, at least to some extent, the different clinical entities in mastocytosis.

Several studies have investigated the prognostic impact of these additional mutations. Most of the mutations have been found in patients with AdvSM, and the presence and number of *SRSF2*, *ASXL1*, and *RUNX1* (S/A/R) mutations are associated with a poor prognosis, even in patients treated with midostaurin (Figure 2)^{33–35}. *In vitro* studies suggest that these mutations act in synergy with abnormal *KIT* signal transduction to induce MC survival and proliferation. However, the underlying molecular mechanisms have yet to be characterized.

Two studies have investigated the clonal architecture in SM-AHN. First, Schwaab and colleagues reported a correlation among the *KIT* allele burden, the number of colony-forming unit granulocytes monocytes (CFU-GM) bearing the D816V *KIT* mutation, and the severity of mastocytosis. This finding strongly suggests that an early D816V *KIT* mutation inside the hematopoietic progenitor compartment is associated with a poor outcome (Figure 2)⁶. The second study of mutations in both AHN and mastocytosis showed that the D816V *KIT* mutation could be found in CD15⁺ circulating cells and that MCs carried associated mutations. The results of a colony forming unit assay suggested that the associated mutations arise before the *KIT* mutation during hematopoiesis³³.

Prognosis

The prognosis for CM and ISM is excellent, as reported by Lim *et al.* in 2009³⁶. Indeed, patients with ISM in the USA have much the same life expectancy as the general population. However, the prognosis is poor for AdvSM, especially in elderly

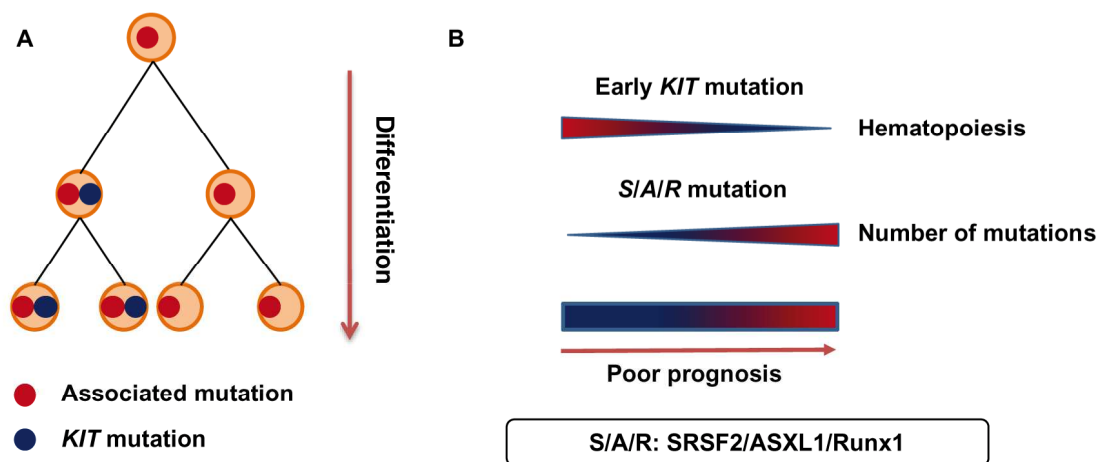


Figure 2. Advanced systemic mastocytosis: clonal architecture and prognosis. A. A representation of the clonal architecture of the hematopoietic compartment in advanced mastocytosis. The associated mutations occur before the *KIT* mutation. **B.** An early D816V *KIT* mutation inside the hematopoietic progenitor compartment and the presence of *SRSF2*, *ASXL1*, *RUNX1* (S/A/R) mutations are associated with a poor outcome. A, *ASXL1* mutation; R, *RUNX1* mutation; S, *SRSF2* mutation.

patients: median OS was 41 months for ASM, 24 months for SM-AHN, and 2 months for MCL in the aforementioned study reported by Lim *et al.*

Along with age, several prognostic factors have been reported. Splenomegaly and elevated alkaline phosphatase are predictive of a poor prognosis in both AdvSM and ISM. In AdvSM, the presence of one or more S/A/R mutations has a negative impact on the outcome.

Treatment

Several new treatments have improved the prognosis and quality of life for patients with mastocytosis. The therapeutic objective depends on the type of mastocytosis, the prognosis, the patient's age, and the presence or absence of an associated hematologic neoplasm.

Cutaneous and indolent systemic mastocytosis: the main treatment objective is to decrease handicap and improve quality of life (Table 3 and Figure 3)

Patients with an indolent form of mastocytosis (like CM and ISM) can present two types of clinical symptoms: those related to MC activation syndrome (MCAS) and those related to MC infiltration (particularly skin infiltration). The treatment choice is therefore based on the signs that cause the most severe disability (Figure 3 and Figure 4).

The treatment of signs of MC activation is initially based on antihistamines (anti-H1 and anti-H2), leukotriene receptor inhibitors, and cromolyn. Although aspirin and NSAIDs may induce allergic and/or anaphylactic reactions, there is no abso-

lute contra-indication to these drugs and they may even improve some symptoms like pains and flushing. For children with isolated mastocytoma and severe symptoms, the treatment of choice is topical corticosteroids with occlusive dressings. If this fails, excision *in toto* can be considered. Ultraviolet A (either alone or combined with oral psoralen) can be used in adolescents and adults to treat skin manifestations (especially pruritus) that are resistant to standard medications. It is essential to eliminate triggering factors (e.g. foods, medications, or environmental factors such as Hymenoptera stings) by testing for IgE-mediated allergy. These measures must be accompanied by patient education on epinephrine self-administration (especially in patients with a history of anaphylactic reactions)⁸. Honeybee- and wasp-allergic patients with a history of severe reactions must be submitted to allergen-specific immunotherapy³⁷. Patients must be warned of the risk associated with anesthesia; for example, the French Society of Anesthesia & Intensive Care Medicine has published specific guidelines on this topic. Most patients are improved by these initial therapeutic measures³⁸.

In our experience, we prescribe anti-H1 medications almost systematically for MCAS, especially for pruritus, urticaria, flushing, recurrent hypotension/anaphylaxis, or neuropsychic manifestations. We use anti-H2 medication and cromolyn with or without a proton pump inhibitor for gastrointestinal symptoms. Leukotriene antagonists seem particularly effective for flushing and pollakiuria. We are currently testing the effect of NMDA receptor inhibitors (such as ketamine) in patients (about 20%) with fentanyl-refractory chronic pain³⁹. Our preliminary results suggest that these treatments can be efficient. Lastly, as there is no prospective study published so far on the role of bone-forming

Table 3. Completed clinical trials and large retrospective studies of indolent systemic mastocytosis or smoldering systemic mastocytosis.

Author (Journal)	Treatment	Patients	Type of study	ORR (%)	Follow up
Barete (Blood) ⁴⁰	Cladribine	36	Retrospective	ORR: 92 %	Duration of response: 44.5 months
Lim (Am. J. Hematol.) ⁴¹	Interferon	11	Retrospective	ORR: 60%	Duration of response: 12 months (with AdvSM)
Broesby-Olsen (Allergy) ⁴²	Omalizumab	13	Retrospective	ORR: 78.6 %	Duration of treatment: 21 months
Lernal (JACI practice) ⁴³	Omalizumab	56	Retrospective	ORR: 76.8%	Response at least > 3 months (76.7%)
Vega-Ruiz (Leukemia Research) ⁴⁴	Imatinib	11	Phase II	ORR: 55%	Duration of improvement lasted between 9 and 36 months
Verstovsek (Clin Cancer Res) ⁴⁵	Dasatinib	18	Phase II	ORR: 33%	Duration of symptomatic responses ranged from 3 to 18+ months
Lortholary (Lancet) ¹⁵	Masitinib	masitinib n=71 placebo n=64	Phase III	Cumulative response (≥75% symptom improvement) Masitinib: 18.7% Placebo: 7.4%	Duration of treatment: 18.9 months
Moraly (unpublished data, submitted for publication)	Rapamycine	11	Retrospective	ORR: 70%	Duration of treatment: 10.8 months

AdvSM, advanced systemic mastocytosis; ORR, overall response rate.

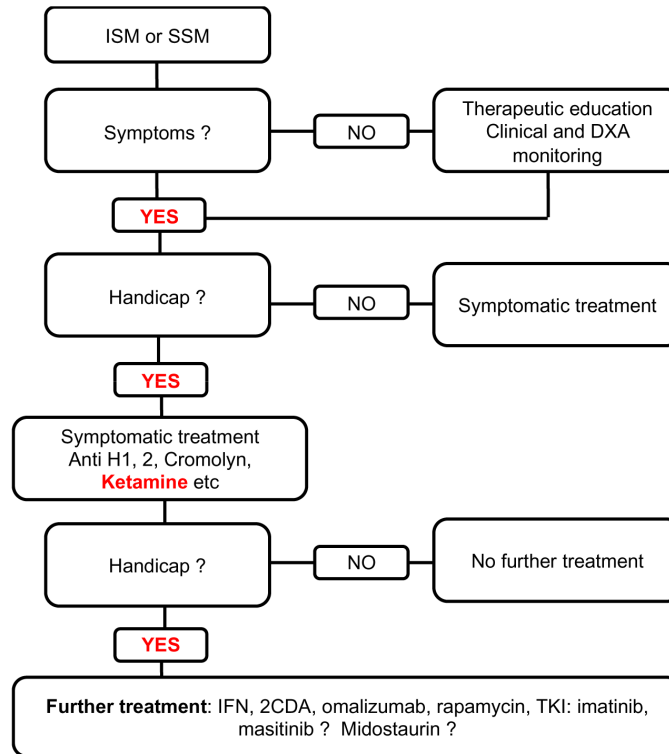


Figure 3. Treatment flow chart for indolent and smoldering systemic mastocytosis. 2CDA, cladribine; DXA, dual-energy X-ray absorptiometry; IFN, interferon; ISM, indolent systemic mastocytosis; SSM, smoldering mastocytosis; TKI, tyrosine kinase inhibitor.

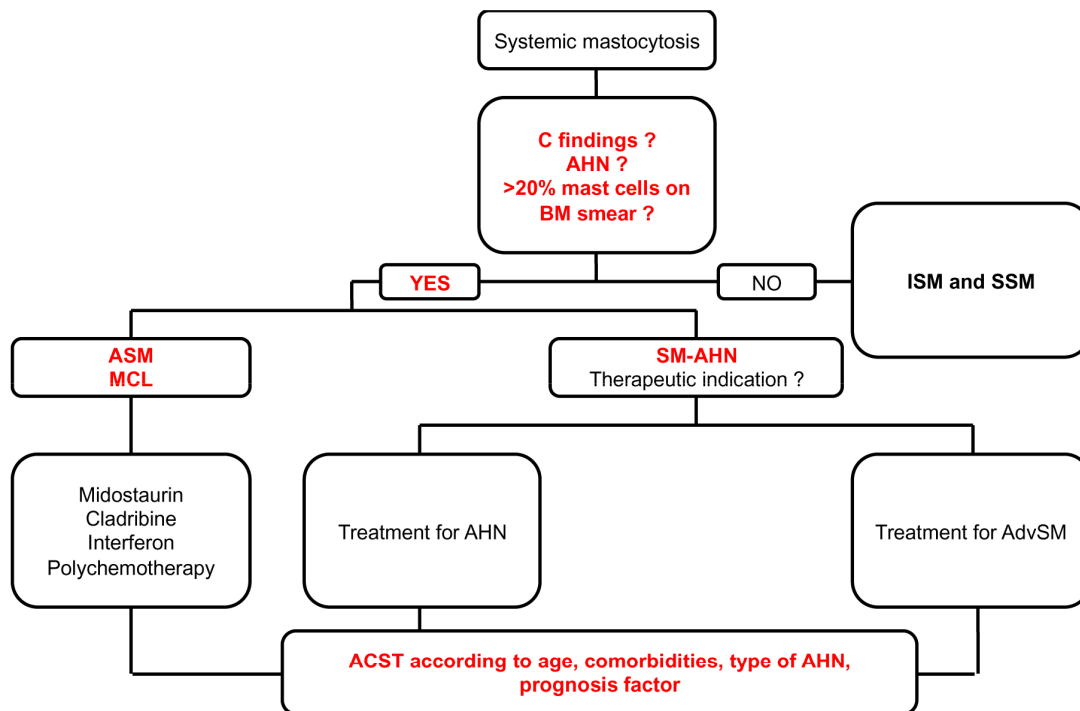


Figure 4. Treatment flow chart for advanced systemic mastocytosis. ACST, allogeneic stem cell transplantation; AdvSM, advanced systemic mastocytosis; AHN, associated hematologic neoplasm; ASM, aggressive systemic mastocytosis; BM, bone marrow; ISM, indolent systemic mastocytosis; MCL, mast cell leukemia; SM-AHN, systemic mastocytosis with an associated hematologic neoplasm; SSM, smoldering systemic mastocytosis.

therapies for mastocytosis-associated osteoporosis, we are investigating the efficacy of denosumab in a phase III study (NCT03401060). In addition to signs of MC activation, patients may experience disability due to the psychological and social impact of the skin involvement in MPCM. It is difficult to accurately assess the disability related to acute and chronic symptoms. Several consultations are necessary to confirm the patient's willingness to accept the potential risks associated with certain treatments, particularly for esthetic reasons, because the treatment of cutaneous lesions requires the use of cytoreductive drugs.

At present, there are no guidelines on MC activation that is refractory to antihistamine medications or on when cytoreductive drugs should be used. With the exception of masitinib, prospective clinical trials have not been performed. Hence, treatment choice is based solely on the specialist center's own experience (Table 3)^{15,40–45}.

Tyrosine kinase inhibitors. Given the involvement of constitutive KIT tyrosine kinase activity in the pathophysiology of mastocytosis, several drugs used to block both BCR-ABL and KIT in cases of chronic myeloid leukemia have also been evaluated in SM.

The results of several prospective studies of first-generation (imatinib) and second-generation (dasatinib and nilotinib) inhibitors have been disappointing, with low response rates^{44,45}. On the molecular level, the presence of the D816V *KIT* mutation in the vast majority of cases of mastocytosis confers resistance to the above-mentioned inhibitors. We therefore reserve these treatments for the small proportion of patients who do not have a *KIT* exon 17 mutation; the results for MC activation and cutaneous involvement are encouraging.

Masitinib was evaluated in the first phase III study of patients with CM or ISM and significant disability¹⁵. Although masitinib lacks direct activity on the D816V *KIT* mutation, its action (particular on Lyn) appears to block MC degranulation *in vitro*. In Lortholary *et al.*'s study, masitinib had an acceptable safety profile and showed significant efficacy on symptoms; a reduction of more than 75% in symptoms was observed in 18.7% of the patients treated with the inhibitor and 7.4% of those treated with placebo ($P = 0.0076$). This drug is currently being evaluated in a confirmatory phase III trial.

Cladribine. Cladribine has never been prospectively evaluated in SM, although long-term follow-up data from patients with SM have been reported retrospectively. This drug has a positive effect on both skin involvement and the symptoms of MC activation. Barete *et al.* studied cladribine treatment in 36 patients with ISM/SSM; the overall response rate was 92%, and the median response duration was 44.5 months⁴⁰. Although the treatment induced significant neutropenia and prolonged CD4⁺ T-cell lymphopenia, the toxicity was mild and acceptable for an indolent disease. However, given the risk of secondary cancer observed in other indications, it is recommended to exclude

patients with a history of cancer and to limit the number of courses of cladribine (0.14 mg/kg/day, for 5 days) to 6. We are currently looking at whether lower-dose maintenance treatment with cladribine might be as efficacious.

Omalizumab. Omalizumab is an anti-IgE monoclonal antibody indicated in the treatment of asthma and chronic urticaria. Given the drug's mode of action and lack of cytoreductive activity, it has been suggested that omalizumab can decrease the signs of MC activation associated with mastocytosis⁴². The initial results in a small cohort were encouraging. In an analysis of the CEREMAST database, we reported on the largest-yet cohort of omalizumab-treated patients ($n = 56$) with indolent, cutaneous forms and MCAS⁴³. The results were particularly encouraging, with an overall response rate of 76.8% and reductions in all symptoms assessed, even the difficult-to-treat neuropsychiatric symptoms. Omalizumab is therefore an option that we often consider in patients who are very disabled by their signs of MC activation. Further work is needed to define the population that will benefit most from omalizumab treatment. At present, the optimal dosing frequency (150 to 300 mg every week to every four weeks) remains to be determined. Furthermore, omalizumab may be of value for Hymenoptera venom desensitization in patients with mastocytosis.

Other options. Pegylated interferon (pegIFN) has been used for decades in the treatment of mastocytosis. It effectively reduces both the signs of MC activation and the extent of cutaneous lesions⁴¹. The main limitation relates to the associated neuropsychiatric side effects in a patient population that frequently suffers from psychiatric signs in general and major depressive episodes in particular. However, pegIFN remains a valuable option, especially when other treatments are contraindicated or for cladribine sparing. PegIFN can be used also to treat the myeloproliferative disorders associated with mastocytosis.

Rapamycin may also be a relevant treatment option in relapsed or refractory patients carrying the D816V *KIT* mutation. We found that *in vitro*, D816V-mutated MC lines (but not wild-type MC lines) were specifically sensitive to rapamycin⁴⁶. Even though the first-in-human results did not show significant efficacy, our study of a series of 24 patients (including 12 with ISM) highlighted a response rate of 70% (especially for the signs of MC activation), as could be expected from the *in vitro* data (unpublished data, submitted for publication). Efficacy on MPCM was also observed.

Advanced mastocytosis: the main objective is to prolong overall survival (Table 4 and Figure 4)

Advanced mastocytosis is a spectrum of hematological malignancies with a poor prognosis. In eligible and particularly poor prognosis patients, the aim of the treatment is to induce remission to perform an allogeneic stem cell transplantation (ASCT) that remains the only current treatment with the potential to cure. Until recently, no targeted therapies were available for this difficult-to-treat set of MC diseases (Table 4)^{40,41,44,45,47–50}. Lately, impressive efficacy of midostaurin has been reported in the

Table 4. Completed clinical trials and large retrospective studies for advanced mastocytosis.

Author (Journal)	Treatment	Patients	Type of study	Non hematological AE (grade III/IV)	Response	Mediane response duration	Overall survival
Lim (<i>Am J Hematol.</i>) ⁴¹	Interferon α	30	Retrospective	Asthenia, depression	ORR: 50%	12 months (with ISM)	NA
Kluin-Nelemens (<i>Blood</i>) ⁴⁷	Cladribine	6	Phase II	Infection, toxidermia	ORR: 100% CR: 0%	NA	NA
Barete (<i>Blood</i>) ⁴⁰	Cladribine	32	Retrospective	Infection	ORR: 50% CR: 0%	ASM: 30 months SM-AHN: 57 months	Median: ASM: 2.4 years SM-AHN: 6.5 years
Vega-Ruiz (<i>Leukemia Research</i>) ⁴⁴	Imatinib	9	Phase II	Ascites, diarrhea, asthenia, pain, rash	ORR: 11% CR: 11%	NA	NA
Lim (<i>Am J Hematol.</i>) ⁴¹	Imatinib	19	Retrospective	Diarrhea, edema	ORR: 20% CR: 0%	19 months (with ISM)	NA
Pagano (<i>Int J Hematol.</i>) ⁴⁸	Imatinib	17	Retrospective	NA	ORR: 29% CR: 5%	NA	NA
Verstovsek (<i>Clin Cancer Res</i>) ⁴⁵	Dasatinib	15	Phase II	Pleural effusion, pains, nausea, asthenia	ORR: 13% CR: 13%	12 months	Median: 13 months
Gotlib (<i>NEJM</i>) ⁴⁹	Midostaurin	116	Phase II	Nausea, diarrhea, fatigue	ORR: 60% CR: 0%	24.1 months	Median: 33.9 months
Ustun (<i>JCO</i>) ⁵⁰	ASCT: MAC: 63% Geno-identical: 60%	57	Retrospective	1 year NRM: 20%	ORR: 70% CR: 28%	20 months	3 years overall survival: 57%

AdvSM, advanced systemic mastocytosis; AE, adverse events; ASCT, allogeneic stem cell transplantation; ASM, aggressive systemic mastocytosis; CR, complete response; ISM, indolent systemic mastocytosis; MAC, myeloablative conditioning; NA, not available; NRM, non-relapse mortality; ORR, overall response rate; SM-AHN, systemic mastocytosis with an associated hematologic neoplasm.

first large-scale phase II study in advanced mastocytosis, and so it was approved by the FDA in 2017. We will discuss below the main cytoreductive therapies used at our reference center.

Midostaurin. The broad-spectrum tyrosine kinase inhibitor midostaurin has activity against D816V *KIT* mutations. The results of the first large-scale clinical trial in patients with AdvSM (n = 116) were published in 2016⁴⁹. Overall, 60% of the patients treated with midostaurin exhibited a response. The safety profile was acceptable, and the most frequent adverse events affected the gastrointestinal tract (nausea and diarrhea). The median response duration was 24.1 months, and the median overall survival time was 33.9 months. Interestingly, the midostaurin response rates were similar in all of the subgroups of patients with ASM, including those with AHN. However, histologically complete responses were rarely observed, and treatment had to be maintained. In our opinion, midostaurin is currently the first-line treatment of choice for first-line AdvSM.

Cladribine. Cladribine has been studied to some extent, but it is not considered as the standard of care⁴⁷. In the above-mentioned study by Barete *et al.*, 32 patients received cladribine for AdvSM⁴⁰. The overall response rate was 50%, and the median response durations in ASM and SM-AHN were 30 and 57 months, respectively. However, the median overall survival time was only

2.4 years for ASM. Furthermore, the treatment was not efficient in SM with AHN (particularly associated with myelodysplastic syndrome) and worsened cytopenia. Therefore, cladribine might best be used to treat smoldering forms, chronic MCL and forms associated with myeloproliferative neoplasms, or as a bridge to ASCT transplantation for midostaurin refractory patients.

Allogeneic stem cell transplantation. ASCT remains the only curative treatment for AdvSM and must be considered for all patients. The procedure's major limitation is eligibility, given the frequency of comorbidities and advanced age in this patient population. Ustun *et al.* have reported on the largest-yet published series of patients treated with ASCT for AdvSM (n = 57)⁵⁰. Around two-thirds of the patients underwent prior myeloablative conditioning, and the 1-year non-relapse mortality rate was 20%. Strikingly, the overall response rate was 70%, and the complete response rate was 28%. The SM and AHN components were both sensitive to ASCT. The 3-year overall survival rate was 57%. It is noteworthy that most of these patients had not received midostaurin, and so one would expect to see better results in midostaurin-treated individuals. A Europe-wide retrospective analysis is ongoing (the European Society for Blood and Marrow Transplantation registry).

At the CEREMAST, we always consider early ASCT for eligible patients with MCL or high-risk AHN (Figure 4). For

other cases, we typically use next-generation sequencing to screen for S/A/R mutations and decide on the optimal time for ASCT. With regard to the poor outcome for patients bearing these mutations, we plan to perform ASCT within a year of diagnosis (i.e. as soon as patients have achieved the best possible response to treatments such as midostaurin).

Future perspectives

Therapeutic progress over the last 10 years (particularly with the emergence of KIT D816V kinase inhibitors) has improved quality of life and survival in patients with mastocytosis. Indeed, these patients have benefited from targeted therapies developed in other diseases, such as cancer and chronic urticaria. Nevertheless, most patients with SM relapse or are incompletely relieved (even after midostaurin treatment), and the symptoms of mastocytosis often decrease their quality of life and significantly affect their social and working lives. Hence, novel therapeutic approaches (alone or in combination with other treatments) are therefore still required, especially for patients with AdvSM who are not eligible for ASCT.

The more active areas of research are targeted therapies, particularly the tyrosine kinase inhibitor avapritinib. No studies are currently investigating chemotherapies or checkpoint inhibitors. Given the overexpression of PD-L1 in SM, anti-PD1 and anti-PDL1 antibodies might be effective with an acceptable safety profile⁵¹. Molecules that target extracellular antigens might be one option (Figure 5)^{51,52}. Given that tumor MCs from a subset of patients with AdvSM express CD30, brentuximab has been assessed⁵³. The results were very disappointing; none of the 10 patients responded to treatment⁵⁴. Other molecules (AK002, SL-401, and denileukin diftitox) are currently in early phase clinical development. Other treatments targeting signaling pathways are being studied (Figure 5); avapritinib or BLU-285 (a new-generation tyrosine kinase inhibitor targeting KIT and its mutants) appears to be the most promising of these. Indeed, the

results of a phase I trial (reported at the 2017–2018 American Society of Hematology meeting) highlighted a response in 13 of the 18 treated patients (72%) and, strikingly, included two complete responses. An international phase II study is in progress (the PATHFINDER study, NCT03580655), and the results are particularly expected to assess the adverse events and the long-term response. Lastly, preclinical studies for another tyrosine kinase inhibitor, DCC-2618, have reported interesting results and the drug is currently in phase I study in AdvSM (NCT02571036)⁵⁵. In case of confirmation of the efficacy of the two last medications mentioned, a phase III study versus midostaurin seems unlikely regarding the low prevalence of AdvSM. However, that would allow us to optimize the management of our patients according to the safety profile and the patients' comorbidities.

Concluding remarks

Mastocytosis is a rare disease, the classification, physiopathology, and treatment of which have been greatly refined over the last decade. The discovery of *KIT* mutations has shed light on the physiopathology of mastocytosis and has provided a rationale for targeted treatment. The development of KIT-blocking tyrosine kinase inhibitors has increased overall survival rates among patients with aggressive forms of mastocytosis and has improved quality of life for patients with indolent forms of the disease. However, a better understanding of the role of additional somatic mutations should provide better prognoses, open up new treatment options, and optimize the use of ASCT (currently the only curative treatment). Many questions have yet to be answered, including the cause and physiopathology of spontaneous regression in pediatric forms, the mechanisms by which *KIT* mutations and other somatic mutations cooperate, the respective roles of the genetic background and environmental factors in disease development, and the heterogeneity of the disease's signs and symptoms. Answers to these questions would not only provide new treatment options for mastocytosis but also help to

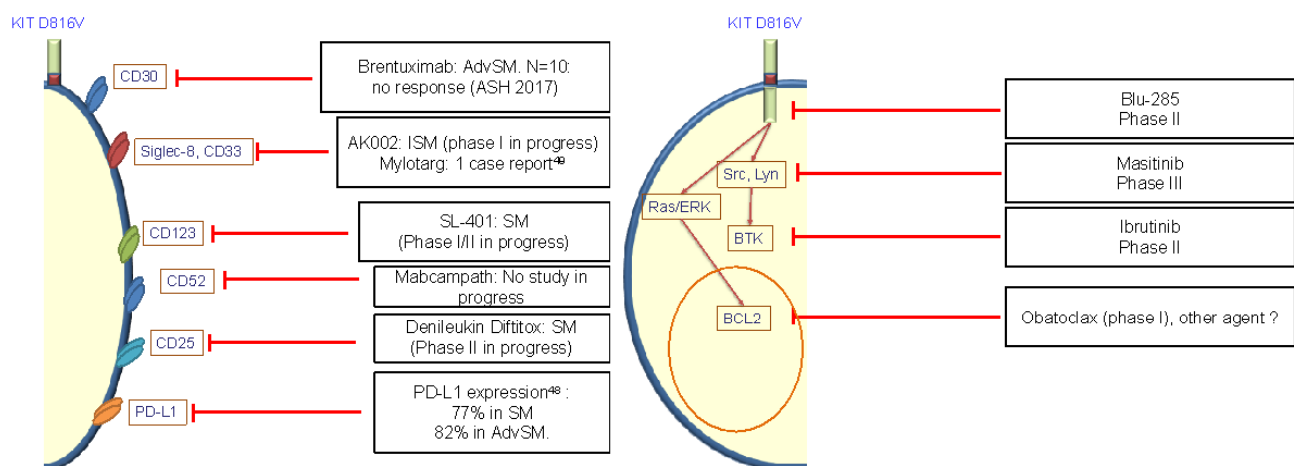


Figure 5. Therapeutic perspectives for mastocytosis^{48,49}. AdvSM, advanced systemic mastocytosis; ISM, indolent systemic mastocytosis; SM, systemic mastocytosis. Based on clinicaltrials.com

resolve a number of problems in oncology and in allergic, neurologic, and psychiatric diseases.

Abbreviations

AdvSM, advanced systemic mastocytosis; ASCT, allogeneic stem cell transplantation; ASM, aggressive systemic mastocytosis; BM, bone marrow; CEREMAST, French Reference Center for

Mastocytosis; CM, cutaneous mastocytosis; ISM, indolent systemic mastocytosis; MC, mast cell; MCAS, mast cell activation syndrome; MCL, mast cell leukemia; MPCM, maculopapular cutaneous mastocytosis; pegIFN, pegylated interferon; SM, systemic mastocytosis; SM-AHN, systemic mastocytosis with an associated hematologic neoplasm; SSM, smoldering systemic mastocytosis; WHO, World Health Organization

References



- Vaes M, Benghlat FS, Hermine O: **Targeted Treatment Options in Mastocytosis.** *Front Med (Lausanne)*. 2017; 4: 110.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
- Pardananani A: **How I treat patients with indolent and smoldering mastocytosis (rare conditions but difficult to manage).** *Blood*. 2013; 121(16): 3085–94.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Valent P, Akin C, Metcalfe DD: **Mastocytosis: 2016 updated WHO classification and novel emerging treatment concepts.** *Blood*. 2017; 129(11): 1420–7.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
- Scherber RM, Borate U: **How we diagnose and treat systemic mastocytosis in adults.** *Br J Haematol*. 2018; 180(1): 11–23.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
- Arock M, Wedeh G, Hoermann G, et al.: **Predclinical human models and emerging therapeutics for advanced systemic mastocytosis.** *Haematologica*. 2018; 103(11): 1760–71.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
- Schwaab J, Schnitger S, Sotlar K, et al.: **Comprehensive mutational profiling in advanced systemic mastocytosis.** *Blood*. 2013; 122(14): 2460–6.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Yavuz AS, Lipsky PE, Yavuz S, et al.: **Evidence for the involvement of a hematopoietic progenitor cell in systemic mastocytosis from single-cell analysis of mutations in the c-kit gene.** *Blood*. 2002; 100(2): 661–5.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Pardananani A: **Systemic mastocytosis in adults: 2017 update on diagnosis, risk stratification and management.** *Am J Hematol*. 2016; 91(11): 1146–59.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Valent P, Akin C, Bonadonna P, et al.: **Proposed Diagnostic Algorithm for Patients with Suspected Mast Cell Activation Syndrome.** *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2019; 7(4): 1125–1133.e1.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
- Alvarez-Twose I, González-de-Olano D, Sánchez-Muñoz L, et al.: **Validation of the REMA score for predicting mast cell clonality and systemic mastocytosis in patients with systemic mast cell activation symptoms.** *Int Arch Allergy Immunol*. 2012; 157(3): 275–80.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Carter MC, Desai A, Komarow HD, et al.: **A distinct biomolecular profile identifies monoclonal mast cell disorders in patients with idiopathic anaphylaxis.** *J Allergy Clin Immunol*. 2018; 141(1): 180–188.e3.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
- Arock M, Akin C, Hermine O, et al.: **Current treatment options in patients with mastocytosis: Status in 2015 and future perspectives.** *Eur J Haematol*. 2015; 94(6): 474–90.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Hartmann K, Escribano L, Grattan C, et al.: **Cutaneous manifestations in patients with mastocytosis: Consensus report of the European Competence Network on Mastocytosis; the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology; and the European Academy of Allergy and Clinical Immunology.** *J Allergy Clin Immunol*. 2016; 137(1): 35–45.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Wiechers T, Rabenhorst A, Schick T, et al.: **Large maculopapular cutaneous lesions are associated with favorable outcome in childhood-onset mastocytosis.** *J Allergy Clin Immunol*. 2015; 136(6): 1581–1590.e3.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Lortholary O, Chandesaris MO, Bulai Livideanu C, et al.: **Masitinib for treatment of severely symptomatic indolent systemic mastocytosis: A randomised, placebo-controlled, phase 3 study.** *Lancet*. 2017; 389(10069): 612–20.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
- Valent P, Horny HP, Escribano L, et al.: **Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: A consensus proposal.** *Leuk Res*. 2001; 25(7): 603–25.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Gentek R, Ghigo C, Hoeffel G, et al.: **Hemogenic Endothelial Fate Mapping Reveals Dual Developmental Origin of Mast Cells.** *Immunity*. 2018; 48(6): 1160–1171.e5.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
- Longley BJ Jr, Metcalfe DD, Tharp M, et al.: **Activating and dominant inactivating c-KIT catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(4): 1609–14.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
- Bodemer C, Hermine O, Palmérini F, et al.: **Pediatric mastocytosis is a clonal disease associated with D816V and other activating c-KIT mutations.** *J Invest Dermatol*. 2010; 130(3): 804–15.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Zappulla JP, Dubreuil P, Desbois S, et al.: **Mastocytosis in mice expressing human Kit receptor with the activating Asp816Val mutation.** *J Exp Med*. 2005; 202(12): 1635–41.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
- Hartmann K, Wardelmann E, Ma Y, et al.: **Novel Germline Mutation of KIT Associated With Familial Gastrointestinal Stromal Tumors and Mastocytosis.** *Gastroenterology*. 2005; 129(3): 1042–6.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Zhang LY, Smith ML, Schultheis B, et al.: **A novel K509I mutation of KIT identified in familial mastocytosis-in vitro and in vivo responsiveness to imatinib therapy.** *Leuk Res*. 2006; 30(4): 373–8.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
- Speight RA, Nicolle A, Needham SJ, et al.: **Rare, Germline Mutation of KIT With Imatinib-Resistant Multiple GI Stromal Tumors and Mastocytosis.** *J Clin Oncol*. 2013; 31(16): e245–e247.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Chan EC, Bai Y, Kirshenbaum AS, et al.: **Mastocytosis associated with a rare germline KIT K509I mutation displays a well-differentiated mast cell phenotype.** *J Allergy Clin Immunol*. 2014; 134(1): 178–187.e1.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
- Tang X, Boxer M, Drummond A, et al.: **A germline mutation in KIT in familial diffuse cutaneous mastocytosis.** *J Med Genet*. 2004; 41(6): e88.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
- Foster R, Byrnes E, Meldrum C, et al.: **Association of paediatric mastocytosis with a polymorphism resulting in an amino acid substitution (M541L) in the transmembrane domain of c-KIT.** *Br J Dermatol*. 2008; 159(5): 1160–9.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Beghini A, Tibiletti M, Roversi G, et al.: **Germline mutation in the juxtamembrane domain of the kit gene in a family with gastrointestinal stromal tumors and urticaria pigmentosa.** *Cancer*. 2001; 92(3): 657–62.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Li FP, Fletcher JA, Heinrich MC, et al.: **Familial gastrointestinal stromal tumor syndrome: Phenotypic and molecular features in a kindred.** *J Clin Oncol*. 2005; 23(12): 2735–43.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Pollard WL, Beachkofsky TM, Kobayashi TT: **Novel R634W c-kit Mutation Identified in Familial Mastocytosis.** *Pediatr Dermatol*. 2015; 32(2): 267–70.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Wasag B, Niedoszytko M, Piskorz A, et al.: **Novel, activating KIT-N822I mutation in familial cutaneous mastocytosis.** *Exp Hematol*. 2011; 39(8): 859–65.e2.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- de Melo Campos P, Machado-Neto JA, Scopim-Ribeiro R, et al.: **Familial systemic mastocytosis with germline KIT K509I mutation is sensitive to treatment with imatinib, dasatinib and PKC412.** *Leuk Res*. 2014; 38(10): 1245–51.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Mayerhofer M, Gleixner KV, Hoelbl A, et al.: **Unique effects of KIT D816V in BaF3 cells: induction of cluster formation, histamine synthesis, and early mast cell differentiation antigens.** *J Immunol*. 2008; 180(8): 5466–76.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)

33. Jawhar M, Schwaab J, Schnittger S, *et al.*: **Molecular profiling of myeloid progenitor cells in multi-mutated advanced systemic mastocytosis identifies KIT D816V as a distinct and late event.** *Leukemia*. 2015; 29(5): 1115–22.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
34. Jawhar M, Schwaab J, Schnittger S, *et al.*: **Additional mutations in SRSF2, ASXL1 and/or RUNX1 identify a high-risk group of patients with KIT D816V⁺ advanced systemic mastocytosis.** *Leukemia*. 2016; 30(1): 136–43.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
35. **F** Patnaik MM, Vallapureddy Rangit, Lasho TL, *et al.*: **A comparison of clinical and molecular characteristics of patients with systemic mastocytosis with chronic myelomonocytic leukemia to CMML alone.** *Leukemia*. 2018; 32(8): 1850–6.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
36. **F** Lim KH, Tefferi A, Lasho TL, *et al.*: **Systemic mastocytosis in 342 consecutive adults: survival studies and prognostic factors.** *Blood*. 2009; 113(23): 5727–36.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
37. **F** Sturm GJ, Varga EM, Roberts G, *et al.*: **EAACI guidelines on allergen immunotherapy: Hymenoptera venom allergy.** *Allergy*. 2018; 73(4): 744–64.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
38. Dewachter P, Castells MC, Hepner DL, *et al.*: **Perioperative management of patients with mastocytosis.** *Anesthesiology*. 2014; 120(3): 753–9.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
39. Niesters M, Martini C, Dahan A: **Ketamine for chronic pain: risks and benefits.** *Br J Clin Pharmacol*. 2014; 77(2): 357–67.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
40. Barete S, Lortholary O, Damaj G, *et al.*: **Long-term efficacy and safety of cladribine (2-CdA) in adult patients with mastocytosis.** *Blood*. 2015; 126(6): 1009–16; quiz 1050.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
41. Lim KH, Pardanani A, Butterfield JH, *et al.*: **Cytoreductive therapy in 108 adults with systemic mastocytosis: Outcome analysis and response prediction during treatment with interferon-alpha, hydroxyurea, imatinib mesylate or 2-chlorodeoxyadenosine.** *Am J Hematol*. 2009; 84(12): 790–4.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
42. **F** Broesby-Olsen S, Vestergaard H, Mortz CG, *et al.*: **Omalizumab prevents anaphylaxis and improves symptoms in systemic mastocytosis: Efficacy and safety observations.** *Allergy*. 2018; 73(1): 230–8.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
43. Lemal R, Fouquet G, Terriou L, *et al.*: **Omalizumab Therapy for Mast Cell-Mediator Symptoms in Patients with ISM, CM, MMAS, and MCAS.** *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2019; 7(7): 2387–2395.e3.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
44. Vega-Ruiz A, Cortes JE, Sever M, *et al.*: **Phase II study of imatinib mesylate as therapy for patients with systemic mastocytosis.** *Leuk Res*. 2009; 33(11): 1481–4.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
45. Verstovsek S, Tefferi A, Cortes J, *et al.*: **Phase II study of dasatinib in Philadelphia chromosome-negative acute and chronic myeloid diseases, including systemic mastocytosis.** *Clin Cancer Res*. 2008; 14(12): 3906–15.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
46. Gabillot-Carré M, Lepelletier Y, Humbert M, *et al.*: **Rapamycin inhibits growth and survival of D816V-mutated c-kit mast cells.** *Blood*. 2006; 108(3): 1065–72.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
47. Kluin-Nelemans HC, Oldhoff JM, van Doormaal JJ, *et al.*: **Cladribine therapy for systemic mastocytosis.** *Blood*. 2003; 102(13): 4270–6.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
48. Pagano L, Valentini CG, Caira M, *et al.*: **Advanced mast cell disease: an Italian Hematological Multicenter experience.** *Int J Hematol*. 2008; 88(5): 483–8.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
49. **F** Gotlib J, Kluin-Nelemans HC, George TI, *et al.*: **Efficacy and Safety of Midostaurin in Advanced Systemic Mastocytosis.** *N Engl J Med*. 2016; 374(26): 2530–41.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
50. Ustun C, Reiter A, Scott BL, *et al.*: **Hematopoietic stem-cell transplantation for advanced systemic mastocytosis.** *J Clin Oncol*. 2014; 32(29): 3264–74.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
51. **F** Hatch EW, Geeze MB, Martin C, *et al.*: **Variability of PD-L1 expression in mastocytosis.** *Blood Adv*. 2018; 2(3): 189–99.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
52. Alvarez-Twose I, Martínez-Barranco P, Gotlib J, *et al.*: **Complete response to gemtuzumab ozogamicin in a patient with refractory mast cell leukemia.** *Leukemia*. 2016; 30(8): 1753–6.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
53. Blatt K, Cerny-Reiterer S, Schwaab J, *et al.*: **Identification of the Ki-1 antigen (CD30) as a novel therapeutic target in systemic mastocytosis.** *Blood*. 2015; 126(26): 2832–41.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
54. Baird JH, *et al.*: **Phase 2 Study of Brentuximab Vedotin in Patients with Advanced Systemic Mastocytosis.** *Blood*. 2017; 130: 2909–2909.
55. **F** Schneeweiss M, Peter B, Bibi S, *et al.*: **The KIT and PDGFRA switch-control inhibitor DCC-2618 blocks growth and survival of multiple neoplastic cell types in advanced mastocytosis.** *Haematologica*. 2018; 103(5): 799–809.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)

ANNEXE 2 - EPITHELIAL BARRIER DYSFUNCTION IN DESMOGLEIN-1 DEFICIENCY - ARTICLE MASTER 2

(REVISION PENDANT LA THESE)

Mon Mastère 2 au sein de l'équipe du Dr Asma Smahi (Institut Imagine) a porté sur la description d'un nouveau phénotype dermatologique chez deux patients indépendants. Ils présentaient l'association d'une érythrodermie congénitale, de multiples allergies, des IgE totales augmentées, des désordres métaboliques, une dysplasie ectodermique et une cardiomyopathie bi-ventriculaire arythmogène; nous avons dénommé ce syndrome SAMEC. L'analyse d'exome nous a permis d'identifier deux nouvelles mutations faux-sens hétérozygotes dans l'exon 14 du gène *DSP*, codant pour la Desmoplakine. Sur le plan structural, ces mutations sont responsables d'une diminution d'expression de deux protéines partenaires, la desmoplakine et la desmogléine 1 (DSG1) et conduisent à la déstructuration du desmosome essentiel à la cohésion intercellulaire. Sur le plan fonctionnel, les cytokines pro-inflammatoires IL6, IL-1 β , IL8 et TSLP étaient surexprimées par les kératinocytes des patients à l'état basal témoignant d'une dérégulation intrinsèque de l'inflammation indépendante de la fonction barrière du desmosome. Cette dérégulation était médiée par la protéine DSG1, elle-même, *via* la voie de signalisation NF- κ B. Chez nos deux patients, nous avons montré que DSG1 agissait comme un nouvel inhibiteur inattendu de l'inflammation épithéliale en inhibant la voie de signalisation NF- κ B, probablement par le biais d'une interaction fonctionnelle DSG1 / ERBIN. Un déficit en DSG1 est observé dans d'autres maladies plus fréquentes telles que le syndrome de Netherton, les oesophagites à éosinophiles et la dermatite atopique. Ainsi, le déficit en DSG1, semble être un lien crucial entre la perte de l'intégrité de la barrière épithéliale et la dérégulation immunologique, dans les maladies inflammatoires associées à une rupture de la barrière. Il a fait l'objet d'une publication dans le Journal of Allergy and Clinical Immunology et d'un dépôt de brevet, compte tenu des ouvertures thérapeutiques que ces résultats suggèrent. J'ai effectué les révisions de cet article pendant ma première année de thèse.



HHS Public Access

Author manuscript

J Allergy Clin Immunol. Author manuscript; available in PMC 2018 August 06.

Published in final edited form as:

J Allergy Clin Immunol. 2018 August ; 142(2): 702–706.e7. doi:10.1016/j.jaci.2018.04.007.

Epithelial barrier dysfunction in desmoglein-1 deficiency

Laura Polivka, MD, MSc^{a,b,*}, Smail Hadj-Rabia, MD, PhD^{a,b,*}, Elodie Bal, PhD^b, Stéphanie Leclerc-Mercier, MD^{a,c}, Marine Madrangé, MSc^b, Yamina Hamel, PhD^b, Damien Bonnet, MD, PhD^d, Stéphanie Mallet, MD^e, Hubert Lepidi, MD^f, Caroline Ovaert, MD^g, Patrick Barbet, MD, PhD^c, Christophe Dupont, MD^h, Bénédicte Neven, MD, PhDⁱ, Arnold Munnich, MD, PhD^j, Lisa M. Godsel, PhD^{k,l}, Florence Campeotto, MD, PhD^m, Robert Weil, MD, PhDⁿ, Emmanuel Laplantine, PhDⁿ, Sylvie Marchetto, BS, BM^o, Jean-Paul Borg, PhD^o, William I. Weis, PhD^p, Jean-Laurent Casanova, MD, PhD^{i,q,r,s,t}, Anne Puel, PhD^{q,r,s,t}, Kathleen J. Green, PhD^{k,l}, Christine Bodemer, MD, PhD^{a,b,*}, and Asma Smahi, PhD^{b,*}

^aDepartment of Dermatology, Reference Center for Genodermatoses (MAGEC), Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité University, Imagine Institute, Paris, France

^bLaboratory of Genetics of Monogenic Auto-inflammatory Diseases, Necker Branch, U1163, Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité University, Imagine Institute, Paris, France

^cDepartment of Pathology, Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité University, Imagine Institute, Paris, France

^dM3C-Necker, Pediatric Reference Center for Inherited Cardiac Diseases, Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité University, Imagine Institute, Paris, France

^eDepartment of Dermatology, La Timone Hospital (AP-HM), Aix Marseille University, Marseille, France

^fDepartment of Pathology, La Timone Hospital (AP-HM), Aix Marseille University, Marseille, France

^gDepartment of Pediatric Cardiology, La Timone Hospital (AP-HM), Aix Marseille University, Marseille, France

^hDepartment of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité University, Imagine Institute, Paris, France

ⁱDepartment of Pediatric Immunology and Hematology, Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité University, Imagine Institute, Paris, France

^jLaboratory of Molecular and Pathophysiological Basis of Cognitive Disorders, U1163, Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité University, Imagine Institute, Necker-Enfants Malades Hospital, Paris, France

^kDepartment of Pathology, Northwestern University Feinberg School of Medicine, Chicago, Ill

*These authors contributed equally to this work.

Disclosure of potential conflict of interest: J.-L. Casanova reports personal fees from Genentech, Sanofi, Novartis, Pfizer, Bioaster, Regeneron, BiogenIdec, and Merck outside the submitted work. The rest of the authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

^lDepartment of Dermatology, Northwestern University Feinberg School of Medicine, Chicago, Ill

^mDepartment of Paediatric Gastroenterology, Necker-Enfants Malades Hospital (AP-HP), Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité University, Imagine Institute, Paris, France

ⁿLaboratory of Signaling and Pathogenesis, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR3691, Pasteur Institute, Paris, France

^oCentre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), Aix Marseille University, UM105, Inst Paoli-Calmettes, CNRS, UMR7258, Inserm, U1068, “Cell Polarity, Cell Signalling, and Cancer–Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer,” Marseille, France

^pDepartments of Structural Biology, Molecular & Cellular Physiology and Photon Science, Stanford University, Stanford, Calif

^qLaboratory of Human Genetics of Infectious Diseases, Necker Branch, INSERM U1163, Paris, France

^rParis Descartes University, Imagine Institute, Paris, France

^sSt Giles Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases, Rockefeller Branch, Rockefeller University, New York, NY

^tHoward Hughes Medical Institute, New York, NY

To the Editor

Mutations in the desmoplakin (*DSP*) and desmoglein-1 (*DSG1*) genes have been implicated in patients with the inherited inflammatory skin disease known as severe dermatitis, multiple allergies, and metabolic wasting (SAM) syndrome (MIM#603165, see Tables E1 and E2 in this article’s Online Repository at www.jacionline.org).^{1,2} The *DSP* and *DSG1* genes encode desmosome components that are critical for the structure of intercellular junctions and maintenance of epithelial barrier integrity. *DSP* and *DSG1* are also key regulators of signaling pathways involved in differentiation, epidermal homeostasis, and carcinogenesis. *DSG1* promotes keratinocyte differentiation by inhibiting epidermal growth factor receptor/extracellular signal-regulated kinase signaling through ERBB2-interacting protein (ERBIN), a scaffolding and signaling protein.³ Through characterization of a new syndrome featuring severe allergic dermatitis and *DSG1* deficiency, we highlighted the pivotal role of the functional *DSG1*/ERBIN interaction as an inhibitor of skin inflammation through the nuclear factor κ B (NF- κ B) signaling pathway.

Patients 1 and 2 (13 and 9 years old, respectively) are 2 unrelated boys born to healthy parents. They were referred for life-long desquamative erythroderma associated with sparse and wooly hair and dysplastic enamel. Both patients had painful palmoplantar keratoderma and dystrophic nails (Fig 1, *A* and *B*). Skin manifestations combined recurrent and painful erythrodermic skin flares triggered by infections and episodes of aseptic pustular psoriasiform dermatitis. Patient 1 (but not patient 2) displayed failure to thrive, eosinophilic esophagitis, colitis, and a variety of food allergies (total serum IgE level, 2968 kIU/mL [$n < 114$]). Cardiac examination of patient 1 revealed an asymptomatic, biventricular, dilated

cardiomyopathy. At 9 years of age, patient 2 received a heart transplant because of a severe left-dominant arrhythmogenic cardiomyopathy.

For both patients, cutaneous histopathology showed epidermal acantholysis and dermal inflammatory lymphocytic infiltration (Fig 1, C, and see Fig E1 and the Methods section in this article's Online Repository at www.jacionline.org). Ultrastructural examination revealed large numbers of abnormal clusters of desmosomes in the epidermis (patient 1; Fig 1, D). Histopathology of the explanted heart showed the characteristic fibro-fatty myocardial infiltration of arrhythmogenic dysplasia (see Fig E1).

Two different heterozygous *de novo* missense mutations were identified by using whole-exome sequencing in exon 14 of the *DSP* gene: c.A1757C (p.H586P, patient 1) and c.T1828C (p.S610P, patient 2). Substitution of H586 or S610 by a proline is expected to induce a kink in the α -helix of DSP plakin domain that perturbs DSP's 3-dimensional structure (see Fig E1).

In both patients skin immunohistochemistry showed the following features: (1) low DSP and DSG1 expression in the epidermis (as in patient 1's primary keratinocytes), (2) irregular and less intense DSP and DSG1 staining at the keratinocyte plasma membrane, and (3) abnormal cytoplasmic accumulation of DSP and DSG1 proteins in keratinocytes (Fig 1, E). Esophageal immunohistochemistry revealed a low level of DSP staining, which was irregular and mottled at the cell border, and the absence of DSG1 expression (patient 1; Fig 1, F). Expression of DSP protein was also low in heart tissue (patient 2; see Fig E1; DSG1 is not expressed in the heart).

Abnormally high levels of mRNAs encoding proinflammatory cytokines (*IL6*, *IL8*, and *IL1B*), 3 NF- κ B target genes, and *TSLP* were found in patient 1's keratinocytes (Fig 2, A). Overexpression of IL-6 was confirmed by means of ELISA (see Fig E2 in this article's Online Repository at www.jacionline.org). In contrast, mRNA levels of *TNFA* and other pro-T_H2 cytokines (*IL13*, *CCL5*, and *IL4*; data not shown) were not increased. Inhibition of the NF- κ B signaling pathway by ML120B, which selectively targets the catalytic subunit of inhibitor of NF- κ B kinase (IKK) β , restored normal expression of *IL8* mRNA by patient 1's keratinocytes (see Fig E2). In view of the primary DSG1 deficiency reported in patients with SAM syndrome and the very low levels of DSG1 protein expression in our patients, we hypothesized that DSG1 could play a role in the inflammatory phenotype. We demonstrated that DSG1 (but not DSP) inhibits NF- κ B reporter activity in a dose-dependent manner after stimulation by IL-1 β or TNF- α in HEK293T cells (Fig 2, B, and see Fig E2). Concomitant downregulation of *IL6* and *IL8* expression was observed on transfection with the DSG1-encoding plasmid (see Fig E2). Silencing of *DSG1* by short hairpin RNA (with a mean decrease of *DSG1* mRNA of 32%) enhanced transcription of *IL6*, *IL8*, *IL1B*, *TNFA*, and *TSLP* genes in control keratinocytes (regardless of stimulation with IL-1 β ; Fig 2, C, and see Fig E2). Retroviral transduction of wild-type *DSG1* into patient 1's keratinocytes rescued the inflammatory cellular phenotype by restoring *IL8* production (Fig 2, D).

Given that DSG1 might regulate ERBIN's cellular localization and thus modulate the latter's ability to block extracellular signal-regulated kinase signaling, we hypothesized that ERBIN

can play a role in DSG1-mediated NF- κ B inhibition.³ We observed little ERBIN/DSG1 colocalization at the cell membrane and an accumulation of ERBIN in the cytoplasm in a skin biopsy specimen from patient 1 relative to healthy control values (mean proportion of ERBIN/DSG1 colocalization, 40.7% vs 71.2%; $P < .001$; see Fig E3 in this article's Online Repository at www.jacionline.org).

Experiments in control keratinocytes highlighted recruitment of ERBIN to the cell membrane and an increase in ERBIN/DSG1 colocalization after stimulation by IL-1 β . Interestingly, this recruitment did not occur in patient 1's keratinocytes (see Fig E3). Contrary to patient 1's keratinocytes, the level of ERBIN protein increased after stimulation of control keratinocytes by IL-1 β (see Fig E3). These results demonstrated that localization of ERBIN at the cell membrane and membrane colocalization of ERBIN/DSG1 in keratinocytes were regulated by inflammatory stimuli (eg, IL-1 β).

In a reporter transactivation assay, we found that ERBIN transfection in both nonstimulated and IL-1 β -stimulated HEK293T cells led to NF- κ B activation in a dose-dependent manner (Fig 2, E). *Erbin*^{-/-} keratinocytes, derived from *Erbin*^{-/-} mice, showed abnormally low mRNA expression of the proinflammatory cytokines *IL6* and *IL1B* (Fig 2, F). In addition, abnormally low expression of *IL1B* mRNA were found in the *Erbin*^{-/-} mouse embryo fibroblasts (MEFs), regardless of stimulation with LPS (Fig 2, G). Biochemical analysis of NF- κ B activation showed that in *Erbin*^{-/-} MEFs, I κ B α degradation was delayed in response to IL-1 β (Fig 2, H).

Here we report on 2 unrelated patients in whom severe dermatitis and loss of epithelial barrier integrity were related to 2 different heterozygous mutations in *DSP*. Both patients presented with a combination of SAM syndrome, ectodermal dysplasia (combination of hair, nail, and tooth anomalies), and arrhythmogenic cardiomyopathy (hereby named SAMEC syndrome). Because of the major risk of severe cardiac involvement in patients carrying a *DSP* mutation, a thorough cardiac assessment should always be carried out in patients presenting with the SAM syndrome phenotype unless *DSP* mutations have been ruled out.

Our results demonstrate that DSG1 inhibits skin inflammation by inhibiting the NF- κ B signaling pathway. Various observations support that DSG1 deficiency is linked to inflammation. First, DSG1 deficiency has been reported in patients with atopic dermatitis and Netherton syndrome,^{4,5} which share chronic inflammatory dermatitis and allergic manifestations with SAMEC. Second, 2 siblings presented with Netherton syndrome and normal DSG1 epidermal staining, whereas no skin inflammation was observed.⁶ Third, DSG1 deficiency is probably responsible for the mucosal barrier impairment and inflammation observed in patients with eosinophilic esophagitis.⁷

We suggest that DSG1 normally inhibits the NF- κ B signaling pathway, at least in part by retaining ERBIN at the cell membrane. Involvement of ERBIN in other inflammatory diseases has been shown. In the context of inflammatory bowel disease, ERBIN seems to specifically inhibit the NF- κ B signaling pathway through nucleotide-binding oligomerization domain 2.⁸ In addition, 5 related patients presenting with allergic inflammatory manifestations similar to SAMEC syndrome (eczema, eosinophilic

esophagitis, and an increased serum IgE level) were shown to carry a heterozygous mutation in the gene coding for ERBIN.⁹ Thus ERBIN mislocalization in patients with SAMEC syndrome might explain our patients' allergic manifestations.

Through characterization of SAMEC syndrome, we showed that DSG1 acts as a novel and hitherto unexpected inhibitor of epithelial inflammation by inhibiting the NF- κ B signaling pathway, probably through functional DSG1/ERBIN interaction. The lack of an epithelial barrier protein, here DSG1, appears to be a crucial link between loss of epithelial barrier integrity and immunologic dysregulation.

METHODS

Molecular genetics

DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes by using the Nucleon BACC3 DNA extraction kit (GE Healthcare, Piscataway, NJ), according to the manufacturer's instructions. Samples of genomic DNA (1 μ g) from patient 1 and his parents underwent whole-exome sequencing. The exons were captured with an in-solution enrichment technique (Sure-Select Human All Exon Kits Version 3; Agilent, Massy, France) based on a biotinylated oligonucleotide probe library (Human All Exon v3 50 Mb; Agilent). Each genomic DNA fragment was sequenced by using the paired-end strategy and an average read length of 75 bases (Illumina HiSeq Sequencer; Illumina, San Diego, Calif). Image analysis and base calling were performed with the Illumina Real-Time Analysis pipeline (version 1.9, Illumina) by using its default parameters. Sequences were aligned with the Human Genome Project reference sequence (hg19 assembly), and single nucleotide polymorphisms were called on the basis of allele calls and read depth by using the Consensus Assessment of Sequence and Variation pipeline (version 1.8; Illumina).

Genetic variations were annotated by using an in-house pipeline (Integra-Gen, Evry, France), and the results for each sample were made available online for analysis with ERIS (<http://eris.integragen.com/>). The *DSP* variant was confirmed by using Sanger sequencing with specific primers for exon 14 of the *DSP* gene. For patient 2 and his relatives, *DSP*'s 24 exons were amplified by using PCR with specific primers. The PCR products were sequenced by using the Sanger method and a BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (version 3.1; Applied Biosystems, Foster City, Calif) and then analyzed with SeqScape software (version 3.0; Applied Biosystems). Whole-exome sequencing was then performed for patient 2.

Primary keratinocyte culture

Primary human keratinocytes were obtained from 4-mm punch biopsy specimens from patient 1 and 3 healthy control subjects. Keratinocytes were cultured on a feeder layer of lethally irradiated mouse 3T3-J2 fibroblasts, as described previously.^{E1,E2} Perhaps because of intrinsic factors linked to desmosomal disease, several tentative keratinocyte cultures for patient 2 failed. Similarly, keratinocytes from patient 1's biopsy specimen were obtained after several culture assays.

Cell lines

HEK293T cells were purchased from ATCC (Teddington, Middlesex, United Kingdom).

Isolation and culture of MEFs and epidermal keratinocytes from *Erbin*-null mice

Primary MEFs were isolated from 14.5-day-old *Erbin*^{+/+} and *Erbin*^{-/-} FVB mouse embryos. After dissection, fetuses were transferred in sterile PBS, livers and heads were removed and discarded, and the remaining part of each fetus was teased into fine pieces. Tissues were broken up into a suspension by means of vigorous pipetting, and after a short sedimentation, the remaining cell suspension was grown in Dulbecco modified Eagle medium supplemented with 10% FCS and antibiotics.

Primary mouse epidermal keratinocytes were isolated from 19.5-day-old *Erbin*^{+/+} and *Erbin*^{-/-} BALB/c mouse embryos. After dissection, fetuses were transferred in sterile PBS; heads, paws, and tails were removed and discarded; and back skins were removed and treated with Dispase (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, Calif). The epidermis was separated from the dermis with forceps and incubated with a trypsin/versene mixture. The epidermis was cut into small pieces, and after pipetting vigorously up and down, the basal layer keratinocytes were separated out from the epidermis. The cell suspension was filtered, washed with medium, and grown in CnT-57 medium (CELLnTEC, Bern, Switzerland) containing a low concentration of bovine pituitary extract.

RNA extraction, RT-PCR, and real-time PCR

Total RNA was isolated from HEK293T cells, MEFs, and cultured keratinocytes from patient 1 and different control subjects by using the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. RNA samples were reverse transcribed into cDNA by using the High Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit (Applied Biosystems). Real-time PCR was carried out with the Fast SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) on an ABI Prism 7000 (PE Applied Biosystems). Quantitative RT-PCR primers were designed by using the sequences available in Ensembl and spanned an intron-exon boundary.

Amounts of the various mRNAs were normalized against the amount of *ACTB* RNA in each sample (measured by using quantitative RT-PCR). Results were analyzed with DataAssist (version 3.01; Applied Biosystems), which uses the comparative cycle threshold (ddCt) method. All experiments were performed in triplicates.

All data are expressed as the means \pm SDs. Values were calculated by using an unpaired *t* test as follows.

Immunoblotting analysis

HEK293T cells were transiently transfected with increasing doses (100–1000 ng) of DSG1 plasmid (plasmid #55029; Addgene, Cambridge, Mass) or 250 ng of DSP plasmid (plasmid #32227; Addgene) and/or ERBIN plasmid (pEF1-Erbin-Myc-HisA construct) together with 0.2 μ g of Ig κ -Luc (see above). Cells were then lysed in RIPA buffer (150 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, and 50 mmol/L Tris-HCl [pH 8]) with

protease inhibitors (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Western blotting was performed by using mouse anti-DSP I/II antibody (diluted 1:1000, sc-390975; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), rabbit anti-DSG1 antibody (diluted 1:1000, sc-20114; Santa Cruz Biotechnology), and rabbit anti-ERBIN antibody (diluted 1:10000, a gift from Lionel Fontao, Laboratory of Dermatology, University Hospitals and Medical School of Geneva, Geneva, Switzerland). Bound antibodies were visualized with horseradish peroxidase-conjugated antibodies against rabbit or mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology) and an Enhanced Chemiluminescence kit (SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate; Thermo Scientific, Rockford, Ill). Western blotting to assess degradation of I κ B α proteins in MEFs was performed with a mouse anti-I κ B α antibody (diluted 1:1000, L35A5; Cell Signaling Technology, Danvers, Mass). MEFs were stimulated with 20 ng/mL mouse IL-1 β (R&D Systems, Minneapolis, Minn).

Inhibition of IKK-2 by ML120B

Keratinocytes from a healthy control subject and patient 1 were seeded into 12-well plates (100,000 cells/well). Twenty-four hours later, keratinocytes were preincubated with 20 μ mol/L ML120B at 37°C for 1 hour and then stimulated with 10 ng/mL IL-1 β . Twenty-four hours after stimulation, cells were pelleted for RNA extraction. ML120B was sent as a gift by Emmanuel Laplantine (Institut Pasteur, Paris, France).

Luciferase NF- κ B reporter assays

HEK293T cells were seeded into 24-well plates and transfected in triplicates by using jetPRIM reagent (Polyplus Transfection, New York, NY) with increasing doses (100–1000 ng) of DSG1 plasmid (mCherry-desmoglein-1-C-18, a gift from Michael Davidson; plasmid #55029; Addgene) or 250 ng of DSP plasmid (1136-Desmoplakin-GFP, a gift from Kathleen Green (Addgene plasmid #32227) and/or increasing doses (100–500 ng) of ERBIN plasmid (pEF1-ErbIn-Myc-HisA construct, a gift from Masaki Inagaki, Division of Biochemistry, Aichi Cancer Center Research Institute, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi, Japan), together with 0.2 μ g of a plasmid carrying the firefly luciferase gene under the control of the NF- κ B promoter (Ig κ -Luc; a gift from Gilles Courtois, Biosciences and Biotechnology Institute of Grenoble, Grenoble, France). Sixteen hours after transfection, cells were stimulated with 10 ng/mL IL-1 β or 20 ng/mL TNF- α . Eight hours after stimulation, luciferase activity was determined by using a dual luciferase assay kit (Promega, Madison, Wis).

Retroviral vector production

pRetro-DSG1 was a gift from Kathleen Green (Northwestern University, Chicago, Ill). For virus preparation, pRetro-DSG1 or blank vector was cotransfected with jetPRIME reagent (Polyplus Transfection) and packaging vectors pGag/Pol and pVSVG into HEK293T cells. Infectious retroviruses were harvested at 24, 48, and 72 hours after transfection and filtered through 0.8- μ m-pore cellulose acetate filters. Recombinant retroviruses were concentrated by means of ultracentrifugation (2 hours at 20,000g) and resuspended in Hank balanced salt solution. Viral aliquots were frozen and stored.

Lentiviral and retroviral transductions

Primary keratinocytes from a healthy control subject were seeded into 12-well plates. Twelve hours later, keratinocytes were infected with lentivirus containing (or not) DSG1 short hairpin RNA (sc-35224-V; Santa Cruz Biotechnology). Twenty-four hours after infection, keratinocytes were stimulated or not with 10 ng/mL human IL-1 β (R&D Systems). Twenty-four hours after stimulation, cells were pelleted for RNA extraction. Expression of DSG1 was assessed by using quantitative RT-PCR. Primary keratinocytes from patient 1 and a healthy control subject were seeded into 12-well plates (80,000 cells/well). Twelve hours later, keratinocytes (20% confluent) were infected with retrovirus containing (or not) the DSG1 construct. Twenty-four hours after infection, keratinocytes were stimulated with 10 ng/mL IL-1 β (R&D Systems). Lastly, 24 hours after stimulation, cells were pelleted for RNA extraction. DSG1 expression was assessed by using quantitative RT-PCR.

Reagents

Anti-FLAG antibody (diluted 1:10 000; Sigma-Aldrich, St Louis, Mo) was used as a reagent.

Light microscopy

Skin and heart biopsy specimens were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, and processed by using standard procedures. Three-micrometer-thick sections were stained with hematoxylin and eosin reagent and examined under LEICA DFC280 light microscopy (Leica, Buffalo Grove, Ill) at different magnifications. Images were acquired with Leica Application Suite Software.

Electron microscopy

Skin biopsy specimen was immersed in 2.5% glutaraldehyde fixative in 0.1 mol/L cacodylate buffer at pH 7.4 for 3 to 5 hours at 4°C, washed thoroughly in cacodylate buffer overnight at 4°C, and then postfixated in 1% osmium tetroxide for 1 hour at room temperature. The skin biopsy slices were then dehydrated in graded ethanol and impregnated with epoxy resin. After selection of suitable areas, semithin sections were stained with 1% toluidine blue and examined under a light microscope. Ultrathin sections were prepared and stained with uranyl acetate and lead citrate for electron microscopy (Tecnaï T12; FEI, Hillsboro, Ore).

Immunohistochemical analysis of skin and esophageal biopsy specimens

Immunohistochemical reactions were performed on 4- μ m-thick frozen tissue sections by using rabbit anti-DSG1 antibody (diluted 1:50, sc-20114; Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-DSP I/II antibody (diluted 1:50, sc-390975; Santa Cruz Biotechnology), or sheep anti-ERBIN antibody (diluted 1:20, AF-7866; R&D Systems). Secondary antibodies were anti-rabbit Alexa Fluor 546, anti-mouse Alexa Fluor 488, and anti-sheep Alexa Fluor 488 (Life Technologies, Grand Island, NY) diluted 1:500 in 1% normal goat serum and incubated for 1 hour at 37°C. Sections were washed with once with PBS. Coverslips were mounted with *In Situ* Mounting Medium with DAPI (Duo-link; Olink Biosciences, Uppsala, Sweden). Images were acquired and processed with an LSM700 microscope (Zeiss, Jena, Germany)

and Zen Software (Zeiss). Data were quantified with ImageJ software (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Quantifications of the ERBIN/DSG1 colocalization have been made by using a surface-based colocalization measurement on Fiji (with immunofluorescence and confocal microscopy). Data corresponded to the average of the quantification of 5 images per skin (n = 5). Data are quoted as means \pm SDs. *** $P < .001$. All scale bars = 20 μ m.

Immunohistochemistry of heart biopsy specimens

Immunohistochemistry was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded sections. After the deparaffination steps, reactions were carried out according to the automatized system Bond (A. Menarini Diagnosis system, Firenze, Italy). Staining was performed with the Menarini refine detection kit. Anti-desmoplakin 1+2 antibody (clone 65146; Progen, Heidelberg, Germany) was used.

Study approval

Clinical investigations were conducted according to Declaration of Helsinki principles and approved by the local ethics committee. Written informed consent was provided for a picture of the 3 patients appearing in the article. All patients, parents, and control subjects provided informed consent for genetic studies.

Statistical analysis

Results were expressed as the means \pm SDs. Statistical significance was determined by using unpaired 2-sample *t* tests (equal variance). All data were normally distributed, and variance was similar in groups that were compared in statistical tests. The threshold for statistical significance was set at a *P* value of less than .05.

Supplementary Material

Refer to Web version on PubMed Central for supplementary material.

Acknowledgments

We thank the families involved in this study and the following physicians for their collaboration: Jean-Jacques Grob (Marseille, France), Véronique Fressart (Paris, France), Estelle Gandjbakhch (Paris, France), and Lionel Fontao (Geneva, Switzerland).

Supported by grants from the French Society of Dermatology (SFD), Laboratoires Expanscience, and the French National Research Agency (ANR) under the "Investments for the Future" program (reference: ANR-10-IAHU-01). Expanscience Laboratories helped to fund the molecular and immunologic analyses. J.-P.B.'s laboratory is funded by La Ligue Nationale Contre le Cancer (Label Ligue) and SIRIC (INCa-DGOS-Inserm 6038). J.-P.B. is a scholar of Institut Universitaire de France.

References

1. Samuelov L, Sarig O, Harmon RM, Rapaport D, Ishida-Yamamoto A, Isakov O, et al. Desmoglein 1 deficiency results in severe dermatitis, multiple allergies and metabolic wasting. *Nat Genet.* 2013; 45:1244–8. [PubMed: 23974871]
2. McAleer MA, Pohler E, Smith FJD, Wilson NJ, Cole C, MacGowan S, et al. Severe dermatitis, multiple allergies, and metabolic wasting syndrome caused by a novel mutation in the N-terminal plakoin domain of desmoplakin. *J Allergy Clin Immunol.* 2015; 136:1268–76. [PubMed: 26073755]

3. Harmon RM, Simpson CL, Johnson JL, Koetsier JL, Dubash AD, Najor NA, et al. Desmoglein-1/Erbin interaction suppresses ERK activation to support epidermal differentiation. *J Clin Invest*. 2013; 123:1556–70. [PubMed: 23524970]
4. Broccardo CJ, Mahaffey S, Schwarz J, Wruck L, David G, Schlievert PM, et al. Comparative proteomic profiling of patients with atopic dermatitis based on history of eczema herpeticum infection and *Staphylococcus aureus* colonization. *J Allergy Clin Immunol*. 2011; 127:186–93. e1–11. [PubMed: 21211653]
5. Fortugno P, Furio L, Teson M, Berretti M, El Hachem M, Zambruno G, et al. The 420K LEKTI variant alters LEKTI proteolytic activation and results in protease deregulation: implications for atopic dermatitis. *Hum Mol Genet*. 2012; 21:4187–200. [PubMed: 22730493]
6. Guerra L, Fortugno P, Pedicelli C, Mazzanti C, Proto V, Zambruno G, et al. Ichthyosis linearis circumflexa as the only clinical manifestation of Netherton syndrome. *Acta Derm Venereol*. 2015; 95:720–4. [PubMed: 25710899]
7. Sherrill JD, Kc K, Wu D, Djukic Z, Caldwell JM, Stucke EM, et al. Desmoglein-1 regulates esophageal epithelial barrier function and immune responses in eosinophilic esophagitis. *Mucosal Immunol*. 2014; 7:718–29. [PubMed: 24220297]
8. McDonald C, Chen FF, Ollendorff V, Ogura Y, Marchetto S, Lécine P, et al. A role for Erbin in the regulation of Nod2-dependent NF- κ B signaling. *J Biol Chem*. 2005; 280:40301–9. [PubMed: 16203728]
9. Lyons JJ, Liu Y, Ma CA, Yu X, O'Connell MP, Lawrence MG, et al. ERBIN deficiency links STAT3 and TGF- β pathway defects with atopy in humans. *J Exp Med*. 2017; 214:669–80. DOI: 10.1016/j.jaci.2018.04.007 [PubMed: 28126831]

REFERENCES

- E1. Green H, Rheinwald JG, Sun TT. Properties of an epithelial cell type in culture: the epidermal keratinocyte and its dependence on products of the fibroblast. *Prog Clin Biol Res*. 1977; 17:493–500. [PubMed: 928463]
- E2. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*. 1975; 6:331–43. [PubMed: 1052771]
- E3. Choi H-J, Weis WI. Crystal structure of a rigid four-spectrin-repeat fragment of the human desmoplakin plakin domain. *J Mol Biol*. 2011; 409:800–12. [PubMed: 21536047]
- E4. Samuelov L, Sarig O, Harmon RM, Rapaport D, Ishida-Yamamoto A, Isakov O, et al. Desmoglein 1 deficiency results in severe dermatitis, multiple allergies and metabolic wasting. *Nat Genet*. 2013; 45:1244–8. [PubMed: 23974871]
- E5. Has C, Jakob T, He Y, Kiritsi D, Hausser I, Bruckner-Tuderman L. Loss of desmoglein 1 associated with palmoplantar keratoderma, dermatitis and multiple allergies. *Br J Dermatol*. 2015; 172:257–61. [PubMed: 25041099]
- E6. Schlipf NA, Vahlquist A, Teigen N, Virtanen M, Dragomir A, Fismen S, et al. Whole-exome sequencing identifies novel autosomal recessive DSG1 mutations associated with mild SAM syndrome. *Br J Dermatol*. 2016; 174:444–8. [PubMed: 26288349]
- E7. Cheng R, Yan M, Ni C, Zhang J, Li M, Yao Z. Report of Chinese family with severe dermatitis, multiple allergies and metabolic wasting syndrome caused by novel homozygous desmoglein-1 gene mutation. *J Dermatol*. 2016; 43:1201–4. [PubMed: 27154412]
- E8. D nescu S, Leppert J, Cosgarea R, Zurac S, Pop S, Baican A, et al. Compound heterozygosity for dominant and recessive DSG1 mutations in a patient with atypical SAM syndrome (severe dermatitis, multiple allergies, metabolic wasting). *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2017; 31:e144–6. [PubMed: 27632246]
- E9. McAleer MA, Pohler E, Smith FJD, Wilson NJ, Cole C, MacGowan S, et al. Severe dermatitis, multiple allergies, and metabolic wasting syndrome caused by a novel mutation in the N-terminal plakin domain of desmoplakin. *J Allergy Clin Immunol*. 2015; 136:1268–76. [PubMed: 26073755]

- E10. Boyden LM, Kam CY, Hernández-Martín A, Zhou J, Craiglow BG, Sidbury R, et al. Dominant de novo DSP mutations cause erythrokeratoderma-cardiomyopathy syndrome. *Hum Mol Genet.* 2016; 25:348–57. [PubMed: 26604139]

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

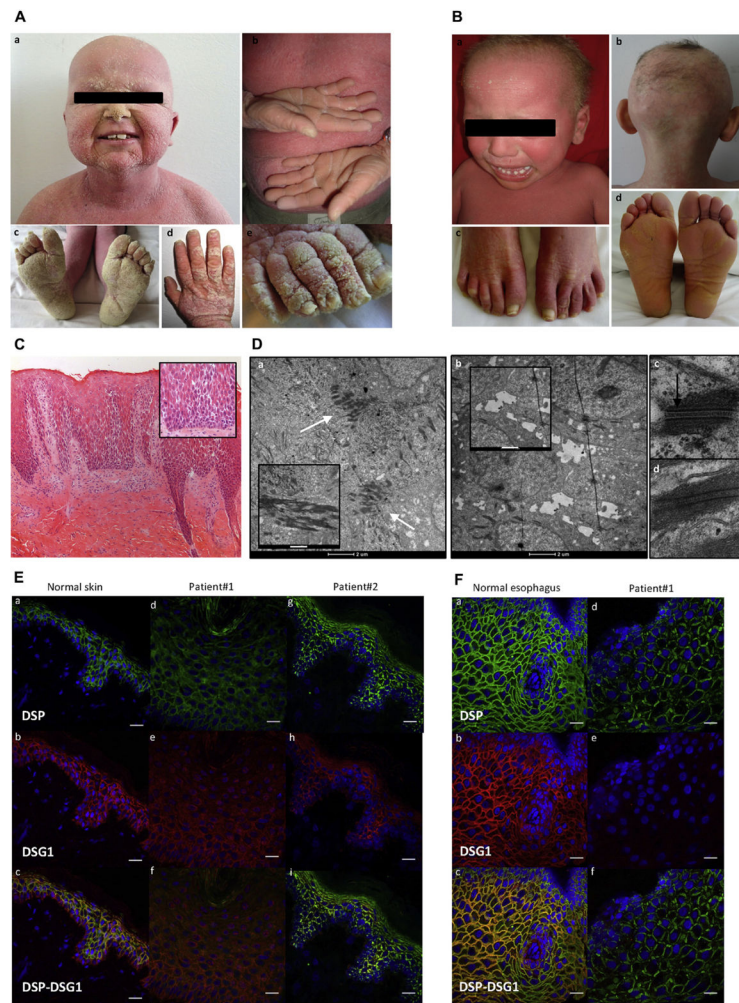


FIG 1. Clinical and histopathologic features of patients 1 and 2. **A**, Clinical phenotype of patient 1: desquamative erythroderma, thickening of the skin (*a–e*), sparse hair (*a*), diffuse palmoplantar keratoderma (PPK; *b* and *c*), and thickening of the nail plate (*d* and *e*). **B**, Clinical phenotype of patient 2: desquamative erythroderma (*a*), sparse hair (*a* and *b*), onycholysis (*c*), and plantar keratoderma (*d*). **C**, Skin histology (patient 1) showing epidermal acanthosis, hyperorthokeratosis, extensive acantholysis (*inset*), and inflammation in the superficial dermis (lymphocytes; $\times 100$ magnification for Fig 1, *C*, and $\times 200$ magnification for the *inset* of Fig 1, *C*). **D**, Ultrastructural features of a skin biopsy specimen from patient 1 (*a*, *b*, and *d*) and a healthy control subject (*c*). *a*, Many desmosomes clustered in the upper epidermis (*arrows*). Keratin filaments strongly aggregated to the desmosome (*inset*). *b*, Complete absence of desmosomes and widened spaces between keratinocytes (cell membrane features filipodium-like processes; *inset*) in the lower epidermis. *d*, Patient 1’s desmosome lacks the inner plaque compared with a control subject (*arrow*, *c*). Scale bar = 2 μm for Fig 1, *D*, *a* and *b*. Scale bar = 500 nm for the *inset* of Fig 1, *D*, *a*, and 1 μm for the *inset* of Fig 1, *D*, *b*. **E**, Immunofluorescence on skin sections from a healthy control subject (*a–c*), patient 1 (*d–f*), and patient 2 (*g–i*) showed drastic reduction and mislocalization in

staining of DSP and DSG1 in both patients. Scale bar =20 μ M. **F**, Immunofluorescence on esophageal sections from a healthy control subject (*a-c*) and patient 1 (*d-f*), showing low levels of DSP staining and absence of DSG1 staining in patient 1. Scale bar = 20 μ M.

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

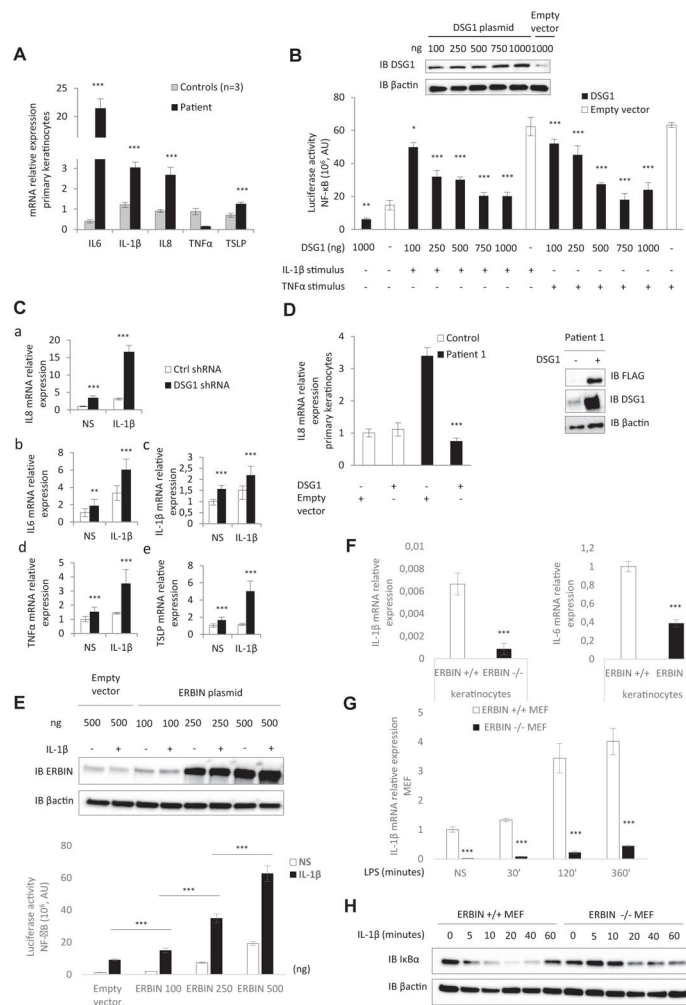


FIG 2. Role of DSG1 and ERBIN in NF- κ B-mediated epithelial inflammation. **A**, Relative mRNA expression levels of proinflammatory cytokines in primary keratinocytes (patient 1). **B**, NF- κ B luciferase reporter assay in HEK293T cells transfected with DSG1 vector or with an empty vector and stimulated with IL-1 β or TNF- α . AU, Arbitrary units. *Inset*, Western blot of DSG1 expression in HEK293T cells transfected with DSG1 vector. **C**, Relative mRNA expression of *IL8* (a), *IL6* (b), *IL1B* (c), *TNFA* (d), and *TSLP* (e) in control (*ctrl*) keratinocytes infected with a lentivirus-expressing short hairpin RNA against *DSG1* and stimulated or not stimulated (NS) with IL-1 β . **D**, Relative mRNA expression of patient 1's keratinocytes infected with a retrovirus expressing FLAG *DSG1*. *Inset*, Western blot of DSG1 and FLAG expression in patient 1's keratinocytes after transduction. **E**, NF- κ B luciferase reporter assay in HEK293T cells transfected with ERBIN or empty vector and stimulated with IL-1 β . *Inset*, Western blot of ERBIN expression in HEK293T cells transfected with the ERBIN vector. **F**, Relative mRNA expression levels of *IL1B* and *IL6* in nonstimulated *Erbin*^{+/+} and *Erbin*^{-/-} keratinocytes. **G**, Relative mRNA expression levels of *IL1B* in *Erbin*^{+/+} and *Erbin*^{-/-} MEFs before/after stimulation with LPS. **H**, Immunoblot

assays showing degradation of I κ B α proteins in *Erbin*^{+/+} and *Erbin*^{-/-} MEFs induced by IL-1 β stimulation. **P* < .05, ***P* < .01, and ****P* < .001.

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

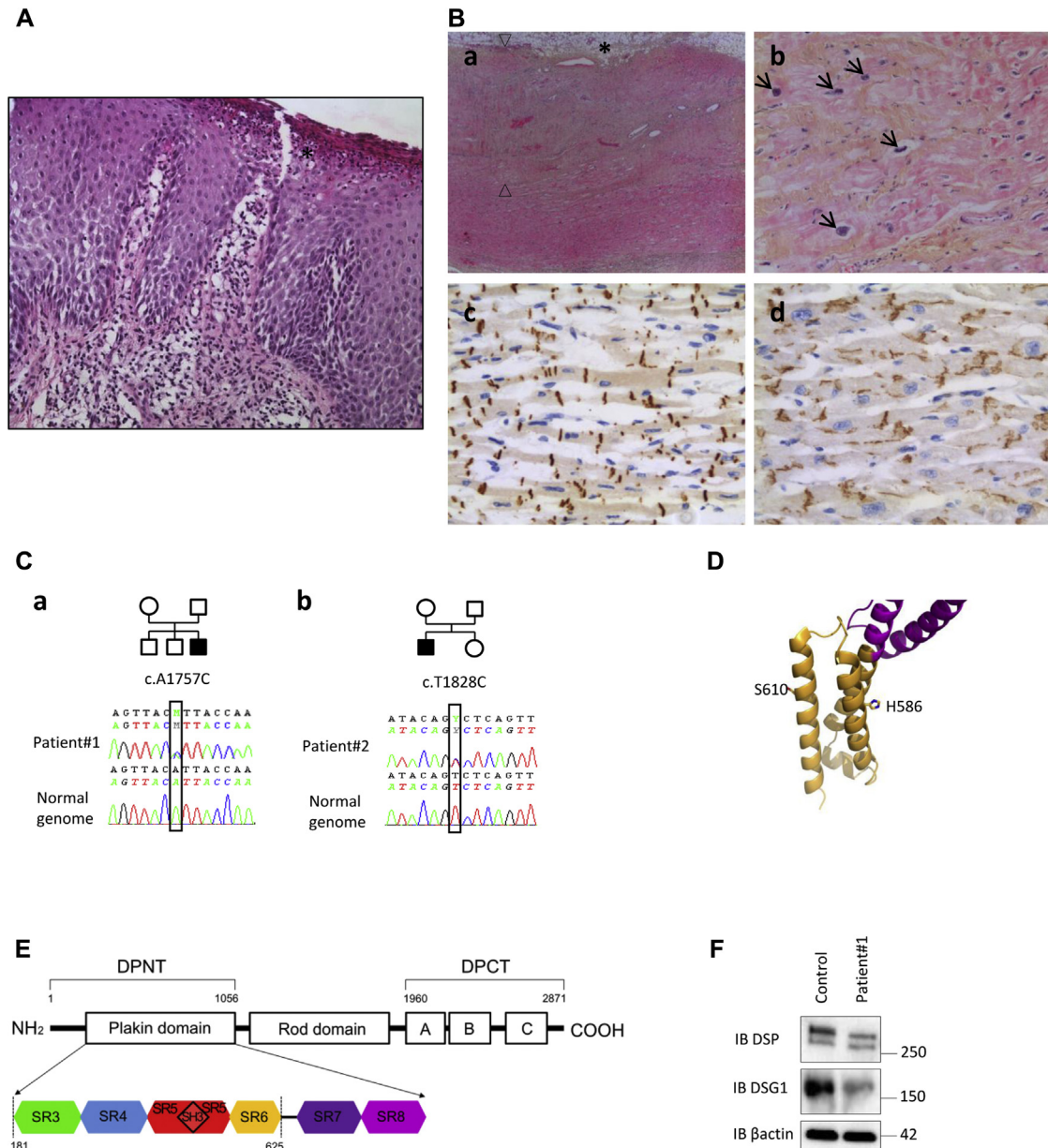


FIG E1. Histopathologic and molecular features of patients 1 and 2. **A**, Histopathology of a skin biopsy specimen (patient 2) revealed acanthosis, acantholysis (lower part of the epidermis), inflammatory infiltrate (lymphocytes and histiocytes) in the dermis, and a pustula with neutrophils (*asterisk*; $\times 200$ magnification for the *inset* of Fig E1, **A** and **B**, **b**). **B**, Histopathology of heart explants (left ventricle, patient 2) showing fatty infiltration (epicardium, *asterisk*) and major fibrous infiltration (subepicardium, *arrows*, **a**; $\times 25$ magnification for Fig E1, **B**, **a**). Presence of dystrophic nuclei in the cardiomyocytes is shown (fibrotic areas, *arrows*, **b**). Immunohistochemical comparison of DSP expression in heart sections shows a strong and regular pattern of reactivity in the intercalated discs (control, **c**) compared with the lower and abnormally distributed pattern (patient 2, **d**). **C**, Pedigrees and sequence electropherograms of patients 1 (**a**) and 2 (**b**). **D**, Locations of H586 and S610 residues within DSP's SR6 domain (orange) at the surface of straight α -helices. The SR5 domain is shown in magenta. **E**, DSP protein consists of 3 major regions with the indicated amino acid boundaries. Close-up view of the plakin domain within the DSP N-terminal domain (*DPNT*), with colored regions representing the 4 spectrin repeats found in the crystal structure of DSP (residues 181-625). The figure was used with permission from Choi et al.^{E3} **F**, Immunoblots of DSP and DSG1 in keratinocytes from patient 1 and a control subject.

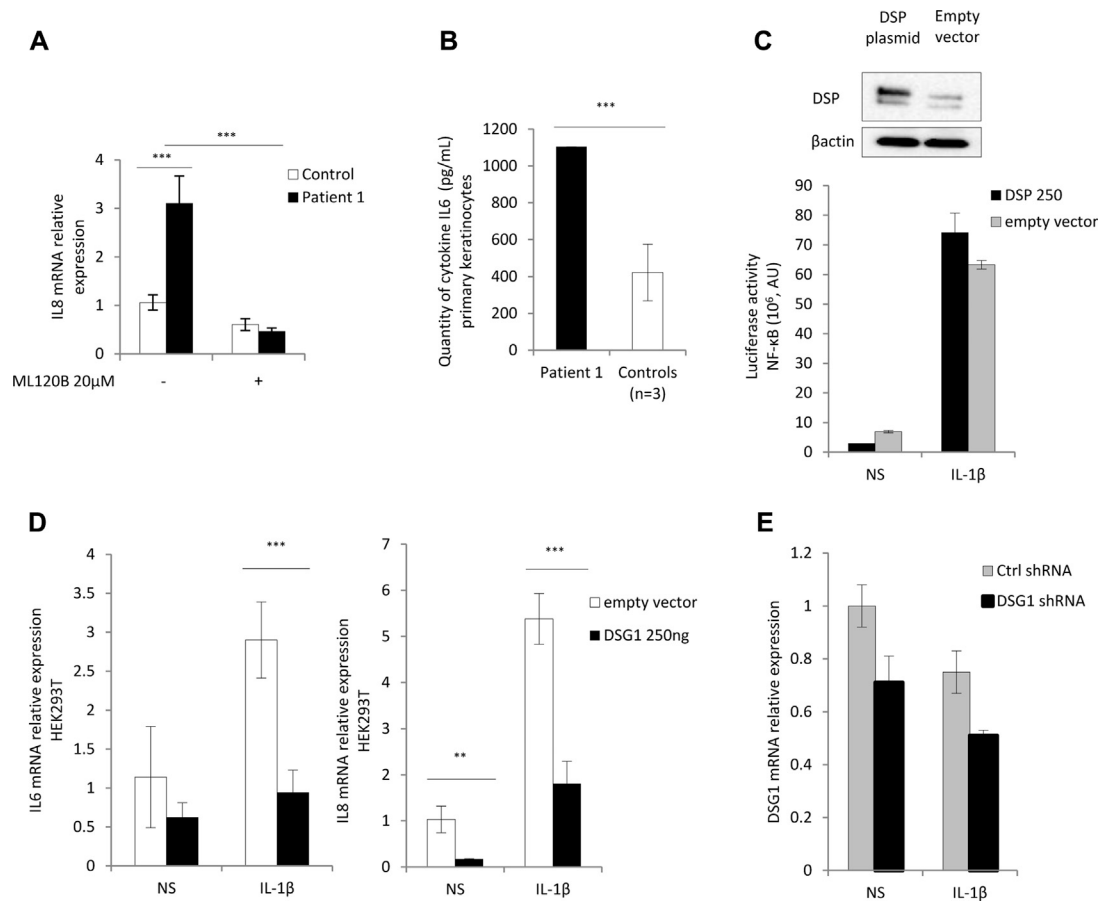


FIG E2. DSG1 inhibits NF- κ B-mediated epithelial inflammation. **A**, Relative mRNA expression of *IL8* analyzed by using quantitative RT-PCR in primary keratinocytes from patient 1 and a healthy control subject after inhibition of IKK β by ML120B. **B**, *IL6* production by keratinocytes from patient 1 and control subjects ($n = 3$). **C**, NF- κ B luciferase reporter assay in HEK293T cells transfected with 250 ng of DSP. *Inset*, Western blot analysis of DSP expression in HEK293T cells transfected with 250 ng of DSP. **D**, *IL6* and *IL8* mRNA relative expression in HEK293T cells transfected with DSG1 (250 ng) and stimulated with IL-1 β . **E**, *DSG1* mRNA relative expression in control keratinocytes infected with lentivirus expressing shDSG1 and stimulated or not with IL-1 β . AU, Arbitrary units; NS, nonstimulated. ** $P < .01$ and *** $P < .001$.

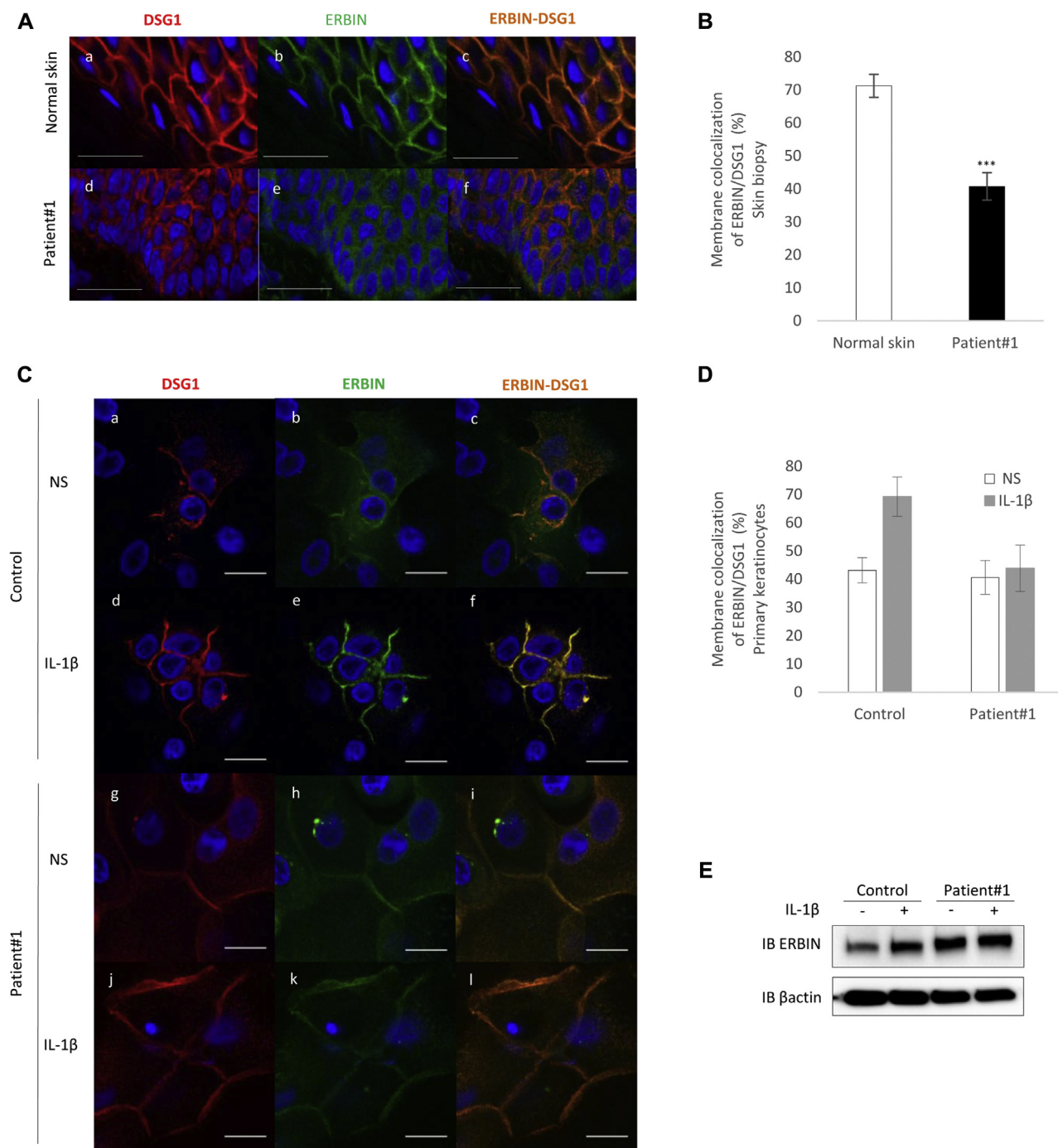


FIG E3. Expression and subcellular localization of ERBIN in the keratinocytes of patient 1. **A**, Immunofluorescence analysis of skin sections from a healthy control subject (*a-c*) and from patient 1 (*d-f*) showing a reduction in DSG1 (in red) and ERBIN (in green) staining at the plasma membrane of patient 1's keratinocytes. The 2 proteins accumulated in the cytoplasm of patient 1's keratinocytes. Scale bar = 20 μ m. Data are representative of 3 independent experiments. **B**, Quantification of ERBIN/DSG1 colocalization at the plasma membranes in skin keratinocytes from a healthy control subject and patient 1. **C**, Immunofluorescence analysis of primary keratinocytes from a healthy control subject (*a-f*) and patient 1 (*g-i*). Note the increase in DSG1 (in red) and ERBIN (in green) staining at the plasma membrane of control keratinocytes (*d-f*) after stimulation with IL-1 β . This increase was absent in patient 1's keratinocytes (*j-l*). Scale bar = 20 μ m. Data are representative of 2 independent experiments (controls, $n = 3$). **D**, Quantification of ERBIN/DSG1 colocalization at the plasma membrane of primary keratinocytes. **E**, Immunoblotting of ERBIN in keratinocytes from patient 1 and a healthy control subject. Primary keratinocytes were either stimulated with IL-1 β or not stimulated (NS). Data are shown as means \pm SDs. *** $P < .001$.

TABLE E1. Main clinical characteristics of reported patients with SAM syndrome caused by recessive mutation in the *DSG1* gene

Disease	Total patients	Past familial history	Dermatologic symptoms	Features of ectodermal dysplasia				Allergic details	Cardiac involvement	<i>DSG1</i> mutation
				Hair	Teeth	Nails	Sweating			
SAM syndrome	Two sisters	Diffuse plantar keratoderma (mother)	PPK, skin fragility, congenital ichthyosiform erythroderma	Sparse	NS	NS	NS	Severe food allergies, increased total IgE levels, eosinophilic esophagitis (1 patient)	No (1)/muscular ventricular-septal defects (1)	c.49-1G>A (homozygous) ^{E4}
	Two sisters	Focal palmar keratoderma (father)	Congenital erythroderma	Sparse	NS	NS	NS	Multiple food allergies, increased total IgE levels	No	c.1861delG (homozygous) ^{E4}
	1 (F)	Focal plantar keratoderma (mother)	PPK, atopic dermatitis since the first month of life with severe generalized flares of dermatitis	Curly	No	No	NS	Multiple allergies, increased total IgE levels	No	c.2659C>T, p.R887*, exon 15 (homozygous) ^{E5}
	Two half brothers	Mild PPK (mother)	PPK, skin erosions, psoriasiform and eczematous erythroderma in the first few months of life	No	No	No	No (1)/NS (1)	Multiple allergies, increased total IgE levels	No	c.2614delA (p.Ile872Serfs*10), exon 15 (homozygous) ^{E6}
	Two brothers and sisters	PPK (both parents)	PPK, skin erosions, congenital erythroderma	Curly and hard	No	No (1)/“affected nails” w/o precision (1)	NS	Isolated increased total IgE levels for the boy	No	c.1892-1delG/p.Gly631Glnfs*8, exon 14 (homozygous) ^{E7}
	1 (F)	PPK (father)	PPK, transient erythematous patches	Curly	No	No	No	Slight increased total IgE levels, no clinical manifestation of allergy	No	c.811_812delAC, (p.Q271Vfs*20), exon 7 + c.2100+4A>G, IVS14+4A>G, intron 14 ^{E8}

These 10 patients do not seem to have ectodermal dysplasia, even when they presented with ectodermal dysplasia features.

F, Female; NS, not specified; PPK, palmoplantar keratoderma; w/o, without.

TABLE E2. Main clinical characteristics of reported patients with SAM syndrome caused by a dominant mutation in the *DSP* gene

Disease	Total patients	Past familial history	Dermatologic symptoms	Features of ectodermal dysplasia				Allergic details	Cardiac involvement	<i>DSP</i> mutation
				Hair	Teeth	Nails	Sweating			
SAMEC syndrome	1 (M)	NS	Diffuse PPK, erythroderma from the first week of life with superficial pustulosis	Yes, hypotrichosis	Yes, hypodontia	Yes, nail dystrophy	NS	Multiple food allergies, increased total IgE levels	Normal at 6 y (clinical examination and ultrasonography)	c.1757A>C (p.His586Pro-, exon 14 (heterozygous) ^{E9}
	1 (M)	NS	PPK, erythrokeratoderma	Yes, sparse hair at birth, scalp hair was absent afterward	Yes, enamel defect, no hypodontia on primary teeth (but died at 3 y)	Yes, nail dystrophy	NS	No clinical manifestation of allergy, normal level of total IgE	Yes, marked left atrial and ventricular dilation and right ventricular dilation with an ejection fraction of 20%; patient died of heart failure at 3 y	Q616P, exon 14 (heterozygous) ^{E10}
	1 (M)		PPK, erythrokeratoderma	Yes, sparse eyebrows, eyelashes, and scalp hair	Yes, hypodontia, enamel defects	Yes, nail dystrophy	NS	No clinical manifestation of allergy, normal level of total IgE	Yes, pronounced left ventricular dilation and right atrial dilation	H618P, exon 14 (heterozygous) ^{E10}
	1 (F)		PPK, erythrokeratoderma	Yes, sparse eyebrows, eyelashes, and scalp hair	Yes, hypodontia	Yes, nail dystrophy	NS	No clinical manifestation of allergy, normal level of total IgE	Yes, a moderately dilated left ventricle with low normal systolic function	L622P, exon 14 (heterozygous) ^{E10}

These 4 patients have ectodermal dysplasia.

F, Female; M, male; NS, not specified; PPK, palmoplantar keratoderma.

Titre : Implication de la voie Hedgehog dans la mastocytose : apport de l'étude génétique de formes rares de mastocytoses à début pédiatrique

Mots clés : Mastocytose – Mastocytose pédiatrique – KIT – Hedgehog – GLI3R – syndrome de Greig

Introduction. Les mastocytoses sont caractérisées par une accumulation clonale de mastocytes dans un ou plusieurs organe(s). Alors que la majorité des mastocytoses à début pédiatrique sont cutanées pures (MC) et spontanément régressives, les mastocytoses adultes sont plus souvent systémiques et persistantes. Des mutations somatiques du gène *KIT* responsables d'une activation constitutive du récepteur à activité tyrosine kinase KIT ont été identifiées chez la majorité des patients. La mutation D816V est la plus fréquente (85% des adultes et 42% des enfants). D'autres mutations, hors codon 816, sont retrouvées chez un peu plus de 40% des enfants. Toutes les tentatives de démonstration de l'effet oncogène de la mutation *KIT* D816V seule ont échoué. D'autres facteurs interviennent donc dans la genèse de la maladie. **Objectifs.** Nos deux objectifs étaient i- d'étudier les facteurs cliniques, biologiques et moléculaires associés à la régression de la mastocytose chez l'enfant et ii- d'identifier dans des formes rares de mastocytoses congénitales des événements génétiques primitifs agissant en synergie avec la mutation de *KIT* dans l'apparition de la mastocytose. **Résultats.** À partir d'une cohorte de 272 enfants atteints de mastocytose, nous avons montré, pour la première fois, qu'une régression spontanée des lésions cutanées était statistiquement associée au caractère congénital de la mastocytose, et à la mutation *KIT* D816V. Ainsi, contrairement à l'adulte, la mutation *KIT* D816V est associée de façon significative à la régression de la mastocytose chez l'enfant. Les différences mutationnelles dans le gène *KIT* n'expliquent donc pas à elles seules les différences phénotypiques observées entre ces deux populations.

A partir de 3 patients appartenant à 2 familles indépendantes qui présentaient l'association d'une mastocytose congénitale et une céphalopolysyndactylie de Greig (MIM175700) – syndrome malformatif lié à des mutations hétérozygotes perte de fonction dans le gène *GLI3* codant pour le principal répresseur de la voie de signalisation Hedgehog (Hh), GLI3R, nous avons montré que i) la voie Hh était constitutivement hyperactivée dans les mastocytes néoplasiques de patients atteints de mastocytoses agressives, ii) l'utilisation d'inhibiteurs de la voie de signalisation Hh inhibait la prolifération et induisait l'apoptose des mastocytes néoplasiques de patients, et retardait significativement la mort chez les souris présentant une mastocytose agressive KITD816V+, iii) les mastocytes dérivés de moelle de souris *GlI3Xt^{+/-}*, modèle murin du syndrome de Greig, et transduits avec le vecteur KIT-D816V avaient un fort potentiel prolifératif par rapport aux témoins, confirmant la coopération oncogénique entre les voies Hh et KIT. Enfin, nous avons montré que l'expression ectopique de GLI3R induisait rapidement la mort des mastocytes pathologiques, démontrant son rôle de suppresseur de tumeur dans ce modèle. **Conclusion.** Notre étude a permis d'identifier un nouveau mécanisme contribuant à la pathogénèse des mastocytoses agressives et suggérant ainsi des nouvelles cibles thérapeutiques dans cette pathologie. De nouvelles hypothèses expliquent la régression de la mastocytose à début pédiatrique.

Title: Involvement of the Hedgehog pathway in mastocytosis: contribution of the genetic study of rare forms of pediatric mastocytosis

Keywords: Mastocytosis – Pediatric mastocytosis – KIT – Hedgehog – GLI3R – Greig syndrome

Introduction. Mastocytosis is a neoplastic condition characterized by the accumulation of mast cells (MCs) in one or more organs. Adults tend to have persistent, systemic mastocytosis, whereas MC infiltration in children is usually limited to the skin and classically regresses after several years. In more than 85% of both adult and pediatric patients, *KIT* mutations are identified, the *KIT* D816V mutation being present in most affected adults but in only half of affected children. All attempts to demonstrate the oncogenic effect of the D816V mutation alone have failed – suggesting that other pathogenic factors cooperate with *KIT* in the context of mastocytosis. **Objectives.** i- To identify the clinical, biological and molecular factors associated with the regression of cutaneous mastocytosis (CM) in children and ii-to identify, in rare forms of congenital mastocytosis, primitive genetic events acting in synergy with the *KIT* mutation, in order to analyze the underlying pathophysiological mechanisms and test them in sporadic forms. **Results.** Through the study of a cohort of 272 children with mastocytosis, we showed that congenital mastocytosis and the *KIT* D816V mutation were associated with a regression of CM. Thus, the mutational differences between children and adults (especially the high prevalence of *KIT* D816V mutation in adults) cannot alone explain the outcome of CM. Then, through the observation of 3 patients from 2 unrelated families, presenting with i-a

Cephalopolysyndactyly syndrome (GCPS) - a rare polymalformative syndrome caused by a loss-of-function mutation in *GLI3* gene coding for the main repressive transcription factor of the Hedgehog (Hh) signaling pathway (GLI3R) and ii-a congenital mastocytosis, we showed that Hh is overactive in neoplastic MCs from patients with aggressive systemic mastocytosis (ASM). Hedgehog pathway inhibitors suppressed MC proliferation, induced the apoptosis of neoplastic MCs, and significantly extended the survival time of mice with ASM. We showed that MCs derived from the bone marrow of *GlI3Xt^{+/-}* mice (a mouse model of GCPS) and transduced with the KIT-D816V vector proliferated much more than controls - confirming the synergistic tumorigenic effects of *GLI3* and *KIT* mutations on the onset of mastocytosis. Ectopic expression of GLI3R rapidly induced the death of pathological MCs - highlighting the protein's tumor suppressor activity and therapeutic potential in this model. **Conclusion.** Our study i- opens up new hypotheses with regard to the spontaneous regression of CM in pediatric patients and ii- highlights, a new mechanism contributing to the pathogenesis of ASM and suggests new therapeutic targets in this pathology.