



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*
Discipline ou spécialité : **IMMUNOLOGIE**

Présentée et soutenue par *Nicolas Gaudenzio*
Le Jeudi 18 Octobre 2012

Titre : *Étude de l'interaction entre les mastocytes
et les lymphocytes T Helper*

JURY

Président du jury : Professeur Roland Liblau
Rapporteur : Professeur Michel Arock
Rapporteur : Docteur Jacques Nunès

Ecole doctorale : *Biologie, Santé, Biotechnologies (BSB)*
Unité de recherche : *INSERM U1043*

Directeur(s) de Thèse : *Docteur Eric Espinosa / Professeur Salvatore Valitutti*
Rapporteurs : *Professeur Michel Arock / Docteur Jacques Nunès*

ABRÉVIATIONS

BMMC / FSMC : bone marrow derived / fetal skin derived mast cells

CBMC : cord blood derived mast cells

CMH-II : complexe majeur d'histocompatibilité de type II

CPA : cellules présentatrices d'antigènes

EAE : encéphalomyélite autoimmune expérimentale

FcεR : récepteurs à la portion Fc des immunoglobulines E

FcγR : récepteurs à la portion Fc des immunoglobulines G

hMC : mastocytes humains

IFN : interféron

Ig : immunoglobuline

IL- : interleukine

LTC4 : leucotriène C4

MCP : progéniteurs de mastocytes

MC_T/MC_{TC} : mastocytes exprimant la tryptase/exprimant la tryptase et la chymase

MMC/CTMC : mucosal mast cells/connective tissue mast cells

NLR : récepteurs NOD-*like*

PBMC : peripheral blood derived mast cells

PCMC : peritoneal cell derived mast cells

PGD2 : prostaglandine D2

SCF : *stem cell factor*

SP : substance P

T_H/T_{reg} : T Helper/ T régulateur

TLR : récepteurs *toll-like*

TNF : *tumor necrosis factor*

FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1. Phénotype et caractéristiques des mastocytes.

Figure 2. Structure des protéoglycanes à motifs serycine et de leurs glycosaminoglycanes sulfatés.

Figure 3. Morphologie des granules.

Figure 4. Complexes protéoglycanes/protéases à l'intérieur ou à l'extérieur du mastocyte.

Figure 5. Particules synthétiques.

Figure 6. La signalisation du récepteur au SCF (KIT).

Figure 7. Les deux modèles de différenciation mastocytaire.

Figure 8. Impact de l'activation des mastocytes par les TLR.

Figure 9. La signalisation du récepteur FcεRI.

Figure 10. Régulation négative de la signalisation du récepteur FcεRI.

Figure 11. L'interaction mastocyte/neurone.

Figure 12. Sécrétion de LL-37 et activation des mastocytes.

Figure 13. Les mastocytes induisent le recrutement de cellules effectrices *via* la sécrétion de nombreux médiateurs.

Figure 14. Représentation schématique d'une synapse immunologique.

Figure 15. Schéma montrant les trois signaux requis pour l'activation et la différenciation des lymphocytes T_H.

Figure 16. La différenciation des différents sous-types de lymphocytes T_H.

Figure 17. Identification des différentes populations de lymphocytes T CD4⁺.

Tableau 1. Effet de différents facteurs sur les mastocytes.

Tableau 2. L'activation des mastocytes par les PRR et ses conséquences fonctionnelles.

Tableau 3. Mécanismes inhibiteurs de la signalisation du récepteur FcεRI.

Tableau 4. Expression et activation des FcγR dans les mastocytes.

Tableau 5. Effet des mastocytes sur la réponse T_H.

Schéma 1. Les mastocytes coopèrent avec les lymphocytes T_H.

Schéma 2. Les mastocytes différencient les lymphocytes T_H en cellules productrices d'IL-22.

Study of the interaction between mast cells and T Helper cells

Thesis directors : Dr. Eric Espinosa / Pr. Salvatore Valitutti

ABSTRACT

Mast cells have been classically associated to allergic disorders, however several studies describe their involvement in the inflammatory response. Mast cells are often observed in tissues in close apposition with CD4 T cells (T_H). The aim of my thesis is to better characterize the nature of mast cell/ T_H interaction and in particular the mast cell capacity to act as antigen presenting cell and the consequences for the T_H cell response.

We first addressed this question using mouse primary mast cell lines derived from peritoneal progenitors (PCMC) used as antigen presenting cell to activate cognate OTII T cells with OVA peptide. Our results show that *in vitro* treatment of PCMC with IFN- γ and IL-4 induced surface expression of mature MHC class II and costimulatory molecules. When IFN- γ primed PCMC were used as antigen presenting cells for Helper T (T_H) cells, they induced activation of effector T cells but not of their naive counterparts. Confocal laser scanning microscopy showed that T_H cells formed immunological synapses and polarized their secretory machinery towards antigen-loaded PCMC. Finally, upon cognate interaction with T_H cells, mast cells lowered their threshold of activation *via* Fc ϵ RI. These results show that mast cells can specifically cooperate with class II restricted T_H cells.

In a second part, we investigated the functional impact of mast cell antigen presentation on human T cell-mediated responses. *In vitro*, human mast cells form productive immunological synapses with antigen-experienced T_H cells. These interactions promote the generation of interleukin 22 (IL-22) producing T_H cells (either pure T_H22 or IL-22 plus IFN- γ -producing T_H cells) from the circulating CD4⁺ memory T cell pool *via* a tumor necrosis factor (TNF- α)- and IL-6-dependent mechanism. Three-color immunohistochemistry and confocal laser scanning microscopy reveal a rich infiltrate of IL-22⁺ T_H cells in psoriatic skin biopsies. Most of the IL-22⁺ T_H cells are found in contact with mast cells and co-express IFN- γ , suggesting that IFN- γ ⁺IL-22⁺ T_H cells are generated *in vivo* upon interaction with mast cells.

Our results reveal a novel functional trait of mast cells by showing that they can shape the inflammatory potential of human T_H lymphocytes in tissues, by providing activating signals and skewing the T_H cell response toward the production of IL-22.

Keywords: mast cells, T Helper lymphocytes, interleukin-22, inflammation.

Discipline: Immunology.

Étude de l'interaction entre les mastocytes et les lymphocytes T Helper

Directeurs de thèse : Dr. Eric Espinosa / Pr. Salvatore Valitutti

RÉSUMÉ

Les mastocytes ont longtemps été associés aux réponses allergiques, néanmoins de nombreuses études les décrivent comme des acteurs de la réponse inflammatoire. Les mastocytes sont souvent retrouvés en étroite apposition au sein des tissus avec les lymphocytes T Helper (T_H). L'objet de ma thèse est de caractériser la nature de l'interaction mastocyte/ T_H et notamment la capacité des mastocytes à jouer le rôle de cellules présentatrices d'antigène.

Dans une première étude, nous avons démontré que des lignées primaires de mastocytes murins (PCMC) peuvent acquérir un phénotype de cellules présentatrices d'antigènes, lorsqu'elles sont traitées en présence d'IFN- γ pendant 72 heures. Ainsi conditionnés, les PCMC capturent, apprêtent et présentent l'antigène à des lymphocytes T $CD4^+$ activés, mais restent incapables d'activer leurs homologues naïfs. Durant ce phénomène, une véritable synapse immunologique est mise en place où le lymphocyte T_H polarise son TCR et toute sa machinerie sécrétoire vers l'aire de contact intercellulaire. En retour, le mastocyte s'active et baisse significativement le seuil d'activation des récepteurs $Fc\epsilon RI$ en réponse à une stimulation par des IgE. Ces résultats indiquent que les mastocytes peuvent établir une coopération spécifique avec les lymphocytes T_H .

Dans une seconde étude, nous avons déterminé les conséquences fonctionnelles d'une telle coopération sur la biologie des lymphocytes T_H humains. *In vitro* les mastocytes humains forment des synapses immunologiques fonctionnelles avec des lymphocytes T $CD4^+$ activés. Ces interactions productives favorisent la génération de lymphocytes T_H produisant de grandes quantités d'IL-22 (à la fois de purs T_H22 et des T_H produisant simultanément de l'IL-22 et de l'IFN- γ) à partir d'un pool de lymphocytes T_H mémoires. Cette différenciation vers un tel profil de T_H est dépendante de l'action de deux cytokines que sont l'IL-6 et le TNF- α . L'analyse microscopique détaillée d'échantillons de peaux psoriasiques révèle un enrichissement en lymphocytes T_H produisant simultanément de l'IL-22 et de l'IFN- γ , lorsqu'ils sont au contact des mastocytes.

Ces résultats indiquent que les mastocytes peuvent être de véritables partenaires fonctionnels pour les lymphocytes T_H au sein des tissus, leur fournissant des signaux d'activation et les orientant vers la production d'une cytokine supplémentaire l'IL-22.

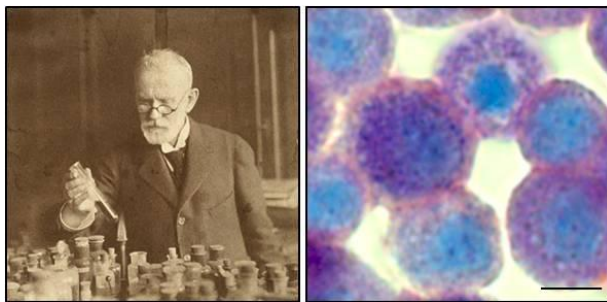
Mots clés : mastocytes, lymphocytes T Helper, interleukine-22, inflammation.

Discipline : Immunologie.

INTRODUCTION

1- La carte d'identité des mastocytes.

Le mastocyte est une cellule du système immunitaire qui fascine le monde de la recherche biomédicale depuis de nombreuses années. C'est en 1878, lors de l'analyse de tissus connectifs humains, que le scientifique allemand Paul Ehrlich découvre avec stupeur une grosse cellule au contenu cytoplasmique granuleux et métachromatique¹. Il baptise alors cette étrange cellule « *mastzellen* » signifiant littéralement « cellule bien nourrie », qui deviendra par la suite « *mast cell* » en anglais ou bien « mastocyte » en français.



Paul Ehrlich 1854-1915 Mastocytes, bleu de Toluidine

Les mastocytes sont caractérisés par l'expression de deux molécules à leur surface, le récepteur de haute affinité aux immunoglobulines de type E (FcεRI) et le récepteur au *stem cell factor* (KIT ou SCFR). Ils sont facilement visualisables au sein des tissus humains en mettant en évidence la tryptase, une protéase constitutivement exprimée dans leurs granules cytoplasmiques. Ces cellules sont célèbres pour leur capacité à exocytter leur contenu granulaire riches en histamine, lors des réactions allergiques. Cependant, leur rôle au sein de l'organisme ne se restreint pas à la seule fonction de dégranulation sous l'influence d'allergènes. Leurs localisations stratégiques, près des voies d'entrées de pathogènes, permet aux mastocytes d'être fortement impliqués dans la lutte contre les divers micro-organismes. Ils ont non seulement la capacité d'agir « en première ligne » au sein de l'immunité innée, mais peuvent aussi influencer et moduler la réponse immunitaire adaptative.

1-1 Hétérogénéités des populations mastocytaires.

a. La distribution tissulaire et le phénotype des mastocytes.

Bien que tous les mastocytes aient un aspect et des caractéristiques phénotypiques relativement similaires, ils ne représentent pas une population homogène. Nous savons de nos jours que les mastocytes ont des profils de médiateurs qui leur sont propres et des propriétés fonctionnelles bien précises en fonction du tissu dans lequel ils se trouvent.

La première évidence d'une différence morphologique au sein de la population mastocytaire fut apportée par Hardy et Westbrook en 1895. En effet, ils ont observé chez le rat que les granules des mastocytes ont des propriétés de colorations acido-basiques différentes si les cellules proviennent de la cavité péritonéale (coelomique) ou bien de tissus viscéraux (splanchnique)². Dans les années 1960, les travaux d'Enerback confirmèrent ces résultats et démontrèrent que les mastocytes retrouvés dans la muqueuse intestinale de rats ont des propriétés métachromatiques, histochimiques et biologiques bien précises (particularités détaillées par la suite dans ce chapitre)³⁻⁶. Ces travaux établirent le dogme d'une diversité au sein de la population mastocytaire et furent approfondis par de nombreuses études dans les années qui suivirent⁷.

La classification des mastocytes de rongeurs est basée sur des différences phénotypiques et histochimiques observées entre les mastocytes retrouvés dans les tissus connectifs (CTMC pour *connective tissue mast cells*) tels que la peau ou la cavité péritonéale et ceux présents dans les muqueuses (MMC pour *mucosal mast cells*) telle que les poumons ou la *lamina propria* de l'intestin. Les travaux de Enerback⁸, Bienestock⁹ et de Miller¹⁰ montrent qu'en plus d'une disparité d'ordre morphologique ou histochimique, les MMC et CTMC diffèrent aussi par la nature biochimique et fonctionnelle de leur contenu granulaire cytoplasmique. D'un point de vue phénotypique, les deux catégories de mastocytes se distinguent par leur taille, leur teneur en histamine, en protéoglycanes et leurs contenu en protéases neutres¹¹. Il est d'ailleurs possible de distinguer les MMC des CTMC grâce aux propriétés anioniques de deux protéoglycanes : l'héparine et le chondroïtine sulfate. En effet, dans les tissus les MMC contenant du chondroïtine sulfate seront colorés par le bleu alcian, alors que les CTMC contenant de l'héparine seront colorés par de la safranine-o (**Figure 1**)^{5,12}. D'un point de vue fonctionnel, les CTMC et les MMC présentent aussi des différences remarquables. En effet, les MMC produisent de hauts niveaux de leukotriènes C₄ (LTC₄) après une activation *via* le FcεR1¹³ et ne sont que peu sensibles au cromoglycate de sodium (un agent « stabilisateur »

de mastocytes connu et utilisé pour prévenir la dégranulation) ou au sécrétagogue 48/80 (inducteur de dégranulation)¹⁴. Par contre, les mastocytes de type CTMC provenant de la cavité péritonéale produisant de grandes quantités de prostaglandine D2 (PGD2)¹³, sont « stabilisés » par le cromoglycate de sodium et dégranulent en réponse au composé 48/80^{14,15} (**Figure 1**).

Les deux types de mastocytes divergent aussi par leur dépendance aux facteurs dérivés des lymphocytes T. En effet, l'IL-3 semble particulièrement importante pour le développement des MMC lors d'une infection par certains parasites intestinaux tels que *Trichinella spiralis* ou *Nippostrongylus brasiliensis*^{16,17,18}. Cependant, cette dépendance aux lymphocytes T reste controversée puisqu'il a été reporté qu'en l'absence d'infection, un nombre normal de mastocytes est retrouvé dans la muqueuse intestinale de rats ou de souris *nude* (souris dépourvue de thymus et donc de lymphocyte T)¹⁹.

Chez l'homme, la dichotomie entre les populations de mastocytes n'est pas si évidente que dans les modèles murins. Néanmoins, il est possible de distinguer deux grands sous-types de mastocytes en fonction de leur contenu en protéases neutres cytoplasmiques et de leur localisation. Un premier sous-type exprime simultanément de la tryptase, de la chymase et de la carboxypeptidase G (MC_{TC}) ; c'est le sous-type majoritaire de la peau et de la cavité péritonéale (analogue des CTMC de rongeurs). Un deuxième sous-type, constitué de mastocytes exprimant uniquement de la tryptase (MC_T), est retrouvé majoritairement dans les poumons et la muqueuse intestinale (proche des MMC de rongeurs)^{11,20,21}. Ce dernier sous-type de mastocyte pourrait être, comme dans les modèles murins, dépendant de facteurs provenant de lymphocytes T, puisqu'il a été rapporté que des patients souffrant d'immunodéficience en lymphocyte T ont une très forte réduction des populations MC_T dans la muqueuse intestinale alors que les populations MC_{TC} ne sont pas affectées²² (**Figure 1**).

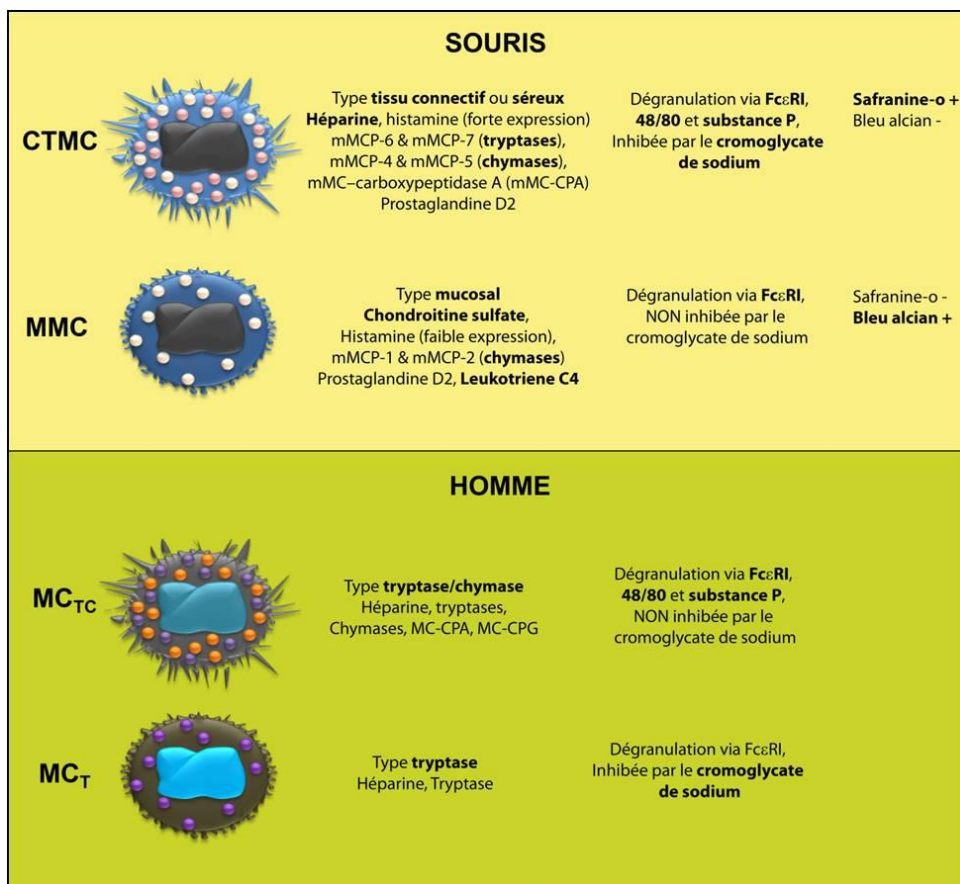


Figure 1. Phénotype et caractéristiques des mastocytes.

Inspiré de Galli et al.¹¹ et de Metcalfe et al.²³

La recherche de progéniteurs différents, les uns donnant naissance aux mastocytes de type MC_T et les autres à ceux de type MC_{TC}, fut la motivation de nombreuses recherches ces dernières années. Mais l'absence de composante granulaire des progéniteurs sanguins laisse présager que cette dichotomie s'opère lors de la maturation au sein des tissus. Des études ont montré que les facteurs micro-environnementaux jouent un rôle important dans le développement et la maturation des mastocytes comme notamment l'IL-3 et le SCF^{12,24,25,26,27,28,29}. Les travaux de *Sonoda et al.* et de *Nakano et al.* suggèrent que les mastocytes peuvent changer de caractéristiques suivant leur localisation. En effet, des mastocytes injectés dans un site peuvent acquérir les caractéristiques et les fonctionnalités des mastocytes qui y résident normalement^{29,30}. Il a été observé qu'une inflammation locale

chez des patients souffrant de conjonctivites³¹ ou encore d'arthrites³² pouvait altérer la nature des populations mastocytaires résidentes. Ces données suggèrent donc un rôle primordial du microenvironnement dans le développement et la maturation des mastocytes. Au vu de ces résultats, il est intéressant de spéculer que les mastocytes, même déjà différenciés, gardent une certaine plasticité leur permettant d'adapter leur phénotype au microenvironnement dans lequel ils se trouvent.

b. Les principaux modèles de mastocytes primaires.

Les modèles murins : BMMC et PCMC.

Il est possible d'isoler *ex vivo* des mastocytes d'une souris après lavage péritonéal ou broyat et digestion d'organes tels que la peau ou les poumons. Cependant, devant le faible nombre de mastocytes isolés, la communauté scientifique a développé des cultures primaires *in vitro* de mastocytes à partir de progéniteurs hématopoïétiques. Ainsi, des cellules de moelle osseuse de souris cultivées dans un milieu contenant seulement de l'interleukine 3 (IL-3) se différencient en un modèle de mastocytes relativement immatures appelés BMMC (*bone marrow-derived mast cells*), avec une pureté de culture avoisinant les 95%³³. Ce modèle de mastocyte est un des plus utilisés dans la littérature actuelle, il sert notamment pour la reconstitution des populations mastocytaires dans des souris dépourvues de mastocytes (cf chapitre 1-4).

Le groupe de Marc Daéron a récemment décrit un autre modèle de mastocytes murins dérivés à partir de progéniteurs péritonéaux, ce sont les PCMC (*peritoneal cell-derived mast cells*)³⁴. C'est un modèle de mastocytes qui s'avère plus matures que le modèle BMMC et proche des mastocytes péritonéaux (c'est pourquoi j'ai choisi d'utiliser ce modèle lors de l'étude de l'interaction mastocyte/lymphocyte T chez la souris, cf partie RESULTATS). C'est un modèle qui a besoin de *stem cell factor* (SCF) pour proliférer et survivre, il n'a par contre pas besoin d'IL-3. Il est à noter que les MCP utilisés pour générer les BMMC et les PCMC ne proviennent pas du même site (respectivement la moelle osseuse et le péritoine), il n'est donc pas à exclure qu'ils proviennent soit de différents MCP, soit de même MCP mais à un stade de maturation bien distinct.

Les modèles chez l'homme : CBMC et PBMC.

Il est possible d'isoler *ex vivo* des mastocytes humains à partir d'explants tissulaires tels que les biopsies cutanées. Comme chez la souris, ce processus est compliqué et ne permet pas d'isoler de grandes quantités de mastocytes. On peut aussi générer un modèle de mastocytes humains à partir de cellules CD34⁺ de cordon ombilical, ce sont les CBMC (*cord blood-derived mast cells*)^{24,28}. Ce modèle a besoin de SCF pour proliférer et l'addition d'IL-3 pendant la première semaine de culture, augmente dramatiquement leur prolifération³⁵. C'est le modèle de culture de mastocytes primaires humains qui a été le plus utilisé jusqu'à présent. Dans un autre modèle, les mastocytes humains sont générés à partir de progéniteurs CD34⁺ issus du sang périphérique de donneurs sains, ce sont les PBMC (*peripheral blood derived mast cells*)^{36,37,38}. Dans ce modèle là, l'IL-3 est nécessaire dans la première semaine pour démarrer la culture, après elle devient superflue³⁷. Pour ces deux modèles d'étude, l'interleukine 6 (IL-6) est un facteur crucial pour la culture à long terme de mastocytes humains^{35,37,39}. En plus d'être nécessaire à leur développement^{37,40}, l'IL-6 est importante pour leur survie puisqu'elle exerce sur la culture une activité anti-apoptotique non négligeable^{41,42,43}.

1-2 Les granules du mastocyte.

a. La composition des granules.

Les protéoglycanes : héparine et chondroïtine sulfate E.

Paul Ehrlich a identifié les mastocytes comme de grosses cellules dont le cytoplasme était rempli de granules qui étaient colorées de façon métachromatiques par des colorants basiques tels que le bleu de Toluidine ou le bleu Alcian¹. Cette interaction des colorants basiques avec les granules de mastocytes est due à leur richesse en protéoglycanes (fortement anioniques).

Les protéoglycanes sont des macromolécules constituées d'un cœur protéique central, qui consiste principalement en un enchainement d'unités sérine-glycines (Ser-Gly), sur lequel des chaînes de glycosaminoglycanes (GAG) sont liées de manière covalente^{44,45,46}. Les GAG sont des unités diosidiques répétées d'acide D-glucuronique et de N-acetyl D-glucosamine (**Figure 2**).

L'héparine est le GAG le plus négativement chargé du corps humain, elle est exclusivement synthétisée par le mastocyte puis stockée dans ses granules sécrétoires (**Figure 2**). Sa

biosynthèse, comme celle des autres GAG, est un processus relativement complexe dans lequel des précurseurs non sulfatés subissent des modifications en séries. En effet, quatre N-deacetylase/N-sulfotransferases (NDST-1 à 4) se succèdent pour transformer une chaîne précurseur en héparine ou héparane sulfate appartenant à la famille des GAG^{46,47,48}. Chez l'homme, l'héparine est retrouvée dans tous les types de mastocytes, par contre chez les rongeurs elle est uniquement présente dans les mastocytes de type CTMC (**Figure 1**).

L'autre GAG important retrouvé dans les granules de mastocytes est le chondroïtine sulfate E (**Figure 2**). C'est le deuxième GAG le plus négativement chargé du corps humain. Il est quant à lui retrouvé dans les mastocytes de type MMC chez le rongeur et les mastocytes de la muqueuse intestinale ou pulmonaire chez l'homme (**Figure 1**)^{46,49,50}.

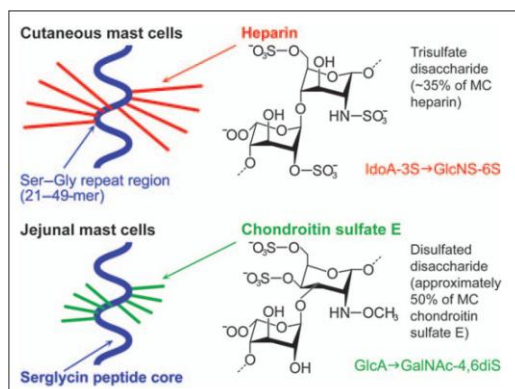


Figure 2. Structure des protéoglycanes à motifs serglycine et de leurs glycosaminoglycanes sulfatés. Stevens *et al.*⁴⁶

L'histamine.

L'histamine une des premières substances à avoir été associée aux mastocytes, elle est connue depuis longtemps pour être un des médiateurs principaux des réactions allergiques sévères chez l'homme⁵¹. Elle est synthétisée dans l'appareil de Golgi des mastocytes et des basophiles par décarboxylation de l'acide aminé histidine⁵². Une fois formée, elle est retrouvée dans les granules, associée aux résidus acides des glycosaminoglycanes⁵³. Elle peut agir sur les vaisseaux sanguins, les muscles lisses des bronches et de l'intestin, l'estomac, les fibres nerveuses ou encore sur les éosinophiles *via* quatre récepteurs différents (H1-4)^{54,55}.

Les hydrolases acides.

La β -gluconidase, la β -D-galactosidase, l'arylsulfatase et la β -hexosaminidase sont quatre hydrolases acides retrouvées dans les granules des mastocytes et libérées lors de la dégranulation. La présence de toutes ces hydrolases acides, normalement retrouvées dans les compartiments lysosomaux d'autres types cellulaires, a permis de définir les granules de mastocytes dans les années 1980 comme des « lysosomes modifiés »⁵⁶. Leur rôle dans la biologie du mastocyte reste à ce jour peu connu, néanmoins il est supposé qu'elles agissent ensemble dans la dégradation des glycoprotéines ou protéoglycanes ainsi que dans la lutte antibactérienne⁵⁷.

La détection de la β -hexosaminidase est souvent utilisée pour mettre en évidence la dégranulation de mastocytes. En effet, elle a la capacité de cliver un substrat synthétique chromogène, le p-nitrophenol- β -D-2-acetamino-2-deoxyglucopyranoside (DNP) et de libérer du p-nitrophenol qui est coloré et permet un dosage enzymatique^{51,58}.

Les protéases neutres : tryptase, chymase et carboxypeptidase A.

Les protéases neutres constituent la majorité des protéines contenues dans les granules des mastocytes. Leur poids total cumulé représente 60 pg de protéases par mastocyte alors que par exemple la quantité d'histamine n'excède pas 1 à 2 pg⁵¹. Elles sont souvent à l'origine de la classification phénotypique des mastocytes (**Figure 1**) et sont stockées dans les granules, complexées aux GAG.

La tryptase est une sérine protéase tétramérique de 134 kD présente sous deux isoformes α (monomère inactif sécrété en continue responsable du taux basal sérique) et β (libéré dans le sérum lors des chocs anaphylactiques), elle représente environ 20% des protéines cellulaires contenues dans un mastocyte humain⁵⁹. La tryptase semble pouvoir aussi bien jouer un rôle autant pathologique que protecteur. Des modèles murins de souris sans tryptase infectées par des espèces bactériennes⁶⁰ ou parasitaires⁶¹ ont plus de difficultés pour lutter contre les infections que des souris sauvages. Ces travaux ont démontré que la tryptase était nécessaire pour un recrutement massif de neutrophiles au site inflammatoire et de ce fait pour initier une réponse immunitaire efficace et bénéfique⁶². En effet, en clivant le récepteur PAR-2 (*protease-activated receptor 2*) présent à la surface des cellules endothéliales, la tryptase induit l'expression de P-sélectines qui permettent le recrutement de leucocytes⁶³. Mais elle est aussi retrouvée en forte concentration dans les lavages

bronchoalvéolaires de patients souffrant d'asthme allergique⁶⁴, dans le fluide cérébrospinal de patients souffrant de scléroses multiples⁶⁵ ou encore dans des cas d'arthrite rhumatoïde⁶⁶, suggérant un rôle pro-inflammatoire néfaste dans ces pathologies.

La chymase est une sérine protéase chymotryptique (elle clive après des résidus aromatiques tels que la phenylalanine ou la tyrosine) retrouvée au sein de granules différents de ceux contenant la tryptase et associée aux GAG⁶⁷. Chez l'homme, le rôle de la chymase dans l'asthme reste encore à ce jour débattu, la présence de mastocytes chymase⁺ est rapportée comme étant de bon pronostic dans certains cas⁶⁸ et de mauvais dans d'autres^{62,69}. Des études pharmacologiques, utilisant des inhibiteurs de la chymase, impliquent cette dernière dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires. En effet, un des substrats de la chymase est l'angiotensine I qui est convertie en angiotensine II, orientant alors le système rénine/angiotensine/aldostérone vers une augmentation pathologique de la pression artérielle⁷⁰. Par contre, des études menées chez des modèles murins déficients en chymase (MCP-1) montrent que cette dernière est impliquée, au même titre que la tryptase, dans la lutte contre les infections parasitaires^{62,71}.

La carboxypeptidase A (MC-CPA ou carboxypeptidase 3) est une métallo-exopeptidase spécifique des mastocytes^{72,73,74}, elle est uniquement exprimée par le type MC_{TC}⁷⁵. Des études plus approfondies ont montré qu'elle était localisée dans les mêmes granules que la chymase et associée aux GAG⁶⁷. Il est intéressant de noter que chez la souris aussi il semble y avoir un lien entre ces deux enzymes puisque la délétion de l'une influe sur l'expression de l'autre⁷⁶. A ce jour aucune implication de la carboxypeptidase A n'a été détectée dans les pathologies pulmonaires, mais très peu d'études se sont intéressées au sujet. Néanmoins, la carboxypeptidase A est importante pour limiter les effets potentiellement létaux de peptides endogènes (telle que la neurotensine ou l'endothéline)^{77,78} et de venins de la famille des sarafotoxines^{76,79}.

b. La formation et l'architecture des granules.

Des travaux de microscopie électronique ont permis d'identifier trois types de granules contenus dans les mastocytes (**Figure 3**). Les granules de type I et II peuvent être marqués par des molécules endocytées en phase fluide (BSA attachée sur des particules d'or) et contiennent toutes deux des molécules de complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH-II) ainsi que des marqueurs lysosomaux. Ces données suggèrent qu'elles se

positionnent dans la continuité de la voie d'endocytose, de manière similaire à des lysosomes. De la sérotonine est retrouvée dans les granules de type II et de type III. Le fait que les granules de type II possèdent des caractéristiques communes à celles de type I et III suggère qu'elles résultent de la fusion des deux autres^{80,81}. De récents travaux dans l'équipe de Stephen Galli démontrent qu'il existe de nombreux événements de fusions permettant la maturation des granules dans le cytoplasme des mastocytes⁸². Les mécanismes moléculaires qui contrôlent la fusion des granules entre elles et leur exocytose *via* la membrane plasmique sont relativement complexes et restent encore flous de nos jours. Cependant, nous savons qu'ils font intervenir de multiples molécules appartenant à la famille des SNARE (*N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor*) telle que VAMP-8^{83,84} et à la famille des synaptotagmines (Syt) telles que Syt II, III et IX⁸¹.

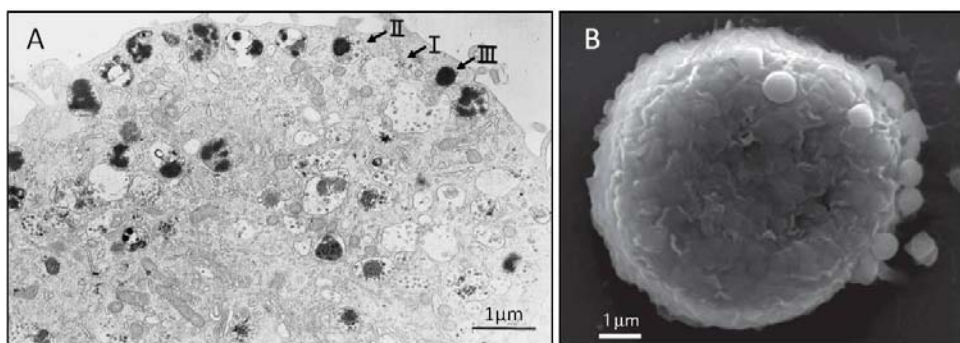


Figure 3. Morphologie des granules.

- A. Microscopie électronique du contenu d'un mastocyte, identification des granules de type I, II et III.
 B. Microscopie électronique à balayage d'un mastocyte partiellement dégranulé. Modifié de Raposo *et al.*⁸⁰ et de St.John *et al.*⁸⁵

L'architecture des granules est formée lors de l'interaction entre les protéoglycanes et les protéases durant un processus de complexations électrostatiques⁴⁶. En effet, au sein des granules, l'héparine ou le chondroïtine sulfate E peuvent lier un grand nombre de protéases basiques (tryptase, chymase, carboxypeptidase, etc.), grâce à leurs groupements acides fortement anioniques et à leur capacité à exclure l'eau. Ainsi, il a été démontré que les granules de mastocytes issus de péritoines de rats contiennent un mélange de 30% d'héparine et de 70% de protéines basiques, dans des complexes qui sont insolubles à l'eau⁵³.

Dans les mastocytes, seules les protéases matures et enzymatiquement actives peuvent se lier aux protéoglycanes au sein des granules. Les protéoglycanes jouent ici un rôle fondamental de contrôle de conformation et d'activité des protéases cellulaires avant l'empaquetage dans les granules^{46,86,87,88}. Deux études menées chez la souris par Humphries *et al.* et Forsberg *et al.*, parues en 1999, démontrent l'importance de l'héparine dans l'intégrité des granules mastocytaires. Ils ont en effet constaté que les mastocytes des tissus connectifs d'une souris NDST-2^{-/-} (déficiente en héparine) avaient un défaut de stockage des protéases mMCP-4, mMCP-5 et CPA3 dans leurs granules. Ces mastocytes avaient aussi une expression protéique réduite de la protéase mMCP-6 alors que les gènes codant les quatre protéases étaient encore hautement transcrits^{89,90}. L'accumulation de données sur ce sujet montrera que les protéoglycanes contenant de l'héparine jouent un rôle post-transcriptionnel important en contrôlant spécifiquement l'expression de certaines protéases neutres au sein des mastocytes^{46,51}.

A l'intérieur des complexes macromoléculaires protéoglycanes/protéase, mMCP-6 et mMCP-7 peuvent former spontanément des homo ou des hétérotétramères protéiques qui sont enzymatiquement très actifs (contrairement à mMCP-5 et à MC-CPA qui sont retrouvés sous forme de monomères)⁹¹ (**Figure 4**). Une fois exocytés, les complexes restent stables pendant plusieurs heures dans la matrice extracellulaire. L'héparine contenue dans ces complexes leur confère une charge négative importante. Il est d'ailleurs possible de visualiser en temps réel par microscopie confocale l'exocytose des granules à la surface des mastocytes par ajout d'avidine (chargée positivement) couplée à un fluorochrome dans le milieu de culture (technique développée au sein du laboratoire).

Bien que les protéases soient enzymatiquement actives lorsqu'elles sont en complexe avec les protéoglycanes, certaines d'entre elles peuvent se dissocier après exocytose. Il a été montré que mMCP-6 et mMCP-7 sont exocytées dans la matrice extracellulaire toujours associées ioniquement aux protéoglycanes. Le domaine de liaison au protéoglycane de mMCP-6, riche en lysine et arginine (*idem* pour mMCP-5 et CPA3)⁴⁶, lui permet de rester étroitement associée aux protéoglycanes de longues heures après exocytose, elle exerce ainsi une activité protéase localisée⁹² (**Figure 4**). Le domaine de liaison aux protéoglycanes de mMCP-7 est lui riche en histidine⁸⁷. A l'intérieur des granules, l'histidine est chargée positivement à pH 5.5, mais contrairement à l'arginine et à la lysine, elle perd ses charges positives lorsqu'elle est exposée au pH neutre de la matrice extracellulaire⁹² (**Figure 4**). Cela

permet donc après exocytose des granules, une dissociation sélective de mMCP-7, qui peut à ce moment là être véhiculée dans le sang et jouer un rôle systémique.

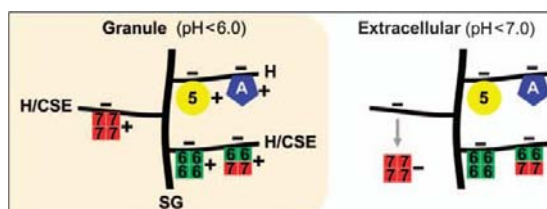


Figure 4. Complexes protéoglycane/protéases à l'intérieur ou à l'extérieur du mastocyte.
 Héparine (H), chondroïtine sulfate E (CSE), mMCP-5 (jaune), mMCP-6 (vert), mMCP-7 (rouge), MC-CPA (bleue)
 Stevens *et al.*⁴⁶

Les mastocytes sont une source de nombreuses cytokines, certaines d'entre elles comme le *tumor necrosis factor* (TNF) et le *fibroblast growth factor* (FGF) sont associées aux granules^{51,93,94}. Des études récentes menées par l'équipe de Soman N. Abraham démontrent que le TNF empaqueté dans les granules est protégé de l'action des protéases extracellulaires. De plus, ce mode de confinement permet une libération progressive au cours du temps des molécules de TNF permettant d'augmenter considérablement à la fois sa biodisponibilité et son efficacité⁹⁵. Cette équipe a confirmé ces résultats en créant des granules synthétiques formées par l'agrégation, à pH acide, de molécules d'héparine chargées négativement et de chitosan chargé positivement⁸⁵ (**Figure 5**). Elle a d'ailleurs confirmé que l'ajout de TNF lors de l'assemblage, permet son incorporation dans les granules synthétiques, ce qui le préserve de l'action de protéase tout en le libérant progressivement dans le milieu pour une meilleure efficacité. Ce TNF « particulière » a aussi prouvé son efficacité en tant qu'adjuvant. En effet co-injecté avec un Ag, il permet une bonne protection lors de la vaccination de modèles murins⁸⁵. Il semblerait que d'autres cytokines puissent se trouver stockées au sein des granules, c'est le cas de l'IL-17 et de RANTES (résultats non publiés obtenus dans le laboratoire).

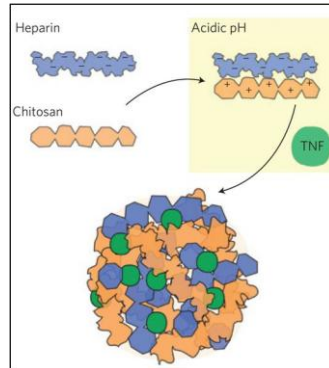


Figure 5. Particules synthétiques.
Ashley et al.⁸⁵

Toutes ces études nous éclairent sur le rôle et l'architecture des granules contenus dans le cytoplasme des mastocytes. Ils sont formés lors d'un assemblage anionique complexe et jouent un rôle physiologique important dans la régulation de l'activité des molécules qu'ils transportent.

1-3 Le développement des mastocytes.

a. Le « *stem cell factor* » et son récepteur KIT.

Il a souvent été observé que les progéniteurs de mastocytes murins ou humains proliféraient et se différenciaient en mastocytes lorsqu'ils étaient en présence d'une monocouche de cellules de peau embryonnaire ou de fibroblastes 3T3 murins^{24,27,96,97}. Ces observations ont mené à l'identification de locus régulant le développement des mastocytes. Ce fut alors la découverte du locus *W* codant pour un récepteur tyrosine kinase de type III appelé KIT (SCFR ou CD117)^{98,99} et du locus *Sl* codant pour son ligand le *stem cell factor* (SCF ou KIT ligand)^{100,101,102}.

Le SCF est facteur de croissance produit par de nombreuses cellules telles que les fibroblastes, les cellules stromales, les cellules épithéliales ou encore les cellules endothéliales. Il joue un rôle important dans l'hématopoïèse, la spermatogénèse et la mélanogénèse. On le retrouve *in vivo* sous forme soluble ou transmembranaire, ces deux conformations fournissant des signaux de croissance différents mais complémentaires¹⁰³. Le SCF est aussi le principal facteur de croissance des mastocytes que ce soit *in vitro*^{104,105,106,107,108,109} ou *in vivo*¹². En se fixant sous forme de dimère sur son récepteur, le SCF

induit sa dimérisation permettant ainsi l'autophosphorylation de sa queue cytoplasmique. S'en suit le recrutement de molécules cytosoliques adaptatrices telles que la phospholipase C γ , les kinases de la famille de SRC, le GRB2 (*growth-factor-receptor-bound protein 2*) ou encore la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) qui permettront l'activation des voies JAK-STAT (*janus kinase-signal transducer and activator of transcription*) et MAPK (*mitogen-activated protéine kinase*). Ces deux dernières voies de signalisation favoriseront la croissance, la différenciation ainsi que la survie des mastocytes stimulés au SCF^{23,110,111} (Figure 6 et Tableau 1).

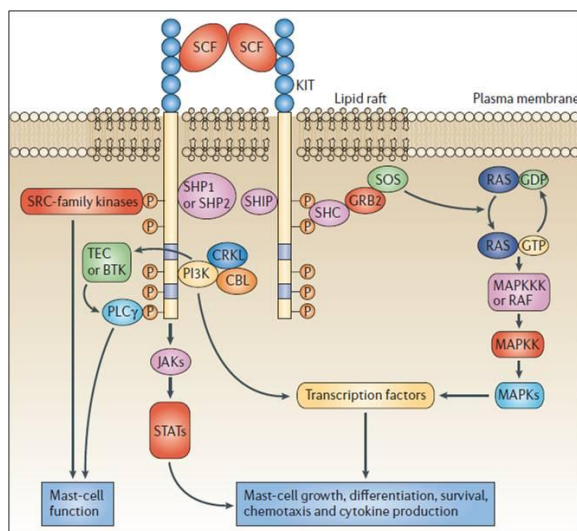


Figure 6. La signalisation du récepteur au SCF (KIT).

Gilfillan *et al.*¹¹⁰

L'expression du récepteur KIT est primordiale pour le développement des mastocytes, en effet il est impossible de détecter la présence de mastocytes dans les souris déficientes pour ce récepteur (cf chapitre 1-4 b). Il en est de même pour les diverses molécules de signalisation qui sont requises pour un développement mastocytaire normal et homogène dans les divers tissus. En effet, de nombreuses études ont reporté que des souris génétiquement modifiées, ayant un défaut d'activation de la voie de la PI3K ou de la voie JAK-STAT, avaient un développement mastocytaire anormal. La PI3K de classe I_A est un hétéromère constitué de deux sortes de sous unités aux propriétés différentes : les sous unités catalytiques (p110 α , p110 β et p110 δ) et les sous unités régulatrices (p85 α , p85 β et

p55 γ)^{112,113}. Ainsi, des souris dépourvues de p85 α ¹¹⁴ ou des souris exprimant des formes inactives de p110 δ ¹¹⁵ ou encore qui possèdent une mutation dans le domaine de liaison de KIT à p85 α ^{116,117} ne développent aucun mastocyte dans la muqueuse gastro-intestinale mais ont un nombre normal de mastocytes cutanés¹¹⁸. Il en est de même pour la voie JAK-STAT, les souris STAT5^{-/-} n'ont pas de mastocyte dans la peau, l'estomac ou la rate, elles possèdent seulement quelques mastocytes dans la cavité péritonéale¹¹⁹.

A l'inverse, une trop forte activation de la signalisation due à une mutation du récepteur KIT a été détectée chez des patients souffrant de mastocytose. Chez ces personnes, la mutation D816V est la plus fréquente et se traduit par une autophosphorylation constitutive du récepteur KIT, indépendante de la présence de son ligand. Les conséquences sont souvent dramatiques, il y a une accumulation massive de mastocytes dans de multiples organes associée à un « relargage » continu de médiateurs mastocytaires¹²⁰.

Ces données ici rassemblées suggèrent fortement qu'une régulation fine de l'activation du récepteur KIT par son ligand est absolument nécessaire au développement, à la localisation, mais aussi à l'activation raisonnée des mastocytes humains et murins.

b. Les autres facteurs de différenciation mastocytaire.

Bien que nécessaire, le SCF n'est pas le seul facteur de différenciation des mastocytes. Diverses cytokines, souvent produites par les lymphocytes T, agissent en synergie pour « aiguiller » la prolifération et la différenciation des MCP en mastocytes pleinement matures.

L'interleukine 4.

L'IL-4 est une cytokine de type T_H2 impliquée dans la biologie du mastocyte. Chez la souris l'IL-4 agit en synergie avec l'IL-3 pour faciliter la différenciation en mastocytes et permettre l'aiguillage de la population vers un profil de type tissu connectifs^{121,122}. Chez l'homme, l'effet de l'IL-4 a uniquement été étudié *in vitro*. Il dépend du stade de différenciation des mastocytes. Il a été démontré qu'ajoutée en début de culture, l'IL-4 inhibe la croissance et la différenciation de mastocytes à partir de progéniteurs cellulaires de foie fœtal^{123,124}. En 2005, il a été confirmé par l'équipe de Dean Metcalfe que l'IL-4 inhibait la différenciation en réduisant l'expression du récepteur KIT sur des progéniteurs CD34⁺ de sang périphériques¹²⁵. Par contre, l'ajout d'IL-4 dans une culture de mastocytes déjà matures (provenant de sang

de cordons ou de sang périphérique) ou de mastocytes purifiés *ex vivo* à partir de tissus intestinaux a un effet positif. Elle induit non seulement la prolifération des mastocytes matures, mais augmente aussi l'expression du récepteur FcεRI les rendant plus sensible à la dégranulation^{39,125,126} (**Tableau 1**).

L'interleukine 3.

Lorsqu'elle est seule, l'IL-3 est une cytokine qui permet le développement de mastocytes murins, mais si elle est associée au SCF à la fois le développement et la maturation sont potentialisés (**Tableau 1**). Il a également été rapporté que l'IL-3 stimulait la prolifération et la survie de mastocytes de souris de type tissu connectif *in vitro*^{27,122,127,128}. L'équipe de Stephen Galli a observé que des souris déficientes en IL-3 développaient quand même des mastocytes, mais leur nombre était considérablement réduit. Par contre, dans ces mêmes expériences, le développement de BMDC *in vitro* à partir de précurseur de moelle osseuse provenant de ces souris n'est pas altéré¹²⁹. Ces données indiquent clairement que l'IL-3 exogène augmente le développement des mastocytes *in vivo* et *in vitro*. Chez la souris, les modèles d'études BMDC et PCMC n'ont pas les mêmes besoins en IL-3 (cf chapitre 1-1 b). Dans ces deux modèles, les mastocytes proviennent donc de MCP qui n'ont pas besoin des mêmes facteurs pour proliférer. Ils viennent par conséquent soit de MCP distincts, soit de même MCP mais à un stade de maturité différent. Envisageant les deux possibilités, il est tentant de spéculer que l'IL-3 pourrait être, soit nécessaire à la prolifération d'une certaine population de MCP, soit nécessaire à un stade bien précis de la différenciation des MCP. En effet, on ne sait pas encore s'il existe plusieurs stades de différenciations des MCP (cf chapitre 1-3 c) comme il est décrit pour d'autres populations cellulaires telles que les lymphocytes B ou T.

Chez l'homme, le rôle de l'IL-3 est encore discuté. Dans le modèle PBMC seulement, l'IL-3 est nécessaire dans la première semaine de culture (cf chapitre 1-1 b). Ici encore, l'IL-3 ne joue un rôle sur les MCP qu'à un stade bien précis correspondant au tout début de la longue période de culture qui est nécessaire à la génération de lignées mastocytes primaires humains (**Tableau 1**).

L'interleukine 6.

L'IL-6 est une cytokine qui agit différemment chez l'homme et chez la souris. Dans les modèles murins l'action de cette cytokine n'est pas beaucoup documentée. Cela dit elle n'est pas requise pour la croissance des mastocytes, mais ajoutée à la culture elle peut favoriser leur développement^{130,131}. Par contre, l'IL-6 est un facteur nécessaire à la culture et au développement des différents modèles de mastocytes humains (cf chapitre 1-1 b) (**Tableau 1**).

L'interleukine 9.

L'IL-9 est impliquée dans les réactions inflammatoires de type T_H2¹³². Des études *in vivo* ont démontré que l'IL-9 régule le recrutement et l'état d'activation de mastocytes au sein de différents organes tels que les poumons, l'intestin ou encore les ganglions drainant les reins^{132,133,134,135}. Des systèmes de surexpression dans des souris transgéniques ont prouvé qu'une quantité anormalement haute d'IL-9 dans un tissu peut provoquer une prolifération anarchique des mastocytes, semblable à une mastocytose^{134,136,137} (**Tableau 1**). En ce qui concerne la fonctionnalité des mastocytes *in vivo*, l'IL-9 active les mastocytes notamment en favorisant la sécrétion d'histamine, d'IL-6, du facteur pro-angiogénique VEGF (*vascular endothelial growth factor*) et l'expression du récepteur FcεRI^{138,139}.

Chez l'homme, l'IL-9 semble avoir des effets similaires à ceux observés *in vivo* chez la souris dans les études précédentes. Il a été observé que des mastocytes humains, dérivés de MCP CD34⁺ de sang de cordons, prolifèrent et se différencient plus efficacement en mastocytes matures sous l'action du SCF en synergie avec l'IL-9 (**Tableau 1**). Enfin, ces mêmes études ont montré que des MCP provenant de patients souffrant d'asthme sévère répondent beaucoup mieux à l'IL-9 que ceux provenant de donneurs sains¹⁴⁰. Ces données tendent à indiquer que chez l'homme aussi, l'IL-9 agit sur la différenciation et la maturation des mastocytes et pourrait être impliquée dans les pathologies associées aux T_H2.

Le nerve growth factor.

Le *nerve growth factor* (NGF) est un facteur impliqué dans la régulation de la neurogénèse. Il a été observé que le NGF pouvait influencer la culture et la biologie des mastocytes. En effet, il est connu pour stimuler la prolifération de BMMC murins en présence d'IL-3 tout en orientant la culture vers un phénotype proche de celui des tissus connectifs¹⁴¹. Chez

l'homme l'effet du NGF est encore mal connu. Deux équipes qui étudient l'effet de cytokines sur la différenciation des mastocytes, à partir toutes les deux de MCP de sang de cordons, se contredisent. Les travaux de Yanagida *et al.* démontrent que le NGF n'a aucun effet sur la différenciation et la prolifération de mastocytes humains⁴¹, alors que ceux de Welker *et al.* clament le contraire¹⁴². Cependant, il a été observé que le NGF en agissant en synergie avec le SCF pouvait promouvoir une activité anti-apoptotique sur la culture¹⁴³ (**Tableau 1**). Enfin, une étude récente a révélé que la tryptase sécrétée dans les tissus contribuait au clivage du pro-NGF en NGF, le rendant ainsi assimilable par les mastocytes et par les cellules avoisinantes¹⁴⁴. Il n'est donc pas à exclure que le NGF ainsi rendu biologiquement actif, joue un rôle *in vivo* sur les mastocytes tissulaires.

Facteur	Source	Récepteur	Voie de signalisation induite	Effet biologique chez la souris	Effet biologique chez l'Homme
SCF	Fibroblastes, cellules stromales, endothéliales et épithéliales	KIT (SCFR ou CD117)	PI3K, JAK-STAT5 et MAPK	Prolifération, différenciation et survie	Prolifération, différenciation et survie
IL-4	Lymphocytes T _H , basophiles, éosinophiles, mastocytes...	IL-4R α associé à γ c ou IL-13R α 1	JAK-STAT6, PI3K, ERK1/2	Couplée au SCF : différenciation vers le type CTMC	Couplée au SCF : prolifération et expression du Fc ϵ RI
IL-3	Lymphocytes T _H , cellules stromales et mastocytes	Chaîne IL-3R α et β	JAK-STAT5, PI3K, ERK1/2	Prolifération, différenciation et survie	Couplée au SCF : prolifération des progéniteurs
IL-6	Lymphocytes T _H , basophiles, mastocytes et macrophages	IL-6R associé à la GP130	JAK-STAT3, PI3K, ERK1/2	Couplée au SCF : favorise le développement	Couplée au SCF : prolifération, différenciation et survie
IL-9	Lymphocytes T _H	IL-9R α associé à γ c	JAK-STAT5, PI3K, ERK1/2	Recrutement de progéniteurs, activation et prolifération	Couplée au SCF : prolifération et maturation
NGF	Ter. nerveuses, mastocytes, éosinophiles, macrophages...	LNGFR et TrkA	PI3K, ERK1/2, MAPK	Couplée à l'IL-3 : différenciation vers le type CTMC	Couplée au SCF : favorise la survie

Tableau 1. Effet de différents facteurs sur les mastocytes.

c. Les progéniteurs de mastocytes.

L'origine des mastocytes est longtemps restée inconnue et fut l'objet de nombreuses hypothèses au sein de la communauté scientifique. Les premiers travaux sur le sujet ont suggéré qu'ils pouvaient provenir de la différenciation d'autres cellules telles que des fibroblastes ou bien des cellules du système immunitaire. En effet, le virologue australien Frank Macfarlane Burnet émit l'hypothèse inédite d'une différenciation de mastocytes à partir d'une population de lymphocytes T¹⁴⁵. Plus tard, l'immunologiste allemande Beate Czarnetzki proposera que les mastocytes dérivent directement de populations phagocytaires mononucléaires¹⁴⁶. Mais il faudra attendre les travaux de Yukihiro Kitamura et de ses collaborateurs pour qu'un véritable consensus soit établi sur l'origine des mastocytes au sein de la communauté scientifique. Ils ont démontré *in vivo*, que les mastocytes proviennent de cellules hématopoïétiques pluripotentes^{23,147,148,149}. Ils ont injecté des cellules de moelle osseuse provenant d'une souris sauvage C57/Bl6^{+/+} dans une souris mutante C57/Bl6^{W/W^v} (dépourvue de mastocytes, cf chapitre 1-4) et ont observé dans cette dernière le développement d'une population exprimant toutes les caractéristiques de mastocytes. De plus, des expériences d'injections de cellules pluripotentes, provenant d'unités formant des colonies (UFC) dans la peau de souris C57/Bl6^{W/W^v}, leur ont permis d'affirmer que les mastocytes proviennent bien de progéniteurs différents de ceux destinés à la différenciation en neutrophiles, macrophages ou érythrocytes^{23,150}.

Grâce aux nombreux travaux réalisés sur ce sujet, il est maintenant clairement établi que les mastocytes quittent la moelle osseuse sous forme de progéniteurs immatures (les MCP pour *mast cell-committed progenitor* en anglais) puis migrent vers les tissus connectifs et muqueux où ils achèvent leur maturation^{23,151}. Le facteur de transcription MIF (*Microphthalmia-associated transcription factor*), qui est exprimé à la fois par les MCP et par les tissus environnants, joue un rôle clé dans ce processus. Les travaux de Morii *et al.* ont démontré que les souris transgéniques MIF^{-/-} ont de grands défauts de développement, de maturation et de survie de mastocytes *in vivo*¹⁵². Lors de leur migration, l'expression différentielle d'intégrines et de récepteurs de chimiokines influence la migration des MCP. Par exemple, il est bien établi que l'expression de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ et du récepteur CXCR2 par les MCP est nécessaire pour leur migration au sein de la muqueuse intestinale. Dans un tout autre contexte, l'expression concomitante des intégrines $\alpha 4\beta 7$ et $\alpha 4\beta 1$ par les MCP est

quand à elle requise pour la migration des MCP dans la muqueuse pulmonaire en conditions inflammatoires¹⁵³.

Les travaux de Chen *et al.* publiés en 2005 dans le journal PNAS ont proposé que des MCP présents dans la moelle osseuse de souris adultes provenaient de progéniteurs myéloïdes multipotents (MMP pour *multipotent myeloïd progenitors*) et harboiraient le phénotype suivant : $Lyn^{-}c-kit^{+}Sca-1^{-}Ly6c^{-}Fc\epsilon RI\alpha^{-}CD27^{-}\beta 7^{+}T1/ST2^{+154}$. Ces MCP ne possèdent pas de granule basophile, ni le récepteur de haute affinité aux IgE ($Fc\epsilon RI\alpha^{-}$), excluant donc selon les auteurs une possible différenciation en mastocytes à partir de basophiles. De plus ces travaux identifient les MCP comme des progéniteurs différents des progéniteurs myéloïdes (CMP pour *common myeloïd progenitor*) ou des progéniteurs lymphoïdes (CLP pour *common lymphoid progenitor*) qui eux se différencient respectivement en cellules de la lignée myéloïde ou de la lignée lymphoïde^{111,151,155}. Cependant, d'autres études menées par Arinobu *et al.* et Jamur *et al.* laissent relativement floues les limites entre les MCP et les autres progéniteurs hématopoïétiques^{156,157}. Les travaux de Arinobu *et al.* proposent même l'existence d'un progéniteur bipotent commun aux mastocytes et aux basophiles appelé BMCP (*basophil mast cell progenitor*)^{111,156} (**Figure 7**). Les différences entre ces deux modèles peuvent s'expliquer notamment par les disparités qui existent entre les différents organes (rate, muqueuse intestinale ou moelle osseuse de souris), les marqueurs cellulaires et les modèles d'animaux utilisés.

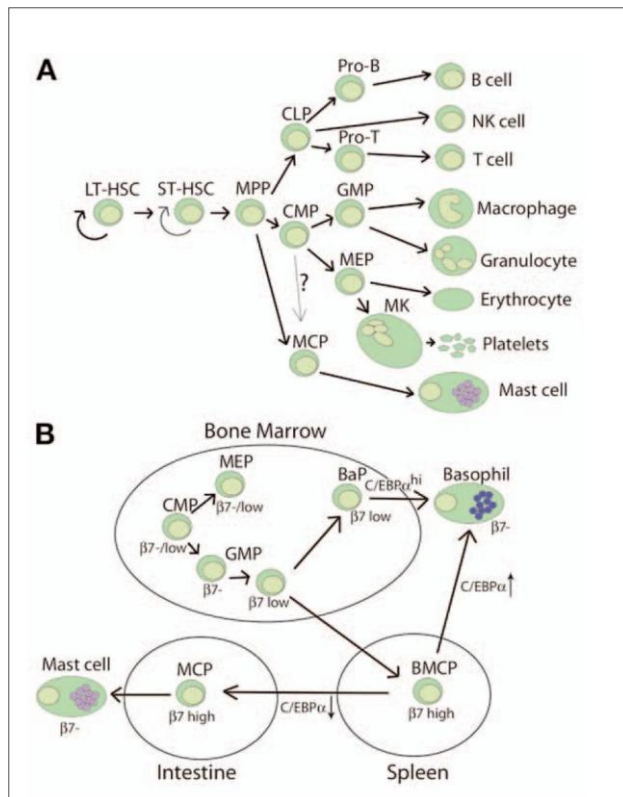


Figure 7. Les deux modèles de différenciation mastocytaire.
 A. Le modèle défendu par Chen *et al.* les MCP dérivent directement des MPP. B. Le modèle défendu par Arinobu *et al.* les MCP proviennent des BMCP, des progéniteurs communs pour les mastocytes et les basophiles. Okayama *et al.*¹¹¹

Chez l’homme beaucoup moins de travaux ont été réalisés, néanmoins nous savons à présent que les mastocytes se différencient aussi à partir de progéniteurs cellulaires provenant de cellules hématopoïétiques pluripotentes de la moelle osseuse¹⁵⁸. Ce sont des cellules mononuclées qui circulent dans le sang périphérique avec le phénotype suivant : $CD13^+CD33^+CD38^+CD34^+KIT^{+37,159}$. Tout comme leur homologue murin, ces MCP ne possèdent ni granule sécrétoire, ni de $Fc\epsilon R1\alpha$.

1-4 Les modèles d’études des mastocytes.

Il est possible de dériver des mastocytes à partir de précurseurs présents dans différents tissus hématopoïétiques, ce sont alors de bons outils pour étudier en détail comment les mastocytes pourraient influencer les réponses biologiques *in vitro* (cf chapitre 1-1 b).

Cependant, leurs fonctions et leurs phénotypes sont dépendants du tissu dans lequel ils se trouvent. Pour prendre en compte l'influence et l'impact de ce microenvironnement, les études *in vivo* chez la souris se sont rapidement imposées.

a. Les approches pharmacologiques.

Les approches pharmacologiques ou les approches basées sur l'utilisation d'anticorps, pour « dépler » les mastocytes ou neutraliser leurs médiateurs, peuvent fournir de précieuses informations. Cependant, ces approches sont limitées par la spécificité de la drogue ou de l'anticorps choisi. Les antihistaminiques par exemple bloquent l'action de l'histamine, mais personne ne peut affirmer que cette dernière ait été sécrétée par les mastocytes. Les anticorps neutralisant le SCF¹⁶⁰ ou bloquant son récepteur KIT^{161,162} peuvent induire une déplétion de plus de 90% des mastocytes *in vivo*, mais peuvent aussi influencer les autres types cellulaires qui expriment le récepteur KIT. Le cromoglycate de sodium est un « stabilisateur de membrane » (utilisé en clinique humaine), il est connu pour inhiber la dégranulation des mastocytes dans des modèles pathologiques *in vivo*¹⁶³. Néanmoins, les populations cellulaires cibles sur lesquelles cette drogue agit ne sont pas restreintes aux mastocytes, car elle influence aussi la fonction d'autres cellules comme les granulocytes et les lymphocytes B^{151,164}.

b. L'utilisation de modèles murins.

Le ciblage de médiateurs produits par les mastocytes.

Il est possible d'étudier le rôle de médiateurs « exclusivement » produits par les mastocytes en utilisant tout simplement des souris dont le gène codant pour le médiateur a été invalidé. Cependant, il faut s'assurer que le développement des mastocytes n'est pas dépendant de ce médiateur ou bien que l'expression de ce dernier n'influence pas l'expression d'autres substances produites par le mastocyte. Si et seulement si toutes ces conditions sont réunies, alors il est possible de tirer des conclusions sur le rôle de tel ou tel médiateur produit par les mastocytes *in vivo*. C'est le cas par exemple pour les souris mMCP-1^{-/-165}, les souris mMCP-4^{-/-166} ou encore les souris mMCP-6^{-/-61}.

Le ciblage du gène codant le SCF ou son récepteur KIT.

Les souris dépourvues de mastocytes ont été énormément utilisées pour étudier la fonction des mastocytes *in vivo*. Modifier le gène codant le SCF ou son récepteur pour obtenir une souche dépourvue de mastocyte n'est pas chose facile, car le SCF n'agit pas exclusivement sur les mastocytes, il est nécessaire à de nombreux autres types cellulaires.

Les souris Kit^{Sl/Sl-d} ont une mutation (Sl-d pour *steel-dickie*) dans le locus *steel* (Sl) qui code pour le SCF situé sur le chromosome 10. Ces souris ont une délétion de la partie transmembranaire du SCF et n'expriment donc que du SCF soluble¹⁰⁸. Elles sont dépourvues de mastocytes et ont un phénotype altéré : elles n'ont pas de cellules germinales, ni de mélanocytes, ni de cellules interstitielles de Cajal et développent une anémie sévère. Il est néanmoins possible de restaurer une population mastocytaire en injectant dans l'animal du SCF^{167,168}.

Les souris Kit^{W/W-v} ont une délétion (W-v pour *W-viable*) dans le locus *white spotting* (W) qui code le récepteur KIT situé sur le chromosome 5. Il en résulte une mutation dans la partie tyrosine kinase du récepteur impliquée dans sa signalisation⁹⁸. Elles sont déficientes en mastocytes et partagent les lacunes de la souris Kit^{Sl/Sl-d}, avec en addition une carence sévère en neutrophiles médullaires et sanguins^{151,167,168,169}.

Les souris Kit^{W/W-sh} n'ont pas une délétion mais une inversion (W-sh pour *w-sash*) dans le locus *W*. Cette modification perturbe les éléments de régulation du récepteur KIT allant jusqu'à réduire fortement son expression. Ces souris ne sont ni anémiques, ni stériles et ont un nombre relativement normal de neutrophiles médullaires et sanguins, cependant elles ont un nombre réduit de mélanocytes^{151,167,168,170}. Parce qu'elles ont un phénotype moins altéré, qu'elles sont fertiles et que leur fond génétique est de souche commune C57Bl6, ces souris déficientes en mastocytes sont le modèle le plus utilisé pour les études *in vivo*.

Le ciblage de la région promotrice du gène Mcpt5.

Récemment, il a été généré des souris génétiquement modifiées qui permettent une déplétion spécifique des mastocytes, basée sur une modification génétique de la région promotrice de *Mcpt5* et l'utilisation de la recombinaise Cre. Il est maintenant bien connu que le croisement de souris *iDTR* (exprimant le récepteur DTR à la diphtériatoxine A, et ayant la cassette STOP de résistance à la Diphtériatoxine A flanquée de site loxP excisables) avec des souris *Cre* (exprimant la recombinaise Cre sous un promoteur spécifique d'un type cellulaire

précis) résulte en la création d'une souche *Cre-iDTR* dont la population cellulaire exprimant la recombinaise Cre est sensible à la dyphtériatoxine A (DTA)¹⁷¹. Les souris *Mcpt5-Cre* expriment la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur du gène *Mcpt5* uniquement exprimé par les mastocytes¹⁷². Le croisement de ces souris avec une souche *iDTR* permet d'obtenir des souris *Mcpt5-Cre iDTR* dans lesquelles l'injection de DTA induit une délétion spécifique des populations mastocytaires de type CTMC, exprimant normalement la protéase MCP-5. De même que le croisement avec une souche R-DTA (exprimant constitutivement la DTA) induit aussi une déplétion mais cette fois constitutive des ces populations¹⁷³. Ces souris n'ont pas de défauts majeurs dans les autres populations cellulaires, elles semblent être un bon outil d'étude de l'influence des mastocytes des tissus connectifs *in vivo*. Il serait intéressant de développer une souris dans laquelle uniquement les mastocytes muqueux MMC seraient absents, afin d'en étudier leur fonction. Cela est réalisable puisque la Cre est sous le promoteur de la chymase mMCP1 ou 2, elle est sélectivement exprimée dans les MMC¹⁷⁴. Il suffirait alors de croiser cette souris avec une souris *iDTR* ou R-DTA¹⁶⁸.

Le ciblage du locus codant le gène *Cpa3*.

Le gène *Cpa3*, qui code la carboxypeptidase CPA3, est considéré comme un gène propre au mastocyte⁷⁴, il est exprimé très tôt dans le lignage au niveau du stade de MCP¹⁷⁵. Feyerabend *et al.* ont généré des souris *Cpa3-Cre* en insérant par recombinaison homologue la recombinaise Cre dans le premier exon du gène *Cpa3*. Mais au lieu de détecter la présence de la recombinaise dans les mastocytes, ils ont constaté une absence complète de CTMC et de MMC. Cette déplétion semble être due à un mécanisme génotoxique induit par l'insertion de la recombinaise et impliquant entre autre la protéine p53¹⁷⁶. Dans ces souris, les autres cellules du système immunitaire ne semblent pas être affectées à l'exception des basophiles qui voient leur nombre considérablement réduit (en effet les basophiles expriment aussi CPA3 bien que faiblement¹⁷⁷).

Enfin, les souris *Cpa3-Cre Mcl-1^{fl/fl}* sont une variation du système précédent dans lequel le facteur anti-apoptotique *Mcl-1* « floxé » est délété dans les mastocytes et basophiles exprimant la recombinaise Cre. Dans ces souris, il n'y a donc plus de mastocytes CTMC ni MMC et environ 80% des basophiles sont absents.

La reconstitution des souris déficientes en mastocytes : les souris MC knock-in.

Comme décrit ci-dessus, les souris déficientes en mastocytes ne sont pas de parfaits modèles d'étude. Les différences de réponses observées par rapport à une souris sauvage peuvent être dues à l'effet de la mutation sur d'autres populations cellulaires, c'est pourquoi il est nécessaire de réellement prouver l'implication des mastocytes. Pour cela, il est possible d'injecter en intraveineuse, en intrapéritonéal ou en intradermal des mastocytes dérivés de moelle osseuse BMMC, provenant d'une souris congénique (sauvage ou transgénique) : ce sont les souris MC *knock-in*^{29,151,167,168}. Après le transfert adoptif, les BMMC pourront acquérir les caractéristiques phénotypiques relatives aux populations mastocytaires retrouvées dans des souris sauvages congéniques. Dans certains sites anatomiques notamment comme la peau et la cavité péritonéale, les mastocytes injectés vont avoir une distribution qui ressemble fortement aux populations résidentes d'une souris sauvage^{29,151,178}. Néanmoins ces modèles expérimentaux ont leurs limites, en effet dans d'autres sites tels que le tractus respiratoire, la trachée ou encore le système nerveux central, la distribution des mastocytes et leur nombre dans des souris *knock-in* n'est pas du tout identique à celui des populations mastocytaires normalement résidentes^{179,180}. Enfin, des études ont montré que l'injection de mastocytes matures (provenant du péritoine) dans un nouveau site anatomique ne changeait rien à leur phénotype, ils n'acquièrent pas les caractéristiques des mastocytes normalement résidents (comme par exemple l'expression de protéases particulières)^{151,181,182}.

2- L'activation des mastocytes et la réponse inflammatoire.

Les mastocytes ont été traditionnellement étudiés en tant que cellules effectrices dans les maladies allergiques. Au sein des tissus, ils sont le plus souvent retrouvés autour de terminaisons nerveuses et de vaisseaux sanguins avec lesquels ils interagissent. Enfin, leur présence dans des endroits stratégiques de l'organisme tels que la peau ou les muqueuses, font de ces cellules de redoutables sentinelles impliquées dans la reconnaissance et l'élimination de multiples pathogènes.

2-1 L'interaction directe entre les mastocytes et les pathogènes.

a. Les récepteurs *toll-like*.

Les récepteurs *toll-like* (TLR) sont des récepteurs appartenant à la grande famille des *pattern recognition receptors* (PRR) qui jouent un rôle fondamental dans la reconnaissance des pathogènes pénétrant l'organisme. Ils fonctionnent généralement en complexes multimoléculaires qui consistent en la formation d'homo- ou d'hétérodimères de TLR quelque fois associés à des corécepteurs et autres molécules adaptatrices¹⁸³. L'expression des TLR par les mastocytes dépend fortement du modèle mais aussi de l'espèce étudiée et semble être influencé par le microenvironnement. Des études menées sur des cellules murines ont démontré que les mastocytes pouvaient potentiellement posséder les ARN codant tous les TLR, à l'exception du TLR5 qui reste controversé^{15,184,185,186}. Chez l'homme, les mastocytes expriment aussi la majorité des ARN codant les TLR à l'exception du TLR8 qui n'a été détecté qu'au sein de lignées tumorales hMC1 ou LAD2^{186,187}. Il semble y avoir chez l'homme une expression différentielle des TLR dans les mastocytes en fonction du site anatomique dans lequel ils se trouvent. Ainsi le TLR9 est plus exprimé par les mastocytes de la peau et le TLR7 par ceux des poumons¹⁸⁸. Bien que l'on ait étudié l'expression de certains TLR sur les populations mastocytaires, peu d'études se sont penchées sur leur rôle fonctionnel.

L'activation du TLR4.

L'activation du TLR4 sur la biologie des mastocytes a fait l'objet de nombreuses études dans la lutte contre les infections bactériennes. La molécule la plus utilisée pour stimuler le TLR4

est le lipopolysaccharide (LPS) présent sur les bactéries GRAM⁻. Après la fixation de son ligand, le TLR4 forme un homodimère qui active la sécrétion de diverses cytokines par le mastocyte sans pour autant provoquer de dégranulation^{184,185,189,190,191}, puisqu'il n'induit aucun flux calcique intracellulaire¹⁹⁰.

Plusieurs travaux ayant étudié l'impact de l'activation du TLR4 sur le répertoire de cytokines produites par le mastocyte sont contradictoires. D'une part, il a été rapporté que le LPS induit l'activation du facteur de transcription NF- κ B^{184,190,191,192} et de nombreux gènes codants des cytokines et chimiokines inflammatoires. Des BMMC stimulés avec du LPS produisent de l'IL-6, IL-13, IL-1 β et du TNF- α ^{184,185,191,193} mais aussi des chimiokines telles que MIP-1 α et MIP-2 (IL-8 chez l'homme)^{185,193}. *In vivo* la reconstitution de souris KIT^{W/W-v} avec des BMMC TLR4^{-/-} ou TLR4^{+/+} a permis de mettre en évidence le rôle primordial de la stimulation des mastocytes *via* le TLR4, lors d'infections à entérobactéries^{184,191}.

D'autre part, des études ont montré que la liaison du LPS sur le TLR4 pouvait induire la voie des protéines kinases MAPK/p38 et les facteurs de transcription GATA-1 et GATA-2 qui permettent la sécrétion de cytokines de type T_H2 telles que l'IL-5, l'IL-10 et l'IL-13^{192,194}. *In vivo*, dans un modèle d'asthme induit à l'OVA-LPS, les travaux de Nigo *et al.* démontrent que le TLR4 des mastocytes est important pour le recrutement des éosinophiles dans la muqueuse pulmonaire et contribue donc à l'exacerbation de la pathologie¹⁹² (**Tableau 2** et **Figure 8**).

L'activation du TLR2.

Les principaux ligands du TLR2 sont le peptidoglycane (PGN) et l'acide lipotéichoïque (LTA) présents sur les bactéries GRAM⁺, comme le *staphylococcus aureus* et le zymosan qui est un polysaccharide retrouvé chez la levure telle que *saccharomyces cerevisiae*¹⁹⁵. Le TLR2 est présent sous forme homodimérique, mais aussi sous forme hétérodimérique alors associé avec le TLR1 ou le TLR6¹⁹⁵. L'activation du TLR2 dans les BMMC induit la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires tels que le LTC₄, l'IL-6 ou le TNF- α mais aussi de cytokines T_H2 telles que l'IL-4, l'IL-5 ou l'IL-13^{190,191}. Chez l'homme, l'activation de CBMC par différents ligands du TLR2, induit la libération de profils cytokiniques similaires^{196,197}, mais aussi de médiateurs de type T_H2 tels que l'IL-5, l'IL-10 ou l'IL-13¹⁹⁸.

Tandis que des travaux décrivent que l'activation du TLR2 provoque la dégranulation des mastocytes *in vitro* et *in vivo*¹⁹¹, d'autres tendent à affirmer le contraire^{189,190}. Chez

l'homme, le groupe de Jean Marshall a démontré que des CBMC ne dégranulent pas sous l'effet du zymosan, dégranulent très faiblement pour de fortes doses de PGN et dégranulent fortement sous l'action du ligand synthétique le Pam₃Cys (tripalmitoyl Cys-Ser)¹⁹⁷.

Il a été démontré dans un modèle d'infection par *mycobacterium tuberculosis* (MTB), que la stimulation *in vivo* des mastocytes par le TLR2 jouait un rôle dans l'augmentation de la réponse T_H1 et la migration dans les poumons de lymphocytes T CD8 activés, *via* la sécrétion de cytokines inflammatoires¹⁹⁹. Dans ce sens, les travaux de Rocha-de-Souza *et al.* ont démontré que du *staphylococcus aureus* pouvait être internalisé et survivre dans des CBMC humains. Cette infection a pour conséquence la libération de cytokines pro-inflammatoires *via* une stimulation des mastocytes par le TLR2¹⁹⁶ (**Tableau 2** et **Figure 8**).

L'activation du TLR3.

Le TLR3 est un TLR intracellulaire, à l'inverse des TLR2 et 4 il ne reconnaît pas de composants bactériens mais de l'ARN double brin (dsRNA) synthétisé par de nombreux virus. Il est possible d'activer le TLR3 avec un analogue synthétique du dsRNA qui est l'acide polyinosinique-polycytidylique (Poly(I :C))¹⁹⁵. Ainsi, des FSMC murins stimulés au Poly(I :C) peuvent sécréter les chimiokines MIP-1 α , MIP-2 et RANTES, mais aussi les cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- α , le tout sans dégranuler¹⁸⁵. Les travaux de Orinska *et al.* démontrent que des BMMC stimulés au poly(I :C) augmentent la transcription des gènes impliqués dans la lutte antivirale que sont IFN- β , ISG15 et IP10²⁰⁰. Chez l'homme, Kulka *et al.* observent que des mastocytes humains stimulés au poly(I :C) sécrètent de l'IFN- α sans pour autant libérer des cytokines pro-inflammatoires¹⁸⁷. Cette stimulation inhibe aussi l'adhésion des mastocytes humains et de ce fait réduit leur aptitude à dégranuler suite à une stimulation à l'IgE¹⁸⁸. Ces données semblent indiquer que l'activation des mastocytes *via* le TLR3 permet de mettre en place un processus de lutte antivirale, en favorisant les mécanismes qui pourraient être bénéfiques (**Tableau 2** et **Figure 8**).

L'activation du TLR7 et du TLR9.

Le TLR7 et le TLR9 sont deux autres TLR intracellulaires qui reconnaissent respectivement les ARN simples brins (mimé par deux composés synthétiques l'imiquimod/R837 et le R848) et les îlots CpG non-méthylés de l'ADN (mimé par l'ODN CpG)¹⁹⁵. Un faible nombre d'études évoque l'implication de ces deux TLR dans la biologie des mastocytes. Il a été démontré que

la stimulation de FSMC avec du R838 ou de l'ODN CpG stimule (au même titre que le poly(I :C)) la libération des chimiokines MIP-1 α , MIP-2 ou RANTES et des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- α , sans induire de dégranulation¹⁸⁵. Enfin, les travaux de Heib *et al.* démontrent qu'après immunisation transcutanée en utilisant de l'imiquimod pour adjuvant, la sécrétion d'IL-1 β et de TNF- α par les mastocytes est nécessaire pour induire la migration des cellules de Langerhans et de ce fait créer une réponse CD8 spécifique²⁰¹ (**Tableau 2 et Figure 8**).

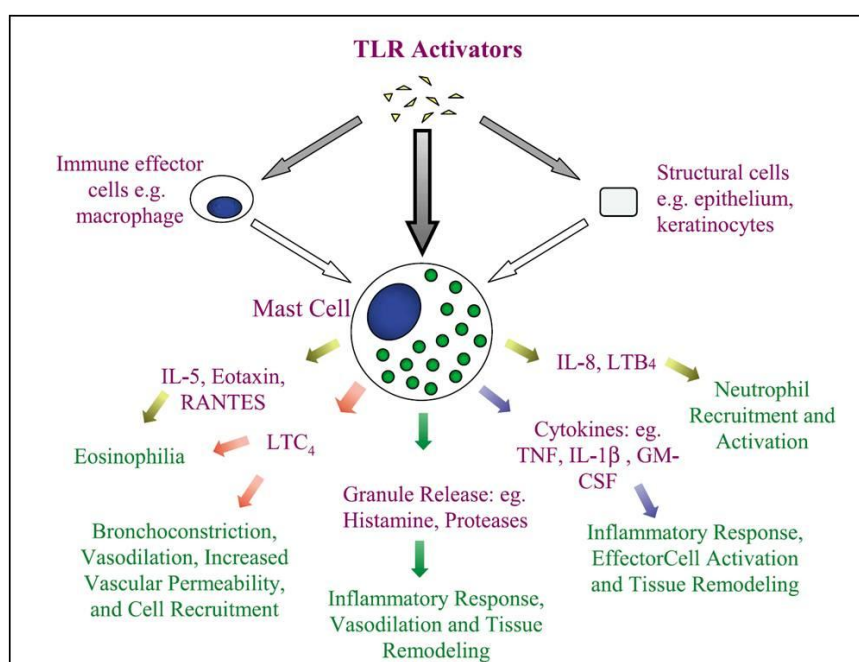


Figure 8. Impact de l'activation des mastocytes par les TLR.

D'après Marshall *et al.*¹⁹⁵

b. Les récepteurs NOD-like.

Au même titre que les récepteurs TLR, les NLR sont censés reconnaître des dérivés microbiens (PAMPs bactériens et viraux) et autres signaux de dangers intracellulaires (ATP, influx ioniques ou espèces réactives de l'oxygène). Par exemple les récepteurs NOD-like (NLR) NOD-1 et NOD-2 reconnaissent des sous-unités du PGN tels que l'acide D-glutamyl-meso-diaminopimélique et le dipeptide muramyl (MDP) respectivement²⁰². Le MDP peut aussi induire l'activation de l'inflammasome contenant un autre NLR, le NLRP3. La résultante

principale de l'activation de ces NLR est l'activation des caspases inflammatoires requises pour la production d'IL-1 β ²⁰².

Utilisés seuls, le MDP et le murabutide (un analogue synthétique du MDP) n'induisent pas la production de cytokines inflammatoires telles que l'IL-6 ou l'IL-1 β par des CBMC humains. Par contre, utilisés en synergie avec du PGN ou du Pam₃Cys provenant de *staphylococcus aureus*, ils augmentent considérablement la production d'IL-6, sans pour autant provoquer de dégranulation²⁰³. Cet article suggère donc un rôle potentiellement bénéfique de l'activation des récepteurs NOD-2 et NLRP3 dans l'activation des mastocytes cutanés, lors d'une infection bactérienne. Cependant il est possible d'envisager qu'une activation non contrôlée de ces récepteurs pourrait avoir un effet délétère, c'est le cas chez les patients souffrant de syndrome périodique associé à la cryopyrine (CAPS). En effet, les patients CAPS souffrent d'urticaire sévère chronique du à l'activation constitutive du récepteur NLRP3, induisant la production continue de la cytokine inflammatoire IL-1 β ²⁰⁴. Les travaux de Nakamura *et al.* identifient les mastocytes comme la principale source d'IL-1 β dans la peau de ces patients. Ils confirment d'ailleurs que le récepteur NLRP3 est nécessaire à la production d'IL-1 β par les mastocytes et que c'est l'activation constitutive de ce dernier dans les mastocytes, qui est responsable des manifestations cliniques d'urticaire sévère observées chez les patients CAPS²⁰⁵ (**Tableau 2**).

c. La protéine CD48.

CD48 est une protéine de la famille CD2 exprimée principalement dans les cellules d'origine hématopoïétique. Elle existe sous deux formes, une forme ancrée à la membrane par un glycosylphosphatidylinositol (GPI) et une autre forme soluble²⁰⁶. CD48 présent à la surface de BMMC peut reconnaître la bactérie E.Coli qui exprime l'adhésine bactérienne FimH. La liaison de FimH sur CD48 induit non seulement la dégranulation des mastocytes, mais aussi la production de TNF- α ²⁰⁷. De plus, les entérobactéries exprimant FimH ont une plus grande propension à la phagocytose et sont plus facilement détruites par les mastocytes par un mécanisme faisant intervenir des anions superoxydes²⁰⁸. Cependant dans certaines conditions, la bactérie peut être endocytée et se retrouver dans un compartiment cavéolaire incapable d'acidification ou de séquestration d'espèce réactive de l'oxygène. Dans ce cas là, le mastocyte constitue un refuge pour la bactérie qui sera à l'origine d'infections récurrentes²⁰⁹.

Les travaux de Munoz *et al.* montrent que, *in vitro*, des mastocytes murins isolés du péritoine peuvent reconnaître *mycobacterium tuberculosis* et l'internaliser *via* la molécule CD48. Cela induit leur dégranulation et la libération de molécules pro-inflammatoires telles que l'histamine, l'IL-6 et le TNF- α ²¹⁰.

Chez l'homme, le CD48 présent sur les mastocytes peut aussi être activé suite à un contact avec *staphylococcus aureus* et il en résulte la production de TNF- α et d'IL-8¹⁹⁶. Tout comme le TLR2, il est possible d'imaginer un rôle pro-inflammatoire de la stimulation du CD48 des mastocytes cutanés, lors d'une dermatite atopique éventuellement causée par une infection à *staphylococcus aureus*.

Les éosinophiles expriment aussi le récepteur de CD48 appelé 2B4²¹¹. L'équipe de Francesca Levi-Schaffer a observé *in vivo* de nombreux contacts entre des éosinophiles et des mastocytes dans des polypes nasaux, des bronches de patients souffrant d'asthme, ainsi que dans des modèles murins de dermatites atopiques²¹². Ils ont démontré *in vitro* que cette interaction *via* CD48/2B4 a un effet anti-apoptotique sur les deux populations et induit la libération de cytokines pro-inflammatoires comme le GM-CSF et le TNF- α ²¹² (**Tableau 2**).

TLR	Ligands	Médiateurs sécrétés	Effets biologiques
TLR4	LPS	IL-6/TNF- α /IL-1- β MIP-1 α /MIP-2(IL-8) IL-5/IL-10/IL-13	Inflammation Antibactérien Asthme allergique
TLR2 associé aux TLR1/6	PGN/LTA Zymosan Pam ₃ Cys	Histamine IL-6/TNF- α /IL-1- β GMCSF/IL-8 IL-5/IL-10/IL-13	Dégranulation Inflammation Antibactérien Pathologies cutanées
TLR3	dsRNA Poly(I:C)	IL-6/TNF- α MIP-1 α /MIP-2/RANTES IFN- α / β	Inhibition de la dégranulation Inflammation Antiviral
TLR7 et TLR9	ssRNA ou Umiquimode et ADN avec CpG non méthylés ou ODN	IL-6/TNF- α /IL-1- β MIP-1 α /MIP-2	Inflammation Antiviral (favorise la réponse CD8)
NOD-1/2 et NLRP3	PAMPs MDP	IL-6/IL-1- β	Potentialise l'effet du TLR2 Inflammation Antibactérien CAPS
CD48	FimH 2B4	Histamine IL-6/TNF- α /IL-1- β GMCSF/IL-8	Dégranulation Inflammation Antibactérien Interaction avec les éosinophiles

Tableau 2. L'activation des mastocytes par les PRR et ses conséquences fonctionnelles.

2-2 L'interaction indirecte entre les mastocytes et les pathogènes *via* le récepteur de haute affinité aux IgE.

Les mastocytes sont phénotypiquement caractérisés par la présence de deux récepteurs majeurs à leur surface, le récepteur au SCF (KIT, précédemment décrit) et le récepteur de haute affinité aux IgE (Fc ϵ RI). Le mécanisme d'activation fonctionnelle des mastocytes le plus étudié est la dégranulation induite par l'activation du récepteur Fc ϵ RI.

a. Le fonctionnement du récepteur FcεRI.

La sensibilisation des mastocytes et l'activation du récepteur FcεRI.

L'interaction spécifique d'un antigène (souvent un allergène ou une protéine parasitaire) avec les IgE déjà liés sur les récepteurs FcεRI, induit l'agrégation des récepteurs et l'initiation d'une importante cascade de signalisation intracellulaire, dont la résultante sera l'exocytose du contenu granulaire cytoplasmique^{110,213,214,215,216,217,218}. Les mastocytes jouent un rôle primordial dans la lutte contre les infections parasitaires. En effet, des études menées avec des souris Kit^{W/W-v} MC *knock-in* décrivent que l'axe IgE/FcεRI sur les mastocytes est fortement impliqué dans l'élimination de pathogènes parasitaires^{219,220,221}, en plus d'autres facteurs inflammatoires tels que l'IL-25, l'IL-33 et TSLP (thymic stromal lymphopoietin)²²².

Les IgE monomériques restent liées et disponibles longtemps sur leur récepteur car leur affinité pour le FcεRI est grande ($10^{10}M^{-1}$) et la dissociation du complexe IgE/FcεRI est lente^{213,214}. Des études ont reporté qu'en absence d'antigène, la fixation de l'IgE seule sur son récepteur a un effet anti-apoptotique (*via* l'activation de BCL_{xL}) et peut favoriser la prolifération des mastocytes de souris (*via* l'activation des voies MAPK et ERK) ainsi que la libération de cytokines comme l'IL-13, IL-6, IL-4 et le TNF^{223,224,225,226}. Ce phénomène est appelé la « sensibilisation du mastocyte », il permet la mise en place d'une réponse quasi immédiate, suite à l'entrée d'un antigène dans l'organisme.

La signalisation du récepteur FcεRI.

Le FcεRI est un récepteur hétérotétramérique composé d'une sous-unité α qui lie les IgE, d'une sous-unité β ayant quatre domaines transmembranaires, et de deux sous-unités γ identiques (FcRγ) reliées par des ponts disulfures^{110,213,214,215,218}. Les sous-unités γ sont nécessaires pour l'initiation de la cascade de signalisation sous le récepteur FcεRI car elles possèdent deux motifs activateurs ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) et la sous-unité β est un important amplificateur de signal^{110,213,215}. Comme beaucoup d'immunorécepteurs, le FcεRI n'a pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque. De ce fait l'agrégation des récepteurs FcεRI va induire « un ballet harmonieux et complexe » de cascades protéiques où se relaieront successivement tyrosines kinases et phosphatases. Ainsi, la tyrosine kinase Lyn (qui appartient à la famille Src) est recrutée, elle phosphoryle les motifs ITAM du récepteur FcεRI et active une autre kinase nommée Syk. Ces deux kinases

phosphorylent des molécules adaptatrices telles que Lat (*linker for activation of T cells*) et NTAL (*non T cell activation linker*) et activent des protéines enzymatiques qui régulent l'activation de la GTPase Ras ou encore les voies de signalisation de phospholipase C- γ (PLC- γ). Cette dernière voie contrôle le « relargage » des stocks de calcium intracellulaire et l'activité de la protéine kinase C, en hydrolysant le phosphatidyl inositol 4,5,-bisphosphate (PI-4,5-P2) pour former de l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) et libérer du diacylglycerol (DAG)^{110,217,218} (**Figure 9**).

Quelques secondes après ce phénomène, Fyn (une autre kinase de la famille Src) est recrutée, elle phosphoryle la protéine adaptatrice Gab2 qui active alors la voie de la phosphatidylinositol-3-OH kinase (PI3K) qui permet de maintenir le signal déjà initié. Deux hypothèses tendent à expliquer le rôle complémentaire de la PI3K à celui de la PLC- γ , l'une suggère qu'elle permet d'augmenter le recrutement de la PLC- γ à la membrane plasmique et de ce fait de maintenir la production d'IP3 ; l'autre propose qu'elle active la phospholipase D (PLD) qui elle-même induit la voie de la sphingosine kinase-1-Phosphate (S1P) pouvant réguler les stocks de calcium intracellulaire indépendamment de l'action de l'IP3^{110,217,218} (**Figure 9**).

Le « relargage » des stocks de calcium intracellulaire sous l'action de l'IP3 permet l'activation des canaux calciques CRAC (*calcium release-activated calcium channel*) via le senseur calcique du réticulum endoplasmique STIM (*stromal interaction molecule*). L'influx calcique ainsi produit active le cytosquelette et génère des événements de fusions membranaires, sous le contrôle des protéines de la famille des SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein receptors*) et des VAMP (*vesicle associated membrane proteins*), ayant pour finalité l'exocytose massive des granules du mastocyte²¹⁸.

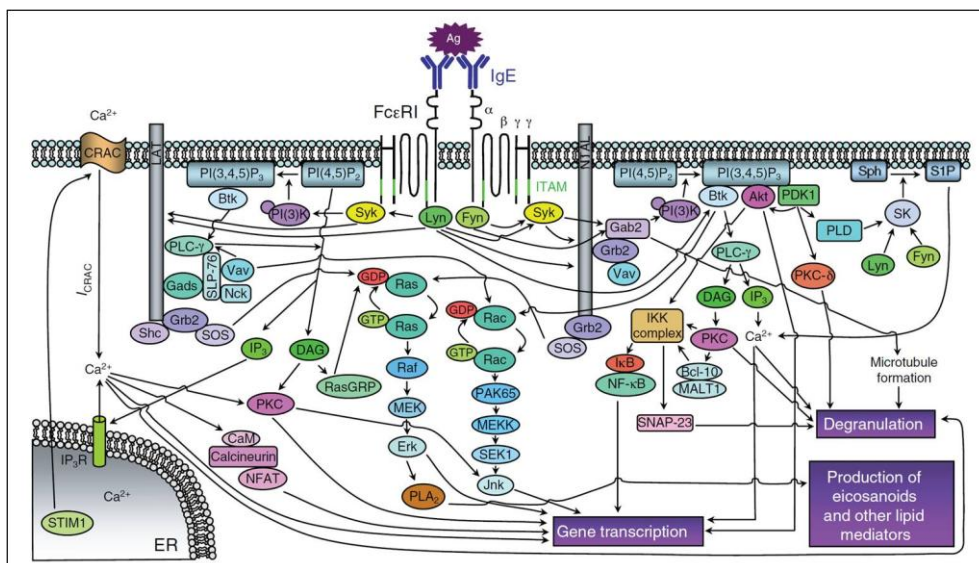


Figure 9. La signalisation du récepteur FcεRI.

Kalesnikoff et al. ²¹⁸

b. La régulation négative du récepteur FcεRI.

Les mécanismes de régulation négative du récepteur FcεRI limitent la dégranulation et de ce fait tendent à modérer les effets néfastes d'une activation mastocytaire abusive. La compréhension de ces mécanismes inhibiteurs est un enjeu médical important pour le traitement des pathologies associées à l'activation des mastocytes dépendante des IgE, comme par exemple les rhinites allergiques, l'asthme, l'anaphylaxie ou encore la dermatite atopique²¹⁹.

Plusieurs molécules sont impliquées dans la régulation négative de la dégranulation, en agissant à plusieurs endroits de la voie de signalisation du récepteur FcεRI. C'est le cas de la molécule Lyn, qui est impliquée à la fois dans l'activation et l'inhibition du récepteur. Mais aussi des protéines RabGEF1 ou RGS13 qui agissent respectivement au niveau des voies ERK et PI3K, et des deux molécules membranaires FcγRIIB et Allergin-1 qui sont porteuses de résidus ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs*) inhibiteurs. Ces deux dernières ayant besoin d'être coagrégées avec le récepteur FcεRI pour agir. (Tableau 3 ; Figure 10)

Molécule	Lyn	RabGEF1	RGS13	FcγRIIB	Allergin-1
Mécanisme inhibiteur	Phosphorylation de motifs ITIM Recrutement de SHIP Inhibition de Gab2	Liaison à la molécule Ras Inhibition de la voie Ras/Raf/ERK	Liaison à la sous unité p85α de la PI3K Inhibition de la voie FcεRI/Gab2/Grb2	Coagrégation avec FcεRI Recrutement de SHIP sur les résidus ITIM	Coagrégation avec FcεRI Recrutement de SHP-1 sur les résidus ITIM
Références	217,218, 227, 228, 229	230	231	168, 232, 233, 234, 235, 236, 237	233

Code de champ modifié

Tableau 3. Mécanismes inhibiteurs de la signalisation du récepteur FcεRI.

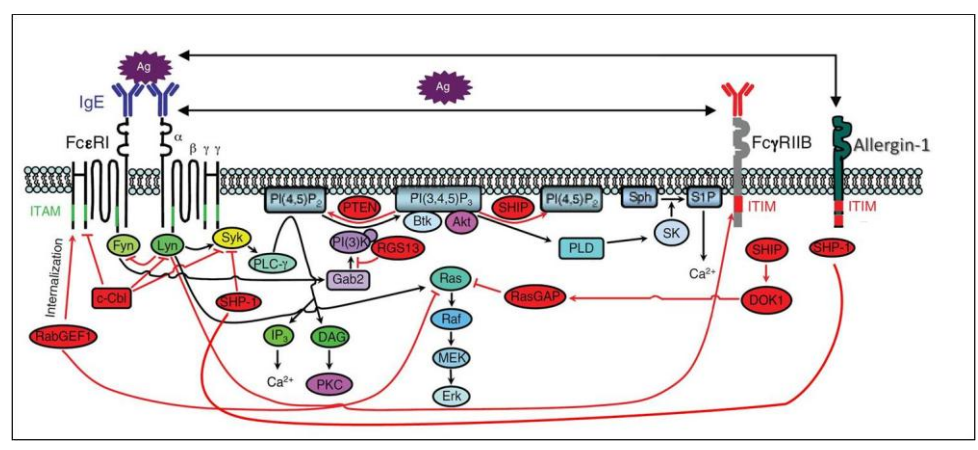


Figure 10. Régulation négative de la signalisation du récepteur FcεRI.
Modifié de Kalesnikoff et al.²¹⁸

2-3 L'interaction indirecte entre les mastocytes et les pathogènes via le récepteur au fragment constant des IgG.

Lors de la réponse immunitaire adaptative, les lymphocytes B sécrètent des IgG spécifiques de motifs antigéniques bien précis. Une fois fixées sur le pathogène, les IgG peuvent exercer plusieurs fonctions comme la neutralisation de toxines ou de particules virales, l'activation de la cascade protéique du complément, ou encore l'opsonisation. Cette dernière fonction permet d'augmenter considérablement la prise en charge du pathogène par les cellules du système immunitaire possédant des récepteurs au fragment constant des IgG (FcγR) à leur surface.

a. L'activation des mastocytes et l'expression des FcγR.

L'équipe de Marc Daeron a acquis une notoriété internationale dans l'étude de l'expression et de l'activité de ces récepteurs dans les mastocytes. Mise à part le récepteur FcεRI, elle a démontré que les mastocytes de souris expriment de manière constitutive les récepteurs FcγRIIB et FcγRIIIA²³⁸. Dans des BMMC et PCMC murins, l'agrégation des récepteurs FcγRIIIA par des complexes GST/IgG anti-GST induit (au même titre qu'une stimulation *via* FcεRI) la dégranulation des mastocytes et la production de TNF-α³⁴ (**Tableau 4**). En effet, aucun relargage de β-hexosaminidase n'est détecté si les mastocytes proviennent de souris FcγRIIIA^{-/-}. La signalisation induite lors de l'activation du récepteur FcγRIIIA est relativement similaire à celle induite lors de l'agrégation des récepteurs FcεRI, ils possèdent les deux même sous unités FcRγ portant deux résidus ITAM activateurs²³⁹.

Chez l'homme, l'analyse des FcγR est basée sur les explants tissulaires qui sont les seules sources de mastocytes matures différenciés *in vivo*. Contrairement aux modèles murins, les mastocytes humains n'expriment pas le FcγRIIIA. Les mastocytes provenant de biopsies de peaux expriment constitutivement le récepteur FcγRIIA mais pas le récepteur FcγRIIB, alors que les CBMC expriment les deux récepteurs^{240,241,242} (**Tableau 4**). Par contre, les mastocytes issus de muqueuse pulmonaire ne semblent pas exprimer le récepteur FcγRIIA^{240,243}. De manière similaire à une stimulation *via* les récepteurs FcγRIIIA dans les modèles murins, la stimulation des récepteurs FcγRIIA sur des mastocytes dérivés de peau humaine induit une dégranulation accompagnée d'une libération d'histamine^{241,244} (**Tableau 4**). Enfin, il est intéressant de noter qu'après stimulation par l'interféron-γ (IFN-γ), les mastocytes cutanés peuvent exprimer le récepteur de haute affinité aux IgG : FcγRI²⁴⁵.

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

Tableau 4. Expression et activation des FcγR dans les mastocytes.

b. L'implication des FcγR dans la réponse inflammatoire.

La lutte antimicrobienne.

Jusqu'à ce jour, peu de travaux montrent directement l'implication des FcγR des mastocytes dans l'inflammation. Cependant il a été rapporté qu'après stimulation par des complexes immuns à IgG, les mastocytes cutanés humains sécrètent en plus de l'histamine, des facteurs pro-inflammatoires tels que le TNF-α, l'IL-6, le GM-CSF, la PGD2 et le LTC4^{241,244} (**Tableau 4**). Le fait qu'ils puissent induire une réponse pro-inflammatoire suite à une telle stimulation laisse présager un rôle potentiel des mastocytes dans la lutte antimicrobienne. Les mastocytes provenant de pathologies à fort infiltrat T_H1, comme dans le cas du psoriasis²⁴⁶ ou de la maladie de Crohn²⁴⁷ expriment dans les tissus le récepteur FcγRI. Enfin, les travaux de Brown *et al.* démontrent l'existence d'un rôle protecteur des mastocytes humains, lors d'une infection par le virus de la dengue, *via* une activation du récepteur FcγRII. Cette activation a pour conséquence la production de la chimiokine RANTES, particulièrement importante pour la migration de leucocytes au site inflammatoire²⁴⁸.

La sclérose en plaque.

Quelques évidences suggèrent un rôle de l'activation des mastocytes *via* le FcγR dans des maladies auto-immunes telle que la sclérose en plaques. Dans le modèle d'encéphalite auto-immune expérimentale active (EAE active) où les souris sont immunisées avec de la myéline ou le peptide MOG, on retrouve aussi un enrichissement de mastocytes aux sites lésionnels.

Dans les souris déficientes en mastocytes $KIT^{W/W-v}$, l'infiltrat T, la production d'IFN- γ et les symptômes cliniques sont considérablement réduits¹⁸⁰. Les travaux de Robbie-Ryan *et al.* décrivent que ces mêmes souris reconstituées avec des BMMC $Fc\gamma R^{-/-}$ ou $Fc\gamma RIII^{-/-}$ développent des symptômes cliniques bien moins sévères que celles reconstituées avec des BMMC sauvages. De manière intéressante, si les BMMC proviennent de souris déficientes en récepteur inhibiteur $Fc\gamma RIIB$ (BMMC $Fc\gamma RIIB^{-/-}$), les symptômes cliniques sont par contre exacerbés²⁴⁹.

2-4 L'interaction des mastocytes avec les fibres nerveuses.

Les mastocytes sont retrouvés dans de nombreux tissus en étroite apposition avec les terminaisons nerveuses (**Figure 11 A**). Cette disposition particulière du mastocyte, fait de ces cellules les cibles privilégiées des neuropeptides produits par les neurones adjacents²⁵⁰. Les neurones produisent de nombreux neuropeptides différents dans le microenvironnement qui les entoure. Les travaux de Singh *et al.* ont mis en évidence un neuropeptide important : la substance P (SP, appelée aussi neurokinine 1). Ils ont démontré qu'un stress aigu stimule la dégranulation des mastocytes, mais ce processus est inhibé si on enlève la SP des terminaisons nerveuses²⁵¹. Ce phénomène d'activation n'est pas à sens unique, puisqu'en retour les neurones sont rendus « hyperexcitables » par la tryptase et l'histamine libérées par les mastocytes (car ils possèdent les récepteurs PAR2 et H1R à leur surface)^{252,253,254}. Il s'instaure alors une boucle d'activation entre les mastocytes et les fibres nerveuses, contribuant à l'établissement d'un microenvironnement inflammatoire (**Figure 11 B**).

Chez les rongeurs, les mastocytes expriment des récepteurs pour la SP mais aussi pour d'autres neuropeptides que sont le facteur de différenciation des nerfs (NGF, *nerve growth factor*), le peptide relié au gène de la calcitonine (CGRP, *calcitonin gene-related peptide*) et le polypeptide intestinal vasoactif (VIP). Ces neuropeptides sont connus pour activer les mastocytes, soit par activation directe de protéines G, soit par liaison spécifique à leur récepteur²⁵⁵. Il a été décrit qu'une concentration faible de SP induit uniquement une réponse électrique dans les mastocytes murins sans provoquer de dégranulation²⁵⁶. Cependant, une forte concentration de SP est capable d'induire une dégranulation accompagnée d'une importante production de médiateurs pro-inflammatoires comme les chimiokines MIP-1, IP10, RANTES ou l'IL-8 mais aussi de cytokines comme l'IL-6 et le TNF- α ^{257,258} (**Figure 11 B**). Il en résulte une infiltration massive de granulocytes au site

inflammatoire²⁵⁷. Une stimulation à la SP induit aussi l'augmentation de l'expression des TLR et notamment du TLR2, ainsi la réponse des mastocytes au Pam₃Cys ou au LTA est potentialisée²⁵⁹ (**Figure 11 B**). Ces données suggèrent qu'une stimulation par la SP pourrait favoriser la mise en place d'une réponse immunitaire antibactérienne bénéfique.

Dans les pathologies cutanées inflammatoires telles que le psoriasis, à la fois le nombre de fibre nerveuses positives pour la SP, le nombre de mastocytes et le nombre de leurs contacts sont augmentés par rapport à une peau normale^{260,261}. Les travaux de Teoharides *et al.* montrent que dans une peau psoriasique, l'abondance de SP induit la sécrétion de VEGF par les mastocytes, contribuant ainsi à la formation de plaques psoriasiques. Ce phénomène est amplifié par la présence d'IL-33, une cytokine inflammatoire abondante dans le psoriasis²⁶².

Il est intéressant aussi de noter que la SP permet de différencier à la fois les mastocytes de type tissus connectif, des mastocytes de type mucoaux (**Figure 1**). En effet, les CTMC murins (à l'inverse des MMC) expriment le récepteur NK1R (*neurokinin 1 receptor*) sur lequel la SP se lie et stimule la dégranulation^{23,263,264}. Chez l'homme, les mastocytes de type tissus connectifs expriment aussi NK1R et dégranulent sous l'effet de neuropeptides tels que la SP ou le peptide VIP²⁵⁸. De plus, l'expression du NK1R et du récepteur à VIP de type 2 est augmentée suite à une dégranulation induite par l'agrégation des récepteurs FcεRI²⁵⁸. Les mastocytes intestinaux (considérés comme mucoaux) ne dégranulent pas sous l'effet de la SP car ils n'expriment constitutivement aucun récepteur NKR²⁶⁵. Cependant, suite à la dégranulation induite par l'agrégation des récepteurs FcεRI, ces mêmes mastocytes expriment le NK1R et deviennent de ce fait sensibles à la SP. Il est donc intéressant de spéculer qu'en condition allergique, la capacité des mastocytes à répondre à une stimulation par des neuropeptides tels que la SP est augmentée, permettant ainsi l'émergence ou le maintien d'un état inflammatoire.

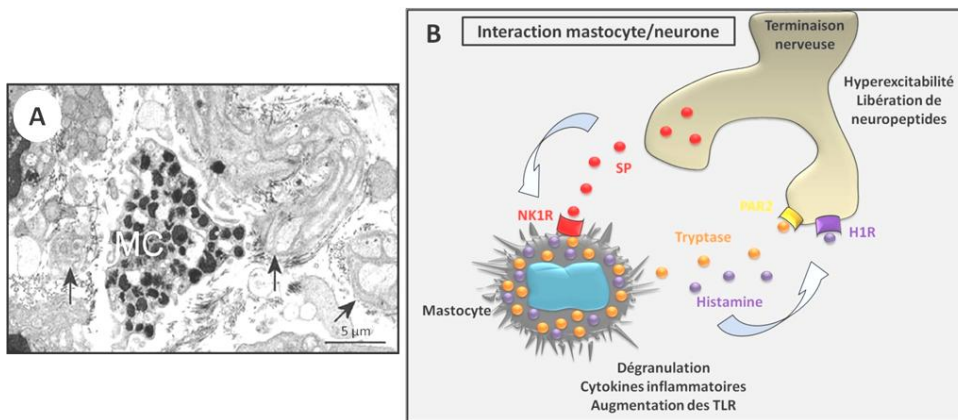


Figure 11. L'interaction mastocyte/neurone.

A. Microscopie électronique de l'interaction entre un mastocyte (MC) dégranulant et des terminaisons nerveuses (flèches noires) dans la muqueuse intestinale, Barbara *et al.*²⁵⁴ **B.** Schéma représentant la boucle d'activation entre un mastocyte et un neurone.

2-5 L'activation des mastocytes et la sécrétion du peptide antimicrobien LL-37.

La production de peptides antimicrobiens par les mastocytes est un autre aspect important de leur fonction au sein de l'immunité innée. Les cathélicidines et les défensines sont les deux plus grandes familles de peptides antimicrobiens chez les mammifères²⁶⁶. Elles ont pour fonction de détruire l'intégrité de la membrane microbienne et contribuent de ce fait à l'élimination des pathogènes. En effet, leurs propriétés cationiques et amphipathiques leur permettent de se lier aux microorganismes chargés négativement et de s'insérer dans leurs membranes²⁶⁶. La cathélicidine humaine LL-37 et la cathélicidine murine CRAMP (*cathelicidin-related antimicrobial peptide*) sont deux peptides antimicrobiens exprimés par les mastocytes²⁶⁷. LL-37 est produit sous la forme d'un précurseur appelé hCAP-18 (*human cationic antimicrobial peptide 18*) qui est clivé par la protéinase 3 (principalement produite par les neutrophiles) pour devenir actif²⁶⁸. L'activation des TLR peut induire la sécrétion de peptides antimicrobiens par les mastocytes (**Figure 12 A**). Ainsi, la stimulation de BMDC murins avec du LPS induit *via* une activation de la voie NF- κ B, l'augmentation de la synthèse et de la sécrétion de la protéine CRAMP²⁶⁹. Les travaux de Di Nardo *et al.* ont démontré toute l'importance de la sécrétion du peptide CRAMP par les mastocytes lors d'une infection bactérienne. Ils ont observé que des souris déficientes en mastocytes KIT^{W/W⁻} sont beaucoup plus sensibles à une infection par des *streptococcus* du groupe A (GAS). La reconstitution de ces souris avec des mastocytes sauvages ou des mastocytes provenant de

souris déficientes en cathélicidines (Cnlp^{-/-}), a permis de constater toute l'importance du rôle joué par les mastocytes, *via* la sécrétion de cathélicidines, dans la lutte contre une infection cutanée par des GAS²⁷⁰. Récemment, l'utilisation du même modèle expérimental lors d'une infection virale a permis de mettre en évidence l'importance de ce phénomène dans la lutte antivirale. Lors d'une infection cutanée par le virus de la vaccine, la protéine virale L1 stimule la dégranulation des mastocytes (indépendamment du TLR2), induisant ainsi la sécrétion de cathélicidines permettant de réduire l'infection²⁷¹.

L'action des cathélicidines n'est cependant pas infaillible. D'autres travaux ont montré que des *staphylococcus aureus* pouvaient être internalisés dans le mastocyte, *via* un mécanisme faisant intervenir les intégrines $\alpha 5\beta 1$ exprimées à la surface des mastocytes. En persistant de manière intracellulaire dans les mastocytes, cette bactérie échappe à l'action des peptides antimicrobiens sécrétés dans le milieu extracellulaire²⁷². Ce mécanisme d'échappement peut permettre de constituer un réservoir infectieux à l'intérieur du mastocyte et de ce fait favoriser l'établissement d'une infection chronique.

Plusieurs autres types cellulaires sont une source importante de peptide LL-37, c'est le cas des kératinocytes et des cellules épithéliales^{273,274}. Outre son action antimicrobienne, le peptide LL-37 peut induire la migration²⁷⁵, la dégranulation ainsi que la production d'histamine, de TNF- α et de PGD2 par les mastocytes²⁷⁶ (**Figure 12 A**). Si les effets de ces peptides sont bénéfiques lors d'une infection bactérienne pour la mise en place d'une réponse immunitaire, ils peuvent être délétères lors d'affections chroniques cutanées telles que le psoriasis. Dans une peau psoriasique, le nombre de mastocytes²⁷⁷ et la quantité de LL-37 sont dramatiquement augmentés²⁷⁸. Il a récemment été démontré que le LL-37 induit aussi la sécrétion de l'IL-31 par les mastocytes, qui avec l'histamine et la PGD2 sont trois produits pruritogènes, impliqués dans la pathogénèse du psoriasis²⁷⁹ (**Figure 12 B**). La régulation de sécrétion des cathélicidines apparaît donc comme essentielle durant les processus inflammatoires. Les travaux de Shiemann *et al.* ont démontré qu'en dégranulant sous l'effet du LL-37, des mastocytes de la muqueuse pulmonaire libèrent de la tryptase- β qui en retour clive le LL-37 restant, le rendant ainsi inactif (action inhibée par la présence du facteur pro-inflammatoire CXCL4)²⁸⁰. Cet effet de la tryptase pourrait constituer un mécanisme de rétrocontrôle négatif, permettant de limiter les éventuels effets pro-inflammatoires néfastes qu'occasionnerait un surplus de ces peptides antimicrobiens.

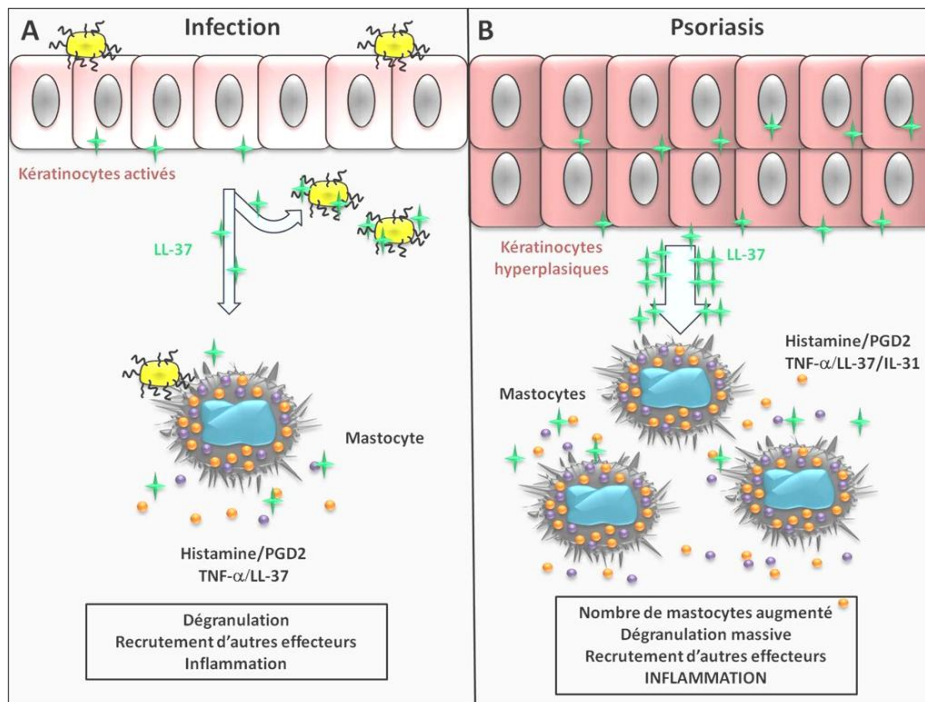


Figure 12. Sécrétion de LL-37 et activation des mastocytes.

- A. Effet bénéfique de l'activation des mastocytes par LL-37 lors d'une infection bactérienne.
B. Effet délétère d'une trop forte activation des mastocytes par LL-37 dans la maladie du psoriasis.

2-6 L'interaction des mastocytes avec les vaisseaux sanguins : le recrutement de cellules effectrices.

a. Le recrutement des neutrophiles et des éosinophiles.

La capacité des mastocytes à induire le recrutement de cellules effectrices au site inflammatoire a fait l'objet de nombreuses études ces dernières années. Leur position stratégique autour des vaisseaux permet la libération rapide de leurs médiateurs dans la circulation sanguine²³. La sécrétion de TNF- α par les mastocytes est un élément clé du recrutement des neutrophiles au site inflammatoire. Elle a lieu juste quelques minutes après l'exposition à certains types de bactéries et joue un rôle crucial dans ce processus. Elle résulte initialement en la libération de molécules préformées et stockées dans le compartiment granulaire du mastocyte, puis rapidement une synthèse *de novo* se met en place^{281,282}. Cependant, de nombreux autres médiateurs sont libérés par les mastocytes et contribuent au recrutement des cellules du système immunitaire comme les neutrophiles. Certains médiateurs préformés agissent sur le système vasculaire pour augmenter le

recrutement cellulaire. L'histamine est une molécule bien connue pour augmenter la perméabilité vasculaire et aussi l'expression de molécules d'adhésion. La sécrétion d'histamine par les mastocytes induit l'expression de la molécule P-sélectine à la surface des cellules endothéliales, permettant ainsi l'adhésion et la transmigration des neutrophiles²⁸³ (**Figure 13**). D'autres travaux identifient la sécrétion de protéases telles que les tryptases, comme un phénomène impliqué non seulement dans le recrutement des neutrophiles dans la cavité péritonéale²⁸⁴, mais aussi des éosinophiles dans les poumons²⁸⁵. Le changement de perméabilité vasculaire, induit par le relargage des molécules précédemment citées, permet le passage dans la circulation d'autres médiateurs inflammatoires tels que les leukotriènes B₄ ou C₄ et les interleukines IL-1 α ou β , impliqués aussi dans le recrutement des neutrophiles et des éosinophiles^{15,286} (**Figure 13**). Lors d'une infection bactérienne ou virale, les mastocytes jouent donc un rôle protecteur en permettant la mobilisation rapide de cellules effectrices du système immunitaire. Enfin, de manière complémentaire, de récents travaux ont démontré qu'une dérégulation de la sécrétion d'IL-1 β par les mastocytes cutanés de patients CAPS, étaient responsables du recrutement massif des neutrophiles au niveau de la peau et de l'induction d'urticaire sévère²⁰⁵.

b. Le recrutement des cellules dendritiques.

Au site infectieux, la production de TNF- α par les mastocytes permet aussi l'expression des molécules d'adhésion E-sélectine à la surface des cellules endothéliales locales, permettant le recrutement de cellules dendritiques (CD) au site infectieux²⁸⁷. Quelques études suggèrent d'ailleurs que la sécrétion de CCL20 par les mastocytes est impliquée dans le recrutement de précurseurs de cellules dendritiques du sang périphérique vers le tissu²⁸⁸ (**Figure 13**). Enfin, d'autres études montrent que les mastocytes sont importants pour induire une mobilisation des cellules de Langerhans en réponse au PGN²⁸⁹ et de cellules dendritiques après une infection par des bactéries Gram⁺²⁹⁰. Ces phénomènes d'induction de migration des cellules dendritiques par les mastocytes sont très importants, car ils permettent la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative future.

c. Le recrutement des cellules *natural killers* (NK), NKT et des lymphocytes T.

Lors d'une infection par le virus de la dengue, les mastocytes induisent le recrutement de cellules NK et NKT *via* la sécrétion des médiateurs inflammatoires TNF- α , CCL5, CXCL12 et

CX3CL1²⁹¹. De même, chez l'homme l'activation de CBMC, par du poly(I :C) ou par des réovirus, induit le recrutement de cellules NK *via* la sécrétion de CXCL8²⁹² (**Figure 13**).

Les mastocytes peuvent aussi induire le recrutement de lymphocytes T au site infectieux. Dans un modèle de péritonite virale, l'activation du TLR3 dans les mastocytes résulte en la sécrétion d'IP10 et de RANTES permettant le recrutement de lymphocytes T CD8 effecteurs au site inflammatoire²⁰⁰ (**Figure 13**). L'IL-16 est un facteur chimiotactique pour les lymphocytes T CD4 qui est stocké au sein des granules de mastocytes humains et relargué lors de la dégranulation²⁹³. Dans un modèle murin d'hypersensibilité de contact induite à l'haptène, les mastocytes cutanés migrent jusqu'aux nœuds lymphatiques drainants, où ils sécrètent la molécule CCL4, responsable du recrutement des lymphocytes T CD4^{294,295}. De manière plus générale, les mastocytes sécrètent de nombreux facteurs chimiotactiques pour les différents sous types de lymphocytes T_H (CCL3, CCL4, CXCL9 et CXCL10 pour les T_H1 ; CCL5 et CCL11 pour les T_H2 et CCL2 et CCL20 pour les T_H17)²⁹⁶.

Enfin, dans un modèle d'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE), les mastocytes de méninges jouent plutôt un rôle délétère notamment en permettant le recrutement de lymphocytes T CD4 encéphalitogènes au travers de la barrière hémato-encéphalique^{297,298}.

Les mastocytes et les lymphocytes T CD4 sont souvent retrouvés en étroite apposition au sein des tissus. Il est donc important de découvrir s'il existe un dialogue entre ces deux types cellulaires et quel serait l'impact d'une telle coopération dans les réponses inflammatoires.

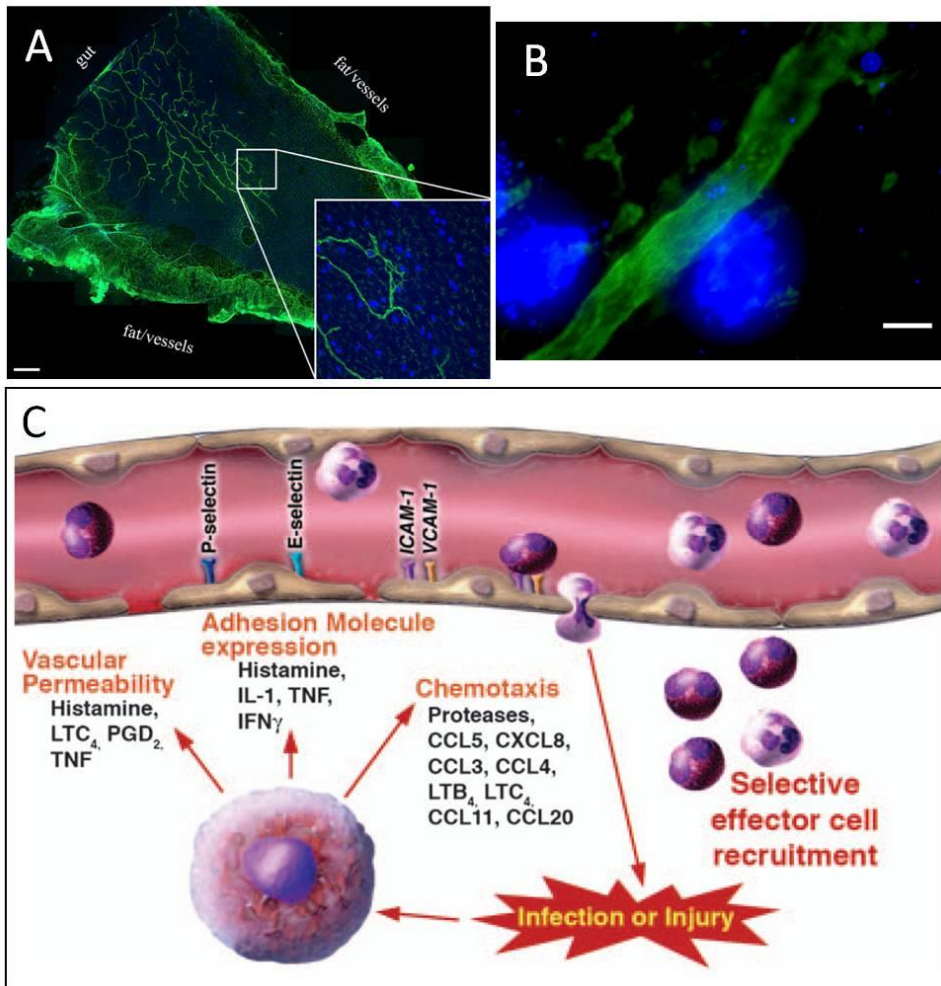


Figure 13. Les mastocytes induisent le recrutement de cellules effectrices via la sécrétion de nombreux médiateurs.

A. Microscopie confocale montrant la proximité des mastocytes (bleu) et des capillaires (vert) dans le mésentère de rat. **B.** Microscopie confocale montrant des mastocytes dégranulant à proximité de vaisseaux. **C.** Schéma du recrutement de cellules effectrices via l'activation de l'endothélium par les mastocytes. (A-B) Kunder *et al.*⁹⁵ (C) Marshall *et al.*¹⁵

3- La réponse T_H et sa modulation.

3-1 L'activation et la différenciation des lymphocytes T_H.

a. L'interaction spécifique lymphocyte T_H/cellule présentatrice d'antigènes.

La formation d'une synapse immunologique.

Les lymphocytes T CD4 $\alpha\beta$ conventionnels sortent du thymus sous forme de cellules matures naïves et migrent dans les organes lymphoïdes secondaires. Suite à la pénétration d'un pathogène dans l'organisme, des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) professionnelles, telles que des cellules dendritiques (CD), vont capturer l'antigène et migrer à leur tour jusqu'aux nœuds lymphatiques. C'est en ce lieu, qu'elles vont présenter un peptide antigénique (*via* le CMH-II) aux lymphocytes T dont le TCR (*T cell receptor*) est spécifique.

Lors de l'interaction CPA/lymphocyte T, il y a formation d'une aire de contact spécialisée appelée « synapse immunologique » (**Figure 14**). C'est une structure dynamique et organisée permettant un flux bidirectionnel et spécifique d'informations entre la cellule T et la CPA²⁹⁹.

La synapse immunologique s'organise en structures concentriques appelées les SMAC (*supra-molecular activation cluster*)³⁰⁰. Ainsi, le TCR s'accumule au centre de la synapse dans le « *central SMAC* » (cSMAC) avec d'autres molécules telles que CD2, CD28, la PKC θ , Lck, Fyn et les corécepteurs CD4 et CD8³⁰¹. LFA-1 et la Taline s'organisent dans une structure en anneau entourant le cSMAC appelée le « *peripheral SMAC* » (pSMAC). Enfin, les molécules CD43, CD45 et CD148 sont exclues de l'aire de contact par leur taille et constituent la région la plus éloignée du centre de la synapse appelée « *distal SMAC* » (dSMAC)^{300,302,303,304} (**Figure 14**).

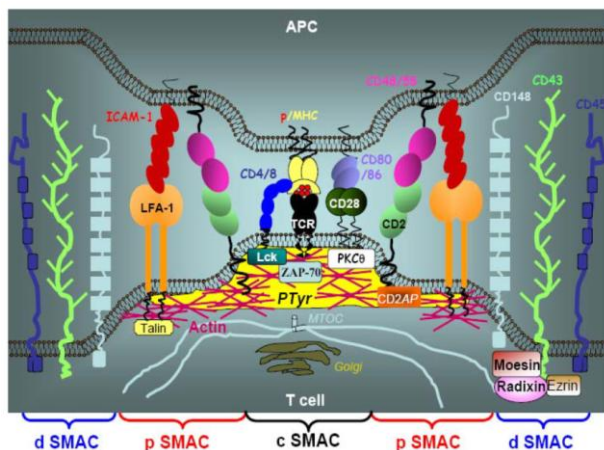


Figure 14. Représentation schématique d'une synapse immunologique.

Adapté de Valitutti and Espagnole. *Encyclopedia of life sciences* 2005.

La différenciation des sous-types de lymphocytes T_H .

Plusieurs signaux sont nécessaires à la pleine activation et à la différenciation des lymphocytes T $CD4^+$ naïfs. Un premier signal est donné lors de l'engagement des TCR sur les complexes CMH-II/peptide antigénique présents à la surface de la CPA. Un deuxième signal est transmis par la combinaison des molécules de costimulation présentes à la membrane des cellules³⁰⁵. Enfin, les cytokines sécrétées par les deux protagonistes et par les cellules présentes dans le microenvironnement représentent un troisième signal, très important pour la polarisation des lymphocytes T_H ³⁰⁶ (**Figure 15**).

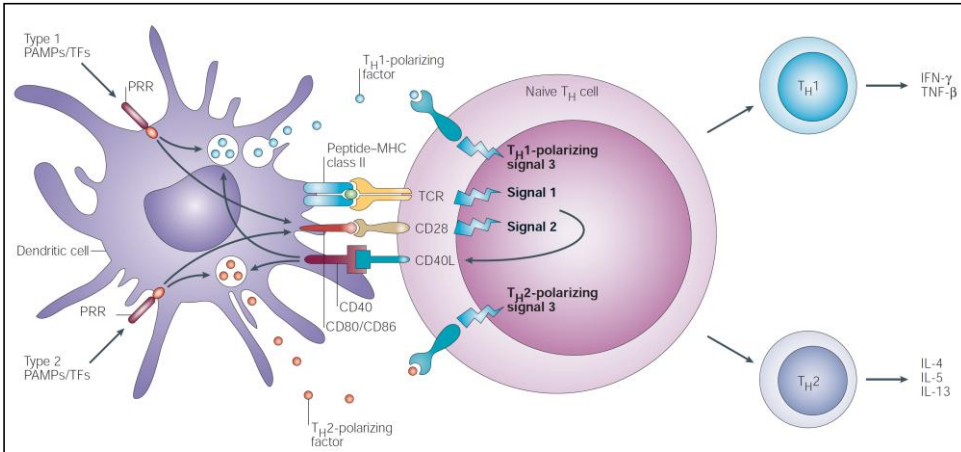


Figure 15. Schéma montrant les trois signaux requis pour l'activation et la différenciation des lymphocytes T_H. Kapsenberg *et al.*³⁰⁶

En fonction de la combinaison de tous ces paramètres, les lymphocytes T naïfs se différencient en différents sous types de lymphocytes T_H ayant chacun des propriétés bien précises. De nos jours, environ six sous types sont considérés comme des lignages à part entière, exprimant des facteurs de transcription qui leur sont propres (**Figure 16**).

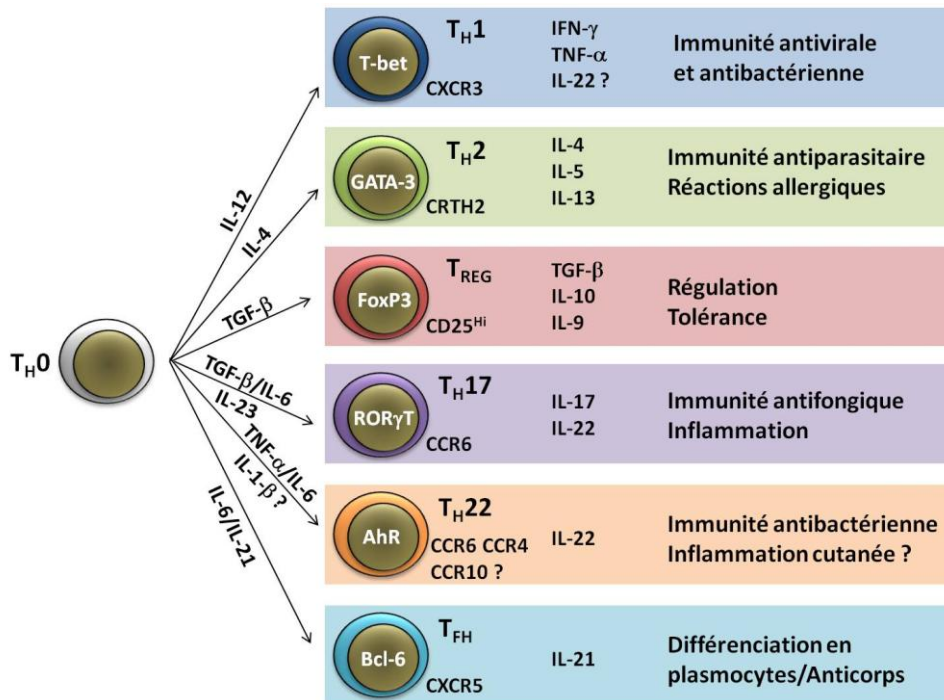


Figure 16. La différenciation des différents sous-types de lymphocytes T_H.

Adapté de Broomley. *et al.*³⁰⁷

b. Les lymphocytes T_H mémoires.

La génération et la fonction.

Durant l'interaction lymphocyte T naïf/CPA, l'intégration de plusieurs signaux détermine donc la qualité de la réponse immunitaire mise en œuvre. Ainsi ces paramètres définissent non seulement le sous type de lymphocytes, mais aussi l'ampleur de l'expansion clonale et la proportion de cellules effectrices ou mémoires générées³⁰⁸. Seulement une faible fraction de cellules ayant proliféré lors de la réponse immunitaire se maintient en tant que cellules mémoires.

Les lymphocytes T_H mémoires ont longtemps été considérés comme indépendants de cytokines γ c. De nos jours, il est bien établi que l'homéostasie de ces cellules nécessite la présence de deux cytokines : l'IL-7 et l'IL-15³⁰⁹. Le rôle de l'IL-7 a été dévoilé lors d'expériences montrant que la survie et la prolifération des cellules mémoires étaient fortement dépendantes de la présence d'IL-7, et cela même à la suite à d'une stimulation du

TCR par les molécules du CMH-II^{310,311}. Enfin, des études récentes démontrent qu'à la fois l'IL-7 et l'IL-15 sont nécessaires à la prolifération homéostatique ainsi qu'à la survie à long terme de lymphocytes T_H mémoires antigène spécifiques^{309,312}.

Les différentes populations.

L'analyse de différents marqueurs de surface a été particulièrement utile pour disséquer les hétérogénéités fonctionnelles qu'il existe au sein des cellules T_H mémoires humaines. En effet, l'expression combinée de molécules d'adhésion et de récepteurs aux chimiokines confère aux cellules leur propriétés de migration et de localisation dans les différents tissus du corps humain^{313,314}. Les populations de lymphocytes T_H mémoires sont hétérogènes et peuvent être divisées en deux groupes : les lymphocytes T mémoires centraux (T_{CM}) et les lymphocytes T mémoires effecteurs (T_{EM})³¹³. Comme les T naïfs, les T_{CM} expriment à leur surface des molécules leur permettant de migrer dans les organes lymphoïdes secondaires. Ainsi, ils expriment la molécule d'adhésion CD62L (*L-selectine*) leur permettant d'adhérer à la paroi des vaisseaux sanguins et le récepteur CCR7 (*chemokine C-C motif receptor 7*) leur permettant de migrer jusqu'au nœud lymphatique en réponse aux chimiokines CCL19 et CCL21³¹³. Les T_{CM} ont des fonctions effectrices limitées mais gardent en revanche un seuil d'activation très bas. Ils ont la capacité de produire de grandes quantités d'IL-2 et de fortement proliférer, ils peuvent donc se différencier rapidement en cellules effectrices suite à la rencontre avec un antigène spécifique.

Contrairement aux T_{CM}, les T_{EM} n'expriment ni CD62L ni CCR7, cependant ils arborent à leur surface un riche panel de récepteurs (CCR6, CCR4, CCR10, CXCR3, CRTH2 ou CCR5) leur permettant de migrer au sein des tissus périphériques ou jusqu'au site inflammatoire. Les T_{EM} sont une population hétérogène en terme de récepteurs aux chimiokines et de fonctions effectrices, ils constituent les différents sous types de lymphocytes T_H producteurs de forts taux de cytokines (**Figure 16**)³¹⁵. En réponse à des signaux de dangers chimiokiniques, ces lymphocytes migrent dans les tissus périphériques (comme la peau et les muqueuses) où ils rencontrent des cellules présentatrices d'antigènes résidentes. Suite à cette interaction, ils prolifèrent et sécrètent des cytokines qui modulent ainsi la réponse immunitaire locale^{316,317}. Ce phénomène joue par exemple un rôle très important dans les pathologies inflammatoires cutanées telle que le psoriasis ou la dermatite de contact³¹⁸.

D'autres marqueurs sont utilisés pour différencier les populations de lymphocytes T_H humains lors d'analyses par cytométrie en flux. Ainsi l'utilisation combinée des marqueurs suivants CD3, CD4, CCR7, CD45RA ou CD45RO est suffisante pour discriminer les T naïfs, les T effecteurs, les T_{CM} et les T_{EM} dans un échantillon de sang périphérique humain (**Figure 17**).

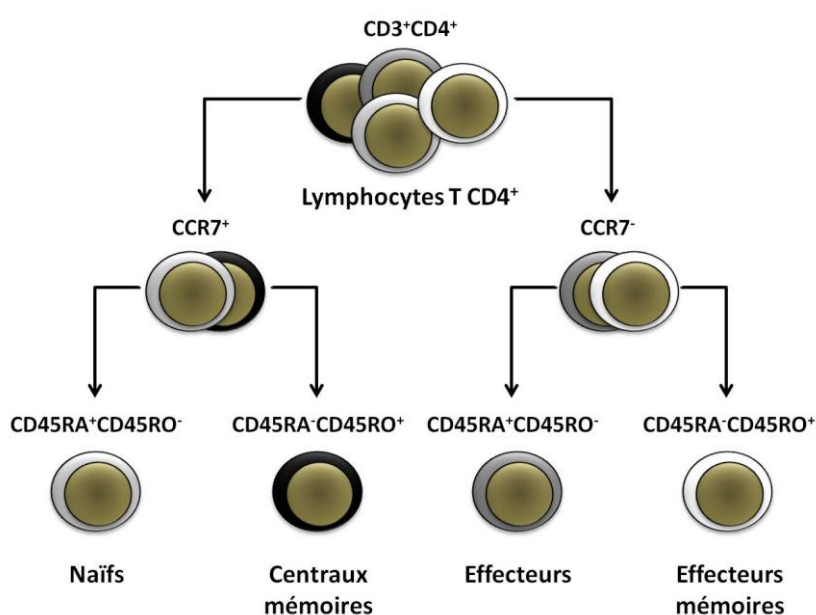


Figure 17. Identification des différentes populations de lymphocytes T CD4⁺.

c. La plasticité des lymphocytes T_H.

Les différents sous types de lymphocytes T_H (**Figure 16**) représentent des archétypes entre lesquels les populations cellulaires oscillent *in vivo*. Des populations chimériques exprimant simultanément des cytokines exprimées spécifiquement par plusieurs sous types de T_H sont fréquemment retrouvées^{319,320,321}. De nombreux facteurs semblent impliqués dans le remodelage des sous types de lymphocytes T_H, tels que les molécules de costimulation, les cytokines ou encore les microRNA³²². Des cellules T humaines produisant à la fois de l'IL-4 et de l'IFN- γ ont souvent été décrites. Elles peuvent être générées *in vitro*, après restimulation de clones T_H1 ou T_H2 dans des conditions de polarisation opposées. Durant cette reconversion un remodelage des gènes cibles des cytokines est détecté^{323,324}.

Il est aussi possible d'observer des cellules T_H mémoires possédant un phénotype intermédiaire à mi chemin entre les sous types T_{H1} et T_{H17} . En effet, ces cellules sont retrouvées dans la muqueuse intestinale et certaines d'entre elles prolifèrent en réponse à un antigène issu de mycobactéries. Elles sécrètent simultanément de l'IFN- γ et de l'IL-17 et co-expriment à leur membrane les récepteurs CXCR3 et CCR6^{325,326}.

Un autre bon exemple de plasticité cellulaire est donné par l'analyse des populations cellulaires produisant de l'IL-10. Cette dernière était initialement vue comme une cytokine essentiellement T_H2 , de nos jours il est bien établi que les T_{H1} , les T_{H17} et les T_{reg} peuvent sécréter de l'IL-10. Il existe aussi une étrange flexibilité entre le compartiment T_{reg} et les autres cellules. Ainsi, il est possible d'observer des T_{reg} FoxP3⁺ qui expriment aussi ROR γ t et produisent de l'IL-17. De façon similaire, ils peuvent exprimer le facteur de transcription T-bet et produire de l'IFN- γ ^{327,328,329}.

Les T_{FH} peuvent être détectés comme positifs pour le facteur de transcription FoxP3, et des cellules T_{H2} produisant de l'IL-4 peuvent devenir des T_{FH} ^{330,331,332,333}. Les T_{H17} peuvent produire de l'IL-21 tout comme les T_{FH} ³²². Enfin, l'IL-22 a été décrite comme pouvant être produite par les T_{H17} et les T_{H1} , néanmoins une population de T_{H2} produisant uniquement de l'IL-22 a récemment été décrite^{334,335}.

Ces données réunies démontrent que des cellules T_H maintiennent le profil cytokinique pour lesquelles elles ont été programmées, mais gardent néanmoins une certaine flexibilité. Dans un microenvironnement approprié, elles peuvent alors sécréter d'autres cytokines après remodelage transcriptionnel.

3-2 Les cellules présentatrices d'antigènes.

a. Les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles.

Les cellules dendritiques.

En tant que CPA professionnelles, les cellules dendritiques (CD) jouent un rôle fondamental dans la mise en place de la réponse immunitaire adaptative. En effet, de nombreuses études montrent que les CD sont à l'origine de la génération de différents types de réponses T_H et de la mise en place de la mémoire immunitaire^{306,308,336}. Il existe plusieurs sous types de CD présentes dans les différents tissus et arborant des caractéristiques fonctionnelles bien distinctes³³⁷. Un seul sous type de CD peut promouvoir différents types de réponses, par exemple une réponse T_{H1} ou une réponse T_{H2} ^{338,339}. Ainsi, en fonction du type de CD et des

signaux activateurs qu'elles ont reçu, différentes réponses T_H pourront être générées^{337,340,341,342,343}. Ces signaux peuvent être d'origines diverses. Ils peuvent provenir de la nature³⁴⁴ et de la charge³⁴⁵ antigénique, des facteurs inflammatoires présents dans le microenvironnement^{346,347,348,349}, d'interactions physiques avec d'autres types cellulaires³⁵⁰, de l'intensité de l'engagement du TCR³³⁸ ou encore d'une éventuelle stimulation *via* les PRR^{351,352}. Tandis qu'une population de CD myéloïdes (mCD) stimulée par NOTCH³⁵³ ou par un ligand du TLR3 peut induire la génération d'une population T_H17 , la même population stimulée *via* le TLR4 en est incapable³⁵⁴. De la même manière, une population de CD plasmocytoïde (pCD) stimulée *via* le TLR7 différencie les lymphocytes vers un profil T_H17 ^{355,356}, alors qu'une stimulation *via* le TLR9 génère des lymphocytes T_H1 et T_H22 ³³⁴. Enfin, il a été démontré que dans la peau les cellules de Langerhans sont plus aptes à générer des lymphocytes T_H22 qu'une population de cellules dendritiques dermales³⁵⁷. Ces divers sous types de CD sont donc des acteurs clés de la réponse immunitaire adaptative. Ils interviennent différemment dans la génération d'une réponse T_H effectrice en fonction des signaux activateurs qu'ils reçoivent.

Les macrophages.

Bien que moins efficaces que les CD, les macrophages sont des CPA professionnelles qui participent à la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative. Comme pour les CD, il existe aussi plusieurs sous types de macrophages aux propriétés et localisations distinctes³⁵⁸. La présence de cellules NK sécrétant de l'IFN- γ permet généralement d'orienter les macrophages se trouvant à proximité vers un phénotype inflammatoire M1³⁵⁹. Ces derniers sécrètent de grandes quantités de TNF- α , d'IL-12, d'IL-1 β et d'IL-23, ils sont donc des acteurs importants de la différenciation en T_H1 et T_H17 . En retour, les lymphocytes T_H1 sécrètent de l'IFN- γ favorisant ainsi l'expansion des populations de macrophages M1 et leurs propriétés bactéricides³⁵⁹. Au contraire, les macrophages alternatifs M2 sont induits par une immunité de type T_H2 sous l'action de l'IL-4 ou l'IL-13. Ils sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie en inhibant les réponses T_H et en favorisant la génération de lymphocytes T_{reg} par sécrétion d'IL-10¹¹.

Les lymphocytes B.

De nombreuses études indiquent que les lymphocytes B sont importants pour la prolifération initiale des lymphocytes T CD4⁺ après rencontre avec l'antigène³⁶⁰⁻³⁶³ et pour l'établissement d'une réponse T_H mémoire efficace³⁶⁴⁻³⁶⁶. Par exemple, les lymphocytes B sont requis pour la mise en place d'une réponse primaire et d'une réponse mémoire T_H2, suite à une infection par *H.Polygyrus*³⁶⁶. Dans d'autres travaux, les lymphocytes B permettent de générer une réponse primaire et mémoire T_H1 suite à une infection par le LCMV (*lymphocytic choriomeningitis virus*)³⁶⁷.

Les CPA professionnelles ci-dessus sont donc très importantes dans la biologie des lymphocytes. Elles régulent l'initiation, l'orientation et la maintenance à long terme de la réponse adaptative des lymphocytes T_H.

b. Les cellules présentatrices d'antigènes non conventionnelles.

Les éosinophiles.

Des études ont décrit que les éosinophiles ont la capacité de migrer jusqu'aux nœuds lymphatiques en conditions inflammatoires, leur permettant d'être à proximité des lymphocytes T pour une éventuelle présentation d'antigènes^{368,369}. En conditions inflammatoires, les éosinophiles murins et humains expriment des caractéristiques de cellules présentatrices d'antigènes professionnelles. En effet, ils peuvent posséder à leur surface des molécules du CMH-II ainsi que des molécules de costimulation telles que CD80, CD86 ou CD40^{369,370,371,372,373,374,375}. D'anciens travaux ont suggéré qu'*in vitro*, les éosinophiles peuvent capturer, apprêter et présenter un antigène à des lymphocytes T CD4⁺³⁷⁶⁻³⁷⁹. Plus récemment, il a été démontré que les éosinophiles peuvent se comporter comme des CPA professionnelles *in vitro* et *in vivo*. Les travaux de Padigel *et al.* décrivent que des éosinophiles incubés avec des antigènes provenant de *Strongyloides* augmentent l'expression de molécules de CMH-II et de costimulation et activent des cellules T naïves vers un profil T_H2 produisant de l'IL-4 et de l'IL-5. De plus, dans ces expériences la capacité des éosinophiles à activer des cellules naïves est comparable à celle de CD³⁸⁰. Le même groupe démontre que des éosinophiles (ici aussi chargés en antigènes de *Strongyloides*), injectés en intrapéritonéal dans une souris, migrent jusqu'à la rate et induisent la sécrétion d'IL-4 et d'IL-5 par les cellules spléniques. Ce phénomène n'a pas lieu si les éosinophiles proviennent

de souris CMH-II⁻³⁸¹. La présentation d'antigènes par les éosinophiles a aussi été démontrée dans d'autres contextes comme une inflammation allergique induite à l'ovalbumine^{369,373,382}.

Les basophiles.

Comme les mastocytes ou les éosinophiles, les basophiles sécrètent de l'IL-4 ce qui suggère leur participation dans l'immunité de type T_{H2}^{383,384}. Les éosinophiles expriment à leur surface des molécules du CMH-II et peuvent directement activer les lymphocytes T CD4⁺, il est donc envisageable que les basophiles puissent posséder de telles facultés. Trois articles publiés en 2009 présentent les basophiles comme des cellules présentatrices d'antigènes nécessaires et suffisantes pour induire une immunité de type T_{H2}.

Les travaux de Perrigou *et al.* décrivent que des CD exprimant des molécules de CMH-II ne peuvent pas induire une réponse immunitaire T_{H2} suffisante pour protéger des souris d'une infection par l'helminthe gastrointestinal *Trichuris Muris*. Dans leur modèle, les basophiles activent des lymphocytes T CD4⁺ naïfs et les différencient en cellules T_{H2} *in vitro*. Des expériences de déplétions et de reconstitutions de populations de basophiles leurs permettent de conclure que ces cellules sont responsables de la mise en place de la réponse T_{H2} protectrice *in vivo*³⁸⁵.

Dans leurs études Sokol *et al.* et Yoshimoto *et al.* étudient l'implication des basophiles dans deux modèles d'inflammations allergiques induites respectivement par la papaïne et l'ovalbumine. De manière relativement similaire, ils démontrent qu'*in vitro* et *in vivo*, les basophiles et non les cellules dendritiques différencient des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en lymphocytes T_{H2} responsables des manifestations allergiques^{386,387}.

Ces travaux ont récemment été contredits par les recherches de Hammad *et al.* En effet, ils décrivent que les CD inflammatoires FcεRI⁺ et non les basophiles sont responsables *in vivo* de la mise en place de l'immunité T_{H2} et de phénomènes allergiques. Dans leurs modèles d'allergie induite par HDM (*house dust mite*), ils font une déplétion spécifique des basophiles et démontrent que les CD inflammatoires FcεRI⁺ sont nécessaires et suffisantes pour induire la pathologie allergique³⁸⁸.

Toutes ces expériences diffèrent par les nombreux modèles murins utilisés, les voies d'administration des antigènes, les modes de déplétion des populations cellulaires d'intérêts, sans écarter l'hypothèse d'éventuelles CD résiduelles dans les cultures de basophiles. Toujours étant que les basophiles sont impliqués dans la réponse T_{H2} par leur

sécrétion d'IL-4 et il semble qu'ils puissent aussi se comporter comme des CPA pro-T_H2 mais ce sujet est encore à ce jour l'objet de nombreuses discussions.

Les neutrophiles.

Les neutrophiles interagissent avec les lymphocytes T_H par l'intermédiaire de facteurs solubles. En effet, les neutrophiles sécrètent les chimiokines CCL2/CXCL9/CXCL10 et CCL2/CCL20 qui attirent respectivement les lymphocytes T_H1 et T_H17. A l'inverse, ces deux types cellulaires sécrètent la chimiokine CXCL8 qui attire les neutrophiles³⁸⁹. Plusieurs études mettent en évidence que les neutrophiles humains et murins présents aux sites inflammatoires expriment les molécules du CMH-II et de costimulation CD80 et CD86^{390,391}. De manière intéressante, la coculture entre des neutrophiles présentant l'antigène et des lymphocytes T CD4⁺ naïfs induit la génération de lymphocytes produisant notamment de l'IFN- γ et de l'IL-17^{391,392}. Ces expériences démontrent qu'il existe un lien entre les populations T_H1/T_H17 et les neutrophiles. Cependant la réelle pertinence physiologique *in vivo* de la présentation d'antigènes par les neutrophiles reste encore à démontrer.

Les cellules endothéliales.

Le possible rôle de CPA des cellules endothéliales humaines a été suggéré par l'observation *in situ* de molécules du CMH à leur surface^{393,394}. Ces cellules expriment aussi les molécules de costimulation CD2, ICOS, 4-1BB et OX40 impliquées dans l'activation et le maintien de lymphocytes T mémoires³⁹⁵. De manière complémentaire à ces observations, le traitement à l'IFN- γ de cultures de cellules endothéliales humaines induit l'expression de molécules du CMH-II. Ces cellules induisent la prolifération de lymphocytes T_H mémoires *in vitro*, mais pas de leurs homologues naïfs³⁹⁵. Ce problème d'activation de cellules naïves provient sans doute du défaut d'expression de CD80 et CD86 à la surface des cellules endothéliales, ne permettant pas l'engagement du CD28.

Il y a deux explications possibles à cette fonction de faible CPA des cellules endothéliales. Dans une première hypothèse, les cellules endothéliales portent des peptides du soi à leur surface permettant une interaction de faible affinité avec le TCR de lymphocytes T mémoires circulants, donnant ainsi à ces derniers une faible stimulation traduite en signal de survie. Dans une deuxième hypothèse, les molécules du CMH-II portent des antigènes provenant de pathogènes qui permettent une forte stimulation des cellules mémoires circulantes et donc

la réactivation localisée d'une réponse immunitaire. Deux études récentes vont dans le sens de cette dernière hypothèse. L'infection de cellules endothéliales de cornée par le virus HSV-1 induit l'expression d'un transcriptome relatif à la présentation d'antigènes et ces cellules supportent l'activation de lymphocytes T CD4⁺ autologues *in vitro*³⁹⁶. De plus, il a été démontré que des cellules endothéliales traitées au TNF- α (mimant une condition inflammatoire) permettent la migration trans-endothéliale de lymphocytes T_H mémoires effecteurs³⁹⁷.

Il est donc intéressant de spéculer qu'en conditions infectieuses inflammatoires, la fonction de CPA des cellules endothéliales pourrait permettre une réactivation locale des lymphocytes T_H mémoires effecteurs, tout en facilitant leur pénétration dans le tissu infecté.

3-3 L'influence des mastocytes sur la réponse des lymphocytes T_H.

Les mastocytes sécrètent de nombreux médiateurs impliqués dans l'initiation de l'inflammation et le recrutement de cellules effectrices au site inflammatoire (cf chapitre 2-6). En plus de cette fonction, les mastocytes libèrent d'autres facteurs (IL-12, IL-4, IL-6, TGF β , IL10...) qui peuvent influencer la réponse immunitaire adaptative et notamment moduler le phénotype des lymphocytes T_H^{217,398,399}.

a. La modulation de la balance T_H1/T_H2.

Une modulation pro-T_H1.

Les mastocytes sont traditionnellement associés à une réponse allergique et une amplification du phénotype T_H2. Cependant ils interviennent aussi dans la biologie des autres types de lymphocytes T_H.

Lors de leur dégranulation, les mastocytes libèrent de l'histamine dans le microenvironnement. Les travaux de Jutel *et al.* démontrent que l'histamine peut agir directement sur les populations lymphocytaires T_H1 et T_H2. En se fixant sur le récepteur H2R présent à la surface des lymphocytes T_H2, l'histamine va inhiber la production d'IL-4. Par contre en se fixant sur le récepteur H1R présent sur les lymphocytes T_H1, elle va favoriser la prolifération de ces cellules et augmenter la production d'IFN- γ . De plus, les souris H1R^{-/-} ont entre autres phénotypes, une réponse T_H1 fortement diminuée⁴⁰⁰.

L'IL-12 est une cytokine clé habituellement produite par les macrophages ou les CD et impliquée dans la différenciation T vers le profil T_H1. Les travaux de Nakano *et al.* présentent

les mastocytes comme une source importante d'IL-12, induite par l'expression du facteur de transcription ICSBP (*IFN consensus sequence binding protein*). En utilisant un modèle de souris MC *knock-in*, ils démontrent également que l'IL-12 produite par les mastocytes est importante pour la mise en place d'une réponse T_{H1} *in vivo*⁴⁰¹.

Enfin, les mastocytes peuvent moduler la réponse T_{H1} en agissant sur les CD. Une étude récente menée dans un modèle murin démontre que des CD maturées lors d'une coculture avec des PCMC, différencient préférentiellement les lymphocytes T vers un profil T_{H1} plutôt que T_{H2}⁴⁰².

Une modulation pro-T_{H2}.

Les mastocytes sont connus pour être une source importante de cytokines de type T_{H2} comme l'IL-4, l'IL-6 ou l'IL-13, favorisant ainsi l'amplification de ce type de réponse²²⁰. La dégranulation de mastocytes humains provoque le relargage de PGD2. Les lymphocytes T_{H2} sont caractérisés par l'expression du récepteur à la PGD2 : CRTH2. *In vitro*, la stimulation du récepteur CRTH2 par son ligand induit la libération massive d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 par les lymphocytes T_{H2}^{403,404}.

Les mastocytes peuvent aussi exprimer à leur surface des molécules de la famille des TIM (*T cell immunoglobulin and mucin domain containing molecule*) qui sont impliquées dans la régulation de la balance T_{H1}/T_{H2} dans de nombreuses pathologies, telles que des maladies autoimmunes ou des phénomènes allergiques^{405,406}. En effet, les mastocytes de péritoine de souris expriment à leur surface les molécules TIM-1 et TIM-3, respectivement impliquées dans l'amplification de la réponse T_{H2} et l'inhibition de la réponse T_{H1}. De manière intéressante, l'activation de TIM-1 par son ligand TIM-4 ou le blocage de TIM-3, induit la libération de cytokines pro-T_{H2} par les mastocytes telles que l'IL-4, l'IL-6 ou l'IL-13, sans induire de dégranulation⁴⁰⁷.

Ces données démontrent que les mastocytes peuvent favoriser l'émergence de populations lymphocytaires T_{H1} ou T_{H2}, en sécrétant plusieurs médiateurs et en agissant à différents niveaux de la réponse immunitaire adaptative.

D'autres études se sont intéressées à l'impact des mastocytes sur les autres populations de lymphocytes T_H, elles sont résumées au sein du **Tableau 5**.

Sous type de T _H	Mécanisme d'action	Effet sur le T _H	Implications physiopathologiques	Références
T _{H1}	Histamine/H1R CD pro-T _{H1} Sécrétion d'IL-12 Sécrétion d'IL-4(EAE)	Prolifération Sécrétion d'IFN-γ	Pro-inflammatoire Anti-allergique Favorise l'EAE	400,401,402,408
T _{H2}	CD pro-T _{H2} IL-4/IL-5/IL-13 PGD2/CRT2 IL-6/TNF-α	Maintien du profil TH2 Sécrétion d'IL-4	Switch IgE Pro-allergique Anti-parasitaire	220,403,404,405,406,407
T _{H17}	IL-6/TNF-α OX40/OX40L	Maintien du profil T _{H17} Switch T _{reg} /T _{H17}	Neutrophilie Favorise l'EAE Pro-tumoral	409,410,411
T _{reg}	T _{reg} IL-9 ⁺ Dégranulation IL-6 OX40/OX40L	Pro-régulateur Switch T _{reg} /T _{H17}	Tolérance/Rejet d'allogreffes Pro-tumoral Anti-allergique	135,412,413,414,415,416,417,418
T _{FH}	UV IL-10	Baisse de sécrétion d'IL-21 et d'expression de Bcl-6	Pas de centre germinatif Pas de production d'anticorps	419

Code de champ modifié

Code de champ modifié

Tableau 5. Effet des mastocytes sur la réponse T_H.

b. L'impact de la modulation des lymphocytes T_H sur la physiopathologie.

L'implication dans les réactions allergiques.

Lors d'une réaction allergique, la dégranulation des mastocytes permet la libération d'autres médiateurs impliqués dans la réponse T_{H2}. Il est intéressant de spéculer que chez l'homme, la libération massive de PGD2 par les mastocytes, lors d'un processus allergique, amplifie dramatiquement la réaction en favorisant la sécrétion de cytokines par les lymphocytes T_{H2}. De nombreux travaux visant à mieux comprendre les phénomènes allergiques ont pu mettre en évidence un rôle crucial des mastocytes dans l'initiation du processus. La présence d'un allergène induit la dégranulation des mastocytes et donc la libération de nombreux médiateurs préformés tels que l'IL-6 et le TNF-α qui vont permettre un recrutement massif

de neutrophiles et de cellules présentatrices d'antigènes au site inflammatoire. Il a été démontré qu'après injection sous-cutanée d'un antigène et d'adjuvants, les mastocytes activés par leurs récepteurs FcεRI éduquent les CD au site inflammatoire qui, sous l'action des médiateurs mastocytaires, vont acquérir la capacité de différencier les lymphocytes T dans le ganglion drainant, en cellules productrices d'IL-4⁴²⁰. En plus de libérer de l'IL-4 et de l'IL-5, Les mastocytes sécrètent aussi de l'IL-13 qui va induire un switch isotypique des lymphocytes B présents dans le ganglion drainant et permettre la production d'IgE. Ces derniers viendront en retour fixer les allergènes et activer de nouveau les mastocytes, permettant ainsi une boucle d'amplification du processus allergique^{219,421}.

Cependant, certaines populations de lymphocytes peuvent en retour réguler l'activation des mastocytes, c'est le cas des lymphocytes T_{reg}. Des souris déficientes en T_{reg} développent une susceptibilité accrue aux hypersensibilités immédiates provoquées par la dégranulation mastocytaire⁴¹⁸. En effet, il a été observé que la coculture entre des lymphocytes T_{reg} et des mastocytes réduit les capacités de dégranulation de ces derniers. Ce phénomène est indépendant de la sécrétion d'IL-10 ou de TGF-β mais est induit par l'interaction physique entre les deux cellules, *via* l'axe OX40/OX40L. Le mastocyte ainsi stimulé va réduire le taux d'expression de ses récepteurs FcεRI, augmenter sa concentration cytosolique d'AMPc et réduire les éventuels influx calciques^{417,418}. Les T_{reg} jouent donc un rôle important dans les réactions d'hypersensibilité immédiate en interagissant avec les mastocytes pour freiner leur dégranulation.

L'implication dans l'immunité anti-parasitaire.

La réponse des mastocytes aux IgE peut avoir un effet bénéfique, c'est le cas lors des infections parasitaires. L'induction d'une réponse T_{H2} est primordiale dans la lutte contre les infections par les helminthes. Les souris KIT^{w/w-v} ont une plus grande sensibilité à ces infections notamment due à une trop faible induction de réponse T_{H2}. On observe la même susceptibilité si l'on traite des souris KIT^{w/w-v} MC *knock in* avec du cromoglycate sodium qui inhibe la dégranulation mastocytaire²²². Durant ce type d'infection, les mastocytes agissent à plusieurs niveaux, notamment ils amplifient la réponse T_{H2} ainsi que la production d'IgE, qui sont des éléments clés du contrôle de l'infection parasitaire^{221,422} (**Tableau 5**).

Les mastocytes jouent donc plusieurs rôles importants dans la modulation de la réponse de type T_H2 . Ils peuvent être délétères dans les processus allergiques, mais ils peuvent aussi jouer un rôle bénéfique lors d'infections à caractère parasitaire.

L'implication dans l'EAE.

L'EAE est un modèle d'étude chez la souris mimant la sclérose en plaque développée par l'homme. De manière surprenante, dans un modèle murin d'EAE active dans des souris MC *knock in*, la production d'IL-4 par les mastocytes favorise l'apparition de lymphocytes T_H1 encéphalitogènes et contribue de ce fait à la sévérité de la maladie. Dans ces travaux, la sécrétion d'IL-4 par les mastocytes semble être régulée négativement par le facteur de transcription Ikaros qui diminue l'accès au locus de l'IL-4 par remodelage de la chromatine⁴⁰⁸.

Les T_H17 sont un sous type de lymphocyte T_H impliqués dans la lutte antifongique, dans de nombreux processus inflammatoires et certaines maladies autoimmunes comme l'EAE. L'équipe de Carlo E. Pucillo a étudié en détail l'implication des mastocytes dans la réponse T_H17 . Elle a notamment démontré que des lymphocytes T_{reg} cultivés en présence de mastocytes pouvaient changer de phénotype, perdre leurs propriétés suppressives et devenir pro-inflammatoires. Ce phénomène est rendu possible par l'intermédiaire de l'IL-6 et d'une interaction T_{reg} /mastocyte *via* l'axe OX40/OX40L. Il est observé un glissement du phénotype T_{reg} vers un phénotype T_H17 producteur de fort taux d'IL-17. Par ailleurs, d'étroites appositions sont observées entre des lymphocytes T_{reg} produisant de l'IL-6, des lymphocytes T_H17 exprimant OX40 et des mastocytes, dans des coupes de ganglions de souris atteintes d'EAE⁴¹⁰ (**Tableau 5**).

Ces données suggèrent qu'une telle coopération pourrait amplifier la réponse inflammatoire lors d'une pathologie autoimmune telle que l'EAE.

L'implication dans la lutte anti-tumorale.

Comme il a été indiqué dans le chapitre précédent, en interagissant avec les mastocytes, les T_{reg} peuvent aussi acquérir un phénotype T_H17 plus inflammatoire⁴¹⁰. Plus récemment, chez des patients souffrant de lymphomes T angioimmunoblastiques, la même équipe observe un recrutement massif au site tumoral de mastocytes producteurs d'IL-6, qui est corrélé positivement avec la présence de fort taux de lymphocytes T_H17 . Ici encore, d'étroits

contacts sont observés au site tumoral entre des mastocytes producteurs d'IL-6, des T_{reg} et des T_H17⁴¹¹. Chez des patients souffrants de cancers colorectaux, ainsi que dans des modèles murins de polyposes rectocoliques, on observe partiellement ce phénomène. Les mastocytes présents au site tumoral influencent le devenir des lymphocytes T_{reg} présents. Ces derniers vont avoir une production d'IL-10 relativement diminuée et vont sécréter de l'IL-17 au site tumoral⁴¹⁵. En effet, à proximité de mastocytes, les T_{reg} perdent leur propriété importante de contrôle de la prolifération des cellules tumorales⁴¹⁶.

Ces données suggèrent encore une implication des mastocytes dans l'établissement du microenvironnement inflammatoire de tumeurs, en permettant la génération de lymphocytes T_H17 à partir de lymphocytes T_{reg} (**Tableau 5**).

L'implication dans la tolérance.

Les lymphocytes T_{reg} ont un rôle fondamental dans la régulation de la balance homéostasie/inflammation. Ils sont essentiels pour établir une tolérance périphérique lors d'expériences d'allogreffes. Néanmoins, la présence de T_{reg} dans une souris KIT^{w/w-sh} n'est pas suffisante pour inhiber le rejet de greffe, suggérant un rôle des mastocytes dans ce phénomène. En effet, il a été démontré que les T_{reg} attirent les mastocytes jusqu'au site greffé, *via* la sécrétion d'IL-9. La présence de ces mastocytes est alors requise pour une suppression efficace. L'analyse de coupes de tissus a permis de démontrer que ces deux types cellulaires se trouvaient effectivement localisés au même endroit à l'intérieur du greffon⁴¹². Dans un modèle murin de néphrotoxicité, les mastocytes sont recrutés dans les ganglions drainants grâce ici encore, à la sécrétion d'IL-9 par les lymphocytes T_{reg} résidents. Dans ce cas, la présence des mastocytes est nécessaire pour le contrôle de l'inflammation par les T_{reg}¹³⁵. Ces deux exemples indiquent que dans certaines circonstances, les mastocytes peuvent avoir un rôle positif dans la fonction des cellules T régulatrices (**Tableau 5**).

D'autres études ont rapporté que la dégranulation des mastocytes pouvait avoir un effet négatif sur la fonction des T_{reg}. Lors de l'activation par ses récepteurs FcεRI, le mastocyte va libérer un arsenal de médiateurs inflammatoires et notamment de l'histamine. La liaison de cette dernière sur le récepteur H1R présent à la membrane des lymphocytes T_{reg}, va induire une baisse d'expression de la chaîne α du récepteur à l'IL-2 (CD25) et du facteur de transcription FoxP3⁴¹³. Suite à ce changement, les lymphocytes T_{reg} perdent leur fonction immunosuppressive. Dans des expériences *in vivo* de tolérance aux allogreffes, la

dégranulation des mastocytes induit une rupture de tolérance par inhibition des propriétés immunorégulatrices des T_{reg}^{414} . Ces données mettent en évidence le danger de développer une réaction allergique chez un patient ayant subi une allogreffe récente.

Il existe donc un lien étroit entre les mastocytes et les lymphocytes T_{reg} qui passe par une régulation fine et réciproque de leurs fonctions. Lors d'allogreffes, la présence de mastocytes est requise pour que les lymphocytes T_{reg} exercent pleinement leurs fonctions régulatrices. Néanmoins, la dégranulation des mastocytes aboutit à une perte de ces fonctions régulatrices et à une rupture de tolérance.

3-4 L'interaction spécifique entre les mastocytes et les lymphocytes T_H .

a. L'expression des molécules de CMH-II.

Les CPA professionnelles telles que les CD possèdent des molécules de CMH-II et de costimulation leur permettant d'interagir spécifiquement avec les lymphocytes T_H^{305} . Cependant, il existe des CPA dites « non conventionnelles » capables de modifier la réponse T_H en conditions inflammatoires. La possibilité que des mastocytes puissent présenter des déterminants antigéniques, restreints par le CMH-II à des lymphocytes $T CD4^+$ spécifiques, est longtemps restée controversée. Il est classiquement accepté qu'à l'état basal, les mastocytes murins n'expriment pas de molécules de CMH-II. Cette observation est basée sur une étude initialement réalisée sur des mastocytes directement prélevés *ex vivo* du péritoine de souris⁴²³. Plus récemment, l'analyse détaillée du compartiment granulaire du modèle BMMC a permis de détecter la présence de molécules de CMH-II cytoplasmiques. Contrairement à des CPA professionnelles, les BMMC ne semblent pas avoir de compartiment spécialisé dans l'apprêtement des molécules de CMH-II. Ces dernières sont retrouvées accumulées dans les granules dits de type I et de type II (**Figure 3A**). La plupart de ces molécules de CMH-II sont présentes sous une forme immature, encore associées à la chaîne invariante Ii. Enfin, seulement un faible pourcentage de ces molécules est retrouvé à la surface des mastocytes⁸⁰.

b. La présentation d'antigènes.

Des études ont montré que des BMMC peuvent présenter des déterminants antigéniques à des lignées de lymphocytes T ou à des hybridomes, induisant leur prolifération et la production d'IL-2^{424,425,426}. Il a aussi été observé que la capture d'antigène *via* les IgE amplifie les capacités de présentation des BMMC⁴²⁷. Il reste néanmoins une limitation importante à toutes ces études, il est impossible d'exclure une éventuelle contamination des cultures cellulaires par des CPA professionnelles résiduelles (modèles cellulaires peu pertinents). Effectivement, la présence inopportune d'un très faible nombre de CPA, ayant capté l'antigène, suffirait à induire une activation significative des lymphocytes T dans ces expériences.

c. La présence de CPA résiduelles.

Les travaux de Kambayashi *et al.* adressent ce point et décrivent qu'après capture de l'antigène *via* les IgE, les BMMC qui meurent par apoptose, sont phagocytés par les CPA contaminant la culture qui peuvent alors présenter l'antigène aux lymphocytes T *via* leurs molécules de CMH-II. Après avoir méticuleusement éliminé les possibles CPA présentes dans les préparations cellulaires, ils ont testé les capacités de présentation d'antigènes de cultures de BMMC. Ces études relatent qu'en l'absence de CPA, les BMMC ne peuvent pas activer les lymphocytes T, car même s'ils peuvent capturer l'antigène, ils n'expriment pas de molécules de CMH-II (que ce soit au repos ou après traitement avec de l'IL-4, du GM-CSF ou de l'IFN- γ)⁴²⁸.

d. L'objet de mes travaux.

Les données présentes dans la littérature visant à décrire l'activation spécifique des lymphocytes T par les mastocytes restent donc controversées. Alors que certains travaux confirment la possibilité de ce phénomène, en utilisant des modèles de cultures cellulaires approximatifs et trop éloignés de situations physiologiques, d'autres travaux le réfutent en utilisant un modèle de mastocytes relativement immatures, phénotypiquement très différents de mastocytes que l'on peut observer *in vivo*. Ainsi, s'il semble clair que les mastocytes peuvent influencer la réponse immune innée et adaptative par la richesse des médiateurs qu'ils produisent, leur capacité à jouer le rôle de CPA et à peser sur l'activation et la différenciation antigène-spécifique de lymphocytes T_H reste une question cruciale.

Durant ma thèse, j'ai étudié en détail l'interaction spécifique entre les mastocytes et les lymphocytes T CD4⁺, en étant constamment soucieux de la pertinence physiologique des cultures cellulaires utilisées.

Dans un premier temps, j'ai évalué les capacités de présentation d'antigènes de mastocytes primaires murins à des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques lors d'expériences de proliférations cellulaires et d'analyses morphologiques détaillées. J'ai pu apprécier les conséquences d'une telle interaction spécifique sur les capacités des mastocytes à répondre à une stimulation par les récepteurs FcεRI.

Dans un deuxième temps, j'ai analysé l'impact d'une coopération mastocyte humain/lymphocyte T_H mémoire sur la biologie de ces deux partenaires cellulaires. J'ai notamment recherché les conséquences d'une telle interaction sur la réponse T_H engendrée et plus particulièrement sur le profil cytokinique généré. D'autre part, je me suis intéressé à l'implication de ce phénomène dans une situation inflammatoire pathologique : le psoriasis.

RÉSULTATS

1. La coopération entre mastocytes et lymphocytes T_H résulte en la formation d'une synapse immunologique.

En premier lieu nous avons recherché la capacité des mastocytes à jouer le rôle de CPA et à activer les lymphocytes T CD4⁺. Nous avons mené cette étude chez la souris pour pouvoir disposer facilement de lymphocytes T CD4⁺ spécifiques d'un antigène donné. Nous avons utilisé des souris transgéniques OT-II dont le TCR est spécifique du peptide pOVA₃₂₃₋₃₃₉ dérivé de l'ovalbumine. En ce qui concerne les mastocytes, nous avons préféré le modèle des PCMC récemment décrit par Marc Daeron aux classiques BMMC, car ils sont plus matures et donc plus proches de mastocytes susceptibles d'interagir avec les lymphocytes T CD4⁺ *in vivo*. Des techniques de cytométrie en flux et de microscopie confocale nous ont permis de quantifier l'état d'activation de chaque cellule et de disséquer morphologiquement les différentes étapes de l'interaction mastocyte/lymphocyte T_H.

Cell-cell cooperation at the T helper cell/mast cell immunological synapse

Nicolas Gaudenzio,¹ Nicolas Espagnolle,¹ Lennart T. Mars,¹ Roland Liblau,^{1,2} *Salvatore Valitutti,^{1,2} and *Eric Espinosa^{1,2}

¹Inserm, U563, Toulouse; and ²Université Toulouse III Paul-Sabatier, Centre de Physiopathologie de Toulouse-Purpan, Toulouse, France

It has been suggested that mast cells might serve, under certain circumstances, as antigen-presenting cells (APCs) for T cells. However, whether cognate interactions between mast cells and class II-restricted CD4⁺ T cells actually occur is still an open question. We addressed this question by using peritoneal cell-derived mast cells (PCMCs) and freshly isolated peritoneal mast cells as APC models. Our results show that in vitro treatment of PCMCs with interferon- γ and interleu-

kin-4 induced surface expression of mature major histocompatibility complex class II molecules and CD86. When interferon- γ /interleukin-4-primed PCMCs were used as APCs for CD4⁺ T cells, they induced activation of effector T cells but not of their naive counterparts as evidenced by CD69 up-regulation, proliferation, and cytokine production. Confocal laser scanning microscopy showed that CD4⁺ T cells formed immunological synapses and polarized their secretory ma-

chinery toward both antigen-loaded PCMCs and freshly isolated peritoneal mast cells. Finally, on cognate interaction with CD4⁺ T cells, mast cells lowered their threshold of activation via Fc ϵ RI. Our results show that mast cells can establish cognate interactions with class II-restricted helper T cells, implying that they can actually serve as resident APCs in inflamed tissues. (Blood. 2009;114:4979-4988)

Introduction

Mast cells are known to play a pivotal role in allergic hypersensitivity reaction and, more generally, in inflammation.^{1,2} By virtue of their strategic and widespread location in tissues, namely at host-environment interface, and of their functional characteristics, mast cells behave as sentinels of the immune system.³ Once activated, mast cells release several preformed and de novo-synthesized mediators (including histamine, proteases, leukotrienes, prostaglandins, and various cytokines and chemokines), resulting in the recruitment and activation of other immune cells.³

Several lines of evidence highlight an emerging role of mast cells in numerous steps of innate and adaptive immune responses, indicating that their contribution to immunity goes far beyond their well-known role in allergy.³⁻⁸ Functional interplay between mast cells and T cells has been suggested by studies that document colocalization of activated mast cells and T cells in inflamed tissues^{9,10} or involvement of mast cells in autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis and multiple sclerosis.¹¹⁻¹³ Additional lines of evidence show that mast cells can contribute to the development of different T cell-associated responses by influencing the activation, the proliferation, the differentiation, and the recruitment of T cells.^{7,14,15} Recent in vitro studies showed that IgE-activated mast cells can enhance T-cell proliferation by a mechanism involving tumor necrosis factor α (TNF- α) secretion, cell contact, and mast cell expression of OX40L.^{6,7} In turn, it has been shown that activated T cells can induce in vitro histamine, TNF- α , matrix metalloproteinase-9 secretion, and interleukin 4 (IL-4) mRNA expression in mast cell subsets.¹⁶⁻¹⁸ Finally, mast cells have been reported to promote in vivo T-cell migration to inflammatory sites by secreting chemotactic factors, such as lymphotactin and IL-16¹⁹ and to orient Th differentiation via the

production of IL-4 and histamine.^{20,21} Taken together these studies highlight the existence of functionally important mast cell/T-cell crosstalk and raise the question of whether mast cell/T-cell cognate interactions might occur in the course of immune responses.

Immunological synapses (ISs) are the morphologic manifestation of the cognate interactions occurring between T cells and other cells of the immune system serving as antigen-presenting cells (APCs). These specialized areas of signal transduction, formed at the T cell/APC contact site, are characterized by large scale clustering and segregation of surface molecules and intracellular signaling components.²²⁻²⁴ Among the different molecular rearrangements occurring at the IS, the polarization of T-cell Golgi apparatus toward the APCs for polarized secretion is a distinctive, rapid, and efficient T-cell response, occurring within minutes after T cell/APC encounter both in resting and activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells.^{25,27} It is, therefore, considered, together with T-cell receptor (TCR) enrichment into the IS, a morphologic hallmark of specific TCR engagement.

To investigate whether cognate interactions could be established at the contact site between CD4⁺ T cells and mast cells, resulting in the formation of ISs and in T-cell polarization toward the APCs, we used, as potential APCs for ovalbumin (OVA)-specific CD4⁺ (OT-II) T cells, (1) a recently described cellular model (peritoneal cell-derived mast cells, PCMCs) based on the expansion in vitro, for several weeks, of murine peritoneal mast cells,²⁸ and (2) freshly isolated peritoneal mast cells.

Our results show that, after priming with a combination of interferon- γ (IFN- γ) and IL-4, a fraction of PCMCs express mature major histocompatibility complex (MHC) class II molecules,

Submitted February 2, 2009; accepted September 8, 2009. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, October 5, 2009; DOI 10.1182/blood-2009-02-202648.

*S.V. and E.E. contributed equally to this study.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2009 by The American Society of Hematology

present antigenic determinants to OT-II T cells, and elicit functional responses in effector T cells but not in their naive counterparts. We also show the formation of ISs and T-cell polarization at the contact site between T cells and mast cells (both PCMCs and freshly isolated peritoneal mast cells), thus unambiguously illustrating the formation of cognate interaction between these cells. Our results show that, although less efficiently than professional APCs, mast cells can indeed present antigens to T cells, resulting in antigen-dependent cell-cell cooperation.

Methods

Abs and cell-surface immunofluorescence

The following Abs were purchased from eBioscience: fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-FcεRI (MAR-1), FITC-anti-CD40 (HM40-3), PE-anti-CD44 (IM7), FITC-anti-CD117 (ACK2), FITC-anti-CD69 (H1.2F3), FITC-anti-CD80 (16-10A1), phycoerythrin (PE)-anti-CD86 (GL-1), PE-anti-ICOSL (HK53), PE-anti-OX40L (RM134L), FITC-anti-IA^b (M5/114), PE-anti-Vα2 (B20.1), anti-4-1BBL (TKS-1), FITC-anti-rat IgG, and isotype-matched control Ig. Biotinylated anti-IA^b mAb (KH74) was purchased from BioLegend. In direct immunofluorescence experiments, cells were blocked with 2.4G2 hybridoma supernatant for 15 minutes at 4°C (gift from Dr Joost van Meerwijk, Inserm U563); otherwise, cells were blocked with phosphate-buffered saline (PBS) containing 10% normal goat serum and 10% normal mouse serum. Antibodies were added in PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA) and incubated for 30 minutes at 4°C. Flow cytometric data were acquired on a BD FACScan cytometer with the use of BD CellQuest software (Version 4.0) and were analyzed with the use of FlowJo software (Version 7.2.5; TreeStar Inc).

Mice

C57BL/6 male C57BL/6 OT-II mice aged 6 to 12 weeks old and synthetic peptide corresponding to amino acid residues 323 to 339 (ISQAVHAAHAEINEAGR) of ovalbumin (OVA) were kindly provided by Dr S. Guerdier (Inserm U563). All mice used in this study were raised and housed under specific pathogen-free conditions and handled according to protocols approved by the Inserm Ethics Committee on Animal Experimentation in compliance with European Union guidelines.

Generation of PCMCs

Peritoneal cells from C57BL/6 mice were collected by peritoneal washing with 4 mL of RPMI 1640. Cells were washed and seeded in a 24-well culture plate at 10⁶/mL in Opti-MEM supplemented with 10% FCS, 100 IU/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin (Invitrogen), 3% supernatant of Chinese hamster ovary transfectants secreting murine stem cell factor (a gift from Dr P. Dubreuil, Inserm U891). Twenty-four hours later, nonadherent cells were removed, and fresh culture medium was added to adherent cells. Three days later, nonadherent cells and adherent cells harvested by flushing were pelleted and resuspended (3 × 10⁶/mL) in fresh culture medium. The same procedure was repeated twice a week. Cells were used for experiments between week 4 and week 10. PCMCs were characterized by histochemistry: cell suspensions were cytocentrifuged onto glass slides, air-dried, and stained with toluidine blue or Alcian blue followed by Safranin.²⁹

Ex vivo peritoneal mast cells

Peritoneal cells from 20 C57BL/6 mice were collected by peritoneal washing. Nonadherent cells were washed in magnetic-activated cell sorting buffer, and CD117⁺ cells were positively selected by using CD117 MicroBeads (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's protocol. Mast cell-enriched cell population was immediately primed with 50 ng/mL IFN-γ and 10 ng/mL IL-4 for 72 hours in complete Opti-MEM and used as APCs.

Degranulation assay

Mast cell degranulation was determined by measuring the release of β-hexosaminidase. PCMCs were incubated in culture medium with or without anti-dinitrophenol (DNP) IgE (0.5 μg/mL SPE-7; Sigma-Aldrich) overnight at 37°C. The cells were then washed and distributed in 96-well flat-bottom plates at a density of 10⁵ cells in 50 μL of Tyrode buffer. The cells were adapted to 37°C for 20 minutes and then treated with prewarmed 50 μL of the mentioned stimuli diluted in Tyrode buffer for 45 minutes at 37°C. β-Hexosaminidase release in the supernatants was measured according to Bachelet et al.³⁰

Confocal microscopy

Effector CD4⁺ OT-II T cells (10⁵) were plated with APCs (2 × 10⁵) either unpulsed or pulsed with 10 μg/mL OVA or 400 μg/mL ovalbumin in 96-well U-bottom plates and spun to 500 rpm to allow conjugates formation. The cells were transferred onto poly-L-lysine-coated slides and then fixed with 4% paraformaldehyde in PBS. Cells were first permeabilized and blocked in 10% normal goat serum/10% normal mouse serum in PBS containing 0.5% saponin. Cells were stained with the following primary antibodies in PBS containing 1% BSA, 0.5% saponin 45 minutes at room temperature: anti-IFN-γ (clone AN-18), anti-CD3ε (clone 17A2), anti-p56^{lck} (clone 28/lck) from BD Pharmingen; polyclonal anti-protein kinase C (PKC) θ (Santa Cruz Biotechnology Inc); and anti-α-tubulin (clone DM1A; Sigma-Aldrich). In some experiments, 2 μg/mL avidin-sulforhodamine 101 (highly cationic glycoprotein that selectively stains mast cell granules^{31,32}; Sigma-Aldrich) was added to unambiguously identify mast cells. After washing, secondary antibodies (Alexa Fluor-conjugated; Invitrogen) were applied in PBS containing 1% BSA, 0.5% saponin. In some experiments, PCMCs were labeled with anti-mast cell tryptase polyclonal rabbit Ab (Santa Cruz Biotechnology Inc). The samples were mounted and examined with the use of a Zeiss LSM 510 or a Zeiss LSM 710 confocal microscope with a 63× Plan-Apochromat objective (1.4 oil), electronic zoom 3, as described.²⁷ Scoring of the slides was performed in a blinded fashion by evaluating for each condition at least 100 conjugates in randomly selected fields from at least 3 independent experiments.

Results

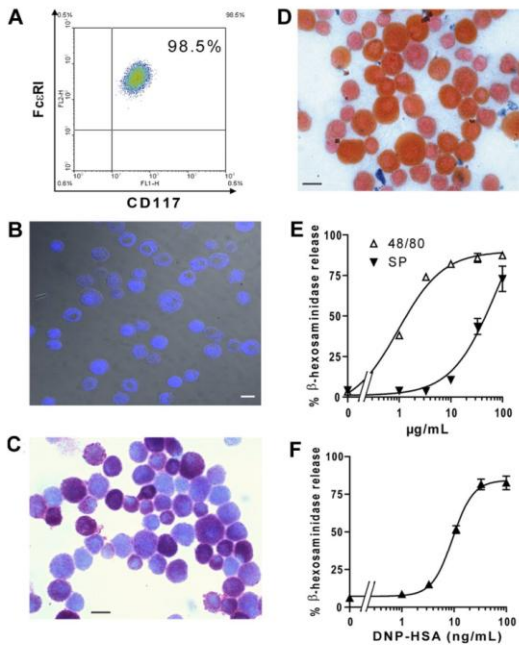
Phenotypic and functional characterization of murine PCMCs

Cells obtained from peritoneal washing of C57BL/6 mice were cultured in the presence of stem cell factor to generate PCMCs as described by Malbec et al.²⁸ After 1 month in culture, more than 98% of the cells expressed on their surface characteristic markers of mast cells, such as FcεRI and CD117 (Figure 1A), and stained positive for mast cell tryptase (Figure 1B) as previously described for PCMCs.²⁸ None of these cells were positive for B220 or CD11c (data not shown).

PCMCs were further characterized by toluidine blue staining and Alcian blue/safranin staining, a procedure commonly used to discriminate mast cells of the mucosal type (Alcian blue high, safranin low) from connective tissue-type mast cells (CTMCs; Alcian blue low, safranin high^{29,33}). Toluidine blue staining for metachromatic granules was positive, with approximately 40% of the cells showing a stronger staining compared with the remaining cells (Figure 1C). Alcian blue/safranin staining showed that all PCMCs counterstained red with safranin, whereas they were either negative or faintly positive for Alcian blue, indicating that these cells were mostly of the CTMC-like phenotype (Figure 1D). Interestingly, similarly to toluidine blue staining, also safranin staining was heterogeneous: approximately 40% of the PCMCs exhibited a stronger safranin staining than did the remaining cells (Figure 1D). Taken together toluidine blue and safranin staining suggested that, among the PCMCs, approximately 40% of cells had

Figure 1. Phenotypic and functional characterization of PCMCs.

(A) CD117 and FcεRI expression on PCMC surface. The number in the top right indicates the percentage of double-positive cells. (B) Mast cell tryptase staining by indirect immunofluorescence with an Alexa 633-conjugated secondary Ab (blue). Samples were inspected with a confocal laser-scanning microscope. (C-D) Histochemical staining of PCMCs with toluidine blue (C) or Alcian blue followed by safranin (D). Bars = 10 μm. (E) Secretagogue-induced β-hexosaminidase release. PCMCs were stimulated with increasing concentrations of Substance P or compound 48/80 for 30 minutes at 37°C. (F) FcεRI-dependent β-hexosaminidase release. PCMCs were sensitized with mouse IgE anti-DNP and challenged with DNP-HSA. The percentage of β-hexosaminidase released was plotted against the concentration of the stimulus. Tests for phenotypic and functional analysis of PCMCs were routinely performed after 3 to 5 weeks of culture. Data are from 1 representative experiment of 3.



a more mature phenotype, characterized by a higher content of mature secretory granules.

We next investigated PCMC biologic function by using a standard degranulation assay. We used 2 classes of stimuli: polycationic compounds, such as compound 48/80 and substance P, that induce degranulation specifically in CTMCs (and not in mucosal-type mast cells) or antigen (dinitrophenylated human serum albumin [DNP-HSA]) in IgE-sensitized mast cells. When PCMCs were incubated with increasing concentrations of 48/80 or substance P, they exhibited a strong and dose-dependent degranulation as detected by β-hexosaminidase release (Figure 1E). Moreover, PCMCs, previously sensitized with anti-DNP IgE, degranulated in a dose-dependent fashion when incubated with increasing concentrations of DNP-HSA (Figure 1F). Together these results indicated that PCMCs exhibit connective tissue mast cell functional properties.

Treatment with IFN-γ and IL-4 induces MHC class II molecule expression on PCMC surface

Having phenotypically and functionally characterized PCMCs, we used these cells to investigate whether they could be primed to become APCs for class II-restricted T lymphocytes.

PCMCs expressed neither surface MHC class II molecules nor costimulation molecules (Figure 2). We thus investigated whether these cells might be induced to express class II molecules by using treatments known to prime conventional APCs. Treatment of PCMCs with Toll-like receptor ligands (different lipopolysaccharide preparations from Gram-negative bacteria, peptidoglycan, poly I:C, lipoteichoic acid) added to PCMCs for 24, 48, 72, or 96 hours did not result in a detectable increase in I-A^b expression (data not shown).

We next tested whether IFN-γ and IL-4 could induce I-A^b on the PCMC surface. After 72 hours of culture with 50 ng/mL IFN-γ, a significant fraction of PCMCs (20%-35%) expressed I-A^b (Figure 2A-B). Interestingly, although the addition of 10 ng/mL IL-4 alone to PCMC cultures did not affect I-A^b expression level, it increased the frequency of IFN-γ-induced MHC class II expression, resulting in 40% to 50% MHC class II⁺ PCMCs (Figure 2A-B). Moreover, the level of I-A^b expression per cell was also significantly increased. I-A^b expression was assessed by using 2 different monoclonal antibodies: M5/114 that recognizes mature and immature forms of MHC class II molecules and KH-74 that mainly binds mature forms of MHC class II.³⁴ Under these conditions, although individual class II⁺ PCMCs expressed fairly high levels of I-A^b, approximately 50% of the PCMC population remained I-A^b negative (Figure 2A-B).

We next investigated by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis whether IFN-γ plus IL-4 could induce the expression of costimulatory molecules. Untreated PCMCs were negative for several costimulation molecules: CD80, CD86, CD40, ICOSL, 4-1BB-L, and OX40L (Figure 2; supplemental Figure 1, available on the *Blood* website; see the Supplemental Materials link at the top of the online article). Treatment with IFN-γ plus IL-4 resulted in the up-regulation of the surface expression of CD86 (Figure 2C) but did not enhance the expression of the other costimulation molecules tested (supplemental Figure 1). To test whether the PCMC population used in this study, although expressing phenotypic and histochemical markers of mast cells, could result from the skewing of peritoneal mast cells toward monocytes, we measured the surface expression of CD11b and F4/80 before and after treatment with IFN-γ plus IL-4. This analysis showed that neither untreated PCMCs nor cytokine-treated

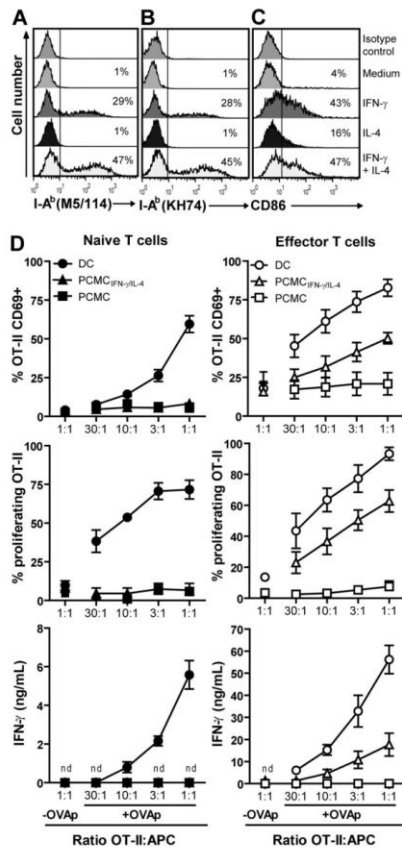


Figure 2. IFN- γ /IL-4-primed PCMCs express MHC class II and CD86 and induce functional responses in effector OT-II T cells but not in their naive counterparts. (A-C) PCMCs were incubated 72 hours with IFN- γ (50 ng/mL) or IL-4 (10 ng/mL) or with IFN- γ + IL-4. CD86 and I-A^b molecule expression (using the KH74 or M5/114 mAb) was analyzed by flow cytometry. The numbers inside the panels indicate the percentage of positive cells. Data are representative of at least 10 experiments. (D) APCs were pulsed or not for 16 hours with 10 μ g/mL OVAp and cocultured with naive (left) or effector (right) OT-II T cells. OT-II T-cell activation was monitored by CD89 expression (after 20 hours of coculture), IFN- γ production (after 20 hours of coculture), and proliferation (after 72 hours of coculture). Results are presented as mean \pm SEM of 4 independent experiments. nd indicates not detected.

PCMCs expressed detectable levels of CD11b and of F4/80, ruling out the contribution of monocyte-like cells to the T-cell activation we observed (supplemental Figure 2). Together the above-mentioned results indicate that a fraction of the whole PCMC population treated with IFN- γ plus IL-4 (further referred to as PCMCs_{IFN- γ /IL-4}) develop into potential APCs.

PCMCs_{IFN- γ /IL-4} can serve as APCs for CD4⁺ T lymphocytes

To examine the antigen-presenting function of PCMCs, we investigated whether they could present the OVAp to CD4⁺ T cells from OT-II TCR transgenic mice. When freshly purified naive OT-II T cells were cocultured overnight with unprimed PCMCs or with

PCMCs_{IFN- γ /IL-4} either unpulsed or pulsed with OVAp at different T cell/APC ratios, they did not undergo detectable up-regulation of the T-cell activation marker CD69. Accordingly, neither proliferation nor IFN- γ production (measured after 3 days of coculture) was detected (Figure 2D). Conversely, these cells exhibited CD69 up-regulation, proliferation, and IFN- γ production when cocultured with OVAp-pulsed mature dendritic cells (DCs; Figure 2D).

We next tested whether PCMCs_{IFN- γ /IL-4} could serve as APCs for effector T cells. To this end, OT-II T cells were expanded with anti-CD3/anti-CD28 coated beads for 8 to 10 days before coculture with PCMCs_{IFN- γ /IL-4} or mature DCs either unpulsed or pulsed with OVAp. These previously activated T cells exhibited effector T-cell phenotype CD62L⁺CD44^{hi} (data not shown). As shown in Figure 2D, effector OT-II T cells up-regulated CD69, proliferated and produced IFN- γ when interacting with OVAp-pulsed DCs, and, although to a lesser extent, also with OVAp-pulsed PCMCs. Similar results were obtained when IL-2 production was measured; conversely, in the same conditions, we did not detect IL-4 production by OT-II T cells (data not shown). Peptide-pulsed PCMCs not primed with IFN- γ and IL-4 were unable to induce detectable responses in the same OT-II T-cell population (Figure 2D).

To further characterize the APC potential of PCMCs we investigated whether they could capture and process ovalbumin. PCMCs_{IFN- γ /IL-4} or DCs were incubated 16 hours with ovalbumin alone or with ovalbumin complexed with IgG, and their capacity to process and present ovalbumin was assessed by measuring CD69 up-regulation in effector OT-II T cells. As shown in Figure 3A and B, PCMCs_{IFN- γ /IL-4} incubated with a high concentration of ovalbumin (400 μ g/mL) efficiently activated OT-II T cells to CD69 up-regulation, indicating that PCMCs_{IFN- γ /IL-4} can internalize and process native antigens. When incubated with a lower concentration of ovalbumin (30 μ g/mL) in the presence of irrelevant rabbit IgG, PCMCs_{IFN- γ /IL-4} failed to induce CD69 up-regulation in OT-II T cells. Conversely, PCMCs were able to present the antigenic determinant to OT-II T cells when pulsed with the same concentration of ovalbumin complexed with anti-ovalbumin IgG, indicating that PCMCs_{IFN- γ /IL-4} can uptake antigens via an IgG-assisted mechanism. Similar results were obtained when T-cell proliferation (Figure 3C) and IFN- γ production (Figure 3D) were measured, indicating that the activation of OT-II T cells by PCMCs presenting a native antigen is not limited to CD69 up-regulation.

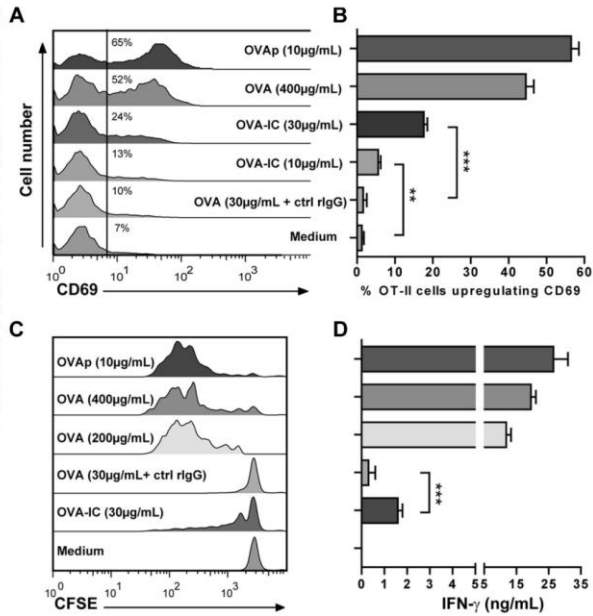
These results show that PCMCs_{IFN- γ /IL-4} can capture and process native antigens and can present antigenic peptides to effector CD4⁺ T lymphocytes, leading to cytokine production and proliferation.

ISs and T-cell polarization responses at the mast cell/T-cell contact site

Taken together the above-mentioned results show that IFN- γ /IL-4-primed PCMCs can activate CD4⁺ T cells in an antigen-dependent fashion. These observations do not formally rule out the possibility that bystander professional APCs (possibly present as contaminants of T-cell purification) could uptake antigenic determinants and in turn present them to T cells.³⁵

To address this point we aimed to directly visualize T cell/PCMC cognate interactions. In a first round of experiments we measured the formation of conjugates between OT-II T cells and PCMCs_{IFN- γ /IL-4} by FACS analysis. As shown in supplemental Figure 3, OT-II T cells formed stable conjugates with PCMCs_{IFN- γ /IL-4} (lasting up to 1 hour). Conjugate formation was more pronounced with antigen-pulsed PCMCs than with unpulsed PCMCs_{IFN- γ /IL-4} (supplemental Figure 3).

Figure 3. IFN- γ /IL-4-primed PCMCs can capture and process of protein antigen. (A-D) IFN- γ /IL-4-primed PCMCs were incubated for 16 hours with soluble OVA, OVA-IgG immune complexes (ICs), or soluble OVA in the presence of control rabbit IgG (ctrl rlgG) or OVAp. (A-B) Cells were cocultured with effector OT-II T cells for 16 hours, and CD69 up-regulation on OT-II T-cell surface was measured by FACS analysis on V α 2⁺ gated cells. (A) FACS profiles representative of 3 independent experiments. The numbers inside the panel indicate the percentage of positive cells. (B) Data are presented as percentage of V α 2⁺ gated cells up-regulating CD69 (mean \pm SEM of 3 independent experiments). (C) Proliferation of T cells was monitored by carboxyfluorescein succinimidyl ester dilution after 72 hours of coculture. Panels show FACS profiles from 1 representative experiment of 3. (D) IFN- γ in supernatant was dosed by ELISA after 16 hours of coculture (mean \pm SEM of 3 independent experiments). Difference between groups was evaluated by an unpaired Student *t* test with the GraphPad Prism software. It should be noted that DCs were more efficient than PCMCs in inducing functional responses to whole ovalbumin in OT-II T cells. Approximately 95% of T cells proliferated when cultured with DCs previously incubated with OVA (400 μ g/mL) and approximately 85% of T cells proliferated when cultured with DCs previously incubated with IgG-OVA (30 μ g/mL). IFN- γ production by OT-II T cells when cultured with DCs pulsed with OVA (400 μ g/mL) or IgG-OVA (30 μ g/mL) was approximately 50 ng/mL and approximately 10 ng/mL, respectively.



We next investigated by confocal microscopy the capacity of OT-II T cells to form ISs with PCMCs. To this end, OT-II T cells were cocultured with PCMCs_{IFN- γ /IL-4} for 20 minutes and stained with anti-phosphotyrosine (PTyr) antibodies to detect PTyr staining (an early marker of signaling at the IS²⁷) and with Alexa 488-labeled phalloidin (to detect F-actin). Confocal microscopy analysis showed that OT-II T cells interacting with ovalbumin-pulsed PCMCs_{IFN- γ /IL-4} exhibited F-actin (~37% of scored conjugates) and PTyr enrichment (~22% of scored conjugates) at the synaptic area (supplemental Figure 4).

To further characterize T-cell activation during interaction with PCMCs, compared with the activation induced by professional APCs, we focused on later steps of the TCR-mediated signaling cascade. OT-II T cells were cocultured with PCMCs_{IFN- γ /IL-4} or mature DCs (either unpulsed or OVAp-pulsed) for 2.5 hours; cells were fixed, permeabilized, and stained with anti-PKC θ , anti-tubulin, and anti-IFN- γ antibodies to detect sustained signaling at the ISs and polarization of the T-cell secretory machinery toward the APCs. As shown in supplemental Figure 5, T cells interacting with OVAp-pulsed DCs exhibited enrichment of PKC θ (~60% of scored conjugates) and polarization of IFN- γ secretion (~40% of scored conjugates) toward the APCs. Interestingly, also at the T cell/PCMC contact site a significant number of conjugated T cells enriched PKC θ and polarized IFN- γ toward PCMCs (~33% enriched PKC θ and ~16% enriched PKC θ and polarized IFN- γ of 300 total scored T cells from 3 independent experiments, Figure 4). The above-mentioned results show that, among OT-II T cells exhibiting an enrichment of PKC θ at the IS, a limited fraction only polarized IFN- γ toward PCMCs. This observation can be explained by the fact that the T-cell lines were expanded in nonpolarizing conditions; thus, only a fraction of T cells was of the Th1 phenotype. In some experiments, to better show the establish-

ment of functional ISs between mast cells and T cells, cell conjugates were simultaneously stained with anti-PKC θ , anti-IFN- γ , and avidin-sulforhodamine 101 (which stains mast cell granules^{31,32}). This triple staining unambiguously showed T cell/mast cell cognate interactions (supplemental Figure 6). Similar results were obtained when mast cell tryptase staining was used to identify PCMCs (data not show).

To define whether the observed directionality of the T cell/PCMC interactions was due to specific TCR engagement at the IS, we stained cell conjugates with antibodies directed against the TCR/CD3 complex (anti-CD3 ϵ antibodies) and with antibodies against p56^{lck} (a key signaling component of the TCR-mediated signaling cascade). As shown in Figure 5, in a significant fraction of conjugated T cells TCR/CD3 and p56^{lck} were enriched at the contact site with OVAp-pulsed PCMCs (~40% enriched both CD3 ϵ and p56^{lck} of ~300 total scored T cells from 3 independent experiments).

To further document the formation of cognate interactions between OT-II T cells and PCMCs, we investigated the enrichment of PKC θ at the IS and the polarization of the T-cell secretory machinery in conditions in which PCMCs_{IFN- γ /IL-4} had captured and processed ovalbumin. As shown in Figure 6, OT-II T cells interacting with PCMCs previously incubated for 16 hours with 400 μ g/mL ovalbumin (and identified by avidin-sulforhodamine 101 staining) exhibited an enrichment of PKC θ (~35%) and IFN- γ -polarized secretion (~25%) toward the antigen-presenting PCMCs.

Finally, we used an additional ex vivo model to investigate T cell/mast cell cognate interactions. In a first set of experiments, freshly isolated peritoneal mast cells were tested for their capacity to activate OT-II T cells. As shown in supplemental Figure 7,

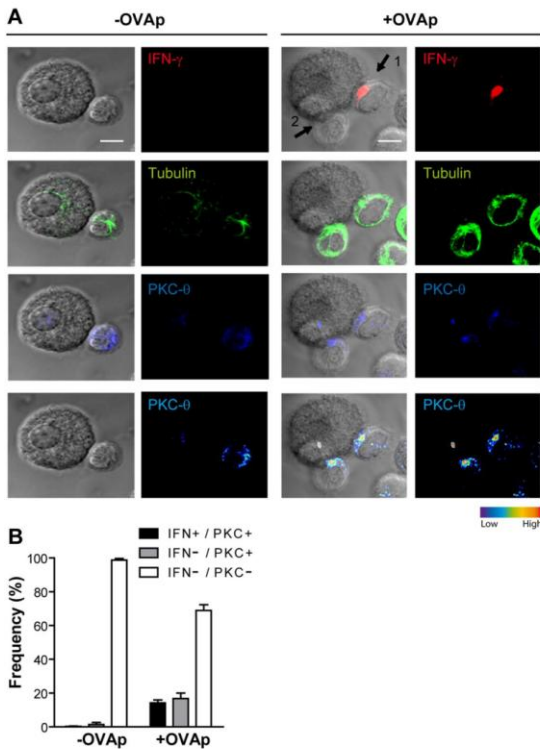


Figure 4. CD4⁺ T cells polarize their secretory machinery toward IFN- γ /IL-4-primed PCMCs. IFN- γ /IL-4-primed PCMCs were pulsed or not with 10 μ g/mL OVAp. After washing, APCs were cocultured with effector OT-II T cells for 10 minutes. Cells were settled onto polylysine-coated slides; fixed; and stained for tubulin, PKC θ , and IFN- γ ; and analyzed by confocal laser scanning microscopy. (A) Representative staining for IFN- γ (red), tubulin (green), and PKC θ (blue) of a PCMC_{IFN- γ /IL-4}/OT-II T-cell conjugate, each staining is represented alone or merged with DIC images; PKC θ staining is also shown as pseudocolor intensity. Arrow 1 points to a synapse where IFN- γ is polarized toward the PCMCs and PKC θ is enriched at the OT-II T cell/PCMC contact site; arrow 2 points to a synapse where PKC θ only is enriched. (B) OT-II T-cell/PCMC conjugates were randomly selected and scored for the recruitment of PKC θ to the cell-cell contact site either alone or in combination with IFN- γ polarization. ■ indicates conjugates exhibiting recruitment of PKC θ alone; ■, conjugates exhibiting polarization of both PKC θ and IFN- γ ; □, conjugates exhibiting neither PKC θ nor IFN- γ polarization. Approximately 100 conjugates were analyzed per experiment. Histograms represent means \pm SEM of 3 independent experiments. Bar = 5 μ m.

interaction of OT-II T cells with freshly isolated mast cells, primed with IFN- γ and IL-4 (under the same conditions as PCMCs) and pulsed with OVAp, resulted in T-cell activation to IFN- γ production and proliferation. We next investigated whether freshly isolated peritoneal mast cells could form ISs with OT-II T cells. Freshly isolated mast cells were IFN- γ /IL-4 primed, cocultured 16 hours with 400 μ g/mL ovalbumin, and conjugated for 2.5 hours with OT-II T cells. In these conditions we detected an enrichment of PKC θ (~36%) and polarization of IFN- γ secretion (~20%) toward mast cells (Figure 6), comparable with that observed in OT-II T cells interacting with PCMCs, thus validating the use of PCMCs as a model of antigen-presenting mast cells.

Together these results show that CD4⁺ T cells form ISs and polarize their secretory machinery toward both peptide-loaded and native antigen-loaded mast cells, providing the first morphologic evidence in support of a role of mast cells as APCs for T lymphocytes.

PCMCs are functionally activated during cognate interaction with OT-II T cells

To investigate whether PCMCs are functionally activated during cognate interaction with OT-II T cells, we evaluated the effect of antigen-specific T cell/PCMC interactions on DNP-HSA-induced granulation of IgE-sensitized mast cells. As shown in Figure 7A and B,

PCMCs_{IFN- γ /IL-4} pulsed with OVAp and cocultured with effector OT-II exhibited lower threshold responses to DNP-HSA stimulation than did unpulsed PCMCs_{IFN- γ /IL-4}. Moreover, PCMCs_{IFN- γ /IL-4} increased their surface expression of the activation marker CD69 after cognate interaction with OT-II T cells (Figure 7C). CD69 up-regulation could not be mimicked by supernatant from activated OT-II cells, indicating that PCMC_{IFN- γ /IL-4} activation is not mediated by soluble factors but results from cell-cell contact.

Taken together the above-mentioned results indicate that, on cognate interaction with helper T cells, PCMCs receive stimulatory signals that enhance their biologic functions.

Discussion

In the present study we used PCMCs and freshly isolated peritoneal mast cells, primed with IFN- γ and IL-4, as potential APCs for CD4⁺ T cells. We report that cognate interactions are formed between mast cells and effector CD4⁺ T cells, resulting in their activation.

It was previously reported that mouse bone marrow-derived mast cells (BMMCs) could synthesize functional class II molecules³⁶ and could present antigenic peptides to CD4⁺ T-cell hybridoma.³⁷ However, a recent study by Kambayashi et al³⁵

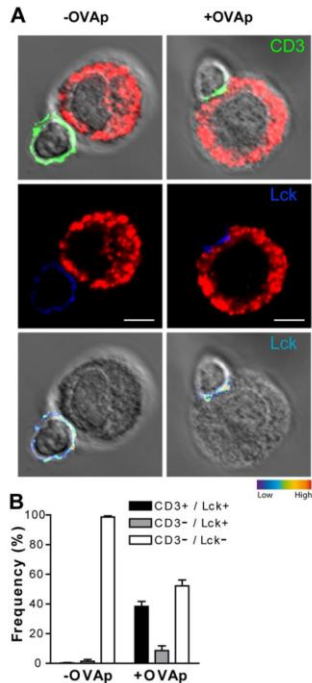


Figure 5. Enrichment of TCR/CD3 complex and of p56^{lck} at the T cell/PCMC_{IFN-γ/IL-4} contact site. IFN-γ/IL-4-primed PCMCs were pulsed or not with 10 μg/mL OVAp. After washing, APCs were cocultured with effector OT-II T cells for 10 minutes. Cells were settled onto polylysine-coated slides, fixed, and stained for mast cell granules with avidin-sulforhodamine 101 (red), CD3ε (green), and p56^{lck} (blue). (A) Representative staining for CD3ε (green), and p56^{lck} (blue) of a PCMC_{IFN-γ/IL-4}/OT-II T-cell conjugate. Staining is represented merged with DIC images; p56^{lck} staining is also shown as pseudocolor intensity. (B) OT-II T cell/PCMC conjugates were randomly selected and scored for the recruitment of p56^{lck} to the cell-cell contact site either alone or in combination with CD3ε. ■ indicates conjugates exhibiting recruitment of p56^{lck} alone; ■, conjugates exhibiting polarization of both p56^{lck} and CD3ε; □, conjugates exhibiting neither p56^{lck} nor CD3ε polarization. Approximately 100 conjugates were analyzed per experiment. Histograms represent means ± SEM of 3 independent experiments. Bar = 5 μm.

casted doubts on the possibility that BMDCs might present antigens to CD4⁺ T cells, by showing that, although BMDCs could uptake antigens, they did not express functional class II molecules on their surface. That study also showed that activation of CD4⁺ T cells by antigen-loaded BMDCs was indirect and depended on cross-presentation of Ag determinants by adjacent DCs after phagocytosis.³⁵ More recently, the same investigators reported that BMDCs can, under certain circumstances, activate CD4⁺ T cells via direct antigen presentation, thus reproposing the issue of direct antigen presentation by mast cells.³⁸ In addition, recent studies, by showing that basophils, which are closely related to mast cells, can serve as APCs are able to initiate T helper type 2 responses, support the idea that “nonconventional” APCs can play a central role in the development of adaptive immune-responses.³⁹⁻⁴¹

Our results extend these previous studies and provide experimental evidence of direct antigen presentation by mast cells at the single-cell level by (1) showing antigen presentation by PCMCs, a cellular system that more closely mimics tissue mast cells²⁸;

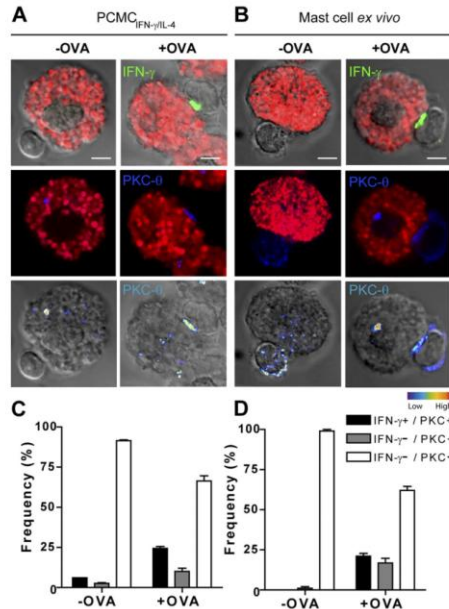


Figure 6. IFN-γ/IL-4-primed PCMCs and freshly isolated mast cells process whole ovalbumin and form functional ISs. IFN-γ/IL-4-primed PCMCs (A) or IFN-γ/IL-4-primed peritoneal mast cells (B) were pulsed or not for 16 hours with 400 μg/mL ovalbumin. After washing, APCs were cocultured with effector OT-II T cells for 2.5 hours. Cells were fixed, permeabilized, and stained for mast cell granules with avidin-sulforhodamine 101 (red), PKCθ (blue), and IFN-γ (green) and analyzed by confocal laser scanning microscopy. (Top) IFN-γ (green) and avidin-sulforhodamine 101 (red) are merged with DIC images; (middle) avidin-sulforhodamine 101 (red) and PKCθ staining (blue) are shown; (bottom) PKCθ staining is shown as pseudocolor intensity merged with DIC images. (C-D) For each condition, OT-II T-cell/APC conjugates were randomly selected and scored for the recruitment of PKCθ to the cell-cell contact site either alone or in combination with IFN-γ polarization. ■ indicates conjugates exhibiting recruitment of PKCθ alone; ■, conjugates exhibiting polarization of both PKCθ and IFN-γ; □, conjugates exhibiting neither PKCθ nor IFN-γ polarization. Approximately 50 conjugates were analyzed per experiment. Histograms represent means ± SEM of 3 independent experiments. Bar = 5 μm.

(2) presenting the first morphologic evidence of IS formation and T-cell polarization at the T-cell/PCMC contact site; and (3) showing cognate interactions between T cells and freshly isolated peritoneal mast cells.

We present strong morphologic evidence of the antigen-presenting role of individual mast cells. Our results show that T cells exhibit the enrichment of pTyr and F-actin at the contact site with cognate PCMCs, indicating that these early events of IS formation are triggered at the cell-cell interface. We also show the sustained enrichment of PKCθ (a key signaling component of TCR-mediated signal transduction, that is known to translocate for prolonged periods of time at the IS,⁴²⁻⁴⁴ at the T cell/mast cell contact site. Finally, we provide evidence for the polarization of tubulin cytoskeleton and of IFN-γ-filled Golgi apparatus toward mast cells and of CD3 and p56^{lck} enrichment at the T cell/mast cell interface, showing that individual T cells in conjugation with mast cells are specifically activated via their TCR.

In the present study only effector (that have low activation threshold^{45,46}) and not naive OT-II T cells exhibited functional

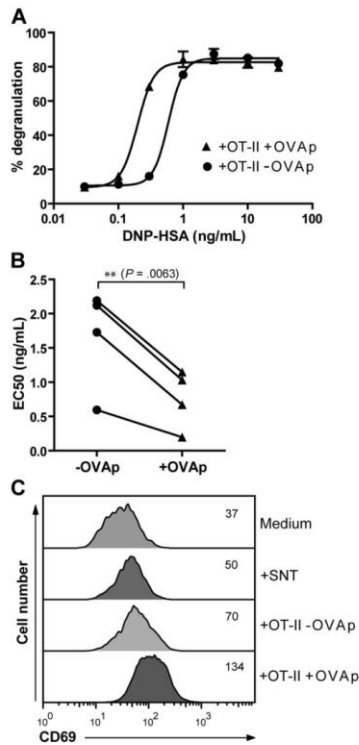


Figure 7. PCMC_{IFN- γ /IL-4} activation after antigen-specific interaction with OT-II T cells. (A-B) PCMC_{IFN- γ /IL-4} either unpulsed or pulsed with 10 μ g/mL OVAp were cocultured with OT-II T cells in the presence of anti-DNP IgE (1 μ g/mL) for 16 hours. (A) Ability to release β -hexosaminidase in response to increasing concentrations of DNP-HSA. Data are from 1 representative experiment of 4 performed in triplicates. (B) EC₅₀ (half maximal effective concentration) of DNP-HSA from 4 independent experiments. Difference between groups was evaluated by a paired Student *t* test by using GraphPad Prism software. (C) PCMC_{IFN- γ /IL-4} either unpulsed or pulsed with 10 μ g/mL OVAp were cocultured with OT-II T cells for 16 hours. In parallel samples PCMCs were treated for 16 hours with supernatant from activated OT-II (SNT; 50%, from OT-II cultured for 6 days with anti-CD3/anti-CD28-coated beads) or medium alone. Expression of CD69 on PCMCs was analyzed by flow cytometry; numbers indicate MFI. Data are from 1 representative experiment of 3.

responses when cocultured with peptide-pulsed PCMCs_{IFN- γ /IL-4}. This selective stimulation of effector cells should be sufficient for an antigen-presenting role of mast cells in vivo, considering their preferential location in tissues and, therefore, their susceptibility to encounter effector lymphocytes.

Our results show that the capacity of mast cells to activate CD4⁺ T cells is quantitatively relevant, as shown by the amount of IFN- γ released after antigen triggering. However, IFN- γ production remained weaker than that obtained using mature DCs. This can be partially explained by the lower level of expression of MHC class II and costimulation molecules on the PCMC surface and by the fact that only a fraction of PCMCs (30%–45%) expressed MHC class II, probably because of the heterogeneity of the PCMC population (Figure 1).

In our cellular model, the best condition to prime PCMCs for MHC class II expression was 3 days of culture in the presence of IFN- γ and IL-4. The role of IFN- γ in positively regulating MHC class I and II expression on different cell types is well documented.⁴⁷ Moreover, it is well known that IL-4 and IFN- γ represent the major inducers of class II in the B-lymphoid and monocytic/macrophage lineages, respectively.^{48,49} Here, we show an intriguing and unexpected cooperation between IL-4 and IFN- γ on the same cellular subset: although IL-4 cannot by itself induce class II expression on PCMCs, it enhances the IFN- γ -induced expression of these molecules. This indicates that IFN- γ is necessary and sufficient to induce MHC class II expression on a fraction of PCMCs, yet the presence of IL-4 optimizes the APC phenotype of these cells. These observations suggest that by responding to both IFN- γ and IL-4 (possibly produced by local Th1 T cells or natural killer T cells, undergoing simultaneous activation in an inflamed tissue), mast cells could provide platforms for antigen presentation to both Th1 and Th2 cells.

What could be the functional role of the observed cognate interactions between mast cells and CD4⁺ T lymphocytes? We propose that antigen presentation by mast cells to effector T lymphocytes is instrumental to optimize bidirectional crosstalks between these cells in the course of immune responses (supplemental Figure 8).

From the "T helper cell point of view," the possibility that tissue mast cells might detect, internalize, and present antigens make them important "refueling" cells able to restimulate in situ effector CD4⁺ T lymphocytes. In other words, mast cells, although less efficient than professional APCs, might offer strategically located platforms for antigen presentation that would locally boost the activation state of effector T lymphocytes, thus favoring their biologic responses. The fact that mast cells produce IL-16 and several chemokines such as CCL3, CCL4, CCL5, CCL20³⁻¹⁹ that have specific receptors on effector CD4⁺ lymphocytes, makes T cell–mast cell encounters in tissues likely.

From the "mast cell point of view," the observation that cognate interactions can be established with T cells suggests that activated T cells might boost mast cell functions. Evidence in support of this hypothesis comes from our observation that on cognate interaction with OT-II T cells, PCMCs increase their sensitivity to anti-DNP IgE/DNP-HSA stimulation. Thus, after cognate interaction with Th cells, mast cells might lower their threshold for IgE-mediated stimulation and might become more efficient in antigen presentation to T cells. These observations extend previous studies showing that mast cells exhibit enhanced responses after close contact with activated T cells.^{16,17}

It is tempting to speculate that, on one hand, the APC role of tissue mast cells might have a positive effect on the development of adaptive immune responses, but, on the other hand, it might become detrimental in autoimmune diseases (supplemental Figure 8). By responding to Th-derived signals via class II up-regulation and antigen presentation, mast cells can contribute to create an activation loop favorable to the establishment of inflammation. Activated mast cells would then strongly contribute to the inflammatory milieu and would also participate to tissue damage via release of their granule content, thus favoring epitope spreading in the course of the autoimmune process. A recent report showing that regulatory T cells suppress mast cells during inflammatory processes is in agreement with the idea that mast cells might play a role in the establishment of autoimmunity.⁵⁰

In conclusion, our results shed new light on mast cell function. We show that among the heterogeneous mast cell population only a

fraction is able to successfully present antigens to effector CD4⁺ T lymphocytes, yet this cognate interaction results in cell-cell cooperation at the IS. Further research, looking at mast cell biology from this new angle, will be instrumental to broaden our understanding of their contribution to immunity.

Acknowledgments

We thank Sabina Mueller, Sylvie Guerder, and Jean-Charles Guéry for critical reading of the manuscript; Denis Hudrisier for generously sharing reagents; Fatima L'Faqihi (IFR30, plateau technique cytométrie, Toulouse) and Sophie Allart (IFR30, Plateau technique Imagerie cellulaire, Toulouse) for assistance.

References

- Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):445-454.
- Theoharides TC, Kempuraj D, Tagen M, Conti P, Kalogeromitos D. Differential release of mast cell mediators and the pathogenesis of inflammation. *Immunol Rev*. 2007;217:65-78.
- Marshall JS. Mast-cell responses to pathogens. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(10):787-799.
- Galli SJ, Wershil BK. The two faces of the mast cell. *Nature*. 1996;381(6577):21-22.
- Metz M, Maurer M. Mast cells—key effector cells in immune responses. *Trends Immunol*. 2007;28(5):234-241.
- Nakae S, Suto H, Kakurai M, Sedgwick JD, Tsai M, Galli SJ. Mast cells enhance T cell activation: importance of mast cell-derived TNF. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(18):6467-6472.
- Nakae S, Suto H, Iikura M, et al. Mast cells enhance T cell activation: importance of mast cell costimulatory molecules and secreted TNF. *J Immunol*. 2006;176(4):2238-2248.
- Sayed BA, Brown MA. Mast cells as modulators of T-cell responses. *Immunol Rev*. 2007;217:53-64.
- Mekori YA, Metcalfe DD. Mast cell-T cell interactions. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104(3 Pt 1):517-523.
- Galli SJ, Gimbaldeston M, Tsai M. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(6):478-486.
- Sayed BA, Christy A, Quirion MR, Brown MA. The master switch: the role of mast cells in autoimmunity and tolerance. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:705-739.
- Secor VH, Secor WE, Gutekunst CA, Brown MA. Mast cells are essential for early onset and severe disease in a murine model of multiple sclerosis. *J Exp Med*. 2000;191(5):813-822.
- Zappulla JP, Arock M, Mars LT, Liblau RS. Mast cells: new targets for multiple sclerosis therapy? *J Neuroimmunol*. 2002;131(1-2):5-20.
- Kashiwakura J, Yokoi H, Saito H, Okayama Y. T cell proliferation by direct cross-talk between OX40 ligand on human mast cells and OX40 on human T cells: comparison of gene expression profiles between human tonsillar and lung-cultured mast cells. *J Immunol*. 2004;173(8):5247-5257.
- Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2005;6(2):135-142.
- Inamura N, Mekori YA, Bhattacharyya SP, Bianchine PJ, Metcalfe DD. Induction and enhancement of Fc(epsilon)RI-dependent mast cell degranulation after coculture with activated T cells: dependency on ICAM-1- and leukocyte function-associated antigen (LFA)-1-mediated heterotypic aggregation. *J Immunol*. 1998;160(8):4026-4033.
- Bhattacharyya SP, Drucker I, Reshef T, Kirshenbaum AS, Metcalfe DD, Mekori YA. Activated T lymphocytes induce degranulation and cytokine production by human mast cells following cell-to-cell contact. *J Leukoc Biol*. 1998;63(3):337-341.
- Baram D, Vaday GG, Salamon P, Drucker I, Hershkoviz R, Mekori YA. Human mast cells release metalloproteinase-9 on contact with activated T cells: juxtacrine regulation by TNF-alpha. *J Immunol*. 2001;167(7):4008-4016.
- Rumsaeng V, Cruikshank WW, Foster B, et al. Human mast cells produce the CD4+ T lymphocyte chemoattractant factor, IL-16. *J Immunol*. 1997;159(6):2904-2910.
- Jutel M, Watanabe T, Klunker S, et al. Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. *Nature*. 2001;413(6854):420-425.
- Huels C, Germann T, Goedert S, et al. Co-activation of naive CD4+ T cells and bone marrow-derived mast cells results in the development of Th2 cells. *Int Immunol*. 1995;7(4):525-532.
- Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*. 1998;395(6697):82-86.
- Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, et al. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*. 1999;285(5425):221-227.
- Trautmann A, Valitutti S. The diversity of immunological synapses. *Curr Opin Immunol*. 2003;15(3):249-254.
- Huse M, Klein LO, Girvin AT, et al. Spatial and temporal dynamics of T cell receptor signaling with a photoactivatable agonist. *Immunity*. 2007;27(1):76-88.
- Kupfer H, Monks CR, Kupfer A. Small splenic B cells that bind to antigen-specific T helper (Th) cells and face the site of cytokine production in the Th cells selectively proliferate: immunofluorescence microscopic studies of Th-B antigen-presenting cell interactions. *J Exp Med*. 1994;179(5):1507-1515.
- Depoil D, Zaru R, Guiraud M, et al. Immunological synapses are versatile structures enabling selective T cell polarization. *Immunity*. 2005;22(2):185-194.
- Malbec O, Roget K, Schiffer C, et al. Peritoneal cell-derived mast cells: an in vitro model of mature serosal-type mouse mast cells. *J Immunol*. 2007;178(10):6465-6475.
- Enerback L. Mast cells in rat gastrointestinal mucosa: 2, dye-binding and metachromatic properties. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1966;66(3):303-312.
- Bachelet I, Munitz A, Levi-Schaffer F. Co-culture of mast cells with fibroblasts: a tool to study their crosstalk. *Methods Mol Biol*. 2006;315(295-317).
- Tharp MD, Seelig LL Jr, Tigelaar RE, Bergstresser PR. Conjugated avidin binds to mast cell granules. *J Histochem Cytochem*. 1985;33(1):27-32.
- Bergstresser PR, Tigelaar RE, Tharp MD. Conjugated avidin identifies cutaneous rodent and human mast cells. *J Invest Dermatol*. 1984;83(3):214-218.
- Tsai M, Takeishi T, Thompson H, et al. Induction of mast cell proliferation, maturation, and heparin synthesis by the rat c-kit ligand, stem cell factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(14):6382-6386.
- Fung-Leung WP, Surh CD, Liljedahl M, et al. Antigen presentation and T cell development in H2-M-deficient mice. *Science*. 1996;271(5253):1278-1281.
- Kambayashi T, Baranski JD, Baker RG, et al. Indirect involvement of allergen-captured mast cells in antigen presentation. *Blood*. 2008;111(3):1489-1496.
- Raposo G, Tenza D, Mecheri S, Peronet R, Bonnerot C, Desaymard C. Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. *Mol Biol Cell*. 1997;8(12):2631-2645.
- Frantzi P, Oskeritzian C, Cacaraci F, et al. Antigen-dependent stimulation by bone marrow-derived mast cells of MHC class II-restricted T cell hybridoma. *J Immunol*. 1993;151(11):6318-6328.
- Kambayashi T, Allenspach EJ, Chang JT, et al. Inducible MHC class II expression by mast cells supports effector and regulatory T cell activation. *J Immunol*. 2009;182(8):4686-4695.
- Perrigoue JG, Saenz SA, Siracusa MC, et al. MHC class II-dependent basophil-CD4+ T cell interactions promote T(H)2 cytokine-dependent immunity. *Nat Immunol*. 2009;10(7):697-705.
- Sokol CL, Chu NQ, Yu S, Nish SA, Laufer TM, Medzhitov R. Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response. *Nat Immunol*. 2009;10(7):713-720.
- Yoshimoto T, Yasuda K, Tanaka H, et al. Basophils contribute to T(H)2-IgE responses in vivo

- via IL-4 production and presentation of peptide-MHC class II complexes to CD4⁺ T cells. *Nat Immunol*. 2009;10(7):706-712.
42. Isakov N, Altman A. Protein kinase C(theta) in T cell activation. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:761-794.
43. Kupfer A, Kupfer H. Imaging immune cell interactions and functions: SMACs and the Immunological Synapse. *Semin Immunol*. 2003;15(6):295-300.
44. Monks CR, Kupfer H, Tamir I, Barlow A, Kupfer A. Selective modulation of protein kinase C-theta during T-cell activation. *Nature*. 1997;385(6611):83-86.
45. Iezzi G, Karjalainen K, Lanzavecchia A. The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity*. 1998;8(1):89-95.
46. Kimachi K, Sugie K, Grey HM. Effector T cells have a lower ligand affinity threshold for activation than naive T cells. *Int Immunol*. 2003;15(7):885-892.
47. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:749-795.
48. Littman BH, Dastvan FF, Carlson PL, Sanders KM. Regulation of monocyte/macrophage C2 production and HLA-DR expression by IL-4 (BSF-1) and IFN-gamma. *J Immunol*. 1989;142(2):520-525.
49. Stuart PM, Zlotnik A, Woodward JG. Induction of class I and class II MHC antigen expression on murine bone marrow-derived macrophages by IL-4 (B cell stimulatory factor 1). *J Immunol*. 1988;140(5):1542-1547.
50. Gri G, Piconese S, Frossi B, et al. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction. *Immunity*. 2008;29(5):771-781.

Supplementary informations

Generation of bone marrow-derived DC (BMDC)

Femurs and tibiae of 6–8 weeks old C57BL/6 mice were removed and freed of surrounding tissues. Both bone ends were cut off, and the marrow was flushed out with RPMI-1640 medium using a syringe with a 25G needle. The cell suspension was filtered through a 100 μ m-nylon filter (Falcon, Becton Dickinson), to remove small pieces of bone and debris and red blood cells were lysed with ACK buffer. After washing, bone marrow cells were plated at 2×10^5 cells/well in a 24-well plate in R10 medium (RPMI-1640 containing 2 mM glutamax I, 10% heat inactivated FCS, 100 IU/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, 1 mM sodium pyruvate, 50 μ M 2-mercapto-ethanol and 10 mM HEPES all from Invitrogen Life Technologies) supplemented with 20 ng/mL rmGM-CSF (eBioscience). At day 3, 1 mL/well of R10 medium supplemented with 20 ng/mL rmGM-CSF was added. At day 6 and every 2 days, half of the culture supernatant was discarded and replaced with R10 medium supplement with 10 ng/mL rmGM-CSF. Cells were used for experiments between day 10 and 14 after being matured with 1 μ g/mL LPS (Sigma) for 16 hours.

OT-II T lymphocytes

Red blood cell-depleted splenocytes were washed in MACS buffer and CD4⁺ T cells were negatively selected, using the CD4⁺ T-cell isolation kit (Miltenyi Biotec) following the manufacturer's protocol. Freshly purified CD4⁺ OT-II T cells (more than 80% V α 2⁺ and more than 80% CD62L⁺) were used as naive T lymphocytes. To obtain effector OT-II T cells, purified CD4⁺ OT-II T cells were amplified by plating 1×10^6 cells with 1×10^6 anti-CD3/anti-CD28 coated beads (Dyna) in 24-well plates in R10 medium. Growing cells were diluted in R10 medium plus 50 IU/mL rhIL-2. After 10 days, beads were magnetically removed, and cells were allowed to rest in R10+rhIL-2 (30 IU/mL) for 72 hours before use.

T-cell stimulation assays

APC were pulsed for 16 hours with 10 μ g/mL OVAp or ovalbumin protein (OVA, grade V; Sigma-Aldrich at the indicated concentrations) alone or complexed with specific rabbit IgG and extensively washed. Immune complexes were preformed by incubating indicated concentrations of soluble OVA with 50 μ g/mL polyclonal OVA-specific rabbit IgG (Sigma-Aldrich) for 30 minutes at 37°C. As a control, soluble OVA was incubated with 50 μ g/mL control rabbit IgG. For CD69 upregulation assays, 1×10^5 CD4⁺ OT-II T cells were plated with 1×10^5 , 3×10^4 , 1×10^4 or 3×10^3 OVAp pulsed or unpulsed APC in 96-well U-bottom plates. After 16 hours, supernatants were harvested for cytokine measurement and CD69 expression was analyzed on V α 2 gated cells by flow cytometry. For proliferation assay, CD4⁺ OT-II T cells were labelled with 2.5 μ mol/L carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) in HBSS 5% FCS during 5 min. After washing 5×10^4 CD4⁺ OT-II T cells were plated with 5×10^4 , 1.7×10^4 , 5×10^3 or 1.7×10^3 OVAp pulsed or unpulsed APC in 96-well U-bottom plates. The plates were incubated for 3 days and the cells were washed, resuspended in 200 μ L PBS/EDTA (PBS plus 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid) and analysed by flow cytometry. IFN- γ production was measured by a sandwich ELISA using antibody pairs (BD Pharmingen), Streptavidin-HRP (SouthernBiotech) and TMB (Sigma) according to the manufacturers' instructions. Standards were included in every plate, and the samples were tested in duplicate.

Measurement of T-cell/PCMC conjugate formation

PCMC_{IFN- γ /IL-4} were either unpulsed or pulsed with 400 μ g/mL OVA or with 10 μ g/mL OVAp. After washing, cells were loaded with DDAO-SE (CellTrace™ Far Red DDAO-SE, Invitrogen)

according to manufacturer's instructions. OT-II effector T cells were loaded with the cell tracker CMFDA (Invitrogen). 3×10^5 PCMC were added to 1×10^5 OT-II T cells in 200 μ L R10 medium and spun to allow conjugates formation. After 20 or 60 minutes, cells were gently resuspended and analyzed by flow cytometry to identify double positive conjugates formation.

Detection of F-actin and PTyr by confocal microscopy

PCMC_{IFN- γ /IL-4} were pulsed with 400 μ g/mL OVA for 16 hours. After washing, PCMC were conjugated with OT-II effector T cells for 20 minutes at 37°C in R10 medium. Cells were settled onto poly-L-lysine-coated slides, fixed, permeabilized and stained with Alexa 488-conjugated phalloidin (Invitrogen), an anti PTyr mAb (clone PY99, Santa cruz), followed with Alexa 633-conjugated secondary mAb (Invitrogen) and with avidin-sulforhodamine 101.

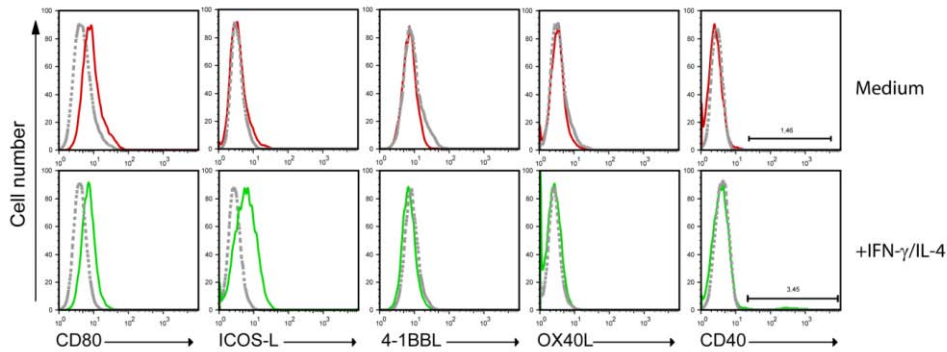


Figure S1. Expression of costimulation molecules by IFN- γ /IL-4 primed PCMC
 PCMC were incubated for 72 hours with (lower panels) or without (upper panels) IFN- γ (50 ng/mL) and IL-4 (10 ng/mL). Expression of the indicated molecules on PCMC surface was measured by immunofluorescence and analyzed by flow cytometry. Dotted line histograms represent staining with isotype matched control antibody. Results are from one representative experiment out of three.

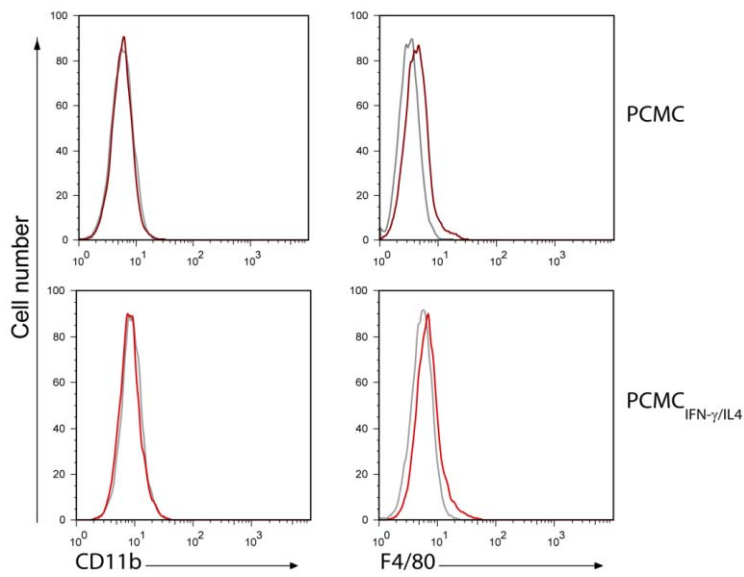


Figure S2. IFN- γ /IL-4 primed PCMC do not express CD11b nor F4/80 macrophagic markers
 PCMC were either untreated or incubated for 72 hours with IFN- γ (50 ng/mL) and IL-4 (10 ng/mL). Expression of the indicated molecules on untreated PCMC surface (upper panels), IFN- γ /IL-4 treated PCMC (lower panels) was analyzed by flow cytometry. Gray line histograms represent staining with isotype matched control antibodies. Results are from one representative experiment out of three.

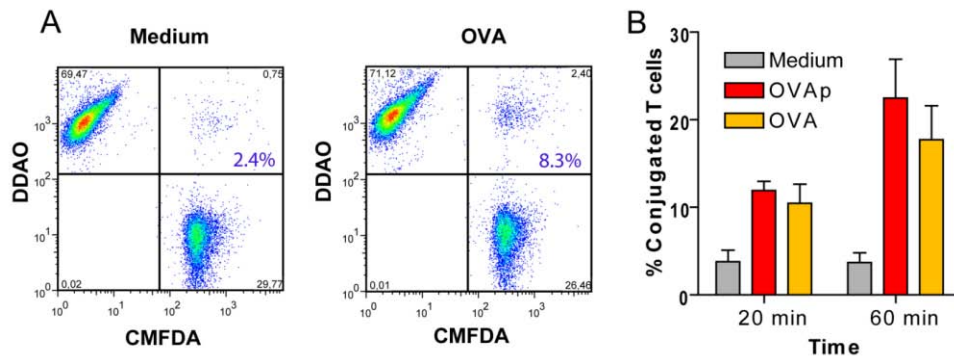


Figure S3. OT-II effector T cells establish stable conjugates with antigen-bearing PCMC_{IFN-γ/IL-4}
 PCMC_{IFN-γ/IL-4} either unpulsed or pulsed with 400 μg/mL OVA or with 10 μg/mL OVAp were loaded with DDAO-SE and conjugated with OT-II T cells previously loaded with CMFDA. After 20 or 60 minutes conjugates were measured by flow cytometry to identify double positive conjugates formation. (A) Representative dot-plot obtained after 20 minute of incubation, in blue is indicated the percentage of conjugated T cells calculated as follow: number of T cells detected in conjugation with PCMC / number of total acquired T cells × 100, (B) The histograms represent means ± SEM of three independent experiments.

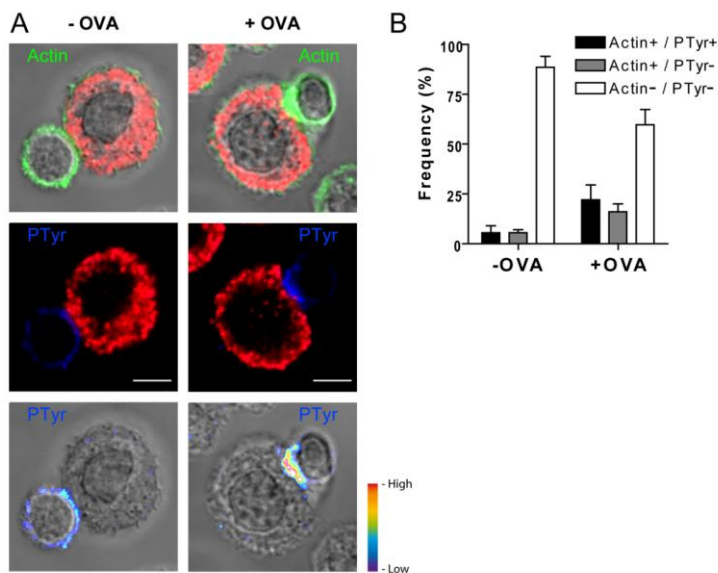


Figure S4. OT-II T cells show actin cytoskeleton polymerization and tyrosine phosphorylation at the contact site with ovalbumin pulsed PCMC_{IFN-γ/IL-4}
 PCMC_{IFN-γ/IL-4} either unpulsed or pulsed with 400 μg/mL OVA for 16 hours were conjugated with OT-II effector T cells for 20 minutes at 37°C. Cells were stained with Alexa 488-conjugated phalloidin (green), PTyr (blue) and avidin-sulforhodamine 101 (red). Cells were analyzed by confocal microscopy. (A) Representative OT-II T cell/PCMC conjugates are shown. Upper panels, F-actin (green) and avidin-sulforhodamine 101 (red) are merged with DIC images; middle panels, avidin-sulforhodamine 101 (red) and PTyr staining (blue) are shown; lower panels, PTyr staining is shown as pseudocolor intensity merged with DIC images. (B) OT-II T cell/PCMC conjugates were randomly selected and scored for the polarization of the actin cytoskeleton at the cell-cell contact site either alone or in combination with PTyr polarization. Grey bars: conjugates exhibiting polarization of actin cytoskeleton alone; black bars conjugates exhibiting polarization of both actin and PTyr; white bars: conjugates exhibiting neither actin nor PTyr polarization. ~100 conjugates were analyzed per experiment. Histograms represent means ± SEM of three independent experiments. Bar = 5 μm.

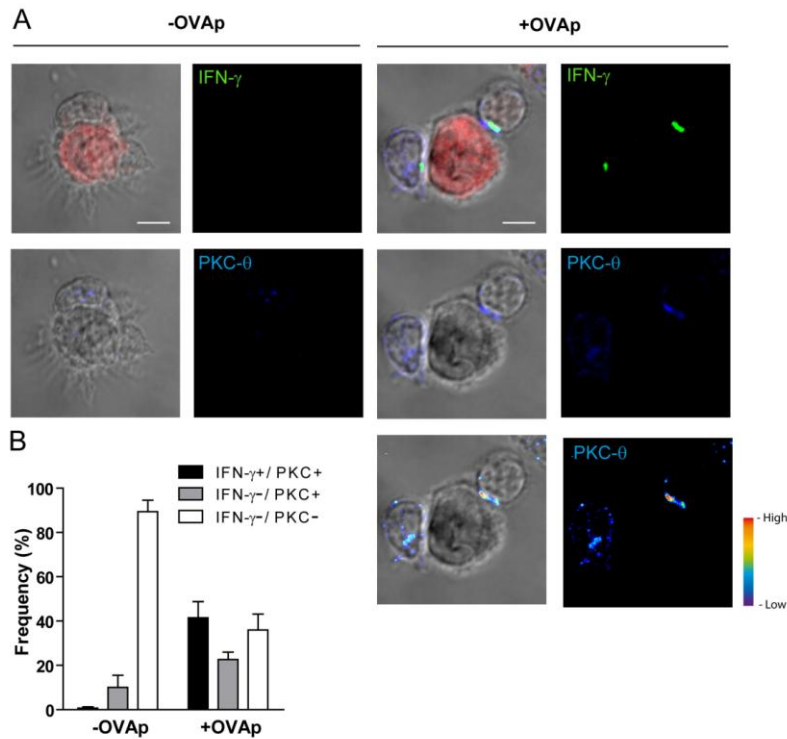


Figure S5. Immunological synapses are formed at the OT-II T cell/mature DC contact site
 (A) Mature DC were pulsed or not with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ OVAp. After washing, DC were labeled with CMTMR and co-cultured with effector OT-II T cells for 2.5 hours. Cells were settled onto poly-L-lysine-coated slides, fixed and stained for IFN- γ (green), and PKC θ (blue) by immunofluorescent labeling and analyzed by confocal microscopy. (B) quantitative analysis of OT-II T cell/DC conjugates exhibiting PKC θ enrichment alone at the cell-cell contact area (grey bars), PKC θ enrichment in combination with IFN- γ polarization toward the DC (black bars) or neither (white bars). More than 100 conjugates were analyzed per experiments. The histograms represent means \pm SEM of three independent experiments. Bar = 5 μm .

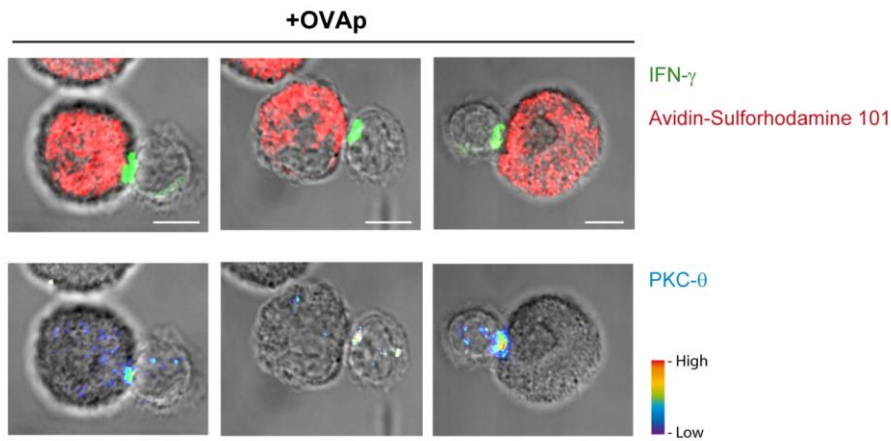


Figure S6. PCMC_{IFN- γ /IL-4} identified by avidin-sulforhodamine 101 form functional immunological synapses with OT-II T cells
 PCMC_{IFN- γ /IL-4} were pulsed with 10 μ g/mL OVAp. After washing, cells were co-cultured with effector OT-II T cells for 2.5 hours. Cells were settled onto poly-L-lysine-coated slides, fixed and stained for IFN- γ (green) and PKC θ (blue) by immunofluorescence and labeled with avidin-sulforhodamine 101 (red). Cells were analyzed by confocal microscopy. Three representative OT-II T cell/PCMC conjugates in which PCMC were previously pulsed with OVAp are shown. DIC images are merged with green IFN- γ staining and red avidin sulforhodamine 101 staining (upper panels) or with PKC θ staining (blue staining shown as pseudo-color intensity, lower panels). Bar = 5 μ m.

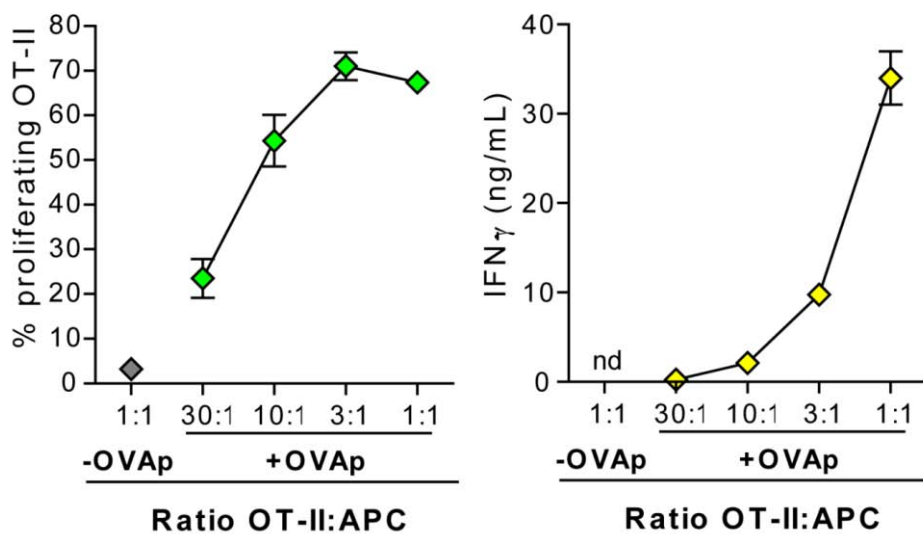
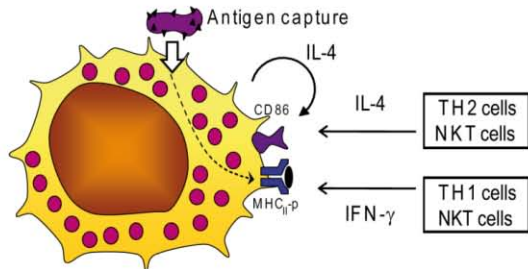
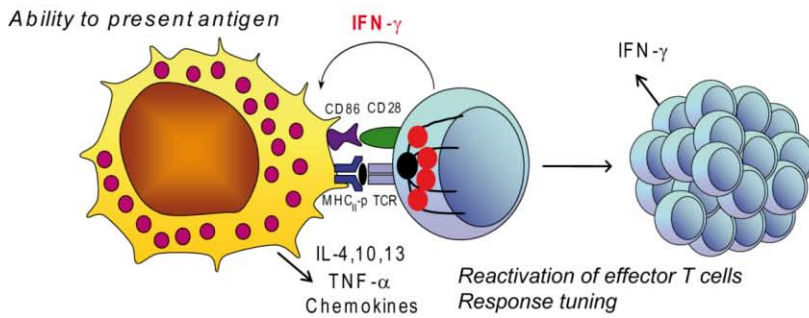


Figure S7. IFN- γ /IL-4 primed freshly isolated peritoneal mast cells induce functional responses in effector OT-II T cells
 Peritoneal mast cells were incubated 72 hours with IFN- γ (50 ng/mL) plus IL-4 (10 ng/mL) and pulsed with 10 μ g/mL OVAp 16 hours and co-cultured with effector OT-II T cells at different ratios. OT-II T-cell activation was monitored by proliferation and IFN- γ production (after 72 hours co-culture). Results are presented as mean \pm SEM of three independent experiments (nd: not detected).

1) Mast cell priming



2) Mast cell - T cell cooperation: T cell "point of view"



3) Mast cell - T cell cooperation: mast cell "point of view"

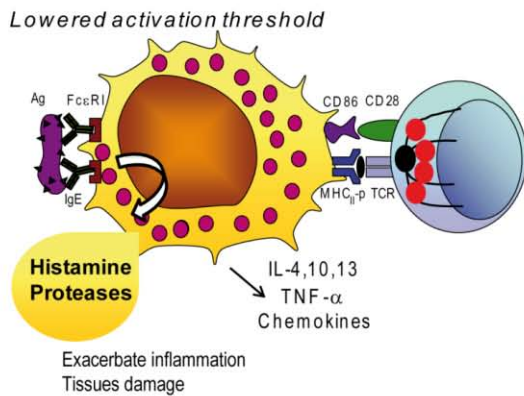


Figure S8. Schematic representation of mast cell/T-cell cognate interaction

1) Antigen-presenting mast cells are primed by IFN- γ secreted by Th1 lymphocytes and by IL-4 secreted by Th2 lymphocytes, NKT cells or by mast cells themselves. 2) Cognate T cells/APC conjugates are formed resulting in re-activation of antigen experienced T cells. 3) Upon cognate interaction with T lymphocytes, mast cells lower their threshold of activation via Fc ϵ RI.

Nous avons démontré que des lignées primaires de PCMC, ainsi que des mastocytes péritonéaux *ex vivo* peuvent acquérir un phénotype de cellules présentatrices d'antigènes (expression de molécules de classe II et de costimulation) lorsqu'ils sont traités en présence d'IFN- γ pendant 72H. Ce phénotype est exacerbé lorsque de l'IL-4 est associée à l'IFN- γ . Ainsi conditionnés, les mastocytes capturent, apprêtent et présentent l'antigène à des lymphocytes T CD4⁺ effecteurs, mais restent incapables d'activer leurs homologues naïfs. Durant cette interaction, une véritable synapse immunologique est mise en place où le lymphocyte T_H polarise son TCR et toute sa machinerie sécrétoire vers l'aire de contact intercellulaire. En retour, le mastocyte s'active et baisse significativement le seuil d'activation de ses récepteurs Fc ϵ RI suite à une stimulation par des IgE. Ces résultats indiquent que les mastocytes peuvent établir une coopération spécifique avec des lymphocytes T_H pendant laquelle a lieu un authentique dialogue intercellulaire.

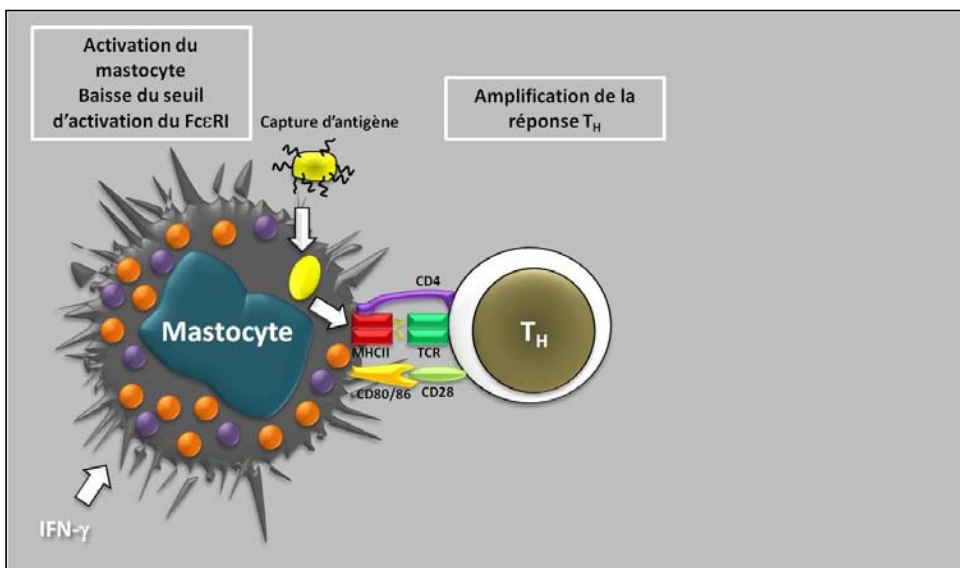


Schéma 1. Les mastocytes coopèrent avec les lymphocytes T_H⁴²⁹.

2. Les mastocytes humains induisent la génération de lymphocytes T_H producteurs d'IL-22.

Après cette étude menée chez la souris, nous avons recherché si ces résultats étaient applicables dans un modèle humain. Nous avons utilisé des cultures primaires de mastocytes humains en dérivant des précurseurs hématopoïétiques CD133⁺ issus du sang périphérique de donneurs sains, en présence de SCF et d'IL-6. Nous avons démontré, que comme chez la souris, ces cellules étaient capables d'acquérir un phénotype de CPA après traitement à l'IFN- γ et d'activer des lymphocytes T CD4⁺ effecteurs. Nous nous sommes alors posé la question du rôle de cette coopération dans la réponse immune : qu'apporte le mastocyte à la réponse T en jouant le rôle de CPA ?

Nous avons focalisé notre recherche sur les conséquences de cette coopération pour les lymphocytes T_H et notamment en ce qui concerne leur différenciation. Nous avons utilisé des lymphocytes T_H mémoires issus du sang périphérique, ce sont des cellules qui infiltrent les tissus inflammés et donc susceptibles de rencontrer des mastocytes. La comparaison d'une différenciation de T CD4⁺ mémoires par des mastocytes, par des CD ou encore par une stimulation CD3/CD28, a montré que les mastocytes diversifient le panel de cytokines produites. Nous nous sommes focalisés sur leur capacité à générer une forte population produisant de l'IL-22 que nous avons caractérisée en détail. Enfin, nous avons recherché des indices de cette coopération dans les tissus humains en choisissant la situation inflammatoire du psoriasis, où l'IL-22 a récemment été décrite comme étant une cytokine jouant un rôle clé dans la physiopathologie de cette maladie.

Human mast cells drive memory CD4⁺ T cells towards an inflammatory IL-22⁺ phenotype

Nicolas Gaudenzio¹, Camille Laurent², Salvatore Valitutti^{1,3} and Eric Espinosa^{1,3}.

¹Inserm, U1043, Toulouse, F-31300, France; Université de Toulouse, UPS, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan (CPTP), Toulouse, F-31300, France.

²Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Purpan, Toulouse, F-31300, France.

³These authors contributed equally to this work.

Correspondence should be addressed to E.E. (eric.espinosa@inserm.fr, ☎ +33 (0)562 748 304, Fax: +33 (0)562 744 558).

This work was supported by grants from the “Association pour la Recherche sur le Cancer (Grant SL220100601347)” and from INSERM.

ABSTRACT

Background

Mast cells are key components of skin microenvironment in psoriasis, yet their functional role in this T cell-mediated inflammatory disorder remains to be elucidated.

Objectives

To define the impact of mast cell/T cell cognate interactions on the quality of human T helper (T_H) cell responses.

Methods

We used human primary mast cells and effector/memory CD4⁺ T cells for in vitro coculture experiments and we analyzed T_H cells responses by cytometry. Mast cell/CD4⁺ T cell conjugates in skin lesions from psoriatic patients were analyzed by three color immunohistochemistry and confocal microscopy.

Results

We show that IFN- γ -primed human mast cells formed productive immunological synapses with antigen-experienced CD4⁺ T cells. These interactions promoted the generation of T_H22 and IL-22/IFN- γ -producing T_H cells from the circulating CD4⁺ memory T cell pool *via* a TNF- α - and IL-6-dependent mechanism. Analysis of human psoriatic skin biopsies showed a rich infiltrate of IL-22⁺CD4⁺ T cells frequently found in contact with mast cells. Moreover most of these mast cell-conjugated lymphocytes co-expressed IFN- γ , suggesting that IL-22⁺IFN- γ ⁺ CD4⁺ T cells are generated *in vivo* upon interaction with mast cells.

Conclusion

Our findings identify human mast cells as functional partners of T_H cells, shaping their responses towards IL-22 production.

Key Messages

- Cognate interactions between human mast cells and memory CD4⁺ T cells led to the emergence of IL-22- and IL-22/IFN- γ -producer T_H cells.
- The major part of CD4⁺ T cells conjugated with mast cells in lesional psoriatic skin biopsy specimens expressed IL-22 alone or in combination with IFN- γ .
- These data reveal a novel functional trait of mast cells by showing that they can play the role of APC to shape the inflammatory potential of human T helper lymphocytes.

Capsule summary

Human mast cells appear to be key regulators of the production of inflammatory cytokines such as IL-22 and IFN- γ by T_H cells. In patients with psoriasis, therapeutic strategies targeting mast cell/T_H cell functional cooperation should be considered to dampen the T cell-mediated inflammatory process.

Key words

Mast cells; T helper cells; IL-22; immunological synapse; inflammation; psoriasis

Abbreviations used

APC, antigen presenting cell; DC, dendritic cell; hMC, human mast cell; hMC^{IFN- γ} , hMC treated for 72 hours with IFN- γ ; IHC, immunohistochemistry; SCF, Stem cell factor.

INTRODUCTION

Naive CD4⁺ T cells differentiation into T_H cells occurs in secondary lymphoid organs in response to signals provided by professional antigen presenting cells (APC). Effector or memory T_H cells infiltrate inflamed tissues where they receive additional signals from microenvironment and from resident APC. The plasticity of antigen-experienced CD4⁺ T cells might allow them to adapt their response to the local immunological milieu.¹⁻⁴ While the role of professional APC in T_H differentiation has been thoroughly investigated, the impact that tissue resident immune cells might have on T_H responses upon antigen re-exposure is less understood.

Mis en forme : Français (France)

Mast cells are widely distributed in tissues and are especially enriched in regions exposed to the external environment such as skin, gastrointestinal track and airways.⁵ In the dermis, they are found to be among the most frequent leukocytes in steady state condition (about 75 to 100 cells/mm²).⁶ Moreover, their number has been reported to increase in skin diseases such as psoriasis and atopic dermatitis.^{7,8}

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Being strategically located, mast cells are among the first immune cells to encounter antigens or incoming pathogens in tissues.^{5, 9-11} Although mast cells are often associated to allergic processes, several studies have demonstrated that their participation to the immune response extends far beyond their well-known role in allergy.^{5, 11, 12}

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

We have recently shown that IFN- γ -primed mouse mast cells can present antigenic determinants to CD4⁺ T cells resulting in the formation of functional immunological synapses.¹³ Cognate mast cells were shown to form productive interactions only with previously activated T cells and not with their naive counterpart, indicating that, at least in mouse models, mast cell might selectively cooperate with tissue-infiltrating CD4⁺ T cells exhibiting an effector/memory phenotype. Nevertheless, the impact of mast cell-mediated antigen presentation on the outcome of human T_H cell biological responses and its possible link to human disease remain to be elucidated.

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Here we show that mast cells establish synaptic-like contacts with CD4⁺ T cells in inflamed skin from patients with psoriasis and that human peripheral blood-derived mast cells primed with IFN- γ form productive immunological synapses with antigen-experienced CD4⁺ T cells. This cooperation induces the generation of T_H22 and IL-22⁺IFN- γ ⁺ T_H cell subsets from circulating CD4⁺ memory T cells. We also show that, in psoriatic skin, CD4⁺ T_H cells in contact with mast cells frequently express IL-22 either alone or in combination with IFN- γ . Our findings identify human mast cells as functional partners of T_H cells, shaping T_H cell responses towards IL-22 production.

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

METHODS

Mast cell culture and priming.

CD133⁺ cells were seeded in IMDM Glutamax I, sodium pyruvate, 2-mercaptoethanol, 0.5% BSA, Insulin-transferrin selenium (all from Invitrogen), ciprofloxacin (10 µg/mL; Sigma Aldrich), human IL-6 (50 ng/mL; Peprotech) and 3% supernatant of CHO transfectants secreting murine SCF (a gift from Dr. P. Dubreuil, Marseille, France). Cells were cultured for two months and tested phenotypically (Tryptase⁺, CD117⁺, FcεRI⁺) and functionally (β-hexosaminidase release in response to FcεRI crosslinking) before use for experiments. hMC were primed in culture medium with IFN-γ (50 ng/mL; eBiosciences) for 72 hours and referred to as hMC^{IFN-γ}.

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Memory CD4⁺ T cells differentiation and co-culture experiments.

Mis en forme : Anglais (États-Unis)

5x10⁴ freshly purified CD4⁺ memory T cells were incubated for 6 days in 96 well U-bottom plates with 5x10⁴ APC pulsed or not with a cocktail of SAg (50 ng/mL TSST-1, SEA, SEB, SEE, Sec-1; Toxin Technology, Sarasota, Florida) or with 5x10⁴ anti-CD3/CD28 coated beads (Invitrogen) in RPMI 1640 supplemented with 10% Serum Replacement Medium (KnockOut medium, Invitrogen), Glutamax I, sodium pyruvate, 2-mercaptoethanol, ciprofloxacin (10 µg/mL; Sigma Aldrich) and 1% SCF. At day 3, 20 IU/mL hIL-2 (Proleukin, Chiron) were added. At day 6, cells were processed for intracellular cytokines staining.

Mis en forme : Anglais (États-Unis)

Intracellular cytokine staining and enzyme-linked immunosorbent assay.

After 6 days culture, intracellular cytokines were analyzed on CD4⁺ T cells following 5 hours restimulation with PMA (50 ng/mL; Sigma) and ionomycin (1µg/mL; Sigma) in presence of Golgistop (BD Pharmingen). Cells were fixed, permeabilized (0.3% saponin in PBS 1% BSA, Sigma Aldrich) and stained with antibodies directed against IFN-γ, IL-4, IL-17A and IL-22. Flow cytometric data were acquired on a BD FACScalibur or BD LSR-II cytometer and were analyzed using FlowJo software (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA).

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Anglais (États-Unis)

Cytokine production was measured by sandwich ELISA using commercial matched-pairs antibodies (IFN-γ: Biosource, IL-22: Peprotech), Streptavidin-HRP (SouthernBiotech) and TMB (Sigma) according to the manufacturer's instructions. IL-4 and IL-17 production were measured using CBA flex detection kits (BD Pharmingen).

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Anglais (États-Unis)

Confocal microscopy analysis of T cell/mast cell conjugates.

1x10⁵ CD4⁺Vβ2⁺ T cells were plated with 2x10⁵ APC either unpulsed or pulsed with 50 ng/mL TSST-1 in 96-well U-bottom plates and spun down at 500 rpm for 30 seconds to allow conjugate formation and incubated for 5 min. at 37°C. Cells were transferred to poly-L-lysine-coated slides then fixed, permeabilized and stained with anti-CD3ε and anti-pTyr antibodies followed by secondary antibodies and 2 µg/mL avidin-sulforhodamine 101 (highly cationic glycoprotein that

Mis en forme : Anglais (États-Unis)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Anglais (États-Unis)

Mis en forme : Français (France)

selectively stains mast cell granules¹⁴ (Sigma). Samples were examined using a Zeiss LSM 710 confocal microscope as described¹⁵. Unprocessed images were analyzed using Region Measurement and Linescan functions of the MetaMorph software (Universal Imaging, Downingtown, PA) as described previously¹⁵.

Mis en forme : Anglais (États-Unis)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Anglais (États-Unis)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Anglais (États-Unis)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Anglais (États-Unis)

Mis en forme : Anglais (États-Unis)

Patients and tissue staining.

Psoriatic skin samples, fixed in 10% buffered formalin (n=6) or Dubosq-Brazil (n=1) and non lesional skin samples as control (n=9) were retrieved from the tissue bank of the department of pathology at the Purpan Hospital between 2010 and 2011. The use of these samples has been approved by the institutional review board of the Toulouse University Hospital. Fixed and embedded in paraffin, specimens were processed for routine histopathologic examination. Three μm thick sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E).

For immunohistochemistry, 3 μm -thick sections were tested using Ventana Benchmark XT immunostainer (Ventana). Double staining was performed with anti-mast cell tryptase (FL-275; Santa Cruz) or CD117 (A4502; Dako) and anti-CD4 (1F6; DAKO).

Triple staining was performed with first anti-IL22 (polyclonal; Thermo scientific) and CD117 (A4502; Dako) using Ventana Benchmark XT immunostainer (Ventana) followed by manually added anti-CD4 (1F6; DAKO) with VECTASTAIN Universal ABAP Kit, Vector Blue AP substrate (blue). Samples were scored by an expert pathologist (C.L).

For confocal microscopy analysis, 3- μm -thick sections were pretreated by microwave incubation in pH 9.0 TRIS-EDTA buffer then in pH 6.0, 0.1M sodium citrate. Samples were then permeabilized and stained overnight with antibodies against CD4, tryptase and IL-22. Secondary antibodies were applied for 2 hours at room temperature¹⁶. Fluorescence was analyzed using Zeiss LSM 710 confocal microscope, images were processed and quantified using Zen software.

Mis en forme : Anglais (États-Unis)

Mis en forme : Français (France)

Statistical analysis

Unpaired Student *t* test was used for comparison between 2 groups unless otherwise noted. Data are expressed as means \pm SEM (P value range was indicated). Flow cytometric profiles and histological pictures are representations of repeated experiments.

A complete description of the methods is available in this article's Online Repository.

Mis en forme : Anglais (États-Unis)

RESULTS

Mast cells and CD4⁺ T cells establish synaptic-like contacts in psoriatic skin and immunological synapses *in vitro*.

To investigate the possibility that human mast cells and CD4⁺ T cells might interact in inflamed tissues, we examined the number and localization of CD4⁺ T cells and mast cells in lesional skin biopsies from patients with psoriasis. In agreement with previously reported data⁸, this analysis showed a significant increase of mast cells and of CD4⁺ T cells in lesional skin as compared to non-lesional skin (Fig 1, A-F). The frequency of mast cells in close apposition with CD4⁺ T cells was also increased (Fig 1, F). These cell-cell contacts exhibited morphological features of immunological synapses (Fig 1, C). Based on these observations, we investigated the nature of mast cell/CD4⁺ T cell interactions *in vitro*. Human CD133⁺ peripheral blood precursors were cultured in the presence of stem cell factor and IL-6 as described¹⁷. After two months culture, the cell population harbored phenotypical and functional characteristics of mature human mast cells (hMC, Fig E1). Similarly to their mouse counterparts¹³, hMC treated for 72 hours with IFN- γ (referred to as hMC^{IFN- γ}) expressed MHC class II and costimulatory CD54 and CD80 molecules (Fig E2). To investigate immunological synapse formation between CD4⁺ T cells and mast cells we used as cellular system primary human polyclonal CD4⁺V β 2⁺ T cell lines and hMC^{IFN- γ} loaded with the bacterial superantigen (SAg) TSST-1. While in TSST-1 unloaded conditions CD3 ϵ and phosphotyrosines (pTyr) were not enriched at the T cell/mast cell contact site, interaction of T cells with TSST-1 loaded hMC^{IFN- γ} resulted in CD3 ϵ and pTyr enrichment at the synaptic area (Fig 1, G-H). In parallel experiments, sustained [Ca²⁺]_i increase in CD4⁺V β 2⁺ T cells interacting with TSST-1 pulsed hMC^{IFN- γ} was detected by time-lapse microscopy (Video 1). Taken together, these results indicate that IFN- γ primed human mast cells are capable to form immunological synapses upon cognate interaction with effector CD4⁺ T cells.

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Memory CD4⁺ T cells produce IL-22 following interaction with cognate human mast cells

We next investigated the functional outcome of hMC^{IFN- γ} interaction with freshly isolated memory CD4⁺ T cells by analyzing cytokines produced by T_H cells. CD4⁺CD45RO⁺CD45RA⁻ memory T cells were isolated from peripheral blood of human healthy donors and cultured for 6 days with: i) anti-CD3/CD28 coated beads to trigger TCR and CD28 in the absence of polarizing factors such as cytokines and APC accessory molecules; ii) LPS-primed monocyte-derived dendritic cells (DC^{LPS}), as professional APC; or iii) hMC^{IFN- γ} . Both DC^{LPS} and hMC^{IFN- γ} were pulsed with a cocktail of bacterial SAg to activate a substantial fraction of the polyclonal memory T cell population¹⁸.

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

We observed a significant induction of IL-17 producing cells following stimulation with DC^{LPS} and with hMC^{IFN- γ} that was not observed following stimulation with anti-CD3/CD28-coated beads. hMC^{IFN- γ} induced a stronger IL-4 response as compared to both DC^{LPS} and anti-CD3/CD28-coated beads (Fig 2, B-E).

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

As regards IL-22 production, anti-CD3/CD28-coated bead stimulation resulted in a detectable induction of IL-22 producing cells. Conversely DC^{LPS} did not support IL-22 production. Interestingly, hMC^{IFN- γ} induced an unexpectedly strong IL-22 response in the CD4⁺ memory T cell population. Both the percentage and the number of IL-22 producing cells were significantly increased compared with control stimulations, reaching up to 10-15% IL-22⁺ cells and resulting in a substantial release of IL-22 in the culture medium (Fig 2, B-E).

Mis en forme : Français (France)

Human mast cell functional interaction with memory CD4⁺ T cells results in T_H22 and IFN γ ⁺/IL-22⁺ T_H cells

Mis en forme : Français (France)

To deepen our characterization of IL-22-producing T cells generated in the presence of mast cells, we investigated their cytokine profile and homing potential. Following stimulation with anti-CD3/CD28 coated beads more than 70% of the relatively small fraction of IL-22⁺ T cells were IL-17⁻ and IFN- γ ⁻ (IL-22 only) (Fig 3, A-B). Conversely, hMC^{IFN- γ} stimulation led to a heterogeneous profile with a major population of double positive IFN- γ ⁺IL-22⁺ T cells (corresponding to >50% of total IL-22⁺ T cells) and a population of IL-22 only producing cells (25-30 % of total IL-22 positive cells, Fig 3, A-C). In parallel experiments, hMC^{IFN- γ} stimulation of peripheral CD4⁺ T cells isolated on the basis of their expression of the cutaneous lymphocyte-associated antigen^{19, 20}, led to the emergence of these two cell subsets (Fig E3). This result indicates that a skin homing CD4⁺ T cell population (composed of memory and effector cells) differentiates into similar IL-22⁺ T cell subsets when stimulated with hMC^{IFN- γ} .

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

We also measured the expression of the transcription factor AHR (which favors the IL-22 production^{21, 22}) by FACS analysis. As shown in Fig 3D, the IL-22⁺ T cell populations exhibited increased expression of the transcription factor AHR.

Mis en forme : Français (France)

We next analyzed the expression of the skin-homing chemokine receptors CCR4, CCR6 and CCR10. Following both anti-CD3/CD28 coated beads and hMC^{IFN- γ} stimulation most IL-22⁺CD4⁺ T cells were CCR6⁺ (Fig E4). Among these cells, 70-80% also expressed the skin homing receptor CCR4 and only a small fraction was found to be CCR10⁺ (Fig E4). These results indicated that, regardless of the stimulation conditions, IL-22 producing cells harbored comparable homing potential.

Mis en forme : Français (France)

Taken together the above results indicate that stimulation of memory T cells with SAg presenting mast cells results in the induction of two major IL-22 producing cell populations, one representing pure T_H22 cells, the other, that we defined as IL-22⁺/IFN- γ ⁺ T_H cells, exhibiting a mixed T_H1/T_H22 phenotype.

Mis en forme : Français (France)

Mast cells induce IL-22 producing T_H cells via an IL-6 and TNF- α dependent mechanism

Mis en forme : Français (France)

We next investigated the mechanisms by which IL-22 producing cells were induced upon coculture with hMC^{IFN- γ} . We focused on IL-6 and TNF- α that have been shown to be required for commitment of naive CD4⁺ T cells to IL-22 production²³. IL-6 receptor and/or TNF- α blocking antibodies had no significant effect on the percentage and number of IL-22 producing cells upon CD3/CD28 stimulation (Fig 4). Conversely, upon hMC^{IFN- γ} stimulation, blocking antibodies used separately or simultaneously induced a significant decrease of the percentage and number of IL-22 producing cells (Fig 4, A-C) including T_H22 (Fig 4, D) and IFN- γ ⁺IL-22⁺ T_H cell subsets (Fig 4, E). The same treatment did not affect the percentage of IFN- γ -producing cells indicating that blocking antibodies did not interfere with productive TCR engagement and T cell activation (Fig 4, F). These results extend the notion that IL-6 and TNF- α are key cytokines involved in IL-22 induction in CD4⁺ T cells

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Human psoriatic skin is enriched in IL-22⁺CD4⁺ T cell/mast cell conjugates

To investigate whether interactions between human mast cells and T_H cells might take place in tissues we focused on psoriasis, a skin inflammatory disorder characterized by important mast cell and T cell infiltrates and by augmented IL-22 production²⁴⁻²⁶

Mis en forme : Français (France)

Three-color IHC revealed that IL22⁺CD4⁺ T cells were enriched in psoriatic samples (Fig 5, A-C) and were found to form synaptic-like contacts with mast cells more frequently than in non-lesional skin (Fig 5, D). Moreover, when conjugated with mast cells, CD4⁺ T cells produced more frequently IL-22 than their unconjugated counterparts (Fig 5, E). Similar results were obtained by analyzing skin biopsies from additional patients using confocal laser scanning microscopy. This analysis showed that about 30% of unconjugated CD4⁺ T cells were IL-22⁺ in psoriatic skin while up to 60% CD4⁺ T cells in contact with mast cells expressed IL-22 (Fig 5, F-H). In addition, in psoriatic skin, most of IL-22⁺CD4⁺ T cells were IFN- γ ⁺ indicating that a major IFN- γ /IL-22 producing CD4⁺ T cell population is present *in vivo* (Fig E5).

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Together these results show that T_H cells producing IL-22 and IFN- γ are strongly enriched in psoriatic skin where they are mostly found in contact with mast cells.

Mis en forme : Français (France)

Discussion

In the present study we addressed the question of whether human mast cells might form cognate interactions with CD4⁺ T cells and have an impact on T_H cell biology. We report that IFN- γ -primed human mast cells form immunological synapses with previously activated CD4⁺ T cells. Our results also reveal that mast cell/T cell cognate interactions fine-tune T_H cell responses by broadening the array of cytokine produced and by favoring the emergence of T_H22 and of IFN- γ /IL-22 producing T_H cells.

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Like their mouse counterparts, human mast cells acquired an APC phenotype following IFN- γ treatment and were able to form immunological synapses with previously activated CD4⁺ T cells. IFN- γ appears as a crucial signal in the commitment of human mast cells towards cognate cooperation with CD4⁺ T cells. In an inflamed tissue, several cells (e.g. T_H1 cell, NK cell, and cytotoxic T lymphocytes) could be potential sources of the IFN- γ required to induce mast cell maturation towards an APC phenotype. It is tempting to speculate that, in the course of a T_H1 immune response, T cell-derived IFN- γ might promote the APC function of mast cells that in turn, might further amplify and diversify the immune response by serving as "tissue localized" APC.

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

In psoriatic skin, we observed that mast cells were often in close apposition with CD4⁺ T cells. This finding suggests that infiltrated T cells and IFN- γ -primed mast cells could form immunological synapses in lesional skin.

Mis en forme : Français (France)

We next focused on freshly isolated human memory CD4⁺ T cells as a model of *in vivo* antigen-experienced T cells recirculating throughout the body and expected to encounter mast cells when infiltrating tissues such as skin.^{20, 27, 28} These cells represent a mosaic of cells that have not been repeatedly stimulated and keep a certain level of plasticity in the panel of produced cytokines.²⁹⁻³¹ We used this cellular model to investigate the impact of mast cells as APC on the T_H cell responses. Our results show that mast cells molded T_H responses by broadening the panel of cytokine produced. T_H2 cells were induced following interaction with mast cells but not with DC^{LP5}, compatible with the notion that mast cells are involved in T_H2-type responses in some pathological conditions.¹² Moreover, mast cells induced the emergence of T_H22, IFN- γ /IL-22 and of IL-17/IL-22 producing T_H cells.

Mis en forme : Anglais (États-Unis)

Mis en forme : Français (France)

Supprimé :

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Induction of similar T cell populations was observed by Fujita et al. when coculturing cutaneous DC (dermal DC or Langerhans cells) with allogenic whole peripheral T cells.³² However, in this study, the main T_H cell population generated was T_H22. In our study hMC^{IFN- γ} induced mostly IL-22⁺/IFN- γ ⁺ T_H cells indicating that mast cells might provide fate-determining signals less restricted than those of cutaneous DC.

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Upon antigen re-exposure to the skin, mast cell-mediated induction of IL-22 and/or IFN- γ producing cells might contribute to fine-tune immune responses. IL-22 would promote the secretion of molecules implicated in tissue homeostasis, inflammation and antimicrobial responses by epithelial cells³³; IFN- γ would amplify and sustain inflammatory responses.

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

What might be the origin of the observed IL-22⁺IFN- γ ⁺ T_H population? The observation that IL-22⁺/IFN- γ ⁺ T_H cells are not induced by CD3/CD28 stimulation suggests that these cells do not

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

preexist in the circulating memory T cell pool. We hypothesize that IL-22⁺/IFN- γ ⁺ T_H cells could derive from T_H1 cells endowed with a certain degree of functional plasticity. In this way, mast cells might confer new biological functions, instrumental for immune response in skin or mucosa, to cells initially committed towards a T_H1 phenotype.

Mis en forme : Français (France)

Our results also show that, in line with previous reports^{22, 23}, most of the IL-22⁺CD4⁺ T cells induced in our experimental conditions expressed CCR4 and CCR6 as well as the transcription factor AHR. CCR4 binds CCL17 and CCL22, both produced by keratinocytes in response to inflammatory signals.³⁴ CCR6 binds CCL20 which is produced in the skin in response to inflammation and by mast cells in response to *P.aeruginosa*.³⁵ CCR4 and CCR6 could therefore guide recirculating memory T cells into the skin or mucosa to favor their interaction with keratinocytes or mast cells. {Egawa, 2011 #700}

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Our results also shed light on the mechanisms involved in the induction of IL-22 production by human mast cells. It has been shown that stimulation with CpG treated plasmacytoid DC induces the emergence of T_H22 cells from allogenic naive T cells *via* an IL-6 and TNF- α dependent mechanism.²³ Our results extend these finding by showing that IL-6 and TNF- α signaling is also required for the generation of both T_H22 or IL-22⁺/IFN- γ ⁺ T_H cells from memory CD4⁺ T cells. IL-6 and TNF- α are produced by mast cells⁵, by some DC and T_H cell subsets. Nevertheless, unlike mast cells, inflammatory DC are strong producers of IL-12, which rather induces T_H1 differentiation. In the course of an immune response in the skin or mucosa, mast cells could thus be instrumental to provide IL-22 differentiating signals.

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

In the present study we provide first evidence in favor of the hypothesis that a functional T cell/mast cell cooperation for IL-22 production might occur in human inflamed skin. Our results show a rich infiltrate of CD4⁺ T cells in contact with mast cells and producing IL-22 in psoriatic skin. In addition, most of these IL-22⁺CD4⁺ T cells were IFN- γ ⁺. IL-22 and IFN- γ are known to play a central role in psoriasis pathogenesis.^{24, 36, 37} Our results extend this notion and suggest that mast cells contribute to the generation of IL-22⁺ T_H cells in psoriatic skin. They imply that mast cell/T_H cell cooperation might play a role in psoriasis pathogenesis.

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

In summary, our results shed new light on the functional outcome of T_H cell/mast cell cognate interactions by showing that mast cells can shape the inflammatory potential of human memory T lymphocytes. In physiological conditions, these interactions might serve to diversify biological responses of memory T cells entering tissues and to shift the balance of local responses towards protective inflammatory reactions. According to this view, the IFN- γ produced by incoming T_H cells would enhance the antigen presenting potential of mast cells that, in turn, by presenting antigenic determinants to memory T cells, would amplify IFN- γ and IL-22-based responses. In uncontrolled inflammatory conditions, such as in psoriatic skin, the presence of an abundant immune cell infiltrate might exacerbate the IFN- γ /IL-22-based inflammatory loop, turning T cell/mast cell interactions into "dangerous liaisons" for tissue integrity.

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Acknowledgements

We thank Loïc Dupré, Nicolas Fazilleau, Jean-Charles Guéry and Manish J. Butte for critical reading of the manuscript, Fatima L'Faqihi (IFR30, plateau technique cytométrie, Toulouse) and Sophie Allart (IFR30, Plateau technique Imagerie cellulaire, Toulouse) for assistance.

References

1. Zhou L, Chong MM, Littman DR. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity* 2009; 30:646-55.
2. Murphy KM, Stockinger B. Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. *Nat Immunol* 2010; 11:674-80.
3. O'Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science* 2011; 327:1098-102.
4. Ahmadzadeh M, Farber DL. Functional plasticity of an antigen-specific memory CD4 T cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:11802-7.
5. Abraham SN, St John AL. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat Rev Immunol* 2010; 10:440-52.
6. Janssens AS, Heide R, den Hollander JC, Mulder PG, Tank B, Oranje AP. Mast cell distribution in normal adult skin. *J Clin Pathol* 2005; 58:285-9.
7. Harvima IT, Nilsson G, Suttle MM, Naukkarinen A. Is there a role for mast cells in psoriasis? *Arch Dermatol Res* 2008; 300:461-78.
8. Ackermann L, Harvima IT, Pelkonen J, Ritamaki-Salo V, Naukkarinen A, Harvima RJ, et al. Mast cells in psoriatic skin are strongly positive for interferon-gamma. *Br J Dermatol* 1999; 140:624-33.
9. Marshall JS. Mast-cell responses to pathogens. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:787-99.
10. Galli SJ, Tsai M. Mast cells in allergy and infection: versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity. *Eur J Immunol* 2010; 40:1843-51.
11. Galli SJ, Grimaldeston M, Tsai M. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:478-86.
12. Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2005; 6:135-42.
13. Gaudenzio N, Espagnolle N, Mars LT, Liblau R, Valitutti S, Espinosa E. Cell-cell cooperation at the T helper cell/mast cell immunological synapse. *Blood* 2009; 114:4979-88.
14. Tharp MD, Seelig LL, Jr., Tigelaar RE, Bergstresser PR. Conjugated avidin binds to mast cell granules. *J Histochem Cytochem* 1985; 33:27-32.

15. Depoil D, Zaru R, Guiraud M, Chauveau A, Harriague J, Bismuth G, et al. Immunological synapses are versatile structures enabling selective T cell polarization. *Immunity* 2005; 22:185-94.
16. Laurent C, Muller S, Do C, Al-Saati T, Allart S, Larocca LM, et al. Distribution, function, and prognostic value of cytotoxic T lymphocytes in follicular lymphoma: a 3-D tissue-imaging study. *Blood* 2011; 118:5371-9.
17. Wang XS, Yip KH, Sam SW, Lau HY. Buffy coat preparation is a convenient source of progenitors for culturing mature human mast cells. *J Immunol Methods* 2006; 309:69-74.
18. Kappler J, Kotzin B, Herron L, Gelfand EW, Bigler RD, Boylston A, et al. V beta-specific stimulation of human T cells by staphylococcal toxins. *Science* 1989; 244:811-3.
19. Kupper TS, Fuhlbrigge RC. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:211-22.
20. Clark RA. Skin-resident T cells: the ups and downs of on site immunity. *J Invest Dermatol* 2010; 130:362-70.
21. Ramirez JM, Brembilla NC, Sorg O, Chicheportiche R, Matthes T, Dayer JM, et al. Activation of the aryl hydrocarbon receptor reveals distinct requirements for IL-22 and IL-17 production by human T helper cells. *Eur J Immunol* 2010; 40:2450-9.
22. Trifari S, Kaplan CD, Tran EH, Crellin NK, Spits H. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat Immunol* 2009; 10:864-71.
23. Duhon T, Geiger R, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol* 2009; 10:857-63.
24. Boniface K, Guignouard E, Pedretti N, Garcia M, Delwail A, Bernard FX, et al. A role for T cell-derived interleukin 22 in psoriatic skin inflammation. *Clin Exp Immunol* 2007; 150:407-15.
25. Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, Pallotta S, et al. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest* 2009; 119:3573-85.
26. Van Belle AB, de Heusch M, Lemaire MM, Hendrickx E, Warnier G, Dunussi-Joannopoulos K, et al. IL-22 Is Required for Imiquimod-Induced Psoriasiform Skin Inflammation in Mice. *J Immunol* 2011.
27. Wakim LM, Gebhardt T, Heath WR, Carbone FR. Cutting edge: local recall responses by memory T cells newly recruited to peripheral nonlymphoid tissues. *J Immunol* 2008; 181:5837-41.
28. Egawa G, Kabashima K. Skin as a peripheral lymphoid organ: revisiting the concept of skin-associated lymphoid tissues. *J Invest Dermatol* 2011; 131:2178-85.
29. Murphy E, Shibuya K, Hosken N, Openshaw P, Maino V, Davis K, et al. Reversibility of T helper 1 and 2 populations is lost after long-term stimulation. *J Exp Med* 1996; 183:901-13.
30. Locksley RM. Nine lives: plasticity among T helper cell subsets. *J Exp Med* 2009; 206:1643-6.

31. Agarwal S, Rao A. Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation. *Immunity* 1998; 9:765-75.
32. Fujita H, Nograles KE, Kikuchi T, Gonzalez J, Carucci JA, Krueger JG. Human Langerhans cells induce distinct IL-22-producing CD4+ T cells lacking IL-17 production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:21795-800.
33. Sonnenberg GF, Fouser LA, Artis D. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nat Immunol* 2011; 12:383-90.
34. Reiss Y, Proudfoot AE, Power CA, Campbell JJ, Butcher EC. CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. *J Exp Med* 2001; 194:1541-7.
35. Lin TJ, Maher LH, Gomi K, McCurdy JD, Garduno R, Marshall JS. Selective early production of CCL20, or macrophage inflammatory protein 3alpha, by human mast cells in response to *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 2003; 71:365-73.
36. Kagami S, Rizzo HL, Lee JJ, Koguchi Y, Blauvelt A. Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. *J Invest Dermatol* 2010; 130:1373-83.
37. Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, Kasman I, Eastham-Anderson J, Wu J, et al. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 2007; 445:648-51.

Figure legends

Fig 1. Mast cells and CD4⁺ T cells establish synaptic-like contacts in psoriatic skin and immunological synapses *in vitro*. **A**, Representative sections from non lesional and psoriatic skin showing CD4⁺ (brown) and tryptase⁺ (blue) cells as detected by IHC. **B-C**, Example of CD4⁺ cell/tryptase⁺ cell interactions (red arrows). **D-F**, CD4⁺ and tryptase⁺ cells/field and CD4⁺/tryptase⁺ conjugated cells number/field were scored. Each symbol (D and E) represents data scored in one field from psoriatic (5 patients) or non-lesional (4 patients) skin samples. **G**, Confocal microscopy analysis of hMC^{IFN- γ} /CD4⁺V β 2⁺ T cells conjugates (n=392). Cells were stained for hMC granules with avidin-sulforhodamine 101 (red), CD3 ϵ (green) and pTyr (blue). Original magnification x63; bars, 5 μ m. **H**, Quantification of CD3 ϵ staining at the contact site area using Region Measurement (scheme) and Linescan functions of the MetaMorph software, each point represent one conjugate; data are from 3 independent experiments. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Fig 2. Memory T cells/hMC^{IFN- γ} cognate interactions result in the induction of IL-22 producing T_H cells. Freshly isolated CD4⁺CD45RO⁺CD45RA⁻ memory T cells were co-cultured for 6 days with anti-CD3/CD28 coated beads or with superantigens loaded (50ng/mL) DC^{LPS} or hMC^{IFN- γ} . Production of IFN- γ , IL-17, IL-4 and IL-22 among CD4⁺ T cells population after restimulation for 5 h with phorbol myristate acetate and ionomycin (PMA-iono) was measured by intracellular flow cytometry. **A**, Gating strategy. **B-E**, Cytokine production by CD4⁺ T cells. Representative dot plots (B); Frequency (C), Numbers (D) of CD4⁺ T cells producing IFN- γ , IL-17, IL-4 and IL-22 from at least six donors; Cytokine production in supernatant of co-cultures described above (E). Each symbol represents one donor. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ (two-tailed, paired t -test).

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Fig 3. hMC^{IFN- γ} induce T_H22 and IFN- γ ⁺IL-22⁺ T_H cell subsets. Memory T cells were stimulated as described in Figure 2. **A**, IL-17 and IFN- γ producing cells among IL-22⁺CD4⁺ T cells. **B**, Frequency and **C**, Numbers of IL-22⁺CD4⁺ T cells expressing IL-17 or IFN- γ or both, pooled data from five donors. **D**, Representative histogram of AHR expression in CD4⁺ T cells producing IL-22 alone (black lines, AHR; shaded area, isotype control). Fold increase in MFI of AHR over the isotype control. Data represent mean \pm SEM of 4 independent experiments from 2 different donors. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ (two-tailed, paired t -test).

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Fig 4. Human mast cells induce IL-22 producing T_H cell subsets *via* an IL-6-and TNF- α - dependent mechanism. Memory CD4⁺ T cells were stimulated as described in Figure 2, in the presence or absence of antibodies neutralizing the IL-6 receptor and TNF- α , alone or in combination. **A**, Intracellular IL-22 expression in the CD4⁺ T cell population (representative dot plots). **B-F**, Pooled data (each symbol represents 1 donor) depicting: frequency (B), numbers (C) of IL-22⁺ CD4⁺ T cells, numbers of T_H22 cells (D), numbers of IFN- γ ⁺IL-22⁺ T_H cells (E), frequency of IFN- γ ⁺IL-22⁺ T_H cells (F). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ (two-tailed, paired t -test).

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Fig 5. CD4⁺ T cells in close apposition with mast cells express IL-22 in human psoriatic skin. **A**, Representative sections from non lesional skin (upper panel) and psoriatic skin (lower panel) showing CD4⁺ (blue), CD117⁺ (pink) and IL-22⁺ (brown) cells as detected by IHC. **B**, representative IL-22⁻ and IL-22⁺CD4⁺ T cells/CD117⁺ cells conjugates in psoriatic skins (red arrows). **C-D**, Number of IL-22⁺CD4⁺ T cells (C) and IL-22⁺CD4⁺ T cells/CD117⁺ cells conjugates (D) per field in non lesional (n=2) and psoriatic (n=4) skin samples. **E**, Percentage of CD4⁺ T cells expressing IL-22 either conjugated or not with CD117⁺ cells in psoriatic skin samples from four patients. **F-H**, Confocal microscopy analysis of sections from non-lesional (n=3) and from psoriatic (n=3) skin samples showing CD4⁺ (red), tryptase⁺ (blue) and IL-22⁺ (green) cells. IL-22⁺CD4⁺ T cells are indicated by white arrows (bar=5 μm, F). Two representative CD4⁺ T cell/Tryptase⁺ cell conjugates with IL-22⁻ T cells and IL-22⁺ T cells found in psoriatic skin (G). Percentage of CD4⁺ T cell producing IL-22 (green bars) conjugated or not with Tryptase⁺ cells. Pooled data (H). **P*<0.05, ***P*<0.01 and ****P*<0.001 (two-tailed, unpaired *t*-test (C and D), paired *t*-test (E and H)).

Fig 1

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

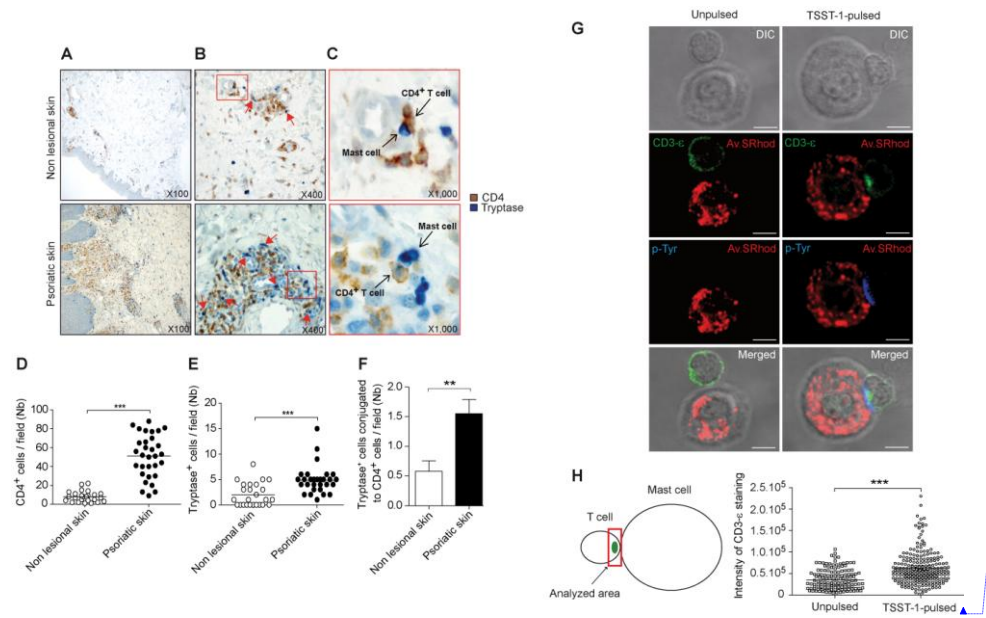
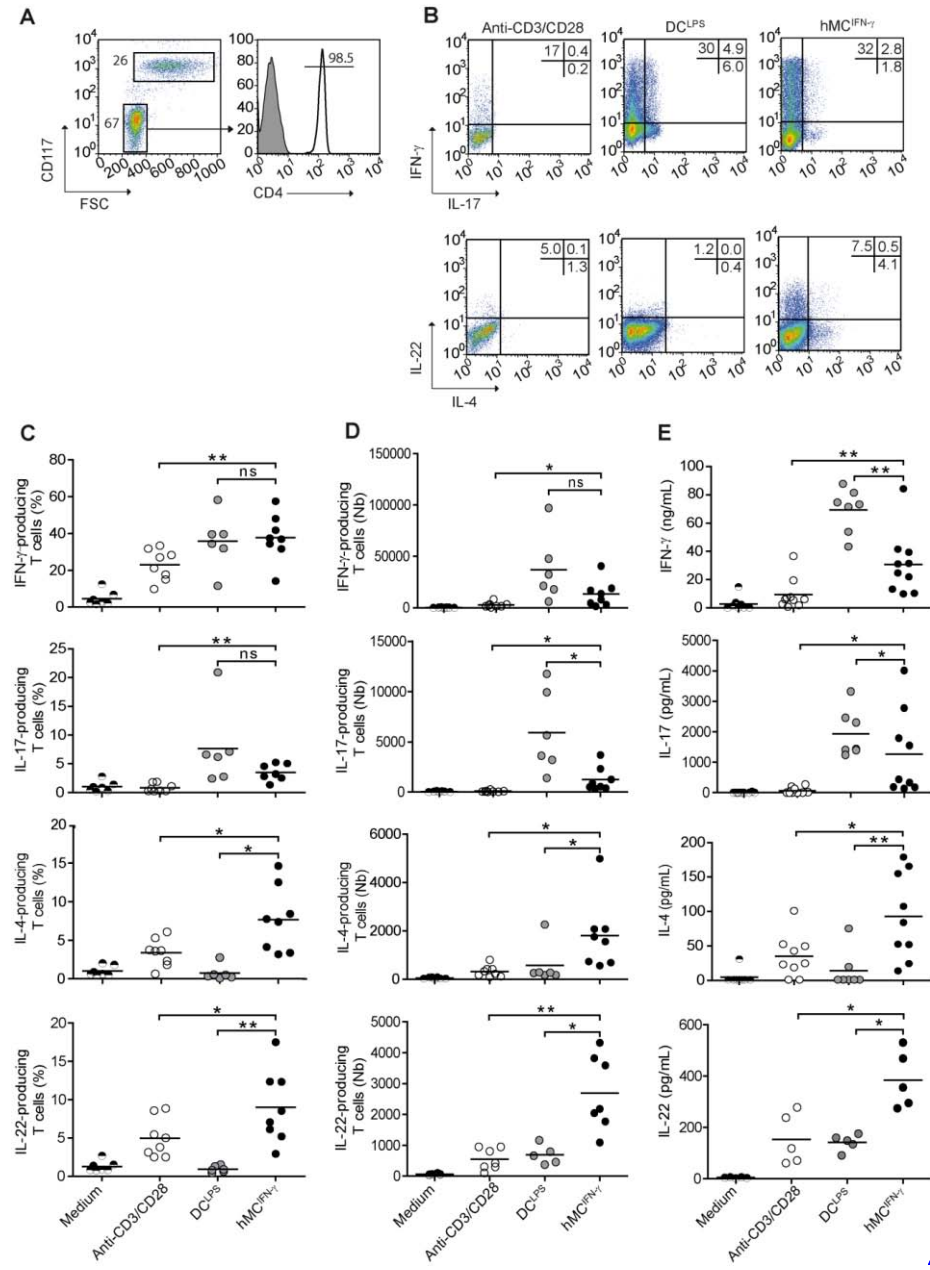
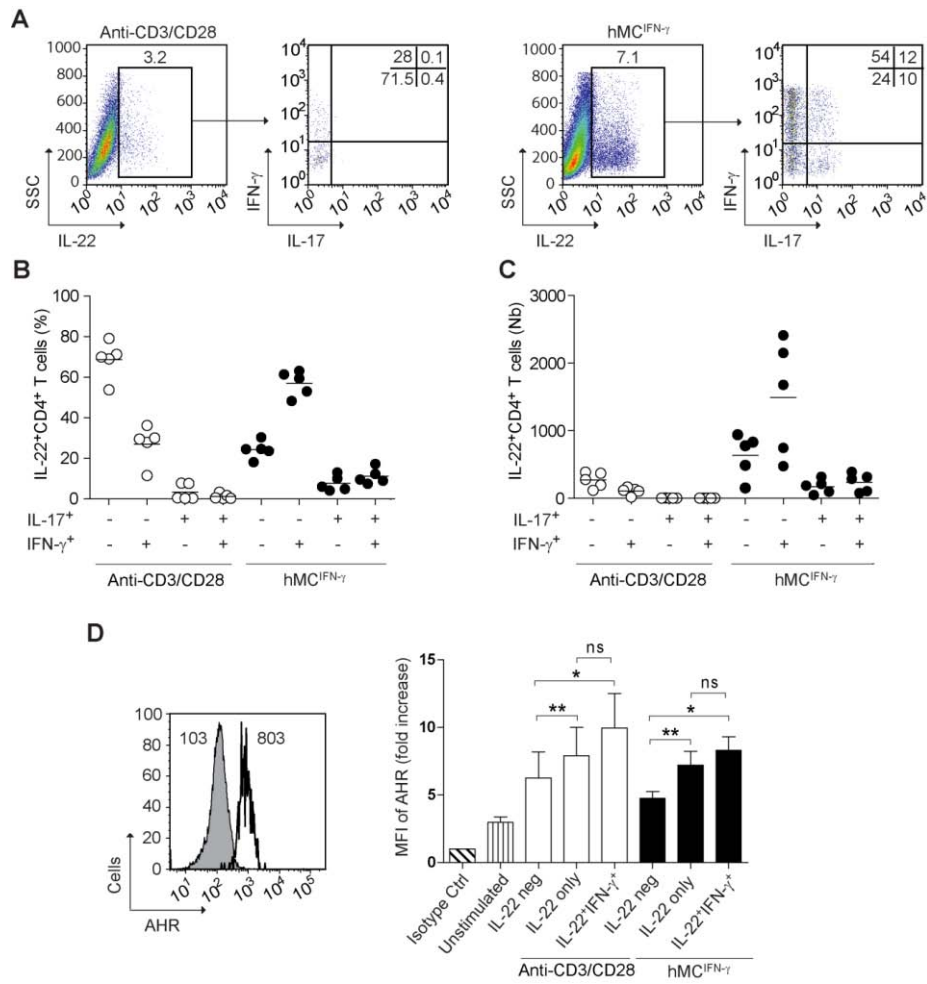


Fig 2



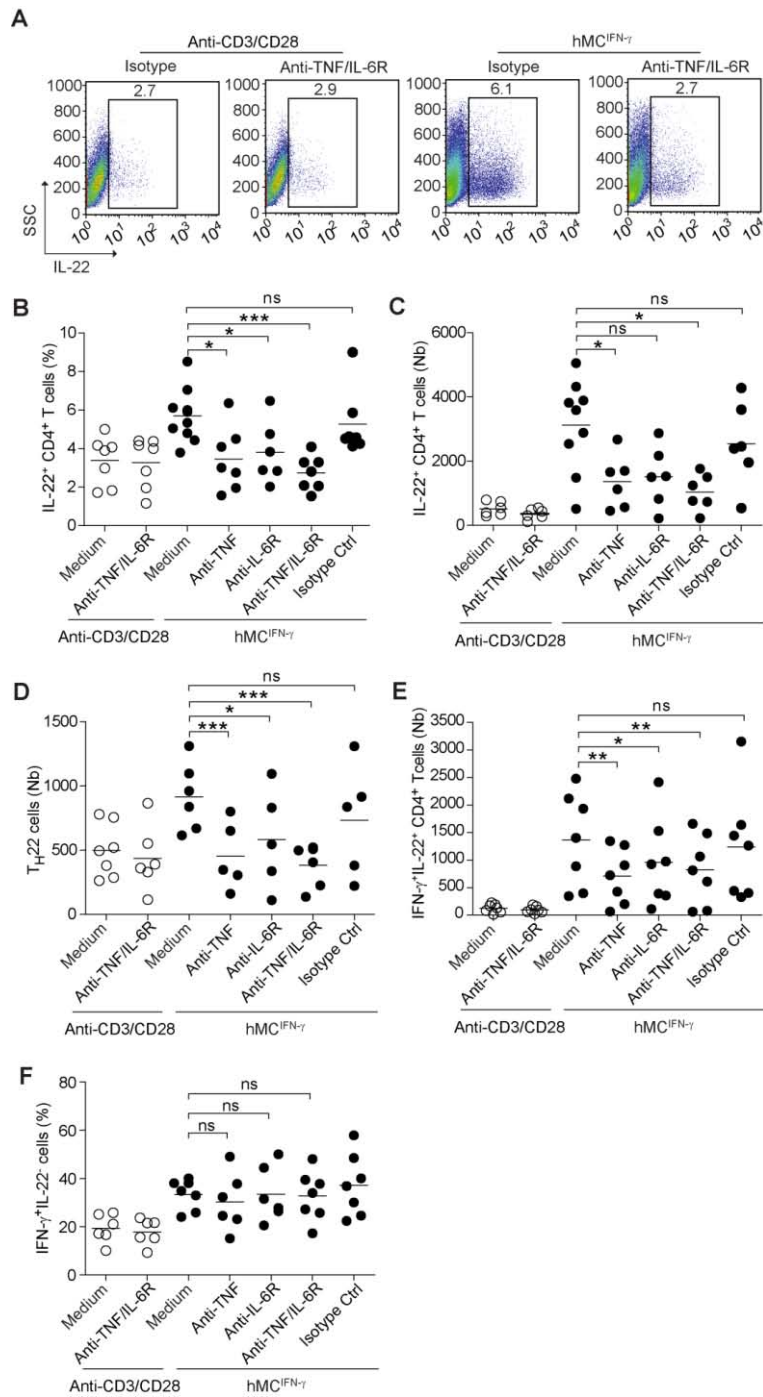
Mis en forme : Français (France)

Fig 3



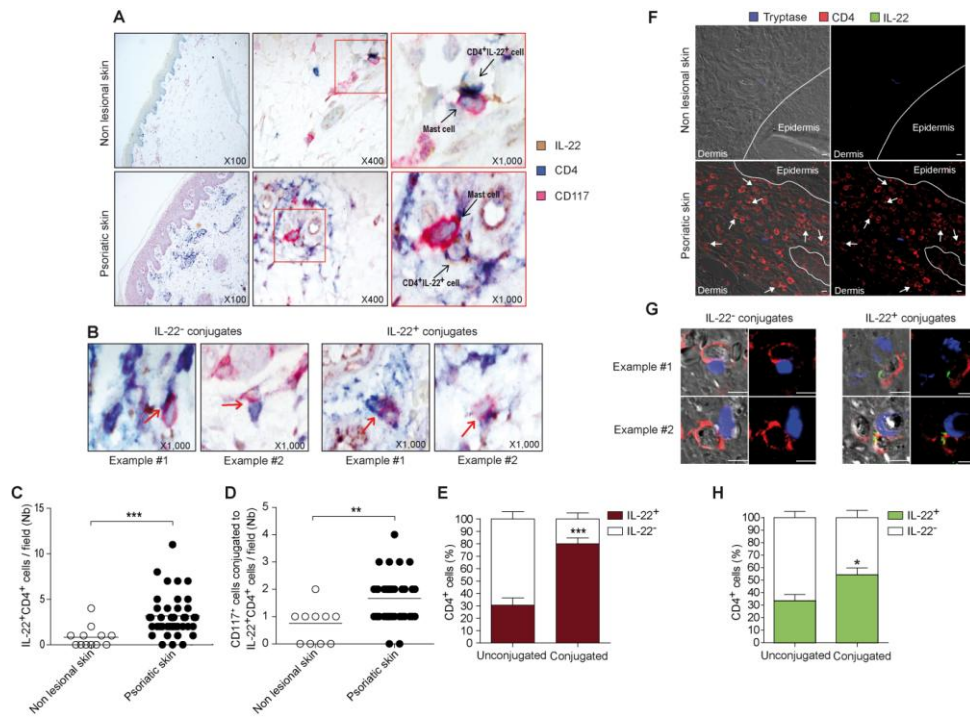
Mis en forme : Français (France)

Fig 4



Mis en forme : Français (France)

Fig 5



Mis en forme : Français (France)

Supplementary Figures Legend

Fig E1. Phenotypic and functional characterization of hMC. **A**, Histochemical staining of hMC with toluidin blue. **B**, Flow cytometry analysis of CD117 and FcεRI expression on hMC surface. **C**, Mast cell tryptase staining by immunocytochemistry. Bars = 10 μm. **D**, FcεRI-dependent β-hexosaminidase release. hMC were sensitized with human IgE and challenged with anti-IgE mAb for 30 min at 37°C. Percentage of β-hexosaminidase released was plotted against the anti-IgE mAb dilution. **E**, Secretagogue-induced β-hexosaminidase release. hMC were stimulated with increasing concentrations of compound 48/80. **F**, Confocal visualization of a representative hMC. Avidin-sulforhodamine (red) to stain heparin-filled mast cell granules and DAPI (blue) are shown. Data are from one representative experiment out of five. Phenotypic and functional analyses were performed on hMC after 8 weeks culture.

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Fig E2. IFN-γ-primed hMC express HLA-DR and co-stimulatory molecules.

Mis en forme : Français (France)

Flow cytometry analysis of the expression of surface HLA-DR, CD54, CD80 after 72h incubation with IFN-γ (50 ng/mL). **A**, Representative histograms are depicted in left panel (black lines, IFN-γ treatment; dotted lines, untreated; shaded areas, isotype-matched control antibodies). **B**, Fold increase in geometric mean fluorescence intensity, MFI, over isotype control are shown in right panel. Data are from 6 independent experiments. **P*<0.05, ***P*<0.01, (two-tailed, unpaired *t*-test).

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Fig E3. hMC^{IFN-γ} induce CLA⁺CD4⁺T cells to produce IL-22 alone or in combination with IFN-γ. Skin homing CLA⁺CD4⁺T cells were stimulated as described in Figure 3. **A**, Flow cytometry analysis of IL-17 and IFN-γ producing cells among IL-22⁺CD4⁺T cells. Frequency (**B**) and numbers (**C**) of IL-22⁺CD4⁺T cells expressing IL-17 or IFN-γ or both. Horizontal bars indicate mean, each symbol represents 1 experiment with 1 donor.

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Fig E4. Most IL-22⁺T_H cells express CCR4 and CCR6. Freshly isolated CD4⁺CD45RO⁺CD45RA⁻ memory T cells were co-cultured for 6 days with anti-CD3/CD28 coated beads or with superantigens loaded (50 ng/mL) hMC^{IFN-γ} and stimulated for 5 h with PMA-iono. **A**, Flow cytometry of CCR6 expression on IL-22⁺T cells and CCR4/CCR10 expression on IL-22⁺CCR6⁺CD4⁺T cells, representative dot plots. **B**, Frequency of IL-22⁺CCR6⁺CD4⁺T cells expressing CCR4 or CCR10 or both. Data represent mean ± SEM of 3 independent experiments using 3 different donors.

Mis en forme : Français (France)

Fig E5. Most of IL-22 producing CD4⁺T cells produce concomitantly IFN-γ in psoriatic skin. **A**, Confocal microscopy analysis of sections from psoriatic skin sample showing CD4⁺ (blue), IFN-γ⁺ (red) and IL-22⁺ (green) cells (bar=5 μm). White arrows indicate IFN-γ⁺IL-22⁺CD4⁺T cells. **B**, Four examples of CD4⁺T cells positive or not for IFN-γ or/and IL-22 staining (bar=5 μm). **C**, Percentage of IL-22⁺CD4⁺T cells producing IFN-γ (red bar) or not (white bar) in psoriatic skin. Mean ± SEM from two patients with psoriasis.

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Supplementary Methods

Antibodies

Anti-CD4-FITC (RPA-T4), anti-CD117-PEcy5 (YB5.B8), anti-CD14-PE (MφP9), anti-CD45RO-PE (UCHL1), anti-CD11c-PEcy5 (B-ly6), anti-IFN- γ -FITC (B27), anti-IL-4-APC (MP4-25D2), anti-IL-17A-alexa647 (SCPL1362), anti-HLA-DR-PEcy5 (L243), anti-HLA-DM (MaP.DM1), anti-CD54 (HA58), anti-CD58 (1C3), anti-CD80 (L307.4), anti-CD86 (2331), anti-CD69 (FN50), anti-CCR6-PerCP-Cy5.5 (11A9), anti-CCR4-Biotin (1G1), anti-CCR10-APC (6588-5), anti-GATA-3 (TWAJ), anti-T-bet (O4-46), anti-RORC-PE (AFKJS-9) and isotypes control were from Becton Dickinson ; anti-IL-22-PE (142928; R&D Systems); anti-mast cell tryptase (FL-275), anti-cathepsin S (M-19), anti-Ah Receptor (H-211), anti-pTyr (PY99), anti-CD3 ϵ (SH-T1), anti-IL-22 (E-17), were from Santa Cruz biotechnology; anti-Fc γ RI-FITC (AER-37) and anti-mouse secondary mAbs were from e-Bioscience. Anti-CD4 (1F6) was from DAKO. Streptavidin-alexa488, anti-rabbit-alexa647, anti-goat-alexa488 and anti-mouse-alexa555 were from Invitrogen.

Mis en forme : Anglais (États-Unis)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Anglais (États-Unis)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Anglais (États-Unis)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Anglais (États-Unis)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Anglais (États-Unis)

Cell purification and sorting.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from buffy coats (Etablissement français du sang). CD133⁺ precursors cells were isolated from PBMC using CD133-specific microbeads (130-050-801; Miltenyi Biotec). CD4⁺ T cells were isolated from PBMC using CD4⁺ T cells isolation kit II (130-091-155; Miltenyi Biotec) then V β 2⁺ cells were sorted using anti-V β 2-specific mAb (MPB2D5, Beckman Coulter, Fullerton, CA) and goat anti-mouse IgG microbeads (130-048-402; Miltenyi Biotec). Naive CD4⁺ T cells were isolated using naive CD4⁺ T cells isolation kit II (130-094-131; Miltenyi Biotec). Memory CD4⁺ T cells were isolated using human memory CD4⁺ T cells enrichment kit (19157; Stem cell technology) with a purity of at least 96%.

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Phenotypical and functional characterization of hMC.

PCMC were characterized by histochemistry: cell suspensions were cytocentrifuged onto glass slides, airdried, and stained with toluidine blue. hMC were characterized by immunocytochemistry, cells were probed with anti-tryptase pAb as described in confocal microscopy section and revealed with HRP-labelled secondary mAb (Invitrogen) and stained using AEC staining kit (AEC-101, Sigma). Mast cell degranulation was determined by measuring the release of β -hexosaminidase. hMC were sensitized with human IgE for 16 hours, the cells were then washed and distributed in 96-well flat-bottom plates at a density of 1×10^5 cells in 50 μ L Tyrode's buffer. The cells were adapted to 37°C for 20 minutes and then treated with prewarmed 50 μ L of the mentioned stimuli diluted in Tyrode's buffer for 45 min at 37°C. release of β -hexosaminidase in the supernatants was measured by means of enzymatic colorimetric analysis using p-nitrophenyl N-acetyl-beta-D-glucosamine.

Mis en forme : Anglais (États-Unis)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Anglais (États-Unis)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Anglais (États-Unis)

Dendritic cell culture and priming.

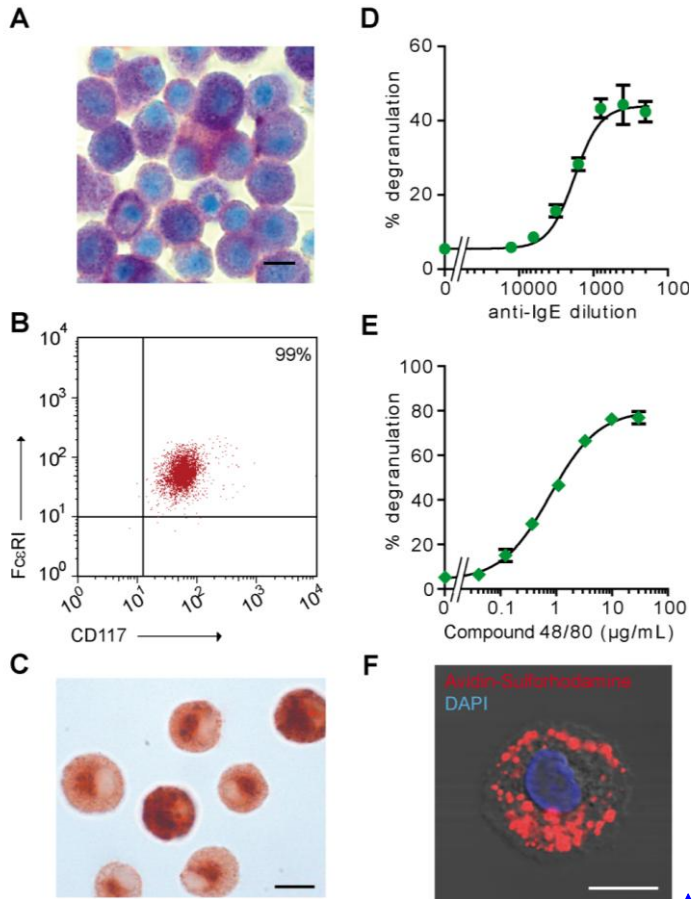
CD14⁺ cells were seeded at 2×10^5 cells/mL in complete RPMI 1640 medium (10% heat-inactivated FCS, Glutamax I, sodium pyruvate, 2-mercaptoethanol, cyprofloxacin (10 μ g/mL; Sigma Aldrich))

supplemented with IL-4 (100 IU/ml) and GM-CSF (750 IU/ml) both from R&D Systems, Minneapolis, MN and cultured for 6 days. DC were primed during 16 hours with LPS (500 ng/mL; Sigma Aldrich) and referred to as DC^{LPS}.

Mis en forme : Anglais (États-Unis)

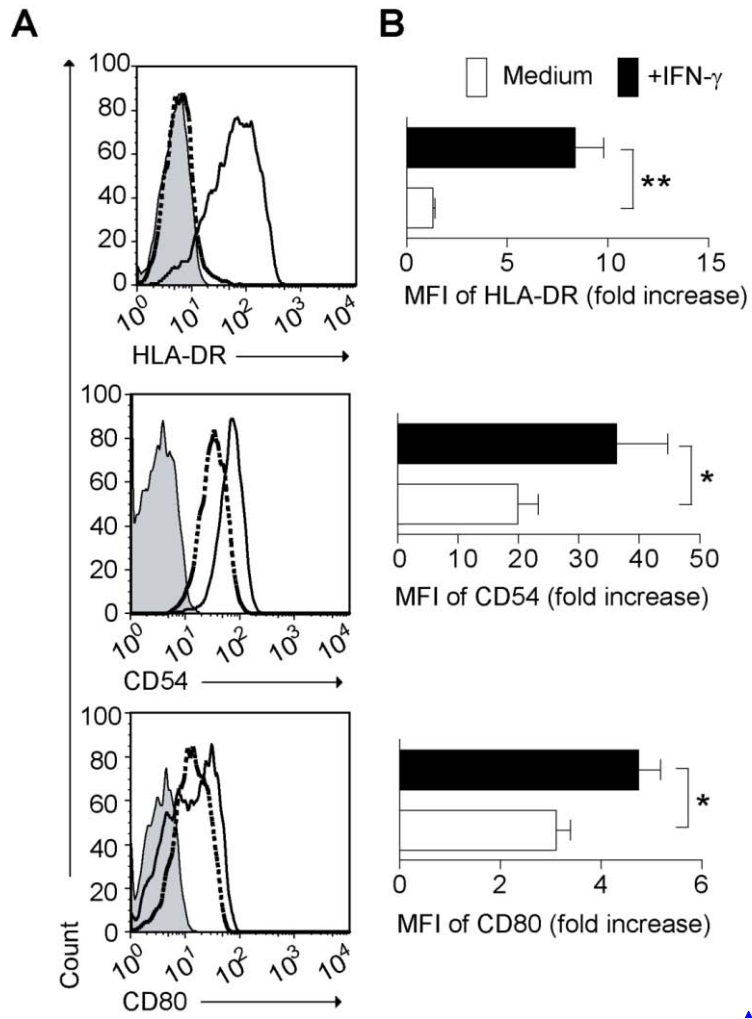
Fig E1

Mis en forme : Français (France)



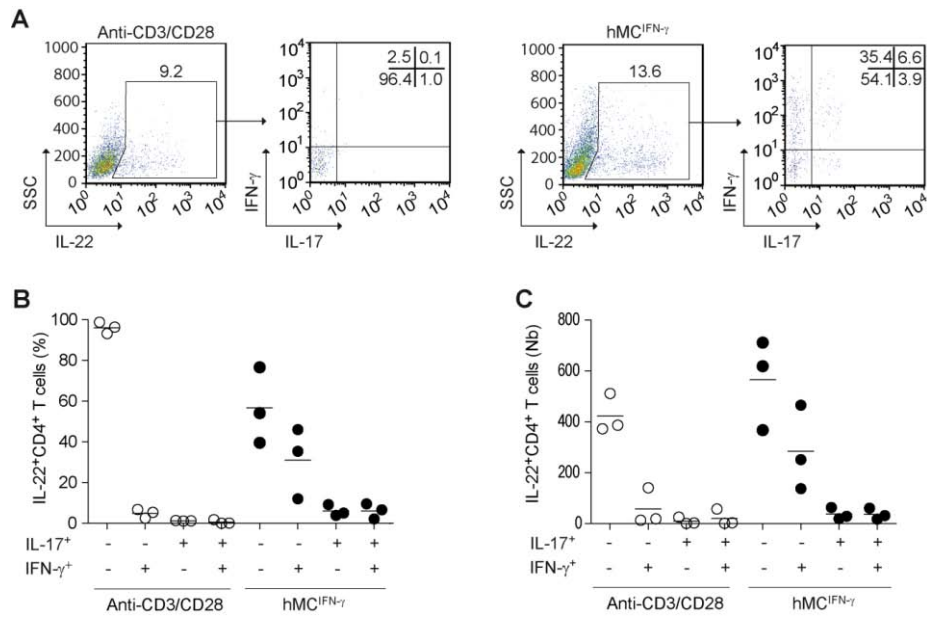
Mis en forme : Français (France)

Fig E2



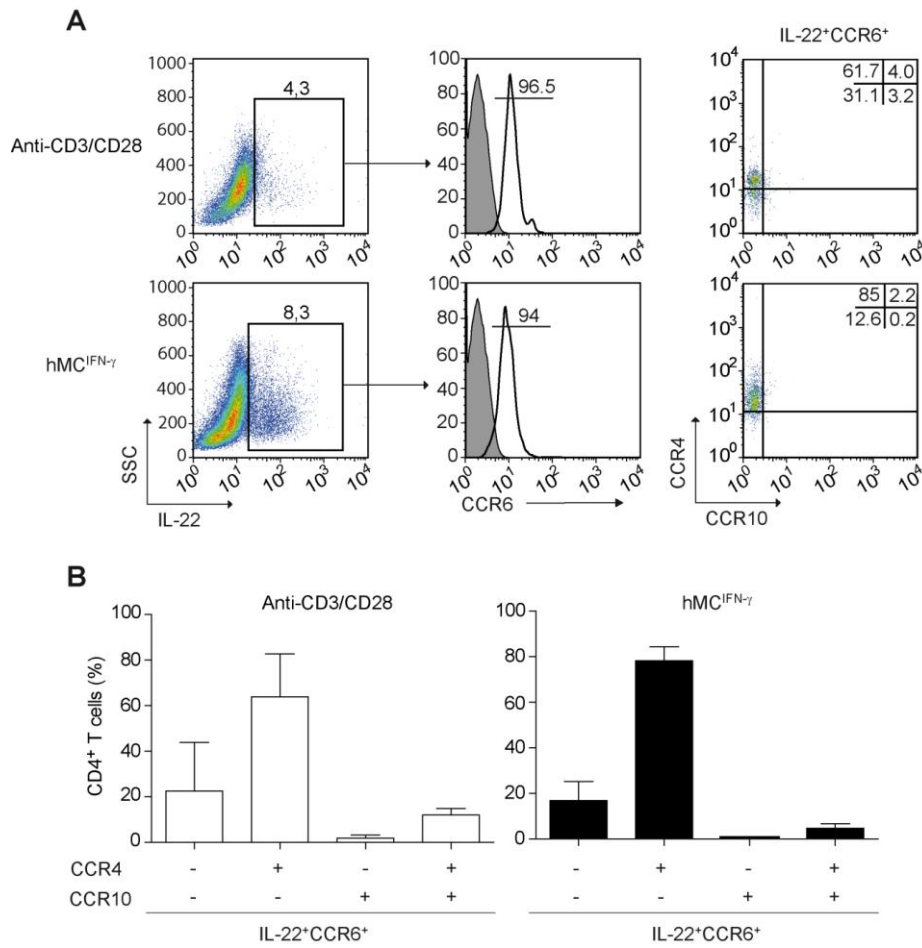
Mis en forme : Français (France)

Fig E3



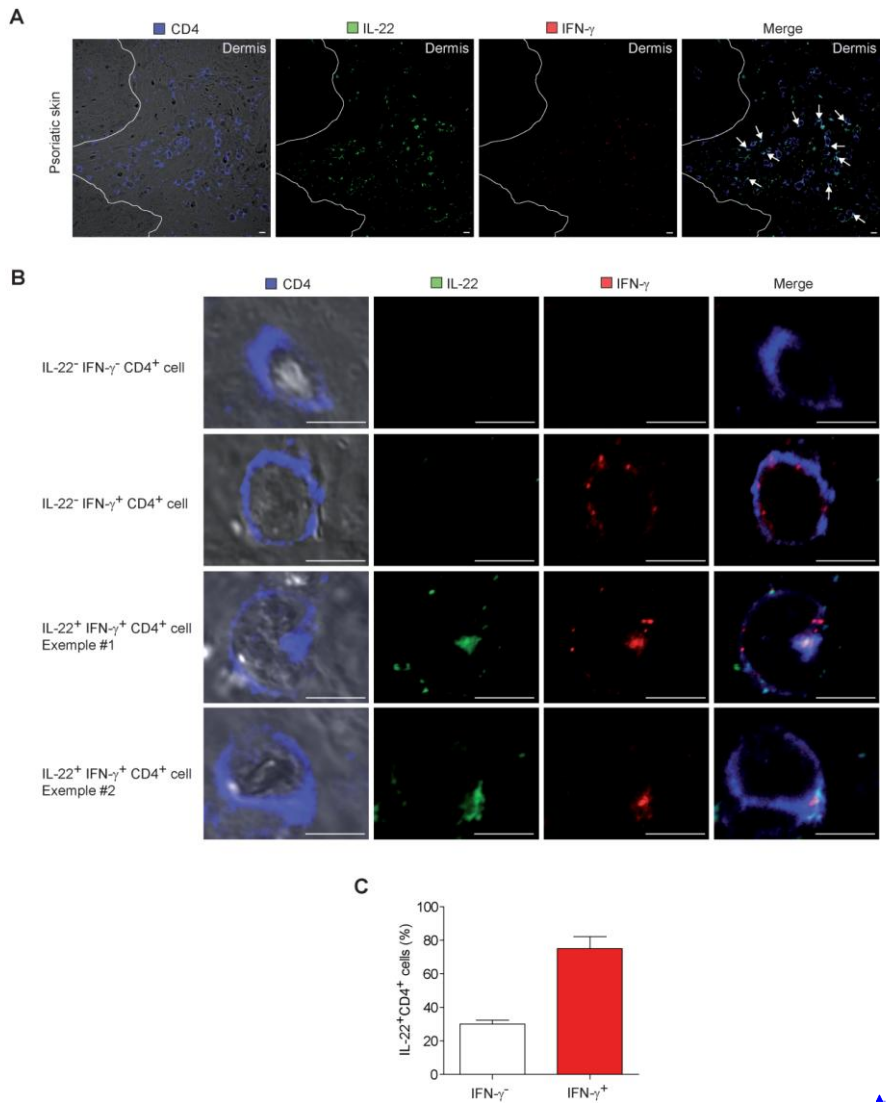
Mis en forme : Français (France)

Fig E4



Mis en forme : Français (France)

Fig E5



Mis en forme : Français (France)

Nous avons observé que les mastocytes humains (tout comme leurs homologues murins) peuvent se comporter comme des cellules présentatrices d'antigène, lorsqu'ils sont traités avec de l'IFN- γ . *In vitro*, ils forment des synapses immunologiques fonctionnelles avec des lymphocytes T CD4⁺ activés. Ces interactions productives favorisent la génération de lymphocytes T_H produisant de grandes quantités d'IL-22 (à la fois de purs T_H22 et des T_H produisant simultanément de l'IL-22 et de l'IFN- γ) à partir d'un pool de lymphocytes T_H mémoires. Cette différenciation vers un tel profil de T_H est dépendante de l'action de deux cytokines que sont l'IL-6 et le TNF- α . Des analyses microscopiques détaillées d'échantillons de peaux psoriasiques révèlent un enrichissement en lymphocytes T_H produisant simultanément de l'IL-22 et de l'IFN- γ au contact de mastocytes.

Ces résultats indiquent que les mastocytes peuvent être de véritables partenaires fonctionnels pour les lymphocytes T_H au sein des tissus, leur fournissant des signaux d'activation et les orientant vers la production d'une cytokine supplémentaire l'IL-22.

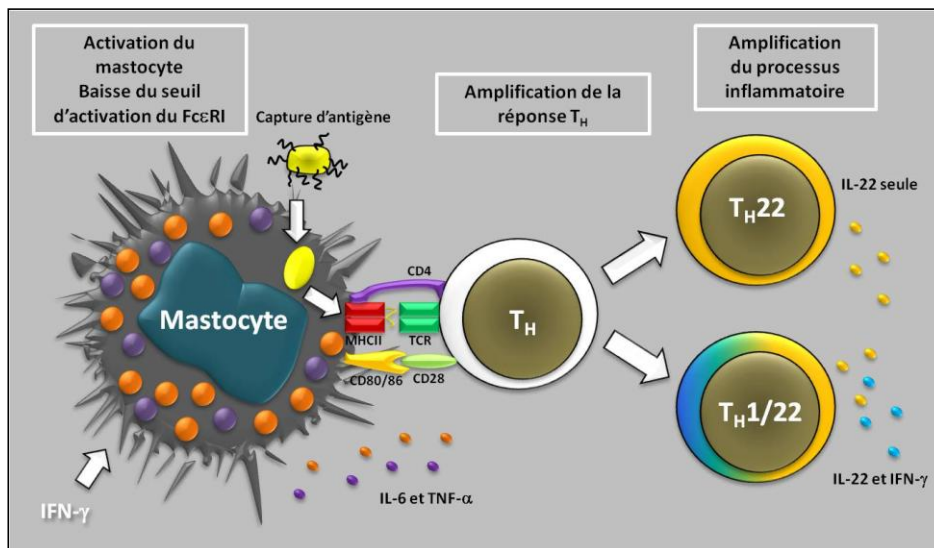


Schéma 2. Les mastocytes différencient les lymphocytes T_H en cellules productrices d'IL-22.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les mastocytes peuvent influencer la réponse immunitaire adaptative et plus précisément moduler la réponse T_H induite, par le biais de nombreux procédés (cf INTRODUCTION chapitre 3-3). Cependant, l'idée que des mastocytes puissent activer et moduler spécifiquement l'activation des lymphocytes T_H reste controversée.

Nous avons démontré que les mastocytes murins (PCMC) ou humains (hMC) peuvent acquérir un phénotype de cellules présentatrices d'antigènes lors qu'ils sont traités avec de l'IFN- γ . Dans ces deux modèles cellulaires, l'expression maximale de molécules du CMH-II à la surface des mastocytes est obtenue après trois jours de traitement lors d'une synthèse *de novo*. Il est intéressant de noter que l'IL-4 potentialise l'effet de l'IFN- γ dans le modèle murin (seule elle n'induit pas l'expression des molécules du CMH-II), alors que dans le modèle humain on observe un effet plutôt répressur (données non publiées). A noter que cette disparité de l'effet de l'IL-4 chez l'homme et la souris a aussi été retrouvée au niveau de la prolifération des progéniteurs mastocytaires (cf INTRODUCTION Chapitre 1-3 b *L'interleukine 4*).

Dans les deux modèles cellulaires, l'ajout de ligands de TLR dans la culture n'induit pas l'expression de molécules de CMH-II (données non publiées). L'IFN- γ apparait donc dans nos travaux comme une molécule clé, pouvant induire un changement phénotypique des mastocytes vers un profil de cellules présentatrices d'antigènes. Récemment les travaux de Yu *et al.* ont identifié l'axe IFN- γ /mastocyte comme un important régulateur d'asthme chronique chez la souris⁴³⁰, confirmant *in vivo* l'importance de cette molécule dans l'activation des populations mastocytaires. L'IFN- γ produit à proximité des mastocytes peut provenir de différents types cellulaires comme par exemple des lymphocytes T cytotoxiques, des T_H1 ou encore des cellules NK.

Dans le modèle murin mais aussi dans le modèle humain, les mastocytes sont incapables d'activer les lymphocytes T $CD4^+$ naïfs. Cela est probablement dû au manque de molécules de costimulation comparé à des CPA professionnelles. Par contre, ils peuvent activer spécifiquement des lymphocytes T $CD4^+$ ayant déjà rencontré l'antigène, comme des lymphocytes T_H effecteurs ou mémoires. De manière intéressante, les mastocytes sont majoritairement retrouvés dans les tissus comme la peau et les muqueuses, qui sont des lieux de migration des lymphocytes T $CD4^+$ activés. De plus, ils sécrètent de nombreux

facteurs chimiotactiques qui permettent d'attirer les lymphocytes T jusqu'au site inflammatoire et de ce fait faciliter leurs interactions avec les mastocytes (cf INTRODUCTION Chapitre 2-6 c). Lors d'une réponse inflammatoire, les mastocytes se positionnent donc comme des cellules présentatrices d'antigènes non conventionnelles, capables de réactiver localement une réponse T_H initiée dans les organes lymphoïdes secondaires.

Lors de l'interaction mastocyte/lymphocyte T_H , il y a formation d'une synapse immunologique productive à l'interface intercellulaire. Nous montrons qu'il y a une réelle polarisation du TCR du lymphocyte T_H vers l'aire de contact avec le mastocyte. Durant ce processus, les kinases $p56^{lck}$ et $PKC\theta$ sont rapidement recrutées suite à l'engagement productif du TCR. Il s'en suit une polarisation de toute la machinerie sécrétoire du lymphocyte T_H , permettant en retour une sécrétion de cytokines (comme l' $IFN-\gamma$) en direction du mastocyte présentateur d'antigène. Ces observations démontrent que les mastocytes sont capables d'induire une véritable réponse T_H , en fournissant une combinaison de signaux soutenus (nécessaires à la prolifération et à la production de cytokines) et en induisant une polarisation rapide de la réponse T_H (nécessaire à la fonction d'aide de ces lymphocytes)^{431,432}.

Du point de vue du mastocyte, cette interaction spécifique induit un changement fonctionnel significatif. En effet, le mastocyte baisse son seuil d'activation et dégranule plus facilement suite à une stimulation *via* le récepteur $Fc\epsilon RI$. Ces résultats approfondissent les observations relatées dans des travaux précédents, où les mastocytes au contact de lymphocytes T activés ont des réponses fonctionnelles exacerbées^{288,433}. Il est intéressant de spéculer que lors d'une réaction allergique, les interactions spécifiques entre les mastocytes et les lymphocytes T_H aboutissent à l'activation mutuelle des deux types cellulaires et à l'amplification des signes cliniques.

Dans ce sens d'autres études seraient nécessaires pour évaluer l'impact de différentes populations de lymphocytes T_H sur le phénotype et la fonction des mastocytes. En effet, on pourrait imaginer qu'en fonction du type de lymphocyte généré lors d'une réponse adaptative contre un pathogène donné, on aurait une modulation spécifique des fonctions mastocytaires au sein des tissus. En contre partie, en fonction du pathogène, les mastocytes

présentant des motifs antigéniques pourraient à leur tour réorienter la réponse T_H dans les tissus et ainsi permettre une modulation de la réponse immunitaire adaptative.

Chez l'homme, nous avons démontré que l'interaction spécifique entre des mastocytes et des lymphocytes T_H mémoires élargit le panel de cytokines produit par les lymphocytes. Nous avons notamment observé l'apparition d'une importante population cellulaire produisant de grandes quantités d'IL-22 seule ou en combinaison avec de l'IFN- γ . La génération de ces cellules est dépendante de deux facteurs solubles que sont l'IL-6 et le TNF- α . Ces deux molécules sont produites par les mastocytes⁴²², mais aussi par certains sous-types de CD et de lymphocytes T_H . Il a récemment été démontré que des pCD stimulées au CpG sont capable d'induire la différenciation de lymphocytes T naïfs vers un profil T_H22 et cela *via* un mécanisme dépendant de l'IL-6 et du TNF- α ³³⁴. Dans nos travaux nous décrivons qu'en plus d'être impliqués dans la différenciation de cellules naïves en T_H22 , l'IL-6 et le TNF- α peuvent aussi réorienter le profil d'une population de lymphocytes T_H mémoires vers la production d'IL-22. Le fait que cette population n'apparaisse pas lors d'une stimulation acellulaire, à l'aide de billes coatées avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28, laisse présager qu'elle ne provient pas d'une amplification d'un pool existant de lymphocytes T_H , mais qu'elle résulte de la reprogrammation d'un autre sous type de lymphocyte T_H (cf INTRODUCTION chapitre 3-1C). En effet, l'apparition de lymphocytes produisant de manière concomitante de l'IL-22 et de l'IFN- γ , lors d'une interaction spécifique avec les mastocytes, suggère que ces cellules proviennent d'un pool de lymphocytes T_H1 qui ont acquis la capacité de produire de l'IL-22.

Il serait intéressant de vérifier par la suite si les mastocytes produisent d'éventuels ligands endogènes du facteur de transcription AhR, pouvant de ce fait favoriser un profil IL-22⁺. Par exemple, les mastocytes sont une source importante de prostaglandines²²⁰, or il a été montré que ces molécules peuvent lier AhR et ainsi activer une voie de signalisation qui lui est propre⁴³⁴. Lors de futures expériences de différenciations, nous pourrions utiliser des mastocytes infectés avec un lentivirus exprimant un shRNA dirigé contre la prostaglandine d'intérêt (technologie déjà développée par le Docteur Loïc Dupré au sein du laboratoire) et voir ainsi son influence sur la population de cellules IL-22⁺ générées.

L'IL-22 est une cytokine inflammatoire jouant un rôle important dans l'immunité cutanée. En effet, les kératinocytes sont les cibles privilégiées de cette cytokine qui stimule leur

prolifération et leur production de peptides antimicrobiens^{435,436}. Ainsi, lors de la pénétration d'un pathogène dans la peau, la présentation d'antigènes par les mastocytes pourrait favoriser la production d'IL-22 dans le pool de lymphocytes T_H infiltrant le site inflammatoire. Cela aurait pour conséquence bénéfiques, une activation des kératinocytes et une production de peptides antimicrobiens. Cependant, les mastocytes ne sont pas les seules cellules à détenir ce potentiel, il a récemment été décrit que les cellules de Langerhans et les CD dermales peuvent aussi induire une différenciation vers un profil T_H22³⁵⁷, ce qui renforcerait encore ce phénomène. Des études complémentaires dans des modèles murins permettraient d'évaluer l'impact de la présentation antigénique par les mastocytes lors de la réponse immunitaire contre une bactérie cutanée. Pour cela il serait intéressant d'utiliser des souris déficientes en mastocytes, reconstituées avec des BMMC ou des PCMC dérivés *in vitro* provenant de souris CMH-II^{-/-}, puis d'analyser la réponse IL-22 des lymphocytes T_H au site inflammatoire.

Comme pour beaucoup de médiateurs, lorsque l'IL-22 est produite en trop grande quantité, elle peut avoir un effet néfaste. C'est le cas dans certaines pathologies cutanées inflammatoires comme par exemple le psoriasis où un fort taux d'IL-22 est détecté dans la peau et le sérum des patients atteints⁴³⁷. Chez la souris, des études ont démontré que l'IL-22 jouait un rôle fondamental dans l'établissement des lésions psoriasiques^{438,439}. Dans nos travaux, nous avons décrit un enrichissement en mastocytes et en lymphocytes T CD4⁺ produisant de l'IL-22 dans la peau lésionnelle de patients atteints de psoriasis. Il est intéressant de noter que des lymphocytes T CD4⁺ au contact des mastocytes produisent plus fréquemment de l'IL-22 que leurs homologues non conjugués. De plus, la majorité des cellules positives pour l'IL-22 produisent de manière concomitante de l'IFN- γ indiquant que les cellules IL-22⁺IFN- γ ⁺, générées *in vitro* après contact avec les mastocytes, existent vraiment dans la peau lésionnelle de patients.

Ces données suggèrent fortement que la présentation d'antigène par les mastocytes pourrait jouer un rôle néfaste lors de maladies inflammatoires cutanées telle que le psoriasis, en contribuant à la génération de cellules productrices d'IL-22 et d'IFN- γ .

Durant ces travaux, nous avons démontré qu'une interaction spécifique peut avoir lieu entre les mastocytes et les lymphocytes T_H activés. Ce phénomène a pour conséquence la modification du statut d'activation des deux types cellulaires. Le mastocyte augmente sa capacité de dégranulation pour de faibles concentrations d'antigènes et le lymphocyte T_H prolifère et acquiert la capacité de produire une nouvelle cytokine, l'IL-22. Nous proposons qu'une réelle coopération cellulaire mastocyte/lymphocyte T_H se mette en place au site inflammatoire, capable de moduler localement la réponse immunitaire mise en jeu.

BIBLIOGRAPHIE

1. Ehrlich, P. Beiträge zur kenntniss der quilinfärbunger und ihrer verivendung in der mikroskopischen technik. *Alch. Mikros. Anat.* **13**, 263-267 (1877).
2. Hardy, W.B. & Wesbrook, F.F. The Wandering Cells of the Alimentary Canal. *J Physiol* **18**, 490-i3 (1895).
3. Enerback, L. Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. 3. Reactivity towards compound 48/80. *Acta Pathol Microbiol Scand* **66**, 313-22 (1966).
4. Enerback, L. Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. 4. Monoamine storing capacity. *Acta Pathol Microbiol Scand* **67**, 365-79 (1966).
5. Enerback, L. Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. 2. Dye-binding and metachromatic properties. *Acta Pathol Microbiol Scand* **66**, 303-12 (1966).
6. Enerback, L. Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. I. Effects of fixation. *Acta Pathol Microbiol Scand* **66**, 289-302 (1966).
7. Galli, S.J. New insights into "the riddle of the mast cells": microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. *Lab Invest* **62**, 5-33 (1990).
8. Aldenborg, F. & Enerback, L. Thymus dependence of connective tissue mast cells: a quantitative cytofluorometric study of the growth of peritoneal mast cells in normal and athymic rats. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **78**, 277-82 (1985).
9. Bienenstock, J. An update on mast cell heterogeneity. *J Allergy Clin Immunol* **81**, 763-9 (1988).
10. Miller, H.R. et al. Granule proteinases define mast cell heterogeneity in the serosa and the gastrointestinal mucosa of the mouse. *Immunology* **65**, 559-66 (1988).
11. Galli, S.J., Borregaard, N. & Wynn, T.A. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol* **12**, 1035-44 (2011).
12. Tsai, M. et al. Induction of mast cell proliferation, maturation, and heparin synthesis by the rat c-kit ligand, stem cell factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 6382-6 (1991).
13. Heavey, D.J. et al. Generation of leukotriene C4, leukotriene B4, and prostaglandin D2 by immunologically activated rat intestinal mucosa mast cells. *J Immunol* **140**, 1953-7 (1988).
14. Pearce, F.L., Befus, A.D., Gauldie, J. & Bienenstock, J. Mucosal mast cells. II. Effects of anti-allergic compounds on histamine secretion by isolated intestinal mast cells. *J Immunol* **128**, 2481-6 (1982).
15. Marshall, J.S. & Jawdat, D.M. Mast cells in innate immunity. *J Allergy Clin Immunol* **114**, 21-7 (2004).
16. Ruitenbergh, E.J. & Elgersma, A. Absence of intestinal mast cell response in congenitally athymic mice during *Trichinella spiralis* infection. *Nature* **264**, 258-60 (1976).
17. Mayrhofer, G. & Fisher, R. Mast cells in severely T-cell depleted rats and the response to infestation with *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunology* **37**, 145-55 (1979).
18. Madden, K.B. et al. Antibodies to IL-3 and IL-4 suppress helminth-induced intestinal mastocytosis. *J Immunol* **147**, 1387-91 (1991).
19. Mayrhofer, G. & Bazin, H. Nature of the thymus dependency of mucosal mast cells. III. Mucosal mast cells in nude mice and nude rats, in B rats and in a child with the Di George syndrome. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **64**, 320-31 (1981).
20. Irani, A.A., Schechter, N.M., Craig, S.S., DeBlois, G. & Schwartz, L.B. Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 4464-8 (1986).
21. Miller, J. & Schwartz, L.B. Heterogeneity of human mast cells. *Prog Clin Biol Res* **297**, 115-29; discussion 129-30 (1989).

22. Irani, A.M. et al. Deficiency of the tryptase-positive, chymase-negative mast cell type in gastrointestinal mucosa of patients with defective T lymphocyte function. *J Immunol* **138**, 4381-6 (1987).
23. Metcalfe, D.D., Baram, D. & Mekori, Y.A. Mast cells. *Physiol Rev* **77**, 1033-79 (1997).
24. Furitsu, T. et al. Development of human mast cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 10039-43 (1989).
25. Galli, S.J. et al. Reversible expansion of primate mast cell populations in vivo by stem cell factor. *J Clin Invest* **91**, 148-52 (1993).
26. Kanakura, Y. et al. Multiple bidirectional alterations of phenotype and changes in proliferative potential during the in vitro and in vivo passage of clonal mast cell populations derived from mouse peritoneal mast cells. *Blood* **72**, 877-85 (1988).
27. Levi-Schaffer, F., Austen, K.F., Gravalles, P.M. & Stevens, R.L. Coculture of interleukin 3-dependent mouse mast cells with fibroblasts results in a phenotypic change of the mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 6485-8 (1986).
28. Mitsui, H. et al. Development of human mast cells from umbilical cord blood cells by recombinant human and murine c-kit ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 735-9 (1993).
29. Nakano, T. et al. Fate of bone marrow-derived cultured mast cells after intracutaneous, intraperitoneal, and intravenous transfer into genetically mast cell-deficient W/W^v mice. Evidence that cultured mast cells can give rise to both connective tissue type and mucosal mast cells. *J Exp Med* **162**, 1025-43 (1985).
30. Sonoda, S. et al. Development of mucosal mast cells after injection of a single connective tissue-type mast cell in the stomach mucosa of genetically mast cell-deficient W/W^v mice. *J Immunol* **137**, 1319-22 (1986).
31. Irani, A.M., Butrus, S.I., Tabbara, K.F. & Schwartz, L.B. Human conjunctival mast cells: distribution of MCT and MCTC in vernal conjunctivitis and giant papillary conjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol* **86**, 34-40 (1990).
32. Gotis-Graham, I. & McNeil, H.P. Mast cell responses in rheumatoid synovium. Association of the MCTC subset with matrix turnover and clinical progression. *Arthritis Rheum* **40**, 479-89 (1997).
33. Razin, E., Cordon-Cardo, C. & Good, R.A. Growth of a pure population of mouse mast cells in vitro with conditioned medium derived from concanavalin A-stimulated splenocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 2559-61 (1981).
34. Malbec, O. et al. Peritoneal cell-derived mast cells: an in vitro model of mature serosal-type mouse mast cells. *J Immunol* **178**, 6465-75 (2007).
35. Saito, H. Culture of human mast cells from hemopoietic progenitors. *Methods Mol Biol* **315**, 113-22 (2006).
36. Rottem, M., Okada, T., Goff, J.P. & Metcalfe, D.D. Mast cells cultured from the peripheral blood of normal donors and patients with mastocytosis originate from a CD34⁺/Fc epsilon RI⁺ cell population. *Blood* **84**, 2489-96 (1994).
37. Kirshenbaum, A.S. et al. Demonstration that human mast cells arise from a progenitor cell population that is CD34⁺, c-kit⁺, and expresses aminopeptidase N (CD13). *Blood* **94**, 2333-42 (1999).
38. Wang, X.S., Yip, K.H., Sam, S.W. & Lau, H.Y. Buffy coat preparation is a convenient source of progenitors for culturing mature human mast cells. *J Immunol Methods* **309**, 69-74 (2006).
39. Toru, H. et al. Induction of the high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) on human mast cells by IL-4. *Int Immunol* **8**, 1367-73 (1996).
40. Ochi, H. et al. T helper cell type 2 cytokine-mediated comitogenic responses and CCR3 expression during differentiation of human mast cells in vitro. *J Exp Med* **190**, 267-80 (1999).
41. Yanagida, M. et al. Effects of T-helper 2-type cytokines, interleukin-3 (IL-3), IL-4, IL-5, and IL-6 on the survival of cultured human mast cells. *Blood* **86**, 3705-14 (1995).
42. Oskeritzian, C.A. et al. Recombinant human (rh)IL-4-mediated apoptosis and recombinant human IL-6-mediated protection of recombinant human stem cell factor-dependent human

- mast cells derived from cord blood mononuclear cell progenitors. *J Immunol* **163**, 5105-15 (1999).
43. Cruse, G., Cockerill, S. & Bradding, P. IgE alone promotes human lung mast cell survival through the autocrine production of IL-6. *BMC Immunol* **9**, 2 (2008).
 44. Lindahl, U., Cifonelli, J.A., Lindahl, B. & Roden, L. The Role of Serine in the Linkage of Heparin to Protein. *J Biol Chem* **240**, 2817-20 (1965).
 45. Sasisekharan, R. & Venkataraman, G. Heparin and heparan sulfate: biosynthesis, structure and function. *Curr Opin Chem Biol* **4**, 626-31 (2000).
 46. Stevens, R.L. & Adachi, R. Protease-proteoglycan complexes of mouse and human mast cells and importance of their beta-tryptase-heparin complexes in inflammation and innate immunity. *Immunol Rev* **217**, 155-67 (2007).
 47. Eriksson, I., Sandback, D., Ek, B., Lindahl, U. & Kjellen, L. cDNA cloning and sequencing of mouse mastocytoma glucosaminyl N-deacetylase/N-sulfotransferase, an enzyme involved in the biosynthesis of heparin. *J Biol Chem* **269**, 10438-43 (1994).
 48. Orellana, A., Hirschberg, C.B., Wei, Z., Swiedler, S.J. & Ishihara, M. Molecular cloning and expression of a glycosaminoglycan N-acetylglucosaminyl N-deacetylase/N-sulfotransferase from a heparin-producing cell line. *J Biol Chem* **269**, 2270-6 (1994).
 49. Gilead, L. et al. Human gastric mucosal mast cells are chondroitin sulphate E-containing mast cells. *Immunology* **62**, 23-8 (1987).
 50. Stevens, R.L., Fox, C.C., Lichtenstein, L.M. & Austen, K.F. Identification of chondroitin sulfate E proteoglycans and heparin proteoglycans in the secretory granules of human lung mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 2284-7 (1988).
 51. Church. *Chapter 13, Mast cell derived mediators*, 146-167 (MO, Mosby Year Book, St. Louis, 2003).
 52. White, M.V., Slater, J.E. & Kaliner, M.A. Histamine and asthma. *Am Rev Respir Dis* **135**, 1165-76 (1987).
 53. Uvnas, B., Aborg, C.H. & Bergendorff, A. Storage of histamine in mast cells. Evidence for an ionic binding of histamine to protein carboxyls in the granule heparin-protein complex. *Acta Physiol Scand Suppl* **336**, 1-26 (1970).
 54. Leurs, R., Blandina, P., Tedford, C. & Timmerman, H. Therapeutic potential of histamine H3 receptor agonists and antagonists. *Trends Pharmacol Sci* **19**, 177-83 (1998).
 55. Akdis, C.A. & Simons, F.E. Histamine receptors are hot in immunopharmacology. *Eur J Pharmacol* **533**, 69-76 (2006).
 56. Schwartz, L.B. & Austen, K.F. Acid hydrolases and other enzymes of rat and human mast cell secretory granules. *Kroc Found Ser* **14**, 103-21 (1981).
 57. Koo, I.C. et al. Role for lysosomal enzyme beta-hexosaminidase in the control of mycobacteria infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 710-5 (2008).
 58. Robinson, D. & Stirling, J.L. N-Acetyl-beta-glucosaminidases in human spleen. *Biochem J* **107**, 321-7 (1968).
 59. Schwartz, L.B. Tryptase from human mast cells: biochemistry, biology and clinical utility. *Monogr Allergy* **27**, 90-113 (1990).
 60. Huang, C. et al. Evaluation of the substrate specificity of human mast cell tryptase beta I and demonstration of its importance in bacterial infections of the lung. *J Biol Chem* **276**, 26276-84 (2001).
 61. Shin, K. et al. Mouse mast cell tryptase mMCP-6 is a critical link between adaptive and innate immunity in the chronic phase of *Trichinella spiralis* infection. *J Immunol* **180**, 4885-91 (2008).
 62. Trivedi, N.N. & Caughey, G.H. Mast cell peptidases: chameleons of innate immunity and host defense. *Am J Respir Cell Mol Biol* **42**, 257-67 (2009).
 63. Lindner, J.R. et al. Delayed onset of inflammation in protease-activated receptor-2-deficient mice. *J Immunol* **165**, 6504-10 (2000).

64. Wenzel, S.E., Fowler, A.A., 3rd & Schwartz, L.B. Activation of pulmonary mast cells by bronchoalveolar allergen challenge. In vivo release of histamine and tryptase in atopic subjects with and without asthma. *Am Rev Respir Dis* **137**, 1002-8 (1988).
65. Rozniecki, J.J., Hauser, S.L., Stein, M., Lincoln, R. & Theoharides, T.C. Elevated mast cell tryptase in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* **37**, 63-6 (1995).
66. Crisp, A.J., Chapman, C.M., Kirkham, S.E., Schiller, A.L. & Krane, S.M. Articular mastocytosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **27**, 845-51 (1984).
67. Goldstein, S.M., Leong, J., Schwartz, L.B. & Cooke, D. Protease composition of exocytosed human skin mast cell protease-proteoglycan complexes. Tryptase resides in a complex distinct from chymase and carboxypeptidase. *J Immunol* **148**, 2475-82 (1992).
68. Balzar, S., Chu, H.W., Strand, M. & Wenzel, S. Relationship of small airway chymase-positive mast cells and lung function in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **171**, 431-9 (2005).
69. Shiang, C. et al. Pulmonary periarterial inflammation in fatal asthma. *Clin Exp Allergy* **39**, 1499-507 (2009).
70. Miyazaki, M., Takai, S., Jin, D. & Muramatsu, M. Pathological roles of angiotensin II produced by mast cell chymase and the effects of chymase inhibition in animal models. *Pharmacol Ther* **112**, 668-76 (2006).
71. Knight, P.A., Wright, S.H., Lawrence, C.E., Paterson, Y.Y. & Miller, H.R. Delayed expulsion of the nematode *Trichinella spiralis* in mice lacking the mucosal mast cell-specific granule chymase, mouse mast cell protease-1. *J Exp Med* **192**, 1849-56 (2000).
72. Goldstein, S.M. et al. Detection and partial characterization of a human mast cell carboxypeptidase. *J Immunol* **139**, 2724-9 (1987).
73. Reynolds, D.S. et al. Cloning of cDNAs that encode human mast cell carboxypeptidase A, and comparison of the protein with mouse mast cell carboxypeptidase A and rat pancreatic carboxypeptidases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 9480-4 (1989).
74. Reynolds, D.S. et al. Isolation and molecular cloning of mast cell carboxypeptidase A. A novel member of the carboxypeptidase gene family. *J Biol Chem* **264**, 20094-9 (1989).
75. Irani, A.M., Goldstein, S.M., Wintroub, B.U., Bradford, T. & Schwartz, L.B. Human mast cell carboxypeptidase. Selective localization to MCTC cells. *J Immunol* **147**, 247-53 (1991).
76. Schneider, L.A., Schlenner, S.M., Feyerabend, T.B., Wunderlin, M. & Rodewald, H.R. Molecular mechanism of mast cell mediated innate defense against endothelin and snake venom sarafotoxin. *J Exp Med* **204**, 2629-39 (2007).
77. Maurer, M. et al. Mast cells promote homeostasis by limiting endothelin-1-induced toxicity. *Nature* **432**, 512-6 (2004).
78. Piliponsky, A.M. et al. Neurotensin increases mortality and mast cells reduce neurotensin levels in a mouse model of sepsis. *Nat Med* **14**, 392-8 (2008).
79. Metz, M. et al. Mast cells can enhance resistance to snake and honeybee venoms. *Science* **313**, 526-30 (2006).
80. Raposo, G. et al. Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. *Mol Biol Cell* **8**, 2631-45 (1997).
81. Sagi-Eisenberg, R. The mast cell: where endocytosis and regulated exocytosis meet. *Immunol Rev* **217**, 292-303 (2007).
82. Hammel, I., Lagunoff, D. & Galli, S.J. Regulation of secretory granule size by the precise generation and fusion of unit granules. *J Cell Mol Med* **14**, 1904-16 (2010).
83. Puri, N. & Roche, P.A. Mast cells possess distinct secretory granule subsets whose exocytosis is regulated by different SNARE isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 2580-5 (2008).
84. Tiwari, N. et al. VAMP-8 segregates mast cell-preformed mediator exocytosis from cytokine trafficking pathways. *Blood* **111**, 3665-74 (2008).
85. St John, A.L., Chan, C.Y., Staats, H.F., Leong, K.W. & Abraham, S.N. Synthetic mast-cell granules as adjuvants to promote and polarize immunity in lymph nodes. *Nat Mater* **11**, 250-7 (2012).

86. Sali, A., Matsumoto, R., McNeil, H.P., Karplus, M. & Stevens, R.L. Three-dimensional models of four mouse mast cell chymases. Identification of proteoglycan binding regions and protease-specific antigenic epitopes. *J Biol Chem* **268**, 9023-34 (1993).
87. Matsumoto, R., Sali, A., Ghildyal, N., Karplus, M. & Stevens, R.L. Packaging of proteases and proteoglycans in the granules of mast cells and other hematopoietic cells. A cluster of histidines on mouse mast cell protease 7 regulates its binding to heparin serglycin proteoglycans. *J Biol Chem* **270**, 19524-31 (1995).
88. Pereira, P.J. et al. Human beta-tryptase is a ring-like tetramer with active sites facing a central pore. *Nature* **392**, 306-11 (1998).
89. Humphries, D.E. et al. Heparin is essential for the storage of specific granule proteases in mast cells. *Nature* **400**, 769-72 (1999).
90. Forsberg, E. et al. Abnormal mast cells in mice deficient in a heparin-synthesizing enzyme. *Nature* **400**, 773-6 (1999).
91. Huang, C. et al. Formation of enzymatically active, homotypic, and heterotypic tetramers of mouse mast cell tryptases. Dependence on a conserved Trp-rich domain on the surface. *J Biol Chem* **275**, 351-8 (2000).
92. Ghildyal, N. et al. Fate of two mast cell tryptases in V3 mastocytosis and normal BALB/c mice undergoing passive systemic anaphylaxis: prolonged retention of exocytosed mMCP-6 in connective tissues, and rapid accumulation of enzymatically active mMCP-7 in the blood. *J Exp Med* **184**, 1061-73 (1996).
93. Thomas, P.S., Pennington, D.W., Schreck, R.E., Levine, T.M. & Lazarus, S.C. Authentic 17 kDa tumour necrosis factor alpha is synthesized and released by canine mast cells and up-regulated by stem cell factor. *Clin Exp Allergy* **26**, 710-8 (1996).
94. Reed, J.A., Albino, A.P. & McNutt, N.S. Human cutaneous mast cells express basic fibroblast growth factor. *Lab Invest* **72**, 215-22 (1995).
95. Kunder, C.A. et al. Mast cell-derived particles deliver peripheral signals to remote lymph nodes. *J Exp Med* **206**, 2455-67 (2009).
96. Bland, C.E., Ginsburg, H., Silbert, J.E. & Metcalfe, D.D. Mouse heparin proteoglycan. Synthesis by mast cell-fibroblast monolayers during lymphocyte-dependent mast cell proliferation. *J Biol Chem* **257**, 8661-6 (1982).
97. Ginsburg, H. & Lagunoff, D. The in vitro differentiation of mast cells. Cultures of cells from immunized mouse lymph nodes and thoracic duct lymph on fibroblast monolayers. *J Cell Biol* **35**, 685-97 (1967).
98. Chabot, B., Stephenson, D.A., Chapman, V.M., Besmer, P. & Bernstein, A. The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. *Nature* **335**, 88-9 (1988).
99. Geissler, E.N., Ryan, M.A. & Housman, D.E. The dominant-white spotting (W) locus of the mouse encodes the c-kit proto-oncogene. *Cell* **55**, 185-92 (1988).
100. Anderson, N.G., Maller, J.L., Tonks, N.K. & Sturgill, T.W. Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature* **343**, 651-3 (1990).
101. Copeland, N.G. et al. Mast cell growth factor maps near the steel locus on mouse chromosome 10 and is deleted in a number of steel alleles. *Cell* **63**, 175-83 (1990).
102. Flanagan, J.G. & Leder, P. The kit ligand: a cell surface molecule altered in steel mutant fibroblasts. *Cell* **63**, 185-94 (1990).
103. Gallj, S.J., Zsebo, K.M. & Geissler, E.N. The kit ligand, stem cell factor. *Adv Immunol* **55**, 1-96 (1994).
104. Martin, F.H. et al. Primary structure and functional expression of rat and human stem cell factor DNAs. *Cell* **63**, 203-11 (1990).
105. Matsui, Y., Zsebo, K.M. & Hogan, B.L. Embryonic expression of a haematopoietic growth factor encoded by the Sl locus and the ligand for c-kit. *Nature* **347**, 667-9 (1990).

106. Nocka, K., Buck, J., Levi, E. & Besmer, P. Candidate ligand for the c-kit transmembrane kinase receptor: KL, a fibroblast derived growth factor stimulates mast cells and erythroid progenitors. *Embo J* **9**, 3287-94 (1990).
107. Williams, D.E. et al. Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogene. *Cell* **63**, 167-74 (1990).
108. Zsebo, K.M. et al. Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell* **63**, 213-24 (1990).
109. Zsebo, K.M. et al. Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from buffalo rat liver--conditioned medium. *Cell* **63**, 195-201 (1990).
110. Gilfillan, A.M. & Tkaczyk, C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat Rev Immunol* **6**, 218-30 (2006).
111. Okayama, Y. & Kawakami, T. Development, migration, and survival of mast cells. *Immunol Res* **34**, 97-115 (2006).
112. Okkenhaug, K. & Vanhaesebroeck, B. PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. *Nat Rev Immunol* **3**, 317-30 (2003).
113. Koyasu, S. The role of PI3K in immune cells. *Nat Immunol* **4**, 313-9 (2003).
114. Fukao, T. et al. Selective loss of gastrointestinal mast cells and impaired immunity in PI3K-deficient mice. *Nat Immunol* **3**, 295-304 (2002).
115. Ali, K. et al. Essential role for the p110delta phosphoinositide 3-kinase in the allergic response. *Nature* **431**, 1007-11 (2004).
116. Agosti, V. et al. Critical role for Kit-mediated Src kinase but not PI 3-kinase signaling in pro T and pro B cell development. *J Exp Med* **199**, 867-78 (2004).
117. Kissel, H. 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* **19**, 1312-26 (2000).
118. Koyasu, S., Minowa, A., Terauchi, Y., Kadowaki, T. & Matsuda, S. The role of phosphoinositide-3-kinase in mast cell homing to the gastrointestinal tract. *Novartis Found Symp* **271**, 152-61; discussion 161-5, 198-9 (2005).
119. Shelburne, C.P. et al. Stat5 expression is critical for mast cell development and survival. *Blood* **102**, 1290-7 (2003).
120. Akin, C. & Metcalfe, D.D. Systemic mastocytosis. *Annu Rev Med* **55**, 419-32 (2004).
121. Hamaguchi, Y. et al. Interleukin 4 as an essential factor for in vitro clonal growth of murine connective tissue-type mast cells. *J Exp Med* **165**, 268-73 (1987).
122. Tsuji, K. et al. Effects of interleukin-3 and interleukin-4 on the development of "connective tissue-type" mast cells: interleukin-3 supports their survival and interleukin-4 triggers and supports their proliferation synergistically with interleukin-3. *Blood* **75**, 421-7 (1990).
123. Nilsson, G. et al. Interleukin-4 inhibits the expression of Kit and tryptase during stem cell factor-dependent development of human mast cells from fetal liver cells. *Blood* **84**, 1519-27 (1994).
124. Xia, H.Z. et al. Effect of recombinant human IL-4 on tryptase, chymase, and Fc epsilon receptor type I expression in recombinant human stem cell factor-dependent fetal liver-derived human mast cells. *J Immunol* **159**, 2911-21 (1997).
125. Kulka, M. & Metcalfe, D.D. High-resolution tracking of cell division demonstrates differential effects of TH1 and TH2 cytokines on SCF-dependent human mast cell production in vitro: correlation with apoptosis and Kit expression. *Blood* **105**, 592-9 (2005).
126. Bischoff, S.C. et al. IL-4 enhances proliferation and mediator release in mature human mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8080-5 (1999).
127. Nakahata, T. et al. Extensive proliferation of mature connective-tissue type mast cells in vitro. *Nature* **324**, 65-7 (1986).
128. Gurish, M.F. et al. Differential expression of secretory granule proteases in mouse mast cells exposed to interleukin 3 and c-kit ligand. *J Exp Med* **175**, 1003-12 (1992).

129. Lantz, C.S. et al. Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature* **392**, 90-3 (1998).
130. Hu, Z.Q., Kobayashi, K., Zenda, N. & Shimamura, T. Tumor necrosis factor-alpha- and interleukin-6-triggered mast cell development from mouse spleen cells. *Blood* **89**, 526-33 (1997).
131. Yuan, Q., Gurish, M.F., Friend, D.S., Austen, K.F. & Boyce, J.A. Generation of a novel stem cell factor-dependent mast cell progenitor. *J Immunol* **161**, 5143-6 (1998).
132. Hauber, H.P., Bergeron, C. & Hamid, Q. IL-9 in allergic inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* **134**, 79-87 (2004).
133. Jones, T.G. et al. Antigen-induced increases in pulmonary mast cell progenitor numbers depend on IL-9 and CD1d-restricted NKT cells. *J Immunol* **183**, 5251-60 (2009).
134. Forbes, E.E. et al. IL-9- and mast cell-mediated intestinal permeability predisposes to oral antigen hypersensitivity. *J Exp Med* **205**, 897-913 (2008).
135. Eller, K. et al. IL-9 production by regulatory T cells recruits mast cells that are essential for regulatory T cell-induced immune suppression. *J Immunol* **186**, 83-91 (2010).
136. Merz, H. et al. Interleukin-9 (IL-9) and NPM-ALK each generate mast cell hyperplasia as single 'hit' and cooperate in producing a mastocytosis-like disease in mice. *Oncotarget* **1**, 104-19 (2010).
137. Temann, U.A., Ray, P. & Flavell, R.A. Pulmonary overexpression of IL-9 induces Th2 cytokine expression, leading to immune pathology. *J Clin Invest* **109**, 29-39 (2002).
138. Louahed, J. et al. Interleukin 9 promotes influx and local maturation of eosinophils. *Blood* **97**, 1035-42 (2001).
139. Patkai, J. et al. Deleterious effects of IL-9-activated mast cells and neuroprotection by antihistamine drugs in the developing mouse brain. *Pediatr Res* **50**, 222-30 (2001).
140. Matsuzawa, S. et al. IL-9 enhances the growth of human mast cell progenitors under stimulation with stem cell factor. *J Immunol* **170**, 3461-7 (2003).
141. Matsuda, H. et al. Nerve growth factor induces development of connective tissue-type mast cells in vitro from murine bone marrow cells. *J Exp Med* **174**, 7-14 (1991).
142. Welker, P., Grabbe, J., Gibbs, B., Zuberbier, T. & Henz, B.M. Nerve growth factor-beta induces mast-cell marker expression during in vitro culture of human umbilical cord blood cells. *Immunology* **99**, 418-26 (2000).
143. Kanbe, N. et al. Nerve growth factor prevents apoptosis of cord blood-derived human cultured mast cells synergistically with stem cell factor. *Clin Exp Allergy* **30**, 1113-20 (2000).
144. Spinnler, K., Frohlich, T., Arnold, G.J., Kunz, L. & Mayerhofer, A. Human tryptase cleaves pro-nerve growth factor (pro-NGF): hints of local, mast cell-dependent regulation of NGF/pro-NGF action. *J Biol Chem* **286**, 31707-13 (2011).
145. Burnet, F.M. The probable relationship of some or all mast cells to the T-cell system. *Cell Immunol* **30**, 358-60 (1977).
146. Czarnetzki, B.M., Sterry, W., Bazin, H. & Kalveram, K.J. Evidence that tissue mast cells derive from mononuclear phagocytes. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **67**, 44-8 (1982).
147. Kitamura, Y., Shimada, M., Hatanaka, K. & Miyano, Y. Development of mast cells from grafted bone marrow cells in irradiated mice. *Nature* **268**, 442-3 (1977).
148. Kitamura, Y., Yokoyama, M., Matsuda, H., Ohno, T. & Mori, K.J. Spleen colony-forming cell as common precursor for tissue mast cells and granulocytes. *Nature* **291**, 159-60 (1981).
149. Nabel, G., Galli, S.J., Dvorak, A.M., Dvorak, H.F. & Cantor, H. Inducer T lymphocytes synthesize a factor that stimulates proliferation of cloned mast cells. *Nature* **291**, 332-4 (1981).
150. Sonoda, T., Kitamura, Y., Haku, Y., Hara, H. & Mori, K.J. Mast-cell precursors in various haematopoietic colonies of mice produced in vivo and in vitro. *Br J Haematol* **53**, 611-20 (1983).
151. Galli, S.J., Grimbaldeston, M. & Tsai, M. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* **8**, 478-86 (2008).

152. Morii, E. et al. Roles of MITF for development of mast cells in mice: effects on both precursors and tissue environments. *Blood* **104**, 1656-61 (2004).
153. Hallgren, J. & Gurish, M.F. Pathways of murine mast cell development and trafficking: tracking the roots and routes of the mast cell. *Immunol Rev* **217**, 8-18 (2007).
154. Chen, C.C., Grimbaldston, M.A., Tsai, M., Weissman, I.L. & Galli, S.J. Identification of mast cell progenitors in adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 11408-13 (2005).
155. Kitamura, Y. & Ito, A. Mast cell-committed progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 11129-30 (2005).
156. Arinobu, Y. et al. Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18105-10 (2005).
157. Jamur, M.C. et al. Identification and characterization of undifferentiated mast cells in mouse bone marrow. *Blood* **105**, 4282-9 (2005).
158. Kirshenbaum, A.S., Kessler, S.W., Goff, J.P. & Metcalfe, D.D. Demonstration of the origin of human mast cells from CD34+ bone marrow progenitor cells. *J Immunol* **146**, 1410-5 (1991).
159. Kempuraj, D. et al. Characterization of mast cell-committed progenitors present in human umbilical cord blood. *Blood* **93**, 3338-46 (1999).
160. Newlands, G.F., Miller, H.R., MacKellar, A. & Galli, S.J. Stem cell factor contributes to intestinal mucosal mast cell hyperplasia in rats infected with *Nippostrongylus brasiliensis* or *Trichinella spiralis*, but anti-stem cell factor treatment decreases parasite egg production during *N. brasiliensis* infection. *Blood* **86**, 1968-76 (1995).
161. Brandt, E.B. et al. Mast cells are required for experimental oral allergen-induced diarrhea. *J Clin Invest* **112**, 1666-77 (2003).
162. Gekara, N.O. & Weiss, S. Mast cells initiate early anti-*Listeria* host defences. *Cell Microbiol* **10**, 225-36 (2008).
163. Soucek, L. et al. Mast cells are required for angiogenesis and macroscopic expansion of Myc-induced pancreatic islet tumors. *Nat Med* **13**, 1211-8 (2007).
164. Norris, A.A. Pharmacology of sodium cromoglycate. *Clin Exp Allergy* **26 Suppl 4**, 5-7 (1996).
165. Lawrence, C.E., Paterson, Y.Y., Wright, S.H., Knight, P.A. & Miller, H.R. Mouse mast cell protease-1 is required for the enteropathy induced by gastrointestinal helminth infection in the mouse. *Gastroenterology* **127**, 155-65 (2004).
166. Tchougounova, E., Pejler, G. & Abrink, M. The chymase, mouse mast cell protease 4, constitutes the major chymotrypsin-like activity in peritoneum and ear tissue. A role for mouse mast cell protease 4 in thrombin regulation and fibronectin turnover. *J Exp Med* **198**, 423-31 (2003).
167. Moon, T.C. et al. Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. *Mucosal Immunol* **3**, 111-28 (2009).
168. Jönsson. Mast cells and company. *frontiers in IMMUNOLOGY* **3**(2012).
169. Chervenick, P.A. & Boggs, D.R. Decreased neutrophils and megakaryocytes in anemic mice of genotype W/W. *J Cell Physiol* **73**, 25-30 (1969).
170. Grimbaldston, M.A. et al. Mast cell-deficient W-sash c-kit mutant Kit W-sh/W-sh mice as a model for investigating mast cell biology in vivo. *Am J Pathol* **167**, 835-48 (2005).
171. Buch, T. et al. A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration. *Nat Methods* **2**, 419-26 (2005).
172. Scholten, J. et al. Mast cell-specific Cre/loxP-mediated recombination in vivo. *Transgenic Res* **17**, 307-15 (2008).
173. Dudeck, A. et al. Mast cells are key promoters of contact allergy that mediate the adjuvant effects of haptens. *Immunity* **34**, 973-84 (2011).
174. Musch, W., Wege, A.K., Mannel, D.N. & Hehlhans, T. Generation and characterization of alpha-chymase-Cre transgenic mice. *Genesis* **46**, 163-6 (2008).
175. Rodewald, H.R., Dessing, M., Dvorak, A.M. & Galli, S.J. Identification of a committed precursor for the mast cell lineage. *Science* **271**, 818-22 (1996).

176. Feyerabend, T.B. et al. Cre-mediated cell ablation contests mast cell contribution in models of antibody- and T cell-mediated autoimmunity. *Immunity* **35**, 832-44 (2011).
177. Voehringer, D., Shinkai, K. & Locksley, R.M. Type 2 immunity reflects orchestrated recruitment of cells committed to IL-4 production. *Immunity* **20**, 267-77 (2004).
178. Kitamura, Y. Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations. *Annu Rev Immunol* **7**, 59-76 (1989).
179. Williams, C.M. & Galli, S.J. Mast cells can amplify airway reactivity and features of chronic inflammation in an asthma model in mice. *J Exp Med* **192**, 455-62 (2000).
180. Tanzola, M.B., Robbie-Ryan, M., Gutekunst, C.A. & Brown, M.A. Mast cells exert effects outside the central nervous system to influence experimental allergic encephalomyelitis disease course. *J Immunol* **171**, 4385-91 (2003).
181. Lee, Y.M. et al. Alteration of protease expression phenotype of mouse peritoneal mast cells by changing the microenvironment as demonstrated by in situ hybridization histochemistry. *Am J Pathol* **153**, 931-6 (1998).
182. Jippo, T. et al. Tissue-dependent alteration of protease expression phenotype in murine peritoneal mast cells that were genetically labeled with green fluorescent protein. *Am J Pathol* **158**, 1695-701 (2001).
183. Medzhitov, R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* **1**, 135-45 (2001).
184. Supajatura, V. et al. Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4. *J Immunol* **167**, 2250-6 (2001).
185. Matsushima, H., Yamada, N., Matsue, H. & Shimada, S. TLR3-, TLR7-, and TLR9-mediated production of proinflammatory cytokines and chemokines from murine connective tissue type skin-derived mast cells but not from bone marrow-derived mast cells. *J Immunol* **173**, 531-41 (2004).
186. Stelekati, E., Orinska, Z. & Bulfone-Paus, S. Mast cells in allergy: innate instructors of adaptive responses. *Immunobiology* **212**, 505-19 (2007).
187. Kulka, M., Alexopoulou, L., Flavell, R.A. & Metcalfe, D.D. Activation of mast cells by double-stranded RNA: evidence for activation through Toll-like receptor 3. *J Allergy Clin Immunol* **114**, 174-82 (2004).
188. Kulka, M. & Metcalfe, D.D. TLR3 activation inhibits human mast cell attachment to fibronectin and vitronectin. *Mol Immunol* **43**, 1579-86 (2006).
189. Ikeda, T. & Funaba, M. Altered function of murine mast cells in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Immunol Lett* **88**, 21-6 (2003).
190. Qiao, H., Andrade, M.V., Lisboa, F.A., Morgan, K. & Beaven, M.A. FcepsilonR1 and toll-like receptors mediate synergistic signals to markedly augment production of inflammatory cytokines in murine mast cells. *Blood* **107**, 610-8 (2006).
191. Supajatura, V. et al. Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J Clin Invest* **109**, 1351-9 (2002).
192. Nigo, Y.I. et al. Regulation of allergic airway inflammation through Toll-like receptor 4-mediated modification of mast cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2286-91 (2006).
193. Kirshenbaum, A.S., Swindle, E., Kulka, M., Wu, Y. & Metcalfe, D.D. Effect of lipopolysaccharide (LPS) and peptidoglycan (PGN) on human mast cell numbers, cytokine production, and protease composition. *BMC Immunol* **9**, 45 (2008).
194. Masuda, A., Yoshikai, Y., Aiba, K. & Matsuguchi, T. Th2 cytokine production from mast cells is directly induced by lipopolysaccharide and distinctly regulated by c-Jun N-terminal kinase and p38 pathways. *J Immunol* **169**, 3801-10 (2002).
195. Marshall, J.S., McCurdy, J.D. & Olynych, T. Toll-like receptor-mediated activation of mast cells: implications for allergic disease? *Int Arch Allergy Immunol* **132**, 87-97 (2003).
196. Rocha-de-Souza, C.M., Berent-Maoz, B., Mankuta, D., Moses, A.E. & Levi-Schaffer, F. Human mast cell activation by *Staphylococcus aureus*: interleukin-8 and tumor necrosis factor alpha release and the role of Toll-like receptor 2 and CD48 molecules. *Infect Immun* **76**, 4489-97 (2008).

197. McCurdy, J.D., Olynych, T.J., Maher, L.H. & Marshall, J.S. Cutting edge: distinct Toll-like receptor 2 activators selectively induce different classes of mediator production from human mast cells. *J Immunol* **170**, 1625-9 (2003).
198. Varadaradjalou, S. et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human mast cells. *Eur J Immunol* **33**, 899-906 (2003).
199. Carlos, D. et al. TLR2-dependent mast cell activation contributes to the control of Mycobacterium tuberculosis infection. *Microbes Infect* **11**, 770-8 (2009).
200. Orinska, Z. et al. TLR3-induced activation of mast cells modulates CD8+ T-cell recruitment. *Blood* **106**, 978-87 (2005).
201. Heib, V. et al. Mast cells are crucial for early inflammation, migration of Langerhans cells, and CTL responses following topical application of TLR7 ligand in mice. *Blood* **110**, 946-53 (2007).
202. Kanneganti, T.D. Central roles of NLRs and inflammasomes in viral infection. *Nat Rev Immunol* **10**, 688-98 (2010).
203. Haidl, I.D., McAlpine, S.M. & Marshall, J.S. Enhancement of mast cell IL-6 production by combined toll-like and nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor activation. *Int Arch Allergy Immunol* **154**, 227-35 (2010).
204. Agostini, L. et al. NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* **20**, 319-25 (2004).
205. Nakamura, Y. et al. Mast cells mediate neutrophil recruitment and vascular leakage through the NLRP3 inflammasome in histamine-independent urticaria. *J Exp Med* **206**, 1037-46 (2009).
206. Smith, G.M., Biggs, J., Norris, B., Anderson-Stewart, P. & Ward, R. Detection of a soluble form of the leukocyte surface antigen CD48 in plasma and its elevation in patients with lymphoid leukemias and arthritis. *J Clin Immunol* **17**, 502-9 (1997).
207. Malaviya, R., Gao, Z., Thankavel, K., van der Merwe, P.A. & Abraham, S.N. The mast cell tumor necrosis factor alpha response to FimH-expressing Escherichia coli is mediated by the glycosylphosphatidylinositol-anchored molecule CD48. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8110-5 (1999).
208. Malaviya, R. et al. Mast cell phagocytosis of FimH-expressing enterobacteria. *J Immunol* **152**, 1907-14 (1994).
209. Feger, F., Varadaradjalou, S., Gao, Z., Abraham, S.N. & Arock, M. The role of mast cells in host defense and their subversion by bacterial pathogens. *Trends Immunol* **23**, 151-8 (2002).
210. Munoz, S., Hernandez-Pando, R., Abraham, S.N. & Enciso, J.A. Mast cell activation by Mycobacterium tuberculosis: mediator release and role of CD48. *J Immunol* **170**, 5590-6 (2003).
211. Munitz, A. et al. 2B4 (CD244) is expressed and functional on human eosinophils. *J Immunol* **174**, 110-8 (2005).
212. Elishmereni, M. et al. Physical interactions between mast cells and eosinophils: a novel mechanism enhancing eosinophil survival in vitro. *Allergy* **66**, 376-85 (2010).
213. Turner, H. & Kinet, J.P. Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI. *Nature* **402**, B24-30 (1999).
214. Kinet, J.P. The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. *Annu Rev Immunol* **17**, 931-72 (1999).
215. Nadler, M.J., Matthews, S.A., Turner, H. & Kinet, J.P. Signal transduction by the high-affinity immunoglobulin E receptor Fc epsilon RI: coupling form to function. *Adv Immunol* **76**, 325-55 (2000).
216. Blank, U. & Rivera, J. The ins and outs of IgE-dependent mast-cell exocytosis. *Trends Immunol* **25**, 266-73 (2004).
217. Galli, S.J. et al. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol* **23**, 749-86 (2005).
218. Kalesnikoff, J. & Galli, S.J. New developments in mast cell biology. *Nat Immunol* **9**, 1215-23 (2008).

219. Galli, S.J., Tsai, M. & Piliponsky, A.M. The development of allergic inflammation. *Nature* **454**, 445-54 (2008).
220. Galli, S.J. & Tsai, M. Mast cells in allergy and infection: versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity. *Eur J Immunol* **40**, 1843-51 (2010).
221. Gurish, M.F. et al. IgE enhances parasite clearance and regulates mast cell responses in mice infected with *Trichinella spiralis*. *J Immunol* **172**, 1139-45 (2004).
222. Hepworth, M.R. et al. Mast cells orchestrate type 2 immunity to helminths through regulation of tissue-derived cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 6644-9 (2012).
223. Asai, K. et al. Regulation of mast cell survival by IgE. *Immunity* **14**, 791-800 (2001).
224. Kalesnikoff, J. et al. Monomeric IgE stimulates signaling pathways in mast cells that lead to cytokine production and cell survival. *Immunity* **14**, 801-11 (2001).
225. Kawakami, T. & Galli, S.J. Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nat Rev Immunol* **2**, 773-86 (2002).
226. Alfredsson, J., Puthalakath, H., Martin, H., Strasser, A. & Nilsson, G. Proapoptotic Bcl-2 family member Bim is involved in the control of mast cell survival and is induced together with Bcl-XL upon IgE-receptor activation. *Cell Death Differ* **12**, 136-44 (2005).
227. Siraganian, R.P. Mast cell signal transduction from the high-affinity IgE receptor. *Curr Opin Immunol* **15**, 639-46 (2003).
228. Nadler, M.J. & Kinet, J.P. Uncovering new complexities in mast cell signaling. *Nat Immunol* **3**, 707-8 (2002).
229. Odom, S. et al. Negative regulation of immunoglobulin E-dependent allergic responses by Lyn kinase. *J Exp Med* **199**, 1491-502 (2004).
230. Tam, S.Y. et al. RabGEF1 is a negative regulator of mast cell activation and skin inflammation. *Nat Immunol* **5**, 844-52 (2004).
231. Bansal, G., Xie, Z., Rao, S., Nocka, K.H. & Druey, K.M. Suppression of immunoglobulin E-mediated allergic responses by regulator of G protein signaling 13. *Nat Immunol* **9**, 73-80 (2008).
232. Kraft, S. & Kinet, J.P. New developments in FcεRI regulation, function and inhibition. *Nat Rev Immunol* **7**, 365-78 (2007).
233. Hitomi, K. et al. An immunoglobulin-like receptor, Allergin-1, inhibits immunoglobulin E-mediated immediate hypersensitivity reactions. *Nat Immunol* **11**, 601-7 (2010).
234. Daeron, M. et al. The same tyrosine-based inhibition motif, in the intracytoplasmic domain of Fc gamma RIIb, regulates negatively BCR-, TCR-, and FcR-dependent cell activation. *Immunity* **3**, 635-46 (1995).
235. Daeron, M., Malbec, O., Latour, S., Arock, M. & Fridman, W.H. Regulation of high-affinity IgE receptor-mediated mast cell activation by murine low-affinity IgG receptors. *J Clin Invest* **95**, 577-85 (1995).
236. Lesourne, R., Fridman, W.H. & Daeron, M. Dynamic interactions of Fc gamma receptor IIB with filamin-bound SHIP1 amplify filamentous actin-dependent negative regulation of Fc epsilon receptor I signaling. *J Immunol* **174**, 1365-73 (2005).
237. Tam, S.W., Demissie, S., Thomas, D. & Daeron, M. A bispecific antibody against human IgE and human FcγRIIb that inhibits antigen-induced histamine release by human mast cells and basophils. *Allergy* **59**, 772-80 (2004).
238. Benhamou, M., Bonnerot, C., Fridman, W.H. & Daeron, M. Molecular heterogeneity of murine mast cell Fc gamma receptors. *J Immunol* **144**, 3071-7 (1990).
239. Daeron, M. Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol* **15**, 203-34 (1997).
240. Ghannadan, M. et al. Phenotypic characterization of human skin mast cells by combined staining with toluidine blue and CD antibodies. *J Invest Dermatol* **111**, 689-95 (1998).
241. Zhao, W. et al. Fc gamma RIIa, not Fc gamma RIIb, is constitutively and functionally expressed on skin-derived human mast cells. *J Immunol* **177**, 694-701 (2006).

242. Kepley, C.L. et al. Co-aggregation of FcγRII with FcεRI on human mast cells inhibits antigen-induced secretion and involves SHIP-Grb2-Dok complexes. *J Biol Chem* **279**, 35139-49 (2004).
243. Agis, H. et al. Comparative immunophenotypic analysis of human mast cells, blood basophils and monocytes. *Immunology* **87**, 535-43 (1996).
244. Jonsson, F. et al. Human FcγRIIA induces anaphylactic and allergic reactions. *Blood* **119**, 2533-44 (2012).
245. Okayama, Y., Kirshenbaum, A.S. & Metcalfe, D.D. Expression of a functional high-affinity IgG receptor, FcγRI, on human mast cells: Up-regulation by IFN-γ. *J Immunol* **164**, 4332-9 (2000).
246. Tkaczyk, C. et al. Activation of human mast cells through the high affinity IgG receptor. *Mol Immunol* **38**, 1289-93 (2002).
247. Kobayashi, R. et al. Hyperexpression of FcγRI and Toll-like receptor 4 in the intestinal mast cells of Crohn's disease patients. *Clin Immunol* **125**, 149-58 (2007).
248. Brown, M.G., King, C.A., Sherrin, C., Marshall, J.S. & Anderson, R. A dominant role for FcγRII in antibody-enhanced dengue virus infection of human mast cells and associated CCL5 release. *J Leukoc Biol* **80**, 1242-50 (2006).
249. Robbie-Ryan, M., Tanzola, M.B., Secor, V.H. & Brown, M.A. Cutting edge: both activating and inhibitory Fc receptors expressed on mast cells regulate experimental allergic encephalomyelitis disease severity. *J Immunol* **170**, 1630-4 (2003).
250. Bienenstock, J. et al. Mast cell/nerve interactions in vitro and in vivo. *Am Rev Respir Dis* **143**, S55-8 (1991).
251. Singh, L.K., Pang, X., Alexacos, N., Letourneau, R. & Theoharides, T.C. Acute immobilization stress triggers skin mast cell degranulation via corticotropin releasing hormone, neurotensin, and substance P: A link to neurogenic skin disorders. *Brain Behav Immun* **13**, 225-39 (1999).
252. Gao, C. et al. Serine proteases excite myenteric neurons through protease-activated receptors in guinea pig small intestine. *Gastroenterology* **123**, 1554-64 (2002).
253. Fu, L.W., Pan, H.L. & Longhurst, J.C. Endogenous histamine stimulates ischemically sensitive abdominal visceral afferents through H1 receptors. *Am J Physiol* **273**, H2726-37 (1997).
254. Barbara, G. et al. Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* **126**, 693-702 (2004).
255. Ferry, X., Brehin, S., Kamel, R. & Landry, Y. G protein-dependent activation of mast cell by peptides and basic secretagogues. *Peptides* **23**, 1507-15 (2002).
256. Janiszewski, J., Bienenstock, J. & Blennerhassett, M.G. Picomolar doses of substance P trigger electrical responses in mast cells without degranulation. *Am J Physiol* **267**, C138-45 (1994).
257. Okayama, Y., Ono, Y., Nakazawa, T., Church, M.K. & Mori, M. Human skin mast cells produce TNF-α by substance P. *Int Arch Allergy Immunol* **117 Suppl 1**, 48-51 (1998).
258. Kulka, M., Sheen, C.H., Tancowny, B.P., Grammer, L.C. & Schleimer, R.P. Neuropeptides activate human mast cell degranulation and chemokine production. *Immunology* **123**, 398-410 (2008).
259. Tancowny, B.P., Karpov, V., Schleimer, R.P. & Kulka, M. Substance P primes lipoteichoic acid- and Pam3CysSerLys4-mediated activation of human mast cells by up-regulating Toll-like receptor 2. *Immunology* **131**, 220-30 (2010).
260. Naukkarinen, A. et al. Quantitative histochemical analysis of mast cells and sensory nerves in psoriatic skin. *J Pathol* **180**, 200-5 (1996).
261. Ozdamar, S.O., Seekin, D., Kandemir, B. & Turanli, A.Y. Mast cells in psoriasis. *Dermatology* **192**, 190 (1996).
262. Theoharides, T.C. et al. IL-33 augments substance P-induced VEGF secretion from human mast cells and is increased in psoriatic skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 4448-53 (2010).
263. van der Kleij, H.P. et al. Functional expression of neurokinin 1 receptors on mast cells induced by IL-4 and stem cell factor. *J Immunol* **171**, 2074-9 (2003).

264. Karimi, K., Redegeld, F.A., Heijdra, B. & Nijkamp, F.P. Stem cell factor and interleukin-4 induce murine bone marrow cells to develop into mast cells with connective tissue type characteristics in vitro. *Exp Hematol* **27**, 654-62 (1999).
265. Bischoff, S.C. et al. Substance P and other neuropeptides do not induce mediator release in isolated human intestinal mast cells. *Neurogastroenterol Motil* **16**, 185-93 (2004).
266. Ganz, T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* **3**, 710-20 (2003).
267. Di Nardo, A., Vitiello, A. & Gallo, R.L. Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide. *J Immunol* **170**, 2274-8 (2003).
268. Sorensen, O.E. et al. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* **97**, 3951-9 (2001).
269. Li, G., Domenico, J., Jia, Y., Lucas, J.J. & Gelfand, E.W. NF-kappaB-dependent induction of cathelicidin-related antimicrobial peptide in murine mast cells by lipopolysaccharide. *Int Arch Allergy Immunol* **150**, 122-32 (2009).
270. Di Nardo, A., Yamasaki, K., Dorschner, R.A., Lai, Y. & Gallo, R.L. Mast cell cathelicidin antimicrobial peptide prevents invasive group A Streptococcus infection of the skin. *J Immunol* **180**, 7565-73 (2008).
271. Wang, Z. et al. Skin mast cells protect mice against vaccinia virus by triggering mast cell receptor S1PR2 and releasing antimicrobial peptides. *J Immunol* **188**, 345-57 (2011).
272. Abel, J. et al. Staphylococcus aureus evades the extracellular antimicrobial activity of mast cells by promoting its own uptake. *J Innate Immun* **3**, 495-507 (2011).
273. Bals, R., Wang, X., Zasloff, M. & Wilson, J.M. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9541-6 (1998).
274. Frohm, M. et al. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J Biol Chem* **272**, 15258-63 (1997).
275. Niyonsaba, F. et al. A cathelicidin family of human antibacterial peptide LL-37 induces mast cell chemotaxis. *Immunology* **106**, 20-6 (2002).
276. Niyonsaba, F., Someya, A., Hirata, M., Ogawa, H. & Nagaoka, I. Evaluation of the effects of peptide antibiotics human beta-defensins-1/-2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D(2) production from mast cells. *Eur J Immunol* **31**, 1066-75 (2001).
277. Harvima, I.T., Nilsson, G., Suttle, M.M. & Naukkarinen, A. Is there a role for mast cells in psoriasis? *Arch Dermatol Res* **300**, 461-78 (2008).
278. Dombrowski, Y. & Schaubert, J. Cathelicidin LL-37: a defense molecule with a potential role in psoriasis pathogenesis. *Exp Dermatol* **21**, 327-30 (2012).
279. Niyonsaba, F. et al. Antimicrobial peptides human beta-defensins and cathelicidin LL-37 induce the secretion of a pruritogenic cytokine IL-31 by human mast cells. *J Immunol* **184**, 3526-34 (2010).
280. Schiemann, F. et al. The cathelicidin LL-37 activates human mast cells and is degraded by mast cell tryptase: counter-regulation by CXCL4. *J Immunol* **183**, 2223-31 (2009).
281. Gordon, J.R. & Galli, S.J. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin. *Nature* **346**, 274-6 (1990).
282. Malaviya, R., Ikeda, T., Ross, E. & Abraham, S.N. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature* **381**, 77-80 (1996).
283. Burns, A.R. et al. P-selectin mediates neutrophil adhesion to endothelial cell borders. *J Leukoc Biol* **65**, 299-306 (1999).
284. Huang, C. et al. Induction of a selective and persistent extravasation of neutrophils into the peritoneal cavity by tryptase mouse mast cell protease 6. *J Immunol* **160**, 1910-9 (1998).
285. Schmidlin, F. et al. Protease-activated receptor 2 mediates eosinophil infiltration and hyperreactivity in allergic inflammation of the airway. *J Immunol* **169**, 5315-21 (2002).

286. Lin, T.J., Garduno, R., Boudreau, R.T. & Issekutz, A.C. *Pseudomonas aeruginosa* activates human mast cells to induce neutrophil transendothelial migration *via* mast cell-derived IL-1 alpha and beta. *J Immunol* **169**, 4522-30 (2002).
287. Shelburne, C.P. et al. Mast cells augment adaptive immunity by orchestrating dendritic cell trafficking through infected tissues. *Cell Host Microbe* **6**, 331-42 (2009).
288. Galli, S.J., Nakae, S. & Tsai, M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* **6**, 135-42 (2005).
289. Jawdat, D.M., Rowden, G. & Marshall, J.S. Mast cells have a pivotal role in TNF-independent lymph node hypertrophy and the mobilization of Langerhans cells in response to bacterial peptidoglycan. *J Immunol* **177**, 1755-62 (2006).
290. Maurer, M. et al. Skin mast cells control T cell-dependent host defense in *Leishmania* major infections. *Faseb J* **20**, 2460-7 (2006).
291. St John, A.L. et al. Immune surveillance by mast cells during dengue infection promotes natural killer (NK) and NKT-cell recruitment and viral clearance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 9190-5 (2011).
292. Burke, S.M. et al. Human mast cell activation with virus-associated stimuli leads to the selective chemotaxis of natural killer cells by a CXCL8-dependent mechanism. *Blood* **111**, 5467-76 (2008).
293. Rumsaeng, V. et al. Human mast cells produce the CD4+ T lymphocyte chemoattractant factor, IL-16. *J Immunol* **159**, 2904-10 (1997).
294. Tedla, N. et al. Regulation of T lymphocyte trafficking into lymph nodes during an immune response by the chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-1 alpha and MIP-1 beta. *J Immunol* **161**, 5663-72 (1998).
295. Wang, H.W., Tedla, N., Lloyd, A.R., Wakefield, D. & McNeil, P.H. Mast cell activation and migration to lymph nodes during induction of an immune response in mice. *J Clin Invest* **102**, 1617-26 (1998).
296. Marshall, J.S. Mast-cell responses to pathogens. *Nat Rev Immunol* **4**, 787-99 (2004).
297. Sayed, B.A., Christy, A.L., Walker, M.E. & Brown, M.A. Meningeal mast cells affect early T cell central nervous system infiltration and blood-brain barrier integrity through TNF: a role for neutrophil recruitment? *J Immunol* **184**, 6891-900 (2010).
298. Sayed, B.A., Walker, M.E. & Brown, M.A. Cutting edge: mast cells regulate disease severity in a relapsing-remitting model of multiple sclerosis. *J Immunol* **186**, 3294-8 (2011).
299. Grakoui, A. et al. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* **285**, 221-7 (1999).
300. Valitutti, S. Immunological synapse: center of attention again. *Immunity* **29**, 384-6 (2008).
301. Huppa, J.B. & Davis, M.M. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* **3**, 973-83 (2003).
302. Allenspach, E.J. et al. ERM-dependent movement of CD43 defines a novel protein complex distal to the immunological synapse. *Immunity* **15**, 739-50 (2001).
303. Delon, J., Kaibuchi, K. & Germain, R.N. Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin. *Immunity* **15**, 691-701 (2001).
304. Leupin, O., Zaru, R., Laroche, T., Muller, S. & Valitutti, S. Exclusion of CD45 from the T-cell receptor signaling area in antigen-stimulated T lymphocytes. *Curr Biol* **10**, 277-80 (2000).
305. Germain, R.N. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* **76**, 287-99 (1994).
306. Kapsenberg, M.L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* **3**, 984-93 (2003).
307. Bromley, S.K., Mempel, T.R. & Luster, A.D. Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. *Nat Immunol* **9**, 970-80 (2008).
308. Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* **290**, 92-7 (2000).

309. Surh, C.D. & Sprent, J. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity* **29**, 848-62 (2008).
310. Kondrack, R.M. et al. Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells. *J Exp Med* **198**, 1797-806 (2003).
311. Lenz, D.C. et al. IL-7 regulates basal homeostatic proliferation of antiviral CD4+T cell memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 9357-62 (2004).
312. Purton, J.F. et al. Antiviral CD4+ memory T cells are IL-15 dependent. *J Exp Med* **204**, 951-61 (2007).
313. Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708-12 (1999).
314. Sallusto, F., Mackay, C.R. & Lanzavecchia, A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol* **18**, 593-620 (2000).
315. Zielinski, C.E. et al. Dissecting the human immunologic memory for pathogens. *Immunol Rev* **240**, 40-51 (2011).
316. Woodland, D.L. & Kohlmeier, J.E. Migration, maintenance and recall of memory T cells in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol* **9**, 153-61 (2009).
317. Egawa, G. & Kabashima, K. Skin as a peripheral lymphoid organ: revisiting the concept of skin-associated lymphoid tissues. *J Invest Dermatol* **131**, 2178-85 (2011).
318. Clark, R.A. Skin-resident T cells: the ups and downs of on site immunity. *J Invest Dermatol* **130**, 362-70 (2009).
319. Zhou, X., Bailey-Bucktrout, S., Jeker, L.T. & Bluestone, J.A. Plasticity of CD4(+) FoxP3(+) T cells. *Curr Opin Immunol* **21**, 281-5 (2009).
320. Zhou, L., Chong, M.M. & Littman, D.R. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity* **30**, 646-55 (2009).
321. Lee, Y.K., Mukasa, R., Hatton, R.D. & Weaver, C.T. Developmental plasticity of Th17 and Treg cells. *Curr Opin Immunol* **21**, 274-80 (2009).
322. Bluestone, J.A., Mackay, C.R., O'Shea, J.J. & Stockinger, B. The functional plasticity of T cell subsets. *Nat Rev Immunol* **9**, 811-6 (2009).
323. Messi, M. et al. Memory and flexibility of cytokine gene expression as separable properties of human T(H)1 and T(H)2 lymphocytes. *Nat Immunol* **4**, 78-86 (2003).
324. Hegazy, A.N. et al. Interferons direct Th2 cell reprogramming to generate a stable GATA-3(+)T-bet(+) cell subset with combined Th2 and Th1 cell functions. *Immunity* **32**, 116-28 (2010).
325. Acosta-Rodriguez, E.V. et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* **8**, 639-46 (2007).
326. Annunziato, F. et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* **204**, 1849-61 (2007).
327. Xu, L., Kitani, A., Fuss, I. & Strober, W. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J Immunol* **178**, 6725-9 (2007).
328. Koch, M.A. et al. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol* **10**, 595-602 (2009).
329. Wei, G. et al. Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells. *Immunity* **30**, 155-67 (2009).
330. Tsuji, M. et al. Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3+ T cells in gut Peyer's patches. *Science* **323**, 1488-92 (2009).
331. Reinhardt, R.L., Liang, H.E. & Locksley, R.M. Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nat Immunol* **10**, 385-93 (2009).
332. King, I.L. & Mohrs, M. IL-4-producing CD4+ T cells in reactive lymph nodes during helminth infection are T follicular helper cells. *J Exp Med* **206**, 1001-7 (2009).
333. Zaretsky, A.G. et al. T follicular helper cells differentiate from Th2 cells in response to helminth antigens. *J Exp Med* **206**, 991-9 (2009).

334. Duhon, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol* **10**, 857-63 (2009).
335. Trifari, S., Kaplan, C.D., Tran, E.H., Crellin, N.K. & Spits, H. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat Immunol* **10**, 864-71 (2009).
336. Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. From synapses to immunological memory: the role of sustained T cell stimulation. *Curr Opin Immunol* **12**, 92-8 (2000).
337. Ueno, H., Palucka, A.K. & Banchereau, J. The expanding family of dendritic cell subsets. *Nat Biotechnol* **28**, 813-5 (2010).
338. Bottomly, K. T cells and dendritic cells get intimate. *Science* **283**, 1124-5 (1999).
339. Maldonado-Lopez, R. & Moser, M. Dendritic cell subsets and the regulation of Th1/Th2 responses. *Semin Immunol* **13**, 275-82 (2001).
340. Maldonado-Lopez, R. et al. CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp Med* **189**, 587-92 (1999).
341. Maldonado-Lopez, R. et al. Role of CD8alpha+ and CD8alpha- dendritic cells in the induction of primary immune responses in vivo. *J Leukoc Biol* **66**, 242-6 (1999).
342. Maldonado-Lopez, R., Maliszewski, C., Urbain, J. & Moser, M. Cytokines regulate the capacity of CD8alpha(+) and CD8alpha(-) dendritic cells to prime Th1/Th2 cells in vivo. *J Immunol* **167**, 4345-50 (2001).
343. Pulendran, B. et al. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1036-41 (1999).
344. Medzhitov, R. & Janeway, C.A., Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* **91**, 295-8 (1997).
345. Arriaga, A.K., Orozco, E.H., Aguilar, L.D., Rook, G.A. & Hernandez Pando, R. Immunological and pathological comparative analysis between experimental latent tuberculous infection and progressive pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol* **128**, 229-37 (2002).
346. Matzinger, P. An innate sense of danger. *Ann N Y Acad Sci* **961**, 341-2 (2002).
347. Matzinger, P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* **296**, 301-5 (2002).
348. Rescigno, M. Dendritic cells and the complexity of microbial infection. *Trends Microbiol* **10**, 425-61 (2002).
349. Rescigno, M. et al. Toll-like receptor 4 is not required for the full maturation of dendritic cells or for the degradation of Gram-negative bacteria. *Eur J Immunol* **32**, 2800-6 (2002).
350. Fernandez, N.C. et al. Dendritic cells (DC) promote natural killer (NK) cell functions: dynamics of the human DC/NK cell cross talk. *Eur Cytokine Netw* **13**, 17-27 (2002).
351. Pulendran, B., Palucka, K. & Banchereau, J. Sensing pathogens and tuning immune responses. *Science* **293**, 253-6 (2001).
352. Reis e Sousa, C. Dendritic cells as sensors of infection. *Immunity* **14**, 495-8 (2001).
353. Bugeon, L., Gardner, L.M., Rose, A., Gentle, M. & Dallman, M.J. Cutting edge: Notch signaling induces a distinct cytokine profile in dendritic cells that supports T cell-mediated regulation and IL-2-dependent IL-17 production. *J Immunol* **181**, 8189-93 (2008).
354. Tanaka, J. et al. Human TSLP and TLR3 ligands promote differentiation of Th17 cells with a central memory phenotype under Th2-polarizing conditions. *Clin Exp Allergy* **39**, 89-100 (2009).
355. Yu, C.F. et al. Human plasmacytoid dendritic cells support Th17 cell effector function in response to TLR7 ligation. *J Immunol* **184**, 1159-67 (2010).
356. Isaksson, M. et al. Plasmacytoid DC promote priming of autoimmune Th17 cells and EAE. *Eur J Immunol* **39**, 2925-35 (2009).
357. Fujita, H. et al. Human Langerhans cells induce distinct IL-22-producing CD4+ T cells lacking IL-17 production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 21795-800 (2009).
358. Gordon, S. & Taylor, P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* **5**, 953-64 (2005).

359. Mosser, D.M. & Edwards, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* **8**, 958-69 (2008).
360. Christensen, J.P., Kauffmann, S.O. & Thomsen, A.R. Deficient CD4+ T cell priming and regression of CD8+ T cell functionality in virus-infected mice lacking a normal B cell compartment. *J Immunol* **171**, 4733-41 (2003).
361. Crawford, A., Macleod, M., Schumacher, T., Corlett, L. & Gray, D. Primary T cell expansion and differentiation in vivo requires antigen presentation by B cells. *J Immunol* **176**, 3498-506 (2006).
362. Linton, P.J. et al. Costimulation via OX40L expressed by B cells is sufficient to determine the extent of primary CD4 cell expansion and Th2 cytokine secretion in vivo. *J Exp Med* **197**, 875-83 (2003).
363. Lund, F.E. et al. B cells are required for generation of protective effector and memory CD4 cells in response to *Pneumocystis* lung infection. *J Immunol* **176**, 6147-54 (2006).
364. Linton, P.J., Harbertson, J. & Bradley, L.M. A critical role for B cells in the development of memory CD4 cells. *J Immunol* **165**, 5558-65 (2000).
365. Schultze, J.L. et al. Human non-germinal center B cell interleukin (IL)-12 production is primarily regulated by T cell signals CD40 ligand, interferon gamma, and IL-10: role of B cells in the maintenance of T cell responses. *J Exp Med* **189**, 1-12 (1999).
366. Wojciechowski, W. et al. Cytokine-producing effector B cells regulate type 2 immunity to *H. polygyrus*. *Immunity* **30**, 421-33 (2009).
367. Whitmire, J.K. et al. Requirement of B cells for generating CD4+ T cell memory. *J Immunol* **182**, 1868-76 (2009).
368. Duez, C. et al. Migration and accumulation of eosinophils toward regional lymph nodes after airway allergen challenge. *J Allergy Clin Immunol* **114**, 820-5 (2004).
369. Shi, H.Z., Humbles, A., Gerard, C., Jin, Z. & Weller, P.F. Lymph node trafficking and antigen presentation by endobronchial eosinophils. *J Clin Invest* **105**, 945-53 (2000).
370. Hansel, T.T. et al. Sputum eosinophils from asthmatics express ICAM-1 and HLA-DR. *Clin Exp Immunol* **86**, 271-7 (1991).
371. Ohkawara, Y. et al. CD40 expression by human peripheral blood eosinophils. *J Clin Invest* **97**, 1761-6 (1996).
372. MacKenzie, J.R., Mattes, J., Dent, L.A. & Foster, P.S. Eosinophils promote allergic disease of the lung by regulating CD4(+) Th2 lymphocyte function. *J Immunol* **167**, 3146-55 (2001).
373. Tamura, N. et al. Requirement of CD80 and CD86 molecules for antigen presentation by eosinophils. *Scand J Immunol* **44**, 229-38 (1996).
374. Woerly, G. et al. Expression of CD28 and CD86 by human eosinophils and role in the secretion of type 1 cytokines (interleukin 2 and interferon gamma): inhibition by immunoglobulin a complexes. *J Exp Med* **190**, 487-95 (1999).
375. Celestin, J. et al. IL-3 induces B7.2 (CD86) expression and costimulatory activity in human eosinophils. *J Immunol* **167**, 6097-104 (2001).
376. Del Pozo, V. et al. Eosinophil as antigen-presenting cell: activation of T cell clones and T cell hybridoma by eosinophils after antigen processing. *Eur J Immunol* **22**, 1919-25 (1992).
377. Hansel, T.T. et al. Induction and function of eosinophil intercellular adhesion molecule-1 and HLA-DR. *J Immunol* **149**, 2130-6 (1992).
378. Mawhorter, S.D., Kazura, J.W. & Boom, W.H. Human eosinophils as antigen-presenting cells: relative efficiency for superantigen- and antigen-induced CD4+ T-cell proliferation. *Immunology* **81**, 584-91 (1994).
379. Weller, P.F. et al. Accessory cell function of human eosinophils. HLA-DR-dependent, MHC-restricted antigen-presentation and IL-1 alpha expression. *J Immunol* **150**, 2554-62 (1993).
380. Padigel, U.M., Lee, J.J., Nolan, T.J., Schad, G.A. & Abraham, D. Eosinophils can function as antigen-presenting cells to induce primary and secondary immune responses to *Strongyloides stercoralis*. *Infect Immun* **74**, 3232-8 (2006).

381. Padigel, U.M. et al. Eosinophils act as antigen-presenting cells to induce immunity to *Strongyloides stercoralis* in mice. *J Infect Dis* **196**, 1844-51 (2007).
382. Wang, H.B., Ghiran, I., Matthaei, K. & Weller, P.F. Airway eosinophils: allergic inflammation recruited professional antigen-presenting cells. *J Immunol* **179**, 7585-92 (2007).
383. Gessner, A., Mohrs, K. & Mohrs, M. Mast cells, basophils, and eosinophils acquire constitutive IL-4 and IL-13 transcripts during lineage differentiation that are sufficient for rapid cytokine production. *J Immunol* **174**, 1063-72 (2005).
384. Min, B. et al. Basophils produce IL-4 and accumulate in tissues after infection with a Th2-inducing parasite. *J Exp Med* **200**, 507-17 (2004).
385. Perrigoue, J.G. et al. MHC class II-dependent basophil-CD4+ T cell interactions promote T(H)2 cytokine-dependent immunity. *Nat Immunol* **10**, 697-705 (2009).
386. Sokol, C.L. et al. Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response. *Nat Immunol* **10**, 713-20 (2009).
387. Yoshimoto, T. et al. Basophils contribute to T(H)2-IgE responses in vivo via IL-4 production and presentation of peptide-MHC class II complexes to CD4+ T cells. *Nat Immunol* **10**, 706-12 (2009).
388. Hammad, H. et al. Inflammatory dendritic cells--not basophils--are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. *J Exp Med* **207**, 2097-111 (2010).
389. Mantovani, A., Cassatella, M.A., Costantini, C. & Jaillon, S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* **11**, 519-31 (2011).
390. Pliyev, B.K., Sumarokov, A.B., Buriachkovskaia, L.I. & Menshikov, M. Extracellular acidosis promotes neutrophil transdifferentiation to MHC class II-expressing cells. *Cell Immunol* **271**, 214-8 (2011).
391. Ostanin, D.V. et al. Acquisition of antigen-presenting functions by neutrophils isolated from mice with chronic colitis. *J Immunol* **188**, 1491-502 (2012).
392. Abi Abdallah, D.S., Egan, C.E., Butcher, B.A. & Denkers, E.Y. Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. *Int Immunol* **23**, 317-26 (2010).
393. Hancock, W.W., Kraft, N. & Atkins, R.C. The immunohistochemical demonstration of major histocompatibility antigens in the human kidney using monoclonal antibodies. *Pathology* **14**, 409-14 (1982).
394. Hart, D.N. et al. Localization of HLA-ABC and DR antigens in human kidney. *Transplantation* **31**, 428-33 (1981).
395. Shiao, S.L., McNiff, J.M. & Pober, J.S. Memory T cells and their costimulators in human allograft injury. *J Immunol* **175**, 4886-96 (2005).
396. Miyazaki, D. et al. Herpes simplex virus type 1-induced transcriptional networks of corneal endothelial cells indicate antigen presentation function. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**, 4282-93 (2011).
397. Manes, T.D. & Pober, J.S. Antigen presentation by human microvascular endothelial cells triggers ICAM-1-dependent transendothelial protrusion by, and fractalkine-dependent transendothelial migration of, effector memory CD4+ T cells. *J Immunol* **180**, 8386-92 (2008).
398. Grimaldeston, M.A., Metz, M., Yu, M., Tsai, M. & Galli, S.J. Effector and potential immunoregulatory roles of mast cells in IgE-associated acquired immune responses. *Curr Opin Immunol* **18**, 751-60 (2006).
399. Sayed, B.A., Christy, A., Quirion, M.R. & Brown, M.A. The master switch: the role of mast cells in autoimmunity and tolerance. *Annu Rev Immunol* **26**, 705-39 (2008).
400. Jutel, M. et al. Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. *Nature* **413**, 420-5 (2001).
401. Nakano, N. et al. Involvement of mast cells in IL-12/23 p40 production is essential for survival from polymicrobial infections. *Blood* **109**, 4846-55 (2007).

402. Dudeck, A., Suender, C.A., Kostka, S.L., von Stebut, E. & Maurer, M. Mast cells promote Th1 and Th17 responses by modulating dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol* **41**, 1883-93 (2011).
403. Xue, L., Barrow, A. & Pettipher, R. Interaction between prostaglandin D and chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells mediates cytokine production by Th2 lymphocytes in response to activated mast cells. *Clin Exp Immunol* **156**, 126-33 (2009).
404. Xue, L. et al. Prostaglandin D2 causes preferential induction of proinflammatory Th2 cytokine production through an action on chemoattractant receptor-like molecule expressed on Th2 cells. *J Immunol* **175**, 6531-6 (2005).
405. Kuchroo, V.K., Umetsu, D.T., DeKruyff, R.H. & Freeman, G.J. The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease. *Nat Rev Immunol* **3**, 454-62 (2003).
406. McIntire, J.J., Umetsu, D.T. & DeKruyff, R.H. TIM-1, a novel allergy and asthma susceptibility gene. *Springer Semin Immunopathol* **25**, 335-48 (2004).
407. Nakae, S. et al. TIM-1 and TIM-3 enhancement of Th2 cytokine production by mast cells. *Blood* **110**, 2565-8 (2007).
408. Gregory, G.D., Raju, S.S., Winandy, S. & Brown, M.A. Mast cell IL-4 expression is regulated by Ikaros and influences encephalitogenic Th1 responses in EAE. *J Clin Invest* **116**, 1327-36 (2006).
409. Nakae, S., Suto, H., Berry, G.J. & Galli, S.J. Mast cell-derived TNF can promote Th17 cell-dependent neutrophil recruitment in ovalbumin-challenged OII mice. *Blood* **109**, 3640-8 (2007).
410. Piconese, S. et al. Mast cells counteract regulatory T-cell suppression through interleukin-6 and OX40/OX40L axis toward Th17-cell differentiation. *Blood* **114**, 2639-48 (2009).
411. Tripodo, C. et al. Mast cells and Th17 cells contribute to the lymphoma-associated proinflammatory microenvironment of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Am J Pathol* **177**, 792-802 (2010).
412. Lu, L.F. et al. Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature* **442**, 997-1002 (2006).
413. Forward, N.A., Furlong, S.J., Yang, Y., Lin, T.J. & Hoskin, D.W. Mast cells down-regulate CD4+CD25+ T regulatory cell suppressor function *via* histamine H1 receptor interaction. *J Immunol* **183**, 3014-22 (2009).
414. de Vries, V.C. et al. Mast cell degranulation breaks peripheral tolerance. *Am J Transplant* **9**, 2270-80 (2009).
415. Blatner, N.R. et al. In colorectal cancer mast cells contribute to systemic regulatory T-cell dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 6430-5 (2010).
416. Gounaris, E. et al. T-regulatory cells shift from a protective anti-inflammatory to a cancer-promoting proinflammatory phenotype in polyposis. *Cancer Res* **69**, 5490-7 (2009).
417. Kashyap, M. et al. Cutting edge: CD4 T cell-mast cell interactions alter IgE receptor expression and signaling. *J Immunol* **180**, 2039-43 (2008).
418. Gri, G. et al. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction. *Immunity* **29**, 771-81 (2008).
419. Chacon-Salinas, R., Limon-Flores, A.Y., Chavez-Blanco, A.D., Gonzalez-Estrada, A. & Ullrich, S.E. Mast cell-derived IL-10 suppresses germinal center formation by affecting T follicular helper cell function. *J Immunol* **186**, 25-31 (2010).
420. Mazzoni, A., Siraganian, R.P., Leifer, C.A. & Segal, D.M. Dendritic cell modulation by mast cells controls the Th1/Th2 balance in responding T cells. *J Immunol* **177**, 3577-81 (2006).
421. Hofmann, A.M. & Abraham, S.N. New roles for mast cells in modulating allergic reactions and immunity against pathogens. *Curr Opin Immunol* **21**, 679-86 (2009).
422. Abraham, S.N. & St John, A.L. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat Rev Immunol* **10**, 440-52 (2010).

423. Daeron, M. & Voisin, G.A. Mast cell membrane antigens and Fc receptors in anaphylaxis. I. Products of the major histocompatibility complex involved in alloantibody-induced mast cell activation. *Immunology* **38**, 447-58 (1979).
424. Frandji, P. et al. Antigen-dependent stimulation by bone marrow-derived mast cells of MHC class II-restricted T cell hybridoma. *J Immunol* **151**, 6318-28 (1993).
425. Frandji, P. et al. Presentation of soluble antigens by mast cells: upregulation by interleukin-4 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and downregulation by interferon-gamma. *Cell Immunol* **163**, 37-46 (1995).
426. Fox, C.C., Jewell, S.D. & Whitacre, C.C. Rat peritoneal mast cells present antigen to a PPD-specific T cell line. *Cell Immunol* **158**, 253-64 (1994).
427. Tkaczyk, C. et al. Specific antigen targeting to surface IgE and IgG on mouse bone marrow-derived mast cells enhances efficiency of antigen presentation. *Immunology* **94**, 318-24 (1998).
428. Kambayashi, T. et al. Indirect involvement of allergen-captured mast cells in antigen presentation. *Blood* **111**, 1489-96 (2008).
429. Gaudenzio, N. et al. Cell-cell cooperation at the T helper cell/mast cell immunological synapse. *Blood* **114**, 4979-88 (2009).
430. Yu, M. et al. Identification of an IFN-gamma/mast cell axis in a mouse model of chronic asthma. *J Clin Invest* **121**, 3133-43 (2011).
431. Depoil, D. et al. Immunological synapses are versatile structures enabling selective T cell polarization. *Immunity* **22**, 185-94 (2005).
432. Valitutti, S., Dessing, M., Aktories, K., Gallati, H. & Lanzavecchia, A. Sustained signaling leading to T cell activation results from prolonged T cell receptor occupancy. Role of T cell actin cytoskeleton. *J Exp Med* **181**, 577-84 (1995).
433. Inamura, N., Mekori, Y.A., Bhattacharyya, S.P., Bianchine, P.J. & Metcalfe, D.D. Induction and enhancement of Fc(epsilon)RI-dependent mast cell degranulation following coculture with activated T cells: dependency on ICAM-1- and leukocyte function-associated antigen (LFA)-1-mediated heterotypic aggregation. *J Immunol* **160**, 4026-33 (1998).
434. Seidel, S.D. et al. Activation of the Ah receptor signaling pathway by prostaglandins. *J Biochem Mol Toxicol* **15**, 187-96 (2001).
435. Boniface, K. et al. IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J Immunol* **174**, 3695-702 (2005).
436. Liang, S.C. et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* **203**, 2271-9 (2006).
437. Boniface, K. et al. A role for T cell-derived interleukin 22 in psoriatic skin inflammation. *Clin Exp Immunol* **150**, 407-15 (2007).
438. Ma, H.L. et al. IL-22 is required for Th17 cell-mediated pathology in a mouse model of psoriasis-like skin inflammation. *J Clin Invest* **118**, 597-607 (2008).
439. Van Belle, A.B. et al. IL-22 is required for imiquimod-induced psoriasiform skin inflammation in mice. *J Immunol* **188**, 462-9 (2011).

Étude de l'interaction entre les mastocytes et les lymphocytes T Helper

Directeurs de thèse : Dr. Eric Espinosa / Pr. Salvatore Valitutti

RÉSUMÉ

Les mastocytes ont longtemps été associés aux réponses allergiques, néanmoins de nombreuses études les décrivent comme des acteurs de la réponse inflammatoire. Les mastocytes sont souvent retrouvés en étroite apposition au sein des tissus avec les lymphocytes T Helper (T_H). L'objet de ma thèse est de caractériser la nature de l'interaction mastocyte/T_H et notamment la capacité des mastocytes à jouer le rôle de cellules présentatrices d'antigène.

Dans une première étude, nous avons démontré que des lignées primaires de mastocytes murins (PCMC) peuvent acquérir un phénotype de cellules présentatrices d'antigènes, lorsqu'elles sont traitées en présence d'IFN- γ pendant 72 heures. Ainsi conditionnés, les PCMC capturent, apprêtent et présentent l'antigène à des lymphocytes T CD4⁺ activés, mais restent incapables d'activer leurs homologues naïfs. Durant ce phénomène, une véritable synapse immunologique est mise en place où le lymphocyte T_H polarise son TCR et toute sa machinerie sécrétoire vers l'aire de contact intercellulaire. En retour, le mastocyte s'active et baisse significativement le seuil d'activation des récepteurs Fc ϵ RI en réponse à une stimulation par des IgE. Ces résultats indiquent que les mastocytes peuvent établir une coopération spécifique avec les lymphocytes T_H.

Dans une seconde étude, nous avons déterminé les conséquences fonctionnelles d'une telle coopération sur la biologie des lymphocytes T_H humains. *In vitro* les mastocytes humains forment des synapses immunologiques fonctionnelles avec des lymphocytes T CD4⁺ activés. Ces interactions productives favorisent la génération de lymphocytes T_H produisant de grandes quantités d'IL-22 (à la fois de purs T_H22 et des T_H produisant simultanément de l'IL-22 et de l'IFN- γ) à partir d'un pool de lymphocytes T_H mémoires. Cette différenciation vers un tel profil de T_H est dépendante de l'action de deux cytokines que sont l'IL-6 et le TNF- α . L'analyse microscopique détaillée d'échantillons de peaux psoriasiques révèle un enrichissement en lymphocytes T_H produisant simultanément de l'IL-22 et de l'IFN- γ , lorsqu'ils sont au contact des mastocytes.

Ces résultats indiquent que les mastocytes peuvent être de véritables partenaires fonctionnels pour les lymphocytes T_H au sein des tissus, leur fournissant des signaux d'activation et les orientant vers la production d'une cytokine supplémentaire l'IL-22.

Mots clés : mastocytes, lymphocytes T Helper, interleukine-22, inflammation.

Discipline : Immunologie.