Thèse de doctorat
de l'UNIVERSITE PARIS SORBONNE PARIS CITE
Préparée à l'Université Paris Diderot

****

Ecole doctorale : ED 562 Immunologie

****

Unité de recherche :

Centre de Recherche sur l'inflammation U1149 Inserm

Equipe 2 : Mastocytes et Basophiles dans l'Inflammation et le Remodelage

****

Spécialité : Immunologie

Soutenue par

Mme FLAVIE NGO NYEKEL

Le 11 juillet 2018

Régulations des réponses cellulaires immunitaires par les Mastocytes au cours des rejets d'allogreffe de peau d'oreille chez la souris

****

Mast cells orchestrate immune cells during mouse skin graft rejection

****

Thèse dirigée par les Dr. Ulrich BLANK et Dr. Gregory GAUTIER

JURY :

Pr. Antonino Nicoletti	**Président / Univerté Paris Diderot**
Pr. Sylvie Chollet-Martin	**Rapporteur / Université Paris-Sud**
Dr. Laurent Reber, CR	**Rapporteur / Université Pierre et Marie Curie**
Dr. Susanna Celli, CR	**Examinateur / /Université Paris Descartes**
Dr. Christine Bourgeois, CR	**Examinateur / Université Paris-Sud**

Il faut réaliser sa mission.

C'est mon objectif, c'est l'objectif, je crois, de tous les humains: comprendre pourquoi on est venu et arriver à faire ce pourquoi on est là. C'est très difficile surtout qu'en plus ce n'est pas comme dans Mission Impossible où on a une feuille de route: "votre mission c'est d'accepter, mon cher Bernard, de réaliser vingt romans". Non, on ne sait pas.

D'entrée de jeu, ce qui est important c'est de ne pas être inactif, de bouger, de s'agiter. On s'agite et on se rend compte que de l'agitation, de la rencontre avec les gens surgira quelque chose. Il faut aller voir partout si on a besoin d'y être.

Bernard Werber

Remerciements

À l'image des greffes que j'ai réalisées au cours de mon parcours doctoral, de nombreux souvenirs ont aussi été greffés en moi tant sur un plan personnel que professionnel. Les plus douloureux ont été rejetés et les meilleurs ont été définitivement acceptés et sont restés inoubliables. Ceci n'aurait pas été possible sans la présence de nombreux acteurs qui ont marqué de manière passive ou active, leur passage dans ce chapitre singulier de ma vie. C'est la raison pour laquelle je tiens à leur rendre hommage dans la partie la plus sensible de l'écriture de thèse, car les bons mots pour exprimer sa gratitude restent souvent compliqués à trouver et surtout par l'émotion émergente. Certains se reconnaîtront directement ou indirectement et d'autres ne seront probablement pas cités, raison pour laquelle je m'excuse par avance. Qu'à cela ne tienne, je remercie tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à rendre ce voyage possible en m'accompagnant à bon port. Tout au long de ce projet, vous m'avez supportée, encouragée, fait rire, parfois ramassée à la petite cuillère, mais également soutenue et remise sur les chemins afin de rendre cette thèse viable.

Merci aux membres du Jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail en m'accordant un peu de leur précieux temps pour le relire et l'évaluer. Merci pour l'ensemble de vos remarques constructives qui ont permis une meilleure révision de ce travail. Surtout merci pour votre présence à ma soutenance.

Je tiens ensuite à exprimer ma gratitude au Professeur Renato Monteiro, directeur du centre de recherche sur l'inflammation, pour sa confiance et son accueil au sein de son centre de recherche rendant ainsi possible la réalisation de mon projet doctoral.

Merci aux Dr Ulrich Blank et Pierre Launay qui m'ont accueillie au sein de l'équipe 2 « Mastocytes et Basophiles dans l'inflammation et le remodelage » et à toutes les réunions scientifiques tenues le lundi matin, bien que chronophages (9h45-13h30 pour le record) ont été d'une utilité considérable. Grâce à elles, des petites et grandes idées ont été développées et surtout des conseils précieux ont été prodigués.

J'adresse un merci chaleureux au Docteur Ulrich Blank, mon directeur de thèse qui m'a encadrée durant toutes ces années me donnant des conseils les plus utiles ; merci pour sa disponibilité, sa générosité, sa patience, son soutien et sa rigueur scientifique. Vous avez été le pompier de ce projet, et à l'image du mastocyte, une vraie sentinelle dans l'aboutissement de sa réalisation. Travailler avec vous était un honneur.

Merci au Dr Gregory Gautier, mon superviseur et co-directeur de thèse de m'avoir proposé ce travail il y a maintenant trois ans et demi. Notre collaboration n'a pas été des plus simples car

je suis ton premier bébé biologique, scientifiquement parlant, mais cela m'a aidé à être indépendant. J'ai appris avec toi que l'encadrement est un exercice qui demande de l'apprentissage, beaucoup de travail personnel, émotionnel mais surtout de la patiente et du temps.

Je remercie particulièrement le Dr Nicolas Charles d'une part pour sa contribution scientifique dans ce travail, son empathie, sa sympathie, sa volonté de m'aider, sa disponibilité même quand je n'étais pas prioritaire, et tout son soutien technique dans les moments les plus difficiles et la maitrise des logiciels d'analyse. Ses précieuses suggestions et ses conseils ont permis de faire avancer mon travail de recherche.

Je remercie également le Dr Pierre Launay pour ses critiques constructives et son soutien qui m'ont permis d'avancer.

Je tiens à remercier le Docteur Marc Benhamou pour sa gentillesse, sa disponibilité, son soutien scientifique tout au long de ces années. Ses qualités de correcteurs ont permis d'améliorer la rédaction de mon travail de thèse.

Je remercie également tous les membres de mon équipe avec qui j'ai tissé des liens forts au cours de cette expérience de vie. Je remercie évidemment tous ceux avec qui j'ai partagé un bureau, un ordi, des moments de vie. Les thésards, les post-docs, les stagiaires qui m'ont suivi, soutenu et supporté toutes ces années.

Merci Emeline qui est sans aucun doute, beaucoup plus qu'une ingénieure dans cette équipe. Je te remercie pour tous tes conseils, les conversations personnelles et professionnelles qu'on a pu avoir et au cours desquelles tu m'as énormément appris, apporté. Partager cette belle aventure avec toi a été constructive dans tous les sens. Tu as pleinement contribué à ma maturité tant scientifiquement de par les nombreuses techniques de labo que j'ai pu développer grâce à ta précieuse aide. Tu es certainement la seule qui me connaisse personnellement le mieux dans cet environnement professionnel. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce tu as fait pour moi, pour la personne que je suis devenue grâce à toi. Si je pouvais t'emporter avec moi, je le ferais sans hésitation. J'espère que notre amitié résistera au temps et aux frontières.

Merci à Samira qui m'a fait rire lors de la réalisation de nos films à caractère scientifique. Ne pas te dédier un petit paragraphe dans cette partie aurait été inimaginable. Merci pour ton

soutien sincère, ta disponibilité et surtout ta patience au cours de ces longues années qui paraissent interminables quand on connaît les difficultés rencontrées dans le travail de thèse. Un petit clin d'œil à ton adorable famille dont les péripéties ont contribué à notre rapprochement. J'espère que tu conserveras cette force pour l'aboutissement de ton projet doctoral.

Le labo est devenu au cours de ces dernières années ma deuxième maison qui m'a permis de créer en quelque sorte, une petite famille de labo… Je remercie donc Fanny (pour tes visites matinales), Yasmine, Shamila, Julie, John, Florian, Christophe, Manuela, Rasha, Jean Davoust, Viviana, Lucas, Iris et Barbara (deux grandes sœurs remarquables et impressionnantes) … chacun d'entre vous à sa manière aura laissé une empreinte dans mon cœur et marqué ma vie.

Merci à tous les membres de l'équipe 1 avec qui j'ai partagé un moment, des repas et des discussions : ma voisine rigolote Julie pour ta gentillesse, Erwan, Lilia, Christian (pour nos discussions dont je ne dévoilerai pas le caractère, mais je reste marquée par « l'inflammation et l'anti-inflammation à ton sens »), mon Brother rafa, Carine, Héloïse, Carolina, Amaya, victoria, Benjamin, Agnès, Sébastien, IV, Nathalie, Elodie, Emmanuel, Sanae (pour ta disponibilité et tes conseils), Lorédana, Cesaire, Naman, Irini, Mijiana.

Je remercie également mes différents stagiaires, Daniela, Marine, et surtout Ane, avec qui j'ai partagé ma petite expérience et qui m'a obligé à me remettre en question lors de nos échanges scientifiques et de son apprentissage au laboratoire.

Merci aux responsables et membres des plateaux techniques, Olivier Thibodeau, Sandrine olivre, Malala, Yanis, Daniele, Lynda et tous les autres que j'aurai oubliée et qui s'occupent bien apportent un soin particulier aux souris.

Merci aux collègues externes et internes au CRI et de l'hôpital bichât.

Merci à mes amis, de loin, de longue date qui ont toujours été là dans les bons et les mauvais moments : Emilie, Cecilia, Malick, Ophélie, Kétia pour nos restos incroyables, la team du lycée Lakanal et ses membres pour nos moments riches en émotion. Un énorme bisou et une grosse pensée à Lisou pour ta fidèle et ta sincère amitié depuis maintenant plus de 10 ans, la team de l'étoile du berger et ses membres, Miss frany, pour nos brunchs gourmants et riches en potins …Votre amitié vaut plus que de l'or pour moi.

Je tiens tout particulièrement à remercier ma famille pour son soutien tout au long de ces

années, mes nombreuses mamans, papa, tonton, tata, sœurs, frères, cousines et cousins … Votre amour m'a toujours accompagné, malgré les frontières géographiques qui finalement rendent nos rapports si singuliers. Je ne citerai personne par pudeur et surtout parce ce qu'il y a tellement à dire sur chacun de vous et que je suis limitée en nombre de pages. De ma naissance à ce jour, chacun d'entre vous proches ou éloignés a fortement contribué à l'accomplissement de ce projet de vie. Votre présence et votre soutien à tous ont été et resteront un socle important dans ma vie. Merci à tous et à toutes pour tous. Ce travail vous est dédié.

Et enfin un merci particulier à mon cher Tristan, à chacun des membres de ta famille pour leur générosité et à tes amis de toujours. Ton soutien inconditionnel depuis plus de 2 ans m'est précieux. Ta patience à mon égard et ta présence à mes côtés malgré mon caractère parfois pénible sont de très belle preuve de la considération et de l'affection que tu me portes. J'ai beaucoup de chance de t'avoir même si je ne te le montre pas assez souvent. Je sais désormais que je pourrai toujours compter sur toi quelle que soit la nature des épreuves. Et que même si ta contribution dans l'article associé à cette thèse restera anonyme tu auras toujours une place spéciale et très importante dans mon cœur.

Un gigantesque MERCI à tous et pour tous.

SOMMAIRE

Liste des Abréviations 8
Table des illustrations 10
RÉSUMÉ 209
ABSTRACT 208
Greffes : chronologie des premières réussites 11
AVANT-PROPOS 12
INTRODUCTION 15
I. Structure et biologie de la peau 16
II. Les fonctions immunitaires innées de la peau 18
A. Système immunitaire cutané 19
B. Cellules épithéliales du système immunitaire cutané 20
C. Les cellules non épithéliales du système immunitaire cutané 22
III. La plasticité des DCs et leur développement 24
A. Les cellules dendritiques de l'épiderme (LCs) 25
B. Dendritic epidermal T cells (DETC) 27
Iles cellules effectrices et mémoires T CD8+ 27
V. Les cellules dermiques du système immunitaire cutané 28
A. Les cellules dermiques T γδ 28
B. Les cellules lymphoïdes innées (ILCs) 29
C. Les cellules effectrices et mémoires T CD4+ 30
D. Les cellules mémoires résidentes T régulatrices 30
E. Les cellules tueuses naturelles (NKs) 31
A. Les cellules dendritiques du derme (DCs) 31
1. Les cDCs CD11b+ dermiques 33
2. Les cDCs dermiques Double negatif 34
3. Les DCs dermiques XCR1+ 34
B. Les macrophages 36
I. La petite allégorie du mastocyte 37
II. Généralités 39
III.Stucture et localisation du mastocyte 40
IV. Origine, maturation tissulaire et survie 42
A. Le Stem Cell Factor (SCF) et les autres facteurs de différenciation mastocytaire 45
V. Hétérogénéité du phénotype mastocytaire 48

VI. Activation et fonctions des mastocytes 50
A. Médiateurs mastocytaires 50
1. Les médiateurs préformés 52
2. Les médiateurs lipidiques 53
3. Les cytokines et chimiokines 53
VII. Modèles d'études des mastocytes 55
VIII. Les mastocytes dans l'immunité 59
A. Rôle dans l'immunité innée et acquise 59
B. Rôle en physiopathologie 61
C. La dualité du mastocyte tantôt protecteur tantôt néfaste suivant son activation (exemple du sepsis) 66
I. Généralités 67
II. Historique de l'allogreffe des organes solides 67
III. Les types de rejet 69
IV. Immunologie de l'allorejet 70
A. Contexte génétique 70
B. Mécanismes de rejet 71
V. Rôle de l'immunité innée dans l'allo transplantation 75
A. Les mastocytes dans l'allo transplantation 75
B. Les neutrophiles 78
1. Origine et devenir du neutrophile 78
2. Physiologie du recrutement des neutrophiles 79
3. Fonction des polynucléaires neutrophiles 79
4. Rôle des polynucléaires neutrophiles dans l'allo transplantation 80
VI. La Place des cellules T régulatrices dans l'allotransplantation 84
A. Ontogénie et phénotype 84
I. Rôle de l'immunité innée dans l'allotransplantation 86
A. Homéostasie et activation des Tregs 87
B. Mécanisme d'action 87
C. Physiologie des cellules lymphocytes T Régulatrices 90
Introduction générale aux travaux de recherche 93
RESULTATS 96
Discussion 136

CONCLUSION 153
Perspectives 155
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 159
ANNEXES 192
Identification of Biological and Pharmaceutical Mast Cell- and Basophil-Related Targets.. 193
Acknowledgment 201
Author contributions 201
Références 202
Curriculum vitae 205

Liste des Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
AMP : Adénosine Monophosphate

ARNm : Acide ribonucléique messager
BMMC: Bone marrow-derived mast cells
BPCO: Bronchopneumopathie chronique obstructive

CBMC: Cord blood derived mast cell

CD: Cluster of différenciation
CCL: CC-chemokine ligand
cDC: conventionnal DC
CDP: Common-DC progenitor
CLP: Cecal ligation and puncture
CMP: Common myeloid progenitor
CMH : major histocompatibility complex / complexe majeur d'histocompatibilté
APC/CPA : Antigen-presenting cell / Cellules Présentatrices de l'Antigène
CTLA-4 : Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4
CTMC: Connective tissue mast cell
CXCL: CXC-chemokine ligand
CXCR: CXC-chemokine receptor
DAMPs: Danger-associated molecular pathern
DETC: Dendritic epidermal T cells
DC: Dendritic Cell
dDC: dermal DC
DTH: Delayed-Type Hypersensitivity
DT: Diphteria Toxin
EGF: Epidermal growth factor
Eomes: Eomesodermin
FGF2: Fibroblast growth factor 2 cells
FLT3L: FMS-like tyrosine kinase 3 ligand
FLT3: Fms like tyrosine kinase 3
Foxp3: Forhead box P3
GFP: Green Fluorescent Protein
GM-CSF: Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
GVHD: Graft versus Host Desease
GFI: Growth factor independent
GM-CSF: Granulocyte/Macrophage colony-stimulating factor
GMP: granulocytes/monocytes progenitor
Grb2: Growth factor receptor-bound protein 2
hDTR: human diphtheria toxin receptor

hBMMC: human bone marrow-derived mast cells
HLA: Human Leucocyte Antigen
HMC: Human mast cell line

ICAM: Intercellular Adhesion Molecule
IDO: Indolamine 2,3- dioxygenase
IFN: Interferon
Ig: Immunoglobuline de classe
IL: Interleukine
ILC: Innate lymphoid cells
IPEX: Immune dysregulation Polyendocrinopathy Entheropathy X-linked Syndrome
KC: Keratinocyte-derived protein chemokine
LB: Lymphocytes B
LC : Langerhans cells
LT : Lymphocytes T

LTB4/C4: Leucotriène B4/C4
MC (s): Mast cell (s)
MMC : Mucosal mast cell : Mastocyte(s) de rongeur de phénotype muqueux
MCS : Mastocyte(s) de rongeur de phénotype séreux
MCT: human Mast cell (s) (s) tryptase positif
MCTC: Mastocyte(s) human tryptase chymase positif
MCC: human Mast cell (s) chymase positif
MCP: Mast cell progenitor
mMCP: Mouse mast cell protease
M-CSF: Macrophage colony-stimulating factor
MIP: Macrophage inflammatory protein
NFKB: Nuclear Factor Kappa B
NK: Cellules Natural killer
PAF: Platelet activating factor
PAMPs: Pathogen-associated molecular pathern

PBMC: Peripheral blood derived mast cells

PCMC: Peritoneal cell derived mast cell
pDC: plasmacytoïdes Dendritic Cell
PGD2/E2: Prostaglandine D2/E2
PNM: Polymorphonuclear neutrophil
PRR: Pattern-recognition receptors
RANTES: Regulated on activation normal T cell expressed and secreted
RBL: Rat basophilic leukemia
RMB: Red mast cells and basophils
ROS : Reactives oxygene species
RFcεI : Récepteur de haute affinité pour les IgE
ROR: Retinoic acid-related Orphan Receptor
SALT: Skin associated lymphoid tissues
SCF: Stem cell factor
T-bet : T-box transcription factor
TCR: T cell receptor
TGF-ß: Transforming Growth Factor beta
TLR: Toll Like Receptor
TNF: Tumor Necrosis Factor
TNFR: Tumor Necrosis Factor Receptor
Tr1: Lymphocytes T régulator 1
Treg: Lymphocyte T Régulator
TSLP: Thymic stromal lymphopoïetin
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
WT: Wild-type

Table des illustrations

Figure 1 : Chronologie des premières réussites des greffes. 12

Figure 2 : Structure de la peau (Eucerin). 17

Figure 3 : Mécanismes immunitaires innés dans la peau 20

Figure 4: Une vue schématique des différents types de cellules qui peuplent la peau. 21
Figure 5: Structure et composants cellulaires de la peau chez la souris et l'homme 23
Figure 6 : Développement de DC chez les souris. 24
Figure 7 : Les sous populations d'ILC, fonctions et associations aux maladies. 29
Figure 8 : Les origines et les fonctions des cellules dendritiques dans la peau. 32
Tableau 1 : Phénotype des cellules dendritiques de la peau humaine et murine. 35
Figure 9 : Photographie de Paul Ehrlich dans son laboratoire (1880). 37
Figure 10 : Un mastocyte au repos. 38
Figure 11 : Activation du mastocyte. Le mastocyte en état de repos et le mastocyte après activation et dégranulation. 39
Figure 12 : Marquage de la tryptase contenu dans les granules mastocytaires.L'épithélium des tubules infiltrés montre souvent une positivité à la tryptase..... 41
Figure 13 : Modèle proposé pour le développement de MCp. 43
Figure 14 : La différenciation mastocytaire chez la souris et chez l'homme à partir de la cellule souche médullaire.....47
Table 3 : Phénotype et caractéristiques des mastocytes. 49
Figure 15 : Effets biologiques des médiateurs mastocytaires sur différentes cellules et sur les tissus. 51
Table 4 : Principales classes de médiateurs libérés par les mastocytes 54
Table 5: Modèles d'études murines pour l'étude des fonctions des mastocytes 56
Figure 16 : Principaux mécanismes d'intervention du mastocyte au cours de l'immunité antibactérienne 60
Figure 17 : Mastocytes - le bon et le mauvais côté.....62
Figure 18 : Rôle des mastocytes dans les maladies cutanées immunologiques. 64
Table 6 : Diversité et base expérimentale des fonctions supposées des mastocytes dans le système immunitaire et au-delà 65
Figure 19 : Première et seconde étape du rejet.....72
Figure 20 : Réponses immunitaires innées dans l'allotransplantation 74
Figure 21 : Les Tregs thymiques sont directement issus des précurseurs dans le thymus. 86
Figure 22 : Mécanismes de suppression utilisés par les Tregs CD4+CD25+. 89
Figure 23 : Les Tregs favorise la réparation et la régénération des tissus en modulant l'inflammation. 91
Figure 24 : Implication des Mastocytes dans les mécanismes nflammatoires associés au rejet de greffe de peau.....154

Greffes : chronologie des premières réussites

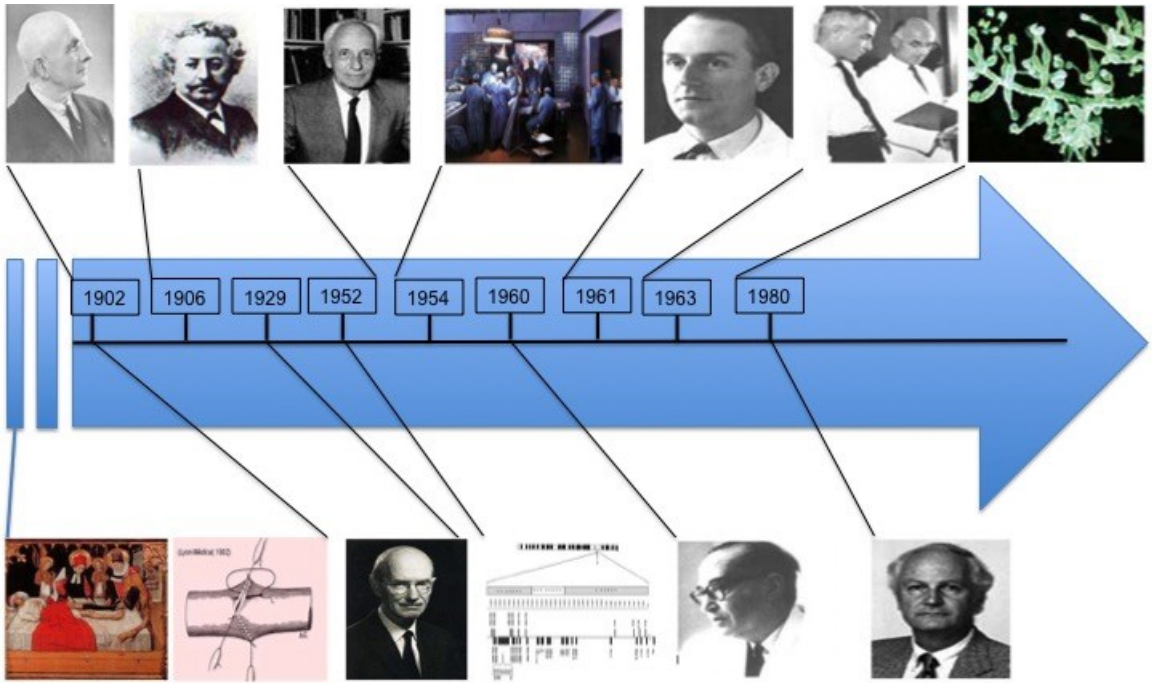


Figure 1 : Chronologie des premières réussites des greffes.

a. Au-dessous à gauche : la photo illustrant les toutes premières greffes qui sont le fruit d'incroyables travaux, de preuve de génie, de ténacité et surtout de patience.

b. Au-dessus : et de gauche à droite : Alexis Carrel, inventeur de la technique d'anastomose vasculaire. Puis, Mathieu Jaboulay qui réalisa la première xénotransplantation en 1906. Jean Dausset qui découvre le système HLA. Ensuite, le tableau de la première transplantation rénale réalisée en 1954 entre de jumeaux monozygotes. René Küss qui est l'un des pionniers de la transplantation rénale. Murray et Merril établissant un protocole d'immunosuppression à base de corticoïdes. Enfin, le Tolypocladium inflatum, champignon à partir duquel Jean Borel a isolé la cyclosporine.

c. Au-dessous : de gauche à droite : d'abord la photo de la technique d'anastomose vasculaire. Georges Snell, découvreur du système d'histocompatibilité H2 chez la souris. Organisation du locus HLA sur le bras court du chromosome 6 chez l'homme. Jean Hamburger qui réussit la première transplantation rénale en France. Jean Borel, développeur de la cyclosporine.

AVANT-PROPOS

Allogreffe, également appelée greffe allogénique, dans les procédures médicales est le transfert de cellules, de tissus ou d'organes à un receveur provenant d'un donneur génétiquement non identique de la même espèce. Les allogreffes sont couramment utilisées dans les

transplantations de la peau, des cornées, des cœurs, des foies, des reins et des os et de la moelle osseuse.
À l'origine, les allogreffes de peau servaient de pansement biologique et étaient donc fréquemment remplacées. Mais leur utilisation remonte à la seconde guerre mondiale et grâce à la compréhension des processus cellulaires puis moléculaires impliqués dans le rejet de greffe, le confort des patients a été amélioré. Les allogreffes cutanées permettent aujourd'hui de soigner des brûlures sévères ou encore des lésions cutanées graves (cancer, pathologie cutanée, plaies importantes…), car ces traumatismes demeurent difficiles et importants.

Cependant, les progrès thérapeutiques notamment par le développement de traitements immunosuppressifs, ont permis le contrôle de la réponse immunitaire contre le greffon. Mais, ces traitements immunosuppressifs restent tout de même relativement peu ou pas efficaces et sont associés aux effets secondaires qui rendent les patients sensibles aux pathologies de type infectieuses et non infectieuses (tumeurs, toxicité…).

Cette réponse immunitaire contre le greffon induit le rejet de la greffe d'organe, en l'occurrence la peau car le système immunitaire du receveur est capable de discriminer le soi et le non soi. En effet, la collaboration des cellules du système immunitaire inné et adaptatif permet la mise en place des mécanismes efficaces contre les éléments susceptibles d'être étrangers. Il est donc aujourd'hui indéniable que le système immunitaire inné tient un rôle critique dans la régulation du système immunitaire adaptatif dans le cadre des rejets de greffe de peau.

Au cours de cette introduction, nous décrirons tout d'abord l'organe important qu'est la peau en insistant sur les nombreuses populations cellulaires qui résident dans ses différents compartiments. Nous nous attarderons sur la plasticité phénotypique de ces populations cellulaires qui définit leurs fonctions multiples et variées.

Ensuite, nous nous intéresserons aux résidents immunitaires quantitativement importants dans la peau que sont les mastocytes. Nous détaillerons les connaissances à ce jour sur le mastocyte, de sa découverte à ses fonctions immunitaires longtemps controversées mais aujourd'hui bien définies notamment dans les réponses immunitaires de type allergique.

Pour finir, après une introduction sur l'histoire de la transplantation, de ses débuts à son évolution médicale et scientifique à visée thérapeutique, nous étudierons le rôle de quelques cellules immunitaires innées dans l'allo-rejet de greffe cutanée, notamment celui des mastocytes et des neutrophiles qui ont fait l'objet de mon travail de thèse. Enfin, nous parlerons également du rôle suppresseur et anti-inflammatoire des cellules T régulatrices dans les mécanismes associés à la tolérance et à la réparation tissulaire suite aux dommages tissulaires.

INTRODUCTION

Chapitre 1 : LA PEAU ET SON IMMUNITE

La peau est un organe complexe d'une vaste étendue d'environ 2 m^2 de surface pour un poids de 4 kg chez l'adulte humain, conférant ainsi une protection naturelle à l'interface entre

l'environnement extérieur et intérieur de l'organisme (Melissopoulos A., 1998). Elle agit non seulement comme élément de l'immunité de manière non spécifique en qualité de défense de surface contre des germes (microorganismes) et des lésions (substances environnementales), mais également comme un régulateur de l'équilibre hydrique par sa capacité à limiter les pertes excessives en eau ((Madison 2003) ; (Ehrhardt, M. et al. 2008)) .

I. Structure et biologie de la peau

La peau est un système composé de deux couches élémentaires d'origine embryologique différente : l'épithélium ou épiderme dérivé de l'ectoderme et le derme d'origine mésodermique (Braverman 2000) (figure 2).

L'épiderme est un compartiment superficiel très fin de la peau qui est stratifié et en contact directe avec l'extérieure ((Gabbiani, Chaponnier et al. 1978) ;(Montagna and Carlisle 1991)).
Une pellicule hydrolipidique recouvre l'épiderme et permet le développement et le maintien de microorganismes constituant la flore cutanée. Cette flore procure un système de protection en rivalisant avec les bactéries pathogènes à la fois pour les nutriments et l'espace ((Schweizer, Bowden et al. 2006)). Cet épiderme est constamment renouvelé et modifié avec une épaisseur qui varie plus ou moins selon les zones de l'organisme. Cette genèse de la croute protectrice épidermique découle d'un mécanisme de différentiation et de maturation permanente des kératinocytes (modification biochimique (telle que le vieillissement prématuré de la peau et de l'apparition des rides) et morphologiques) ((Steinert and Marekov 1995); (Green, Wallingford et al. 2011)).

Les kératinocytes majoritairement présents dans l'épiderme, constituent une barrière cutanée par leur implication active dans l'élaboration des réponses immunitaires innées ((Madison 2003, Green, Wallingford et al. 2011).

En effet, kératinocytes expriment à leur surface des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRRs) associés aux pathogènes (PAMPs) retrouvés chez les microorganismes ou des motifs moléculaires associé aux dégâts cellulaires (DAMPs) tels que les récepteurs de type Toll (TLRs) ou les récepteurs de type NOD (NLRs). En réponse à une stimulation pathogène, les kératinocytes sont capables de produire et secréter des peptides antimicrobiens (AMPs) comme la β-défensine (rôle conservé dans les mécanismes de défense des cellules eucaryotes contre les agents pathogènes), LL-37 (rôle dans les inflammations infectieuses) ou des bactéricides nucléaires tel que les ARNases ((Lebre, van der Aar et al. 2007),(Miller and Modlin 2007).

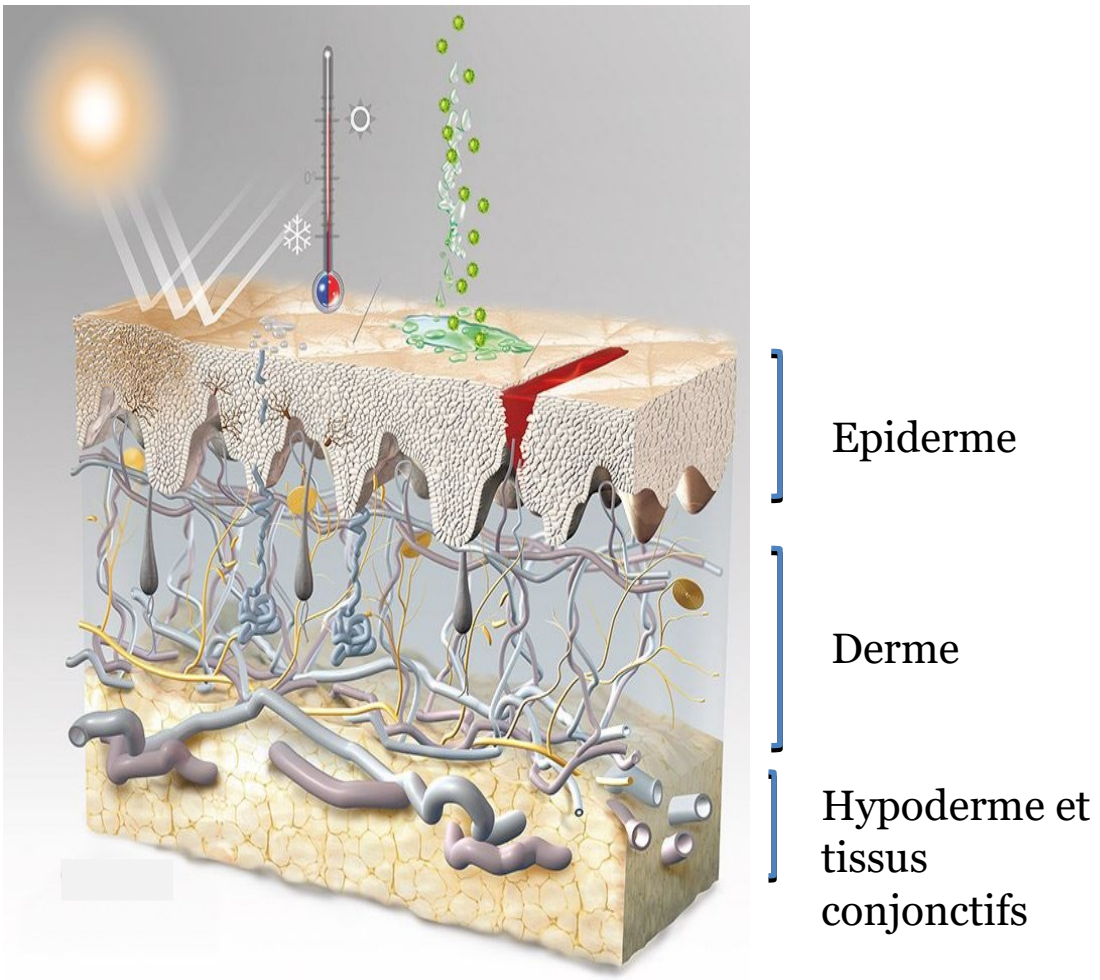


Figure 2 : Structure de la peau (Eucerin). La peau est constituée de 3 tissus différents superposes. La couche superficielle est l'épiderme. La couche intermédiaire est le derme tissu de soutien, le derme assure à la fois la solidité et l'élasticité de la peau. Il est traversé par les vaisseaux et les nerfs et sert d'ancrage aux glandes sudoripares, poils, glandes sébacées et ongles. La couche la plus profonde est l'hypoderme, matelas graisseux et réserve énergétique, moulé sur les muscles sous-jacents.

En outre, elles expriment des molécules de présentation tel que le CD1 ((Brossay, Jullien et al. 1997); (Blandine, Catherine et al. 2008); (Brossay, Jullien et al. 1997); (Roark, Park et al. 1998)) et possèdent des molécules d'adhésion comme ICAM1 leur conférant une activité de cellules présentatrices d'antigènes (CD2/LFA-3 (CD58), LFA-1/ICAM-1 et ICAM-2 et ICAM-3(CD50)/DC-SIGN ((*Charles A. Janeway and Medzhitov 2002),* Elles produisent aussi régulièrement à l'état basal et en conditions de stress des facteurs de croissance (le basic fibroblast growth factor (bFGF), le stem cell growth factor (SCF), l'hepatocyte growth factor

(HGF), l'endothéline-1 (ET1)) et de nombreuses hormones (MSH (Melanocyte Stimulating Hormone)), et cytokines (IL-1, IL-8, IL-6, TNF…) pour renforcer la tropicité et l'homéostasie dermo-épidermique mais aussi celle de l'ensemble de l'organisme((Hall, Tran et al. 2013)).
Les autres cellules constituant l'épiderme sont les mélanocytes qui assurent la synthèse de la mélanine, des cellules de Langerhans (cellules dendritiques pré- sentatrices d'antigènes susceptibles d'activer les lymphocytes T) et les cellules de Merkel qui sont des acteurs clés du système neuro-endocrino-immuno-cutané. Elles envoient des prolongements dendritiques entre les kératinicytes et les cellules de Langerhans et peuvent former des synapses avec des neurones sensoriels mais ne sont pas toujours associées aux nerfs

L'épiderme, qui est avasculaire repose sur une charpente : le derme. Ce tissu conjonctif est constitué de cellules stromales fixes telles que les fibroblastes et de cellules résidentes telles que les dendrocytes, mastocytes, macrophages, qui vont assurer sa tropicité et sa reconstitution régulière par la synthèse de molécules de structure et enzymatique comme les métalloprotéines intervenant dans les mécanismes de cicatrisation, de vieillissement mais aussi dans des mécanismes métastatiques des cancers ((Egeblad and Werb 2002); (E. and U. 2003); (and and Werb 2001)) (figure 2).
La matrice extracellulaire du derme assure l'équilibre physiologique et la réparation tissulaire à travers son organisation et sa capacité à produire de nombreux facteurs de croissance dermique et épidermique ((Hinz 2007) ; (Tomasek, Gabbiani et al. 2002)).

Enfin, l'hypoderme d'origine mésodermique, est la couche la plus profonde située sous le derme en connexion avec les vaisseaux sanguins et lymphatiques. Il est généralement considéré comme faisant partie de la peau mais joue un rôle d'interface entre la peau et les structures sous-jacentes. Il est essentiellement composé de tissu adipeux assurant une protection mécanique, élastique par l'amortissement des chocs et thermique en protégeant du froid par isolation mais joue aussi un rôle de réservoir énergétique en stockant les graisses((He, Papoutsi et al. 2003); (Greenberg, Egan et al. 1993)).

Lorsque qu'il y a une rupture de l'intégrité cutanée par une brûlure, une intrusion, une altération ou une blessure, l'ensemble des tissus et cellules de la peau vont constituer un système de défense biologique en vue d'un rétablissement homéostatique.

II. Les fonctions immunitaires innées de la peau

La peau doit régulièrement contrôler à la fois les réponses immunes dirigées contre des agents pathogènes et non pathogènes potentiels exerçant donc un rôle dans l'immunité car elle est capable de rendre compétentes certaines cellules spécialisés dans les défenses immunitaires.

C'est la raison pour laquelle des cellules de l'immunité innée et adaptative sont présentes dans l'épiderme et le derme afin de participer et contribuer substantiellement à la fonction protectrice de la peau.

A. Système immunitaire cutané

En prévenant l'entrée des substances étrangères, la peau est la première barrière (mécanique) de défense immunitaire. De plus, les cellules de la peau orchestrent et participent activement à l'inflammation cutanée de manière générale ainsi qu'au remodelage cutané faisant de la peau un organe immunitaire actif.

La réponse immunitaire cutanée nécessite des processus de défense immédiate de l'hôte incluant une coordination des cellules immunitaires résidentes compétentes, des facteurs solubles (comme des peptides antimicrobiens, des chimiokines et des cytokines qui sont synthétisés par une diversité de cellules résidentes telles que les mastocytes, les fibroblastes et les kératinocytes) et des cellules circulantes telles que les polynucléaires neutrophiles (PNMs), les monocytes/macrophages, des cellules dendritiques (DCs) et les cellules « natural killer » (NK). Il implique également le système du complément (figure 3).
En effet, les cellules épidermiques vont produire diverses cytokines (IL-1, IL-6, TNF) et chimiokines (CCL20) pour le recrutement et l'activation de différentes cellules inflammatoires ((Pastore, Mascia et al. 2005); (Saint-Mezard, Berard et al. 2004)). La libération locale de ces facteurs moléculaires et leur propagation à travers le système vasculaire dermique permettent la transmission rapide d'un signal informant le système immunitaire de l'hôte de la rupture de la barrière cutanée superficielle. C'est alors que le système immunitaire est mobilisé, activé et dirigé vers le site de la lésion cutanée ((Appay and Rowland-Jones 2001); (A., Rosemary et al. 1999)).

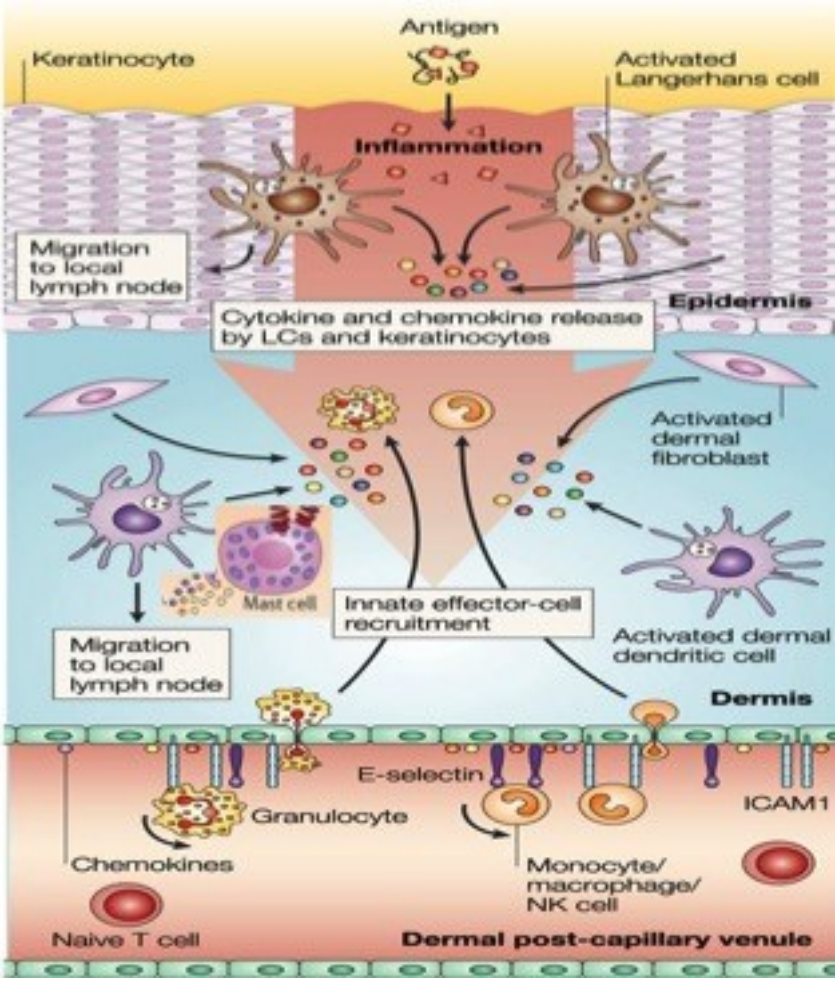


Figure 3 : Mécanismes immunitaires innés dans la peau

La lésion des cellules épithéliales ou l'invasion pathogène entraîne la libération de cytokines primaires et l'activation des cellules de la peau (kératinocytes et fibroblastes) et des cellules immunitaires innées résidentes (cellules de Langerhans (LC), cellules dendritiques dermiques (DC) et mastocytes), stimulant cascades d'activation en aval. Les cellules de Langerhans activées et les DC dermiques sont stimulées puis se différentie et émigre du tissu vers le ganglion lymphatique drainant, transportant l'antigène pour présentation aux cellules T naïves et mémoires. Les cytokines et chimiokines produites en réponse à cette cascade d'activation agissent sur les endothéliums locaux par l'intermédiaire de voies médiées par le facteur nucléaire κB (NF-κB) pour réguler l'expression des molécules d'adhésion, y compris E-sélectine, P-sélectine et molécule d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM1), et de diriger le recrutement de composants immunitaires innées supplémentaires en fonction des signaux spécifiques qui sont générés - par exemple, les neutrophiles, les éosinophiles et les cellules tueuses naturelles (NK). CCL17, ligand de chimiokine CC 17 (d'après kupper and fuhlbrigge et al, 2004).

B. Cellules épithéliales du système immunitaire cutané

Comme décrit précédemment, les kératinocytes sont des cellules épithéliales ayant une activité immunitaire à part entière, notamment par leur capacité à influencer le système naturel de défense cutané inné aussi bien en condition physiologique qu'en situation de rupture de tolérance.

Par ailleurs, ces cellules au niveau de l'épiderme sont en interaction permanente avec de nombreuses autres cellules immunitaires non épithéliales afin de maintenir l'homéostasie cutanée.

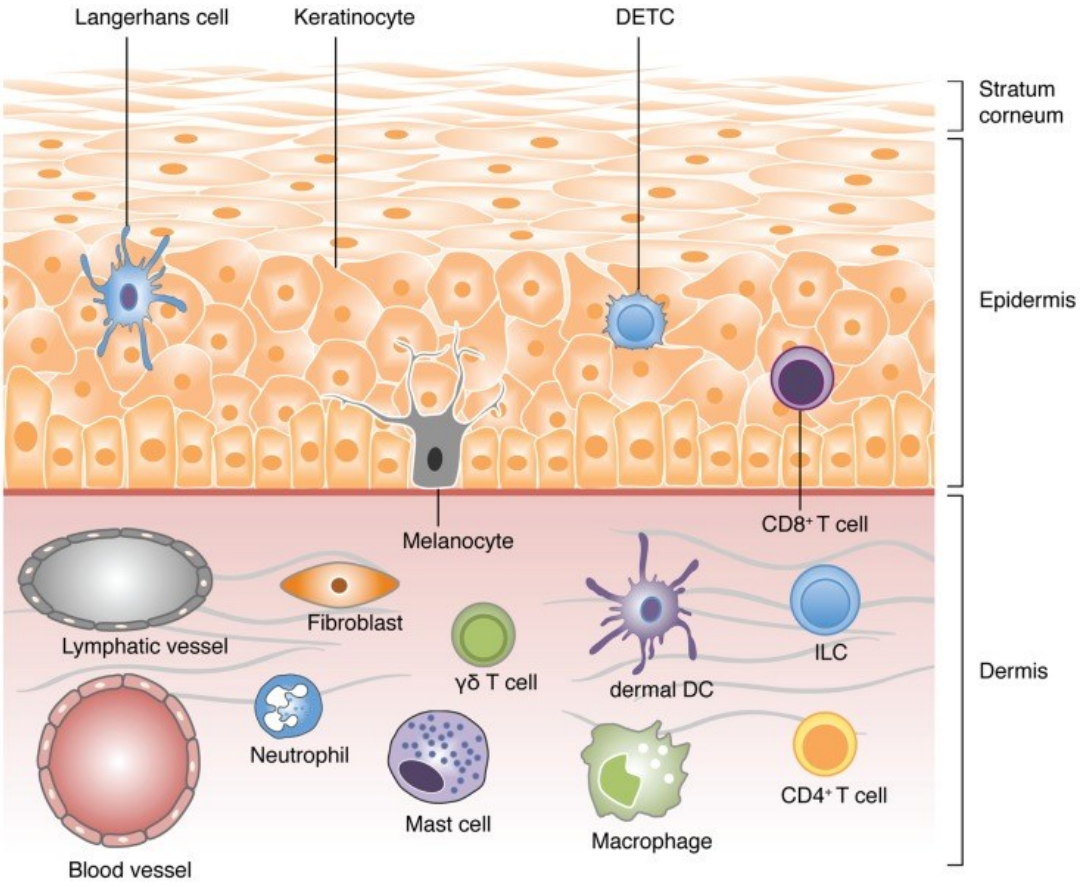


Figure 4: Une vue schématique des différents types de cellules qui peuplent la peau. La peau des vertébrés est composée de deux compartiments principaux : l'épiderme et le derme. La partie superficielle de l'épiderme, appelée stratumcorneum, est composée de kératinocytes morts et agit comme une barrière. L'épiderme est une région dense et mal vascularisée qui comprend principalement des kératinocytes avec peu de mélanocytes. Les cellules immunitaires majeures dans ce compartiment comprennent les cellules de Langerhans (LC), les cellules T épidermiques dendritiques (DETC, un sous-ensemble de cellules γδT) et les cellules T CD8. Le derme est une région hautement vascularisée, riche en collagène et en fibres d'élastine, à faible densité cellulaire. Il comprend des fibroblastes, des lymphocytes T (CD4αβ, et γδ), des cellules lymphoïdes innées (ILC), des dermiques DC (dDC), des macrophages, des mastocytes et des neutrophiles (liste non exhaustive (d'après Chong et al, 2013)).

C. Les cellules non épithéliales du système immunitaire cutané

Le compartiment épidermique est également colonisé par des populations cellulaires immunitaires non épithéliales d'origines différentes et possédant une plasticité phénotypique et fonctionnelle. Notamment les cellules effectrices de l'immunité innée ayant pour buts de protéger l'hôte contre les infections et restaurer l'intégrité de la peau (figure 4).

Cette plasticité cellulaire est différente selon que l'on soit chez la souris ou chez l'Homme et cette différence est à prendre en considération lors des études de phénotypes inflammatoires cutanées murins en comparaison aux mécanismes contrôlant les altérations inflammatoires de la peau chez l'homme (figure 5).

La localisation de chacune de ces populations cellulaires est soumise à une régulation fine. En effet, d'après de nombreuses études, les tissus lymphoïdes associés à la peau (SALT pour « skin associated lymphoid tissues »), établissent des contacts avec l'épithélium avant le développement de la réponse immunitaire contre les pathogènes ou des lésions ((Bos and Kapsenberg 1993); (Wayne Streilein 1983, Wayne Streilein 1985). En effet, les SALTs agissent comme des sentinelles spécifiques contre l'invasion des pathogènes.

Constituant du système lymphatique, les SALTs comprennent les follicules lymphoïdes, les cellules présentatrices d'antigène (les cellules de Langerhans) une sous-population circulante de cellules lymphocytaires T ayant un tropisme spécifique et préférentiel pour la peau, enfin une population de cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse et exprimant l'allo antigène Thy-1 ((Egawa and Kabashima 2011)).

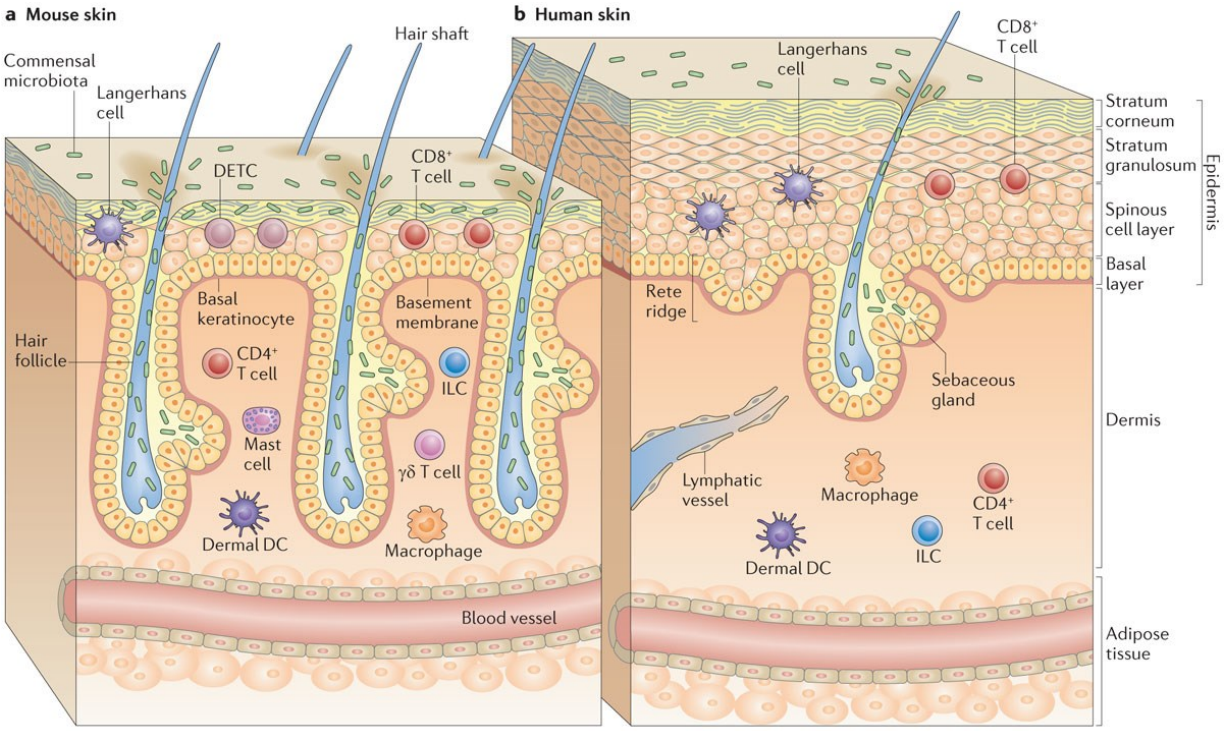


Figure 5: Structure et composants cellulaires de la peau chez la souris et l'homme (d'après Pasparaskis et al, 2014). (a) La peau de la souris a des follicules pileux densément remplis, alors que (b) la peau humaine a de plus grandes zones interfolliculaire avec des follicules pileux clairsemés. La peau humaine a un épiderme plus épais (avec plus de couches de cellules) et un derme plus épais que la peau de la souris, et est caractérisée par la baisse projections des crêtes de la rétine épidermique. Cette caractéristique est plus importante dans le psoriasis et est en corrélation avec l'allongement des papilles dermiques. Il est parfois confondu avec l'hyperplasie folliculaire qui est observée dans les modèles murins de la maladie inflammatoire de la peau. Les types de cellules immunitaires les plus répandus dans l'épiderme humain sont les cellules de Langerhans et les lymphocytes T CD8 +. Dans l'épiderme de la souris, il existe une population importante de lymphocytes T épidermiques dendritiques Vγ5 + (DETC), absents de l'épiderme humain. Le derme de l'homme et de la souris est peuplé de macrophages, de mastocytes, de cellules T αβ conventionnelles et d'une petite population de cellules lymphoïdes innées (CLI). Dans la peau de la souris, il y a une contribution importante des lymphocytes T γδ recrutés pour la surveillance immunitaire de la peau et à la production d'interleukine-17.

III. La plasticité des DCs et leur développement

Dans la rate murine, les DCs sont divisés en pDC (DC plasmacitoïde) et en cDC (DC conventionnelle) par l'expression de plusieurs molécules de surface. Les cDCs peuvent être divisées en deux sous-ensembles principaux, $CD8a^{+}CD11b^{-}$ et $CD8a^{-}CD11b^{+}$. Les cDCs sont issues de cellules souches hématopoïétiques (CSH) dans la moelle osseuse (BM) via des progéniteurs intermédiaires (Figure 6) (Geissmann, Manz et al. 2010). Les HSC se différencient d'abord en progéniteurs myéloïdes communs (CMP).

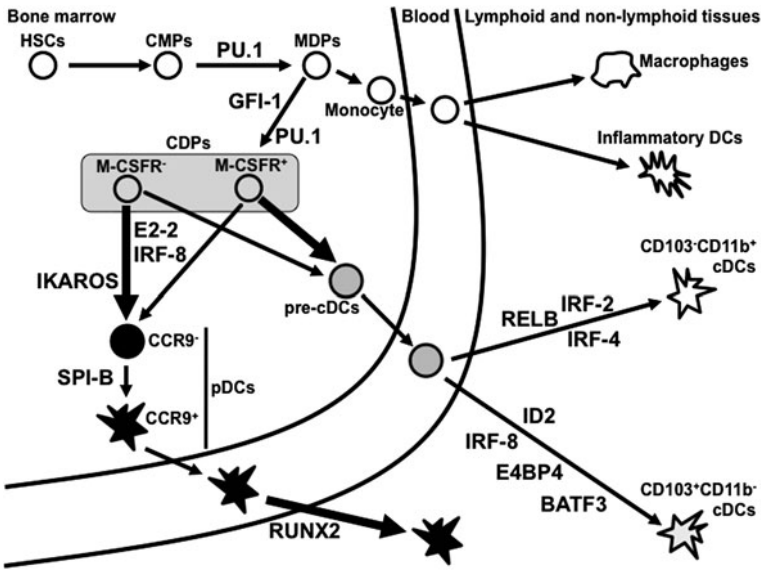


Figure 6 : Développement de DC chez les souris. Les DCs sont dérivés des CSH par le biais de précurseurs graduellement limités. Les sous-ensembles de DC peuvent être classés en trois catégories principales : les DC migratrices, les DC résidentes lymphoïdes et les DC plasmacytoïdes (d'après Van de Laar et al, 2012).

Les progéniteurs myéloïdes communs vont ensuite donner naissance à des précurseurs de macrophages / DC (MDP pour macrophage dendritic cell precursor), capables de se différencier en monocytes et DC, mais pas en granulocytes. Les monocytes pénètrent à partir du sang vers les tissus périphériques non lymphoïdes, où ils se différencient en macrophages ou DC inflammatoires, mais pas en cDC ni en précurseurs de DC communs (CDP pour « Common-DC progenitor »). Les précurseurs de macrophages / DC se développent en CDP, incapables de se différencier en monocytes. Un facteur répresseur de la transcription contenant des doigts de zinc, GFI-1, est requis pour la transition des MDP en CDP, car les souris déficientes en GFI-1

présentent une diminution de tous les cDC et de tous les CDP ((Rathinam, Geffers et al. 2005)). Les progéniteurs hématopoïétiques déficients en GFI-1 perdent la capacité de se développer en DC, mais vont plutôt se différencier en macrophages (Rathinam, Geffers et al. 2005). Les précurseurs de DC communs donnent également des DC pré-classiques (pré-cDC) et des pDCs. Les pré-cDC quittent la moelle osseuse pour circuler dans le sang afin d'atteindre les tissus périphériques lymphoïdes ou non lymphoïdes. Dans les tissus lymphoïdes comme la rate ou les ganglions lymphatiques, on retrouve plusieurs sous-populations de cDCs provenant des pré-cDCs, tels que les cDCs $CD8a^{+}CD103^{+}CD11b^{+}$ et $CD8a^{-}CD103^{-}CD11b^{+}$. Des sous-ensembles de DC conventionnelles associés à ces deux catégories de cDCs peuvent également être observés dans les tissus non lymphoïdes tels que la peau, où l'expression du biomarqueur CD103 est plus spécifique que le CD8a pour distinguer ces deux cDCs. Notamment, dans les tissus intestinaux, y compris les ganglions lymphatiques mésentériques et lamina propria, les populations principales de cDC les plus présentes sont les cDCs $CD103^{+}CD11b^{+}$. Les progéniteurs DC comprenant des MDP et des CDP expriment le récepteur à la tyrosine kinase de type Fms 3 (La déficience en FLT3 entraîne un déficit de pDC et une disparition de toutes les cDCs) ((McKenna, Stocking et al. 2000); (Waskow, Liu et al. 2008)). De plus, les souris injectées avec FLT3L présentent une augmentation voire une repopulation totale de toutes les DC (Maraskovsky, Brasel et al. 1996). Ainsi, le développement DC dépend de l'interaction de FLT3L (ligand du FLT3) avec FLT3 ((Breton, Lee et al. 2015)).

A. Les cellules dendritiques de l'épiderme (LCs)

En 1868 le patho-biologiste allemand Paul Langherans décrit l'existence de cellules dotées de dendrites dans l'épiderme comme étant des récepteurs intradermiques du signal extra-cutané du système nerveux. Mais au milieu des années 1970, avec la détection à leur surface des récepteurs aux immunoglobulines, des récepteurs au complément et du CMHII, on leur découvre des fonctions plus spécifiques dans le système immunitaire associées à une protection cutanée. En effet, les cellules de Langherans (LCs) sont des cellules présentatrices d'antigènes majeures de la peau de la famille des cellules dendritiques et jouent un rôle clé dans les composantes du système immunitaire périphérique tant chez la souris que chez l'homme.

Exclusivement présentes dans l'épiderme, les LCs sont des cellules dérivées de la lignée monocytaire qui vont se différencier dans la peau (Le Borgne, Dubois et al. 2007).
Les précurseurs des LCs, qui sont produits dans la moelle osseuse, migrent à travers les vaisseaux sanguins dans la peau où elles vont résider et former 2 à 4% des cellules épidermiques. Leur genèse physiologique a longtemps été controversée, mais il apparait aujourd'hui que ces cellules tirent leur origine de cellules progénitrices hématopoïétiques du foie fœtal et des

macrophages dérivés des yolks sacs en condition de stabilité physiologique (A. and A. 1989). Elles peuvent être caractérisées dans l'épiderme humain entre 6 et 7 semaines de vie fœtale, puis à 14 semaines plus tard elles acquièrent par étapes un phénotype spécifique des LCs ((G. 1980); (Bangert, Brunner et al. 2011)). Ces cellules sont caractérisées par leur expression des récepteurs lectines de type II CD207/langerin impliqués dans la formation des granules de Birbeck (Valladeau, Ravel et al. 2000).

Leur maintien dans l'épiderme dépend de facteurs de croissance tels que le facteur de croissance transformant TGF-β (transforming growth factor βeta) et le macrophage colony-stimulating factor receptor (M-CSFR) issu des kératinocytes qui va activer les précurseurs des LCs pour leur recrutement et leur développement dans l'épiderme chez la souris ((Merad, Ginhoux et al. 2008)).

En revanche en condition inflammatoire, leur repopulation dans le tissu de revêtement qu'est l'épiderme, va dépendre du macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) qui ne s'avère pas être nécessaire pour leur implantation cutanée.
Par ailleurs, il a été prouvé chez la souris, que les keratinocytes des follicules pileux expriment des chimiokines induisant (CCL2, CCL20, CCL8) ou régulant le recrutement des LCs et de leur précurseur en réponse au stress et à l'inflammation (Ginhoux, Collin et al. 2007, Pasparakis, Haase et al. 2014).

Au repos, les LCs sont maintenues par mitose et leur renouvellement constant s'accompagne d'une migration spontanée de certaines cellules vers les ganglions lymphatiques (Merad, Manz et al. 2002).
Les LCs présentent des dendrites qui s'étendent entre les keratinocytes (L Berger, Gabriel Vasquez et al. 2006) leur permettant de capturer rapidement l'antigène sans mouvement constant. Leur arrangement spatial est un avantage car elles forment un réseau dense qui réduit la capacité d'invasion des agents pathogènes et facilite leur détection (Romani, Clausen et al. 2010). Suivant la capture des pathogènes, les LCs vont exprimer des marqueurs de maturité et des molécules de co-stimulations à leur surface perdant ainsi leurs dendrites afin de changer de morphologie (Pearton, Kang et al. 2010). Cette nouvelle forme leur permet de pénétrer naturellement dans le derme pour leur passage dans le système lymphatique afin de présenter l'antigène aux cellules T $CD4^+$ dans les ganglions drainant, initiant leur activation et donc la réponse immunitaire adaptative ((Stoitzner, Tripp et al. 2006), (Hunger, Sieling et al. 2004)).

En outre, elles vont aussi secréter soit chez l'homme ou soit chez la souris, diverses cytokines intervenant dans la modulation de l'environnement telles que IL-1, IL-3, IL-4, IL-8, GM-CSF, TNF alpha, TGF beta et LIF (Kannourakis and Abbas 1994).

B. Dendritic epidermal T cells (DETC)

Les DETCs (dendritic epidermal T cells) résident dans l'épiderme des souris et pas chez l'homme, ont été caractérisées comme des cellules Thy-1$^+$CD3$^+$ et expriment un TCR Vγ3Jγ1Cγ1/Vδ1Dδ2Jδ2Cδ canonique sans diversité de liaison au niveau des segments mais conservé suggérant un répertoire antigénique restreint (Havran and Allison 1990).

Leur développement est associé à un programme de réarrangement du TCR suivi de leur migration vers divers tissus épithéliaux. La première étape de réarrangement survient vers 14-16 jours dans le thymus fœtal pour constituer les thymocytes exprimant un TCR Vγ3/Vδ1. Ces cellules migrent dans l'épiderme soulignant l'importance de la présence de ce TCR pour leur localisation cutanée (Jameson, Cauvi et al. 2004).

Les DETCs jouent un rôle important dans le processus de cicatrisation et vont ainsi interagir avec les keratinocytes qui produisent des facteurs de croissance en vue d'un modelage tissulaire (Sharp, Jameson et al. 2004)

Les DETCs sont caractérisées par leur cytotoxicité et sécrètent une diversité de lymphokines immunomodulatrices telles que l'IL-2, IL-4, GM-CSF, INF-γ, IL-17 suggérant leur implication immunorégulatrice dans le développement des cellules lymphocytaires T αβ conventionnelles.

IV. Les cellules effectrices et mémoires T CD8+

Les lymphocytes effecteurs T CD8$^+$ résident en condition physiologique dans l'épiderme cutané et ils deviennent prédominants suite à une infection ou une inflammation. Ils sont caractérisés par l'expression phénotypique du CD8, CD69, CD103, CCR7, TCR αβ (Appay, Dunbar et al. 2002).

Ils sont initialement localisés au niveau de la couche basale de l'épiderme pour un meilleur contact avec les cellules du derme et une élimination rapide des pathogènes. Leur recrutement dans le derme pour ensuite rejoindre l'épiderme dépend de l'expression des récepteurs aux chimiokines tel que le CXCR3 (Zaid, Mackay et al. 2014). L'absence de récepteurs aux chimiokines une fois dans l'épiderme explique leur localisation permanente dans ce tissu. Du fait de cette persistance dans l'épiderme ils sont assimilés aux cellules T résidentes mémoires ou T_{RM} pour tissue-resident memory T cells. (Zaid, Mackay et al. 2014).

Elles agissent comme des cellules tueuses à travers la libération de perforine, de granules cytotoxiques ou encore par la sécrétion de nombreuses cytokines (IFN-gamma, IL-17…) lors de contextes infectieux, leur conférant leur fonction régulatrice (Bangert, Brunner et al. 2011).

Ainsi, les lymphocytes T CD8 vont à la fois coordonner le recrutement d'autres cellules immunitaire et lutter contre les pathogènes afin de contrôler l'infection.

V. Les cellules dermiques du système immunitaire cutané

Comme dans l'épiderme, le derme regorge d'une plasticité cellulaire impliquée dans la surveillance de l'intégrité cutanée. Ces différentes populations cellulaires immunitaires composées de lymphocytes et de cellules myéloïdes résident ou circulent à travers le derme. Ces populations cellulaires sont dynamiques et subissent des changements au cours des réponses immunitaires.

A. Les cellules dermiques T γδ

Les cellules lymphocytaires T de la circulation sanguine périphérique et des organes lymphoïdes tant chez l'homme que la souris, sont majoritairement des lymphocytes T αβ**.** Les lymphocytes T γδ sont, eux, principalement présents dans les tissus épithéliaux de la peau chez la souris. Ces cellules Tγδ présentent dans le derme à la fois chez l'homme et la souris, possèdent des caractéristiques phénotypiques et migratoires différentes des cellules DETCs. Mais elles jouent néanmoins un rôle important dans les processus de cicatrisation, remodelage tissulaire, dans la surveillance immunitaire tumorale et dans la résolution rapide de l'inflammation cutanée (Toulon, Breton et al. 2009).

Les cellules T γδ sont issues du thymus puis sont localisées dans la peau chez la souris. De plus, leur sélection thymique Vγ5Vδ1+ dépend de l'expression du SKINT1 (Goodman and Lefrançois 1988) un membre de la superfamille des immunoglobulines.
Ces cellules T γδ expriment les récepteurs à IL-17, au CCR6 et à l'acide retinoic (RORγt) et produisent également de l'IL-17 en réponse aux infections microbiennes (Sumaria, Roediger et al. 2011).

B. Les cellules lymphoïdes innées (ILCs)

Les cellules lymphoïdes innées ou ILCs (pour innate lymphoid cells) sont issues du progéniteur lymphoïde commun (CLP). En effet, elles dépendent pour leur différenciation de l'expression de la chaîne γ commune du récepteur à l'IL-2 (IL-2Rγc) et de l'inhibiteur de la liaison à l'ADN ID2 ((Ghaedi, Steer et al. 2016); (Artis and Spits 2015)).

Ce sont d'importantes cellules effectrices tissulaires qui ne présentent pas de récepteurs provenant d'un réarrangement génique comme pour les lymphocytes B et T. On en distingue deux classes : les ILC cytotoxiques telles que les NK qui dépendent des facteurs de transcription T-bet et Eomes pour produire de l'IFN-γ ; et les ILC auxiliaire (ILC1, ILC2, ILC3) qui sont gouvernées par les facteurs de transcription T-bet, GATA-3 ou RORγT et vont produire respectivement de l'IFN-γ et l'IL-5/IL-13 ou de l'IL-17/IL-22 (C Zhong, 2016) (figure 7).

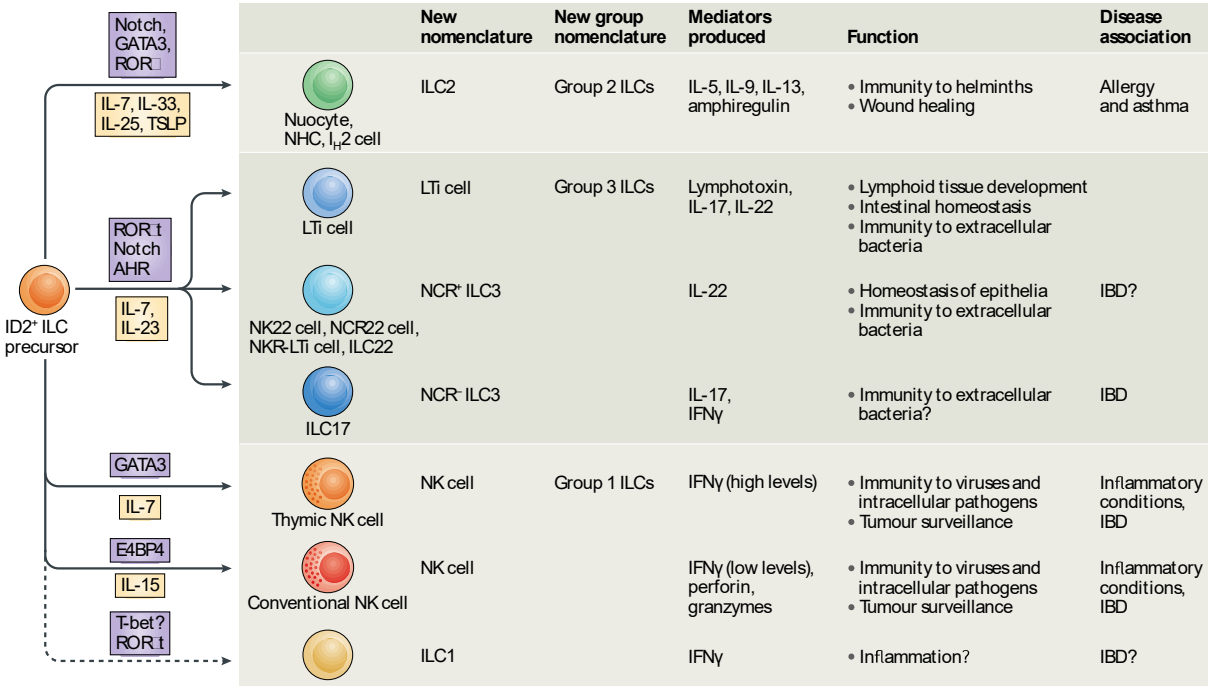


Figure 7 : Les sous populations d'ILC, fonctions et associations aux maladies. Les ILCs sont divisés en trois sous-ensembles : les ILCs de type1 (comprenant les ILCs et les cellules NK), les ILCs de type 2 (comprenant les ILC2) et les ILCs de type 3 (comprenant des cellules ILC3 et LTi) - en fonction de leur capacité respective à produire des cytokines associées aux cellules de type 1, de type 2 et de cellules TH17 (d'après Walker et al, 2013).

Les ILCs ont récemment été caractérisées comme étant les premiers acteurs de la réponse immunitaire innée. Leur implication dans le développement de nombreuses pathologies inflammatoires en fait donc des cibles thérapeutiques potentielles (Cherrier 2014). En effet, les patients atteints de la maladie de Crohn ou d'une broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) présentent une fréquence plus importante d'ILC1 dans, respectivement, les intestins et les poumons ((Bernink, Peters et al. 2013) ; (Fuchs, Vermi et al. 2013); (Crinier, Viant et al. 2017)).

C. Les cellules effectrices et mémoires T CD4+

Les lymphocytes T CD4+ mémoires après maturation dans le thymus, résident dans le derme en condition physiologique. Ils sont caractérisés par l'expression en surface des marqueurs CD4, CD69, CD103, CLa, le TCR αβ et l'absence d'expression du récepteur CCR7 ce qui restreint leur migration vers les ganglions lymphatiques en limitant leur localisation dans le derme (Campbell, Clark et al. 2010).

Chez l'homme, ils sont estimés à 20 millions dans la peau et au double dans la circulation sanguine.
Bien que la surveillance immunitaire du derme par les lymphocytes T CD4+ soit limitée, ils offrent localement une protection immunitaire efficace et rapide contre une réinfection par la sécrétion de cytokines IFN-**γ** et IL-2, indiquant une réponse orientée vers la voie TH1 (Di, Ma et al. 2016).

D. Les cellules mémoires résidentes T régulatrices

Les cellules T régulatrices résidentes dans le derme représentent entre 5 et 10 % des lymphocytes T résidents ((Clark, Huang et al. 2008); (Clark and Kupper 2007)). Par ailleurs, il a été démontré dans des modèles murins que ces cellules persistent dans la peau et induisent la tolérance à un nouveau "autoantigène" exprimé transgéniquement dans un modèle de souris (Rosenblum, Gratz et al. 2011). Elles sont caractérisées phénotypiquement par les marqueurs CD4, CD25, foxp3, et l'absence du CD127 à leur surface. Elles contribuent fortement à la tolérance périphérique en sécrétant des cytokines immuno-régulatrices (IL-10, TGF-β) aptes à induire l'arrêt du cycle cellulaire et en appauvrissant le micro-environnement en IL-2, une cytokine essentielle à la survie des LT. Elles préviennent aussi des maladies auto-immunes par l'élimination des lymphocytes auto-réactifs au niveau des organes lymphoïdes primaires, et des mécanismes de tolérance périphérique. Les Treg produisent également des granzymes et des perforines pouvant induire l'apoptose des LT ((Miyara, Yoshioka et al. 2009); (Sakaguchi, Miyara et al. 2010)).

Ces effecteurs CD45RO+ Treg chez l'homme, ont la capacité de supprimer la prolifération et la production de cytokines des cellules T effectrices en condition de stress ou inflammatoire (Mottet, Uhlig et al. 2003). De plus elles peuvent proliférer localement lors des inflammations cutanées (Vukmanovic-Stejic, Agius et al. 2008) et peuvent servir de frein pour le control de l'inflammation dans les tissus périphériques (Dudda, Salaun et al. 2013).

Elles sont aussi impliquées dans la régulation des réponses immunes observées dans les allergies, les greffes, les cancers et les maladies infectieuses (Seneschal, Clark et al. 2012).

E. Les cellules tueuses naturelles (NKs)

Ce sont des lymphocytes du système immunitaire inné, de taille supérieure aux lymphocytes B et T (Yokoyama, Sojka et al. 2013). Elles se caractérisent par l'expression des marqueurs CD3-, CD56+, CD16+, CD94+ et CD161+

Bien que représentant 10 à 20% des lymphocytes circulant du sang, elles sont présentes dans les tissus comme la peau et contiennent des granules chargés de molécules cytotoxiques (granzyme, perforine) qui induisent l'apoptose des cellules cibles (Topham and Hewitt 2009).

Elles éliminent toutes les cellules du soi ayant un défaut d'expression des molécules caractérisant l'individu (molécules du complexe majeur d'histocompatibilité ou CMH) pouvant traduire un processus cancéreux ou une infection virale.

Initialement décrites pour leur capacité inhérente à tuer les cellules tumorales et allogéniques sans sensibilisation préalable, les cellules NK sont maintenant connues pour leur participation dans diverses réponses immunitaires telles que la destruction des cellules infectées par les microorganismes, la production de cytokines comme l'IFN-γ pour stimuler la réponse immunitaire et leur rôle dans l'immunité adaptive en devenant des cellules mémoires (Schleinitz, Vély et al. 2010), (Jaeger and Vivier 2012).

A. Les cellules dendritiques du derme (DCs)

Le derme possède un réseau densifié de sous-populations de cellules dendritiques, comprenant les pDCs, les cDCs et les DCs derivées des monocytes (figure 8).

Ainsi, les DCs plasmacytoïdes qui sont absentes au repos dans la peau, mais présentes en condition inflammatoire vont stimuler la cicatrisation et médier la réponse inflammatoire systémique observée après l'activation des agonistes du récepteur TLR7 (Hemmi, Kaisho et al. 2002).

D'autre part, les cDCs dont l'origine est similaire aux pDC, se différencient et se maintiennent sous l'influence de différents facteurs de transcription mais se caractérisent en général par l'expression du CD11b (ou ITGAM pour integrin alpha M) (Satpathy, M Murphy et al. 2011).

Toutes ces cellules ne sont pas au repos dans le derme car une petite population appelée les cDCs des tissus non lymphoïdes va maturer pour pouvoir migrer dans les ganglions lymphatiques (S, J et al. 2008). Au cours de leur maturation en conditions d'homéostasie, ces DCs conventionnelles des tissus non lymphoïdes acquièrent un rôle tolérogénique en surexprimant le CMH de classe II. Ceci permet de transporter les antigènes du soi vers la zones folliculaire des T dans les ganglions lymphatiques en vue d'une tolérance au soi et d'une inhibition des cellules T autoréactives *(Hochweller, Wabnitz et al. 2010)*

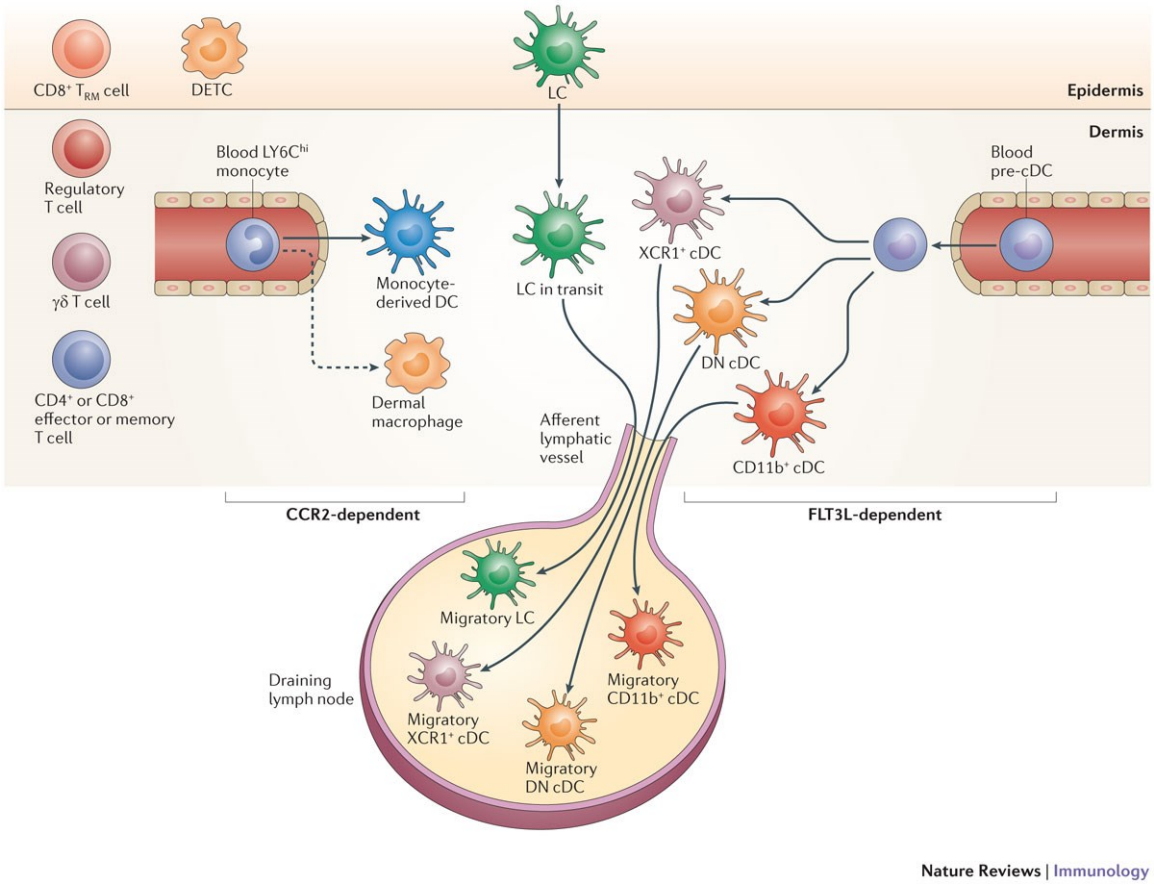


Figure 8 : Les origines et les fonctions des cellules dendritiques dans la peau. Les cellules dendritiques conventionnelles (CDC) XCR1 + CD11b-, CD11b + et double-négatif (DN) résident dans le derme et se développent à partir de précurseurs pré-cDCs dérivés du sang d'une manière dépendante de la tyrosine kinase 3 (FLT3L). Les cellules de Langerhans (LCs) résident dans l'épiderme et proviennent de progéniteurs dérivés du sac vitellin. Les CDC sont dotés de la capacité de migrer vers les ganglions lymphatiques de drainage. Les monocytes LY6C^{hi} extravasés génèrent des DC dérivées de monocytes dermiques d'une manière dépendante du récepteur CC-chimiokine 2 (CCR2). Les macrophages résidant également dans le derme, proviennent probablement à la fois des progéniteurs embryonnaires et des monocytes sanguins LY6C^{hi} (indiqués par la flèche pointillée). L'épiderme contient également des cellules T épidermiques dendritiques (DETC) et des cellules CD8 + T (T) à mémoire tissulaire, tandis que les cellules effectrices CD4 + ou des cellules T mémoire, des cellules T γδ et des cellules T régulatrices se trouvent dans le derme (d'après Malissen et al, 2014).

Les cDCs ont un potentiel unique pour réaliser cette fonction de par leur localisation importante dans les tissus non lymphoïdes et dans la zone marginale de la rate à l'état physiologique, où elles détectent constamment des antigènes tissulaires et sanguins, grâce à l'expression des biomarqueurs bien spécifiques acquis au cours de leur développement ou conditionnellement lorsqu'elles vont être activées (Tableau 1) (Merad, Sathe et al. 2013).

Les DCs dérivant des monocytes sont des cellules dendritiques inflammatoires possédant des propriétés fonctionnelles spécifiques de l'inflammation. En effet, elles sont capables de produire du TNF/iNOS (Serbina, Salazar-Mather et al. 2003). Par ailleurs, elles ne sont pas capables d'activer les lymphocytes T mais d'éliminer certains pathogènes (Engel, Maurer et al. 2008). De manière différente des monocytes et des macrophages. En effet, les monocytes recrutés sur le site de l'inflammation peuvent se différencier en cellules dendritiques classiques (Rosenzwajg, Canque et al. 1996) ; (Caux, Dezutter-Dambuyant et al. 1992); (Romani, Clausen et al. 2010)

1. Les cDCs CD11b+ dermiques

Les cDCs CD11b^{+} dermiques sont la population de cellules dendritiques la plus abondante dans le derme murin dont l'équivalent humain est la population cDCs CD1c+ (Tamoutounour, S. *et al*, 2013). Elles sont caractérisées par le phénotype XCR1-CD127a+ et produisent la déshydrogénase retynaldehyde qui favorise la synthèse de l'acide rétinoïque, une vitamine A essentielle à l'induction des cellules T régulatrices qui vont atténuer la réponse immune par une rétroaction négative dans un contexte inflammatoire chronique (McLachlan, Catron et al. 2009).

De plus, après une stimulation cutanée, les cellules cDCs CD11b+ répondent à la lymphopoïétine stromale thymique (TSLP pour « thymic stromal lymphopoietin ») et activent les lymphocytes TH naïfs en orientant leur différenciation vers un phénotype de type Th2 (Allakhverdi, Comeau et al. 2007, Kitajima and Ziegler 2013).

2. Les cDCs dermiques Double negatif

Ces cellules expriment le facteur de transcription ZBTB46 spécifique de la différenciation des DCs conventionnelles. Elles sont doublement négatives pour les marqueurs XCR1 et CD207 et expriment faiblement le marqueur CD11b. Malgré leur absence chez l'homme, leur développement va dépendre des facteurs de régulation IRF4, FLT3L, de la présence du récepteur CCR2 et CX_3CR1 chez la souris (Hohl, Rivera et al. 2009).

3. Les DCs dermiques XCR1+

Cette population de DCs est retrouvée à la fois dans les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes humains et murins et expriment le récepteur de chimiokine XCR1 et le CD8α mais pas le CD11b. Elles sont subdivisées en deux sous-populations, celles qui sont CD103- et celles qui sont CD103+ impliquées dans la présentation croisée des antigènes du soi dérivés des kératinocytes.

Les DCs $XCR1^+$ dermiques murines sont les seules à exprimer fortement le CD207 et leur homologue humain exprime le CD142 (thrombomoduline et BDCA3) (Venetia, Naomi et al. 2015).

Phenotypical marker	pDC	Lymphoid tissue cDC		Nonlymphoid tissue cDC			Langerhans cell
		CD8⁺ cDC	CD11b⁺ cDC	CD103⁺ CD11b⁻ cDC	CD103⁺ CD11b⁺ intestinal cDC	CD103⁻ CD11b⁺ cDC	
CD45	+	+	+	+	+	+	+
CD11c	+	+++	+++	++	++	++	++
MHC class II	+	++	++	++	++	++	++
CD8	subset	+	−	−	−	−	−
CD4	+	−	+/−	−	−	−	ND
CD11b	−	−	+	−	+	+	+
CD103	−	subset	−	++	++	−	−
Langerin	−	subset	−	+	−	−	++
EpCAM	−	−	−	−	−	−	++
B220	+	−	−	−	−	−	−
CD24	ND	++	+	++	++	+/−	++
Btla	+	++	+	++	+	+/−	ND
c-kit	−	+	+	+	+	+/−	ND
CD26	+	+	+	+	+	+/−	ND
Xcr1	−	+	−	+	−	−	−
CD36	−	+	−	+	ND	−	−
Cystatin C	+	++	+	ND	ND	ND	ND
Clec9a (DNGR1)	+	++	−	++	−	−	−
Cadm1 (Necl2)	−	+	−	ND	ND	ND	ND
CD205	−	++	+	++	ND	ND	++
CX_3CR1	−	subset	−	−	−	++	+
CD209 (dc-sign)	++	−	+	−	+	+/−	−
F4/80	−	−	+	−	−	+	+
CD172a (Sirpa)	+	−	++	−	−	++	+
CD64 (Fc r1)	−	−	−	−	−	++	ND
Ly6C	++	−	−	−	−	+/−	−

Tableau 1 : Phénotype des cellules dendritiques de la peau humaine et murine. Dans le système immunitaire et au-delà. : Phénotype des CD des tissus lymphoïdes et non lymphoïdes chez la souris (d'après Merad et al, 2013).

B. Les macrophages

Dérivés de la moelle osseuse, les macrophages font partie du système phagocytaire mononucléaire. Une fois dans le sang, leurs précurseurs se différencient en monocytes, puis en macrophages dans le derme et arrêtent de proliférer. Ils exprimeront ainsi les marqueurs CD14, $AF^{hi}SSC^{hi}$, $FXIIIa^{+}$, mais seront $CD1a^{-}$ (marqueurs des cellules de Langherans) tant chez la souris que chez l'homme. Les macrophages dermiques ne migrent pas vers les ganglions lymphatiques drainants chez les souris et ils ont une faible capacité de présentation des antigènes par rapport aux CDC dermiques et aux DC dérivées des monocytes (Tamoutounour, Guilliams et al. 2013).

En revanche, ils ont la capacité de phagocyter les débris cellulaires et les pathogènes, de les digérer ou de les apprêter et de présenter les antigènes apprêtés aux lymphocytes et autres cellules immunitaires pour déclencher une réponse immunitaire spécifique. Ceci est rendu possible grâce à l'expression d'un ensemble unique de gènes qui soutiennent des rôles spécifiques dans l'élimination des intermédiaires de dégradation des auto-macromolécules et dans la destruction des micro-organismes comme les bactéries par exemple (Caroline and Muriel 2010).

Les macrophages secrètent également une large gamme de facteurs impliqués dans la régulation des réponses immunitaires et le développement de l'inflammation. En effet, les macrophages expriment des taux élevés d'IL-10 indiquant qu'ils pourraient avoir un rôle anti-inflammatoire.
Par ailleurs, les macrophages dermiques ont un rôle sentinelle dans la détection d'une invasion précoce par des microorganismes car ils produisent des chimiokines (MDC (macrophage-derived chemokine) ou CCL2)((Guan, Burghes et al. 1999); (N.C., A. et al. 1996)) impliquées dans l'extravasation des neutrophiles dans le derme infecté ((Wilgus, Roy et al. 2013); (Rodero and Khosrotehrani 2010)).

De plus, ils peuvent produire des enzymes hydrolytiques, des composants du système du complément, et une large gamme de facteurs solubles tels que l'interleukine-1, certaines prostaglandines (prostaglandines E2), de l'interféron (IFN-γ), et des facteurs de croissance (GM-CSF). Ils expriment aussi à leur surface des récepteurs pour des lymphokines qui induisent leur activation (Abtin, Jain et al. 2014);(Malu, Bélanger et al. 2011);(P.-C., L. et al. 1991); (Rahman and McFadden 2006)).

Chapitre 2 : LES MASTOCYTES

I. La petite allégorie du mastocyte

Les mastocytes ont été soigneusement décrits dans le péritoine de grenouille, dès 1863 par Von Recklinghausen. C'est à la suite du rapport de ce dernier que les histologistes et pathologistes s'y intéressent et Ehrlich en fait son sujet de thèse doctoral en 1879 (figure 9).

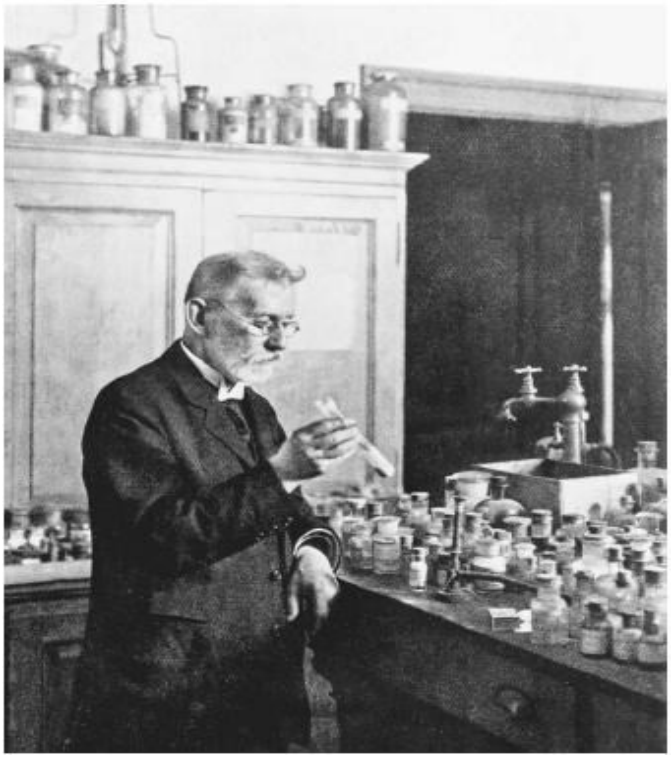


Figure 9 : Photographie de Paul Ehrlich dans son laboratoire (1880).

Il prouve que le mastocyte représente un type cellulaire singulier présent dans les tissus corporels. A priori, pour lui, il s'agissait de cellules suralimentées issues des tissus conjonctifs justifiant ainsi son appellation (mast zellen= cellule bien nourrie).
Il découvre également que le mastocyte se colore de manière spécifique avec des colorants de la famille des anilines tel que le bleue de toluidine (figure 10).
Par la suite, il décrira aussi les caractères morphologiques des basophiles dans ses travaux de coloration des cellules circulantes du sang, permettant de les différencier des neutrophiles ou des éosinophiles.

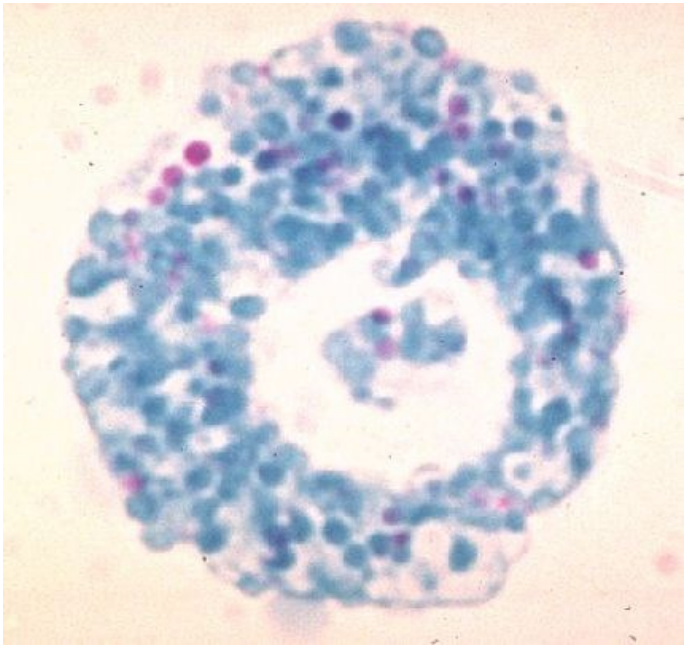


Figure 10 : Un mastocyte au repos. Les granules sont colorés en bleue de toluidine (image prise au microscope optique).

Les caractéristiques fonctionnelles des mastocytes et des basophiles sont restées longtemps énigmatiques et controversées du fait des diverses hypothèses. En effet, les études initiales sur mastocytes étaient centrées sur ses caractéristiques histologiques, sa distribution et son abondance tant sur le plan physiologique que sur le plan pathologique.
Il faudra près d'un siècle après sa description pour percevoir son rôle dans l'allergie en contradiction avec leurs mécanismes immunitaires avec des effets pro-inflammatoires pouvant être protecteurs lorsqu'ils ont une action anti-infectieuse ou anti- tumorale ou participent au remodelage tissulaire. En effet, avec la découverte de l'implication de l'histamine en 1910, des leucotriènes en 1938 dans l'anaphylaxie et des IgE (1966) associés aux FcεRI, leurs récepteurs de haute affinité à la surface des mastocytes et les basophiles, il y aura une progression importante des connaissances de leur rôle dans les réactions allergiques (figure 11).

Ainsi, en 1953, les mastocytes et les basophiles sensibilisés aux IgE ont été identifiés comme des cellules effectrices capables de libérer immédiatement une variété de médiateurs biologiques tels que l'histamine ou les leucotriènes en réponse à la stimulation des allergènes et responsables du choc anaphylactique.
A partir de là, les caractéristiques morphologiques du mastocyte deviennent mieux décrites, en particulier leur implication fonctionnelle dans les réactions inflammatoires associées aux allergies et les réponses immunitaires abstraites.

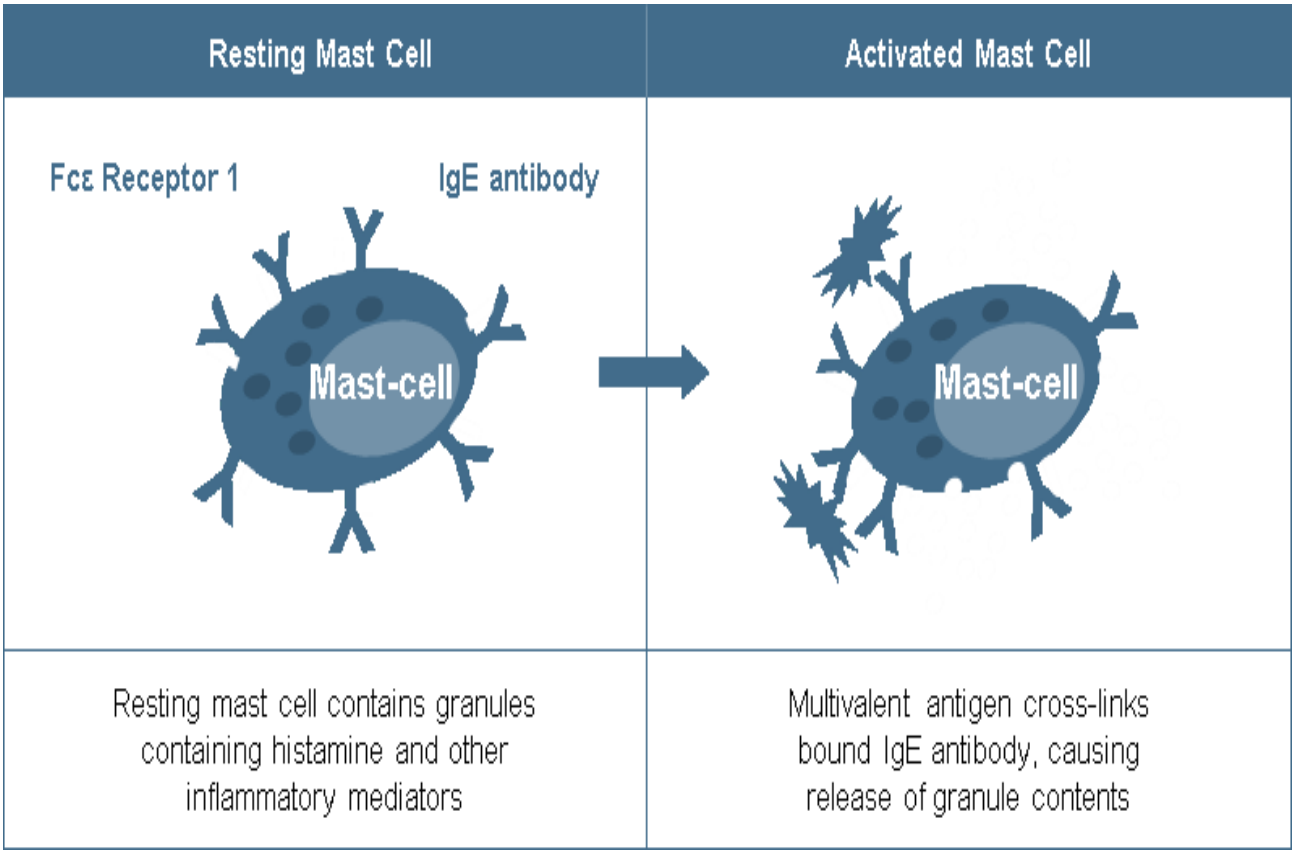


Figure 11 : Activation du Mastocyte. Le Mastocyte en état de repos et le Mastocyte après activation et dégranulation. A gauche : le mastocyte au repos possède des granules contenant l'histamine et d'autres médiateurs inflammatoires. A droite : les antigènes se lient à l'anticorps IgE, induisant la libération du contenu granulaire (d'après Wernerson et Pejler et al, 2014).

II. Généralités

Les mastocytes sont des cellules inflammatoires présentes dans les tissus à l'interface avec l'environnement extérieur de l'hôte tels que les tissus conjonctifs, les voies cutanées, aériennes, urinaires, génitales et le tractus digestif. Il a été montré que leur présence importante dans le tissu conjonctif cutané est corrélée avec la densité des vaisseaux sanguins (T., P. et al. 1979).

Son activation et sa dégranulation vont clairement influencer de nombreux aspects des conditions physiologiques et pathologiques dans diverses situations.
En contexte physiologique, les mastocytes sont connus pour réguler la vasodilatation, l'homéostasie vasculaire, les réponses immunitaires innées et adaptatives, l'angiogenèse *via*

l'action de facteurs de croissance angiogéniques et la détoxification des venins et toxines. En effet, il y aura très souvent une dégradation du tissu conjonctif autour des sites de néovascularisation (Dabbous, Walker et al. 1986), impliquant la modification protéolytique localisée de la matrice extracellulaire (ECM) (H. and H. 2004).
D'autre part, les mastocytes ont également été impliqués dans la physiopathologie de nombreuses maladies, comprenant l'allergie, l'asthme, l'anaphylaxie, les troubles gastro-intestinaux, de nombreux types de tumeur.

III. Structure et localisation du mastocyte

Le mastocyte est la plus grande cellule mononuclée et possède une surface plasmique membranaire plus complexe et des granules cytoplasmiques plus petites et plus nombreuses que celles du basophile (Kawakami and Galli 2002). La forme morphologique des mastocytes est tissu dépendant et varie en fonction de leur localisation. Lorsqu'ils sont dans un tissu conjonctif lâche, ils apparaissent arrondis, mais lorsqu'ils sont étroitement apposés aux vaisseaux sanguins, ils sont allongés ou ovoïdes, tandis que dans les fibres du derme, ils sont fusiformes, étoilés ou filiformes. Les mastocytes qui sont collectés du péritoine chez le rat par exemple, sont de forme arrondie. Ils ont un diamètre moyen compris entre 7 et 20 μm et sont identifiables par coloration au bleu de toluidine ou au bleu de méthylène, une coloration bleue qui devient violette au contact des granules contenant des protéoglycanes sulfatés telles que l'héparine et les chondroïtines sulfates ((L. 1963)). Ces caractéristiques de coloration sont uniquement partagées avec les basophiles parmi les autres cellules hématopoiétiques. *In vitro*, les cellules péritonéales résidentes ont un diamètre moyen de 12,8 μm (Sara 1963). Le noyau est relativement gros, mesurant 4 à 7 μm de diamètre avec des quantités variables de chromatine et présente un, voire deux ou plusieurs nucléoles (Bloom 1974).

Les mastocytes sont identifiables par l'expression caractéristique des protéines membranaires telles que le FcεRI, le CD63, le CD117 et le CD203 servant de marqueur biologique. De plus, les mastocytes peuvent aussi être identifiés par des réactifs biochimiques détectant les protéases intracellulaires ayant des propriétés enzymatiques ou encore par immunofluorescence en utilisant des anticorps anti-tryptase et chymase (figure 12) (Irani, Schechter et al. 1986, Bentley, Jacobson et al. 1992, P. 1996).

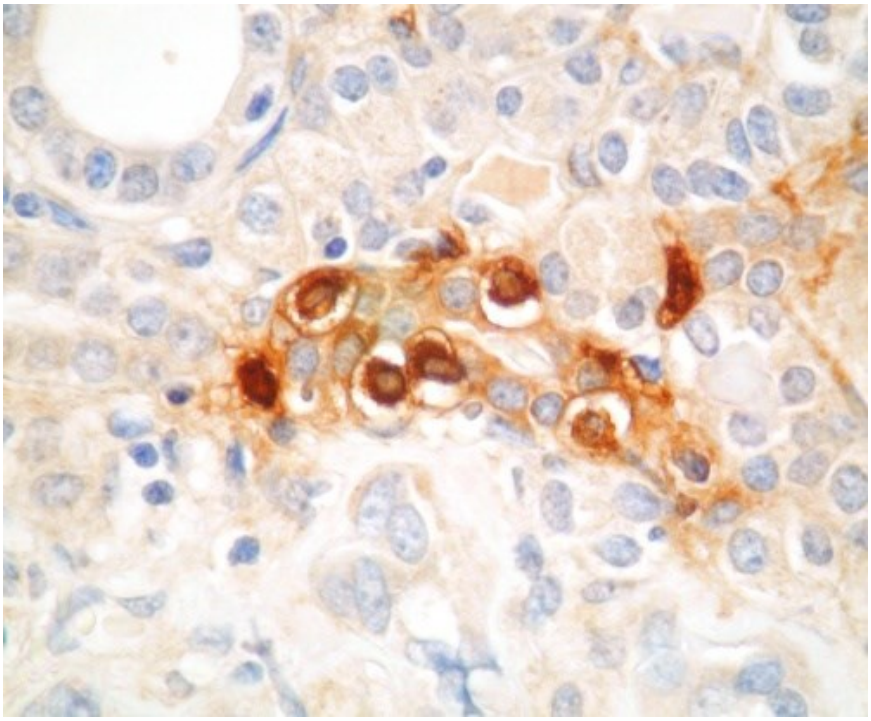


Figure 12 : Marquage de la tryptase contenu dans les granules mastocytaires.
L'épithélium des tubules infiltrés montre souvent une positivité à la tryptase. Les mastocytes ne sont pas présents dans les artères normales mais sont présents en petit nombre dans l'intima fibrotique des artères intra-rénales dans la vasculopathie chronique de l'allogreffe (d'après Jones e al, 2003).

Les informations sur la distribution tissulaire des mastocytes sont largement basées sur des observations chez le rat. En effet, les mastocytes sont largement présents chez les vertébrés avec une densité dans divers tissus corporels en grande partie liée à la teneur en tissu conjonctif. Leur durée de vie est longue, probablement de plusieurs années, mais ils peuvent proliférer en réponse au signal d'activation (Siraganian 1998). Généralement, plus la teneur en tissu conjonctif est grande, plus on trouve de mastocytes. Par conséquent, de nombreux mastocytes sont présents dans le tissu cutané et sous-cutané et peu de mastocytes sont présents dans le foie, la rate et les glandes surrénales en raison du manque de tissu conjonctif dans ces organes.
Par ailleurs, certains organes tels que la langue, le prépuce, le pars nervosa de l'hypophyse et le tube digestif ont un grand nombre de mastocytes.

IV. Origine, maturation tissulaire et survie

D'après EHRLICH et WESTPHAL les mastocytes seraient des cellules issues de tissu conjonctif métamorphosées. Mais il a été difficile à cette époque de déterminer l'origine exacte du mastocyte du fait de l'absence de moyens permettant d'identifier la cellule précurseur. Néanmoins, des études ont pu montrer que chez le rat, les mastocytes apparaissent dans le tissu sous-cutané au 15ème ou 16ème jour de gestation avec une colonisation rapide dans les tissus conjonctifs de la peau, vers 18 ou 19 jours, mais pas dans les tissus conjonctifs des organes solides (Gamble and Stempak 1961).

Les mastocytes sont donc dérivés des cellules souches hématopoïétiques pluripotentes de la moelle osseuse mais mûrissent à partir des progéniteurs de mastocytes (MCp) dans les tissus périphériques qui sont $CD34^{+}$ $Sca\text{-}1^{-}$ $Ly6c^{-}$ Kit^{+} $Fc\varepsilon RI\alpha^{-}$(Kitamura, Yokoyama et al. 1981)Les mastocytes sont donc dérivés des cellules souches hématopoïétiques pluripotentes de la moelle osseuse mais mûrissent à partir des progéniteurs de mastocytes (MCp) dans les tissus périphériques et exprimant les marqueurs de surface $CD34^{+}$ $Sca\text{-}1^{-}$ $Ly6c^{-}$ Kit^{+} $Fc\varepsilon RI\alpha^{-}$ (Rodewald, Dessing et al. 1996). Au cours de l'hématopoïèse, le développement de MCp est fortement régulé par des facteurs de transcription, puis le MCp non différencié circule dans les vaisseaux vers les tissus dans un état immature. La plus grande partie des MCp dans les tissus exprime le c-kit (récepteur du facteur de cellules souches SCF) et le récepteur de haute affinité des IgE FcεRI, tout comme les mastocytes matures. Cependant, ils sont moins ou non granulés (Abonia, Austen et al. 2005).

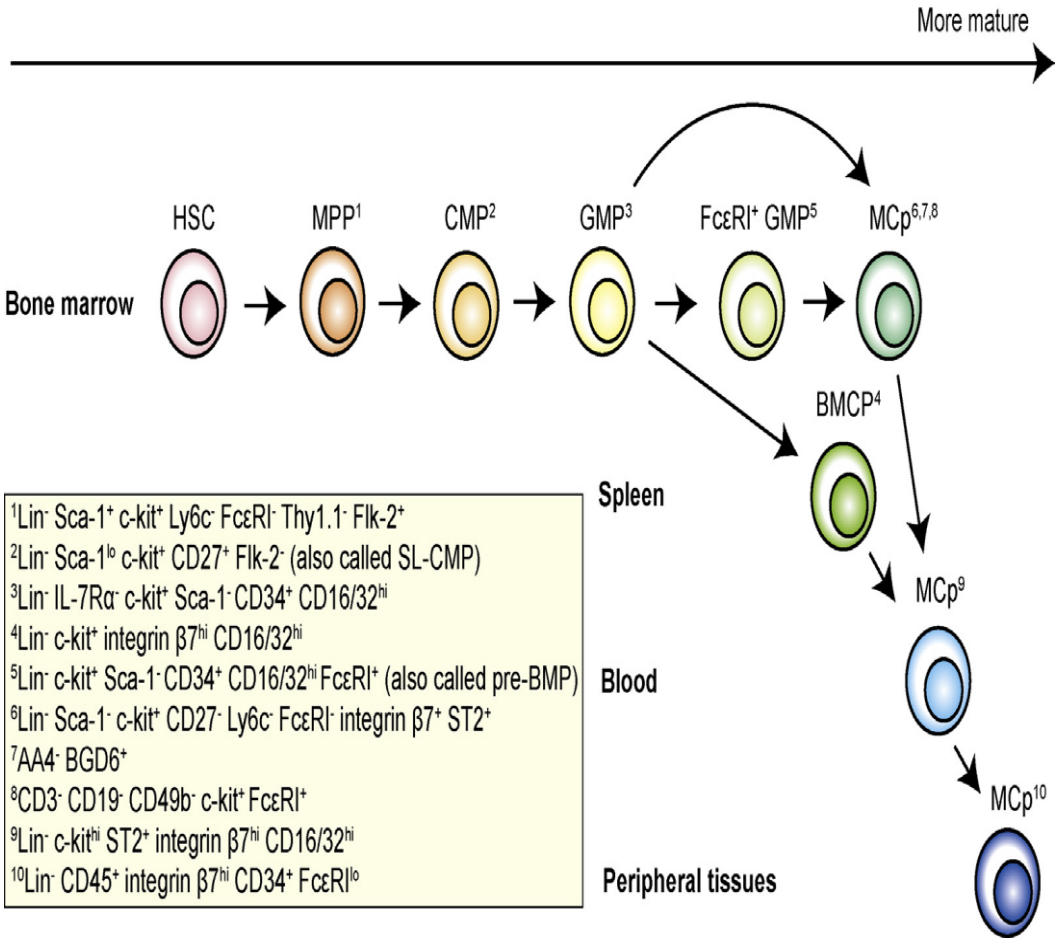


Figure 13 : Modèle proposé pour le développement de MCp. Les mastocytes proviennent de la moelle osseuse où ils se développent à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH) via des progéniteurs multipotents (MPP), des progéniteurs myéloïdes communs (CMP) et des progéniteurs de granulocytes / monocytes (GMP). Dans les tissus périphériques, MCp exprime RFcεI à des taux faibles chez les souris C57BL. Les nombres en exposant à chaque stade de progéniteur sont répétés dans la boîte jaune pour décrire les marqueurs de surface utilisés pour définir le stade progéniteur particulier (d'après Dahlin et Hallgren et al, 2015).

Néanmoins, plusieurs théories récentes ont été exposées pour expliquer l'origine des mastocytes. En effet, Chen et collaborateurs proposent que le MCP présent dans la moelle osseuse ne provienne pas du progéniteur myéloïde commun (CMP) ou bien du progéniteur des Granulocytes/Monocytes (GMP), mais qu'il provienne directement du progéniteur multipotent (MPP) (Chen, Grimbaldeston et al. 2005); Franco (Franco, Chen et al. 2010).

Arinobu et collaborateur ont quant à eux trouvé dans la population GMP classiquement définie (Lin-IL-7R-c-Kit + Sca-1- CD34 + FcRII / III^{hi}), des cellules uniques donnant naissance à des neutrophiles, des basophiles et des mastocytes démontrant donc que les mastocytes appartiennent à la lignée granulocytaire / monocytaire (Arinobu, Iwasaki et al. 2005).

Des progéniteurs uniques nommés pré-BMP (pre-basophil and mast cell progenitors, des cellules trouvées parmi les FcεRI+ GMP) et capables de donner naissance à la fois à des basophiles et à des mastocytes dans la fraction GMP de la moelle osseuse ont été récemment isolés par Qi et ses collègues (Qi, Hong et al. 2013).

Ainsi, l'ensemble de ces données suggère que la MCp engagée provient de progéniteurs bipotents ayant à la fois une capacité de se différencier en mastocytes et en basophiles dans la population GMP (figure 13).
Cependant, une meilleure compréhension de la nature des cellules progénitrices donnant naissance à cette population cellulaire reste encore à approfondir.
Par ailleurs, chez l'homme, la relation entre les cellules progénitrices hématopoïétiques $CD34^+$ et les mastocytes est restée spéculative mais les progéniteurs migrent dans le sang et expriment les biomarqueurs CD34, CD117, CD13 et CD133 sous l'influence de cytokines, en particulier du SCF (Sawai, Kita et al. 1999).

D'une manière générale, l'adressage, la maturation et la survie des mastocytes dans les tissus dépendent de l'environnement local et sont influencés par des facteurs de croissance spécifiques tel que le SCF et de cytokines diverses telles que l'IL-4, l'IL-5 et l'IFNγ, l'IL-6, l'IL-9, la Thrombopoïétine (TPO), le facteur de croissance des nerfs Nerve Growth Factor (NGF) et le Facteur de croissance Transforming Growth Factor-1β (TGF-1β)) (Lantz et al., 1998 (Galli SJ 1993). Ces cytokines réagissent en synergie, contrôlant ainsi soit la survie soit l'inhibition de différenciation des mastocytes selon que l'on se trouve chez l'homme (Nilsson G 1994) ou chez les rongeurs (Wang, Tedla et al. 1998). En outre, cette association de facteur pour la maturation mastocytaire dépend aussi du tissu. En effet, il a été rapporté que les mastocytes issus de l'intestin prolifèrent en présence de l'interleukine 4 et du SCF (Bischoff, Sellge et al. 1999), Sellge et al. 1999).
En plus de la prolifération mastocytaire *in vitro* l'IL4 induit l'expression du FcεRI, du CD117 et des tryptases granulaires des mastocytes ((Andersen, Holm et al. 2008)).

L'hétérogénéité de la population des mastocytes ainsi que leur développement dépendra de l'environnement propre. Puis, suivant les organes et le stade de maturation, la modulation de ce développement se fera de façon différente.

A. Le Stem Cell Factor (SCF) et les autres facteurs de différenciation mastocytaire

Le SCF est le facteur de croissance principal nécessaire à la différenciation et à la prolifération du mastocyte murin et humain ((Williams, de Vries et al. 1992, MICHEL, FLORENCE et al. 1994)). Généralement produit par les cellules épithéliales et mésenchymateuses (Anderson, Lyman et al. 1990), il va permettre la différenciation, l'activation, la prolifération et la survie des MCs. Ce chimioattractant est exprimé soit à la surface des cellules ou secrété sous forme soluble, et son récepteur qui est le c-kit ou CD117 possédant une activité tyrosine kinase est quant à lui exprimé à la surface des cellules hématopoïétiques. Ainsi, il va induire le recrutement des mastocytes en direction de la périphérie après s'être fixé à son récepteur Kit ((Tsai, Takeishi et al. 1991)).

L'implication essentielle du SCF et du CD117 dans le développement du MC et ses fonctions sécrétrices a été mis en évidence chez des modèles de rongeurs dépourvus de mastocytes tels que la souris Kit$^{W/W-v}$, Kit$^{W-f/W-f}$ et le rat Kit$^{W-s/W-s}$ (Geissler, Ryan et al. 1988) ou encore la souris Kit$^{W-sh/W-sh}$ (Grimbaldeston, Chen et al. 2005). En effet, après la découverte de mutations affectant la voie de régulation essentielle de la différenciation mastocytaire, à savoir la voie *stem cell factor* (SCF ou Kit ligand, KL/c-Kit (récepteur du SCF ou KL)), le déficit en MCs sans incidence sur la production des progéniteurs myéloïdes précoces a pu être expliqué. Ainsi, Les souches WW^{v}, dont le gène codant pour le c-Kit est délété (Kitamura 1989) et les souris Sl/Sl^{d} ne synthétisent que la forme soluble du SCF ((Flanagan and Leder 1990)) provoquant par conséquent des anomalies physiologiques (infertilité, neutropénie, …).

D'autre part, certains facteurs comme L'Interleukine-3 (IL-3) seul permettent d'obtenir des MCs in vitro à partir de moelle osseuse de souris déficientes en MCs (Eklund, Ghildyal et al. 1993); (Hallgren and Gurish 2011). L'IL-3 est donc une autre cytokine importante pour le développement des mastocytes chez les rongeurs, mais pas chez l'homme (voir ci-dessous). En effet, la culture de cellules médullaires normales de souris ou de rat, en présence d'IL-3, conduit à l'obtention en quelques semaines de populations pures de mastocytes dont le phénotype les rapproche des mastocytes muqueux (Arock and Valent 2010). Ces mastocytes obtenus en présence d'IL-3 peuvent acquérir des caractéristiques des mastocytes séreux lorsqu'ils sont cultivés en présence de SCF/KL (Haig, Huntley et al. 1994).
De plus, l'IL-6, l'IL-10, les cytokines impliquées dans la polarisation des lymphocytes (Ly) T helper comme IL-4, IL-9, le Nerve Growth Factor (NGF), le Transforming Growth Factor-1β (TGF-1β) et la prostaglandine E2 dans les muqueuses du tractus digestif contribuent à influencer le phénotype ainsi que le nombre de MCs comme l'IL-3.

Ainsi, ces cytokines sont aussi essentielles que le SCF à la croissance, la différenciation et la prolifération des mastocytes (Yanagida, Fukamachi et al. 1995).

Chez l'homme, la différenciation des mastocytes à partir de progéniteurs hématopoïétiques $CD34^+$ de la moelle osseuse, du sang de cordon, de sang périphérique ou de foie fœtal et en plus de la présence du c-Kit ou CD117, elle s'accompagne de l'apparition séquentielle de deux catégories de marqueurs *(figure 14)* : des antigènes précoces non spécifiques (récepteur au M-CSF ou CD115, récepteur au GM-CSF ou CD116), des marqueurs précoces de différenciation mastocytaire (FceRI ou récepteur de haute affinité des IgE, histamine, tryptase) et des marqueurs tardifs de différenciation mastocytaire (héparine, chymase) (Valent, Spanblochl et al. 1992) que nous reverrons plus loin. Par ailleurs, le SCF associé à d'autres cytokines telles que l'IL-6, permet la croissance des mastocytes in vitro chez l'homme (Yanagida, Fukamachi et al. 1995). Il joue en effet aussi un rôle central chez l'homme car il a été prouvé qu'en mettant en culture des cellules progénitrices $CD34^+$ isolées du sang périphérique en présence de SCF, il y aura induction de leur prolifération et de leur différenciation en mastocytes (Gaudenzio, Laurent et al. 2013).

En effet, on remarque donc que les connaissances sur la différentiation et la régulation des mastocytes humains sont beaucoup moins étendues que chez la souris, ce qui est dû aux souches de souris déficientes en mastocytes mentionnées précédemment. Même si différentes cytokines contrôlent la différenciation et la prolifération des mastocytes humains, la principale reste aussi le SCF, et son récepteur spécifique le c-Kit ou CD117, dont nous détaillerons les principales caractéristiques. C'est grâce à la capacité d'une lignée de fibroblastes murins (3T3) à induire la différenciation de progéniteurs humains $CD34^+$ en mastocytes que le SCF avait été initialement identifié comme une cytokine essentielle pour cette voie de différenciation (Dvorak, Morgan et al. 1993). Le SCF est aussi synthétisé par les cellules, comme les hépatocytes, les kératinocytes, les cellules stromales médullaires, les cellules stromales thymiques, les cellules endothéliales ou encore les cellules de Langerhans.

Des chercheurs ont montré que des progéniteurs humains $CD34^+$ cultivés en présence de SCF génèrent des mastocytes de phénotype MCT ((K. and A. 1995) ;(Mitsui, Furitsu et al. 1993)). La co-culture de cellules mononuclées de sang de cordon avec des fibroblastes 3T3 durant 8 semaines permet d'obtenir des mastocytes dont plus de 90 % sont de phénotype MCTC. Ceci suggère que des facteurs autres que le SCF peuvent influencer le degré de maturation des mastocytes humains. Contrairement à ce qui a été observé chez le rongeur, l'IL-3 ne semble pas jouer de rôle majeur dans la différenciation mastocytaire humaine. Cependant, l'IL-3 peut agir en synergie avec le SCF sur la différenciation mastocytaire à partir de cellules de moelle osseuse humaine (Kirshenbaum, Goff et al. 1992) , peut-être par une stimulation de la mise en cycle de précurseurs sensibles à l'effet ultérieur du SCF (Durand, Migliaccio et al. 1994). En revanche,

l'addition d'IL-3 semble inhiber la différenciation mastocytaire de cellules mononucléées périphériques cultivées en présence de SCF. Par ailleurs, l'IL-4 est aussi impliquée dans la différenciation mastocytaire humaine car elle est capable, en association avec le SCF, d'induire la différenciation des mastocytes MCT en cellules MCTC à partir de progéniteurs de sang de cordon (Toru, Pawankar et al. 1998) (figure 14).
De nombreuses autres cytokines peuvent avoir un effet positif ou négatif sur la croissance et la différenciation des mastocytes humains.

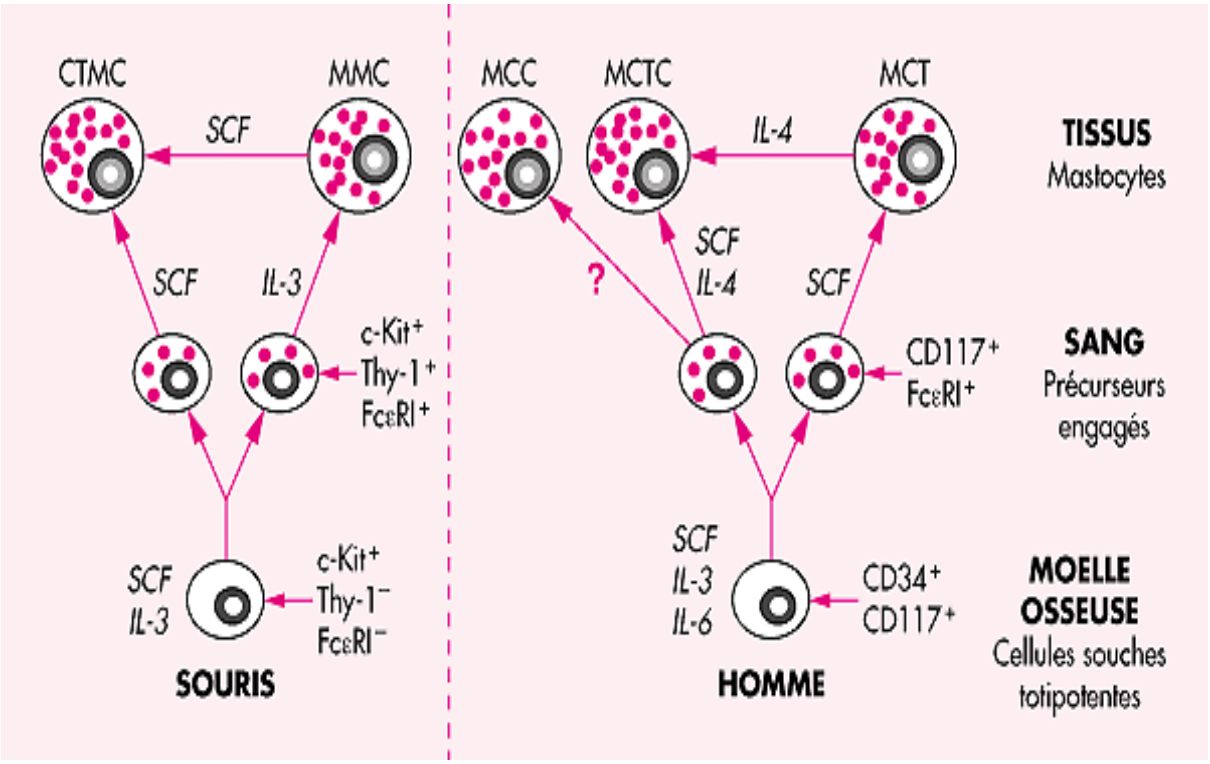


Figure 14 : La différenciation mastocytaire chez la souris et chez l'homme à partir de la cellule souche médullaire : MMC : mastocyte muqueux ; CTMC : mastocyte du tissu conjonctif ; MCC : mastocyte tryptase$^-$chymase$^+$; MCTC : mastocyte tryptase$^+$ chymase$^+$; MCT : mastocyte tryptase$^+$ chymase ; FcεRI : récepteur de haute affinité pour les IgE ; IL- : interleukine ; SCF : Stem cell factor (d'après Boissan et al, 1999).

V. Hétérogénéité du phénotype mastocytaire

Comme évoquée précédemment, la maturation des mastocytes sera influencée par une disponibilité appropriée des cytokines, des facteurs de croissance et des différents contacts établis et dépendant de leur environnement. Ainsi, en fonction de la localisation des mastocytes, la variation de ces différents stimuli aura un impact sur l'orientation de leur phénotype.

On distingue donc deux grandes catégories de mastocytes murins : les mastocytes des tissus connectifs ou conjonctifs appelés CTMC (pour connective tissue mast cell) retrouvés dans les tissus conjonctifs et dans la cavité péritonéale, et les mastocytes des muqueuses MMC (pour mucosal mast cell) retrouvés dans la muqueuse du tube digestif et des bronches. La principale différence entre ces deux sous-populations réside dans la nature de leur contenu granulaire en terme de protéoglycane et de protéases secrétées. En effet, les CTMC qui sont colorés par la safranine possèdent de l'héparine et ont une activité chymase (mMCP4, mMCP5) et tryptase (mMCP-7, mMCP6) (Metcalfe, Baram et al. 1997), alors que les MMC qui sont colorés par le bleu alcian sont riches en chondroïtine sulfate (Fukuzumi, Waki et al. 1990) et ont uniquement une activité chymase (mMCP1, mMCP2) (Wernersson and Pejler 2014). Par ailleurs, les MMC produisent d'importantes quantités de LTC_4 (leucotriène C_4) suite à une activation médiée par l'IgE tandis que les mastocytes séreux (CTMC) de la cavité péritonéale vont majoritairement produire de la prostaglandine D_2 (PGD_2) ((Barr, Koro et al. 1988)).

De manière hétérogène, on distingue aussi différentes sous-populations de mastocytes humains : les mastocytes Tryptase MC_T et Tryptase-Chymase MC_{TC} répondant tous deux à une activation via le RFcεI. Les MC_{TC} sont les seuls à exprimer le C5aR et répondent au fragment du complément C5a (Irani, Schechter et al. 1986). Par ailleurs, il existe une troisième population minoritaire ne contenant que de la chymase, connue sous le terme MCC (A., M. et al. 1990). Les granules des MC_{TC} (analogues des CTMC murins) contiennent simultanément de la chymase et de la tryptase ainsi que des carboxypeptidases et de la cathepsine G tandis que les MC_T équivalent des MMC murins ne contiennent que de la tryptase (Bradding, Okayama et al. 1995). Seules les enzymes tryptase et chymase sont spécifiques des mastocytes. La tryptase est actuellement le marqueur de choix pour identifier ces cellules car elle est présente dans tous les mastocytes (à l'exception de la très minoritaire population MCC qui ne possède que de la chymase).

	LOCALISATION	GRANULES	COLORATION	PROTEOGLYCANES	AMIN-BIOGENIC
MASTOCYTES Murins 1) Mastocytes des muqueuses MMC	Poumon, muqueuse nasale, lamina propria des intestins	MCPT1,-2	Bleu alcian +	Chondroitine sulfate	Histamine sérotonine
2) Mastocyte du tissu conjonctif CTMC	Tissus sous- muqueux : Peau et péritoine	MCPT3,-4,-5,-6 carboxypepdidase	Safranine +	Héparine	Histamine sérotonine
Mastocytes Humains 1) Mastocytes tryptase MC_T	Muqueuse intestinale, muqueuse nasale, poumon, Epithélium, lamina propria	α-β Tryptase		Héparine, chondroitine sulfate	Histamine
2) Mastocytes tryptase chymase MC_{TC}	Intestin (sous-muqueuse), Lamina propria, tissus connectifs, peau	Tryptase, chymase carboxypeptidase et cathepsine G	Safranine +	Héparine, chondroitine sulfate	Histamine

Table 3 : Phénotype et caractéristiques des mastocytes. Alors que Les MC_{TC} sont omniprésents dans la peau et la sous-muqueuse intestinale, les MC_T sont quant à eux, prédominants dans les voies aériennes normales et dans la muqueuse intestinale. On peut trouver résumées dans le tableau ci-dessous les généralités des sous-populations connues des mastocytes murins et humains. De plus, les caractéristiques des MCs murins résident donc sur leur distribution tissulaire et celle des MC humains dans leur contenu granulaire, en termes de protéases. Les mastocytes murins CTMC diffèrent des mastocytes MMC et sont colorés par la safranine à cause de la présence importante d'héparine au sein des granules (d'après Heib et al, 2007).

En marquant la tryptase, on peut identifier tous les mastocytes dans les tissus par immunohistochimie. Cette enzyme peut être mise en évidence aussi bien dans les liquides biologiques qu'au niveau de coupes tissulaires. Il s'agit d'une protéine tétramérique de 130 kDa qui est présente sous deux formes, alpha inactive et bêta active, et est stockée dans les granules cytoplasmiques sous forme d'un complexe avec l'héparine ou un autre protéoglycane (Caughey 2007). La chymase, protéine monomérique de 30 kDa, est un marqueur mastocytaire beaucoup moins utilisé, car elle n'est pas retrouvée dans toutes les populations de mastocytes, et n'est synthétisée qu'à un stade tardif de la différenciation (Table 3) (Dvorak, Morgan et al. 1993).

VI. Activation et fonctions des mastocytes

Une des principales caractéristiques du mastocyte est de présenter à sa surface des récepteurs de haute affinité pour les IgE (RFcεI) sur lesquels vont se lier des antigènes responsables de l'activation mastocytaire. Son implication dans la lutte anti-infectieuse et dans la présentation d'antigènes révèle maintenant son utilité pour l'organisme bien qu'il ait été considéré comme un élément n'ayant qu'un effet délétère sur l'organisme du fait de la fixation d'un allergène sur le RFcεI induisant une réaction allergique. Ses fonctions sont associées d'une part à la présence de récepteurs membranaires particuliers, et d'autre part à la libération de nombreux médiateurs après activation (figure 15).

A. Médiateurs mastocytaires

De manière générale, il y a une activation des mastocytes matérialisée par l'agrégation des récepteurs de haute affinité pour l'IgE (RFcεI) après fixation des IgE et de l'antigène. Cette agrégation induit brièvement l'association de la partie intracytoplasmique du récepteur à des protéines tyrosine kinases, comme syk et lyn (Benhamou, Berenstein et al. 1994), qui entraîne une cascade de signalisation conduisant à l'exocytose des granulations et à la sécrétion de cytokines (Blank 2011).

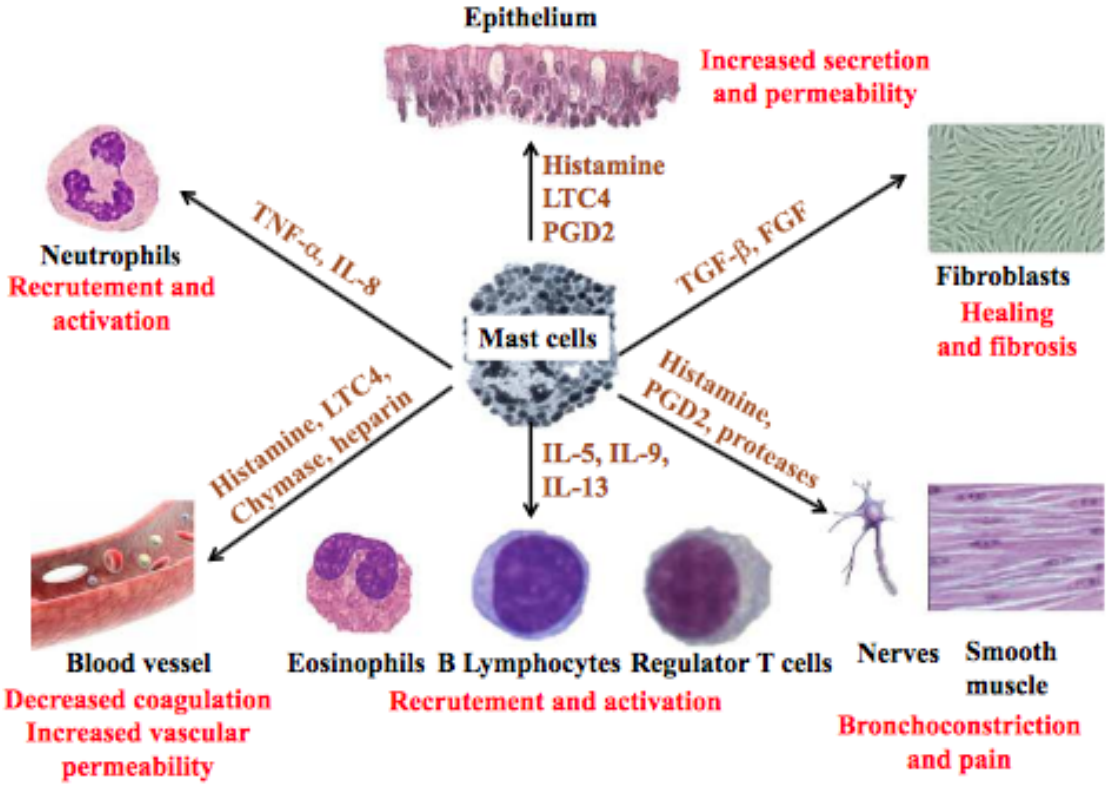


Figure 15 : Effets biologiques des médiateurs mastocytaires sur différentes cellules et sur les tissus. Le relargage immédiat de ces médiateurs est induit directement de certains symptômes cliniques rencontrés dans de nombreuses manifestations de type inflammatoires modérées et sévères telles que les réactions dites d'hypersensibilité immédiate pouvant aller jusqu'au choc anaphylactique (d'après Saleh, 2014).

Des protéases et des médiateurs d'origines variées possédant de nombreuses fonctions biologiques vont ensuite être relargués suite à cette activation des mastocytes (Persil, Wang et al. 1991). Il y aura donc des médiateurs préformés ou stockés (histamine, protéoglycanes, protéases neutres) et les médiateurs qui nécessitent une synthèse *de novo* (médiateurs lipidiques provenant du métabolisme de l'acide arachidonique dont le principal est la PGD2) (Moon, Befus et al. 2014), puis une production de chimiokines (IL-8, MCP-1, MIP-1a) et cytokines (TNF-a, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, IL-16, GM-CSF, PDGF). Ces cytokines et chimiokines synthétisées par le mastocyte activé jouent un rôle prépondérant dans le recrutement de cellules effectrices (neutrophiles, éosinophiles, lymphocytes) au niveau du site de dégranulation mastocytaire tandis que les médiateurs pré et néoformés vont avoir une action directe sur les différents tissus de l'organisme (poumon, tractus digestif, vaisseaux, kératinocytes, fibroblastes) (table 4).

1. Les médiateurs préformés

Ces molécules sont abondantes et stockées dans des granules cytoplasmiques, puis libérés immédiatement dans l'environnement en réponse à des stimuli spécifiques par le processus de dégranulation. Cette activation peut par exemple avoir lieu après l'agrégation du RFcεI au cours de laquelle il y aura une fusion des granules avec la membrane cytoplasmique puis une libération de leur contenu dans l'environnement extracellulaire en quelques minutes.

Ainsi, les granules contiennent des protéases et des amines vasoactives (l'histamine et la sérotonine qui ont une influence sur la perméabilité des vaisseaux); les métabolites de l'acide arachidonique dérivés de novo, LTC4 et PGD2 ; des protéases neutres (carboxypeptidase A (CP-A), tryptase et/ou chymase (chez l'homme), mMCPs (chez la souris) et rMCPs (chez le rat)) ; des hydrolases acides (β-hexosaminidase, β-D- galactosidase, β-glucoronidase, aryl-sulfatase, enzymes oxydantes dont la superoxyde dismutase et la peroxidase…) ; et des protéoglycanes (héparine et chondroïtine sulfate) qui forment des complexes avec l'histamine et les protéases.
En effet, lorsque l'histamine est dissociée de ses complexes ioniques, elle va se lier à ses récepteurs (H1, H2, H3, H4 des cellules immunitaires telles que le mastocyte), et exercer des effets biologiques sur la contraction des muscles lisses (H1), sur l'augmentation de la perméabilité vasculaire des cellules endothéliales (H2), sur la production du mucus ou encore sur les terminaisons nerveuses (H3). L'histamine est dégradée rapidement et donc très difficile à doser dans le sérum du fait de sa demi vie d'une minute dans le milieu extérieur.

Les serines protéases neutres telles que la tryptase, la chymase et la carboxypeptidase A ont un rôle plutôt physiopathologique car leurs effets ont été décrits dans la dégradation et le remodelage des matrices extracellulaires, la production de médiateurs pro-inflammatoires, l'activation des monocytes et macrophages, la prolifération fibroblastique et la synthèse de collagène corrélé à l'amplitude de la baisse de pression artérielle.

2. Les médiateurs lipidiques

Ils sont aussi produits par les mastocytes et comprennent les eicosanoïdes leucotriènes (LTC4) et prostaglandines (PGD2) et le facteur activant les plaquettes PAF. Le LTC4 et le PGD2 sont tous deux des bronchoconstricteurs impliqués dans l'attraction des éosinophiles et des basophiles mais le LTC4 va en plus augmenter la perméabilité vasculaire et induire la sécrétion de mucus.

3. Les cytokines et chimiokines

Les mastocytes sont une source de nombreux facteurs de croissance pro-inflammatoire (IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, IL-33, GM-CSF, TNFα.) et immunorégulateurs (IL-10, TGF-β) et de chimiokines (CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP1-α), CCL4, CCL5, CXCL8…).

Certains d'entre eux comme le tumor necrosis factor (TNF) et le fibroblast growth factor (FGF) sont associés aux granules. Le TNF par exemple va augmenter l'expression des molécules d'adhésion, augmenter la réactivité bronchique ou encore aura un effet anti-tumoral. IL-3/5/GM-CSF influence le développement et la survie des éosinophiles. L'IL-13 participe à la polarisation Th2 (induit la synthèse d'IgE), antagonise les réponses Th1, influence l'hypersécrétion de mucus, et joue un rôle dans l'environnement défavorable pour le développement des parasites.

D'une manière générale, la production de ces facteurs a lieu après activation de novo de la transcription de leur gène et quelque fois indépendamment de la dégranulation.

Types de Médiateur	Médiateurs	Effets Biologiques
Granulaires	Histamine et sérotonine	Altèrent la perméabilité vasculaire
	Héparine- et/ou chondroïtine-sulfates	Amplifient les fonctions des cytokines et/ou des chimiokines et l'angiogenèse
	Tryptase, chymase, carboxypeptidase et autres	Protéases neutres, remodelage des tissus et recrutement des cellules effectrices
	TNFα, VEGF et FGF2	Recrutement des cellules effectrices et amplification de l'angiogenèse
Dérivés lipidiques	LTC4, LTB4, PGD2 et PGE2	Recrutement des cellules effectrices, régulation des réponses immunitaires, et promotion de l'angiogenèse, des oedèmes et de la bronchoconstriction
	PAF (facteur d'activation des plaquettes)	Active les cellules effectrices, amplifie l'angiogenèse et induit une inflammation physiologique
CYTOKINES	TNFα, IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-18, GM-CSF, LIF, IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-15 et IL-16 / IL-12 et IFN-γ / IL-10, TGF-β et VEGF	IFN-α et IFN-β Induisent une inflammation / Ont des fonctions de cytokines de type T helper 2(Th2) / Ont des fonctions de cytokines de type T helper 1 (Th1) / Régulent l'inflammation et l'angiogenèse
CHIMIOKINES	CCL2, CCL3 (=MIP-1α), CCL4, CCL5, CCL11 et CCL20 / MIP-1β, I-309, MCP-1, RANTES, IL-8, CXCL1, CXCL2, CXCL8, CXCL9, CXCL10 et CXCL11	Recrutent les cellules effectrices dont les cellules dendritiques, et régulent les réponses immunitaires / Recrutent les cellules effectrices et régulent les réponses immunitaires
AUTRES	Monoxyde d'azote (NO) et radicaux superoxydes Bactéricides et/ou myorelaxants /Peptides antimicrobiens	Recrutent les cellules effectrices et régulent les réponses immunitaires / Bactéricides

Table 4 : Principales classes de médiateurs libérés par les mastocytes. *CC*L, CC-chemokine ligand; CXCL, CXC-chemokine ligand; FGF2, fibroblast growth factor 2; GM-CSF, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor; IFN, interferon; IL, interleukin; LIF, leukaemia inhibitory factor; LTB4, leukotriene B4; LTC4, leukotriene C4; PGD2, prostaglandin D2; PGE2, prostaglandin E2; TGF-β, transforming growthfactor-β; TNF, tumor-necrosis factor; VEGF, vascular endothelial growth factor. D'après Marshall J.S., Nature Review Immunology 2004, vol.4, p 787 et Church M.K., and Sampson A.P. (2003). Mast cell-derived mediators.

VII. Modèles d'études des mastocytes

Au cours de ces dernières décennies, l'incidence des allergies et des maladies auto-immunes a considérablement augmenté, ce qui nécessite une meilleure compréhension des processus immunopathologiques cellulaires et moléculaires à l'origine de ces maladies.

Par exemple, il a été rapporté que de l'activation des mastocytes par les immunoglobulines IgE joue un rôle clé non seulement dans les allergies IgE-dépendantes mais aussi, dans les modèles de maladies murines auto immun aussi bien chez l'homme (Gothis-graham (Ian and Patrick 1997) que chez la souris et d'encéphalite ((Sayed, Christy et al. 2010); (Sayed, Walker et al. 2011)) associées aux immunoglobulines, nécessitant ainsi une meilleure compréhension de la biologie des mastocytes.

De par son rôle de sentinelle, le mastocyte lors de son activation peut stimuler de nombreuses cellules immunitaires ainsi que toutes les cellules présentes dans son environnement. L'étude des mastocytes *in vivo* est donc essentielle afin de comprendre leur rôle remis dans un contexte physiologique. De nombreux modèles de souris ont donc été créés au fil des années afin de répondre aux questions concernant le rôle des mastocytes dans un contexte particulier. Le système immunitaire de la souris étant proche de celui de l'homme (et le mastocyte faisant partie du système immunitaire), la technologie et l'éthique permettant de modifier le génome de ces animaux, la souris a donc été un outil de choix pour créer des modèles d'organisme génétiquement modifié. (Grimbaldeston, Chen et al. 2005).

Ces modèles important pour l'étude de la physiologie et des physiopathologies associées aux MCs, permettent de rendre compte de la fonction des mastocytes, mais présentent tout de même de nombreuses limitations d'utilisation notamment dans les études d'interaction cellulaire et moléculaire comme indiqué dans la figure ci-après (Table 5).

Déficience	souris	limitation
Constitutive	• W/W^{v} • W^{SH}/W^{SH}	• Neutropénie • Neutrophilie
	• Mcpt5-Cre ; R-DTA	• Présence des MMCs
	• Cre-Master Cpa^{CRE}	• Cpa3 exprimée par d'autres cellules • Basopénie • Cpa3 exprimée par d'autres cellules
	• Hello Kitty Cpa3-cre ; MCl-1	• Basopénie
induite	• Mcpt5-Cre ; iDTR	• Présence des MMcs
	• Mas-TRECK	• Basopénie

Table 5: Modèles d'études murines pour l'étude des fonctions des mastocytes. De nouvelles souches de souris mutantes présentant des déficiences constitutives marquées dans les MC ont été rapportées

Afin de palier à ces différentes limitations d'utilisation dans l'analyse des états inflammatoires aigus, qui impliquent notamment d'autres cellules immunitaires innées et des altérations (telles qu'une réduction partielle du nombre de basophiles dans certains modèles murins), un modèle de souris Knock-in appelé RMB (Red Mast cells and Basophils) sans anomalies hématopoïétiques accidentelles permettant l'ablation conditionnelle des mastocytes et des basophiles a été développé par l'équipe. Sous le contrôle du promoteur de la chaîne β du RFcεI, a été cloné le récepteur humain à la toxine diphtérique (hDTR) et la protéine fluorescente rouge

dT-tomato (tdT). Lorsque la transcription du gène codant pour la chaîne β du RFcεI est induite, l'expression des 3 protéines indépendantes (chaîneβ, hDTR et tdT) l'est aussi. La chaîne β du RFcεI étant spécifiquement exprimée par les mastocytes et les basophiles, on peut suivre les MCs et les basophiles sur la base de leur fluorescence rouge et on peut dépléter ces 2 types cellulaires sans induire d'anomalies hématopoïétiques en injectant de la toxine diphtérique (Dahdah, Gautier et al. 2014).

Comme indiqué précédemment, les modèles déficients en MC ont de nombreuses limites. Différents modèles *in vivo* de déficience en mastocyte existent ainsi, notamment les souris Kit-Wv présentant une mutation dans le domaine tyrosine kinase du c-kit réduisant son activité (Yoshinaga, Nishikawa et al. 1991) . Les souris Kit-W-sh, ont, quant à elles, une mutation d'inversion qui affecte la régulation transcriptionnelle du gène c-kit (L Nagle, Martin-Deleon et al. 1994); (Nigrovic, Gray et al. 2008). D'autres souris Kit-^{W} , présentent une mutation du c-kit qui n'est pas exprimée à la surface cellulaire car il est tronqué (Manova, Nocka et al. 1990). Puisqu'il existe des mutations du récepteur c-kit chez ces souris, elles vont présenter certaines anomalies biologiques affectant les cellules du système immunitaire et non immunitaires qui expriment ce récepteur (Chen, Grimbaldeston et al. 2005) ; (Piliponsky, Chen et al. 2010) ; (Zhou, Xing et al. 2007) ; (A. and R. 1969) Chervenick Paul A., Boggs Dane R; (Nigrovic, Gray et al. 2008).

On retrouve aussi des modèles de rat *in vivo* comme le rat Kit$^{W\text{-}s/W\text{-}s}$. Laurent L. Reber, Thomas Marichal et Stephen J.Galli passent en revue chaque modèle de souris déficientes en mastocyte de manière complète tout en concluant que les modèles déficients en mastocyte n'ont pas aidé à évaluer en détail le rôle des mastocytes dans différents types de maladies, principalement parce que ces modèles présentaient des caractéristiques phénotypiques biologiquement distinctes, qui induisaient des interprétations biaisées dans une majorité d'études (Reber, Marichal et al. 2012).

In vitro, un bon modèle de mastocytes doit être représentatif des mastocytes de tissus matures et différenciés, puis répondre non seulement aux IgE, mais aussi aux IgG. Ainsi on distingue les lignées cellulaires et les cultures primaires des mastocytes dérivés, par exemple, de la moelle osseuse (BMMC) qui sont obtenus à partir des cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse de souris ((Razin, Cordon-Cardo et al. 1981)) ou de rat (Haig, McMenamin et al. 1988).

La lignée RBL-2H3, « Rat Basophilic Leukemia clone 2H3 », est une lignée tumorale adhérente mastocytaire de rat (Barsumian (L., Chaviva et al. 1981), permettant l'étude de la signalisation mastocytaire médiée par le RFcεI. Même s'il s'agit d'un modèle stable du fait du phénotype muqueux de ces cellules inchangées au cours du temps, il présente une limite d'utilisation à cause de leur caractère tumoral.

Par ailleurs, les souris fournissent aussi de puissants outils d'analyse, leurs mastocytes permettant en effet de disséquer les mécanismes moléculaires impliqués dans la génération de réponses pathologiques.
Un des modèles le plus fréquemment utilisé dans la littérature aujourd'hui est la différenciation après 4 semaines de cellules progénitrices issues de moelle osseuse en mastocytes (BMMC pour « bone marrow derived mast cells ») en présence d'IL-3 et/ou SCF. Ces BMMC présentent une taille supérieure à celle des MC *in vivo* et un phénotype plutôt immature et de type muqueux (Razin, Cordon-Cardo et al. 1981). Les avantages de cette culture sont le très grand nombre de mastocytes obtenus après 4 semaines et la durée d'utilisation de ces cellules (culture jusqu'à 10 semaines).

La culture de cellules issues de la cavité péritonéale en présence d'IL-3 et de SCF, permet de produire des dérivés de progéniteurs mastocytaires du péritoine des souris qui présentent un phénotype de type séreux et plus mature que les BMMC. L'avantage de cette culture est d'obtenir un mastocyte beaucoup plus proche du phénotype observé in *vivo* mais le nombre obtenu est beaucoup plus faible que celui obtenu pour les BMMC.
Ces modèles de culture *in vitro* permettent d'étudier les interactions entre mastocytes et cellules effectrices (Gaudenzio, Espagnolle et al. 2009) semblent aussi être un meilleur modèle *in vitro* pour comprendre le rôle du MC dans les réactions IgE et IgG-dépendantes (Malbec, Roget et al. 2007) et permettent de reconstituer le compartiment mastocytaire par injection intrapéritonéale ou intraveineuse dans des souris déficientes en mastocytes.

Chez l'homme, en raison de la difficulté pour obtenir des quantités suffisantes de tissus primaires pour extraire les mastocytes, des chercheurs ont réussi à établir des lignées cellulaires mastocytaires tumorales humaines (LAD-2 (lignée dérivée de la moelle osseuse d'un patient atteint d'un sarcome mastocytaire), HMC-1 (lignée immature et n'exprimant pas le RFcεI avec une culture indépendante de facteur de croissance), ROSA (exprimant le RFcεI fonctionnel et le c-KIT, avec une dépendance du SCF, un temps de doublement rapide en culture et un phénotype proche du phénotype sauvage,...)(Kirshenbaum, Akin et al. 2003) ; (Butterfield, Marcoux et al. 1988) ; (Saleh, Wedeh et al. 2014)et al., 2014). Mais ces lignées proviennent souvent de patients présentant des anomalies ou mutations dans les mastocytes ce qui empêche une étude de la biologie normale du mastocyte. Malgré cela, on peut tout de même isoler des MCs humain à partir des cellules primaires dérivées de moelle osseuse (hBMMC), de sang de cordon (CBMC) ou encore de sang périphérique (PBMC) cultivé en présence de SCF et d'IL-3(Butterfield, Marcoux et al. 1988).

VIII. Les mastocytes dans l'immunité

A. Rôle dans l'immunité innée et acquise

L'activation du mastocyte induit une production et une sécrétion de nombreux médiateurs qui peuvent activer les cellules leucocytaires présentes dans les tissus ou dans le site d'inflammation. Les cellules activées vont ensuite à leur tour sécréter des cytokines pro-inflammatoires déclenchant alors un processus inflammatoire local qui peut s'étendre car maintenu par les cytokines libérées par le mastocyte. Les conséquences fonctionnelles de cette activation sont l'élimination du pathogène (par ex. par phagocytose) et/ou la réparation de la lésion (remodelage de la matrice extracellulaire).
En plus de leur implication dans les processus de croissance des vaisseaux sanguins (Ribatti, De Falco et al. 2003), de réparation (Artuc, Muscha Steckelings et al. 2002) et de cicatrisation (Maltby, Khazaie et al. 2009) *via* la sécrétion de facteurs de croissance tels que le FGF2, le VEGF, le TGF-β, l'IL-8, l'histamine, l'héparine et l'angiopoiétine, les MCs ont aussi un rôle immunorégulateur contrôlant l'amplitude et la durée de la réponse immunitaire. De par leurs fonctions protectrices, ce sont donc des sentinelles à l'interface entre organisme et environnement, garant de la défense antibactérienne et antiparasitaire (figure 16).

Le rôle des mastocytes dans la réaction inflammatoire chronique ou dans la phase tardive a aussi été démontré à travers des « cascades mastocytes-leucocytes-cytokines » impliquées dans les processus inflammatoires (Galli S. J.Costa J. J.(J. and J. 1995)). En effet, après une infection bactérienne par exemple, les médiateurs tels que le TNF-α, MIP-2 (« macrophage inflammatory protein 2 ») et le KC (murine « keratinocyte-derived protein chemokine ») sécrétés par dégranulation vont faciliter le recrutement des neutrophiles, éosinophiles et autres lymphocytes par chimiotactisme. Mais ces trois cytokines régulent l'adhérence des leucocytes à l'endothélium, la migration transendothéliale et, enfin, la localisation tissulaire en contrôlant l'activité des ligands endothéliaux comme ICAM-1, VCAM-1, E-sélectine et de leurs récepteurs leucocytaires. En effet, la P-sélectine est rapidement exprimée sur les cellules endothéliales après exposition à l'histamine, aux leucotriènes B4 et D4.

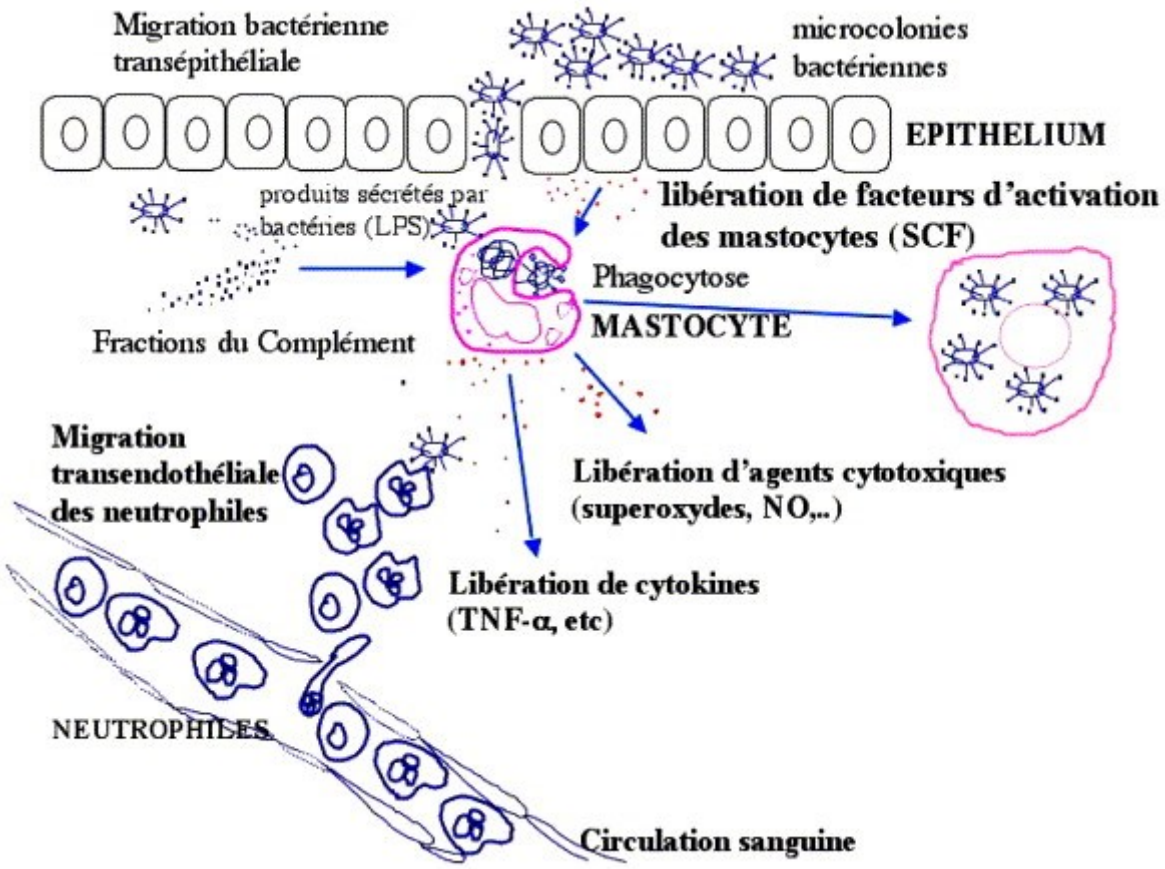


Figure 16 : Principaux mécanismes d'intervention du mastocyte au cours de l'immunité antibactérienne. Les mastocytes interagissent avec les bactéries pour la défense de l'hôte en secrétant des agents bactéricides et des cytokines permettant la communication avec les autres cellules (d'après (Arock 2004)).

Par ailleurs, des fonctions purement immunitaires sont attribuées aux mastocytes. À titre d'exemple, les mastocytes de rongeur sont capables de présenter l'antigène aux cellules T spécifiques et, en l'absence de lymphocytes T, d'activer les cellules B (Frandji, Oskéritzian et al. 1993). Le mastocyte, comme le macrophage, peut internaliser des protéines antigéniques, les dégrader en petits peptides immunogènes, présenter ces petits peptides en association avec une molécule du CMH aux cellules T ce qui lui confère une fonction de cellule présentatrice d'antigènes (Frandji, Tkaczyk et al. 1995). Ceci est rendu possible grâce à l'IL-4 ou l'interféron-γ qui régulent l'expression des molécules du CMH et des molécules de co-stimulation du mastocyte (Frandji, Tkaczyk et al. 1996). Cela induit donc l'activation de ces lymphocytes T et leur sécrétion d'interleukines (IL-4, IL-5, IL-6) qui, à leur tour, stimulent les cellules B responsables de la production d'anticorps. Il s'agit donc d'une coopération tripartite (mastocyte-cellule T-cellule B). Chez l'homme, il n'a pas encore été démontré que les mastocytes puissent présenter l'antigène comme le font les mastocytes de rongeur.

B. Rôle en physiopathologie

Il est aujourd'hui indéniable que la suractivation des MCs associée à des facteurs extrinsèques, et en particulier celle médiée par l'IgE, peut causer des désordres sévères menaçant l'intégrité du système immunitaire (figure 17). En effet, ces cellules jouent un rôle central dans l'asthme, l'eczéma, le prurit (de diverses causes), la rhinite allergique et la conjonctivite allergique (La Rosa, Lionetti et al. 2013). Les anti-histaminiques agissent en bloquant l'action de l'histamine sur les terminaisons nerveuses. Les médicaments à base de cromoglicate (cromoglicate de sodium, nédocromil) bloquent un canal calcique essentiel à la dégranulation des mastocytes, stabilisant la cellule et empêchant la libération d'histamine et de médiateurs associés (Finn D F Walsh J J (F and J 2013). Les antagonistes des leucotriènes (tels que le montélukast et le zafirlukast) bloquent l'action des médiateurs des leucotriènes et sont de plus en plus utilisés dans les maladies allergiques (Galli and Tsai 2012).

Les réactions d'hypersensibilités sont classées de I à IV sur la base des mécanismes impliqués et des délais de réaction Les mastocytes sont connus comme des médiateurs de réactions allergiques de type I dites d'hypersensibilité immédiate en libérant de l'histamine, des tryptases, des chymases, du TNF, du PGD2 et du leucotriène B4 (LTB4). Par conséquent, ils vont induire une réponse immune excessive et inadaptée contre des agents sensibilisant ou des traumatismes physiques qui provoquant leur activation (Manfred and Martin 2009).
Cette fonction est devenue évidente grâce aux données montrant que les mastocytes sont la source centrale d'histamine et de leucotriènes libérés lors de la signalisation des IgE par le RFceRI ((Galli, Tsai et al. 2008),(Galli 2000), (Yamaguchi, Sayama et al. 1999)). Les réactions d'hypersensibilité de type immédiat (type I) sont principalement médiées par des antigènes protéiques se liant aux anticorps IgE qui se fixe aux mastocytes à travers la partie Fc comme les mastocytes sont la principale population tissulaire exprimant le RFce1, récepteur de haute affinité pour les IgE précédemment décrit.

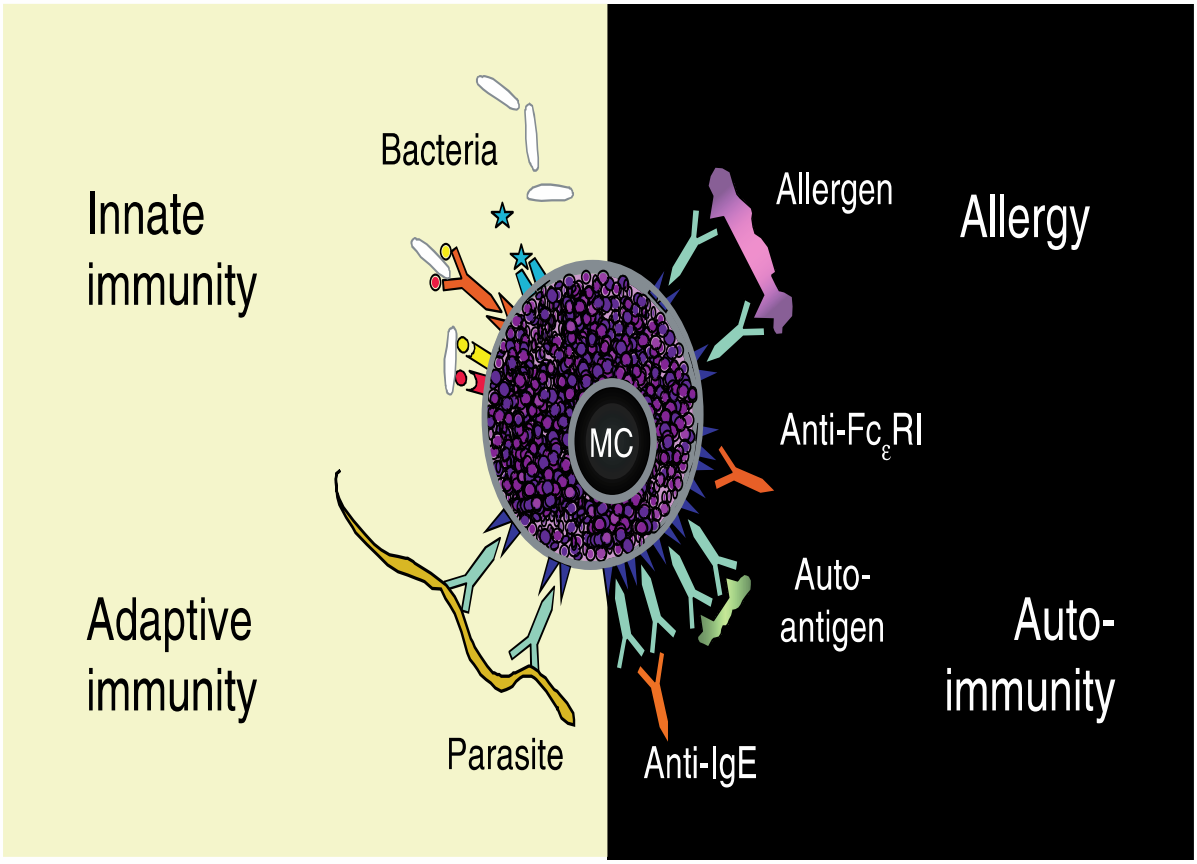


Figure 17 : Mastocytes - le bon et le mauvais côté. Les MC peuvent être préjudiciables à l'allergie (par exemple choc anaphylactique) et à l'auto-immunité (par exemple l'arthrite auto-immune) mais ont également des rôles bénéfiques dans les infections innées (par exemple bactériennes) et adaptatives (infections parasites). MC, mastocyte ; RFcεI, récepteur d'IgE de haute affinité (d'après (Marcus and Martin 2005)).

Suite à la liaison de l'antigène correspondant à l'IgE, il y aura un engagement sur le RFceI des mastocytes entraînant la libération de médiateurs préformés dérivés de l'histamine et des lipides (PGD2 et LTB4) qui provoquent les symptômes aigus de réactions immunitaires avec des phases comprenant la vasodilatation, l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la contraction du muscle lisse bronchique, la sécrétion de mucus, l'éternuement, le prurit ou la toux ((Gibson, Allen et al. 1993). La libération systémique rapide d'histamine, de PGD2 ou de LTB4 est également responsable de la plupart des pathologies associées à l'anaphylaxie. De plus, les mastocytes libèrent rapidement dans les minutes suivant son à l'interaction avec les IgE, une large gamme de glycoprotéines et de médiateurs nouvellement synthétisés. Ces médiateurs déclenchent également les réactions dites de phase tardive qui se développent généralement entre 2 et 6 heures après l'exposition aux allergènes et atteignent un pic après 6-9 heures ((Galli, Tsai et al. 2008)).

Comme l'histamine provoque une vasodilatation, des antihistaminiques ont été développés pour empêcher la libération d'histamine. Le but de ces composés est d'éviter les réactions allergiques, la rhinite allergique et souvent aussi l'urticaire. Les antihistaminiques peuvent aussi améliorer la constriction bronchique ou la vasodilatation lors de réactions allergiques de type immédiat (Baroody F. M(M. and M. 2000)).

Dans l'anaphylaxie (une réaction systémique grave aux allergènes d'origine alimentaire comme les noix, environnementale comme les piqûres d'abeilles ou médicamenteuse), la dégranulation des mastocytes à l'échelle du corps entraîne une vasodilatation et, si elle est sévère, des symptômes de choc potentiellement mortels (Charles A. Janeway and Medzhitov 2002). Les mastocytes ont été impliqués dans des maladies auto-immunes avec le recrutement de cellules inflammatoires dans les articulations (par exemple la polyarthrite rhumatoïde) et dans la peau (par exemple, la pemphigoïde bulleuse) et cette activité dépend des anticorps et des composants du complément (Fang, Zhang et al. 2018). Les mastocytes sont présents dans l'endomètre, avec une activation accrue et la libération de médiateurs dans l'endométriose (Menzies, Shepherd et al. 2011). Chez les mâles, les mastocytes sont présents dans les testicules et sont augmentés en oligo- et azoospermie avec les médiateurs des mastocytes supprimant directement la motilité des spermatozoïdes d'une manière potentiellement réversible (Yamanaka, Fujisawa et al. 2000).
De plus, la détection de médiateurs mastocytaires et la présence d'IgE spécifiques associés aux pathologies cutanées d'origine immunitaire telles que la sclérodermie, la dermatite atopique ou encore la maladie chronique du greffon contre l'hôte ont permis de comprendre la contribution importante du mastocyte dans la pathogenèse de ces affections cutanées (Navi, Saegusa et al. 2007) (figure 18).

Concernant les pathologies liées aux facteurs intrinsèques des MCs, il a été décrit deux principales formes : la mastocytose, où le corps produit trop de mastocytes, et le syndrome d'activation mastocytaire (MCAS), où le nombre de mastocytes est normal mais où ceux-ci sont activés de manière incontrôlée et libèrent leurs médiateurs chimiques. Ces médiateurs sont à l'origine de multiples symptômes imprévisibles chez les enfants et les adultes, comprenant des éruptions cutanées, des bouffées congestives, des douleurs abdominales, des ballonnements, des nausées, des vomissements, des maux de tête, des douleurs osseuses et des lésions squelettiques et une anaphylaxie. Les déclencheurs peuvent être chaleur, le froid, le stress (physique ou émotionnel), les parfums ou les odeurs, les médicaments, les piqûres d'insectes et les aliments. Les anti-histaminiques, des stabilisateurs de mastocytes et des inhibiteurs de leucotriènes permettent d'atténuer ces manifestations cliniques, tandis que l'anaphylaxie est une urgence médicale nécessitant l'administration d'épinéphrine. La mastocytose peut affecter la peau et les organes internes tels que la moelle osseuse, le tractus gastro-intestinal, le foie et la rate.

La plupart des patients atteints de mastocytose ont des formes systémiques cutanées ou indolentes (bénignes), conduisant à des cancers et pouvant donc nécessiter une chimiothérapie.

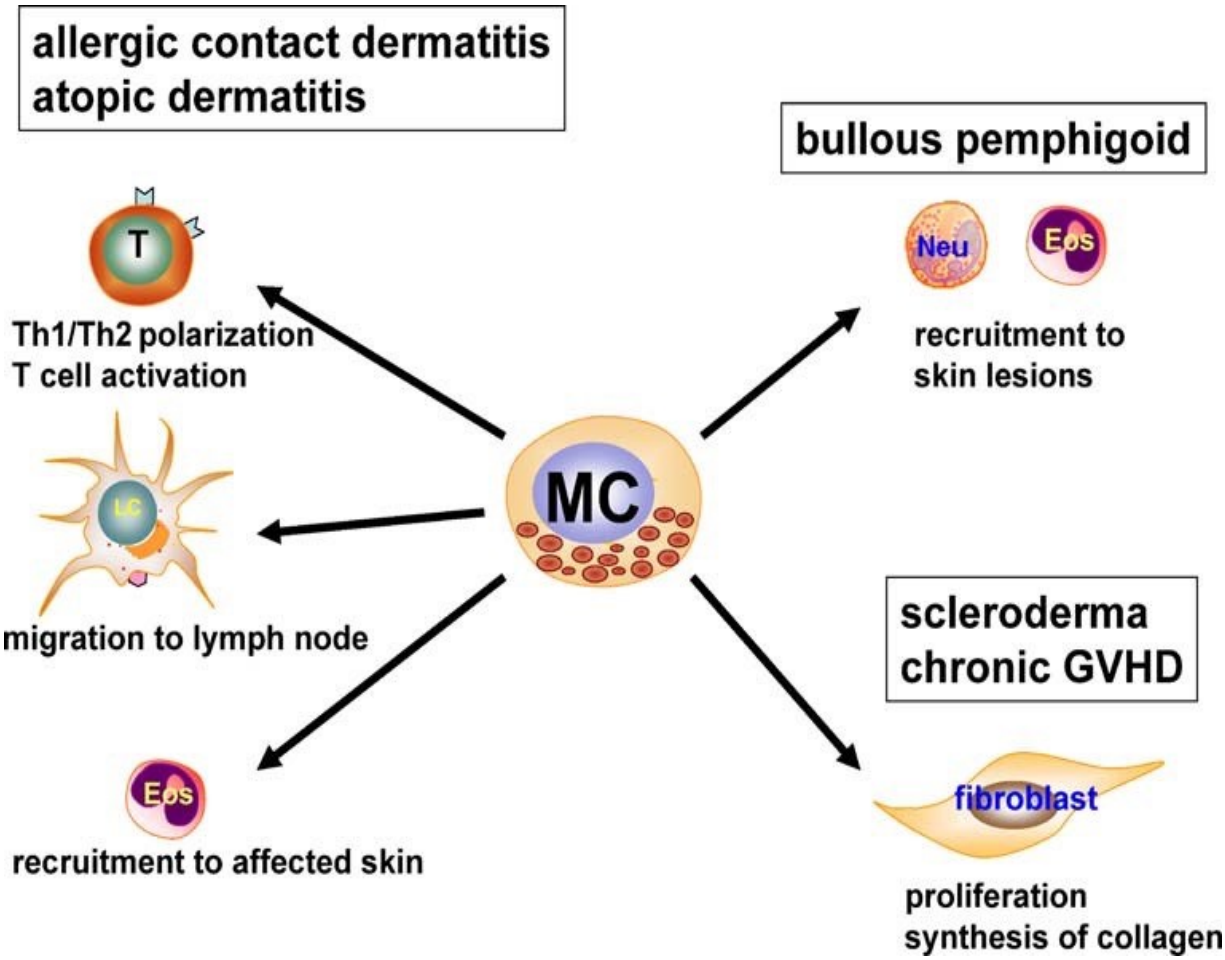


Figure 18 : Rôle des mastocytes dans les maladies cutanées immunologiques. Les mastocytes sont augmentés en nombre et subissent une dégranulation dans la dermatite de contact, la dermatite atopique, la maladie immunobulleuse, la sclérodermie et la cGVHD. Cette activation (libération de cytokines/chimiokines) induit la polarisation Th1 / Th2, l'activation des cellules T, à la migration des cellules de Langerhans vers les ganglions lymphatiques et au recrutement d'éosinophiles sur la peau lésionnelle lors de dermatite de contact allergique ou de dermatite atopique. Dans le cas de la sclérodermie en plaque et de la cGVHD, les mastocytes activent les fibroblastes conduisant à leur prolifération et la production de collagène. Dans le cas de pemphigoide bulleux, les mastocytes induisent le recrutement d'éosinophiles et neutrophiles (d'après (Navi, Saegusa et al. 2007)).

Nous avons donc résumé quelques fonctions des MCs en nous basant sur la littérature (Table 6). Ils sont impliqués dans les mécanismes inflammatoires associés à l'asthme, à l'hypersensibilité de contact, aux infections bactériennes et parasitaires sélectives, à la dégradation des toxines et de l'endothéline, au rejet de greffe, aux brûlures et à certaines pathologies vasculaires. Les MCs sont à la fois protecteurs (comme dans la dégradation des toxines ou la défense anti-bactérienne) et dangereux (comme dans l'anaphylaxie ou l'inflammation exacerbée des brûlures) mais l'étendue de leurs nombreuses fonctions dans l'immunité innée et adaptative, ainsi que dans l'auto-immunité, les maladies métaboliques immunitaires, et dans de nombreux autres domaines reste actuellement complexe et doit être déterminée et comprise.

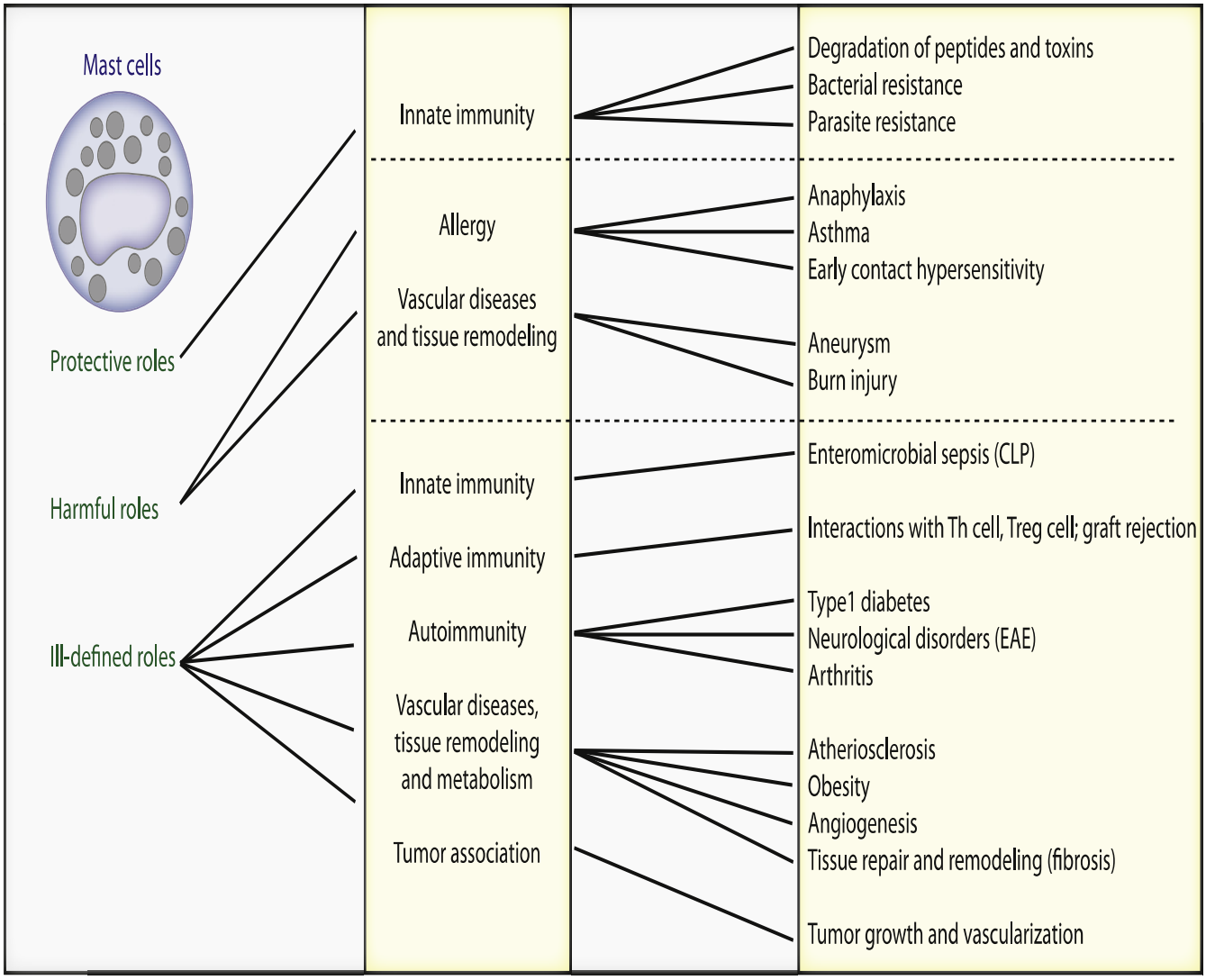


Table 6 : Diversité et base expérimentale des fonctions supposées des mastocytes dans le système immunitaire et au-delà. Les fonctions des mastocytes sont classées en « protecteurs », « nocifs » et « mal définis ». (D'après (Rodewald and Feyerabend 2012))

C. La dualité du mastocyte tantôt protecteur tantôt néfaste suivant son activation (exemple du sepsis)

La conclusion selon laquelle les mastocytes jouent un rôle protecteur critique dans le modèle CLP (La ligature et la perforation du caecum, un modèle aigu de septicémie largement utilisé pour évaluer le rôle spécifique des cellules innées dans le développement des stades précoces de l'inflammation), était initialement basée sur des expériences chez des souris $Kit^{W / Wv}$ (Echtenacher, Männel et al. 1996). Cependant, une étude utilisant $Kit^{W / Wv}$ et $Kit^{W\text{-}sh / W\text{-}sh}$ a révélé une image plus complexe: en fonction du fond génétique de la souris, de la nature de la mutation entraînant une déficience en mastocytes, et du type et de la gravité de l'infection, les mastocytes peuvent ne pas favoriser la survie voire même augmenter la mortalité (Piliponsky, Chen et al. 2010). C'est d'ailleurs dans ce sens que le laboratoire d'accueil en utilisant le modèle de souris RMB avait démontré que les mastocytes inhibent rapidement la capacité phagocytaire des macrophages résidents et donc contrôlent les stades précoces de l'infection. Cet effet nocif est médié par la libération d'IL-4 préformée dès 15 minutes après la stimulation bactérienne TLR4-dépendante des mastocytes ce qui a des effets néfastes sur la survie en cas de sepsis sévère (Dahdah, Gautier et al. 2014).

Cependant, l'importance du mastocyte comme régulateur de l'homéostasie lors de réponses immunitaires innées ou adaptatives particulières, et l'identification des facteurs qui recrutent les mastocytes du côté obscur dans les interactions entre l'hôte et son environnement, ne représentent que quelques-unes des nombreuses questions concernant la fonction des mastocytes en physiopathologie qui restent à traiter.

Chapitre 3 : Immunologie de la transplantation d'organe : l'allorejet de greffe de peau

I. Généralités

Le dernier moyen de corriger le dysfonctionnement d'un organe tel que peau, rein, foie, cœur, poumon ou pancréas, est la transplantation. La transplantation permet donc de transférer des cellules, des tissus ou des organes d'un individu à un autre. Cependant, le greffon provenant d'un autre individu, le corps reconnait ces cellules greffées comme du non soi/un élément étranger et la réaction immunitaire peut être délétère. C'est ce qui se produit par exemple dans le cadre du rejet de greffe où l'organe greffé est attaqué par le système immunitaire. Cette activation du système immunitaire du receveur conduisant au rejet de l'organe greffé est l'obstacle majeur en transplantation malgré les traitements immunosuppresseurs actuellement utilisés en clinique. Ces traitements à vie qui inhibent efficacement le rejet réduisant ainsi l'activation du système immunitaire dans sa globalité sont longs, lents, lourds et ne sont pas sans conséquence car ils augmentent la sensibilité des patients aux infections opportunistes et à la survenue ou la réactivation de tumeurs.

La compréhension de ces mécanismes est importante, car elle aide à mieux cerner les caractéristiques cliniques du rejet et, par conséquent, à poser un diagnostic précoce et à administrer un traitement approprié. La connaissance de ces mécanismes et leur contrôle est également essentielle pour développer des stratégies visant à minimiser le rejet et à développer de nouveaux médicaments et traitements qui atténuent les attaques par le système immunitaire des organes transplantés, assurant ainsi une survie plus longue de ces organes.

II. Historique de l'allogreffe des organes solides

A l'origine, bien avant le XVI^{e} siècle, la transplantation n'est qu'une simple curiosité chirurgicale qui deviendra au fil du temps grâce aux expériences de greffes sur l'animal d'Abraham Trembley (1779), une démarche scientifique permettant de développer de nouvelles techniques pour soigner. Mais, l'incapacité des chirurgiens de l'époque à suturer de façon durable les vaisseaux sanguins des organes greffés et ceux des receveurs demeurent longtemps l'une des

problématiques majeures encore insurmontables. En 1901, le Dr Landsteiner décrit le système des groupes érythrocytaires ABO. En 1902, les Dr Ulman à Vienne et Carrel à Lyon définissent les bases de la chirurgie vasculaire et réalisent les premières autogreffes en transférant un rein chez un même animal. Mais tous deux constatent rapidement l'impossibilité de réaliser des allogreffes d'un animal à l'autre. Il devient alors évident que d'autres mécanismes interviennent (Carrel 1908). Et malgré les avancées chirurgicales qui rendent techniquement possible la greffe d'organe, son évolution reste figée pendant un demi-siècle en raison d'une progression plus lente de la recherche fondamentale et du contexte mondial des années 40 (Carrel 1910). En 1944, le Dr Medawar montre que des greffes de peau cadavérique appliquées successivement sur les brûlures des blessés de guerre sont rejetées de plus en plus rapidement après chaque chirurgie. Puis, ses expériences chez le lapin, lui permettent d'expliquer ce rejet accéléré par un mécanisme de mémorisation par l'organisme des tissus du receveur montrant ainsi que le rejet de l'allogreffe cutanée est une réponse de l'hôte contre la greffe (Medawar (Billingham, Brent et al. 2003, Billingham, Brent et al. 2010). Le Dr Mitchison a démontré plus tard les caractéristiques à médiation cellulaire de cette réponse et par la suite, le Dr Burnet énonce la théorie de la sélection clonale en décrivant des anticorps spécifiques produits en réponse à une stimulation par une substance étrangère à l'organisme définie comme l'antigène. Le rejet est donc expliqué par le fait que les allogreffes se comportent comme un antigène (Snell and Stevens 1961). En 1952, le Dr Jean Dausset énonce le principe d'identité tissulaire (prix Nobel de médecine en 1980) en découvrant le système HLA (human leucocyte antigen) dont le rôle et les différents groupes (HLA-A, -B et -C chez l'homme, H2-K, -D et -L chez la souris) seront établis en 1958 (Dausset and Brecy 1957). C'est donc à partir de cela que Joseph E. Murray en 1954 à Boston réalise et réussi la première greffe identique d'un rein humain entre deux jumeaux homozygotes (Starzl 1993); (Billingham, Brent et al. 2003).

Afin d'obtenir une survie prolongée des allogreffes, les chercheurs s'investissent vers un moyen de rompre la barrière immunitaire. En 1953, les Dr Medawar, Brent et Billingham (Joffre, Santolaria et al. 2007) parviennent à induire une tolérance en injectant des cellules de rate immunologiquement immatures chez des souris à leur naissance. Des greffes de peau ensuite réalisées chez les mêmes souris à partir du même donneur survivent indéfiniment. D'autre part, en 1959 Hitchings et Elion marquent le début du traitement immunosuppresseur en développant le premier traitement anti-mitotique, la 6-Mercapto-Purine (6 MP). Ce traitement induit une tolérance aux allogreffes de peau chez l'animal, et des essais pré-cliniques extensifs chez le chien révèlent un meilleur succès des greffes de rein chez ce dernier mais sont un échec chez l'homme malgré l'association avec d'autres anti-mitotiques (Merrill, Harrison et al. 1956).

Cependant, en 1961, René Kuss, à Paris, associe la 6 MP à un protocole d'irradiation allégée et obtient la première survie à un an d'une allogreffe rénale sans identité tissulaire (Hamburger,

Vaysse et al. 1962). La grande avancée clinique viendra en 1963 lorsque Starzl réussi la première greffe de foie en établissant à Denver un protocole d'immunosuppression basé sur l'association de corticoïdes et de 6 MP (Murray, Merrill et al. 1963); (Starzl, Marchioro et al. 1963). Il propose un traitement d'induction par bolus de corticoïdes à fortes doses pendant les premiers jours afin de traiter le rejet aigu. Il publie les résultats d'une série de 22 patients transplantés rénaux qui représentent les premiers cas consécutifs de survie à long terme d'allogreffes rénales. Puis, au cours des 20 années suivantes, ce protocole d'immunosuppression sera appliqué par toutes les équipes de transplantation (Herman and Rado 1966)
En s'aidant des travaux de Shumway à San Francisco, le 3 décembre 1967, Christian Barnard étonne le monde par la première greffe de l'organe le plus symbolique : le cœur (Barnard 1967). L'année suivante, E. Donnall Thomas réalise la première greffe de moelle osseuse réussie (Starzl, Groth et al. 1968).

Les années 70 connaissent une avancée dans le domaine de l'immunosuppression avec la découverte des vertus immunosuppressives de la ciclosporine A par Borel (Starzl, Koep et al. 1980). En effet, Morris utilise la ciclosporine A lors d'une greffe de cœur et de rein sur l'animal en 1979. Le taux de survie des greffons augmente en 5 ans de 40 à 75%. Les bases de la transplantation moderne sont alors posées. En 1974 Burke réalise la première allogreffe de peau.

Depuis lors, de nombreux agents immunosuppresseurs nouveaux et progressivement plus sélectifs ont été développés et, bien que la greffe d'organe soit devenue une procédure relativement usuelle, des exploits techniques sont encore régulièrement réalisés (Williams 1997).

Ces avancées ont amélioré la survie des organes transplantés. Les derniers en date concernent les greffes de visage: partielle en 2005 (France), elle est quasi complète (80%) en 2008 aux Etats Unis. Enfin, une greffe complète de visage a été réalisée pour la première fois en 2010 en Espagne.

III. Les types de rejet

L'échelle de réponse immunitaire à une greffe dépend en partie du niveau de disparité génétique entre l'organe greffé et l'hôte.
Les xénogreffes, qui sont des greffes entre des membres d'espèces différentes, présentent le plus de disparités et provoquent une réponse immunitaire maximale aboutissant à un rejet rapide. Les autogreffes, qui sont des greffes d'une partie du corps à l'autre (par exemple, les greffes de peau), ne concernent pas des tissus étrangers et, par conséquent, n'entraînent pas de rejet. Les

isogreffes, qui sont des greffes entre des individus génétiquement identiques (par exemple, des jumeaux monozygotes), n'induisent aucun rejet.
Les allogreffes sont des greffes entre membres d'une même espèce qui sont génétiquement différents. Ce sont les formes les plus communes de la transplantation et celles qui feront l'objet principal de notre étude. Le degré de rejet des allogreffes dépend en partie du degré de similarité ou d'histocompatibilité entre le donneur et le receveur. Donneur et receveur doivent partager des gènes d'histocompatibilité ou alloantigènes. On distingue ainsi:

- Des antigènes d'ordre tissulaire dont l'histocompatibilité mineure et majeure font partie. Lorsqu'il est mineur il met en cause l'antigène Y retrouvé chez l'homme. Puis lorsque l'histocompatibilité est majeure, on parlera d'antigène HLA de classe I exprimé par un grand nombre de cellules ou de classe II exprimée par les cellules du système immunitaire.
- Des antigènes sanguins exprimés par les globules rouges (Système ABO);

Le degré et le type de réponse varient également selon le type de greffe (hyper aiguë, aiguë, chronique). Ainsi, certains sites, comme l'œil et le cerveau, sont immunologiquement privilégiés (c'est à dire qu'ils ont peu ou pas de cellules du système immunitaire et peuvent tolérer même des greffes non appariées). Les greffes de peau ne sont pas initialement vascularisées et ne manifestent donc pas de rejet jusqu'à ce que l'approvisionnement en sang se développe (Boix, Millan et al. 2015). Le cœur, les reins et le foie sont des organes hautement vascularisés et conduisent à une réponse vigoureuse à médiation cellulaire chez l'hôte.

IV. Immunologie de l'allorejet

A. Contexte génétique

Les antigènes responsables du rejet de tissus génétiquement différents sont appelés antigènes d'histocompatibilité produits par les gènes d'histocompatibilité (Baldwin WM 3rd, 2015). Les antigènes d'histocompatibilité sont codés sur plus de 40 loci, mais les loci responsables des réactions de rejet d'allogreffe les plus fortes sont situés sur le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Chez l'homme, le CMH est appelé système de l'antigène leucocytaire humain (HLA) et est situé sur le chromosome 6, près des gènes du complément. D'autres antigènes ne provoquent que des réactions plus faibles, mais des combinaisons de plusieurs antigènes mineurs peuvent provoquer de fortes réactions de rejet (Lin and Gill 2016).
C'est par exemple le cas des antigènes mineurs d'histocompatibilité qui ont été découverts grâce au GVHD (maladie du greffon contre l'hôte) lors des greffes entre donneur et receveur

présentant le même CMH (greffe HLA-identique). Les antigènes mineurs d'histocompatibilité sont des fragments peptidiques provenant de la dégradation de protéines intracellulaires possédant un polymorphisme allélique, mais qui n'appartiennent pas au CMH. Les gènes du CMH sont exprimés de manière codominante, ce qui signifie que chaque individu exprime les deux allèles du gène à la surface cellulaire. De plus, ils sont hérités sous forme d'haplotypes (un de chaque parent). Cela rend une personne à moitié identique à chacun de ses parents en ce qui concerne le complexe CMH. Cela conduit également à 25% de chances qu'un individu puisse avoir un frère ou une sœur identique par rapport au HLA. Les molécules du CMH sont divisées en 2 classes. Les molécules de classe I sont normalement exprimées sur toutes les cellules nucléées, tandis que les molécules de classe II sont exprimées uniquement sur les cellules présentatrices d'antigène professionnelles (CPA), telles que les cellules dendritiques, les macrophages activés et les cellules B. La fonction physiologique des molécules du CMH est de présenter des peptides antigéniques aux cellules T, puisque les lymphocytes T ne reconnaissent l'antigène que lorsqu'ils sont présentés dans un complexe avec une molécule du CMH (Habiro, Kotani et al. 2003). Les molécules de classe I sont responsables de la présentation des peptides antigéniques d'origine intracellulaire (par exemple, les antigènes provenant des virus intracellulaires, des antigènes tumoraux, des auto-antigènes) aux cellules T CD8. Les molécules de classe II présentent des antigènes extracellulaires tels que ceux provenant des bactéries aux cellules T CD4.

D'autre part, des gènes codant les protéines présentant un polymorphisme génétique se situent sur divers chromosomes expliquant donc leur transmission autosomique ou gonosomique. Ainsi, l'antigène H-Y n'est exprimé que par les hommes puisque le gène qui le code est localisé sur le chromosome Y. Il existe aussi un polymorphisme des cytokines et de leurs récepteurs, ainsi que des antigènes du système KIR (Killer Immunoglobulin Receptors) présents sur les cellules NK (Petter, Jonas et al. 1997); (Lanier 1998). Le polymorphisme extensif du génome humain inclut par ailleurs des délétions de gènes. Le système immunitaire d'un individu porteur d'une délétion homozygote d'un gène n'a pas acquis de tolérance vis-à-vis du produit de ce gène. En cas de greffe allogénique il peut reconnaître ce produit comme un alloantigène. C'est donc sur cette base de données que notre modèle d'étude de greffe a été développé.

B. Mécanismes de rejet

Une allogreffe de la peau peut être rejetée dans les dix à quatorze jours suivant la transplantation. Si on réalise une seconde allogreffe, à partir du même donneur, le rejet peut avoir lieu plus rapidement (cinq à sept jours): c'est un rejet de seconde intention, qui est plus rapide à cause de la mémoire immunitaire de l'hôte (figure 19).

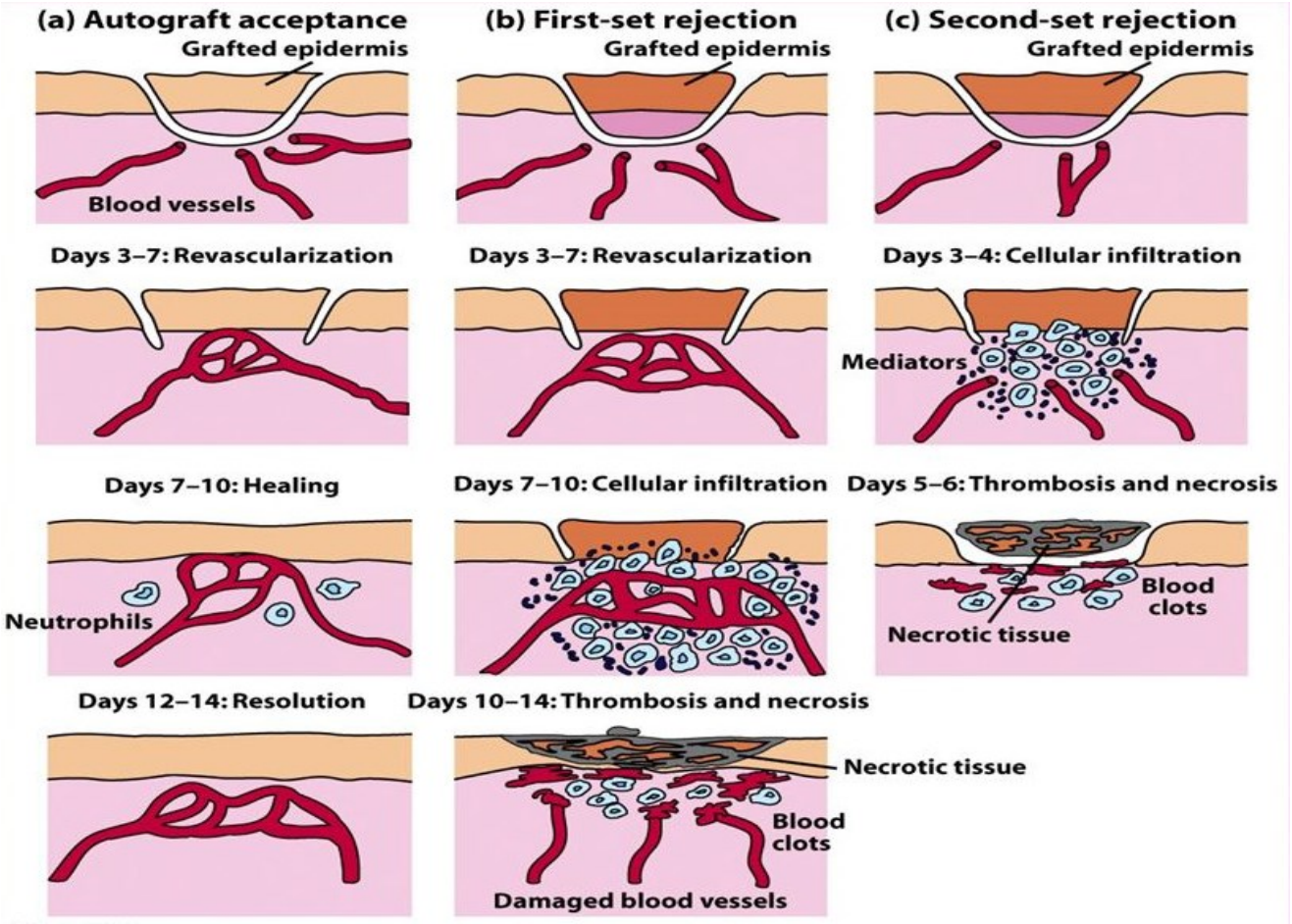


Figure 19 : Première et seconde étape du rejet : Si une souris consanguine A est greffée avec la peau de la souris B, le rejet primaire de la greffe, connu sous le nom de rejet initial, se produit. Lorsque la réaction se développe, il y a une vascularisation de la greffe avec un influx de lymphocytes, de monocytes et d'autres cellules inflammatoires ; il y a une diminution de la vascularisation du tissu transplanté entre 6-9 jours, une nécrose apparente à 10 jours et un rejet complet au bout de 14 jours. La mémoire immunologique est démontrée lorsqu'une seconde greffe de peau de souris B est transférée à une souris A préalablement greffée. Dans ce cas, la réaction de rejet de greffe se développe plus rapidement qu'après la première greffe, avec un rejet complet survenant au bout de 5-6 jours. La spécificité de ce rejet peut être démontrée en greffant une greffe de peau de souris C non apparentée en même temps que la seconde greffe de peau de souris B. Le rejet de la greffe de peau de souris C survient selon la première cinétique de rejet, tandis que la greffe de peau souris B est rejetée de façon accélérée (Kuby IMMUNOLOGY, sixth Edition).

De nombreux travaux de recherche ont toujours mis l'accent sur la nécessité et la suffisance des cellules T et B dans le rejet de pratiquement tous les tissus allogéniques en insistant sur les mécanismes cellulaires (à médiation lymphocytaire) et humoraux (à médiation par des anticorps) induits par ces cellules T et B du rejet d'allogreffe et de l'induction de tolérance. En effet, l'alloreconnaissance se réfère à la capacité des cellules T à reconnaître des molécules de CMH génétiquement différentes et se produit par deux voies distinctes mais non exclusives. Dans la voie directe, les cellules T alloréactives reconnaissent les molécules de CMH du donneur intactes sur les CPA (Auchincloss, Lee et al. 1993, Gould and Auchincloss 1999). Dans la voie indirecte, les CPA hôtes traitent l'Ag dérivé des molécules du CMH donneur et les présentent aux cellules T alloréactives d'une manière restreinte au soi (Daniel, Horvath et al. 1998); (Zerrahn, Held et al. 1997).

Après avoir reçu les signaux d'activation, les cellules T naïves se différencient en cellules effectrices et vont directement endommager le tissu greffé. Le rejet de greffe aigu est considéré comme un processus médié par les lymphocytes T reposant sur plusieurs études montrant que les souris dépourvues de lymphocytes T acceptent des allogreffes totalement incompatibles, le rejet ne se produisant que lors de la reconstitution avec les cellules T (Lombardi, Sidhu et al. 1990). La greffe est détruite par des mécanismes de cytotoxique directe des lymphocytes T et d'hypersensibilité retardée classique (Benichou, Valujskikh et al. 1999).

Cependant, les progrès dans la compréhension des réponses innées aux molécules dérivées de micro-organismes ont mis en évidence son rôle critique dans l'élaboration de la réponse adaptative dans le rejet et la tolérance de l'allogreffe *(Iwasaki and Medzhitov 2004)*. D'une part parce que l'immunité innée initie le rejet d'allogreffe par des mécanismes faisant intervenir les voies des TLRs (Goldstein, Tesar et al. 2003, Daniel 2006, Shen and Goldstein 2009); (M., A. et al. 2009, Nogueira, Lindsten et al. 2009). En effet, plusieurs études récentes ont examiné le rôle des agonistes des récepteurs Toll-like (TLR) et des signaux TLR dans l'alloreconnaissance et le rejet. D'autre part, il y a une régulation et production importante des médiateurs pro-inflammatoires dans l'allogreffe avant la réponse des lymphocytes T et B (Furuta, Miyoshi et al. 2006). Cette inflammation précoce après la greffe du tissu est due à la réponse innée à une lésion tissulaire indépendante du système immunitaire adaptatif *(Schnare, Barton et al. 2001)*.

Quelques-uns de ces mécanismes innés seront plus amplement abordés et décrits au cours de notre travail. Même si, seuls, ils ne semblent pas suffisants pour entraîner le rejet de greffe lui-même, ils restent tout de même importants pour des réponses immunitaires adaptatives optimales à la greffe et peuvent jouer un rôle majeur dans la résistance à l'induction de la tolérance ou alors du rejet. Le développement de thérapies pour atténuer les réponses immunitaires innées, qui ont des implications potentielles pour une grande variété de maladies, est susceptible d'avoir également un impact significatif sur la transplantation (figure 20).

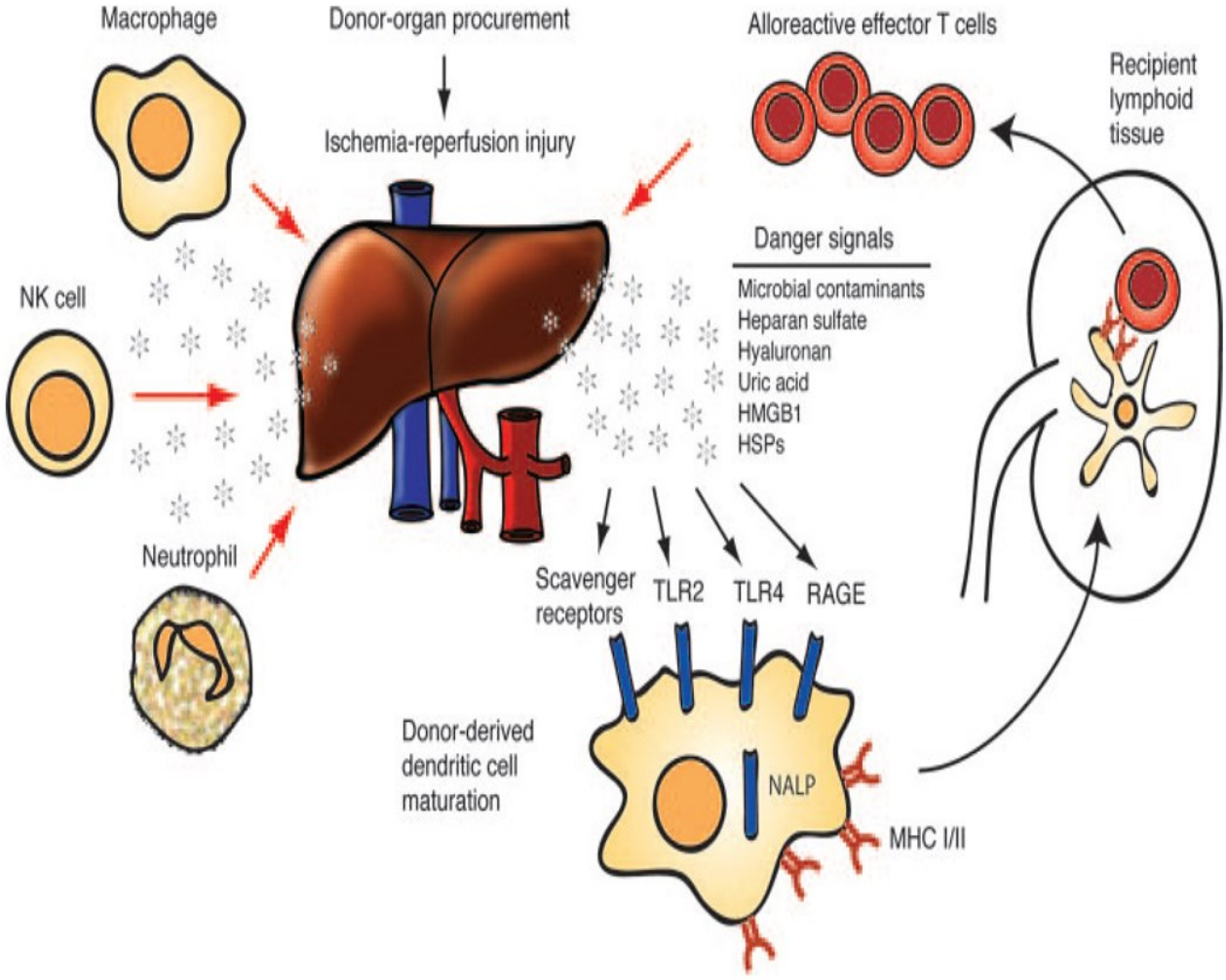


Figure 20 : Réponses immunitaires innées dans l'allotransplantation. Peu après la transplantation d'organes solides, les lésions liées à l'allogreffe induites par l'Ag favorisent l'immunogénicité via des signaux de danger qui conduisent à l'activation des CPA issues de donneurs. Ainsi, les cellules T alloréactives naïves sont stimulées, deviennent effectrices en s'engageant directement dans la greffe. D'autres cellules du système immunitaire inné, telles que les neutrophiles, les macrophages et les cellules NK, s'infiltrent rapidement dans l'allogreffe en réponse aux signaux inflammatoires et favorisent une lésion supplémentaire par leurs propres mécanismes pro-inflammatoires ou en soutenant l'activité des cellules T alloréactives. (D'après LaRosa, 2007).

V. Rôle de l'immunité innée dans l'allotransplantation

Sachant que les cellules innées reconnaissent des molécules largement exprimées dérivées de pathogènes ou de cellules apoptotiques, elles peuvent donc avoir à la fois des effets pro- et anti-inflammatoires, mais jouent également un rôle important dans l'amorçage des réponses immunitaires adaptatives.

A. Les mastocytes dans l'allotransplantation

Les mastocytes au-delà de leur implication historique et principale dans les réactions allergiques (comme l'anaphylaxie et l'asthme) et les infections parasitaires, bactériennes et virales, peuvent être considérés comme des cellules immunorégulatrices clés ayant une influence sur l'immunité innée et adaptative ((Galli, Kalesnikoff et al. 2005) (Galli SJ et Tsai M., 2010) (Metz M. et al., 2007)). La dualité fonctionnelle des mastocytes décrite précédemment, démontre donc qu'ils ont une activité pro-inflammatoire, anti-inflammatoire et / ou immunosuppressive (comme dans les dommages UV-B (Grimbaldeston, Nakae et al. 2007), les piqûres de moustiques ((Depinay, Hacini et al. 2006)).

De plus, comme il a été décrit que les mastocytes peuvent apprêter et présenter l'antigène aux lymphocytes T à travers la classe I et la classe II majeure complexes d'histocompatibilité (Tkaczyk, Villa et al. 1999), ils vont donc par conséquent participer à l'initiation des réponses immunes innées. En effet, alors même qu'ils possèdent une activité proinflammatoire, il a été montré de manière inattendu qu'ils jouaient un rôle indispensable dans la tolérance allogreffe (Lu (Lu, Lind et al. 2006)LF et al., 2006).

Cependant, le rôle des mastocytes en transplantation demeure à ce jour mystérieux car la littérature fournit des données contradictoires sur les fonctions délétères et protectrices de l'hôte au cours des rejets de greffe de type aigu.

C'est en 1974 que Colvin et Dvorak remarquent pour la première fois une présence importante de mastocytes dans leurs travaux sur les allogreffes de rein (Colvin R.B. & Dvorak H.F., 1974). Cette augmentation était corrélée au rejet sévère du greffon. Puis les travaux qui ont suivi et qui avaient pour but de prouver que le rejet d'allogreffe était associé à une augmentation de mastocytes se sont soldés par des résultats contradictoires (Jahanyar, Koerner et al. 2008). Il a par ailleurs été montré chez des modèles de rat qu'au cours du rejet de type aigu de greffe de coeur, les mastocytes pouvaient subir d'important changement phénotypique (modification des mastocytes conjonctifs en mastocytes muqueux) (Zweifel, Hirsiger et al. 2002), suggérant donc que les mastocytes peuvent avoir des propriétés et des fonctions différentes de celles observées et décrites chez les individus non transplantés.

De manière intéressante, l'analyse de l'expression des gènes dans les allogreffes tolérantes a révélé une augmentation des transcrits pouvant être associée aux mastocytes (Zelenika D. et al. 2002). Mais ce n'est qu'après les travaux de recherche de Noëlle et al en 2006, dans un modèle de tolérance que les mastocytes ont été clairement impliqués dans l'induction de la tolérance de la greffe de peau.

En effet, puisque les mastocytes sont extrêmement présents dans la peau où ils forment un véritable réseau, cette équipe montre dans un modèle murin tolérisé (dépourvu de cellules T effectrices), que les mécanismes de tolérance de la greffe et les processus nécessaires pour limiter le rejet d'une greffe dépendant des cellules T régulatrices et des cellules dendritiques sont associés au recrutement des mastocytes et à une production de cytokine des mastocytes (GM-CSF) (de Vries, Pino-Lagos et al. 2011), qui permettent donc la survie de la greffe. Les mastocytes sont essentiels dans le maintien de l'immunosuppression des souris allogreffées et tolérisées, ce qui signifie donc une plus longue acceptation ou tolérance de la greffe (de Vries, Pino-Lagos et al. 2011). Pucillo montre également que les mastocytes et les Treg peuvent interagir via l'axe OX-40/OX-40L (Riccardo, Giorgia et al. 2011)et Lu et al qu'une boucle d'activation des mastocytes/Treg via l'IL-9 se crée dans le modèle de GVHD (Lu, Lind et al. 2006).

Dans ce sens donc, les mastocytes suppriment l'inflammation et protègent le greffon. Ils ont donc un rôle dans les activités immunorégulatrices induites par Treg qui produisent l'IL-9 responsable de leur recrutement et de leur fonction ((Lu, Lind et al. 2006).

Dans des souris déficientes en mastocytes, la tolérance du greffon est réduite. La reconstitution en mastocytes dans ces souris restaure une survie prolongée.

De plus, la survie des tissus est significativement réduite chez les individus déficients en mastocytes et le rejet aigu est plus sévère dans les modèles animaux déficients en mastocytes.

Les mastocytes influencent également la présence de lymphocytes T avec un recrutement important de ces lymphocytes T dans le tissu transplanté. Il a été également rapporté que les mastocytes suppriment la GVHD murine dans un mécanisme indépendant des cellules T régulatrices CD4 + CD25 + (Leveson-Gower, Sega et al. 2013). Ces observations conduisent à la conclusion que les mastocytes peuvent jouer un rôle protecteur après la transplantation tissulaire et le rejet aigu.

Les mastocytes activés sécrètent TGF-β et IL-10 pour une amplification et une activation supplémentaires des cellules Treg qui vont inhiber les cellules effectrices CD8 + (Jahanyar, Koerner et al. 2008). Ainsi, les Treg sécrètent l'IL-9, en augmentant la croissance des mastocytes et la chimiotaxie suggérant que les Treg et les mastocytes forment une unité fonctionnelle qui intervient dans la tolérance du greffon.

Les interactions entre les cellules Treg, l'IL-9 et les mastocytes paraissent donc très importantes et la sécrétion de l'IL-9 empêche la régulation du rejet du greffon par les cellules Treg. Cependant, les mécanismes exacts de ces interactions et des effets protecteurs des mastocytes restent encore à clarifier.

Bien que d'autres facteurs puissent être impliqués, ces résultats suggèrent fortement un rôle indispensable pour les mastocytes dans la tolérance des transplants cutanés, et justifient aussi la localisation des mastocytes au niveau de tissus spécifiques tels que la peau, les nerfs, les vaisseaux, des follicules pileux et des épitheliums.
Cependant, ce qui semble paradoxal mais ne l'est pas, c'est le rôle délétère du mastocyte dans l'allo-rejet d'organe(Marjan, P. et al. 2007). En effet, tout est dépendant du modèle d'étude selon qu'on soit en condition physiologique en présence des cellules T effectrices ou en condition de tolérance en leur absence.

Les mêmes chercheurs de l'équipe de Noëlle ont montré que la dégranulation des mastocytes chez des souris pré-tolérisées ayant reçu des greffes de peau, le rejet a lieu dans les 15 jours impliquant une rupture de tolérance précédemment établie avec une diminution importante de cellules Treg. Mais ils ne décrivent pas du tout les mécanismes ou le déroulement du rejet chez les souris non tolérisées, probablement parce que l'ensemble de leurs études visait plutôt des thérapies anticancéreuses (de Vries, Wasiuk et al. 2009). Ils émettent d'ailleurs l'hypothèse même en mentionnant que de nombreuses tumeurs ont un nombre accru de mastocytes, de sorte que la dégranulation autour d'une tumeur pourrait aider le système immunitaire. Pour ces spécialistes de cancérologie, la tolérance immunitaire peut être cruciale pour la réussite des greffes, mais sans présence tumorale dans cet environnement.

En dépit de leurs effets protecteurs au cours du rejet aigu de l'allogreffe, les effets à long terme des mastocytes et leur implication dans le rejet d'allogreffe chronique semblent aussi préjudiciables. En effet, les mastocytes sont également impliqués dans le rejet chronique où ils sont associés à une incidence accrue de fibrose dans l'allogreffe, (Li 2010). Ces effets stimulent les fibroblastes, augmentent la synthèse du collagène et conduisent à la fibrose tissulaire. Par conséquent, le rejet chronique est associé à une régulation tissulaire importante par les mastocytes et à la sécrétion de l'IL-4 qui peut activer les fibroblastes et conduire à la fibrose (Jiang, Wang et al. 2010). Le nombre de mastocyte est significativement plus élevé chez les patients ayant un rejet chronique, et il existe une relation importante entre les mastocytes et la fibrose.

Si on compare les deux types de rejets, on constate que dans le rejet aigu en condition de tolérance, les mastocytes semblent avoir un rôle protecteur par l'activation et l'amplification de la fonction des cellules Treg et par l'inhibition des lymphocytes T effecteurs; tandis que dans le rejet chronique, ils ont une fonction opposée par la production de plusieurs médiateurs profibrotique différents.

Par conséquent, les mastocytes semblent avoir un double rôle dans la transplantation cutanée avec des activités à effets pro-inflammatoires ou immunosuppressives qui diffèrent selon les types cellulaires qu'ils vont rencontrer ou avec lesquels ils vont être en contact en situation inflammatoire.
Comme les mastocytes sont capables d'initier et de réguler tous les aspects du système immunitaire, il est donc important de comprendre leur rôle/activation au cours de la transplantation, afin d'éclaircir les zones d'ombre et de développer de nouvelles thérapies potentielles utiles pour améliorer la prévention du rejet.

B. Les neutrophiles

1. Origine et devenir du neutrophile

Il a précédemment été décrit que la production de facteurs chimiotactiques par les mastocytes peut améliorer le recrutement de multiples cellules inflammatoires, y compris les éosinophiles (éotoxine), les cellules tueuses naturelles (NK) (IL-8) et aussi de manière précoce les neutrophiles (TNF-α et leucotriènes) pour le développement des défenses de l'hôte.
Les neutrophiles polynucléaires sont issus des cellules souches hématopoïétiques différenciées en présence de facteurs de croissance et cytokines (IL-3, GM-CSF, G-CSF, IL-1 et IL-6). Une fois produits, ils sont stockés quelques jours dans la moelle osseuse ou dans la rate en quantité dite physiologique qui augmentera dans des contextes pathologiques ou de lésion inflammatoire (Manz and Boettcher 2014). Grâce au G-CSF (Granulocyte - Colony stimulating factor), ils vont être libérés dans la circulation sanguine où ils constitueront la plus grande famille de leucocytes circulants. En conditions homéostatiques, les polynucléaires neutrophiles ont une demi-vie dans la circulation d'environ 6 heures qui varie selon que l'on soit chez la souris ou chez l'homme. Dans les tissus où ils exercent leurs fonctions physiologiques principales lorsqu'ils sont activés, ils ont une durée de vie plus longue d'environ 1 à 2 jours.

Les polynucléaires neutrophiles constituent donc la première ligne de défense infectieuse et non infectieuse de l'hôte (Anderson 2015) ; (Radic 2014)En se servant des mécanismes de phagocytose, de dégranulation (granules à effet microbicides), de la nétose (pièges extracellulaires (NETs)), ils protègent contre les infections bactériennes et fongiques, certaines infections virales *via* les défensines et possèdent aussi une activité antiparasitaire et en particulier antiplasmodiale (Mantovani, Cassatella et al. 2011).

2. Physiologie du recrutement des neutrophiles

En situation d'homéostasie, les polynucléaires neutrophiles circulent dans le sang. Lors d'une réaction inflammatoire, après la libération des médiateurs tels que l'histamine, le TNFα, l'IL-1, la thrombine, et l'endotoxine par les MCs et les autres cellules résidentes au niveau du site inflammatoire, il y a une dilatation des vaisseaux et une préactivation des cellules endothéliales (Wyman, Bjornsen et al. 2002). Les chimioattractants (MIP-2, KC, PAF, LTB4) sécrétés par les cellules résidentes comme le MC (Amulic, Cazalet et al. 2012); (Brinkmann, Reichard et al. 2004), vont activer les neutrophiles qui vont subir des modifications de forme et se polariser avant de traverser l'endothélium (diapédèse) en s'y accrochant par des récepteurs d'adhérence (les sélectines et les β intégrines) (Awad, Rouse et al. 2009) ; (Kelly, Williams et al. 1996), pour enfin se diriger au long d'un gradient chimiotactique vers les tissus cibles (Witko-Sarsat, Rieu et al. 2000) .

3. Fonction des polynucléaires neutrophiles

Ce sont les premières cellules recrutées sur un site inflammatoire, où elles peuvent rapidement éliminer les agents pathogènes, phagocyter les bactéries, les débris des cellules mortes, dégranuler pour libérer la myéloperoxidase (MPO), des molécules bactéricides, des enzymes lytiques, des médiateurs de l'inflammation, des cytokines pro- et anti-inflammatoires et produire massivement des formes réactives de l'oxygène (FRO) (Borregaard 2010) ; (Segal 2005). L'explosion oxydative est initiée dans les neutrophiles stimulés par l'activation du complexe NADPH oxydase qui transfère un électron du NADPH sur l'oxygène formant ainsi l'anion superoxyde qui est le précurseur des FRO comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle ($HO^{\cdot}$) et l'acide hypochlorique (HOCl) (Kim, Siracusa et al. 2013); (Mócsai, Jakus et al. 2000); (Aoshiba, Yasui et al. 1999). Ces FRO contribuent à la destruction des pathogènes. Cependant, lorsqu'elles sont produites de manière excessive et inappropriée, elles induisent des lésions tissulaires et contribuent à la pathologie (Janke, Poth et al. 2009).

4. Rôle des polynucléaires neutrophiles dans l'allotransplantation

Les neutrophiles sont habituellement les premiers leucocytes à s'infiltrer dans les organes transplantés et constituent un marqueur bien établi des lésions de transplantation(Schofield, Woodruff et al. 2013). La plupart des travaux sur les neutrophiles dans les organes transplantés ont mis l'accent sur leur rôle destructeur pendant l'ischémie-reperfusion (IRI), une forme de lésion tissulaire stérile exacerbée par la libération massive de l'activité effectrice oxydative et protéolytique par ces cellules.

Des expériences de microscopie intravitale à deux photons ont montré une accumulation significative des neutrophiles dans les greffes cardiaques et pulmonaires quelques heures après reperfusion (Li, Goh et al. 2012); (Kreisel, Nava et al. 2010). Ces travaux ont révélé d'une part l'existence de sous-ensembles de neutrophiles ayant des fonctions différentes dans les tissus greffés et d'autre part des interactions directes entre les neutrophiles et d'autres leucocytes qui favorisent l'allo-immunité.

Paradoxalement, la rétention de certains neutrophiles peut être importante pour induire ou maintenir la tolérance. Les neutrophiles peuvent stimuler les signaux anti-inflammatoires dans d'autres phagocytes et libérer des molécules qui inhibent l'activation des lymphocytes T.

De nombreuses études sur les mécanismes à la suite d'une inflammation stérile ont révélé que l'expression des motifs moléculaires associés aux dommages (DAMP) des cellules nécrotiques et de la matrice extracellulaire (ECM) induit de manière très importante l'infiltration et l'activation des neutrophiles (Braza, Brouard et al. 2016). Les DAMPs vont aussi stimuler l'expression de cytokines inflammatoires via les PRRs (des récepteurs de reconnaissance de motifs stimulants) sur les macrophages. Ceux-ci comprennent les chimiokines (par exemple, CXCL8 chez l'homme et CXCL1, CXCL2 chez les rongeurs) et IL-lß qui jouent un rôle clé dans le recrutement des neutrophiles en activant l'endothélium vasculaire (McDonald, Pittman et al. 2010, Beauvillain, Cunin et al. 2011). Les neutrophiles expriment également des PRRs qui, lorsque fixés aux DAMPs, induisent la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'enzymes hydrolytiques qui exacerbent les lésions du greffon.

Ainsi, en infiltrant le greffon les neutrophiles élaborent des réponses de défense immunes similaires à celles émises au cours d'une infection car les DAMPs contiennent les caractéristiques structurelles analogues aux modèles moléculaires associés aux agents pathogènes.

Cependant, de nouvelles fonctions immunitaires ont été attribuées en particulier dans leur rôle critique dans l'immunité adaptative. De même que les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) professionnelles, les neutrophiles ont la capacité d'infiltrer les sites périphériques et de

présenter l'antigène dans les ganglions lymphatiques (Beauvillain, Cunin et al. 2011). De plus, les neutrophiles peuvent induire la différenciation des lymphocytes T via l'expression de molécules CMH et co-stimulatrices (Leliefeld, Koenderman et al. 2015). Enfin, et peut-être le rôle le moins décrit des neutrophiles est leur contribution dans la résolution de l'inflammation. Grâce à leur propre mort apoptotique, certaines sous-populations de neutrophiles peuvent induire et activer l'expression de molécules anti-inflammatoires par d'autres cellules myéloïdes (Huynh, Fadok et al. 2002) tandis que d'autres sous populations peuvent inhiber l'activation des lymphocytes T (Pillay, Kamp et al. 2012) et favoriser l'angiogenèse (Christoffersson, Vågesjö et al. 2012).

Lors des rejets de type cellulaire, les expériences de déplétion des neutrophiles ont révélé l'importance des neutrophiles dans la promotion des réponses allo-immunes. Par exemple, dans un modèle de transplantation cutanée chez la souris, la déplétion des neutrophiles a ralenti le rejet aigu en atténuant le recrutement de lymphocytes T CD8 + à mémoire allo-réactive (Jones, Brook et al. 2010) . Les neutrophiles peuvent stimuler le recrutement de lymphocytes T CD8 + activés par l'expression de leur ligand Fas, induisant l'expression des chimioattractant CCL1, CCL2 et CCL5 des cellules T (Kish, Gorbachev et al. 2012). De plus, par imagerie des interactions importantes entre les neutrophiles et les cellules résidentes pour stimuler des réponses allo-immunes ont été mises en évidence. Dans un modèle de transplantation pulmonaire, il a été démontré que la déplétion des neutrophiles favorise la survie de l'allogreffe médiée par l'immunosuppression, ce qui entraîne une production moins importante d'IL-12 et une réduction de l'allo-immunité des cellules Th1 (Kreisel, Sugimoto et al. 2011).
Contrairement à l'allo-immunité médiée par les lymphocytes T, il existe relativement peu de données mécanistiques sur la façon dont les neutrophiles régulent les réponses humorales après la transplantation d'organe.
Actuellement, il n'y a pas de rapports analysant les effets de la déplétion des neutrophiles sur le rejet à médiation par anticorps ou humoral. Des résultats cliniques montrent que la neutrophilie dans le greffon est liée au rejet d'une greffe médiée par un anticorps (Wasowska 2010). Dans les modèles de transplantation cardiaque et pulmonaire chez la souris, le rejet induit par les anticorps stimule une infiltration active des neutrophiles provoquant la destruction des tissus (Saini, Angaswamy et al. 2010) (Hattori, Bucy et al. 2012). De ce fait, les neutrophiles pourraient être recrutés dans les greffes via des complexes immuns recouverts par les éléments du système du complément ou par des plaquettes liées à l'endothélium vasculaire stimulé par des allo-anticorps (Morrell, Murata et al. 2008). Les neutrophiles expriment donc le récepteur du complément 1 (C1) qui fixe le C1 afin d'éliminer les complexes immuns.
Par ailleurs, l'activation par les complexes peut activer une forte régulation de la sélectine P exprimée à la surface des cellules endothéliales, favorisant ainsi le recrutement des neutrophiles.

La manière dont les allo-anticorps contribuent aux réponses effectrices des neutrophiles dans les greffes demeure encore peu claire.
Des études réalisées dans un modèle de lésion pulmonaire aiguë médiée par des anticorps anti-CMH de classe I ont suggéré que la reconnaissance médiée par le récepteur Fcγ des complexes d'immunoglobulines pourrait conduire à des réponses effectrices des neutrophiles dans les greffes.
Il est également possible que les neutrophiles contrôlent la différenciation des lymphocytes B après la transplantation. Des travaux récents ont montré l'existence d'une sous-population de neutrophiles infiltrant les zones marginales des ganglions lymphatiques sécrétant des niveaux élevés de BAFF, APRIL, CD40L et IL-21, qui sont des facteurs de stimulation des lymphocytes B impliqués dans la commutation isotipique (ou changement de classe) des anticorps (Cerutti, Puga et al. 2013). Des études plus approfondies doivent être menées pour déterminer si les neutrophiles peuvent à la fois induire des cellules B après des greffes de tissu ou d'organe et s'ils jouent un rôle dans le rejet à médiation humorale.

Lors des rejets chroniques, on observe très souvent une migration importante des neutrophiles dans les allogreffes d'organes. Ceci s'explique par le fait que l'infiltration et l'augmentation importante des neutrophiles induisent l'expression de l'IL-17 dans le rejet chronique, produit par les cellules Th17 qui sont aussi présents au site de la greffe (Abadja, Sarraj et al. 2012). En effet, l'IL-17 est un puissant moteur de l'infiltration et de la différentiation de neutrophiles via la stimulation de la sécrétion de chimiokines et de cytokines granulopoïétiques (comme par exemple, G-CSF, GM-CSF), respectivement. L'impact de la neutrophilie médiée par l'IL-17 sur le rejet chronique a été rapporté chez des transplantés pulmonaires, chez qui une mutation du récepteur de l'IL-17 favorisant la neutrophilie des voies respiratoires augmentait le risque de rejet chronique (Ruttens, Wauters et al. 2013).

En revanche, les mécanismes par lesquels les neutrophiles favorisent le rejet chronique restent mal décrits. Des études associant les voies de signalisation des TLR au rejet chronique suggèrent que, comme dans les conditions de rejet aigu, l'activation des neutrophiles est déclenchée par les DAMPs. Par exemple, l'acide hyaluronique (HA) provenant de la matrice extracellulaire (MEC) et qui est donc un DAMPs, s'accumule dans les lésions pulmonaires dans les poumons des patients atteints du syndrome de la bronchiolite oblitérant (BOS). L'analyse de la forme à faible poids moléculaire de HA dans un modèle de transplantation pulmonaire chez la souris a montré qu'elle stimulait l'infiltration des neutrophiles de manière dépendante des TLR2 / 4 en plus de la production des ROS (Todd, Wang et al. 2014). De plus, les enzymes protéolytiques communément associées à la dégradation de la MEC et à la migration des neutrophiles, telles que les métalloprotéinases (par exemple, MMP9, MMP8), se sont révélées être augmentées chez

les patients atteints de BOS (Scozzi, Ibrahim et al. 2017). Les neutrophiles peuvent également favoriser l'inflammation chronique en influençant le maintien des tissus parenchymateux. Un rapport récent a montré l'accumulation de peptides alpha et bêta-défensine dérivés de neutrophiles chez des patients atteints de BOS. Ces peptides induisent des cytokines inflammatoires (par exemple, IL-8, IL-1β) et des facteurs de croissance pro-fibrotiques (VEGF, EGF) suggérant un lien entre le recrutement des neutrophiles et l'induction des profils d'expression des gènes dans les cellules parenchymateuses connu pour favoriser le remodelage tissulaire (Tiriveedhi, Banan et al. 2014).

Il a par ailleurs été noté que les monocytes et les mastocytes régulent la migration transendothéliale des neutrophiles dans les greffes de poumons et peuvent leur fournir des signaux chimiotactiques dans le greffon suite à leur extravasation. Zhu a récemment donné un aperçu de la façon dont les neutrophiles sont recrutés dans les greffes cardiaques. Des corps apoptotiques provenant des tissus cardiaques stimulent les macrophages d'une manière dépendant de TLR4 induisant la production d'IL-23. Cette cytokine stimule les lymphocytes T γδ qui sécrètent à leur tour l'IL-17, conduisant à la production des chimioattractants des neutrophiles tels que le KC, MIP-2 et LIX. Ceci constitue donc une voie nécessaire pour un recrutement efficace des neutrophiles et des dommages tissulaires maximaux (Zhu, Isikman et al. 2013).

La plupart des études ont montré que l'infiltration de neutrophiles à un effet délétère dans la survie de la greffe. Les allogreffes cardiaques survivent plus longtemps lorsque les receveurs ont un défaut d'expression de CXCR2, un récepteur à chimiokines des neutrophiles. De plus, la diminution du recrutement des neutrophiles dans la greffe, potentiellement due à une diminution de l'expression des chimiokines pro-inflammatoires et des cytokines, comprenant le TNF-α, l'IL-6 et l'IFN-γ, induit un retard de l'infiltration des lymphocytes T. De plus, la déplétion des neutrophiles associée à l'inhibition des voies chimiotactiques avec le blocage des co-stimulateurs des neutrophiles potentialise le prolongement de la survie des allogreffes cardiaques (El-Sawy, Belperio et al. 2005).
Citro et al ont montré que les souris déficientes en CXCR2 retrouvent une euglycémie (glycémie normale) plus rapidement et uniformément suite à une greffe d'îlots pancréatiques comparées aux souris de type sauvage. Ils ont ensuite essayé de traiter les receveurs de greffe d'îlots humains avec de la réparixine (inhibiteur de CXCR1 et CXCR2). Contrairement aux témoins non traités, les patients recevant ce médicament présentent une meilleure survie du greffon avec un contrôle glycémique normal et une diminution des besoins en insuline (Citro, Cantarelli et al. 2012).

Il a également été observé par imagerie biphotonique que les neutrophiles interagissent avec les DC des donneurs dans les allogreffes pulmonaires peu après la transplantation. En effet, la production de TNF-α par les neutrophiles stimule la production d'IL-12 par les DC, ce qui biaise la différenciation des lymphocytes T vers un profil TH1 et déclenche le rejet du greffon (Kreisel, Sugimoto et al. 2011). Les neutrophiles recrutés dans les allogreffes pulmonaires murines en réponse à une infection respiratoire par *Pseudomonas aeruginosa* expriment les molécules de costimulation de la famille B7 et costimulent en *trans* les cellules T CD4+ alloréactives, améliorant ainsi les réponses allo-immunes (Kreisel, Sugimoto et al. 2011). Dans une étude portant sur des transplantés pulmonaires, l'augmentation de la neutrophilie était associée à la présence d'anticorps spécifiques du donneur, avec une corrélation inverse à la survie de l'allogreffe (DeNicola, Weigt et al. 2013).

Les neutrophiles sont de plus en plus reconnus comme des intermédiaires importants des processus inflammatoires qui régulent le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. À partir du moment de la prise de greffe, ils exercent un large éventail de fonctions effectrices qui entraînent l'exacerbation de l'IRI et l'activation des mécanismes conduisant au rejet par une interaction bidirectionnelle avec d'autres cellules immunitaires. Il existe également des preuves contrastées consistantes sur les propriétés anti-inflammatoires inductibles par les neutrophiles suggérant qu'ils pourraient être utilisés pour protéger l'allogreffe contre les blessures et favoriser la tolérance. Cependant, il reste à déterminer si le ciblage des neutrophiles est une approche envisageable pour promouvoir la tolérance. Comparativement à d'autres populations de leucocytes, peu de travaux traitent directement du rôle des neutrophiles dans les transplantations. Des études mécanistiques futures seront nécessaires pour mieux comprendre le rôle des neutrophiles dans les organes transplantés. Notamment pour la mise en place des approches à visé thérapeutique ciblant les neutrophiles pour promouvoir la survie du greffon.

VI. La Place des cellules T régulatrices dans l'allotransplantation

A. Ontogénie et phénotype

La découverte de ces lymphocytes T nécessaires pour éviter le rejet de greffon par l'hôte, découle de travaux visant à comprendre comment une population de cellules, les lymphocytes, pouvait à la fois induire des réactions inflammatoires et une tolérance (François Bach 2003). L'immunorégulation par les lymphocytes T est un des mécanismes principaux responsables du maintien de l'homéostasie des lymphocytes T et de la tolérance envers des antigènes spécifiques (Sakaguchi, Miyara et al. 2010).

Ce mécanisme est utilisé, non seulement pour contrôler les réponses immunes envers le soi, prévenant ainsi les réactions autoimmunes, mais aussi pour contrôler les réponses immunes envers des antigènes étrangers, comme dans les cas de transplantation. Des études réalisées chez des souris thymectomisées ayant reçu des injections de cellules T, ont démontré l'existence d'une population de lymphocytes issus du thymus, qui persiste en périphérie à l'âge adulte et qui possède des capacités suppressives. Cette dernière caractéristique a défini leur nom initial de lymphocytes T « suppresseurs » qui maintiennent donc la tolérance aux auto-antigènes, l'homéostasie cellulaire et inhibent les réponses immunitaires excessives (Matzinger 1994).

On distingue des Tregs naturels qui se développent dans le thymus (tTregs) et les Tregs induits à la périphérie (pTregs) qui se développent en présence de facteurs de croissance tels que le TGFβ et l'IL-2 (figure 22) (Benson, Pino-Lagos et al. 2007); (Mucida, Pino-Lagos et al. 2009). Le développement et la fonction de ces deux sous-populations de Tregs dépendent du facteur de transcription FOXP3 (« Forkhead box protein », gène situé sur le chromosome X) (Fontenot, Rasmussen et al. 2005). La mutation perte de fonction dans le gène *foxp3* peut inhiber le développement de Tregs (Ramsdell and Ziegler 2014). Cette déficience conduit à une maladie auto-immune multi-organe qui inclut des immunopathologies cutanées, récapitulant les immunopathologies sévères observées chez les souris Scurfy (souris possédant une mutation sur le gène codant pour FOXP3 conduisant à une absence de Tregs dans le système immunitaire) et chez des patients atteints de syndrome d'immunodépression humaine, de polyendocrinopathie et d'entéropathie, liés au chromosome X (IPEX) (McGinness, Bivens et al. 2006). Non-seulement la protéine FOXP3 contrôle l'expression de nombreux marqueurs identifiés préalablement comme le $CD45RB^{low}$ (Hara, Kingsley et al. 2001), le CTLA-4 (« cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 »; CD152) (Kingsley, Karim et al. 2002), le CD62L (L-sélectine) (Herbelin, Gombert et al. 1998), le GITR (« glucocorticoid-induced tumor-necrosis factor receptor ») (Zelenika, Adams et al. 2002), le CD122 (chez les cellules humaines seulement) (Levings, Sangregorio et al. 2001), le CD103 (Zelenika, Adams et al. 2002), le CD25 (sous-unité α du récepteur de l'IL-2 (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995); (Thornton and Shevach 1998) mais son induction sur les cellules T CD4 naïves permet l'obtention de cellules immunosuppressives *in vitro* et *in vivo* (Hori, Nomura et al. 2003).

En outre, la présence de cellules T $CD4^{+}CD25^{+}$ dans le thymus et en périphérie associée à un niveau d'expression faible du CD127 (chaîne α du récepteur à l'IL-7) chez les souris exprimant les molécules de CMH-II exclusivement dans le cortex, ((Bensinger, Bandeira et al. 2001)indique une sélection des Tregs par le CMHII. Cette sélection permettra le développement important de Treg lors d'une interaction de forte affinité du TCR avec le complexe CMH-II/HA.

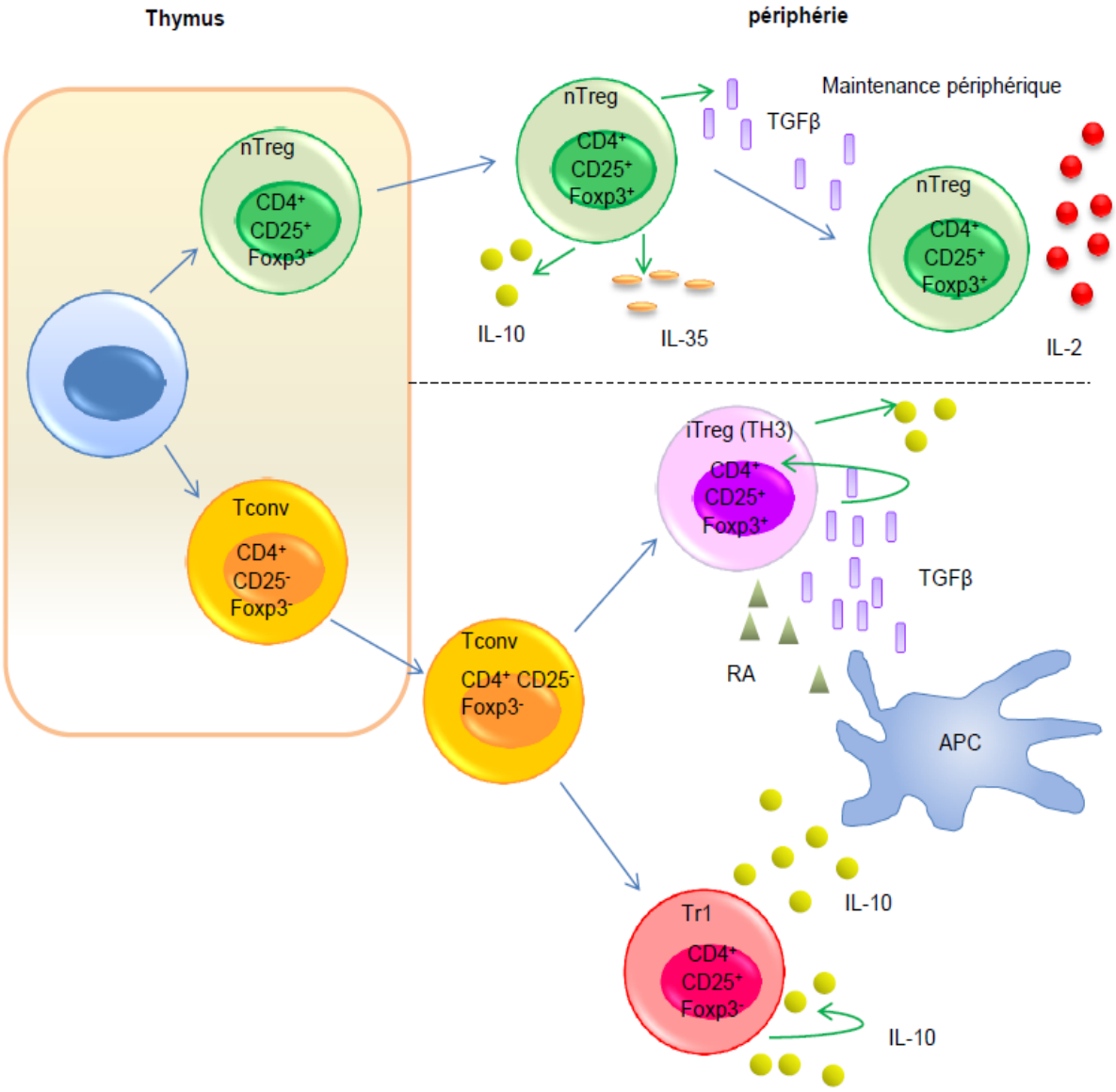


Figure 21 : Les Tregs thymiques sont directement issus des précurseurs dans le thymus. Ces Treg vont synthétiser à la périphérie différentes cytokines immuno-régulatrices telles que le TGF-β, l'IL-10 et l'IL-35. La survie de ces Treg dépend de l'IL-2 environnante. Les Treg induits sont eux issus de T conventionnels différenciés à la périphérie par l'IL-10/ TGF-β. On distingue deux types de Treg induits les Tr1 ($Foxp3^-$) producteurs d'IL-10 et les iTreg ou TH3 ($Foxp3^+$). RA= « retinoic acid » *(d'après Fabien et al, 2014).*

I. Rôle de l'immunité innée dans l'allotransplantation

Sachant que les cellules innées reconnaissent des molécules largement exprimées dérivées de pathogènes ou de cellules apoptotiques, elles peuvent donc avoir à la fois des effets pro- et anti-inflammatoires, mais jouent également un rôle important dans l'amorçage des réponses immunitaires adaptatives.

A. Homéostasie et activation des Tregs

D'importants travaux ont montré qu'au repos, des Tregs existent et expriment le CD62L fortement, le CD44 de manière intermédiaire, le CD69, le Ki67 ou le TNFRII mais pas la molécule OX40. Et d'autre part des Treg dits mémoires et activés sont $CD44^{high}$ $CD62L^{low}$ associé à une expression de ICOS, Ki67, TNFRII, OX40, CD103 (Fisson, Darrasse-Jèze et al. 2003); (Huehn, Siegmund et al. 2004). Ces Treg activés mémoires vont proliférer, se diviser activement et vont être responsables de l'inhibition précoce de la réponse anti-tumorale (Darrasse-Jèze, Bergot et al. 2009). Les Treg activés mémoires, exprimant le TNFRII ou ICOS, sont plus suppresseurs que les Treg au repos (Chen, Yuan et al. 2010); (Chen, Haines et al. 2011).

A l'état basal, les organes lymphoïdes secondaires renferment 15% des Treg $CD4^+$ qui sont en réalité des Treg issus du thymus. Ces Treg comme les autres LT, recirculent entre le sang, la rate, puis migrent dans les tissus de manière active *via* des chimiokines, leurs récepteurs et les intégrines tel que CD62L (L-selectine) (Tomura, Honda et al. 2010) (Figure 16). Cependant, lors d'une inflammation, les Treg vont se différencier et exprimer fortement des récepteurs aux chimiokines inflammatoires (CCR2, CCR5, CCR4, CCR6, CCR8) (Lee et al., 2007). Ceci leur permet de migrer et d'envahir le site inflammatoire. Les Tregs activés dans ce contexte prolifèrent significativement (Tomura, Honda et al. 2010).

B. Mécanisme d'action

Plusieurs mécanismes permettant aux Tregs d'exercer leur fonction de régulation ont été proposés jusqu'à présent (figure 23) :

- De façon directe:

  - Par la sécrétion de cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10 (Groux, O'Garra et al. 1997) qui contrôle l'asthme allergique mais induit le développement des colites chez la souris (Hawrylowicz 2005);(Asseman, Mauze et al. 1999)
  - Le TGFβ (qui contrôle l'infiltration des lymphocytes T $CD8^+$ dans les îlots pancréatiques aboutissant à un délai de développement du diabète (Green, Gorelik et al. 2003); (Nakamura, Amikura et al. 2001) et IL-35 (hétérodimère Ebi3-IL-12p35) (Collison, Workman et al. 2007).

- Par la cytotoxicité directe *via* des contacts cellule-cellule d'une manière indépendante du granzyme B et de la perforine (Gondek, Lu et al. 2005).

    - De façon indirecte:

- En inhibant la fonction des CPA *via* les mécanismes dépendants de CTLA-4 et LFA-1 conduisant à une régulation négative des CD80 / CD86 sur les CPA (Onishi, Fehervari et al. 2008).
- Par l'expression dans les CPA de l'indoleamine 2, 3- dioxygénase (IDO), qui catabolise le tryptophane (Tadokoro, Shakhar et al. 2006).
- Par la consommation d'IL-2 (Pandiyan, Zheng et al. 2007) et la génération d'adénosine par les Tregs (Deaglio, Dwyer et al. 2007) qui pourraient représenter d'autres modes indirects de suppression de l'activation des lymphocytes T CD4 + induite par les Treg .

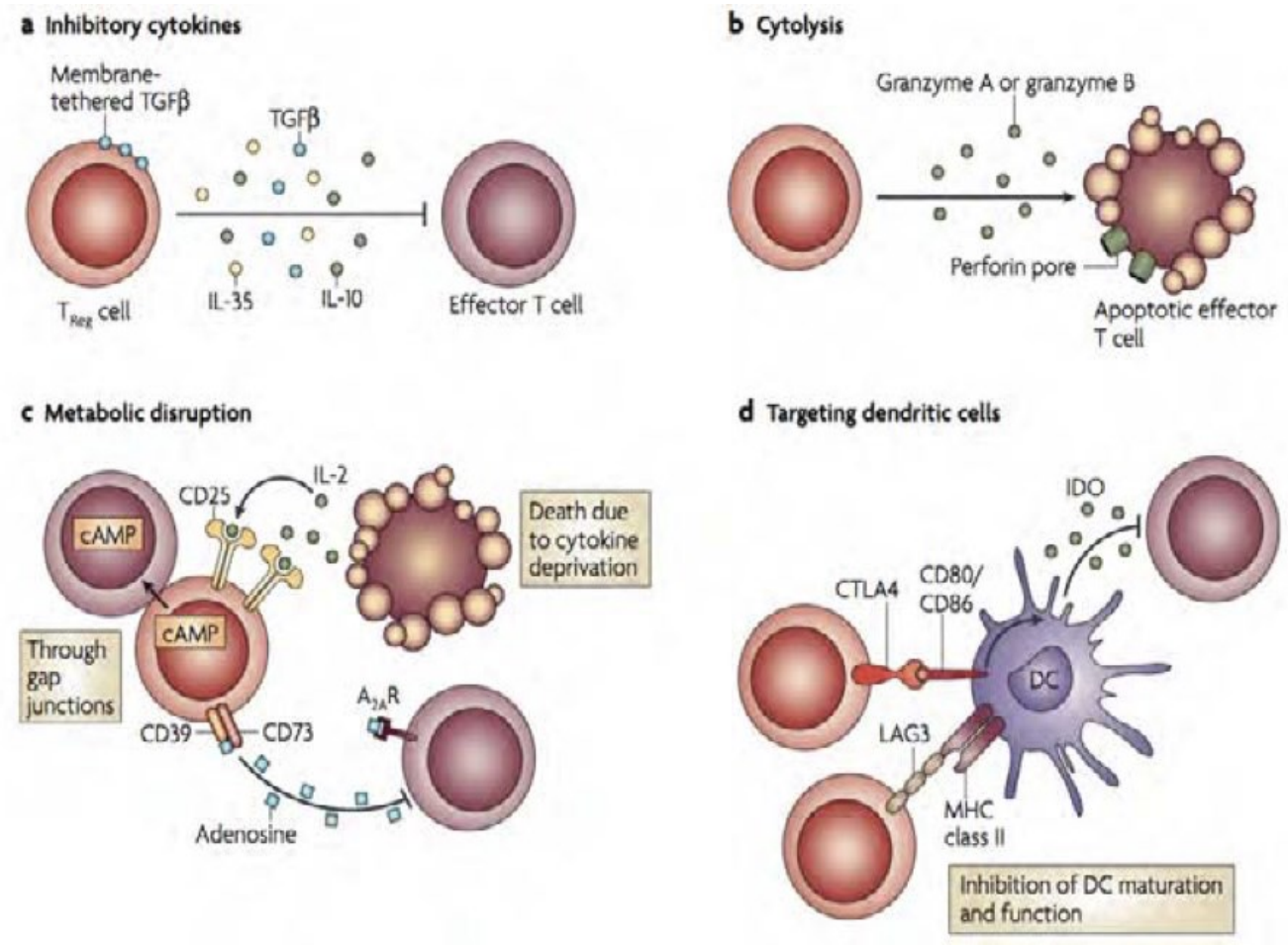


Figure 22 : Mécanismes de suppression utilisés par les Tregs CD4+CD25+. a) La sécrétion de cytokines (IL-10, IL-35, TGFb) permet aux LT régulateurs (Treg) d'inhiber l'activation des LT conventionnels. b) Les Treg peuvent également avoir une capacité cytotoxique par la production de perforines et de granzymes A ou B entrainant l'apoptose des lymphocytes T. c) Les Treg peuvent créer un environnement suppressif en déprivant le milieu en cytokines de survie, telles que l'IL-2. Elles expriment en outre les ecto-enzymes CD39 et CD73 qui génèrent de l'adénosine, nucléoside dont la concentration locale élevée inhibe les LT effecteurs activés qui expriment son récepteur $A_{2A}R$. Elles produisent également de l'adénosine monophosphate cyclique qui diffusent par les jonctions gap aux lymphocytes T liés. d) Les Treg peuvent cibler les DC par des mécanismes modulant leur activation et leur fonction. L'engagement de CTLA-4 par la DC *via* les molécules de costimulation CD80/CD86 induit la synthèse d'IDO, enzyme du catabolisme du tryptophane, qui appauvrit le milieu en cet acide aminé essentiel et libère des catabolites (comme les kinurénines). L'engagement de LAG3 *via* le CMH II inhibe aussi la maturation des DCn (d'après Vignali, 2008).

AMPc : cyclic adenosine monophosphate ; $A_{2A}R$: adenosine receptor 2 ; CTLA-4 : cytotoxis T lymphocyte antigen-4 ; DC : dendritic cell ; IDO : indolamine 2,3-dioxygenase.

C. Physiologie des cellules lymphocytes T Régulatrices

L'ensemble des mécanismes d'action cités précédemment rendent compte des fonctions physiologiques des lymphocytes T régulateurs, notamment dans le maintien de la tolérance périphérique et la prévention des maladies auto-immunes, ainsi que leur rôle dans la régulation des réponses immunes observées dans les allergies, les greffes, les cancers et les maladies infectieuses (Siri, de Boysson et al. 2012).

Leur rôle essentiel dans la suppression de l'inflammation a été démontré par leur capacité à moduler indirectement la régénération tissulaire en contrôlant les neutrophiles (Carbone, Mackay et al. 2013), en induisant la polarisation des macrophages (Lavine, Epelman et al. 2014), et en régulant les lymphocytes T auxiliaires (Dombrowski, O'Hagan et al. 2017) (Figure) Les Treg sont recrutés sur le site endommagé pour faciliter la résolution de l'inflammation et réguler l'immunité après une blessure (figure 24)(Murphy, Choileain et al. 2005).

L'efficacité des Treg lors de la transplantation a été illustrée par Hall *et al.* en 1990 qui avait noté un prolongement de la survie de greffes cardiaques après un transfert de cellules $CD4^+CD25^+$ préalablement traitées à la ciclosporine A (Hall, Pearce et al. 1990). Puis, Waldmann et al a démontré que l'utilisation d'un anti-CD4 non-déplétant permettait de transférer la tolérance d'une souris greffée du cœur vers une souris non greffée (phénomène appelé tolérance infectieuse) (Qin, Cobbold et al. 1993). Ce groupe a aussi démontré que ces cellules étaient retrouvées principalement dans le greffon (Graca, Cobbold et al. 2002), et dépendaient de la présence des alloantigènes car elles disparaissaient au bout de quelques semaines après transplantation (Waldmann and Cobbold 2001). Par ailleurs, la présence de cellules Treg permet d'inhiber les GVHD (complication redoutable des greffes de cellules souches hématopoïétiques) lors de greffes de moelle osseuse (Taylor, Noelle et al. 2001); (Cohen, Trenado et al. 2002). Lors de cette complication, les Teff compétents du donneur déclenchent une réponse immunitaire contre les antigènes du receveur. Cette réaction peut être prévenue par le transfert de Treg (Hoffmann, Levchenko et al. 2002). À ce titre, des stratégies d'induction ou de thérapies cellulaires semblent aujourd'hui prometteuses (Cohen, Trenado et al. 2002).

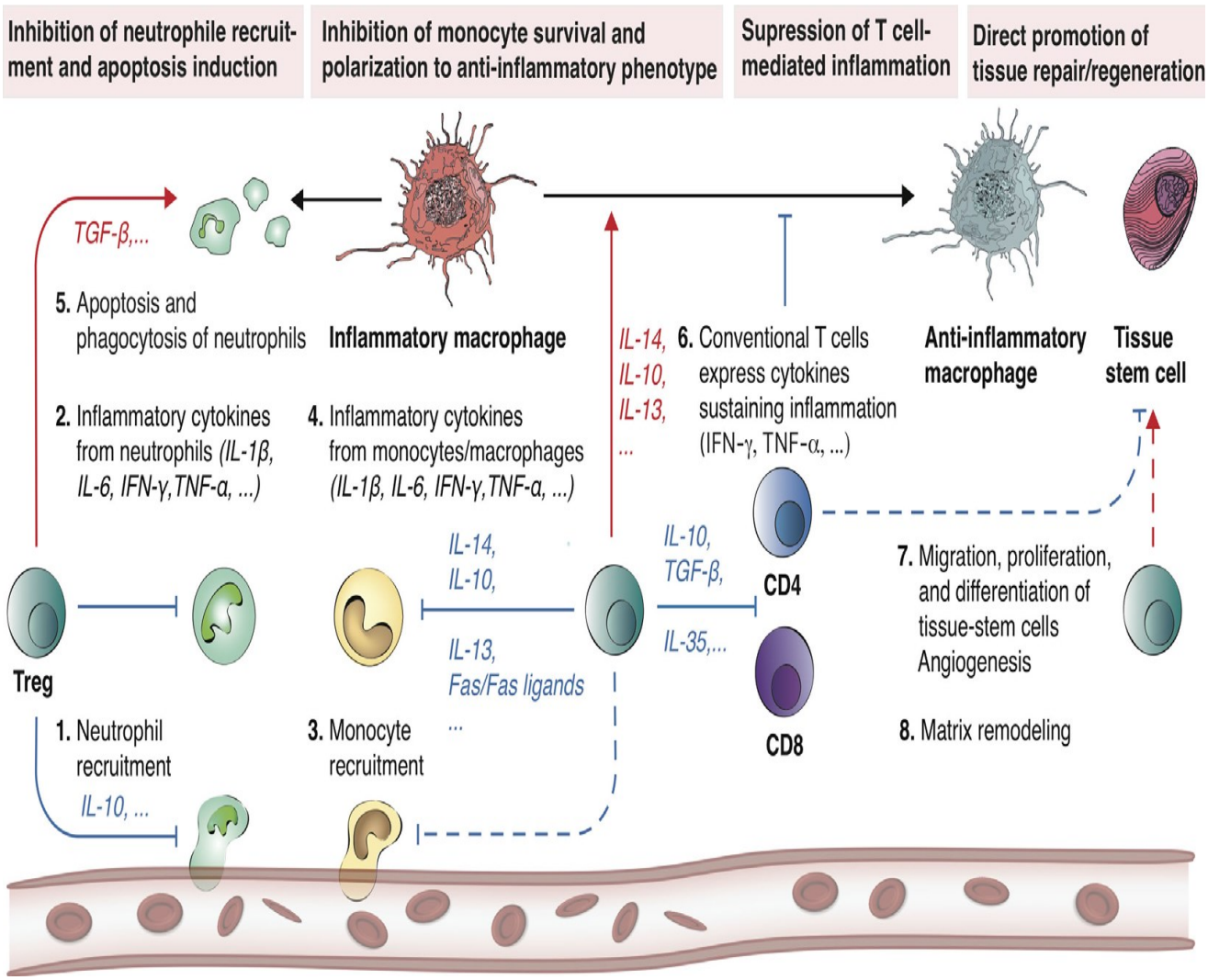


Figure 23 : Les Treg favorise la réparation et la régénération des tissus en modulant l'inflammation. Les Treg sont impliqués dans toutes ces différentes étapes. Au début de l'inflammation, Treg peut neutraliser la sécrétion de cytokines inflammatoires (par exemple, IL-6, IFN-y, TNF-a et IL-lß) en inhibant l'extravasation des neutrophiles via IL-10. Dans l'ensemble, ces mécanismes induits par les Treg entraînent l'inhibition des macrophages inflammatoires et des neutrophiles, ainsi que l'activité des lymphocytes T CD4 et CD8, qui est généralement favorable à la réparation et à la régénération des tissus. Les lignes pointillées indiquent un mécanisme hypothétique. Les flèches rouges indiquent l'induction, tandis que les flèches bleues indiquent l'inhibition (d'après Li et al, 2018).

En outre, il a été rapporté que dans plusieurs modèles d'étude d'animaux, la déplétion des Treg entraînait une perte rapide du greffon, tandis que leur transfert adoptif restaurait la survie de la greffe. Chez l'homme, la présence importante de Treg dans des biopsies ou dans les urines de patients faisant un rejet aigu de greffe de cœur ou de rein et l'observation d'un taux de Treg significativement bas dans le sang de patients ayant un rejet chronique de greffe de foie suggère d'une part que les Treg agissent en réponse à l'activité des Teff responsables du rejet et d'autre part que le résultat de la greffe (tolérance ou rejet) dépend probablement de la balance entre Teff allogéniques et Treg (P. and S. 2009).

Cependant, la distinction entre le soi et le non soi se révèle imparfaite. En dépit de la sélection thymique et des mécanismes périphériques visant à contrôler les lymphocytes autoréactifs, la tolérance immunitaire peut être rompue, aboutissant alors à l'activation de lymphocytes auto-réactifs et à l'apparition de maladies auto-immunes (Kouskoff, Korganow et al. 1996). L'auto-immunité traduit donc l'absence de rétrocontrôle.

La rupture de tolérance peut être favorisée par un contexte infectieux ou inflammatoire. Ainsi, des lymphocytes présentant une faible affinité pour un auto-antigène peuvent s'activer s'ils rencontrent des cellules dendritiques activées présentant cet antigène et de forts signaux de co-stimulation ou encore si ces auto-antigènes sont également des ligands pour les TLR (Mondino, Khoruts et al. 1996).

La rupture de tolérance peut être favorisée par la présence anormale et/ou en quantité importante d'un auto-antigène habituellement présent dans un site privilégié. Cette situation peut être observée suite à la rupture traumatique ou d'origine infectieuse d'une barrière naturelle, ou par nécrose tissulaire.

La rupture de tolérance peut être également induite par un dysfonctionnement des cellules T régulatrices pouvant être à l'origine du développement de maladies auto-immunes, parfois graves et invalidantes (Mondino, Whaley et al. 1996).

Introduction générale aux travaux de recherche

Les rejets de greffe d'organes (peau, coeur, rein,…) liés à l'incompatibilité tissulaire entre le donneur et le receveur demeurent un problème important et difficile. Et même si les traitements immunosuppresseurs se sont révélés efficaces pour le succès des greffes ces dernières années, il n'en demeure pas moins qu'ils impliquent la suppression du système immunitaire qui rend le patient vulnérable à de nombreuses infections.

Après une greffe de peau par exemple, les réactions immunitaires peuvent parfois être délétères car le système immunitaire va reconnaitre le greffon comme un élément du non-soi et donc développer des mécanismes efficaces pour détruire ces éléments qui lui semblent étrangers.

Parmi ces composants de l'immunité cutanée, on distingue les mastocytes qui sont connus pour leur implication principale dans les réponses immunitaires associées aux allergies. En effet après leur contact avec l'allergène, ils libèrent des médiateurs inflammatoires comme l'histamine par un processus appelé la dégranulation. L'histamine provoque une vasodilation importante des vaisseaux facilitant le passage des cellules circulant dans le sang vers les tissus ayant subi une lésion.

Les mastocytes jouent donc un rôle critique dans l'immunorégulation des réponses innées. Ils peuvent ainsi positivement contrôler les réponses immunes associées aux inflammations de types infectieuses ou allergiques et c'est d'ailleurs ce qu'a démontré le laboratoire d'accueil dans une précédente étude. Effectivement, les mastocytes en sécrétant de l'IL-4 étaient capables d'abroger la capacité qu'ont les macrophages résidents à phagocyter les bactéries afin de les éliminer dans un modèle inflammatoire aigu de sepsis.

Cependant, les mastocytes jouent aussi un rôle dans l'immunorégulation des réponses adaptives. C'est par exemple le cas dans la tolérance de greffe où l'équipe de Noëlle a démontré que les mastocytes par des contacts directs et la sécrétion de l'IL-9, influence et renforce les propriétés immunosuppressives des cellules T régulatrices afin de prolonger la tolérance des allogreffes de peau. Malgré le fait que cette équipe de recherche et d'autres aient respectivement observé un rejet de la greffe en présence de mastocytes dans des conditions non tolérantes et une accumulation de ces cellules dans les greffes, leur fonction en transplantation est mal caractérisée.

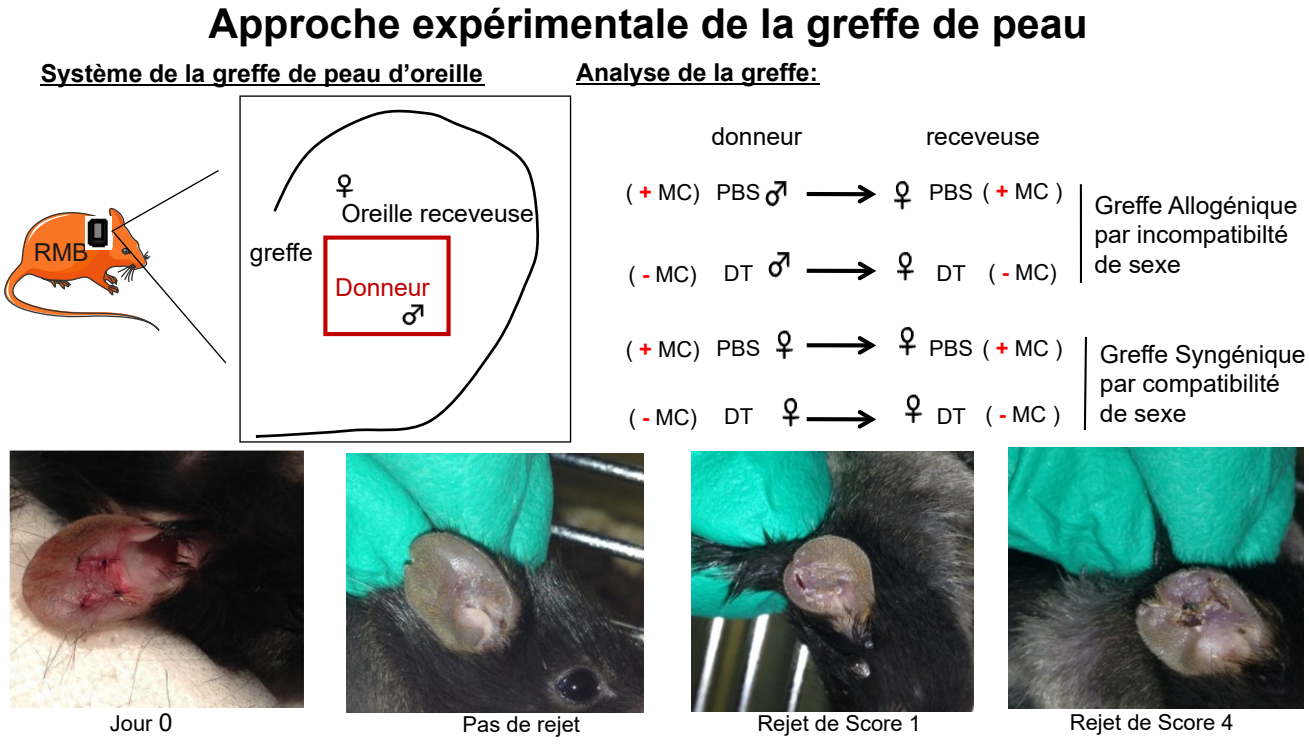
Puisque les mastocytes forment un important réseau dans le tissue cutané, nous avons voulu savoir s'ils étaient véritablement impliqués dans le rejet de greffe de peau et par la suite évaluer leur rôle dans les rejets de greffe de peau afin de comprendre les mécanismes innés inflammatoires qui s'organisent autour du rejet.

Pour ce faire, le modèle de souris RMB développé par le laboratoire nous a permis de mettre en place un modèle de greffe de peau induisant le rejet. En effet, l'incompatibilité de sexe entre les femelles et les mâles provoque un rejet du greffon ce qui permet une démarche scientifique pour l'étude des rejets d'organe.

Dans cette étude, nous avons observé que les mastocytes contribuent au rejet rapide des allogreffes de greffe car le rejet était accéléré en leur présence et retardé en leur absence. Ce rejet accéléré était dû à une sécrétion importante de chimiokines et de cytokines inflammatoires associée à la migration rapide de cellules immunitaires au niveau de la greffe, indiquant que les mastocytes influencent certains aspects biologiques de ces cellules immunitaires.

Par la suite nous avons cherché à caractériser les mécanismes permettant aux mastocytes d'intervenir dans le l'allorejet de greffe de peau. Ainsi, malgré l'implication certaine d'autres facteurs, la dégranulation mastocytaire influence le recrutement des cellules du système immunitaire qui définira le devenir de l'allogreffe de peau.

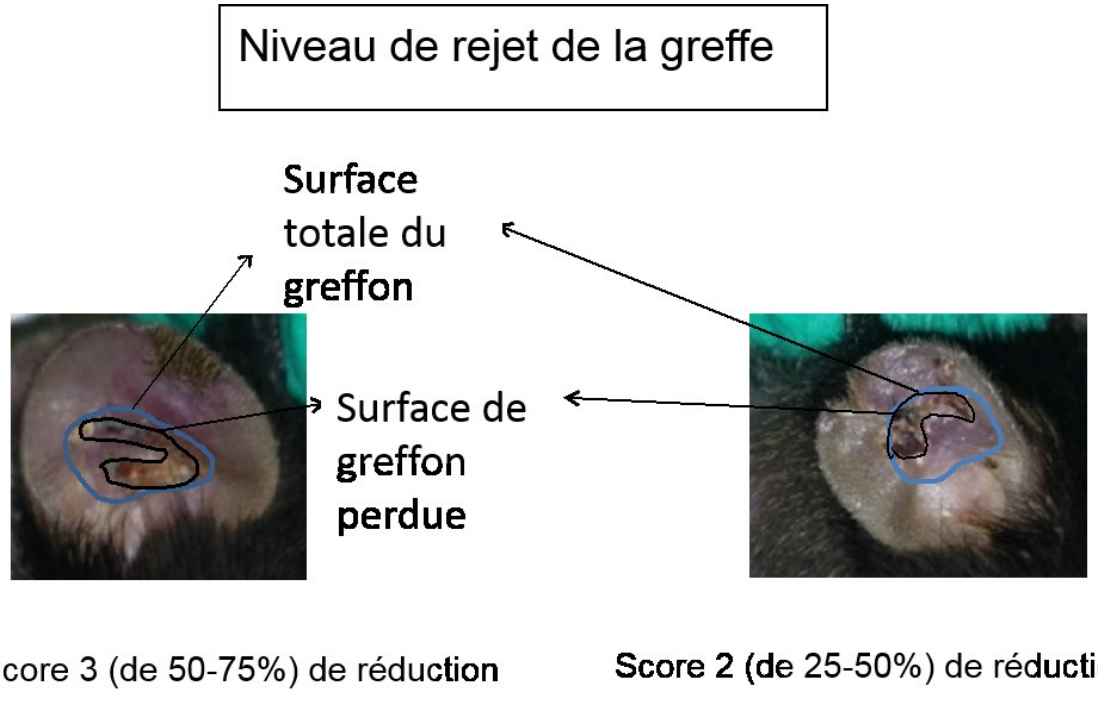
D'autres investigations en cours permettront de mieux caractériser les mécanismes immunitaires supplémentaires associés au rejet de la greffe de peau.



Description de la greffe de Greffe de peau d'oreille et évaluation du rejet

Le modèle de rejet d'allogreffe d'oreille réalisé repose sur un système d'incompatibilité de sexe entre les souris mâle donneuse (exprimant l'antigène d'histocompatibilité mineure H-Y) et les souris femelle receveuses comme décrit précédemment (Celli et al., 2011a, Simpson et al., 1997). Brièvement, des souris donneuses femelles (syngéniques) ou mâles (allogénique) ont été euthanasiées et un morceau de peau de 5 x 5 mm comprenant l'épiderme et le derme, mais pas le cartilage du donneur, du côté ventral de l'oreille a été retiré et placé dans une solution saline froide. Les femelles receveuses syngéniques ou allogénique ont été anesthésiées et un morceau de peau de taille identique à celui du donneur (5 × 5 mm épiderme, derme) du côté ventral de l'oreille a été remplacé par celui du donneur allogénique ou syngénique. Nous avons appliqué quatre points de suture (8/0 Dexon, Davis et Geck) pour maintenir la greffe.

Les greffes ont été contrôlées pendant 35 jours pour évaluer le rejet et ont été considérées rejetées lorsque 80% de la greffe originale avait disparu ou était devenue nécrotique.



RESULTATS

Mast cell degranulation exacerbates skin rejection by enhancing neutrophil recruitment

Flavie Ngo Nyekel[1,2,3], Emeline Pacreau[1,2,3], Samira Benadda[1,3], Rascha Nsallam[4], Magnus Abrink[5], Gunnar Pejler[6], Jean Davoust[4], Marc Benhamou[1,2,3], Nicolas Charles[1,2,3], Pierre Launay[1,2,3], Ulrich Blank[1,2,3]*, Gregory Gautier[1,2,3]*

[1]INSERM UMRS 1149, Paris 75018, France; [2]CNRS ERL8252, [3]Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire d'excellence INFLAMEX, Paris 75018, France; [4]Institut Necker Enfants Malades, INSERM U1151, CNRS, UMR8253, Faculté de Médecine, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 75743 Paris, France. [5]Section of Immunology, Dept. of Biomedical Sciences and Veterinary Public Health, Swedish University of Agricultural Sciences, VHC, Box 7028, 75007 Uppsala, Sweden; [6]Department of Anatomy, Physiology and Biochemistry, Swedish University of Agricultural Sciences, 750 07 Uppsala, Sweden

Running title: Mast cells in skin transplantation

Corresponding author: Ulrich Blank and Gregory Gautier Inserm UMRS-1149, Université Paris 7, Faculté de Médecine Denis Diderot, Site Xavier Bichat, 16 rue Henri Huchard, 75780 Paris Cedex 18. Tel: +33 (0)1 57 27 73 45, Fax: +33 (0)1 57 27 76 61, email: ulrich.blank@inserm.fr and gregory.gautier@inserm.fr

Summary

Here we investigate the role of mast cells (MC) in a male to female skin allograft rejection model using RMB mice enabling their conditional depletion. Kinetic analysis showed that MC markedly accelerate skin rejection. MC induce an inflammatory response releasing histamine and MCPT4 chymase and boost local synthesis of KC, MIP-2 and TNF. This enhances early neutrophil infiltration when compared to a female-female graft-associated repair response. The uncontrolled neutrophil influx accelerates rejection as antibody-mediated depletion of neutrophils like for MCs delays skin rejection. No marked MC-dependent differences were seen in T cell or monocyte/macrophage infiltration, while B cells showed a late increase in skin allografts in the absence of MCs. Administration of cromolyn, a MC stabilizer and to a lesser extent ketotifen, a histamine type I receptor antagonist, and absence of MCPT4 chymase also delayed graft rejection. Together our data indicate that the acute MC-associated inflammatory response accelerates graft rejection via their ability to promote an enhanced neutrophil infiltration.

Introduction

Many chronic diseases have in common severe tissue destruction with solid organ or tissue transplantation often representing the unique solution to avoid end stage organ failure (Lechler, Sykes et al. 2005). Transplantation is now possible for many organs (heart, lung, liver, pancreas, kidneys) and tissues (skin, heart valves, cornea etc) enabled by the use of potent immunosuppressive drugs to maintain immunological tolerance (Turka and Lechler 2009). Yet, they are associated with severe side effects increasing tumor incidence, susceptibility to infections and chronic graft inflammatory processes. While T cell and Antibody (Ab)-mediated rejection mechanisms have been known for long as the prime actors (Lin and Gill 2016), new evidences show that tissue inflammatory responses as well as the immunological environment including NK cells, dendritic cells, monocytes/macrophages, neutrophils and eosinophils can importantly impact allograft acceptance and/or destabilize an established tolerant state (Goldman, Le Moine et al. 2001, Liu and Li 2010, Chong and Alegre 2012, Scozzi, Ibrahim et al. 2017). These findings of high clinical relevance advocate for novel strategies to minimize local inflammation in engrafted tissues.

Skin allografting is performed in case of injuries, burns or other illnesses of the skin to overcome the loss of the skin protection. It requires an extraction of a donor skin surface area in order to transplant it onto another skin zone of the recipient. This is generally linked to a strong inflammatory and immune response that significantly compromises graft survival even in the presence of immunosuppressive treatments (Jones, Turvey et al. 2001, Benichou, Yamada et al. 2011). During this response, granulocytes, macrophages, T cells and dendritic cells (DCs) infiltrate the graft releasing proinflammatory cytokines and angiogenic factors. Concomitantly, donor DCs migrate from the graft to the recipient's secondary lymphoid organs to present donor antigens

and elicit an adaptive immune response (Benichou, Yamada et al. 2011, Hautz, Wolfram et al. 2012).

Mast cells (MC) are widely predominant immune cells in the skin (Metz, Siebenhaar et al. 2008). They contribute to host defense against pathogens via the innate immune system involving many different receptors (Abraham and St John 2010, Redegeld, Yu et al. 2018). They also participate in adaptive responses protecting the host from parasites, venoms and other noxious substances via an IgE-mediated recognition (Mukai, Tsai et al. 2016). In allografting it has been noted early on that MC numbers increase both during the acute and chronic rejection phase in various organs (Jahanyar, Koerner et al. 2008). Previous data showed that they represent essential intermediates in inducing tolerance in a graft protocol under tolerizing conditions. This involved their ability to support regulatory T cell function (Lu, Lind et al. 2006) by increasing tolerogenic DC in draining lymph nodes through the release of GM-CSF (de Vries, Pino-Lagos et al. 2011), tryptophan hydroxylase-1 (Tph-1) creating a nutrient-stressed environment that favors allograft tolerance (Nowak, de Vries et al. 2012). Although known to accumulate in grafts, their function in transplantation under non-tolerizing conditions is poorly characterized. One study reports a protective role in a rat cardiac allograft model (Boerma, Fiser et al. 2007), while others did not notice significant differences in acute or chronic rejection (Itoh, Nakae et al. 2010). Besides rejection, MC have also been associated with ischemia reperfusion injury in various organs (Yang, Ma et al. 2014), which is known to represent a common complication in transplantation due to the prolonged ischemia time of the transplanted organ. MC are known to exert their proinflammatory action by rapidly secreting mediators stored preformed in cytoplasmic granules by degranulation (Blank, Madera-Salcedo et al. 2014). These have potent effects in tissues including the well-known effect of histamine on the vasculature or of

MC-specific proteases in remodeling (Wernersson and Pejler 2014). The initial burst of degranulation is followed by the *de novo* secretion of additional mediators such as prostaglandins and leukotrienes (Boyce 2007) as well as a vast array of cytokines and chemokines further enhancing the inflammatory response but also fulfilling immunoregulatory functions that bias the way other immune cells behave within the inflammatory network (Boyce 2007, Mukai, Tsai et al. 2018).

To test the implication of MC in skin grafting under non-tolerizing conditions, we have set up a skin graft model where C57BL6 male male-specific (H-Y) histocompatibility minor transplantation antigen donor ear skin is grafted to the ventral side of a female recipient's ear (Simpson, Scott et al. 1997, Celli, Albert et al. 2011). In this model rejection of H-Y disparate skin, besides CD8 cytotoxic T cells can also be accomplished by CD4 effector T cells, likely through the help of antigen-nonspecific innate effector cells (Zelenika, Adams et al. 1998). In this model ischemia reperfusion injury is minimized as grafting is performed rapidly (less than 15 min). We used our Red Mast cell and Basophil (RMB) mouse model that allows visualization and conditional depletion of MC (Dahdah, Gautier et al. 2014). In contrast to c-kit dependent models of MC deficiency it is not associated with any other hematopoietic abnormalities with the exception of basophils. However, basophils become rapidly replenished within 6 days, while this takes considerably more time for MC providing a specific time window for the analysis of MC.

Using this approach we show that MC accelerate graft rejection through an innate mechanisms involving their ability to enhance neutrophil extravasation after degranulation and neutrophil chemotactic responses within engrafted tissues.

Results

Mast cells accelerate graft rejection in the skin

To investigate MC function in skin grafting, we took advantage of our RMB mice, which allow diphtheria toxin (DT)-mediated ablation of MCs and Basophils (Ba) as well as their visualization via the bright red td-Tomato (tdT) fluorescent protein (Dahdah, Gautier et al. 2014). We initially verified the efficient depletion of tdT-positive MCs in the skin after systemic and local injections starting 12 days before the intended surgery to allow Ba replenishment according to the protocol depicted in Fig. 1A. Analysis of the fraction of tdT/c-kit positive cells isolated form the skin at the day 0 showed a > 95% depletion while at this time point tdT/CD49b-positive blood basophils were completely replenished (Fig. 1B) as described before (Dahdah, Gautier et al. 2014) generating *de facto* MC-only depleted mice. Follow up quantification using confocal imaging confirmed that MCs remain substantially depleted up to 11 (< 20%) and even at D33 less than half of the compartment had been replenished in the skin (Fig. 1C).

We next undertook skin allograft surgery using the sex-mismatch H-Y minor transplantation antigen donor ear skin model (Simpson, Scott et al. 1997, Celli, Albert et al. 2011). An example of our scoring strategy of graft-survival is shown in Fig. 2A. Kinetic experiments in the presence or absence of MCs in both donor and host skins were performed (Fig. 2B). While sex mismatched ear skin graft rejection occurred rapidly (median survival time (MST) ~ 6 days) in the presence of MCs (PBS injected mice), there was a marked delay (MST ~ 15 days) in the absence of MCs (DT injected mice). No differences were seen in the case of sex matched grafts, which were readily accepted whether MCs were present or not suggesting that MC were not essential for graft acceptance (Fig. 2B). We also analyzed whether MCs in either host or donor alone could influence the rejection profile. Depletion of MCs in the host alone (Male PBS $\rightarrow$ Female DT) did not significantly impact the delay of rejection as compared to the situation where both graft and donor (Male DT $\rightarrow$ Female DT) were depleted of MCs indicating a dominant role of the host MCs (Fig. 2C). By contrast, only a slight delay in rejection was observed when MCs were present in the host but absent in the donor's skin (Male DT $\rightarrow$ Female

PBS), as rejection reached its plateau phase at later time points (Day 18 versus Day 21) indicating that graft MCs can also somewhat contribute to the acceleration of rejection (Fig. 2C). Taken together these data show that MCs significantly accelerate graft rejection with a major contribution exerted by host MCs in recipient ear and a minor contribution by donor ear skin MCs.

MCs impact the immune cell infiltrate in the ear and the draining lymph nodes after grafting.

As MCs have a major impact in the graft response, we analyzed whether their numbers changed after grafting using flow cytometry analysis following tissue extraction. We chose Day 2 and 6 after grafting corresponding, respectively to the phase just preceding visible rejection as well as the exponential phase where rejection was maximal (see Fig. 2B). Figure 3 shows that MC numbers significantly increased at Day 2 in both matched and mismatched grafts as compared to non-grafted tissue supporting early MC recruitment and/or proliferation at the inflammatory site. No significant differences were seen between matched and mismatched grafts suggesting that it occurred independent of the status of the graft. At D6 the MC decreased again rejoining MC numbers in steady state tissue both in matched and mismatched grafts. This supports a transient increase of MC infiltration triggered at the initiation of the inflammatory reaction after grafting. As expected, MC numbers were and remained barely detectable in ears from DT-treated mice.

As MCs are known to drive immune cell recruitment during inflammation (Metz, Grimbaldeston et al. 2007, Mukai, Tsai et al. 2018), we analyzed the immune cells in the ear and in the draining lymph nodes using flow cytometry in MC-sufficient or MC-deficient mice (Fig. 4). We focused on neutrophils, monocytes and macrophages for the myeloid lineage as well as B and T cells for the lymphoid lineage. In addition, Foxp3 positive regulatory cells were analyzed using RMB mice crossed with Foxp3-eGFP mice. Most strikingly, while essentially no neutrophils were detected in non-grafted tissue, at Day 2 we found a marked and significant increase of infiltrated neutrophils both in matched and mismatched grafts (Fig. 4 panel neutrophils). The increase in

neutrophils was significantly majored in mismatched grafts in the presence of MCs while in matched grafts no differences were seen between MC-sufficient or MC-deficient mice. Furthermore, the increase in neutrophils was transient as both their numbers strongly declined (between 50 and 200 fold) at Day 6 independent of whether MCs were present or not in matched and mismatched ear grafts (Fig. 4, panel neutrophils). However, the ratio of neutrophil infiltration reversed at Day 6 being now higher under mismatch conditions in the absence of MC. They also were more elevated as compared to match conditions supporting an active role of neutrophils in the inflammatory response in allogenic grafts and an active role of MCs in their recruitment .

We also observed a sizable infiltration (3 to 15-fold) of monocytes and macrophages at Day 2 both in matched and mismatched grafts as compared to non-grafted tissue (Fig. 4, panels monocytes and macrophages). In mismatched grafts, while the MC status did not significantly impact macrophage infiltration, the appearance of monocytes was decreased when decreased in the presence of MC in sex-mismatched grafts supporting a protective function. For both monocytes and macrophages the presence of MCs led to a decrease of both populations under mismatch versus match conditions supporting a possible role in repair functions. This profile remained essentially the same at Day 6 with no major changes in total numbers (Fig. 4, panels monocytes and macrophages).

B cell recruitment to local skin grafts increased at Day 2 except for mismatched conditions in the absence of MC where it was less pronounced (~ 2-fold) (Fig. 4, panel B cells).The recruitment was higher in the presence of MC in mismatched grafts while they were similar in the case of matched grafts. At Day 6 all B cells returned to baseline levels reaching levels of non-grafted tissue except for the mismatched graft where a strong increase in the absence of MC was observed supporting a regulatory role of MCs under these conditions (Fig. 4, panel B cells). Concerning T cells, their numbers also increased in the graft as compared to non-grafted tissue at D2 and stabilizing at Day 6 (Fig. 4, panel T cells). Under mismatch conditions in the absence of MC we observed, however, a slight delay at Day 2 as compared to matched conditions. The difference to the presence of MC was, however, not statistically significant (Fig. 4, panel T cells).

Concerning Foxp3-positive cell recruitment (Fig. 4, panel Foxp3) it was minor at Day 2, and appeared elevated only in the presence of MCs in the case of matched graft, but not mismatched grafts. However, at Day 6 a large increase in Foxp3-positive infiltration was noted with no significant differences being apparent between the various categories.

We also analyzed draining cervical lymph nodes (dLN) after graft transplantation (Fig 5). In the dLN MC did not influence the immune cell infiltrate under sex-matched conditions as no significant differences between the presence or absence of MC were observed neither at Day 2 nor at Day 6. Likewise, no differences were seen between sex-matched and sex-mismatched conditions except for B cells (see below). The absence of MC under mismatch conditions led to a reduced accumulation of monocytes and Foxp3-positive cells (Fig. 5, panels, monocytes and Foxp3). These differences were lost at Day 6. Concerning B cells, while no differences were seen at Day 2, we found a relative deficiency in the presence of MC at Day 6 between matched and mismatched conditions as well as under sex-mismatched conditions when comparing MC-sufficient and MC-defient mice (Fig. 5, panel B cells).These data indicate that the impact of MC on the dLN is relatively minor, albeit some influence on monocyte, Foxp3-positive cell and B cell populations can be noted.

Taken together, we found that MC promote a highly prominent local infiltration of neutrophils into both syngenic and allogenic ear skin grafts at Day 2, which essentially disappeared at Day 6. In syngenic grafts this infiltrate was independent of the MC status, while in allogenic grafts their infiltration being clearly MC-dependent being two-fold higher than in matched grafts. Some differences were also seen for some other populations, however, changes in numbers were minor as compared to the early neutrophil infiltration.

MC promote enhanced production of several cytokines and chemokines in the early phase after grafting.

To assess how MC could influence the graft-associated inflammatory response, we monitored several pro-and anti-inflammatory chemokines and cytokines focusing on those expressed locally in the graft area using qRT-PCR (Fig. 6). They include cytokines described for their role

in allograft rejection (IL6, IL10, TGFβ) (Pribylova-Hribova, Kotsch et al. 2006, Shen and Goldstein 2009, Chae, Kim et al. 2018) or their role in MC activation (IL33, thymic stromal lymphopoetin or TSLP) (Carpentier, Chappert et al. 2013, Saluja, Zoltowska et al. 2016) and neutrophil chemotaxis and activation (MIP2, KC, TNF) (Kobayashi 2006). Concerning graft-relevant cytokines, at Day 2 we observed a significant increase in IL6 and IL10 in grafted versus non-grafted tissues that was slightly favored by MCs in the case of IL6 both under matched and mismatched conditions, while TGFβ mRNA levels were not different (Fig. 6A). At Day 6, IL6 mRNA levels returned to non-grafted baseline levels under matched conditions. Under mismatch conditions, they remain elevated, albeit at lower levels, independentl of the presence of MC. Concerning IL10 and TGFβ, levels were comparable to those at Day 2.

Concerning the MC-activating cytokines at Day 2, we found a strong increase in TSLP (~10 fold) as compared to non-grafted tissue under both match and mismatch conditions (Fig 6B). This increase was further enhanced in the presence of MCs under mismatch conditions (~80 fold). At Day 6, levels remained elevated under matched conditions independently of the MC status. Under mismatch conditions TSLP further increased in the absence of MC, but decreased markedly in their presence with level being significantly lower than in the absence of MC (Fig. 6B) This suggest that TSLP is an important inflammatory cytokine under mismatched conditions that is particularly boosted by MC at the initial phase of grafting. IL33 showed a tendency to increase after grafting especially at Day 6, while this was not evident at Day2 (Fig. 6B). Yet, we saw some differences between the presence or absence of MC. The latter supported MC-dependent IL33 production in the early phase, while in the later phase at Day 6 this was reversed.

For the neutrophil attracting chemokines/cytokines (Fig. 6C), we observed a strong induction in the early phase for KC, MIP2 and TNF both under matched and mismatched conditions. While no differences were seen between the absence or presence of MC under matched conditions in this early phase, MC clearly supported KC, MIP2 and TNF mRNA induction under mismatch conditions, in accordance with the amount of neutrophils recruited locally. At Day 6, levels

declined strongly for KC (reaching values of non-grafted tissue), moderately for MIP 2 and slightly for TNF and the noted MC-dependent differences under mismatch conditions disappeared (Fig. 6C).

Together these data indicate that the presence of MC significantly enhances several cytokine and chemokine mRNA levels especially during the early phase of allografting supporting an important contribution to the acute inflammatory response. The most striking differences were observed for the MC activating cytokine TSLP as well as for the neutrophil attracting chemokines/cytokines KC, MIP-2 and TNF.

Neutrophils are important actors in early graft rejection.

The data above show that the MC initiated inflammatory response in mismatch conditions leads to neutrophil infiltration that is largely increased as compared to syngenic grafts (Fig. 4, panel neutrophils). Therefore, we sought to determine whether the MC-promoted neutrophil-driven inflammation directly contributes to graft rejection. This was analyzed by undertaking neutrophil depletion experiments. Preliminary experiments established that, as reported before (Porcherie, Mathieu et al. 2011), neutrophils were essentially depleted 24h after ip administration, but reappeared at Day 4 requiring a second injection of antibody to maintain depletion (Fig 7A). Applying this depletion protocol to a male to female graft our data followed for nine days shows that neutrophil depletion significantly retards rejection, indicating the contribution of neutrophils to acceleration of graft rejection (Fig. 7B).

Mast cell degranulation is a key event for early graft rejection

Previously, Lu et al reported that degranulation by MC could break an established tolerant state in an experimental model where skin grafts were rendered tolerant albeit the precise mechanism was not investigated (Lu, Lind et al. 2006). Given that the presence of MC strongly affected the early inflammatory response, we surmised that MCs might exert their pro-inflammatory activity during the early phase of allografting through their degranulation. We therefore examined whether MC in the grafted tissue exhibited a degranulated phenotype after allografting. As depicted in Fig. 8, MC degranulated significantly more in grafted tissue as compared to non-

grafted tissue. As this degranulation was observed within 6 h after allografting, we examined whether their implication in the acute inflammatory response during grafting is responsible for the observed delay in rejection. To test this, we depleted MC after the acute inflammatory phase (i.e. at Day 2 after allografting). As shown in Fig. 9A, when MC were depleted locally by a subcutaneous local injection two days after grafting, the delay in rejection in the absence of MC was abolished supporting that MC enhance rejection during the acute inflammatory phase, likely due to their ability to release many vasoactive and proinflammatory compounds by degranulation. To test this directly, we analyzed whether blocking MC degranulation or certain MC degranulation products could impact the rejection profile. As shown in Fig. 9B treatment with cromolyn, a known MC degranulation blocker (Muto, Wang et al. 2014), before and after grafting led to a marked delay in graft rejection supporting that MC preformed mediator release (ie degranulation) contributes to graft rejection. Treatment of mice with Ketotifen, an antagonist of the histamine type 1 receptor (known to be expressed on the vasculature (Habibi Asl, Vaez et al. 2014), also induced a slight delay, albeit the effect was less pronounced than with cromolyn (Fig. 9C). MCPT4, a MC-released chymase expressed in skin MCs, is a known chemoattractant for neutrophils (He and Walls 1998, Tani, Ogushi et al. 2000). We next performed allografting in MCPT4-deficient mice. Here also, rejection was slightly but significantly delayed in the absence of MCPT4 when compared to wild type mice (Fig. 9D). Again, the delay was less pronounced than after cromolyn treatment (Fig. 9B).

Together, these data support that MC accelerate rejection of allografts by driving an acute inflammatory response after degranulation. The fact that testing of individual granule-contained mediators had a partial effect when compared to the degranulation blocker cromolyn supports that it is likely the combined action of several MC degranulation products, which is necessary to more profoundly delay the graft rejection.

Discussion

Although adaptive immunity has been recognized and studied for decades for their role in graft rejection, recent studies support also a role of innate immunity (Liu and Li 2010). Besides orchestrating the adaptive immune response, it can promote a graft inflammatory response that may itself contribute to the initiation of rejection events leading to the destruction of grafted tissue (Wood and Goto 2012). In this study, we have set up a skin allograft model to investigate the functional contributions of MCs to rejection. Skin allografts are at the lower end of graftable tissue even under conditions of immunosuppression due to the pronounced graft-associated inflammatory response and to the low numbers of effector T cells required for rejection (Mason, Mottram et al. 1988, Jones, Turvey et al. 2001, Benichou, Yamada et al. 2011). Using a sex-mismatched allograft protocol, our findings support a crucial role of MCs in the acceleration of rejection by promoting an early inflammatory response after degranulation. It also involved their ability to promote the synthesis of neutrophil attracting chemokines/cytokines. This led to an important unbalanced neutrophil infiltration known to participate in the initiation of tissue destruction in allografts (Scozzi, Ibrahim et al. 2017). Therapeutic strategies aimed at the stabilization of MCs using cromolyn that blocks degranulation (Bernstein 1985) also decreased the rejection rate. This effect was partial when individual mast cell mediators such as histamine or mast cell chymase MCPT4 were blocked supporting that MCs enhanced rejection through the release of a diverse set of mediators released through degranulation.

MCs are highly prominent inflammatory effectors in the skin accounting for > 400 cells /mm^2 (see Fig.1). Moreover, independent data indicated that MCs could represent important effectors in the graft associated inflammatory response and hence contribute to graft rejection. Indeed, it was reported that MCs readily increase after grafting both in acute and chronic graft in different tissues (Yamada, Ueda et al. 2001, Zweifel, Hirsiger et al. 2002, Blank, Essig et al. 2007, Arikan, Nart et al. 2008, Jahanyar, Koerner et al. 2008). This is also confirmed by our data that show an enhanced presence of MCs shortly after grafting in the grafted ears at Day 2. This increase in MC numbers was transient since at Day 6 numbers reached again baseline levels.

Analysis of their degranulation status clearly showed that rapidly after allografting, a sizable fraction of MCs become activated as revealed by their degranulated phenotype. Presently, the mechanism of activation remains unknown. However, given their large panoply of expressed cell surface receptors and the strong inflammatory response associated with grafting it is likely that multiple activation pathways may be implicated (Redegeld, Yu et al. 2018). In agreement, we measured a strong increase of TSLP (> 80-fold) and to a minor extend (>2-fold) of IL33 in the case of mismatched grafts. Although, this was MC-dependent these cytokines are likely released by keratinocytes and epithelial cells known to be strong producers of these cytokines in skin-associated inflammatory responses (Saluja, Zoltowska et al. 2016). Both cytokines are known to represent important MC activators supporting an amplification loop between tissue-associated inflammatory events and MCs (Saluja, Zoltowska et al. 2016).

One of the important consequences of grafting was the rapid and massive infiltration of neutrophils at Day2. Several previous studies showed that neutrophils directly contribute to graft rejection via an innate immune response through their capacity to produce large amounts of oxidative species, myeloperoxidase as well as proteases with cytotoxic effects (Scozzi, Ibrahim et al. 2017). The influx in neutrophils was highly prominent during the early phase after grafting buttransient as their numbers largely dropped by 50 to 200-fold at Day 6 in transplanted ears. Interestingly, a strong and transient neutrophil infiltration was also observed in matched grafts in a MC-independent manner. These data suggest first that neutrophil recruitment on the grafting site does not predict the outcome of the transplantation and second, that they might also contribute to graft repair mechanisms by a MC-independent mechanism. Indeed, recent data provided evidence for a contribution of neutrophils to repair in sterile inflammation performing critical tasks such as dismantling injured vessels and creating channels for new vascular regrowth (Wang, Hossain et al. 2017). Of note, we clearly confirmed the role of neutrophils in the acceleration of mismatched graft rejection as their selective antibody-mediated depletion led to a significant delay in this process. Therefore, neutrophil infiltration needs to be tightly controlled to favor repair and limit pro-inflammatory pathologic consequences. In agreement, our data show that in the case of mismatched grafts, neutrophil infiltration further increases as

compared to matched grafts by a MC-dependent mechanism. In addition, in mismatched grafts an about five-fold increase in neutrophil infiltration was noticed in the presence of MCs as compared to their absence supporting that it is the unbalanced neutrophil influx, which contributes to graft rejection. The involvement of neutrophils in the rapid rejection supports that this process can at least partially be mediated directly by innate immune cells (MCs and neutrophils) controlling the extent of the inflammatory response. This notion is also supported by our data, which did not reveal significant differences in T cells between the various groups (matched versus mismatch; absence versus presence of MCs) at the early time points of rejection up to Day 6. Likewise, we did not observe major differences in Foxp3-positive cell infiltration except for the early stage at Day 2 where more cells were seen in the presence of MCs. However, it is unlikely that at this stage their presence is due to an adaptive response but seems rather triggered by MC released factors, possibly IL-2 (Hershko, Suzuki et al. 2011). Concerning B cells we rather saw a decrease in the presence of MCs at the later stages (Day 6) supporting that MCs do not influence the B cell effector response under these conditions. Some differences were also seen for monocytes and macrophages either in the graft or in draining lymph nodes again supporting possible innate functions. However, presently we did not investigate the functional significance of these differences.

Concerning the possible mechanisms by which MCs contribute to the accelerated graft rejection and to the increase in neutrophil recruitment, we analyzed proinflammatory cytokines and chemokines. Our data show that MCs had only a minor effect on graft-associated cytokines at Day 2 enhancing by less than two-fold the mRNA levels of graft-associated pro-inflammatory IL6 as well as anti-inflammatory IL10, while no effect was seen for TGFβ. No differential effects were present at the later stages (Day 6). Concerning matched and mismatched grafts we only saw a difference for IL6 both at Day 2 and 6, however, with no notable differences concerning the dependency on MC. This supports that these cytokines do not account for the MC influence on the kinetics of graft rejection. By contrast, when mRNA levels of neutrophil attracting chemokines such as KC (CXCL1), MIP-2 (CXCL2) and TNF were examined we found a strong induction both in matched and mismatched grafts at Day 2 in agreement with the marked

neutrophil infiltration observed at this early time point. Whereas no differences were seen between matched conditions, we noted a significant MC dependency on the elevation of mRNA levels for all three chemokines/cytokines.

Hence it is possible that the combined action of these three neutrophil attracting cytokines/chemokines contributes to the stronger increase in neutrophil infiltration observed in the presence of MC in allografts (Fig. 4). In addition to chemokines/cytokines induction the ability of MC to release numerous mediators by degranulation may also contribute to the influx of neutrophils. Clearly, we counted more degranulated MCs after grafting and granule-stored mediators are known to target neutrophils (Wershil, Wang et al. 1991). Thus histamine has been known for long as a potent vasodilator enhancing the blood flow within tissues (Greaves and Sabroe 1996). It also has potent vasopermeability activity opening blood vessel as an essential mechanisms necessary for extravasation (Renkin and Curry 1982). Furthermore, certain MC specific proteases such as chymase and its murine functional counterpart MCPT4 have been shown to have a direct neutrophil chemoattractant activity both *in vitro* and *in vivo* (He and Walls 1998, Tani, Ogushi et al. 2000). Likewise, tryptase another abundant protease released by degranulation has also shown effects on vascular permeability and neutrophil chemoattraction (Compton, Cairns et al. 2000). However, this effect seems to be indirect and involve the capacity of tryptase to induce IL8 production through the activation of endothelial cells. In agreement with an important role of MC degranulation in the acceleration of rejection our data show that pharmacological blockade of degranulation had a major effect on the kinetics of graft rejection approaching the half-lives achieved with the absence of MCs alone. Although the action of cromolyn on mast cell degranulation in mice was challenged (Oka, Kalesnikoff et al. 2012) many other studies reported significant effects with this compound (Jones, Hargrove et al. 2016, Tellechea, Leal et al. 2016, Zhong, Cui et al. 2016). It is possible that the time of administration to engender active metabolites may play an important role in different species. Hence degranulation besides fostering repair may also play an important role in rejection. While cromolyn had an important effect, administration of an H1 receptor blocker or experiments conducted in MCPT4-deficient mice showed only a partial effect. This supports that probably

several products contained in granules may synergisticall act together to produce the biologic effect of MCs in grafting. Some of these effects may be indirect as for example the aforementioned release of MC stimulating cytokines and neutrophil attracting chemokines, which can also be released by other cells during an inflammatory response.

In conclusion our data show that MCs are important actors in the innate immune response associated with skin allografting. They can accelerate the rejection kinetics, which involves their capacity to degranulate releasing mediators such as histamine and chymase driving an inflammatory response. This inflammatory response leads to an excessive neutrophil influx that contributes to tissue damage and facilitates graft rejection.

Materials & Methods

Mice

C57BL/6J mice were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). RMB (official name, B6. Ms4a2^{tm1Mal}) and *Mcpt4*$^{-/-}$ mice have been described previously (Tchougounova, Pejler et al. 2003, Dahdah, Gautier et al. 2014, Pons, Ali et al. 2017). In addition RMB mice bred with Foxp3-IRES-eGFP mice (Carpentier, Chappert et al. 2013) in the C57Bl/6J backround were used. All mice were housed under strictly controlled specific pathogen-free conditions at the mouse facilities at Bichat Medical School. In all experiments, mice were 10 to 12 weeks old. For mast cell depletion, RMB mice expressing the human diphtheria toxin (DT) receptor and the fluorescent protein TdTomato gene cassettes under the control of the FcεRI β-chain specifically expressed in MC and basophils (Dahdah, Gautier et al. 2014) were injected first ip with 1 µg of DT followed two days later ip plus iv (1 µg each) followed by a last local injection 10 days later of 100 ng DT s.c. at the base of the ear pinna. PBS-treated RMB mice were used as controls. Skin transplantation was performed 2 days later. All animal experimental protocols were approved by the French Agricultural Office and the INSERM ethics committee, and all animal care and experimentation were conducted in accordance with European directives.

In vivo neutrophils depletion and drug treatments

For neutrophil depletion experiments, 200 µg of a rat anti–mouse antibodies (clone NIMP-R14; anti-Ly6G) or irrelevant control rat antibody was injected twice i.p. to C57Bl/6 mice 24 h before and, at day 4 post ear skin transplantation as previously described (Porcherie, Mathieu et al. 2011). Ketotifen fumarate (Sigma-Aldrich), a histamine H1-*receptor* antagonist, or solvent control was injected ip into C57Bl/6 mice at 32 mg/kg in 0.2 mL PBS 12h prior transplantation and then every day for 6 days (Habibi Asl, Vaez et al. 2014). Cromolyn Sodium Salt (Sigma-Aldrich) (100 mg/kg) in 0.2 mL PBS was injected sc. 48h, 12h and 30 minutes before transplantation and then every day for 6 days to block mast cell degranulation (Muto, Wang et al. 2014).

Ear skin transplantation

A male to female sex-mismatched minor histocompatibility H-Y antigen ear skin allograft model was performed as previously described (Simpson, Scott et al. 1997, Celli, Albert et al. 2011). Briefly, female (syngeneic) or male (allograft) donor mice were euthanized and a 5 × 5 mm flap of skin comprising the epidermis and dermis, but not donor cartilage, from the ventral side of the ear was removed and placed in cold saline solution. Recipient female were anesthetized for syngeneic or allograft recipients and a 5 × 5 mm flap of skin (epidermis, dermis) from the ventral side of the ear with female syngeneic or male allograft donor skin was replaced. We applied four stitches (8/0 Dexon, Davis and Geck) to maintain the graft. Grafts were monitored for rejection for 35 days and were considered rejected when 80% of the original graft disappeared or became necrotic.

Flow cytometry analysis

Ears and draining cervical lymph nodes (dLN) were collected from grafted mice 2 or 6 days after skin transplantation. Ear and dLN were split mechanically and digested in RPMI 1640 containing 1%FCS, 0.25 mg/mL of Liberase TL (Roche, Diagnostics Corp.) and 0.25 mg/mL DNase I (Sigma-Aldrich) for 90 min at 37°C. Cell suspensions were then filtrated on a 40 µm cell strainer (Falcon) in FACS buffer (PBS 2% FCS 2 mM EDTA). The following fluorochrome-conjugated anti-mouse monoclonal antibodies were used: CD11b (M1/70); Ly6C (AL-21); Ly6G (1A8); βTCR (H57-597); CD45 (30-F11); CD19 (1D3); (all from BD) F4/80 (BM8); CD117 (ACK2); and FcεRIα (MAR-1) (all from eBioscience) Viability was checked by ghost violet 510 viability dye staining (Thermo Fisher) in PBS for 30 min at 4°C in the dark. After blocking Fc receptors with 2.4G2 antibodies cells were stained with the antibodies in PBS with 2% FCS and 2 mM EDTA for 30 minutes at 4°C. Cells were gated as follows: after gating out doublets, tCD45+ cells were identified, then CD19+ B cells and βTCR+ T cells (CD4+ and CD8+) were gated. Among CD19– and βTCR– cells, neutrophils (CD11b+Ly6G+) were detected. In the CD19–βTCR–Ly6G– cell population, the tdT+ cells (basophils and MCs), monocytes (CD11b+Ly6G–Ly6C+) were identified. MC were tdT+FcεRIα+CD117+, and resident macrophages were

CD11b+F4/80+Ly6G–Ly6Clo, as previously described (Dahdah, Gautier et al. 2014). Fluorescent cells were detected using a BD LSR Fortessa instrument with Diva software (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo software (Tree Star Inc.). Absolute numbers were determined following direct counting of live total cells under the microscope for each group with calculations taking into account the percentage of $CD45^+$ cells.

Cytokine quantification

Ear skin tissue around the graft area or draining lymph nodes of the ear were cut at 2 or 6 days after skin transplantation and total RNA was extracted using the Plus Mini Kit (Quiagen, Les Ulis, France). Reverse transcription was carried out using 1 µg of total RNA and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen). For determining the quantitative transcription profile of cytokines the following primers were used : KC, forward, 5'-TCC CCA AGT AAC GGA GAA AGA A-3', reverse, 5-' TGT CAG AAG CCA GCG TTC AC-3', probe, FAM-5'- AGA CTG CTC TGA TGG CAC CGT CT-3'-TAMRA, TNF, forward, 5′-CAT CTT CTC AAA ATT CGA GTG ACA A-3′, reverse, 5′-TGG GAG TAG ACA AGG TAC AAC CC-3′, probe, FAM-5′-CAC GTC GTA GCA AAC CAC CAA GTG GA-3′-TAMRA; TGF-β, forward; 5′-TGA CGT CAC TGG AGT TGT ACG G-3′, reverse, 5′-GGT TCA TGT CAT GGA TGG TGC-3′, FAM-5′-TTC AGC GCT CAC TGC TCT TGT GAC AG-3′-TAMRA; IL6, forward, FAM-5'-TCC TAC CCC AAT TTC CAA TGC-3', reverse, 5'-TGA ATT GGA TGG TCT TGG TCC T-3', probe, FAM-5'-CAG ATA AGC TGG AGT CAC AGA AGG AGT GG-3'-TAMRA; MIP2, forward, FAM-5'-TGA CTT CAA GAA CAT CCA GAT CTT-3', reverse, 5'-CTT GAG AGT GGC TAT GAC TTC TGT CT-3', probe, FAM-5'-TGA CGC CCC CAG GAC CC CA-3'-TAMRA; β-actin, , forward,FAM-5'-AGA GGG AAA TCG TGC GTG AC-3', reverse,5'-CAA TAG TGA TGA CCT GGC CGT-3', probe, FAM-5'-CAC TGC CGC ATC CTC TTC CTC CC-3'-TAMRA. For TSLP ans Il-33, TaqMan primer and probe mixtures were purchased from Applied Biosystems. IDs (*TaqMan* Gene Expression Assay IDs, Applied Biosystems) for mouse was respectively Mm01157588-m1 and Mm00505403-m1. Beta-actin was used as endogenous reference gene to normalize sample variation and relative expression was calculated by the change-in-threshold ($-\Delta\Delta C_T$) method. All are available in

Rosatto et al (Rossato, Ben Mkaddem et al. 2015) Expression in ears and dLn was determined with a TaqMan real-time PCR assay using a CFX96 PCR system (Bio-Rad). PCR data were reported as the relative increase in mRNA transcripts using the levels of β-actin mRNA for normalization.

MC quantification

MC numbers in skin were evaluated in anesthetized RMB mice treated with either PBS or DT by placing them on a custom-designed heated platform. A metal ring was clued on the ear and filled with echography gel aquasonic 100 parker allow immersion of a X20/0.95NA dipping objective (Olympus). Imaging was carried out using an upright two-photon microscope (DM6000B, Leica Microsystems) with excitation provided by a Ti-sapphire laser (Coherent) tuned at 900–950 nm. We detected fluorescence with four nondescanned detectors (Leica Microsystems). Typically, we collected images from 10 to 15 *z*-planes, spaced 5 µm apart, every 5 min for up to 90 min.

To evaluate degranulated MC sections of nongrafted and allograft transplanted tissues were embedded in paraffin and stained with toluidine blue as described (Beghdadi, Madjene et al. 2013).

General experimental design and statistical analysis

For animal experiments, littermates were used and randomly assigned to PBS or DT treatment groups. All experiments were conducted at least three times as indicated in the figure legends. Statistical analysis was performed using GraphPad software Prism 6.0 and statistical tests are indicated in the figure legends. Data are presented as the means ± SEM, and *P* values of less than 0.05 (1 *, #, §), 0,01 (2 *, #, §), 0,001 (3 *, #, §), 0,0001 (4 *, #, §) were considered significant

Figure legends

Figure 1. Injection of DT in RMB mice induces selective long-term depletion of MC in the skin of RMB mice. (A) Schematic presentation of the protocol of DT injection used throughout the study to allow selective depletion of MC in the ear skin and full replenishment of Ba. (B) Analysis of the fraction of skin tdT/c-kit positive MC and blood tdT/CD49b-positive Ba amongst CD45 positive cells by flow cytometry. Bars represent means ± SEM obtained from at least 3 independent experiments (total n = 6 to 8 mice/group). (C) Long-term depletion of MC in the skin. Left panel shows representative confocal images of tdT positive MC in the skin after PBS or DT treatment at the days indicated. Right panel shows corresponding quantitative analysis skin MCs using confocal images. Data represent means ± SEM from at 8 high power fields counted from 3 independent experiments.

Figure 2. The presence of mast cells accelerates graft rejection in a sex-mismatch MHC CII-restricted minor transplantation antigen donor ear skin model. (A) Representative images of progressive rejection scores as detailed in Materials & Methods used for evaluation are shown. B) Kinetic analysis of rejection in sex-matched and sex-mismatched animals treated with PBS- (+ MC) or DT (- MC) in both host and donor mice as indicated. (C) Kinetic analysis of rejection in sex-mismatched animals treated with PBS- (+ MC) or DT (- MC) in either donor, host or both as indicated. Data in B and C represent means ± SEM of rejection scores from at least 4 independent experiments (total n = 8 to 10 mice/condition. Statistic was analyzed using one-way ANOVA test using the nonparametric Bonneferoni multiple comparisons test (comparing all the groups).

Figure 3. Mast cells transiently increase after grafting under both matched and mismatched conditions. Analysis of skin tdT/c-kit positive MC in nongrafted and grafted tissue as indicated. Numbers are absolute numbers of counted MC per ear pair in the indicated conditions following tissue extraction and flow cytometry analysis as detailed under Materials & Methods. Data represent means ± SEM from at least 4 independent experiments (total n = 8 to

10 mice/condition. * compares nongraft versus graft conditions, ♯ compares mast cell sufficient PBS (+ MC) versus MC-deficient DT (- MC) treated mice, § compares matched versus mismatched conditions using two-way ANOVA test using the nonparametric Bonneferoni multiple comparisons test (comparing all the groups).

Figure 4. Marked early neutrophil infiltration in ear tissue after grafting is majored under mismatch conditions in the presence of MC. Analysis of neutrophils, monocytes, macrophages, B cells, T cells and Foxp3-positive regulatory cells in nongrafted and grafted ear tissue at day 2 and 6. Numbers represent absolute numbers of counted cells per ear pair in the indicated conditions following tissue extraction and flow cytometry analysis as detailed under Materials & Methods. Data represent means ± SEM from at least 4 independent experiments (total n = 8 to 10 mice /condition. * compares nongraft versus graft conditions, ♯ compares PBS- (+ MC) versus DT (- MC) treated mice, § compares sex-matched versus sex-mismatched conditions using two-way ANOVA test using the nonparametric Bonneferoni multiple comparisons test (comparing all the groups).

Figure 5. Mast cells induce some early transient changes in monocyte and Foxp3-positive cell infiltration in draining lymph nodes after grafting under mismatch conditions. Analysis of neutrophils, monocytes, macrophages, B cells, T cells and regulatory T cells in draining lymph nodes of nongrafted and grafted draining lymph nodes (cervical in the neck region) at day 2 and 6. Numbers represent absolute numbers of counted cells in pooled lymph nodes in the indicated conditions following tissue extraction and flow cytometry analysis as detailed under Materials & Methods. Data represent means ± SEM from at least 4 independent experiments (total n = 8 to10 mice/ group. * compares nongraft versus graft conditions, ♯ compares PBS- (+ MC) versus DT (- MC) treated mice, § compares sex-matched versus sex-mismatched conditions using two-way ANOVA using the nonparametric Bonneferoni multiple comparisons test (comparing all the groups).

Figure 6. Grafting is associated with significant MC dependent cytokine mRNA levels involved in graft rejection, MC activation and neutrophil chemotaxis. Analysis of indicated cytokines and chemokine mRNA levels in nongrafted and grafted ear tissue at day 2 and 6 using qRT-PCR. mRNA levels of chemokines/cytokines and beta actin, respectively, were determined after extraction from ear pairs and the ratio in nongrafted tissue was arbitrarily set to 1 and compared to the ratios obtained in grafted tissues as indicated. Data in A to C represent means ± SEM from at least 4 independent experiments (total n = 8 to 10 mice /group. * compares nongraft versus graft conditions, ♯ compares PBS- (+ MC) or DT (- MC) treated mice, § compares sex-matched versus sex-mismatched conditions using two-way ANOVA using the nonparametric Bonneferoni multiple comparisons test (comparing all the groups).

Figure 7. Deletion of neutrophils delays rejection. (A) C57BL/6N mice were treated twice at 16h before grafting and at Day 4 after grafting i.p. with 200 µg of anti-neutrophil (NIMP-R14) or isotype control antibodies. Representative images of the assessment of neutrophil depletion shows dot blots of the neutrophil population in control and anti-neutrophil treated animals at indicated times. (B) Kinetic analysis of rejection in sex-mismatched animals treated with control and anti-neutrophil antibody in the host as indicated. Data represent means ± SEM of rejection scores from at least 4 independent experiments (total n = 8 to 10 mice/condition) using one-way ANOVA using the nonparametric Bonneferoni multiple comparisons test (comparing all the groups).

Figure 8. MCs degranulate after grafting under sex-mismatch conditions (A) Photomicrographs of ear skin from nongrafted and sex-mismatched grafted tissue stained with toluidine blue. Degranulated MC visible in allogenic grafts are indicated by arrows. Scale bar 50µm. The inset show a high magnification picture of a nondegranulated and a degranulated MC (B) Quantitative evaluation of degranulated MC in nongrafted and sex-mismatched grafted tissues. Data represent the percentage of degranulated MC (means ± SEM) present 8 high power fields counted from at least three independent experiments using Student T Test MANN WITHNEY

Figure 9. Blockade of mast cell degranulation or certain MC mediators released by degranulation delays rejection. (A) Kinetic analysis of rejection in sex-mismatched animals treated with PBS (+ MC) or 1 µg DT (- MC) injected sc into the ear pinnae two days after allografting to allow an initial MC-mediated acute inflammatory response. Data represent means ± SEM of rejection scores from 4 to 5 independent experiments (total n = 8 to 10 mice/condition. from one-way ANOVA using the nonparametric Bonneferoni multiple comparisons test (comparing all the groups). (B) C57BL/6N mice were treated i.p. with 100 mg/kg of Cromolyn sodium or PBS solvent 30 min before male to female grafting as indicated. Treatment was continued every day after grafting until sacrifice and the rejection profile was monitored. Data show the quantitative analysis of rejection in sex-mismatched animals treated with solvent and cromolyn as indicated. Data represent the means ± SEM of rejection scores from 4 to 5 independent experiments (total n = 8 to 10 mice/condition. from one-way ANOVA using the nonparametric Bonneferoni multiple comparisons test (comparing all the groups). (C) C57BL/6N mice were treated i.p. with SEM from two-way ANOVA test (B) C57BL/6N mice were treated i.p. with (32 mg/kg) of the H1R antagonist Ketotifen or solvent DMSO before male to female grafting as indicated. Treatment was continued every day after grafting until sacrifice and the rejection profile was monitored. Data represent the means ± SEM of rejection scores from 4 to 5 independent experiments (total n = 8 to 10 mice/condition. from one-way ANOVA using the nonparametric Bonneferoni multiple comparisons test (comparing all the groups). (C) Male to female grafting was performed in *MCPT4-/-* or C57BL/6N mice and the rejection profile was monitored. Data represent the means ± SEM of rejection scores from 4 to 5 independent experiments (total n = 8 to 10 mice/condition. from one-way ANOVA using the nonparametric Bonneferoni multiple comparisons test (comparing all the groups).

References

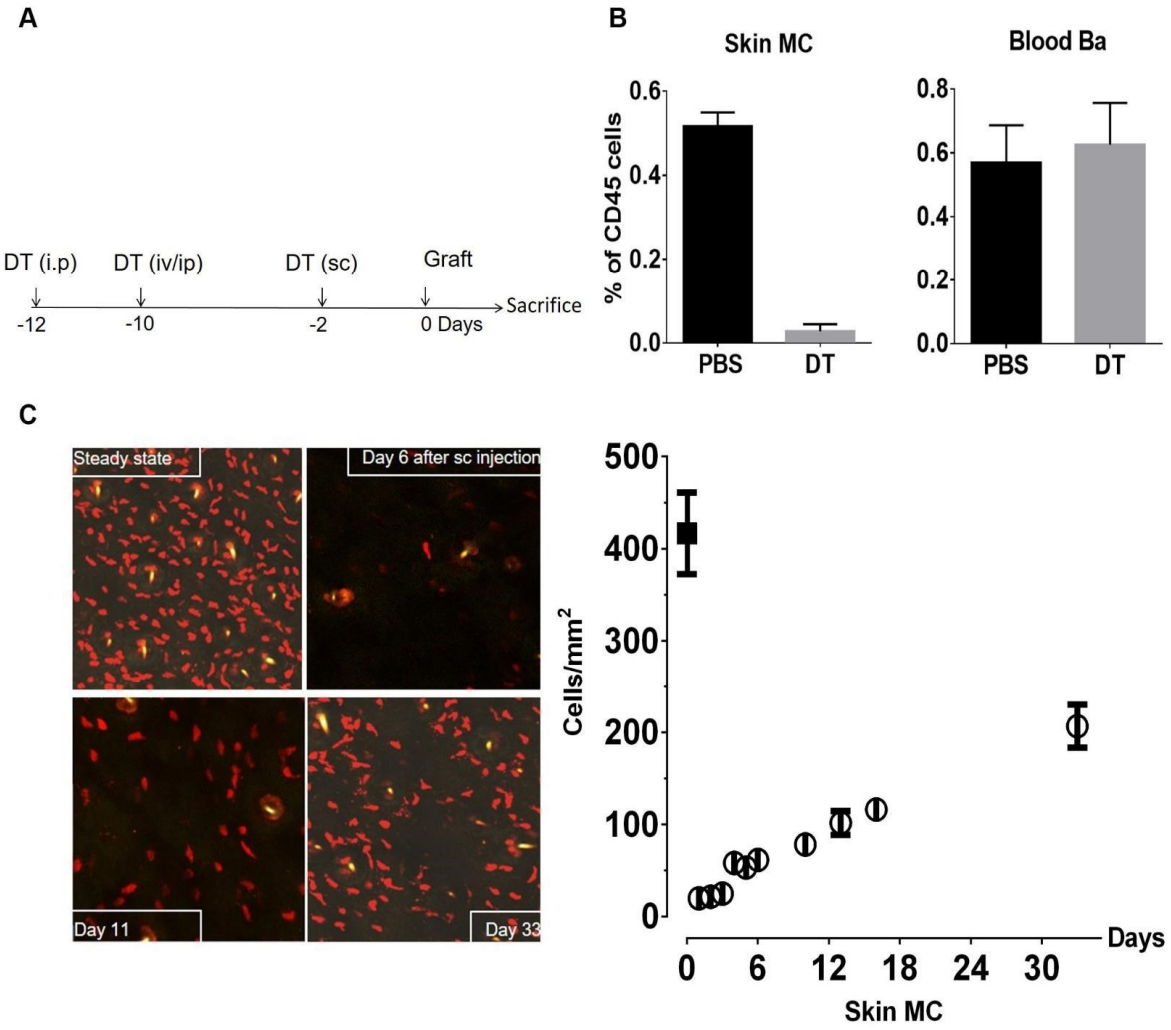
1. Lechler, R.I., M. Sykes, A.W. Thomson, and L.A. Turka. 2005. Organ transplantation--how much of the promise has been realized? *Nat Med* 11:605-613.
2. Turka, L.A., and R.I. Lechler. 2009. Towards the identification of biomarkers of transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 9:521-526.
3. Lin, C.M., and R.G. Gill. 2016. Direct and indirect allograft recognition: pathways dictating graft rejection mechanisms. *Curr Opin Organ Transplant* 21:40-44.
4. Liu, W., and X.C. Li. 2010. An overview on non-T cell pathways in transplant rejection and tolerance. *Curr Opin Organ Transplant* 15:422-426.
5. Scozzi, D., M. Ibrahim, C. Menna, A.S. Krupnick, D. Kreisel, and A.E. Gelman. 2017. The Role of Neutrophils in Transplanted Organs. *Am J Transplant* 17:328-335.
6. Goldman, M., A. Le Moine, M. Braun, V. Flamand, and D. Abramowicz. 2001. A role for eosinophils in transplant rejection. *Trends Immunol* 22:247-251.
7. Chong, A.S., and M.L. Alegre. 2012. The impact of infection and tissue damage in solid-organ transplantation. *Nat Rev Immunol* 12:459-471.
8. Jones, N.D., S.E. Turvey, A. Van Maurik, M. Hara, C.I. Kingsley, C.H. Smith, A.L. Mellor, P.J. Morris, and K.J. Wood. 2001. Differential susceptibility of heart, skin, and islet allografts to T cell-mediated rejection. *J Immunol* 166:2824-2830.
9. Benichou, G., Y. Yamada, S.H. Yun, C. Lin, M. Fray, and G. Tocco. 2011. Immune recognition and rejection of allogeneic skin grafts. *Immunotherapy* 3:757-770.
10. Hautz, T., D. Wolfram, J. Grahammer, R. Starzl, C. Krapf, J. Pratschke, W.P. Lee, G. Brandacher, and S. Schneeberger. 2012. Mechanisms and mediators of inflammation: potential models for skin rejection and targeted therapy in vascularized composite allotransplantation. *Clin Dev Immunol* 2012:757310.
11. Metz, M., F. Siebenhaar, and M. Maurer. 2008. Mast cell functions in the innate skin immune system. *Immunobiology* 213:251-260.
12. Abraham, S.N., and A.L. St John. 2010. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat Rev Immunol* 10:440-452.
13. Redegeld, F.A., Y. Yu, S. Kumari, N. Charles, and U. Blank. 2018. Non-IgE mediated mast cell activation. *Immunol Rev* 282:87-113.
14. Mukai, K., M. Tsai, P. Starkl, T. Marichal, and S.J. Galli. 2016. IgE and mast cells in host defense against parasites and venoms. *Semin Immunopathol* 38:581-603.
15. Jahanyar, J., M.M. Koerner, M. Loebe, K.A. Youker, G. Torre-Amione, and G.P. Noon. 2008. The role of mast cells after solid organ transplantation. *Transplantation* 85:1365-1371.
16. Lu, L.F., E.F. Lind, D.C. Gondek, K.A. Bennett, M.W. Gleeson, K. Pino-Lagos, Z.A. Scott, A.J. Coyle, J.L. Reed, J. Van Snick, T.B. Strom, X.X. Zheng, and R.J. Noelle. 2006. Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature* 442:997-1002.
17. de Vries, V.C., K. Pino-Lagos, E.C. Nowak, K.A. Bennett, C. Oliva, and R.J. Noelle. 2011. Mast cells condition dendritic cells to mediate allograft tolerance. *Immunity* 35:550-561.
18. Nowak, E.C., V.C. de Vries, A. Wasiuk, C. Ahonen, K.A. Bennett, I. Le Mercier, D.G. Ha, and R.J. Noelle. 2012. Tryptophan hydroxylase-1 regulates immune tolerance and inflammation. *J Exp Med* 209:2127-2135.
19. Boerma, M., W.P. Fiser, G. Hoyt, G.J. Berry, L. Joseph, J. Joseph, J. Wang, M.D. Crew, R.C. Robbins, and M. Hauer-Jensen. 2007. Influence of mast cells on outcome after heterotopic cardiac transplantation in rats. *Transpl Int* 20:256-265.
20. Itoh, S., S. Nakae, J.B. Velotta, H. Kosuge, A. Connolly, M. Tsai, H. Adachi, S.J. Galli, R.C. Robbins, and M.P. Fischbein. 2010. The role of recipient mast cells in acute and chronic cardiac allograft rejection in C57BL/6-KitW-sh/W-sh mice. *J Heart Lung Transplant* 29:401-409.
21. Yang, M.Q., Y.Y. Ma, J. Ding, and J.Y. Li. 2014. The role of mast cells in ischemia and reperfusion injury. *Inflamm Res* 63:899-905.

22. Blank, U., I.K. Madera-Salcedo, L. Danelli, J. Claver, N. Tiwari, E. Sanchez-Miranda, G. Vazquez-Victorio, K.A. Ramirez-Valadez, M. Macias-Silva, and C. Gonzalez-Espinosa. 2014. Vesicular trafficking and signaling for cytokine and chemokine secretion in mast cells. *Front Immunol* 5:453.
23. Wernersson, S., and G. Pejler. 2014. Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nat Rev Immunol* 14:478-494.
24. Boyce, J.A. 2007. Mast cells and eicosanoid mediators: a system of reciprocal paracrine and autocrine regulation. *Immunol Rev* 217:168-185.
25. Mukai, K., M. Tsai, H. Saito, and S.J. Galli. 2018. Mast cells as sources of cytokines, chemokines, and growth factors. *Immunol Rev* 282:121-150.
26. Simpson, E., D. Scott, and P. Chandler. 1997. The male-specific histocompatibility antigen, H-Y: a history of transplantation, immune response genes, sex determination and expression cloning. *Annu Rev Immunol* 15:39-61.
27. Celli, S., M.L. Albert, and P. Bousso. 2011. Visualizing the innate and adaptive immune responses underlying allograft rejection by two-photon microscopy. *Nat Med* 17:744-749.
28. Zelenika, D., E. Adams, A. Mellor, E. Simpson, P. Chandler, B. Stockinger, H. Waldmann, and S.P. Cobbold. 1998. Rejection of H-Y disparate skin grafts by monospecific CD4+ Th1 and Th2 cells: no requirement for CD8+ T cells or B cells. *J Immunol* 161:1868-1874.
29. Dahdah, A., G. Gautier, T. Attout, F. Fiore, E. Lebourdais, R. Msallam, M. Daeron, R.C. Monteiro, M. Benhamou, N. Charles, J. Davoust, U. Blank, B. Malissen, and P. Launay. 2014. Mast cells aggravate sepsis by inhibiting peritoneal macrophage phagocytosis. *J Clin Invest* 124:4577-4589.
30. Metz, M., M.A. Grimbaldeston, S. Nakae, A.M. Piliponsky, M. Tsai, and S.J. Galli. 2007. Mast cells in the promotion and limitation of chronic inflammation. *Immunol Rev* 217:304-328.
31. Shen, H., and D.R. Goldstein. 2009. IL-6 and TNF-alpha synergistically inhibit allograft acceptance. *J Am Soc Nephrol* 20:1032-1040.
32. Chae, M.S., J.W. Kim, H.S. Chung, C.S. Park, J. Lee, J.H. Choi, and S.H. Hong. 2018. The impact of serum cytokines in the development of early allograft dysfunction in living donor liver transplantation. *Medicine (Baltimore)* 97:e0400.
33. Pribylova-Hribova, P., K. Kotsch, A. Lodererova, O. Viklicky, S. Vitko, H.D. Volk, and J. Lacha. 2006. TGF-beta1 mRNA upregulation influences chronic renal allograft dysfunction. *Kidney Int* 69:1872-1879.
34. Carpentier, M., P. Chappert, C. Kuhn, M. Lalfer, H. Flament, O. Burlen-Defranoux, O. Lantz, A. Bandeira, B. Malissen, J. Davoust, and D.A. Gross. 2013. Extrathymic induction of Foxp3(+) regulatory T cells declines with age in a T-cell intrinsic manner. *Eur J Immunol* 43:2598-2604.
35. Saluja, R., A. Zoltowska, M.E. Ketelaar, and G. Nilsson. 2016. IL-33 and Thymic Stromal Lymphopoietin in mast cell functions. *Eur J Pharmacol* 778:68-76.
36. Kobayashi, Y. 2006. Neutrophil infiltration and chemokines. *Crit Rev Immunol* 26:307-316.
37. Porcherie, A., C. Mathieu, R. Peronet, E. Schneider, J. Claver, P.H. Commere, H. Kiefer-Biasizzo, H. Karasuyama, G. Milon, M. Dy, J.P. Kinet, J. Louis, U. Blank, and S. Mecheri. 2011. Critical role of the neutrophil-associated high-affinity receptor for IgE in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *J Exp Med* 208:2225-2236.
38. Muto, Y., Z. Wang, M. Vanderberghe, A. Two, R.L. Gallo, and A. Di Nardo. 2014. Mast cells are key mediators of cathelicidin-initiated skin inflammation in rosacea. *J Invest Dermatol* 134:2728-2736.
39. Habibi Asl, B., H. Vaez, T. Imankhah, and S. Hamidi. 2014. Impact of caffeine on weight changes due to ketotifen administration. *Adv Pharm Bull* 4:83-89.
40. He, S., and A.F. Walls. 1998. Human mast cell chymase induces the accumulation of neutrophils, eosinophils and other inflammatory cells in vivo. *Br J Pharmacol* 125:1491-1500.
41. Tani, K., F. Ogushi, H. Kido, T. Kawano, Y. Kunori, T. Kamimura, P. Cui, and S. Sone. 2000. Chymase is a potent chemoattractant for human monocytes and neutrophils. *J Leukoc Biol* 67:585-589.
42. Wood, K.J., and R. Goto. 2012. Mechanisms of rejection: current perspectives. *Transplantation* 93:1-10.

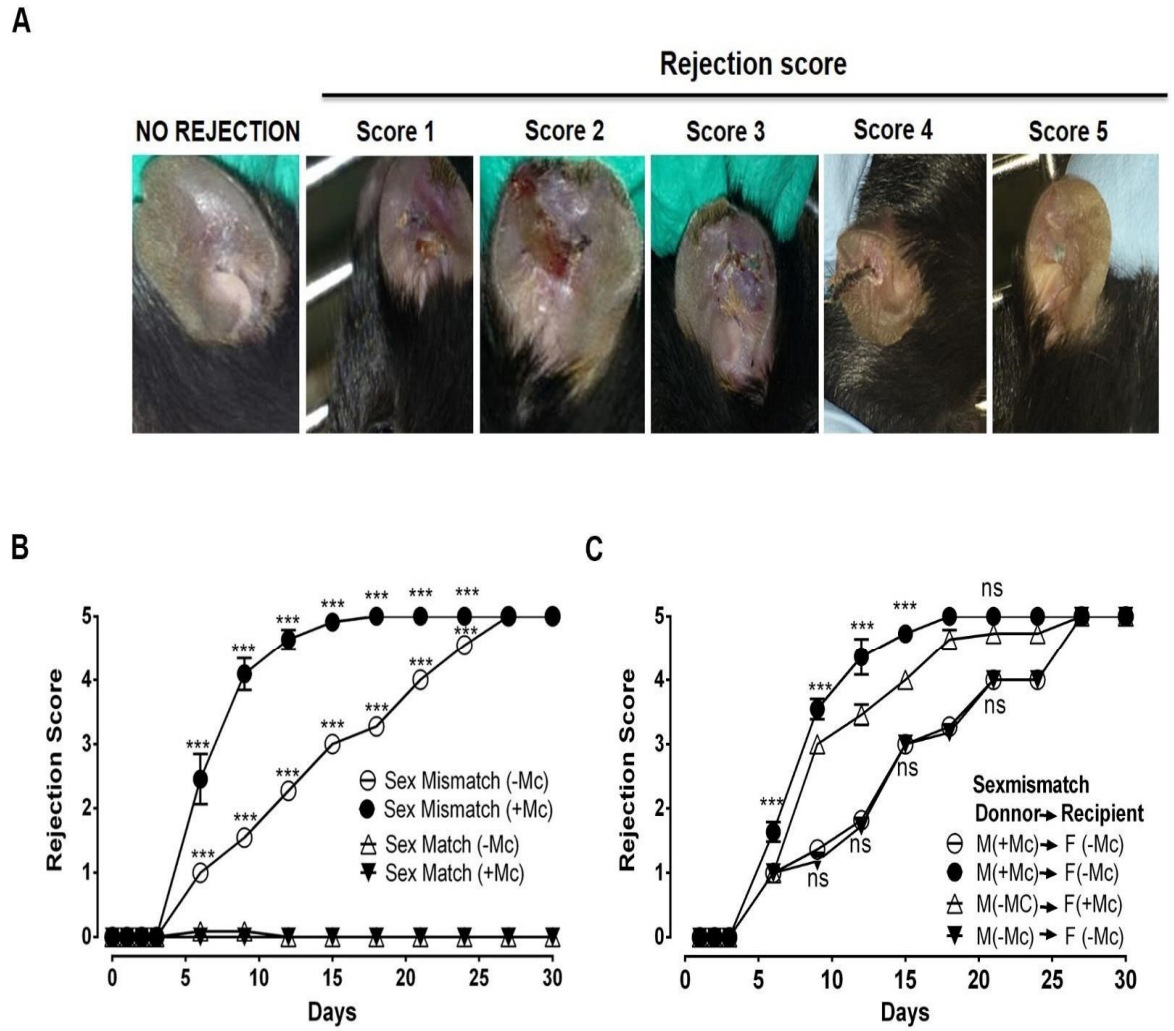
43. Mason, A., P.L. Mottram, A. Mirisklavos, G.J. Clurne, and T.E. Mandel. 1988. A comparison of cyclosporine, donor-specific transfusion, and antilymphocyte serum suppression of skin, heart, and fetal pancreatic islet allograft rejection in mice. *Transplantation* 45:1155-1157.
44. Bernstein, I.L. 1985. Cromolyn sodium in the treatment of asthma: coming of age in the United States. *J Allergy Clin Immunol* 76:381-388.
45. Zweifel, M., H. Hirsiger, K. Matozan, M. Welle, T. Schaffner, and P. Mohacsi. 2002. Mast cells in ongoing acute rejection: increase in number and expression of a different phenotype in rat heart transplants. *Transplantation* 73:1707-1716.
46. Yamada, M., M. Ueda, T. Naruko, S. Tanabe, Y.S. Han, Y. Ikura, M. Ogami, S. Takai, and M. Miyazaki. 2001. Mast cell chymase expression and mast cell phenotypes in human rejected kidneys. *Kidney Int* 59:1374-1381.
47. Arikan, C., D. Nart, M. Kilic, H.A. Yuksekkaya, and S. Aydogdu. 2008. Association of mast cells and liver allograft rejection. *Pediatr Transplant* 12:347-352.
48. Blank, U., M. Essig, L. Scandiuzzi, M. Benhamou, and Y. Kanamaru. 2007. Mast cells and inflammatory kidney disease. *Immunol Rev* 217:79-95.
49. Wang, J., M. Hossain, A. Thanabalasuriar, M. Gunzer, C. Meininger, and P. Kubes. 2017. Visualizing the function and fate of neutrophils in sterile injury and repair. *Science* 358:111-116.
50. Hershko, A.Y., R. Suzuki, N. Charles, D. Alvarez-Errico, J.L. Sargent, A. Laurence, and J. Rivera. 2011. Mast cell interleukin-2 production contributes to suppression of chronic allergic dermatitis. *Immunity* 35:562-571.
51. Wershil, B.K., Z.S. Wang, J.R. Gordon, and S.J. Galli. 1991. Recruitment of neutrophils during IgE-dependent cutaneous late phase reactions in the mouse is mast cell-dependent. Partial inhibition of the reaction with antiserum against tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Invest* 87:446-453.
52. Greaves, M.W., and R.A. Sabroe. 1996. Histamine: the quintessential mediator. *J Dermatol* 23:735-740.
53. Renkin, E.M., and F.E. Curry. 1982. Endothelial permeability: pathways and modulations. *Ann N Y Acad Sci* 401:248-259.
54. Compton, S.J., J.A. Cairns, S.T. Holgate, and A.F. Walls. 2000. Human mast cell tryptase stimulates the release of an IL-8-dependent neutrophil chemotactic activity from human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). *Clin Exp Immunol* 121:31-36.
55. Oka, T., J. Kalesnikoff, P. Starkl, M. Tsai, and S.J. Galli. 2012. Evidence questioning cromolyn's effectiveness and selectivity as a 'mast cell stabilizer' in mice. *Lab Invest* 92:1472-1482.
56. Jones, H., L. Hargrove, L. Kennedy, F. Meng, A. Graf-Eaton, J. Owens, G. Alpini, C. Johnson, F. Bernuzzi, J. Demieville, S. DeMorrow, P. Invernizzi, and H. Francis. 2016. Inhibition of mast cell-secreted histamine decreases biliary proliferation and fibrosis in primary sclerosing cholangitis Mdr2(-/-) mice. *Hepatology* 64:1202-1216.
57. Tellechea, A., E.C. Leal, A. Kafanas, M.E. Auster, S. Kuchibhotla, Y. Ostrovsky, F. Tecilazich, D. Baltzis, Y. Zheng, E. Carvalho, J.M. Zabolotny, Z. Weng, A. Petra, A. Patel, S. Panagiotidou, L. Pradhan-Nabzdyk, T.C. Theoharides, and A. Veves. 2016. Mast Cells Regulate Wound Healing in Diabetes. *Diabetes* 65:2006-2019.
58. Gan, P.Y., K.M. O'Sullivan, J.D. Ooi, M.A. Alikhan, D. Odobasic, S.A. Summers, A.R. Kitching, and S.R. Holdsworth. 2016. Mast Cell Stabilization Ameliorates Autoimmune Anti-Myeloperoxidase Glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 27:1321-1333.
59. Tchougounova, E., G. Pejler, and M. Abrink. 2003. 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* 198:423-431.
60. Pons, M., L. Ali, W. Beghdadi, L. Danelli, M. Alison, L.C. Madjene, J. Calvo, J. Claver, S. Vibhushan, M. Abrink, G. Pejler, M.L. Poli-Merol, M. Peuchmaur, A. El Ghoneimi, and U. Blank. 2017. Mast Cells and MCPT4 Chymase Promote Renal Impairment after Partial Ureteral Obstruction. *Front Immunol* 8:450.
61. Rossato, E., S. Ben Mkaddem, Y. Kanamaru, M. Hurtado-Nedelec, G. Hayem, V. Descatoire, C. Vonarburg, S. Miescher, A.W. Zuercher, and R.C. Monteiro. 2015. Reversal of Arthritis by Human Monomeric IgA Through the Receptor-Mediated SH2 Domain-Containing Phosphatase 1 Inhibitory Pathway. *Arthritis Rheumatol* 67:1766-1777.

62. Beghdadi, W., L.C. Madjene, J. Claver, G. Pejler, L. Beaudoin, A. Lehuen, E. Daugas, and U. Blank. 2013. Mast cell chymase protects against renal fibrosis in murine unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 84:317-326.

Ngo-Nyekel & al. **Figure 1.**



Ngo-Nyekel & al. Figure 2.



Ngo-Nyekel & al.

Figure 3.

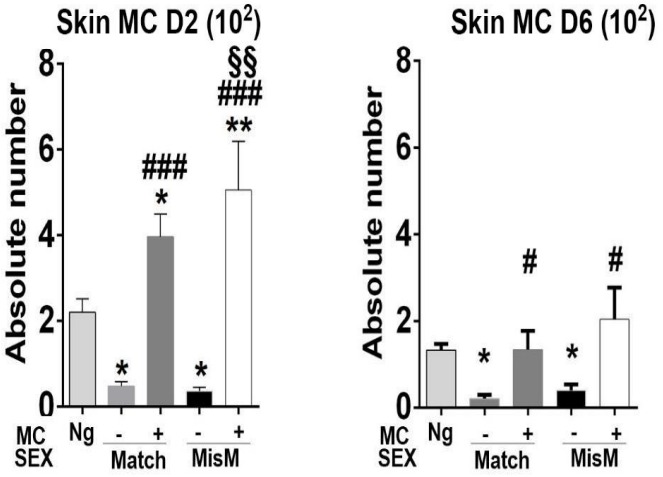


Figure 4

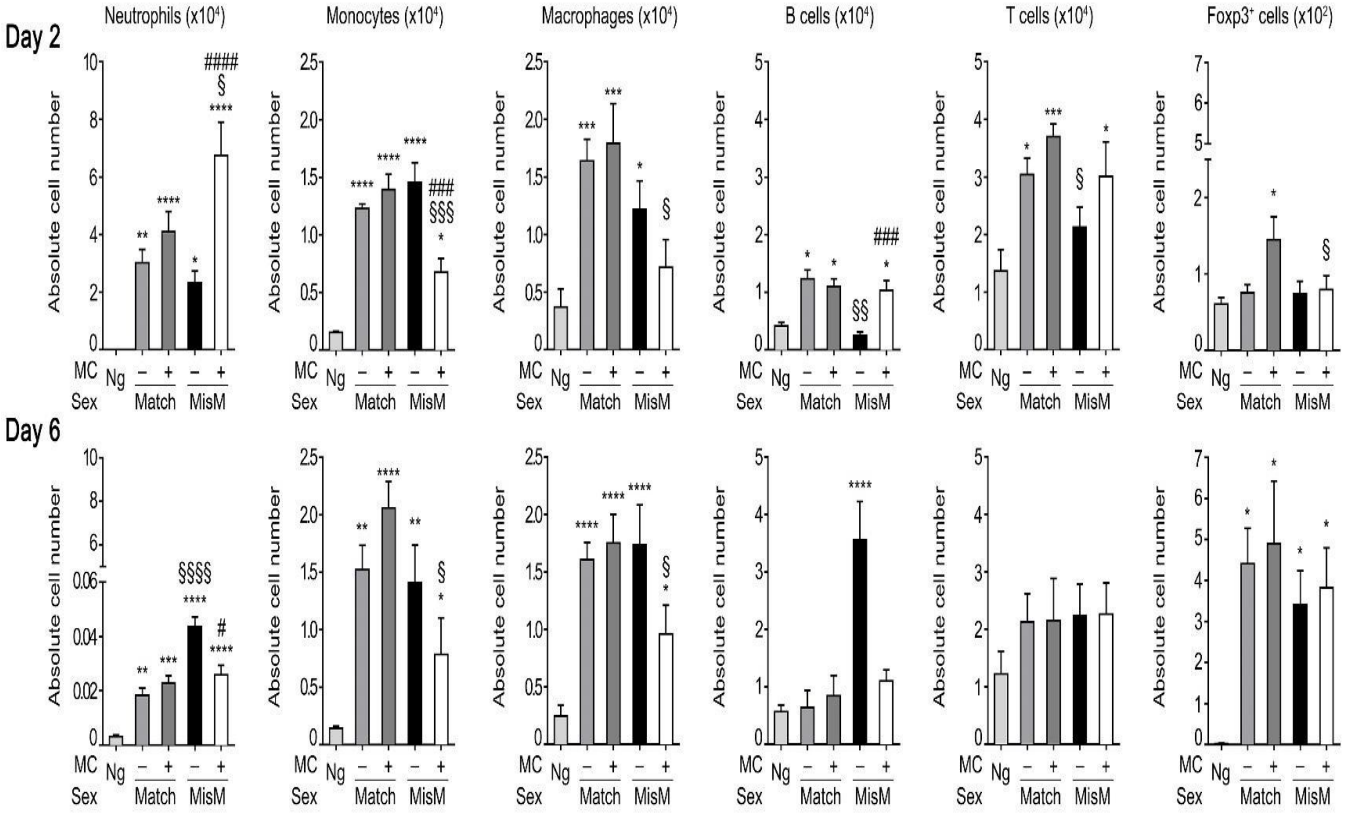

Day 2
Day 6
Neutrophils (x10⁴)
Monocytes (x10⁴)
Macrophages (x10⁴)
B cells (x10⁴)
T cells (x10⁴)
Foxp3⁺ cells (x10²)
Absolute cell number
MC
Ng
Sex
Match
MisM

Figure 5.

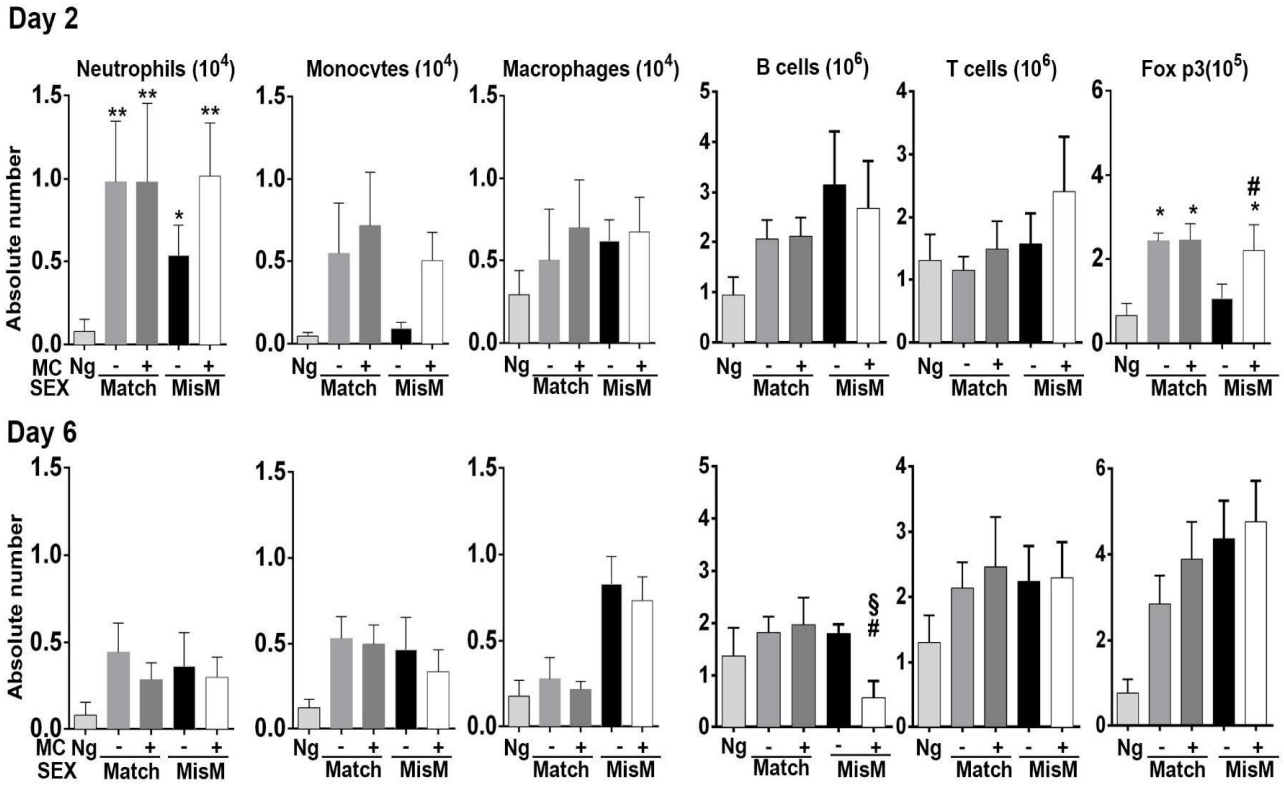
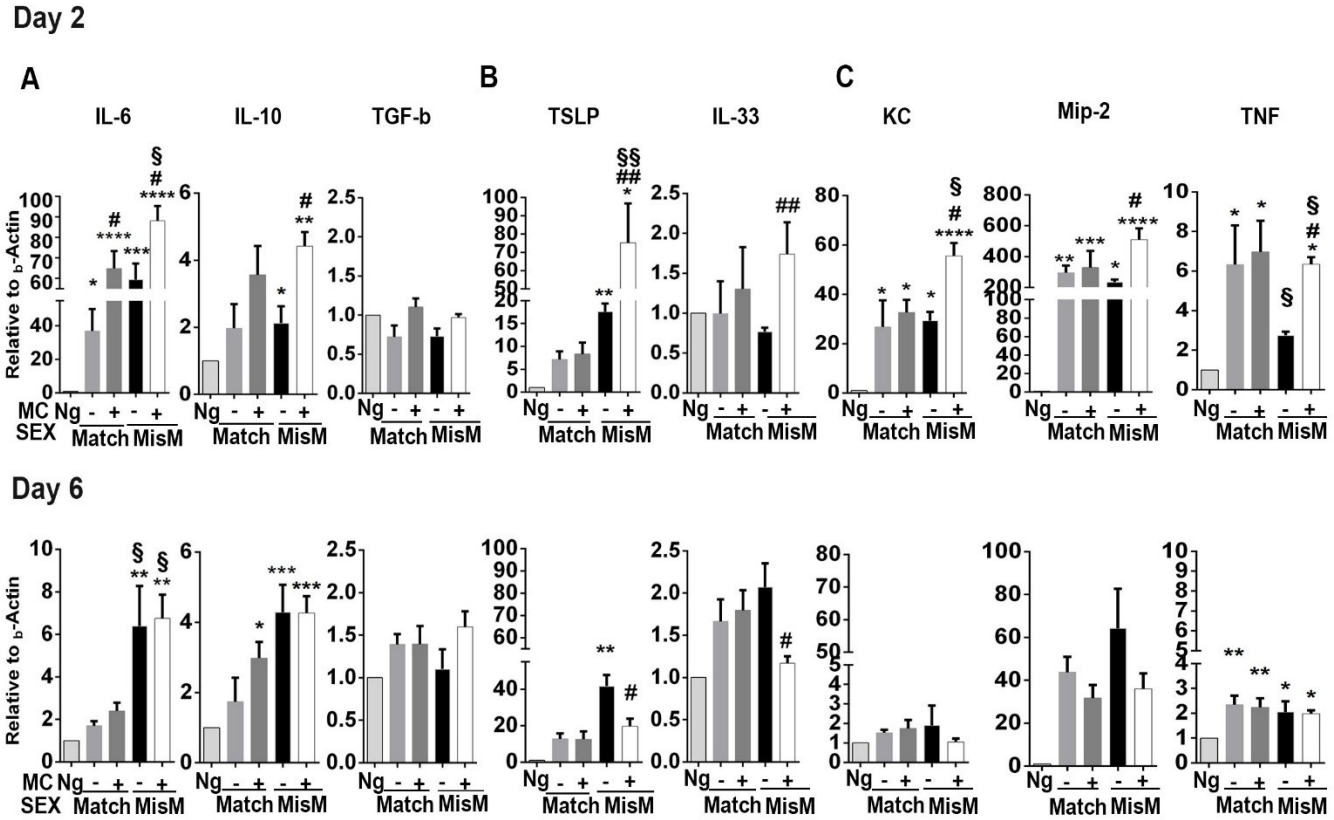
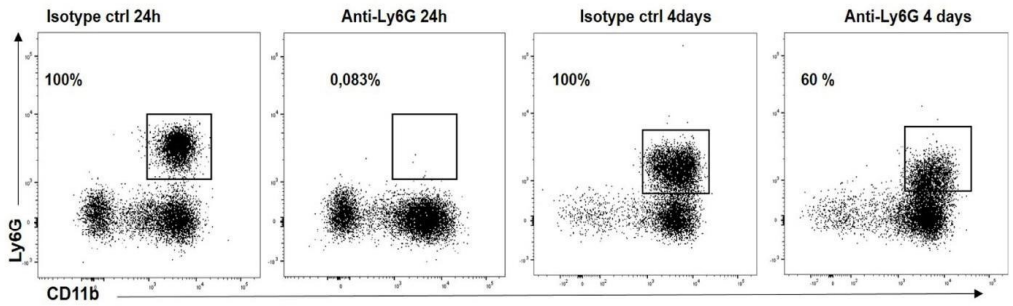

Day 2
Neutrophils (10^4)
Monocytes (10^4)
Macrophages (10^4)
B cells (10^6)
T cells (10^6)
Fox p3(10^5)
Absolute number
MC Ng - + - +
SEX Match MisM
Day 6
Absolute number
MC Ng - + - +
SEX Match MisM

Figure 6.


Day 2
A
B
C
IL-6
IL-10
TGF-b
TSLP
IL-33
KC
Mip-2
TNF
Relative to b-Actin
MC Ng - + - +
SEX Match MisM
Day 6

Ngo-Nyekel & al.

Figure 7.



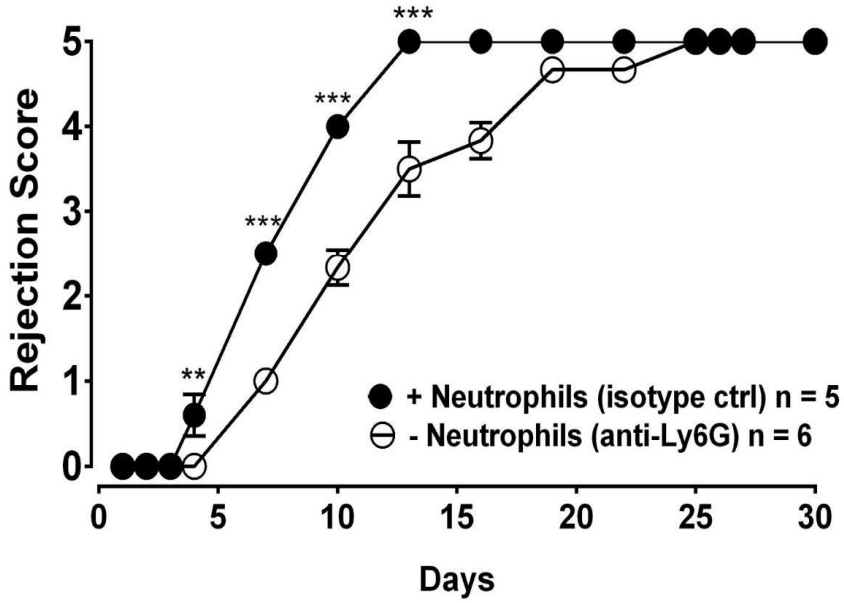


Figure 8

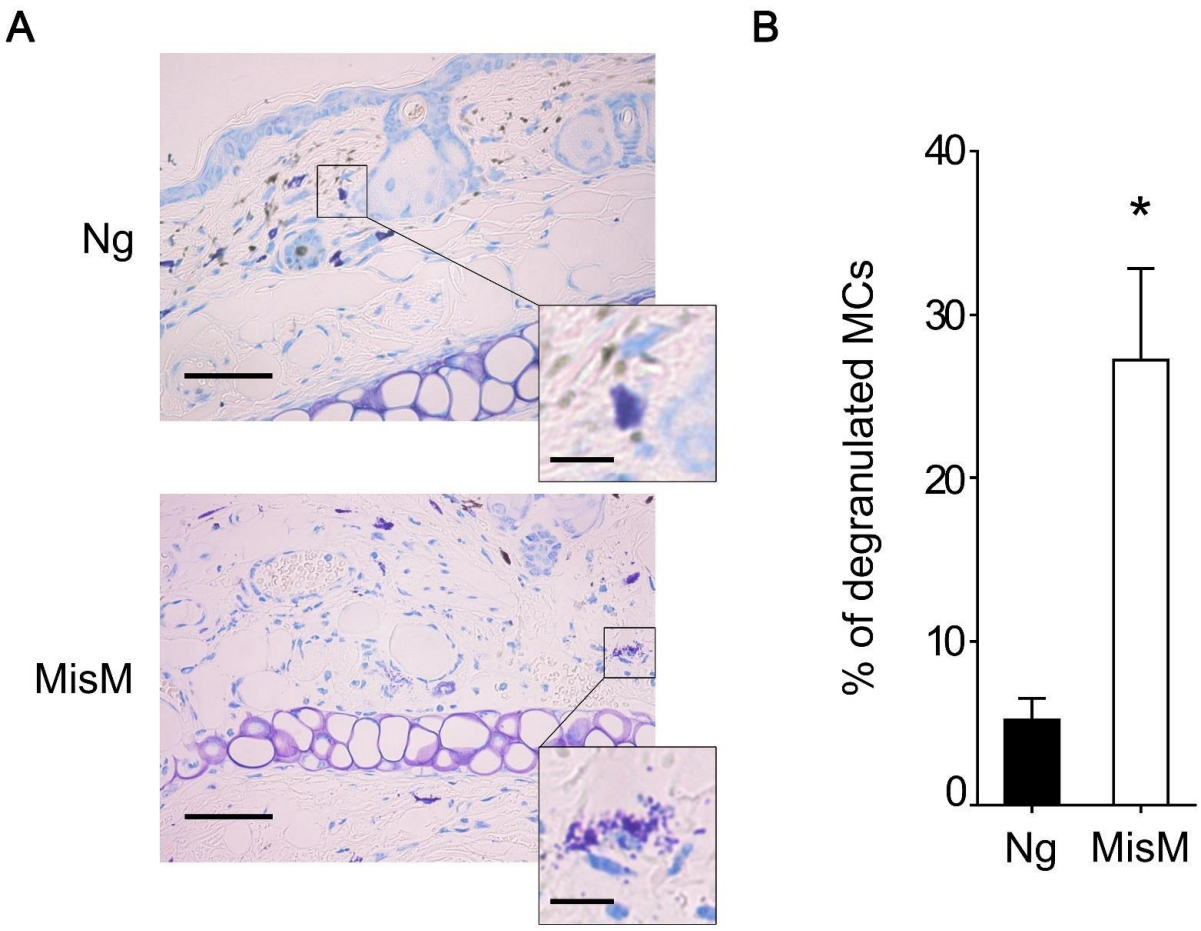
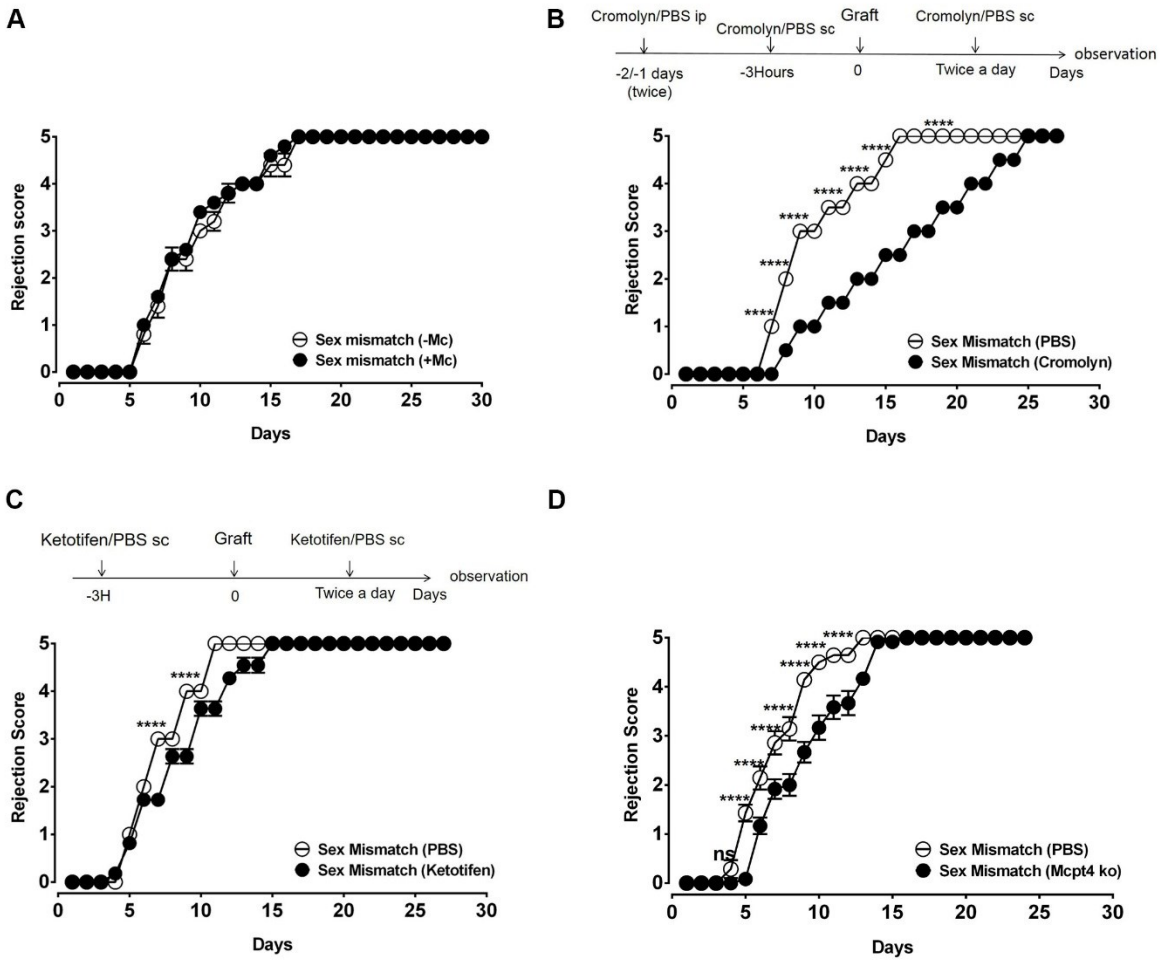


Figure 9.


A
Rejection score
Days
Sex mismatch (-Mc)
Sex mismatch (+Mc)
B
Cromolyn/PBS ip
Cromolyn/PBS sc
Graft
Cromolyn/PBS sc
observation
-2/-1 days (twice)
-3Hours
0
Twice a day
Days
Rejection Score
Days
Sex Mismatch (PBS)
Sex Mismatch (Cromolyn)
C
Ketotifen/PBS sc
Graft
Ketotifen/PBS sc
observation
-3H
0
Twice a day
Days
Rejection Score
Days
Sex Mismatch (PBS)
Sex Mismatch (Ketotifen)
D
Rejection Score
Days
ns
Sex Mismatch (PBS)
Sex Mismatch (Mcpt4 ko)

Discussion

Chaque année en France, plus de 14000 personnes sont en attente d'une greffe d'organe (foie, coeur, rein…) mais aussi de greffe de tissus (peau, cornée, moelle osseuse). Les greffes cutanées sont généralement réalisées après une brûlure sévère ou à la suite de lésions cutanées graves. Elles se font souvent avec un greffon provenant du patient lui-même, ce qui évite les problèmes de rejet. Cependant, selon l'âge, la localisation de la lésion, l'étendue ou la gravité (par exemple, les brûlures graves du deuxième degré qui touchent l'épiderme et sa membrane basale contenant des cellules en division cellulaire ou encore les brûlures du troisième degré qui touchent l'épiderme, la membrane basale et le derme) une greffe provenant d'un donneur sera nécessaire pour que le patient recouvre la santé (G. 1987); (Hexsel, Loosemore et al. 2015).

Bien qu'il y ait eu des progrès ces dernières années, le défi majeur de la transplantation, du point de vue médical ou de recherche, est d'éviter le rejet de l'organe ou du tissu transplanté par le receveur du fait de leur incompatibilité génétique. En effet, même si l'usage de traitement immunosuppresseur reste une condition indispensable pour éviter le rejet, le problème des effets secondaires demeure. Ainsi l'inhibition du système immunitaire rend les patients transplantés vulnérables à diverses infections. Nous avons vu en introduction qu'au cours de la transplantation allogénique, le système immunitaire du receveur reconnaît la greffe comme un composant étranger (le non-soi). Des mécanismes de rejet vont alors se mettre en place pour éliminer cet élément qui lui semble étranger (Goldstein, Tesar et al. 2003), (Nogueira, Lindsten et al. 2009) ; (Jiang, Herrera et al. 2004).

Parmi les acteurs de la réponse immunitaire pouvant agir contre le greffon, on distingue les mastocytes qui sont particulièrement présents dans la peau où ils forment un véritable réseau de cellules sentinelles. Ainsi, les MCs, compte tenu de leur localisation, pourraient donc avoir une influence majeure sur les mécanismes immunitaires associés au rejet de la greffe de peau.

Les mastocytes induisent le rejet rapide du greffon chez l'hôte

Le nouveau modèle murin RMB (Red Mast cells ans Basophils) établi par le laboratoire d'accueil, et qui permet la détection et déplétion conditionnelle des mastocytes par la toxine diphtérique, nous a permis de développer un modèle de greffe basé sur l'incompatibilité d'antigène mineur sexuel. En effet, le phénomène de rejet est induit en remplaçant un morceau de peau d'oreille d'une souris femelle (en présence et en absence de mastocytes) par un morceau de peau d'oreille d'une souris mâle (antigène mâle non présent chez la femelle) en présence ou en absence de mastocytes. Ce modèle nous permet d'évaluer l'implication du mastocyte dans les mécanismes inflammatoires conduisant au rejet ou à la tolérance de la greffe de peau.

Nos résultats montrent que le rejet du greffon survient en absence ou en présence des mastocytes reproduisant les données de la littérature ((Celli, Albert et al. 2011) (Elizabeth Simpson, and et al. 1997, Itoh, Nakae et al. 2010)). Néanmoins, notre modèle nous a permis d'évaluer différents stades de la cinétique du rejet. Nos résultats ont montré que la présence des mastocytes entraine un rejet plus rapide du greffon par l'hôte dans nos conditions expérimentales n'impliquant aucune pré-tolérisation comparé à la condition en absence de mastocytes. Contrairement à notre modèle, qui répond à des cas habituellement rencontrés dans la situation clinique le modèle de l'équipe de Noëlle nécessite des conditions strictes de suppression des cellules lymphocytaire T CD4+ et T CD8+ effectrices par infusion de cellules allogéniques en présence d'un anticorps tolérogène (anti-CD154). Dans leurs conditions le mastocyte joue donc un rôle bénéfique dans la tolérance alors que dans nos conditions les mastocytes joueraient un rôle délétère avec une influence négative sur le devenir de la greffe.

Par ailleurs, le modèle de greffe dans les études de l'équipe de Noëlle est différent car leur modèle implique les antigènes majeurs d'histocompatibilités (H-2K, D et L / I-A et I-E chez la souris) au niveau de la peau du dos de souris génétiquement différentes(Lu, Lind et al. 2006), (de Vries, Pino-Lagos et al. 2011).

Dans notre contexte immunitaire impliquant les antigènes mineurs d'histocompatibilité (en l'occurrence les antigènes mâles HY), le rejet est observé dans les 6 jours suivant la greffe. Ceci nous permet de visualiser facilement le tissu en microscopie contrairement à la peau du dos ou la cinétique de rejet est plus long(Lu, Lind et al. 2006) ; (de Vries,

Pino-Lagos et al. 2011). En effet, la peau de l'oreille et celle du dos ne présentent pas la même épaisseur et donc la revascularisation pourrait être associée à des réponses immunitaires différentes.

En plus la localisation et le type d'antigène qui module l'activité du mastocyte et leur nombre sont tout aussi importants. Nous avons noté que les mastocytes de l'hôte semblaient avoir une importance capitale dans le rejet comparativement aux mastocytes provenant du greffon. En effet, la présence de mastocytes uniquement dans le greffon, mais pas chez le receveur n'a pas une influence importante sur le rejet qui semble donc impliquer majoritairement les mastocytes de l'hôte. Le nombre de mastocytes dans la partie du greffon est donc trop faible pour jouer un rôle dans le rejet (Gordon, Mathieson et al. 1976, Sena, S Wachtel et al. 1976).

En outre, il a été montré *in vivo* comme *in vitro* que les mastocytes modulaient l'activité des lymphocytes T par l'expression des molécules du CMH de classe II *(Kambayashi and Laufer 2014)*. Ceci soulève donc la question de la voie de reconnaissance du greffon par le mastocyte en dehors de l'aspect purement inflammatoire. Nous suggérons donc que les mastocytes sont capables de reconnaitre un certain nombre d'antigènes associés à ceux de l'histocompatibilité mineure et qu'après apprêtement, ils les présenteraient ensuite aux lymphocytes T CD8+ cytotoxique *(Kambayashi, Allenspach et al. 2009, Gaudenzio, Sibilano et al. 2016)*. En effet, un rôle des mastocytes dans la présentation de l'antigène est discuté dans la littérature et il a été démontré dans des modèles inflammatoires que l'activation des mastocytes en réponse à différents stimuli induit la sécrétion de granules cytoplasmiques mastocytaires. De plus cette activation présente une dynamique distincte et des caractéristiques dépendant du modèle inflammatoire (Gaudenzio, Sibilano et al. 2016).

Alors qu'une greffe de peau induit une réponse inflammatoire massive et fulgurante, une question en suspens reste celle des signaux induisant l'activation des mastocytes. Néanmoins, il est fortement probable qu'il s'agit d'un ensemble de signaux étant donné le grand nombre de récepteurs exprimés à la surface du mastocyte (A., Yingxin et al. 2018). De plus, une question soulevée également est celle de savoir si le mastocyte peut intervenir directement dans le rejet du greffon par l'intermédiaire par exemple de protéases libérées. Les mastocytes expriment des récepteurs TLR (Toll-like receptor) appartenant à la famille des PRRs (Pattern-recognition receptors) susceptibles de reconnaitre des motifs moléculaires cibles du greffon et d'activer les mastocytes pour

libérer des cytokines et chimiokines (Matsushima, Yamada et al. 2004). Une approche pourrait être de vérifier si la stimulation de ces récepteurs TLRs pourrait expliquer l'activation instantanée du mastocyte dans la médiation du rejet rapide par des expériences de reconstitution avec des mastocytes dépourvu de ces récepteurs. En effet, certains travaux cliniques, rapportent que la signalisation induite par les TLRs contribue à l'alloréactivité (Goldstein, Tesar et al. 2003). Les zones lésées vont libérer des ligands des TLRs et d'autres molécules de danger initiant la réponse inflammatoire (Auchincloss, Lee et al. 1993) ; (Benichou, Valujskikh et al. 1999). L'identification d'un possible voie d'allo-reconnaissance par le mastocyte et son implication directe dans le rejet reste donc un défi majeur afin de mieux comprendre les mécanismes d'activation et d'action directs du mastocyte dans les allorejets de greffe de peau. De plus, on remarque aussi que la vitesse du rejet va dépendre du type d'alloantigène présent. Notre cinétique de rejet qui a lieu de façon précoce et celle observée dans d'autres modèles d'étude (alloantigène majeur) pourrait expliquer cette différence (de Vries, Pino-Lagos et al. 2011).

Les mastocytes modulent l'infiltrat des cellules immunitaires dans l'oreille et sur les ganglions lymphatiques drainants après la greffe.

L'examen de l'environnement cellulaire après l'allogreffe de peau nous a permis de détecter et de quantifier les cellules présentes dans la greffe précocement dès 2 jours après la greffe, puis au jour 6 au moment où le rejet est continu et rapide.

Nous avons tout d'abord noté une augmentation importante du nombre de mastocytes deux jours après la greffe, indiquant une migration et un recrutement ou encore une prolifération au site de la greffe durant la phase précoce. Pendant cette phase, les mécanismes relatifs à l'immunité innée vont avoir lieu. Des études anciennes soulignent notamment cette augmentation en nombre de mastocytes après transplantation (Colvin, Dvorak et al. 1974). Les mastocytes sont donc abondants dans les différents tissus des patients transplantés et leur infiltration a été observée dès la première semaine après la transplantation. Les patients avec un nombre accru de mastocytes ont également montré des rejets encore plus sévères (Pardo, Diaz et al. 2000). Ce nombre élevé de mastocytes est peut-être associé à la sévérité de l'œdème et de la lésion notamment liée à l'acte

chirurgical. Cependant les résultats de Lu et al à l'inverse montrent une absence de mastocytes dans les rejets de greffe à histocompatibilité majeure. Selon eux, cette perte de mastocyte n'était pas due à leur émigration vers les ganglions mais plutôt à l'élimination cytotoxique directe des mastocytes par l'hôte. Mais cette hypothèse n'a pas été clairement prouvée dans leur modèle. De plus il s'agit clairement d'un modèle de greffe tolérogène avec des mécanismes inflammatoires et immunologiques différents de notre modèle.

Un autre résultat majeur dans notre modèle a été une augmentation beaucoup plus importante et significative de neutrophiles deux jours post-greffe révélant leur migration et leur recrutement au niveau du site greffé. Ce recrutement est clairement favorisé par la présence de mastocytes. Il est transitoire puisque le nombre de neutrophiles diminue considérablement (> 50 fois) au Jour 6.

De plus, le rejet d'allogreffe de peau est généralement caractérisé par une augmentation de la perméabilité vasculaire ce qui favorise le recrutement de cellules inflammatoires et la formation d'un œdème comme dans la réaction d'hypersensibilité´ retardée (Delayed-type hypersensibility ou DTH) (VanBuskirk, Wakely et al. 1998). Le rejet rapide pourrait donc être une conséquence directe du recrutement important des neutrophiles par les mastocytes suite à l'allogreffe de peau. Ainsi il a été montré que dans un modèle de rejet de greffe de peau, d'importants dommages tissulaires dus à une infiltration massive de neutrophiles recrutés favorisaient le rejet (Surquin, Buonocore et al. 2005). Plusieurs facteurs comme la production de réactifs oxygénés, mais aussi la libération de protéases, comme l'élastase pourrait avoir un effet direct et induire ces dommages tissulaires (Porcherie, Mathieu et al. 2011) .

La présence massive et significative des neutrophiles dans notre modèle indique bien le recrutement précoce de ces cellules et par conséquent le rejet. En absence des mastocytes le rejet est plus tardif et on observe un recrutement plus tardif des neutrophiles probablement médié par les monocytes et les macrophages qui sont *a contrario* significativement présents en absence des mastocytes. Il y aurait donc un phénomène compensatoire permettant le recrutement des neutrophiles en absence de mastocytes mais survenant plus tardivement. Nous avons aussi remarqué que le profil de recrutement cellulaire en général était inversé à 6 jours en absence des mastocytes comparé au jour 2 en présence des mastocytes, ce qui a permis de confirmer notre hypothèse du rejet rapide et précoce dépendant de la présence des mastocytes.

Les théories sur l'implication des cellules immunitaires innées dans le rejet d'allogreffe commencent tout juste à émerger car pendant de nombreuses années on s'est focalisé sur les cellules du système immunitaire adaptatif dans le domaine de l'immunologie de la transplantation. En effet, les études montrent que les cellules T sont à la fois nécessaires et suffisantes pour le rejet de pratiquement tous les tissus allogéniques. Les recherches ont donc été focalisées sur les mécanismes induits par les cellules T sur le rejet d'allogreffe et sur l'induction de tolérance. Cependant, la compréhension progressive des réponses innées aux molécules dérivées de micro-organismes a généré un nouveau regain d'attention pour le domaine de l'immunité innée et a mis en évidence son rôle crucial dans la formation de la réponse adaptative, mais aussi dans les réponses directes ce qui est un aspect très important de ce bras de l'immunité (Iwasaki and Medzhitov 2004, Pradeu and Cooper 2012). En accord avec ces observations, un nombre croissant de publications a émergé examinant le rôle du système immunitaire inné dans le rejet et la tolérance de l'allogreffe, notamment via des mécanismes comprenant l'élimination ou l'inhibition des cellules T effectrices de l'hôte et la destruction des cellules du donneur (P., M. et al. 2011). Les cellules innées reconnaissent des molécules largement exprimées dérivées de pathogènes ou de cellules apoptotiques. Ils peuvent avoir à la fois des effets pro- et anti-inflammatoires, mais également influencer de manière importante l'initiation des réponses immunitaires adaptatives (Spahn, Li et al. 2014).

Nous avons également remarqué peu d'effets, ou en tout cas des effets moins importants, dans le recrutement cellulaire au niveau des ganglions drainant par rapport à celui observé au niveau de la greffe. Notre hypothèse est que l'ensemble des mécanismes menant au rejet rapide était plus local que systémique faisant intervenir des acteurs du système de défense inné contre le greffon. Nous pourrions envisager de prélever les ganglions un peu avant le jour 2 post-greffe afin de vérifier que les effets de la réponse au niveau systémique ont lieu plus précocement dès les premières heures consécutives à la transplantation.

Notre travail apporte une nouvelle explication sur la façon dont les composants cellulaires du système immunitaire inné participent à la réponse immunitaire au cours de la transplantation de la peau voire d'autres organes solides. Le lien particulier entre les mastocytes et les neutrophiles dans notre modèle d'étude sera davantage développé ultérieurement.

Les MCs favorisent la production accrue de plusieurs cytokines et chimiokines dans la phase précoce après la greffe.

Nous avons précédemment vu que les MCs dans des modèles d'ischémie-reperfusion peuvent induire le recrutement des cellules inflammatoires en sécrétant des médiateurs des réponses inflammatoires. Nous nous sommes donc centrés sur les réponses locales dans la peau pour étudier les réponses moléculaires observées après l'allogreffe de peau d'oreille. Nous avons montré que l'induction significative de l'expression des cytokines et chimiokines MIP-2, KC et de TNF est en accord avec le recrutement des neutrophiles deux jours après la transplantation en présence des mastocytes, puisqu'en leur absence l'expression tardive de ces gènes était associée à leur recrutement tardif. Les mastocytes, du moins leur présence, semblent nécessaires pour le recrutement des neutrophiles au site de la greffe ou pour amplifier la réponse immunitaire pour un rejet accéléré du greffon. Néanmoins, malgré le fait que le mastocyte peut produire ces chimiokines et cytokines en grande quantité d'autres cellules, et notamment des cellules épithéliales de la peau, peuvent aussi en produire de grandes quantités. Il semble donc que c'est la réponse inflammatoire généralisée impliquant aussi la dégranulation mastocytaire (voir plus loin) qui en est responsable.

Ces conclusions sont aussi confortées par l'expression importante du TSLP (thymic stromal lymphopoietin) et d'IL-33 deux jours après la greffe en présence des mastocytes et bien plus tard en absence de mastocytes. Le mastocyte n'étant pas le principal producteur de ces cytokines (Saluja, Zoltowska et al. 2016) cela suggère l'implication d'autres acteurs cellulaires qui participent au rejet. La TSLP et l'IL-33 sont principalement sécrétées dans les tissus par les cellules épithéliales et les fibroblastes en réponse à divers facteurs environnementaux tels que les lésions mécaniques comme dans le cas de la greffe de peau ((Oyoshi, Larson et al. 2010, Gajardo, Morales et al. 2015)).

Ces deux cytokines jouent un rôle central en tant que régulateur principal de l'inflammation allergique chez la souris et l'homme et se révèlent donc clairement être de nouvelles cibles pour la thérapie en transplantation de la peau. Les mastocytes en exprimant respectivement leurs récepteurs Cytokine Receptor-like Factor 2 (CRLF2) et ST2, sont capables de s'activer et donc d'effectuer leurs fonctions immunitaires (Morita, Moro et al. 2016).

Dans notre étude on observe la sécrétion de ces deux cytokines, et en particulier, celle du TSLP est fortement induite par la présence de mastocytes. Son expression est bien corrélée à la cinétique de rejet dans les deux conditions et peut donc influer sur les fonctions du mastocyte dans l'amplification des mécanismes inflammatoires conduisant au rejet de la greffe tant physiologiquement que dans des inflammations de type allergique (Divekar and Kita 2015).

Le TSLP et l'IL-33 affectent également d'autres propriétés biologiques des mastocytes, tels que la croissance, le développement, l'adhésion et la survie mais en aucun cas leur dégranulation (Allakhverdi, Comeau et al. 2007); (V., Shoko et al. 2011); (H., Tatsukuni et al. 2007); (Iikura, Suto et al. 2007). Donc leur expression suite à la greffe pourrait être à l'origine de l'augmentation quantitative des mastocytes dans les conditions de rejet rapide et également au retour hypothétique des mastocytes dans les greffes déficientes en mastocytes. Cependant, afin de mieux caractériser et confirmer les variations observées dans l'expression des ARNm de la TSLP et de l'IL-33, des expériences indépendantes supplémentaires doivent être réalisées analysant notamment plus en détail leur provenance et leur rôle dans l'activation des mastocytes ou le dialogue entre mastocytes et cellules tissulaires productrices. Il est notamment acquis que les protéases du mastocyte peuvent jouer un rôle dans l'activation de la pro-forme de l'IL33 (Lefrançais, Roga et al. 2012). Il serait donc intéressant de vérifier sous quelle forme se trouve l'IL-33 dans l'ensemble des conditions afin de mieux évaluer son rôle la fois sur le mastocyte et indépendamment du mastocyte. Réciproquement il faudrait vérifier l'impact des mastocytes sur une éventuelle dégradation de l'IL-33 dans notre étude comme il a déjà été démontré dans d'autres études (Roy, Ganesh et al. 2014).

En outre, il est aussi connu que le TSLP et IL-33 ont une influence sur l'activité chimiotactique agissant sur les neutrophiles et qui dépend des mastocytes *(Roussel, Farias et al. 2013);* (Kim, Siracusa et al. 2013)*).* Ainsi, compte tenu de l'effet de dégradation des chymases des mastocytes sur les protéines IL-33 et de l'effet de l'IL-33 sur la fonction des mastocytes, une interaction complexe pourrait exister entre l'IL-33, les neutrophiles, les mastocytes et les cellules épithéliales pour favoriser le rejet de la greffe.

Les neutrophiles sont des acteurs importants du rejet précoce des greffes.

Dans notre étude, nous avons montré que MIP-2, KC, et TNF étaient fortement et significativement exprimés de manière mastocyte-dépendante justifiant donc le recrutement des neutrophiles après la greffe de peau d'oreille en phase précoce en présence de mastocytes tandis que ce recrutement apparaît en phase plus tardive en absence des mastocytes.

Nous avons donc effectué des expériences fonctionnelles afin d'étudier le rôle des neutrophiles dans le rejet de greffe. Les résultats obtenus en analysant la cinétique de rejet chez les souris possédant des mastocytes en présence et en absence de neutrophiles étaient semblables à ceux observés dans l'étude du rôle du mastocyte. En effet, le rejet est retardé en absence de neutrophiles et accéléré en leur présence, suggérant donc un rôle important des neutrophiles dans les processus menant aux dommages tissulaires. Par ailleurs, 6 jours après la greffe nous avons observé une diminution des neutrophiles à la fois chez les souris syngéniques (contrôle autogreffe) et les souris allogreffées (mâle-femelle) en présence de mastocytes, confirmant leur contribution dans les mécanismes anti-inflammatoires modulant la réparation du tissu endommagé. Cependant, des expériences supplémentaires doivent être effectuées afin d'identifier les facteurs modulant l'activation et la migration des neutrophiles, pour potentiellement bloquer leur activité au site de l'allogreffe cutanée. Par ailleurs, l'évaluation de leur statut d'activation limitée dans notre étude à l'expression du CD11b évalué dans des résultats préliminaires ne montre pas de différences notables et est insuffisante car les neutrophiles acquièrent déjà ce cluster de différentiation dans le sang au moment de leur migration dans les tissus. Nous pourrions ainsi quantifier différents marqueurs d'activation comme la production des ROS (les espèces réactives de l'oxygène), l'expression du CD16, de la Phospholipase A2, la libération de l'élastase qui est très caractéristique de l'activation des neutrophiles lors des mécanismes inflammatoires (Viedma Contreras José 1999). Les ROS et la libération de l'élastase ont clairement être impliqués dans le rejet de greffes (Scozzi, Ibrahim et al. 2017).

Nos expériences ont aussi démontré que les neutrophiles infiltrent le tissu également dans le cas d'une greffe syngénique. Dans ce cas le mastocyte ne semble pas jouer un rôle dans le recrutement et l'infiltrat est moins important. Dans ce cas le neutrophile pourrait aussi jouer un rôle dans la réparation tissulaire, comme cela a été récemment

démontré dans le cas d'inflammation stérile (Nicolás-Ávila, Adrover et al. 2017). Il semble donc que dans le cas de greffe allogénique c'est l'excès de neutrophiles induit par le mastocyte qui est à l'origine du rejet.

Influence de la dégranulation des mastocytes dans l'allogreffe de peau

Certains stimuli induisent les mastocytes à libérer immédiatement le contenu de leurs granules incluant de nombreux médiateurs impliqués dans le processus inflammatoire. La sécrétion instantanée de ces médiateurs inflammatoires a lieu par dégranulation. Nous avons observé que déjà 6h après la greffe, les souris greffées–syngéniques présentaient une dégranulation plus importante et significative par rapport aux souris greffées allogéniques chez lesquelles il y avait un rejet de greffe en présence de mastocytes.

Nous avons par la suite vérifié l'effet de la dégranulation sur le rejet de greffe. L'utilisation de la cromolyne, un stabilisateur des mastocytes par blocage des canaux calciques empêchant la dégranulation, nous a permis d'observer le même retard qu'en absence de mastocytes. Ceci montre donc que la dégranulation influe sur le rejet de la peau. Par ailleurs, De Vries V.C. et al., ont montré que même dans le modèle de tolérance (souris pre-tolérisées), la dégranulation des mastocytes induisait une rupture de tolérance périphérique avec une diminution des cellules Treg ainsi que des gènes liés à la tolérance (de Vries, Wasiuk et al. 2009).

La dégranulation des mastocytes a aussi été observée dans le cas d'une greffe syngénique (résultats non montrés) car les processus inflammatoires en réponse à la lésion tissulaire issue de l'acte chirurgical sont mis en place pour le nettoyage rapide du tissu lésé et de sa réparation tissulaire rapide. Ces résultats montrent donc que le contexte de la réaction inflammatoire est très important. En effet, les souris greffées de sexe compatible, ne possèdent pas d'alloantigène pouvant provoquer le rejet de la greffe. De plus, de précédentes études antérieures ont déjà soutenu le rôle de la dégranulation des mastocytes tant *in vitro* qu'*in vivo* dans les mécanismes de réparation des inflammations non infectieuses. Ceci inclut notamment les maladies auto-immunes comme par exemple les fibroses d'organes (Levi-Schaffer and Piliponsky 2003), ou

encore d'autres affections cutanées (Iba, Shibata et al. 2004) ; (Levi-Schaffer, Gare et al. 1990); (Weller, Foitzik et al. 2006).

Les granules cytoplasmiques contiennent de nombreux médiateurs inflammatoires. Les médiateurs tels que l'histamine ou encore certaines protéases spécifiques de MC telles que la chymase murine Mcpt4 (fonctionnellement similaire à la chymase humaine), libérés après dégranulation ont une activité vasoactive (Pons, Ali et al. 2017) et chimioattractive (Nestle, Filgueira et al. 1998, Kenji, Fumitaka et al. 2000) favorisant l'infiltration des neutrophiles. Cependant il y a une dualité dans la régulation du recrutement des neutrophiles par la chymase Mcpt4. Alors que Roy A et al décrivent une activité plutôt de type inhibitrice du recrutement des neutrophiles par la chymase murine Mcpt4 et son homologue humain dans les péritonites, Reber et al associent le recrutement des neutrophiles à l'expression et à l'activité enzymatique de Mcpt-4 dans les inflammations pulmonaires (Roy, Ganesh et al. 2014); (Reber and Frossard 2014) démontrant une fois de plus la dualité du rôle des mastocytes suivant le type d'inflammation ou de stimulus.

L'histamine stockée dans les granules des MC a une puissante activité de vasodilatation en relaxant les muscles lisses des capillaires et augmente la perméabilité vasculaire, deux mécanismes essentiels nécessaires à l'extravasation (M. and E. 1982) ; (Singh, Pang et al. 1999) ; (W. and R.A. 1996) ; (Wang, Xiong et al. 2008).

Pour vérifier l'impact de ces deux médiateurs, la protéase Mcpt4 et l'histamine, sur le rejet de la greffe de peau, nous avons bloqué les récepteurs H1 à l'histamine avec de la Kétotifène et effectué des expériences d'allogreffes sur des souris déficientes en Mcpt4 (Mcpt4 knock-down). Le rejet était légèrement retardé dans les 2 cas. Le blocage de l'activité de ces deux protéines présentait un effet de type intermédiaire par rapport aux effets important observés avec la cromolyne et à l'effet retardé observé lors des expériences réalisées en absence de mastocyte. L'hypothèse attenante serait que, probablement, plusieurs produits contenus dans des granules des mastocytes agissent en synergie ou de manière indépendante mais combinée pour produire l'effet biologique des mastocytes dans la greffe. Certains de ces effets peuvent être indirects comme par exemple la libération précipitée de cytokines stimulant les mastocytes et des chimiokines attirant les neutrophiles, qui peuvent également être libérées par d'autres cellules dans une réponse inflammatoire. Cependant, si les effets stabilisant de la cromolyne sont souvent contestés avec des différences importantes entre espèces (rat et

souris notamment) dans certaines études (Oka, Kalesnikoff et al. 2012), il n'en reste pas moins que tout est dépendant du modèle utilisé et de la durée d'administration de la cromolyne (Oka, 2012). Nous avons pu confirmer qu'il est nécessaire que le traitement soit administré plusieurs jours avant d'entreprendre toute procédure expérimentale, puis quelques jours après la transplantation chez la souris alors que chez le rat l'effet est immédiat (Hannah, Laura et al. 2016); (Tellechea, Leal et al. 2016); (Gan, O'Sullivan et al. 2016); (Vincent, Vang et al. 2013); (Oka, Kalesnikoff et al. 2012, Muto, Wang et al. 2014). Cette différence est certainement explicable par une différence de métabolisation et d'élimination du produit chez ces 2 espèces. Ceci montre également que tout l'environnement joue un rôle dans le rejet et le processus inflammatoire et qu'on ne peut réduire cela à l'activité d'une seule cellule mais que l'on doit replacer une réponse cellulaire dans la globalité du système. Ceci démontre l'importance du travail *in vivo*.

De plus dans notre étude, le blocage uniquement des récepteurs H1 à l'histamine par administration de la Kétotifène, pourrait expliquer l'effet intermédiaire cinétiquement observé, car on n'inhibe pas l'activité des autres récepteurs histaminiques à savoir H2, H3, H4, exprimés sur certaines cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques. La démarche la plus rigoureuse pour pouvoir étudier le rôle de l'histamine dans la vasodilatation vasculaire pour la médiation du rejet serait l'administration simultanée d'agents bloquant pour chacun des récepteurs ou alors plus simplement de réaliser l'étude sur des souris déficientes pour tous les récepteurs histaminiques.

Notre étude apporte un élément supplémentaire quant à la compréhension de l'influence des produits de la dégranulation mastocytaire dans le modèle d'allogreffes de peau d'oreille. La dégranulation joue donc un rôle nécessaire au recrutement des neutrophiles dans les tissus greffés et à l'induction du rejet accéléré du greffon. Cette étude permet donc de progresser dans l'identification des molécules impliquées dans l'accélération du rejet de l'allogreffe cutanée.

En outre, nous pouvons suggérer l'implication d'autres protéases spécifiques aux mastocytes, libérées lors de la dégranulation mastocytaire, qui peuvent agir indépendamment ou alors en synergie pour potentialiser l'effet délétère du mastocyte dans l'immunorégulation négative induisant le rejet d'allogreffe de peau. De Vries et al dans leur travail sur la tolérance de greffe, montrent que la protéase MCP-6 (dont le substrat est l'IL-6), diminue activement l'IL-6 dans un environnement local afin de maintenir la tolérance. Ces résultats sont en accord avec les nôtres dans la mesure où

nous avons obtenu une expression importante d'ARNm d'IL-6 en présence ou en absence de mastocytes. Ils observent une augmentation identique et significative en mesurant la quantité de protéine dans les conditions de rejet (de Vries and Noelle 2010)

Nous avons confirmé que l'expression de l'IL-6 est un biomarqueur du rejet dans tous les cas, que le rejet soit rapide en présence de mastocytes ou tardif en absence de mastocytes conformément aux études réalisées antérieurement (Shen and Goldstein 2009). Son expression est plus importante en présence de mastocytes en accord avec le rejet plus rapide. De plus, d'autres études ont aussi permis de démontrer que l'IL-6 pourrait jouer un rôle dans le recrutement des neutrophiles (Fielding, McLoughlin et al. 2008).

Les autres biomarqueurs de l'allorejet et la phase de réparation

Nous nous sommes intéressés à l'infiltrat inflammatoire après la greffe de peau d'oreille pour deux raisons. En effet nous avons observé un profil cinétique très différent selon qu'on soit en présence ou en absence de mastocytes.

En effet, au cours du rejet, l'infiltrat cellulaire est stable pour certaines populations cellulaires (monocytes et macrophages) et transitoire pour d'autres (neutrophiles, lymphocytes B, T effecteurs et T régulateurs).

Nous avons remarqué un infiltrat important et significatif des lymphocytes B dans le rejet rapide en présence de mastocytes. En absence des mastocytes on observait cet infiltrat dans le rejet tardif. Ceci suggère que les lymphocytes B semblent être impliqués dans les processus immunitaires se produisant après transplantation. Nous avons voulu rester prudents quant à leur rôle précis dans l'amplification du rejet ou dans la réparation car l'infiltrat de cellules B a été caractérisé sur la seule base de l'expression du CD19. En effet, il a été montré que les lymphocytes B pouvaient avoir des fonctions immunorégulatrices (B reg) à la fois dans le rejet et dans la tolérance (V., L. et al. 2008) ; (Zarkhin, Talisetti et al. 2010). Nous avons observé un profil identique de recrutement et de migration des lymphocytes B entre les contrôles greffés syngéniques et allogéniques en présence de mastocytes. Ce profil est inversé dans le cas des rejets de greffe tardifs en absence de mastocytes. Ceci suggère qu'il pourrait y avoir une différence qualitative pour

les lymphocytes B présents au moment du rejet, notamment en termes de phénotype, selon la présence ou l'absence de MCs. En effet, tout comme les lymphocytes T, les lymphocytes B sont maintenant reconnus comme ayant deux implications principales en immunité : soit comme des cellules pro-inflammatoires, soit comme des cellules régulatrices (Mauri and Blair 2010). Ainsi, dans le cas des souris contrôles avec greffe syngéniques, la tolérance est notamment associée à une accumulation des lymphocytes B au sein de la greffe. Ces résultats pourraient être en accord avec des travaux qui ont souligné précédemment l'importance des lymphocytes B dans la mise en place de la tolérance dans des modèles murins (L., P. et al. 2011); (Lal, Zhang et al. 2009). En effet ici, l'élimination des lymphocytes B lors de la transplantation conduisait à l'abrogation de cette tolérance. De manière intéressante, une équipe a montré que l'IL-10, une cytokine connue pour son rôle anti-inflammatoire, était indispensable à l'établissement de cette tolérance (Chen et al. 2011). Nos résultats ont aussi montré une augmentation significative d'ARN messagers de l'IL-10 dans la greffe syngénique et allogénique mastocyte-dépendant pouvant justifier le recrutement des lymphocytes B régulateurs. Cette cytokine peut agir sur différents types cellulaires et conduire à la suppression de diverses fonctions (Asadullah, Sterry et al. 2003). En effet, l'IL-10 *in vivo* s'est avérée jouer un rôle clé dans la modulation du recrutement des neutrophiles et de l'inflammation pulmonaire au cours de l'infection par *Streptococcus pneumoniae* (F., A. et al. 2015). L'expression d'ARNm d'IL-10 a été décrite comme fortement augmentée pour l'infiltrat cellulaire après une allogreffe cutanée tolérante (F., A. et al. 2015) ;(Lu, Lind et al. 2006); (Zheng, Steele et al. 1997). Les données supportent l'idée que la production d'IL-10, à la suite d'une allogreffe de peau pourrait moduler l'expression d'autres cytokines pro-inflammatoires et ainsi influencer l'infiltrat inflammatoire dans les oreilles greffées. Il pourrait ainsi éviter une inflammation excessive du tissu greffé. Néanmoins, dans le cas des greffes syngénique cette augmentation d'IL10 ne semble pas être importante puisqu'aucune différence du processus de réparation n'est observée entre souris sauvages et déficientes en mastocytes. De la même manière, l'IL-10 ne semble pas avoir d'influence sur le rejet de greffe.

L'importance des lymphocytes B dans les processus immunologiques associés au rejet provient de deux évidences. D'abord par la part de plus en plus reconnue de la composante humorale de certains rejets et en particulier du rejet chronique, puis de la fonction propre du lymphocyte B dans la régulation du système immunitaire. De plus, l'utilisation récente de nouveaux outils a permis de spécifier ces données et d'affirmer

que 10 à 30% des rejets aigus possèdent une composante humorale et cellulaire. Le rejet humoral chronique est une des causes majeures de perte de greffon. Le rôle des lymphocytes B bien qu'actuellement sous-estimé et mal connu pourrait donc impliquer ces cellules de façon importante dans la réponse allogénique mais aussi dans la phase réparatrice par sa composante régulatrice. Le rôle du lymphocyte B en transplantation ne se limiterait donc pas uniquement à une réaction inflammatoire par la production d'anticorps, la présentation antigénique et la sécrétion de cytokines (Zarkhin, Talisetti et al. 2010). En conclusion, la caractérisation phénotypique plus poussée des lymphocytes B devrait permettre une meilleure identification de leurs différentes populations présentes et de leurs fonctions dans le cadre à la fois d'une greffe de peau allogénique et d'une greffe de peau syngénique (tolérance).

Nous avons évoqué une autre population cruciale dans la régulation immunitaire en introduction : les lymphocytes T régulateurs. En effet, les cellules du système immunitaire défendent constamment l'organisme contre les pathogènes par l'induction de signaux activateurs mais jouent aussi un rôle inhibiteur pour freiner le système, empêcher son emballement ou stopper le processus inflammatoire. Parmi les acteurs impliqués dans cette balance négative, les lymphocytes T régulateurs (Treg) occupent le premier rôle depuis de nombreuses années. Fortement présents dans les greffes de sexe compatible où la tolérance est observée en présence de mastocytes, l'équipe de Noëlle a montré le rôle bénéfique du dialogue entre Treg et mastocytes dans la maintenance de la tolérance (Lu, Lind et al. 2006). L'utilisation des souris double knock-in Foxp3-eGFP/RMB dans notre étude nous a permis d'appréhender ce rôle complexe des mastocytes dans la tolérance cutanée, du moins dans la phase de réparation tissulaire. Grâce à une évaluation des greffes de peau d'oreille syngéniques et allogéniques, nous avons effectué l'analyse phénotypique du recrutement et de la migration de Tregs pendant la greffe cutanée dans les deux cas. Néanmoins, à part une petite accélération de recrutement dans la phase initiale de rejet de l'allogreffe à J2 nous n'avons pas trouvé de différence notable contrairement au modèle de greffe tolérogénique de Lu et al (Lu, Lind et al. 2006). Ces résultats indiquent que les mastocytes ne semblent pas jouer une influence majeure sur cette population même si nos résultats préliminaires en microscopie confocale montrent le recrutement de Tregs majoritairement aux abords de la greffe et minoritairement à l'intérieure de la greffe mais en contact avec les mastocytes.

Nous avons vu précédemment qu'il y avait une expression importante d'IL-10 qui pourrait provenir du dialogue entre lymphocytes T régulateurs et mastocytes. En effet, d'une part, il a été démontré *in vitro* que les lymphocytes T régulateurs de type (Tr1) sécrètent de l'IL-10 (Cottrez, Hurst et al. 2000) et d'autre part, que l'IL-10 possède des fonctions anti-inflammatoires liées au développement (favorisant la différenciation des LT en Treg) et au recrutement des T régulateurs (Levings, Sangregorio et al. 2001); (Jarrod 2001). Néanmoins, comme discuté auparavant, l'IL10 comme les T régulateurs ne semble pas jouer un rôle important ni dans la greffe syngénique ni dans la greffe allogénique. Une des limites de notre travail encore une fois réside dans la caractérisation phénotypique des T régulateurs qui s'est faite sur l'expression seule des marqueurs βTCR et FoxP3 (*via* l'eGFP), alors que ces cellules sont identifiables par d'autres marqueurs cités précédemment en introduction. En outre, des expériences de déplétion des T régulateurs avec un anti CD25+ (clone PC61) ne nous ont pas permis de constater que l'absence de T régulateurs changeait le devenir de la greffe à savoir le rejet en présence de mastocytes (résultats non montrés). En effet, si l'administration de l'anti-CD25 PC61 retardait le rejet comme en absence de mastocyte, elle déplétait toutes les cellules CD25+, incluant aussi les T CD4+ effecteurs. Il a été démontré que dans le modèle de greffe H-Y-dépendent, les cellules T CD4 pouvaient à elle seule sans intervention de cellules T C8 cytotoxiques être responsables du rejet. Or la molécule CD25 est induite suite à l'activation des lymphocytes. Il aurait donc fallu étudier l'implication des Foxp3 dans les mécanismes associés au rejet dans un modèle totalement déficient en cellules strictement CD25+, Foxp3+ et d'autres molécules spécifiques des T régulateurs.

Les premières études *in vitro* ont montré que l'action des Treg nécessitait une interaction cellulaire directe(Takahashi, Kuniyasu et al. 1998); (Thornton and Shevach 1998). Malgré le fait que nous n'avons pas observé des différences notables en nombre, *in vivo* nous avons repéré des interactions de durée plus ou moins longue entre ces lymphocytes T régulateurs et les mastocytes suggérant une coopération au cours de la mise en place des mécanismes liés à la réparation tissulaire après la greffe cutanée. Il serait donc important d'examiner plus amplement ces interactions cellulaires, afin de mieux les caractériser et de définir leur rôle potentiel non seulement dans les processus de tolérance cutanée mais aussi de réparation cutanée et de cicatrisation.

Nous avons décrit de nombreuses cellules en introduction dont les cellules dendritiques qui ont une plasticité phénotypique et fonctionnelle leur permettant de développer des réponses spécifiques et non spécifiques aux antigènes. Faisant partie de l'immunité innée, elles tiennent un rôle critique dans le rejet car elles vont activer les lymphocytes T afin d'établir un lien avec l'immunité adaptative pour médier le rejet tissulaire. C'est d'ailleurs dans ce cadre-là que, Celli et al avaient regardé par imagerie les déplacements dynamiques vers les ganglions des cellules dendritiques provenant du greffon et ceux du receveur. Ils ont ainsi montré que ces DCs migraient très rapidement vers les ganglions et activaient les cellules T qui finissaient par détruire le tissu greffé (Celli, Albert et al. 2011). Dans notre étude, nous avons vérifié l'implication des DCs dans le rejet de greffe de peau cutanée en étudiant leur migration dans les ganglions et leur possible recrutement au site de la greffe en présence et en absence de mastocytes. La mesure de l'expression du CD11c à 2 jours puis à 6 jours ne nous a apporté aucune information intéressante dans la mesure où l'inflammation d'un point de vue qualitative et quantitative, était similaire dans les deux cas, avec un profil augmenté à 2 jours en présence et absence de mastocytes. Par ailleurs, il a été démontré que les mastocytes en produisant du granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) et tumor necrosis factor (TNFα), contrôlait la migration des DCs vers les ganglions en condition de tolérance(de Vries, Pino-Lagos et al. 2011). Nous avons donc examiné l'accumulation de différentes populations de DC, dont les moDC, à la fois dans les ganglions et dans la peau greffée de l'oreille en présence et en absence de mastocytes. Là encore, aucune différence importante n'était notable. D'un point de vue critique, pour améliorer la détection de ces différentes populations dans les deux tissus, il serait certainement intéressant de les discriminer avec davantage de marqueurs car ceux que nous avions utilisés n'étaient probablement pas spécifiques ou alors insuffisants pour les détecter.

En revanche, comme dans l'étude de Celli et al, nous avons observé de façon rassurante une migration, et un recrutement de leucocytes au niveau de la greffe, à savoir les neutrophiles, les monocytes et les DCs (Celli, Albert et al. 2011).

CONCLUSION

En conclusion, notre travail visait à comprendre comment les mastocytes pouvaient réagir dans le système immunitaire cutané après une greffe de peau. Plusieurs axes ont été étudiés ; 1) leur rôle dans le rejet rapide de la greffe cutanée, 2) leur implication dans le recrutement et la migration cellulaire locale immédiatement après la greffe de peau, 3) la fonction de la dégranulation et des produits de dégranulation dans ce recrutement cellulaire conduisant principalement au rejet de la greffe cutanée puis à la tolérance et à la réparation tissulaire, et 4) la part contributive des autres cellules effectrices d'une part dans le rejet et d'autre part dans la réparation tissulaire.

Le résultat majeur montre que les mastocytes sont capables d'accélérer le rejet de la greffe de peau en sécrétant des médiateurs inflammatoires par le processus de dégranulation. Cette dégranulation déclenche un processus inflammatoire dans lequel des médiateurs peuvent également être libérés par d'autres cellules conduisant à une boucle d'amplification pour un rejet rapide de la greffe allogénique. Un aspect important de cette réaction inflammatoire est le recrutement des neutrophiles en très grand nombre qui participent à la destruction tissulaire. Ceci suggère donc que les mastocytes sont impliqués dans les mécanismes inflammatoires innés associés au rejet de la greffe de peau d'oreille. Ces mécanismes innés se révèlent donc être indépendants des mécanismes immunologiques adaptatifs impliquant des cellules T effectrices et les cellules B. Ils suggèrent que la stabilisation du mastocyte pourrait être un moyen important pour diminuer la réponse inflammatoire néfaste dans la greffe dans les tissus où elles sont prédominantes comme la peau connue pour être le tissu le plus difficilement transplantable, même en condition d'immunosuppression.

Notre travail a donc permis de comprendre les interactions directes et indirectes entre les mastocytes et d'autres cellules immunitaires innées et adaptatives afin de développer des stratégies thérapeutiques visant à moduler l'activité effectrice des mastocytes lors des transplantations tissulaires, notamment celles d'organes tel que le cœur, le poumon, le rein, et bien d'autres.

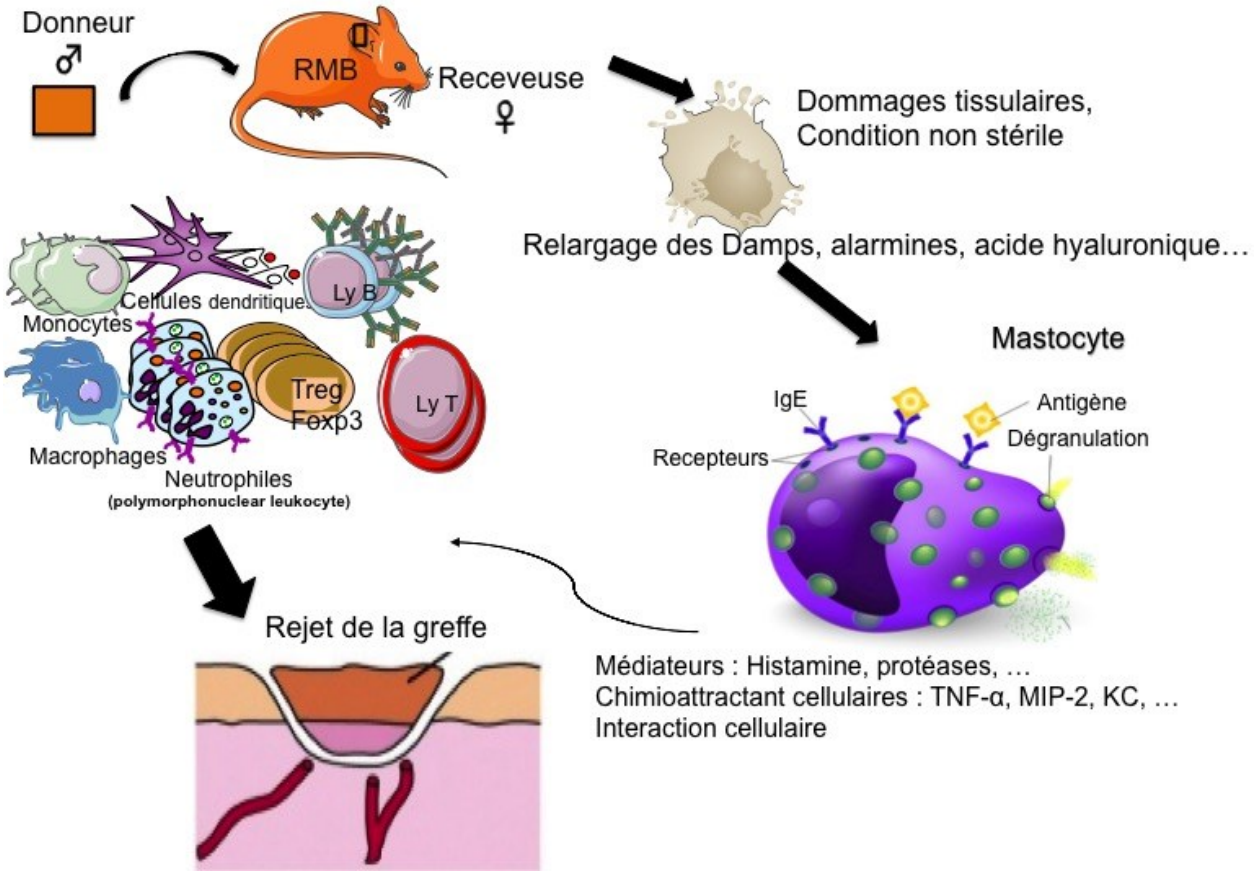


Figure 24 : Implication des Mastocytes dans les mécanismes inflammatoires associés au rejet de greffe de peau.

Perspectives

Nos données présentent les mastocytes comme des acteurs importants dans la réponse immunitaire innée associée au rejet de greffe de peau. Les mastocytes semblent certainement être importants dans l'influx de neutrophiles et de bien d'autres cellules *in vivo* dans notre modèle de rejet d'allogreffe cutanée. Le greffon n'est donc pas seulement la cible d'une réponse alloimmune exacerbée mais il est aussi à l'origine d'une réponse immune innée intense.

Cependant, des études supplémentaires doivent être effectuées afin d'identifier les signaux intrinsèques et extrinsèques liés à l'activation des mastocytes et qui moduleraient l'activation et la migration des neutrophiles, pour potentiellement les inhiber au site d'allogreffe cutanée. Nous avons par exemple évoqué une activité passant par les alarmines émises par les corps apoptotiques et afin de le vérifier nous pourrions stimuler *in vitro* des mastocytes BMMC avec des macrophages nécrosés et comparer la sécrétion de composés inflammatoires avec les résultats obtenus *in vivo*. Le rôle potentiel que jouerait le système du complément et les TLRs dans l'activation des mastocytes en bloquant leur engagement afin de mieux comprendre la fonction importante de la dégranulation mastocytaire nécessite d'être étudié.

Nous avons présenté des idées pour étudier les interactions directes ou indirectes entre les mastocytes et les autres cellules effectrices ayant pour résultante le rejet de l'allogreffe. A cela, nous pouvons aussi inclure des démarches scientifiques *in vitro* pour étudier les interactions entre mastocytes et T régulateurs par des réactifs induisant leur contact ou encore en bloquant les récepteurs permettant leur contact ou en travaillant sur des modèles déficients en éléments susceptibles de soutenir leur contact. Il en va de même pour le rôle des cellules B.

Par ailleurs, le laboratoire d'accueil possède des souris double transgéniques RMB-Fop3eGFP et RMB-LangeGFP qui vont pouvoir permettre de suivre le déplacement dynamique et *in situ* après la greffe des cellules Fop3+ et des cellules Langerin+ afin de mieux définir et comprendre la collaboration non seulement entre les mastocytes et les T regs, mais aussi les interactions partagées par les mastocytes, les dDCs et les LCs au cours du rejet de greffe de peau d'oreille.

En outre, le screening en tant que protéines des protéases mastocytaires et des cytokines libérées et leur blocage ou l'inhibition de leur activité permettraient d'apporter une lumière nouvelle sur leur importance dans le rejet de greffe. En l'occurrence le TSLP et l'IL-33 qui pourraient jouer un rôle sur l'activation des mastocytes et par conséquent induire leur expression par le mastocyte. En effet, cette production de cytokine pourrait avoir une influence sur d'autres cellules qu'il serait intéressant d'étudier. Notamment les ILCs qui résident dans la peau et dont toutes les fonctions restent encore mal connues dans les processus inflammatoires se produisant suite à une greffe.

À l'heure actuelle, il n'existe aucun agent cliniquement disponible qui inhibe spécifiquement la fonction des neutrophiles. Compte tenu de l'état d'immunosuppression des receveurs de greffe, si de telles thérapies sont développées, une surveillance rigoureuse de l'infection sera nécessaire, car une altération des neutrophiles ou une neutropénie augmente considérablement la susceptibilité aux infections fongiques et bactériennes. Cependant, il peut être possible de cibler des molécules sur les neutrophiles qui augmentent l'allo-immunité sans atténuer de manière préjudiciable la surveillance des agents pathogènes.
Par ailleurs, cibler la fonction effectrice des neutrophiles peut représenter une autre voie thérapeutique pour promouvoir la survie de l'allogreffe.
Enfin l'induction de l'apoptose des neutrophiles pourrait favoriser la tolérance. En effet, il existe notamment des traitements anti-nflammatoires qui accélèrent l'apoptose des neutrophiles de façon prédominante par la libération de l'arginase-1 et inhibent aussi l'activité des cellules T pour l'amélioration de la tolérance des allogreffes. Comme pour d'autres thérapies impliquant potentiellement des neutrophiles, d'autres études seront nécessaires pour déterminer quels mécanismes devraient être ciblés pour favoriser la survie de la greffe.

La déficience en mastocytes entraîne une diminution significative de la perméabilité vasculaire, et de l'infiltration des cellules inflammatoires dans les greffes de peau. Mais les éliminer de l'hôte poserait certainement de nombreux problèmes de santé. Les mastocytes restent des cellules indispensables aux défenses immunitaires contre les agents pathogènes et non pathogènes en dépit des conséquences nocives induites par son hyperactivation.

Les connaissances actuelles sur les mastocytes dans la greffe de peau proviennent en grande partie d'études observationnelles. Cependant, le travail expérimental d'autres organes et modèles suggère que les mastocytes jouent un double rôle.

D'un point de vue clinique, le rôle des mastocytes dans la transplantation d'organes chez l'homme n'a pas été étudié de manière approfondie, mais les mastocytes sont présents dans tous les organes transplantés comme la peau, y compris les reins, le foie et le cœur, et plusieurs études corrélatives suggèrent que leur présence est associée au rejet.
La question qui se pose est donc de savoir comment les mastocytes peuvent être régulés au profit de l'organe greffé afin de prévenir le rejet. Pour répondre à cette question, plusieurs aspects doivent être pris en compte: quel est le profil moléculaire d'activation acquis par les mastocytes lors de la greffe de peau et comment les mastocytes sont-ils affectés par l'immunosuppression traditionnelle donnée après une greffe d'organe? Selon les connaissances actuelles, il semble convenable d'envisager la suppression des propriétés pro-inflammatoires et de présentation des antigènes des mastocytes.

L'utilisation de la ciclosporine et la rapamicine qui sont des médicaments immunosuppresseurs les plus importants utilisés en transplantation de manière générale, n'affecte pratiquement pas les mastocytes après administration. Ceci offre l'opportunité de moduler immunologiquement les mastocytes, soit en les éliminant, soit en supprimant leur activité.
Bien que les bases moléculaires de la régulation des mastocytes dans l'inflammation et le rejet ou la tolérance ne soient pas encore totalement résolue, les informations actuelles suggèrent que favoriser la sécrétion de IL-10 et TGF-b par les mastocytes semble être l'approche la plus prometteuse pour un rôle bénéfique des mastocytes dans le rejet aigu de la greffe de peau mais potentiellement aussi dans le rejet chronique d'autres organes.
En supposant que les mastocytes, éventuellement aussi leur progéniteur, présentent un certain degré de plasticité et s'adaptent fonctionnellement en fonction de l'environnement immunologique, le défi pour les études futures est de définir le rôle des mastocytes comme source précieuse de cytokines immunosuppressives.

Par ailleurs la cromolyne ou cromoglycate sodium, utilisé depuis plus de 30 ans pour stabiliser les mastocytes et traiter les allergies a fait ses preuves dans de nombreux modèle de souris dont le notre, il devrait donc être facile de tester si cela pourrait également améliorer le succès de la transplantation d'organes chez les l'homme.

Notre étude en plus d'autres devraient inspirer d'autres recherches sur le rôle des mastocytes dans d'autres modèles de transplantation pour établir la base mécanistique de leurs effets afin que nous puissions contrôler le rejet quelle que soit la cellule maîtresse en faveur de la tolérance.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A., B. D., R. Rosemary, K. Ian, S. Ian and W. J. E. (1999). "Skin sensitization risk assessment: a comparative evaluation of 3 isothiazolinone biocides." Contact Dermatitis 40(3): 150-154.

A., C. P. and B. D. R. (1969). "Decreased neutrophils and megakaryocytes in anemic mice of genotype W/Wv." Journal of Cellular Physiology **73**(1): 25-30.

A., F. C. and H. K. A. (1989). "Ontogeny of langerhans cells in human embryonic and fetal skin: Cell densities and phenotypic expression relative to epidermal growth." American Journal of Anatomy **184**(2): 157-164.

A., I. A., G. M. M., M. D. D. and S. L. B. (1990). "Mast cells in cutaneous mastocytosis: accumulation of the MCTC type." Clinical & Experimental Allergy **20**(1): 53-58.

A., R. F., Y. Yingxin, K. Sangeeta, C. Nicolas and B. Ulrich (2018). "Non-IgE mediated mast cell activation." Immunological Reviews **282**(1): 87-113.

Abadja, F., B. Sarraj and M. J. Ansari (2012). "Significance of Th17 Immunity in Transplantation." Current opinion in organ transplantation **17**(1): 8-14.

Abonia, J. P., K. F. Austen, B. J. Rollins, S. K. Joshi, R. A. Flavell, W. A. Kuziel, P. A. Koni and M. F. Gurish (2005). "Constitutive homing of mast cell progenitors to the intestine depends on autologous expression of the chemokine receptor CXCR2." Blood **105**(11): 4308-4313.

Abraham, S. N. and A. L. St John (2010). "Mast cell-orchestrated immunity to pathogens." Nat Rev Immunol **10**(6): 440-452.

Abtin, A., R. Jain, A. J. Mitchell, B. Roediger, A. J. Brzoska, S. Tikoo, Q. Cheng, L. G. Ng, L. L. Cavanagh, U. H. von Andrian, M. J. Hickey, N. Firth and W. Weninger (2014). "Perivascular macrophages mediate neutrophil recruitment during bacterial skin infection." Nature immunology **15**(1): 45-53.

Allakhverdi, Z., M. R. Comeau, H. K. Jessup, B.-R. P. Yoon, A. Brewer, S. Chartier, N. Paquette, S. F. Ziegler, M. Sarfati and G. Delespesse (2007). "Thymic stromal lymphopoietin is released by human epithelial cells in response to microbes, trauma, or inflammation and potently activates mast cells." The Journal of Experimental Medicine **204**(2): 253-258.

Amulic, B., C. Cazalet, G. L. Hayes, K. D. Metzler and A. Zychlinsky (2012). "Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease." Annual Review of Immunology **30**(1): 459-489.

and, M. D. S. and Z. Werb (2001). "How Matrix Metalloproteinases Regulate Cell Behavior." Annual Review of Cell and Developmental Biology **17**(1): 463-516.

Andersen, H. B., M. Holm, T. E. Hetland, C. Dahl, S. Junker, P. O. Schiøtz and H. J. Hoffmann (2008). "Comparison of short term in vitro cultured human mast cells from different progenitors — Peripheral blood-derived progenitors generate highly mature and functional mast cells." Journal of Immunological Methods **336**(2): 166-174.

Anderson, D. M., S. D. Lyman, A. Baird, J. M. Wignall, J. Eisenman, C. Rauch, C. J. March, H. S. Boswell, S. D. Gimpel, D. Cosman and D. E. Williams (1990). "Molecular cloning of mast cell

growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms." Cell **63**(1): 235-243.

Anderson, J. M. (2015). "Exploiting the inflammatory response on biomaterials research and development." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **26**(3): 121.

Aoshiba, K., S. Yasui, M. Hayashi, J. Tamaoki and A. Nagai (1999). "Role of p38-Mitogen-Activated Protein Kinase in Spontaneous Apoptosis of Human Neutrophils." The Journal of Immunology **162**(3): 1692-1700.

Appay, V., P. R. Dunbar, M. Callan, P. Klenerman, G. M. A. Gillespie, L. Papagno, G. S. Ogg, A. King, F. Lechner, C. A. Spina, S. Little, D. V. Havlir, D. D. Richman, N. Gruener, G. Pape, A. Waters, P. Easterbrook, M. Salio, V. Cerundolo, A. J. McMichael and S. L. Rowland-Jones (2002). "Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections." Nature Medicine **8**: 379.

Appay, V. and S. L. Rowland-Jones (2001). "RANTES: a versatile and controversial chemokine." Trends in Immunology **22**(2): 83-87.

Arikan, C., D. Nart, M. Kilic, H. A. Yuksekkaya and S. Aydogdu (2008). "Association of mast cells and liver allograft rejection." Pediatr Transplant **12**(3): 347-352.

Arinobu, Y., H. Iwasaki, M. F. Gurish, S.-i. Mizuno, H. Shigematsu, H. Ozawa, D. G. Tenen, K. F. Austen and K. Akashi (2005). "Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(50): 18105-18110.

Arock, M. (2004). "Similitudes et différences entre les mastocytes et le polynucléaire basophile." Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique **44**(1): 23-36.

Arock, M. and P. Valent (2010). "Pathogenesis, classification and treatment of mastocytosis: state of the art in 2010 and future perspectives." Expert Review of Hematology **3**(4): 497-516.

Artis, D. and H. Spits (2015). "The biology of innate lymphoid cells." Nature **517**: 293.

Artuc, M., U. Muscha Steckelings and B. M. Henz (2002). "Mast Cell–Fibroblast Interactions: Human Mast Cells as Source and Inducers of Fibroblast and Epithelial Growth Factors." Journal of Investigative Dermatology **118**(3): 391-395.

Asadullah, K., W. Sterry and H. D. Volk (2003). "Interleukin-10 Therapy—Review of a New Approach." Pharmacological Reviews **55**(2): 241-269.

Asseman, C., S. Mauze, M. W. Leach, R. L. Coffman and F. Powrie (1999). "An Essential Role for Interleukin 10 in the Function of Regulatory T Cells That Inhibit Intestinal Inflammation." The Journal of Experimental Medicine **190**(7): 995-1004.

Auchincloss, H., R. Lee, S. Shea, J. S. Markowitz, M. J. Grusby and L. H. Glimcher (1993). "The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **90**(8): 3373-3377.

Awad, A. S., M. Rouse, L. Huang, A. L. Vergis, J. Reutershan, H. P. Cathro, J. Linden and M. D. Okusa (2009). "Compartmentalization of neutrophils in the kidney and lung following acute ischemic kidney injury." Kidney international **75**(7): 689-698.

Bangert, C., P. M. Brunner and G. Stingl (2011). "Immune functions of the skin." Clinics in Dermatology **29**(4): 360-376.

Barnard, C. N. (1967). "Human cardiac transplant: an interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Cape Town." South African Medical Journal **41**(48): 1271-1274.

Barr, R. M., O. Koro, D. M. Francis, A. K. Black, T. Numata and M. W. Greaves (1988). "The release of prostaglandin D2 from human skin in vivo and in vitro during immediate allergic reactions." British Journal of Pharmacology **94**(3): 773-780.

Beauvillain, C., P. Cunin, A. Doni, M. Scotet, S. Jaillon, M.-L. Loiry, G. Magistrelli, K. Masternak, A. Chevailler, Y. Delneste and P. Jeannin (2011). "CCR7 is involved in the migration of neutrophils to lymph nodes." Blood **117**(4): 1196-1204.

Beghdadi, W., L. C. Madjene, J. Claver, G. Pejler, L. Beaudoin, A. Lehuen, E. Daugas and U. Blank (2013). "Mast cell chymase protects against renal fibrosis in murine unilateral ureteral obstruction." Kidney Int **84**(2): 317-326.

Benhamou, M., E. H. Berenstein, M.-H. Jouvin and R. P. Siraganian (1994). "The receptor with high affinity for IgE on rat mast cells is a functional receptor for rat IgG2a." Molecular Immunology **31**(14): 1089-1097.

Benichou, G., A. Valujskikh and P. S. Heeger (1999). "Contributions of Direct and Indirect T Cell Alloreactivity During Allograft Rejection in Mice." The Journal of Immunology **162**(1): 352-358.

Benichou, G., Y. Yamada, S. H. Yun, C. Lin, M. Fray and G. Tocco (2011). "Immune recognition and rejection of allogeneic skin grafts." Immunotherapy **3**(6): 757-770.

Bensinger, S. J., A. Bandeira, M. S. Jordan, A. J. Caton and T. M. Laufer (2001). "Major Histocompatibility Complex Class II–Positive Cortical Epithelium Mediates the Selection of Cd4Immunoregulatory T Cells." The Journal of Experimental Medicine **194**(4): 427-438.

Benson, M. J., K. Pino-Lagos, M. Rosemblatt and R. J. Noelle (2007). "All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation." The Journal of Experimental Medicine **204**(8): 1765-1774.

Bentley, A. M., M. R. Jacobson, V. Cumberworth, J. R. Barkans, R. Moqbel, L. B. Schwartz, A.-M. A. Irani, A. B. Kay and S. R. Durham (1992). "Immunohistology of the nasal mucosa in seasonal allergic rhinitis: Increases in activated eosinophils and epithelial mast cells." Journal of Allergy and Clinical Immunology **89**(4): 877-883.

Bernink, J. H., C. P. Peters, M. Munneke, A. A. te Velde, S. L. Meijer, K. Weijer, H. S. Hreggvidsdottir, S. E. Heinsbroek, N. Legrand, C. J. Buskens, W. A. Bemelman, J. M. Mjösberg and H. Spits (2013). "Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues." Nature Immunology **14**: 221.

Bernstein, I. L. (1985). "Cromolyn sodium in the treatment of asthma: coming of age in the United States." J Allergy Clin Immunol **76**(2 Pt 2): 381-388.

Billingham, R. E., L. Brent and P. B. Medawar (2003). "'Actively acquired tolerance' of foreign cells1." Transplantation **76**(10): 1409-1412.

Billingham, R. E., L. Brent and P. B. Medawar (2010). "Pillars Article: 'Activity Acquired Tolerance' of Foreign Cells Nature 172: 603–606." The Journal of Immunology **184**(1): 5-8.

Bischoff, S. C., G. Sellge, A. Lorentz, W. Sebald, R. Raab and M. P. Manns (1999). "IL-4 enhances proliferation and mediator release in mature human mast cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**(14): 8080-8085.

Blandine, M., A. Catherine, S. Jean, H. Daniel, F. Dominique, S. François, P. Fabienne, C. Jean-Pierre, G. Bruno, T. Sylvie and D. L. S. Henri (2008). "Control of the Intracellular Pathway of CD1e." Traffic **9**(4): 431-445.

Blank, U. (2011). The Mechanisms of Exocytosis in Mast Cells. Mast Cell Biology: Contemporary and Emerging Topics. A. M. Gilfillan and D. D. Metcalfe. Boston, MA, Springer US**:** 107-122.

Blank, U., M. Essig, L. Scandiuzzi, M. Benhamou and Y. Kanamaru (2007). "Mast cells and inflammatory kidney disease." Immunol Rev **217**: 79-95.

Blank, U., I. K. Madera-Salcedo, L. Danelli, J. Claver, N. Tiwari, E. Sanchez-Miranda, G. Vazquez-Victorio, K. A. Ramirez-Valadez, M. Macias-Silva and C. Gonzalez-Espinosa (2014). "Vesicular trafficking and signaling for cytokine and chemokine secretion in mast cells." Front Immunol **5**: 453.

Bloom, G. D. (1974). Chapter 10 - STRUCTURAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF MAST CELLS A2 - Zweifach, Benjamin W. The Inflammatory Process (Second Edition). L. Grant and R. T. McCluskey, Academic Press**:** 545-599.

Boerma, M., W. P. Fiser, G. Hoyt, G. J. Berry, L. Joseph, J. Joseph, J. Wang, M. D. Crew, R. C. Robbins and M. Hauer-Jensen (2007). "Influence of mast cells on outcome after heterotopic cardiac transplantation in rats." Transpl Int **20**(3): 256-265.

Boix, F., O. Millan, D. San Segundo, E. Mancebo, M. Miras, A. Rimola, E. Fábrega, L. Allende, A. Minguela, E. Paz-Artal, M. López-Hoyos, M. Brunet and M. Muro (2015). "Activated Regulatory T Cells Expressing CD4 Biomarkers Could Be a Risk Factor in Liver Allograft Rejection." Transplantation Proceedings **47**(8): 2380-2381.

Borregaard, N. (2010). "Neutrophils, from Marrow to Microbes." Immunity **33**(5): 657-670.
Bos, J. D. and M. L. Kapsenberg (1993). "The skin immune system: progress in cutaneous biology." Immunology Today **14**(2): 75-78.

Boyce, J. A. (2007). "Mast cells and eicosanoid mediators: a system of reciprocal paracrine and autocrine regulation." Immunol Rev **217**: 168-185.

Bradding, P., Y. Okayama, P. H. Howarth, M. K. Church and S. T. Holgate (1995). "Heterogeneity of human mast cells based on cytokine content." The Journal of Immunology **155**(1): 297-307.

Braverman, I. M. (2000). "The Cutaneous Microcirculation." Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings **5**(1): 3-9.

Braza, F., S. Brouard, S. Chadban and D. R. Goldstein (2016). "Role of TLRs and DAMPs in allograft inflammation and transplant outcomes." Nature Reviews Nephrology **12**: 281.

Breton, G., J. Lee, Y. J. Zhou, J. J. Schreiber, T. Keler, S. Puhr, N. Anandasabapathy, S. Schlesinger, M. Caskey, K. Liu and M. C. Nussenzweig (2015). "Circulating precursors of human CD1c(+) and CD141(+) dendritic cells." The Journal of Experimental Medicine **212**(3): 401-413.

Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch and A. Zychlinsky (2004). "Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria." Science **303**(5663): 1532-1535.

Brossay, L., D. Jullien, S. Cardell, B. C. Sydora, N. Burdin, R. L. Modlin and M. Kronenberg (1997). "Mouse CD1 is mainly expressed on hemopoietic-derived cells." The Journal of Immunology **159**(3): 1216-1224.

Butterfield, J. H., J. P. Marcoux, D. Weiler and S. G. Harner (1988). "Mast cell pharyngitis as a cause of supraglottic edema." Archives of oto-rhino-laryngology **245**(2): 88-91.

Campbell, J. J., R. A. Clark, R. Watanabe and T. S. Kupper (2010). "Sézary syndrome and mycosis fungoides arise from distinct T-cell subsets: a biologic rationale for their distinct clinical behaviors." Blood **116**(5): 767-771.

Carbone, F. R., L. K. Mackay, W. R. Heath and T. Gebhardt (2013). "Distinct resident and recirculating memory T cell subsets in non-lymphoid tissues." Current Opinion in Immunology **25**(3): 329-333.

Caroline, C. and M. Muriel (2010). "DC subsets in positive and negative regulation of immunity." Immunological Reviews **234**(1): 317-334.

Carpentier, M., P. Chappert, C. Kuhn, M. Lalfer, H. Flament, O. Burlen-Defranoux, O. Lantz, A. Bandeira, B. Malissen, J. Davoust and D. A. Gross (2013). "Extrathymic induction of Foxp3(+) regulatory T cells declines with age in a T-cell intrinsic manner." Eur J Immunol **43**(10): 2598-2604.

Carrel, A. (1908). "TRANSPLANTATION IN MASS OF THE KIDNEYS." The Journal of Experimental Medicine **10**(1): 98-140.

Carrel, A. (1910). "VIII. On the Experimental Surgery of the Thoracic Aorta and Heart." Annals of Surgery **52**(1): 83-95.

Caughey, G. H. (2007). "Mast cell tryptases and chymases in inflammation and host defense." Immunological reviews **217**: 141-154.

Caux, C., C. Dezutter-Dambuyant, D. Schmitt and J. Banchereau (1992). "GM-CSF and TNF-α cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells." Nature **360**: 258.

Celli, S., M. L. Albert and P. Bousso (2011). "Visualizing the innate and adaptive immune responses underlying allograft rejection by two-photon microscopy." Nat Med **17**(6): 744-749.

Celli, S., M. L. Albert and P. Bousso (2011). "Visualizing the innate and adaptive immune responses underlying allograft rejection by two-photon microscopy." Nature Medicine **17**: 744.

Cerutti, A., I. Puga and G. Magri (2013). "The B cell helper side of neutrophils." Journal of Leukocyte Biology **94**(4): 677-682.

Chae, M. S., J. W. Kim, H. S. Chung, C. S. Park, J. Lee, J. H. Choi and S. H. Hong (2018). "The impact of serum cytokines in the development of early allograft dysfunction in living donor liver transplantation." Medicine (Baltimore) **97**(16): e0400.

Charles A. Janeway, J. and R. Medzhitov (2002). "Innate Immune Recognition." Annual Review of Immunology **20**(1): 197-216.

Chen, C.-C., M. A. Grimbaldeston, M. Tsai, I. L. Weissman and S. J. Galli (2005). "Identification of mast cell progenitors in adult mice." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(32): 11408-11413.

Chen, W., Y. Yuan and L. Zhang (2010). Scalable Influence Maximization in Social Networks under the Linear Threshold Model. 2010 IEEE International Conference on Data Mining.

Chen, Y., Christopher J. Haines, I. Gutcher, K. Hochweller, Wendy M. Blumenschein, T. McClanahan, G. Hämmerling, Ming O. Li, Daniel J. Cua and Mandy J. McGeachy (2011). Regulatory T Cells Promote T Helper 17 Cell Development In Vivo through Regulation of Interleukin-2." Immunity **34**(3): 409-421.

Cherrier, M. (2014). "Les cellules lymphoïdes innées." Med Sci (Paris) **30**(3): 280-288.
Chong, A. S. and M. L. Alegre (2012). "The impact of infection and tissue damage in solid-organ transplantation." Nat Rev Immunol **12**(6): 459-471.

Christoffersson, G., E. Vågesjö, J. Vandooren, M. Lidén, S. Massena, R. B. Reinert, M. Brissova, A. C. Powers, G. Opdenakker and M. Phillipson (2012). "VEGF-A recruits a proangiogenic MMP-9–delivering neutrophil subset that induces angiogenesis in transplanted hypoxic tissue." Blood **120**(23): 4653-4662.

Citro, A., E. Cantarelli, P. Maffi, R. Nano, R. Melzi, A. Mercalli, E. Dugnani, V. Sordi, P. Magistretti, L. Daffonchio, P. A. Ruffini, M. Allegretti, A. Secchi, E. Bonifacio and L. Piemonti (2012). "CXCR1/2 inhibition enhances pancreatic islet survival after transplantation." The Journal of Clinical Investigation **122**(10): 3647-3651.

Clark, R. A., S. J. Huang, G. F. Murphy, I. G. Mollet, D. Hijnen, M. Muthukuru, C. F. Schanbacher, V. Edwards, D. M. Miller, J. E. Kim, J. Lambert and T. S. Kupper (2008). "Human squamous cell carcinomas evade the immune response by down-regulation of vascular E-selectin and recruitment of regulatory T cells." The Journal of Experimental Medicine **205**(10): 2221-2234.

Clark, R. A. and T. S. Kupper (2007). "IL-15 and dermal fibroblasts induce proliferation of natural regulatory T cells isolated from human skin." Blood **109**(1): 194-202.

Cohen, J. L., A. Trenado, D. Vasey, D. Klatzmann and B. L. Salomon (2002).
"CD4Immunoregulatory T Cells." New Therapeutics for Graft-Versus-Host Disease **196**(3): 401-406.

Collison, L. W., C. J. Workman, T. T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K. M. Vignali, R. Cross, D. Sehy, R. S. Blumberg and D. A. A. Vignali (2007). "The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function." Nature **450**: 566.

Colvin, R. B., A. M. Dvorak and H. F. Dvorak (1974). "Mast cells in the cortical tubular epithelium and interstitium in human renal disease." Human Pathology **5**(3): 315-326.

Compton, S. J., J. A. Cairns, S. T. Holgate and A. F. Walls (2000). "Human mast cell tryptase stimulates the release of an IL-8-dependent neutrophil chemotactic activity from human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)." Clin Exp Immunol **121**(1): 31-36.

Cottrez, F., S. D. Hurst, R. L. Coffman and H. Groux (2000). "T Regulatory Cells 1 Inhibit a Th2-Specific Response In Vivo." The Journal of Immunology **165**(9): 4848-4853.

Crinier, A., C. Viant, M. Girard-Madoux and É. Vivier (2017). "Les cellules lymphoïdes innées." Med Sci (Paris) **33**(5): 534-542.

Dabbous, M. K., R. Walker, L. Haney, L. M. Carter, G. L. Nicolson and D. E. Woolley (1986). "Mast cells and matrix degradation at sites of tumour invasion in rat mammary adenocarcinoma." British Journal of Cancer **54**(3): 459-465.

Dahdah, A., G. Gautier, T. Attout, F. Fiore, E. Lebourdais, R. Msallam, M. Daeron, R. C. Monteiro, M. Benhamou, N. Charles, J. Davoust, U. Blank, B. Malissen and P. Launay (2014). "Mast cells aggravate sepsis by inhibiting peritoneal macrophage phagocytosis." J Clin Invest **124**(10): 4577-4589.

Dahdah, A., G. Gautier, T. Attout, F. Fiore, E. Lebourdais, R. Msallam, M. Daëron, R. C. Monteiro, M. Benhamou, N. Charles, J. Davoust, U. Blank, B. Malissen and P. Launay (2014). "Mast cells aggravate sepsis by inhibiting peritoneal macrophage phagocytosis." The Journal of Clinical Investigation **124**(10): 4577-4589.

Daniel, C., S. Horvath and P. M. Allen (1998). "A Basis for Alloreactivity: MHC Helical Residues Broaden Peptide Recognition by the TCR." Immunity **8**(5): 543-552.

Daniel, G. (2006). "To the Editor." European Journal of Immunology **36**(10): 2820-2820.

Darrasse-Jèze, G., A.-S. Bergot, A. Durgeau, F. Billiard, B. L. Salomon, J. L. Cohen, B. Bellier, K. Podsypanina and D. Klatzmann (2009). "Tumor emergence is sensed by self-specific CD44(hi) memory Tregs that create a dominant tolerogenic environment for tumors in mice." The Journal of Clinical Investigation **119**(9): 2648-2662.

Dausset, J. and H. Brecy (1957). "Identical Nature of the Leucocyte Antigens detectable in Monozygotic Twins by means of Immune Iso-Leuco-agglutinins." Nature **180**: 1430.

de Vries, V. C. and R. J. Noelle (2010). "Mast cell mediators in tolerance." Current opinion in immunology **22**(5): 10.1016/j.coi.2010.1008.1015.

de Vries, V. C., K. Pino-Lagos, E. C. Nowak, K. A. Bennett, C. Oliva and R. J. Noelle (2011). "Mast cells condition dendritic cells to mediate allograft tolerance." Immunity **35**(4): 550-561.

de Vries, V. C., K. Pino-Lagos, E. C. Nowak, K. A. Bennett, C. Oliva and R. J. Noelle (2011). "Mast Cells Condition Dendritic Cells to Mediate Allograft Tolerance." Immunity **35**(4): 550-561.

de Vries, V. C., A. Wasiuk, K. A. Bennett, M. J. Benson, R. Elgueta, T. J. Waldschmidt and R. J. Noelle (2009). "Mast cell degranulation breaks peripheral tolerance." American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons **9**(10): 10.1111/j.1600-6143.2009.02755.x.

Deaglio, S., K. M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J.-F. Chen, K. Enjyoji, J. Linden, M. Oukka, V. K. Kuchroo, T. B. Strom and S. C. Robson (2007). "Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression." The Journal of Experimental Medicine **204**(6): 1257-1265.

DeNicola, M. M., S. S. Weigt, J. A. Belperio, E. F. Reed, D. J. Ross and W. D. Wallace (2013). "Pathologic findings in lung allografts with anti-HLA antibodies." The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation **32**(3): 10.1016/j.healun.2012.1011.1018.

Depinay, N., F. Hacini, W. Beghdadi, R. Peronet and S. Mécheri (2006). "Mast Cell-Dependent Down-Regulation of Antigen-Specific Immune Responses by Mosquito Bites." The Journal of Immunology **176**(7): 4141-4146.

Di, Z.-H., L. Ma, R.-Q. Qi, X.-D. Sun, W. Huo, L. Zhang, Y.-N. Lyu, Y.-X. Hong, H.-D. Chen and X.-H. Gao (2016). "T Helper 1 and T Helper 2 Cytokines Differentially Modulate Expression of Filaggrin and its Processing Proteases in Human Keratinocytes." Chinese Medical Journal **129**(3): 295-303.

Divekar, R. and H. Kita (2015). "Recent advances in epithelium-derived cytokines (IL-33, IL-25 and TSLP) and allergic inflammation." Current opinion in allergy and clinical immunology **15**(1): 98-103.

Dombrowski, Y., T. O'Hagan, M. Dittmer, R. Penalva, S. R. Mayoral, P. Bankhead, S. Fleville, G. Eleftheriadis, C. Zhao, M. Naughton, R. Hassan, J. Moffat, J. Falconer, A. Boyd, P. Hamilton, I. V. Allen, A. Kissenpfennig, P. N. Moynagh, E. Evergren, B. Perbal, A. C. Williams, R. J. Ingram, J. R. Chan, R. J. M. Franklin and D. C. Fitzgerald (2017). "Regulatory T cells promote myelin regeneration in the central nervous system." Nature Neuroscience **20**: 674.

Dudda, Jan C., B. Salaun, Y. Ji, Douglas C. Palmer, Gwennaelle C. Monnot, E. Merck, C. Boudousquie, Daniel T. Utzschneider, Thelma M. Escobar, R. Perret, Stefan A. Muljo, M. Hebeisen, N. Rufer, D. Zehn, A. Donda, Nicholas P. Restifo, W. Held, L. Gattinoni and P. Romero (2013). "MicroRNA-155 Is Required for Effector CD8+ T Cell Responses to Virus Infection and Cancer." Immunity **38**(4): 742-753.

Durand, B., G. Migliaccio, N. Yee, K. Eddleman, T. Huima-Byron, A. Migliaccio and J. Adamson (1994). "Long-term generation of human mast cells in serum-free cultures of CD34+ cord blood cells stimulated with stem cell factor and interleukin- 3." Blood **84**(11): 3667-3674.

Dvorak, A. M., E. S. Morgan, R. P. Schleimer and L. M. Lichtenstein (1993). "Diamine oxidase-gold labels histamine in human mast-cell granules: a new enzyme-affinity ultrastructural method." Journal of Histochemistry & Cytochemistry **41**(6): 787-800.

E., K. and S. K. U. (2003). "Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer." Experimental Dermatology **12**(2): 109-125.

Echtenacher, B., D. N. Männel and L. Hültner (1996). "Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis." Nature **381**: 75.

Egawa, G. and K. Kabashima (2011). "Skin as a Peripheral Lymphoid Organ: Revisiting the Concept of Skin-Associated Lymphoid Tissues." Journal of Investigative Dermatology **131**(11): 2178-2185.
Egeblad, M. and Z. Werb (2002). "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression." Nature Reviews Cancer **2**: 161.

Ehrhardt, P., B. J. M. and J. Jens-Michael (2008). "The skin: an indispensable barrier." Experimental Dermatology **17**(12): 1063-1072.

Eklund, K. K., N. Ghildyal, K. F. Austen and R. L. Stevens (1993). "Induction by IL-9 and suppression by IL-3 and IL-4 of the levels of chromosome 14-derived transcripts that encode late-expressed mouse mast cell proteases." The Journal of Immunology **151**(8): 4266-4273.

El-Sawy, T., J. A. Belperio, R. M. Strieter, D. G. Remick and R. L. Fairchild (2005). "Inhibition of Polymorphonuclear Leukocyte–Mediated Graft Damage Synergizes With Short-Term Costimulatory Blockade to Prevent Cardiac Allograft Rejection." Circulation **112**(3): 320-331.

Elizabeth Simpson, D. S. and and P. Chandler (1997). "THE MALE-SPECIFIC HISTOCOMPATIBILITY ANTIGEN, H-Y:A History of Transplantation, Immune Response

Genes, Sex Determination and Expression Cloning." Annual Review of Immunology **15**(1): 39-61.

Engel, D. R., J. Maurer, A. P. Tittel, C. Weisheit, T. Cavlar, B. Schumak, A. Limmer, N. van Rooijen, C. Trautwein, F. Tacke and C. Kurts (2008). "CCR2 Mediates Homeostatic and Inflammatory Release of Gr1 Monocytes from the Bone Marrow, but Is Dispensable for Bladder Infiltration in Bacterial Urinary Tract Infection." The Journal of Immunology **181**(8): 5579-5586.

F, F. D. and W. J. J (2013). "Twenty-first century mast cell stabilizers." British Journal of Pharmacology **170**(1): 23-37.

F., P. H., N. P. A., M. D. Natalia, S. E. F. J., T. Javiera, P. M. J., A. L. Manuel, R. C. A., K. A. M. and B. S. M. (2015). "Interleukin-10 plays a key role in the modulation of neutrophils recruitment and lung inflammation during infection by Streptococcus pneumoniae." Immunology **146**(1): 100-112.

Fang, H., Y. Zhang, N. Li, G. Wang and Z. Liu (2018). "The Autoimmune Skin Disease Bullous Pemphigoid: The Role of Mast Cells in Autoantibody-Induced Tissue Injury." Frontiers in Immunology **9**(407).

Fielding, C. A., R. M. McLoughlin, L. McLeod, C. S. Colmont, M. Najdovska, D. Grail, M. Ernst, S. A. Jones, N. Topley and B. J. Jenkins (2008). "IL-6 Regulates Neutrophil Trafficking during Acute Inflammation via STAT3." The Journal of Immunology **181**(3): 2189-2195.

Fisson, S., G. Darrasse-Jèze, E. Litvinova, F. Septier, D. Klatzmann, R. Liblau and B. L. Salomon (2003). "Continuous Activation of Autoreactive CD4Regulatory T Cells in the Steady State." The Journal of Experimental Medicine **198**(5): 737-746.

Flanagan, J. G. and P. Leder (1990). "The ligand: A cell surface molecule altered in steel mutant fibroblasts." Cell **63**(1): 185-194.

Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, M. A. Gavin and A. Y. Rudensky (2005). "A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells." Nature Immunology **6**: 1142.

Franco, C. B., C.-C. Chen, M. Drukker, I. L. Weissman and S. J. Galli (2010). "Distinguishing Mast Cell and Granulocyte Differentiation at the Single-Cell Level." Cell Stem Cell **6**(4): 361-368.

François Bach, J. (2003). "Regulatory T cells under scrutiny." Nature Reviews Immunology **3**: 189.

Frandji, P., C. Oskéritzian, F. Cacaraci, J. Lapeyre, R. Peronet, B. David, J. G. Guillet and S. Mécheri (1993). "Antigen-dependent stimulation by bone marrow-derived mast cells of MHC class II-restricted T cell hybridoma." The Journal of Immunology **151**(11): 6318-6328.

Frandji, P., C. Tkaczyk, C. Oskeritzian, B. David, C. Desaymard and S. Mécheri (1996). "Exogenous and endogenous antigens are differentially presented by mast cells to CD4+ T lymphocytes." European Journal of Immunology **26**(10): 2517-2528.

Frandji, P., C. Tkaczyk, C. Oskéritzian, J. Lapeyre, R. Peronet, B. David, J.-G. Guillet and S. Mécheri (1995). "Presentation of Soluble Antigens by Mast Cells: Upregulation by Interleukin-4 and Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor and Downregulation by Interferon-γ." Cellular Immunology **163**(1): 37-46.

Fuchs, A., W. Vermi, Jacob S. Lee, S. Lonardi, S. Gilfillan, Rodney D. Newberry, M. Cella and M. Colonna (2013). "Intraepithelial Type 1 Innate Lymphoid Cells Are a Unique Subset of IL-12- and IL-15-Responsive IFN-3b3;-Producing Cells." Immunity **38**(4): 769-781.

Fukuzumi, T., N. Waki, Y. Kanakura, J. Nagoshi, S. Hirota, K. Yoshikawa and Y. Kitamura (1990). Differences in irradiation susceptibility and turnover between mucosal and connective tissue-type mast cells of mice.

Furuta, A., S. Miyoshi, Y. Itabashi, T. Shimizu, S. Kira, K. Hayakawa, N. Nishiyama, K. Tanimoto, Y. Hagiwara, T. Satoh, K. Fukuda, T. Okano and S. Ogawa (2006). "Pulsatile Cardiac Tissue Grafts Using a Novel Three-Dimensional Cell Sheet Manipulation Technique Functionally Integrates With the Host Heart, In Vivo." Circulation Research **98**(5): 705-712.

G., H. T. (1987). "Contouring of Donor Skin in Full-Thickness Skin Grafting." The Journal of Dermatologic Surgery and Oncology **13**(8): 883-888.

G., S. (1980). "New Aspects of Langerhans' Cell Function." International Journal of Dermatology **19**(4): 189-213.

Gabbiani, G., C. Chaponnier and I. Hüttner (1978). "Cytoplasmic filaments and gap junctions in epithelial cells and myofibroblasts during wound healing." The Journal of Cell Biology **76**(3): 561-568.

Gajardo, T., R. A. Morales, M. Campos-Mora, J. Campos-Acuña and K. Pino-Lagos (2015). "Exogenous interleukin-33 targets myeloid-derived suppressor cells and generates periphery-induced Foxp3(+) regulatory T cells in skin-transplanted mice." Immunology **146**(1): 81-88.

Galli, S. J. (2000). "Mast cells and basophils." Current Opinion in Hematology **7**(1): 32-39.
Galli, S. J., J. Kalesnikoff, M. A. Grimbaldeston, A. M. Piliponsky, C. M. M. Williams and M. Tsai (2005). "MAST CELLS AS "TUNABLE" EFFECTOR AND IMMUNOREGULATORY CELLS: Recent Advances." Annual Review of Immunology **23**(1): 749-786.

Galli, S. J. and M. Tsai (2012). "IgE and mast cells in allergic disease." Nature Medicine **18**: 693.
Galli, S. J., M. Tsai and A. M. Piliponsky (2008). "The development of allergic inflammation." Nature **454**: 445.

Gamble, H. J. and J. G. Stempak (1961). "Observations upon the mast cells of rat foetal tissues." Experientia **17**(10): 460-461.

Gan, P.-Y., K. M. O'Sullivan, J. D. Ooi, M. A. Alikhan, D. Odobasic, S. A. Summers, A. R. Kitching and S. R. Holdsworth (2016). "Mast Cell Stabilization Ameliorates Autoimmune Anti-Myeloperoxidase Glomerulonephritis." Journal of the American Society of Nephrology **27**(5): 1321-1333.

Gaudenzio, N., N. Espagnolle, L. T. Mars, R. Liblau, S. Valitutti and E. Espinosa (2009). "Cell-cell cooperation at the T helper cell/mast cell immunological synapse." Blood **114**(24): 4979-4988.

Gaudenzio, N., C. Laurent, S. Valitutti and E. Espinosa (2013). "Human mast cells drive memory CD4⁺ T cells toward an inflammatory IL-22 phenotype." Journal of Allergy and Clinical Immunology **131**(5): 1400-1407.e1411.

Gaudenzio, N., R. Sibilano, T. Marichal, P. Starkl, L. L. Reber, N. Cenac, B. D. McNeil, X. Dong, J. D. Hernandez, R. Sagi-Eisenberg, I. Hammel, A. Roers, S. Valitutti, M. Tsai, E. Espinosa and

S. J. Galli (2016). "Different activation signals induce distinct mast cell degranulation strategies." The Journal of Clinical Investigation **126**(10): 3981-3998.

Geissler, E. N., M. A. Ryan and D. E. Housman (1988). "The dominant-white spotting (W) locus of the mouse encodes the c-kit proto-oncogene." Cell **55**(1): 185-192.

Geissmann, F., M. G. Manz, S. Jung, M. H. Sieweke, M. Merad and K. Ley (2010). "Development of monocytes, macrophages and dendritic cells." Science (New York, N.Y.) **327**(5966): 656-661.

Ghaedi, M., Catherine A. Steer, I. Martinez-Gonzalez, Timotheus Y. F. Halim, N. Abraham and F. Takei (2016). "Common-Lymphoid-Progenitor-Independent Pathways of Innate and T Lymphocyte Development." Cell Reports **15**(3): 471-480.

Gibson, P. G., C. J. Allen, J. P. Yang, B. J. O. Wong, J. Dolovich, J. Denburg and F. E. Hargreave (1993). "Intraepithelial Mast Cells in Allergic and Nonallergic Asthma: Assessment Using Bronchial Brushings." American Review of Respiratory Disease **148**(1): 80-86.

Ginhoux, F., M. P. Collin, M. Bogunovic, M. Abel, M. Leboeuf, J. Helft, J. Ochando, A. Kissenpfennig, B. Malissen, M. Grisotto, H. Snoeck, G. Randolph and M. Merad (2007). "Blood-derived dermal langerin⁺ dendritic cells survey the skin in the steady state." The Journal of Experimental Medicine **204**(13): 3133-3146.

Goldman, M., A. Le Moine, M. Braun, V. Flamand and D. Abramowicz (2001). "A role for eosinophils in transplant rejection." Trends Immunol **22**(5): 247-251.

Goldstein, D. R., B. M. Tesar, S. Akira and F. G. Lakkis (2003). "Critical role of the Toll-like receptor signal adaptor protein MyD88 in acute allograft rejection." The Journal of Clinical Investigation **111**(10): 1571-1578.

Gondek, D. C., L.-F. Lu, S. A. Quezada, S. Sakaguchi and R. J. Noelle (2005). "Cutting Edge: Contact-Mediated Suppression by CD4 Regulatory Cells Involves a Granzyme B-Dependent, Perforin-Independent Mechanism." The Journal of Immunology **174**(4): 1783-1786.

Goodman, T. and L. Lefrançois (1988). "Expression of the γ-δ T-cell receptor on intestinal CD8+ intraepithelial lymphocytes." Nature **333**: 855.

Gordon, R. D., B. J. Mathieson, L. E. Samelson, E. A. Boyse and E. Simpson (1976). "The effect of allogeneic presensitization on H-Y graft survival and in vitro cell-mediated responses to H-y antigen." The Journal of Experimental Medicine **144**(3): 810-820.

Gould, D. S. and H. Auchincloss, Jr. (1999). "Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection." Immunology Today **20**(2): 77-82.

Graca, L., S. P. Cobbold and H. Waldmann (2002). "Identification of Regulatory T Cells in Tolerated Allografts." The Journal of Experimental Medicine **195**(12): 1641-1646.

Greaves, M. W. and R. A. Sabroe (1996). "Histamine: the quintessential mediator." J Dermatol **23**(11): 735-740.

Green, A. C., S. C. Wallingford and P. McBride (2011). "Childhood exposure to ultraviolet radiation and harmful skin effects: Epidemiological evidence." Progress in Biophysics and Molecular Biology **107**(3): 349-355.

Green, E. A., L. Gorelik, C. M. McGregor, E. H. Tran and R. A. Flavell (2003). "CD4 T regulatory cells control anti-islet CD8 T cells through TGF-β–TGF-β receptor interactions in type 1 diabetes." Proceedings of the National Academy of Sciences **100**(19): 10878-10883.

Greenberg, A. S., J. J. Egan, S. A. Wek, M. C. Moos, C. Londos and A. R. Kimmel (1993). "Isolation of cDNAs for Perilipins A and B: Sequence and Expression of Lipid Droplet-Associated Proteins of Adipocytes." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **90**(24): 12035-12039.

Grimbaldeston, M. A., C.-C. Chen, A. M. Piliponsky, M. Tsai, S.-Y. Tam and S. J. Galli (2005). "Mast Cell-Deficient W-sash c-kit Mutant Kit(W-sh/W-sh) Mice as a Model for Investigating Mast Cell Biology in Vivo." The American Journal of Pathology **167**(3): 835-848.

Grimbaldeston, M. A., S. Nakae, J. Kalesnikoff, M. Tsai and S. J. Galli (2007). "Mast cell–derived interleukin 10 limits skin pathology in contact dermatitis and chronic irradiation with ultraviolet B." Nature Immunology **8**: 1095.

Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J. E. de Vries and M. G. Roncarolo (1997). "A CD4+T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis." Nature **389**: 737.

Guan, P., A. H. M. Burghes, A. Cunningham, P. Lira, W. H. Brissette, K. Neote and S. R. McColl (1999). "Genomic Organization and Biological Characterization of the Novel Human CC Chemokine DC-CK-1/PARC/MIP-4/SCYA18." Genomics **56**(3): 296-302.

H., B. and L. H. (2004). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor neuropilin-1's distribution in astrocytic tumors." APMIS **112**(4-5): 257-263.

H., H. L., O. Tatsukuni, O. Keisuke, K. Naoki, S. Hajime, I. Motoyasu, O. Yoshimichi, A. Shizuo, S. Hirohisa, G. S. J. and N. Susumu (2007). "IL-33 induces IL-13 production by mouse mast cells independently of IgE-FcεRI signals." Journal of Leukocyte Biology **82**(6): 1481-1490.

Habibi Asl, B., H. Vaez, T. Imankhah and S. Hamidi (2014). "Impact of caffeine on weight changes due to ketotifen administration." Adv Pharm Bull **4**(1): 83-89.

Habiro, K., M. Kotani, K. Omoto, S. Kobayashi, K. Tanabe, H. Shimmura, K. Suzuki, T. Hayashi, H. Toma and R. Abe (2003). "Mechanism of allorecognition and skin graft rejection in CD28 and CD40 ligand double-deficient mice." Transplantation **76**(5): 854-858.

Haig, D., J. Huntley, A. MacKellar, G. Newlands, L. Inglis, R. Sangha, D. Cohen, A. Hapel, S. Galli and H. Miller (1994). "Effects of stem cell factor (kit-ligand) and interleukin-3 on the growth and serine proteinase expression of rat bone-marrow-derived or serosal mast cells." Blood **83**(1): 72-83.

Haig, D. M., C. McMenamin, J. Redmond, D. Brown, I. G. Young, S. D. Cohen and A. J. Hapel (1988). "Rat IL-3 stimulates the growth of rat mucosal mast cells in culture." Immunology **65**(2): 205-211.

Hall, B. M., N. W. Pearce, K. E. Gurley and S. E. Dorsch (1990). "Specific unresponsiveness in rats with prolonged cardiac allograft survival after treatment with cyclosporine. III. Further characterization of the CD4+ suppressor cell and its mechanisms of action." The Journal of Experimental Medicine **171**(1): 141-157.

Hall, B. M., G. T. Tran, N. D. Verma, K. M. Plain, C. M. Robinson, M. Nomura and S. J. Hodgkinson (2013). "Do Natural T Regulatory Cells become Activated to Antigen Specific T Regulatory Cells in Transplantation and in Autoimmunity?" Frontiers in Immunology **4**: 208.

Hallgren, J. and M. F. Gurish (2011). "MAST CELL PROGENITOR TRAFFICKING AND MATURATION." Advances in experimental medicine and biology **716**: 14-28.

Hamburger, J., J. Vaysse, J. Crosnier, J. Auvert, M. Lalanne and J. Hopper, Jr. (1962). "Renal homotransplantation in man after radiation of the recipient." The American Journal of Medicine **32**(6): 854-871.

Hannah, J., H. Laura, K. Lindsey, M. Fanyin, G. E. Allyson, O. Jennifer, A. Gianfranco, J. Christopher, B. Francesca, D. Jennifer, D. Sharon, I. Pietro and F. Heather (2016). "Inhibition of mast cell-secreted histamine decreases biliary proliferation and fibrosis in primary sclerosing cholangitis Mdr2−/− mice." Hepatology **64**(4): 1202-1216.

Hara, M., C. I. Kingsley, M. Niimi, S. Read, S. E. Turvey, A. R. Bushell, P. J. Morris, F. Powrie and K. J. Wood (2001). "IL-10 Is Required for Regulatory T Cells to Mediate Tolerance to Alloantigens In Vivo." The Journal of Immunology **166**(6): 3789-3796.

Hattori, Y., R. P. Bucy, Y. Kubota, W. M. Baldwin and R. L. Fairchild (2012). "Antibody-Mediated Rejection of Single Class I MHC-Disparate Cardiac Allografts." American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons **12**(8): 2017-2028.

Hautz, T., D. Wolfram, J. Grahammer, R. Starzl, C. Krapf, J. Pratschke, W. P. Lee, G. Brandacher and S. Schneeberger (2012). "Mechanisms and mediators of inflammation: potential models for skin rejection and targeted therapy in vascularized composite allotransplantation." Clin Dev Immunol **2012**: 757310.

Havran, W. L. and J. P. Allison (1990). "Origin of Thy-1+ dendritic epidermal cells of adult mice from fetal thymic precursors." Nature **344**: 68.

Hawrylowicz, C. M. (2005). "Regulatory T cells and IL-10 in allergic inflammation." The Journal of Experimental Medicine **202**(11): 1459-1463.

He, L., M. Papoutsi, R. Huang, S. I. Tomarev, B. Christ, H. Kurz and J. Wilting (2003). "Three different fates of cells migrating from somites into the limb bud." Anatomy and Embryology **207**(1): 29-34.

He, S. and A. F. Walls (1998). "Human mast cell chymase induces the accumulation of neutrophils, eosinophils and other inflammatory cells in vivo." Br J Pharmacol **125**(7): 1491-1500.

Hemmi, H., T. Kaisho, O. Takeuchi, S. Sato, H. Sanjo, K. Hoshino, T. Horiuchi, H. Tomizawa, K. Takeda and S. Akira (2002). "Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88–dependent signaling pathway." Nature Immunology **3**: 196.

Herbelin, A., J.-M. Gombert, F. Lepault, J.-F. Bach and L. Chatenoud (1998). "Mature Mainstream TCRαβ Thymocytes Expressing L-Selectin Mediate “Active Tolerance” in the Nonobese Diabetic Mouse." The Journal of Immunology **161**(5): 2620-2628.

Herman, E. and J. Rado (1966). "Fatal hyperkalemic paralysis associated with spironalactone: Observation on a patient with severe renal disease and refractory edema." Archives of Neurology **15**(1): 74-77.

Hershko, A. Y., R. Suzuki, N. Charles, D. Alvarez-Errico, J. L. Sargent, A. Laurence and J. Rivera (2011). "Mast cell interleukin-2 production contributes to suppression of chronic allergic dermatitis." Immunity **35**(4): 562-571.

Hexsel, C. L., M. Loosemore, L. H. Goldberg, F. Awadalla and A. Morales-Burgos (2015). "Postauricular Skin: An Excellent Donor Site for Split-Thickness Skin Grafts for the Head, Neck, and Upper Chest." Dermatologic Surgery **41**(1): 48-52.

Hinz, B. (2007). "Formation and Function of the Myofibroblast during Tissue Repair." Journal of Investigative Dermatology **127**(3): 526-537.

Hochweller, K., G. H. Wabnitz, Y. Samstag, J. Suffner, G. J. Hämmerling and N. Garbi (2010). "Dendritic cells control T cell tonic signaling required for responsiveness to foreign antigen." Proceedings of the National Academy of Sciences **107**(13): 5931-5936.

Hoffmann, A., A. Levchenko, M. L. Scott and D. Baltimore (2002). "The IκB-NF-κB Signaling Module: Temporal Control and Selective Gene Activation." Science **298**(5596): 1241-1245.

Hohl, T. M., A. Rivera, L. Lipuma, A. Gallegos, C. Shi, M. Mack and E. G. Pamer (2009). "Inflammatory Monocytes Facilitate Adaptive CD4 T Cell Responses during Respiratory Fungal Infection." Cell Host & Microbe **6**(5): 470-481.

Hori, S., T. Nomura and S. Sakaguchi (2003). "Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor." Science **299**(5609): 1057-1061.

Huehn, J., K. Siegmund, J. C. U. Lehmann, C. Siewert, U. Haubold, M. Feuerer, G. F. Debes, J. Lauber, O. Frey, G. K. Przybylski, U. Niesner, M. de la Rosa, C. A. Schmidt, R. Bräuer, J. Buer, A. Scheffold and A. Hamann (2004). "Developmental Stage, Phenotype, and Migration Distinguish Naive- and Effector/Memory-like CD4 Regulatory T Cells." The Journal of Experimental Medicine **199**(3): 303-313.

Hunger, R. E., P. A. Sieling, M. T. Ochoa, M. Sugaya, A. E. Burdick, T. H. Rea, P. J. Brennan, J. T. Belisle, A. Blauvelt, S. A. Porcelli and R. L. Modlin (2004). "Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells." The Journal of Clinical Investigation **113**(5): 701-708.

Huynh, M.-L. N., V. A. Fadok and P. M. Henson (2002). "Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-β1 secretion and the resolution of inflammation." The Journal of Clinical Investigation **109**(1): 41-50.

Ian, G. G. and M. H. Patrick (1997). "Mast cell responses in rheumatoid synovium. Association of the MCTC subset with matrix turnover and clinical progression." Arthritis & Rheumatism **40**(3): 479-489.

Iba, Y., A. Shibata, M. Kato and T. Masukawa (2004). "Possible involvement of mast cells in collagen remodeling in the late phase of cutaneous wound healing in mice." International Immunopharmacology **4**(14): 1873-1880.

Iikura, M., H. Suto, N. Kajiwara, K. Oboki, T. Ohno, Y. Okayama, H. Saito, S. J. Galli and S. Nakae (2007). "IL-33 can promote survival, adhesion and cytokine production in human mast cells." Laboratory Investigation **87**: 971.

Irani, A. A., N. M. Schechter, S. S. Craig, G. DeBlois and L. B. Schwartz (1986). "Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **83**(12): 4464-4468.

Irani, A. A., N. M. Schechter, S. S. Craig, G. DeBlois and L. B. Schwartz (1986). "Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions." Proceedings of the National Academy of Sciences **83**(12): 4464-4468.

Itoh, S., S. Nakae, J. B. Velotta, H. Kosuge, A. Connolly, M. Tsai, H. Adachi, S. J. Galli, R. C. Robbins and M. P. Fischbein (2010). "The role of recipient mast cells in acute and chronic cardiac allograft rejection in C57BL/6 mice." The Journal of Heart and Lung Transplantation **29**(4): 401-409.

Itoh, S., S. Nakae, J. B. Velotta, H. Kosuge, A. Connolly, M. Tsai, H. Adachi, S. J. Galli, R. C. Robbins and M. P. Fischbein (2010). "The role of recipient mast cells in acute and chronic cardiac allograft rejection in C57BL/6-KitW-sh/W-sh mice." J Heart Lung Transplant **29**(4): 401-409.

Iwasaki, A. and R. Medzhitov (2004). "Toll-like receptor control of the adaptive immune responses." Nature Immunology **5**: 987.

J., G. S. and C. J. J. (1995). "Mast-cell—leukocyte cytokine cascades in allergic inflammation." Allergy **50**(11): 851-862.

Jaeger, B. N. and E. Vivier (2012). "Natural Killer Cell Tolerance: Control by Self or Self-Control?" Cold Spring Harbor Perspectives in Biology **4**(3): a007229.

Jahanyar, J., M. M. Koerner, M. Loebe, K. A. Youker, G. Torre-Amione and G. P. Noon (2008). "The role of mast cells after solid organ transplantation." Transplantation **85**(10): 1365-1371.

Jahanyar, J., M. M. Koerner, M. Loebe, K. A. Youker, G. Torre-Amione and G. P. Noon (2008). "The Role of Mast Cells After Solid Organ Transplantation." Transplantation **85**(10): 1365-1371.

Jameson, J. M., G. Cauvi, D. A. Witherden and W. L. Havran (2004). "A Keratinocyte-Responsive γδ TCR Is Necessary for Dendritic Epidermal T Cell Activation by Damaged Keratinocytes and Maintenance in the Epidermis." The Journal of Immunology **172**(6): 3573-3579.

Janke, M., J. Poth, V. Wimmenauer, T. Giese, C. Coch, W. Barchet, M. Schlee and G. Hartmann (2009). "Selective and direct activation of human neutrophils but not eosinophils by Toll-like receptor 8." Journal of Allergy and Clinical Immunology **123**(5): 1026-1033.

Jarrod, W. (2001). "Globalization and Disciplinary Neoliberal Governance." Constellations **8**(4): 461-479.

Jiang, J., Z. Wang, Z. Li, J. Zhang, C. Wang, X. Xu and Z. Qin (2010). "Early exposure of high-dose interleukin-4 to tumor stroma reverses myeloid cell-mediated T-cell suppression." Gene Therapy **17**: 991.

Jiang, S., O. Herrera and R. I. Lechler (2004). "New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance." Current Opinion in Immunology **16**(5): 550-557.

Joffre, O., T. Santolaria, D. Calise, T. A. Saati, D. Hudrisier, P. Romagnoli and J. P. M. van Meerwijk (2007). "Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes." Nature Medicine **14**: 88.

Jones, H., L. Hargrove, L. Kennedy, F. Meng, A. Graf-Eaton, J. Owens, G. Alpini, C. Johnson, F. Bernuzzi, J. Demieville, S. DeMorrow, P. Invernizzi and H. Francis (2016). "Inhibition of mast cell-secreted histamine decreases biliary proliferation and fibrosis in primary sclerosing cholangitis Mdr2(-/-) mice." Hepatology **64**(4): 1202-1216.

Jones, N. D., M. O. Brook, M. Carvalho-Gaspar, S. Luo and K. J. Wood (2010). "Regulatory T cells can prevent memory CD8(+) T-cell-mediated rejection following polymorphonuclear cell depletion." European Journal of Immunology **40**(11): 3107-3116.

Jones, N. D., S. E. Turvey, A. Van Maurik, M. Hara, C. I. Kingsley, C. H. Smith, A. L. Mellor, P. J. Morris and K. J. Wood (2001). "Differential susceptibility of heart, skin, and islet allografts to T cell-mediated rejection." J Immunol **166**(4): 2824-2830.

K., M. I. and B. R. A. (1995). "Stem cell factor." Journal of Leukocyte Biology **58**(1): 14-22.

Kambayashi, T., E. J. Allenspach, J. T. Chang, T. Zou, J. E. Shoag, S. L. Reiner, A. J. Caton and G. A. Koretzky (2009). "Inducible MHC Class II Expression by Mast Cells Supports Effector and Regulatory T Cell Activation." The Journal of Immunology **182**(8): 4686-4695.

Kambayashi, T. and T. M. Laufer (2014). "Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell?" Nature Reviews Immunology **14**: 719.

Kannourakis, G. and A. Abbas (1994). "The role of cytokines in the pathogenesis of Langerhans cell histiocytosis." The British Journal of Cancer. Supplement **23**: S37-S40.

Kawakami, T. and S. J. Galli (2002). "Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE." Nature Reviews Immunology **2**: 773.

Kelly, K. J., W. W. Williams, Jr., R. B. Colvin, S. M. Meehan, T. A. Springer, J. C. Gutierrez-Ramos and J. V. Bonventre (1996). "Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury." The Journal of Clinical Investigation **97**(4): 1056-1063.

Kenji, T., O. Fumitaka, K. Hiroshi, K. Tetsuya, K. Yuichi, K. Takashi, C. Ping and S. Saburo (2000). "Chymase is a potent chemoattractant for human monocytes and neutrophils." Journal of Leukocyte Biology **67**(4): 585-589.

Kim, B. S., M. C. Siracusa, S. A. Saenz, M. Noti, L. A. Monticelli, G. F. Sonnenberg, M. R. Hepworth, A. S. Van Voorhees, M. R. Comeau and D. Artis (2013). "TSLP elicits IL-33–independent innate lymphoid cell responses to promote skin inflammation." Science translational medicine **5**(170): 170ra116-170ra116.

Kingsley, C. I., M. Karim, A. R. Bushell and K. J. Wood (2002). "CD25 Regulatory T Cells Prevent Graft Rejection: CTLA-4- and IL-10-Dependent Immunoregulation of Alloresponses." The Journal of Immunology **168**(3): 1080-1086.

Kirshenbaum, A. S., C. Akin, Y. Wu, M. Rottem, J. P. Goff, M. A. Beaven, V. K. Rao and D. D. Metcalfe (2003). "Characterization of novel stem cell factor responsive human mast cell lines LAD 1 and 2 established from a patient with mast cell sarcoma/leukemia; activation following aggregation of FcεRI or FcγRI." Leukemia Research **27**(8): 677-682.

Kirshenbaum, A. S., J. P. Goff, S. W. Kessler, J. M. Mican, K. M. Zsebo and D. D. Metcalfe (1992). "Effect of IL-3 and stem cell factor on the appearance of human basophils and mast cells from CD34+ pluripotent progenitor cells." The Journal of Immunology **148**(3): 772-777.

Kish, D. D., A. V. Gorbachev, N. Parameswaran, N. Gupta and R. L. Fairchild (2012). "Neutrophil Expression of Fas Ligand and Perforin Directs Effector CD8 T Cell Infiltration into Antigen-Challenged Skin." The Journal of Immunology **189**(5): 2191-2202.

Kitajima, M. and S. F. Ziegler (2013). "Cutting Edge: Identification of the Thymic Stromal Lymphopoietin–Responsive Dendritic Cell Subset Critical for Initiation of Type 2 Contact Hypersensitivity." The Journal of Immunology **191**(10): 4903-4907.

Kitamura, Y. (1989). "Heterogeneity of Mast Cells and Phenotypic Change Between Subpopulations." Annual Review of Immunology **7**(1): 59-76.

Kitamura, Y., M. Yokoyama, H. Matsuda, T. Ohno and K. J. Mori (1981). "Spleen colony-forming cell as common precursor for tissue mast cells and granulocytes." Nature **291**: 159.

Kobayashi, Y. (2006). "Neutrophil infiltration and chemokines." Crit Rev Immunol **26**(4): 307-316.

Kouskoff, V., A.-S. Korganow, V. Duchatelle, C. Degott, C. Benoist and D. Mathis (1996). "Organ-Specific Disease Provoked by Systemic Autoimmunity." Cell **87**(5): 811-822.

Kreisel, D., R. G. Nava, W. Li, B. H. Zinselmeyer, B. Wang, J. Lai, R. Pless, A. E. Gelman, A. S. Krupnick and M. J. Miller (2010). "In vivo two-photon imaging reveals monocyte-dependent neutrophil extravasation during pulmonary inflammation." Proceedings of the National Academy of Sciences **107**(42): 18073-18078.

Kreisel, D., S. Sugimoto, J. Zhu, R. Nava, W. Li, M. Okazaki, S. Yamamoto, M. Ibrahim, H. J. Huang, K. A. Toth, J. H. Ritter, A. S. Krupnick, M. J. Miller and A. E. Gelman (2011). "Emergency granulopoiesis promotes neutrophil-dendritic cell encounters that prevent mouse lung allograft acceptance." Blood **118**(23): 6172-6182.

L Berger, C., J. Gabriel Vasquez, J. Shofner, K. Mariwalla and R. L Edelson (2006). Langerhans cells: Mediators of immunity and tolerance.

L Nagle, D., P. Martin-Deleon, R. B Hough and M. Bućan (1994). Structural analysis of chromosomal rearrangements associated with the developmental mutations Ph, W19H, and Rw on mouse chromosome 5.

L., B. A. (1963). "STUDIES ON LIVING NORMAL MAST CELLS." Annals of the New York Academy of Sciences **103**(1): 245-263.

L., B. E., I. Chaviva, P. M. G. and S. R. P. (1981). "IgE-induced histamine release from rat basophilic leukemia cell lines: isolation of releasing and nonreleasing clones." European Journal of Immunology **11**(4): 317-323.

L., L. T., T. P., L. A., U. C., M. E., Q. T., C. B., S. J. P., C. M. C., B. S. and C. E. (2011). "Long-Term Allograft Tolerance Is Characterized by the Accumulation of B Cells Exhibiting an Inhibited Profile." American Journal of Transplantation **11**(3): 429-438.

La Rosa, M., E. Lionetti, M. Reibaldi, A. Russo, A. Longo, S. Leonardi, S. Tomarchio, T. Avitabile and A. Reibaldi (2013). "Allergic conjunctivitis: a comprehensive review of the literature." Italian Journal of Pediatrics **39**(1): 18.

Lal, G., N. Zhang, W. van der Touw, Y. Ding, W. Ju, E. P. Bottinger, S. P. Reid, D. E. Levy and J. S. Bromberg (2009). "Epigenetic Regulation of Foxp3 Expression in Regulatory T Cells by DNA Methylation." The Journal of Immunology **182**(1): 259-273.

Lanier, L. L. (1998). "NK CELL RECEPTORS." Annual Review of Immunology **16**(1): 359-393.

Lavine, K. J., S. Epelman, K. Uchida, K. J. Weber, C. G. Nichols, J. D. Schilling, D. M. Ornitz, G. J. Randolph and D. L. Mann (2014). "Distinct macrophage lineages contribute to disparate patterns of cardiac recovery and remodeling in the neonatal and adult heart." Proceedings of the National Academy of Sciences **111**(45): 16029-16034.

Le Borgne, M., B. Dubois and D. Kaiserlian (2007). "Cellules dendritiques des muqueuses et de la peau." Med Sci (Paris) **23**(10): 819-825.

Lebre, M. C., A. M. G. van der Aar, L. van Baarsen, T. M. M. van Capel, J. H. N. Schuitemaker, M. L. Kapsenberg and E. C. de Jong (2007). "Human Keratinocytes Express Functional Toll-Like Receptor 3, 4, 5, and 9." Journal of Investigative Dermatology **127**(2): 331-341.

Lechler, R. I., M. Sykes, A. W. Thomson and L. A. Turka (2005). "Organ transplantation--how much of the promise has been realized?" Nat Med **11**(6): 605-613.

Lefrançais, E., S. Roga, V. Gautier, A. Gonzalez-de-Peredo, B. Monsarrat, J.-P. Girard and C. Cayrol (2012). "IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **109**(5): 1673-1678.

Leliefeld, P. H. C., L. Koenderman and J. Pillay (2015). "How Neutrophils Shape Adaptive Immune Responses." Frontiers in Immunology **6**(471).

Leveson-Gower, D. B., E. I. Sega, J. Kalesnikoff, M. Florek, Y. Pan, A. Pierini, S. J. Galli and R. S. Negrin (2013). "Mast cells suppress murine GVHD in a mechanism independent of CD4 regulatory T cells." Blood **122**(22): 3659-3665.

Levi-Schaffer, F., M. Gare and M. Shalit (1990). "Unresponsiveness of rat peritoneal mast cells to immunologic reactivation." The Journal of Immunology **145**(10): 3418-3424.

Levi-Schaffer, F. and A. M. Piliponsky (2003). "Tryptase, a novel link between allergic inflammation and fibrosis." Trends in Immunology **24**(4): 158-161.

Levings, M. K., R. Sangregorio and M.-G. Roncarolo (2001). "Human Cd25(+)Cd4(+) T Regulatory Cells Suppress Naive and Memory T Cell Proliferation and Can Be Expanded in Vitro without Loss of Function." The Journal of Experimental Medicine **193**(11): 1295-1302.

Li, J. L., C. C. Goh, J. L. Keeble, J. S. Qin, B. Roediger, R. Jain, Y. Wang, W. K. Chew, W. Weninger and L. G. Ng (2012). "Intravital multiphoton imaging of immune responses in the mouse ear skin." Nature Protocols **7**: 221.

Li, X. C. (2010). "The significance of non-T cell pathways in graft rejection--implications for transplant tolerance." Transplantation **90**(10): 1043-1047.

Lin, C. M. and R. G. Gill (2016). "Direct and indirect allograft recognition: pathways dictating graft rejection mechanisms." Curr Opin Organ Transplant **21**(1): 40-44.

Lin, C. M. and R. G. Gill (2016). "Direct and indirect allograft recognition: pathways dictating graft rejection mechanisms." Current Opinion in Organ Transplantation **21**(1): 40-44.

Liu, W. and X. C. Li (2010). "An overview on non-T cell pathways in transplant rejection and tolerance." Curr Opin Organ Transplant **15**(4): 422-426.

Lombardi, G., S. Sidhu, M. Daly, J. R. Batchelor, W. Makgoba and R. I. Lechler (1990). "Are primary alloresponses truly primary?" International Immunology **2**(1): 9-13.

Lu, L.-F., E. F. Lind, D. C. Gondek, K. A. Bennett, M. W. Gleeson, K. Pino-Lagos, Z. A. Scott, A. J. Coyle, J. L. Reed, J. Van Snick, T. B. Strom, X. X. Zheng and R. J. Noelle (2006). "Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance." Nature **442**: 997.

Lu, L. F., E. F. Lind, D. C. Gondek, K. A. Bennett, M. W. Gleeson, K. Pino-Lagos, Z. A. Scott, A. J. Coyle, J. L. Reed, J. Van Snick, T. B. Strom, X. X. Zheng and R. J. Noelle (2006). "Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance." Nature **442**(7106): 997-1002.

M., B. F. and N. R. M. (2000). "Antiallergic effects of H1-receptor antagonists." Allergy **55**(s64): 17-27.

M., N. J., H. A., J. S. C., W. M. R., H. H. A., A. Q. H. S., P. M., D. C. B., B. S. T. and C. M. (2009). "The Detrimental Effect of Poor Early Graft Function After Laparoscopic Live Donor Nephrectomy on Graft Outcomes." American Journal of Transplantation **9**(2): 337-347.

M., R. E. and C. F. E. (1982). "ENDOTHELIAL PERMEABILITY: PATHWAYS AND MODULATIONS*." Annals of the New York Academy of Sciences **401**(1): 248-258.

Madison, K. C. (2003). "Barrier Function of the Skin: 201c;La Raison d'Être” of the Epidermis." Journal of Investigative Dermatology **121**(2): 231-241.
Madison, K. C. (2003). "Barrier Function of the Skin: “La Raison d'Être” of the Epidermis." Journal of Investigative Dermatology **121**(2): 231-241.

Malbec, O., K. Roget, C. Schiffer, B. Iannascoli, A. R. Dumas, M. Arock and M. Daëron (2007). "Peritoneal Cell-Derived Mast Cells: An In Vitro Model of Mature Serosal-Type Mouse Mast Cells." The Journal of Immunology **178**(10): 6465-6475.

Maltby, S., K. Khazaie and K. M. McNagny (2009). "Mast Cells in Tumor Growth: Angiogenesis, Tissue Remodeling and Immune-modulation." Biochimica et biophysica acta **1796**(1): 19-26.

Malu, D. T., B. Bélanger, F. Desautels, K. Kelendji, E. Dalko, J. Sanchez-Dardon, L. Leng, R. Bucala, A. R. Satoskar and T. Scorza (2011). "Macrophage Migration Inhibitory Factor: A Downregulator of Early T Cell-Dependent IFN-γ Responses in Plasmodium chabaudi adami (556 KA)-Infected Mice." The Journal of Immunology **186**(11): 6271-6279.

Manfred, K. and R. Martin (2009). "Mast cells: novel clinical perspectives from recent insights." Experimental Dermatology **18**(5): 488-496.

Manova, K., K. Nocka, P. Besmer and R. F. Bachvarova (1990). "Gonadal expression of c-kit encoded at the W locus of the mouse." Development **110**(4): 1057-1069.

Mantovani, A., M. A. Cassatella, C. Costantini and S. Jaillon (2011). "Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity." Nature Reviews Immunology **11**: 519.

Manz, M. G. and S. Boettcher (2014). "Emergency granulopoiesis." Nature Reviews Immunology **14**: 302.

Maraskovsky, E., K. Brasel, M. Teepe, E. R. Roux, S. D. Lyman, K. Shortman and H. J. McKenna (1996). "Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified." The Journal of Experimental Medicine **184**(5): 1953-1962.

Marcus, M. and M. Martin (2005). "The status quo and quo vadis of mast cells." Experimental Dermatology **14**(12): 923-929.

Marjan, B., F. W. P., H. Grant, B. G. J., J. Lija, J. Jacob, W. Junru, C. M. D., R. R. C. and H. J. Martin (2007). "Influence of mast cells on outcome after heterotopic cardiac transplantation in rats." Transplant International **20**(3): 256-265.

Mason, A., P. L. Mottram, A. Mirisklavos, G. J. Clurne and T. E. Mandel (1988). "A comparison of cyclosporine, donor-specific transfusion, and antilymphocyte serum suppression of skin, heart, and fetal pancreatic islet allograft rejection in mice." Transplantation **45**(6): 1155-1157.

Matsushima, H., N. Yamada, H. Matsue and S. Shimada (2004). "TLR3-, TLR7-, and TLR9-Mediated Production of Proinflammatory Cytokines and Chemokines from Murine Connective Tissue Type Skin-Derived Mast Cells but Not from Bone Marrow-Derived Mast Cells." The Journal of Immunology **173**(1): 531-541.

Matzinger, P. (1994). "Tolerance, Danger, and the Extended Family." Annual Review of Immunology **12**(1): 991-1045.

Mauri, C. and P. A. Blair (2010). "Regulatory B cells in autoimmunity: developments and controversies." Nature Reviews Rheumatology **6**: 636.

McDonald, B., K. Pittman, G. B. Menezes, S. A. Hirota, I. Slaba, C. C. M. Waterhouse, P. L. Beck, D. A. Muruve and P. Kubes (2010). "Intravascular Danger Signals Guide Neutrophils to Sites of Sterile Inflammation." Science **330**(6002): 362-366.

McGinness, J. L., M.-M. C. Bivens, K. E. Greer, J. W. Patterson and F. T. Saulsbury (2006). "Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) associated with pemphigoid nodularis: A case report and review of the literature." Journal of the American Academy of Dermatology **55**(1): 143-148.

McKenna, H. J., K. L. Stocking, R. E. Miller, K. Brasel, T. De Smedt, E. Maraskovsky, C. R. Maliszewski, D. H. Lynch, J. Smith, B. Pulendran, E. R. Roux, M. Teepe, S. D. Lyman and J. J. Peschon (2000). "Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells." Blood **95**(11): 3489-3497.

McLachlan, J. B., D. M. Catron, J. J. Moon and M. K. Jenkins (2009). "Dendritic cell antigen presentation drives simultaneous cytokine production by effector and regulatory T cells in inflamed skin." Immunity **30**(2): 277-288.

Menzies, F. M., M. C. Shepherd, R. J. Nibbs and S. M. Nelson (2011). "The role of mast cells and their mediators in reproduction, pregnancy and labour." Human Reproduction Update **17**(3): 383-396.

Merad, M., F. Ginhoux and M. Collin (2008). "Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells." Nature Reviews Immunology **8**: 935.

Merad, M., M. G. Manz, H. Karsunky, A. Wagers, W. Peters, I. Charo, I. L. Weissman, J. G. Cyster and E. G. Engleman (2002). "Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions." Nature Immunology **3**: 1135.

Merad, M., P. Sathe, J. Helft, J. Miller and A. Mortha (2013). "The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting." Annual Review of Immunology **31**(1): 563-604.

Merrill, J. P., J. H. Harrison, J. Murray and W. R. Guild (1956). "Successful Homotransplantation of the Kidney in an Identical Twin." Transactions of the American Clinical and Climatological Association **67**: 166-173.

Metcalfe, D. D., D. Baram and Y. A. Mekori (1997). "Mast cells." Physiological Reviews **77**(4): 1033-1079.

Metz, M., M. A. Grimbaldeston, S. Nakae, A. M. Piliponsky, M. Tsai and S. J. Galli (2007). "Mast cells in the promotion and limitation of chronic inflammation." Immunol Rev **217**: 304-328.

Metz, M., F. Siebenhaar and M. Maurer (2008). "Mast cell functions in the innate skin immune system." Immunobiology **213**(3-4): 251-260.

MICHEL, A., H. FLORENCE, G. JEAN-JACQUES, M. H. JEAN-MICHEL and T. DOMINIQUE (1994). "Differentiation of Human Mast Cells from Bone-Marrow and Cord-Blood Progenitor Cells by Factors Produced by a Mouse Stromal Cell Line." Annals of the New York Academy of Sciences **725**(1): 59-68.

Miller, L. S. and R. L. Modlin (2007). "Human Keratinocyte Toll-like Receptors Promote Distinct Immune Responses." Journal of Investigative Dermatology **127**(2): 262-263.

Mitsui, H., T. Furitsu, A. M. Dvorak, A. M. Irani, L. B. Schwartz, N. Inagaki, M. Takei, K. Ishizaka, K. M. Zsebo and S. Gillis (1993). "Development of human mast cells from umbilical cord blood cells by recombinant human and murine c-kit ligand." Proceedings of the National Academy of Sciences **90**(2): 735-739.

Miyara, M., Y. Yoshioka, A. Kitoh, T. Shima, K. Wing, A. Niwa, C. Parizot, C. Taflin, T. Heike, D. Valeyre, A. Mathian, T. Nakahata, T. Yamaguchi, T. Nomura, M. Ono, Z. Amoura, G. Gorochov and S. Sakaguchi (2009). "Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4T Cells Expressing the FoxP3 Transcription Factor." Immunity **30**(6): 899-911.

Mócsai, A., Z. Jakus, T. Vántus, G. Berton, C. A. Lowell and E. Ligeti (2000). "Kinase Pathways in Chemoattractant-Induced Degranulation of Neutrophils: The Role of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activated by Src Family Kinases." The Journal of Immunology **164**(8): 4321-4331.

Mondino, A., A. Khoruts and M. K. Jenkins (1996). "The anatomy of T-cell activation and tolerance." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**(6): 2245-2252.

Mondino, A., C. D. Whaley, D. R. DeSilva, W. Li, M. K. Jenkins and D. L. Mueller (1996). "Defective transcription of the IL-2 gene is associated with impaired expression of c-Fos, FosB, and JunB in anergic T helper 1 cells." The Journal of Immunology **157**(5): 2048-2057.

Montagna, W. and K. Carlisle (1991). "The architecture of black and white facial skin." Journal of the American Academy of Dermatology **24**(6, Part 1): 929-937.

Moon, T. C., A. D. Befus and M. Kulka (2014). "Mast Cell Mediators: Their Differential Release and the Secretory Pathways Involved." Frontiers in Immunology **5**(569).

Morita, H., K. Moro and S. Koyasu (2016). "Innate lymphoid cells in allergic and nonallergic inflammation." Journal of Allergy and Clinical Immunology **138**(5): 1253-1264.

Morrell, C. N., K. Murata, A. M. Swaim, E. Mason, T. V. Martin, L. E. Thompson, M. Ballard, K. Fox-Talbot, B. Wasowska and W. M. Baldwin (2008). "In Vivo Platelet–Endothelial Cell Interactions in Response to Major Histocompatibility Complex Alloantibody." Circulation Research **102**(7): 777-785.

Mottet, C., H. H. Uhlig and F. Powrie (2003). "Cutting Edge: Cure of Colitis by CD4 Regulatory T Cells." The Journal of Immunology **170**(8): 3939-3943.

Mucida, D., K. Pino-Lagos, G. Kim, E. Nowak, M. J. Benson, M. Kronenberg, R. J. Noelle and H. Cheroutre (2009). "Retinoic Acid Can Directly Promote TGF-β-Mediated Foxp3(+) Treg Cell Conversion of Naive T Cells." Immunity **30**(4): 471-473.

Mukai, K., M. Tsai, H. Saito and S. J. Galli (2018). "Mast cells as sources of cytokines, chemokines, and growth factors." Immunol Rev **282**(1): 121-150.

Mukai, K., M. Tsai, P. Starkl, T. Marichal and S. J. Galli (2016). "IgE and mast cells in host defense against parasites and venoms." Semin Immunopathol **38**(5): 581-603.

Murphy, T. J., N. N. Choileain, Y. Zang, J. A. Mannick and J. A. Lederer (2005). "CD4 Regulatory T Cells Control Innate Immune Reactivity after Injury." The Journal of Immunology **174**(5): 2957-2963.

Murray, J. E., J. P. Merrill, J. H. Harrison, R. E. Wilson and G. J. Dammin (1963). "Prolonged Survival of Human-Kidney Homografts by Immunosuppressive Drug Therapy." New England Journal of Medicine **268**(24): 1315-1323.

Muto, Y., Z. Wang, M. Vanderberghe, A. Two, R. L. Gallo and A. Di Nardo (2014). "Mast Cells Are Key Mediators of Cathelicidin-Initiated Skin Inflammation in Rosacea." Journal of Investigative Dermatology **134**(11): 2728-2736.

Muto, Y., Z. Wang, M. Vanderberghe, A. Two, R. L. Gallo and A. Di Nardo (2014). "Mast cells are key mediators of cathelicidin-initiated skin inflammation in rosacea." J Invest Dermatol **134**(11): 2728-2736.

N.C., W. T., P. C. A., L. N. Manjula, H. A. J., C. R. M., C. Chun-wa, P. M. C. and P. A. E. I. (1996). "Selectivity and antagonism of chemokine receptors." Journal of Leukocyte Biology **59**(1): 53-60.

Nakamura, A., R. Amikura, K. Hanyu and S. Kobayashi (2001). "Me31B silences translation of oocyte-localizing RNAs through the formation of cytoplasmic RNP complex during oogenesis." Development **128**(17): 3233-3242.

Navi, D., J. Saegusa and F.-T. Liu (2007). "Mast Cells and Immunological Skin Diseases." Clinical Reviews in Allergy & Immunology **33**(1): 144-155.

Nestle, F. O., L. Filgueira, B. J. Nickoloff and G. Burg (1998). "Human dermal dendritic cells process and present soluble protein antigens." J Invest Dermatol **110**(5): 762-766.

Nicolás-Ávila, J. Á., J. M. Adrover and A. Hidalgo (2017). "Neutrophils in Homeostasis, Immunity, and Cancer." Immunity **46**(1): 15-28.

Nigrovic, P. A., D. H. D. Gray, T. Jones, J. Hallgren, F. C. Kuo, B. Chaletzky, M. Gurish, D. Mathis, C. Benoist and D. M. Lee (2008). "Genetic Inversion in Mast Cell-Deficient W(sh) Mice Interrupts Corin and Manifests as Hematopoietic and Cardiac Aberrancy." The American Journal of Pathology **173**(6): 1693-1701.

Nogueira, C. V., T. Lindsten, A. M. Jamieson, C. L. Case, S. Shin, C. B. Thompson and C. R. Roy (2009). "Rapid Pathogen-Induced Apoptosis: A Mechanism Used by Dendritic Cells to Limit Intracellular Replication of Legionella pneumophila." PLOS Pathogens **5**(6): e1000478.

Nowak, E. C., V. C. de Vries, A. Wasiuk, C. Ahonen, K. A. Bennett, I. Le Mercier, D. G. Ha and R. J. Noelle (2012). "Tryptophan hydroxylase-1 regulates immune tolerance and inflammation." J Exp Med **209**(11): 2127-2135.

Oka, T., J. Kalesnikoff, P. Starkl, M. Tsai and S. J. Galli (2012). "Evidence questioning cromolyn's effectiveness and selectivity as a 'mast cell stabilizer' in mice." Lab Invest **92**(10): 1472-1482.

Oka, T., J. Kalesnikoff, P. Starkl, M. Tsai and S. J. Galli (2012). "Evidence questioning cromolyn's effectiveness and selectivity as a "mast cell stabilizer" in mice." Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology **92**(10): 1472-1482.

Onishi, Y., Z. Fehervari, T. Yamaguchi and S. Sakaguchi (2008). " natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(29): 10113-10118.

Oyoshi, M. K., R. P. Larson, S. F. Ziegler and R. S. Geha (2010). "Mechanical injury polarizes skin dendritic cells to elicit a Th2 response by inducing cutaneous TSLP expression." The Journal of allergy and clinical immunology **126**(5): 976-984.e975.

P.-C., T., S. L. and S. C. J. F. (1991). "Effects of IL-5, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and IL-3 on the survival of human blood eosinophils in vitro." Clinical & Experimental Immunology **85**(2): 312-316.

P., B. (1996). "Human mast cell cytokines." Clinical & Experimental Allergy **26**(1): 13-19.
P., B. and B. J. S. (2009). "Human FOXP3+ Regulatory T Cells in Transplantation." American Journal of Transplantation **9**(8): 1719-1724.

P., M. S., P. P. M. and T. L. A. (2011). "Innate immunity in transplant tolerance and rejection." Immunological Reviews **241**(1): 39-48.

Pandiyan, P., L. Zheng, S. Ishihara, J. Reed and M. J. Lenardo (2007). "CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation–mediated apoptosis of effector CD4+ T cells." Nature Immunology **8**: 1353.

Pardo, J., L. Diaz, P. Errasti, M. Idoate, E. Alava, I. Sola, L. Lozano and A. Panizo (2000). Mast cells in chronic rejection of human renal allografts.

Pasparakis, M., I. Haase and F. O. Nestle (2014). "Mechanisms regulating skin immunity and inflammation." Nature Reviews Immunology **14**: 289.

Pastore, S., F. Mascia, F. Mariotti, C. Dattilo, V. Mariani and G. Girolomoni (2005). "ERK1/2 Regulates Epidermal Chemokine Expression and Skin Inflammation." The Journal of Immunology **174**(8): 5047-5056.

Pearton, M., S.-M. Kang, J.-M. Song, Y.-C. Kim, F.-S. Quan, A. Anstey, M. Ivory, M. R. Prausnitz, R. W. Compans and J. C. Birchall (2010). "Influenza Virus-Like Particles coated onto microneedles can elicit stimulatory effects on Langerhans cells in human skin." Vaccine **28**(37): 6104-6113.

Petter, H., S. Jonas, O. A. M. Y., J. Maria, S. Margarita, Ö. Claes, L. Hans-Gustaf, S. C. L. and K. Klas (1997). "Host MHC class I gene control of NK-cell specificity in the mouse." Immunological Reviews **155**(1): 11-28.

Piliponsky, A. M., C.-C. Chen, M. A. Grimbaldeston, S. M. Burns-Guydish, J. Hardy, J. Kalesnikoff, C. H. Contag, M. Tsai and S. J. Galli (2010). "Mast Cell-Derived TNF Can Exacerbate Mortality during Severe Bacterial Infections in C57BL/6-Kit(W-sh/W-sh) Mice." The American Journal of Pathology **176**(2): 926-938.

Pillay, J., V. M. Kamp, E. van Hoffen, T. Visser, T. Tak, J.-W. Lammers, L. H. Ulfman, L. P. Leenen, P. Pickkers and L. Koenderman (2012). "A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1." The Journal of Clinical Investigation **122**(1): 327-336.

Pons, M., L. Ali, W. Beghdadi, L. Danelli, M. Alison, L. C. Madjène, J. Calvo, J. Claver, S. Vibhushan, M. Åbrink, G. Pejler, M.-L. Poli-Mérol, M. Peuchmaur, A. El Ghoneimi and U. Blank (2017). "Mast Cells and MCPT4 Chymase Promote Renal Impairment after Partial Ureteral Obstruction." Frontiers in Immunology **8**: 450.

Pons, M., L. Ali, W. Beghdadi, L. Danelli, M. Alison, L. C. Madjene, J. Calvo, J. Claver, S. Vibhushan, M. Abrink, G. Pejler, M. L. Poli-Merol, M. Peuchmaur, A. El Ghoneimi and U. Blank (2017). "Mast Cells and MCPT4 Chymase Promote Renal Impairment after Partial Ureteral Obstruction." Front Immunol **8**: 450.

Porcherie, A., C. Mathieu, R. Peronet, E. Schneider, J. Claver, P. H. Commere, H. Kiefer-Biasizzo, H. Karasuyama, G. Milon, M. Dy, J. P. Kinet, J. Louis, U. Blank and S. Mecheri (2011). "Critical role of the neutrophil-associated high-affinity receptor for IgE in the pathogenesis of experimental cerebral malaria." J Exp Med **208**(11): 2225-2236.

Pradeu, T. and E. L. Cooper (2012). "The danger theory: 20 years later." Frontiers in Immunology **3**: 287.

Pribylova-Hribova, P., K. Kotsch, A. Lodererova, O. Viklicky, S. Vitko, H. D. Volk and J. Lacha (2006). "TGF-beta1 mRNA upregulation influences chronic renal allograft dysfunction." Kidney Int **69**(10): 1872-1879.

Qi, X., J. Hong, L. Chaves, Y. Zhuang, Y. Chen, D. Wang, J. Chabon, B. Graham, K. Ohmori, Y. Li and H. Huang (2013). "Antagonistic Regulation by the Transcription Factors C/EBPα and MITF Specifies Basophil and Mast Cell Fates." Immunity **39**(1): 97-110.

Qin, S., S. Cobbold, H. Pope, J. Elliott, D. Kioussis, J. Davies and H. Waldmann (1993). ""Infectious" transplantation tolerance." Science **259**(5097): 974-977.

Radic, M. (2014). Innate Immunity Response to Tissue Engineering Templates: The Determinant.

Rahman, M. M. and G. McFadden (2006). "Modulation of Tumor Necrosis Factor by Microbial Pathogens." PLoS Pathogens **2**(2): e4.

Ramsdell, F. and S. F. Ziegler (2014). "FOXP3 and scurfy: how it all began." Nature Reviews Immunology **14**: 343.

Rathinam, C., R. Geffers, R. Yücel, J. Buer, K. Welte, T. Möröy and C. Klein (2005). "The Transcriptional Repressor Gfi1 Controls STAT3-Dependent Dendritic Cell Development and Function." Immunity **22**(6): 717-728.

Razin, E., C. Cordon-Cardo and R. A. Good (1981). "Growth of a pure population of mouse mast cells in vitro with conditioned medium derived from concanavalin A-stimulated splenocytes." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **78**(4): 2559-2561.

Reber, L. L. and N. Frossard (2014). "Targeting mast cells in inflammatory diseases." Pharmacology & Therapeutics **142**(3): 416-435.

Reber, L. L., T. Marichal and S. J. Galli (2012). "New models for analyzing mast cell functions in vivo." Trends in immunology **33**(12): 613-625.

Redegeld, F. A., Y. Yu, S. Kumari, N. Charles and U. Blank (2018). "Non-IgE mediated mast cell activation." Immunol Rev **282**(1): 87-113.

Renkin, E. M. and F. E. Curry (1982). "Endothelial permeability: pathways and modulations." Ann N Y Acad Sci **401**: 248-259.

Ribatti, D., G. De Falco, B. Nico, R. Ria, E. Crivellato and A. Vacca (2003). "In vivo time-course of the angiogenic response induced by multiple myeloma plasma cells in the chick embryo chorioallantoic membrane." Journal of Anatomy **203**(3): 323-328.

Riccardo, S., G. Giorgia, F. Barbara, T. Claudio, S. Ryo, R. Juan, M. A. S. and P. C. E. (2011). "Technical Advance: Soluble OX40 molecule mimics regulatory T cell modulatory activity on FcεRI-dependent mast cell degranulation." Journal of Leukocyte Biology **90**(4): 831-838.

Roark, J. H., S.-H. Park, J. Jayawardena, U. Kavita, M. Shannon and A. Bendelac (1998). "CD1.1 Expression by Mouse Antigen-Presenting Cells and Marginal Zone B Cells." The Journal of Immunology **160**(7): 3121-3127.

Rodero, M. P. and K. Khosrotehrani (2010). "Skin wound healing modulation by macrophages." International Journal of Clinical and Experimental Pathology **3**(7): 643-653.

Rodewald, H.-R., M. Dessing, A. M. Dvorak and S. J. Galli (1996). "Identification of a Committed Precursor for the Mast Cell Lineage." Science **271**(5250): 818-822.

Rodewald, H.-R. and Thorsten B. Feyerabend (2012). "Widespread Immunological Functions of Mast Cells: Fact or Fiction?" Immunity **37**(1): 13-24.

Romani, N., B. E. Clausen and P. Stoitzner (2010). "Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin." Immunological reviews **234**(1): 120-141.

Rosenblum, M. D., I. K. Gratz, J. S. Paw, K. Lee, A. Marshak-Rothstein and A. K. Abbas (2011). "Response to self antigen imprints regulatory memory in tissues." Nature **480**: 538.

Rosenzwajg, M., B. Canque and J. Gluckman (1996). "Human dendritic cell differentiation pathway from CD34+ hematopoietic precursor cells." Blood **87**(2): 535-544.

Rossato, E., S. Ben Mkaddem, Y. Kanamaru, M. Hurtado-Nedelec, G. Hayem, V. Descatoire, C. Vonarburg, S. Miescher, A. W. Zuercher and R. C. Monteiro (2015). "Reversal of Arthritis by Human Monomeric IgA Through the Receptor-Mediated SH2 Domain-Containing Phosphatase 1 Inhibitory Pathway." Arthritis Rheumatol **67**(7): 1766-1777.

Roussel, L., R. Farias and S. Rousseau (2013). "IL-33 is expressed in epithelia from patients with cystic fibrosis and potentiates neutrophil recruitment." Journal of Allergy and Clinical Immunology **131**(3): 913-916.

Roy, A., G. Ganesh, H. Sippola, S. Bolin, O. Sawesi, A. Dagälv, S. M. Schlenner, T. Feyerabend, H.-R. Rodewald, L. Kjellén, L. Hellman and M. Åbrink (2014). "Mast Cell Chymase Degrades the Alarmins Heat Shock Protein 70, Biglycan, HMGB1, and Interleukin-33 (IL-33) and Limits Danger-induced Inflammation." The Journal of Biological Chemistry **289**(1): 237-250.

Ruttens, D., E. Wauters, M. Kiciński, S. E. Verleden, E. Vandermeulen, R. Vos, D. E. Van Raemdonck, T. S. Nawrot, D. Lambrechts, G. M. Verleden and B. M. Vanaudenaerde (2013). "Genetic variation in interleukin-17 receptor A is functionally associated with chronic rejection after lung transplantation." The Journal of Heart and Lung Transplantation **32**(12): 1233-1240.

S, W. N., Y. L. J, K. Fiona, N. S. H, V. David, H. W. R, A. Shizuo, S. Ken, B. Jeff, M. Eugene, B. G. T and V. J. A (2008). "Normal proportion and expression of maturation markers in migratory dendritic cells in the absence of germs or Toll-like receptor signaling." Immunology and Cell Biology **86**(2): 200-205.

Saini, D., N. Angaswamy, V. Tiriveedhi, F. N, S. Ramachandran, R. Hachem, E. Trulock, B. Meyers, A. Patterson and T. Mohanakumar (2010). "SYNERGISTIC EFFECT OF ANTIBODIES TO HUMAN LEUKOCYTE ANTIGENS AND DEFENSINS IN PATHOGENESIS OF BOS FOLLOWING HUMAN LUNG TRANSPLANTATION." The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation **29**(12): 1330-1336.

Saint-Mezard, P., F. Berard, B. Dubois, D. Kaiserlian and J.-F. Nicolas (2004). Saint-Mezard P, Berard F, Dubois B, Kaiserlian D, Nicolas JFThe role of CD4+ and CD8+ T cells in contact hypersensitivity and allergic contact dermatitis. Eur J Dermatol 14:131-138.

Sakaguchi, S., M. Miyara, C. M. Costantino and D. A. Hafler (2010). "FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system." Nature Reviews Immunology **10**: 490.

Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh and M. Toda (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." The Journal of Immunology **155**(3): 1151-1164.

Saleh, R., G. Wedeh, H. Herrmann, S. Bibi, S. Cerny-Reiterer, I. Sadovnik, K. Blatt, E. Hadzijusufovic, S. Jeanningros, C. Blanc, M. Legarff-Tavernier, E. Chapiro, F. Nguyen-Khac, F. Subra, P. Bonnemye, P. Dubreuil, V. Desplat, H. Merle-Béral, M. Willmann, T. Rülicke, P. Valent and M. Arock (2014). "A new human mast cell line expressing a functional IgE receptor converts to tumorigenic growth by KIT D816V transfection." Blood **124**(1): 111-120.

Saluja, R., A. Zoltowska, M. E. Ketelaar and G. Nilsson (2016). "IL-33 and Thymic Stromal Lymphopoietin in mast cell functions." Eur J Pharmacol **778**: 68-76.

Saluja, R., A. Zoltowska, M. E. Ketelaar and G. Nilsson (2016). "IL-33 and Thymic Stromal Lymphopoietin in mast cell functions." European Journal of Pharmacology **778**: 68-76.

Sara, S. (1963). "MUCOPOLYSACCHARIDES OF NORMAL MAST CELLS*." Annals of the New York Academy of Sciences **103**(1): 199-208.

Satpathy, A., K. M Murphy and W. Kc (2011). Transcription Factor Networks in Dendritic Cell Development.

Sawai, N., M. Kita, T. Kodama, T. Tanahashi, Y. Yamaoka, Y.-i. Tagawa, Y. Iwakura and J. Imanishi (1999). "Role of Gamma Interferon in Helicobacter pylori-Induced Gastric Inflammatory Responses in a Mouse Model." Infection and Immunity **67**(1): 279-285.

Sayed, B. A., A. L. Christy, M. E. Walker and M. A. Brown (2010). "Meningeal Mast Cells Affect Early T Cell Central Nervous System Infiltration and Blood-Brain Barrier Integrity through TNF: A Role for Neutrophil Recruitment?" The Journal of Immunology **184**(12): 6891-6900.

Sayed, B. A., M. E. Walker and M. A. Brown (2011). "Cutting Edge: Mast Cells Regulate Disease Severity in a Relapsing–Remitting Model of Multiple Sclerosis." The Journal of Immunology **186**(6): 3294-3298.

Schleinitz, N., F. Vély, J.-R. Harlé and E. Vivier (2010). "Natural killer cells in human autoimmune diseases." Immunology **131**(4): 451-458.

Schnare, M., G. M. Barton, A. C. Holt, K. Takeda, S. Akira and R. Medzhitov (2001). "Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses." Nature Immunology **2**: 947.

Schofield, Z. V., T. M. Woodruff, R. Halai, M. C.-L. Wu and M. A. Cooper (2013). "Neutrophils—A Key Component of Ischemia-Reperfusion Injury." Shock **40**(6): 463-470.

Schweizer, J., P. E. Bowden, P. A. Coulombe, L. Langbein, E. B. Lane, T. M. Magin, L. Maltais, M. B. Omary, D. A. D. Parry, M. A. Rogers and M. W. Wright (2006). "New consensus nomenclature for mammalian keratins." The Journal of Cell Biology **174**(2): 169-174.

Scozzi, D., M. Ibrahim, C. Menna, A. S. Krupnick, D. Kreisel and A. E. Gelman (2017). "The Role of Neutrophils in Transplanted Organs." American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons **17**(2): 328-335.

Scozzi, D., M. Ibrahim, C. Menna, A. S. Krupnick, D. Kreisel and A. E. Gelman (2017). "The Role of Neutrophils in Transplanted Organs." Am J Transplant **17**(2): 328-335.

Segal, A. W. (2005). "HOW NEUTROPHILS KILL MICROBES." Annual Review of Immunology **23**(1): 197-223.

Sena, J., S. S Wachtel and G. Murphy (1976). A comparison of the survival of H-Y incompatible ear, tail, and body skin grafts.

Seneschal, J., Rachael A. Clark, A. Gehad, Clare M. Baecher-Allan and Thomas S. Kupper (2012). "Human Epidermal Langerhans Cells Maintain Immune Homeostasis in Skin by Activating Skin Resident Regulatory T Cells." Immunity **36**(5): 873-884.

Serbina, N. V., T. P. Salazar-Mather, C. A. Biron, W. A. Kuziel and E. G. Pamer (2003). "TNF/iNOS-Producing Dendritic Cells Mediate Innate Immune Defense against Bacterial Infection." Immunity **19**(1): 59-70.

Sharp, L. L., J. M. Jameson, G. Cauvi and W. L. Havran (2004). "Dendritic epidermal T cells regulate skin homeostasis through local production of insulin-like growth factor 1." Nature Immunology **6**: 73.

Shen, H. and D. R. Goldstein (2009). "IL-6 and TNF-alpha synergistically inhibit allograft acceptance." J Am Soc Nephrol **20**(5): 1032-1040.

Shen, H. and D. R. Goldstein (2009). "IL-6 and TNF-α Synergistically Inhibit Allograft Acceptance." Journal of the American Society of Nephrology **20**(5): 1032-1040.

Simpson, E., D. Scott and P. Chandler (1997). "The male-specific histocompatibility antigen, H-Y: a history of transplantation, immune response genes, sex determination and expression cloning." Annu Rev Immunol **15**: 39-61.

Singh, L. K., X. Pang, N. Alexacos, R. Letourneau and T. C. Theoharides (1999). "Acute Immobilization Stress Triggers Skin Mast Cell Degranulation via Corticotropin Releasing Hormone, Neurotensin, and Substance P: A Link to Neurogenic Skin Disorders." Brain, Behavior, and Immunity **13**(3): 225-239.

Siraganian, R. P. (1998). Mast Cells A2 - Delves, Peter J. Encyclopedia of Immunology (Second Edition). Oxford, Elsevier**:** 1667-1671.

Siri, A., H. de Boysson and G. Boursier (2012). "Actualité sur les lymphocytes T régulateurs CD4+." Med Sci (Paris) **28**(6-7): 646-651.

Snell, G. D. and L. C. Stevens (1961). "Histocompatibility Genes of Mice: III. H(-1) and H(-4), Two Histocompatibility Loci in the First Linkage Group." Immunology **4**(4): 366-379.

Spahn, J. H., W. Li and D. Kreisel (2014). "Innate immune cells in transplantation." Current opinion in organ transplantation **19**(1): 14-19.

Starzl, T. E. (1993). "FRANCE AND THE EARLY HISTORY OF ORGAN TRANSPLANTATION." Perspectives in biology and medicine **37**(1): 35-47.

Starzl, T. E., C. G. Groth, L. Brettschneider, I. Penn, V. A. Fulginiti, J. B. Moon, H. Blanchard, A. J. J. Martin and K. A. Porter (1968). "Orthotopic Homotransplantation of the Human Liver." Annals of Surgery **168**(3): 392-415.

Starzl, T. E., L. Koep, K. A. Porter, G. P. J. Schroter, R. Weil, R. B. Hartley and C. G. Halgrimson (1980). "Decline in Survival After Liver Transplantation." Archives of surgery (Chicago, Ill. : 1960) **115**(7): 815-819.

Starzl, T. E., T. L. Marchioro, K. N. V. Kaulla, G. Hermann, R. S. Brittain and W. R. Waddell (1963). "HOMOTRANSPLANTATION OF THE LIVER IN HUMANS." Surgery, gynecology & obstetrics **117**: 659-676.

Steinert, P. M. and L. N. Marekov (1995). "The Proteins Elafin, Filaggrin, Keratin Intermediate Filaments, Loricrin, and Small Proline-rich Proteins 1 and 2 Are Isodipeptide Cross-linked Components of the Human Epidermal Cornified Cell Envelope." Journal of Biological Chemistry **270**(30): 17702-17711.

Stoitzner, P., C. H. Tripp, A. Eberhart, K. M. Price, J. Y. Jung, L. Bursch, F. Ronchese and N. Romani (2006). "Langerhans cells cross-present antigen derived from skin." Proceedings of the National Academy of Sciences **103**(20): 7783-7788.

Sumaria, N., B. Roediger, L. G. Ng, J. Qin, R. Pinto, L. L. Cavanagh, E. Shklovskaya, B. Fazekas de St. Groth, J. A. Triccas and W. Weninger (2011). "Cutaneous immunosurveillance by self-renewing dermal γδ T cells." The Journal of Experimental Medicine **208**(3): 505-518.

Surquin, M., S. Buonocore, A. Le Moine, V. Flamand, M. Goldman and D. Abramowicz (2005). "Le rôle des neutrophiles dans le rejet d'allogreffe." Néphrologie & Thérapeutique **1**(3): 161-166.

T., C., T. P. and E. R.A.J. (1979). "Distribution of mast cells in human dermis: development of a mapping technique." British Journal of Dermatology **100**(6): 635-640.

Tadokoro, C. E., G. Shakhar, S. Shen, Y. Ding, A. C. Lino, A. Maraver, J. J. Lafaille and M. L. Dustin (2006). "Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4 T cells and dendritic cells in vivo." The Journal of Experimental Medicine **203**(3): 505-511.

Takahashi, T., Y. Kuniyasu, M. Toda, N. Sakaguchi, M. Itoh, M. Iwata, J. Shimizu and S. Sakaguchi (1998). "Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state." International Immunology **10**(12): 1969-1980.

Tamoutounour, S., M. Guilliams, F. Montanana Sanchis, H. Liu, D. Terhorst, C. Malosse, E. Pollet, L. Ardouin, H. Luche, C. Sanchez, M. Dalod, B. Malissen and S. Henri (2013). "Origins and Functional Specialization of Macrophages and of Conventional and Monocyte-Derived Dendritic Cells in Mouse Skin." Immunity **39**(5): 925-938.

Tani, K., F. Ogushi, H. Kido, T. Kawano, Y. Kunori, T. Kamimura, P. Cui and S. Sone (2000). "Chymase is a potent chemoattractant for human monocytes and neutrophils." J Leukoc Biol **67**(4): 585-589.

Taylor, P. A., R. J. Noelle and B. R. Blazar (2001). "Cd4(+)Cd25(+) Immune Regulatory Cells Are Required for Induction of Tolerance to Alloantigen via Costimulatory Blockade." The Journal of Experimental Medicine **193**(11): 1311-1318.

Tchougounova, E., G. Pejler and M. Abrink (2003). "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**(3): 423-431.

Tellechea, A., E. C. Leal, A. Kafanas, M. E. Auster, S. Kuchibhotla, Y. Ostrovsky, F. Tecilazich, D. Baltzis, Y. Zheng, E. Carvalho, J. M. Zabolotny, Z. Weng, A. Petra, A. Patel, S. Panagiotidou, L. Pradhan-Nabzdyk, T. C. Theoharides and A. Veves (2016). "Mast Cells Regulate Wound Healing in Diabetes." Diabetes **65**(7): 2006-2019.

Tellechea, A., E. C. Leal, A. Kafanas, M. E. Auster, S. Kuchibhotla, Y. Ostrovsky, F. Tecilazich, D. Baltzis, Y. Zheng, E. Carvalho, J. M. Zabolotny, Z. Weng, A. Petra, A. Patel, S. Panagiotidou, L. Pradhan-Nabzdyk, T. C. Theoharides and A. Veves (2016). "Mast Cells Regulate Wound Healing in Diabetes." Diabetes **65**(7): 2006-2019.

Thornton, A. M. and E. M. Shevach (1998). "CD4(+)CD25(+) Immunoregulatory T Cells Suppress Polyclonal T Cell Activation In Vitro by Inhibiting Interleukin 2 Production." The Journal of Experimental Medicine **188**(2): 287-296.

Tiriveedhi, V., B. Banan, S. Deepti, A. Nataraju, R. Hachem, E. Trulock, P. G. Alexander and M. Thalachallour (2014). "Role of defensins in the pathogenesis of chronic lung allograft rejection." Human immunology **75**(4): 370-377.

Tkaczyk, Villa, Peronet, David and Mécheri (1999). "FcεRI-mediated antigen endocytosis turns interferon-γ-treated mouse mast cells from inefficient into potent antigen-presenting cells." Immunology **97**(2): 333-340.

Todd, J. L., X. Wang, S. Sugimoto, V. E. Kennedy, H. L. Zhang, E. N. Pavlisko, F. L. Kelly, H. Huang, D. Kreisel, S. M. Palmer and A. E. Gelman (2014). "Hyaluronan Contributes to Bronchiolitis Obliterans Syndrome and Stimulates Lung Allograft Rejection through Activation of Innate Immunity." American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine **189**(5): 556-566.

Tomasek, J. J., G. Gabbiani, B. Hinz, C. Chaponnier and R. A. Brown (2002). "Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling." Nature Reviews Molecular Cell Biology **3**: 349.

Tomura, M., T. Honda, H. Tanizaki, A. Otsuka, G. Egawa, Y. Tokura, H. Waldmann, S. Hori, J. G. Cyster, T. Watanabe, Y. Miyachi, O. Kanagawa and K. Kabashima (2010). "Activated regulatory T cells are the major T cell type emigrating from the skin during a cutaneous immune response in mice." The Journal of Clinical Investigation **120**(3): 883-893.

Topham, N. J. and E. W. Hewitt (2009). "Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger?" Immunology **128**(1): 7-15.

Toru, H., R. Pawankar, C. Ra, J. Yata and T. Nakahata (1998). "Human mast cells produce IL-13 by high-affinity IgE receptor cross-linking: Enhanced IL-13 production by IL-4–primed human mast cells." Journal of Allergy and Clinical Immunology **102**(3): 491-502.

Toulon, A., L. Breton, K. R. Taylor, M. Tenenhaus, D. Bhavsar, C. Lanigan, R. Rudolph, J. Jameson and W. L. Havran (2009). "A role for human skin–resident T cells in wound healing." The Journal of Experimental Medicine **206**(4): 743-750.

Tsai, M., T. Takeishi, H. Thompson, K. E. Langley, K. M. Zsebo, D. D. Metcalfe, E. N. Geissler and S. J. Galli (1991). "Induction of mast cell proliferation, maturation, and heparin synthesis by the rat c-kit ligand, stem cell factor." Proceedings of the National Academy of Sciences **88**(14): 6382-6386.
Turka, L. A. and R. I. Lechler (2009). "Towards the identification of biomarkers of transplantation tolerance." Nat Rev Immunol **9**(7): 521-526.

V., A. M., I. Shoko, R. Catherine, G. R. T., C. M. J. R. and B. M. A. (2011). "Amplification of cytokine production through synergistic activation of NFAT and AP-1 following stimulation of mast cells with antigen and IL-33." European Journal of Immunology **41**(3): 760-772.

V., Z., L. L., K. N., S. T., S. O. and S. M. M. (2008). "A Randomized, Prospective Trial of Rituximab for Acute Rejection in Pediatric Renal Transplantation." American Journal of Transplantation **8**(12): 2607-2617.

Valent, P., E. Spanblochl, W. Sperr, C. Sillaber, K. Zsebo, H. Agis, H. Strobl, K. Geissler, P. Bettelheim and K. Lechner (1992). "Induction of differentiation of human mast cells from bone marrow and peripheral blood mononuclear cells by recombinant human stem cell factor/kit-ligand in long-term culture." Blood **80**(9): 2237-2245.

Valladeau, J., O. Ravel, C. Dezutter-Dambuyant, K. Moore, M. Kleijmeer, Y. Liu, V. Duvert-Frances, C. Vincent, D. Schmitt, J. Davoust, C. Caux, S. Lebecque and S. Saeland (2000). "Langerin, a Novel C-Type Lectin Specific to Langerhans Cells, Is an Endocytic Receptor that Induces the Formation of Birbeck Granules." Immunity **12**(1): 71-81.

VanBuskirk, A. M., M. E. Wakely, J. H. Sirak and C. G. Orosz (1998). "PATTERNS OF ALLOSENSITIZATION IN ALLOGRAFT RECIPIENTS: Long-Term Cardiac Allograft Acceptance Is Associated with Active Alloantibody Production in Conjunction with Active Inhibition of Alloreactive Delayed-Type Hypersensitivity1." Transplantation **65**(8): 1115-1123.

Venetia, B., M. Naomi, M. Paul, D. Rachel, P. Sarah, C. Sharon, H. Muzlifah and C. Matthew (2015). "Langerin-expressing dendritic cells in human tissues are related to CD1c+ dendritic cells and distinct from Langerhans cells and CD141high XCR1+ dendritic cells." Journal of Leukocyte Biology **97**(4): 627-634.

Viedma Contreras José, A. (1999). Leukocyte Activation Markers in Clinical Practice. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. **37:** 607.

Vincent, L., D. Vang, J. Nguyen, M. Gupta, K. Luk, M. E. Ericson, D. A. Simone and K. Gupta (2013). "Mast cell activation contributes to sickle cell pathobiology and pain in mice." Blood **122**(11): 1853-1862.

Vukmanovic-Stejic, M., E. Agius, N. Booth, P. J. Dunne, K. E. Lacy, J. R. Reed, T. O. Sobande, S. Kissane, M. Salmon, M. H. Rustin and A. N. Akbar (2008). "The kinetics of CD4+Foxp3+ T cell accumulation during a human cutaneous antigen-specific memory response in vivo." The Journal of Clinical Investigation **118**(11): 3639-3650.

W., G. M. and S. R.A. (1996). "Histamine: The Quintessential Mediator." The Journal of Dermatology **23**(11): 735-740.

Waldmann, H. and S. Cobbold (2001). "Regulating the Immune Response to Transplants." Immunity **14**(4): 399-406.

Wang, D., J. Xiong, R. She, L. Liu, Y. Zhang, D. Luo, W. Li, Y. Hu, Y. Wang, Q. Zhang and Q. Sun (2008). "Mast cell mediated inflammatory response in chickens after infection with very virulent infectious bursal disease virus." Veterinary Immunology and Immunopathology **124**(1): 19-28.

Wang, H. W., N. Tedla, A. R. Lloyd, D. Wakefield and P. H. McNeil (1998). "Mast cell activation and migration to lymph nodes during induction of an immune response in mice." Journal of Clinical Investigation **102**(8): 1617-1626.

Wang, J., M. Hossain, A. Thanabalasuriar, M. Gunzer, C. Meininger and P. Kubes (2017). "Visualizing the function and fate of neutrophils in sterile injury and repair." Science **358**(6359): 111-116.

Waskow, C., K. Liu, G. Darrasse-Jèze, P. Guermonprez, F. Ginhoux, M. Merad, T. Shengelia, K. Yao and M. Nussenzweig (2008). "The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues." Nature Immunology **9**: 676.

Wasowska, B. A. (2010). "Mechanisms involved in antibody- and complement-mediated allograft rejection." Immunologic research **47**(1-3): 25-44.

Wayne Streilein, J. (1983). Skin-Associated Lymphoid Tissues (SALT): Origins and Functions.
Wayne Streilein, J. (1985). "Circuits and Signals of the Skin-Associated Lymphoid Tissues (SALT)." Journal of Investigative Dermatology **85**(1, Supplement): S10-S13.

Weller, K., K. Foitzik, R. Paus, W. Syska and M. Maurer (2006). "Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice." The FASEB Journal **20**(13): 2366-2368.

Wernersson, S. and G. Pejler (2014). "Mast cell secretory granules: armed for battle." Nat Rev Immunol **14**(7): 478-494.

Wernersson, S. and G. Pejler (2014). "Mast cell secretory granules: armed for battle." Nature Reviews Immunology **14**: 478.

Wershil, B. K., Z. S. Wang, J. R. Gordon and S. J. Galli (1991). "Recruitment of neutrophils during IgE-dependent cutaneous late phase reactions in the mouse is mast cell-dependent. Partial inhibition of the reaction with antiserum against tumor necrosis factor-alpha." Journal of Clinical Investigation **87**(2): 446-453.

Wershil, B. K., Z. S. Wang, J. R. Gordon and S. J. Galli (1991). "Recruitment of neutrophils during IgE-dependent cutaneous late phase reactions in the mouse is mast cell-dependent. Partial inhibition of the reaction with antiserum against tumor necrosis factor-alpha." J Clin Invest **87**(2): 446-453.

Wilgus, T. A., S. Roy and J. C. McDaniel (2013). "Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions." Advances in Wound Care **2**(7): 379-388.

Williams, D. E., P. de Vries, A. E. Namen, M. B. Widmer and S. D. Lyman (1992). "The Steel factor." Developmental Biology **151**(2): 368-376.

Williams, D. L. (1997). "A comparative approach to topical cyclosporine therapy." Eye **11**: 453.

Witko-Sarsat, V., P. Rieu, B. Descamps-Latscha, P. Lesavre and L. Halbwachs-Mecarelli (2000). "Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects." Laboratory Investigation **80**: 617.

Wood, K. J. and R. Goto (2012). "Mechanisms of rejection: current perspectives." Transplantation **93**(1): 1-10.

Wyman, T. H., A. J. Bjornsen, D. J. Elzi, C. W. Smith, K. M. England, M. Kelher and C. C. Silliman (2002). "A two-insult in vitro model of PMN-mediated pulmonary endothelial damage: requirements for adherence and chemokine release." American Journal of Physiology-Cell Physiology **283**(6): C1592-C1603.

Yamada, M., M. Ueda, T. Naruko, S. Tanabe, Y. S. Han, Y. Ikura, M. Ogami, S. Takai and M. Miyazaki (2001). "Mast cell chymase expression and mast cell phenotypes in human rejected kidneys." Kidney Int **59**(4): 1374-1381.

Yamaguchi, M., K. Sayama, K. Yano, C. S. Lantz, N. Noben-Trauth, C. Ra, J. J. Costa and S. J. Galli (1999). "IgE Enhances Fcε Receptor I Expression and IgE-Dependent Release of Histamine and Lipid Mediators from Human Umbilical Cord Blood-Derived Mast Cells: Synergistic Effect of IL-4 and IgE on Human Mast Cell Fcε Receptor I Expression and Mediator Release." The Journal of Immunology **162**(9): 5455-5465.

Yamanaka, K., M. Fujisawa, H. Tanaka, H. Okada, S. Arakawa and S. Kamidono (2000). "Significance of human testicular mast cells and their subtypes in male infertility." Human Reproduction **15**(7): 1543-1547.

Yanagida, M., H. Fukamachi, K. Ohgami, T. Kuwaki, H. Ishii, H. Uzumaki, K. Amano, T. Tokiwa, H. Mitsui and H. Saito (1995). "Effects of T-helper 2-type cytokines, interleukin-3 (IL-3), IL-4, IL-5, and IL-6 on the survival of cultured human mast cells." Blood **86**(10): 3705-3714.

Yang, M. Q., Y. Y. Ma, J. Ding and J. Y. Li (2014). "The role of mast cells in ischemia and reperfusion injury." Inflamm Res **63**(11): 899-905.

Yokoyama, W. M., D. K. Sojka, H. Peng and Z. Tian (2013). "Tissue-Resident Natural Killer Cells." Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology **78**: 149-156.

Yoshinaga, K., S. Nishikawa, M. Ogawa, S. Hayashi, T. Kunisada, T. Fujimoto and S. Nishikawa (1991). "Role of c-kit in mouse spermatogenesis: identification of spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function." Development **113**(2): 689-699.

Zaid, A., L. K. Mackay, A. Rahimpour, A. Braun, M. Veldhoen, F. R. Carbone, J. H. Manton, W. R. Heath and S. N. Mueller (2014). "Persistence of skin-resident memory T cells within an epidermal niche." Proceedings of the National Academy of Sciences **111**(14): 5307-5312.

Zarkhin, V., A. Talisetti, L. Li, L. J. Wozniak, S. V. McDiarmid, K. Cox, C. Esquivel and M. M. Sarwal (2010). "Expression of Soluble HLA-G Identifies Favorable Outcomes in Liver Transplant Recipients." Transplantation **90**(9): 1000-1005.

Zelenika, D., E. Adams, S. Humm, L. Graca, S. Thompson, S. P. Cobbold and H. Waldmann (2002). "Regulatory T Cells Overexpress a Subset of Th2 Gene Transcripts." The Journal of Immunology **168**(3): 1069-1079.

Zelenika, D., E. Adams, A. Mellor, E. Simpson, P. Chandler, B. Stockinger, H. Waldmann and S. P. Cobbold (1998). "Rejection of H-Y disparate skin grafts by monospecific CD4+ Th1 and Th2 cells: no requirement for CD8+ T cells or B cells." J Immunol **161**(4): 1868-1874.

Zerrahn, J., W. Held and D. H. Raulet (1997). "The MHC Reactivity of the T Cell Repertoire Prior to Positive and Negative Selection." Cell **88**(5): 627-636.

Zheng, X. X., A. W. Steele, W. W. Hancock, A. C. Stevens, P. W. Nickerson, P. Roy-Chaudhury, Y. Tian and T. B. Strom (1997). "A noncytolytic IL-10/Fc fusion protein prevents diabetes, blocks autoimmunity, and promotes suppressor phenomena in NOD mice." The Journal of Immunology **158**(9): 4507-4513.

Zhong, C., K. Cui, C. Wilhelm, G. Hu, K. Mao, Y. Belkaid, K. Zhao and J. Zhu (2016). "Group 3 innate lymphoid cells continuously require the transcription factor GATA3 after commitment." Nature immunology **17**(2): 169-178.

Zhou, J. S., W. Xing, D. S. Friend, K. F. Austen and H. R. Katz (2007). "Mast cell deficiency in Kit^{W-sh} mice does not impair antibody-mediated arthritis." The Journal of Experimental Medicine **204**(12): 2797-2802.

Zhu, H., S. O. Isikman, O. Mudanyali, A. Greenbaum and A. Ozcan (2013). "Optical Imaging Techniques for Point-of-care Diagnostics." Lab on a chip **13**(1): 51-67.

Zweifel, M., H. Hirsiger, K. Matozan, M. Welle, T. Schaffner and P. Mohacsi (2002). "Mast cells in ongoing acute rejection: increase in number and expression of a different phenotype in rat heart transplants." Transplantation **73**(11): 1707-1716.

Zweifel, M., H. Hirsiger, K. Matozan, M. Welle, T. Schaffner and P. Mohacsi (2002). "Mast cells in ongoing acute rejection: increase in number and expression of a different phenotype in rat heart transplants1." Transplantation **73**(11): 1707-1716.

ANNEXES

LETTER TO THE EDITOR doi: 10.1111/sji.12436

Identification of Biological and Pharmaceutical Mast Cell- and Basophil-Related Targets

Scand J Immunol. 2016 Jun;83(6):465-72. doi: 10.1111/sji.12436.

Identification of Biological and Pharmaceutical Mast Cell- and Basophil-Related Targets.

Klein O[1], Ngo-Nyekel F[2,3,4], Stefanache T[5], Torres R[6], Salomonsson M[7], Hallgren J[7], Rådinger M[8], Bambouskova M[9], Campbell M[10], Cohen-Mor S[11], Dema B[2,3,4], Rose CG[12,13], Abrink M[14], Charles N[2,3,4], Ainooson G[15], Paivandy A[7], Pavlova VG[16], Serrano-Candelas E[17], Yu Y[18], Hellman L[19], Jensen BM[20], Van Anrooij B[21], Grootens J[22], Gura HK[23], Stylianou M[24], Tobio A[2,3,4], Blank U[2,3,4], Öhrvik H[7], Maurer M[25].

Mast cells and basophils have been studied mainly regarding their implication in IgE-mediated allergic disease. Yet, it has become clear that apart from the high-affinity IgE receptor (FceRI), these cells can respond to many different inflammatory stimuli via expression of a large variety of additional receptors making them prime effectors and regulators in inflammation and immunity. Besides highlighting mast cell involvement in different acute and chronic inflammatory and autoimmune diseases, studies have also revealed their beneficial functions.

The COST Action BM1007 'Mast cells and Basophils – Targets for Innovative Therapies' represented a network of researchers analysing to a large part the physiological and pathological roles of mast cells and basophils in the organism in order to come up with new treatment strategies. Within this frame, the task of one working group was to identify biological and pharmaceutical mast cell- and basophil-related targets through the identification of relevant pathways, the means to modulate mast cell and basophil functions, the promotion of studies in the human system as well as by the validation of pharmacological approaches and preclinical models.

In February 2015, the third and last training school related to this COST action was held in Uppsala, Sweden. The school gathered 20 students together with eight trainers from 11 countries all across Europe in a relaxed study atmosphere to discuss hot mast cell topics. These topics were as follows: (i) mast cell and basophil development in vivo and in vitro, (ii) mast cell- and basophildeficient mouse strains, (iii) the difference between human and mouse mast cells and basophils and (iv) Are kinase inhibitors potential targets for mast cell- and basophildriven diseases? Here, we summarized the conclusion reached during this two-day training school in the form of a commentary report.

Mast cell and basophil development in vivo and in vitro

Identifying and mapping the different stages of mast cell and basophil development and differentiation is important for designing specific drugs targeting these cells. Current knowledge on the mast cell maturation and differentiation process has been reviewed recently [1], indicating an important role of transcription factors and surface molecules such as integrins and cytokine receptors. New types of regulators have been identified by a screen of microRNAs (miRNAs) expressed during differentiation of mast cells from bone marrow. Very specific miRNA patterns were found to be expressed governing the expression of differentiation and maturation markers such as KIT and the high-affinity IgE receptor (FceRI) [2]. miRNAs play critical roles in maintaining gene expression at appropriate levels, and these small molecules may thus be new potential targets to inhibit particular steps of mast cell differentiation and/or maturation.

Another important aspect of characterizing mast cell and basophil development is to establish better protocols to study these cells in vitro. Due to the low numbers of basophils in blood, many experimental procedures are difficult to perform. Making researchers to rely on basophil cell lines or bone marrow-derived basophils differentiated in vitro. Likewise, mast cells reach full maturation in tissues and mature mast cells are not found in the circulation [1]. Hence, researchers generally use established cell lines or mast cells differentiated in vitro from progenitor cells (i.e. cord blood, bone marrow). Accordingly, better understanding of mast cell and basophil development and maturation should yield better protocols for differentiating them in vitro. Currently, some contradictions arise from the literature regarding the cytokines and factors critical for mast cell and basophil differentiation. For example, while differentiation of murine bone marrow-derived mast cells can be achieved with IL-3 in the absence of stem cell factor (SCF), human mast cells are typically differentiated using IL-6 and SCF. Manninka et al. have characterized in

SCANDINAVIAN JOURNAL OF Immunology

vitro culture conditions suitable for human mast cells and suggested that human mast cells arise from a committed progenitor distinct from other myeloid cells [3].

Since mast cells reach final maturation in tissues, it is plausible that other tissue-resident cells supply additional maturation signals that may be responsible for the existing considerable heterogeneity. Consistent with this notion, mast cells in various types of tissues present different phenotypes, such as connective tissue or mucosal mast cells. Hsieh et al. [4] have shown that airway epithelial cells can provide necessary factors for expression of tryptase/chymase in cord blood-differentiated mast cells. They also demonstrated that culture conditions affect their capacity to release leukotrienes. This finding is important since most studies tend to characterize human mast cells only by their protease content. Importantly, when attempting to study mast cells in vitro, one should consider the type of mast cell that is relevant for the physiological aspect of the study and adjust culture conditions, accordingly. Thus, to model

human lung mast cells, special culture conditions may be required such as coculture with airway epithelial cells along with IL-3 and IL-4 [5].

Cell differentiation is tightly regulated by transcription factors. Mast cell and basophil maturation and differentiation require GATA and STAT transcription factor families [6, 7]. However, new transcription factors continue to be discovered. In mice, interferon regulatory factor 8 (IRF8), a transcription factor essential for the development of several myeloid lineages, also regulates basophil and mast cell development [8]. It is expressed in granulocyte progenitors but not in basophils, mast cells and basophil-/ mast cell-restricted progenitors. However, in IRF8 knockouts, mast cell and basophil development is inhibited supporting a role in the generation of mast cell and basophil progenitors, likely involving its function as a transactivator of GATA2 [8]. The complexity of the gene expression regulation during cell differentiation highlights the need for searching additional candidate transcription factors.

Current drugs used for mast cell- and basophil-induced pathologies are non-specific or target only a single mediator like antihistamines calling for more selective targets and knowledge about factors determining mast cell and basophil development. Improved in vitro systems to model the in vivo mast cell and basophil phenotypes are also crucial for the research community.

Mast Cell- & Basophil-Deficient Mouse Strains

The role of mast cells was originally studied in mouse models carrying natural mutations in KIT, that is WBB6F-KIT W/W-v and C57BL6-KIT W-sh/W-sh, which resulted in 99% depletion. However, due to altered KIT expression in other cell types, abnormalities of haematopoiesis and in the immune system have been described [9]. Basophil in vivo research for long time was impossible lacking naturally occurring deficient mouse strains. First attempts were made using basophil-depleting monoclonal antibodies: anti-FceRIa (clone Mar-1) or antiCD200R3 (clone Ba103), an IgE-independent activating receptor. Despite basophil depletion (>90%), reports of mast cell activation leading to anaphylaxis [10], depletion of dendritic cells [11] via FceRI and activation of myeloid cells and natural killer cells through CD200R [11, 12] complicated the interpretation and needed further validation.

This triggered new mast cell and basophil depletion strategies, for example Cre recombinase models (usually under the control of mast cell- or basophil-associated proteases). Cre mediates constitutive depletion either by toxicity (Cpa3cre/Cre Master; Mcpt8-Cre) [10, 13] or by crossing with Rosa-DTa (R-DTA)

mice expressing the diphtheria toxin (DT) a-subunit downstream a loxP-flanked stop cassette from the Rosa locus (Mcpt5-Cre-RDTA, Basoph8) [14–16]. Conditional depletion is achieved after injection of DT into DT receptor knock-in mice, either by Cre-inducible DTR (iDTR), in which DTR expression is blocked by an upstream loxP-flanked stop sequence (Mcpt5-Cre–iDTR) [15, 16] or by a mast cell/ basophil protein-specific DTR transgenic mice (MasTRECK, Bas-TRECK, Mcpt8-DTR) [17, 18]. A recent model, the red mast cell and basophil model (RMB) [19], allows tracking and depletion of both granulocytes selectively due to the insertion of the bright red tdTomato (tdT) fluorescent protein and the human DTR in the Ms4a2 gene encoding the FceRI b-chain.

Mast cells and basophils are traditionally thought of in the context of TH2-type responses; however, recent studies indicated roles beyond allergic and antihelminth responses [20, 21]. Furthermore, significant differences in mast cell phenotypes derived from different mouse strains, different environment and different investigators have been identified influencing disease susceptibility [9]. Hence, emphasis should be made to carefully report experimental conduct, as well as detailed genetic backgrounds of mouse strains, animal husbandry and origin of mice.

The new deficient mouse models should allow to validate previous work performed with the KIT-dependent mast cell deficiencies. Previous work in KIT W/W-v and KIT W-sh/W-sh mice showed that mast cells can contribute to orchestrating neutrophil recruitment in various inflammatory responses. IgE-dependent local and systemic anaphylaxis reactions in both KIT-dependent and independent mast cell-deficient mice (KIT W/W-v mice, KIT W-sh/W-sh mice and mast cell-depleted Mcpt5-Cre– iDTR mice) [22–25] have consistently demonstrated a critical role of mast cells. However, conflicting results regarding their role in contact hypersensitivity (CHS) responses have been generated. Researchers demonstrated that CHS responses to dinitrofluorobenzene (DNFB) were enhanced in KIT W/W-v and KIT W-sh/W-sh mice, while mast cells were critical for CHS responses to DNFB and fluorescein isothiocyanate when using Mcpt5-Cre–iDTR mice or Mcpt5-Cre–R-DTA mice. Additionally, immediate ear swelling response was abolished in Mcpt5-Cre– iDTR mice but remained intact in the Kit-mutant strains. Further studies are required to clarify the mechanisms that might explain these contradictory results. Similar validation and/or controversies applied also to other pathologies. Despite these discrepancies, previous studies on KITdependent and recent work on KIT-independent mast cell deficiencies should be seen as complementary.

Concerning basophils, generation of (inducible) basophil-deficient mice allowed profound advances in the understanding of their immune regulatory and effector roles. Thus, basophil involvement in acquired tick feeding resistance demonstrated in the 1980s in guinea pigs [26] has been validated just recently, with the help of the Mcpt8-DTR mice [17, 18]. However, conflicting results regarding the role of basophils in antigen presentation or TH2 response to papain have arisen in the literature when antibody-mediated and genetically mediated basophil depletions have been compared [10, 27–30]. Despite these controversies, basophil-deficient mice represent new tools that allow deciphering the role of basophils in health and disease ranging as well as their regulatory role in humoral immune responses and autoimmune diseases [31].

Taken together, while now ‘cleaner models’ for the study of mast cells and basophil functions have become available, the previous studies using KIT-dependent MC deficiencies and antibody-mediated basophil depletion should still be considered as valid, despite the observed differences. One may want to keep in mind that the true mechanisms involving mast

cells and basophils in pathologies may reside precisely in these differences.

Differences between human and mouse mast cells and basophils

Mouse mast cell and basophil models have been the mainstay of in vivo and in vitro investigations to study the causes and to identify cures for mast cell- and basophildriven diseases in humans [32, 33]. Their use has provided valuable insight and triggered various hypotheses about mast cell- and basophil-driven diseases and remains the prime tools for the identification of biological and pharmaceutical mast cell- and basophil-related targets [32, 34]. However, questions remain as to whether these models have been very useful in the identification of these targets for applications in humans [23, 35, 36]. Concise studies that examine the predictability of these models in human disease are still scanty. For example, recent large scale studies have shown that the small differences between the mouse and human genome can give rise to significant differences in their immune system and inflammatory response [36, 37]. It is therefore not surprising that several drugs for mast cell- and basophil-related disease like asthma that were reported to be effective in preclinical models have failed in clinical trials [38, 39]. This warrants careful consideration in experimental design and the extrapolation of data to humans considering known differences between mouse and human mast cell and basophils. In this respect, some of the differences between mouse and human mast cells and basophils are summarized in Tables 1 and 2. These differences suggest that to enhance the chances of identifying clinically useful mast cell- and basophil-related targets, new models that precisely mimic human disease are needed. This will not only accelerate the identification of relevant targets, but will also result in efficient use of the already scarce resources available for research.

The most important question to answer is how to overcome these differences in order to avoid errors when we interpret our results and extrapolate them from mouse or other models to human. One important step is to validate results in the most suitable human model for a specific physiological or pathophysiological context. Furthermore, protocols to obtain, culture and characterize primary mast cells and basophils should be improved in order to approach them as close as possible to this context. Yet, it should be clear that in vitro and ex vivo approaches have still important limitations and do not necessarily reflect the complex relationships in the human body. Several groups have proposed 'humanized mouse models' to study the behaviour of human cells into a whole body [40]. In 2004, Kambe and collaborators were able to populate mouse tissues with human mast cells with the same distribution pattern to human body [41] by using an immunodeficient mouse model (NOD/SCID)/gamma(c) (null) (NOG model). This model allows studying key molecules involved in cell differentiation, cell migration or cell function in a whole body context.

In summary, accumulated evidences show that a large part of animal validated drugs does not make it into clinics. While this may be in part due to incoherence in animal studies themselves (se chapter above), important differences exist also when comparing animal models and humans. For this reason, the identification of the differences between mouse (or any other animal model) and humans will help us to know our limitations and will enable us to extrapolate animal data to humans better.

Mast cells and basophils as targets for tyrosine kinase inhibitors

The non-redundant roles of mast cells and basophils in allergic disorders and systemic mastocytosis are well known. However, mast cells and basophils are increasingly recognized as important contributors to non-allergic inflammatory and autoimmune disorders. Several of the mast cell and basophil signalling pathways are regulated by tyrosine kinases (TKs). There are about 90 human TKs which

regulate cell signalling and protein function by transferring a phosphate group from ATP to the hydroxyl group of a target protein tyrosine [42]. About 90% of mastocytosis patients present the D816V mutation within the cytoplasmic tail of the receptor tyrosine kinase KIT. It results in constitutional KIT activation leading to the pathologic mast cell proliferation and mediator release [43, 44]. TK signalling can be suppressed by tyrosine kinase inhibitors (TKIs) preventing phosphorylation of target proteins. As TKs are involved in mastocytosis, inhibitors have been considered as a feasible way for treatment. Furthermore, specific mast cells eradication may also be a means to treat mast cell-driven diseases.

Several TKIs that target mast cells and basophils are approved by the FDA for clinical use or are in the clinical trial phase. Imatinib was the first TKI used in mastocytosis patients; however, patients carrying the D816V

Table 1 Difference between human and murine mast cells.

Feature	Murine mast cells	Human mast cells	Reference
General phenotype	MMC, CTMC Based on granule proteoglycan Relatively well correlated with tissue distribution	MC_T, MC_{TC}, MC_C Based on granule protease	[54]
Proteoglycan	MMC: chondroitin sulphate di-A, B E CTMC: heparin, chondroitin sulphate-E	Heparin, chondroitin sulphate-A, E	[54]
Protease	Several tryptases and chymases with different specificities (e.g. mouse MMCs predominantly express MMCP-1 and MMCP-2, whereas mouse CTMCs predominantly express MMCP-4, MMCP-5, MMCP-6, MMCP-7 and carboxypeptidase)	MC_T: tryptase MC_{TC}: tryptase, chymase MC_C: chymase Three tryptases (a, b and c) and one chymase	[54]
Functional IL-3 receptor	+	(+) Human intestinal MCs () Human lung, skin, uterus, kidney, or tonsils MCs and HMC-1 (+/) CBDMCs[a] () PBDMCs	[55, 56, 57, 58, 59]
FceRI	+Obligatory tetrameric abc_2 structure; IL-4, IL-10 and TGFb1 inhibit FceRI expression; binds murine IgE	+FceRI b-chain is dispensable for FceRI cell surface expression; IL-4 enhances FceRIa chain expression; binds human and murine IgE	[54, 60]
FccRI	FccRIIb1, FccRIIb2, FccRIII: constitutively expressed in mouse BMDMCs, RBL-2H3, and increased expression in mouse mature PMCs	FccRI: IFN-c increases FccRI expression in PBDMCs FccRII: PBDMCs constitutively express FccRIIa. Human skin MCs constitutively express FccRIIa but not FccRIIb, whereas CBDMCs constitutively express FccRIIb but neither FccRIIa nor FccRIIc	[54]
MHC	MHC-I: constitutively expressed in mouse BMDMCs MHC-II: IFN-c and LPS enhance MHC-II expression in mouse BMDMCs and spleen-derived MCs. IL-3 inhibits MHC-II expression in mouse BMDMCs. IFN-c and IL-4 enhance MHC-II expression in mouse PCDMCs. IFN-c enhances MHC-II expression in rat MCs isolated from pleural cavity.	MHC-1: constitutively expressed in human skin, lung, liver and uterus MCs and HMC-1 MHC-II: IFN-c and TNF enhance MCH-II expression in HMC-1	[54]
CD14	+		[61]
Functional TLRs expression[a]	+++	+/	[62]

Sex hormone receptor	ERa: constitutively expressed in BMDMCs PR: constitutively expressed in BMDMCs	ERa: constitutively expressed in human MCs in nasal polyps, abdominal aortic vessels (fertile women), HMC-1 and LAD2 PR: constitutively expressed in human MCs in nasal polyps and HMC1	[54]
EP2 receptor	(+) PCDMCs () BMDMCs	(+++) PBDMCs, LAD2	[63]
CCR3	() BMDMCs	(+) Immature and mature CBDMCs, human gut, lung, skin MCs	[64, 65]
IL-4 production	(+) Spontaneously or after stimulation by FceRI aggregation	() Under normal conditions (+) Under allergic conditions	[61, 66]
IL-5 production	+[b]	+++	[61]
TNF production	+++	+	[61]
NOS	Mouse MCs: iNOS, eNOS Rat MCs: nNOS, iNOS, eNOS	nNOS, iNOS, eNOS	[54]

[a] See references for details.

[b] Murine mast cells express IL-5, but IL-5 protein synthesis and release from murine mast cells have not been quantified. BMDMCs, bone marrow-derived mast cells.

CBDMC, human cord blood-derived mast cell; CTMC, connective tissue-type mast cell; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; ERa, oestrogen receptora; IFN-c, interferon-c; iNOS, inducible nitric oxide synthase; MHC, major histocompatibility complex; MMC, mucosal type mast cell; MMCP, mouse mast cell protease; nNOS, neuronal nitric oxide synthase; NOS, nitric oxide synthase; PBDMC, human peripheral blood-derived mast cell; PCDMC, peritoneal cell-derived mast cell; PMC, peritoneal mast cell; PR, progesterone receptor; RBL-2H3, rat basophilic leukaemia 2H3 cell line; TLR, Toll-like receptor; TNF, tumour necrosis factor.

Table 2 Difference between human and mouse basophils.

Feature		Murine basophils	Human basophils	References
Act as antigen presenting cells (				
)		Yes	?	[67]
Phenotypical markers	FceRI	+	+	[67]
	CD11b	+/	+ (on IL-3	[68, 69]
	CD15	?	activation) +	[70]
	CD16a (FccRIIIA)	+	+	[67, 70,
	CD16b (FccRIIIB)		?	71]
	CD41	+ (activation marker ↑)		[67, 71] [72]
	CD63	?	+ (activation marker ↑)	[73, 74]
	CD117	+/ ++	+/	[67, 75]
	CD123 (IL-3R)		+++	[68, 70]
	CD191 (CCR1)	?	+	[76]
	CD192 (CCR2)	++	+	[67, 68]
	CD193(CCR3)		+	[67, 76,
	CD195 (CCR5)		+	77]
	CD200R	+ (activation marker ↑)	+	[68, 76] [74, 78]
	CD200R3	+	?	[12]
	CD203c		+(activation marker ↑)	[70, 74]
	CD300a	?	+	[79]

	Protease-activated receptor	+	+	[67, 80]
Cytokine production	IL3	?		[67, 81]
	IL-5		+	[67, 82]
	TSLP	+	?	[28, 67]

MCP-2, monocyte chemotactic protein 2; MIP-1a, macrophage inflammatory protein-1 a; TPA, 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate; TSLP, thymic stromal lymphopoietin; RANKL, receptor activator for nuclear factor kappa B (RANK) ligand.

mutation are resistant, as well as for nilotinib and ponatinib, which all target KIT. Subsequent trials focused on other compounds with a more broad inhibitory spectrum. Thus, dasatinib is inhibiting the SRC family protein TKs, whereas midostaurin also targets protein kinase C (PKC) [45]. Dasatinib and midostaurin, in addition to act on clonal mast cells and basophil diseases, have also been shown to be potent inhibitors of mast cell and basophil degranulation in vitro by targeting both the KIT and FceRI receptor signalling pathways [46, 47]. Nilotinib inhibits passive cutaneous anaphylaxis in mice and imatinib has shown effectiveness in ameliorating diarrhoea in a murine food allergy model [48, 49]. Currently, a trial study is testing the effect of imatinib on treatment of resistant asthma (ClinicalTrials.gov identifier: NCT01097694). So far, all these studies have focused on the short-term effects of TKIs on KIT and IgEmediated signalling. Results from long-term imatinib use in chronic myeloid leukaemia reveal that mast cell depletion can be achieved with less severe side effects compared to short-term treatment, indicating that mast cell depletion can be another possible TKI therapeutic stratagem [50] .

Since TKIs have a broad target profile and are not mast cell specific, they are associated with many adverse events depending on the particular TKI compound. These include periorbital oedema, nausea, cytopenia, folliculitis and pancreatitis, thereby limiting the usefulness in mild diseases [51]. However, recent studies have shown the possibility of combining TKIs for synergistic effect. The big advantage is that patients can be treated by using lower drug concentrations, with possible fewer side effects but, fascinatingly, with much higher antineoplastic or even anti-allergic effect. As an example, the combination of ponatinib and midostaurin requires 75% less midostaurin and 66% less ponatinib in comparison with the individual use of the drugs to halve the proliferation speed (IC50) of HMC1.2 (KIT^{D816V}) cell lines [52]. Moreover, combinations with non-KIT-based therapies are currently being developed. For instance, synergistic apoptotic effect is observed after calcineurin phosphatase and KIT inhibition in KITmutant mast cell lines [53]. Thus, TKIs can be used in multiple synergistic ways to still get a desired outcome in patients with the least systemic problems due to reduced side effects.

In conclusion, TKIs are potentially attractive compounds thus far reserved for severe treatment and resistant diseases. New developments with increasing specificity or the use of synergistic dosing schedules are promising to broaden the therapeutic spectrum, including less severe diseases. The benefit would be the low degree of side effects, which can be seen in the TKIs used in the clinic today.

Acknowledgment

This work was supported by the COST Action BM1007 (Mast cells and Basophils – Targets for Innovative Therapies) of the European Community.

Author contributions

All authors contributed equally to the writing of this manuscript being responsible for the following indicated topic: (i) mast cell and basophil development (authors 1–7), (ii) mast cell- and basophil-deficient animal models (authors 8–13), (iii) differences between mouse and human mast cells and basophils (authors 13–20), and (iv) mast cells and basophils as targets for tyrosine kinase inhibitors (authors 21–27). Author 28 was responsible for the Cost Action BM1007 and proofread the manuscript. Authors 5 and 26 finalized the manuscript and serve as corresponding authors.

References

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

2 Xiang Y, Eyers F, Young IG, Rosenberg HF, Foster PS, Yang M. Identification of microRNAs regulating the developmental pathways of bone marrow derived mast cells. PLoS ONE 2014;9:e98139.

3 Maaninka K, Lappalainen J, Kovanen PT. Human mast cells arise from a common circulating progenitor. J Allergy Clin Immunol 2013;132:463–9 e3.

4 Hsieh FH, Sharma P, Gibbons A, Goggans T, Erzurum SC, Haque SJ. Human airway epithelial cell determinants of survival and functional phenotype for primary human mast cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102:14380–5.

5 Oskeritzian CA, Zhao W, Pozez AL, Cohen NM, Grimes M, Schwartz LB. Neutralizing endogenous IL-6 renders mast cells of the MCT type from lung, but not the MCTC type from skin and lung, susceptible to human recombinant IL-4-induced apoptosis. J Immunol
2004;172:593–600.

6 Ohmori S, Takai J, Ishijima Y et al. Regulation of GATA factor expression is distinct between erythroid and mast cell lineages. Mol Cell Biol 2012;32:4742–55.

7 Verweij MM, Sabato V, Nullens S et al. STAT5 in human basophils: IL-3 is required for its FcepsilonRI-mediated phosphorylation. Cytometry B Clin Cytom 2012;82:101–6.

8 Sasaki H, Kurotaki D, Osato N et al. Transcription factor IRF8 plays a critical role in the development of murine basophils and mast cells. Blood 2015;125:358–69.

9 Galli SJ, Tsai M, Marichal T, Tchougounova E, Reber LL, Pejler G. Approaches for analyzing the roles of mast cells and their proteases in vivo. Adv Immunol 2015;126:45–127.

10 Ohnmacht C, Schwartz C, Panzer M, Schiedewitz I, Naumann R, Voehringer D. Basophils orchestrate chronic allergic dermatitis and protective immunity against helminths. Immunity 2010;33:364–74.

11 Hammad H, Plantinga M, Deswarte K 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
2010;207:2097–111.

12 Kojima T, Obata K, Mukai K et al. Mast cells and basophils are selectively activated in vitro and in vivo through CD200R3 in an IgEindependent manner. J Immunol 2007;179:7093–100.

13 Feyerabend TB, Weiser A, Tietz A et al. Cre-mediated cell ablation contests mast cell contribution in models of antibody- and T cellmediated autoimmunity. Immunity 2011;35:832–44.

14 Dudeck A, Dudeck J, Scholten J et al. Mast cells are key promoters of contact allergy that mediate the adjuvant effects of haptens. Immunity 2011;34:973–84.

15 Scholten J, Hartmann K, Gerbaulet A et al. Mast cell-specific Cre/ loxP-mediated recombination in vivo. Transgenic Res 2008;17:307–15.

16 Sullivan BM, Liang HE, Bando JK et al. Genetic analysis of basophil function in vivo. Nat Immunol 2011;12:527–35.

17 Sawaguchi M, Tanaka S, Nakatani Y et al. Role of mast cells and basophils in IgE responses and in allergic airway hyperresponsiveness. J Immunol 2012;188:1809–18.

18 Wada T, Ishiwata K, Koseki H et al. Selective ablation of basophils in mice reveals their nonredundant role in acquired immunity against ticks. J Clin Invest. 2010;120:2867–75.

19 Dahdah A, Gautier G, Attout T et al. Mast cells aggravate sepsis by inhibiting peritoneal macrophage phagocytosis. J Clin Invest 2014;124:4577–89.

20 Pellefigues C, Charles N. The deleterious role of basophils in systemic lupus erythematosus. Curr Opin Immunol 2013;25:704–11.

21 Yu X, Kasprick A, Petersen F. Revisiting the role of mast cells in autoimmunity. Autoimmun Rev 2015;14:751–9.

22 Arias K, Chu DK, Flader K et al. Distinct immune effector pathways contribute to the full expression of peanut-induced anaphylactic reactions in mice. J Allergy Clin Immunol 2011;127:1552–61 e1.

23 Reber LL, Marichal T, Galli SJ. New models for analyzing mast cell functions in vivo. Trends Immunol 2012;33:613–25.

24 Smith KA, Harcus Y, Garbi N, Hammerling GJ, MacDonald AS, Maizels RM. Type 2 innate immunity in helminth infection is induced redundantly and acts autonomously following CD11c(+) cell depletion. Infect Immun 2012;80:3481–9.

25 Sun J, Arias K, Alvarez D et al. Impact of CD40 ligand, B cells, and mast cells in peanut-induced anaphylactic responses. J Immunol 2007;179:6696–703.

26 Brown SJ, Galli SJ, Gleich GJ, Askenase PW. Ablation of immunity to Amblyomma americanum by anti-basophil serum: cooperation between basophils and eosinophils in expression of immunity to ectoparasites (ticks) in guinea pigs. J Immunol 1982;129:790–6.

27 Otsuka A, Nakajima S, Kubo M et al. Basophils are required for the induction of Th2 immunity to haptens and peptide antigens. Nat Commun 2013;4:1739.

28 Sokol CL, Barton GM, Farr AG, Medzhitov R. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. Nat Immunol 2008;9:310–8.

29 Tang H, Cao W, Kasturi SP et al. The T helper type 2 response to cysteine proteases requires dendritic cell-basophil cooperation via ROS-mediated signaling. Nat Immunol 2010;11:608–17.

30 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;10:706–12.

31 Karasuyama H, Yamanishi Y. Basophils have emerged as a key player in immunity. Curr Opin Immunol 2014;31:1–7.
32 Harvima IT, Levi-Schaffer F, Draber P et al. Molecular targets on mast cells and basophils for novel therapies. J Allergy Clin Immunol 2014;134:530–44.
33 Reber LL, Frossard N. Targeting mast cells in inflammatory diseases. Pharmacol Ther 2014;142:416–35.
34 LeiY,GregoryJA,NilssonGP,AdnerM.Insightsintomastcellfunctions in asthma using mouse models. Pulm Pharmacol Ther 2013;26:532–9.
35 Wall RJ, Shani M. Are animal models as good as we think?
Theriogenology 2008;69:2–9.
36 Seok J, Warren HS, Cuenca AG et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110:3507–12.
37 Mestas J, Hughes CC. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. J Immunol 2004;172:2731–8. 38 Barnes PJ. New drugs for asthma. Semin Respir Crit Care Med
2012;33:685–94.

39 Holmes AM, Solari R, Holgate ST. Animal models of asthma: value, limitations and opportunities for alternative approaches. Drug Discov Today 2011;16:659–70.
40 Shultz LD, Brehm MA, Garcia-Martinez JV, Greiner DL. Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. Nat Rev Immunol 2012;12:786–98.
41 Kambe N, Hiramatsu H, Shimonaka M et al. Development of both human connective tissue-type and mucosal-type mast cells in mice from hematopoietic stem cells with identical distribution pattern to human body. Blood 2004;103:860–7.
42 Robinson DR, Wu YM, Lin SF. The protein tyrosine kinase family of the human genome. Oncogene 2000;19:5548–57.
43 Tobio A, Alfonso A, Botana LM. PKC potentiates tyrosine kinase inhibitors STI571 and dasatinib cytotoxic effect. Anticancer Res 2014;34:3347–56.
44 Tobio A, Alfonso A, Botana LM. Cross-talks between c-Kit and PKC isoforms in HMC-1(560) and HMC-1(560,816) cells. Different role of PKCdelta in each cellular line. Cell Immunol
2015;293:104–12.

45 Ustun C, DeRemer DL, Akin C. Tyrosine kinase inhibitors in the treatment of systemic mastocytosis. Leuk Res 2011;35:1143–52.
46 Kneidinger M, Schmidt U, Rix U et al. The effects of dasatinib on IgE receptor-dependent activation and histamine release in human basophils. Blood 2008;111:3097–107.
47 Krauth MT, Mirkina I, Herrmann H, Baumgartner C, Kneidinger M, Valent P. Midostaurin (PKC412) inhibits immunoglobulin Edependent activation and mediator release in human blood basophils and mast cells. Clin Exp Allergy 2009;39:1711–20.
48 El-Agamy DS. Anti-allergic effects of nilotinib on mast cell-mediated anaphylaxis like reactions. Eur J Pharmacol 2012;680:115–21.
49 Vaali K, Lappalainen J, Lin AH et al. Imatinib mesylate alleviates diarrhea in a mouse model of intestinal allergy. Neurogastroenterol Motil 2012;24:e325–35.
50 Cerny-Reiterer S, Rabenhorst A, Stefanzl G et al. Long-term treatment with imatinib results in profound mast cell deficiency in Ph+ chronic myeloid leukemia. Oncotarget. 2015;6:3071–84.
51 Hartmann JT, Haap M, Kopp HG, Lipp HP. Tyrosine kinase inhibitors - a review on pharmacology, metabolism and side effects. Curr Drug Metab 2009;10:470–81.
52 Gleixner KV, Peter B, Blatt K et al. Synergistic growth-inhibitory effects of ponatinib and midostaurin (PKC412) on neoplastic mast cells carrying KIT D816V. Haematologica 2013;98:1450–7.
53 Macleod AC, Klug LR, Patterson J et al. Combination therapy for KIT-mutant mast cells: targeting constitutive NFAT and KIT activity. Mol Cancer Ther 2014;13:2840–51.
54 Moon TC, St Laurent CD, Morris KE et al. Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. Mucosal Immunol 2010;3:111–28.
55 Gebhardt T, Sellge G, Lorentz A, Raab R, Manns MP, Bischoff SC.
Cultured human intestinal mast cells express functional IL-3 receptors and respond to IL-3 by enhancing growth and IgE receptor-dependent mediator release. Eur J Immunol 2002;32:2308–16.
56 Valent P, Besemer J, Sillaber C et al. Failure to detect IL-3-binding sites on human mast cells. J Immunol 1990;145:3432–7.
57 Dahl C, Hoffmann HJ, Saito H, Schiotz PO. Human mast cells express receptors for IL-3, IL-5 and GM-CSF; a partial map of receptors on human mast cells cultured in vitro. Allergy 2004;59:1087–96.
58 Jensen BM, Frandsen PM, Raaby EM, Schiotz PO, Skov PS, Poulsen LK. Molecular and stimulus-response profiles illustrate heterogeneity between peripheral and cord blood-derived human mast cells. J Leukoc Biol 2014;95:893–901.
59 Schernthaner GH, Hauswirth AW, Baghestanian M et al. Detection of differentiation- and activation-linked cell surface antigens on cultured mast cell progenitors. Allergy 2005;60:1248–55.
60 Kraft S, Kinet JP. New developments in FcepsilonRI regulation, function and inhibition. Nat Rev Immunol 2007;7:365–78.
61 Bischoff SC. Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. Nat Rev Immunol 2007;7:93–104.
62 Sandig H, Bulfone-Paus S. TLR signaling in mast cells: common and unique features. Front Immunol 2012;3:185.
63 Serra-Pages M, Olivera A, Torres R, Picado C, de Mora F, Rivera J. Eprostanoid 2 receptors dampen mast cell degranulation via cAMP/ PKA-mediated suppression of IgE-dependent signaling. J Leukoc Biol 2012;92:1155–65.

64 Collington SJ, Westwick J, Williams TJ, Weller CL. The function of CCR3 on mouse bone marrow-derived mast cells in vitro. Immunology 2010;129:115–24.
65 Juremalm M, Nilsson G. Chemokine receptor expression by mast cells. Chem Immunol Allergy 2005;87:130–44.
66 Bradding P, Feather IH, Wilson S et al. Immunolocalization of cytokines in the nasal mucosa of normal and perennial rhinitic subjects - the mast cell as a source of IL-4, IL-5, and IL-6 in human allergic mucosal inflammation. J Immunol 1993;151:3853–65.
67 van Beek AA, Knol EF, de Vos P, Smelt MJ, Savelkoul HF, van Neerven RJ. Recent developments in basophil research: do basophils initiate and perpetuate type 2 T-helper cell responses? Int Arch Allergy Immunol 2013;160:7–17.
68 Mack M, Schneider MA, Moll C et al. Identification of antigencapturing cells as basophils. J Immunol 2005;174:735–41.
69 Aljadi Z, Mansouri L, Nopp A et al. Activation of basophils is a new and sensitive marker of biocompatibility in hemodialysis. Artif Organs 2014;38:945–53.
70 Reimer JM, Magnusson S, Juremalm M, Nilsson G, Hellman L, Wernersson S. Isolation of transcriptionally active umbilical cord blood-derived basophils expressing Fc epsilon RI, HLA-DR and CD203c. Allergy 2006;61:1063–70.
71 Jonsson F, Daeron M. Mast cells and company. Front Immunol 2012;3:16.
72 Bakocevic N, Claser C, Yoshikawa S et al. CD41 is a reliable identification and activation marker for murine basophils in the steady state and during helminth and malarial infections. Eur J Immunol 2014;44:1823–34.
73 Ebo DG, Bridts CH, Hagendorens MM, Aerts NE, De Clerck LS, Stevens WJ. Basophil activation test by flow cytometry: present and future applications in allergology. Cytometry B Clin Cytom. 2008;74:201–10.
74 Torrero MN, Larson D, Hubner MP, Mitre E. CD200R surface expression as a marker of murine basophil activation. Clin Exp Allergy 2009;39:361–9.
75 Mukai K, Matsuoka K, Taya C et al. Basophils play a critical role in the development of IgE-mediated chronic allergic inflammation independently of T cells and mast cells. Immunity 2005;23:191– 202.
76 Chirumbolo S. State-of-the-art review about basophil research in immunology and allergy: is the time right to treat these cells with the respect they deserve? Blood transfusion = Trasfusione del sangue. 2012;10:148–64.
77 Eberlein B, Hann R, Eyerich S et al. Optimizing of the basophil activation test: comparison of different basophil identification markers. Cytometry B Clin Cytom. 2015;88:183–9.
78 Shiratori I, Yamaguchi M, Suzukawa M et al. Down-regulation of basophil function by human CD200 and human herpesvirus-8 CD200. J Immunol 2005;175:4441–9.
79 Sabato V, Verweij MM, Bridts CH et al. CD300a is expressed on human basophils and seems to inhibit IgE/FcepsilonRI-dependent anaphylactic degranulation. Cytometry B Clin Cytom. 2012;82:132–8.
80 Phillips C, Coward WR, Pritchard DI, Hewitt CR. Basophils express a type 2 cytokine profile on exposure to proteases from helminths and house dust mites. J Leukoc Biol 2003;73:165–71.
81 Schroeder JT, Chichester KL, Bieneman AP. Human basophils secrete IL-3: evidence of autocrine priming for phenotypic and functional responses in allergic disease. J Immunol 2009;182:2432–8.
82 Smithgall MD, Comeau MR, Yoon BR, Kaufman D, Armitage R, Smith DE. IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. Int Immunol 2008;20:1019–30.

curriculum vitae

FLAVIE NGO NYEKEL

126 avenue de Clichy
+ 336.11.45.08.29

Paris 75017, France
Flavie.ngo@gmail.com / Flavie.ngo-nyekel@inserm.fr

EDUCATION:

Centre for Research on Inflammation — Paris, France (9/2014-7/2018)

Ph.D. Immunology

Dissertation:" Mast cells orchestrate immune cell responses during skin graft rejection "

Committee: Dr. U Blank (chaira), Dr. P. Launay, Dr. G. Gauthier

University Paris Diderot — Paris, France (9/2012-6/2014)

Master of Science, Microbiology, Virology and Immunology

Research Project 1: "Study of the regulation of signalling pathways involved in inflammatory responses at the epithelial cell level by microRNAs"

Committee: Pr R.Monteiro (Laboratory Head), Dr. C Chassin (Project Director)

Research Project 2**: "**Study of the effects of Arginine vasopressin (ADH) and the regulatory role of ADH-induced microRNAs on the innate immune response induced by LPS"

Committee: Pr R.Monteiro (Laboratory Head), Dr. C Chassin (Project Director)

University of Paris 7 Denis Diderot — Paris, France (9/2009-6/2012)

Bachelor of Science, Biochemistry and Molecular Biology

EXPERIENCE:

My thesis in three minutes-180 seconds — Paris (2018)

INFLAMEX / LABEX — Paris (2014-2018)

Fellowship and Medical Research Foundation fellowship

Authorization "Animal Experimentation LEVEL I" Scientific Project Designer Using Animals

Scientific Seminars and Scientific Professional Workshops — (2016-2018)

Intern at Summer School Mast Cells/Basophiles — Uppsala, Sweden (2015)

Supervision of Master students — Paris (2014-2017)

PUBLICATION:

Klein O., Ngo Nyekel et al “Identification of Biological and Pharmaceutical Mast Cell and Basophil Related Targets” Scan J Immunol, June 2016, 83(6).

Ngo Nyekel et al “Mast cell degranulation exacerbates skin rejection by enhancing neutrophil recruitment” (submit to J exp Med).

PESENTATIONS:

MAST CELLS CONGRESS (2017) — Prague, Czech Republic

INFLAMEX/LABEX MEETING 2017) — Marseille, France (2015-

MAST CELLS CONGRESS MASTOCYTES — Munich, Germany (2016)

MAST CELLS CONGRESS (2017) — Prague, Czech Republic

SKILLS:

Cellular and Molecular Biology

- Cell Culture (bone marrow derived Mast Cells) / quantification of immortalized Trans cells from the renal cortical collecting tubule / Cryopreservation of cells from in vitro cultures / RNA and DNA extraction from tissues and cultured cells / Polymerase Chain Reaction (PCR) / Reverse-Transcription PCR (RT-PCR) / Quantitative PCRs (or Real-Time PCR) / Southern Blot / Western Blot / In-Vitro Cell experiments: Chemotaxis, E-hexasominidase. Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) / Cell transfection (electroporation) by SiARN messenger (plasmid) / Spectral analyses

Animal Handling:

- Mice: Breeding / Genotyping / Sampling: Tissues, Organs, Blood, Lymphoid Organs, Peritoneal cavity lavages, Bone Marrow.
- Experimental procedures: IV, IP, IM, ID injections / Surgical Procedures: Skin graft/ transplantation procedure other procedures: PCA (Passive Cutaneous Anaphylaxis), PSA (Passive Systemic Anaphylaxis).

Flow Cytometry:

- Extracellular Staining / Intracellular Staining / Cell division (thymidine and CFSE) / Calcium detection and fluctuation assays / Cytometry Bead Array (CBA) / Phagocytosis assays.

Flow Cytometers: BD FACS CANTO / BD FACS LSRII / BD FACS ARIAII

Confocal Microscopy:

- Cell Staining, acquisition (in vitro and in vivo samples), and analysis.

Microscopes: Zeiss LSM510 / Leica SP5

REFERENCES:

Dr. Blank Ulrich. (Doctorate team supervisor). INSERM UMRS1149 / Center for Research on Inflammation; Renal Immunopathology, Receptors and Inflammation University Paris 7, Bichat Medical School 16, Rue Henri Huchard 75018 Paris, France. Tel: +33 1 57 27 73 45 Fax: +33 1 57 27 76 61 E-mail: ulrich.blank@inserm.fr

Dr. Gauthier Gregory. (Doctorate supervisor) – INSERM UMRS1149 University Paris 7, Bichat Medical School 16, Rue Henri Huchard 75018 Paris, Tel: +33 1 57 27 74 81 E-mail: gregory.gauthier@inserm.fr

Dr. Launay Pierre. Group AVENIR – INSERM UMRS1149/ Center for Research on Inflammation University; Paris 7, Bichat Medical School 16, Rue Henri Huchard 75018 Paris, France. Tel: +33 1 57 27 77 56 Fax : +33 1 57 27 76 61 E-mail: launay.pierre@inserm.fr

Pr. Monteiro Renato. (INSERM UMRS1149/ Center for Research on Inflammation Director) Renal Immunopathology, Receptors and Inflammation University Paris 7, Bichat Medical School 16, Rue Henri Huchard 75018 Paris, France. Tel: +33 1 57 27 77 51 Fax: +33 1 57 27 76 61 E-mail: renato.monteiro@inserm.fr

ABSTRACT

Skin allografts are performed after injuries, burns or other skin diseases in order to

Restore skin protection. The real challenge is to induce a better transplant tolerance by decreasing or preventing immunosuppressiv treatments which trigger side effects.

Mast cells (MC) are part of complex cellular networks in every mucosal and connective tissues such as the skin and are playing key regulatory roles for initiating local inflammatory responses. Using our new Red Mast cell and Basophil (RMB) mouse model that allows visualization and conditional depletion of MC by diphteria toxin injection, we showed that both graft and host MC accelerate rejection in a sex mismatch ear skin graft model.

Graft rejection is speeded up in the presence of mast cells (t1/2 3 versus 6 days). A strong recruitment of inflammatory cells, especially neutrophils, were strongly recruited both on the graft site and in the draining lymph node at 2 and 6 days post graft compared to the control condition ie sexmatch female-female ear skin graft. No marked MC-dependent differences were seen in T cell or monocyte/macrophage infiltration, while B cells showed a late increase in skin allografts in the absence of MCs. Inflammatory cytokines such as KC, MIP-2 and TNF were clearly upregulated supporting the early neutrophil infiltration to mediate graft rejection.

We next blocked MC activation using cromolyn treatment, a MC stabilizer and observed same delay in the graft rejection confirming the MC rule. Treatments with ketotifen, a histamine type I receptor antagonist, or using mcpt4 chymase deficient mice showed a light delay of the graft rejection. Depletion of neutrophils with a specific antibody (NIMP) confirmed their involvement in skin rejection.

Together our data indicate that mast cells after degranulation promote the recruitment of inflammatory cells, such as neutrophils, which contribute to the acceleration of an ear skin graft rejection.

Key words: skin, mast cells, neutrophils, rejection, allograft, graft, cytokines, inflammatory, degranulation, histamine.

RÉSUMÉ

L'allogreffe de peau est réalisée suite à des blessures, brûlures ou autres maladies de la peau afin de palier à la perte de protection de la peau. Induire une meilleure tolérance du greffon en évitant ou diminuant le dosage des traitements immunosuppresseurs et leurs effets secondaires est un vrai défi.

Les mastocytes, cellules du système immunitaire cutané, forment un véritable réseau dans la peau participant aux mécanismes de défense de l'hôte. Décrit pour leurs effets bénéfiques en condition de tolérance de greffe par les lymphocytes T régulateur, nous nous sommes intéressés au contrôle du rejet de greffe par les mastocytes.

Grâce au nouveau modèle murin (RMB) développé au laboratoire permettant leur visualisation par fluorescence et leur déplétion par injection de toxine diphtérique, nous avons utilisé un modèle de greffe de peaux d'oreille de souris mâles sur des souris femelles.

Nos résultats montrent une accélération du rejet du greffon en présence de mastocytes ($t_{1/2}$ 3 versus 6 jours).

Nous avons observé un recrutement important de cellules inflammatoires à la fois au niveau de la greffe et dans les ganglions drainants à 2 et 6 jours par rapport au greffe femelle-femelle dont la réponse inflammatoire est associée une réparation tissulaire après la greffe.

Nous avons remarqué une augmentation de l'expression de cytokines inflammatoires telles que KC, MIP-2 et TNF justifiant l'infiltration précoce des neutrophiles pour faciliter le rejet du greffon.

En outre, l'administration de la cromolyne, un stabilisateur des MCs et, dans une moindre mesure, de la kétotifène, un antagoniste des récepteurs histaminiques de type I, et l'absence de la chymase MCPT4 retardait également le rejet du greffon montrant que les MC sécrète de l'histamine et la MCPT4 au cours du rejet.

Nous avons confirmé l'impact des neutrophiles sur ce processus de rejet en montrant que leur déplétion avec un anticorps spécifique retarde le rejet de la peau comme en absence de MCs.

L'ensemble de ces données indique que les mastocytes après la dégranulation favorisent le recrutement de cellules inflammatoires, telles que les neutrophiles, qui contribuent à l'accélération du rejet de la greffe de peau de l'oreille.

Mots clés : peau, mastocytes, neutrophiles, rejet, allogreffe, greffon, cytokines, inflammatoire, dégranulation, histamine.