



Disponible en ligne sur
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com

REVUE FRANÇAISE
D'**Allergologie**

Revue française d'allergologie xxx (2017) xxx–xxx

Mise au point

FcεRI et MRGPRX2 régulent différemment la dynamique de dégranulation des mastocytes

FcεRI and MRGPRX2 differentially regulate mast cell degranulation dynamics

N. Gaudenzio

Unité de différenciation épithéliale et autoimmunité rhumatoïde (UDEAR), UMR 1056 Inserm, hôpital Purpan, université de Toulouse, place du Dr-Baylac, TSA 40031, 31059 Toulouse cedex 9, France

Reçu le 15 novembre 2017 ; accepté le 7 janvier 2018

Résumé

Les mastocytes sont des cellules granulaires du système immunitaire stratégiquement localisées au sein des tissus connectifs et des muqueuses, où ils participent à la régulation des processus inflammatoires. La caractéristique principale des mastocytes est leur capacité à externaliser rapidement leur contenu granulaire cytoplasmique enrichi en molécules bioactives et immunomodulatrices, en réponse à différents signaux activateurs. Mieux comprendre comment ces cellules régulent leur dynamique de sécrétion en fonction du récepteur activé est d'un intérêt majeur pour appréhender les réactions inflammatoires dépendantes des mastocytes. Nous nous sommes particulièrement intéressés à l'activation des mastocytes par deux récepteurs jouant un rôle majeur dans divers processus inflammatoires : le FcεRI (le récepteur de haute affinité aux IgE) et MRGPRX2 (le récepteur des mastocytes aux substances cationiques). Pour pallier aux contraintes technologiques actuelles, nous avons développé une nouvelle approche permettant de visualiser, en temps réel et à l'échelle cellulaire, la dynamique de dégranulation des mastocytes en utilisant la microscopie confocale *in vitro* et biphotonique *in vivo*. Nous avons démontré qu'en réponse à une activation par FcεRI ou MRGPRX2, les mastocytes mettent en place des stratégies de dégranulation bien spécifiques à chaque récepteur, permettant l'externalisation du contenu granulaire avec des caractéristiques physiques distinctes et le développement de réactions inflammatoires de différentes intensités. Nous proposons ici une synthèse des connaissances nouvelles sur les différentes stratégies de dégranulation des mastocytes.

© 2018 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Mastocytes ; IgE ; Substance P ; FcεRI ; MRGPRX2 ; Contenu granulaire ; Inflammation

Abstract

Mast cells are granular immune cells strategically located among connective tissues and mucosa, where they participate to the regulation of diverse inflammatory processes. The principal characteristic of mast cells is their capacity to rapidly exteriorize intracellular granular content enriched in bioactive molecules in response to different activation signals. A better understanding of how these cells regulate their secretion dynamics under different stimulatory conditions is crucial to apprehend mast cell-dependent inflammatory reactions. We particularly focused on mast cell activation via two major receptors involved in diverse pathophysiological processes: FcεRI (the high affinity receptor for IgE) and MRGPRX2 (the mast cell receptor for cationic molecules). To circumvent existing technical constraints, we developed a new approach that permits to monitor, in real-time and at the single cell level, mast cell degranulation dynamics using *in vitro* confocal microscopy and *in vivo* two-photon microscopy. We found that mast cells translate FcεRI- or MRGPRX2-mediated signals into distinct degranulation strategies leading to the release of granular content with specific physical characteristics and the development of mast cell-dependent reactions of different intensities. Here we propose a synthesis of new concept on how mast cells regulate their degranulation strategy in response to activation via different receptors.

© 2018 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Mast cells; IgE; Substance P; FcεRI; MRGPRX2; Granular content; Inflammation

Adresse e-mail : nicolas.gaudenzio@inserm.fr

<https://doi.org/10.1016/j.reval.2018.01.001>

1877-0320/© 2018 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

1. Introduction et état de l'art

L'exocytose du contenu granulaire par les mastocytes (dégranulation) est un processus cellulaire hautement régulé, qui influence le devenir de divers processus physiologiques et pathologiques [1]. La dégranulation des mastocytes peut notamment contribuer à la résistance aux venins [2–4], bactéries [5] ou parasites [6–8], mais aussi à la morbidité et mortalité associées aux maladies allergiques [9,10]. L'agrégation du récepteur de haute affinité aux IgE (FcεRI) à la membrane plasmique des mastocytes induit une cascade de signalisation intracellulaire complexe aboutissant au relargage du contenu granulaire cytoplasmique dans l'environnement extracellulaire [11–13] qui peut orchestrer l'inflammation locale et systémique [14–18]. Cependant les mastocytes peuvent être activés par de nombreux récepteurs de différentes natures, qui mettent en jeu différentes voies de signalisation, et qui contribuent aussi à la régulation des processus inflammatoires [19]. Parmi les nombreuses récepteurs ayant été décrits comme capable d'activer les mastocytes in vivo, les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) occupent une place particulièrement importante. Entre autres, il a été démontré que les mastocytes possèdent les récepteurs C3R et C5R aux anaphylatoxines du complément (C3a et C5a) [20], le récepteur ETA au peptide vasoconstricteur endothéline 1 (ET1) [21], ainsi que le récemment décrit « Mas-related G protein-coupled receptor X2 » (MRGPRX2 et son orthologue murin *Mrgprb2*) qui est spécifiquement exprimé par les mastocytes et qui leur permet d'être activés par tout un panel de substances cationiques telles que le neuropeptide substance P (SP), le composé 48/80 et des substances médicamenteuses associées à des réactions pseudoallergiques (comme l'icatibant ou le cetro-rélix) [22,23]. Une meilleure compréhension de la dynamique d'exocytose du contenu granulaire des mastocytes en réponse à différents signaux activateurs permet de mieux appréhender les réactions inflammatoires dépendantes des mastocytes. Nous proposons ici une revue des récentes avancées technologiques en matière de visualisation du contenu granulaire des mastocytes in vitro et in vivo, ainsi que des découvertes qu'elles ont permis de faire dans la compréhension de la dynamique de sécrétion des mastocytes.

2. L'utilisation de l'avidine couplée à des fluorochromes pour détecter la dégranulation des mastocytes humains et murins

Pendant de nombreuses années, la microscopie électronique à transmission (TEM) fut la technique d'analyse la plus utilisée pour directement visualiser la structure des granules des mastocytes et mieux comprendre le phénomène de dégranulation [24,25]. Les processus de sécrétion (comme la dégranulation des mastocytes) sont des mécanismes cellulaires extrêmement dynamiques, évoluant dans le temps et l'espace, et dont la régulation est extrêmement complexe. De ce fait, l'utilisation de techniques d'imagerie structurales sur échantillons fixés (telle que la TEM), bien que très résolutive, ne permettent malheureusement qu'une analyse figée d'un processus cellulaire qui normalement évolue dans le temps. Pour pallier à

cette contrainte technologique, nous avons récemment décrit une nouvelle approche utilisant la microscopie à fluorescence qui permet de visualiser, en temps réel et en trois dimensions (3-D), l'externalisation du contenu granulaire de mastocytes activés par différents récepteurs [26,27].

La matrice des granules de mastocytes est composée en partie de protéoglycans, principalement constitués d'héparine, formant un complexe macromoléculaire extrêmement anionique dans lequel sont empaquetés de nombreux composés bioactifs [28,29]. Lors du processus de dégranulation, les membranes des granules fusionnent ensemble et avec la membrane plasmique aboutissant à l'extériorisation du contenu granulaire dans l'environnement extracellulaire. L'utilisation d'avidine (une molécule cationique ayant une affinité particulière pour l'héparine [30]) couplée à un fluorochrome permet la détection immédiate du contenu granulaire de mastocytes extériorisé et la visualisation de leur caractéristiques physiques [26,27]. Cette technique peut être utilisée pour visualiser la dynamique de dégranulation de mastocytes aussi bien in vitro en microscopie confocale (Fig. 1B) [26,27], qu'in vivo en microscopie biphotonique intravitale (Fig. 1C) [26]. À ce jour, cette technique est la seule approche non génétique publiée permettant la visualisation « directe » du contenu granulaire extériorisé par des mastocytes in vivo en temps réel.

3. La régulation de la dynamique de dégranulation des mastocytes par les IgE ou la substance P

En utilisant la technique d'analyse de la dégranulation en temps réel (Fig. 1) sur des mastocytes humains primaires in vitro et du derme de souris in vivo, nous avons récemment mis en évidence que les mastocytes régulent de manière spécifique la dynamique d'exocytose de leur contenu granulaire, ainsi que les caractéristiques physiques des structures granulaires externalisées, en réponse à une activation par les IgE ou la SP [26]. Ainsi, l'activation des mastocytes par la SP, via son récepteur MRGPRX2, induit un flux calcique intracellulaire relativement bref, suivit de l'adressage rapide à la membrane plasmique de granules de petites tailles et sphériques. Ce mode de dégranulation aboutit au relargage rapide de ce qui s'apparente le plus au contenu de granules individuelles dans le milieu extracellulaire (avec très peu de fusion au préalable des granules sécrétoires entre elles dans le cytoplasme) (Fig. 2). La même dynamique de dégranulation est observée lorsque les mastocytes sont stimulés par d'autres GPCRs comme les récepteurs C3R, C5R ou ETA.

À l'inverse, l'activation des mastocytes par IgE/antigène, via le récepteur FcεRI, induit un flux calcique élevé et soutenu, suivit d'une période d'intense fusion intracellulaire de granules sécrétoires, aboutissant au relargage progressif de larges composés granulaires d'aspects hétérogènes dans le milieu extracellulaire (un phénomène classiquement appelé « compound exocytosis ») (Fig. 2). Le même mode de dégranulation est observé lorsque les mastocytes sont stimulés par des complexes immuns IgG/antigènes via les FcγR.

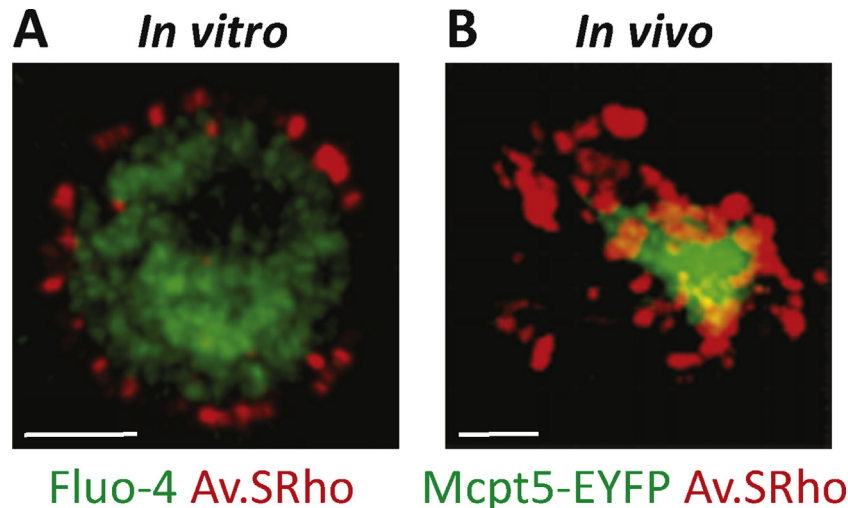


Fig. 1. Visualisation des structures granulaires externalisées grâce à l'avidine couplée à un fluorochrome. A. Photo représentative d'un mastocyte humain primaire sensibilisé avec des IgE humaines pendant 16 heures puis chargé avec une sonde calcique (Fluo-4, vert) et stimulé avec 2 $\mu\text{g/ml}$ d'anti-IgE pendant 30 minutes. L'avidine couplée à de la Sulforhodamine 101 (Av.SRho, rouge) a été ajoutée en solution juste avant la stimulation anti-IgE et la photo a été prise à l'aide d'un microscope confocal. B. Photo représentative d'un mastocyte du derme dans une souris Mcpt5-EYFP (dans laquelle les mastocytes de la peau et du péritoine expriment spécifiquement le fluorochrome EYFP, vert) préalablement sensibilisée avec un IgE anti-DNP-HSA, anesthésiée sous un microscope biphotonique et injectée de manière intrapéritonéale avec 500 μg de DNP-HSA. L'Av.SRho (rouge) a été injectée de manière intradermale 10 minutes avant l'injection de DNP-HSA. Ces photos sont extraites des travaux par Gaudenzio et al. [26]. Barres = 5 μm .

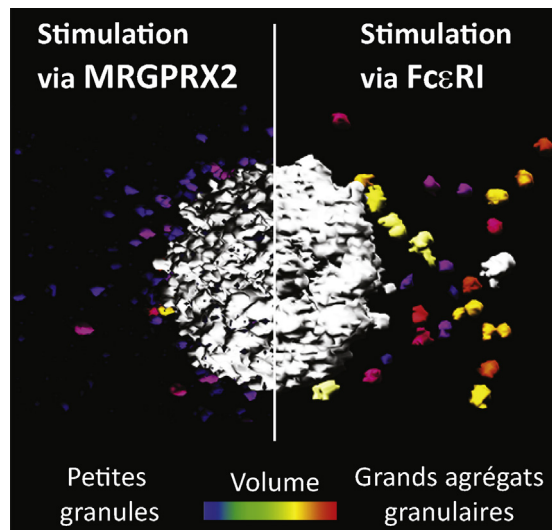


Fig. 2. Représentation graphique du volume des structures granulaires externalisées dans le cadre d'une stimulation des mastocytes via MRGPRX2 ou FcεRI. Représentation graphique réalisée à l'aide de vrais images prises en microscopie confocale 3-D de mastocytes primaires humains dégranulés dans du matrigel en présence d'Av.SRho (images sources extraites de Gaudenzio et al. [26]). La fluorescence de l'Av.SRho a été modélisée par informatique et les structures granulaires colorées informatiquement en fonction de leur volume relatif. Sur la gauche est représentée la moitié d'un mastocyte activé via MRGPRX2 et qui a externalisé un contenu granulaire relativement sphérique et de faible volume (coloration bleu à magenta). Sur la droite est représenté la moitié d'un mastocyte activé via FcεRI et qui a externalisé de larges agrégats granulaires de formes hétérogènes (coloration jaune à rouge).

Cette différence de stratégie de dégranulation peut s'expliquer, en partie, par le fait que l'activation des mastocytes via le récepteur FcεRI induit la phosphorylation de la kinase IKK- β qui elle-même permet l'assemblage de complexes contenant la protéine de la famille des « soluble

N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor » (SNARE) appelée « synaptosomal-associated protein-23 » (SNAP23) et la « syntaxin-4 » (STX4) qui régulent la fusion des granules sécrétoires entre elles dans le cytoplasme. L'utilisation d'un inhibiteur d'IKK- β lors de l'activation des mastocytes via FcεRI prévient la formation de complexes SNAP23/STX4 et reverse la stratégie de dégranulation vers celle classiquement observée lors d'une activation via MRGPRX2. Ces résultats ont élargi notre vision du phénomène de dégranulation des mastocytes en montrant qu'ils peuvent réguler différemment leur dynamique de dégranulation et l'aspect des contenus granulaires externalisés en fonction de la nature du signal activateur (par exemple IgE versus SP).

4. Les conséquences physiopathologiques de l'activation des mastocytes par FcεRI ou Mrgprb2

La régulation différentielle du processus de dégranulation des mastocytes a des conséquences fonctionnelles et physiopathologiques bien précises [26]. L'induction d'un modèle d'anaphylaxie cutanée ou systémique dépendante des mastocytes et du Mrgprb2, déclenchée par l'injection locale ou systémique de SP, provoque une réaction inflammatoire très rapide (maximale 5–10 minutes après l'injection et mimant la cinétique d'activation des mastocytes humains par MRGPRX2 observée *in vitro*), de faible intensité et se résolvant relativement rapidement (Fig. 3, courbe rose). À l'inverse, l'induction d'une réaction dépendante des mastocytes et du FcεRI, induite par l'injection d'un antigène dans des souris préalablement sensibilisées aux IgE spécifiques de cet antigène, déclenche une réaction inflammatoire progressive (maximale 30–40 minutes après l'injection et mimant la cinétique d'activation des mastocytes humains par FcεRI observée

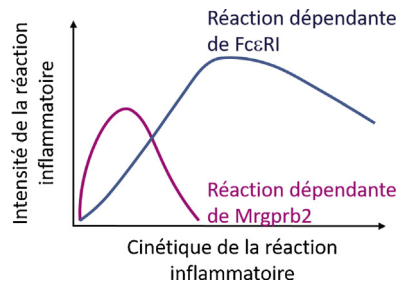


Fig. 3. Modélisation graphique de la durée et de l'intensité d'une réaction inflammatoire dépendante des mastocytes et de leur activation via FcεRI ou Mrpgrb2. Les courbes sont représentatives de données obtenues lors de l'étude de modèles d'anaphylaxie cutanée et systémique dépendantes de FcεRI ou Mrpgrb2 par Gaudenzio et al. [26]. Cette modélisation graphique est susceptible d'être modifiée dans le contexte de modèles différents de réactions inflammatoires dépendantes des mastocytes.

in vitro), de plus forte intensité et persistante dans le temps [26] (Fig. 3, courbe bleue).

Il a longtemps été assumé qu'une fois externalisés, les contenus granulaires des mastocytes (dont les composantes sont tenues ensemble par de puissantes interactions électrostatiques) se désintègrent rapidement en libérant toutes leurs molécules bioactives. De récentes évidences in vivo ont démontré que ce n'était pas le cas. Notamment, les travaux menés par Kunder et al. [31] ont révélé que les contenus granulaires externalisés en réponse à l'activation des mastocytes, non seulement conservent leur structure physique dans le milieu extracellulaire, mais aussi contiennent de puissantes cytokines immunomodulatrices, telle que le TNF-α, empaquetées dans la matrice granulaire. Il est présumé que ces contenus granulaires extracellulaires servent de « biodiffuseurs » pour relâcher progressivement des médiateurs bioactifs au site d'activation des mastocytes [31,32]. En effet, puisque les médiateurs solubles généralement diffusent rapidement ou sont dégradés dans le milieu extracellulaire, la rétention prolongée de ces molécules bioactives dans la matrice granulaire devrait théoriquement les protéger de la dégradation et étendre leur activité biologique [32]. De ce fait la réaction inflammatoire rapide et de faible intensité observée suite à l'activation des mastocytes via Mrpgrb2 pourrait être expliquée, en partie, par le fait que les contenus granulaires de petites tailles sécrétés lors d'une stimulation à la SP diffusent très rapidement dans le milieu extracellulaire pour une action rapide et localisée. Au contraire, les larges agrégats de contenus granulaires sécrétés lors d'une stimulation IgE/antigène mettraient plus de temps à diffuser et donc libèreraient des composés bioactifs pendant une période plus prolongée, favorisant ainsi la mise en place d'une réaction inflammatoire progressive et soutenue dans le temps.

Kunder et al. [31] ont aussi observé que les contenus granulaires des mastocytes circulent dans le système lymphatique jusqu'au ganglion lymphatique drainant, où les médiateurs bioactifs empaquetés dans la matrice granulaire, comme le TNF-α, peuvent favoriser le développement d'une réponse immunitaire adaptative. De manière intéressante, nous avons observé que seul les larges agrégats de contenus granulaires sécrétés dans le cadre d'une stimulation des mastocytes via FcεRI, étaient capable de circuler jusqu'au ganglion lymphatique drainant et

d'induire son hypertrophie. À l'inverse, les contenus granulaires de taille modeste, sécrétés dans le cadre d'une stimulation via MRGPRX2, ne sont pas retrouvés dans le ganglion drainant, probablement parce qu'ils se dissocient rapidement pendant leur voyage avant de l'atteindre. Ces données suggèrent que la régulation de la dynamique de dégranulation des mastocytes, ainsi que la taille des structures granulaires externalisées, peuvent jouer un rôle important dans la régulation de processus physiopathologiques.

5. Perspectives

Nous avons décrit que les mastocytes peuvent prendre la décision d'extérioriser des contenus granulaires de tailles différentes, avec une dynamique bien spécifique, en fonction de la nature du signal activateur. Il est intéressant de spéculer que ces différents programmes de dégranulation ont un rôle bien précis dans la physiologie. Nous pouvons penser qu'un moyen de diffuser rapidement des protéases au site de dégranulation (comme dans le cadre d'une stimulation via MRGPRX2) pourrait être impliqué dans la résistance au venin pour, par exemple, dégrader les composantes toxiques sans impact majeur sur le reste de l'organisme. Alors qu'un mode de dégranulation comme celui observé par la stimulation via FcεRI pourrait être présent pour permettre d'initier ou de relancer l'activation d'une réponse immunitaire adaptative (puisque dans ce contexte les larges agrégats de contenus granulaires externalisés circulent jusqu'au ganglion lymphatique drainant) en réponse à la pénétration d'un pathogène au sein de l'organisme. Finalement, il serait aussi intéressant de découvrir si ces diverses stratégies d'activation sont impliquées dans des processus pathologiques bien précis et mieux comprendre leur dynamique et mécanismes moléculaires nous permettra de pouvoir les appréhender de manière plus efficace.

Déclaration de liens d'intérêts

L'auteur déclare ne pas avoir de liens d'intérêts.

Remerciements

Nous remercions la Société française d'allergologie (SFA) pour son soutien à nos activités de recherche.

Références

- [1] Burgoyne RD, Morgan A. Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev* 2003;83(2):581–632.
- [2] Marichal T, et al. A beneficial role for immunoglobulin E in host defense against honeybee venom. *Immunity* 2013;39(5):963–75.
- [3] Metz M, et al. Mast cells can enhance resistance to snake and honeybee venoms. *Science* 2006;313(5786):526–30.
- [4] Schneider LA, et al. Molecular mechanism of mast cell mediated innate defense against endothelin and snake venom sarafotoxin. *J Exp Med* 2007;204(11):2629–39.
- [5] Abraham SN, StJohn AL. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat Rev Immunol* 2010;10(6):440–52.

- [6] Galli SJ, Tsai M. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med* 2012;18(5):693–704.
- [7] Mukai K, et al. Differences in the importance of mast cells, basophils IgE, and IgG versus that of CD4+ T cells and ILC2 cells in primary and secondary immunity to strongyloides venezuelensis. *Infect Immun* 2017; 85(5).
- [8] Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125(2):S73–80.
- [9] Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2005;6(2):135–42.
- [10] MacGlashan Jr DW. Self-termination/anergic mechanisms in human basophils and mast cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2009;150(2):109–21.
- [11] Blank U, et al. Vesicular trafficking and signaling for cytokine and chemokine secretion in mast cells. *Front Immunol* 2014;5:453.
- [12] Lorentz A, et al. The SNARE machinery in mast cell secretion. *Front Immunol* 2012;3:143.
- [13] Azouz NP, Hammel I, Sagi-Eisenberg R. Characterization of mast cell secretory granules and their cell biology. *DNA Cell Biol* 2014;33(10):647–51.
- [14] Gilfillan AM, Tkaczuk C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat Rev Immunol* 2006;6(3):218–30.
- [15] Kalesnikoff J, Galli SJ. New developments in mast cell biology. *Nat Immunol* 2008;9(11):1215–23.
- [16] Sibilano R, Frossi B, Pucillo CE. Mast cell activation: a complex interplay of positive and negative signaling pathways. *Eur J Immunol* 2014;44(9):2558–66.
- [17] Turner H, Kinet JP. Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI. *Nature* 1999;402:B24–30.
- [18] Wernersson S, Pejler G. Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nat Rev Immunol* 2014;14(7):478–94.
- [19] Bulfone-Paus S, et al. Positive and negative signals in mast cell activation. *Trends Immunol* 2017.
- [20] Schafer B, et al. Mast cell anaphylatoxin receptor expression can enhance IgE-dependent skin inflammation in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2012;131(2):m541–8.
- [21] Maurer M, et al. Mast cells promote homeostasis by limiting endothelin-1-induced toxicity. *Nature* 2004;432(7016):512–6.
- [22] McNeil BD, et al. Identification of a mast-cell-specific receptor crucial for pseudo-allergic drug reactions. *Nature* 2014;519(7542):237–41.
- [23] Subramanian H, et al. Mas-related gene X2 (MrgX2) is a novel G protein-coupled receptor for the antimicrobial peptide LL-37 in human mast cells: resistance to receptor phosphorylation, desensitization, and internalization. *J Biol Chem* 2011;286(52):44739–49.
- [24] Dvorak AM, et al. IgE-mediated anaphylactic degranulation of isolated human skin mast cells. *Blood* 1991;77(3):569–78.
- [25] Dvorak AM, et al. Immunoglobulin E-mediated degranulation of isolated human lung mast cells. *Lab Invest* 1985;53(1):45–56.
- [26] Gaudenzio N, et al. Different activation signals induce distinct mast cell degranulation strategies. *J Clin Invest* 2016;126(10):3981–98.
- [27] Joulia R, Gaudenzio N, et al. Mast cells form antibody-dependent degranulatory synapse for dedicated secretion and defence. *Nat Commun* 2015;6:6174.
- [28] Sali A, et al. Three-dimensional models of four mouse mast cell chymases. Identification of proteoglycan binding regions and protease-specific antigenic epitopes. *J Biol Chem* 1993;268(12):9023–34.
- [29] Stevens RL, et al. Identification of chondroitin sulfate E proteoglycans and heparin proteoglycans in the secretory granules of human lung mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(7):2284–7.
- [30] Tharp MD, et al. Conjugated avidin binds to mast-cell granules. *J Histochem Cytochem* 1985;33(1):27–32.
- [31] Kunder CA, et al. Mast cell-derived particles deliver peripheral signals to remote lymph nodes. *J Exp Med* 2009;206(11):2455–67.
- [32] St John AL, et al. Synthetic mast-cell granules as adjuvants to promote and polarize immunity in lymph nodes. *Nat Mater* 2012;11(3):250–7.