

TABLE DES MATIERES

()a INTRODUCTION.....	19
PREMIERE PARTIE : HISTORIQUE DE LA PROTEINE C-KIT.....	21
.I CONDITIONS DE LA DÉCOUVERTE.....	23
.A Rappels sur les proto-oncogènes et les oncogènes.....	23
.B Origines du proto-oncogène <i>c-kit</i>	24
.C Description des différentes étapes nécessaires à l'identification du ligand.....	25
.II CARACTÉRISTIQUES ET FONCTIONS DU COMPLEXE C-KIT/KIT-LIGAND (SCF).....	26
.A Mise en évidence de l'action du SCF (= MGF) sur les cellules souches hématopoïétiques.....	26
.B Etude des différentes cibles cellulaires du complexe <i>c-kit</i> /SCF.....	27
.1 Dans le système hématopoïétique.....	27
.2 Dans la gamétogenèse.....	29
.3 Dans la mélanogénèse.....	29
.III PRINCIPALES LOCALISATIONS (NORMALES OU TUMORALES) DU C-KIT.....	29
.A Expression du <i>c-kit</i> en fonction du stade physiologique	29
.B Expression du <i>c-kit</i> en fonction du statut immunologique cellulaire.....	30
.C Expression du SCF.....	30
.D Expression du <i>c-kit</i> en fonction du type tumoral.....	31
DEUXIEME PARTIE : STRUCTURES ET MODE D'ACTION DU C-KIT.....	33
.I STRUCTURES GÉNOMIQUES ET MOLÉCULAIRES DU RÉCEPTEUR C-KIT ET DE SON LIGAND.....	35
.A Gènes codant pour le <i>c-kit</i> et son ligand.....	35
.1 Etude du gène <i>c-kit</i>	35
.2 Etude du gène SCF.....	36
.B Etude du groupe des récepteurs tyrosine kinase (RTK).....	37
.C Structures moléculaires du <i>c-kit</i> et de son ligand.....	39
.1 Structure de la protéine <i>c-kit</i>	39
.2 Isoformes du récepteur <i>c-kit</i>	40
.3 Structure du ligand SCF.....	41
.II FONCTIONNEMENT NORMAL DU C-KIT ET DE SON LIGAND ET RÉGULATIONS.....	43
.A Interactions <i>c-kit</i> / ligand SCF.....	43
.1 La transphosphorylation.....	43
.2 Interactions avec les domaines SH2.....	44
.3 Intervention des protéines Ras.....	44
.4 Activation des MAP kinases.....	45
.B Régulations.....	46
.1 Régulation propre au gène	46
.2 Régulation du cycle cellulaire.....	46
.3 Régulation du <i>c-kit</i> par les cytokines.....	46
.a Expression génique.....	46
.b Régulation protidique.....	47
.4 Régulation du ligand SCF.....	47
.5 Conclusion.....	48
.III MÉTHODES DE DIAGNOSTIC : MISE EN ÉVIDENCE ET QUANTIFICATION DU C-KIT.....	48
.A Etude des gènes <i>c-kit</i> et du ligand SCF.....	48
.1 Amplification des gènes par PCR et RT-PCR.....	48
.2 Détection des fragments amplifiés.....	50
.B Etude des protéines <i>c-kit</i> et SCF.....	51
.1 Matériel.....	51
.2 Détection des protéines.....	51
TROISIÈME PARTIE : INTÉRÊTS DU C-KIT EN TANT QUE MARQUEUR TUMORAL.....	55
.I CONDITIONS D'EXPRESSION DU C-KIT EN PATHOLOGIE TUMORALE : LES DIFFÉRENTES MUTATIONS IDENTIFIÉES.....	57
.A Mutations homozygotes	57
.B Mutations hétérozygotes.....	57
.C Mutations connues du gène <i>c-kit</i> (locus W).....	57
.1 Chez la souris.....	58
.2 Chez le rat.....	59
.3 Chez l'homme.....	59
.D Mutations connues du gène SCF (locus Sl).....	60
.E Mutations « actives ».....	60
.1 Mutations « actives » dans le domaine kinase.....	60

.2 Mutations « actives » dans le domaine juxtamembranaire.....	61
.F Conséquences de ces mutations.....	62
.1 Action sur la dimérisation du récepteur c-kit.....	63
.2 Action sur l'internalisation (dégradation) du récepteur c-kit.....	63
.a Récepteurs c-kit FMA3.....	64
.b Récepteurs c-kit Val 814.....	64
.3 Action sur la croissance cellulaire.....	65
.4 Action sur la genèse tumorale.....	65
.5 Conclusion.....	65
.G Conséquences mécanistiques des mutations Gly 559 et Val 814.....	65
.H Mutation d'un gène codant pour le facteur de transcription MTF.....	66
.II ETUDE DE L'EXPRESSION DU C-KIT DANS DIFFÉRENTES TUMEURS.....	67
.A Etude chez l'homme.....	67
.1 Les mastocytoses.....	67
.a Expression de l'ARN c-kit en fonction du stade de mastocytose.....	67
.b Origine de l'excès du c-kit lors de mastocytose.....	67
.c Rôle de la forme soluble du SCF lors de mastocytose cutanée.....	68
.d Origines de ce dérèglement.....	68
.e Mutations identifiées lors de mastocytose.....	68
.2 Les tumeurs stromales digestives (GIST : GastroIntestinal Stromal Tumor).....	69
.a Etude des GIST.....	69
.b Diagnostic et pronostic.....	69
.c Corrélation entre le type de mutation et la valeur pronostic.....	70
.B Etude chez le chien.....	71
.1 Le mastocytome.....	71
.a Rappels sur le mastocytome.....	71
.b Relation expression du c-kit/grade du mastocytome.....	72
.c Pourquoi cette différence de distribution ?.....	72
.d Utilisation du c-kit pour le diagnostic tumoral.....	73
.e Etude de la duplication tandem du c-kit.....	73
.f Hypothèses sur le fonctionnement de cette duplication.....	74
.g Origine génétique de ces mutations ?.....	74
.h Rôle de la duplication tandem dans le diagnostic différentiel du mastocytome.....	75
.i Autres mutations actives retrouvées lors de mastocytomes canins.....	75
.2 Les tumeurs mammaires.....	76
.a Les différents types de tumeurs mammaires canines.....	76
.b Relation entre l'expression de c-kit et la malignité de la tumeur mammaire.....	76
.3 Autres tumeurs.....	76
.III LIMITES DE LA PROTÉINE C-KIT ET PERSPECTIVES THÉRAPEUTIQUES.....	77
.A Les limites.....	77
.B Utilisation des propriétés du c-kit à des fins thérapeutiques.....	77
.1 Découverte du STI 571.....	77
.2 Mode d'action du STI 571.....	78
.a Ses cibles cellulaires.....	78
.b Conséquences du STI 571.....	78
.3 Des inconnues dans le fonctionnement du STI 571.....	79
CONCLUSION.....	81
ANNEXES.....	85
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	88

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Amorces pour les gènes *c-kit* et *SCF*

Annexe 2 : Séquences nucléotidiques des régions des exons 11 et 12 des *c-kit* sauvage et de ceux issus des mastocytes tumoraux

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : STRUCTURES DES RÉCEPTEURS AUX FACTEURS DE CROISSANCE (MCCULLOCH AND MINDEN, 1993).....	24
FIGURE 2 : STRUCTURE DE L'ADNC DU GÈNE C-KIT (LONDON ET AL., 1999).....	36
FIGURE 3 : STRUCTURE DE L'ADNC DU GÈNE SCF (GALLI ET AL., 1994).....	37
FIGURE 4 : COMPARAISON DES GÈNES C-KIT ET C-FMS (CHU AND BESMER, 1995).....	38
FIGURE 5 : RÉCEPTEURS TYROSINE KINASES (RAISONNIER, 2002).....	39
FIGURE 6 : REPRÉSENTATION DE LA STRUCTURE DE LA PROTÉINE C-KIT (CHU AND BESMER, 1994).....	40
FIGURE 7 : ISOFORMES DU C-KIT D'APRÈS ASHMAN (1999).....	41
FIGURE 8 : DIFFÉRENTES ISOFORMES DE SCF D'APRÈS GALLI ET AL. (1994)	42
FIGURE 9 : DIFFÉRENTES FORMES DU SCF D'APRÈS ASHMAN (1999).....	43
FIGURE 10 : ACTIVITÉ TYROSINE KINASE (RAISONNIER, 2003).....	44
FIGURE 11 : ACTIVATION DES MAP KINASES (ALBERTS ET AL., 1994).....	45
FIGURE 12 : SCHÉMA D'AMPLIFICATION PAR PCR D'UN GÈNE DONNÉ (ALBERTS ET AL., 1994).....	49
FIGURE 13 : DÉTECTION DE MOLÉCULES D'ARN OU D'ADN SPÉCIFIQUES PAR HYBRIDATION APRÈS TRANSFERT DE GEL (ALBERTS ET AL., 1994).....	50
FIGURE 14 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES MUTATIONS C-KIT G559 ET C-KIT V814 (KITAYAMA ET AL., 1995).....	62
FIGURE 15 : MISE EN ÉVIDENCE DE LA TYROSINE-PHOSPHORYLATION EN FONCTION DES MUTATIONS DU C-KIT, PAR WESTERN BLOT (KITAYAMA ET AL., 1995).....	63
FIGURE 16 : MÉCANISME SUPPOSÉ D'ACTIVATION CONSTITUTIVE DU RÉCEPTEUR C-KIT D'APRÈS TSUJIMURA ET AL. (1997).....	64
FIGURE 17 : REPRÉSENTATION DES DUPLICATIONS TANDEM AU SEIN DES EXONS 11 ET 12 DES C-KIT ISSUS DE MASTOCYTES TUMORAUX (LONDON ET AL., 1999).....	73

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : MUTATIONS DU LOCUS W/GÈNE C-KIT D'APRÈS CHU AND BESMER (1995).....	58
TABLEAU 2 : MUTATIONS DU LOCUS SL /GÈNE SCF (COPELAND ET AL. 1990).....	60
TABLEAU 3: RÉCAPITULATIF DES MUTATIONS DU C-KIT IDENTIFIÉES DANS DIFFÉRENTES LIGNÉES CELLULAIRES DE MASTOCYTES, D'APRÈS GEGUERA ET AL. (2000).....	61
TABLEAU 4 : GRADING SIMPLIFIÉ ET HISTOPRONOSTIC DES MASTOCYTOMES CUTANÉS CANINS D'APRÈS PATNAÏK ET AL (1984).....	71
TABLEAU 5 : CLASSIFICATION HISTOLOGIQUE DE DIFFÉRENTES TUMEURS CANINES ET EXPRESSION DE C-KIT (KUBO ET AL., 1998).....	76

LISTE DES ABBREVIATIONS

A.A : acides aminés
Ac : anticorps
ADN : acide désoxyribonucléique
Arg : arginine
ARN : acide ribonucléique
Asp : asparagine
ATP : adénosine triphosphate
CSF-R : colony stimulating factor receptor
EGF-R : epidermal growth factor receptor
EPO : érythropoïétine
FU : fluorouracile
GIST : gastro-intestinal stromal tumor
Gln : glutamine
Gly : glycolle
GM-CSF : granulocyte macrophage-colony stimulating factor
G-CSF : granulocyte-colony stimulating factor
His : histidine
Ig : immunoglobuline
IL : interleukine
INF- γ : interferon factor
kD : kilo dalton
KL : kit ligand
Leu : leucine
MAP : mitogen activated protein
MGF : mast cell growth factor
MITF : mi transcription factor
MO : moelle osseuse
pb : paire de bases
PCR : polymerase chain reaction
PDGFR : platelet-derived growth factor
PM : poids moléculaire
Pro : proline
RTK : récepteur tyrosine kinase
RT-PCR : reverse-transcriptase polymerase chain reaction
SCF : stem cell factor
SH2 : src homology 2
Sl : steel
SMCD : systemic mast cell disease
SPF : start promoting factor
TGF- β : tumor growth factor
Thr : thréonine
TNF- α : tumor necrosis factor
Try : tryptophane
U.V : ultra-violet
Val : valine
W : white spotting

Rapport-Gratuit.com

0a INTRODUCTION

C-kit est-il un bon candidat de marqueur tumoral chez le chien ?

Un marqueur tumoral est une réelle aide pour le clinicien afin de diagnostiquer une pathologie tumorale ou un type tumoral lors des analyses histo-pathologiques. Il a aussi une vraie valeur pronostique et est indispensable au clinicien pour choisir l'option thérapeutique la mieux adaptée à chaque cas.

C-kit est responsable de la multiplication des cellules jeunes et a été mis en évidence dans les hémopathies comme les leucémies. Aussi il était nécessaire d'étudier son comportement lors de tumeurs solides. Découvert en 1986 par Besmer et al., le récepteur c-kit est principalement exprimé par les mastocytes et les cellules de la moelle osseuse. Son implication dans la survie cellulaire et surtout dans la multiplication cellulaire et son analogie avec les récepteurs à activité tyrosine kinase le rapprochent des récepteurs aux facteurs de croissance exprimés par les cellules épithéliales et les fibroblastes. La présence de mutations des gènes codants pour le récepteur c-kit et pour son ligand SCF a révélé leur implication dans la genèse tumorale. Deux types de mutations ont été étudiés :

- celles ayant un rapport direct avec les rôles du récepteur c-kit et de son ligand dans l'organisme, à savoir leurs effets sur l'hématopoïèse, la mélanogenèse, et la gamétogenèse.
- celles générant une activation autonome et constitutive du récepteur sans influence du SCF qui sont retrouvées dans des tumeurs spécifiques impliquant les mastocytes et d'autres cellules exprimant le c-kit : mastocytoses, GIST chez l'homme et mastocytomes, tumeurs mammaires chez le chien.

Aussi, la perspective d'un nouveau marqueur tumoral chez le chien a motivé mes recherches pour ce sujet. Dans une première partie, il était donc nécessaire de se renseigner sur les conditions de découverte de ce récepteur c-kit et sur ses rôles dans la biologie de l'organisme. Pour pouvoir l'identifier et le doser afin de l'utiliser de manière fiable et reproductible, il a fallu dans la deuxième partie étudier son génome et sa structure protéique. Ceci nous a permis de répertorier ses caractéristiques biochimiques et biologiques, son mode d'action et les conséquences de son activité tyrosine kinase.

La troisième partie concernant son rôle dans le développement de certaines tumeurs a demandé un travail de recherche sur le type des tumeurs impliquées et sur les mécanismes conduisant à un détournement de son rôle originel. Ceci a débouché sur de nouvelles thérapeutiques utilisant un inhibiteur spécifique de l'activité tyrosine kinase de c-kit.

PREMIERE PARTIE : HISTORIQUE DE LA PROTEINE C-KIT

PREMIÈRE PARTIE : HISTORIQUE DE LA PROTÉINE C-KIT

.I Conditions de la découverte

.A Rappels sur les proto-oncogènes et les oncogènes

Les proto-oncogènes et les oncogènes viraux sont des gènes qui sont transcrits pour produire des facteurs protidiques intervenant dans la transduction des signaux. Certains oncogènes correspondent à des facteurs intermédiaires du mécanisme de transduction du signal : récepteurs (*erb-B1*, *erb-B2*, *fms*, *kit*), protéines G (*ras*), tyrosine kinases (*src*), récepteurs nucléaires ou facteurs de transcription (*erb-A*, *fos*, *jun*, *myb*, *myc*, *ski*). Leur intervention modifie le signal normalement exprimé par les cellules, notamment en codant pour des formes oncogéniques peu régulables des molécules impliquées dans la signalisation cellulaire. Par exemple, *v-erb* code pour le récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) et *v-fms* code pour un récepteur au facteur de croissance de colonies (CSF-R). Les oncogènes existent sous deux formes : les proto-oncogènes ou oncogènes cellulaires (c-oncogènes) qui sont présents dans le génome des eucaryotes et les oncogènes viraux (v-oncogènes) qui sont inclus dans l'acide nucléique d'un virus. Les virus semblent capables de transposer les v-oncogènes dans les cellules des eucaryotes où ils peuvent s'implanter et devenir c-oncogènes transmis dans le patrimoine génétique des espèces infectées par ces virus. Ces proto-oncogènes peuvent subir des mutations, soit dans une des cellules, soit dans un virus qui transmet alors un oncogène muté, et cette mutation peut être la cause d'une transformation cellulaire (Raisonnier, 2003).

L'analyse des séquences de nucléotides révèle des différences structurales entre les oncogènes et leur proto-oncogène : les protéines *v-erb B* et *v-kit* sont dépourvues du domaine de fixation extracellulaire du récepteur par rapport aux proto-oncogènes, ce qui empêche toute régulation de l'activité tyrosine kinase du récepteur ; *v-fms* diffère du *c-fms* par 9 acides aminés substitués et par une structure COOH-terminale. Ces altérations structurales des oncogènes permet l'activation constitutive de la fonction tyrosine kinase et cela peut amener à la transformation cellulaire et donc à un développement néoplasique.

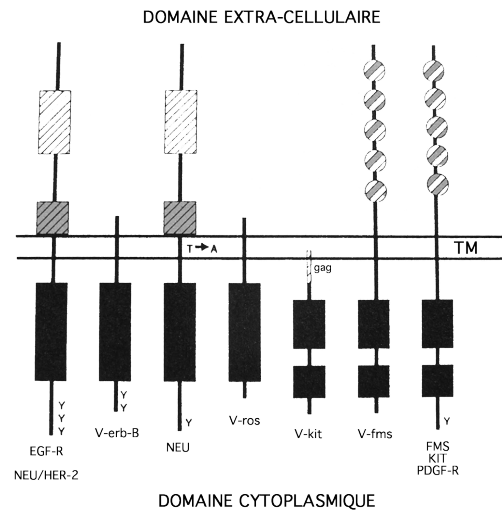


Figure 1 : Structures des récepteurs aux facteurs de croissance (McCulloch and Minden, 1993)

.B Origines du proto-oncogène c-kit

L'homologie de la protéine c-kit à la souche Harvey-Zuckerman 4 du virus du sarcome félin (HZ4-FeSV) a permis les premières isolations de cet oncogène (Galli et al.,1994 ; Chu and Besmer,1995 ; Ashman,1999). Puis le gène a été identifié par P. Besmer et M.D Minden (McCulloch and Minden, 1993). L'oncogène *v-kit* est responsable de la transformation de l'activité du rétrovirus félin et engendre un fibrosarcome multicentrique plus ou moins associé à une leucémie chez le chat. Par clonage de l'ADN, le proto-oncogène *c-kit* s'est révélé être un homologue de l'oncogène *v-kit*. Le clonage des séquences virales a permis d'identifier un gène qui est conservé chez l'homme et chez la souris, et qui s'exprime fortement dans le placenta et le cerveau. L'ADN génomique des *v-* et *c-kit* mesure 5098 paires de bases (5,1 kpb) (Ashman, 1999).

Après séquençages et marquages immunochimiques, l'ADN codant pour les gènes *v-* et *c-kit* s'est révélé être un homologue de l'ADN des récepteurs aux facteurs de croissance. Ils font partie de la famille des récepteurs transmembranaires à activité tyrosine-kinase comme les récepteurs *fms*, *PDGF-R α* et β .

Le gène *c-kit* ayant une structure similaire aux gènes codant pour les récepteurs de facteurs de croissance, il apparaissait logique de rechercher un ligand à ce récepteur.

Aussi, quatre équipes ont entrepris des recherches en employant deux stratégies différentes pour identifier le "kit-ligand" :

⇒ La première équipe a utilisé une stratégie moléculaire basée sur l'affinité du récepteur c-kit et de son ligand pour isoler cette protéine puis pour cloner le gène codant pour celle-ci.

⇒ Les trois autres équipes ont utilisé une approche biologique pour identifier le ligand du récepteur c-kit en se basant sur une des fonctions de celui-ci. Ils ont identifié des molécules en

culture cellulaire capables d'encourager la prolifération des mastocytes de la moelle osseuse, et ont purifié ces protéines biologiquement actives. En utilisant cette approche, les équipes ont isolé l'ADN codant pour une protéine qui stimule la croissance des mastocytes chez les animaux normaux mais pas chez les animaux présentant des mutations du gène *c-kit*, ce qui appuie l'hypothèse que cette protéine est le ligand de la protéine kit. Ces études ont alors permis de nommer ce ligand différemment : kit ligand (KL) ou facteur de croissance des mastocytes (MGF=mast cell growth factor) ou encore facteur des cellules souches (SCF=stem cell factor). Le gène *Steel* (*Sl*) code pour ce ligand (McCulloch and Minden 1993).

.C Description des différentes étapes nécessaires à l'identification du ligand

En se basant sur l'activité du *c-kit*, c'est-à-dire sa capacité à stimuler la lignée mastocytaire, Williams et al. (1990) ont utilisé plusieurs lignées de mastocytes pour étudier la bioactivité du complexe *c-kit*/ligand. En effet, un facteur de croissance de la lignée cellulaire des mastocytes (appelé MGF) a été détecté dans les surnageants de cultures de cellules stromales normales. Ils ont vérifié que cette activité n'était pas due à d'autres facteurs tels que l'IL-1, l'IL-7, l'IL-9 ou encore les CSFs (Colony-Stimulating Factors). De plus, aucune activité de stimulation des mastocytes n'a pu être détectée dans les surnageants issus de cellules stromales mutées (*Sl/Sl^d*). Aussi pour étudier cette hypothèse, Williams et al. (1990) ont testé la capacité de cellules IL-3-dépendantes (3 lignées mastocytaires H7, MC-6, FDC-P2-1D et 3 autres lignées cellulaires comme 32D, DA-1 et FDC-P2) à proliférer en présence de ce facteur partiellement purifié. Seules les cellules mastocytaires ont proliféré alors que les cellules FDC-P2, 32D et DA-1 n'ont pas répondu à cette stimulation. Seules les cellules qui ont proliféré expriment de façon importante l'ARNm codant pour le *c-kit*.

Après purification de ce facteur des milieux de conditionnement des cellules stromales normales par un fractionnement par 6 chromatographies : S-Sepharose, DEAE-Sepharcel, Phenyl-Sepharose+YM 10, matrice blue gel A, HPLC reverse sur une colonne Vydal C4 et HPLC reverse sur une colonne de butyl aquapore, deux protéines ont été obtenues, une de 31 kD et une 36 kD. La première a été isolée après une électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS et révélée par un colorant argentifère. La deuxième a été révélée par auto-radiographie. Afin de vérifier que ces protéines correspondent bien au MGF, elles ont été marquées avec de l'iode radioactif ¹²⁵I et elles ont été mises en présence de cellules sensibles (prolifératives) les MC-6, et de cellules insensibles (non prolifératives) les 32D. Les résultats montrent que la protéine de 31 kD comme la protéine de 36 kD se fixent spécifiquement aux cellules MC-6 et ne se fixent pas aux cellules 32D. Ces deux protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de polyvinylidène (PVDF) pour les séquencer et celles-ci ont une séquence N-

terminale en acides aminés identiques, la différence de poids moléculaire (PM) provenant d'une glycosylation supplémentaire.

Pour identifier ce facteur MGF comme le ligand spécifique de récepteur c-kit, du MGF marqué radio activement (^{125}I) est ajouté aux extraits cellulaires MC-6 et 32-D en présence ou non d'un excès de MGF non marqué (froid), puis a été ajouté un antisérum polyclonal qui reconnaît la portion C-terminale du c-kit. En absence de MGF non marqué, des complexes immuns radioactifs de taille approximative de 175-180 kD ont été obtenus à partir des préparations membranaires des cellules MC-6. Aucun complexe n'a été obtenu à partir des cellules 32-D. En soustrayant le PM de la protéine c-kit (145 kD) à celui du complexe, on déduit que le ligand a un PM de 30-35 kD compatible de celui du MGF. De plus, en présence d'un excès de MGF froid la radioactivité associée à la formation des complexes immuns devient négligeable : il y a donc eu compétition sur la protéine c-kit entre MFG* et MGF froid en excès. Aussi, toutes ces études ont permis de montrer que le facteur MGF est le ligand du récepteur c-kit.

.II Caractéristiques et fonctions du complexe c-kit/kit-ligand (SCF)

.A Mise en évidence de l'action du SCF (= MGF) sur les cellules souches hématopoïétiques

Des facteurs de croissance hématopoïétiques sont connus pour stimuler la moelle osseuse comme le facteur de croissance des granulocytes (G-CSF), le facteur de croissance des granulocytes-macrophages (GM-CSF), le facteur de croissance 1 (CSF-1), l'IL-3 et le multi-CSF (multi Colony-Stimulating Factor) et les cellules cibles prolifèrent rapidement.

Les cellules souches hématopoïétiques, pluripotentes assurent un repeuplement cellulaire à long terme, elles sont dites quiescentes car elles se renouvellent lentement. Aussi pour étudier ces cellules souches qui représentent moins de 0,1 % des cellules totales de la moelle, des enrichissements cellulaires *in vivo* et *in vitro* sont nécessaires. Zsebo et al. (1990) ont identifié un nouveau facteur de croissance des précurseurs primaires de l'hématopoïèse, après l'avoir isolé du milieu de culture des cellules de foie de Rat Buffalo (cellules BRL-3A). L'administration *in vivo* de 5-fluorouracile (5-FU, molécule cytotoxique) à des souris détruit rapidement les précurseurs hématopoïétiques à prolifération rapide mais épargne les cellules souches primaires les plus quiescentes. Deux jours après l'administration de 5-FU, les facteurs de croissance GM-CSF, G-CSF et IL-3 ne parviennent pas à stimuler la prolifération de leur population cellulaire cible. Au contraire, les cibles cellulaires du facteur SCF (= MGF) ne sont pas détruites par le traitement au 5-FU. De plus, la lignée mastocytaire murine MC-9 prolifère en présence du facteur issu du milieu de culture des cellules BRL-3A. En outre, il a

été vérifié que les cellules BRL-3A ne sécrètent ni IL-1, 2, 3, 5, 6 ni de GM-CSF ou de G-CSF (Zsebo et al., 1990).

.B Etude des différentes cibles cellulaires du complexe c-kit/SCF

Les caractéristiques du complexe c-kit/SCF ont été déduites des conséquences qu'ont les mutations sur les gènes respectifs du *c-kit* et du *SCF* : en effet, les souris déficientes en *c-kit* ou en *SCF* ont des caractéristiques phénotypiques très similaires c'est-à-dire une altération de l'hématopoïèse, de la gamétogenèse et de la mélanogénèse.

.1 Dans le système hématopoïétique

Les mutations de *c-kit* affectent les lignées érythrocytaire et mastocytaire ainsi que leurs cellules souches.

- Dans la survie des cellules de l'érythropoïèse, le complexe c-kit/SCF joue un rôle essentiel qui est démontré par la survenue d'une anémie lors de mutations. Pour étudier les effets du SCF purifié sur les cellules de la moelle osseuse (MO), des expériences avec de la MO totale, de la MO dépourvue de cellules myéloïdes et de cellules lymphoïdes matures (MO de lignée négative) et de la MO de souris traitée au 5-FU ont été réalisées. Le SCF seul est capable de stimuler la formation de colonies granulocytaires, monocytaires et mégacaryocytaires issues de MO totale. En revanche le SCF seul a peu d'effet sur la MO négative et il agit en synergie avec l'IL-6. Ceci montre que le SCF n'agit pas directement sur les cellules cibles. L'augmentation du nombre de colonies et de leur taille est due à la combinaison de l'action du SCF et d'autres facteurs de croissance, le SCF semblant rendre les cellules cibles plus sensibles aux autres facteurs de croissance.

Le SCF stimule la formation de colonies de MO traitée au 5-FU et agit en synergie avec l'IL-6 et l'IL-1 β . En effet, seules les cellules capables de repeuplement à long terme (cibles du SCF) sont présentes dans la MO après traitement au 5-FU alors que les cellules à prolifération rapide sont absentes (celles-ci sont les cibles des facteurs de stimulation de type CSF). Aussi, l'IL-6, l'IL-1 β et l'IL-3 seules ne peuvent pas stimuler la formation de colonies après traitement de la MO. **Le SCF a donc une action ciblée sur les jeunes précurseurs hématopoïétiques** (Zsebo et al., 1990).

En effet, le SCF agit à différents niveaux de la hiérarchie de l'hématopoïèse pour promouvoir la survie, la croissance, la prolifération de plusieurs lignées cellulaires. La sensibilité accrue aux radiations des souris mutées sur *c-kit* montre un rôle du complexe c-kit/SCF dans la dynamique des cellules souches (Huang et al, 1990). En se fixant au c-kit, le SCF agit comme un facteur de survie pour les cellules primitives de l'hématopoïèse mais il ne sert pas à leur propre renouvellement, de plus il ne contribue pas à la survie des cellules différenciées car ces

cellules matures fonctionnelles (ex. granulocytes, macrophages) n'expriment pas la protéine c-kit. Le SCF agit en synergie avec l'érythropoïétine (EPO) pour induire la formation de colonies érythroïdes. Le SCF agit aussi avec le GM-CSF pour induire le développement des neutrophiles. Le complexe SCF/c-kit agit sur les mégacaryocytes en augmentant leur prolifération, cependant en combinant son action avec celle d'autres facteurs de croissance hématopoïétiques comme l'IL-3, l'EPO et le GM-CSF, une forte augmentation du nombre et de la taille des colonies myéloïdes est observée (Avraham et al., 1992). Le SCF stimule la croissance des blastes immatures et agit en association avec l'IL-3, l'IL-1 et l'IL-6 pour activer la survie et la prolifération de cellules hautement prolifératives (McCulloch and Minden, 1993 ; Galli et al., 1994 ; Ashman, 1999).

Le SCF apparaît alors comme un facteur primaire de survie et/ ou de prolifération pour les lignées érythroïde, myéloïde et lymphoïde plus qu'un facteur de différenciation ou de maturation.

- Un rôle essentiel du complexe c-kit/SCF dans la prolifération, la différenciation et/ ou la survie des mastocytes a aussi été mis en évidence. En effet, les animaux mutants sont déficitaires en mastocytes. *In vitro*, les BMMC (Bone Marrow Mast Cells) nécessitent de l'IL-3 et les CTMC (Connective Tissue Mast Cells) isolés de la cavité péritonéale nécessitent l'IL-3 et l'IL-4 pour leur prolifération. Les BMMC et les CTMC peuvent être maintenues en co-culture avec les fibroblastes (lignée 3T3) en absence d'IL-3. Ceci montre donc que le complexe a une fonction dans la survie et la prolifération des mastocytes matures indépendamment de l'IL-3 et l'IL-4 et que le ligand du récepteur c-kit est produit par les fibroblastes (Huang et al., 1990). Le SCF agit seul pour induire le développement des mastocytes à partir des cellules hématopoïétiques immatures dans le sang, la moelle osseuse ou encore le foie fœtal. Cependant il agit en synergie avec l'IL-6 pour promouvoir la croissance des mastocytes et avec d'autres facteurs de croissance comme l'IL-3 pour promouvoir la prolifération des mastocytes immatures et l'IL-4 pour aider à la maturation des mastocytes. Le SCF permet ainsi la différenciation et la maturation des mastocytes mais les caractéristiques phénotypiques de ces cellules sont régulées par une interaction complexe entre le SCF et les autres cytokines (McCulloch and Minden, 1993 ; Galli et al., 1994). Meiningner et al. (1992) ont montré que le SCF agit aussi directement sur le fonctionnement des mastocytes en tant que facteur de chimiotactisme. L'interaction SCF/c-kit est indispensable à la migration des cellules embryonnaires. En effet, l'adhésion et la migration sont importantes pour déterminer la localisation cellulaire dans le tissu adapté et cela facilite l'action juxtacrine des facteurs de croissance. Comme pour les mastocytes, le SCF est un

agent chimiotactique pour les différentes lignées cellulaires souches. Premièrement, la forme membranaire du SCF fixée à la cellule hématopoïétique génère l'adhésion des cellules et secondairement, un signal venant du complexe c-kit semble augmenter l'attraction des mastocytes et des cellules souches aux fibroblastes. Bien que le mécanisme ne soit pas encore compris, le SCF est un réel agent de mobilisation des cellules hématopoïétiques allant de la moelle osseuse vers le sang périphérique (Ashman, 1999). Cette mobilisation est accompagnée d'une régulation du c-kit.

.2 Dans la gamétogenèse

Les mutations affectent la prolifération et la survie des cellules germinales primordiales et leur migration de la splanchnopleure de l'œuf (embryon) vers les crêtes génitales durant le développement précoce. Il influence la survie et la prolifération des cellules germinales primitives (McCulloch and Minden, 1993).

.3 Dans la mélanogénèse

Le complexe agit probablement sur la prolifération et la migration des mélanoblastes de la crête neurale jusqu'à la périphérie lors du développement précoce aussi bien que pour les mélanocytes matures. Le SCF agit en tant que facteur de survie et de prolifération pour les mélanocytes. Il agit aussi en stimulant la production de mélanine par les mélanocytes (McCulloch and Minden, 1993).

.III Principales localisations (normales ou tumorales) du c-kit

Il est important de préciser que la protéine c-kit est retrouvée chez toutes les espèces animales dans lesquelles elle a été recherchée : souris, rat, porc, chien, chat et aussi chez l'homme.

Le modèle d'expression du c-kit et de son ligand pendant le développement embryonnaire supporte l'hypothèse que ces gènes sont impliqués dans la régulation de la migration et de la distribution spatiale des cellules des lignées hématopoïétique, pigmentaire et germinale aussi bien que dans la prolifération, la différenciation et la maturation de ces cellules à leur site définitif de développement embryonnaire.

.A Expression du c-kit en fonction du stade physiologique

La protéine c-kit est exprimée dans certaines structures uniquement pendant leur développement comme le placenta, le septum du cœur, les reins, le tube neural, le foie, les poumons. Le c-kit et son ligand sont aussi exprimés dans le cerveau en cours de développement ainsi qu'à l'état adulte et son expression est la plus élevée dans le cervelet.

En ce qui concerne les cellules germinales, leur survie est dépendante de la forme liée du

SCF. Pendant le développement embryonnaire des gonades, un gradient d'expression du SCF est mis en évidence le long de la crête germinale où il agit comme un facteur chimiotactique pour conduire les cellules germinales à leur site final de développement : les gonades. Lors de la gamétogenèse post-natale, l'expression du *c-kit* a été détectée dans les oocytes matures et immatures et dans les spermatogonies A et B aussi bien que dans le tissu interstitiel. Le SCF est aussi présent dans les cellules de la granulosa.

Au niveau de la peau, il existe aussi un gradient du SCF de la crête neurale à l'épiderme qui permet la migration des mélanoblastes et qui joue donc un rôle dans le développement de la pigmentation. Pendant l'embryogenèse, l'expression du *c-kit* dans la peau semble confinée aux mélanoblastes et aux mastocytes et elle persiste dans les mélanocytes pendant leur prolifération et leur différenciation. Certains kératinocytes semblent aussi exprimer le SCF.

Au stade adulte, le récepteur *c-kit* est exprimé normalement uniquement par les mastocytes donc on le retrouve dans les tissus sains où il y a des mastocytes (derme, tractus respiratoire, gastro-intestinal et urinaire), les mélanocytes ainsi que par les cellules épithéliales glandulaires mammaires, les cellules de la glande parotide, des glandes oesophagiennes et des glandes sudoripares.

En conclusion, l'analyse de la distribution du *c-kit* dans les cellules hématopoïétiques indique que le niveau du *c-kit* est plus élevé pendant les stades précoces du développement et diminue progressivement en parallèle à la maturation des différentes lignées hématopoïétiques.

Les mastocytes représentent une exception, les mastocytes matures expriment le *c-kit* et répondent au SCF (Galli et al., 1994).

.B Expression du c-kit en fonction du statut immunologique cellulaire

Les mastocytes sont issus de la multiplication d'une cellule souche hématopoïétique (cellule CD34⁺). Le *c-kit* est exprimé par environ 70% des cellules CD34⁺ de la moelle osseuse incluant les cellules souches et les cellules de la lignée hématopoïétique, chez l'homme.

Les mégacaryocytes sont aussi *c-kit*⁺ mais il existe peu de cellules mononucléées de la MO qui co-expriment le *c-kit* avec les marqueurs lymphoïdes. En effet, le récepteur *c-kit* est exprimé par les cellules souches hématopoïétiques, les cellules myéloïdes immatures, les précurseurs myéloïdes et lymphoïdes et les lignées cellulaires germinales ainsi que par les mastocytes mais pas par les basophiles matures (Ashman, 1999 ; McCulloch and Minden, 1993).

.C Expression du SCF

Le SCF existe sous forme soluble (libre) et sous forme membranaire, et ceci est le résultat

d'un épissage et d'un clivage protéolytique différentiels. Les formes soluble et membranaire du SCF sont en plus ou moins grande quantité en fonction des tissus et elles ont différents effets sur la survie et la prolifération des cellules de la lignée hématopoïétique. Des expériences en culture cellulaire ont permis de montrer que les cellules stromales hématopoïétiques et les fibroblastes embryonnaires et ceux du tissu conjonctif produisent le SCF. La connaissance des types cellulaires produisant le SCF a permis d'évaluer les fonctions du c-kit dans le système digestif, le système nerveux, le placenta et dans certaines structures crânio-faciales (Huang et al., 1990).

.D Expression du c-kit en fonction du type tumoral

On retrouve aussi la protéine c-kit dans des tissus tumoraux à des concentrations augmentées (ou diminuées) par rapport au seuil normal et surtout dans des formes mutées. Sa présence conduit à suspecter un rôle étiologique dans les phénomènes néoplasiques. La protéine c-kit est retrouvée lors de leucémies myéloïdes, lymphoblastiques aiguës, myéloblastiques aiguës, et aussi lors de mastocytoses et mastocytomes. Elle est présente aussi lors de mélanomes, de tumeurs des gonades comme les adénomes tubulaires des ovaires, les tumeurs de la granulosa, les séminomes, lors de tumeurs cérébrales (glioblastomes, astrocytomes, neuroblastes), lors de tumeurs pulmonaires (carcinome des petites cellules pulmonaires (56 %), carcinome des grandes cellules pulmonaires (75 %), carcinome des cellules squameuses (30 %) et adénocarcinome (11%)), lors de tumeurs mammaires (adénocarcinomes) et de tumeurs gastro-intestinales (Galli et al., 1994).

Il apparaît important d'étudier la forme d'expression du récepteur c-kit et de son ligand dans différents types tumoraux afin d'établir si possible des corrélations entre le taux de c-kit et le degré tumoral (grading) ou entre une mutation donnée du c-kit et le type tumoral. Cela sera traité dans la troisième partie de cette étude, mais auparavant il est nécessaire de connaître la structure du récepteur et de son ligand afin de comprendre leur mode d'action.

DEUXIEME PARTIE : STRUCTURES ET MODE D’ACTION DU C-KIT

DEUXIÈME PARTIE : STRUCTURES ET MODE D'ACTION DU GÈNE C-KIT

.I Structures génomiques et moléculaires du récepteur c-kit et de son ligand

.A Gènes codant pour le *c-kit* et son ligand

Les fonctions du c-kit ont été mises en évidence grâce à l'analyse du phénotype des souris ayant des mutations des gènes du locus W et/ou du locus Sl. En effet, ces souris ont des phénotypes très proches caractérisés par des altérations de la couleur du pelage (White Spotting), des anémies, des déficits en mastocytes et des problèmes de fertilité. De nombreuses études ont alors permis de montrer que les gènes W et Sl codent pour un couple ligand-récepteur et grâce à celles-ci les gènes codant pour le *c-kit* et son ligand ont pu être localisés (Galli et al., 1994 ; Chu and Besmer, 1995 ; Ashman, 1999).

.1 Etude du gène *c-kit*

Le gène *c-kit* est situé sur le chromosome 4 de l'homme et sur le chromosome 5 de la souris et plus précisément au niveau du locus W (White Spotting) où des mutations ont été identifiées.

Le proto-oncogène *c-kit* code pour un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase.

Le gène *c-kit* est constitué de 21 exons mesurant entre 80 et 100 kilo bases (kb). Les 19 exons internes codent pour de petites séquences de 90 à 300 paires de bases (pb) tandis que l'exon 1 est constitué de 58 pb de séquence non codante et de 67 pb de séquence codante et le dernier exon est lui-même constitué de 129 pb de séquence codante et de 2147 pb de séquence non codante. Chaque exon interne code pour une sous-unité importante de la structure protéique (figure 2).

L'exon 1 contient l'extrémité 5' non codante et code pour le codon d'initiation à la traduction ATG et pour le signal peptide (SP). Les exons 2 à 9 codent pour le reste du domaine extracellulaire du domaine de fixation au ligand ; les 5 domaines Ig-like (I, II, III, IV et V). L'exon 10 code pour le domaine transmembranaire (TM) hydrophobe et les exons 11 à 20 codent pour le domaine tyrosine kinase (Tk) intracellulaire de la protéine. La séquence codant pour la région de fixation à l'ATP dans le domaine kinase est située dans l'exon 12. Le segment d'insertion de la kinase (KI) est contenu au sein des exons 14 et 15 et sépare le domaine kinase en 2 : Tk1 et Tk2. L'exon 21 code pour le codon stop de la traduction (TGA) et contient l'extrémité 3' non codante de 2,3 kb et le site de polyadénylation (McCulloch and Minden, 1993 ; Galli et al., 1994 ; Chu and Besmer, 1995). La figure 1 montre aussi que le gène *v-kit* est un oncogène tronqué ayant perdu les premiers exons.

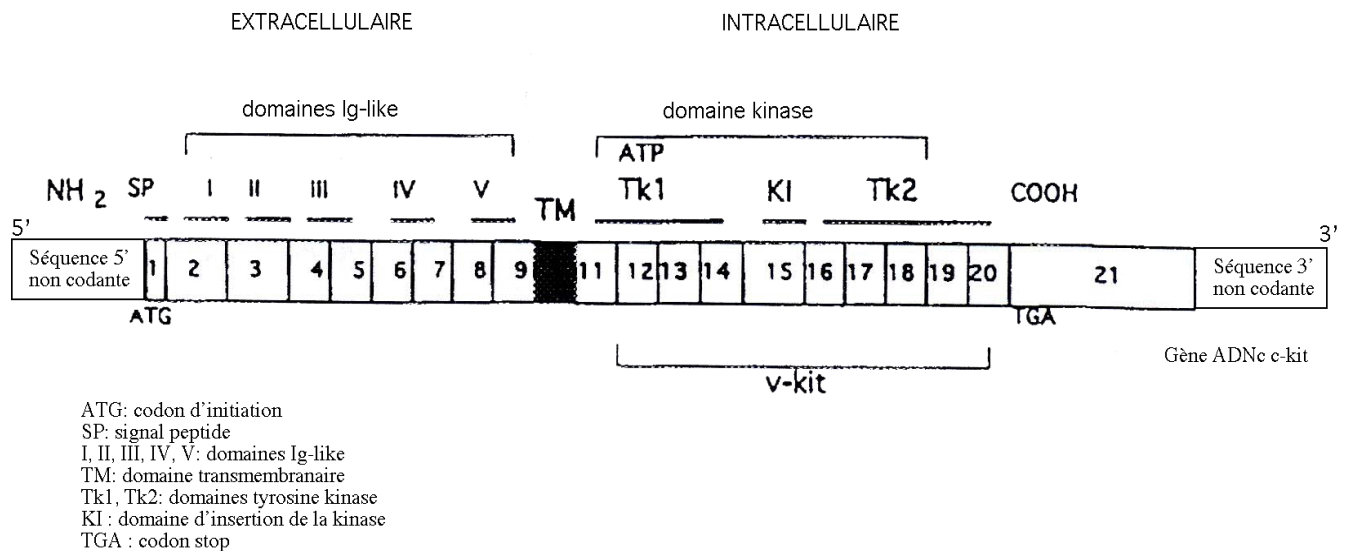


Figure 2 : Structure de l'ADNc du gène *c-kit* (London et al., 1999)

.2 Etude du gène *SCF*

Le gène codant pour le ligand SCF est situé sur le chromosome 10 de la souris au niveau du locus Sl (Steel) et sur le chromosome 12 de l'homme. Chez ces deux espèces, le gène *SCF* est constitué d'au moins 8 exons mesurant entre 51 et 183 pb. Même si la localisation du site d'initiation à la traduction, le promoteur et la structure détaillée intron/exon du gène *SCF* n'est pas totalement connue, la localisation des introns de la région codante du *SCF* est conservée chez le rat, la souris et l'homme. L'exon 1 de l'ADNc du gène *SCF* code pour plus de 198 pb de la séquence 5' non traduite et pour les 5 premiers acides aminés du signal peptide (SP) constitué de 25 A.A au total avec le codon d'initiation à la traduction : ATG. Les exons 2 à 7 codent pour des parties du domaine extracellulaire du ligand et l'exon 7 code en plus pour le domaine transmembranaire (TM). L'exon 8 code pour 35/36 acides aminés du domaine cytoplasmique, pour le codon stop (TGA) et pour une partie ou la totalité de la très longue région non traduite à l'extrémité 3' (4 kb). Il existe deux formes du SCF transcrit selon qu'il possède ou non un site de clivage dans l'exon 6 permettant un épissage alternatif, à l'origine des formes libre et membranaire (Anderson et al., 1990 ; McCulloch and Minden, 1993 ; Galli et al., 1994). (figure 3)

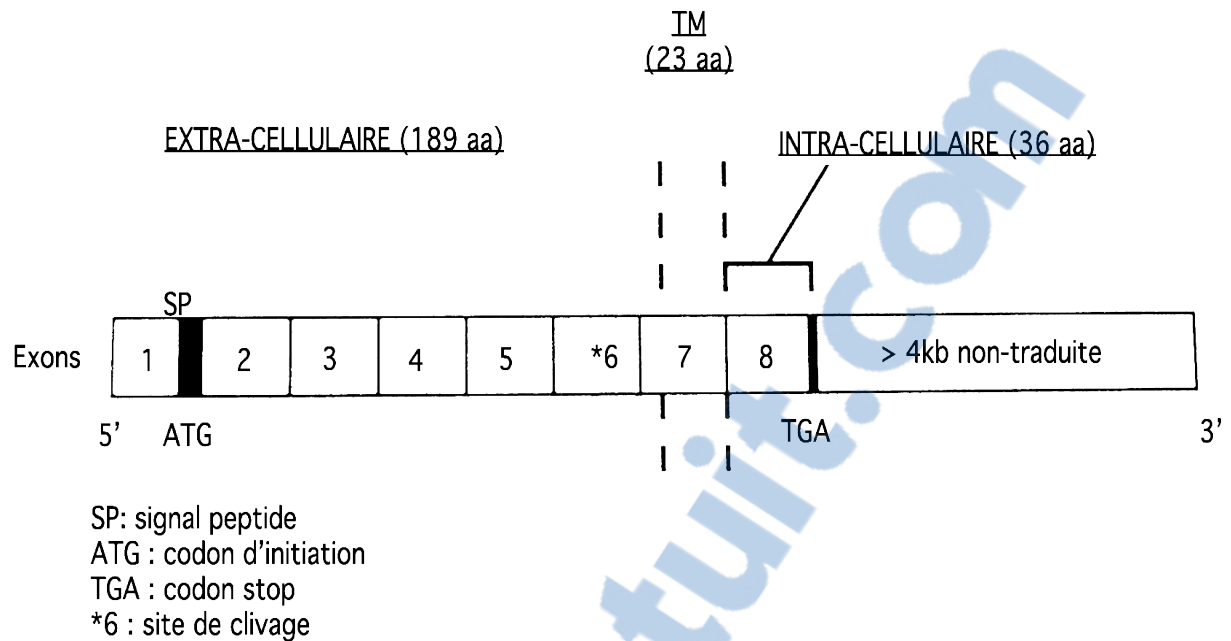


Figure 3 : Structure de l'ADNc du gène SCF (Galli et al., 1994)

.B Etude du groupe des récepteurs tyrosine kinase (RTK)

Le gène *c-fms* codant pour le récepteur transmembranaire du facteur de stimulation des colonies (CSF-1R) et le gène codant pour le récepteur au facteur de croissance d'origine plaquettaire β (PDGFR- β) ont la même taille et une structure génomique comparable à celle du gène *c-kit*. (figure 4)

Les protéines *c-kit* et *c-fms* ont 5 domaines extracellulaires Ig-like codés respectivement par les exons 2 à 9, un ancrage membranaire codé par l'exon 10 et des activités tyrosine kinase codées par les exons 11 à 20. La taille de leurs exons sont similaires mais les introns du *c-kit* sont souvent plus longs que ceux du *c-fms*. Les domaines délimités par les exons des *c-kit* et *c-fms* coïncident le plus souvent sauf pour ceux des extrémités 5' et 3' et pour le domaine KI. L'exon 1 du *c-kit* est plus petit que celui du *c-fms*. Les exons de la séquence 3' des 2 gènes diffèrent par leur séquence et par leur taille tout en respectant les régions codantes et non codantes. Les domaines KI des *c-kit* et *c-fms* ne sont pas définis par les limites des exons 14 et 15 mais la séquence et la longueur du KI sont différentes.

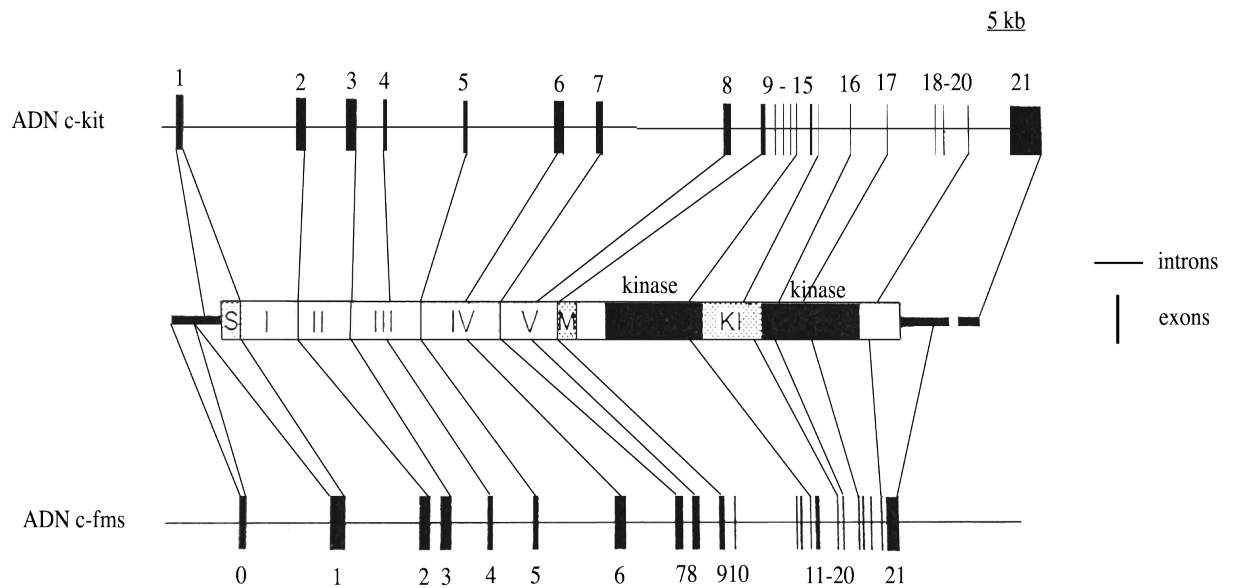


Figure 4 : Comparaison des gènes *c-kit* et *c-fms* (Chu and Besmer, 1995)

Ces homologues de séquences et d'organisation générale permettent de regrouper ces 2 gènes dans le groupe des gènes codants pour les récepteurs transmembranaires tyrosine kinase (RTK) de type III. Les différences décrites précédemment entre les gènes *c-kit* et *c-fms* reflètent l'évolution des besoins fonctionnels des gènes. Ces deux gènes ont donc des fonctions propres et une expression tissulaire différente. Ils n'interagissent pas avec les mêmes substrats et ne s'expriment pas dans les mêmes conditions (Chu and Besmer, 1995).

Ce sous groupe des RTK de type III fait partie de la grande famille des récepteurs tyrosine kinase : les gènes codant pour les RTK ont la même structure kinase mais ont un nombre différent de structures type Ig-like. (figure 5)

Les RTK de type I sont constitués de deux séquences riches en cystéine répétées dans le domaine extracellulaire et un domaine intracellulaire possédant l'activité tyrosine kinase. Exemple : récepteur de l'EGF.

Les RTK de type II ont aussi deux séquences riches en cystéine dans le domaine extracellulaire mais ont une structure hétéro-tétramérique avec 2 chaînes α et 2 chaînes β . Chaque chaîne α est unie par liaison disulfure à une chaîne β et à une autre chaîne α . Ce groupe inclut les récepteurs de l'insuline, du facteur de croissance insuline-like (IGF-1) et du facteur de croissance des hépatocytes (HGF-R).

Les RTK de type III ont un domaine kinasique interrompu par un insert et 5 domaines comparable aux immunoglobulines en région extracellulaire. Exemples : récepteurs du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF-R), du facteur de stimulation des colonies de

macrophages (M-CSF-R).

Les RTK de type IV ont aussi un domaine kinasique interrompu par un insert et 3 domaines comparable aux immunoglobulines en extracellulaire. Exemple : récepteur du facteur de croissance fibroblastique (FGF-R).

Les types I, III et IV sont monomériques, tandis que le type II est un tétramère $\alpha_2\beta_2$. Les chaînes transmembranaires de ces récepteurs ne traversent la double couche qu'une seule fois.

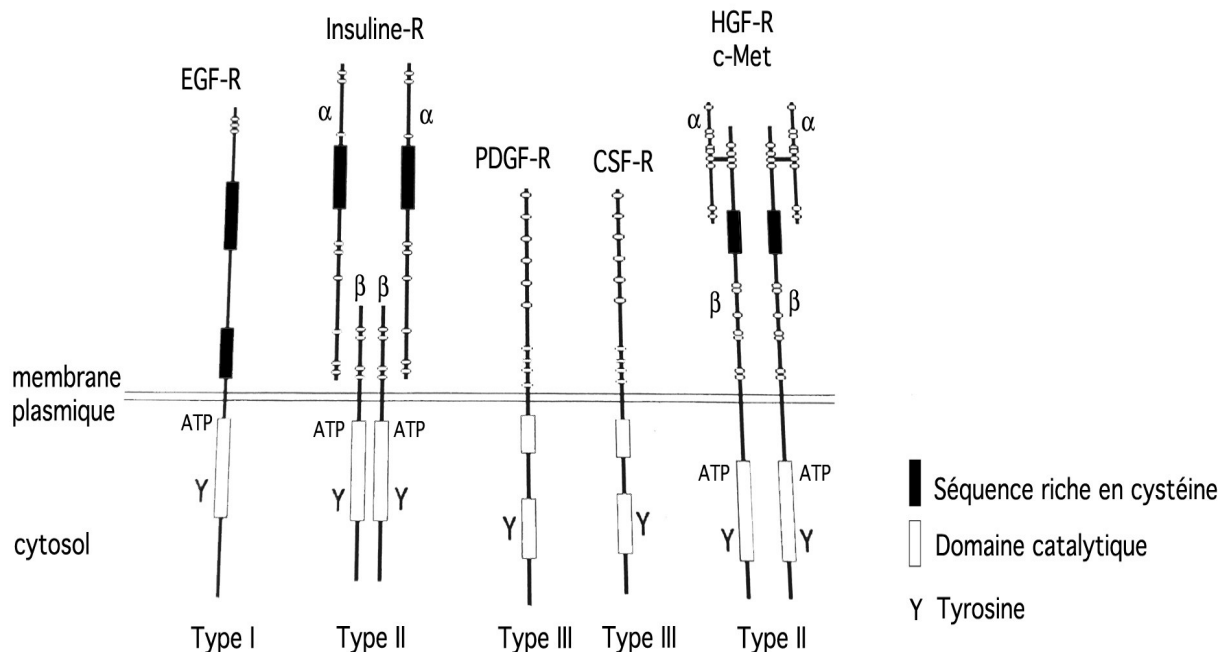


Figure 5 : Récepteurs tyrosine kinases (Raisonnier, 2002)

.C Structures moléculaires du c-kit et de son ligand

.1 Structure de la protéine c-kit

La protéine c-kit est une glycoprotéine (145 kD) entièrement transmembranaire de 975 acides aminés (A.A) constituée de trois parties : extra-cellulaire, transmembranaire et intra-cellulaire. (figure 6)

La région extracellulaire correspond à 518 A.A et sert de site fixation au ligand. Elle est constituée de 5 domaines immunoglobulines-like (Ig-like) répétées qui contiennent plusieurs ponts disulfures intracaténaux et 9 sites potentiels de N-glycosylation.

Les structures de type Ig-like dans cette famille de gènes (*c-kit*, *c-fms*, PDGFR- α et - β) permettent la fixation du ligand. Chaque domaine Ig-like est codé par un ou deux exon(s) dans les récepteurs c-kit et c-fms : 1 seul exon code pour les Ig-I et Ig-II et 2 exons codent pour les Ig-III, Ig-IV et Ig-V. Cette région extra-cellulaire est formée de deux fragments rigides : Ig-I/Ig-II et Ig-III/Ig-IV/Ig-V connectés par une région flexible située entre Ig-II et Ig-III. La fonction de chaque domaine Ig-like extracellulaire a été étudiée. Le domaine

constitué par Ig-II et Ig-III est le site de fixation du ligand. La région entre Ig-III et Ig-IV a un rôle dans la transmission du signal induit lors de la fixation du ligand. Les domaines Ig-IV et Ig-V sont responsables de la dimérisation du récepteur. La sous-unité Ig-V contient une région hautement conservée dans la famille de ces gènes : extrémité N-terminale cystéine suivie de six résidus hydrophobes en alternance avec des résidus hydrophiles et suivie de deux résidus cystéine qui forment le pont disulfure caractéristique du domaine variable des Ig.

La région transmembranaire de 26 A.A, totalement hydrophobe ancre le récepteur à la membrane plasmique et est codée par l'exon 10.

La région intracellulaire (cytoplasmique) de 413 A.A contient toutes les séquences relatives à l'activité tyrosine kinase du récepteur, à savoir la région kinase (résidus A.A 575 à 915), le site de fixation de l'ATP (résidu lysine en 622), le site d'autophosphorylation (résidu tyrosyl 821) et une région hydrophile non catalytique de 77 A.A connue sous le nom de domaine d'insertion de la kinase qui sépare le domaine kinase en deux (domaines Tk1 et Tk2).

La structure intracellulaire est beaucoup plus complexe résultant de la formation d'hélices α et de feuillets β (McCulloch and Minden, 1993 ; Galli et al., 1994 ; Chu and besmer, 1995).

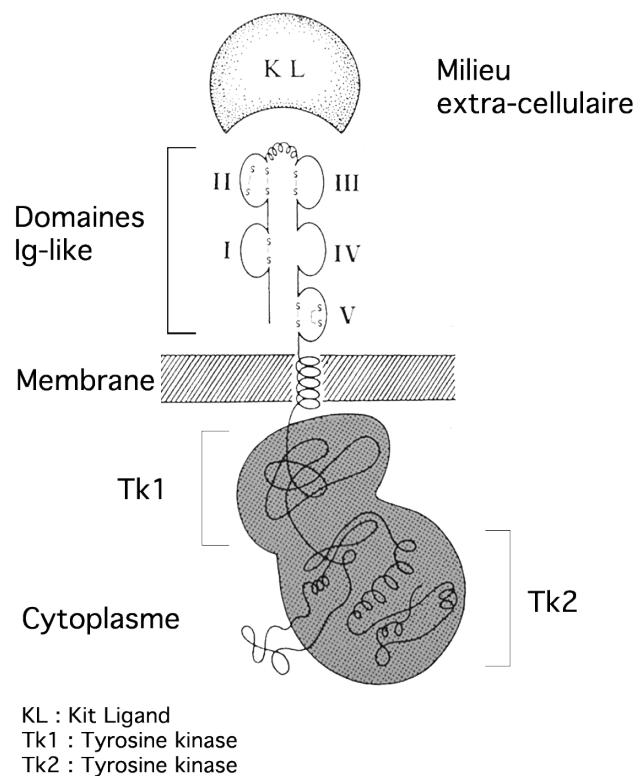


Figure 6 : Représentation de la structure de la protéine c-kit (Chu and Besmer, 1994)

.2 Isoformes du récepteur c-kit

Il existe des isoformes du récepteur c-kit, deux chez la souris et quatre chez l'homme qui

dépendent de la délétion ou non de quatre A.A extracellulaires. En plus chez l'homme, il peut y avoir ou non une délétion d'un résidu Sérine dans la région interkinase du domaine cytoplasmique (figure 7). Il est important de noter que les isoformes ont la même affinité pour le ligand et qu'ils répondent au ligand soluble de la même manière par une réaction d'autophosphorylation et par une dimérisation des récepteurs. Cependant, les formes longue (présence des quatre A.A) et courte ne répondent pas de la même façon à l'absence de ligand : la forme longue n'est pas phosphorylée alors que la forme courte présente un faible niveau d'auto-phosphorylation, ce qui traduit un état d'activation constitutif. Les deux formes sont issues d'un épissage alternatif et les deux ARNm du *c-kit* sont exprimés à des niveaux quasi-identiques dans tous les tissus étudiés comme le cerveau, les testicules, le placenta et la moelle osseuse. A l'heure actuelle, il n'existe aucune corrélation entre l'expression des isoformes du c-kit et les paramètres biologiques ou cliniques. Il semblerait seulement qu'un défaut de ligand favorise l'expression de la forme courte du récepteur c-kit (Galli et al., 1994 ; Ashman, 1999).

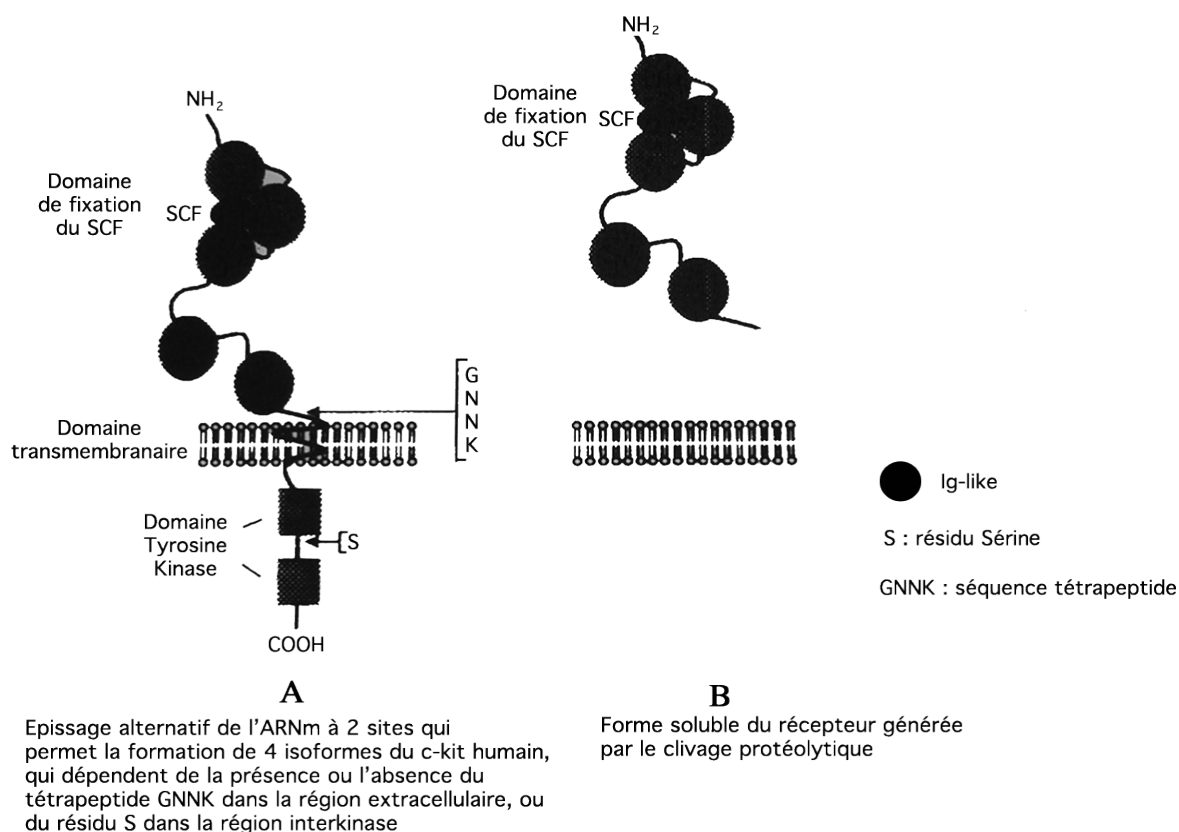


Figure 7 : Isoformes du c-kit d'après Ashman (1999)

.3 Structure du ligand SCF

Le ligand SCF est une protéine de 248 A.A chez l'homme avec un domaine extracellulaire de 185 A.A, un domaine transmembranaire de 27 A.A et un domaine cytoplasmique de 36 A.A.

Dans les cellules humaines, deux formes ont été mises en évidence, elles diffèrent par une délétion de 84 paires de base (28 A.A codés par l'exon 6) dans le domaine extracellulaire (Zsebo et al., 1990 ; McCulloch and Minden, 1993 ; Galli et al., 1994).

Cette protéine SCF est donc produite dans les cellules eucaryotes sous deux formes :

Une longue (gène en totalité) et une courte (gène délété) qui sont initialement fixées à la membrane cellulaire. Cependant, la forme longue après clivage protéolytique entre les A.A 164 et 165 va donner naissance à une forme soluble du ligand de 26 kD. (figures 8 et 9)

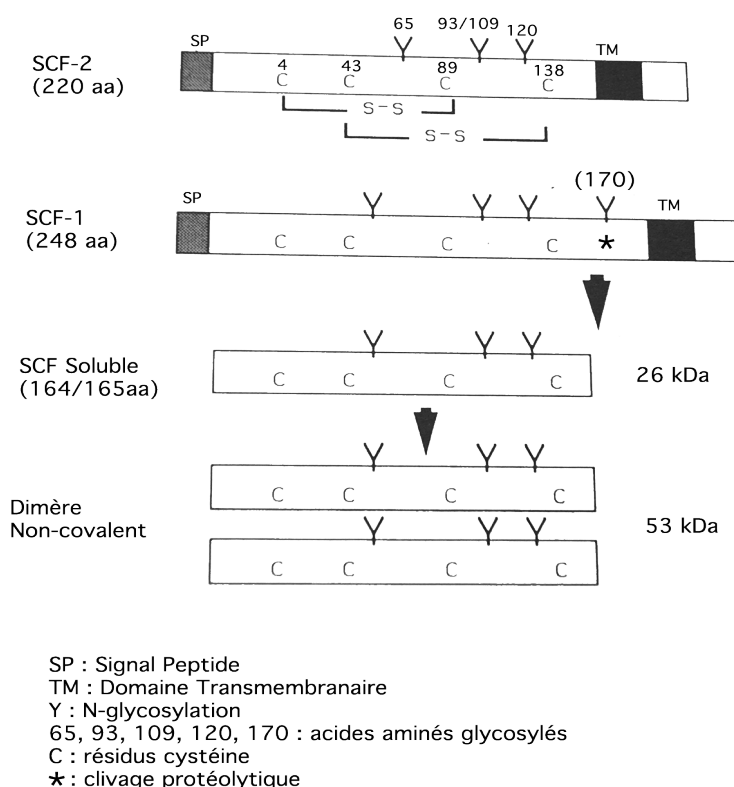


Figure 8 : Différentes isoformes de SCF d'après Galli et al. (1994)

Aussi les interactions entre le récepteur c-kit et son ligand peuvent être divisées en deux types : cellule-cellule et facteur soluble-récepteur membranaire. Quelque-soit le mécanisme qui génère la forme soluble, le SCF semble être physiologiquement actif sous forme liée, soluble ou les deux ensemble mais l'activité biologique n'est pas équivalente.

Miyazawa et al. (1995) ont montré que l'activation de la tyrosine kinase de c-kit issu de cellules myéloïdes persistait plus quand ces cellules interagissaient avec la forme membranaire du SCF plutôt qu'avec la forme soluble. La stimulation des cellules par la forme soluble du SCF induit une rapide diminution de l'expression cellulaire du c-kit par sa dégradation métabolique. Cette protéolyse du récepteur c-kit s'explique par une internalisation accélérée des complexes récepteurs c-kit/ SCF soluble. En revanche, le complexe fixe récepteur/ SCF membranaire n'est pas internalisé, ni dégradé par la même

voie. Ainsi l'activation de c-kit par la forme membranaire est prolongée et continue de générer des signaux de prolifération et de différenciation cellulaires. La forme membranaire du SCF stimule donc plus l'hématopoïèse à long terme. La survie des cellules germinales est stimulée par la forme fixée et non par la forme soluble.

De plus la production de la forme soluble du SCF est moins importante que celle de la forme membranaire. La régulation de l'épissage alternatif contribue fortement à la régulation de la production des différentes formes de SCF.

Chez la souris, trois formes sont issues de cet épissage alternatif : la forme longue (complète), une forme sans l'exon 6 qui correspond à la forme humaine produite avec une délétion de 28 A.A et une troisième forme intermédiaire avec une délétion similaire au sein de l'exon 6, qui commence au même A.A (A.A 149) mais qui s'arrête au bout de 16 A.A (position 164-165) (Anderson et al., 1990 ; Huang et al., 1990 ; Galli et al., 1994).

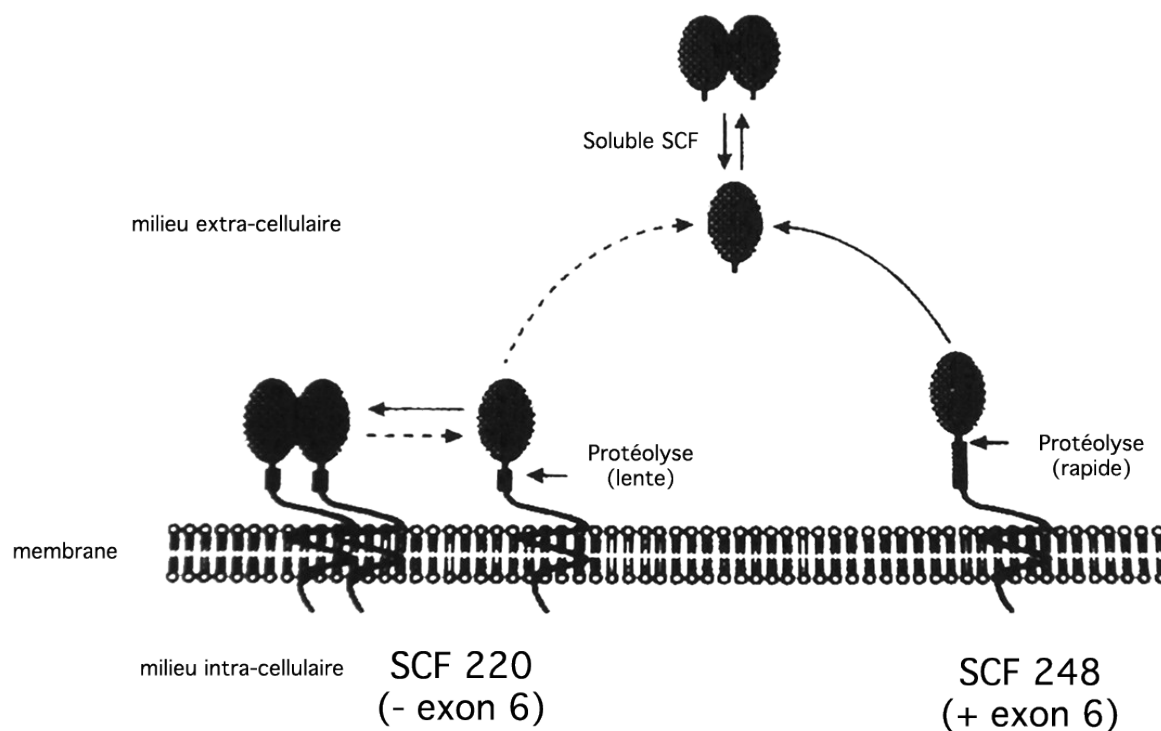


Figure 9 : Différentes formes du SCF d'après Ashman (1999)

.II Fonctionnement normal du c-kit et de son ligand et régulations

.A Interactions c-kit / ligand SCF

.1 La transphosphorylation

La fixation du ligand au récepteur c-kit engendre par modification de conformation la dimérisation des récepteurs et l'activation du domaine tyrosine kinase qui induit la phosphorylation d'une tyrosine de l'autre protomère : transphosphorylation =

autophosphorylation. La kinase transfère un groupement phosphate issu de l'ATP sur l'hydroxy du phénol d'une tyrosine pour former un ester phosphorique. La protéine c-kit est ainsi activée. (figure 10)

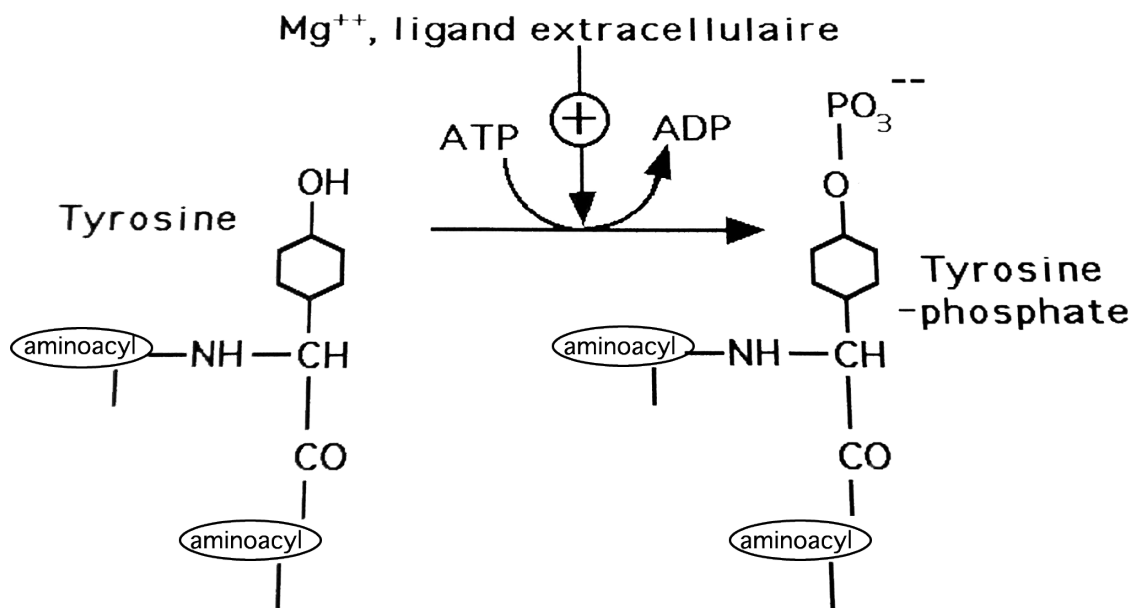


Figure 10 : Activité tyrosine kinase (Raisonnier, 2003)

Par phosphorylation de résidus tyrosine des protéines cibles, les récepteurs à activité tyrosine kinase activent directement des protéines qui induisent la croissance et la différenciation cellulaires.

.2 Interactions avec les domaines SH2

Dans chaque cas, les résidus tyrosine autophosphorylés servent de sites de fixation à haute affinité pour différentes protéines de transmission intracellulaire. Une fois fixées, ces protéines sont à leur tour phosphorylées sur leur résidus tyrosine et donc activées. Il existe une gamme complète de protéines informatives intracellulaires qui ont des structures et des fonctions variées mais ont en commun deux domaines non catalytiques hautement conservés appelés SH2 et SH3 (régions d'homologie avec Src 2 et 3). Les domaines SH2 reconnaissent des résidus tyrosine phosphorylés ; ils permettent aux protéines qui les possèdent de se fixer aux récepteurs à activité tyrosine kinase activés et à d'autres protéines informatives intracellulaires phosphorylées. La fonction du domaine SH3 est moins claire (Alberts et al., 1994 ; Stryer, 1995).

.3 Intervention des protéines Ras

Les récepteurs à activité tyrosine kinase activent indirectement les protéines Ras qui interviennent dans le relais des signaux des récepteurs à activité tyrosine kinase vers le noyau pour stimuler la prolifération ou la différenciation des cellules.

Ces phosphorylations et l'activation de Ras sont des événements de très courte durée qui doivent être convertis en événements de plus longue durée. Ce système de transmission met alors en jeu des cascades multiples de phosphorylations sur des résidus sérine/ thréonine. De nombreuses kinases à sérine/ thréonine sont impliquées mais la famille des MAP kinases est une des plus importantes (Alberts et al., 1994 ; Stryer, 1995).

.4 Activation des MAP kinases

La MAP-kinase est activée par une MAP-kinase-kinase qui phosphoryle à la fois un résidu thréonine et un résidu tyrosine. La MAP-kinase-kinase est elle-même activée par une MAP-kinase-kinase-kinase. Une fois que la MAP-kinase est activée, elle entraîne à son tour la phosphorylation d'autres protéines cibles telles que les MAP (Mitogen Activated Proteins) qui contrôlent l'organisation du squelette ou des facteurs de régulation de la transcription de différents gènes. Ces réactions en chaîne créent donc de véritables cascades d'activation ou de régulation des activités biologiques des protéines cellulaires.

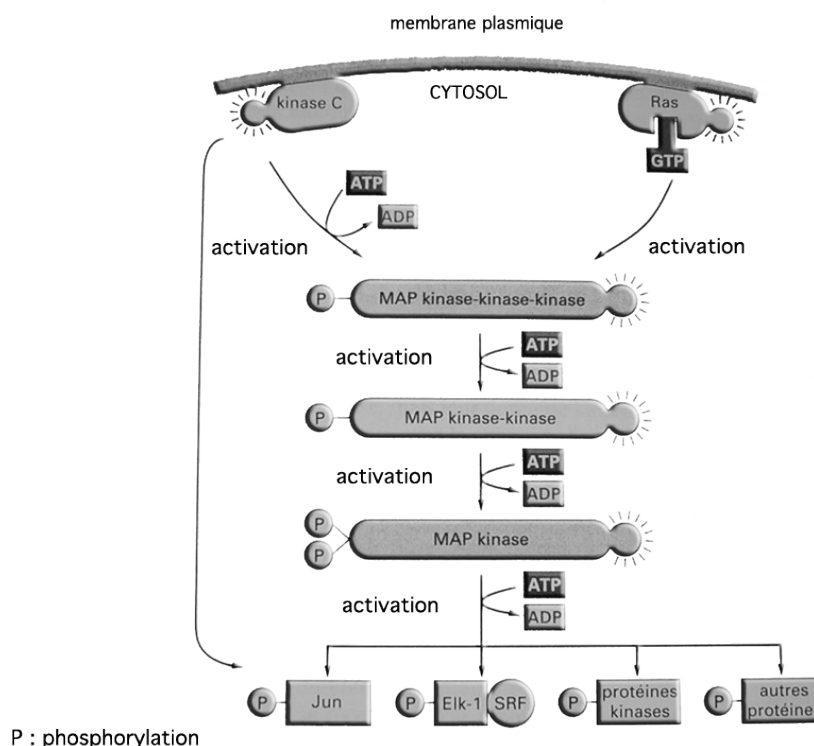


Figure 11 : Activation des MAP kinases (Alberts et al., 1994)

Même si les deux isoformes du c-kit (f. longue ou f. délétée) ont la même affinité avec le SCF, la fixation du ligand sur la forme courte du c-kit provoque une phosphorylation et une activation plus rapide de c-kit que la forme longue. Les cascades réactionnelles consécutives apparaissent plus précocement et induisent une stimulation de la multiplication cellulaire. Comme pour tout facteur intervenant dans la transmission des signaux, le récepteur c-kit est soumis à des régulations par d'autres facteurs telles que les cytokines (Galli et al., 1994 ;

Raisonnier, 2003).

.B Régulations

.1 Régulation propre au gène

Comme toute transcription, il existe une régulation cellulaire spécifique grâce au promoteur du gène qui possède des sites de fixation pour de nombreux facteurs de transcription (Sp1, AP-2, Myb, SCL, GATA-1 et MITF) qui régule les différentes phases. Ce promoteur permet la fixation de l'ARN polymérase qui catalyse la transcription du gène mais il ne peut être fonctionnel qu'en présence de facteurs de transcription. Le GATA-1 régule le *c-kit* par l'intermédiaire des cytokines qui induisent une amplification des fonctions biologiques de *c-kit*. Le facteur Myb est lui-même phosphorylé sur des résidus tyrosine pour agir sur le promoteur en activant le *c-kit*. Le facteur Sp1 est connu pour son rôle dans la régulation de l'expression de *c-kit* dans les cancers des lignées hématopoïétiques et des petites cellules pulmonaires. Le SCL active l'expression fonctionnelle de *c-kit* dans les cellules hématopoïétiques. Lors de mélanome chez l'homme, le potentiel métastatique est corrélé à la perte d'expression du facteur de transcription AP-2 et donc à une diminution de l'expression de *c-kit*. Lors de ré-expression de l'AP-2 dans un mélanome, il y a de nouveau amplification de l'expression du *c-kit* et ceci supprime le potentiel tumoral et métastatique (Ashman, 1999).

.2 Régulation du cycle cellulaire

Le ligand SCF stimule la prolifération cellulaire en favorisant la progression du cycle cellulaire. La présence du SCF est indispensable seulement pendant la phase G1 pour entrer en phase S. En effet, il participe à la transformation de la protéine P53cdc2 (kinase) en SPF (Start Promoting Factor) qui permet à la cellule de s'engager dans la phase S mais aussi dans la phase M (mitose). En absence de facteur de croissance, les cellules entrées en phase G1 peuvent subir un phénomène apoptotique (Maillet, 1995). Mais la présence de SCF même en faible quantité aurait une activité protectrice. Cette aptitude du SCF à proroger la survie des cellules est indépendante de la phase du cycle cellulaire. Le SCF et l'IL-3 bloquent l'apoptose des mastocytes par des mécanismes différents : notamment l'IL-3 induit des protéines anti-apoptogènes de type bcl-2 mais pas le SCF (Yee et al., 1994).

.3 Régulation du *c-kit* par les cytokines

.a Expression génique

L'expression par les mastocytes de l'ARNm de *c-kit* est significativement diminuée après traitement des cellules par des agents immunologiques ou par des facteurs de croissance de l'hématopoïèse. Chez la souris, l'IL-4 et l'IL-3 régulent négativement la transcription de *c-kit*

alors que, chez l'homme, l'IL-3 ne modifie pas ou au contraire augmente l'expression du récepteur c-kit des cellules hématopoïétiques de l'homme. L'IL-4 a un effet négatif sur l'expression du *c-kit* au niveau des cellules CD34⁺ de la moelle osseuse normale de l'homme et des cellules de l'homme atteint d'une leucémie myéloïde. Le TGF- β modifie l'hématopoïèse et régule l'expression de c-kit en diminuant la stabilité de l'ARNm. L'INF- γ est aussi un régulateur négatif des cellules souches érythroïdes et diminue l'expression de *c-kit*. Le TNF- α inhibe l'effet positif de SCF sur la survie des cellules souches de l'hématopoïèse et en diminuant l'expression membranaire de c-kit (Galli et al., 1994 ; Ashman, 1999).

Dans les cellules endothéliales, l'IL-1 régule négativement l'expression de *c-kit* et au contraire, augmente celle du SCF. Il existe donc un équilibre de l'expression de SCF et *c-kit* qui peut être modifié dans la paroi des vaisseaux lors d'inflammation (Ashman, 1999). Aussi, l'expression cellulaire du c-kit peut être influencée par un certain nombre de cytokines et de stimuli.

.b Régulation protidique

Le récepteur c-kit à la surface cellulaire est aussi régulé par le renouvellement des protéines. La fixation du SCF entraîne une endocytose rapide du complexe SCF/ récepteur tyrosine kinase, qui peut conduire à sa dégradation (Ashman, 1999).

Comme nous l'avons vu précédemment, les récepteurs à activité tyrosine kinase interagissent avec des molécules ayant des domaines SH2. Lorenz et al. (1996) ont étudié l'interaction biochimique entre le récepteur c-kit et la protéine tyrosine phosphatase SHP1 (domaine SH2 non transmembranaire) qui est exprimée dans toutes les lignées cellulaires hématopoïétiques à tous les stades de maturation. Après l'activation du c-kit, la SHP1 se fixe à la tyrosine phosphorylée du c-kit, ce qui entraîne la phosphorylation de son propre résidu tyrosine. La SHP1 se comporte comme un facteur de régulation négatif du c-kit qu'au niveau des cellules précurseurs de l'hématopoïèse et les cellules précurseurs c-kit⁺ dépourvues de SHP1 sont extrêmement réactives à la stimulation par le SCF. Ils ont aussi montré que la SHP1 en diminuant la phosphorylation du c-kit est responsable de la baisse du nombre de mastocytes dans le derme.

.4 Régulation du ligand SCF

Le ligand, lui aussi est régulé par l'action des cytokines et d'autres facteurs produits dans le micro-environnement. Le TNF- α et l'IL-1 α semblent réguler négativement le niveau de transcription de l'ARNm du SCF dans les cellules de la moelle osseuse de l'homme. De plus, comme les mastocytes représentent une source potentielle d'IL-1 et de TNF- α , il existe une

possibilité de rétrocontrôle négatif de la production locale du SCF exercé directement par les mastocytes. Ce type de régulation participe à la limitation du nombre de mastocytes (Ashman, 1999).

En revanche, la quantité de SCF est plus élevée en présence de corticoïdes (hydrocortisone) en raison d'une augmentation modérée de la transcription de l'ARNm du SCF dans les cellules de la moelle osseuse.

De plus, la forme soluble du SCF a une action régulatrice sur le récepteur c-kit, en diminuant son expression membranaire. (cf supra)

.5 Conclusion

Le *c-kit* est un proto-oncogène car lorsque celui-ci se retrouve muté, il ne nécessite plus la liaison à son ligand pour s'activer, et son activité tyrosine kinase échappe à tout mécanisme de contrôle. La cellule va alors se diviser sans stimulation et la prolifération cellulaire devient alors totalement incontrôlable et incontrôlée. C'est la base d'un développement tumoral : les cellules prolifèrent de façon anormale car elles expriment un oncogène qui code pour une forme constitutionnellement active d'une protéine, ici le *c-kit*, contrôlant l'expression des gènes.

.III Méthodes de diagnostic : mise en évidence et quantification du c-kit

L'étude du c-kit et de son ligand est basée sur les différentes techniques de biologie moléculaire (Alberts et al., 1994).

.A Etude des gènes *c-kit* et du ligand *SCF*

.1 Amplification des gènes par PCR et RT-PCR

Dans un premier temps, les chercheurs se sont penchés sur la détection des gènes codant pour le *c-kit* et son ligand. Aussi, ils font la plupart du temps appel aux techniques de PCR (Polymerase Chain Reaction) afin d'amplifier les gènes codant pour ensuite les quantifier.

La PCR permet d'amplifier plus d'un milliard de fois les séquences d'ADN spécifiques des gènes situés sur les loci White Spotting et Steel, codant respectivement pour le *c-kit* et son ligand (SCF). On utilise des parties de la séquence qui encadre la région à amplifier pour fabriquer deux oligonucléotides de synthèse (primers spécifiques, amorces), chacun étant complémentaire de l'une des chaînes de la double hélice d'ADN et situé sur les brins opposés de la région à amplifier. Ces oligonucléotides servent d'amorces (annexe 1) pour la synthèse d'ADN *in vitro* qui est catalysée par l'ADN polymérase thermorésistante (Taq polymérase). La PCR est une succession de cycles (de 20 à 30 cycles) comprenant chacun 3 étapes :

(figure12)

1^{ère} étape : Bref traitement thermique pour séparer les deux brins de l'ADN chromosomique

2^{ème} étape : Refroidissement de l'ADN en présence d'un large excès des deux oligonucléotides qui permet leur hybridation spécifique avec les séquences d'ADN génomique complémentaires.

3^{ème} étape : Synthèse de l'ADN grâce au mélange préassocié qui est incubé en présence de l'ADN polymérase et des quatre désoxyribonucléiques triphosphates, de sorte que les régions de l'ADN en aval des amorces soient sélectivement synthétisées.

Ces étapes sont répétées de sorte que les fragments nouvellement synthétisés servent à leur tour de matrice et, en quelques cycles, l'espèce prédominante est un seul fragment d'ADN dont la longueur correspond à la distance entre les deux amorces d'origine. Un seul cycle prend environ 5 minutes et on peut ainsi obtenir en quelques heures le « clonage acellulaire » d'un fragment d'ADN grâce à un système automatisé, alors qu'il faut plusieurs jours avec les techniques standard de clonage. De plus, la méthode de PCR est très sensible et peut ainsi détecter une molécule unique d'ADN dans un échantillon (Longley et al., 1993 ; London et al., 1996 ; Nagata et al., 1998).

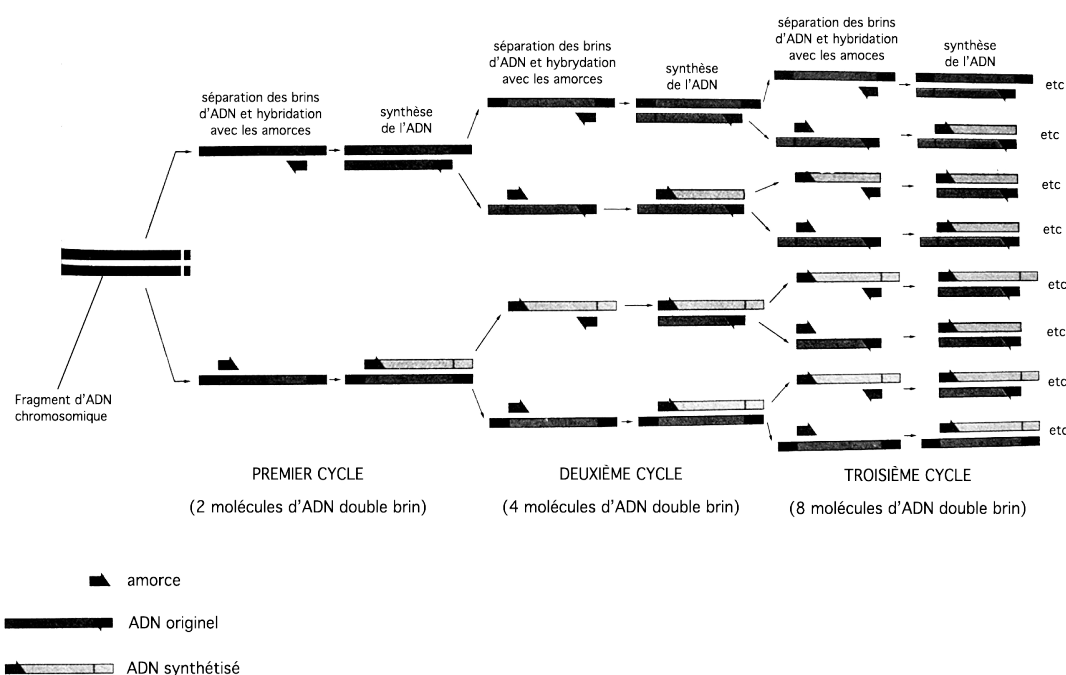


Figure 12 : Schéma d'amplification par PCR d'un gène donné (Alberts et al., 1994)

Il est possible d'analyser de la même façon des quantités infimes d'ARN en les convertissant en séquences d'ADN avec la transcriptase reverse ; c'est la RT-PCR.

Une fois l'amplification effectuée, il faut pouvoir isoler les fragments obtenus et les révéler

afin de les quantifier.

.2 Détection des fragments amplifiés

Le séquençage de l'ADN codant pour le *c-kit* ou le ligand SCF est réalisé par électrophorèse sur gel d'agarose. Des ARNs ou ADNs connus servent de marqueur de taille.

La révélation des fragments repose sur des techniques d'hybridation d'acides nucléiques de type Northern (interaction ARN / ADN) ou de type Southern (interaction ADN/ ADN) après dénaturation en milieu alcalin de la double hélice d'ADN (Anderson et al., 1990 ; Longley et al., 1993 ; Tsujimura et al., 1994).

Après séparation des acides nucléiques, ils sont transférés sur une membrane de nitrocellulose par effet buvard à travers le gel d'agarose et le papier. La membrane est ensuite exposée à une sonde d'ADN marquée pendant une durée prolongée dans des conditions favorables à l'hybridation. La membrane est alors lavée soigneusement, de sorte que seules les molécules d'ARN ou d'ADN immobilisées hybridées avec la sonde soient marquées et apparaissent sous forme de bandes sur la membrane. (figure 13)

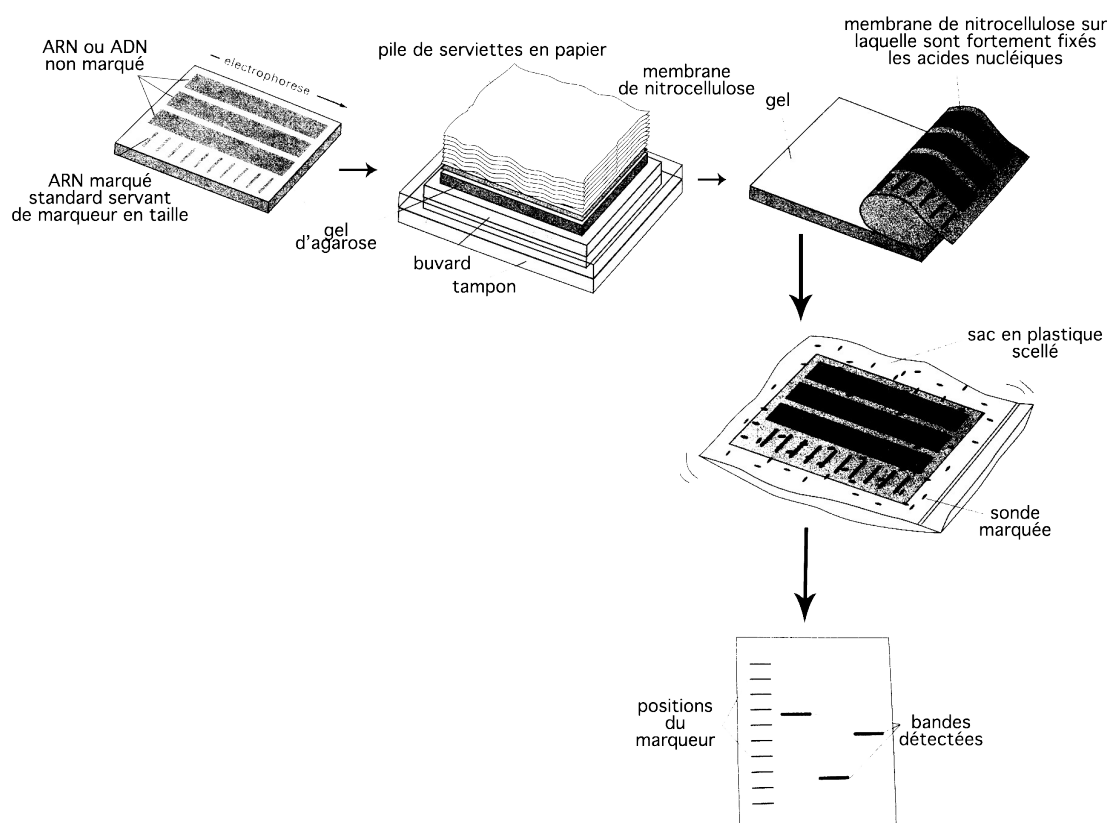


Figure 13 : Détection de molécules d'ARN ou d'ADN spécifiques par hybridation après transfert de gel (Alberts et al., 1994)

La technique de visualisation la plus utilisée est la suivante :

Coloration du gel au bromure d'éthidium et seuls les fragments hybridés prennent le colorant

puis la visualisation se fait grâce à la lumière U.V.

.B Etude des protéines c-kit et SCF

Cependant, l'étude du c-kit et de son ligand peut s'effectuer à partir des protéines directement, essentiellement afin de comparer les quantités tissulaires de c-kit ou bien pour mettre en évidence des mutations.

Aussi, il est important de pouvoir isoler ce récepteur au niveau cellulaire et tissulaire. Des techniques d'immunohistochimie et d'immunocytochimie ainsi que la culture cellulaire sont alors utilisées (London et al., 1996 ; Huang et al., 1990).

.1 Matériel

Des tissus sains dans lesquels le récepteur c-kit est présent comme le cervelet, la rate sont utilisés comme contrôle positif. Différents échantillons tumoraux ont été étudiés pour quantifier le c-kit afin de savoir si ce dernier pouvait servir de marqueur tumoral et aussi pour analyser le c-kit et son ligand dans différentes tumeurs pour identifier les mutations qui les affectent. Ces tissus sont traités au formol 10% et à la paraffine afin de pouvoir réaliser des sections tissulaires au microtome (coupes de 4 à 5 µm).

Puis, des lignées cellulaires de mastocytes connues chez l'homme et chez plusieurs espèces animales sont utilisées, issues de tumeurs multiples dans lesquelles des mutations du *c-kit* ont été mises en évidence. Les cellules C2, cellules BR issues de mastocytomes canins, cellules HMC-1 retrouvées lors de leucémie mastocytaire chez l'homme, cellules P-815 qui sont des cellules murines ayant une mutation connue également du *c-kit*, permettent de comparer et d'identifier la nature de mutations éventuelles dans les types cellulaires à analyser (London et al., 1999 ; Reguera et al., 2000).

.2 Détection des protéines

Que l'on utilise l'immunohistochimie ou l'immunocytochimie, le principe est le même : on réalise dans un premier temps un immunomarquage avec des anti-corps (Ac) polyclonaux de lapin anti- c-kit humain (il existe des réactions croisées entre le c-kit canin et le c-kit humain), qui reconnaissent une séquence spécifique, soit dans le domaine extra-cellulaire, soit dans le domaine intra-cellulaire du récepteur.

Après incubation des cellules ou des coupes de tissus avec l'Ac primaire, un lavage et un rinçage sont effectués et les échantillons sont de nouveau incubés avec des Ac secondaires. Ce sont des Ac marqués de bœuf ou de chèvre anti-lapin (anti-Ig de lapin) qui sont couplés de façon covalente à un marqueur ce qui les rend facilement détectable (Kitayama et al., 1995).

Les marqueurs communément utilisés sont la fluorescéine ou la rhodamine pour la

microscopie en fluorescence ; la peroxydase de raifort pour la microscopie photonique conventionnelle, comme pour la microscopie électronique ; la ferritine, une protéine contenant du fer ou des sphères d'or colloïdal pour la microscopie électronique ; et la phosphatase alcaline ou la peroxydase qui conduisent à la formation locale d'un précipité coloré, en présence de produits chimique appropriés, pour une détection biochimique. Il est donc indispensable de traiter les cellules préalablement pour inhiber la peroxydase endogène et la biotine endogène (Longley et al., 1996 ; London et al., 1996).

On utilise les mêmes méthodes pour étudier le ligand SCF mais l'Ac primaire est un Ac polyclonal de lapin anti-Ig du SCF et l'Ac secondaire est un Ac de bœuf anti-Ig de lapin conjugué à de l'isothiocyanate de fluorescéine.

Cette révélation du c-kit peut être lue directement sur des coupes tissulaires (immunohistochimie) ou sur des cultures cellulaires (immunocytochimie) ou encore par immunotransfert. En effet, la protéine c-kit peut être séparée d'autres protéines par électrophorèse et ensuite toutes les protéines sont transférées par « effet buvard » sur une feuille de papier de nitrocellulose. Puis, elles sont toutes exposées à un Ac spécifique qui reconnaît dans ce cas précis les protéines qui se phosphorylent sur les résidus tyrosine. Seules ces protéines seront révélées grâce à un deuxième Ac couplé à un isotope radioactif, à une enzyme facilement détectable ou à un colorant fluorescent. Cette méthode de détection des protéines est appelée Western blot.

Toutes ces méthodes utilisées sont sensibles et très spécifiques et leur utilisation a permis d'identifier plusieurs mutations du gène *c-kit* lors de pathologies tumorales, par exemple.

TROISIÈME PARTIE : INTÉRÊTS DU C-KIT EN TANT QUE MARQUEUR TUMORAL

TROISIÈME PARTIE : INTÉRÊTS DU C-KIT EN TANT QUE MARQUEUR TUMORAL

.I Conditions d'expression du c-kit en pathologie tumorale : les différentes mutations identifiées

Un grand nombre de mutations indépendantes ont été décrites sur les loci W et Sl. Les souris ayant des mutations sur les loci W ou Sl ont des caractéristiques phénotypiques similaires (Galli et al., 1994). Les mutations dans le locus W affectent le nombre et la fonction des cellules souches hématopoïétiques, des mastocytes, des cellules germinales et des mélanoblastes (action intrinsèque). Les mutations du locus Sl affectent le micro-environnement qui entoure ces différentes lignées cellulaires et ont une action extrinsèque à la cellule (Zsebo et al., 1990).

.A Mutations homozygotes

En général, les mutations homozygotes sur les allèles W et Sl (W^*/W^* ou Sl^*/Sl^*) produisent des animaux à anémie macrocytaire et hypoplasique, avec un défaut de pigmentation cutanée (animaux blancs aux yeux noirs), stériles et avec un profond déficit en mastocytes. Ces mutations sont souvent dominantes négatives (McCulloch and Minden, 1993). Les mutations sur les loci W et Sl induisent une perte fonctionnelle au niveau des mastocytes, c'est-à-dire une interaction défectueuse entre le récepteur c-kit et son ligand SCF. L'activation du récepteur ligand-dépendante ne se fait pas correctement car la transduction du signal est modifiée.

Les mutants homozygotes les plus sévères meurent *in utero* ou en période périnatale immédiate en raison d'une sévère anémie. Il existe une différence entre les homozygotes Sl et W par rapport au développement des cellules germinales et aux cellules hématopoïétiques ; la mutation Sl a un effet plus prononcé et elle cause une anémie plus sévère (Galli et al., 1994).

.B Mutations hétérozygotes

En général, les souris hétérozygotes simples ($W^*/+$) sont fertiles et n'ont aucune défaillance de l'hématopoïèse, leur pelage n'est pas dilué mais elles présentent une tache dépigmentée sur le ventre et/ou sur le front et/ou sur l'extrémité des pattes et de la queue, en fonction de la mutation portée.

Les souris hétérozygotes ($Sl^*/+$) sont généralement viables, elles ont une anémie macrocytaire modérée, une robe diluée avec une tache ventrale et des gonades de taille réduite mais restent fertiles (Galli et al., 1994).

.C Mutations connues du gène c-kit (locus W)

Ces mutations W influencent la mélanogénèse, la gamétogénèse, l'hématopoïèse et la

population des mastocytes.

.1 Chez la souris

Tableau 1 : Mutations du locus W/gène c-kit d'après Chu and Besmer (1995)

<i>Mutation</i>	<i>Phénotype hétérozygote</i>	<i>Phénotype homozygote</i>	<i>Lésion moléculaire</i>	<i>Localisation génomique</i>
W^{42}	Pas de pigmentation, anémie modérée, fertilité réduite	Létalité prénatale	Asp790→Asn	Exon 17
W^{37}	Pelage marbré	Létalité prénatale	Glu582→Lys	Exon 11
$W^v = W^{55}$	Tache ventrale, anémie modérée, fertile	Pas de pigmentation, anémie modérée, stérile	Thr660→Met	Exon 13
W^{41}	Tache ventrale, anémie modérée	Pigmentation très légère, anémie modérée, fertile	Val831→Met	Exon 18
W	Tacheté	Létalité périnatale Sévère anémie, pas de pigmentation	Délétion d'ARNm (épissage défectueux), protéine absente	Intron 10 (domaine transmembranaire)
W^x	Tacheté	Létalité périnatale, sévère anémie, pas de pigmentation	Réarrangement du gène	Région des exons 9 à 15
W^{19H}	Tacheté	Létalité très précoce	Délétion importante	Loci Ph, W, Rw
W^{44}	Petite tache	Pigmentation très légère, pas d'anémie, fertilité réduite	Insertion donc ARNm et protéine réduits	Intron 4 ou 5
W^{57}	Petite tache	Taches blanches, anémie modérée, fertile	ARNm et protéine très réduits	?
W^{sh}	Ceinture blanche	Pas de pigmentation, pas d'anémie, fertile	Absence d'ARNm dans les mastocytes	?
W^{jic}	?	?	Substitution Gly595	Domaine tyrosine kinase
W^n	?	?	Substitution Ala835	Domaine tyrosine kinase
W^f	?	?	Substitution Arg816	Domaine tyrosine kinase

Il existe trois types de mutations :

- **Mutations dans le domaine tyrosine-kinase** nommées W^{42} , W^{37} , W^v (W^{55}),

W^{41} , W^{44} , W^{jic} , W^n , W^f . Elles semblent interférer avec la transduction du signal kinase-dépendant tout en préservant un récepteur c-kit de taille normale et présent à la surface des cellules.

- **Délétion** (mutation W) de 78 acides aminés dans le domaine transmembranaire et dans la région C-terminale du domaine tyrosine kinase. Le gène est plus petit et ne permet pas l'expression membranaire du récepteur.
- **Mutation W^{19H}** qui consiste en une délétion complète du gène c-kit et entraîne une absence totale de récepteur c-kit à la surface cellulaire.

Les défauts chez les souris hétérozygotes avec des mutations non-sens (W^{42} , W^{37} , $W^v = W^{55}$, W^{41} et W) sont plus sévères que ceux des souris hétérozygotes qui ont des récepteurs tronqués. Les mutations sont multiples et sont associées à des altérations structurales du gène *c-kit*, comprenant des mutations de structure et de régulation. Plusieurs sont des substitutions uniques de paire de base dans la région codant pour le domaine kinase et cela génère une perte partielle ou totale de l'activité kinase du récepteur c-kit. Dans les stades hétérozygotes, plus la mutation est sévère, plus la perte de fonction du récepteur c-kit est importante et plus la fonction vitale est entravée. Les animaux dépourvus de toute activité tyrosine kinase de leur c-kit meurent *in utero* alors que les animaux qui ont un niveau réduit de l'activité tyrosine kinase de leur c-kit peuvent survivre jusqu'à l'âge adulte (McCulloch and Minden, 1993).

Nous avons vu précédemment que le récepteur c-kit se dimérise suite à la fixation du ligand et que cette dimérisation est nécessaire pour que la transduction du signal ait lieu. Aussi, les mutations dans le domaine tyrosine-kinase semblent affecter la dimérisation des récepteurs même s'ils sont par ailleurs normaux (Zsebo et al., 1990).

.2 Chez le rat

Une mutation nommée W^s donne un phénotype semblable à celui obtenu avec la mutation de la souris W^v . Les rats atteints sont blancs aux yeux noirs, anémiés et ont un déficit très important en mastocytes (Galli et al., 1994).

.3 Chez l'homme

Des mutations ont aussi été identifiées et sont à l'origine du piébaldisme avec des zones apigmentées de la peau (souvent limitée à une partie du front) et des cheveux (mèche blanche). Ce sont des mutations ponctuelles (substitutions) dans le domaine kinase au niveau des codons 583 (Acide glutamique), 584 (phénylalanine), 664 (glycine) ainsi que des mutations affectant la structure dans les codons 561 et 642 (Galli et al., 1994).

.D Mutations connues du gène *SCF* (locus *Sl*)

Ces mutations ont des effets beaucoup plus dramatiques que celles du gène *c-kit*, les mutants homozygotes meurent en général *in utero* ou bien très rapidement après la naissance, et résultent de délétions qui produisent une perte totale de la fonction du SCF. Différentes mutations ont été identifiées : (tableau 2)

Tableau 2 : Mutations du locus *Sl* /gène *SCF* (Copeland et al. 1990)

<i>Mutation</i>	<i>Mode d'induction</i>	<i>Phénotype hétérozygote</i>	<i>Phénotype homozygote</i>	<i>Altération structurale</i>
<i>Sl^l</i> (Steel-J)	Spontanée	Pelage ventral dilué, bout de la queue blanc	Létalité prénatale : mort dans les 15 ^{iers} jours de gestation	Délétion
<i>Sl^d</i> (Steel-Dickie)	Spontanée	Pelage dilué légèrement +/- taché	Viable, yeux noirs, pelage blanc, stérile, anémie sévère	EcoR1, RFLP
<i>Sl^{gb}</i> (Grizzle Belly)	Spontanée	Ventre clair	Anémie, létal durant la 1 ^{ère} semaine après la naissance	Délétion
<i>Sl^{8H}</i> (Steel-8 ^H)	X-radiations	Pelage et pattes plus clairs, +/- tachés	Anémie, létalité prénatale	Délétion
<i>Sl^{10H}</i> (Steel-10 ^H)	X-radiations	Pelage et pattes plus clairs, +/- tachés	Anémie, létalité néonatale	Délétion
<i>Sl^{pan}</i> (Panda= <i>Sl^{11H}</i>)	X-radiations	Pelage et pattes plus clairs, +/- tachés	Viable, yeux noirs, pelage blanc, mâles fertiles et femelles stériles	Aucune
<i>Sl^{17H}</i> (Steel-17 ^H)	Ac. Nitro-éthylrique (amines carcinogènes)	Tache blanche sur la queue et/ou sur les pattes, pelage dilué	Viable, yeux noirs, pelage blanc, mâles stériles et femelles fertiles	Aucune
<i>Sl^{18H}</i> (Steel-18 ^H)	X-radiations	Pelage grisé, oreilles et queue pâles, tache sur la tête +/- tache sur nez et ventre, anémie et viabilité réduite	Létalité prénatale, mort rapide après implantation des embryons	Délétion
<i>Sl</i>	Mutation originelle	Pelage dilué, anémie modérée, fertile (gonades réduites)	Pelage blanc, stérile, létalité périnatale (anémie)	

.E Mutations « actives »

En étudiant différentes tumeurs, l'analyse génétique a permis de mettre en évidence des mutations spécifiques du gène *c-kit* : ce sont des mutations ponctuelles qui conduisent toutes à une activation autonome, constitutive et permanente du récepteur *c-kit*.

.1 Mutations « actives » dans le domaine kinase

Ces mutations ponctuelles ont été identifiées dans trois lignées de mastocytes (les cellules P-815 chez la souris, les RBL du rat et les cellules HMC-1 chez l'homme). Elles surviennent

dans le domaine kinase du récepteur c-kit et elles consistent en une substitution de l'acide aminé Asparagine du codon 814 par une Tyrosine. Il existe aussi une autre mutation au niveau de ce même codon (814) qui repose sur la substitution de l'Asparagine par une Valine chez la souris. Cette mutation identifiée dans les cellules murines P-815 correspond à la mutation retrouvée au niveau du codon 816 qui substitue une Asparagine par une Valine dans les cellules HMC-1 de la leucémie mastocytaire chez l'homme. Ces mutations sont dominantes positives (Tsujimura et al., 1994 ; Pignon, 1997).

.2 Mutations « actives » dans le domaine juxtamembranaire

Elles sont de deux natures (mutation ponctuelle et délétion) et génèrent aussi une activation autonome et constitutive du récepteur c-kit en l'absence de fixation du ligand.

La première est une substitution de la Valine du codon 559 par une Glycine dans le gène *c-kit* murin. Il existe une mutation équivalente retrouvée chez l'homme dans les cellules HMC-1 qui consiste en la substitution de la Valine du codon 560 par une Glycine (Furitsu et al., 1993 ; Tsujimura et al., 1997).

Ces mutations ponctuelles qui affectent le gène *c-kit* de l'homme sont détectées au niveau des mastocytes des patients atteints de mastocytose cutanée associée à des désordres hématologiques ainsi que chez ceux souffrant d'urticaire pigmenté.

Il existe aussi des cellules murines de mastocytome, les cellules FMA3 chez lesquelles l'ADN du c-kit ne porte pas de mutation ponctuelle comme celles identifiées dans les cellules HMC-1, RBL et P-815 mais comporte une délétion structurale de 21 paires de base. Cette lésion implique les nucléotides 1745 à 1765 qui codent pour les acides aminés suivants : Thr-Gln-Leu-Pro-Tyr-Asp-His (codons 573 à 579) situés dans le domaine juxtamembranaire. Cette délétion génère aussi une activation autonome et constitutive du récepteur c-kit présent dans ces cellules FMA3 (Tsujimura et al., 1997).

Ces mutations identifiées dans des lignées cellulaires de mastocytes de différentes espèces sont retrouvées dans des mastocytes de multiples pathologies tumorales, aussi il nous est facile de supposer très fortement que ces mutations responsables de l'activation constitutive du c-kit ont un rôle dans le développement tumoral des mastocytes.

Tableau 3: Récapitulatif des mutations du c-kit identifiées dans différentes lignées

cellulaires de mastocytes, d'après Geguera et al. (2000)

Néoplasie	Espèce	Mutation
Lignée cellulaire de leucémie mastocytaire (HMC-1)	Humaine	Substitutions : Val560→Gly Asp816→Val
Lignée cellulaire de tumeur des mastocytes (P-815)	Murine	Substitution : Asp814→Tyr
Lignée cellulaire de tumeur des mastocytes (FMA3)	Murine	Délétion de 7 A.A du 573 ^{ième} au 579 ^{ième}
Lignée cellulaire de tumeur des mastocytes (RBL-2H3)	Rat	Substitution : Asp817→Tyr
Lignée cellulaire de tumeur des mastocytes (C2)	Canine	Insertion de 48 pb entre les nucléotides 1784 et 1785 Délétion de 4 A.A dans l'exon 9

.F Conséquences de ces mutations

Qu'il y ait une mutation ou non du gène *c-kit*, la protéine *c-kit* se présente sous forme mature (longue, 145 kD) et immature (courte, 125 kD). Après stimulation par le SCF, la forme mature du *c-kit* normal (sauvage) est phosphorylée sur son résidu tyrosine. Au contraire, les formes mature et immature du *c-kit Gly 559* et du *c-kit Val 814* (figure 14) sont extrêmement phosphorylées sans tenir compte de la stimulation par le SCF (figure 15). Ceci confirme que les *c-kit Gly 559* et *Val 814* subissent une phosphorylation constitutive sur leur résidu tyrosine, c'est-à-dire indépendante de la fixation du ligand SCF (Furitsu et al., 1993 ; Kitayama et al., 1995).

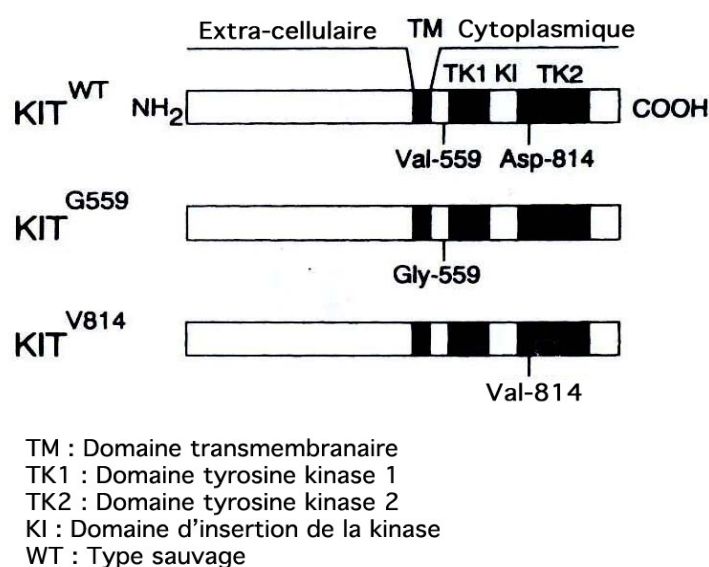


Figure 14 : Représentation schématique des mutations *c-kit* G559 et *c-kit* V814 (Kitayama et al., 1995)

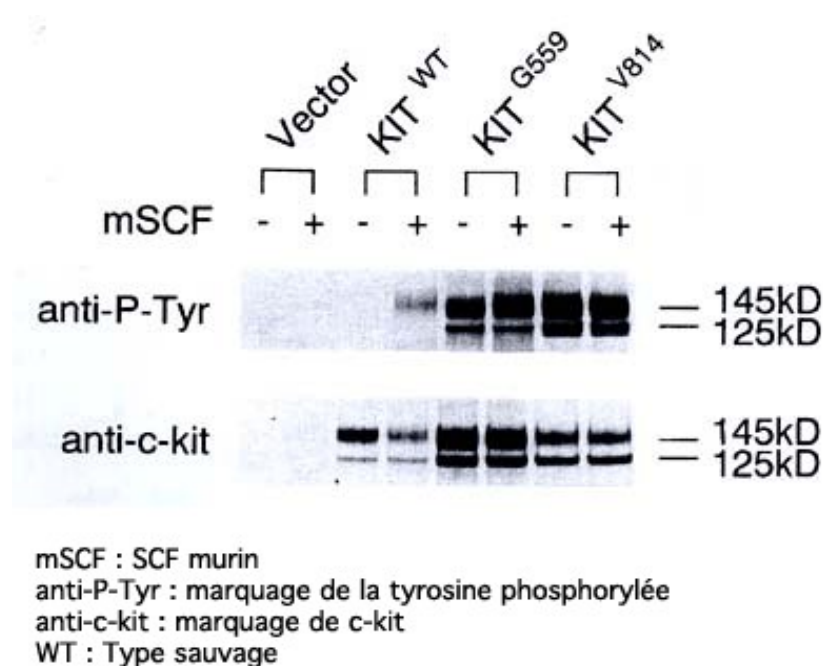


Figure 15 : Mise en évidence de la tyrosine-phosphorylation en fonction des mutations du *c-kit*, par Western blot (Kitayama et al., 1995)

.1 Action sur la dimérisation du récepteur *c-kit*

La dimérisation du récepteur est un événement clé dans la transmission du signal. Pour savoir si les mutations actives du *c-kit* conduisent à la dimérisation du récepteur sans tenir compte de la stimulation par le ligand SCF, les formes phosphorylées des *c-kit sauvage*, *Gly 559*, *FMA3* et *Val 814* avec ou sans SCF ont été comparées. Comme prévu, le SCF induit la phosphorylation du *c-kit sauvage* et la forme phosphorylée est détectée comme une protéine de masse moléculaire 330 kD. Elle représente un dimère du *c-kit* et de son ligand SCF. Au contraire, une protéine *c-kit Gly 559* phosphorylée et une protéine *c-kit FMA3* phosphorylée sont détectées comme un homodimère de masse moléculaire 290 kD en l'absence de SCF. Suite à la stimulation par le SCF, les dimères issus de cette phosphorylation ; complexe *c-kit Gly 559*-SCF et complexe *c-kit FMA3*-SCF ont des masses moléculaires de 330 kD. Quant au *c-kit Val 814*, il est à peine détectable dans sa forme dimérique de 290 kD sans aucune stimulation par le SCF alors qu'une masse moléculaire de 330 kD qui représente un homodimère du complexe *c-kit Val 814*-SCF est détectée après stimulation par le SCF. Ces résultats montrent que les mutations actives dans le domaine juxtamembranaire (*Gly 559*, *FMA3*) induisent la dimérisation du récepteur *c-kit* sans aucune stimulation par le SCF, alors que la mutation active dans le domaine kinase (*Val 814*) ne semble pas induire d'association du récepteur au moins dans son domaine extracellulaire (Kitayama et al., 1995).

.2 Action sur l'internalisation (dégradation) du récepteur *c-kit*

La régulation négative (« down-regulation ») des récepteurs dépendante du ligand est un

mécanisme d'atténuation du signal généré par le ligand. La disparition du signal d'internalisation semble induire l'activation constitutive du c-kit. Aussi, l'internalisation des récepteurs c-kit a elle été étudiée en présence ou non de SCF (Tsujimura et al., 1997).

.a Récepteurs c-kit FMA3

Quand les cellules FMA3 sont incubées avec du SCF, le nombre de récepteurs *c-kit FMA3* diminue fortement. Sans SCF, l'expression à la surface cellulaire du *c-kit FMA3* est très peu diminuée. Ces résultats montrent que les récepteurs *c-kit FMA3* activés de manière constitutive se dimérisent indépendamment de la fixation du SCF mais ne sont pas internalisés sans SCF. (figure 16)

.b Récepteurs c-kit Val 814

En étudiant la dégradation du *c-kit Val 814* en l'absence ou en la présence de SCF, il a été démontré que la stimulation par le SCF entraîne une dégradation rapide du c-kit normal ou muté. Par contre, seul le *c-kit Val 814* est dégradé continuellement en l'absence de SCF. Aussi, ces résultats suggèrent que la transformation de l'activité du *c-kit Val 814* ne résulte pas d'une erreur dans la régulation négative des récepteurs comme cela a été montré pour le *c-kit FMA3* et le *c-kit G559*. Ainsi, Tsujimura et al. (1997) montrent qu'il existe au moins deux mécanismes différents qui interviennent dans l'activation constitutive du c-kit. (figure 16)

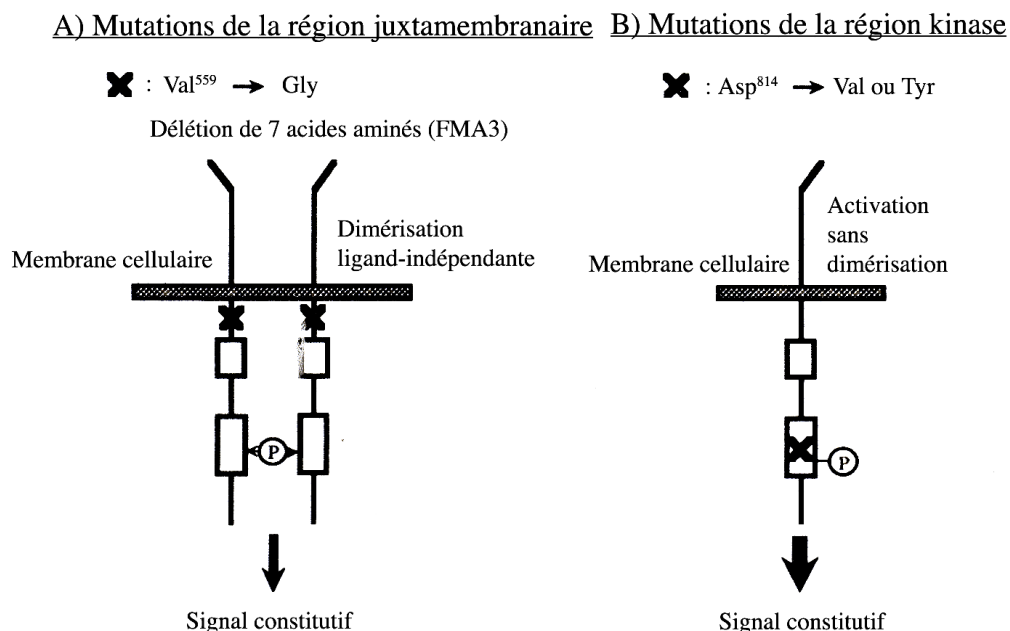


Figure 16 : Mécanisme supposé d'activation constitutive du récepteur c-kit d'après Tsujimura et al. (1997)

.3 Action sur la croissance cellulaire

Il existe un autre rôle des mutations actives à savoir leur influence sur la croissance cellulaire en l'absence de facteurs de croissance. Aussi, la prolifération de cellules hématopoïétiques exprimant les *c-kit sauvage*, *Gly 559* ou *Val 814* a été mesurée en présence ou non de facteur de croissance (IL-3, SCF). Les cellules exprimant le *c-kit sauvage* montrent une prolifération cellulaire dose-dépendante en présence d'IL-3 et de SCF. Pour les cellules exprimant les *c-kit* mutés, elles prolifèrent en l'absence de facteurs exogènes comme l'IL-3 ou le SCF et ces deux derniers facteurs ont un effet minimal sur leur prolifération. Comme contrôle négatif, des cellules n'exprimant pas de récepteur *c-kit* ont aussi été incubées en présence d'IL-3 et de SCF. L'IL-3 induit une prolifération de ces cellules dose-dépendante alors que le SCF n'a absolument aucun effet sur la croissance cellulaire (Kitayama et al., 1995).

.4 Action sur la genèse tumorale

Pour évaluer le potentiel de malignité des cellules exprimant les *c-kit* mutés, elles ont été inoculées par voie sous-cutanée à des souris «nude» (athymiques). Les cellules exprimant les *c-kit Gly 559* et *Val 814* ont induit de grosses tumeurs à chaque site d'inoculation au bout de 10 jours et toutes les souris sont mortes de leucémie au bout de 2 ou 3 semaines. Les souris ayant reçu des cellules exprimant le *c-kit sauvage* n'ont développé aucune tumeur au bout de 2 semaines mais des petits nodules sont apparus sur 3 des 8 sites d'injection au bout de trois semaines (Kitayama et al., 1995).

.5 Conclusion

Ainsi, les mutations *Gly 559*, *Val 814* et *FMA3* du *c-kit* n'induisent pas seulement la phosphorylation constitutive de la tyrosine du récepteur *c-kit* en l'absence du ligand exogène SCF, mais aussi la croissance des cellules hématopoïétiques murines dépendantes de l'IL-3 (en l'absence du ligand aussi). De plus, ces mutations ont des capacités de genèse tumorale. Même si les protéines *c-kit Gly 559* et *Val 814* ont le même potentiel oncogénique, il est important de préciser que le *c-kit Val 814* engendre un niveau supérieur de phosphorylation et une activation plus importante que le *c-kit Gly 559*.

.G Conséquences mécanistiques des mutations *Gly 559* et *Val 814*

Malgré les effets dramatiques des mutations *Gly 559*, *Val 814* et autres, les mécanismes précis par lesquels les mutations du *c-kit* activent la tyrosine kinase et transmettent les signaux oncogènes à travers la cellule ne sont pas totalement connus. Bien que des hypothèses se basent sur le mode d'action du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGF : Epidermal Growth Factor) qui serait activé par un mécanisme intramoléculaire sans

dimérisation des récepteurs, un très grand nombre d'études ont montré que la dimérisation du récepteur jouait un rôle essentiel dans l'activation de la protéine kinase et aussi dans la transmission du signal. De plus, les mécanismes de transphosphorylation entre les deux domaines kinase des récepteurs dimérisés qui se produisent après la fixation du ligand, sont à l'heure actuelle considérés comme le mécanisme naturel d'activation des récepteurs c-kit. Cependant, les deux mutations n'ont pas le même mode d'action car seule la mutation *Gly 559* permet au c-kit d'être sous forme dimérisée en l'absence de SCF. Cette mutation provoquerait la dimérisation du récepteur d'où une activation enzymatique qui conduirait à la transformation cellulaire. Au contraire, la forme dimère du *c-kit Val 814* en l'absence de SCF est quasi indétectable. Cette mutation serait donc une mutation active unique qui, indépendamment de la dimérisation extra-cellulaire du récepteur, induit la croissance cellulaire indépendamment des facteurs de croissance et la tumorigenèse. Les associations entre récepteurs *c-kit Val 814* se feraient dans le domaine cytoplasmique et conduiraient à l'activation du récepteur et à la transformation cellulaire (Kitayama et al., 1995).

.H Mutation d'un gène codant pour le facteur de transcription MITF

Le locus *mi-* sur le chromosome 6 chez la souris code pour un facteur de transcription connu appelé MITF. Des mutations de ce dernier ont été identifiées et consistent en une délétion de 1 à 4 résidus Arginine dans le domaine de base. Les souris mutantes homozygotes développent une myocardiopathie, une disparition pigmentaire des poils et des yeux ainsi que de l'ostéoporose. De plus, ces souris ont une déficience en mastocytes avec une faible réponse de ces cellules à la stimulation par leur facteur de croissance : le SCF. Un défaut d'expression du *c-kit* est alors suspecté. Le MITF apparaît impliqué dans la régulation de la transcription du gène *c-kit* des mastocytes. De surcroît, une délétion ou une mutation ponctuelle dans le promoteur du gène *c-kit* inhibe l'activité du MITF. Par conséquent, si l'activation du promoteur du gène *c-kit* n'a pas lieu, la transcription ne se fait pas et ceci aboutit à une déficience en récepteurs c-kit, une très faible stimulation cellulaire par le SCF et donc une déficience en mastocytes (Tsujimura et al., 1996).

.II Etude de l'expression du c-kit dans différentes tumeurs

Pour étudier les corrélations entre le niveau d'expression du *c-kit* et la progression tumorale, toutes les tumeurs dans lesquelles est détecté le c-kit ont été analysées.

.A Etude chez l'homme

.1 Les mastocytoses

Chez l'homme, c'est une pathologie importante dans laquelle le *c-kit* est impliqué. Il existe différents stades de mastocytose : **mastocytose indolente** (catégorie I), **mastocytose associée à un désordre hématologique** (catégorie II, syndrome de myélodysplasie), **mastocytose agressive** avec lymphadénopathie et éosinophilie (catégorie III), et la IV^{ème} catégorie qui est la **leucémie mastocytaire**. Aussi, ces tumeurs ont permis d'étudier le comportement du *c-kit* chez l'homme en le comparant avec des sujets sains (Pignon, 1997).

.a Expression de l'ARN *c-kit* en fonction du stade de mastocytose

Pour connaître le niveau d'expression du *c-kit*, c'est la quantité d'ARNm codant pour le *c-kit* extrait des cellules mononucléées du sang périphérique qui a été mesurée. La quantité d'ARNm du *c-kit* issu de ces cellules est significativement plus élevée chez les patients atteints de mastocytose associée à un désordre hématologique, de mastocytose agressive ou de leucémie mastocytaire, par rapport aux contrôles (patients sains) mais elle reste faible chez les patients atteints de mastocytose indolente. Il apparaît donc que l'augmentation de l'ARNm du *c-kit* est corrélée à la présence d'un désordre hématologique et reflèterait l'expansion des cellules exprimant le *c-kit* dans le sang périphérique.

Le niveau d'expression des deux isoformes du *c-kit* des patients atteints de mastocytose ne paraît pas sensiblement différent de celui observé chez les patients sains. Il n'y a donc pas de réel défaut du niveau d'expression des isoformes du *c-kit* dans les cellules mononucléées du sang périphérique.

Des processus pathologiques variés pourraient expliquer les différentes catégories de mastocytose, mais chez certains patients atteints de mastocytose, un processus dysplasique est associé qui traduit une surexpression du *c-kit* (Nagata et al., 1998).

.b Origine de l'excès du c-kit lors de mastocytose

Dans le système hématologique humain, une population de cellules souches CD34⁺ expriment le récepteur c-kit. Les cellules CD34⁺ sont les cellules qui expriment majoritairement le c-kit parmi les cellules mononucléées du sang périphérique chez un sujet sain. Ces cellules CD34⁺ restent néanmoins peu nombreuses au sein des cellules mononucléées du sang périphérique et

aucun mastocyte circulant n'est présent dans les conditions normales. Les mastocytes contrairement aux neutrophiles et aux autres cellules myéloïdes expriment le récepteur c-kit à leur stade de cellule mature. Aussi, la surexpression du c-kit lors de mastocytose pourrait être due à la fois à l'augmentation des cellules CD34⁺ et à l'augmentation des mastocytes et de leurs précurseurs. Tous ont été détectés sur des ponctions de moelle osseuse et sur des frottis de sang périphérique (Nagata et al., 1998).

.c Rôle de la forme soluble du SCF lors de mastocytose cutanée

Un autre mécanisme dépendant de l'expression du SCF qui stimule la prolifération des mastocytes et augmente la production de mélanine par les mastocytes semble pouvoir expliquer le développement d'une mastocytose cutanée. Longley et al. (1993) a comparé l'expression du gène SCF dans la peau des patients atteints de mastocytose cutanée et dans la peau de sujets sains. Dans la peau saine, le SCF est associé aux kératinocytes, aux cellules dermiques éparpillées et aux mastocytes ce qui correspond à une reconnaissance du SCF par une structure de récepteur membranaire, c-kit. La production de la forme soluble de SCF résultant du clivage protéolytique de la forme longue (cf supra) dépend alors normalement de la présence de l'ARNm codant pour le SCF et de l'activité protéase. Par contre, dans une peau lésée ou dans une peau cliniquement saine de patients atteints de mastocytose, le SCF est retrouvé associé aux mastocytes mais aussi dans les espaces extracellulaires entre les kératinocytes. La forme soluble du SCF serait donc responsable de cette accumulation caractéristique des mastocytes. La modification de la distribution du SCF dans la peau des patients atteints de mastocytose cutanée repose sur une production anormale de la forme soluble de ce facteur.

.d Origines de ce dérèglement

Comme les séquences d'ARNm de SCF sont normales et qu'aucune anomalie n'est présente dans l'exon 6 (contrôlant l'expression du site de clivage), la forme soluble pourrait résulter d'une altération du métabolisme des mastocytes et du catabolisme des ARNms de SCF ou d'une production par un type cellulaire autre que les kératinocytes, les fibroblastes ou encore les cellules dendritiques du derme. Dans tous les cas, cette forme soluble est le résultat d'une erreur se produisant en aval des processus de transcription et de maturation (épissage) des ARNms, et engendre une prolifération anormale des mastocytes qui ressemble plus à une hyperplasie réactive qu'à un processus néoplasique (Longley et al., 1993).

.e Mutations identifiées lors de mastocytose

Worobec et al. (1998) ont mis en évidence la mutation *Asp816Val* du récepteur c-kit dans les cellules mononucléées du sang périphérique chez les patients atteints de mastocytose

systémique. L'équipe de Longley et al. (1999) a confirmé que cette même mutation était caractéristique de la mastocytose sporadique de l'adulte. En effet, les sujets pédiatriques atteints de mastocytose n'expriment pas cette mutation et la mastocytose familiale semble survenir en l'absence de mutation codante du *c-kit*.

Par contre, après avoir étudié quelques cas de SMCD (Systemic Mast Cell Disease) qui est une pathologie caractérisée par la prolifération des mastocytes dans différents tissus, l'équipe de Pignon et al. (1997) a identifié une nouvelle mutation du *c-kit*, l'*Asp820Gly* qui se situe près de la mutation *Asp816Val* connue pour ses propriétés hautement oncogènes. Aussi, l'*Asp820Gly* est supposé jouer un rôle dans l'activation du *c-kit*.

.2 Les tumeurs stromales digestives (GIST : GastroIntestinal Stromal Tumor)

.a Etude des GIST

C'est l'autre grande entité pathologique faisant intervenir la protéine *c-kit* chez l'homme. Ce sont les tumeurs mésoenchymateuses (ou conjonctives) les plus fréquentes du tube digestif. Ces tumeurs font partie de nombreuses controverses en terme d'histogénèse et de classification (différenciation cellulaire). De plus leur potentiel de malignité est souvent difficile à évaluer. Ce sont des tumeurs relativement rares, moins de 1 % des tumeurs malignes du tube digestif et elles représentent 20 % des tumeurs malignes de l'intestin grêle. Elles surviennent chez les adultes de tout âge, le plus souvent après 50 ans, sans prédominance liée au sexe. Leur siège se répartit ainsi : estomac 60 à 70 %, intestin grêle 20 à 30 %, rectum 5 % et œsophage <5%. Macroscopiquement, ces tumeurs se développent principalement à partir de la musculature du tube digestif, leur taille varie de quelques millimètres à 30 cm de diamètre. Elles sont habituellement bien délimitées, formées d'un tissu fasciculé, parfois entourées d'une pseudo-capsule (surface lisse). La tumeur est constituée le plus souvent d'une prolifération de cellules fusiformes, plus rarement épithélioïdes. Les degrés de différenciation sont variables et ces aspects variés de différenciation peuvent être tous présents au sein de la tumeur (Provendier and Rifard, 2003).

.b Diagnostic et pronostic

En cas de tumeur digestive d'aspect macroscopique et histologique compatible avec le diagnostic de tumeur stromale, l'immuno-histochimie est utilisée avec un immuno-marquage CD 34 qui est positif dans 50 à 80 % des cas et un immuno-marquage CD 117 (épitope antigénique du récepteur *c-kit*) qui est exclusivement cytoplasmique et positif dans la majorité des cas. Dans le tube digestif normal, la protéine *c-kit* est, en dehors des mastocytes, spécifiquement exprimée par les cellules interstitielles de Cajal, qui sont des cellules «pace-maker» responsables de l'induction et de la régulation de l'activité péristaltique de la

musculature cellulaire lisse. Ces cellules expriment en plus le CD 34, suggérant qu'elles pourraient être à l'origine des tumeurs stromales. Les facteurs prédictifs de malignité sont l'invasion d'organes de voisinage ou la présence de métastases mais actuellement les facteurs de malignité les plus péjoratifs sont l'index mitotique et la taille de la tumeur. Le risque de métastases est faible si la tumeur fait moins de deux cm de diamètre sans mitose visible mais le risque est fort si la tumeur fait plus de cinq cm avec un index mitotique élevé (> 5 mitoses pour 50 champs à fort grossissement). Il n'existe cependant pas de consensus sur les critères de taille et d'index mitotique pour clairement distinguer une tumeur stromale maligne, d'une tumeur à faible risque de malignité ou de risque évolutif indéterminé (Landi et al., 2002 ; Provendier and Rifard, 2003).

.c Corrélation entre le type de mutation et la valeur pronostic

Les mutations du gène *c-kit* seraient plus fréquentes en cas de tumeur stromale ayant un fort potentiel de malignité car elles conduiraient à une accélération de la croissance des cellules concernées. On pense aujourd'hui que l'activation de la protéine *c-kit* mutante est l'événement pathogénique décisif dans le développement des GIST. De plus, après exérèse chirurgicale (qui est le seul traitement curatif des tumeurs stromales localisées), les récurrences et les décès sont plus fréquents chez les patients dont la tumeur stromale présente une mutation dans l'exon 11 du gène *c-kit* (substitution *Val559Asp*). Les mutations de l'exon 11 ont été identifiées sur plus de la moitié des GIST, et engendrent une phosphorylation autonome (en l'absence du ligand) et donc une activation de l'activité tyrosine kinase. D'autres mutations dans l'exon 9 (domaine extra-cellulaire) et dans l'exon 13 (domaine kinase) ont été récemment mises en évidence. Ces mutations actives seraient corrélées au degré de malignité des GIST et constitueraient des marqueurs pronostic des GIST (diminution de la durée de survie). Une survie de 5 ans est observée chez 86 % des patients sans mutation de l'exon 11. Par contre, seulement 49 % des patients avec une mutation de l'exon 11 ont une espérance de vie de 5 ans. En raison du fort taux de récurrence après exérèse, un traitement adjuvant pourrait être utile en cas de tumeur ayant des critères histologiques de mauvais pronostic. Il n'existe cependant aucune preuve d'efficacité de la radiothérapie ou de la chimiothérapie adjuvante (Demetri, 2001 ; Landi et al., 2002).

En conclusion, chez l'homme, l'expression de la protéine *c-kit* est corrélée à la malignité de la tumeur lors de mastocytose et de GIST alors que les mélanomes cutanés et le cancer du sein sont des tumeurs dans lesquelles il y a une perte d'expression de *c-kit*. (Nagata et al, 1998 ; London et al, 1996).

.B Etude chez le chien

.1 Le mastocytome

.a Rappels sur le mastocytome

Chez le chien, c'est une des tumeurs cutanées les plus fréquentes et cliniquement trois formes sont distinguées avec en particulier une forme cutanée qui pourrait représenter de 5 à 20 % des tumeurs de la peau. Les chiens atteints sont habituellement âgés (huit ans et demi en moyenne) mais des cas ont été décrits chez de jeunes animaux. Aucune prédisposition sexuelle n'est connue mais il existe une prédisposition raciale marquée. Ainsi, les boxers, bull et Boston terriers sont des races à haut risque ; le labrador est parfois cité. Les trois formes cliniques des mastocytomes sont : 1) une forme cutanée (simple ou multicentrique au niveau de la tête et du cou (10 %), du corps et de la région périnéale (50 %) et des extrémités (40%)), 2) une forme extra-cutanée (foie, rate, cavité buccale, larynx, tissu pulmonaire, os) et 3) une forme systémique caractérisée par une leucémie mastocytaire (Bensignor et al., 1996). La classification des mastocytomes selon Patnaïk permet d'établir un «grading» et donc un histopronostic. (tableau 4)

Tableau 4 : Grading simplifié et histopronostic des mastocytomes cutanés canins d'après Patnaïk et al (1984)

Grade	I	II	III
Fréquence (%)	36	43	20
Degré de l'envahissement tumoral	derme	derme et tissu sous-cutané	Tissu sous-cutané et profond
Densité et morphologie cellulaire	Cellules bien différenciées, granulations nombreuses	Cellules peu différenciées, granulations fines ou anormalement grosses	Cellules très indifférenciées, granulations fines ou absentes
Indice mitotique	Pas de mitose	Mitoses rares	Mitoses nombreuses
Nature de la stroma réaction	nulle	Zones diffuses d'œdème et de nécrose	Œdème, hémorragie et/ou nécrose
Taux de survie à 4 ans (%)	93	44	6
Taux de survie à 1 an (%)	95	60	10

.b Relation expression du c-kit/grade du mastocytome

Reguera et al. (2000) ont étudié le taux d'expression du *c-kit* dans de nombreuses tumeurs des mastocytes et ont cherché s'il y avait une corrélation entre le grade de différenciation des cellules tumorales et l'expression du récepteur.

Dans la peau saine, l'expression du *c-kit* est spécifique aux mastocytes et dans ces mastocytes sains, l'expression du *c-kit* est faible et localisée à la membrane cellulaire.

- Niveau d'expression :

Dans les tumeurs cutanées, tous les mastocytes expriment le *c-kit* mais il existe des différences en fonction du grade : les cellules des mastocytomes de grade I l'expriment faiblement, celles des mastocytomes de grade II l'expriment de façon plus variable et les mastocytes des tumeurs de grade III ont le plus souvent une expression importante de l'oncogène. Par conséquent, il existe une corrélation inverse entre le degré de différenciation et l'expression du *c-kit* ; les mastocytomes bien différenciés (grade I) expriment peu le *c-kit* alors que les mastocytomes peu différenciés (grade III) ont une forte expression de ce dernier.

- Distribution :

Dans les mastocytomes de grade I, les récepteurs *c-kit* sont dispersés dans le cytoplasme et sur la membrane cellulaire des mastocytes. Dans ceux de grade II, les récepteurs sont détectés le plus souvent dans le cytoplasme des mastocytes et tout près du noyau, seule une faible proportion admet une localisation membranaire. Dans les mastocytes des tumeurs de grade III, la localisation des récepteurs est diffuse ou concentrée dans le cytoplasme et jamais dans la membrane. Alors que dans les mastocytes sains, la localisation de la protéine *c-kit* est membranaire, la distribution de cette protéine devient cytoplasmique voire périnucléaire dans le cas de mastocytes tumoraux.

.c Pourquoi cette différence de distribution ?

Comme les récepteurs *c-kit* activés par la forme soluble du SCF ou par des mutations actives sont internalisés, la localisation intracellulaire du récepteur devient cytoplasmique dans les tumeurs de haut grade de malignité. D'autre part, les mécanismes d'amplification génique de *c-kit* entraînent une très forte activité de synthèse cytoplasmique de *c-kit* qui précède leur routage dans la membrane. Ces tumeurs sont probablement génétiquement hétérogènes. Les tumeurs de grade I pourraient être le résultat d'une surproduction de ligand SCF par des cellules annexes, alors que des tumeurs plus agressives pourraient être la conséquence de mutations génétiques qui entraînent une activation constitutive du récepteur. Cependant, aucune recherche pour identifier des mutations dans les tumeurs des mastocytes canines des grades I et III n'a abouti (Reguera et al., 2000).

.d Utilisation du c-kit pour le diagnostic tumoral

La plupart des tumeurs des mastocytes du chien sont faciles à diagnostiquer sauf les grades III qui sont difficiles en raison de leur aspect histologique très variable. De plus, le diagnostic par histochimie est difficile car les mastocytomes indifférenciés ne présentent parfois pas de granule cytoplasmique et ne se colorent donc pas. Aussi, le c-kit se révèle ainsi comme un marqueur immunohistochimique fiable des mastocytes canins et des tumeurs indifférenciées des mastocytes (Reguera et al., 2000).

Une étude plus précise de London et al. (1996) sur des tumeurs de grade II a été effectuée. Elle a montré qu'effectivement les mastocytes tumoraux expriment le récepteur c-kit et que celui-ci est fonctionnel, c'est-à-dire qu'il fixe correctement le ligand SCF.

.e Etude de la duplication tandem du c-kit

London et al. (1999) a étudié la séquence de l'ARNm codant pour le *c-kit* issu de plusieurs tumeurs des mastocytes canines. Aucune mutation ponctuelle active dans le domaine tyrosine kinase n'a été mise en évidence. Par contre, la même duplication tandem a été mise en évidence dans les ARNms du *c-kit* issus des tumeurs des mastocytes (mastocytome de grade II) ainsi que dans les ARNms du *c-kit* issus des lignées cellulaires de mastocytes tumoraux C1 et C2. (annexe 2) Cette duplication est une séquence identique répétée deux fois entre les exons 11 et 12 et elle inclut une partie plus ou moins importante de l'exon 11. Elle correspond à deux séquences d'environ 45 à 70 pb. (figure 17)

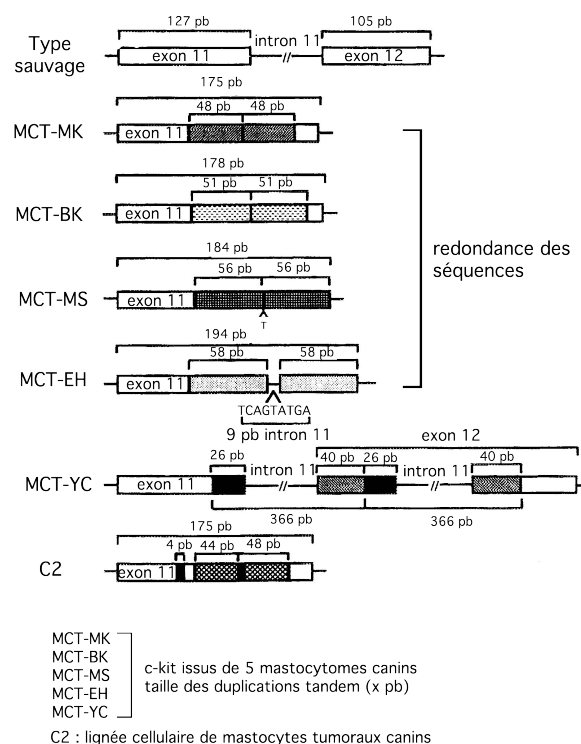


Figure 17 : Représentation des duplications tandem au sein des exons 11 et 12 des c-kit issus de mastocytes tumoraux (London et al., 1999)

Bien qu'il y ait de légères différences dans les duplications des tumeurs étudiées, ces duplications sont toujours présentes dans la région 3' de l'exon 11 et la majorité d'entre elles contiennent la même duplication d'ADN. Cette région est adjacente à l'extrémité 5' du *v-kit* et comprend ainsi la jonction entre les séquences virale et féline dans le virus du sarcome félin à partir duquel a été identifié pour la première fois l'oncogène *kit*.

L'exon 11 code pour le domaine juxtamembranaire qui semble participer à la régulation négative du *c-kit*. Les mutations du *c-kit* détectées dans les mastocytomes canins ne reposent pas sur des délétions dans la séquence codante mais dans la majorité de ces duplications tandem, les acides aminés concernés sont ceux impliqués dans la mutation du *c-kit* des cellules FMA3 (délétion de 21 pb). Aussi, ceci conforte le fait qu'une altération dans le domaine juxtamembranaire du *c-kit* semble compromettre les mécanismes de régulation du *c-kit*.

.f Hypothèses sur le fonctionnement de cette duplication

Les cellules de la lignée C2 qui abritent aussi une duplication tandem subissent une phosphorylation constitutive du *c-kit* sans aucune fixation du ligand SCF. Or, il a été montré que les cellules C2 ne produisent pas de SCF et donc cette phosphorylation constitutive sur le résidu tyrosine n'est pas secondaire à une stimulation autocrine du récepteur. Bien que ne puisse pas être exclue la possibilité que certains mastocytes tumoraux puissent produire eux-mêmes le SCF, il est plus probable que le SCF détecté dans ces tumeurs provienne de cellules stromales saines comme les fibroblastes et/ou les cellules endothéliales vasculaires (London et al., 1999).

Comme les duplications identifiées dans les mastocytomes canins sont très similaires à celle trouvée dans les cellules C2, il est probable qu'elles génèrent aussi une phosphorylation constitutive du *c-kit*. Il faudrait étudier chaque mutation identifiée pour savoir si elle est à l'origine d'une activation constitutive du *c-kit* en l'absence de ligand et pour estimer le potentiel oncogène de chacune de ces mutations.

.g Origine génétique de ces mutations ?

Les événements qui entraînent ces duplications dans le gène *c-kit* sont inconnus. Cependant, les fortes similitudes entre ces différentes séquences en tandem laissent supposer qu'il existe un mécanisme unique. Elles peuvent être dues à des réparations génétiques recombinantes ou bien à des événements d'insertion ou d'excision virale. La prédisposition raciale dans le développement de ces tumeurs plaide en faveur d'une origine génétique de celles-ci. De plus, l'existence de duplications tandem très similaires dans le domaine juxtamembranaire du *c-kit* des mastocytomes canins et du *Flt3* des leucémies myéloïdes aiguës chez l'homme supporte

la notion de l'origine purement génétique avec une instabilité inhérente à cette région particulière de ces gènes. Les altérations dans le domaine juxtamembranaire/proximal de la tyrosine kinase provoquent un dysfonctionnement du récepteur c-kit et contribuent ainsi au développement de tumeurs des mastocytes (London et al., 1999).

.h Rôle de la duplication tandem dans le diagnostic différentiel du mastocytome

Cette duplication tandem au sein du proto-oncogène *c-kit* est mise en évidence par des méthodes moléculaires et c'est un moyen fiable pour diagnostiquer les mastocytomes les plus agressifs (grade III). En effet, une tumeur qui, suite à une analyse histologique, est diagnostiquée provisoirement comme un lymphosarcome systémique avec de nombreuses cellules rondes sans granule cytoplasmique peut se révéler après amplification par PCR du domaine juxtamembranaire du gène *c-kit*, être un mastocytome de grade III (Zemke et al., 2001). Après migration sur gel d'agarose, la duplication est mise en évidence par deux bandes d'environ 50 pb alors que la même opération sur des cellules issues d'un tissu sain ne révèle qu'une seule bande sur le gel (London et al., 1999).

.i Autres mutations actives retrouvées lors de mastocytomes canins

Ma et al. (1999) en a décrit quatre :

- Délétion de six pb qui correspond à la délétion des résidus Try556 et Lys557.
- Délétion de trois pb qui correspond à la délétion du résidu Val558.
- Substitution du résidu Try556 par un résidu Arg (mutation hétérozygote).
- Substitution du résidu Leu575 par un résidu Pro (mutation hétérozygote). Cette même mutation est retrouvée dans les cellules BR (lignée cellulaire de mastocytes tumoraux).

Tous les mutants du *c-kit* précédemment décrits présentent un haut degré de phosphorylation sur les résidus tyrosine de manière spontanée (sans stimulation par le SCF). Ceci montre que ces mutations dans le domaine juxtamembranaire du c-kit mises en évidence lors de mastocytomes canins sont des mutations actives car elles engendrent l'activation autonome du récepteur. Ces mutations dans le domaine juxtamembranaire ont des effets similaires, elles jouent un rôle essentiel dans le développement tumoral des mastocytes.

.2 Les tumeurs mammaires

.a Les différents types de tumeurs mammaires canines

Bien que les mastocytomes soient les tumeurs les plus fréquentes des mastocytes chez le chien, la protéine c-kit est également utilisée pour le diagnostic des tumeurs mammaires. Elles sont très fréquentes chez la chienne et 65 % d'entre elles sont bénignes. L'étude de Kubo et al. (1998) a été réalisée sur des tumeurs mixtes bénignes, des tumeurs mixtes malignes et des adénocarcinomes.

.b Relation entre l'expression de c-kit et la malignité de la tumeur mammaire

Les résultats obtenus montrent que les quantités d'ARNm codant pour la protéine c-kit sont élevées dans les tumeurs mixtes bénignes et dans les adénocarcinomes alors qu'elles sont beaucoup plus faibles dans les tumeurs mixtes malignes.

Comme les tumeurs mammaires mixtes bénignes sont les plus fréquentes et parfois très difficiles à différencier des tumeurs mixtes malignes, l'utilisation de c-kit pourrait permettre de distinguer ces deux situations. En effet, une diminution de l'expression de c-kit caractérise les tumeurs mixtes malignes.

Lors de l'analyse des adénocarcinomes mammaires, une forte amplification de l'expression de *c-kit* a été mise en évidence. En revanche, des adénomes et adénocarcinomes d'autres tissus (glandes apocrines) n'ont montré aucune amplification du *c-kit*. Ainsi, la protéine c-kit est un candidat potentiel en tant que marqueur tumoral en l'associant à l'analyse histologique lors de diagnostic différentiel des tumeurs mammaires chez la chienne.

.3 Autres tumeurs

Nous venons de montrer que les mastocytomes, l'adénocarcinome mammaire et les tumeurs mammaires mixtes bénignes révèlent une amplification de c-kit proportionnelle à la malignité. Cependant il existe d'autres tumeurs malignes pour lesquelles plus le degré de malignité est haut, plus l'expression de *c-kit* diminue. (tableau 5)

Histologie	Amplification de c-kit
Adénocarcinome des glandes apocrines Carcinome cutané des cellules basales Hémangiosarcome Léiomyome vaginal Mélanome malin Carcinome bronchiolo-alvéolaire	-
Mastocytome Lymphosarcome, liposarcome Rhabdomyosarcome des voies urinaires	+

Tableau 5 : Classification histologique de différentes tumeurs canines et expression de c-kit (Kubo et al., 1998).

.III Limites de la protéine c-kit et perspectives thérapeutiques

.A Les limites

La protéine c-kit se révèle être un bon marqueur tumoral pour certaines tumeurs précédemment étudiées, cependant il n'existe pas de règle applicable à toutes les tumeurs surtout en ce qui concerne une corrélation entre le degré de malignité et la quantité de matériel génétique codant pour la protéine c-kit. Par contre, une mutation du gène *c-kit* est toujours associée à un facteur de malignité. Aussi, les chercheurs se sont appuyés sur cette propriété afin de trouver une nouvelle thérapeutique qui pourrait contrer ce développement cellulaire anormal. Ils ont ainsi développé un moyen qui inhibe l'activité principale de cette protéine c-kit, son activité tyrosine kinase.

.B Utilisation des propriétés du c-kit à des fins thérapeutiques

.1 Découverte du STI 571

La molécule STI 571 (le mésylate d'imatinibe) a été mise sur le marché canadien par la firme Novartis Pharma en septembre 2001 en tant qu'antinéoplasique oral indiqué dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique (LMC). La LMC repose sur une anomalie chromosomique qui induit la création du gène *BCR-Abl* responsable de la prolifération des cellules leucémiques. Le proto-oncogène *Abl* code pour une tyrosine kinase et lors de la formation du gène *BCR-Abl*, la tyrosine kinase résultante fonctionne de façon autonome et son activité est accrue. L'imatinibe est un inhibiteur sélectif de certaines tyrosine kinases, en particulier de celle des récepteurs c-abl, c-kit et du récepteur au PDGF (Dionne and Gagnon, 2002). Il s'est avéré également très efficace dans le traitement des tumeurs stromales d'origine digestive (GIST) en agissant contre la tyrosine kinase du c-kit (Demetri, 2001 ; Heinrich et al., 2002). Mieux connue sous le nom déposé de Glivec®, cette substance n'agit pas comme les chimiothérapies classiques par une destruction des cellules impliquées dans le processus de prolifération mais elle bloque de manière ciblée certaines enzymes impliquées dans la croissance tumorale telle que l'activité tyrosine kinase. Comme les tumeurs dans lesquelles est impliquée la protéine c-kit sont associées à une mutation de cette protéine qui conduit à une accélération de la croissance des cellules concernées, les mécanismes de contrôle de la croissance cellulaire normale perdent leur influence. Aussi, en bloquant l'activité de cette protéine mutée, le développement tumoral est stoppé. Cette nouvelle option thérapeutique est une aubaine pour les GIST avancées car seule la chirurgie était un moyen de guérison à condition que l'exérèse tumorale puisse être totale et réalisée au stade précoce. Donc dans tous les cas incurables avec métastases qui résistent à la chimiothérapie et à la radiothérapie, l'action inhibitrice du STI 571 sur la tyrosine kinase est un véritable espoir pour tous ces

patients dont le pronostic était jusqu'en l'an 2000 mauvais (Pfister, 2001).

.2 Mode d'action du STI 571

.a Ses cibles cellulaires

Le STI 571 bloque spécifiquement l'activité tyrosine kinase du c-kit en présence du SCF et diminue de façon significative la croissance cellulaire SCF-dépendante. Quand la molécule est testée sur une lignée cellulaire ayant une mutation du *c-kit* similaire à celle retrouvée lors de GIST (mutation qui engendre une phosphorylation du *c-kit* en l'absence de ligand SCF), elle a un effet inhibiteur encore plus puissant que celui observé sur un récepteur sauvage. Cependant, le STI 571 n'est pas actif contre des cellules ayant une mutation active du *c-kit* au niveau de l'exon 17 comme celle retrouvée lors de mastocytose systémique. Aussi, les cellules contre lesquelles est actif le STI 571 ont une mutation constitutive dans le domaine juxtamembranaire du c-kit (Demetri, 2001).

.b Conséquences du STI 571

L'hypothèse la plus probable est que le STI 571 se lie au site de fixation de l'ATP du domaine kinase du c-kit, ainsi il bloque la liaison de l'ATP et inhibe la phosphorylation de la tyrosine. Les substrats ne peuvent donc pas être phosphorylés et les mécanismes cellulaires comme la prolifération, la différenciation et la survie sont ainsi compromis. En effet, les cellules mutées expriment un signal endogène anormal et les récepteurs c-kit sont hyperphosphorylés même en l'absence de SCF. Après une heure d'exposition au STI 571, la phosphorylation du c-kit diminue et elle est complètement éteinte après 9 heures. Ainsi, le STI 571 peut inhiber le récepteur c-kit muté dans des cellules de GIST et cela implique qu'il peut inhiber la croissance de ces cellules et voire induire l'apoptose des cellules mutées, tumorales (Demetri, 2001). Cependant le phénomène d'apoptose ne semble pas systématique car une augmentation des capacités prolifératives peut se développer par la surexpression de *bcl-2* et/ou de *Bcl-xL* qui sont des molécules anti-apoptogènes. Par exemple, lors de mastocytose il y a une surexpression de la protéine bcl-2 dans les mastocytes cutanés et de la protéine bcl-xL dans la moelle osseuse qui prolongent la survie des mastocytes et qui contribuent ainsi à la pathogénie des mastocytoses (Hartmann et al., 2003). De plus, des mutations sur les gènes suppresseurs de tumeurs (P53) peuvent inhiber l'apoptose des cellules cancéreuses.

Landi et al. (2002) ont montré qu'il existe une corrélation entre le site et le type de mutation du *c-kit* et la réponse au STI 571. Une réponse partielle (cela correspond à une réduction de 50 % de la taille des tumeurs solides) a été observée à 78 % chez des patients présentant une mutation de l'exon 11, 40 % chez des patients avec une mutation de l'exon 9 et 21 % chez les patients ayant la forme sauvage du gène c-kit. Il faut espérer que de nouvelles études seront

menées afin de devancer l'apparition de résistances. En effet, l'étude menée par Domen and Weissman (2003) montre l'augmentation des résistances des cellules souches hématopoïétiques qui surexpriment la protéine bcl-2, aux agents de chimiothérapie. Cependant, la protéine bcl-2 prévient aussi les altérations spectaculaires des cellules souches hématopoïétiques après une chimiothérapie au 5-fluorouracile (régulation négative du c-kit, renouvellement cellulaire à long terme moins efficace). Il pourrait être utile à l'avenir d'associer différentes thérapies : chimiothérapie ou radiothérapie et STI 571.

Paradoxalement, la surexpression de *bcl-2*, de *bcl-xL* et l'activation du c-kit par le même facteur : le SCF, constituent un moyen de protection des précurseurs érythroïdes. En effet, ces moyens anti-apoptotiques constituent une nouvelle stratégie pour prévenir et traiter les anémies induites par la chimiothérapie (Zuener et al., 2003).

.3 Des inconnues dans le fonctionnement du STI 571

Il serait également intéressant de savoir par quel mécanisme le STI 571 contrôle et détruit sa cible tumorale : par l'inhibition du c-kit, par l'inhibition du récepteur au facteur de croissance d'origine plaquettaire (PDGF-R) ou bien par une combinaison des deux. De manière spécifique au c-kit, on ne sait pas si la réponse au STI 571 est corrélée à l'intensité de l'expression du c-kit ou bien si les tumeurs à faible expression du c-kit ont une signification clinique. L'expression universelle du c-kit et la présence de mutations actives et autonomes en proportion significative lors de GIST malignes sont les bases théoriques et scientifiques pour utiliser des inhibiteurs sélectifs de l'activité tyrosine kinase du récepteur c-kit en tant que nouvelle stratégie thérapeutique. De plus, les résultats obtenus chez l'homme avec le STI 571 sont encourageants car la réduction de la taille de la tumeur est obtenue dans un laps de temps très rapide et avec un minimum d'effets secondaires. Cependant, il existe encore des incertitudes notamment sur la durée du traitement (à vie ou pas) et sur la dose à administrer. Actuellement elle oscille entre 400 et 800 mg par jour, ce qui est très élevé et est rendu possible grâce à la bonne tolérance du médicament. Les effets indésirables décrits (nausées, oedèmes) étaient légers et passagers et pouvaient être traités facilement par des mesures simples. Des effets indésirables graves (hémorragie digestive, neutropénie, toxicité hépatique, infection) ayant nécessité l'arrêt du traitement sont survenus chez 5 % des patients (Pfister, 2001 ; Landi et al., 2002).

L'efficacité du STI 571 dans les tumeurs stromales malignes démontre pour la première fois, dans le cas de tumeurs solides, l'intérêt d'agent non «chimiothérapique» inhibant spécifiquement une voie de signalisation impliquée dans la transformation maligne. Le STI 571 va permettre d'envisager des modifications radicales dans la prise en charge et le

pronostic de ces tumeurs résistantes à la chimiothérapie, et plus généralement en cancérologie. Son efficacité propre aux mutations actives du c-kit dans le domaine juxtamembranaire est à l'étude. Il pourrait être utilisé dans d'autres tumeurs exprimant le c-kit comme le cancer des cellules germinales, le cancer du poumon à petites cellules, les leucémies myéloïdes aiguës et les neuroblastomes. Ainsi, son utilisation pourrait être étendue dans quelques années à la cancérologie animale.

CONCLUSION

Chez le chien, nous avons vu que le récepteur c-kit pouvait être utilisé comme marqueur tumoral en considérant son expression dans la tumeur. Par exemple lors de mastocytome cutané, le c-kit permet de diagnostiquer les stades les moins différenciés (grade III), car l'expression du *c-kit* y est la plus élevée. Dans les tumeurs mammaires, le niveau d'expression du *c-kit* tumoral permet de différencier les tumeurs mixtes bénignes et malignes. De plus, l'adénocarcinome mammaire se comporte comme le mastocytome cutané de grade III, à savoir que le *c-kit* s'y exprime très fortement.

Les mutations du gène *c-kit* sont utilisées pour le diagnostic tumoral. Par exemple, lors de mastocytomes cutanés, une duplication «tandem» dans le gène *c-kit* est mise en évidence sur gel d'agarose. Des mutations plus ponctuelles telles des substitutions ou des délétions peuvent aussi être identifiées.

Chez l'homme, l'expression du *c-kit* est corrélée aux différents stades de mastocytose. Les mutations du gène *c-kit* identifiées dans ces tumeurs sont d'autant plus importantes que la tumeur est de mauvais pronostic. Les différentes mutations de *c-kit* sont responsables de l'activation autonome du récepteur c-kit qui est responsable du développement tumoral. Elles sont importantes pour établir une valeur pronostique car le c-kit permet de diagnostiquer des tumeurs agressives telles que les mastocytomes et les GIST dont les récives sont fréquentes. En outre, l'inhibition de l'activité tyrosine kinase du c-kit par le STI 571 est la base des nouvelles thérapies anti-cancéreuses : en effet, cette nouvelle molécule associée aux agents thérapeutiques classiques s'avère être nécessaire pour le traitement des tumeurs résistantes à la chimiothérapie et/ou à la radiothérapie. Cependant, le STI 571 semble avoir une inhibition spécifique de certaines formes de c-kit, à savoir des *c-kit* mutés au sein de leur domaine juxtamembranaire (cas des GIST, des mastocytomes canins), et ne serait pas aussi actif lors de mutations dans le domaine tyrosine kinase : dans ce cas, l'activité tyrosine kinase se trouve modifiée et échappe de ce fait à l'inhibition par le STI 571. C'est en outre le cas des mastocytoses systémiques chez l'homme.

L'étude de la protéine c-kit débouche sur de nombreuses applications en cancérologie. Outre l'implication de cette protéine dans les fonctions de survie et de multiplication cellulaires, c-kit constitue un marqueur tumoral de diagnostic et de pronostic de tumeurs à caractère (relativement) agressif et pourrait être une cible moléculaire de nouvelles thérapies spécifiquement anticancéreuses.

0a

(b)

ANNEXES

ANNEXE 1

AMORCES POUR LE C-KIT ET LE SCF

Différentes amorces pour le *c-kit* :

Primer 1 : 5'GTAAGGCTTACAACGATGTGGGCA3' (sens) qui correspond à la séquence de nucléotides 1493-1516 de l'ADN génomique du *c-kit*.

Primer 2 : 5'TTGAGCATCTTTACAGCGACAGTCA3' (anti-sens) qui correspond à la séquence de nucléotides 1898-1874.

Les amorces suivantes sont utilisées pour l'amplification de l'ADN du domaine cytoplasmique du *c-kit* (London et al., 1998) :

Primer 3 : 5'GAGGAGATCAATGGAAACAATTATG3' (sens) qui correspond à la séquence de nucléotides 1706-1730.

Primer 4 : 5'GTGAATACAATTCTTGAGGCGAGG3' (anti-sens) qui correspond à la séquence 2392-2368.

Primer 5 : 5'CACCCTGGTCATTACAGAATATTG3' (sens) qui correspond à la séquence 2020-2043.

Primer 6 : 5'CGGAAGCCTTCCTTGATCATCTTG3' (anti-sens) qui correspond à la séquence 2685-2662.

Primer 7 : 5'CATGGCCGCATCCGACTTAATCAG3' (anti-sens) qui correspond à la séquence 1876-1853.

Les amorces suivantes sont utilisées pour amplifier l'ADN codant pour les domaines extra-cellulaire et transmembranaire du *c-kit* :

Primer 1 : 5'AGCGCAGCCACCGCGATG3' (sens) qui correspond à la séquence 14 à 31.

Primer 2 : 5'GAAGGCACCAGCACCCAAAGT3' (anti-sens) qui correspond à la séquence 1786-1806.

Amorces spécifiques pour le *SCF* (London et al., 1998) :

Primer 1 : 5'CCAGAGTCAGTGTACAAAACC3' (sens) qui correspond à la séquence 708-729.

Primer 2 : 5'CTTCTTCCAGTATAAGGCTCC3' (anti-sens) qui correspond à la séquence 899-880.

Primer 3 : 5'GGGCTGGATCGCAGCGC3'

Primer 4 : 5'TGCCAAGTCATTGTTGG3'

Primer 5 : 5'CTCCACAAGGTCATCCAC3'

Primer 6 : 5'CTTCAACATTAAGTCCTGAG3'

Primer 7 : 5'GTGTAGGCTGGAGTCTCC3'

Primer 8 : 5'CAGTGTTGATACAAGCCACA3'

ANNEXE 2

SÉQUENCES NUCLEOTIDIQUES DE LA RÉGION DES EXONS 11 ET 12 DES C-KIT SAUVAGE ET DE CEUX ISSUS DE MASTOCYTES TUMORAUX CONTENANT DES DUPLICATIONS TANDEM (London et al., 1999)

Type sauvage

A.A 569 aattatgtttacatagaccaacacagcttccttacgatcacaatgggagttcccagaaacag
gctgagctttgg*gaaaactttgggtgctggtgccttcgggaaagtgggtgaagccact A.A 609

MCT-MK

aattatgtttacatagaccaacacagcttccttacgatcacaatgggagttcccagaaacag
gccaacacagcttccttacgatcacaatgggagttcccagaaacaggctgagctttgg*gaaa
actttgggtgctggtgccttcgggaaagtgggtgaagccact

MCT-BK

aattatgtttacatagaccaacacagcttccttacgatcacaatgggagttcccagaaacag
gctgagcacacagcttccttacgatcacaatgggagttcccagaaacaggctgagctttgg*g
aaaactttgggtgctggtgccttcgggaaagtgggtgaagccact

MCT-MS

aattatgtttacatagaccaacacagcttccttacgatcacaatgggagttcccagaaacag
gctgagctttggtacacagcttccttacgatcacaatgggagttcccagaaacaggctgagct
ttgg* gaaaactttgggtgctggtgccttcgggaaagtgggtgaagccact

MCT-EH

aattatgtttacatagaccaacacagcttccttacgatcacaatgggagttcccagaaacag
gctgagctttggtcagtatgaccaacacagcttccttacgatcacaatgggagttcccagaaa
caggctgagctttgg* gaaaactttgggtgctggtgccttcgggaaagtgggtgaagccact

MCT-YC

aattatgtttacatagaccaacacagcttccttacgatcacaatgggagttcccagaaacag
gctgagctttgg*gaaaactttgggtgctggtgccttcgggaaagtgggtgaattcccagaaac
aggctgagctttgg*gaaaactttgggtgctggtgccttcgggaaagtgggtgaagccact

Lignée C2

aattatgtttacatagaccaacacagcttccttacgatcacaatgggagttcccagaaacata
ccaacacagcttccttacgatcacaatgggagttcccagaaacaggctgagctttgg*gaaa
actttgggtgctggtgccttcgggaaagtgggtgaagccact

Séquences soulignées : séquences d'ADN dupliquées

Séquences en gras : duplications tandem

* : début de l'exon 12

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ALBERTS B, BRAY D, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WATSON JD. Biologie moléculaire- La cellule. 3^e édition. Paris : Médecines sciences-Flammarion, 1994. 1456p.
2. ANDERSON DM, LYMAN SD, BAIRD A, WIGNALL JM, EISENMAN J, RAUCH C et al. (1990) Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. *Cell.*, **63**, 235-243.
3. ASHMAN LK. (1999) The biology of stem cell factor and its receptor c-kit. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **31**, 1037-1051.
4. AVRAHAM H, VANNIER E, COWLEY S, JIANG S, CHI S, DINARELLO CA et al. (1992) Effects of the stem cell factor, c-kit ligand, on human megakaryocytic cells. *Blood*, **79** (2), 365-371.
5. BENSIGOR E, DELISLE F, DEVAUCHELLE P. (1996) Les mastocytomes du chien. *Point Vét.*, **27** (173), 925-932.
6. CHU TY, BESMER P. (1995) The genomic structure of the proto-oncogene c-kit encoded at the murine white spotting locus. *J. Biomed. Sci.*, **2**, 36-45.
7. COPELAND NG, GILBERT DJ, CHO BC, DONOVAN PJ, JENKINS NA, COSMAN D et al. (1990) Mast cell growth factor maps near the steel locus on mouse chromosome 10 and is deleted in a number of steel alleles. *Cell.*, **63**, 175-183.
8. DEMETRI GD. (2001) Targeting c-kit mutations in solid tumors : scientific rationale and novel therapeutic options. *Sem. Onc.*, **28** (5), 19-26.
9. DIONNE A, GAGNON C. (2002) Le mésylate d'imatinib (GleevecTM). *Québec Pharmacie*, **49** (6), 493-500.
10. DOMEN J, WEISSMAN IL. (2003) Hematopoietic stem cells and other hematopoietic cells show broad resistance to chemotherapeutic agents in vivo when overexpressing bcl-2. *Exp. Hematol.* **31** (7), 631-639.
11. FURITSU T, TSUJIMURA T, TONO T, IKEDA H, KITAYAMA H, KOSHIMIZU U et al. (1993) Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J. Clin. Invest.*, **92**, 1736-1744.
12. GALLI SJ, ZSEBO KM, GEISLER EN. (1994) The kit ligand, stem cell factor. *Advances in immunology*, **55**, 1-83.
13. HARTMANN K, ARTUC M, BALDUS SE, ZIRBES TK, HERMES B, THIELE J et al. (2003) Expression of bcl-2 and bcl-xl in cutaneous and bone marrow lesions of mastocytosis. *Am. J. Pathol.*, **163** (3), 819-826.

14. HEINRICH MC, BLANKE CD, DRUKER BJ, CORLESS CL. (2002) Inhibition of KIT tyrosine kinase activity : a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies. *J.Clin. Oncol.*, **20** (6),1692-1703.
15. HUANG E, NOCKA K, BEIER DR, CHU TY, BUCK J, LAHM HW et al. (1990) The hematopoietic growth factor KL is encoded by the Sl locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the W locus. *Cell.*, **63**, 225-233.
16. KITAYAMA H, KANAKURA Y, FURITSU T, TSUJIMURA T, ORITANI K, IKEDA H et al. (1995) Constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase confer factor-independent growth and tumorigenicity of factor-dependent hematopoietic cell lines. *Blood*, **85** (3), 790-798.
17. KUBO K, MATSUYAMA S, KATAYAMA K, TSUTSUMI C, YONEZAWA K, SHIMADA T et al. (1998) Frequent expression of the c-kit proto-oncogene in canine malignant mammary tumor. *J. Vet. Med. Sci.*, **60** (12), 1335-1340.
18. LANDI B, LECOMTE Th, CELLIER Ch. Tumeurs stromales digestives. POST'U, Nantes, mars 2002. [http://www.fmcgastro.org/htdocs/postu02/23_landi.html]
19. LONDON CA, KISSEBERTH WC, GALLI SJ, GEISLER EN, HELFAND SC. (1996) Expression of stem cell factor receptor (c-kit) by the malignant mast cells from spontaneous canine mast cell tumours. *J. Comp. Path.*, **115**, 399-414.
20. LONDON CA, GALLI SJ, YUUKI T, HU ZQ, HELFAND SC, GEISLER EN. (1999) Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene c-kit. *Exp. Hematol.*, **27**, 689-697.
21. LONGLEY BJ, MORGANROTH GS, TYRRELL L, DING TG, ANDERSON DM, WILLIAMS DE et al. (1993) Altered metabolism of mast cell growth factor (c-kit ligand) in cutaneous mastocytosis. *N. Engl. J. Med.*, **328** (18), 1302-1307.
22. LONGLEY BJ, TYRRELL L, LU SZ, MA YS, LANGLEY K, DING TG et al. (1996) Somatic c-kit activating mutation in urticaria pigmentosa and aggressive mastocytosis : establishment of clonality in a human mast cell neoplasm. *Nat. Genet.*, **12**, 312-314.
23. LONGLEY BJ, METCALFE DD, THARP M, WANG X, TYRRELL L, LU SZ et al. (1999) Activating and dominant inactivating c-kit catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **96** (4), 1609-1614.
24. LORENZ U, BERGEMANN AD, STEINBERG HN, FLANAGAN JG, LI X, GALLI SJ et al. (1996) Genetic analysis reveals cell type-specific regulation of receptor tyrosine kinase c-kit by the protein tyrosine phosphatase SHP1. *J. Exp. Med.*, **184**, 111-1126.
25. MA Y, LONGLEY BJ, WANG X, BLOUNT JL, LANGLEY K, CAUGHEY GH. (1999) Clustering of activating mutations in c-kit's juxtamembrane coding region in canine mast cell

neoplasms. J. Invest. Dermatol., **112**, 165-170.

26. MAILLET M. Abrégés de biologie cellulaire. 7^{ième} édition. Paris, Milan, Barcelone : Masson, 1995. 328 p.

27. McCULLOCH EA, MINDEN MD. (1993) The cell surface receptor encoded by the proto-oncogene kit and its ligand. In : EMIL J, HAGOP K, editors. Leukemia : advances research and treatment, 45-77.

28. MEININGER CJ, YANO H, ROTTAPPEL R, BERNSTEIN A, ZSEBO KM, ZETTER BR. (1992) The c-kit receptor ligand functions as a mast cell chemoattractant. Blood, **79** (4), 958-963.

29. MIYAZAWA K, WILLIAMS DA, GOTOH A, NISHIMAKI J, BROXMEYER HE, TOYAMA K. (1995) Membrane-bound steel factor induces more persistent tyrosine kinase activation and longer life span of c-kit gene-encoded protein than its soluble form. Blood, **85** (3), 641-649.

30. NAGATA H, WOROBEK AS, SEMERE T, METCALE DD. (1998) Elevated expression of the proto-oncogene c-kit in patients with mastocytosis. Leukemia, **12**, 175-181.

31. PARODI A. (2000) Le mastocytome du chien est-il une tumeur génétique ?. Point Vét. **31** (204), 67-68.

32. PFISTER U. Un médicament contre la leucémie qui aussi s'avérer utile contre une tumeur rare du tractus gastro-intestinal. In : compte rendu de l'A.S.C.O. San Francisco, 12-15 Mai 2001. 4-5.

33. PIGNON JM. (1997) C-kit mutations and mast cell disorders. Hematol. Cell. Ther., **39**, 114-116.

34. PIGNON JM, GIRAUDIER S, DUQUESNOY P, JOUAULT H, IMBERT M, VAINCHENKER W et al. (1997) A new c-kit mutation in a case of aggressive mast cell disease. Br. J. Haematol., **96** (2), 374-6.

35. PROVENDIER, Dr RIFARD. Un cas de tumeur stromale. [http://www.ch-bourges.fr/rmcc/resumes/tumeurs_stromales.htm]

36. RAISONNIER A. [Paris, France] : Molécules informationnelles in Cours Biochimie PCEM 2 [en ligne] janvier 2003 [cited 2002-2003]. Université Paris VI pierre et Marie Curie. Faculté de médecine Pitié-Salpêtrière [<http://www.chups-jussieu.fr/polys/biochimie/Mibioch/index.html>].

37. REGUERA MJ, RABANAL RM, PUIGDEMONT A, FERRER L. (2000) Canine mast cell tu mors express stem cell factor receptor. Am. J. Dermatopath., **22** (1), 49-54.

38. STRYER L. La biochimie de Lubert Stryer. 4^e édition. Paris : Médecines Sciences-Flammarion, 1995.

39. TAKEBAYASHI K et al. (1996) Involvement of transcription factor encoded by the mi locus in the expression of c-kit receptor tyrosine kinase in cultured mast cells of mice. *Blood*, **88** (4), 1225-1233.
40. TSUJIMURA T, FURITSU T, MORIMOTO M, ISOZAKI K, NOMURA S, MATSUZAWA Y et al. (1994) Ligand-independent activation of c-kit receptor tyrosine kinase in a murine mastocytoma cell line P-815 generated by a point mutation. *Blood*, **83** (9), 2619-2626.
41. TSUJIMURA T, MORII E, NOZAKI M, HASHIMOTO K, MORIYAMA Y, TAKEBAYASHI K et al. (1996) Involvement of transcription factor encoded by the mi locus in the expression of c-kit receptor tyrosine kinase in cultured mast cells of mice. *Blood*, **88** (4), 1225-1233.
42. TSUJIMURA T, KANAKURA Y, KITAMURA Y. (1997) Mechanisms of constitutive activation of c-kit receptor tyrosine kinase. *Leukemia*, **11**, 396-398.
43. WILLIAMS DE, EISENMAN J, BAIRD A, RAUCH C, VAN NESS K, MARCH CJ et al. (1990) Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogene. *Cell.*, **63**, 167-174.
44. WITTE ON. (1990) Steel locus defines new multipotent growth factor. *Cell.*, **63**, 5-6.
45. WOROBEK AS, SEMERE T, NAGATA H, METCALFE DD. (1998) Clinical correlates of the presence of the Asp816Val c-kit mutation in the peripheral blood mononuclear cells of patients with mastocytosis. *Cancer*, **83** (10), 2120-2129.
46. YEE NS, PAK I, BESMER P. (1994) Role of kit-ligand in proliferation and suppression of apoptosis in mast cells : basis for radiosensitivity of White Spotting and Steel mutant mice. *J. Exp. Med.*, **179**, 1777-1787.
47. ZEMKE D, YAMINI B, YUZBASIYAN-GURKAN V. (2001) Characterization of an undifferentiated malignancy as a mast cell tumor using mutation analysis in the proto-oncogene c-kit. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **13**, 341-345.
48. ZSEBO KM, WYPYCH J, McNIECE IK, LU HS, SMITH KA, KARKARE SB et al. (1990) Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from buffalo rat liver-conditioned medium. *Cell.*, **63**, 195-201.
49. ZSEBO KM, WILLIAMS DA, GEISLER EN, BROUDY VC, MARTIN FH, ATKINS HL. (1990) Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell.*, **63**, 213-224.
50. ZEUNER A, PEDINI F, SIGNORE M, TESTA U, PELOSI E, PESCHLE C et al. (2003) Stem cell factor protects erythroid precursor cells from chemotherapeutic agents via up-regulation of bcl-2 family proteins. *Blood*, **102** (1), 87-93.
51. OHTA H, AIZAWA S, NISHIMUNE Y. (2003) Functional analysis of the p53 gene in

apoptosis induced by heat stress or loss of stem cell factor signaling in mouse male germ cells. *Biol. Reprod.*, **68** (6), 2249-2254.

Toulouse, 2004

NOM : KOLLER

PRENOM : JULIE

TITRE : PROTEINE C-KIT : DONNEES STRUCTURALES, FONCTIONS ET IMPLICATIONS EN PATHOLOGIE Tumorale CHEZ L'HOMME ET LE CHIEN

RESUME :

La découverte du proto-oncogène *c-kit* a permis d'identifier un couple récepteur *c-kit*/ ligand SCF impliqué dans la régulation de l'hématopoïèse et dans la survie et la prolifération des mastocytes, des gamètes et des mélanocytes.

Les mutations identifiées des gènes *c-kit* et *SCF* sont 1) les mutations responsables d'un phénotype spécifique chez les hétérozygotes du à une inhibition du *c-kit* (anémie, défaut de pigmentation, stérilité, déficience en mastocytes) et d'une létalité périnatale chez les homozygotes

2) les mutations qui provoquent une activation constitutive et autonome du récepteur, identifiées dans des tumeurs chez le chien (tumeurs mammaires, mastocytomes) et l'homme (mastocytoses, GIST).

Le *c-kit* joue un rôle dans le développement tumoral et constitue un marqueur tumoral utilisé pour leur diagnostic et leur pronostic. Le développement d'un inhibiteur de son activité tyrosine kinase, le STI 571, ouvre de nouvelles perspectives dans le traitement des tumeurs résistantes à la chimio et/ ou radio thérapies.

MOTS-CLES : *c-kit*, SCF, récepteur tyrosine kinase, mutations, chien, homme, tumeurs mammaires, mastocytomes, mastocytose, GIST.

ENGLISH TITLE : C-KIT PROTEIN: STRUCTURE, FONCTIONS AND INVOLVEMENT IN HUMAN AND CANINE TUMOROGENICITY

ABSTRACT :

The *c-kit* proto-oncogene encodes a receptor and its discover prevented identification of a new complex receptor/ ligand. *C-kit*/ SCF are essential for especially haematopoiesis, mast cell growth, fertility and melanogenesis.

The identified mutations in *c-kit* and *SCF* genes are 1) mutations responsible for defects in *kit* functions with a specific phenotype (anemia, lack of pigmentation, sterility, mast cell deficiency) in heterozygous animals and letality in homozygous animals

2) mutations which cause constitutive activation of *c-kit* receptor, that are presents in canine (mammary and mast cell tumors) and human (mastocytosis, GIST) tumors.

C-kit is strongly implicated in tumorigenicity and may serve as tumor marker for diagnosis and prognosis. The development of a tyrosine kinase activity inhibitor, STI 571, open up the way to new strategies in the treatment of resistant tumors to radio/ chemotherapy.

KEY WORDS: *c-kit*, SCF, tyrosine kinase receptor, mutations, dog, human, mammary tumor, mast cell tumor, mastocytosis, GIST.