

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Développement d'une lignée basophile de rat exprimant une chaîne α chimérique du récepteur Fc ϵ RI humain pour la mesure d'une sensibilisation à des agents professionnels

par

Bruno St-Jacques

Université de Montréal

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de M.Sc.
En Biologie moléculaire

Décembre 2007

© Bruno St-Jacques, 2007



Université de Montréal
Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé :

Développement d'une lignée basophilique de rat exprimant une chaîne α chimérique du récepteur Fc ϵ RI humain pour la mesure d'une sensibilisation à des agents professionnels

présenté par :
Bruno St-Jacques

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jean-Claude Labbé, président-rapporteur
Dr Karim Maghni, directeur de recherche
Dr Sophie Laberge, membre du jury

Résumé

L'asthme professionnel est un syndrome respiratoire qui affecte un nombre grandissant de travailleurs. Il est le plus souvent caractérisé par le développement d'une sensibilisation de type IgE à un agent présent dans le milieu de travail (agent professionnel). Il n'existe pas de test pour mesurer une sensibilisation aux 400 agents pouvant induire de l'asthme professionnel. Cette sensibilisation pourrait être détectée et mesurée par un test de dégranulation utilisant la lignée cellulaire de rat RBL-2H3 exprimant un récepteur FcεRI capable de lier les IgE humains. De précédents travaux ont démontré que la chaîne alpha humaine du récepteur FcεRI, responsable de la liaison des IgE, peut former un récepteur fonctionnel en s'associant avec les chaînes bêta et gamma de rat. Dans notre étude, suite à une série d'expériences, nous avons adopté la stratégie de réprimer la chaîne alpha de rat endogène à l'aide d'ARN d'interférences de type shRNA. Nous avons transfecté cette lignée avec la chaîne alpha du récepteur FcεRI humain ou une chaîne alpha chimérique composée d'une portion humaine et d'une portion de rat. En conclusion, cet essai cellulaire pourrait constituer un outil important pour le diagnostic d'une sensibilisation à un agent pouvant causer de l'asthme professionnel.

Mots-clés : Asthme professionnel, Allergie, IgE, RBL-2H3, FcεRI alpha, Dégranulation, Transfection, Chimère, Basophile, shRNA

Abstract

Occupational asthma is a respiratory syndrome affecting a growing number of workers. It is most often characterized by the development of an IgE sensitization, specific to an agent in the workplace (occupational agent). There is no test available that can measure the level of sensitization to all 400 agents that can induce occupational asthma in some workers. We postulate that IgE sensitization in response to sensitization to an occupational agent may be measured using the rat basophilic cell line RBL-2H3 expressing a receptor that can bind human IgE. Previous studies showed that a functional FcεRI receptor is formed with the rat beta and gamma chains when the human alpha chain is transfected in RBL-2H3 cells. In our study, we adopted a strategy involving the repression of the endogenous rat alpha chain with the inhibitory RNA technology (shRNA) to favor the association of the human alpha chain with the beta/gamma rat chains. Furthermore, a human/rat chimera alpha chain was genetically engineered to optimize its association with its endogenous rat beta/gamma chains and to increase the affinity for human IgE. In conclusion, this degranulation assay could become an important tool for the diagnosis of occupational asthma by measuring occupational agent IgE sensitization.

Keywords : Occupational asthma, Allergy, IgE, RBL-2H3 cells, FcεRI alpha chain, Degranulation, Transfection, Chimera, Basophil, shRNA

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	iv
Liste des Tableaux et figures	vii
Remerciements	x
Liste des sigles et abréviations en français	xi
Liste des sigles et abréviations en anglais	xiii
1. Introduction	1
1.1 L'asthme professionnel.....	1
1.2 Rôle de l'IgE dans l'asthme professionnel	1
1.3 Tests disponibles pour mesurer une sensibilisation de type IgE.....	2
1.4 Le récepteur FcεRI	4
1.4.1 Structure et expression du récepteur FcεRI	4
1.4.2 Les voies de signalisation de FcεRI.....	6
1.5 La lignée cellulaire RBL-2H3	8
1.6 Transfection de la chaîne alpha humaine.....	9
1.7 Objectifs du projet	12
2. Matériel et Méthodes	13
2.1 Culture cellulaire	13
2.2 Extraction d'ARN total.....	14
2.3 Le RT-PCR (Reverse transcription PCR).....	15
2.7 La mutagenèse	18
2.9 Le séquençage	20
2.10 La transfection	20
2.11 L'immunoprécipitation.....	21
2.12 L'immunoblot de type Western	22

2.13	La cytométrie en flux.....	23
2.14	La microscopie à épifluorescence.....	26
2.15	Essai de dégranulation.....	28
3.	Résultats.....	30
3.1	Transfection de la chaîne alpha humaine.....	30
3.2	Développement et expression de la chimère.....	37
3.3	Développement d'une lignée RBL-2H3 déficientes pour la chaîne alpha de rat.....	42
4.	Discussion.....	50
4.1	Transfection de la chaîne alpha humaine.....	50
4.2	Design et transfection de la chimère.....	51
4.3	Mutation de la chaîne alpha de rat.....	51
4.4	Transfection des shRNA.....	52
4.5	Discussion générale.....	53
	Conclusion.....	56
	Bibliographie.....	57
	Annexe 1.....	I

Liste des Tableaux et figures

Figure 1. Signalisation simplifiée du récepteur FcεRI	8
Tableau I. Liste des anticorps utilisés pour les immunoblots de type Western	23
Tableau II. Liste des anticorps utilisés en cytométrie de flux	25
Figure 2. Détection de l'ARNm de la chaîne alpha humaine	30
Figure 3. Détection par immunoblot avec un anticorps polyclonal de lapin de la chaîne alpha humaine	31
Figure 4. Détection par immunoblot d'échantillons immunoprécipités avec anticorps monoclonal 3G6.....	32
Figure 5. Détection par immunoblot pour la chaîne alpha humaine.....	33
Figure 6. Détection par immunoblot pour la chaîne alpha humaine.....	34
Figure 7. Essai de compétition entre l'IgE humain et de souris	35
Figure 8. Dégranulation de clones RBL-3H3 transfecté avec la chaîne alpha humaine	36
Figure 9. Construction de l'ADNc de la chimère	38
Figure 10. Construction de l'ADNc de la chimère par PCR	39
Figure 11. Expression de l'ARNm de la chimère.....	40
Figure 12. Marquage de la chaîne alpha humaine sur basophiles humaine et RBL-2H3 transfectées avec la chimère avec l'anticorps anti-FcεRIα humaine biotinylé + Streptavidine-Alexa-488.....	41
Figure 13. Vérification de l'homologie de séquence de FcεRI alpha humain et rat pour le design des shRNA	43
Figure 14. Dégranulation du clone shRNA N4C2.....	44
Figure 15. Mesure de la repression de la chaîne alpha de rat	45

Figure 16. Marquage de la chaîne alpha de rat chez le clone N4C2 avec anticorps de BD Pharmingen	46
Figure 17. Repression de la chaîne alpha de rat dans le clone 2-467A3	47
Figure 18. Expression de la chimère dans le clone N4C2	48
Figure 19. Dégranulation avec IgE humains (IgEh) du clone N4C2 transfecté avec la chimère	49
Figure 20. Schémas des vecteurs utilisés dans le projet	I
Tableau III. Liste des oligonucléotides utilisés au cours du projet.....	II

*Ce mémoire est dédié à tous ceux qui ont
joué un rôle, de près ou de loin à
l'aboutissement de ma maîtrise.*

Remerciements

Je voudrais d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Karim Maghni, de m'avoir accepté dans son laboratoire et de m'avoir donné l'opportunité de faire mes preuves. Je le remercie pour sa disponibilité ainsi que pour le temps consacré à ma formation en recherche.

Je remercie aussi tous les membres du laboratoire que j'ai côtoyés pendant les dernières années. Merci à Bertrand, Mélanie, Sandra, Pascal et Virginie pour leur aide lors de manipulations ainsi que pour avoir contribué à rendre mon séjour mémorable.

Un merci particulier aux membres de ma famille, qui ont cru en moi depuis le début. Je n'aurais jamais pu arriver ou j'en suis sans votre support.

Je voudrais aussi remercier les organismes subventionnaires pour leur soutien financier pendant mes études de maîtrise. Merci au Centre Asthme et Travail ainsi qu'au programme de biologie moléculaire.

Liste des sigles et abréviations en français

Ag: Antigène

AP : Asthme professionnel

BPM : Agent de bas poids moléculaire

CIP : Déphosphorylase alcaline

D1/D2 : Domaines de liaison de l'IgE sur la sous-unité α de Fc ϵ RI

DAG: Diacylglycerol

DNP-BSA : Dinitrophényl couplé à l'albumine sérique bovine

Fc ϵ RI: Récepteur de haute affinité pour les IgE

FITC : fluorescéine isothiocyanate

fMLP : formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine

Gab2: Protéine associée à Grb2

HEPES : Acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonique

HPM : Agent de haut poids moléculaire

IgE: Immunoglobuline de Type E

IgEh : IgE humain

IgEm : IgE de souris

IP3: Inositol 1,4,5-triphosphate

ITAM : Motif activateur basé sur les immunorécepteurs à tyrosine

kDa : kilo Dalton, mesure du poids d'une protéine

KNRK : Lignée cellulaire de cellules de rein de rat

LAT: Protéine de liaison pour les cellules T activées

LB : Bouillon de culture bactérienne

M: Concentration molaire (mole/litre)

NTAL : Protéine de liaison pour les non-cellules-T

PBMC : Cellules mononucléaires de sang périphérique

PBS : Tampon phosphate
PE : Phycoérythrine
PFA : Paraformaldéhyde
PI3K: Phosphatidylinositol 3-OH kinase
PIP2: Phosphatidylinositol-bisphosphate
PIP3: Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
PIPES: Acide Piperazine-N,N'-bis-2-éthanesulfonique
PKC: Protéine kinase C
PLC: Phospholipase C
PMSF : phenylmethanesulphonylfluoride
PTK: Protéine tyrosine kinase
RBL 2H3: Lignée basophilique de rat exprimant FcεRI
RBL-T : Clone de RBL 2H3 transfecté avec FcεRIα humain
RT-PCR : Transcription inverse – réaction de polymérase en chaîne
SDS : Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE : Gel de polyacrylamide contenant du SDS
shRNA : Petit ARN en épingle à cheveux
siRNA : Petit ARN d'inhibition
TBS-T: Tampon Tris avec NaCl et Tween-20
TCR : Récepteur des lymphocytes T
TPS : Test de provocation bronchique

Liste des sigles et abréviations en anglais

Ag: Antigen

AP : Professionnal asthma

BPM : Low molecular weight agent

CIP : Alkaline dephosphorylase

D1/D2 : IgE binding domains on FcεRIα

DAG: Diacylglycerol

DNP-BSA : Dinitrophényl coupled to bovine serum albumine

FcεRI: IgE high affinity receptor

FITC : fluorescein isothiocyanate

fMLP : formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine

Gab2: Grb2 associated protein

HEPES : Acid 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic

HPM : High molecular weight agent

IgE: Type E Immunoglobulin

IgEh : Human IgE

IgEm : Mouse IgE

IP3: Inositol 1,4,5-triphosphate

ITAM : Motif Immunoreceptor tyrosine-based activation motif

kDa : kilo Dalton, protein weight measurement

KNRK : Kidney rat cell line

LAT: Linker for activation of T cells

LB : Lysogeny broth

M: Molar concentration (mole/litre)

NTAL : non-T-cell activation linker

PBMC : Peripheral blood mononuclear cells
PBS : Phosphate buffered saline
PE : Phycoerythrin
PFA : Paraformaldehyde
PI3K: Phosphatidylinositol 3-OH kinase
PIP2: Phosphatidylinositol-bisphosphate
PIP3: Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
PIPES: Piperazine-N,N'-bis-2-éthanesulfonique acid
PKC: Protein kinase C
PLC: Phospholipase C
PMSF : phenylmethanesulphonylfluoride
PTK: Protein tyrosine kinases
RBL 2H3: Rat basophil leukemia cells
RBL-T : RBL 2H3 clone transfected with human FcεRIα
RT-PCR : Transcription inverse – réaction de polymérase en chaîne
SDS : Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE : SDS containing polyacrylamid gel
shRNA : Short hairpin RNA
siRNA : Small inhibitory RNA
TBS-T: Tris buffered saline with NaCl and Tween-20
TCR : T-cell receptor
TPS : Specific inhalation challenge

1. Introduction

1.1 L'asthme professionnel

L'asthme est un syndrome qui affecte un nombre grandissant de personnes à chaque année. Environ 10% de la population d'aujourd'hui en souffre en comparaison à 3,6% en 1980 et 7,2% en 1994 [1]. Il s'agit d'un syndrome respiratoire chronique ou intermittent caractérisé par une bronchoconstriction et une inflammation des voies respiratoires. Les stimuli pour ces symptômes sont variés et comprennent l'exposition à des allergènes et des produits industriels et chimiques. Nous distinguons ainsi l'asthme allergique ou commun de l'asthme professionnel (environ 10 % des personnes atteintes d'asthme). Dans le cas de l'asthme professionnel, une exposition prolongée à ces agents peut causer le développement d'un asthme chez certaines personnes jusqu'à présent exemptes d'asthme ou augmenter la prévalence des exacerbations en milieu de travail chez les personnes déjà asthmatiques. Il existe plus de 400 agents identifiés pouvant causer un asthme professionnel. Ces agents sont classés en 2 groupes : de haut poids moléculaire (HPM) comme le latex et la farine, et de bas poids moléculaire (BPM), comme certains métaux et les isocyanates (Liste exhaustive à <http://www.asmanet.com/asmapro/agents.htm>).

1.2 Rôle de l'IgE dans l'asthme professionnel

L'asthme professionnel est catégorisé en 2 groupes, soit l'asthme allergique et l'asthme non-allergique. L'asthme professionnel non-allergique est causé par des agents qui sont des irritants bronchiques, suite à une ou plusieurs exposition. Cet irritant peut causer une inflammation des voies respiratoire à de fortes concentrations. L'asthme professionnel allergique implique la participation du système immunitaire. Suite à l'exposition prolongée à un agent professionnel, une réaction immunitaire est enclenchée et des immunoglobulines

de type E (IgE) spécifiques pour l'agent sont produites chez certaines personnes. Les IgE lient le récepteur FcεRI présent à la surface des mastocytes, des basophiles, des éosinophiles des macrophages activés et des cellules de Langerhans [2]. Cette étape correspond à la sensibilisation de type IgE pour un ou plusieurs agents professionnels. La période de sensibilisation varie grandement d'un individu à l'autre ainsi que d'un agent à l'autre. Lorsque le travailleur est exposé de nouveau à l'agent auquel il est sensibilisé, les cellules immunitaires exprimant le récepteur FcεRI réagissent en libérant une panoplie de molécules pro-inflammatoires qui causent une bronchoconstriction et une inflammation des voies respiratoires [3].

Les IgE ont aussi un rôle dans la régulation de l'expression du récepteur de haute affinité FcεRI [4]. En effet, lorsque des IgE sont liés sur leur récepteur, ils empêchent l'internalisation et la dégradation de celui-ci, menant à une accumulation de récepteurs à la surface des cellules sans que les niveaux d'ARNm des trois chaînes qui composent FcεRI ne soient affectés [5]. De plus, certaines études indiquent que les IgE sous forme monomérique joueraient un rôle dans la régulation de la production de cytokines et dans la survie cellulaire [6, 7].

1.3 Tests disponibles pour mesurer une sensibilisation de type IgE

La meilleure façon de traiter les travailleurs atteints d'asthme professionnel est d'identifier l'agent causal puis d'éviter que les personnes n'entrent en contact avec cet agent professionnel (par changement de poste de travail par exemple). Afin de déterminer l'agent responsable d'un asthme professionnel, un dépistage est nécessaire. Plusieurs méthodes existent [8]. La technique la plus utilisée pour diagnostiquer un asthme professionnel est le Test de Provocation Spécifique (TPS) bronchique. Ce test consiste à

exposer le travailleur à l'agent suspecté et de mesurer son débit respiratoire. Une chute significative de ce débit est indicatrice d'un asthme professionnel à l'agent testé. Évidemment, ce test fonctionne seulement chez des travailleur ayant développé un asthme professionnel, il n'est donc pas possible de faire de prévention en utilisant cette méthode. Puisque la majorité des asthmes professionnels sont des asthmes allergiques, cela signifie une production d'IgE spécifiques pour l'agent, qui augmente graduellement suite à une exposition répétée. Certaines méthodes sont disponibles pour mesurer une sensibilisation de type IgE à des agents professionnels. Le test cutané consiste à mettre la peau en contact avec l'agent et de mesurer la taille des papules formées. Cette méthode permet d'exclure un asthme professionnel si le test est négatif. Cependant, un test positif ne signifie pas nécessairement l'existence d'un asthme professionnel. De plus, il n'est utilisable que pour les agents professionnels de HPM [8]. Une autre méthode couramment utilisée est la détermination des IgE spécifiques dans le sérum par ELISA. Bien que cette technique soit plus sensible que le test cutané, elle nécessite l'utilisation d'un kit développé pour détecter des IgE spécifiques à un agent particulier. Cependant, il n'existe pas de kit ELISA disponible pour les 400 agents professionnels pouvant causer de l'asthme professionnel. Le système ImmunoCAP, de Pharmacia Diagnostics, par contre est disponible pour un grand nombre de ces agents, mais il s'agit d'un système très coûteux qui ne peut mesurer qu'un agent à la fois. Il fonctionne en immobilisant l'allergène sur un support solide et en mesurant la quantité d'IgE sanguin s'y liant. Une autre technique peut également être utilisée, il s'agit du test d'activation des basophiles [9]. Cette technique consiste à collecter un échantillon de sang du patient et de l'incuber avec l'allergène. Si les basophiles ont des IgE spécifiques pour ces allergènes liés sur leurs récepteurs FcεRI, l'incubation par l'allergène activera les basophiles. L'activation des basophiles est déterminée par cytométrie en flux par la mesure de l'expression de l'antigène de surface CD203c. L'utilisation du test d'activation des basophiles comme méthode de détermination d'une sensibilisation dépendante des IgE dans l'asthme professionnel est actuellement étudiée dans le laboratoire du Dr Maghni. En résumé, il est nécessaire de développer un test servant

à la détermination d'une sensibilisation de type IgE aux agents professionnels sensibilisants qui serait sensible, spécifique, et reproductible. Mon projet de recherche consiste au développement d'un tel test qui se base sur la liaison des IgE sur leur récepteur FcεRI à la surface des basophiles et la dégranulation de ceux-ci suite à une exposition antigénique (agent professionnel).

1.4 Le récepteur FcεRI

1.4.1 Structure et expression du récepteur FcεRI

Le récepteur de haute affinité aux IgE FcεRI est exprimé à la surface des basophiles, des mastocytes, des éosinophiles, des cellules dendritiques, des macrophages activés, des cellules de Langerhans [2, 3], et des cellules de muscle lisse des voies respiratoires supérieures [10]. Le récepteur exprimé à la surface des basophiles est composé de quatre chaînes transmembranaires, soit d'une chaîne alpha, d'une chaîne bêta et de deux chaînes gamma. Le mécanisme de régulation de l'expression de FcεRI fonctionne par cotraduction des quatre chaînes [11]. Il est intéressant de noter que lorsque ces chaînes sont exprimées séparément et ensuite mises ensembles, elles ne s'assemblent pas entre elles. La raison étant que la chaîne gamma agirait comme chaperonne pour que la chaîne alpha ait un repliement adéquat à mesure qu'elle est synthétisée [11]. Les chaînes gamma ont un rôle important dans l'initiation de la signalisation intracellulaire menant à la dégranulation grâce à la présence de motifs ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif). Les chaînes gamma sont sous la forme d'homodimère, reliées par un pont disulfure. La chaîne bêta possède quatre domaines transmembranaires, et joue un rôle de support de la chaîne gamma en amplifiant le signal de transduction par la présence d'ITAM. Suite à un épissage alternatif de bêta, une forme tronquée est produite (βT). L'isovariant βT inhibe l'expression

du récepteur FcεRI à la surface des cellules [12]. La chaîne alpha est responsable de la liaison des IgE ainsi que du contrôle de l'expression du récepteur à la surface cellulaire [11].

La liaison de l'IgE à la chaîne alpha dépend de deux sites présents dans la région extracellulaire de cette chaîne, soit les domaines D1 et D2 (Ig-like domain 1 et 2). Des expériences de mutagenèse de la chaîne alpha humaine ont démontré que le domaine D2 est essentiel à la liaison de l'IgE [13]. De plus, ces mutagenèses aléatoires ont révélé que lorsque les trois acides aminés en position 135-137 Asn-Ile-Ser du domaine D2 sont mutés en Asp-Tyr-Met, l'affinité de la chaîne alpha pour l'IgE augmente d'environ 50 fois. Cette mutation du domaine D2 permet aussi à la chaîne alpha humaine de lier les IgE de souris. Le domaine D1 par contre, n'est pas impliqué directement dans la liaison à l'IgE chez l'humain, son rôle est plutôt d'aider à stabiliser la structure du domaine D2 et d'ainsi contribuer à la liaison de l'IgE [14]. Le domaine D1 aurait donc aussi un rôle à jouer dans le repliement approprié du domaine D2 [15]. La chaîne alpha possède trois domaines qui sont responsables de sa rétention dans le réticulum endoplasmique [16], deux sites de double lysine aux positions 212-216 et 226-230 ainsi qu'une asparagine dans le domaine transmembranaire en position 192. Cette étude a démontré par mutation et par troncation d'un seul ou plusieurs de ces domaines que ces derniers agissent de façon synergique. Ainsi, les chaînes gamma, en plus de servir de chaperonnes pour le bon repliement d'alpha, serviraient aussi à camoufler les domaines de rétention au réticulum endoplasmique de la chaîne alpha. Même si la chaîne gamma est associée avec la chaîne alpha, celles-ci peuvent aussi être séquestrées au réticulum endoplasmique. Ce contrôle de la qualité se fait par contrôle de la glycosylation de la chaîne alpha, si cette glycolysation n'est pas clivée, elle active le système de contrôle qualité qui maintient la chaîne alpha au réticulum endoplasmique [17].

Une étude récente a aussi montré que la stabilité de l'expression du récepteur FcεRI était influencée par la longueur de la région entre les domaines D2 et transmembranaire [18]. Des ajouts d'alanines dans cette région ont augmenté la stabilité des récepteurs à la surface des cellules. Ces données sont supportées par les travaux de Okayama et al. [19], dans lesquels les domaines transmembranaire et cytoplasmique des récepteurs FcεRIα et FcγRIα ont été associés pour former des chimères transfectées dans la lignée cellulaire humaine mastocytaire HMC-1. Leurs résultats ont démontré que ces deux régions ne sont pas essentielles pour augmenter leur expression suite à la liaison de leur ligand, indiquant que c'est la région extracellulaire qui en est responsable.

Lorsque le récepteur FcεRI est activé, il est internalisé dans des vésicules de clathrine. Une étude a montré qu'aucune chaîne du récepteur n'est responsable en particulier de cette internalisation, concluant qu'il s'agit d'une combinaison de chaînes ou de l'ensemble des chaînes qui en sont responsables [20].

1.4.2 Les voies de signalisation de FcεRI

La signalisation intracellulaire associée au récepteur FcεRI est complexe et n'est pas encore complètement élucidée. Lorsque le complexe IgE-FcεRI à la surface des basophiles ou des mastocytes est stimulé par un antigène, celui-ci cause une réticulation de deux complexes IgE-FcεRI [21-26] (Fig. 1). Cette réticulation mène à la phosphorylation des domaines ITAM de la chaîne bêta par la kinase Lyn. Cette phosphorylation facilite la liaison de Lyn sur la chaîne bêta, ce qui augmente localement la concentration de Lyn et amplifie la phosphorylation des ITAM de gamma [27]. La phosphorylation de gamma permet le recrutement de Syk. Syk va ensuite phosphoryler la molécule adaptatrice LAT (linker for activation of T-cell) présente dans la structure des radeaux lipidiques. LAT permet le recrutement et l'activation de la phospholipase C gamma (PLCγ), lui donnant

accès à son substrat $PI(4,5)P_2$, formant du diacylglycérol (DAG) qui active la PKC, et de l'inositol-3-Phosphate (IP_3) qui stimule la relâche de calcium du réticulum endoplasmique. Cette combinaison conduit à la dégranulation des basophiles (ou des mastocytes). Parallèlement, Lyn phosphoryle aussi la molécule adaptatrice d'échafaudage NTAL (non-T-cell activation linker). NTAL est responsable du recrutement de Grb2-Gab2 qui est subséquentment phosphorylé par Fyn. Lorsque Grb2-Gab2 est phosphorylé, elle peut lier et cibler la PI3K (Phosphoinositide 3-kinases) à la membrane. La PI3K catalyse la production de PIP_3 qui entraîne la production de cytokines et de chimiokines et mène aussi à la dégranulation.

Il a été démontré que l'initiation de cette cascade de signalisation est affectée par la proximité des complexes réticulés ainsi que par la valence des antigènes utilisé pour la stimulation des cellules [28]. La valence consiste au nombre de site sur l'antigène pouvant lier un IgE. Ainsi, des études ont montré qu'une distance trop grande ou trop courte entre les récepteurs activés avait un effet nuisible sur la signalisation. Ils ont aussi démontré que des antigènes multivalents étaient plus efficaces pour activer la signalisation que des antigènes bivalents. L'hypothèse est que des antigènes bivalents ne peuvent former que des réseaux linéaires ou circulaires de récepteurs activés, alors que les antigènes trivalents ou plus n'ont pas cette restriction.

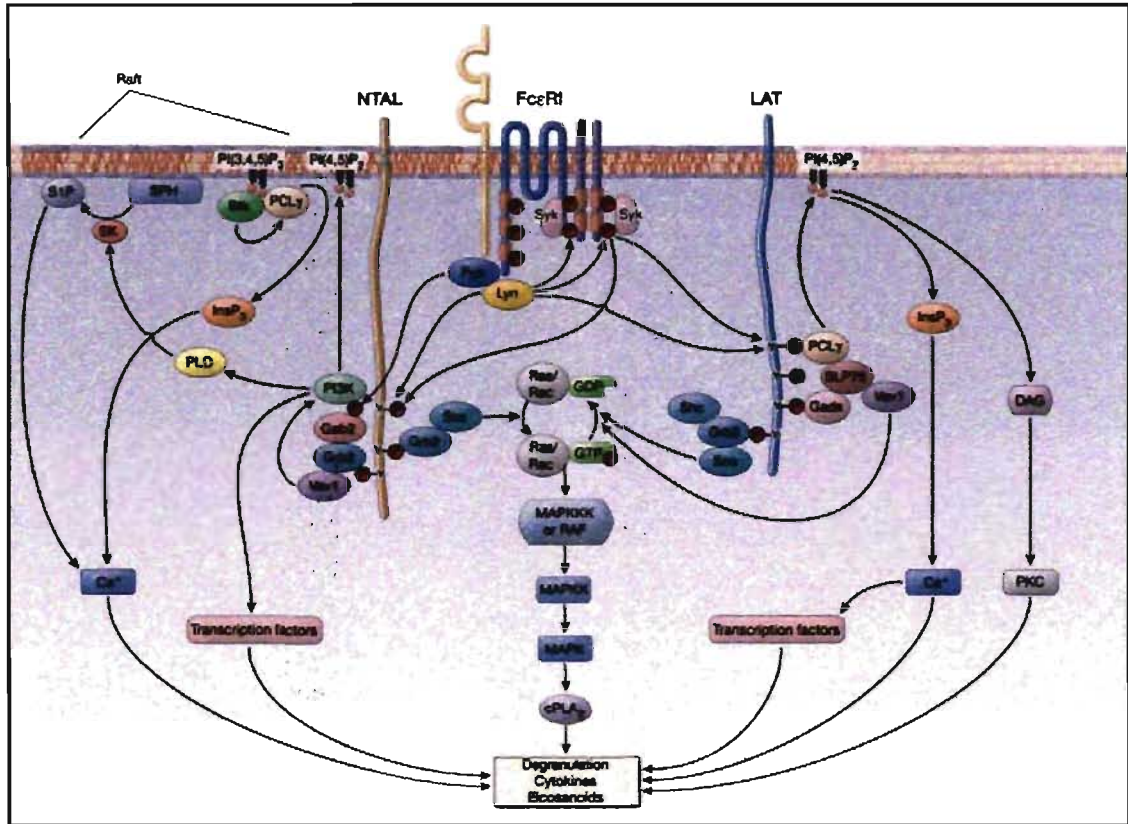


Fig. 1. Signalisation simplifiée du récepteur FcεRI. Schéma tiré de la revue de Rivera [21].

1.5 La lignée cellulaire RBL-2H3

La lignée cellulaire RBL-2H3 est une lignée basophilique de rat. Elle est fréquemment utilisée pour étudier les voies de signalisation intracellulaires du récepteur FcεRI puisque cette lignée réagit de la même façon que des basophiles humains suite à une sensibilisation de type IgE et une stimulation antigénique. La seule différence majeure se situe au niveau de la PKC beta, qui est constitutivement activée chez le RBL-2H3 et qui explique pourquoi une stimulation avec du calcium ionophore seul est suffisant pour entraîner la dégranulation. Cette lignée cellulaire semble donc adéquate pour mesurer une sensibilisation IgE puisque la dégranulation est proportionnelle à la quantité d'IgE présente.

Les cellules RBL-2H3 étant des cellules de rat, le récepteur FcεRI exprimé peut lier les IgE de souris mais pas les IgE humains. Afin de contourner ce problème, plusieurs groupes de chercheurs ont transfecté les cellules RBL-2H3 avec la chaîne alpha humaine.

1.6 Transfection de la chaîne alpha humaine

Au cours des années, différents laboratoires ont transfecté la chaîne alpha du récepteur FcεRI dans les cellules RBL-2H3. Différentes raisons ont motivé ces études. En 1992, l'équipe de Gilfillan [29] s'est questionnée sur l'interaction entre les chaînes du récepteur FcεRI ainsi que sur la signalisation menant à la dégranulation. Ainsi, suite à la transfection de la chaîne alpha humaine dans les RBL-2H3, son association avec les chaînes bêta et gamma endogènes a été observée par co-immunoprécipitation. Des extraits cellulaires ont été incubés avec de l'IgE humain radioactif et la radioactivité obtenue a été comparée suite à une immunoprécipitation de la chaîne bêta et de la chaîne alpha humaine. Leurs résultats démontrent qu'environ un quart des chaînes alpha humaines présentes sont associées avec une chaîne bêta de rat. Lorsque le pourcentage de dégranulation de ces clones suite à une stimulation via la chaîne humaine ou de rat a été mesuré, quelques clones obtenus dégranulaient presque autant par leur chaîne humaine que par leur chaîne de rat. Par contre, aucun de ces clones ne dégranulait aussi fortement que les cellules RBL-2H3 natives. Un immunoblot de type Western a été fait sur leur meilleur clone (RBL 48) en comparaison avec des RBL-2H3 en utilisant un anticorps contre les tyrosines phosphorylées suite à l'activation des cellules. Le même patron de phosphorylation pouvait être observé entre les deux lignées cellulaires. Suite à ces résultats ainsi que d'autres non mentionnés, la conclusion de cette étude était que la chaîne alpha humaine pouvait s'assembler avec les chaînes bêta et gamma de rat, et que le récepteur formé était fonctionnel pour mener à la dégranulation. Deux autres études [30, 31] ont tiré des conclusions similaires suite à la transfection d'une chaîne alpha humaine dans les RBL-

2H3. En 1995, une étude de Lowe et al [32] s'est servie du clone RBL 48 généré par Gilfillan [29] afin de valider le traitement des maladies allergiques en utilisant des anticorps anti-IgE pour empêcher leur liaison sur le récepteur FcεRI. Les RBL 48 ont été incubés avec du plasma de patients sensibilisés à l'herbe à poux en présence ou en absence d'une panoplie d'anticorps recombinant anti-IgE humain. Le relâchement d'histamine suite à la stimulation des cellules avec de l'extrait d'herbe à poux a été mesuré. Il fut remarqué qu'un anticorps en particulier, le rhuMAb-E25 (maintenant connu sous le nom d'Omalizumab) arrivait à bloquer la dégranulation des cellules de façon concentration dépendante. La conclusion de cette étude était donc que le test de dégranulation des RBL-2H3 exprimant la chaîne alpha humaine était une méthode efficace pour valider la fonctionnalité d'anticorps recombinants anti-IgE pour le traitement de maladies allergiques. Une autre étude de Wiegand [33], a développé sa propre lignée RBL-2H3 exprimant les chaînes alpha, bêta et gamma humaines nommé RBL SX-38. Des oligonucléotides ayant la capacité de lier des IgE humains pour leur habilité à bloquer le relâchement de sérotonine suite à une stimulation antigénique ont été testés. Cette lignée fut ensuite reprise en 2003 par Dibbern [34], qui s'intéressait à la sensibilité et à la spécificité de ces cellules vis-à-vis de différents allergènes. Du sérum de patients fortement allergique aux arachides a été incubé avec les RBL SX-38 et la dégranulation a été mesurée suite à une stimulation avec des extraits d'arachides ou d'herbe à poux. Cette étude a conclu que le test de dégranulation utilisant les RBL SX-38 était très sensible et spécifique chez les patients ayant un taux élevé d'IgE spécifique contre les arachides. Par contre, certains sérums de patients cliniquement allergiques aux arachides n'ont pas réussi à suffisamment sensibiliser les cellules pour entraîner une dégranulation. Ces sérums avaient typiquement moins d'IgE totaux et/ou spécifiques aux arachides. L'explication proposée étant que les basophiles des patients atopiques peuvent exprimer autant que 500 000 récepteurs FcεRI par cellule alors que les RBL SX-38 n'expriment qu'environ 100 000 récepteurs par cellule [33]. Ainsi, une lignée cellulaire exprimant plus de récepteurs aurait la capacité de détecter une sensibilisation IgE spécifique dans une plus grande proportion de sérums.

Marchand et al. [35] ont aussi développé une lignée de RBL-2H3 exprimant la chaîne alpha humaine. Ils voulaient savoir si des IgE monoclonaux mélangés avec des IgE de spécificité inconnue pouvaient provoquer une dégranulation différente de celle causée par des IgE de sérum de patients allergiques. Une variation de la dégranulation causée par les IgE de sérum a été observée entre les patients. De plus, il n'existait pas de corrélation entre le pourcentage de dégranulation et la quantité d'IgE spécifiques à l'antigène testé présente dans le sérum (dosé au préalable), à l'opposé du mélange contenant les IgE monoclonaux. Dans ces derniers, plus la proportion d'IgE spécifique augmentait, plus la dégranulation augmentait de façon linéaire. La conclusion de cette étude était que cette lignée cellulaire était un bon outil pour étudier la fonctionnalité des IgE dans des sérums humains. Takagi et al. [36] ont aussi développé une lignée de RBL-2H3 exprimant la chaîne alpha humaine. Ils se sont aussi intéressés à la corrélation entre la quantité d'IgE sérique et la dégranulation pour savoir si le test de dégranulation pourrait servir à doser les IgE dans un sérum. Une corrélation pouvait être observée lorsque le sérum était dilué de 25 fois et de 125 fois. Par contre, leurs expériences ont été effectuées en utilisant un anticorps anti-IgE humain pour induire la dégranulation au lieu d'un antigène spécifique comme dans le cas de l'étude de Marchand.

Un dernier groupe, dirigé par Vogel [37] a transfecté la chaîne alpha humaine seule, ou en combinaison avec les chaînes humaines bêta et gamma dans les RBL-2H3. Ils étaient intéressés à produire une lignée cellulaire pouvant servir à standardiser des extraits d'allergènes à des fins cliniques. Leurs clones produits ont été comparés avec le clone RBL 48 produit par Gilfillan [29] pour son potentiel de dégranulation. Leur clone le plus performant avait été transfecté avec les trois chaînes humaines, cependant, il n'exprimait que la chaîne alpha. Différents lots d'un allergène manufacturé sur trois ans ont été testés pour mesurer leur reproductibilité. Ces différents lots avaient des patrons de dégranulation quasi-identiques, démontrant que la composition et la concentration d'allergène dans

chacun des lots étaient similaires, comme demandé par la régulation nationale et internationale. Les auteurs ont conclu que leur lignée cellulaire pourrait être très utile pour la standardisation d'extraits d'allergènes selon leur effet biologique ainsi que pour s'assurer de la reproductibilité de lot en lot d'extraits manufacturés.

1.7 Objectifs du projet

Comme mentionné précédemment, il existe un besoin pour un test qui permettrait de mesurer une sensibilisation de type IgE à des agents HPM et BPM présents dans le milieu du travail. Nous nous sommes donc basés sur les précédents travaux afin de développer une lignée cellulaire de RBL-2H3 exprimant la chaîne alpha humaine qui possède une forte affinité pour les IgE humains. Notre objectif était de développer notre propre lignée cellulaire car nous avons besoin d'une lignée très sensible afin de mesurer une sensibilisation IgE spécifique potentiellement faible comme dans le cas d'une sensibilisation aux isocyanates [8]. En effet, cette lignée devrait être utilisée non seulement à des fins de diagnostics d'une sensibilisation aux agents de HPM et de BPM, mais aussi de prévention, dans le cadre d'études de suivi des travailleurs afin de déterminer le début d'une sensibilisation et ainsi d'identifier les travailleurs à risque de développer un asthme professionnel.

2. Matériel et Méthodes

2.1 Culture cellulaire

Les cellules RBL-2H3 ont été maintenues en culture dans un incubateur à une température de 37 °C et un pourcentage de CO₂ de 5%. Le milieu de culture utilisé était du MEM Eagle (Sigma-Aldrich) complété avec une concentration finale de 2mM L-glutamine, 1mM pyruvate de sodium, 100U/ml pénicilline, 100µg/ml streptomycine et 15% de FBS (Fetal Bovine Serum). Lors de la sélection de transfectants stables, l'antibiotique geneticin (Gibco) a été ajouté à une concentration de 500µg/ml. La zeocine (Invitrogen) a été utilisée à une concentration de 250µg/ml. Lors des passages cellulaires, après lavage au PBS 1X (phosphate buffered saline pH 7.4), les cellules RBL-2H3 ont été traitées avec de la trypsine (0.53mM EDTA, 0.25% trypsine de pancréas bovin, Sigma-Aldrich) pendant 5 minutes pour les détacher. Elles ont été ensuite centrifugées à 350 g pendant 5 minutes, puis resuspendues dans du milieu frais. Le nombre de cellules a été compté à l'aide d'un hémacytomètre, et la viabilité cellulaire a été mesurée par le test d'exclusion du bleu de Trypan. Dans le cas des expériences de cytométrie en flux, les cellules ont été détachées avec de l'Accutase (Sigma-Aldrich) pendant 10 minutes qui semble être un traitement moins dommageable que la trypsine pour les récepteurs de surface.

Les KU812F sont des cellules prébasophiliques humaines qui expriment le récepteur FcεRI. Bien que le récepteur FcεRI soit exprimé à la surface de ces cellules, les KU812F ne dégranulent pas suite à une stimulation antigénique (ou par le calcium ionophore) puisqu'elles sont déficientes en histamine déshydrogénase, l'enzyme responsable de la synthèse de l'histamine contenu dans les granules de sécrétion. Ces cellules ont été seulement utilisées comme témoins positifs lors des expériences de cytométrie en flux, immunoblot de type Western et d'immunocytofluorescence. Les KU812F ont été maintenues en culture dans les mêmes conditions que les RBL-2H3 à l'exception du milieu de culture. Le milieu de culture utilisé était du RPMI (Sigma-Aldrich)

complémenté pour avoir une concentration finale de 2mM L-glutamine, 4.5g/ml glucose, 1.5g/ml bicarbonate de sodium, 10mM HEPES (acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonique), 1mM pyruvate de sodium, 100U/ml pénicilline, 100 μ g/ml streptomycine et 10% de FBS.

2.2 Extraction d'ARN total

L'extraction d'ARN est nécessaire pour déterminer le profil d'expression d'un gène en mesurant la présence de l'ARN messager codant pour ce gène par RT-PCR. Brièvement, la technique utilisée a consisté à dissoudre les cellules dans une solution dénaturante (TRIZOL) afin d'inhiber les enzymes dégradants l'ARN (ARNases). L'ajout de chloroforme : isoamyl (49 : 1) a permis de séparer l'ARN de l'agent dénaturant. Ensuite l'ARN est précipité par centrifugation suite à l'ajout d'isopropanol, lavé avec de l'éthanol et dissout dans de l'eau exempt d'ARNases.

Le protocole utilisé a consisté à homogénéiser un million de cellules dans du TRIZOL (Invitrogen) en passant le volume complet dans une seringue 26 G^{1/2} dix fois. Les échantillons ont été conservés à -80°C ou utilisés immédiatement. Deux cent microlitres de chloroforme : isoamyl (49 : 1) (Sigma-Aldrich) ont été ajoutés aux échantillons avec le TRIZOL et agités vigoureusement pendant 15 secondes avant de les incuber à température ambiante pendant 10 minutes; les tubes étant agités à toutes les 2 minutes. Les tubes ont ensuite été centrifugés à 15 000 g pendant 15 minutes à 4°C. La phase supérieure (aqueuse) contenant l'ARN a été transférée avec soin (sans perturber l'interphase) dans des nouveaux tubes contenant 500 μ l d'isopropanol. Ils ont ensuite été mélangés doucement par inversion et incubés 10 minutes à température ambiante. Les tubes ont ensuite été centrifugés à 12 000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant a été ensuite jeté, avant d'ajouter un millilitre d'éthanol 75%. Les tubes ont été vortexés pour déloger le culot. Les tubes ont ensuite été centrifugés à 8500 g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant a été éliminé avec

soin, et les échantillons ont été séchés dans un Speed Vac à 43°C pendant 5-10 minutes jusqu'à ce que la majorité du liquide soit évaporé, sans que le culot ne soit sec. Le culot a été dissous dans 20 à 50 μ l d'eau DEPC (eau sans ADNase/ARNase) (Ambion) selon la taille du culot. Les échantillons ont été chauffés à 70°C pendant 10 minutes pour faciliter la dissolution du culot.

2.3 Le RT-PCR (Reverse transcription PCR)

Cette technique suit habituellement l'extraction d'ARN car elle permet d'obtenir de l'ADN complémentaire à partir d'ARNm. Brièvement, elle consiste à ajouter une transcriptase inverse à de l'ARNm, en plus des dNTPs et tampon de réaction. L'amorce utilisée est un oligonucléotide de thymidine (oligo dT). Cette amorce s'apparie à la queue d'adénosines des ARNm servant ainsi de site de départ pour la synthèse du brin complémentaire d'ADN par la transcriptase inverse.

Notre protocole a consisté à mettre dans un microtube : 1 μ l d'amorce Oligo(dT) d'Invitrogen 50 μ M, 1 μ l de mélange de dNTP 20mM, 2 μ g de solution d'ARN et compléter le volume à 20 μ l avec de l'eau sans ARNase (DEPC). Le mélange a été chauffé à 70°C pendant 10 minutes puis placé sur la glace 2-3 minutes. Ensuite, un pré-mélange a été préparé contenant par échantillon : 4 μ l de tampon First Strand 5X, 2 μ l de DTT 0.1M, 1 μ l de BSA acétylé (0.5 μ g/ml) et 0.5 μ l (20 Unités) d'inhibiteur d'ARNase (RNase OUT, Invitrogen). 7.5 μ l du pré-mélange a été ajouté à chaque tube de réaction et incubé à 42°C pendant 2 minutes avant d'ajouter 1 μ l de SUPERSRIPT™ II (200 Unités) à chaque tube. Les tubes ont été incubés à 42°C pendant 60 minutes avant d'être inactivés à 70°C pendant 15 minutes puis placé sur la glace. L'ADNc ainsi produit a servi de matrice pour l'amplification par PCR.

2.4 Le PCR

Le PCR (Polymerase Chain reaction) est une technique servant à amplifier un fragment d'ADN spécifique. Cette technique nécessite une ADN polymérase thermostable, une paire d'oligonucléotides spécifique à la séquence d'ADN désirée ainsi que des deoxynucléosides triphosphate (dNTPs). Le PCR se sépare en trois étapes. 1) La dénaturation, qui consiste à chauffer l'ADN de départ à une température de 94°C afin de dissocier les deux brins d'ADN de départ, 2) L'appariement des amorces (oligonucléotides) aux brins de départ, qui s'effectue à une température variante selon la longueur et composition des amorces et 3) L'extension des amorces par la polymérase en utilisant le brin de départ comme matrice. La répétition de ces 3 étapes permet donc d'amplifier un brin d'ADN spécifique et délimité par les amorces. Voir l'annexe 1 pour le tableau des amorces.

2.5 Purification d'ADN

L'ADN amplifié ou digéré a été purifié à l'aide du kit GFX PCR DNA and gel band purification d'Amersham. La technique consiste à faire migrer l'ADN sur un gel d'agarose, séparant ainsi les différents fragments d'ADN et à découper la bande correspondant à la taille de l'ADN désiré. Le kit fournit un tampon d'extraction qui sert à faire fondre l'agarose, ainsi que des colonnes d'affinité chargées positivement sur lesquelles l'ADN reste lié dû à sa charge négative. Le tampon d'élution contient des molécules chargées négativement afin de décrocher et ainsi purifier l'ADN retenu dans la colonne.

Une autre méthode de purification employée consistait à l'utilisation de gel d'agarose Low-melt. Il s'agit simplement de faire migrer l'ADN sur un gel d'agarose low-melt et de découper la bande d'ADN de la taille désirée. L'agarose a été ensuite fondu dans un tube Eppendorf à 65°C afin de libérer l'ADN, puis placé à - 80°C pendant 15 minutes pour précipiter l'agarose. L'échantillon a été ensuite centrifugé à 21000g pendant 15 minutes pour culotter l'agarose et récupérer le surnageant contenant l'ADN.

2.6 Le clonage

Les plasmides sont des fragments d'ADN extra chromosomiques souvent doubles-brins et circulaires. Cet ADN sert à exprimer des gènes accessoires dans des espèces bactériennes. Cet ADN se réplique indépendamment de l'ADN génomique et se sépare également entre les cellules filles. Les plasmides ont servi au développement de vecteurs plasmidiques pour l'expression de gènes étrangers dans des bactéries ou des cellules. Ces vecteurs ont plusieurs caractéristiques communes dont la présence d'un ou plusieurs marqueurs de sélection pour isoler les bactéries ou cellules hôtes du vecteur, un fort promoteur pour l'expression du gène étranger, ainsi qu'un site de restriction multiple pour faciliter l'insertion de l'ADNc du gène.

Les différents vecteurs plasmidiques utilisés dans ce projet sont :

- pTarget Mammalian Expression system de Promega
- pEGFP-N1 de BD Biosciences
- pDsRed2-N1 de BD Biosciences
- psiRNA-hH1zeo G2 kit d'InvivoGen

Le protocole utilisé pour le clonage a consisté à digérer 4 μ g de vecteur avec deux enzymes différentes pour créer des extrémités cohésives à 37°C pendant une heure. Un microlitre (10 Unités) de CIP (déphosphorylase alcaline, New England Biolab) a été ajouté 30 minutes avant la fin de la dernière digestion (si digestion séquentielle) afin de diminuer la recircularisation du vecteur lors de la ligation. Les enzymes utilisées varient selon le vecteur et selon l'insert. (Voir annexe 1 pour la liste des amorces/inserts). L'insert digéré a été ensuite ligué pendant 16 heures à 4°C dans le vecteur avec un ratio vecteur:insert de 3:1, soit 60ng : 20ng, dans un volume de 20 μ l. Suite à la ligation avec 5 Unités de T4 DNA ligase (Invitrogen), 10 μ l de l'ADN ligué a été ajouté à 100 μ l de bactéries ultracompétentes *E.coli* DH5 α décongelées sur glace et incubées 10 minutes avec l'ADN. Un choc thermique de 45 secondes à 42°C a été effectué pour faire entrer l'ADN dans les bactéries avant de les

laisser sur la glace pendant 2 minutes. Le milieu de culture LB (bouillon de culture bactérienne) (900 μ l) a été ajouté aux tubes placés ensuite sous agitation (250 rpm) à 37°C pendant une heure. Les pétris de culture ont été préparés pendant ce temps si l'utilisation de X-Gal et IPTG est nécessaire. Cent microlitres d'IPTG 100mM et 20 μ l de X-Gal 50mg/ml ont été étendus par pétri et laissés absorber au moins 30 minutes à l'avance.

Le vecteur pTargeT ne nécessite pas d'être digéré avant la ligation de l'insert car il est pré-digéré pour donner des extrémités cohésives thymines. Certaines ADN polymérase comme la Taq utilisée en PCR laissent des extrémités adénines en 3' des deux brins. Le Vecteur pTargeT a été développé pour tirer avantage de cette propriété et permet donc la ligation d'insert d'ADN directement à la suite d'un PCR sans qu'une digestion enzymatique ne soit nécessaire.

L'isolation de plasmides bactériens produits suite au clonage, a été faite en utilisant le kit de MiniPrep de Qiagen. Pour de plus grandes quantités d'ADN, le kit MidiPrep a été utilisé. Les deux kits ont été utilisés selon les instructions du manufacturier.

2.7 La mutagenèse

La mutagenèse est utilisée afin de changer la séquence d'ADN d'un gène. Cette modification peut être aléatoire ou ciblée selon la situation. Dans notre cas, trois acides aminés précis devaient être modifiés, et un site de restriction devait être retiré. Pour ce faire, nous avons utilisé le kit de mutagenèse dirigée GeneEditor de Promega. Ce kit consiste en une amorce de mutagenèse pour modifier le gène de résistance à l'ampicilline du vecteur contenant notre insert afin de le rendre résistant au mélange d'antibiotiques GeneEditor. Cette amorce utilisée conjointement avec deux amorces synthétisées pour la mutagenèse du domaine Ig2 et du site KpnI permet la synthèse d'un brin possédant les trois mutations. Ce vecteur a été ensuite transformé dans des bactéries BMH 71-18 *mutS* qui sont

déficientes pour la réparation de l'ADN pour produire l'ADN muté en grande quantité et le transformer dans des bactéries DH5 α . La présence des mutations a été déterminée par digestion KpnI puisque le site doit être absent si la mutagenèse a fonctionné. Les clones positifs ont alors été séquencés.

Les oligonucléotides de mutagenèse utilisés sont :

Alpha_Del_Kpn :

5'GTAATAAAAGCTCCGCGTGAGAAGTACTGGCTACAACCTCATTTTCCCATCATT
GGCGGTGATTC 3'

Chimère_Ig2 :

5'CTCAAGTACTGGTATGAGAACCACGACTACATGATTACAAATGCCACAGTTG
AAGACAG 3'

2.8 Les shRNA

Les shRNA ont été produit contre la séquence codante du gène Fc ϵ RI α de rat (NM_012724 dans la base de donnée NCBI). Pour le développement des shRNA, le kit psiRNA-hH1-zeo G2 d'Invitrogen a été acheté. Le programme siRNA wizard a été utilisé pour déterminer les séquences à utiliser. Les séquences choisies étaient 467 : GCAACAACATCTCCATTAGA qui contenait les trois codons mutés du domaine D2 dans la chimère, donc 11/20 nucléotides d'homologie avec la chimère ainsi que la séquence 534 : GAACAAGGTTGAATGTAAAT qui avait seulement 10 nucléotides sur un total de 20 d'homologues.

Les oligonucléotides sens et antisens pour les deux séquences ont été dilués à une concentration de 25 μ M. Ensuite, 2 μ l d'oligonucléotide sens et antisens ont été incubés avec 6 μ l de NaCl 0.5M et 20 μ l d'eau pendant 15 minutes à 80°C dans un bloc chauffant. Le bloc a refroidi à température ambiante pour permettre aux brins de s'apparier. Les réactions ont été utilisées lorsqu'elles avaient atteint une température de 35°C. Un mélange contenant 1 μ l d'oligonucléotide apparié, 1 μ l (5 Unités) de T4 DNA Ligase, 2 μ l de tampon de ligation 10X, 100 μ g de vecteur psiRNA digéré préalablement de façon séquentielle par

HindIII et Acc 65I, et complété à 20 μ l avec de l'eau a été préparé. Le mélange a été incubé trois heures à température ambiante. La construction a ensuite été transformée dans des bactéries ultracompétentes DH5 α . Les colonies obtenues ont été criblées par digestion enzymatique avec SpeI et séquencées.

2.9 Le séquençage

Les plasmides ont été séquencés au Centre génomique de l'université McGill avec 100-500ng d'ADN par tube de séquençage dans 20 μ l total. Les amorces de séquençage 20 μ M ont été mises dans des tubes différents, à un volume de 5 μ l par échantillon. Les amorces utilisées pour les shRNA étaient OL381 et OL178. Elles ont été achetées chez Invitrogen. Les amorces utilisées pour séquencer les chaînes alpha humaine, chimérique et de rat ont été commandées chez Alpha DNA. Elles reconnaissent des régions internes des inserts. Elles sont décrites dans le tableau des amorces de l'annexe 1.

2.10 La transfection

La transfection est la stratégie pour introduire des gènes dans des cellules eucaryotes. Les trois méthodes de transfection existantes sont biochimiques, physiques et virales. Différentes techniques biochimiques et physiques ont été testées afin de déterminer la plus efficace pour la transfection dans les cellules RBL-2H3. Le réactif SuperFect de QIAGEN a été choisi. La SuperFect est un dendrimère ayant une structure sphérique avec des branches se terminant en groupes d'acides aminés chargés. Le complexe ADN-SuperFect a une charge nette positive lui permettant de se lier à des récepteurs négativement chargé à la surface des cellules pour induire l'endocytose du complexe. Les transfections ont été réalisées avec 8 μ g d'ADN et 40 μ l de SuperFect pour un million de cellules en flasque T-25, ou 0.4 μ g d'ADN et 2 μ l de SuperFect pour 50 000 cellules dans des plaques de 24 puits. Le protocole a consisté à incubé 5 minutes l'ADN dans du milieu

de culture sans sérum à une concentration de $1\mu\text{g}/100\mu\text{l}$. L'ADN dilué a été incubé 10 minutes avec la SuperFect avant d'ajouter du milieu de culture complet pour obtenir un volume final de 3ml en flasque ou $300\mu\text{l}$ en puits. Le mélange SuperFect-ADN dilué a été ajouté aux cellules préalablement lavées avec du milieu de culture complet. Les cellules ont été incubées avec le mélange pendant 3 heures à 37°C . Le mélange a ensuite été aspiré et remplacé par du milieu frais. L'antibiotique geneticine a été ajouté aux cellules 24 heures plus tard à une concentration de $500\mu\text{g}/\text{ml}$ pour débiter la sélection de clones stables. L'antibiotique zeocine a par contre été ajouté immédiatement après la transfection à une concentration de $250\mu\text{g}/\text{ml}$ car il prend plus de temps à agir.

2.11 L'immunoprécipitation

L'immunoprécipitation est une technique qui sert à enrichir un échantillon en une protéine peu présente, de déterminer les partenaires d'une protéine ou de diminuer le bruit de fond obtenu en Immunoblot de type Western. Elle consiste à incuber des billes d'agarose/sépharose recouverte de protéines bactériennes A ou G avec un anticorps spécifique pour la protéine ciblée afin de la séparer du reste de l'extrait cellulaire.

Le protocole utilisé consiste à incuber $15\mu\text{l}$ de billes d'agarose protéine G compacté avec $500\mu\text{l}$ de PBS 1X contenant $5\mu\text{g}$ d'anticorps pendant une heure à 4°C avec agitation. Les billes ont ensuite été lavées trois fois avec du PBS 1X pour éliminer l'excédant d'anticorps avant d'ajouter l'extrait cellulaire jusqu'à un maximum de $500\mu\text{g}$ de protéines. Les protéines ont été incubées avec les billes pendant une heure à 4°C sous agitation. Elles ont ensuite été lavées trois fois avec du PBS 1X pour éliminer les protéines non liées. Les billes ont ensuite été resuspendues dans $60\mu\text{l}$ de tampon Laemmli 2X et bouillies 5 minutes pour séparer les protéines des billes. Les billes ont été centrifugées et un immunoblot de type western a été réalisé avec le surnageant.

Les anticorps utilisés pour faire l'immunoprécipitation sont :

- Anticorps monoclonal de souris anti-FcεRIα humain, clone 3G6 (Upstate)

- Anticorps monoclonal de souris anti-FcεRIα de rat (Upstate)
- Anticorps de lapin anti-GFP (Cedarlane)

L'obtention des protéines totales cellulaires a été fait en lysant les cellules à l'aide d'un tampon de lyse composé de 100mM acide Borique, 80mM NaCl, 0.5% Triton-X-100, 1mM PMSF (phenylmethanesulphonylfluoride) et 1μg/ml d'inhibiteurs de protéase aprotinine, leupeptine et pepstatin). Les protéines ont été dosées en utilisant le kit de dosage protéique RC de BioRad.

2.12 L'immunoblot de type Western

L'immunoblot de type Western est une technique très sensible qui permet la détection d'une protéine particulière dans un extrait cellulaire. Les protéines sont séparées par électrophorèse selon leur poids moléculaire dans un gel d'acrylamide et transférées sur un support solide. Ce support est incubé avec une solution de blocage afin de combler les sites non occupés par des protéines et diminuer le signal non spécifique. Une sonde, le plus souvent un anticorps spécifique pour la protéine d'intérêt, est ensuite incubée avec le support. Un anticorps couplé à la peroxidase de raifort (HRP) dirigé contre l'anticorps précédent est ajouté. Cette enzyme crée un signal lumineux en présence de son substrat. Les appareils de migration et de transfert utilisés proviennent de la compagnie BioRad. Pour la chaîne alpha (45 kDa), un gel d'acrylamide dénaturant SDS-PAGE de 12% a été utilisé. Les échantillons ont migré une heure à 200 Volts. Le transfert a été effectué pendant une heure à 100 Volts sur une membrane de nitrocellulose. La membrane a ensuite été lavée une fois avec du TBS 1X Tween 0.05% (TBS-Tween). La membrane a été colorée au Rouge de Ponceau pendant 30 secondes pour vérifier que le transfert a bien fonctionné (si les échantillons proviennent d'une immunoprécipitation, cette étape est ignorée car la quantité de protéines est souvent trop faible pour être détectée par Ponceau). La membrane a ensuite été lavée dans du TBS-Tween jusqu'à ce que la coloration soit très faible. Elle a

ensuite été incubée pendant une heure à température pièce sur une plaque agitatrice à faible intensité dans une solution de lait en poudre 5% dissout dans du TBS-Tween (solution de blocage). Suite au blocage, la solution contenant l'anticorps primaire a été ajoutée. La membrane a été incubée pendant 16 heures à 4°C avec l'anticorps à faible agitation. Elle a ensuite été lavée une fois pendant 10 minutes et deux fois 5 minutes dans du TBS-Tween. La solution contenant l'anticorps secondaire a ensuite été ajoutée à la membrane et incubée à température pièce à faible agitation pendant une heure avant d'être lavée comme à l'étape précédente. La membrane a ensuite été incubée 30 secondes avec le substrat de la HRP (Pico ou Femto de la compagnie Pierce) avant de faire l'acquisition. Tous les anticorps utilisés ont été dilués dans du lait 5%, les anticorps secondaires anti-immunoglobuline de lapin, souris et chèvre ont été dilués 1/10000. Les anticorps primaires ont été dilués selon le tableau I.

Tableau I. Liste des anticorps utilisés pour les immunoblots de type Western

Nom de l'anticorps	Compagnie	Dilution	Hôte	Clone
Anti-FcεRIα humain	Upstate	1/3000	Lapin	Polyclonal
Anti-FcεRIα humain biotinylé	eBioscience	1/1000	Souris	AER-37
Anti-FcεRIα humain	Santa-Cruz	1/500	Chèvre	polyclonal
Anti-FcεRIα de rat	Santa-Cruz	1/500	Chèvre	polyclonal
Anti-GFP	Cedarlane	1/200	Lapin	Polyclonal

La protéine recombinante FcεRIα humaine achetée de la compagnie Abnova a été utilisée comme témoin positif. La quantité déposée sur gel était de 430ng.

2.13 La cytométrie en flux

Cette technique sert principalement à compter, identifier et séparer des particules (cellules) présentes dans un liquide en mouvement. Un rayon lumineux de longueur d'onde

unique provenant d'un laser traverse le liquide en un point précis. Plusieurs détecteurs sont dirigés à l'endroit où le faisceau lumineux traverse le liquide. Chaque particule présente dans le liquide passe une par une à grande vitesse devant le faisceau. Ces particules diffractent la lumière dans plusieurs directions. Le détecteur FSC (forward scatter) mesure la lumière diffractée en face du faisceau et permet d'extrapoler la taille des particules qui le traverse. Le détecteur SSC (side scatter) est perpendiculaire au faisceau et mesure la lumière diffractée à 90°, il permet de mesurer la complexité de la particule, comme le nombre ou taille de granules, forme du noyau etc. Si les cellules sont marquées avec une molécule fluorescente, cette dernière est excitée par la lumière du faisceau et émet de la lumière d'une longueur d'onde différente. L'énergie lumineuse produite est mesurée par des détecteurs de fluorescence qui reconnaissent une plage de longueurs d'onde précise. Le détecteur FL1 mesure la lumière émise par le FITC et l'Alexa-488, le détecteur FL2 mesure la lumière émise par la phycoérythrine. Le marquage des cellules avec des anticorps couplés à une molécule fluorescente permet donc d'observer la présence de protéines spécifiques. Cette technique a été utilisée pour détecter la présence de la chaîne alpha native et chimérique du récepteur FcεRI. Le protocole de marquage varie selon l'anticorps utilisé, mais certaines conditions sont communes. Tous les anticorps ont été dilués dans du PBS 1X et incubés avec les cellules à 4°C pendant 30 minutes. Les cellules ont été lavées trois fois au PBS 1X avant d'être incubées dans 500 μl d'anticorps secondaire à une dilution de 1/1000 dans du PBS 1X.

Tableau II. Liste des anticorps utilisés en cytométrie de flux

Nom	Compagnie	Dilution	Volume d'incubation	Anticorps secondaire	Information additionnelle
Anti-Fc ϵ RI α humain monoclonal biotinylé	eBioscience	1/100	100 μ l	Streptavidine Alexa-488	Condition pour sang total
		1/1000	500 μ l		Condition pour RBL 2H3
Anti-Fc ϵ RI de rat monoclonal	BD Pharmingen	1/1000	500 μ l	Goat anti-mouse Alexa-488	
Anti-Fc ϵ RI de rat	abcam	1/1000	500 μ l	Mouse anti-rat Alexa-488	
Anti-IgE de souris-PE (0.1 μ g/ μ l)	eBioscience	1/100	100 μ l	aucun	Cellules préincubées avec IgE
Anti-IgE humain FITC	Caltag Laboratories	1/100	100 μ l	aucun	Dans 100 μ l de sang total

Le test d'activation des basophiles en sang total est un test de cytométrie permettant de déterminer une sensibilisation de type IgE spécifique. Ce test a été utilisé à des fins de validation des anticorps dirigés contre la chaîne alpha humaine ainsi que pour valider l'essai de dégranulation des basophiles. Il repose sur le fait que les basophiles sanguins sont associés à des IgE spécifiques et qu'il suffit de les mettre en présence d'un antigène pour lequel le donneur est sensibilisé pour les activer. Les basophiles activés expriment à leur surface la protéine CD203c. Les cellules sont marquée avec un anticorps contre les IgE humains (ou contre Fc ϵ RI α) pour discriminer les basophiles et contre le CD203c pour mesurer leur activation. Le marquage de cellules en sang total diffère du protocole de base de cytométrie utilisé pour les autres types cellulaires. Il consiste à incuber 100 μ l de sang avec 10 μ l de solution d'herbes à poux 1/10000 (antigène) ou de fMLP 10⁻⁵M (contrôle positif d'activation) dilué dans du PBS 1X dans un micro tube. L'antigène et le fMLP ont été incubés avec le sang 10 minutes à 37°C et 10 minutes à 4°C. Ensuite, 20 μ l d'anticorps anti-CD203c (Immunotech, concentration non disponible) et 10 μ l d'anti-IgE FITC (2 μ g) ou 1 μ l (0.5 μ g) d'anti-Fc ϵ RI alpha humain biotinylé ont été ajouté à chaque tube. Le sang a

été incubé 30 minutes à 4°C avec les anticorps. Ensuite, 10 μ l de Streptavidine-Alexa488 dilué 1/1000 (10ng) dans du PBS 1X ont été ajoutés aux tubes appropriés. Le lavage a été fait en ajoutant 1ml de PBS 1X à chaque tube avant de centrifuger à 400 g à température pièce 3 minutes et d'aspirer le surnageant, cette étape a été faite deux fois. Le culot a été resuspendu dans 1ml d'immuno-lyse 1 : 25 (Whole blood lysing reagent kit, Beckman Coulter) pour lyser les globules rouges. Le culot a ensuite été transféré dans des tubes de 15ml avant d'y ajouter 250 μ l de l'agent fixateur du kit moins de deux minutes après l'immuno-lyse pour fixer les globules blancs. Les tubes ont ensuite été vortexés et lavés deux fois comme décrit précédemment. Les cellules ont été resuspendues dans 1ml de PBS 1X et transférées dans des tubes à cytométrie pour faire l'acquisition.

2.14 La microscopie à épifluorescence

Cette technique permet d'observer la localisation précise d'une protéine spécifique par microscope. Il s'agit d'un microscope équipé d'une lampe à mercure et de différents filtres, qui sont spécifiques à des fluorochromes. La technique consiste à marquer des cellules avec des anticorps couplés à une molécule fluorescente et de les monter sur lame de microscope. Lorsque le faisceau de lumière provenant de la lampe atteint le filtre, seul la longueur d'onde excitatrice du fluorochrome peut le traverser. Cette lumière excite le fluorochrome couplé à l'anticorps, qui émet alors une longueur d'onde différente spécifique. Une caméra, associée à l'objectif du microscope permet de faire l'acquisition par prise de photos, ou de vidéos. Cette technique a donc l'avantage de nous permettre d'observer la localisation spécifique d'une protéine particulière avant et après stimulation si les photos sont analysées par déconvolution, ou pour voir si une protéine non exprimée à la surface de la cellule est séquestrée au réticulum endoplasmique.

Les cellules ont été mises sur lame de deux façons différentes. La première a consisté à faire croître les cellules dans des puits dans une plaque de 6 puits sur des lamelles de verre d'épaisseur 1 (0.13-0.17mm) de Fisher. L'autre méthode consiste à

récolter des cellules et faire des cytopspins sur lames de microscopie (Fisher) avec 75 000 cellules après centrifugation à 400 g pendant 6 minutes. Les cellules sur lamelle et sur lame ont ensuite été traitées de la même façon. Chaque étape a été faite à température pièce, sauf si mention du contraire. Les étapes de lavage ont été faites avec du TBS 1X. Les cellules ont été lavées trois fois avant d'être fixées avec du paraformaldéhyde (PFA) 4% ou de l'Intraprep (Beckman Coulter) pendant 10 minutes. Alternativement, les cellules peuvent être fixées avant l'étape du cytopspin. Les cellules ont été lavées trois fois et perméabilisées avec du Triton 0.1% (Triton-X-100 dans du TBS 1X) pendant 10 minutes. Les cellules ont été lavées trois fois et incubées avec une goutte d'Image-iT Fx Enhancer (Invitrogen) pendant 15 minutes, pour diminuer le bruit de fond. Les cellules ont été lavées trois fois et incubées avec une goutte de solution de blocage universel de Dakocytomation pendant 15 minutes. Trois autres lavages ont été effectués avant d'ajouter l'anticorps primaire ou l'isotype contrôle, à une même concentration pour 16 heures à 4°C. Ensuite, les cellules ont été lavées trois fois et incubées avec l'anticorps secondaire dilué 1/1000 dans du TBS 1X pendant 1-2 heures. Les cellules ont ensuite été lavées trois fois et incubées avec du DAPI (Molecular probes) 1/1000 dans du TBS 1X pendant 5 minutes pour identifier l'ADN des cellules. Cette étape a aussi servi pour déterminer si nos cellules étaient contaminées par des mycoplasmes, ce qui n'était pas le cas. Les cellules ont ensuite été lavées trois fois et montées sur lame avec du réactif anti-terne (Prolong antifade, Invitrogen) pour augmenter la durée de vie des fluorochromes en diminuant le « photobleaching ».

Le seul anticorps contre la chaîne alpha du récepteur FcεRI donnant un signal spécifique positif est l'anti-FcεRI monoclonal de souris biotinylé (eBioscience) à une dilution de 1/100 dans du TBS 1X. L'anticorps secondaire utilisé est l'anti-immunoglobuline de souris couplé à l'Alexa-594 produit chez le poulet (Molecular probes).

2.15 Essai de dégranulation

L'essai de dégranulation sert à mesurer la proportion de β -hexosaminidase, une enzyme associée aux granules de sécrétion, libérée dans le milieu par les cellules RBL-2H3 suite à une stimulation antigénique ou non-antigénique. Cette dégranulation est proportionnelle à la fonctionnalité du récepteur Fc ϵ RI. Ce test a été utilisé pour mesurer la répression de la chaîne alpha de rat ainsi que pour vérifier la fonctionnalité du récepteur de rat associé avec la chaîne alpha humaine ou chimérique.

Le protocole consiste à ensemencer une plaque de 24 puits avec 50 000 cellules RBL-2H3 au jour 1. Au jour 2, le milieu a été remplacé par 490 μ l de milieu frais. Ensuite, 10 μ l d'IgEm (IgE de souris) anti-DNP-BSA (dinitrophenyl couplé à une molécule de BSA) dilué dans du milieu de culture a été ajouté pour avoir une concentration finale de 50ng/ml. Après 22 heures, les cellules ont été lavées trois fois avec du tampon PIPES (NaCl 140mM, KCl 5mM, Glucose 5.5mM, MgCl₂ 0.6mM, PIPES 10mM, CaCl₂ 1mM et BSA 0.1% pH7.4). Aux puits contrôles ont été ajoutés 500 μ l de PIPES, et 490 μ l aux autres puits. Ensuite, 10 μ l de solution de DNP-BSA ont été ajoutés aux puits contenant 490 μ l de PIPES pour obtenir une concentration finale croissante de DNP-BSA de 1 à 40ng/ml. La plaque a été ensuite incubée à 37°C avec agitation légère pendant 10 minutes. Trois cents microlitres par puits a été alors transféré dans des microtubes (fraction surnageant). Le restant a été aspiré et remplacé par 500 μ l de Triton 0.5% (fraction intracellulaire). Des plaques ELISA de 96 puits ont été préparées en y mettant 62.5 μ l de fraction surnageant ou intracellulaire par puits. Ensuite, 25 μ l de substrat de la β -hexosaminidase a été ajouté par puits (1,3mg/ml de p-nitrophényl-N-acétyl- β -D-glucosamide dans du citrate de sodium 0.04M pH 4.5). La plaque a été incubée pendant une heure à 37°C avec agitation légère. La solution Stop (Glycine 0.2M pH10) a été ensuite ajoutée, 75 μ l par puits. La coloration jaune est proportionnelle à la quantité de β -hexosaminidase. Cette coloration a été mesurée dans un

lecteur de plaque à une longueur d'onde de 405nm. Le pourcentage de dégranulation a été calculé selon la formule : $100 * (\text{DO du surnageant} / \text{DO du surnageant} + \text{DO fraction intracellulaire})$.

Un autre protocole de dégranulation utilisé dans le projet utilise le calcium ionophore (2 μM) pour induire une dégranulation indépendante du récepteur Fc ϵ RI. Les cellules ne nécessitent pas une incubation préalable avec l'IgE. L'ajout du calcium ionophore remplace l'étape du DNP-BSA dans le protocole décrit précédemment.

L'expérience de compétition entre l'IgEh (IgE humain) et l'IgEm a été réalisée en utilisant le protocole standard. Brièvement, les puits sensibilisés avec de l'IgEh et de l'IgEm ont été remplis avec 480 μl de milieu de culture plutôt que 490, et 10 μl de chaque solution ont amené la concentration finale d'IgEm et IgEh à 5, 10 ou 50ng/ml. Lors des expériences de dégranulation des clones transfectés avec la chaîne alpha ou la chimère, les cellules ont été sensibilisées avec 50ng/ml d'IgEh. Des anticorps anti-IgEh (QED et BD Pharmingen) 100ng/ml ont été utilisés à la place du DNP-BSA pour stimuler les cellules.

3. Résultats

3.1 Transfection de la chaîne alpha humaine

L'ADN codant pour la chaîne alpha humaine a été acheté de la compagnie ATCC. Cet ADN a été ensuite produit et cloné dans le vecteur d'expression pTarget avec succès. Les cellules RBL-2H3 ont été transfectées en flasque T-25 avec cette construction en utilisant l'agent de transfection SuperFect de QIAGEN. D'autres agents de transfection (PerFectin de Genlantis et GeneJammer de Stratagene) ainsi qu'une méthode de nucléotransfection (système Amaxa) ont donné un taux de transfection beaucoup plus faible (résultats non-montrés). Des transfectants stables (RBL-T) ont été obtenus après deux semaines d'incubation avec l'antibiotique geneticine. Lorsque testées par RT-PCR, ces cellules ont démontré la présence de l'ARNm codant pour la chaîne alpha humaine (Fig. 2). Les cellules pré-basophiliques humaines KU812F ont été utilisées comme témoin positif. Comme attendu, la chaîne alpha humaine n'a pas été détectée dans les cellules RBL-2H3 (Fig. 2).

RT-PCR

RBL RBL-T KU812F



Fig. 2. **Détection de l'ARNm de la chaîne alpha humaine.** PCR pour la chaîne alpha humaine sur ADNc de RBL-2H3 (RBL), de RBL-T et du contrôle positif KU812F. L'ARNtot a été obtenu par la technique d'extraction de l'ARNtot. L'ADNc a été produit puis amplifié par RT-PCR. Représentatif de 5 expériences individuelles.

Nous avons donc ensuite vérifié l'expression de la chaîne alpha humaine par Immunoblot de type Western (Fig. 3). L'anticorps polyclonal utilisé s'est avéré être non-spécifique car il reconnaissait aussi la chaîne alpha de rat. Ainsi, ce résultat ne permettait pas de conclure sur l'expression de la chaîne alpha humaine au niveau protéique.

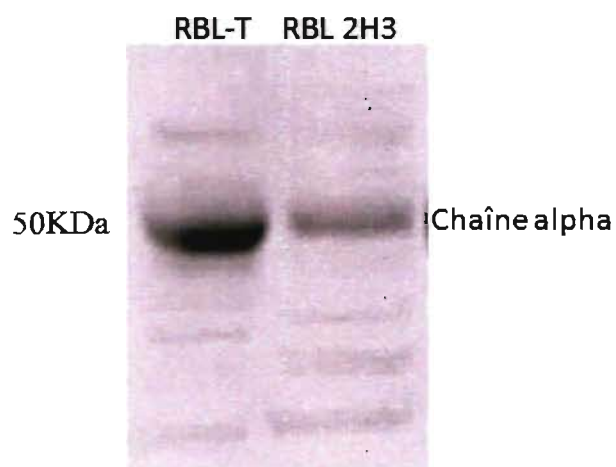


Fig. 3. Détection par immunoblot de la chaîne alpha humaine avec un anticorps polyclonal de lapin. La membrane a été incubée comme décrit dans la section Matériels et Méthodes. La bande qui correspond à la chaîne alpha humaine dans les RBL-T est aussi présente dans les RBL-2H3 (50KDa). Représentatif de 3 expériences individuelles.

Nous avons ensuite tenté d'améliorer la spécificité en faisant une immunoprécipitation en utilisant l'anticorps monoclonal 3G6 de la compagnie Upstate qui est aussi produit contre la chaîne alpha humaine. Dans ce cas, deux bandes ont été observées (Fig. 4). Une de ces bandes se trouvait à environ 50 kDa, similaire au poids théorique de la chaîne alpha humaine. Cette nouvelle combinaison d'anticorps arrivait cependant toujours à détecter la chaîne alpha de rat comme la chaîne alpha humaine.

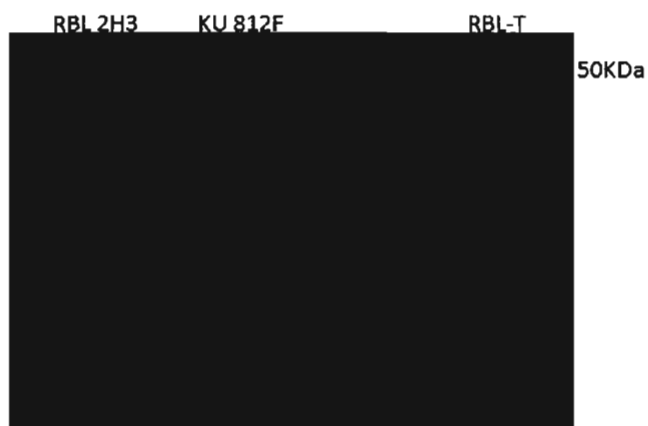


Fig. 4. **Détection par immunoblot d'échantillons immunoprécipités avec l'anticorps monoclonal 3G6.** La membrane a été incubée comme décrit dans la section Matériels et Méthodes. Représentatif de 3 expériences individuelles.

Une nouvelle immunoprécipitation a été alors réalisée avec différentes combinaisons d'autres anticorps commercialement disponibles. Quatre anticorps ont été utilisés pour immunoprécipiter des échantillons de RBL-T, KU812F et RBL-2H3. De gauche à droite, il s'agit de l'anticorps monoclonal de souris anti-FcεRIα de rat, l'anticorps monoclonal anti-FcεRIα humain biotinylé d'eBioscience, l'anticorps polyclonal de lapin anti-FcεRIα humain et l'anticorps monoclonal de souris 3G6 anti-FcεRIα humain. Le nouvel anticorps monoclonal biotinylé de souris de la compagnie eBioscience a été utilisé pour la révélation (Fig. 5). Le résultat obtenu nous démontre que ces nouvelles combinaisons d'anticorps n'arrivent toujours pas à discriminer entre la chaîne alpha humaine et de rat.

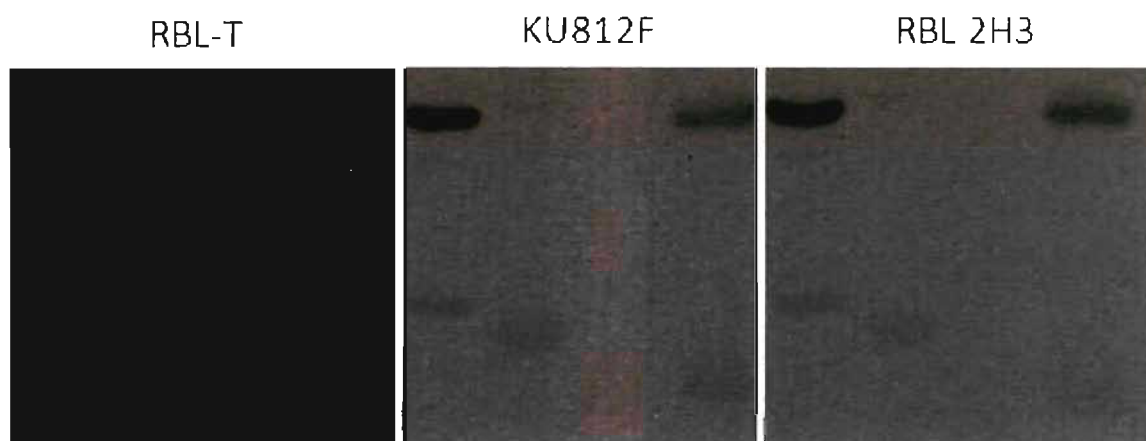


Fig. 5. **Détection par immunoblot de la chaîne alpha humaine.** L'anticorps monoclonal anti-FcεRIα humain biotinylé a été utilisé pour la révélation. La membrane a été incubée comme décrit dans la section Immunoblot de type Western du Matériels et Méthodes. Chaque lignée cellulaire a été immunoprécipitée avec les anticorps suivants : Puit 1, anti-FcεRIα de rat; Puit 2, anticorps monoclonal anti-FcεRIα humain biotinylé; Puit 3, anticorps polyclonal de lapin anti-FcεRIα humain; Puit 4, anticorps monoclonal 3G6 anti-FcεRIα humain.

Afin de discriminer l'expression de la chaîne humaine et de la chaîne de rat, nous avons tenté de faire une immunoprécipitation sur des extraits cellulaires incubés avec de l'IgE humain suivi d'une détection avec un anticorps anti-IgE humain (Fig. 6). Cependant, ce protocole n'a encore une fois pas permis de discriminer entre la chaîne alpha de rat et la chaîne humaine.

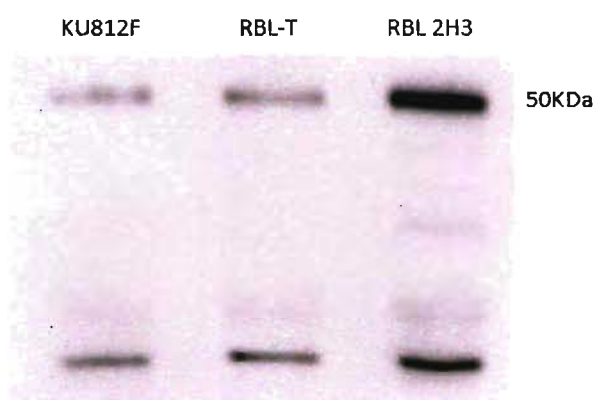


Fig.6. **Détection de la chaîne alpha humaine par immunoblot.** Les échantillons ont été immunoprécipité avec un anticorps anti-IgE humain de BD Pharmingen. La membrane a été incubée comme décrit dans la section Immunoblot de type Western du Matériels et Méthodes. La chaîne alpha (à 50KDa) humaine et de rat est détectée avec l'anticorps biotinylé. Cette méthode est donc inadéquate pour discriminer entre la chaîne alpha humaine et de rat. Représentatif de 4 expériences individuelles.

Nous avons donc ensuite analysé les cellules RBL-T et RBL-2H3 par cytométrie en flux avec l'anticorps anti-chaîne alpha humaine biotinylé d'eBioscience pour l'expression de la chaîne alpha humaine. Cependant, aucun signal ne fut détecté dans ces deux lignées cellulaires. L'anticorps a préalablement été validé sur des basophiles humains isolé de sang total (résultats non montrés). Bien que la détection de la chaîne alpha humaine dans nos transfectants soit une étape importante, c'est la dégranulation en présence d'IgE humains qui détermine si nos cellules pourront être utilisées pour mesurer une sensibilisation de type IgE dans des sérums. Nous avons donc premièrement confirmé que les IgE humains ne

pouvaient pas lier les récepteurs de rat. Pour ce faire, nous avons sensibilisé des cellules RBL-2H3 avec de l'IgE de souris (IgEm) seul, ou en présence d'IgE humain (IgEh). Nous avons mesuré la dégranulation obtenue suite à une stimulation antigénique via les IgE de souris (DNP-BSA). Ce test nous a permis d'observer s'il y avait compétition entre les IgEm et IgEh pour les récepteurs FcεRI de rat (Fig. 7). Tel qu'attendu, la présence d'IgE humain n'a eu aucun effet sur la dégranulation médiée par les IgEm.

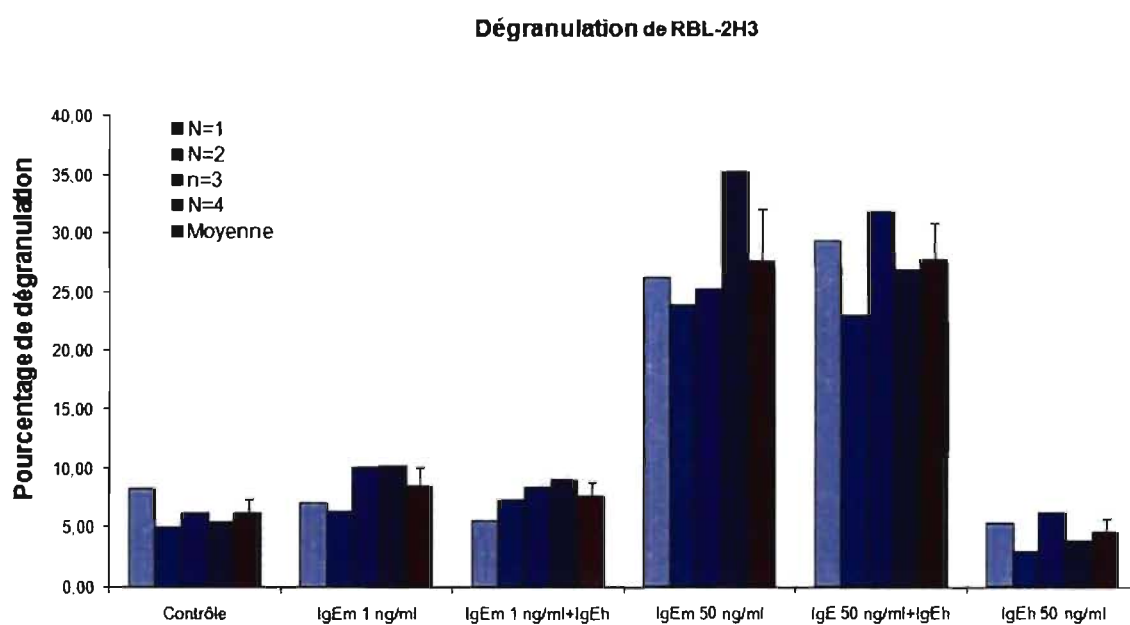


Fig. 7. **Essai de compétition entre l'IgE humain et de souris.** Les RBL-2H3 ont été incubées avec de l'IgEm anti-DNP-BSA 1ng/ml ou 50ng/ml seul ou avec de l'IgEh 50ng/ml pendant 22 heures. Les cellules ont aussi été incubées avec de l'IgEh 50ng/ml seul pendant 22 heures. Le témoin n'a pas été incubé avec de l'IgE. Les cellules ont été stimulées avec du DNP-BSA 40ng/ml pendant 10 minutes avant de mesurer le pourcentage de dégranulation par dosage de la β -hexosaminidase intracellulaire et extracellulaire.

Nous avons alors testé différents clones stables RBL-T par test de dégranulation avec IgE humaine et anti-IgE humaine. Aucune dégranulation médiée par l'IgE humaine ne fut observée en présence des anticorps anti-IgE humaine (Fig. 8). Ces résultats suggèrent que si la chaîne alpha était exprimée, celle-ci ne formait pas un récepteur fonctionnel ou bien que cette chaîne n'est simplement pas exprimée au niveau protéique.

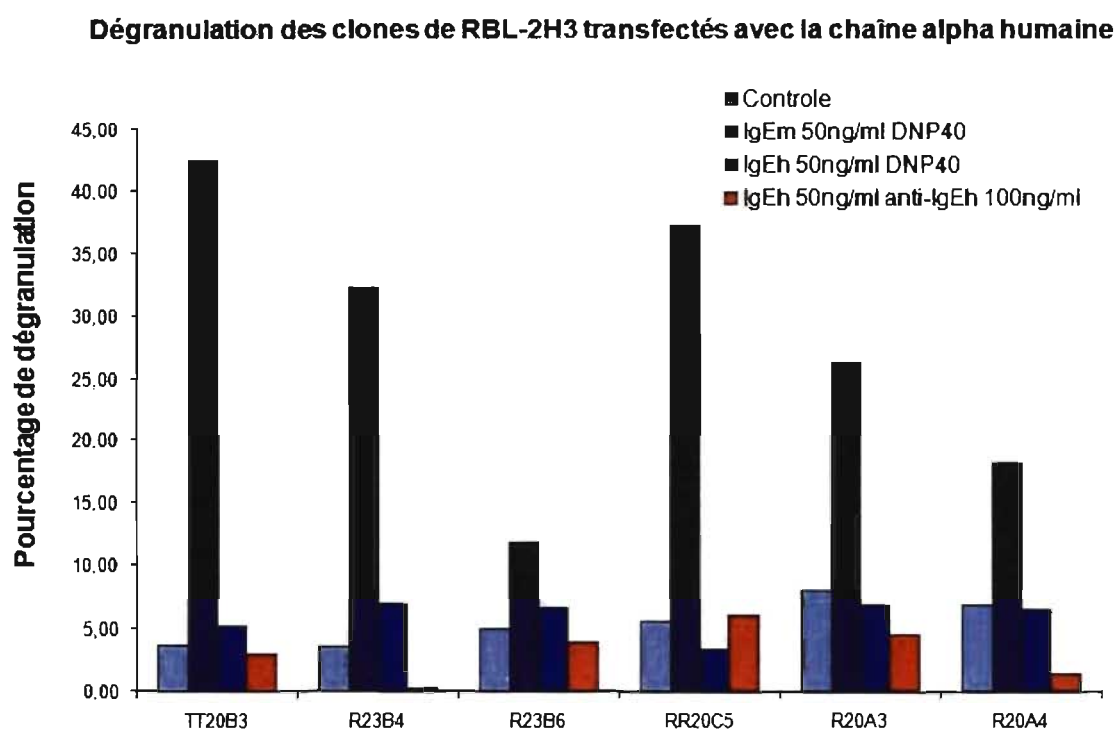


Fig. 8. **Dégranulation de clones RBL-3H3 transfectés avec la chaîne alpha humaine.** Différents clones RBL-T ont été incubés selon quatre conditions : Aucun IgE; IgEm anti-DNP-BSA 50ng/ml + DNP-BSA 40ng/ml; IgEh 50ng/ml + DNP-BSA 40ng/ml; IgEh 50ng/ml + anti-IgEh 100ng/ml. La dégranulation par le récepteur de rat est toujours fonctionnelle bien que variable d'un clone à l'autre. La dégranulation induite par la chaîne alpha humaine est non-délectable, tout comme celle induite par le DNP-BSA en présence de l'IgE humaine.

3.2 Développement et expression de la chimère

Suite à ces résultats, nous avons décidé de modifier notre stratégie afin de produire une nouvelle lignée cellulaire. Nous avons décidé de faire exprimer dans les RBL-2H3, une chaîne alpha chimérique composée d'une région extracellulaire provenant de la chaîne alpha humaine, et des régions transmembranaire et cytoplasmique provenant de la chaîne alpha de rat. Les travaux publiés suivants ont servi de base pour le développement de cette chimère.

Julie Gosse et son équipe [38] ont étudié le rôle de la région transmembranaire de la chaîne alpha humaine en exprimant dans les RBL-2H3 une protéine ayant la région extracellulaire humaine, la région intracellulaire de la chaîne zêta du récepteur des lymphocytes T (TCR), ainsi qu'une région intracellulaire variante. Ils ont montré que c'est la région transmembranaire native qui permettait la plus grande dégranulation. Une autre étude, par Cauvi et al. [16] a démontré par transfection dans des cellules HEK293 et COS-7 l'importance de la région cytoplasmique de la chaîne alpha par des expériences de troncation de différents fragments de cette région. Leur étude a ainsi démontré l'existence de trois régions responsables de la rétention de la chaîne alpha au réticulum endoplasmique. Ces régions seraient camouflées par la chaîne gamma lors de leur assemblage afin de permettre l'expression en surface d'un récepteur fonctionnel. Ces travaux, avec ceux de Gilfillan [29] démontrent que la majorité des chaînes alpha humaines exprimées dans les RBL-2H3 sont sous une forme non associée avec la chaîne bêta da rat. Ces résultats nous ont conduits à formuler l'hypothèse qu'une chaîne alpha humaine composée des régions transmembranaire et cytoplasmique de rat pourrait s'associer avec les chaînes endogènes de rat bêta et gamma beaucoup plus facilement qu'une chaîne alpha humaine native. La résultante serait l'expression de récepteurs fonctionnels à la surface cellulaire.

Iwasaki et al. [13] se sont intéressés à définir quelle région particulière de la chaîne alpha humaine était responsable de la liaison des IgE. Ils ont donc fait exprimer dans des phages, des chaînes alpha humaines dans lesquelles des mutagénèses aléatoires ont été provoquées. Ces expériences ont permis de démontrer que les acides aminés 133-137 font parti du site de liaison pour l'IgE. De plus, ils ont aussi montré que remplacer les trois derniers acides aminés par une asparagine, une tyrosine et une méthionine conférait à cette chaîne alpha une affinité pour les IgE humains cinquante fois plus élevée que la chaîne native. Nous avons donc décidé d'ajouter cette mutation dans la chaîne alpha chimérique qui serait exprimée dans les RBL-2H3 afin d'augmenter la sensibilité de notre test de dégranulation.

Une partie des séquences codantes pour la chaîne alpha humaine et rat ont été amplifiées par PCR en ajoutant un site de restriction KpnI en 3' de la section humaine, et en 5' de la section de rat (Fig. 9). Elles ont ensuite été liguées ensemble avant d'être clonées dans le vecteur pTargetT (Fig. 10).

```

ATGGCTCCTGCCATGGAATCCCCTACTCTACTGTGTGTAGCCTTACTGTTCTTCGCTCCAGATGGCGTGTAG
CAGTCCCTCAGAAACCTAAGGTCTCCTTGAACCCTCCATGGAATAGAATATTTAAAGGAGAGAATGTGACTC
TTACATGTAATGGGAACAATTTCTTTGAAGTCAGTTCCACCAAATGTTCCACAATGGCAGCCTTTCAGAAG
AGACAAATTCAAGTTTGAATATTGTGAATGCCAAATTTGAAGACAGTGGAGAATACAAATGTCAGCACCAA
CAAGTTAATGAGAGTGAACTGTGTACCTGGAAAGTCTTCAGTGACTGGCTGCTCCTTCAGGCCTCTGCTGA
GGTGGTGATGGAGGGCCAGCCCCTCTTCTCAGGTGCCATGGTTGGAGGAACCTGGGATGTGTACAAGGTG
ATCTATTATAAGGATGGTGAAGCTCTCAAGTACTGGTATGAGAACCACAACATCTCCATTACAAATGCCACAG
TTGAAGACAGTGGAACTACTACTGTACGGGCAAAGTGTGGCAGCTGGACTATGAGTCTGAGCCCTCAA
CATTACTGTAATAAAAGCTCCGCGTGAGAAGTACGGTACC TGGCTACAACCTCATTTCCCATCATTGGCGGT
GATTCTGTTTGCTGTGGACACTGGGTTATGGTTCTCAACCCACAAACAGTTCGAATCCATCTTGAAGATTCA
GAAGACTGGAAAAGGCCAAAAAAGGTTGAAACCTAACTCTTAACCAAGGTATATAAAGGAAC

```

Fig. 9. Construction de l'ADNc de la chimère. La région humaine (bleu) et la région de rat (orange) ont été amplifiées par PCR en ajoutant le site de restriction KpnI à la jonction (vert). En rouge est la séquence du domaine D2 devant être muté en GACTACATG pour augmenter l'affinité de la chimère pour l'IgE.

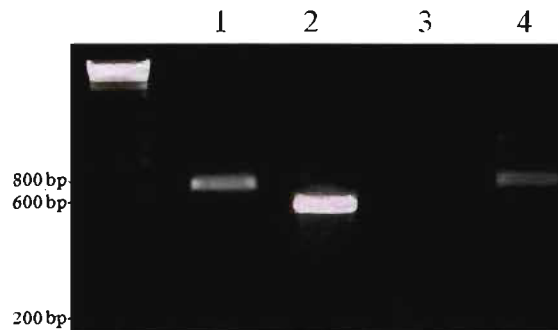


Fig. 10. Construction de l'ADNc de la chimère par PCR. 1) ADNc de la chaîne alpha humaine complète; 2) ADNc de la région humaine; 3) ADNc de la région de rat; 4) Produit de ligation des ADNc 2 et 3. La bande à 800 pb du puit 4 a été purifiée et clonée dans pTargetT.

Nous avons donc procédé à une mutagenèse dirigée pour modifier le domaine de liaison des IgE et pour enlever le site de restriction KpnI. Nous avons utilisé le kit de mutagenèse dirigé GeneEditor pour cette étape car il permettait de faire la mutagenèse des trois acides aminés ainsi que la délétion du site KpnI ajouté en une seule étape. Plusieurs clones bactériens ont été criblés et séquencés avant d'obtenir un vecteur contenant la chimère mutée sans autres mutations indésirables. Ce vecteur a été transfecté de façon stable dans les cellules RBL-2H3. Les clones obtenus ont été testé par RT-PCR en utilisant des paires d'amorces PCR spécifiques à la chimère mutée (Fig. 11) et cytométrie en flux (Fig. 12). L'ARNm codant pour la chimère a été détecté dans les clones. Nos résultats indiquent aussi que l'expression de l'ARNm de la chimère n'interfère pas avec celle de la chaîne alpha native de rat.

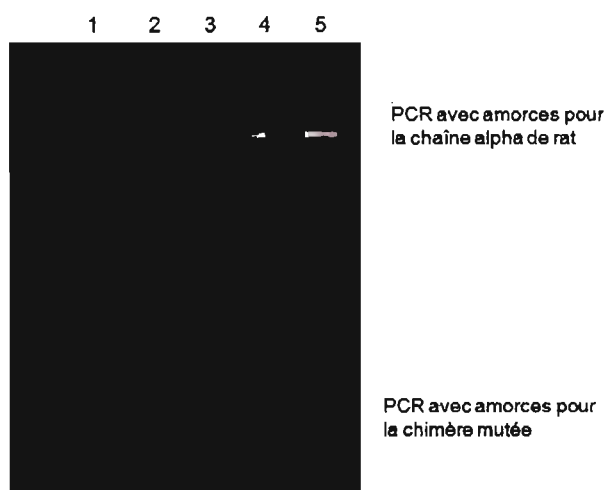


Fig. 11. **Expression de l'ARNm de la chimère.** 1) Contrôle sans ADNc; 2) ADNc de RBL-2H3 transfectées avec le vecteur pTarget vide; 3) ADNc de RBL-2H3 transfectées avec la chaîne alpha humaine; 4) ADNc de RBL-2H3 transfectées avec la chimère non mutée; 5) ADNc de RBL-2H3 transfectées avec la chimère mutée. L'ARNm de la chaîne alpha de rat est exprimée dans toutes les lignées de façon équivalente. L'ARNm de la chimère mutée est exprimé seulement dans les cellules transfectées avec la chimère. Les faibles bandes observées dans 3 et 4 sont attribuables à l'amorce 5' de la chimère qui reconnaît la chaîne alpha humaine, l'amorce 3' est spécifique à la chimère mutée.

Cependant, l'analyse par cytométrie en flux (Fig. 12) n'a pas permis de détecter l'expression de la chimère à la surface des clones stables. Les PBMC (Cellules mononucléaires de sang périphérique) utilisé comme contrôle positif ont été obtenus par séparation de sang sur Dextran et lyse des érythrocytes. Les basophiles sont identifiés par l'expression du marqueur d'activation CD203c suite à une activation antigénique (Voir section 2.13 pour le protocole).

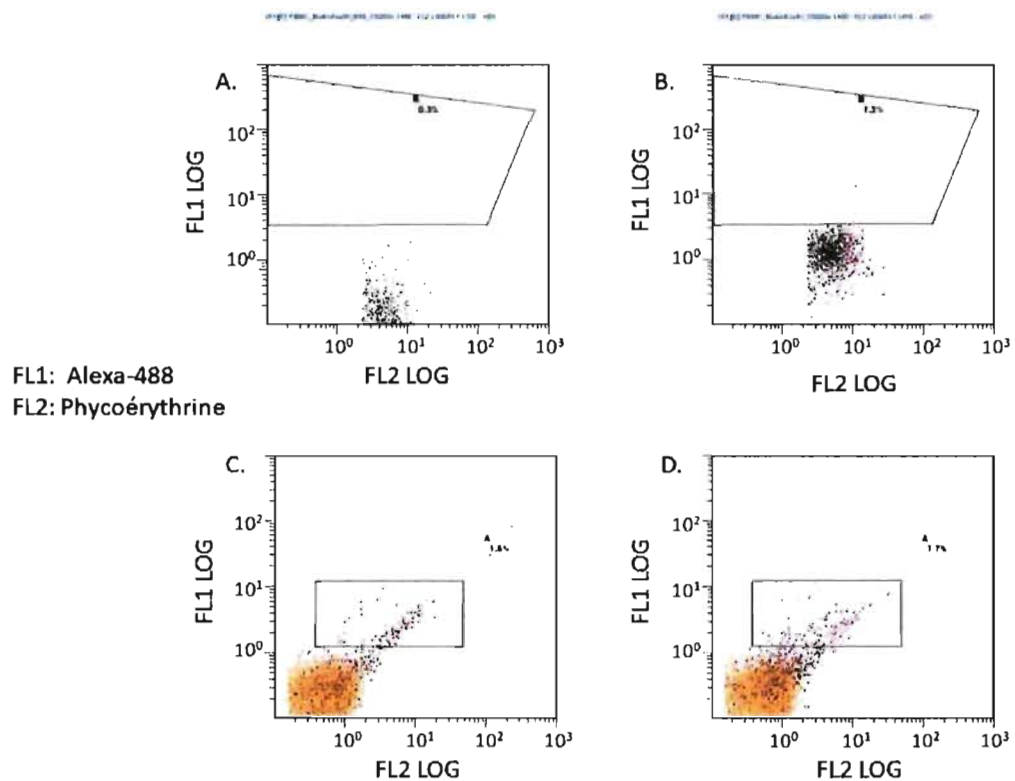


Fig. 12. Marquage de la chaîne alpha humaine sur les basophiles humains et les cellules RBL-2H3 transfectées avec la chimère par un anticorps anti-FcεRIα humaine biotinylé + Streptavidine-Alexa-488 (FL1) ainsi qu'avec l'anticorps anti-CD203c-PE (FL2). A) Basophiles humains dans une population de PBMC (Cellules mononucléaires de sang périphérique) avec streptavidine-488 seule; B) Basophiles avec anticorps biotinylé + streptavidine-488; C) RBL-2H3 transfectées avec la chimère avec streptavidine-488 seule; D) RBL-2H3 transfectées avec la chimère avec anticorps biotinylé + streptavidine-488. Les basophiles humains sont positivement marqués par l'anticorps biotinylé observé par déplacement de la population, alors que les RBL-2H3 transfectés n'indiquent aucun marquage.

3.3 Développement d'une lignée RBL-2H3 déficientes pour la chaîne alpha de rat

Toutes les études précédentes faites sur l'expression de la chaîne alpha humaine dans les RBL-2H3 ont montré que la chaîne alpha de rat endogène était toujours exprimée dans ces cellules puisqu'elles pouvaient dégranuler suite à une stimulation du récepteur FcεRI de rat. Ceci signifie que la chaîne alpha humaine doit entrer en compétition avec la chaîne alpha de rat pour s'associer avec les chaînes bêta et gamma de rat. Cette compétition pourrait avoir comme conséquence de diminuer le nombre de récepteurs possédant la chaîne humaine exprimée à la surface cellulaire. Ainsi, l'expression de la chimère plutôt que de la chaîne humaine native devrait augmenter la probabilité qu'elle s'associe avec les chaînes de rat. Cependant, la chimère sera aussi en compétition avec la chaîne de rat native pour former le récepteur FcεRI fonctionnel. Afin de favoriser l'association de la chaîne alpha chimérique avec les chaînes beta et gamma de rat, nous avons décidé de réprimer l'expression de la chaîne alpha de rat par l'utilisation de siRNA.

Les siRNA sont des petits fragments d'ARN qui sont complémentaires à une région particulière d'un ARN messager (ARNm). En s'associant avec le RISC (RNA-induced silencing complex), il permet à ce complexe de lier l'ARNm complémentaire au siRNA et de les cliver grâce à son activité RNase [39]. Le RISC joue ainsi un rôle important dans le contrôle d'infections virales en clivant l'ARN double brin. La méthode des siRNA est donc très utile pour étudier de la répression d'un gène. Par contre, le principal désavantage des siRNA est qu'ils peuvent seulement être transfecté de façon transitoire dans les cellules, au contraire des shRNA (short hairpin RNA).

Les shRNA sont de petits fragments d'ARN qui sont en fait des précurseurs de siRNA. En effet, ils sont reconnus et clivés par l'endonucléase à ARN Dicer [40]. Comme

les shRNA peuvent être transcrits par la ARN polymérase III, ils peuvent être clonés dans un vecteur et exprimés de façon stable dans des cellules. Ainsi, il est possible d'obtenir une lignée cellulaire réprimée continuellement pour un gène ciblé. Nous avons donc décidé d'utiliser la technique des shRNA pour réprimer l'expression de la chaîne alpha de rat dans les cellules RBL-2H3. Nous avons choisi la séquence reconnue par le shRNA de manière à ce que la chimère ne soit pas affectée par cette répression. Comme les chaînes alpha humaine et de rat ont une très grande homologie de séquence, nous avons choisi deux séquences pour augmenter nos chances de produire une lignée dans laquelle la chimère ne sera pas réprimée. La première séquence reconnaît le domaine D2, la région responsable de la liaison des IgE mutée dans la chimère à partir du nucléotide 467, et la seconde reconnaît une région ayant 50% d'homologie entre le rat et l'humain à partir du nucléotide 534.

Nous avons clonées ces deux séquences dans le vecteur psiRNA-hH1-zeo G2 (Fig. 13).

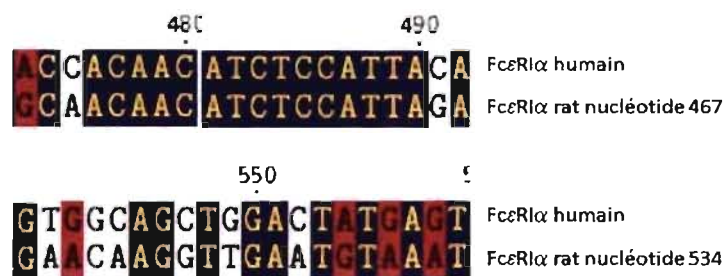


Fig. 13. Vérification de l'homologie de séquence de FcεRI alpha humain et rat pour le design des shRNA. La séquence de la chaîne alpha de rat 467 n'a que 3 nucléotides sur 20 de différents avec la séquence humaine, mais la séquence de la chimère est mutée à ce site, donnant 9 nucléotides différents. La séquence 534 a 10/20 nucléotides de différents.

Nous avons transfecté ces constructions dans des cellules RBL-2H3 et nous avons sélectionné des transfectants stables. Nous avons ainsi obtenu le clone N4C2, que nous avons testé par le test de dégranulation. Ce clone avait un pourcentage de dégranulation fortement diminué par rapport au contrôle pour une stimulation IgE dépendante, mais il avait toujours une forte capacité de dégranulation médiée par le calcium ionophore (Fig. 14).

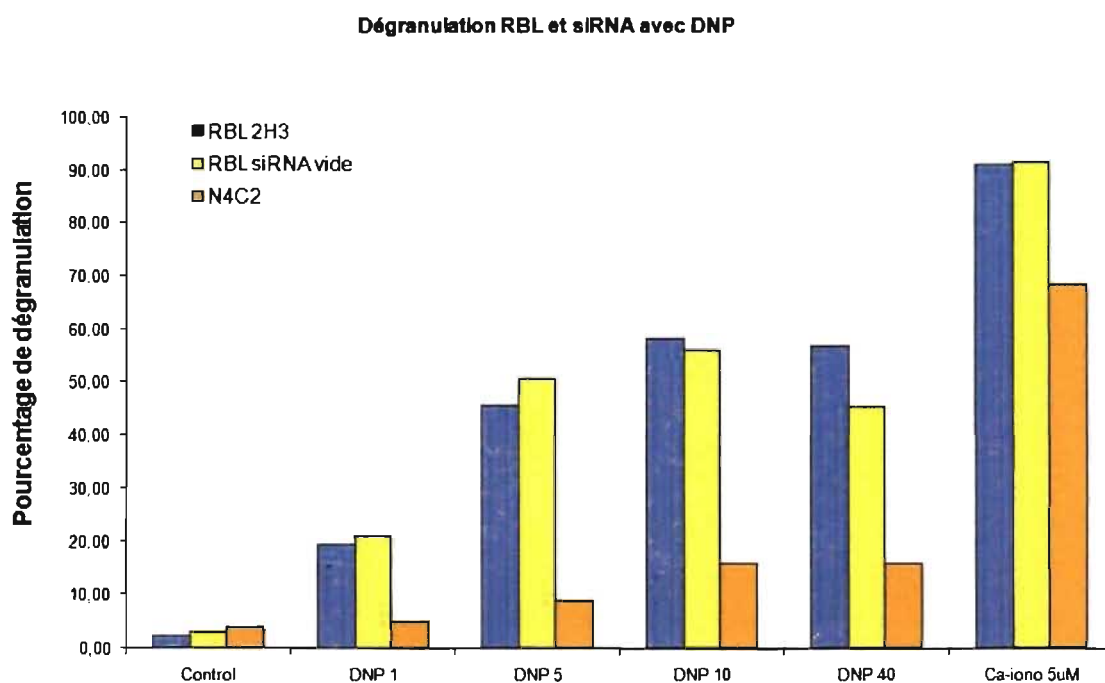


Fig. 14. **Dégranulation du clone shRNA N4C2.** Incubation avec IgEm anti-DNP-BSA pendant 22 heures et stimulation avec le DNP-BSA 1-40ng/ml pendant 10 minutes. La dernière colonne correspond aux cellules stimulées avec du calcium-ionophore 5uM pendant une heure. Le témoin siRNA vide consiste en une lignée stable de RBL-2H3 transfectée avec le vecteur psiRNA vide.

Cette dégranulation IgE indépendante nous indiquait que le clone N4C2 avait conservé sa capacité à dégranuler. Ce résultat suggère donc que la diminution de la dégranulation IgE dépendante est bien attribuable à une répression de l'expression de la chaîne alpha de rat. Par contre, lorsque regardé par RT-PCR semi-quantitatif avec des amorces pour la chaîne alpha de rat ainsi que pour la protéine constitutivement exprimée cyclophyline, aucune diminution d'expression n'est observée dans le clone N4C2 par rapport au témoin négatif. Le clone N4C2 a ensuite été comparé avec des cellules RBL-2H3 natives et exprimant le vecteur psiRNA vide par immunoblot de type Western. Les échantillons ont été immunoprécipités avec l'anticorps anti-FcεRI alpha de rat et la membrane a été incubée avec l'anticorps anti-FcεRI alpha humain biotinylé (qui reconnaît aussi la chaîne alpha de rat). Aucune différence n'a été déterminée au niveau de l'expression protéique (Fig. 15).

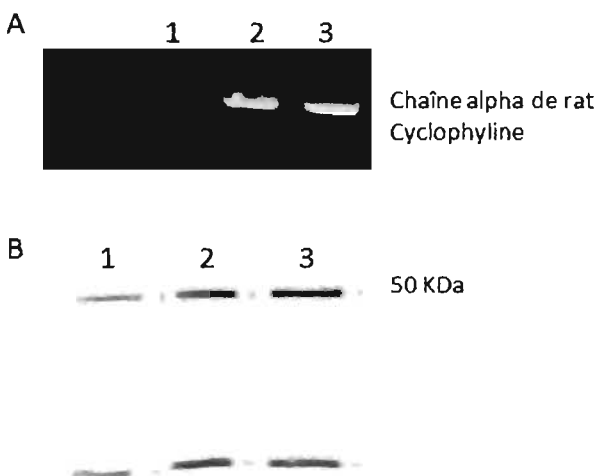


Fig. 15. **Mesure de la répression de la chaîne alpha de rat.** A) RT-PCR multiplexe pour la chaîne alpha de rat et la cyclophyline sur trois échantillons. 1. Aucun ADNc 2. ADNc de RBL-2H3 psiRNA vide 3. ADNc de N4C2. B) Immunoblot avec anticorps anti-FcεRI alpha biotinylé d'eBioscience sur échantillons immunoprécipités avec l'anticorps anti-alpha de rat. 1. RBL-2H3 2. RBL-2H3 psiRNA vide 3. N4C2.

Les analyses par cytométrie en flux avec un anticorps anti-IgE de souris couplé à la phycoérythrine, ainsi qu'avec deux anticorps spécifiques à la chaîne alpha du récepteur FcεRI de rat a permis de montrer que chez le clone N4C2 l'expression de la chaîne alpha est diminuée de +/- 30 % par rapport aux cellules RBL-2H3 transfectées avec le vecteur vide (Fig. 16).

Marquage anti-FcεRI Pharmingen sans IgE

Overlay Plot 1

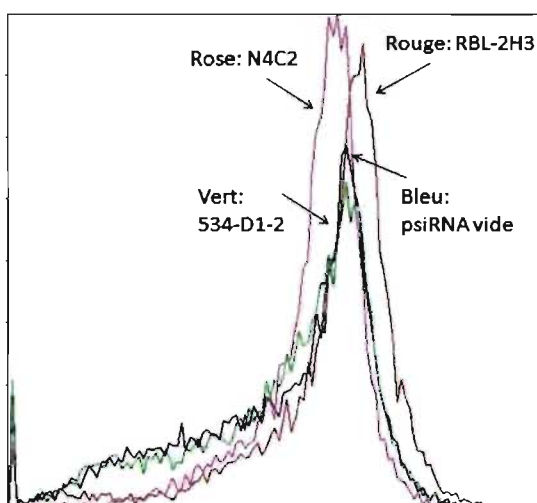


Fig. 16. **Marquage de la chaîne alpha de rat chez le clone N4C2 avec l'anticorps anti-FcεRI de rat de BD Pharmingen.** Les cellules ont été incubées avec l'anticorps primaire et secondaire pendant 30 minutes chacun à 4°C. Résultat identique obtenu avec l'anticorps anti-FcεRI de rat d'abcam. Le clone 534-D1-2 est un autre clone siRNA produit qui ne produisait aucune diminution détectable d'expression de la chaîne alpha de rat.

Cependant, nous avons observé par analyse en cytométrie en flux qu'après quelques semaines, le clone N4C2 perdait l'inhibition de la chaîne alpha de rat. Nous avons donc refait des transfections, et obtenu le clone 2-467A3. Le clone 2-467A3 démontre une diminution de la dégranulation IgE dépendante de 44% par rapport au témoin négatif. Un marquage de la chaîne alpha de rat par cytométrie indique que le clone 2-467A3 possède une intensité de signal de 39% inférieure au témoin négatif. Cette diminution a été maintenue après plusieurs semaines en culture ainsi que suite à plusieurs congélations et décongélations des cellules (Fig. 17).

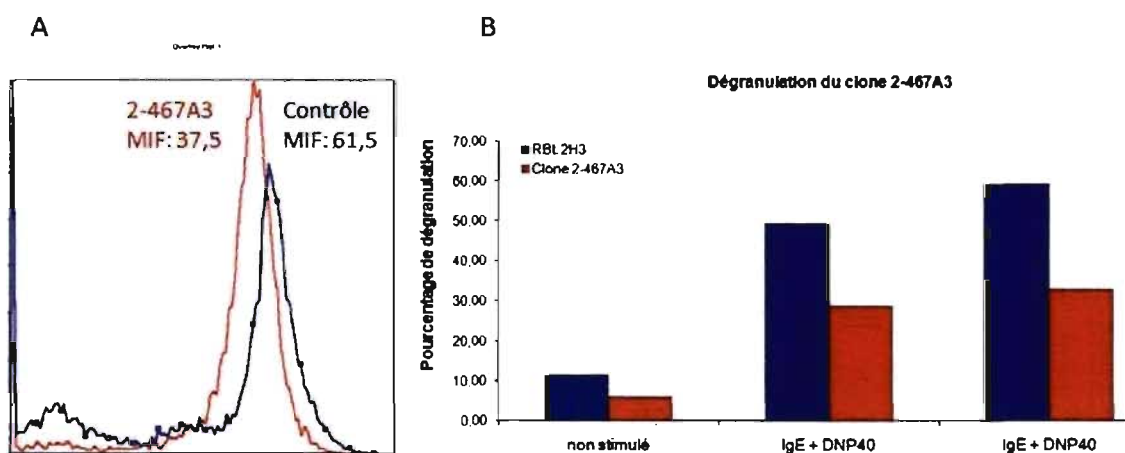


Fig. 17. **Repression de l'expression la chaîne alpha de rat dans le clone 2-467A3.** A) Marquage de FcεRI par anticorps de BD Pharmingen et de l'anticorps secondaire pendant 30 minutes à 4°C successivement. Intensité de fluorescence moyenne (MIF) du clone 2-467A3 est à 37,5 et du contrôle à 61,5. B) Dégranulation par IgEm anti-DNP-BSA + DNP-BSA 40ng/ml du clone 2-467A3 est à 56% du contrôle. Voir Matériels et méthodes pour temps d'incubation.

3.4 Transfection de la chimère dans N4C2

Comme la production de la chimère et de la lignée cellulaire RBL-2H3 réprimée ont été réalisées en même temps et confiants dans le succès de nos expériences, nous avons anticipé la transfection de la chimère dans le clone N4C2 avant de découvrir que la répression de la chaîne alpha était perdue au cours du temps dans ce clone. Ainsi, la lignée stable N4C2-C34M5 fut obtenue. Ces cellules exprimaient l'ARNm codant pour la chimère, testé par l'utilisation des amorces PCR spécifiques à la chimère, mais aucune différence n'a été observée en immunoblot de type Western entre ces cellules et le témoin négatif (Fig. 18). Les échantillons ont été immunoprécipités avec l'anticorps anti-FcεRI alpha 3G6 et la membrane a été incubée avec l'anticorps monoclonal anti-FcεRI alpha biotinylé. Nous avons aussi fait un test de dégranulation sur ces cellules. Elles ont été sensibilisées avec de l'IgEh 50ng/ml et un pontage des IgE a été réalisé avec des anticorps anti-IgEh achetés des compagnies QED et Pharmingen à une concentration de 100ng/ml. Aucune dégranulation suite au pontage des IgE humains ne fut mesurée (Fig. 19).

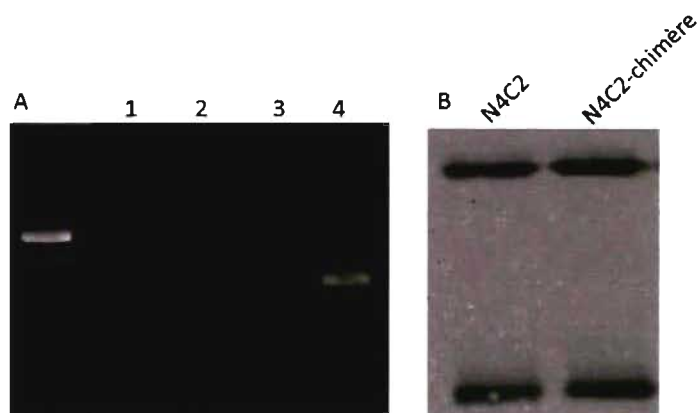


Fig. 18. **Expression de la chimère dans le clone N4C2.** A) PCR pour la chimère des échantillons d'ADNc. 1. Aucun ADNc; 2. ADNc de RBL-2H3; 3. ADNc du clone N4C2 transfecté avec le vecteur pTarget vide; 4. ADNc du clone N4C2 transfecté avec pTarget contenant la chimère mutante. B) Immunoblot avec l'anticorps biotinylé d'eBioscience sur les échantillons immunoprécipités avec l'anticorps anti-FcεRI alpha humain monoclonal 3G6. La membrane a été incubée comme décrit dans la section Matériels et Méthodes.

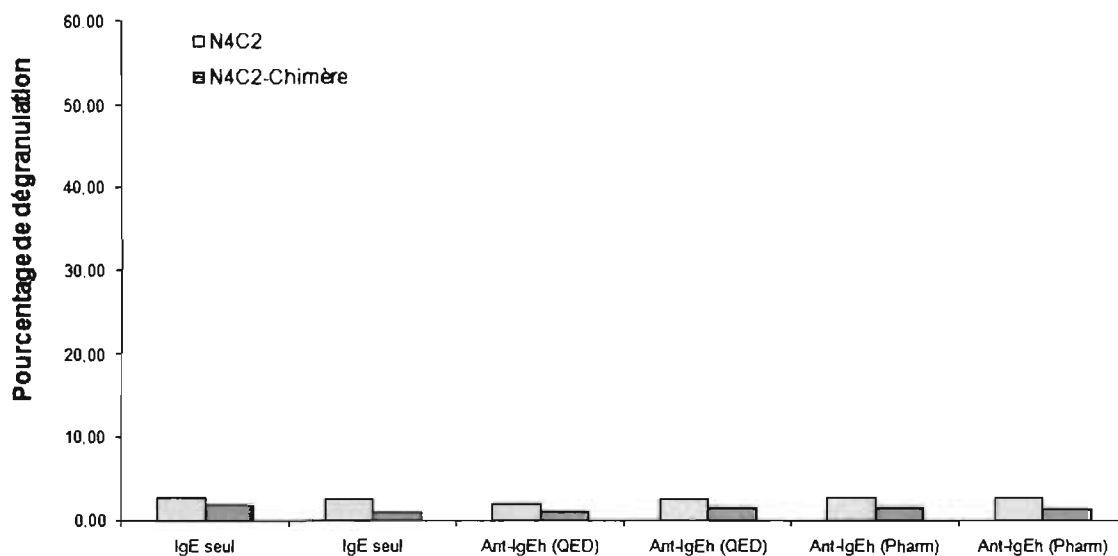
Dégranulation clones siRNA-chimère IgEh 50ng/ml et anti-IgEh 100ng/ml

Fig. 19. **Dégranulation avec IgE humains (IgEh) du clone N4C2 transfecté avec la chimère.** L'IgEh a été incubé avec les cellules pendant 22 heures. L'anti-IgE a été incubé 30 minutes avec les cellules. Aucune dégranulation mesurée.

4. Discussion

4.1 Transfection de la chaîne alpha humaine

Nous avons transfecté les cellules RBL-2H3 avec la chaîne alpha humaine du récepteur FcεRI afin d'obtenir une lignée cellulaire pouvant lier les IgE humains. Nos travaux sont initialement basés sur ceux de différents groupes qui ont produit avec succès une lignée cellulaire de RBL 2H3 exprimant la chaîne alpha humaine. À la suite de nos expérimentations infructueuses quant à l'expression de la chaîne alpha humaine dans les RBL-2H3, plusieurs expériences ont été réalisées pour en comprendre la raison. La chaîne alpha humaine a été clonée dans le vecteur pEGFP-N1 créant aussi une protéine de fusion avec la GFP. Cette construction a été transfectée dans les RBL 2H3 ainsi que dans des cellules KNRK (qui n'expriment pas le récepteur FcεRI) afin de pouvoir observer un signal en Immunoblot de type Western. Les cellules KNRK ont montré la présence de GFP par cytométrie en flux ainsi que par ICF (résultats non montrés). Cependant, le signal observé en ICF était cytosolique plutôt que membranaire. Les expériences d'immunoblot de type Western ont permis d'identifier, la présence d'une bande non spécifique à la taille de la chaîne alpha (50kDa) ainsi que la présence d'une bande correspondant à la protéine GFP seule. Cependant, aucune bande ne fut observée à la taille qui correspondrait à la protéine de fusion. La présence de la protéine GFP seule expliquait le signal cytosolique observé en ICF. Considérant que le GFP possède son propre codon ATG, il est possible qu'il ait été exprimé seul, mais la raison pour laquelle l'ATG de la chaîne alpha est ignorée demeure inexplicée. Nous avons donc procédé au développement de la chimère afin d'améliorer l'association de la chaîne alpha humaine avec les chaînes bêta et gamma de rat endogènes ainsi que pour augmenter son affinité pour l'IgE grâce à la mutation au site de liaison de l'IgE.

4.2 Design et transfection de la chimère

Une chaîne alpha chimérique humaine et rat a donc été développée par PCR en ajoutant le site de restriction KpnI. Une mutagenèse a ensuite été effectuée sur la séquence de la chimère pour éliminer le site KpnI et pour augmenter l'affinité de la chimère pour l'IgE. L'expression de cette chimère semblait être l'avenue la plus prometteuse pour le développement de notre lignée cellulaire. Cependant, lorsque nous avons testé les clones obtenus par cytométrie de flux, par immunoblot Western et par dégranulation, la chimère n'était pas détectée. Les résultats obtenus étaient donc les mêmes que ce qui avait été observé lors de la transfection de la chaîne alpha humaine native. Puisque la chimère possède une mutation dans son domaine D2, il était possible que celle-ci puisse causer un mauvais repliement de la protéine et donc mener à sa dégradation au réticulum endoplasmique. En effet, la production de la chaîne alpha mutée fut seulement caractérisée dans des phages, il était impossible de prévoir comment le contrôle qualité des cellules de mammifère allait considérer cette chaîne alpha mutée. Pour vérifier cette hypothèse, la chimère non mutée fut transfectée dans les RBL-2H3. Encore une fois, les résultats obtenus par cytométrie, immunoblot de type Western et dégranulation semblent nous indiquer que la protéine n'était pas exprimée. Par contre, la chimère non mutée contient toujours le site KpnI ayant servi à la ligation des sections humaine et de rat. La présence de ce site ajoute deux acides aminés à la séquence de la chimère. Il est possible que ces deux acides aminés causent aussi un mauvais repliement de la chimère qui mène celle-ci à la dégradation.

4.3 Mutation de la chaîne alpha de rat

Lorsque nous avons commencé à travailler sur la chimère, nous avons aussi travaillé parallèlement sur une autre stratégie, qui consistait à faire exprimer dans les RBL-2H3 une chaîne alpha de rat pouvant lier des IgE humains. Une étude d'Iwasaki et al. [12] a permis de montrer qu'une mutation du site de liaison de l'IgE du domaine D2, en plus d'augmenter

l'affinité de la chaîne alpha humaine pour l'IgE, causait aussi celle-ci de perdre sa spécificité d'espèce. En effet, la chaîne alpha humaine ainsi mutée avait acquis la propriété de lier les les IgE de souris, tout en restant spécifique aux immunoglobulines de type E. Notre futur test de dégranulation nécessite des cellules qui peuvent lier les IgE humains, il serait possible de spéculer que la mutation de la chaîne alpha de rat lui donnerait la capacité de lier les IgE humains. L'analyse d'homologie de séquence a révélé que la chaîne alpha humaine et de rat ont une séquence identique à la région de la mutation du domaine D2. Ce résultat n'est pas surprenant puisqu'il est souvent observé que les régions conservées entre des protéines homologues sont des régions importantes pour l'activité d'une protéine. L'autre stratégie tentée consistait donc à cloner la chaîne alpha de rat et de muter son domaine D2 comme dans la chimère. Malheureusement, ce clonage s'est avéré être hautement problématique car les bactéries ne survivaient à la transformation. Le développement de la chaîne alpha de rat mutée fut donc abandonné. Cependant, nous étions intéressés à comprendre pourquoi la chimère comme la chaîne alpha humaine ne s'exprimait pas dans les cellules RBL-2H3. La chaîne alpha de rat non mutée a donc été clonée dans un vecteur créant la protéine de fusion fluorescente DsRed afin de démontrer que les cellules RBL-2H3 transfectées conservait la capacité d'exprimer leur propre chaîne. La meilleure construction produite avait une mutation ponctuelle non silencieuse à la fin de la séquence du DsRed. Lorsque transfecté dans des cellules RBL 2H3, aucun signal ne fut observé pour le DsRed. Nous n'avons pas d'explication justifiant que la protéine de fusion ne soit pas exprimée, cependant, la possibilité que l'absence d'expression soit causée par la mutation dans la séquence de la protéine DsRed ne peut pas être exclue.

4.4 Transfection des shRNA

Des shRNA ont été produits et transfectés dans les cellules RBL-2H3 pour diminuer l'expression de la chaîne alpha de rat pour augmenter la probabilité que la chimère puisse s'associer avec les chaînes bêta et gamma de rat. Les clones obtenus exprimant le shRNA

contre la chaîne alpha de rat (N4C2 et 2-467A3) proviennent tous les deux de la séquence 467. D'autres clones produits étaient issus de la séquence 534, mais aucun n'avait une répression de la chaîne alpha de rat aussi marquée que les clones N4C2 et 2-467A3. Lorsque nous avons observé que le clone N4C2 avait perdu sa répression, les séquences 467 et 534 n'ont pas été les seules à être transfectées à nouveaux dans les RBL-2H3. Cinq nouvelles séquences de la chaîne alpha de rat ont été sélectionnées pour produire de nouveaux shRNA afin de maximiser la probabilité d'obtenir un clone qui conserve sa stabilité. Les autres séquences étaient : 34, 327, 386, 435 et 436. Cependant, aucun des clones obtenus à partir de ces séquences ne produisaient une répression suffisante (moins de 20%) de la chaîne alpha (résultats non montrés). Quatre des shRNA ont aussi été transfectés à la fois dans les RBL 2H3 afin de peut-être obtenir une lignée dans laquelle un effet additif des shRNA conduirait à la répression de la chaîne alpha de rat de manière stable. Cette multitransfection a été faite avec les shRNA 34, 386, 467 et 534. Cependant, aucun des clones RBL-2H3 transfectés produits n'étaient réprimés de façon significative (résultats non montrés). Une autre stratégie fut tentée afin d'obtenir une lignée fortement réprimé en chaîne alpha de rat. Le clone 2-467A3 a été retransfecté avec d'autres shRNA séparément. La transfection du shRNA 34 dans les 2-467A3 a diminué l'expression de la chaîne alpha de façon marquée, comme déterminée par cytométrie en flux (résultats non montrés). Cependant, cet effet represser s'est avéré être transitoire puisqu'il a disparu après une semaine. Ce résultat était quand même une indication qu'une combinaison de shRNA pouvait avoir un effet cumulatif sur la répression de la chaîne alpha de rat même si les expériences de co-transfection de quatre shRNA s'étaient finalement avérées non concluantes.

4.5 Discussion générale

Suite à toutes ces expériences, plusieurs questions restent toujours sans réponses. Nous ignorons la raison pour laquelle les chaînes alpha humaine et chimérique ne sont pas

exprimées bien que la présence de leur ARNm soit démontrée. Nous ignorons si ces chaînes sont produites mais séquestrées dans le réticulum endoplasmique pour être dégradées ou si elles ne sont tout simplement pas traduites. La production des protéines de fusion GFP et DsRed a déjà été effectuée pour répondre à ces questions, mais sans succès. Peut-être que l'expression de la chaîne alpha fusionnée avec un plus petit tag comme HA, myc ou Flag nous permettrait de répondre à ces questions, mais des contraintes de temps ne nous ont pas permis d'explorer cette solution. Une autre solution demeure inexplorée. L'équipe de Cauvi, [15] a réalisée une série d'expériences de délétion et de troncation de la chaîne alpha humaine afin de déterminer les séquences responsables de la séquestration de la chaîne alpha humaine au réticulum endoplasmique. Une chaîne alpha humaine tronquée dans son domaine cytoplasmique n'est presque pas retenue au réticulum puisqu'elle ne possède plus ses domaines de rétention. L'expression de cette chaîne alpha humaine tronquée dans les RBL-2H3 pourrait être une solution si le problème est attribuable à une séquestration au réticulum endoplasmique menant à une dégradation. Si elle est exprimée avec succès, cela sera une forte indication que les chaînes alpha humaine native et chimérique n'étaient préalablement pas détectées car elles étaient séquestrées au réticulum endoplasmique et dégradées.

Bien que plusieurs stratégies aient été essayées afin de produire cette lignée cellulaire, il reste encore une possibilité à tenter pour faire exprimer un récepteur FcεRI fonctionnel dans les RBL-2H3 pouvant lier les IgE humains. Il s'agit de la stratégie employée par Wiegand [32]. Ce chercheur a développé la lignée RBL SX-38 en transfectant à la fois dans les cellules RBL-2H3 les chaînes humaines alpha, bêta et gamma. Si les problèmes que nous avons rencontrés jusqu'à maintenant étaient causés par un mauvais assemblage de la chaîne alpha humaine avec la chaîne gamma de rat, cette stratégie pourrait permettre à la chaîne alpha humaine de s'assembler avec la chaîne gamma humaine et d'avoir un repliement adéquat. Cependant, cette stratégie employée par Wiegand a aussi été tentée par Vogel [36]. Ainsi, bien que l'expression de la chaîne alpha fût détectée, ce ne fût

pas le cas pour les chaînes bêta et gamma. Ces résultats ne font que confirmer que les RBL-2H3 sont des cellules qui peuvent réagir différemment à une procédure de transfection. Les expériences de transfection des shRNA peuvent servir d'exemple pour le comportement aléatoire des cellules RBL-2H3 à la transfection d'un gène. En effet, le clone N4C2 avait perdu son inhibition de la chaîne alpha tout en conservant sa résistance à la zeocine, prouvant que les RBL 2H3 peuvent arrêter d'exprimer un gène transfecté tout en conservant la résistance insérée avec le gène. La méthode de sélection des clones pourrait aussi faire la différence pour l'obtention d'un clone exprimant la chaîne alpha humaine. La méthode de Cell Sorting employée par Wiegand permet le criblage de beaucoup plus de clones que la technique dans des plaques de 24 puits utilisée dans ce projet.

Conclusion

L'asthme professionnel est une condition qui affecte un nombre grandissant de travailleurs. Le test d'inhalation spécifique utilisé pour diagnostiquer un asthme professionnel est un test hautement invasif. Les autres tests qui permettent de mesurer la sensibilisation de type IgE à des agents professionnels sont soit coûteux ou non disponibles pour tous les agents professionnels connus. Le test de dégranulation des cellules RBL 2H3 exprimant un récepteur fonctionnel capable de lier des IgE humains serait un outil très utile pour le dépistage et pour le suivi de l'évolution d'une sensibilisation à des agents professionnels chez des travailleurs atteints ou à risque. Bien que le développement de ce test ne soit pas complété à ce jour, l'intérêt clinique important de ce test nous encourage à poursuivre nos travaux par la transfection de la chaîne alpha humaine tronquée ainsi qu'avec la co-transfection des chaînes humaines alpha et gamma. Il ne faut pas oublier de mentionner que même si ces expériences ne permettent pas de produire la lignée cellulaire voulue pour le test de dégranulation, nous avons tout de même réussi à produire une autre lignée cellulaire au cours de nos travaux. La lignée cellulaire de RBL-2H3 réprimée pour la chaîne alpha de rat 2-467A3 va sans doute s'avérer un outil de recherche très utile pour l'étude de l'expression et la signalisation du récepteur FcεRI de rat dans de futurs projets du laboratoire.

Bibliographie

1. Mannino, D.M., et al., *Surveillance for asthma--United States, 1960-1995*. MMWR CDC Surveill Summ, 1998. 47(1): p. 1-27.
2. Poole, J.A., P. Matangkasombut, and L.J. Rosenwasser, *Targeting the IgE molecule in allergic and asthmatic diseases: review of the IgE molecule and clinical efficacy*. J Allergy Clin Immunol, 2005. 115(3): p. S376-85.
3. Bochner, B.S. and W.W. Busse, *Allergy and asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2005. 115(5): p. 953-9.
4. Saini, S.S. and D. MacGlashan, *How IgE upregulates the allergic response*. Curr Opin Immunol, 2002. 14(6): p. 694-7.
5. MacGlashan, D., Jr., et al., *IgE-regulated loss, not IgE-regulated synthesis, controls expression of FcepsilonRI in human basophils*. J Leukoc Biol, 2001. 70(2): p. 207-18.
6. Asai, K., et al., *Regulation of mast cell survival by IgE*. Immunity, 2001. 14(6): p. 791-800.
7. Kalesnikoff, J., et al., *Monomeric IgE stimulates signaling pathways in mast cells that lead to cytokine production and cell survival*. Immunity, 2001. 14(6): p. 801-11.
8. Campo, P., Z.L. Lummus, and D.I. Bernstein, *Advances in methods used in evaluation of occupational asthma*. Curr Opin Pulm Med, 2004. 10(2): p. 142-6.
9. Boumiza, R., A.L. Debard, and G. Monneret, *The basophil activation test by flow cytometry: recent developments in clinical studies, standardization and emerging perspectives*. Clin Mol Allergy, 2005. 3: p. 9.
10. Gounni, A.S., et al., *Human airway smooth muscle cells express the high affinity receptor for IgE (Fc epsilon RI): a critical role of Fc epsilon RI in human airway smooth muscle cell function*. J Immunol, 2005. 175(4): p. 2613-21.
11. Fiebiger, E., et al., *Cotranslational endoplasmic reticulum assembly of FcepsilonRI controls the formation of functional IgE-binding receptors*. J Exp Med, 2005. 201(2): p. 267-77.

12. Kraft, S., et al., *The role of the FcepsilonRI beta-chain in allergic diseases*. *Int Arch Allergy Immunol*, 2004. 135(1): p. 62-72.
13. Iwasaki, A., et al., *Affinity improvement of the high-affinity immunoglobulin E receptor by phage display*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. 293(1): p. 542-8.
14. Rigby, L.J., et al., *Domain one of the high affinity IgE receptor, FcepsilonRI, regulates binding to IgE through its interface with domain two*. *J Biol Chem*, 2000. 275(13): p. 9664-72.
15. Vangelista, L., et al., *Efficient folding of the FcepsilonRI alpha-chain membrane-proximal domain D2 depends on the presence of the N-terminal domain D1*. *J Mol Biol*, 2002. 322(4): p. 815-25.
16. Cauvi, D.M., et al., *Transport of the IgE receptor alpha-chain is controlled by a multicomponent intracellular retention signal*. *J Biol Chem*, 2006. 281(15): p. 10448-60.
17. Albrecht, B., M. Woisetschlager, and M.W. Robertson, *Export of the high affinity IgE receptor from the endoplasmic reticulum depends on a glycosylation-mediated quality control mechanism*. *J Immunol*, 2000. 165(10): p. 5686-94.
18. Kubota, T., et al., *Different stabilities of the structurally related receptors for IgE and IgG on the cell surface are determined by length of the stalk region in their alpha-chains*. *J Immunol*, 2006. 176(11): p. 7008-14.
19. Okayama, Y., et al., *Roles of the transmembrane domain and the cytoplasmic domain of Fc epsilon RI alpha in immunoglobulin E-mediated up-regulation of surface Fc epsilon RI expression*. *Clin Exp Allergy*, 2007. 37(3): p. 451-8.
20. Mao, S.Y., et al., *Effects of subunit mutation on the localization to coated pits and internalization of cross-linked IgE-receptor complexes*. *J Immunol*, 1993. 151(5): p. 2760-74.
21. Rivera, J. and A.M. Gilfillan, *Molecular regulation of mast cell activation*. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. 117(6): p. 1214-25; quiz 1226.

22. Gilfillan, A.M. and C. Tkaczyk, *Integrated signalling pathways for mast-cell activation*. *Nat Rev Immunol*, 2006. 6(3): p. 218-30.
23. Knol, E.F., *Requirements for effective IgE cross-linking on mast cells and basophils*. *Mol Nutr Food Res*, 2006. 50(7): p. 620-4.
24. Galli, S.J., et al., *Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances*. *Annu Rev Immunol*, 2005. 23: p. 749-86.
25. Furuno, T., et al., *Nuclear shuttling of mitogen-activated protein (MAP) kinase (extracellular signal-regulated kinase (ERK) 2) was dynamically controlled by MAP/ERK kinase after antigen stimulation in RBL-2H3 cells*. *J Immunol*, 2001. 166(7): p. 4416-21.
26. Wong, W.S., *Inhibitors of the tyrosine kinase signaling cascade for asthma*. *Curr Opin Pharmacol*, 2005. 5(3): p. 264-71.
27. On, M., et al., *Molecular dissection of the FcRbeta signaling amplifier*. *J Biol Chem*, 2004. 279(44): p. 45782-90.
28. Holowka, D., et al., *Insights into immunoglobulin E receptor signaling from structurally defined ligands*. *Immunol Rev*, 2007. 217: p. 269-79.
29. Gilfillan, A.M., et al., *Conservation of signal transduction mechanisms via the human Fc epsilon RI alpha after transfection into a rat mast cell line, RBL-2H3*. *J Immunol*, 1992. 149(7): p. 2445-51.
30. Wilson, A.P., et al., *Human IgE mediates stimulus secretion coupling in rat basophilic leukemia cells transfected with the alpha chain of the human high-affinity receptor*. *Eur J Immunol*, 1993. 23(1): p. 240-4.
31. Taudou, G., et al., *Expression of the alpha chain of human Fc epsilon RI in transfected rat basophilic leukemia cells: functional activation after sensitization with human mite-specific IgE*. *Int Arch Allergy Immunol*, 1993. 100(4): p. 344-50.

32. Lowe, J., et al., *Allergen-induced histamine release in rat mast cells transfected with the alpha subunits of Fc epsilon RI*. J Immunol Methods, 1995. 184(1): p. 113-22.
33. Wiegand, T.W., et al., *High-affinity oligonucleotide ligands to human IgE inhibit binding to Fc epsilon receptor I*. J Immunol, 1996. 157(1): p. 221-30.
34. Dibbern, D.A., Jr., et al., *RBL cells expressing human Fc epsilon RI are a sensitive tool for exploring functional IgE-allergen interactions: studies with sera from peanut-sensitive patients*. J Immunol Methods, 2003. 274(1-2): p. 37-45.
35. Marchand, F., et al., *Human serum IgE-mediated mast cell degranulation shows poor correlation to allergen-specific IgE content*. Allergy, 2003. 58(10): p. 1037-43.
36. Takagi, K., et al., *Application of human Fc epsilon RI alpha-chain-transfected RBL-2H3 cells for estimation of active serum IgE*. Biol Pharm Bull, 2003. 26(2): p. 252-5.
37. Vogel, L., et al., *Development of a functional in vitro assay as a novel tool for the standardization of allergen extracts in the human system*. Allergy, 2005. 60(8): p. 1021-8.
38. Gosse, J.A., et al., *Transmembrane sequences are determinants of immunoreceptor signaling*. J Immunol, 2005. 175(4): p. 2123-31.
39. Gregory, R.I., et al., *Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing*. Cell, 2005. 123(4): p. 631-40.
40. Paddison, P.J., et al., *Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells*. Genes Dev, 2002. 16(8): p. 948-58.

Annexe 1

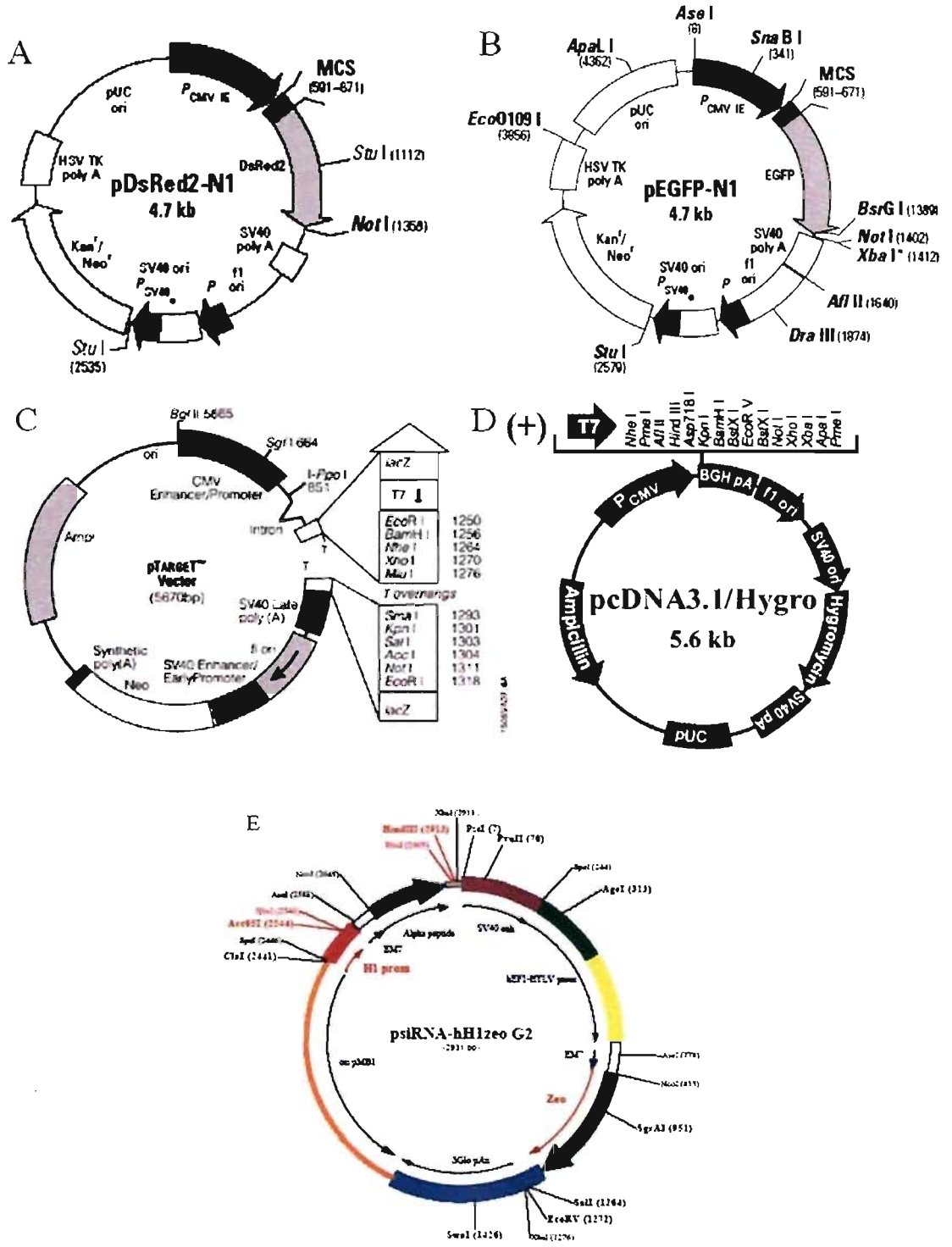


Fig. 20. Schémas des vecteurs utilisés dans le projet. A) pDsRed2-N1 B) pEGFP-N1 C) pTarget D) psiRNA-hH1zeo G2

Tableau III. Liste des oligonucléotides utilisés au cours du projet

Nom	Séquence	TM	Utilisation
3Fc-e-R1	GCATTTCTATAAATCCTTGAGCAC AGACGTTTCTATGTATATTGCAAG	66	Clonage d'alpha humain dans pTarget
5Fc-e-R1	GCCGCCACCATGGATACTGGAGGA TCTG	67	
3int H-FCER1	TCTCACGCGGAGCTTTTATTA	50	Séquençage d'alpha humain
5int H-FCER1	TTGGAGGAACCTGGGATGTGTA	52	
FceRI HindIII (5')	AAGCTTATGGCTCCTGCCATGGAA T	58	Clonage d'alpha humain dans pEGFP-N1
FceRI BamHI (3')	GGATCCATGTTGTTTTGGGGTTT GGC	60	
Rat_alpha3	GTTCTTTATATACTTGGTTAAG AGTTAGGTTTCAACC	62	Clonage d'alpha de rat dans pTarget
Rat_alpha5	GCCGCCACCATGGATACTGGAGGA TCTG	66	
H_alpha_Kpn3	GGGTACCGTACTTCTCACGCGGA GCTTTTATTAC	67	Synthèse de la chimère
Rat_alpha_Kpn5	GGGTACCTGGCTACAACCTATTT TCCCATC	64	
Real-a-chimere5'	AATGGCAGCCTTTCAGAAGAGAC	55	Détection de l'ARNm de la chimère avec mutation
Real_a_chimere3'	GTGGCATTGTGAATCATGTAGTCG	54	
Real-a-rat_mut5'	CTTATGACAGCAACGACTACATG	53	Détection de l'ARNm de la chaîne alpha de rat mutée
Real_a_rat_mut3'	CAGTCTTCTGAATCTTCAAGATGG	54	
Real_a_rat_5'	CTTATGACAGCAACAACATCTCC	53	Détection d'ARNm d'alpha rat
5chim_KpnI	GGGTACCATGGCTCCTGCCATGG AATC	66	Clonage de la chimère dans pDsRed2-N1
3chim_BamHI	CGGGATCCCAACCTTTTTTTTGGC TTTTCCAG	63	
5Kpn_gamma	GGGTACCACCATGATTCCAGCAG TGGTCTTG	67	Clonage de la chaîne gamma dans pcDNA3.1 Hygro
3Bam_gamma	CGGGATCCCTACTGTGGTGGTTTC TCATGC	66	
5alpha_rat_Kpn	GGGTACCATGGATACTGGAGGAT C	61	Cloner alpha rat dans pDSRed2-N1