

Localisation de protéines possédant des signaux de localisation nucléaire exprimé, après transformation de cellules de tabac BY-2 par biolistique

Il peut être intéressant de localiser une protéine spécifique au sein d'une cellule pour obtenir des informations sur sa fonction. Plusieurs techniques peuvent être utilisées mais durant ce TP nous avons réalisé la transformation transitoire des cellules de tabac BY-2 par bombardement, afin de localiser des protéines possédant les Signaux de Localisation Nucléaire (NLS) en fusion avec la GFP. Cette méthode permet une transformation des cellules par un transfert direct d'un gène d'intérêt, en le propulsant en compagnie d'une bille de tungstène grâce à un système à gaz comprimé au travers de la paroi cellulaire. Alors que certaines cellules intègrent spontanément le gène dans leur génome, pour le noyau ce phénomène est aléatoire. Nous allons donc voir quelles sont les différentes étapes nécessaires au bombardement avant l'observation des cellules transformées au microscope à épi-fluorescence ; pour finalement conclure sur les avantages de cette méthode et les perspectives qu'elle apporte.

Matériel & Méthodes : Préalablement, des cellules de tabac BY-2 synchronisables ont été préparées et maintenues en culture liquide, sous agitation et à l'obscurité à 24°C. Et un milieu BY-2 + agar a été coulé dans des boîtes de Pétri servant lors du bombardement. Ensuite, durant le TP, nous avons préparé des micro-billes de tungstène avec un échantillon d'ADN. Les constructions utilisées sont présentées ci-contre.

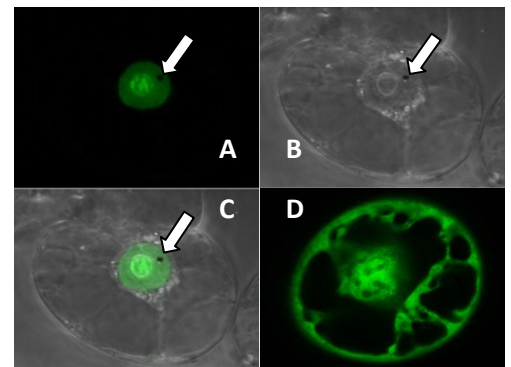
Constructions d'ADN à bombarder			
pCK-eGFP ⁽¹⁾	—	p35S eGFP t35S —	
pCK-eGFP-ChS ⁽²⁾	—	p35S eGFP Chalcone synthase t35S —	
pCK-eGFP-ChS-CP ⁽³⁾	—	eGFP Chalcone synthase Capsid Protein —	
pEGFP-ChS-D1 ⁽⁴⁾	—	eGFP Chalcone synthase ? —	
pEGFP-ChS-D2 ⁽⁵⁾	—	eGFP Chalcone synthase ? —	
eGFP = 27 kDa / ChS = 44 kDa / CP = 28 kDa			

Après avoir déposé des cellules BY-2 en phase exponentielle de croissance (3,5 j de culture) sur un disque de papier filtre placé dans les boîtes de Pétri, nous avons procédé au bombardement à l'aide d'un canon à particules. Enfin, nous avons pu observer nos cellules quelques jours plus tard, en microscopie confocale.

Résultats : Nous avons pu observer de la fluorescence dans le cytoplasme de la cellule « contrôle négatif » contenant la construction n°1, mais aussi dans le noyau au bout d'un certain temps à cause de la diffusion de la protéine à travers les pores nucléaires. Pour la construction n°3, représentant le contrôle positif de l'expérience, nous avons observé une fluorescence très nucléaire puisque la protéine traduite possède un NLS. On constate que la fluorescence est plus cytoplasmique pour la construction n°2 mais que comme pour la construction n°1, il y a une faible diffusion dans le noyau au bout d'un certain temps. La construction n°4 possédant le domaine D1, quant à elle, rentre dans le noyau de la cellule contrairement à la construction n°5 possédant le domaine D2 dont la localisation est similaire à la construction n°2.

Nous avons donc pu en conclure que le domaine D1 possède un NLS qui lui permet d'être transporté dans le noyau ; en effet, ce signal provient du complexe de nucléation des microtubules. Le domaine D2, par contre, possédait le NLS D1 muté, d'où sa perte de fonction et la localisation cytoplasmique de la protéine.

Conclusion : Nous avons pu constater que l'utilisation de la biolistique pour localiser une protéine dans une cellule est une alternative intéressante à la transgénèse par *Agrobacterium tumefaciens* car il n'est pas nécessaire d'utiliser des séquences exogènes pour permettre l'intégration du fragment d'ADN. De plus, cette technique est simple d'utilisation puisqu'elle demande très peu de préparation au préalable. Néanmoins elle reste transitoire donc il reste des cellules non transformées après bombardement. Il est serait donc intéressant de trouver un moyen technique pour mieux cibler les cellules avant le bombardement afin d'améliorer le rendement de transformation et augmenter le nombre d'observations microscopiques.



Observation de cellules de tabac BY-2 en microscopie confocale

A : visualisation de la fluorescence dans le noyau pour la construction n°3

B : cellule entière en DIC (constr. n°3)

C : superposition de A et B

D : visualisation de la fluorescence dans le cytoplasme et le noyau de la cellule ayant intégré la construction n°1

(N.B. : flèche = bille de tungstène dans la cellule)