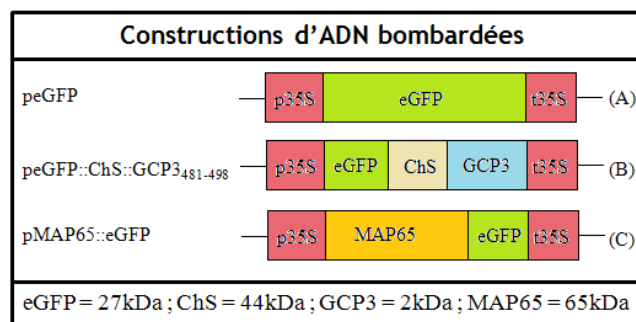


ETUDE DE LA LOCALISATION SUB-CELLULAIRE DE PROTEINES PAR EXPRESSION EN FUSION AVEC LA GFP, APRES TRANSFORMATION TRANSITOIRES DE CELLULES DE TABAC BY-2 PAR BIOLISTIQUE.

Etudier la localisation cellulaire d'une protéine d'intérêt peut apporter des informations précieuses pour l'identification de sa fonction au sein de la cellule. Différentes techniques peuvent être employées pour une telle étude (seules ou combinées) comme le Western-blot, l'immunolocalisation ou l'expression en fusion avec la Green Fluorescent Protéine (GFP). Lors de ce TP, nous avons réalisé une transformation transitoire de cellules de tabac BY-2 par bombardement afin d'étudier la localisation de protéines possédant des motifs d'adressage en fusion avec la GFP. Cette technique permet de transformer des cellules en introduisant de l'ADN exogène enduit sur des billes d'or ou de tungstène dans le noyau des cellules végétales en les propulsant par un système à gaz comprimé. Nous expliquerons tout d'abord les étapes nécessaires au bombardement puis nous analyserons les cellules transformées en microscopie confocale pour finalement conclure sur les avantages et inconvénients de la technique de biolistique.

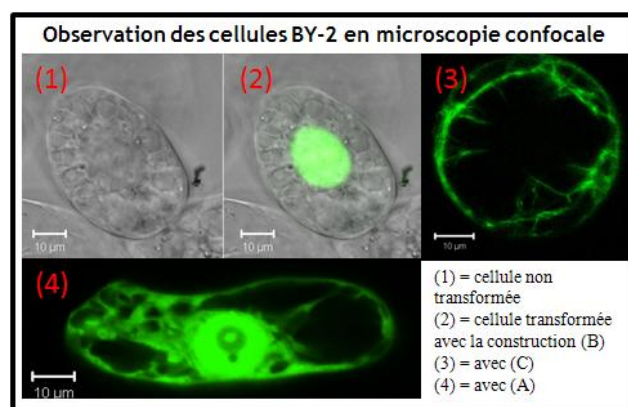
Matériel et méthodes

Des cellules de tabac BY-2 (cellules grandes et robustes, à morphologie constante, au génome séquencé et possédant des protocoles de synchronisation) ont été mises en culture liquide dans du milieu LB à 24°C, sous agitation et à l'obscurité (afin d'éviter l'autofluorescence de la chlorophylle). Une aliquote de 4mL de cellules en phase exponentielle de croissance (3,5 jours de culture) est filtrée sous vide sur un disque de papier filtre. Le disque est récupéré et déposé sur milieu de culture solide BY-2. La boîte est utilisée pour le bombardement avec les microbilles de tungstène qui ont été préalablement enrobées avec différentes constructions plasmidiques (présentées ci-contre). Enfin les cellules transformées sont observées au microscope confocal avec des filtres adaptés à la GFP.



Résultats

Nous pouvons observer sur la photographie (4) de la fluorescence dans le cytoplasme mais aussi dans le noyau de la cellule grâce à la diffusion passive de la GFP par les pores nucléaires (car il s'agit d'une petite molécule de 27 kDa). Il s'agit de la construction témoignant de la réussite de la transformation que l'on peut comparer à la cellule en (1) n'ayant pas été transformée. Pour la cellule photographiée en (2), nous observons une fluorescence localisée dans le noyau de la cellule. Cette fluorescence nucléaire est due au signal d'adressage NLS (signal de localisation nucléaire) de la GCP3 en fusion avec la GFP et la Chalcone synthase. Contrairement à la GFP, le transport est actif car la construction insérée donnera une protéine de taille supérieure à la taille des pores nucléaires. Pour ce qui est de la cellule en (3), on observe une fluorescence au niveau des microtubules car les MAP sont des protéines associées aux microtubules jouant un rôle dans leur stabilisation.



Conclusion

Nous avons pu constater que l'utilisation de la biolistique pour localiser une protéine d'intérêt dans une cellule est une bonne alternative à la transgénèse par *Agrobacterium tumefaciens*. Il s'agit d'une technique plus simple et plus rapide, ne nécessitant que très peu de préparations préalables. En revanche, comme il s'agit d'une transformation transitoire, il reste des cellules non transformées après bombardement. De plus, le rendement de transformation reste assez faible. Il serait donc intéressant de trouver un moyen d'améliorer ce rendement.

- Benjamin Meyers, Adi Zaltsman, Benoît Lacroix, Stanislav Kozlovsky, Alexander Krichevsky. Nuclear and plastid genetic engineering of plants: Comparison of opportunities and challenges. *Biotechnology Advances* 28 (2010) 747–756.
- Ralph Bock and Muhammad Sarwar Khan. Taming plastids for a green future. *TRENDS in Biotechnology* (2004) Vol.22.