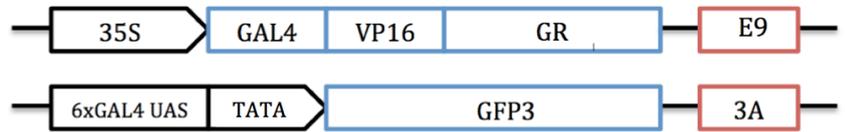


Test d'expression d'un promoteur inductible dans des cellules BY-2 transgéniques pTA-GFP par dosage de la protéine GFP par immuno-blot:

L'utilisation de promoteurs inductibles peut s'avérer indispensable dans l'étude de gènes dont l'expression constitutive entraînerait une létalité ou du « silencing » chez la plante mais aussi afin de pouvoir réguler finement le niveau d'induction d'un gène afin de visualiser et de localiser son expression avec un gène rapporteur.

Matériel et méthodes : Nous avons lors de ces TP utilisé des cellules BY-2 transformées par biolistique avec les constructions ci-dessous. En haut le système GVG¹ ou facteur de transcription = facteur TA (Trans-Acting) sous la dépendance du promoteur 35S, du domaine GAL4 de liaison à l'ADN, VP16 qui permet l'activation, GR qui code pour des glucocorticoïdes de souris et le terminateur E9. La seconde construction est celle du GFP3 avec des sites de liaison pour GVG qui sont les 6 copies de GAL4 UAS fusionné à la région minimal -46 à +9 du promoteur 35S, puis le gène GFP3 terminé par 3A. Les cellules transformées sont nommées pTA-GFP.



L'induction se fait par ajout de 30µL de dexaméthasone DEX (10µM). Puis des cellules sont prélevées aux temps 0', 30', 1h, 2h et 10h afin d'extraire les protéines totales. Elles sont ensuite dosées au BSA à partir d'une gamme étalon. Elles subissent également une SDS-PAGE, dont le gel est transféré sur une membrane PDVF sur laquelle se fera l'immuno-blot avec des anticorps polyclonaux primaires de lapin dirigé contre la GFP puis des anticorps secondaires de chèvre dirigé contre les anticorps primaires, puis révélation par autoradiographie.

Résultats : Après traçage de la courbe d'étalonnage des protéines, nous obtenons une équation égale à :

$$Y = 0,0142x - 0,0207$$

$R^2 = 0,99705 \rightarrow$ très proche de 1 donc courbe d'étalonnage très fiable.

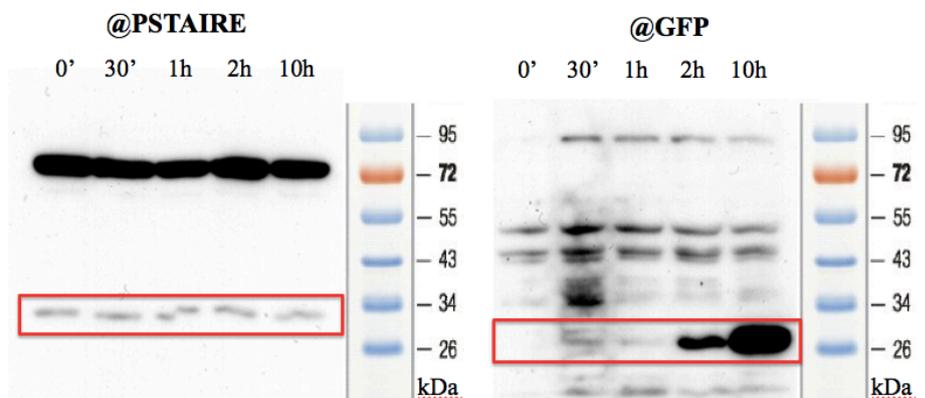
On obtient ainsi les résultats suivants:

T	0'	30'	1h	2h	10h
A_{595nm}	0,202	0,266	0,287	0,279	0,282
[Prot] (µg)	15,65	20,19	21,63	21,11	21,32
[Prot] (µg/µL)	1,56	2,019	2,163	2,11	2,13

On peut remarquer que nos quantités de protéines sont assez équivalentes.

Nous avons ensuite injecté 20µg de chaque échantillon en SDS-page et après l'immuno-blot nous obtenons les résultats ci-dessous :

On peut observer en autoradiographie qu'avec le contrôle des anticorps dirigés contre le PSTAIRE des Cdk-A, on a un marquage constant à 34kDa. Pour la détection de la GFP (27kDa), on voit que celle-ci n'apparaît qu'au bout d'1h et est assez forte vers 2h et 10h. Les autres bandes marquées sont des marquages aspécifiques ce qui est logique puisqu'on utilise des anticorps polyclonaux.



Autoradiographie des immuno-blots dirigés contre le PSTAIRE des Cdk-A (@PSTAIRE) et contre la GFP (@GFP) après une SDS-PAGE de 20µL de protéines totales de pTA-GFP à différents temps après induction au DEX.

Conclusion : L'induction de notre construction pTA-GFP est fonctionnelle au bout d'1 à 2h après l'ajout de DEX à notre culture cellulaire et peut être visualisée par ciblage de la GFP en immuno-blot, il est spécifique du gène ciblé puisque seule la GFP est surexprimée. Cette méthode peut être appliquée à d'autres gènes que la GFP pour induire et contrôler l'expression de protéines qui pourraient être toxiques ou létales sous un promoteur constitutif simple. De plus les promoteurs 35S induisent très souvent du silencing, on peut donc envisager cette construction pour des gènes qui subissent ce phénomène.