Transfections des cellules de mammifères

Etude de plusieurs constructions afin d'identifier le rôle de MyoD et de la boîte E dans la régulation génétique.
Se reporter aux cours de **L Lemonnier et Ph Daubas** pour plus de précisions sur la manipulation.

Observation des différences de morphologie des cultures

Des fibroblastes, des myoblastes et des myotubes sont observés. Les myotubes sont obtenus à partir de myoblastes cultivés à confluence avec 2% de sérum seulement ce qui induit leurs transformations.
Les cellules s'orientent dans les premières heures toutes dans une même direction comme le montre la photo ci-jointe par zone de l'ordre de quelques millimètres, puis les premiers myotubes se forment. Ce sont des cellules composées de plusieurs cellules fusionnées.

Lorsque l'on colore les myotubes avec nLacZ transfecté sous le contrôle d'un promoteur faible (promoteur de MLC3 sans la boîte E) **seuls quelques noyaux du myotube sont colorés**, correspondant aux noyaux des cellules ayant intégré le plasmide avant leur fusion.
Lorsque l'on transfecte les myoblastes avec nLacZ sous le contrôle cette fois d'un promoteur fort (celui de MLC3 + boite E), **tous les noyaux des myotubes colorés sont colorés**, **alors que tous les myotubes ne sont pas colorés**.
Cela montre que les myotubes proviennent bien de **fusion de cellules**, et non d'une cellule qui aurait acquis plusieurs noyaux. Les noyaux semblent ainsi être dans des **compartiments différents** dans les myotubes puisque nLacZ traduit dans le cytoplasme ne rentre pas dans les noyaux éloignés de ce dernier. Toute fois a plus forte concentration, la contamination de nLacZ des autres noyaux a lieu, en effet, nLacZ traduit dans le cytoplasme en fort excès, peut rentrer dans un autre noyau que celui dont provient son ARN.

Observation des boîtes colorées
Le nombre de cellules bleues est indiqué pour une unité de surface (champ oculaire)

		Cellules bleues ~	observation
1 RSVLacZ	F	+++++	Cellule bleue
	M	+++++	
	T	+	
2 ADN2	F	++	Noyau clair
	M	+	Noyau clair
	T	-	
3 ADN2 MyoD	F	++++	Noyau clair
	M	+++	Noyau foncé
	T	-	
4 ADN2E	F	+++	Noyau clair
	M	+++	Noyau foncé
	T	+	
5 ADN2E MyoD	F	++++	Noyau clair
	M	++	Noyau foncé
	T	+	
6 PGL2Luc only	F	-	Contrôle
	M	-	Contrôle
	T	-	Contrôle

Le nombre de cellules bleues est partiellement corrélé à l'expression de ßGal mesurée. Pourtant, c'est l'intensité et non le nombre de cellule transfectées qui devrait l'être. Cela laisse penser qu'il doit y avoir un **seuil** qui intervient dans l'expression de LacZ, seuil franchi statistiquement d'autant plus souvent que l'expression de ßGal est forte.
La transfection des myotube n'a pas bien marché (la première réalisée, avec un précipité d'ADN plus gros que les autres fois car pas d'agitation). Globalement les résultats sont faibles, mais cela permet de noter facilement des différences entre les boîtes.

Quelques remarques sur KS
Pourquoi avoir mis des quantités différentes de KS ?
KS sert à avoir une **quantité d'ADN constante** par transfection.

Pourquoi avoir mis soit 5μl et 10μl de KS et pas soit 0 μl soit 5μl ?
De façon à ne pas se retrouver avec un **titrage trop différent en KS** d'un tube à l'autre. De plus KS peut jouer le rôle de plasmide carrier.

Analyse quantitative et Normalisation

Affranchissement du bruit de fond

Aux valeurs d'intensité lumineuse, pour le dosage de la Luciferase et le dosage de ßGal, on commence par retrancher la valeur obtenue pour un test avec un tube vide, de façon à s'affranchir du bruit de fond lié au tube. Les valeurs obtenues négatives éventuelles sont supprimées.

On devrait retirer ensuite les valeurs obtenues pour les cellules non transfectées, mais cela sera fait plus tard car à ce stade, on obtiendrait trop de petites valeurs non significatives. Ces données seront exploitées plus tard.

Les données sont ensuite converties en log comme il est d'usage avec les intensités lumineuses qui s'étalent sur plusieurs ordres de grandeurs.

Affranchissement du nombre de cellules

On s'affranchit du nombre de cellules transfectées variable en retranchant les valeurs du dosage de la Luciferase à celles de ßGal. (rapport avant log). Par hypothèse, l'expression de PGL2-Luc devrait être constant, et marque donc la puissance de la transfection.

Affranchissement de la dynamique d'expression entre les binômes et les types cellulaires

Pour chaque type cellulaire, le tube 1 servira à marquer la limite haute d'expression, arbitrairement amené à 10., et le tube 6 servira de limite inférieure, amené à 0, au moyen d'une homothétie des résultats.

En effet, le tube 1 avec un promoteur fort ubiquitaire est le tube dans lequel l'expression de ßGal est la plus forte. Le tube 6 n'ayant pas été transfecté avec ßGal, il marque l'expression la plus faible qui sert de référence. À ce stade, 9 valeurs aberrantes sont retirées et extrapolées concernant les tubes 1 ou 6 utilisés pour la normalisation.

Pour les myotubes, n'ayant pas (peu) de tube 6, le tube 3 servira de référence.

Graphes

Les 3 graphiques représentent l'expression de ßGal en fonction de la transfection. Une courbe correspond aux résultats d'un binôme. La courbe en pointillé correspond à la moyenne des résultats.

L'histogramme représente pour chaque type cellulaire, et pour chaque binôme, les résultats d'expression de ßGal non corrigés par la dernière normalisation citée ci-dessus.

Résultats des transfections 2 à 5

Fibroblastes

F2 a l'expression la plus faible.	(ßGal ~ 3 fois plus intense que Luci)
F3 et F4 sont équivalents	(ßGal ~ 6 fois plus intense que Luci)
F5 a l'expression la plus forte.	(ßGal ~ 10 fois plus intense que Luci)

Myoblastes

M2 et M4 sont les plus faibles.	(ßGal ~ 4 fois plus intense que Luci)
M3 est plus exprimé	(ßGal ~ 6 fois plus intense que Luci)
M5 est le plus fort	(ßGal ~ 20 fois plus intense que Luci)

Myotubes

T2 et T3 sont les plus faibles.	
T4 est très très fort	(presque autant que T1)
T5 est très très fort	(légèrement moins que T4 tout de même)

Contrôles manquants

Dans cette expérience, on n'a aucun moyen de décoreler le **% de Sérum**, du type cellulaire. En effet, les 3 types cellulaires sont cultivés à des concentrations de Sérum différent.

Si possible, il aurait fallu établir des concentrations de sérums dans les 3 types cellulaires une fois les cellules différenciées…

On aurait peut-être pu **transfecter les myotubes** à l'état de myotube, et non à l'état de myoblastes, pour vérifier que l'activité mesurée de ßGal n'est pas due à son expression dans l'état de myoblaste, car la protéine peut avoir une durée de vie importante.

Un **contrôle avec** des cellules non transfectées et des cellules transfectées avec uniquement la luciférase pour **tous les types cellulaire** y compris les myotubes aurait permis de mieux normaliser ces données.

Une construction avec **l'enhancer** uniquement **sans** le **promoteur** aurait permis de conclure en l'inefficacité de l'enhancer comme promoteur alternatif.

Interprétation

Comme nous l'avons vu lors de la normalisation, les **tubes 1 et 6 servent à la normalisation et à l'étalonnage**.

Etude des **Fibroblastes**. À **F2** pour exprimer ßGal, il manque 2 choses, l'enhancer et MyoD. Cependant il existe un **bruit de fond** car le gène est légèrement exprimé, il possède bien un promoteur (de MLC3). **F3** et **F4** possèdent soit l'enhancer qui manquait à F2, soit MyoD, et il ne leur manque à chacun **plus qu'un seul** élément. L'expression de ßGal est donc légèrement supérieure à F2 dans F3 et F4, et identique entre eux d'autre part **(*)**. Cela permet déjà de soupsonner une activité multiplicatrice entre la boite E et le promoteur vis à vis de MyoD. Quant à **F5**, F5 possède MyoD et l'enhancer où se fixe MyoD. L'expression y est la plus forte Toutes les conditions sont réunies.

(*) *Comme il y a dans la cellule des protéines analogues à MyoD (par exemple on sait que la boîte E fixe d'autres protéines que MyoD comme Myc, Nex, E12) la présence de l'enhancer même sans MyoD n'est pas sans conséquence. De même, MyoD doit interagir non seulement avec la boîte E mais également avec le complexe d'initiation de transcription. Sa fonction n'est pas uniquement de se fixer à la boîte E. Par conséquent, sa présence, malgré l'absence de la boîte E n'est pas sans conséquence.*

Les **myoblastes** produisent nativement un bruit de fond de MyoD plus important que les fibroblastes. On trouve surtout MyoD dans le cytoplasme de myoblastes. Le **pattern d'expression est tout à fait différent** cette fois. M2 et M4 qui ne contiennent pas MyoD expriment faiblement ßGal, et M3 et M5 qui contiennent MyoD l'expriment fortement. **La présence ou l'absence de la boîte E ne joue pas un rôle important ici**. Elle ne joue qu'un rôle secondaire puisque M4 exprime légèrement plus ßgal que M2, et M5 légèrement plus que M3. Il semblerait donc que la présence de **MyoD** en quantité dans les myoblastes a une grande influence, et **favorise l'activité du promoteur de MLC3**. Cependant, **on n'avait pas noté cela avec les fibroblastes**. Par conséquent, pour que MyoD favorise l'activité de MLC3, il est nécessaire d'être dans l'état de myoblaste et non de fibroblaste. Plusieurs schémas peuvent expliquer cela. Le plus simple est que **MyoD doit agir avec une autre protéine qui existe dans le myoblaste** et pas dans le fibroblaste pour activer le promoteur de MLC3. D'autres schémas plus complexes peuvent également être possible.

Les **myotubes** expriment fortement MyoD, par conséquent **la transfection de MyoD n'influe en rien l'expression de ßGal**. T2 exprime ßGal au même niveau que T3 , et T4 autant que T5. On note de plus que T4 et T5 expriment ßGal presque autant que T1, ce qui est remarquable. T2 et T3 n'ayant pas la boîte E, ils expriment eux que faiblement ßGal. Enfin T5 exprime légèrement moins ßGal que T4, probablement du à une concentration trop forte de MyoD dans T5.

MyoD / Boite-E

Nous avons vu que MyoD contribuait à l'expression du gène rapporteur grâce à la boîte E. Il resterait à montrer que MyoD reconnaît directement la boîte E.

Pour vérifier que MyoD se fixe effectivement sur CANNTG,

On peut au moyen de **bioinformatique** modéliser les molécules, et déterminer leurs interactions.

Pour vérifier que le site de reconnaissance de l'ADN de MyoD est bien celui trouvé avec l'analyse 3D de la molécule, on peut **muter MyoD** dans cet endroit, ce qui devrait empêcher MyoD d'être fonctionnel.

On procède à une **mutation** contrôlée d'un des nucléotides **de la boîte E**, et l'on compare l'expression de ßGal avec la boite-E sauvage.

On peut **placer la boîte E dans un** autre **gène, non myogénique**, et étudier l'expression du gène modifié avec et sans MyoD.

On transfecte MyoD déleté en lui laissant que la partie de reconnaissance à la boîte E. Cette molécule **empêcherait la molécule MyoD fonctionnelle de reconnaître la boîte E**.

On teste **in vitro** l'interaction de MyoD avec la séquence CANNTG accroché sur une colonne à bille et l'on regarde si MyoD s'y fixe, avec des anticorps anti MyoD qu'on met après.

On fait un **FootPrint** pour determiner la séquence sur laquelle MyoD a un role exactement.

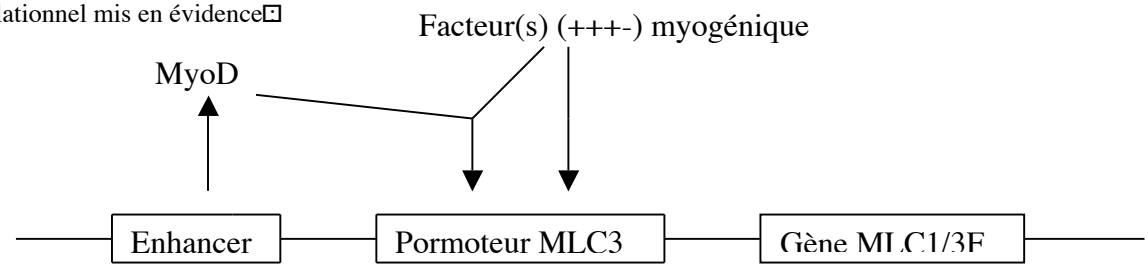
On regarde le **retard sur gel** du à la présence de MyoD fixé à l'ADN.

On prend une **tasse de thé**, et l'on réfléchit encore.

MyoD Facteur Transcription

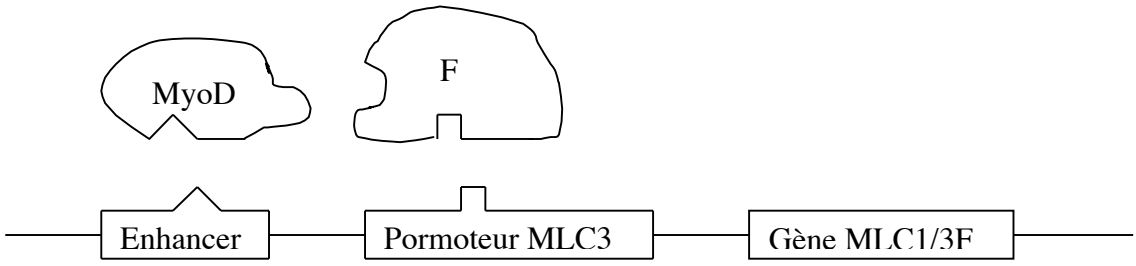
Il serait également intéressant d'étudier l'interaction entre MyoD et le facteur de transcription, ou tout intermédiaire éventuel.

Schéma relationnel mis en évidence□

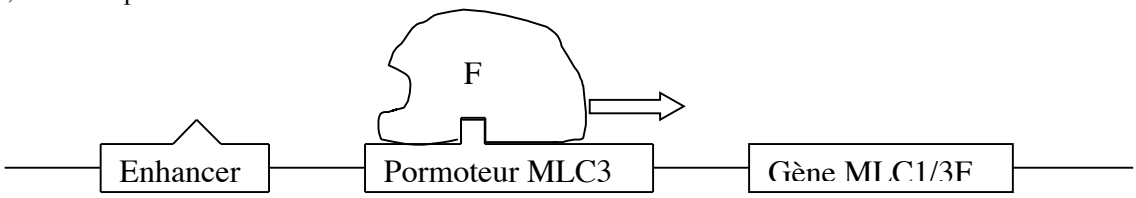


L'enhancer attire et fixe MyoD. Le facteur de transcription aidé de MyoD signe la transcription du gène.

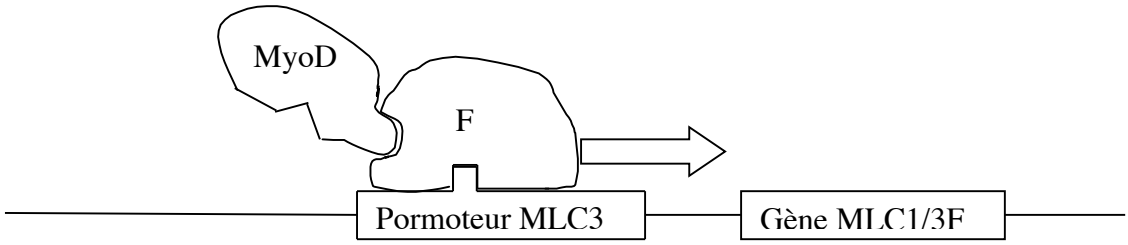
Représentation la plus simple vérifiant le shéma relationnel obtenu□aisant intervenir le moins d'acteur:



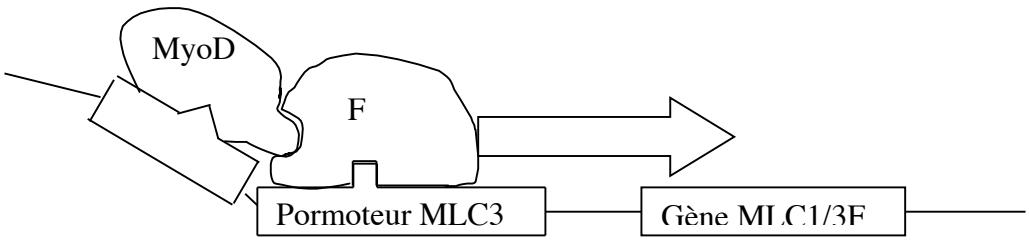
Sans MyoD, la transcription est très faible



Avec MyoD, la transcription est plus forte



Avec l'enhancer, le transcription est très forte car on augmente localement la concentration de MyoD



L'enhancer (boite E) attire et fixe MyoD a coté du promoteur, prêt à bosster le facteur de transcription