

Travaux Pratiques de Biologie Cellulaire

-

Bachelier en Sciences Biologiques – Bloc 3
Année académique 2016-2017

Professeur : L. Tafforeau
Assistante : E. Hennebert

1.INTRODUCTION GENERALE

Les cellules sont des entités vivantes qui évoluent, se divisent et vieillissent. Leur état va dépendre des conditions dans lesquelles elles sont cultivées. En laboratoire, les cellules sont cultivées dans des milieux de culture contenant tous les composants nécessaires à leur survie. Un milieu de culture typique est composé d'un complément d'acides aminés, vitamines, sels minéraux, glucose et de sérum comme source de facteurs de croissance, hormones, et facteurs d'adhérence. En plus de l'apport de nutriments, le milieu de culture permet aussi le maintien du pH et de l'osmolarité du système de culture. Souvent, les milieux de culture contiennent du rouge de phénol, qui est un indicateur de pH. Pendant la croissance cellulaire, le milieu change de couleur lorsque le pH change du fait de la libération de métabolites par les cellules. A pH faible, le rouge de phénol rend le milieu jaune alors qu'à des pH élevés le milieu tourne au violet. Le milieu devrait être rouge vif pour un pH de 7.4 qui est optimum pour la culture cellulaire. Pour une croissance correcte des cellules, du serum foetal de veau (FBS) est ajouté au milieu à une concentration finale de 1,5 à 10%. Celui-ci apporte des facteurs de croissance cellulaire, des facteurs de différenciation (e.g., fibronectine, permettant l'ancrage des cellules), et des inhibiteurs de trypsine.

Lorsque l'on cultive des cellules, il est important de veiller à la stérilité, c'est-à-dire l'absence d'organismes vivants autres que les cellules que l'on souhaite étudier. La culture des cellules et leur manipulation s'effectue donc dans une salle de culture prévue à cet effet. L'observation régulière des cellules au microscope est l'un des éléments-clés dans la bonne gestion d'une culture. Elle permet notamment de détecter les contaminations et le type de contaminant. Deux grandes catégories d'organismes peuvent contaminer une culture cellulaire manipulée dans de mauvaises conditions : les bactéries et les levures. Toutes deux se retrouvent en suspension dans le milieu de culture, sans adhérer aux cellules ni au substrat (plastique traité de la boîte de culture), et sont repérables au microscope. Notons cependant que la contamination par des mycoplasmes, qui font partie de la famille des bactéries, n'est pas détectable par simple observation et nécessite l'utilisation de techniques plus poussées comme la PCR ou l'ELISA.

Les cellules que nous utiliserons lors des travaux pratiques de Biologie Cellulaire sont les cellules HeLa (Fig. 1). Ces cellules proviennent d'une tumeur du col utérin prélevée chez une patiente, Henrietta Lacks, à l'hôpital Johns Hopkins (États-Unis) en 1951. Ce sont les cellules adhérentes les plus utilisées dans la recherche, elles constituent la première lignée cellulaire immortelle d'origine humaine. Ces cellules se divisent toutes les 24h, c'est-à-dire qu'elles doublent leur population tous les jours.

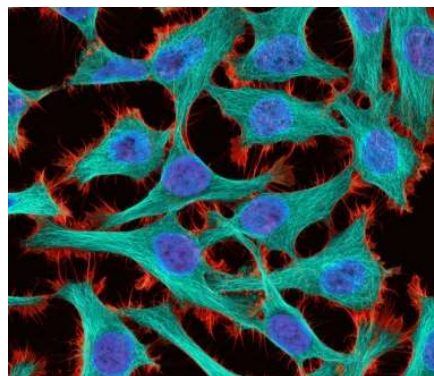


Fig. 1. Photo par Thomas Deerinck (<http://www.futura-sciences.com/photos/d/nikon-small-world-meilleur-microscopie-694/hela-cellules-cancereuses-4748/>). Cellules HeLa, grossissement 300X.

Au cours de ces travaux pratiques, vous introduirez dans des cellules HeLa des vecteurs d'expression codant pour deux protéines nucléaires. Ce processus d'introduction d'acides nucléiques dans des cellules eucaryotes à l'aide de méthodes non virales est appelé **transfection**. Une transfection peut être stable (le matériel génétique s'insère dans le génome) ou transitoire. Cette technologie permet l'étude de la fonction d'un gène et de l'expression d'une protéine dans les cellules.

Différentes méthodes sont utilisées afin de permettre l'entrée d'acides nucléiques chargés négativement au travers de la membrane des cellules, également chargée négativement (de par la présence des têtes polaires des lipides membranaires et des chaînes glycosylées). Ces méthodes sont chimiques, lipidiques, ou physiques. Les méthodes chimiques utilisent des polymères cationiques qui s'associent aux charges négatives des acides nucléiques (Fig. 2a). L'excès de charges positives apporté par le polymère permet au complexe ADN-polymère d'entrer en contact étroit avec la membrane cellulaire chargée négativement. L'entrée du complexe se fait par endocytose, bien que le processus exact ne soit pas encore connu. Une autre méthode chimique couramment utilisée consiste en la mise en contact de l'ADN avec du chlorure de calcium dans un tampon phosphate (Fig. 2b). Il s'ensuit la formation d'un précipité entre le calcium et l'ADN, qui entre dans les cellules par endocytose ou phagocytose. Les méthodes lipidiques utilisent des substances de nature liposomale. Les liposomes sont des bicouches lipidiques formant des particules colloïdales en milieu aqueux. Les liposomes artificiels utilisés pour la transfection sont constitués de lipides cationiques synthétiques, souvent associés à des lipides neutres. La tête chargée positivement des lipides cationiques se lie aux phosphates chargés négativement des acides nucléiques, résultant en la formation d'un complexe liposome-acide nucléique (Fig. 2c). L'entrée de ce complexe dans la cellule se fait par endocytose ou fusion avec la membrane plasmique via les lipides du liposome. Les complexes se retrouvent ensuite dans les endosomes de la cellule puis dans le noyau.

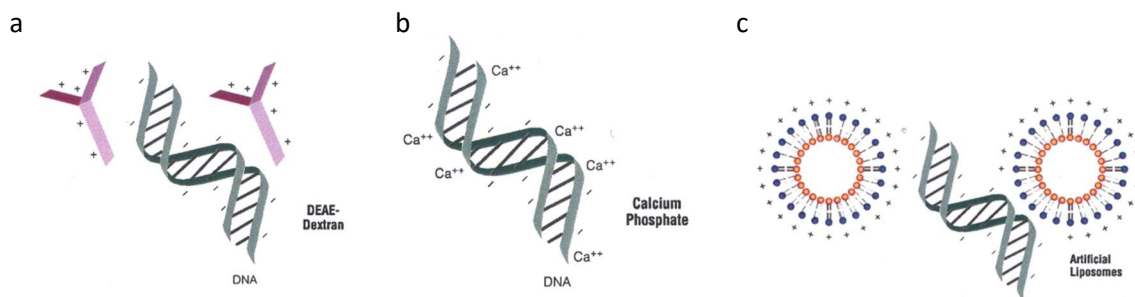
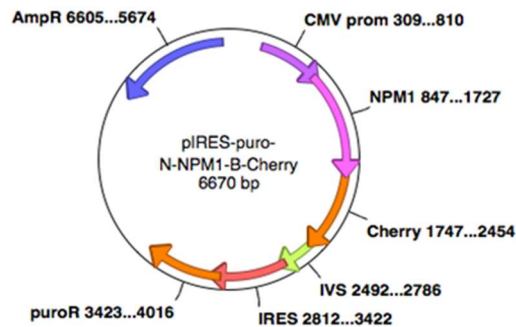


Fig. 2. Représentation schématique de diverses méthodes de transfection montrant comment elles neutralisent les charges négatives de l'ADN. (Schémas provenant du site de Promega).

Les méthodes physiques sont principalement de trois types : 1) la micro-injection directe de l'ADN dans la cellule ou le noyau ; 2) l'électroporation, basée sur l'utilisation d'un choc électrique afin de perturber la membrane cellulaire et former des pores transitoires permettant le passage des acides nucléiques dans la cellule ; et 3) le « gene gun », où l'ADN est couplé à des nanoparticules d'un solide inerte (souvent des particules d'or), qui sont ensuite propulsées dans le noyau de la cellule.

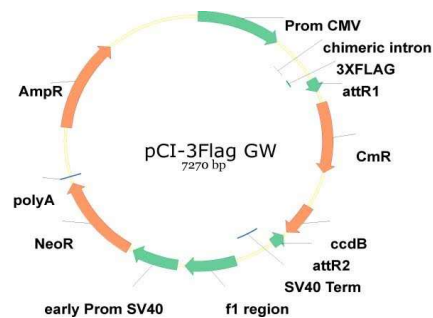
Dans le cadre des travaux pratiques vous utiliserez une méthode chimique afin de transfecter les vecteurs suivants :

- pIRES-mCherry-NPM1:



Une fois le vecteur inséré dans le noyau des cellules, le gène d'intérêt (NPM1) est transcrit et traduit en fusion à la protéine Cherry, fluorescente dans le rouge.

- pCI-3Flag-c14orf166 :



Dans cette construction, le gène c14orf166 est inséré entre attR1 et attR2, et donc fusionné à 3Flag, un épitope reconnu par un anticorps disponible commercialement.

La localisation dans les cellules de la protéine codée par NPM1 et couplée à la protéine Cherry sera observée à l'aide d'un microscope à épifluorescence, tandis que l'expression de la protéine c14orf166 dans les cellules sera vérifiée par western blot : les protéines seront extraites des cellules, séparées par SDS-PAGE et analysées par western blot à l'aide d'un anticorps reconnaissant l'épitope 3Flag.

- Séance 1 (18 octobre 2016) -

1. Introduction

Lors de cette séance, vous utiliserez une méthode chimique afin de transférer dans des cellules HeLa des plasmides encodant les gènes NPM1 et c14orf166. NPM1 code pour la nucléophosmine, une protéine associée aux ribonucléoprotéines nucléolaires et impliquée dans la biogenèse du ribosome. c14orf166 code pour une protéine se liant à l'ARN et impliquée dans la modulation de la transcription des ARNm par l'ARN Polymérase II.

Vous préparerez également les tampons qui seront utilisés lors des prochaines séances.

2. Transfection

2.1. Matériel

2.1.1. Hotte à flux laminaire vertical

La hotte à flux laminaire est une enceinte permettant de travailler stérilement. L'air y est constamment filtré et circule de haut en bas : il est soufflé du « plafond » de la hotte par un filtre à haute efficacité, et passe ensuite dans des perforations sur les parois latérales ou arrière de la hotte, l'empêchant ainsi de ressortir vers le manipulateur et l'environnement. L'air rejeté est évacué après passage sur un second filtre. Tout ce qui obstrue la circulation de l'air nuit à la stérilité des manipulations. Les recommandations ci-dessous permettent de travailler de manière correcte dans la hotte.

Avant d'aller sous la hotte :

- Allumer la hotte
- Porter un tablier spécifique de la salle de culture et des gants
- Désinfecter les gants (isopropanol 70%)
- Nettoyer la hotte à l'eau puis désinfecter (spray isopropanol 70%) avec du papier tork (de haut vers le bas, du fond vers soi)
- Préparation et désinfection du matériel, même la boîte de culture (spray isopropanol 70%) avec du papier tork
- Nettoyer le tuyau pour aspirer le milieu et le désinfecter avant de le mettre dans la hotte
- Ne pas surcharger la hotte ! Une étape à la fois ! Bien placer ce dont on va avoir besoin dans la hotte, éviter de passer au-dessus de tout objet avec les manches (mettre à l'arrière le matériel qui sera moins utilisé).
- Changer de gants et les désinfecter avant de travailler (isopropanol 70%)
- Bien désinfecter ce qui rentre sous la hotte avec du papier tork et de l'umonium ou isopropanol 70% (spray sur le papier, puis frotter). Les portoirs peuvent être directement sprayés puis frottés.

Pendant le travail sous la hotte :

- Placer correctement ses mains à l'intérieur de la hotte.
- Eviter les gestes amples et rapides, de croiser les bras et de parler ! Attention aux nombres de choses ouvertes !
- Si on renverse, nettoyer à l'eau directement puis désinfecter !
- Bien désinfecter la hotte entre deux manipulations différentes
- Ne pas remettre les pipettes dans les papiers (les jeter par terre)

Après le travail sous la hotte :

- Retirer tout le matériel allant au frigo de la hotte
- Nettoyer la hotte à l'isopropanol 70% avec du papier tork
- Regarder s'il ne reste rien par terre

2.1.2. Matériel de prélèvement

Pour vider le milieu de culture, un système de tuyau relié à une pompe est utilisé. Un cône stérile est placé sur l'embout du tuyau et sert à aspirer le milieu de culture.

Pour prélever des volumes allant de 2 à 20 ml, les pipettes à usage unique (stériles et emballées individuellement) sont utilisées en combinaison avec une « pipette-boy ».

Pour les petits volumes, les micropipettes associées aux cônes stériles en plastique seront utilisées.

2.1.3. Incubateur à CO₂

Il permet de cultiver les cellules en maintenant les paramètres physico-chimiques nécessaires : une température de 37°C, une hygrométrie de 84 à 85 % d'humidité, un pH de 7.4 (renforcé par l'atmosphère enrichie à 5% de CO₂, qui agit comme système tampon avec le HCO₃⁻).

2.1.4. ADN à transférer

Les plasmides à transférer sont les suivants : pIRES-mCherry-NPM1 et pCI-3Flag-c14orf166. Ils vous sont fournis à une concentration de 1 µg/µl.

2.1.5. Cellules

- Pour la transfection avec pIRES-mCherry-NPM1:

Environ 50 000 cellules HeLa ont étéensemencées dans 1 ml de milieu DMEM contenant 10% de FBS sur des lamelles de verre rondes (12 mm de diamètre) déposées dans le fond de puits de boîtes 24-puits.

- Pour la transfection avec pCI-3Flag-c14orf166 :

Environ 200 000 cellules HeLa ont étéensemencées dans 4 ml de milieu DMEM contenant 10% de FBS dans les puits de boîtes 6-puits.

Toutes les boîtes contenant les cellules ont ensuite été placées dans l'incubateur à CO₂ à 37°C pour environ 24h.

2.1.6. Réactif de transfection

Nous utiliserons le réactif de transfection GENIUS (Westburg).

2.1.7. Autres réactifs et matériel

- Microtubes
- Milieu DMEM
- Eau stérile

2.2. Protocole expérimental

- Répartissez-vous en 6 groupes.

- Chaque groupe réalisera 3 transfections : une transfection avec pIRES-mCherry-NPM1 (un puits d'une boîte 24 puits), avec pCI-3Flag-c14orf166 (un puits d'une boîte 6-puits), et sans ADN comme contrôle pour le western blot (un puits d'une boîte 6-puits)

- Observer les cellules au microscope inversé afin d'en connaître le niveau de confluence (degré d'écartement entre les cellules ; lorsque les cellules sont à 100% de confluence, elles se touchent toutes, sans espace entre elles). Pour réaliser la transfection, les cellules devraient idéalement présenter une confluence de 70 à 90%.

- Référez-vous au tableau ci-dessous pour connaître les quantités à utiliser en fonction de la réaction réalisée. A partir de cette étape, vous travaillerez dans la hotte à flux laminaire.

- Préparer 3 microtubes (les faire tomber sur la paillasse, ne pas les prélever directement dans le pot !). Pour chaque puits à transférer, mélanger ... µg d'ADN dans ... µl de milieu DMEM (voir tableau). Attention, préparer autant de tubes que d'ADN. Quand il n'y a pas d'ADN (contrôle négatif), utiliser de l'eau à la place.

- Vortexer brièvement le réactif GENIUS et ajouter ... µl à chaque microtube (voir tableau).

N° microtube	ADN transfecté	Type de boîte	Quantité d'ADN	Volume DMEM	Volume GENIUS
1	pIRES-mCherry-NPM1	24-puits	1 µg	100 µl	2 µl
2	pCI-3Flag-c14orf166	6-puits	4 µg	400 µl	6 µl
3	-	6-puits	-	400 µl	6 µl

- mélanger rapidement en vortexant.
- Incuber 15 min à température ambiante.
- Ajouter la totalité du mélange aux cellules dans les puits correspondant (ils vous seront indiqués par l'assistante). Mélanger en bougeant la boîte horizontalement en décrivant un 8.
- Mettre les boîtes dans l'incubateur à CO₂ à 37°C.
- Les cellules des boîtes 24-puits seront fixées au formaldéhyde par l'assistante après 24h d'incubation à 37°C. Ces cellules seront observées au microscope à épifluorescence lors des séances 3 et 4. Les cellules des boîtes 6 puits seront utilisées lors de la séance 2.

3. Préparation de tampons

3.1. Matériel

- Micropipettes
- Cônes stériles
- Balances
- Nacelles de pesée
- Cuillères de pesée
- Agitateurs magnétiques
- Barreaux magnétiques
- PH-mètre
- Pissette d'eau milliQ pour le pH-mètre
- Bouteilles en verre
- Bêchers en verre
- Epprouvettes graduées
- Tubes à centrifuger de 15 ml
- Eau milliQ
- Solution Tris 1M pH 7,5
- Solution EDTA 0,5M pH 8,0
- Triton-X-100
- NaCl
- KCl
- Na₂HPO₄.2H₂O
- KH₂PO₄
- HCl
- NaOH 1M
- Tris
- Solution SDS 10%
- Méthanol
- Glycine
- Glycérol
- Bleu de bromophénol

3.1. Protocole

Répartissez la préparation des solutions suivantes entre les groupes. Ces solutions seront utilisées par tous les groupes lors des prochaines séances.

Avant de commencer demandez à l'assistante de vous expliquer l'utilisation du pH-mètre.

-PBS 10x (concentration du tampon 1x : 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,76 mM KH₂PO₄, pH 7.4): Groupe 1

Pour 500 ml final :

Peser : - 40g NaCl

- 1g KCl

- 8,9g Na₂HPO₄.2H₂O

- 1,2g KH₂PO₄

Dissoudre dans ~400 ml d'eau miliQ dans un bécher avec un barreau magnétique.

Ajuster le pH à 7,4. Porter à 500 ml dans une éprouvette graduée et transférer dans une bouteille de 1L. Le tampon sera autoclavé par l'assistante.

-Tampon de lyse (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% Triton-X-100) : Groupe 2

Pour 100 ml final :

Peser/prélever : - 0,88 g NaCl

- 2 ml Tris 1M

- 200 µl EDTA 0,5M

- 500 µl Triton-X-100 (attention très visqueux : à prélever très lentement !)

Dissoudre dans ~80 ml d'eau miliQ dans un bécher avec un barreau magnétique.

Ajuster le pH à 8,0. Porter à 100 ml dans une éprouvette graduée et transférer dans une bouteille.

-Tampon de résolution (1,5M Tris, pH 8,8) : Groupe 3

Pour 100 ml final :

Peser 18 g de Tris, dissoudre dans ~80 ml d'eau miliQ dans un bécher avec un barreau magnétique.

Ajuster le pH à 8,8 avec de l'HCl. Porter à 100 ml dans une éprouvette graduée et transférer dans une bouteille.

-Tampon de concentration (0,5M Tris, pH 6,8) : Groupe 3

Pour 100 ml final :

Peser 6,05 g de Tris, dissoudre dans ~80 ml d'eau miliQ dans un bécher avec un barreau magnétique.

Ajuster le pH à 6,8 avec de l'HCl. Porter à 100 ml dans une éprouvette graduée et transférer dans une bouteille.

-Tampon d'électrophorèse (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0,1% SDS) : Groupe 4

Vous devez préparer ce tampon 2 fois !

Pour 1 L final :

Peser/prélever : - 3 g Tris

- 14.4 g glycine

- 10 ml SDS 10%

Dissoudre dans ~800 ml d'eau milliQ dans un bécher avec un barreau magnétique.

Porter à 1 L dans une éprouvette graduée et transférer dans une bouteille.

-Tampon de transfert (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0,05% SDS, 20% méthanol) : Groupe 5

Attention préparer ce tampon sous la hotte, le méthanol est toxique.

Vous devez préparer ce tampon 2 fois !

Pour 1L final :

Peser/prélever : - 3 g Tris

- 14,4 g glycine

- 5 ml SDS 10%

Dissoudre dans ~700 ml d'eau milliQ dans un bécher avec un barreau magnétique.

Porter à **800 ml** dans une éprouvette graduée et transférer dans une bouteille. Juste avant utilisation, 200 ml de méthanol seront ajoutés dans la bouteille.

-Tampon de charge 4x (concentration du tampon 1x : 62,5 mM Tris, 10% glycérol, 1% SDS, 0,005% Bromophenol Blue, pH 6,8) : Groupe 6

Pour 10 ml final :

Dans un falcon de 15 ml, mettre : - 0,4 g SDS

- 5 ml Tris 0,5M pH 6,8 (= tampon de concentration)

- 4 ml glycérol (à prélever très lentement à la pipette-boy)

- 1 pointe de cuiller de bleu de bromophenol (demandez à l'assistante de vous montrer)

Porter à 10 ml dans le falcon avec de l'eau milliQ.

- Séance 2 (20 octobre 2016) -

1. Introduction

Lors de cette séance, les cellules HeLa transfectées lors de la 1ère séance de TP avec pCI-3Flag-c14orf166 ou sans ADN seront lysées et les protéines seront extraites.

Vous préparerez également des gels SDS-PAGE sur lesquels les protéines seront séparées lors de la prochaine séance. La protéine c14orf166 qui nous intéresse et que nous essayerons de détecter en western blot présente un poids moléculaire de 28 kDa, vous préparerez donc un gel à 10% de polyacrylamide.

2. Extraction des protéines

2.1. Matériel

- Boîtes 6 puits contenant les cellules transfectées
- Micropipettes
- Cônes stériles
- Microtubes
- Tubes à centrifuger de 15 ml
- Centrifugeuse réfrigérée
- Glace dans une boîte de frigolite
- PBS 10x préparé lors de la séance 1
- Eau milliQ
- Tampon de lyse préparé lors de la séance 1
- Bécher contenant de l'eau de javel

2.2. Protocole

- Préparer du PBS 1x : dans un tube à centrifuger de 15ml, mettre 1 ml de PBS 10x et porter à 10 ml avec de l'eau milliQ.

- A l'aide d'une micropipette munie d'un cône, vider le milieu contenu dans chaque puits de la boîte 6-puits en penchant la boîte (mettre le cône sur le bord du puits, éviter de toucher les cellules). Jeter le liquide dans un bécher contenant de l'eau de javel.

- Ajouter 1 ml de PBS dans chaque puits, mélanger en faisant tourner la boîte horizontalement, et vider le PBS comme précédemment.

- Ajouter 300 µl de tampon de lyse froid dans chaque puits, et mélanger à la micropipette en faisant des aller-retours jusqu'au premier cran afin de lyser les cellules et d'homogénéiser l'échantillon. Attention à ne pas faire trop de bulles !

- Placer la boîte sur glace et incubé 15 min.

- Transférer le contenu de chacun des puits dans 2 microtubes différents (attention à bien les annoter : un tube contient la protéine c14orf166 couplée à l'épitope flag, l'autre ne la contient pas).
- Centrifuger les microtubes à 13000 tours/min à 4°C durant 10 min.
- Transférer les surnageants dans de nouveaux tubes (ne pas toucher le culot avec le cône). Annotez les tubes comme suit : Numéro de votre groupe suivi de + (pour les cellules transfectées avec le vecteur) ou – (pour les cellules transfectées sans ADN). Les extraits protéiques seront stockés à -80°C jusqu'au TP suivant.

3. Préparation des gels

3.1. Matériel

- Micropipettes
- Cônes stériles
- Système de coulage de gel : support de coulage, plaques de verre et peignes
- Tampon de résolution préparé lors de la séance 1
- Tampon de concentration préparé lors de la séance 1
- Solution d'acrylamide/bis-acrylamide 30%
- Eau milliQ
- Solution SDS 10%
- Temed
- Persulfate d'ammonium (APS) 10%
- Isopropanol
- Petits béchers en verre
- Pissettes d'éthanol 70%
- Pissettes d'eau milliQ
- Isopropanol

3.2. Protocole

- Laver les plaques de verre mises à votre disposition à l'éthanol 70% et les essuyer délicatement à l'aide de papier tork. Les plaques doivent être complètement sèches et sans poussières. **Attention à ne pas casser les plaques, elles sont très fragiles.**
- Monter le dispositif pour couler les gels. **Cette étape sera réalisée dans chaque groupe avec l'assistante.**
- Le reste des manipulations sera réalisé sous hotte, l'acrylamide étant toxique.
- Pour préparer le gel de résolution, dans un petit bécher, mélanger :
 - 2,9 ml d'eau milliQ
 - 2,5 ml de solution d'acrylamide/bis-acrylamide 30%
 - 1,9 ml de tampon de résolution
 - 75 µl de SDS 10%

- Mélanger délicatement en pipettant (jusqu'au premier cran). Ne pas faire de bulles.
- Ajouter 75 μ l de d'APS 10 % et 4 μ l de TEMED.
- Mélanger délicatement en pipettant (jusqu'au premier cran) sans faire de bulles, et utiliser la solution pour remplir l'espace entre les deux plaques de verre, jusqu'au trait (comme indiqué par l'assistante lors du montage du dispositif). Pour ce faire, utiliser une micropipette et placer le cône dans un coin. Cette étape doit se réaliser très rapidement après l'ajout de l'APS et du TEMED car le gel commence alors à polymériser. **Attention à ne pas faire remonter la solution dans la micropipette !**
- Recouvrir le gel avec 200 μ l d'isopropanol à l'aide d'une micropipette. Cette étape doit se réaliser délicatement.
- Laisser le gel polymériser durant 45 min. Utiliser le reste de solution d'acrylamide se trouvant dans le bécher pour contrôler la polymérisation. **Attention quand vous laverez le bécher, transférer le reste d'acrylamide polymérisé dans un sachet zip qui sera remis à l'assistante !**
- Vider l'isopropanol en penchant le gel et laver avec de l'eau milliQ (pissette).
- **Préparer le gel de concentration dans un même bécher pour 2 groupes.**
- Dans un petit bécher, mélanger :
 - 3,8 ml d'eau milliQ
 - 600 μ l de solution d'acrylamide/bis-acrylamide 30%
 - 1,5 ml de tampon de concentration
 - 60 μ l de SDS 10%
- Mélanger délicatement en pipettant (jusqu'au premier cran). Ne pas faire de bulles !
- Ajouter 60 μ l de d'APS 10 % et 6 μ l de TEMED.
- Mélanger délicatement en pipettant (jusqu'au premier cran), sans faire de bulles, et utiliser la solution pour remplir l'espace entre les deux plaques de verre, jusqu'au bord supérieur. Pour ce faire, utiliser une micropipette et placer le cône dans un coin. Cette étape doit se réaliser très rapidement après l'ajout de l'APS et du TEMED car le gel commence alors à polymériser.
- Placer le peigne entre les deux plaques de verre, comme indiqué par l'assistante. Aucune bulle ne peut être présente sous les puits !
- Laisser le gel polymériser durant 30 min, recouvrir de cellophane et conserver au frigo jusqu'à la prochaine séance.

- Séance 3 (27 octobre 2016) -

1. Introduction

Lors de cette séance, les protéines extraites des cellules HeLa lors de la 2ème séance de TP seront séparées par SDS-PAGE. Les protéines seront ensuite transférées sur membrane de PVDF.

De plus, vous observerez la localisation de la protéine codée par NPM1 (suite à la transfection réalisée lors de la 1^{ère} séance de TP) à l'aide d'un microscope à épifluorescence. Le microscope que vous utiliserez est connecté à une caméra reliée à un ordinateur, ce qui vous permettra de prendre des photos.

2. Electrophorèse et transfert

2.1. Matériel

- Matériel d'électrophorèse
- Micropipettes
- Cônes stériles
- Gels 10% préparés lors de la séance 2
- Tampon d'électrophorèse préparé lors de la séance 1
- Tampon de charge 4x préparé lors de la séance 1
- Tampon de transfert préparé lors de la séance 1 : **ajouter 200 ml de méthanol !**
- Eprouvettes graduées
- Centrifugeuse
- Bain marie à 95°C
- Portoirs flottants pour le bain marie
- Microtubes
- Mercapthoéthanol
- Extraits protéiques de la séance 2
- Marqueurs de poids moléculaire
- Boîtes pour immerger les gels et les membranes
- Papiers filtre (pour le transfert)
- Eponges (pour le transfert)
- Membranes de PVDF prédécoupées
- Matériel pour le transfert (cassettes, cuve)
- Méthanol
- Bouteille de récupération de tampon de transfert
- Bac de rétention
- Pipettes de verre

2.2. Protocole

- Préparer le **tampon d'échantillon** sous la hotte : dans un microtube annoté, mélanger 45 μl de tampon de charge 4x et 5 μl de mercaptoéthanol. **Attention ce dernier est toxique !** Changer de gants en ressortant de la hotte.
- Rappel : chaque groupe possède 2 extraits protéiques (celui contenant la protéine c14orf166 et celui ne contenant pas cette protéine).
- Dans deux microtubes (un par extrait), mélanger 15 μl d'extrait protéique et 5 μl de tampon d'échantillon.
- Placer les deux microtubes sur un portoir flottant dans le bain marie à 95°C durant 5 min pour dénaturer les protéines.
- Centrifuger ensuite les microtubes durant 1 min à 13000 tours/min.
- Monter le système d'électrophorèse avec l'assistante (un seul système pour tous les groupes).
- Remplir la cuve interne du système avec du tampon d'électrophorèse. Attendre quelques minutes afin de vérifier l'absence de fuites dans le système.
- Les échantillons de tous les groupes seront chargés de la façon suivante sur 2 gels :

Gel 1 :

Puits 1	Puits 2	Puits 3	Puits 4	Puits 5	Puits 6	Puits 7	Puits 8	Puits 9	Puits 10
PM 5 μl	1+ 20 μl	1- 20 μl	PM 5 μl	2+ 20 μl	2- 20 μl	PM 5 μl	3+ 20 μl	3- 20 μl	TE 5 μl

Gel 2 :

Puits 1	Puits 2	Puits 3	Puits 4	Puits 5	Puits 6	Puits 7	Puits 8	Puits 9	Puits 10
PM 5 μl	4+ 20 μl	4- 20 μl	PM 5 μl	5+ 20 μl	5- 20 μl	PM 5 μl	6+ 20 μl	6- 20 μl	TE 5 μl

PM : marqueurs de poids moléculaire

TE : tampon d'échantillon

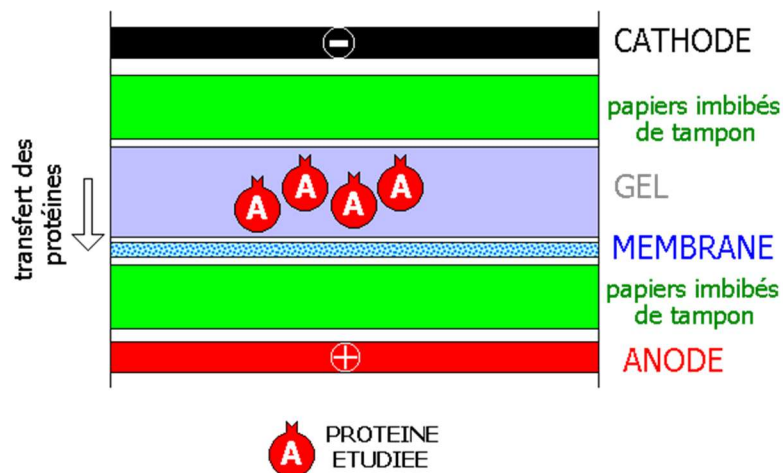
- Remplir la cuve externe avec du tampon d'électrophorèse.
- L'électrophorèse s'effectue à 15mA par gel (30 mA pour 2 gels dans ce cas), ampérage constant, jusqu'à ce que le front de migration atteigne le gel de séparation, puis 20mA par gel (40 mA pour 2 gels dans ce cas), ampérage constant (vérifier que le front de migration atteigne le bas du gel puis arrêter la machine).
- A la fin de l'électrophorèse, éteindre la machine, sortir les deux gels (encore dans les plaques de verre).
- Préparer le matériel pour le transfert (**à faire sous la hotte !**):
 - Dans deux boîtes séparées, mettre un peu de tampon de transfert et y placer les gels (l'assistante vous montrera comment retirer les gels des plaques de verre).

- Dans une autre boîte, placer 4 papiers filtre et 4 éponges dans du tampon de transfert.
- Dans une boîte, mouiller deux membranes de PVDF dans du méthanol durant 1 min, puis remplacer le méthanol par du tampon de transfert

- Vous préparerez (avec l'assistante) deux sandwiches pour le transfert (car deux gels à transférer) comme suit.

- Dans un couvercle en plastique, mettre du tampon de transfert, puis mettre dans l'ordre les éléments suivants :

- Le côté noir d'une cassette dans le fond du couvercle
- Une éponge
- Un papier filtre
- Le gel
- Une membrane de PVDF. A l'aide d'une pipette de verre, bien faire glisser les bulles présentes éventuellement entre le gel et la membrane.
- Un papier filtre
- Une éponge
- Refermer ensuite la cassette et placer le côté noir contre le côté noir de la cuve (= cathode, négative). Le gel se trouve ainsi du côté de l'électrode négative, et les protéines migreront vers la membrane, qui se trouve vers l'électrode positive (anode).



Remarque : lors de la confection du sandwich il est intéressant de repérer l'orientation du gel par rapport à celui de la membrane, qui sera utilisée par la suite. Dans notre cas, nous utiliserons les marqueurs de poids moléculaire comme repère.

Remplir la cuve de tampon de transfert. Le transfert s'effectue durant une nuit à 4°C à 30V/90mA.

Les membranes seront récupérées par l'assistante et stockées dans du PBS à 4°C jusqu'à la séance de TP suivante.

3. Observation au microscope à épifluorescence

3.1. Utilisation du microscope

Pour rappel, les cellules (sur lamelles de verre) transfectées avec NPM1 ont été fixées par l'assistante au formaldéhyde, rincées au PBS, puis montées sur lames microscopiques avec un milieu de montage pour fluorescence. Ce milieu de montage contient du DAPI, qui se lie aux bases adénine et thymine de l'ADN (il permet donc une visualisation des noyaux des cellules). Ce dernier émet dans le bleu alors que la protéine cherry couplée à la nucléophosmine (codée par NPM1) émet dans le rouge.



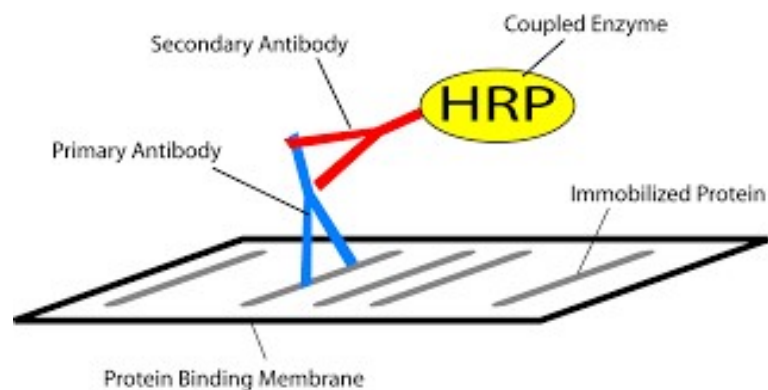
- Avant de placer la lame sur le plateau, vérifier que le plateau est assez bas et que c'est l'objectif 5x qui est utilisé.
- Mettre la vitre de protection, allumer les LED en appuyant de manière horizontale sur la roulette.
- Pour faire la mise au point, il est préférable d'observer d'abord dans le bleu, c'est-à-dire avec le filtre DAPI.
- Une fois la mise au point effectuée, tourner la molette de « sélection œil/caméra » vers le mur.
- Sur l'ordinateur, cliquer sur l'onglet « Live ». L'image apparaît à l'écran.
- Appuyer sur « mesure » afin de sélectionner un temps d'exposition optimal.
- Refaire la mise au point en regardant l'écran.
- Sélectionner l'objectif utilisé et appuyer sur « snap ».
- Mettre l'échelle et enregistrer l'image.
- Recommencer l'observation à l'aide du filtre « texas red » permettant d'observer les émissions dans le rouge.
- Utiliser l'objectif 20x pour prendre les photos.
- Il est possible de superposer des photos prises avec différents filtres (et donc de différentes couleurs), pour autant que vous preniez le même champ en photo :
 - Choisir une des photos à utiliser dans la superposition.
 - Dans l'onglet « Processing », sélectionner « Utilities » puis « Ajouter canaux ».
 - Dans Input 2, sélectionner l'autre image à fusionner.

- Une nouvelle image est créée. Cliquer sur « ON » pour fusionner les 2 images de base.

- Séance 4 (31 octobre 2016) -

1. Introduction

Lors de cette séance, la présence de la protéine c14orf166 sera recherchée par western blot dans les extraits cellulaires séparés par SDS-PAGE et transférés sur membrane de PVDF lors de la 3^{ème} séance de TP. Pour ce faire, un anticorps primaire (produit chez la souris) reconnaissant l'épitope flag (lui-même couplé à la protéine c14orf166) sera utilisé. Ce dernier sera révélé à l'aide d'anticorps secondaires anti-souris couplés à la peroxydase de raifort (HRP). La détection se fera par chimioluminescence après ajout de luminol. Lors de l'oxydation de ce dernier par la HRP, de la lumière est émise et détectée par une caméra spéciale.



2. Western blot

2.1. Matériel

- Micropipettes
- Cônes stériles
- PBS 10x préparé lors de la séance 1
- Tween
- Eau milliQ
- Boîtes en plastique
- Lait en poudre
- Tubes à centrifuger de 50 ml
- Microtubes de 2 ml
- Agitateur horizontal
- Morceaux de membranes de PVDF comprenant : PM, Extrait protéique +, et Extrait protéique – (dans des tubes falcons).

- Anticorps primaires
- Anticorps secondaires
- Pinces fines provenant de vos trouses à dissection

2.2. Protocole

- Par groupe, préparer 500 ml de tampon PBS 1x contenant 0,05% Tween (= PBS-T).
- Dans un tube à centrifuger, préparer 20 ml de PBS-T contenant 5% de lait en poudre.
- Préparer 2 ml d'anticorps primaires (anti-flag) dilués 1000 x dans le PBS-T-lait.
- Préalablement au TP, les membranes de PVDF ont été incubées plusieurs heures dans du PBS-T-Lait. Cette étape permet de bloquer les sites d'interactions non spécifiques entre les anticorps et la membrane et les protéines autres que les protéines d'intérêt.
- Votre morceau de membrane vous est fourni dans un tube à centrifuger.
- Retirer par inversion le PBS-T-lait en contact avec la membrane et remplacer par la solution d'anticorps primaires. Incuber durant 1h à température ambiante sous agitation.
- Rincer la membrane 5 x 5 min avec 10 ml de PBS-T (retirer le liquide par inversion dans l'évier).
- dans des microtubes de 2 ml, préparer 2 ml d'anticorps secondaires (anti-souris) dilués 1000 x dans le PBS-T-lait.
- Incuber la membrane dans la solution d'anticorps secondaires durant 1h à température ambiante sous agitation.
- Rincer 5 x 5 min avec 10 ml de PBS-T.
- Les membranes seront révélées et prises en photo par l'assistante.

- Ecriture du rapport : consignes -

- Un rapport par groupe.
- Un seul rapport pour les 4 séances.
- Ecrire le rapport sous forme d'un petit article scientifique :
 - Introduction avec quelques références (livres, articles scientifiques)
 - Matériel et Méthodes (inutile de retranscrire le matériel et méthode du syllabus de TP, s'inspirer de la façon de faire dans les articles scientifiques)
 - Résultats : description des résultats obtenus, **sans interprétation**.
 - Discussion, également avec quelques références pour appuyer vos observations et interprétations.
- Le rapport devra être rendu le **14 novembre 2016** au plus tard (dépôt sur Moodle).
- Les points du TP comptent pour 20% de la note finale du cours de Biologie cellulaire. Cette note inclut la cote du rapport mais également votre participation lors des séances de TP.