

LIGNÉES STABLES

But

- ☞ Augmenter la production d'une protéine
- ☞ Éviter la variabilité d'expression

A partir d'une transfection, on peut faire soit :

- Sélection d'un « pool » de cellules
 - Ensemble de cellules produisant à différents niveaux d'expressions, population hétérogène.
- FACS (*Fluorescence activated cell Sorting*) ou triage de cellules à l'aide d'anticorps qui sélectionnent un niveau de l'expression semblable (haut, moyen, bas niveau d'expression) population hétérogène.
- Clonage : population homogène originaire d'une seule cellule, permet d'avoir un maximum d'expression et une stabilité après plusieurs passages.

Facteur variant

Type cellulaire

Monocouche ou suspension, facilité de transfection, difficulté aux cellules à pousser de façon isolée. Plusieurs cellules poussent difficilement lorsqu'elles sont isolées. Il faudra choisir une méthode adéquate (cloning ring, sélection dans les plaques de 96 puits). Une bonne façon de contourner la solitude des cellules est de les nourrir avec un milieu conditionné.

Un facteur important aussi est de bien séparer les cellules lors du passage. Certains poussent en agrégats, séparez bien mécaniquement ou utilisez la trypsine qui convient le mieux.

Type de milieu

Dans certains cas, il est préférable d'utiliser un milieu plus riche, supplémenté : Sodium pyruvate, sérum FBS plutôt que le Calf..., nucléosides si alphaMEM. D'ajouter certains réactifs pour favoriser l'attachement des cellules.

Ex. : insuline 1×10^{-10} IU/ml, Dexaméthasone 2.5×10^{-5} M, 10 µg/ml, poly-D-Lysine 1 mg/ml, fibronectine 5 µg/ml, matrigel, laminine.

Choix de l'agent transfectant

CA₂PO₄, PEI, Lipofectine, lipofectamine, fugene

Lors qu'on effectue une transfection transitoire, l'efficacité de transfection est importante. Pour faire des lignées stables, l'efficacité est moins importante car finalement, seules les cellules transfectées survivront. Une trop bonne efficacité devient presque un problème car on a trop de colonies et il faut faire de très haute dilution. Les méthodes de CA₂PO₄ et de PEI deviennent un avantage, pourquoi pas économiser!

Choix de l'agent de sélection

G418 (généticin), puromycine

Si parfois pour effectuer une double transfection, il est conseillé de ne pas surcharger les cellules avec de trop forte dose de ces antibiotiques qui deviennent alors toxique. IL est préférable de réaliser une sélection à la fois. Lors de la deuxième sélection, soit enlever ou diminuer la concentration du premier agent sélectif.

Temps après la transfection où l'on choisi d'isoler les cellules

Certains étudiants font d'abord une transfection stable et à partir de ce pool, sélectionnent des clones. Ca me semble une mauvaise approche, car les cellules qui sont les plus intéressantes sont souvent celles qui poussent le moins vite. Lors de la transfection, les cellules expriment votre protéine différemment selon le site d'intégration du plasmide utilisé. Après quelques passages les clones les plus forts prennent le dessus. Pour éviter contourner ce problème, vous devez isolées les cellules au moment de mettre votre sélection. Sans mentionné que parfois, la protéine exprimé est toxique pour les cellules, on peut alors utiliser un système régulé : TET OFF ou TET ON.

Transfection et réalisation d'un pool

Jour 1 : Ensemencement des cellules soit environ 2millions de cellules par pétris 100mm

Jour 2 : Transfection

Jour 3 : Changement de milieu selon la technique utilisée

Jour 4 : Addition de l'agent sélectif (G-418 ou hygromycine)

Jour 4 ou 5 selon la confluence des cellules, passez les en divers dilution soit 1/4 : 1/8.

Attention de ne pas trop dilué vos cellules, car la sélection au geneticin va prendre une dizaine de jours avant d'atteindre le maximum de mortalité cellulaire. Il ne faudrait pas vous retrouver à la fin avec presque plus rien. Vaut mieux les passer plus souvent, plus concentré et ainsi favoriser la sélection.

Les cellules trop confluentes ont moins de surface de contact avec le G418 et dans certains cas, les 293 forment des montagnes (ilots de cellules qui montent en hauteur) et se protègent ainsi. Si ces montagnes apparaissent c'est que vous les avez trop laissé aller. Attention aussi à l'hygromycine car quand ca meurt, ca meurt en bloque. *Changez souvent de milieu, surtout entre le 12 et 18 jours.* Le milieu semble contaminé mais ce sont les débris cellulaires qui occupent votre vision.

C'est aussi à ce moment, au jour 4-5, que vous faites vos dilutions limites, en 96 puits ou pétris pour les clonings rings.

Geneticin (néomycine ou G418)

Stabilité : En poudre, gardez à température pièce, en solution à 4C et à long terme -20°C
Stable 8jours à 37°C.

Concentration : En liquide, la solution contient 50mg/ml actif, utilisé 1 :50
Concentration final entre 300-1000ug/ml

Dilution : le produit peut être dilué dans l'eau, mais je le prépare de la façon suivante :
Pour 100ml de solution stock , mettre 1g actif ou 10mg/ml

Exemple : disons si c'est écrit 619ug/mg actif
Milieu DMEM + 10mM Hepes + G418
ajustez le pH à 7.3, puis filtrez, aliquotez, -20°C

$$\text{Calcul : } x \text{ ml} = \frac{1 \text{g actif}(1000\text{mg}) \times 1\text{mg}}{0.619\text{mg}} = 1.6\text{g pour 100ml}$$

Pour maintenir les cellules mettre 1% = [100ug/ml] final
Pour sélection 4% = [400ug/ml] final
Selon les lignées cellulaires utilisées

Hygromycine

Stabilité : Peut être conservé à 4°C et à long terme à -20°C
Stable au moins un an à 4°C et un mois à 37°C
Rend les cellules sensible au pH, plus le pH est élevé, plus la sensibilité augmente. Dans un milieu a faible concentration de sel, on peut diminuer la quantité d'hygromycine.

Concentration : Pour les cellules de mammifère varient entre 50-1000ug/ml

Mortalité : De une semaine à 10 jours, selon les cellules

Puromycine

1-10ug/ml

Zéocine

Concentration varie 100-750ug/ml ou 50-1000ug/ml
Mortalité différent des autres agents sélectifs
Exemple : pour les 293 et COS-1 = 400ug/ml zéocin

Autres : HAT, methotrexate (MTX)

	genetin	hygromycine	puromycine	zéocine	Blastocin S
293	400	100	3	200-400	5-10
HeLa	700	200-550	1-3	150	1-3
CHO	400	250		250	5-10
COS				400	3-10
NIH3T3	750			400	5-10
Jurkat	600-700	1000		200	
MDCK	1000				
SF9				250	
S2(drosophile)		200-300		75	5
B16		50-100	1-3		
Fibroblaste primaire		75-100	2.5		

Isolation de cellules sélectionnées (à partir du pool)

Par FACS

L'appareil peut trier une cellule par puit.

Par dilution limite

En plaque de 96 puits, soit 0,5 cellules par puits. Les cellules poussent souvent mal lorsqu'elles sont isolés, vaut mieux alors utiliser un milieu conditionné.

Ce milieu est récolté sur des cellules de même type (mais non transfectée) avant leur pleine confluence, qu'on centrifuge, qu'on filtre sur 45u. Ce milieu peut être congelé et utilisé : 1 volume milieu conditionné pour 2 volumes de milieu frais.

Par cloning ring

Après avoir compté les cellules, on dépose 500 cellules dans un pétris de 150mm. Vous pouvez faire en parallèle, deux dilutions diverses soit : un pétris plus dilué à 100 cellules par 150mm et un autre à 1000 cellules par pétris.

Choisir le pétris ou les clones qui ont le mieux poussé, et où les clones sont quand même assez isolé. Une fois que les clones ont atteints une grosseur voulue, après 10 jours environ, identifiez ceux-ci avec un marqueur, sous le microscope à faible objectif.

Préparer à l'avance, les clonings rings que vous avez fait séché dans un grand pétris ouvert sous la hotte à l'aide d'une pince stérilisé à EtOh 70%.

Préparer aussi une plaque de 48 puits idéalement, avec du milieu complet.

Une fois que vous êtes prêts, enlevez le milieu des cellules, lavez doucement les cellules avec du PBS, puis sans trainer, déposez les clonings rings, sur les clones identifiés et déposez quelques gouttes de trypsin (+/- 15ul). Reprenez chaque clone avec une P200 et déposez dans des puits différents de la plaque de 48 puits.

Attendre quelques jours et observer les puits où ça pousse, transférer dans des plaques de 12 puits, selon le type cellulaire et la vitesse de croissance. Les clones sont fragiles, du moins au début, vaut mieux les passer plus serrés (concentrés) et plus souvent, que de trop les diluer et les perdre.

Selon votre type de détection, s'il s'agit de récolter le surnageant c'est simple.

Si vous devez récolter les cellules elles même, alors passer les cellules en duplicata.

Isolation des cellules pendant la sélection

Comme les meilleurs clones poussent moins rapidement, vaut mieux faire la sélection dès le début. Pour cela, on commence au moment de mettre la sélection dès le jour 4 ou 5. Faites attention au mode de transfection utilisé. Le CaPo4 est moins performant que d'autres techniques. Les protocoles ci-dessous sont écrits pour le CaPo4, alors si vous utilisez d'autres techniques, dilué d'avantage.

Dilution limite

En plaque de 96 puits. Bien séparer les cellules lors de la trypsinisation et ensemencez les plaques de 96 puits avec un multichannel et un réservoir conçus à cet effet. A partir du pétris de cellules transfectées, faite une plaque 1/500, 1/2000, 1/5000 à raison de 10ml par plaque. Chaque 4 jours, vous changez le milieu avec l'aspirateur (pompe) jusqu'à ce qu'il y ait de la pousse. La sélection va se faire dans les puits directement. Ainsi, les cellules ne seront pas isolées et au fur et à mesure que la sélection va se faire, seules les cellules transfectées vont survivre.

Choisir la plaque où vous avez moins de 50% des puits qui croient. Transférer au besoin.

Cloning rings

Procédez comme mentionné ci-haut. La différence est que vous divisez les cellules au jour 4 dans de gros pétris, 150mm, de divers dilution : 1/500 1/2000 1/5000. Attendre que la sélection soit terminée (gardez un contrôle en parallèle) et isolez les clones avec les clonings rings. Certains types cellulaires qui ont peu d'attachement comme les 293 peuvent aussi être collectés avec un papier buvard stérilisé (0.5mm²), que l'on trempe dans la trypsine et déposé directement sur les clones. Après quelques secondes, déposez le papier dans le puit, (d'une plaque de 48 puits) brassez et retirez les papiers.

En vrac

- Lorsque vous effectuez des dilutions, faites des séries de 1/10 : 1ml dans 9ml ainsi de suite. Jouer avec de gros volumes, c'est plus précis.
- Bien séparer les cellules lors de trypsination.
- Changez les milieux, peu au début, mais quand les cellules meurent, changez plus souvent pour bien nettoyer et se débarrasser des débris cellulaires.
- Assurez-vous au microscope que les clones sont bien isolés, évitez d'avoir 2 clones en un.
- Divisez les cellules avant qu'elles ne forment des ilots en hauteur.
- Faites un contrôle de l'agent sélectif avec vos cellules non transfectées en parallèle.

Annexe 1

antibiotique	gène	Mode d'action	concentration
Blasticin S Streptomyces griseochromogenes	Blasticidin deaminase de Bacillus cereus Bsr- BSD	Inhibe la synthèse des protéines en bloquant la traduction (Gould et al , 1989) Pro et eucaryotes	1-10 ug/ml
Geneticin (G418)	Néomycin phosphotransférase de Tn5 ou aph2	Bloque la synthèse des protéines en interférant sur l'élongation des protéines (Bar-Nun et al 1983)	50-1000 ug/ml
Hygromycin B Streptomyces hygroscopicus	Hygromycin phosphotransférase de E.Coli	Inhibe la synthèse des protéines en interrompant la translocation des ribosomes. (Cabanas et al. 1978)	10-500 ug/ml
Puromycine Streptomyces alboniger	Puromycine acetyltransferase de streptomyces	Bloque la synthèse des protéines en terminant prématurément la traduction (Niman et al. 1983)	1-10 ug/ml
Zeocin Streptomyces verticillus	Sh ble Streptaolloteichus hindustanus	Intercaler dans le DNA, il cause des clivages aux brins d'ADN. (Porath et al 1975)	10-1000 ug/ml

Annexe 11

Agents de Transfection

Compagnie	Produit	Composition
AMAXA	Hifect	Proprietary
ALTOGEN BioSystème	A549 Transfection Reagent HepG2; Ma-10; MCF-7;etc.....	Polymer-based
BD Bioscience- Clontech	CLONfectin	Cationic lipid
	CalPhos	Calcium phosphate
Biontex	Metafectene	Cationic lipid
	MetafectenePro	
	Dotap	Monocationic lipid
	Insectogene	Liposome
BioRad labs	Trans Pass DI	Cationic lipid
Boca Scientific (OZ Bioscience)	Verofect	Lipoplexe + Polyplexe
	CombiMag	Magnetic nanoparticule + Cationicmolecule
	Dreamfect	Cationic lipid + cationic polymers
	EcoTransfect	Lipid-based
	FlyFectin	Cationic + neutral lipid
	Lullaby	RNA complexe
Cell & Molecular Technologies (CMT)	Mammalian Cell Transfection Kit	CaPO ₄ (Specialty media)
	Transcient Expression Kit	DEAE-Dextran
CPG Inc	GeneLimo Plus	Polycationic lipids + lipid compound
	GeneLimo Super	Polycationic lipids + lipid compound
GE Healthcare	CellPfect Transfection kit	CaPO ₄ or DEAE-Dextran
Genlantis	GenePORTER	DOPE + Proprietary compounds
	GenePORTER 2	Proprietary material
	BoosterExpress Reagent kit	Proprietary material
	PGene Grip Vector/Transfection	GenePORTER + plasmid vector
	Perfectin	Cationic lipid
	GeneSilencer	Cationic lipid
	Neurofect	Polymer cationic
	Cytofect	Cationic lipid
	BaculoPorter	DOPANT
Glen Reasearch	Cytofectin GS	Cationic lipid

Invitrogen	293fectin	Cationic lipid
	Calcium Phosphate	Co précipité
	Cellfectin	Cationic lipid
	DMRIE-C	Liposomal
	Electroporation Cuvette	Electroporation
	FreeStyle MAX	Cationic lipid
	Lipofectamine 2000 and 2000 CD	Polycationic lipid
	Lipofectamine LTX	
	Lipofectamine RNAiMAX	Cationic lipid
	Lipofectamine	Cationic lipid
	Lipofectin	Cationic lipid (DOTMA;DOPE)
	Oligofectamine	Proprietary
	Optifect	LipofectAMINEPLUS+Lipofectin+Cellfectin+DMRIE
	PLUS	Polycationic lipid (DOSPA;DOPE)
INVIVOGEN	LipoVEC	Cationic phosphonolipids
	LipoGen	Non-liposomal lipid
MBI Fermentas	ExGen 500	Cationic polymer
	ExGen 500 in vivo delivery agent	Cationic polymer
Millipore	Si IMPORTER	Cationic lipid
MIRUS	Bio TransIT-293	Polyamine
	TransIT-siPak ans siPak Plus kit	Polyamine + Cationic lipid
	Bio TransIT-Keratinocyte	Polyamine
	BioTransIT-3T3	Polyamine
	Bio TransIT-Neural	Polyamine
	Bio TransIT-Oligo	
	Bio TransIT-COS	
	Bio TransIT in Vivo Gene	Polymer
	TransIT-QR Hydrodynamic delivery	
	TransIT-EE Hydrodynamic delivery	
Mediatech	SOC medium	
Merk Bioscience Novagen	GeneJuice	Proprietary polyamine
	RiboJuice TM siRNA	
	Bacvector-1000	
	ProteoJuice	Non covalent complexe
Panomics	Deliver X transfection siRNA	Virus-derived amphipathic peptides
	Deliver X Peptide	
Pan Vera Corporation	TransIT-TKO	Polyamine
	TransIT-LT-1 and LT-2	Polyamine
	Trans Express	Polyamine
	TransIT PanPack	Polyamine + Cationic lipid
	TransIT-Insecta	Cationic lipid
	TransIT-293	Polyamine
	TransIT-Keratinocyte	Polyamine
Pierce	Pro-Ject Protein Transfection kit	

PolyPLus Transfection	JetPEI	Polymer cationic
	In Vivo Jet-PEI	Complexe + nanoparticule
	JetPEI-Hepatocyte	PEI et derivé
	Interfer	
	Fecturin	
	Pulsin	Cationic amphiphile
Promega	TransFAST	Cationic lipid
	Tfx10-20-50	Cationic lipid
	Tfx Reagents Transfection Trio	Cationic lipid
	Transfectam	Lipopolyamine
	Profection Mammalian	DEAE-Dextran or CaPO ₄
Promokine	Promofectin	Non liposomal
	IBAfect	Lipofection
	MaTraProduct	Magnetic nanoparticule
Qbiogene	GeneSHUTTLE 20-40	Polycationic lipid
	In vivo GeneSHUTTLE	Liposome-mediated DOTAP; chol
	DuoFect Reagent System	Receptor-mediated endocytosis
	Calcium Phosphate Transfection kit	CaPO ₄
	Penetratin 1 peptide	Complexe RNA interference
	MegaFectin	Liposomal
	Penetratin	Peptide internalization
	InvivoMegafectin	DOTAP cholesterol lipid
Qiagen	TransMessenger	Proprietary lipid
	SuperFect	Activated dendrimer
	Effectene	Non liposomal lipid
	Transfection Reagent Selector Kit	Dendrimer+ nonliposomal lipid
	PolyFect	Activated dendrimer
	HiPerfect	
	RNAi Human/Mouse	Cationic + neutral lipid
Roche Applied Science	FuGENE 6	Nonliposomal proprietary lipid
	X-trengENE Ro-1539	Proprietary lipid
	X-trengENE Q2	Proprietary lipid
	DOSPAR	Polycationic lipid
	DOTAP	Cationic lipid
	FuGENE HD	Nonliposomal
	X-trengENE siRNA	
Sigma Aldrich Corporation	DOTAP	
	DEAE-Dextran	DEAE-Dextran
	Calcium Phosphate	CaPO ₄
	Escort -11-I11-V	Cationic lipid
	In vivo Liposome	Cationic lipid

Stratagene	LipoTaxi	Cationic lipid
	Mammalian Transfection Kit	CaPO ₄
	MBS Mammalian	Modified CaPO ₄
	Primary Enhancer Reagent	Lipid + CaPO ₄
	GeneJammer	Proprietary
	Satisfaction	Cationic polymer
	GeneEraser siRNA	
	Biotrek	
Takara	RetroNectin Fibronectin	Chimeric peptide
Tageting System	Targefect 293	Lipofectamine 2000 + FuGENE 6
Thermo Science	Hybaid OptiBuffer Kit	Electroporation
Wako USA	Genetransfer	Cationic liposomes