

Transformation d'organismes supérieurs

Par Ben Rabah Myriam, étudiante de l'institut Villebon Georges Charpak



sommaire

I/ Technique de transformation

A- Transfert direct

B- Transfert indirect

C- Avantage et inconvénient

II/ Transfection de cellules

A- Technique: phosphate de Calcium, DEAE- dextran, électroporation, liposomes

B- Efficacité de transformation

C- Avantage et inconvénient

III/ Transfection transitoire et stable

A- Transfection transitoire

B- Transfection stable

C- Transfection Transitoire Vs Stable



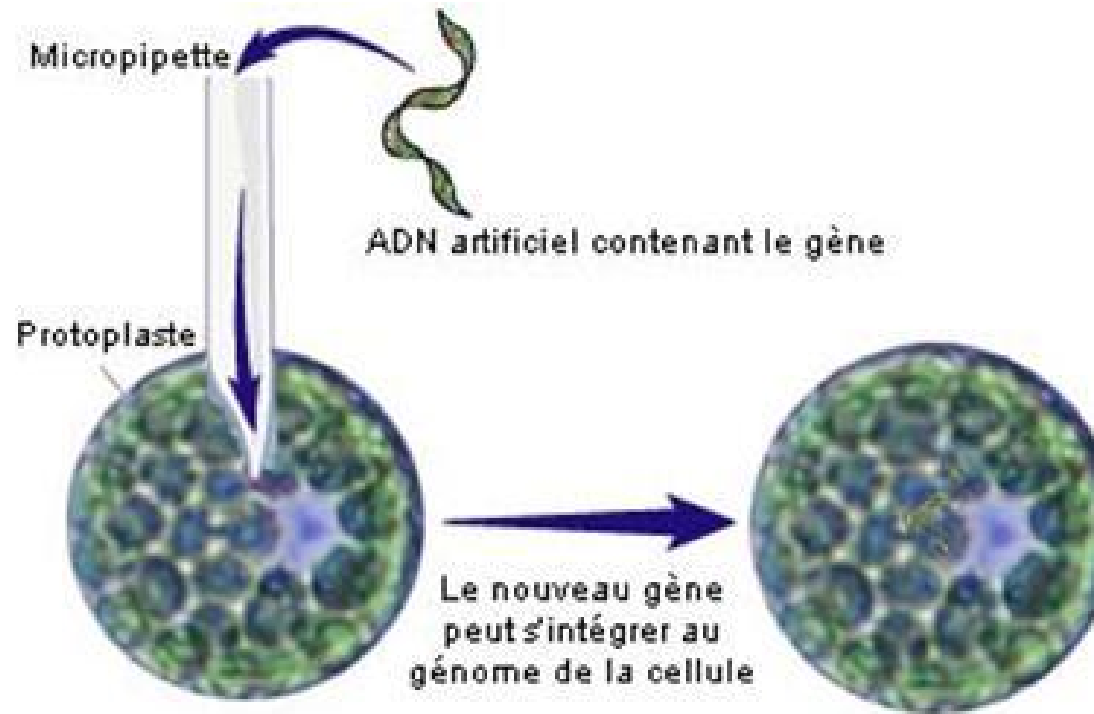
I/ Technique de Transformation

A- Technique de transfert direct

- La transformation directe consiste en l'introduction dans l'ADN d'un gène véhiculé le plus souvent par un plasmide classique, à l'aide de techniques physico-chimiques.
- pas toujours nécessaire d'avoir un plasmide, on peut faire rentrer l'ADN directement.
- Seule la construction est importante, c'est-à-dire, le gène avec son promoteur et terminateur.
- Je prendrais comme principal exemple les cellules végétales.

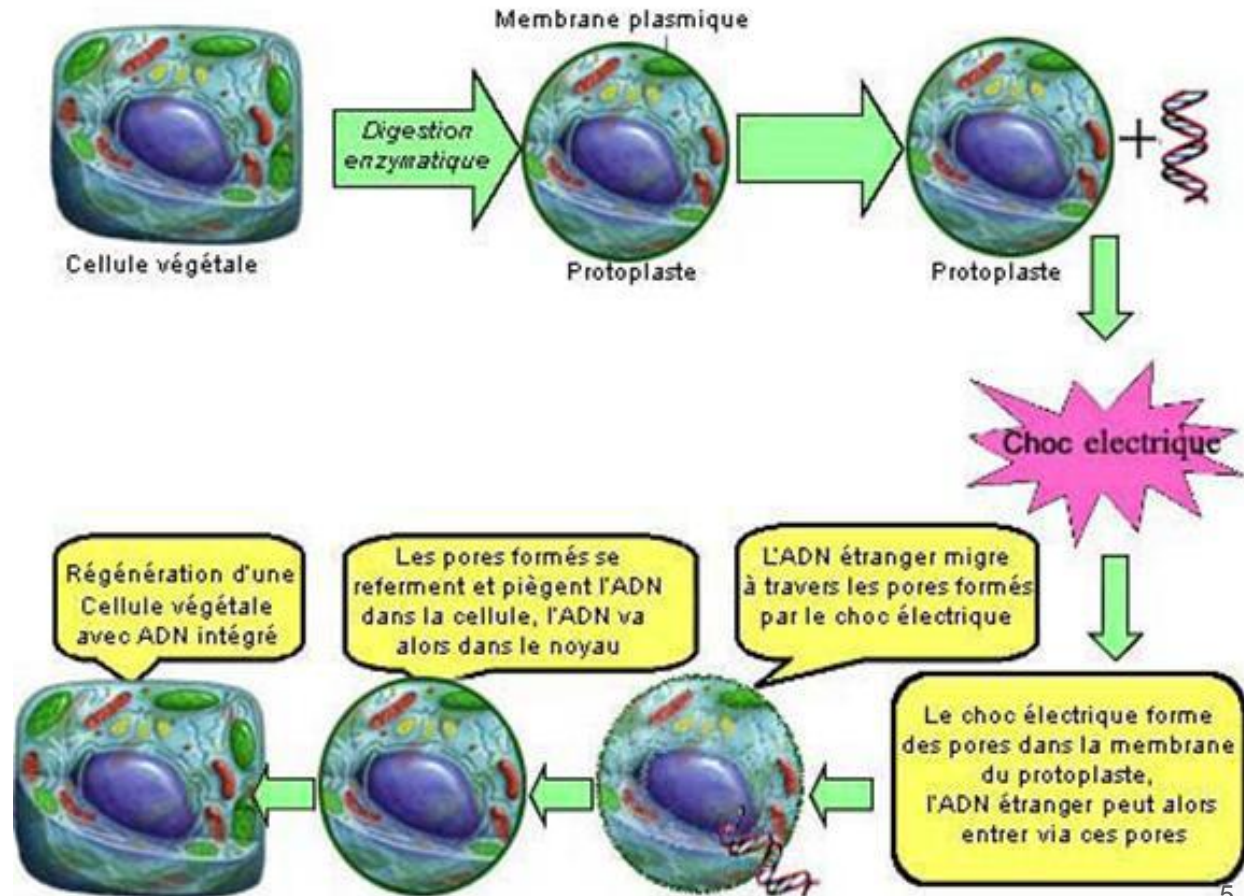
a/ Micro-injection

- Réaliser sur des protoplastes
- Introduction d'un gène étranger dans la cellule à modifier, à l'aide d'un micromanipulateur monté avec un microscope.
- On maintient le protoplaste à transformer avec une micro-aiguille et on introduit le gène accompagné de son complexe promoteur-terminateur dans le noyau, à l'aide d'une micro-pipette.



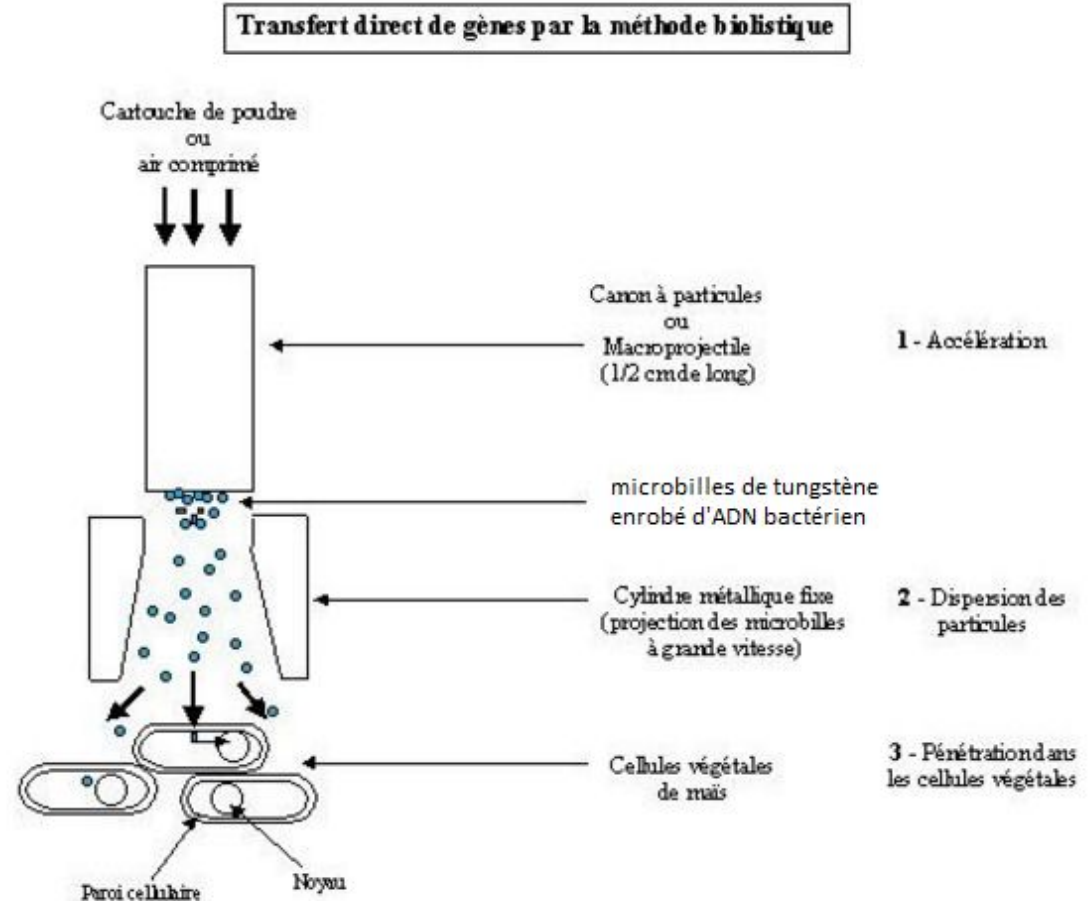
b/ Electroporation

Les chocs électriques déstabilisent la membrane plasmique du protoplaste permettant la formation d'ouvertures dans la membrane qui vont faciliter le passage de l'ADN étranger vers le noyau



c/ La biolistique

- utilise des microbilles projetées sur les cellules à transformer afin de traverser leur paroi.
- les billes seront freinées en traversant les différentes couches cellulaires.



B- Transfert indirect

Les micro-organismes sont capables de modifier à leur profit le métabolisme des cellules de certaines espèces végétales en faisant produire, aux cellules qu'ils infectent, des molécules nutritives nécessaires à leur croissance.

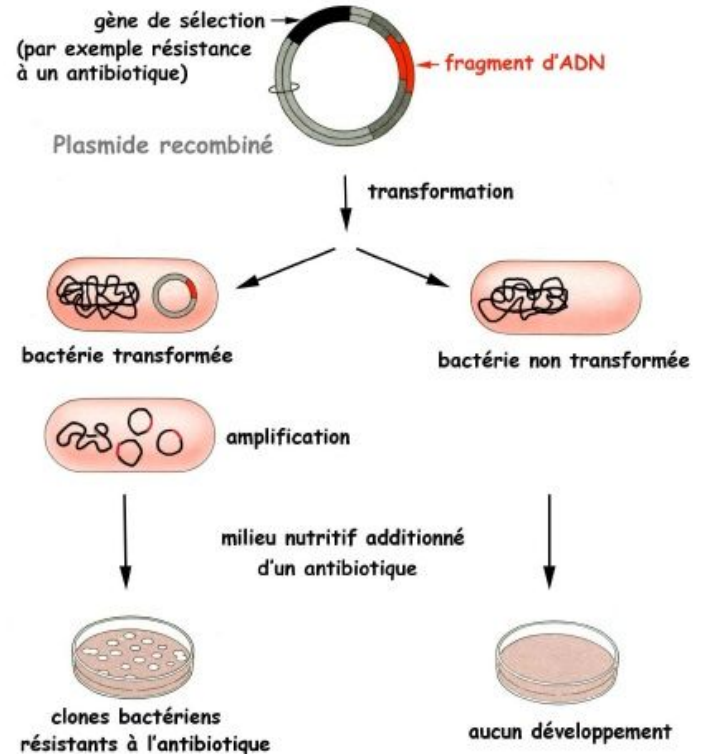
Ce dérèglement est dû à une véritable opération de génie génétique dont les responsables sont les plasmides de ces micro-organismes.

Suite à l'infection bactérienne, le génome de la plante a intégré un fragment de ces plasmides qui a conduit au dérèglement métabolique : le T-DNA.

Les chercheurs se sont servis de ce T-DNA et de l'ensemble du mécanisme pour intégrer les gènes d'intérêt aux génomes de certaines plantes.

a/ Transfection biologique

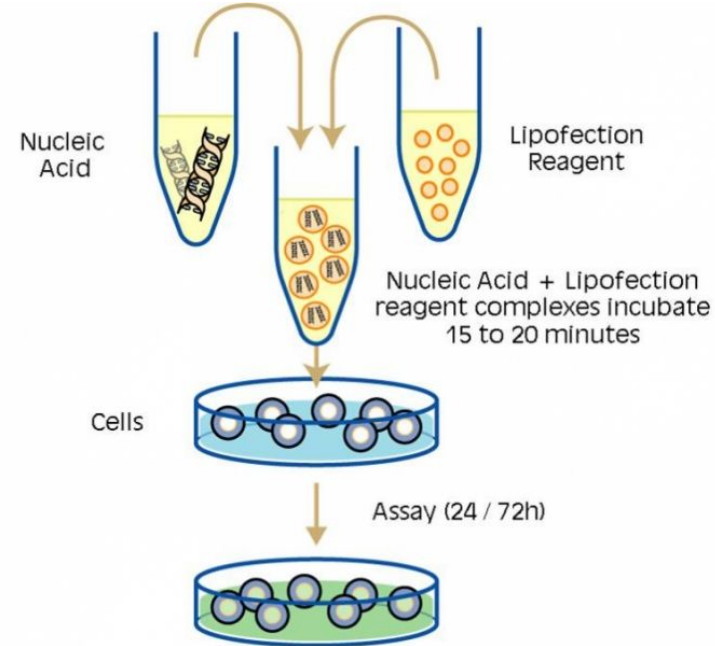
1. Introduction d'un gène d'intérêt dans un plasmide
→ avec ligase
2. Culture de colonies des bactéries
→ obtenir beaucoup de plasmide
3. Les bactéries modifiées
→ le gène d'intérêt + gène de résistance à un antibiotique
4. Mises en culture dans un milieu qui contient un antibiotique particulier
→ sélection




5. plasmide transformé des bactéries → aux plantes → *Agrobacterium tumefaciens* → introduire des fragments précis de son A.D.N. dans le génome des plantes.
6. Ce transfert de plasmide d'*E.coli* à *Agrobacterium* → choc thermique ou par conjugaison.
7. Incubation → *A. tumefaciens* dans un milieu de culture avec un fragment de tissu végétal de la plante à modifier
8. La partie du plasmide contenant le gène d'intérêt ADN-T est transférée dans le noyau de la cellule végétale qui l'intègre alors dans son génome.
9. Couplé au gène d'intérêt, un gène dit " de sélection" qui apportera une caractéristique particulière à la cellule transformée afin de ne permettre la multiplication qu'à partir d'une cellule transformée

b/ La lipotransfection

1. Introduction d'un gène d'intérêt dans un liposome
→ fusionner avec la membrane plasmique des protoplastes
→ libération du gène d'intérêt dans le cytoplasme des cellules végétales
2. Mais peu de ces gènes parviendront jusqu'au noyau et s'intégreront au génome de la cellule
3. 2 temps :
→ des complexes sont formés entre les acides nucléiques et les lipides cationiques
→ ils sont internalisés dans la cellule.



C- Avantage et inconvénient

	Avantage	inconvénient
La transfection biologique	- Méthode naturelle	- Cette méthode plus « naturelle » ne fonctionne que chez certaines espèces (principalement des dicotylédones, hôtes <u>d'<i>Agrobacterium tumefaciens</i></u>)
La <u>lipotransfection</u> 		- Une minorité des gènes vont parvenir jusqu'au noyau et s'intégrer au génome de la cellule - Méthode peu utilisée

	Avantage	Inconvénient
La micro-injection	<ul style="list-style-type: none"> - " proof of concept " en recherche 	<ul style="list-style-type: none"> - Cette méthode ne s'applique que dans des cas particuliers car elle est complexe et lourde à utiliser - Demande un équipement adapté
Electroporation	<ul style="list-style-type: none"> - Utilisation sur tous les types de cellules - Efficacité proche de 90% des cellules intègrent l'ADN recombinant dans leur cytoplasme 	<ul style="list-style-type: none"> - Importante mortalité cellulaire - Mise au point laborieuse - Pour les cellules végétales, implique de passer par la préparation de protoplastes
La biolistique	<ul style="list-style-type: none"> - Cette méthode permet de façon simple et rapide d'injecter de l'ADN dans une grande quantité de cellules sans passer par une phase protoplasmique. - Cette injection peut être réalisée sur un tissu non désolidarisé de l'organe d'origine. 	<ul style="list-style-type: none"> - Très mal maîtrisée chez certaines espèces

II/ Transfection de cellules

Processus de transfert de gènes → introduction d'ADN exogène dans des cellules eucaryotes (en général un plasmide)

Pas de virus comme vecteur, par opposition à la transduction

Les plasmides utilisés sont des vecteurs d'expression eucaryote, codant des protéines s'exprimant dans une cellule eucaryote

A- Technique

a/ Technique au phosphate de calcium

Fragilisation des membranes cellulaires ce qui permet à l'ADN de traverser et de rentrer dans la cellule.

L'ADN étranger se trouve en solution avec du phosphate de calcium.

→ ADN va alors co-précipiter avec les cristaux tricalciques → protégé des nucléases.

Précipitation → augmenter le contact avec les cellules cibles

Ce contact entre la cellule et le co-précipité va induire une endocytose → introduction de l'ADN étranger dans la cellule cible.

b/ Technique au DEAE - dextran (diéthylaminoéthyl)

Ce gel → charges positives permettant de fixer l'ADN (chargé négativement).

Introduction des cellules dans cette colonne et on provoque un choc thermique.

→ Des pores apparaissent dans la membrane plasmique de ces cellules → introduction de l'ADN.

Beaucoup de cellules sont réfractaires à ce système → pas propice

c/ technique électroporation

Vue précédemment

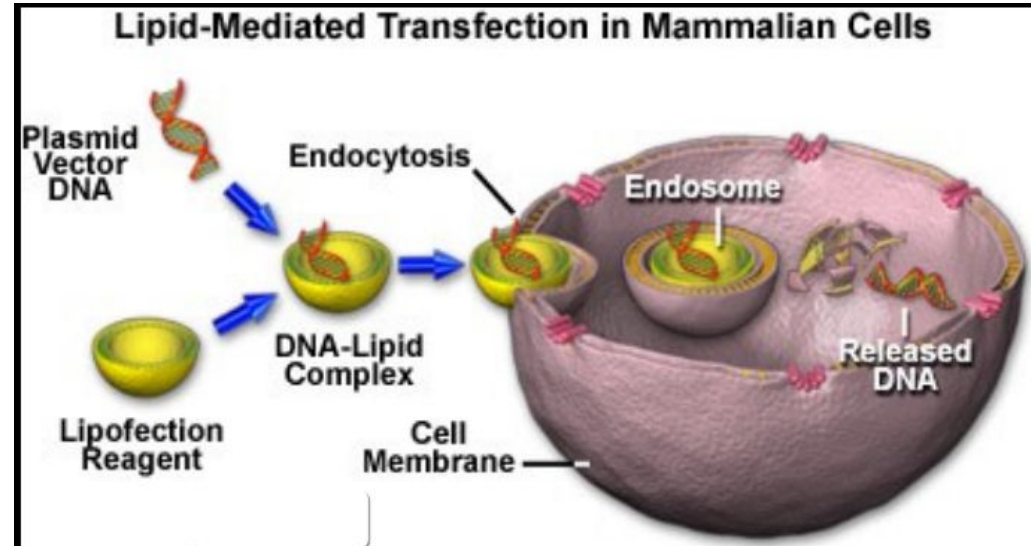
d/ Technique utilisant des liposomes

Les liposomes → des vésicules artificielles formées par des bicouches phospholipidiques.

Association liposome + ADN

→interaction électrostatique entre les groupes phosphates de l'ADN chargés négativement et les têtes polaires des lipides cationiques chargés positivement.

On obtient un vecteur qui au contact des cellules, pénètre dans celles-ci. La pénétration intracellulaire reste pour le moment mal connue.



Dans le cytoplasme de la cellule, le liposome se dissocie, libérant l'ADN.

B- Efficacité de la transformation

- Taille
- Qualité pénétration du plasmide transfecté
- Nature plasmide
- Type cellulaire utilisé
- Technique utilisée
- Savoir faire du manipulateur

C- Avantage et inconvénient

Technique	Avantage	Inconvénient
Phosphate de Calcium	<ul style="list-style-type: none">- Technique simple à réaliser- Rendement est bon	<ul style="list-style-type: none">- Acidifie le milieu de culture- Toxique à plus ou moins long terme- Peu efficace
DEAE-dextran (diéthylaminoéthyl)	<ul style="list-style-type: none">- Efficacité de la transfection élevée- obtention jusqu'à 25% de cellules transfectées	<ul style="list-style-type: none">- Peut être toxique pour les cellules
Les liposomes	<ul style="list-style-type: none">- Augmentation de la stabilité du principe actif- Réduction de la toxicité de l'agent encapsulé- Augmentation de l'efficacité	<ul style="list-style-type: none">- Le rendement faible de la pénétration intracellulaire et dans le noyau- Nature de l'agent à encapsulé- Taille des particules (RES) et charge de surface

III/ Transfection Transitoire et stable

a/ Transfection transitoire

Le plasmide transfecté reste présent transitoirement dans les cellules, à chaque division cellulaire, les cellules filles perdent le plasmide et donc le niveau d'expression diminue progressivement.

b/ Transfection stable

- Le plasmide transfecté reste présent continuellement dans les cellules transfectées.
- Transmis fidèlement à la descendance et en général s'intègre dans le génome → les cellules génétiquement modifiées.
- Le niveau d'expression à partir du plasmide est constant dans le temps.

c/ Transfection transitoire Vs stable

Transfection transitoire	Transfection stable
Analyse de la transfection à 24-72h	Transfection à long terme
Perte de l'ADN en quelques jours/ semaines	Criblage par résistance à un antibiotique
	L'ADN reste dans la cellule ou peut s'intégrer au génome
	Isolation des clones cellulaires par dilutions limites