

Classeur de technique de base en Biologie

Transformation d'organisme supérieur et étude fonctionnelle d'un gène ou d'une protéine

Transfection de cellules

Principe

Introduire du matériel génétique exogène dans des cellules eucaryotes sans utiliser de virus. Cette technique s'oppose à la transduction

Les méthodes :

Nom	Techniques	Dans quel organisme
Transfection par phosphate de calcium ou chlorure de calcium	Une solution saline contenant des ions phosphates combinée avec une solution de chlorure de calcium avec l'ADN à transférer. Les cellules mis en contact avec ces solutions qui contiennent l'ADN à transférer.	Chez les bactéries
Utilisation des liposomes	Les liposomes possèdent des propriétés structurales similaires aux membranes. Ainsi, en réalisant une inclusion de l'ADN dans les liposomes, ces derniers fusionneront avec les membranes en libérant l'ADN.	Pour les Cellules animales
Utilisation dendrimères	Utilisation de dendrimères permet de lier l'ADN et de le transporter dans la cellule. Le polycation se fixe aux phosphates négatifs de l'ADN. Le complexe formé est alors positif et va pouvoir se fixer aux polysaccharides de la membrane plasmique. Le complexe est ensuite endocyté et adressé à l'endosome. Les hydrolases acides du lysosome qui peuvent dégrader l'ADN sont dégradées par le polyéthylèneimine. Puis par un mécanisme encore peu compris, l'ADN est transloqué dans le noyau où il sera exprimé.	Cellules animales

Nom	Techniques	Dans quel organisme
Gene gun	L'ADN est couplé à une nanoparticule d'un solide inerte et est ensuite "tiré "directement dans le noyau des cellules cibles.	Pour tout type de tissus
L'électroporation	Les cellules sont soumises à un champs électrique. Les impulsion électriques produisent un potentiel transmembranaire provoquant une rupture réversible de la membrane cellulaire. Des pores se forment et permettent au plasmide de pénétrer dans la cellule	Utiliser pour les cellules animales, les protoplastes de cellules végétales et les bactéries
La transgénèse	Un organisme donneur possède un gène d'intérêt qu'on va récupérer grâce à des enzymes de restrictions. On adapte le gène en lui ajoutant un promoteur et un gène d'intérêt. On le multiplie et on l'insère dans un organisme par plusieurs méthodes. Les deux plus utiliser : canon à particules et agrobacterium tumefaciens.	Tous types de cellules

Sources:

<https://fr.wikipedia.org/wiki/Transfection>

<http://www.technobio.fr/article-29137025.html>

<http://www.gnis-pedagogie.org/biotechnologie-amelioration-transgenese-etape.html>

<https://fr.wikipedia.org/wiki/Transg%C3%A9n%C3%A8se>

Transformation transitoire / stable

Suite à une insertion d'ADN dans une cellule, la transformation peut être transitoire ou stable. Si elle est transitoire, cela signifie que l'ADN n'a pas été inséré de manière stable dans le génome cellulaire et il sera normalement perdu lors de la mitose. La transformation transitoire permet d'étudier les AN ou les protéines traduites à partir de ces ARN et aussi d'étudier le taux d'expression d'un gène. Si la transformation est stable cela signifie que le gène qui est inséré dans le génome de l'hôte, demeure après la mitose dans les cellules et filles.

Sources:

<https://fr.wikipedia.org/wiki/Transfection>

<http://www.technobio.fr/article-29137025.html>

Gènes rapporteurs

Un gène rapporteur est un gène qui va pouvoir être observé facilement dû à une caractéristique propre (fluorescence, activité enzymatique détectable...). Ils vont être utiles par exemple, pour mesurer l'expression d'un gène d'intérêt ou sa localisation.

Les gènes rapporteurs doivent être étrangers au génome de l'organisme modifié pour que leur produit n'intervienne pas dans le métabolisme. Il faut que leur produit permet une visualisation rapide et précise pour pouvoir identifier le tissu dans lequel ce gène a été exprimé et qu'il soit potentiellement quantifiable si on souhaite par exemple, mesurer l'activité du promoteur induisant la modification.

Il y a deux types de gènes rapporteurs:

- Ceux codant des protéines qui provoquent la bioluminescence.
 - Par exemple, la protéine fluorescente vert GFP à la propriété d'émettre une fluorescence de couleur verte et est donc facilement repérable. Il n'existe pas que la GFP mais aussi d'autre protéine comme la RFP (rouge) ou YFP (jaune).
 - Il y a aussi la luciférase qui peut être utilisé comme un gène rapporteur. Cette enzyme oxyde son substrat, la luciférine, et lors de cette réaction un photon est relâché dont la lumière résultante est jaune-verte.

- Ceux codant pour des protéines dont l'activité enzymatique provoque l'apparition d'un produit coloré facilement quantifiable. Le clivage des substrats du gène rapporteur GUS, X-gluc, va produire un précipité bleu et insoluble que l'on pourra visualiser à l'œil, à la loupe ou encore au microscope. Un autre exemple du même type est le gène lacZ qui code pour la β -galactosidase qui métabolise le X-gal. Cette réaction fait apparaître une coloration bleue.

Sources:

http://scinti.edu.umontpellier.fr/files/2013/02/Imagerie-des-genes-rapporteurs_LOZZA.pdf

https://fr.wikipedia.org/wiki/G%C3%A8ne_rapporteur

RNAi / Surexpression

L'interférence ARN ou RNAi est une voie de régulation du taux d'ARN messagers traduits. S'ils ont une complémentarité parfaite avec la séquence de l'ARNm alors ils induisent une inhibition de la transcription ou le clivage de l'ARNm. S'ils ne l'ont pas, alors ils induisent un inhibiteur de la traduction de l'ARNm cible.

On peut grâce à cette méthode étudier la fonction d'une protéine. Pour étudier le fonctionnement d'une protéine, il existe 2 méthodes :

- L'inhibition
- La surexpression

En insérant de l'ARNi dans la cellule, les ARNm peuvent être inhiber. Ainsi, a protéine n'est pas exprimer et nous pouvons comparer l'organisme à un organisme sauvage et voir quelles sont les différences.

On peut également surexprimé la protéine en insérant un promoteur fort. Il y aura ainsi plus d'ARN et donc plus de protéine si la voie de dégradation n'est pas augmentée. On pourra comparer l'organisme avec la surexpression avec un organisme sauvage pour voir quelle (s) est/ sont la/ les fonction(s) de la protéine.

Sources: <http://biochimej.univ-angers.fr>