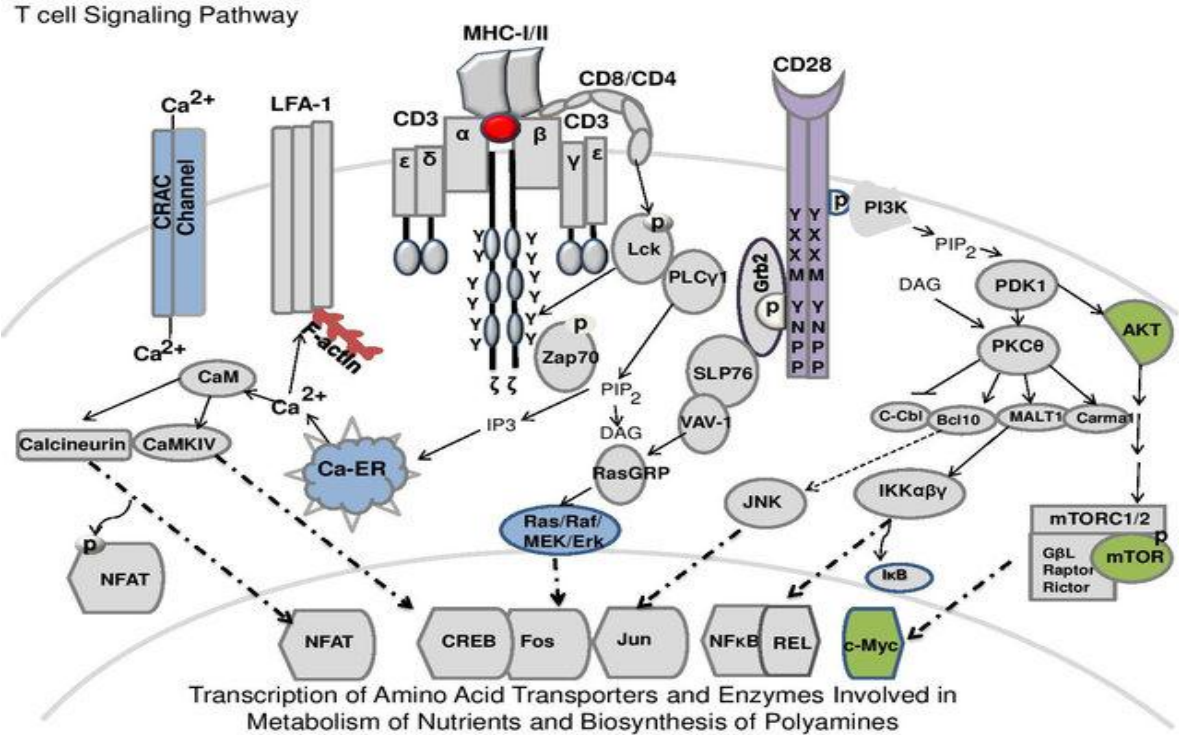



Module : CVSC (Communication et Voies de Signalisation Cellulaire)
Transfert des gènes



Introduction :

Le transfert de gènes consiste à transporter un ou plusieurs gènes dans une cellule hôte.

Le vecteur est le véhicule de transport qui permet le transfert d'une séquence d'ADN spécifique dans une cellule hôte.

ADN incapable de pénétrer passivement dans les cellules (nature chimique polyanionique et taille)  nécessité d'utiliser des vecteurs (physiques, chimiques ou biologiques) pour transférer l'ADN dans les cellules.

Vecteur idéal : permet une transfection efficace et sélective, une bonne expression du transgène, doit être facile à produire et pas toxique.

1. Transformation des bactéries :

- Mélange ADN et bactéries
- Stimulation de l'entrée de l'ADN par choc thermique ou choc électrique.

2. Transformation des cellules végétales :

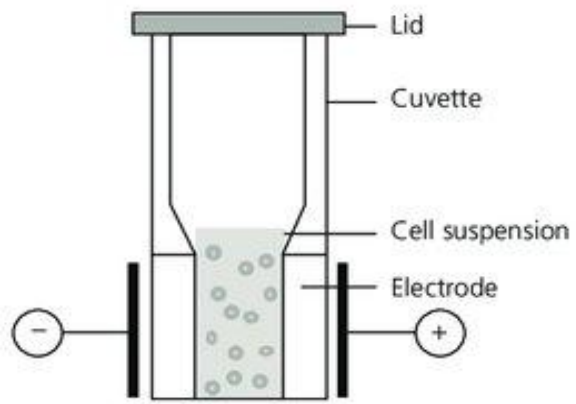
a. Utilisation de *Agrobacterium tumefaciens*

b. Autres méthodes :

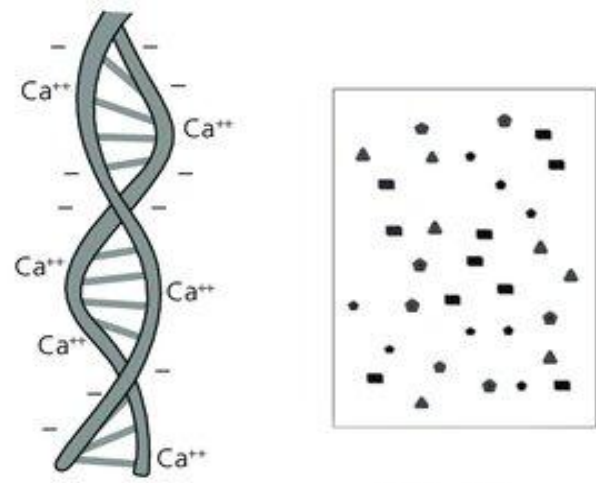
- Electroporation,
- Biolistique.

3. Transformation des cellules animales (transfection)

3.1. Méthodes non virales (physique ou chimique):

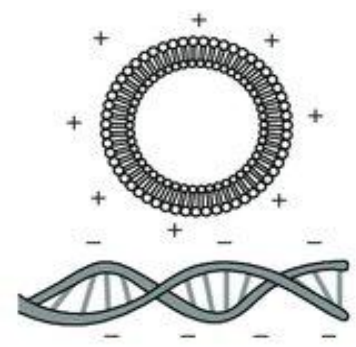


(a) Electroporation



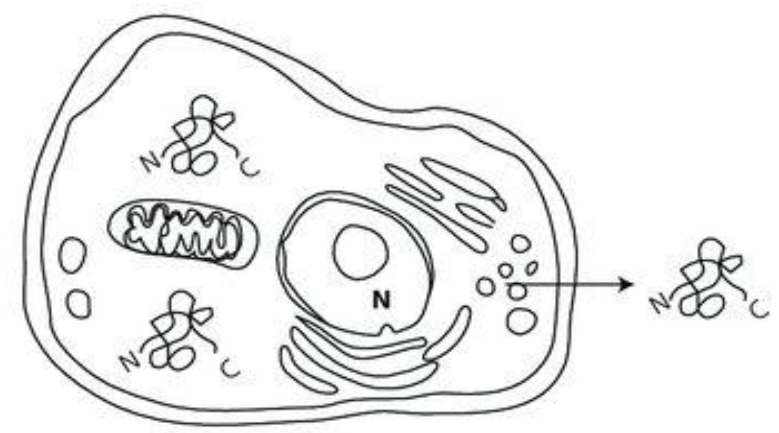
DNA - Calcium phosphate precipitate

(b) Calcium phosphate method



DNA

Cationic liposome

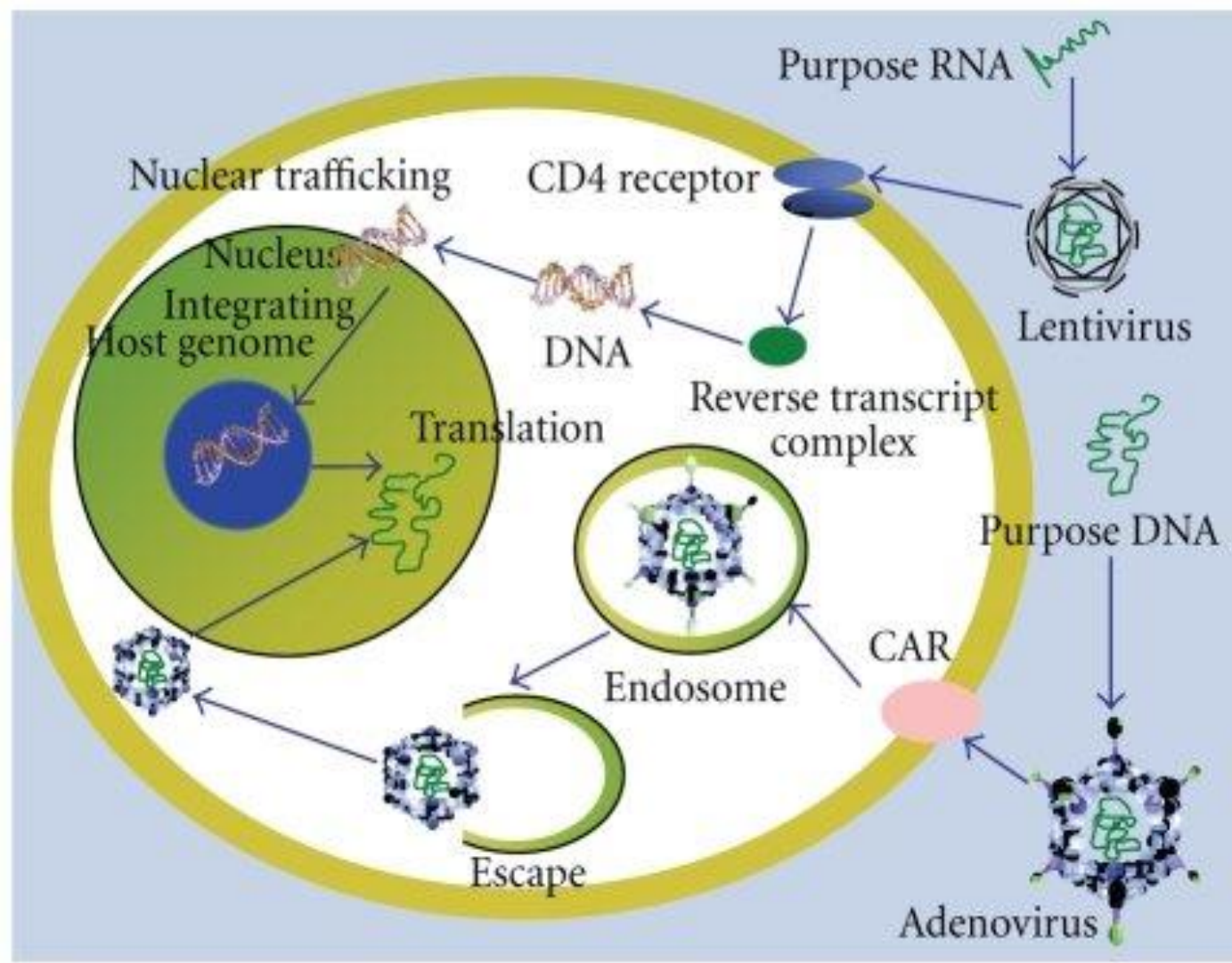


Mammalian cell

(c) Lipofection

3. Transformation des cellules animales (transfection)

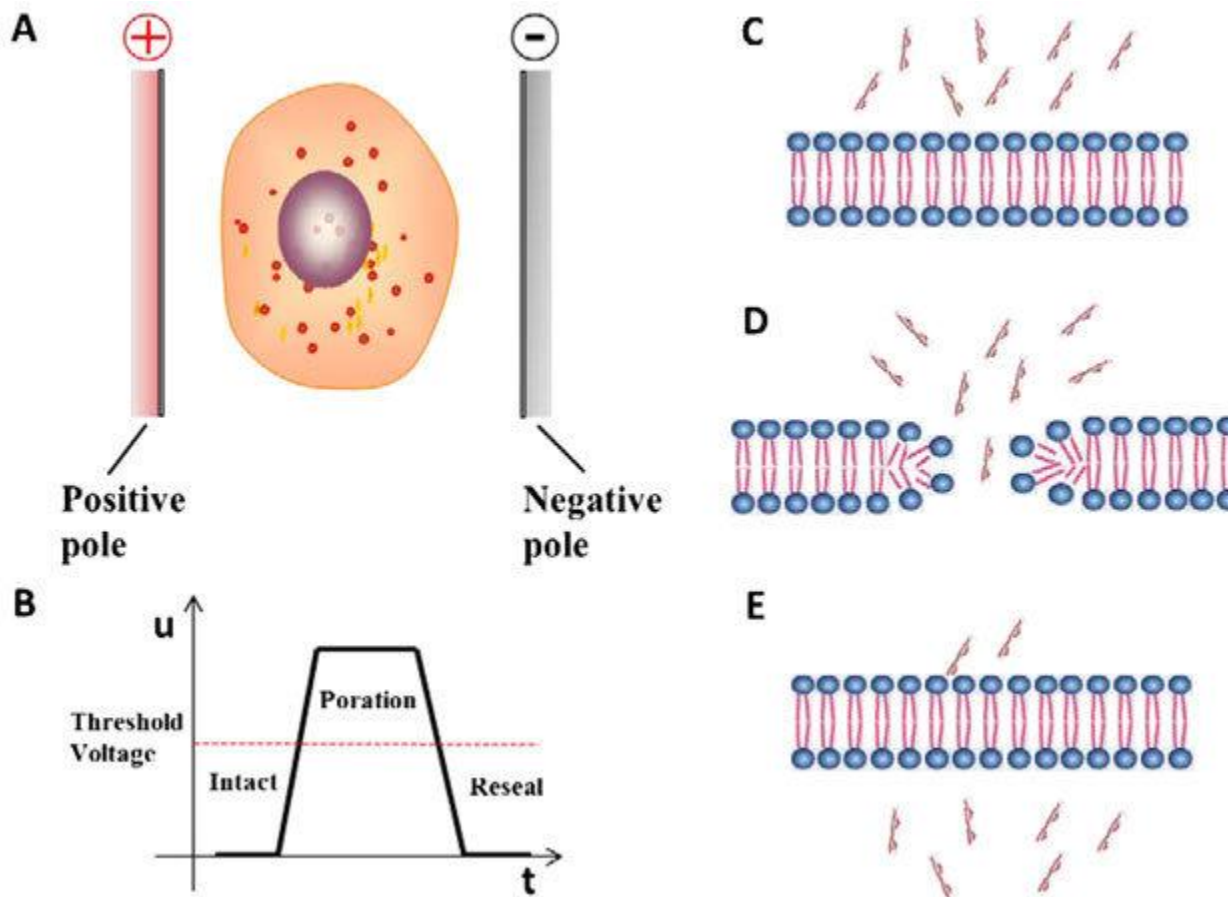
3.2. Méthodes virales :



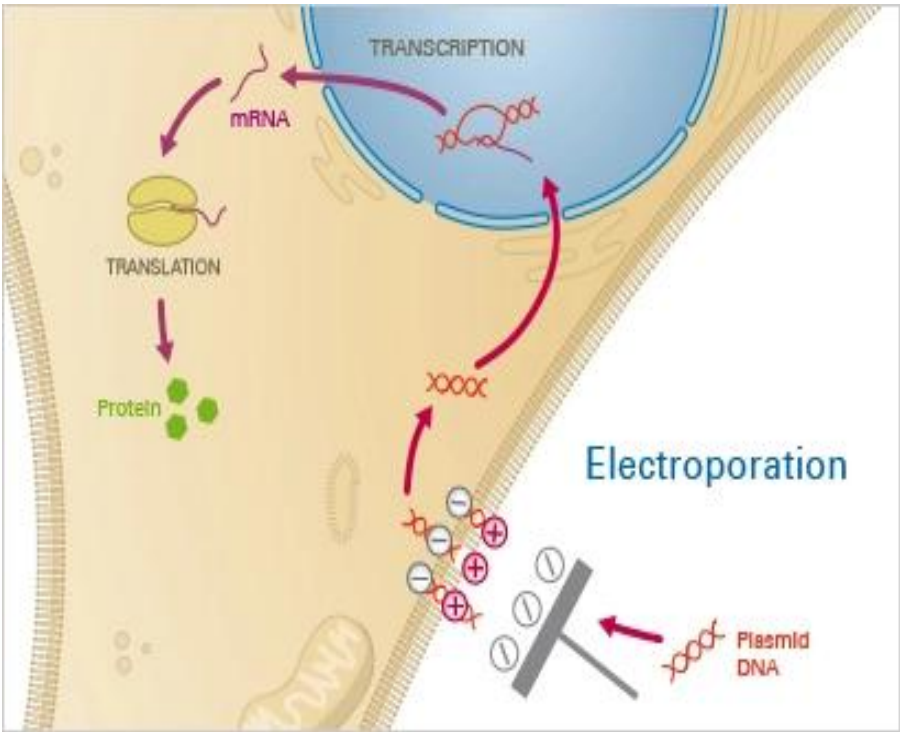
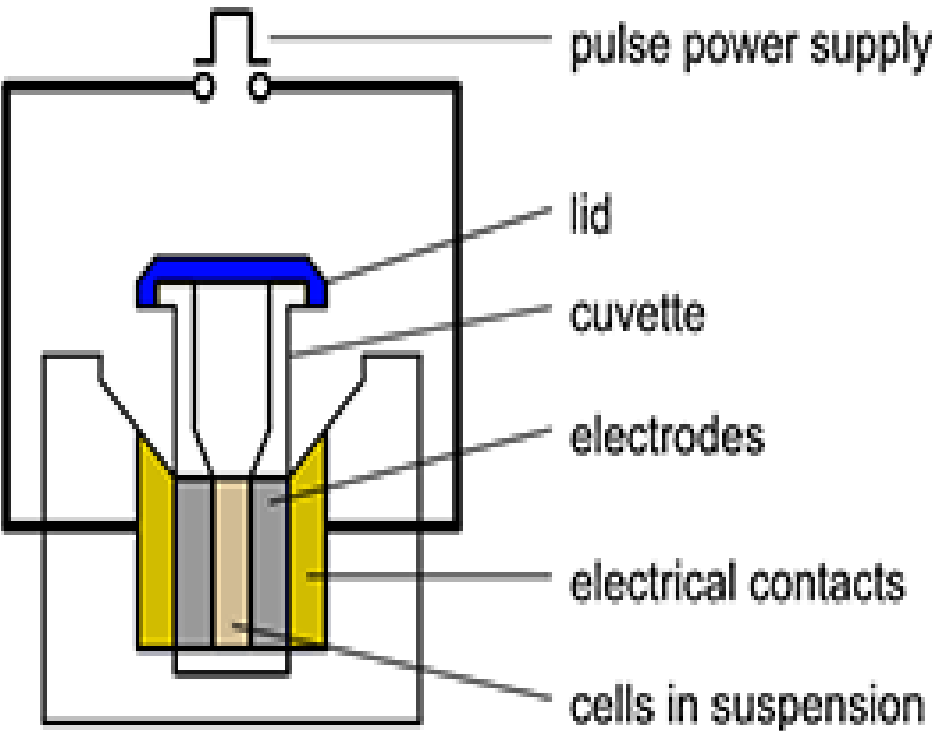
3.1. Méthodes non virales (physique ou chimique):

3.1.1. L'électroporation:

Champ électrique: Les impulsions électriques produisent un potentiel transmembranaire \rightarrow rupture réversible de la membrane cellulaire \rightarrow Formation de pores \rightarrow pénétration du plasmide dans la cellule.



3.1.1. L'électroporation:



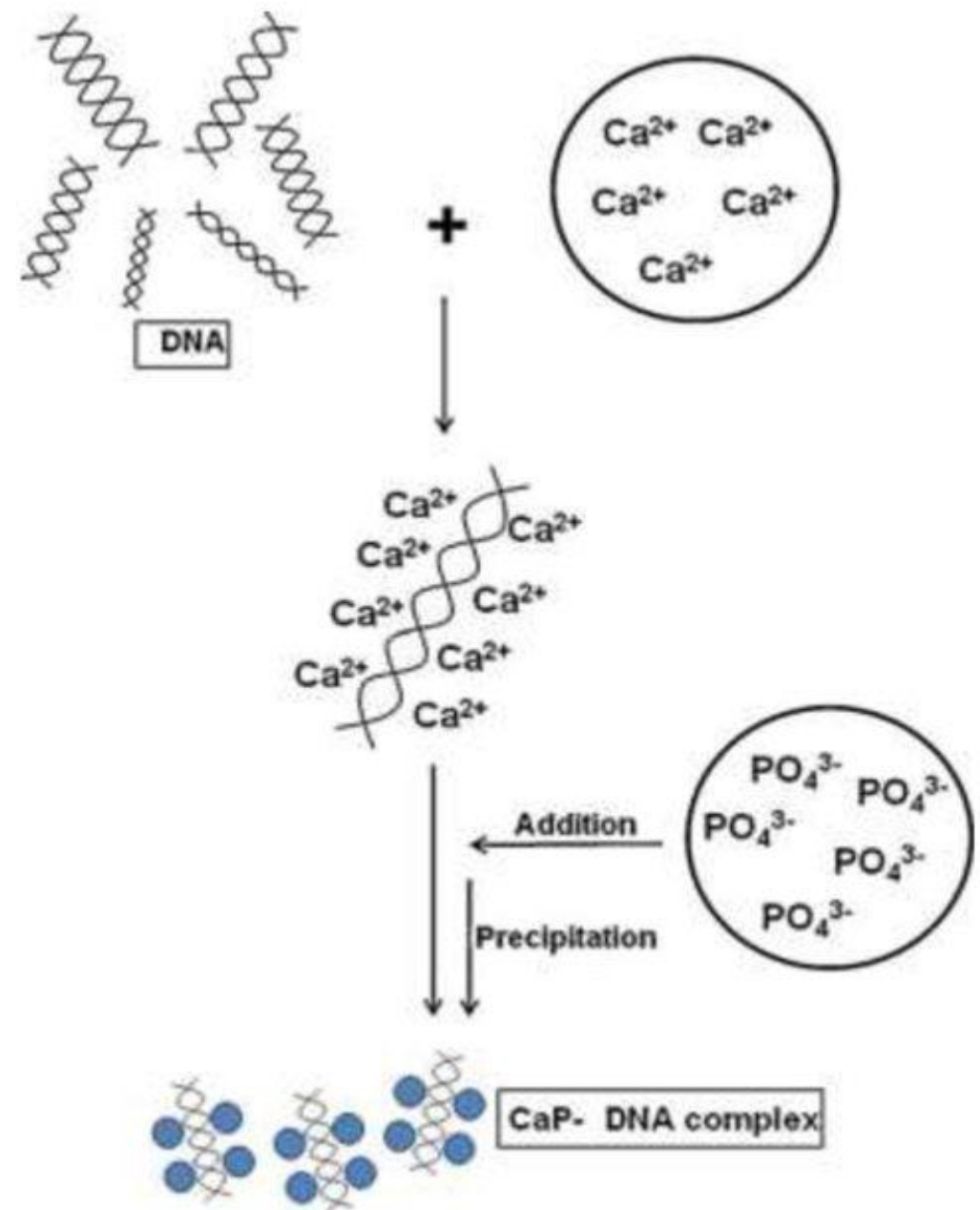
3.1.2. Utilisation du phosphate de calcium:

Mise en contact de l'ADN avec du chlorure de calcium dans un tampon phosphate → Formation d'un précipité entre le calcium et l'ADN → Précipité dans la cellule par endocytose.

Avantages : Technique relativement simple à réaliser, bon rendement.

Inconvénients : Acidification du milieu de culture, peut être toxique à long terme.

3.1.2. Utilisation du phosphate de calcium:



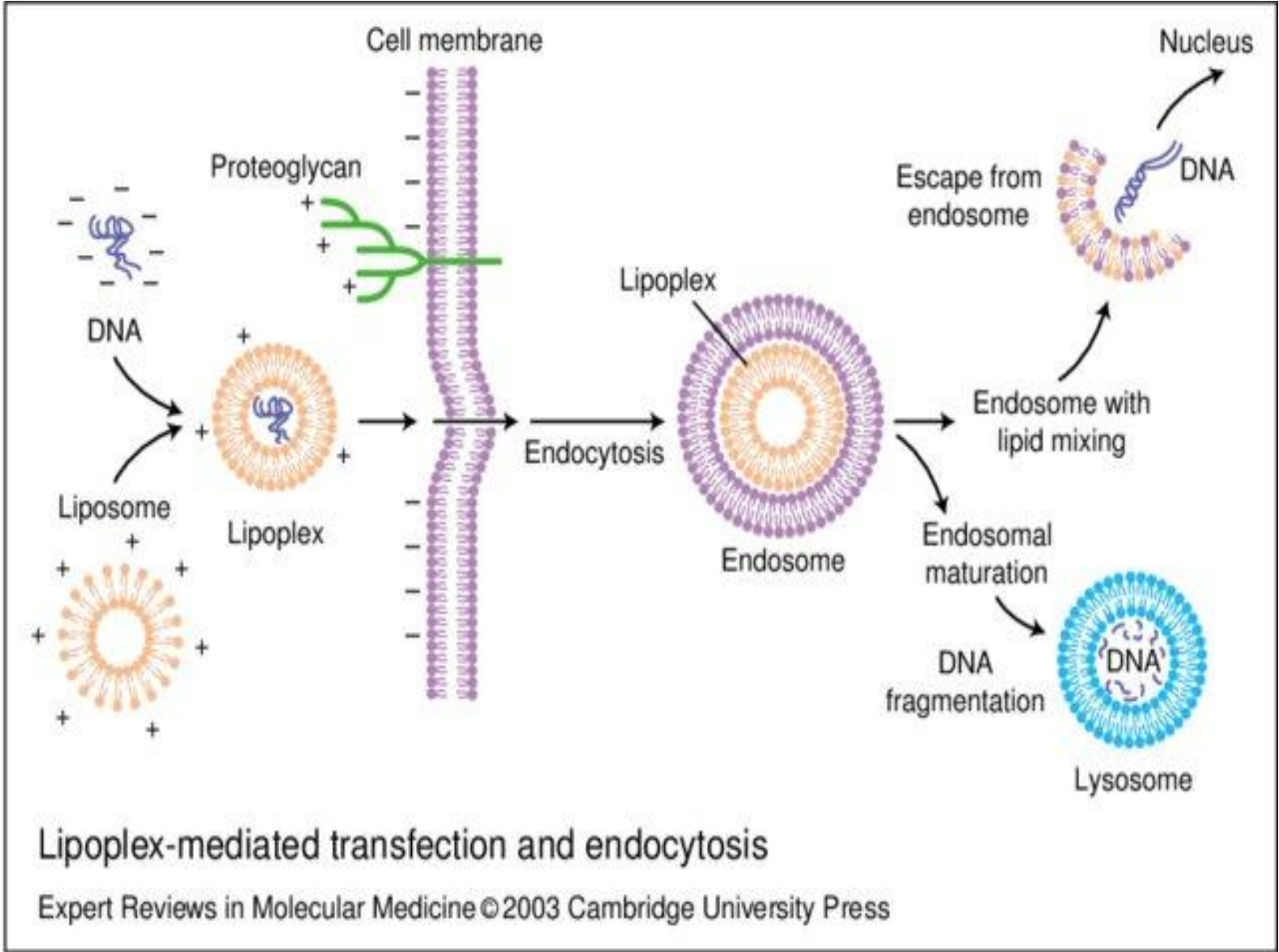
3.1.3. Les liposomes :

- Vésicules artificielles de quelques dizaines à quelques milliers de nm de diamètre formées par des bicouches phospholipidiques.
- L'association avec l'ADN se fait par interaction électrostatique entre les groupes phosphates de l'ADN chargés négativement et les têtes polaires des lipides cationiques chargés positivement.

Le mécanisme de pénétration intracellulaire le plus probable est l'endocytose. Dans le cytoplasme de la cellule, le liposome peut se dissocier, libérant l'ADN et entraîner l'expression génique. Alternativement, l'ADN pourrait être dégradé dans le lysosome.

Inconvénients : rendement faible de la pénétration intracellulaire et dans le noyau.

3.1.3. Les liposomes :



3.1.4. Biolistique

3.1.5. Microinjection

3.2. Les virus :

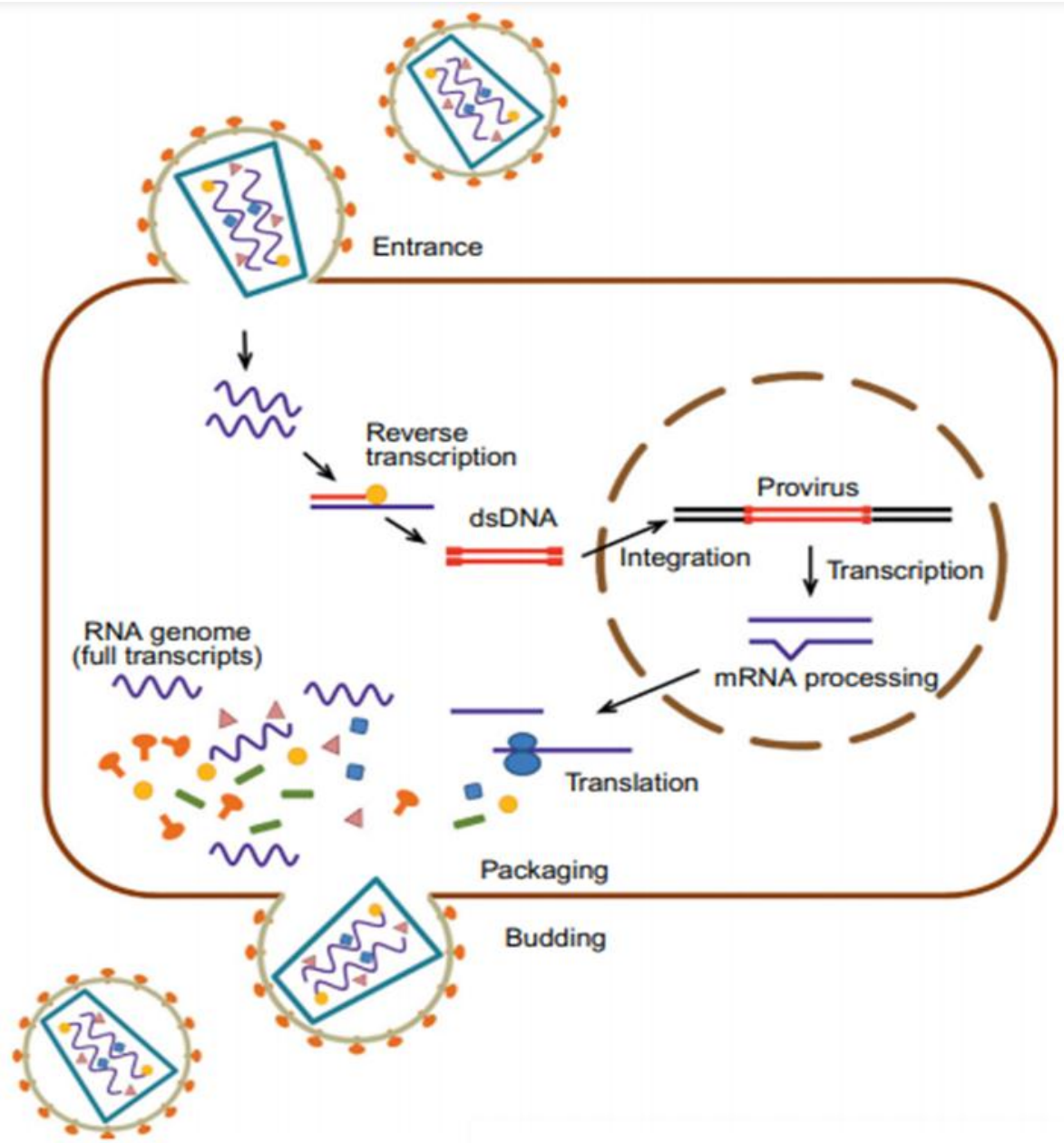
- Les vecteurs viraux sont issus de virus génétiquement modifiés.
- Remplacement des gènes non essentiels impliqués dans la réplication virale et la production de protéines pathogènes par des gènes thérapeutiques.

3.2.1. Les Rétrovirus :

Ils ont la particularité de n'infecter que les cellules en division → vecteurs intéressants pour les cellules à prolifération rapide (tumeurs).

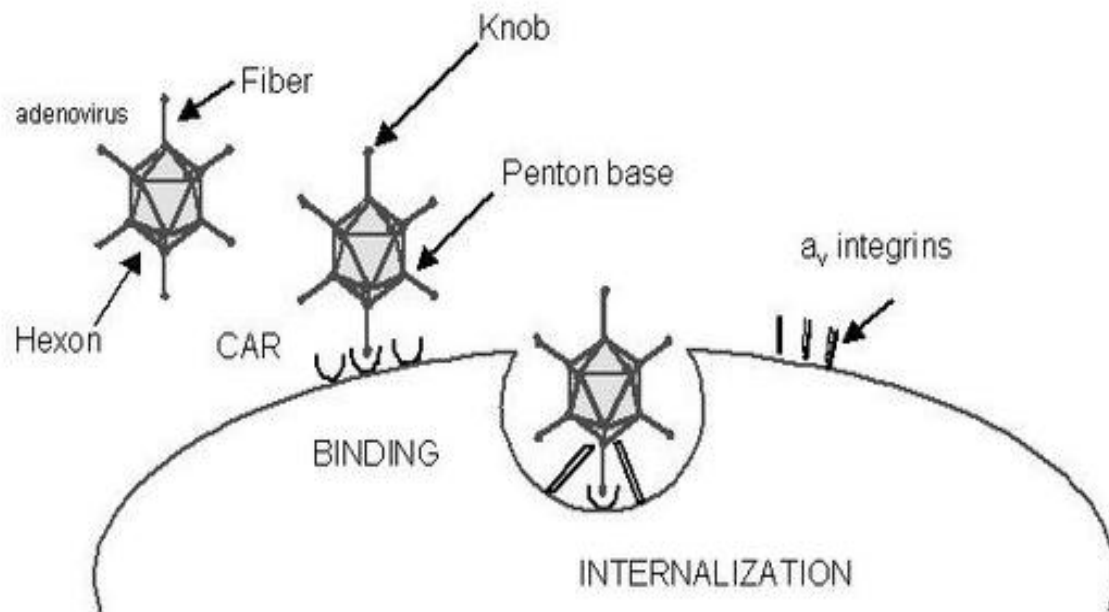
Utilisation : thérapie génique : les cellules du patient sont prélevées, mises en culture puis transfectées à l'aide d'un rétrovirus. Les cellules sont ensuite réinjectées au patient.

3.2.1. Les Rétrovirus :

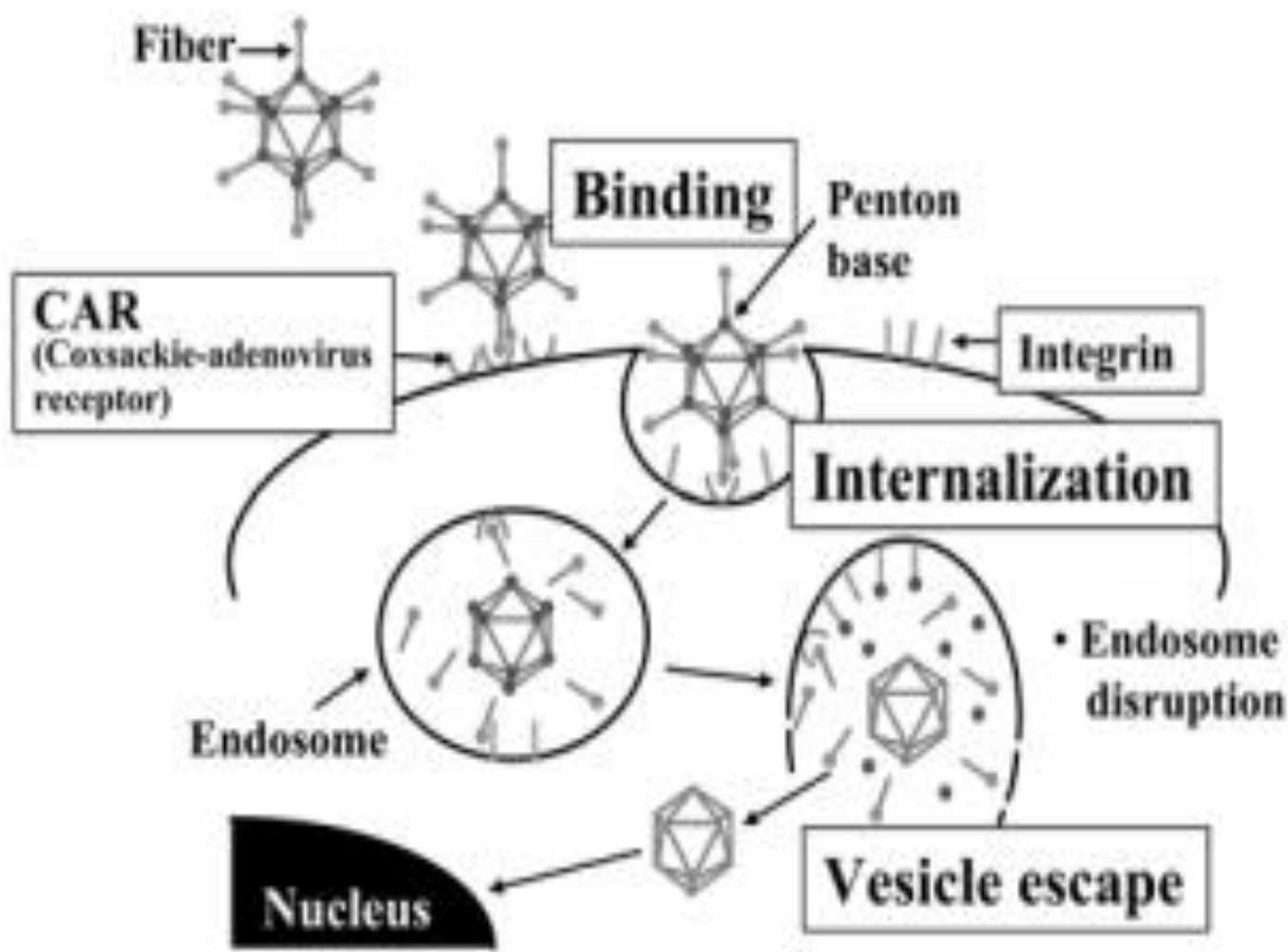


3.2.2. Les Adénovirus :

Virus à ADN. L'infection par les adénovirus met en jeu l'interaction entre une fibre de la particule virale et un récepteur cellulaire CAR (*Coxsackie and Adenovirus Receptor*), et entre les protéines penton base et les intégrines. Le génome viral reste à l'état épisomal dans les cellules et ne permet qu'une expression transitoire du transgène dans les cellules en division. Cette expression peut être prolongée dans les cellules quiescentes.



3.2.2. Les Adénovirus :



4. Identification des cellules transfectées

Utilisation de gènes marqueurs :

Le gène marqueur **aph** (aminoglycoside phosphotransférase) : gène bactérien qui confère la résistance au **G418** (généticine) qui tue les cellules de mammifères en bloquant la synthèse protéique, en codant pour une enzyme qui détruit cette substance.

La transfection peut soit être stable ou transitoire.

Les cellules ayant subi une transfection stable continueront à produire la protéine codée par l'ADNc tant que la culture soit maintenue.

Dans le cas de la transfection transitoire, on ne laisse pas le temps au plasmide de s'intégrer au génome. On lyse les cellules et on récupère leur contenu.

La transfection transitoire permet d'étudier le taux d'expression d'un gène.

Gène rapporteur : lorsqu'il est exprimé en ARNm puis traduit en protéine, cette dernière sera facilement détectable par des tests. On pourra déterminer le taux de la protéine et par conséquent déduire la force du promoteur.

Exemple:

Gène rapporteur de la luciférase. Il code pour une enzyme, la luciférase, capable d'oxyder la luciférine pour former l'oxyluciférine et l'émission de photons.

Un appareil est utilisé pour détecter la bioluminescence.