

TRANSFECTION D'UN VECTEUR D'EXPRESSION EUCARYOTE DANS DES CELLULES DE MAMMIFERE

La transfection de cellules eucaryotes consiste en l'introduction d'un fragment d'ADN (en général un plasmide) dans une cellule eucaryote. Les plasmides utilisés sont des vecteurs d'expression eucaryote, codant des protéines s'exprimant dans une cellule eucaryote.

1. Les vecteurs d'expression eucaryote

2. Les différentes techniques de transfection dans les cellules de Mammifères

2.1. Technique au phosphate de Calcium

Le principe consiste à fragiliser les membranes cellulaires ce qui permet à l'ADN de traverser et de rentrer dans la cellule.

2.2. Technique au DEAE-dextran et choroquine (TP)

Le principe est le même que le précédent.

2.3. Technique d'électroporation

Une suspension de cellules eucaryotes mélangée à la préparation d'ADN à transférer est placée dans une cuve à électroporer entre les plaques d'un condensateur. L'électroporation consiste à charger les plaques du condensateur et de permettre une décharge rapide de celui-ci. La suspension cellules-ADN est alors parcourue transitoirement par un champ électromagnétique qui fragilise les membranes cellulaires et autorise l'entrée de l'ADN.

2.4. Technique utilisant des liposomes

Le mélange de la solution d'ADN à la solution lipidique (de futur liposome), provoque la formation des liposomes. Ils vont véhiculer l'ADN jusqu'à la membrane cellulaire. L'ADN pourra ensuite entrer dans la cellule (endocytose ou fusion du liposome avec la membrane plasmique).

3. Suivi des transfections

3.1. Efficacité de transformation

Efficacité de transformation: le pourcentage de cellules transfectées par μg de plasmide Elle dépend de la taille, de la qualité de la préparation du plasmide transfecté, de la nature du plasmide...

- du type cellulaire utilisé
- de la technique utilisée
- du savoir faire du manipulateur

3.2. Transfections stables et transitoires

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.

Transfection stable: le plasmide transfecté reste présent continuellement dans les cellules transfectées. Il est transmis fidèlement à la descendance et en général s'intègre dans le génome. Les cellules sont donc génétiquement modifiées. Idéalement, le niveau d'expression à partir du plasmide est constant dans le temps.

Particularités des vecteurs utilisés pour réaliser des transfections stables : ce sont souvent des vecteurs rétroviraux (le génome des rétrovirus (2 ARN +) après une étape de transcription inverse s'intègre dans le génome de la cellule infectée).