HAL
open science

VECTEURS D'EXPRESSION CHEZ LES EUCARYOTES DÉRIVÉS DE VIRUS À ADN

G Devauchelle

To cite this version:

G Devauchelle. VECTEURS D'EXPRESSION CHEZ LES EUCARYOTES DÉRIVÉS DE VIRUS À ADN. Annales de Recherches Vétérinaires, 1988, 19 (1), pp.78-79. hal-00901800

HAL Id: hal-00901800

https://hal.science/hal-00901800

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

nous avons recherché des plasmides qui ne génèrent pas d'ADN-SB au cours de leur réplication puis mesuré la recombinaison en leur sein. Plusieurs plasmides de ce type ont été répertoriés et, dans deux d'entre eux, nous avons démontré que la fréquence de recombinaison entre des séquences répétées de 9pb est faible et voisine de celle observée dans le chromosome de *B subtilis*. Des vecteurs issus de ces plasmides ont alors été construits. Ils nous ont permis de cloner de nombreux fragments d'ADN de plus de 15 kb (jusqu'à 33 kb) chez *B subtilis* alors que dans les vecteurs classiques producteurs d'ADN-SB, les inserts ont une taille moyenne de 2 à 3 kb. Finalement, des résultats préliminaires indiquent que ces grands inserts peuvent être propagés pendant de nombreuses générations chez *B subtilis* sans subir de remaniement. En conclusion, ces résultats montrent que la génération d'ADN-SB peut avoir un effet important sur la structure des génomes, que cet effet semble être un phénomène général puisqu'il a été observé dans deux organismes différents, *E coli* et *B subtilis*, et souligne l'importance du choix des plasmides dans des expériences de clonage.

Références

Jannière L, Ehrlich SD, 1987. Recombinaison between short repeated sequences is more frequent in plasmids than in the chromosome of *Bacillus subtilis*. Mol Gen Genet. Sous presse.

Noirot P, Petit MA, Ehrlich SD, 1987. Plasmid replication stimulates DNA recombination in *Bacillus subtilis*. J Mol Biol 195. sous presse

Te Riele H, Michel B, Ehrlich SD, 1986. Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. Proc Natl Acad Sci USA 83:2541-2545.

VECTEURS D'EXPRESSION CHEZ LES EUCARYOTES DÉRIVÉS DE VIRUS À ADN

G DEVAUCHELLE

Station de Recherches de Pathologie Comparée INRA-CNRS, 30380 St-Christol-lez-Alès, France

Aujourd'hui, nous disposons d'un grand nombre de vecteurs capables d'exprimer chez les Procaryotes, les levures ou les cellules Eucaryotes des gènes étrangers. Cependant, l'obtention de protéines fonctionnelles chez l'animal nécessite le plus souvent l'utilisation de vecteurs spécifiques.

Tous les virus à ADN des animaux représentent des candidats potentiels, mais aucun d'entre eux n'est vraiment un « vecteur idéal » (Baichwal et Sugden 1986). En effet, le plus souvent, ce sont des vecteurs d'expression transitoire dont certains ont besoin d'un système Helper (cellule ou virus) pour pouvoir fonctionner. Seuls actuellement les virus de type papillome sont capables de se comporter comme de véritables « plasmides » et les cellules transformées peuvent alors exprimer un gène étranger pendant plusieurs générations.

Cependant, des résultats très significatifs ont déjà été obtenus à partir de plusieurs virus en particulier du SV40, production d'antigènes du virus de l'hépatite B par exemple, et des Poxvirus, production de nombreux antigènes viraux susceptibles d'être utilisés comme vaccin en médecine humaine et en médecine vétérinaire.

Depuis quelques années (Smith *et al* 1983), un nouveau type de vecteur d'expression est utilisé par plusieurs chercheurs, il s'agit de vecteurs dérivés des Baculovirus. Ces virus d'insectes possèdent deux régions codantes pour des protéines (polyédrine, P10) qui s'expriment en très grande quantité en phase tardive du cycle de réplication et dont les produits ne sont pas indispensables à l'infectiosité des virions.

L'utilisation de ces promoteurs forts permet ainsi la synthèse de très grandes quantités de protéines exogènes, protéines qui sont correctement « maturées » (glycosylation, phosphorylation...) et souvent excrétées. La possibilité de multiplier ces virus *in vitro* et *in vivo* dans des conditions relativement simples les rend particulièrement attractifs comme vecteurs d'expression de gènes étrangers provenant de cellules Eucaryotes pour la production de molécules d'intérêt médical ou vétérinaire.

Références

Baichwal VR, Sugden B, 1986. Vectors for gene transfer derived from animal DNA viruses. In Kucherlapati R (ed) Gene transfer, 117-148, Plenum, New York.

Smith G, Summers M, Fraser J, 1983. Production of human beta interferon in insect cells infected with a Baculovirus expression vector. Mol Cell Biol 3:2156-2165.

TRANSFERT DE GÈNES

JF NICOLAS

Unité de Génétique cellulaire du Collège de France et de l'Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France

Chez la souris, plusieurs méthodes sont utilisées pour introduire des gènes dans la lignée germinale :

1) microinjection de matériel génétique dans l'œuf fertilisé (Palmiter et Brinster 1986) ;

2) infection d'embryons par des rétrovirus recombinants (RVR) défectifs (Nicolas *et al* 1985) ;

3) infection ou transfection de cellules souches totipotentes qui sont ensuite reprogrammées dans des blastocystes receveurs.

La microinjection de gènes non modifiés comprenant leur propre promoteur a permis de démontrer que ces gènes conservent leur spécificité d'expression tissulaire et de développement, quelle que soit leur nouvelle localisation dans le génome de ces souris transgéniques. Cependant, lorsque des gènes chimériques sont microinjectés, il n'est pas rare d'observer un pattern d'expression qui ne laisse prévoir aucun des éléments présents dans les constructions. Cela est vraisemblablement dû au fait que la base de la régulation de la transcription qui sous-tend la spécificité tissulaire réside dans une combinaison d'éléments génétiques *cis* dispersés sur tout le gène et reconnus par une série d'éléments complémentaires agissant en *trans*. Ces imperfections dans l'expression devraient pouvoir être corrigées en jouant sur les éléments *cis* de cette combinaison.

Il est d'autres imperfections qui sont inhérentes à la microinjection elle-même :

1) l'ADN adjacent au point d'intégration est souvent (toujours ?) très remanié, ce qui explique la fréquence (20 %) de mutations létales récessives générées ;

2) le nombre de copies intégrées est souvent très supérieur à 1 et ce, bien qu'elle soient intégrées à un site unique.

L'utilisation de rétrovirus recombinants (Nicolas et Rubinstein 1987) permet d'éviter ces complications. En effet, à un virus correspond, au plus, un provirus. Il s'intègre par un site spécifique localisé aux extrémités des régions U5 et U3 des LTR. Le site d'intégration dans le génome est ouvert par une endonucléase. L'intrégrité des séquences virales et cellulaires est donc conservée.

Le problème créé par l'utilisation des RVR est celui du ciblage de l'expression génétique. Les éléments de régulation des LTR du virus peuvent, en effet, interférer avec les éléments *cis* du gène. Deux familles de RVR permettent de résoudre ce problème :

1) RVR à promoteur interne. L'introduction d'une région promotrice entre les deux LTR du RVR n'interfère pas avec la production virale. Ce promoteur est utilisé préférentiellement ou non suivant le contexte cellullaire.

2) RVR à LTR modifiés. Les régions transcriptionnelles peuvent être délétées sans interférer ni avec la production virale ni avec l'intégration. Si un promoteur ubiquitaire est présent dans le rétrovirus, il sera alors le seul à être utilisé. Si un promoteur est associé à une combinaison d'éléments de régulation spécifique, il devrait n'être actif que dans les types cellulaires correspondants.

L'efficacité d'introduction des gènes dans l'embryon par infection rétrovirale semble être du même ordre de grandeur que par microinjection. Lorsque le ciblage de l'expression génétique sera complètement maîtrisé, les RVR seront l'outil idéal pour modifier le génome des animaux.