

Comment régler simultanément l'expression de deux gènes par le système tétracycline ?

Il serait essentiel de pouvoir contrôler l'expression du produit de gènes, quantitativement et dans le temps, que ce soit pour appréhender leur fonction, ou pour moduler leur activité à des fins thérapeutiques. Plusieurs systèmes de régulation ont été décrits dont le système de régulation par la tétracycline, qui présente de nombreux avantages : (1) l'origine procaryote des éléments de ce système assure une transactivation spécifique des séquences d'intérêt, et élimine les effets pléiotropiques ; (2) la tétracycline est un antibiotique bien caractérisé et il agit dans ce contexte à des concentrations suffisamment faibles pour éliminer tout risque d'effets indésirables *in vitro* et *in vivo* ; (3) la tétracycline est un effecteur allostérique, ce qui permet de réguler l'intensité de la réponse en fonction de la dose d'antibiotique, alors que la plupart des autres systèmes fonctionnent sur le mode du tout ou rien.

Deux versions complémentaires du système de régulation par la tétracycline ont été successivement développées. Le premier système (système *Tet-off* ; *figure 1A*) utilise une protéine chimérique tTA, construite en fusionnant le domaine de liaison à l'ADN de la protéine bactérienne tetR avec le domaine de transactivation de la protéine VP16 du virus de l'herpès simplex [1]. En l'absence de tétracycline (ou doxycycline), la protéine tTA reconnaît un motif composé de sept répétitions de la séquence opératrice tetO de l'opéron tétracycline placé en amont d'un promoteur minimal, s'y fixe sous forme de dimère avec une très forte affinité, et induit la transcription avec des niveaux d'activation pouvant

atteindre 10^5 fois. En présence de tétracycline, tTA se lie préférentiellement à l'antibiotique ce qui induit des changements de conformation, une baisse d'affinité de tTA pour tetO et une absence de transcription. Si on introduit une mutation dans la protéine tetR, le système peut fonctionner de façon inverse (système *Tet-on* ; *figure 1B*) [2]. Le transactivateur muté rtTA ne peut se fixer sur les séquences tetO qu'en présence de doxycycline, qui est un analogue de la tétracycline pour lequel rtTA a une meilleure affinité. Les systèmes *Tet-off* et *Tet-on* ont été utilisés dans de nombreuses applications *in vitro* et *in vivo* (pour revue voir [3]) et ont été progressivement affinés en construisant par exemple des systèmes bidirectionnels afin de réguler simultanément l'expression de deux gènes [4]. Baron *et al.* [5] compliquent l'approche en combinant les deux systèmes, de façon à tenter de contrôler simultanément l'expression de deux gènes d'une façon mutuellement exclusive. Pour cela ils ont exploité l'affinité différente des deux protéines tTA et rtTA pour la doxycycline. Alors que le système tTA est inhibé à des concentrations de doxycycline de l'ordre de 0,1 à 10 ng/ml, le système rtTA n'est induit qu'en présence de doxycycline à des concentrations de l'ordre de 100 à 3000 ng/ml (*figure 1A* et *1B*). Pour développer un tel système deux conditions devaient être remplies : (1) les deux transactivateurs tTA et rtTA devaient être modifiés de telle sorte que chacun reconnaisse une séquence opératrice de façon spécifique et mutuellement exclusive. Certaines mutations de tetR qui abolissent la liaison à tetO peuvent être

compensées par des altérations dans la séquence de tetO. C'est sur ce principe que deux « couples » répresseur/opérateur ont été identifiés ; (2) les deux transactivateurs agissant sous forme de dimères, la formation d'hétérodimères tTA/rtTA non fonctionnels risquait de réduire la concentration intracellulaire des homodimères fonctionnels, d'où la nécessité d'altérer les propriétés de dimérisation de tetR afin d'éviter la formation des hétérodimères. En se fondant sur les séquences et les structures cristallisées des molécules tetR de plusieurs souches de bactéries, les auteurs ont modifié les domaines de dimérisation de tTA et rtTA en utilisant des domaines de molécules tetR de différentes classes. Ils ont montré que ces nouveaux transactivateurs étaient incapables de s'hétérodimériser (*figure 1C*). Dans des cellules HeLa exprimant de façon stable les deux transactivateurs, l'expression de deux gènes rapporteurs distincts a été observée. Cette expression, mutuellement exclusive et fonction de la concentration en doxycycline, démontrait ainsi que les deux transactivateurs pouvaient être exprimés à des concentrations intracellulaires suffisantes pour contrôler les deux unités de transcription.

La mise au point d'un tel système est réellement remarquable. En effet c'était un enjeu difficile de modifier à la fois les domaines de fixation à l'ADN, de réponse à la doxycycline et de dimérisation de la protéine tetR, sans altérer ses propriétés allostériques complexes, et tout en conservant des niveaux de transactivation équivalents à ceux obtenus avec les molécules tTA et rtTA d'origine.

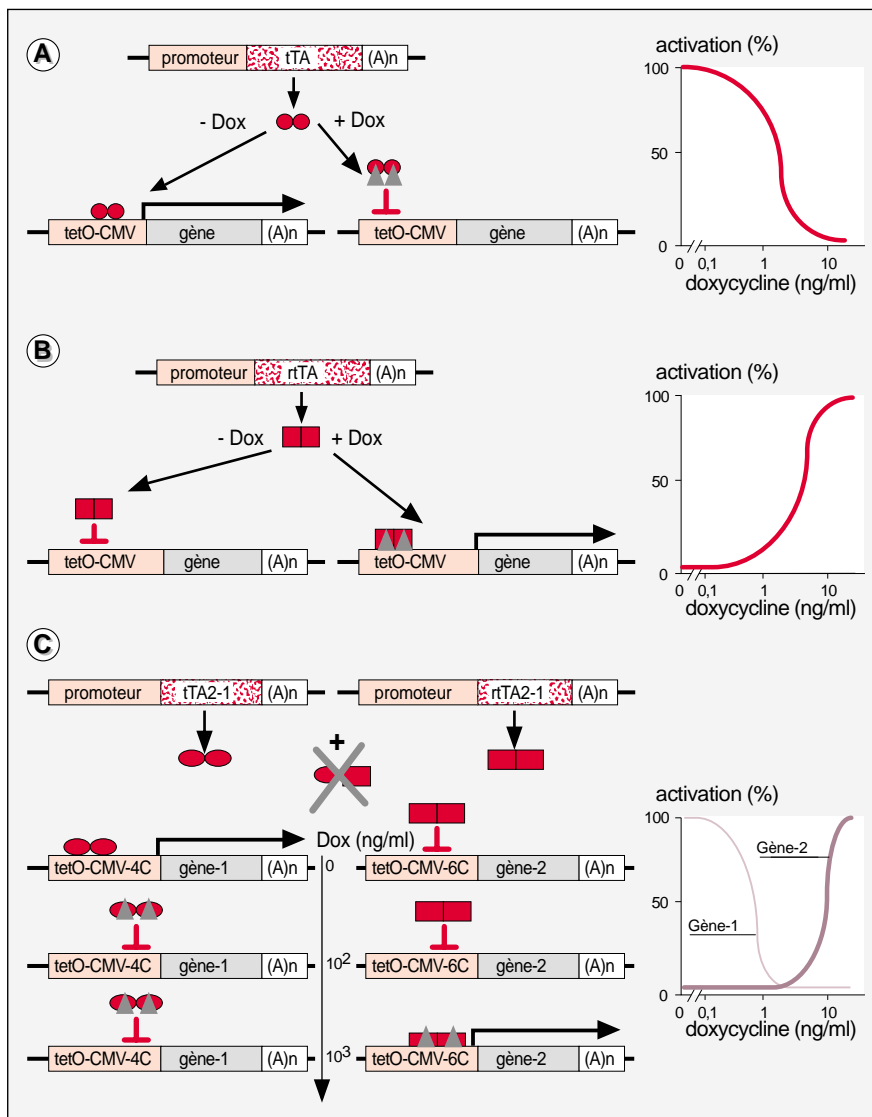


Figure 1. **Schématisme des systèmes Tet-off (A), Tet-on (B) et Tet-on-off (C) réglés par la doxycycline.** Dans chaque système le transactivateur tTA, rtTA, tTA-1, ou rtTA-1, est sous le contrôle d'un promoteur fort constitutif. Les gènes d'intérêt sont placés sous le contrôle d'un promoteur inducible qui associe sept répétitions de la séquence opératrice bactérienne tetO et un promoteur minimal du cytomégalovirus (CMV), spontanément muet. En fonction de la concentration en doxycycline chaque système est induit ou réprimé.

Reste à déterminer quelles seront les applications de ce système non seulement pour étudier l'expression des gènes *in vitro*, mais également pour des études chez des animaux transgéniques et à plus long terme peut-être dans le cadre de transfert de gènes chez l'homme. On peut envisager par exemple de réprimer l'expression d'un gène sauvage et d'activer l'expression d'un allèle mutant à une étape précise du développement de l'organisme, puis de réactiver le gène sauvage. En théorie, il serait séduisant de contrôler à la fois l'expression d'un gène d'intérêt thérapeutique et l'expression d'un gène suicide capable d'éliminer les cellules transduites.

D.B.

1. Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 5547-51.
2. Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Müller G, Hillen W, Bujard H. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 1995; 268: 1766-9.
3. Bohl D, Heard JM. Transcriptional modulation of foreign gene expression in engineered somatic tissues. *Cell Biology and Toxicology* 1998; 14: 83-94.
4. Baron U, Freundlieb S, Gossen M, Bujard H. Co-regulation of two gene activities by tetracycline via a bidirectional promoter. *Nucleic Acid Res* 1995; 23: 3605-6.
5. Baron U, Schnappinger D, Helbl V, Gossen M, Hillen W, Bujard H. Generation of conditional mutants in higher eukaryotes by switching between the expression of two genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 1013-8.

Jeudi 10 juin 1999 à 9 h 00 au Palais du Luxembourg, 15, rue de Vaugirard - 75006 Paris - France

Session spéciale du Club Santé L'hépatite C: priorité de santé publique

Sous le Haut Patronage du Pr Claude Huriel, Sénateur de Meurthe-et-Moselle

Avec la participation de:

Professeur Claude Huriel, Sénateur de Meurthe-et-Moselle

Professeur Daniel Dhumeaux, Chef de service d'hépatologie et de gastro-entérologie - CHU Henri-Mondor - Créteil
Professeur Jean-Philippe Miguet, Chef de service d'hépatologie et de soins intensifs digestifs - CHU Jean-Minjoz - Besançon
Président de l'Association Française pour l'Étude du Foie (AFEP)

et de Vincent Ravoux*

Directeur de l'Union Régionale de la Caisse d'Assurance Maladie (URCAM) de Bourgogne (* orateur présent)

Contacts Presse: PR International

Houney Touré-Valogne - Magalie Alphonse - Tél.: 01 44 05 83 15 et 83 12 - Fax: 01 44 05 18 28 - e.mail: htv@club-internet.fr