

■■■■ **Divisions des asters: le secret de la permissivité à la phase S.**

Les facteurs intervenant dans la division des centrosomes sont encore mal connus mais ils sont recherchés activement car ils permettraient de mieux comprendre certains processus de tumorigenèse (*m/s* 1999, n° 1, p. 121). Pour les étudier, l'observation *in vitro* de centrosomes en présence d'extraits d'œufs de xénope est une méthode de choix. Ces œufs contiennent dans leur cytoplasme les protéines nécessaires à l'accomplissement des divisions cellulaires du zygote jusqu'au stade MBT (*midblastula transition*). Lorsqu'on met en présence des extraits d'œufs de xénope et de l'ADN, les centrosomes se divisent en formant des asters (et non pas des fuseaux qui se produisent en présence de chromosomes) et ces divisions peuvent se faire en l'absence de synthèse protéique [1]. Parmi les nombreux complexes cycline/kinase dépendante de cyclines (Cdk) qui contrôlent le cycle cellulaire, seul, le complexe Cdk-2/cycline E (Cdk-2/E) fonctionne indépendamment de la synthèse et de la dégradation de la cycline E puisque le taux de celle-ci reste constant jusqu'au stade MBT [2]. Pour analyser le rôle de l'activité Cdk-2/E sur la division des centrosomes, en phase S, une équipe américaine a incubé des extraits d'œufs de xénope bloqué en phase S (par l'aphidicoline) avec des noyaux de spermatozoïdes de ce même batracien [3]. La numération des asters – qui reflète le nombre de divisions effectuées par les centrosomes – est faite par vidéomicroscopie durant six heures, soit en présence d'une activité Cdk-2/E intacte, soit en inactivant le complexe par un inhibiteur des cyclines du xénope (un variant de Xic^{p27}). En présence de Cdk-2/E, 69 % des asters se divisent 3 fois et plus, mais quand Cdk-2/E est inhibé, aucun centrosome ne s'est divisé plus de 2 fois en 6 heures. De plus, la cycline E est majoritairement localisée dans le centrosome. Le fait que le centrosome ne puisse se dupli-

quer qu'une seule fois avant le début de la phase S laisse supposer qu'un facteur « permissif » (peut-être justement le complexe Cdk-2/E) conférerait une possibilité illimitée de divisions aux descendants du centrosome initial. Il convient donc à présent de vérifier si le nombre anormal de centrosomes observé dans les fibroblastes embryonnaires de souris dépourvues de p53 et dans de nombreuses cellules tumorales humaines ne serait pas dû à un trouble de la régulation de l'activité Cdk-2/E pendant la phase S.

- [1. Karsenti E. *Med Sci* 1993; 9: 131-9.]
- [2. Hartley RS, et al. *Dev Biol* 1997; 188: 312-21.]
- [3. Hinchcliffe EH, et al. *Science* 1999; 283: 851-4.]

■■■■ **Promoteurs synthétiques: ils sont petits mais ils sont forts.**

L'injection d'ADN nu est la méthode de transfert de gènes la plus simple, mais son application est limitée par la faible efficacité de transfection (*m/s* 1991, n° 5, p. 591). Un moyen de remédier à cet inconvénient serait d'augmenter le niveau transcriptionnel du gène tout en conservant la spécificité tissulaire de son expression et sa stabilité dans le temps. Pour ce faire, une équipe américaine a construit des promoteurs synthétiques (PS), associant une combinaison de séquences régulatrices connues [1]. L'approche a consisté à synthétiser des oligonucléotides double-brins contenant des sites de liaison pour des facteurs de transcription musculaires tels que SRE, MEF-1, MEF-2, TEF-1 (*m/s* 1997, n° 10, p. 1182), et à les assembler de façon aléatoire, en variant leur rapport respectif. Les fragments synthétiques ont été placés en amont d'un promoteur minimal dérivé de l' α -actine squelettique et dirigeant l'expression du gène rapporteur de la luciférase. Plus de 1 000 clones différents ont été testés après transfection transitoire dans des myoblastes de poulet. Les deux PS présentant la plus forte activité transcriptionnelle

ont été séquencés et comportent 3 sites MEF2, 1 site MEF1, 3 sites SRE et 5 sites TEF1 dans différentes orientations. L'un d'entre eux, testé *in vivo* par injection intramusculaire chez la souris, présentait une activité luciférase comparable à celle du promoteur fort ubiquitaire du cytomégalo virus (CMV). La spécificité d'expression musculaire et cardiaque de ce promoteur a été vérifiée *in vitro* et *in vivo* par transgénèse, en utilisant la β -galactosidase comme gène rapporteur. Son activité est stable 4 mois après l'injection *in vivo* chez la souris avec des niveaux d'activité transcriptionnelle 6 à 8 fois plus élevés que ceux qu'entraîne un promoteur CMV. La capacité qu'a ce PS d'assurer la production d'une protéine thérapeutique, la GHRH (*growth hormone releasing hormone*) a également été testée. Sept jours après l'injection, la concentration d'hormone de croissance mesurée dans le plasma de souris est semblable à celle obtenue avec un promoteur CMV. Cette possibilité d'accroître significativement et de façon stable l'activité transcriptionnelle grâce à des PS spécifiques du muscle pourrait en tout cas permettre d'étendre les applications de l'injection de l'ADN nu.

- [1. Li X, et al. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 241-5.]

