

Figure 1. **Construction de gènes artificiels à visée biotechnologique.** A) Transformation de cellules bactériennes. L'ADN complémentaire du messager que l'on veut exprimer à un haut niveau dans les cellules bactériennes (en général *E. coli*) est placé sous le contrôle d'un promoteur bactérien inductible et fort. Il comprend, au-delà du site d'initiation de la transcription : la séquence de Shine Dalgarno, indispensable à la fixation des ribosomes bactériens au messager, et donc à sa traduction ; un codon d'initiation de la traduction (ATG) ; une séquence codant pour un peptide signal d'une protéine bactérienne, permettant la sécrétion du produit final du gène étudié dans le milieu de culture bactérienne ; éventuellement, un ATG codant pour une méthionine et non utilisé comme initiateur de la traduction, situé juste entre les séquences bactériennes à gauche (rectangle étroit) et eucaryotiques à droite (rectangle large). Au-delà du codon de terminaison de la traduction (TAA, TAG ou TGA), un signal spécifique de fin de transcription est indispensable dans un système procaryotique. Le plasmide dans lequel est intégré ce gène comprend au moins une origine de replication (ORI) et un gène de résistance aux antibiotiques. Les bactéries sont « transformées » par un tel plasmide recombinant qui leur confère la résistance à un antibiotique, ceci permettant d'éliminer les bactéries non transformées. Le gène hybride n'est alors pas exprimé, le promoteur étant inhibé par la fixation d'un répresseur (R) sur une région régulatrice appelée « opérateur ». Lorsque cette répression cesse (par exemple, parce que le répresseur est thermo-instable et que le milieu de culture est placé à une température le détruisant, ou bien par addition d'une substance bloquant la fixation du répresseur sur l'opérateur), le gène est transcrit très activement et l'ARN est traduit. Le produit protéique, grâce à la présence d'un peptide signal de protéine bactérienne (m/s n° 6, vol. 2, p. 341) est sécrété dans le milieu à partir duquel il peut être purifié. Les restes de protéine bactérienne persistant après l'excision du peptide signal lors du passage transmembranaire du produit peuvent être éliminés par clivage de la méthionine rajoutée entre les séquences procaryotiques et eucaryotiques... à condition qu'il n'existe pas d'autres méthionines dans le gène.

B) Transfection de cellules eucaryotiques. Le gène (ou plus souvent l'ADN complémentaire dépourvu d'introns) dont on désire faire synthétiser le produit par des cellules eucaryotiques est placé sous le contrôle d'un promoteur et d'une séquence stimulatrice (enhancer) forts et actifs chez les eucaryotes, tels par exemple des promoteurs et des enhanceurs viraux (LTR du virus de Rous, séquences régulatrices de gènes d'adénovirus ou de virus SV-40). Au-delà du site d'initiation de la transcription, on peut introduire dans cette construction plusieurs types de signaux : une séquence localisée dans la partie 5' non codante du messager et destinée à en augmenter la traductibilité, comme cela a été démontré dans le virus LAV-HTLVIII (ou HIV) (séquence TAR, m/s n° 5, vol. 2, p. 285). Au-delà de l'ATG initiateur de la traduction il est, là aussi, possible d'introduire une séquence de peptide signal permettant la sécrétion du produit dans le milieu ; après le signal de fin de traduction, l'introduction d'une séquence comportant un intron, avec ses séquences consensus d'excision-épissage (m/s n° 3, vol. 1, p. 158) est de nature à augmenter l'expression du gène hybride ; enfin, la présence d'un signal de polyadénylation AATAAA est absolument indispensable à la stabilité du messager. Le plasmide dans lequel est insérée cette construction peut être similaire au précédent (ce qui permet son « amplification » dans des cellules bactériennes) et comporter en plus le gène « Néo » qui code pour la résistance des cellules eucaryotiques à l'antibiotique G 418. Ainsi, après amplification du plasmide dans des cellules bactériennes, celui-ci est transféré par divers procédés (on parle alors de « transfection ») dans des cellules eucaryotiques en culture. Le plasmide s'intègre alors au bout de quelques jours dans l'ADN chromosomique des cellules transfectées qui sont sélectionnées grâce à leur résistance au G 418. Les « clones » ainsi isolés sont testés pour la production de la protéine codée par le gène introduit.

## ■■■■ BRÈVES ■■■■

■■■■ Cachectine, « tumor necrosis factor » et un facteur induisant la différenciation des myéloblastes en macrophages sont une seule et même molécule sécrétée par les lymphocytes T stimulés par la phytohématagglutinine. Il s'agit donc d'une lymphokine qui pourrait lyser certaines cellules tumorales (activité « TNF »), changer l'activité de nombreuses enzymes lipogéniques dans les adipocytes (activité « cachectine ») et stimuler la différenciation de cellules souches en macrophage (activité « differentiating inducing factor, DIF »).

[Takeda K *et al.* *Nature* 1986 ; 323 : 338-40.]

■■■■ Le gène codant pour l'oncogène c-myc a 3 exons, les 2 derniers codant pour la protéine myc. La séquence du 1<sup>er</sup> exon révèle que, chez l'homme au moins, il pourrait coder pour une protéine à la fonction encore inconnue. L'équipe de Galibert vient de démontrer qu'une telle protéine existe dans les tissus humains : elle est reconnue par des anticorps dirigés contre des peptides synthétisés d'après la séquence codante supposée de cet exon. L'intervention de cette protéine dans la régulation de l'expression ou de la fonction de l'oncogène c-myc reste hypothétique.

[Gazin C *et al.* *Embo J* 1986 ; 5 : 2241-50.]

■■■■ La stabilité des ARN messagers peut être considérablement diminuée *in vivo* par l'adjonction d'une séquence riche en acide adénylique et uridylique (poly A-U) au niveau de leurs régions 3' non codantes. Cette instabilité exige une synthèse protéique active, suggérant que la séquence poly A-U pourrait être reconnue par une protéine indispensable à la dégradation de l'ARN. Il pourrait s'agir là d'une cible des processus de régulation de l'expression des gènes par modification de la stabilité des transcrits.

[Shaw G, Kamen R, *Cell* 1986 ; 46 : 659-67.]