



# Les Promoteurs Inductibles

BONNE Katia

HOEFLER Christelle

SCHMELTZ Vanessa

MI VRV

# Promoteurs

## Définition

Le promoteur d'un gène est une courte séquence d'ADN, généralement situé en amont de celui-ci, qui en contrôle l'expression, notamment en régulant sa transcription.

# Promoteurs constitutifs

- Peuvent s'exprimer dans toute la plante
- Expression peu spécifique et mal contrôlée dans l'espace et le temps

Systeme incompatible si le transgène exprimé conduit à :

- un phénotype létal pour la plante
- de sévères modifications métaboliques
- des altérations de développement et croissance

**Nécessité d'une  
alternative**

# Promoteurs inductibles

- Activation d'un promoteur en réponse à la présence d'un composé particulier (= inducteur) ou bien à une condition externe définie → ex : température élevée
- Le transgène est exprimé à un stade précis de développement et pendant une durée précise
- Contrôle du transgène : spatialement (cellule ou tissu -spécifique) et quantitativement
- Contrôlé par différents produits :
  - tétracycline, stéroïdes, dexaméthasone, œstradiol ou éthanol
  - ...

# Critères du promoteur inductible

**Système** : → très inductible  
→ bien contrôlé répondant à des inductions spécifiques

**Activation** : → spécifique des gènes cibles  
→ sans effets négatifs sur la plante même à un haut niveau d'expression

→ Afin de s'assurer que la réponse biologique observée est due à l'expression d'un gène d'intérêt et non à l'expression inductible elle-même

**Utilisation d'un vecteur vide**

# Systeme inductible

Composé de 2 éléments :

- Facteur de transcription : activité sensible à un produit chimique
- Elément de réponse : par lequel le FT contrôle le gène d'intérêt

Il existe 2 possibilités de systèmes



Tissus spécifique



Inducteur chimique

## Tissus-spécifique :

- expression transgène limité à 1 tissu
- expression de systèmes basés sur 2 éléments séparés pouvant être introduits dans des lignées différentes et combinés par croisement

**MAIS** → peut altérer une voie métabolique d'expression d'un gène endogène

## Inducteur chimique :

- système binaire basé sur la combinaison d'un FT synthétique ou chimérique avec un promoteur contrôlant l'expression du gène d'intérêt

# Construction

- Promoteur cible + activateur dans un **même** plasmide :
  - introduction simultanée mais ne peut pas user d'autres modèles d'activateur de l'expression
- Promoteur cible + activateur dans plasmides **différents** :
  - grande polyvalence et variétés d'activateurs pour exprimer un FT inductible mais beaucoup plus complexe

# Un inducteur chimique : éthanol

- FT chimique réactif qui active un promoteur
- Transport et métabolisme rapide
- Produits du métabolisme → acétaldéhyde plus efficace
- Toxique → perturbe le développement et diminue l'expression

Compromis optimal entre expression induite  
et effets secondaires  
sur les fonctions de la plante

- Volatilité EtOH : applicable en vapeur
  - pénètre dans cellules du méristème
  - effets sur les plantes voisines
  - induction locale compliquée
  
- Vapeurs conseillées pour :
  - courtes séries d'induction
  - maximiser l'efficacité du système d'induction
  - minimiser la toxicité

Traitements répétés en dessous du seuil optimal  
+ efficace sans altérer la plante

# Ressource compatible : système alc

Traitement chimique à l'éthanol

→ P *palcA* activé

→ acétaldéhyde

Fig 1



- FT = gène ALCR d'*Aspergillus nidulans* → dirige l'expression du *palcA* en se liant à la séquence *alcA* fusionné au P 35S
- Activité ↗ quand accumulation de métabolites endogènes (activation ALCR)
- Développement d'un vecteur *palcA* qui transmet la résistance Basta

Culture et sélection des transformants  
en serre ou en sol

# Systeme XVE

= LexA-VPI6-ER

## Composition :

- Promoteur fort G10-90
- Domaine de liaison à l'ADN du répresseur bactérien LexA
- Protéine virale VPI6 : activation du facteur de transcription
- Région régulatrice → récepteur humain à l'œstradiol (ER)
- Un marqueur de sélection

→ Régulation par l'œstradiol

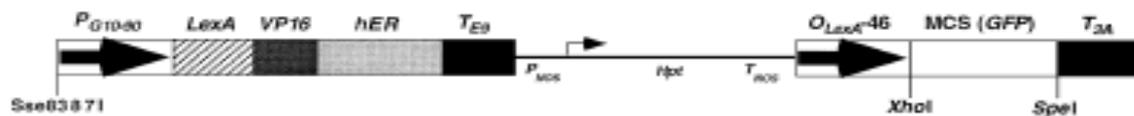


Fig 2

- Système GFP-XVE : introduction du gène codant pour la GFP
- XVE répond à une large gamme de concentration d'inducteur : de 8nM → 5μM
- Système XVE :
  - non toxique dans *Arabidopsis thaliana*
  - n'active pas PDF1-2 = un gène de défense (mais induit par du dexaméthasone)
  - ne fonctionne pas très bien dans plantes contenant des phytoestrogènes (soja)

- Non testé dans des monocotylédones
  - mais surement utilisable car ER-C bien contrôlé et bien inductible dans des suspensions cellulaires de maïs
- **Maïs : pas utilisable pour des cultures en champs**
  - nature de l'inducteur
- Possibilité de remplacer la séquence régulatrice ER par un **récepteur nucléaire stéroïde d'insecte**

→ Système GVG

# Systeme GVG

- Récepteur aux glucocorticoïdes (GR) : famille des récepteurs à hormones chez les vertébrés
  - GR = Facteur de transcription (FT) : en présence de glucocorticoïdes il active la transcription
- Utilisation d'une partie de GR : l'hormone binding domain (HBD)
  - régule la fonction du FT dans les plantes transgéniques
- Construction d'un système contenant de l'HBD dans un FT chimérique = GVG

## GVG contient :

- un ADN hétérologue = domaine du récepteur aux glucocorticoïdes de rat
- FT chimérique contenant domaine de liaison à l'ADN d'une levure : FT Gal 4
- la protéine virale VP16 : activation du FT
- Grâce au P35 S : transgène exprimé tout le temps dans cellule
- Avec ajout d'un inducteur : celui-ci se fixe sur domaine GR = activation

➔ GR va dans le noyau

- GR se fixe sur le promoteur  
GAL4 : active le gène de la luciférase

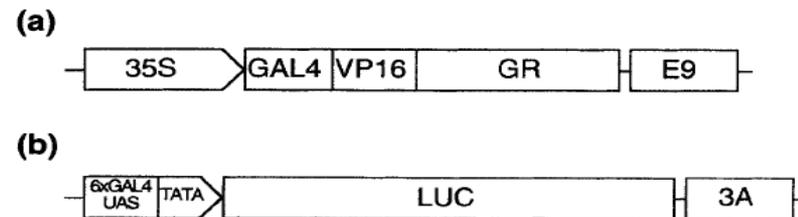


Fig 3

Luciférase = gène rapporteur  
(GFP pendant les Travaux Pratiques)

**L'inducteur = DEX : dexaméthasone**

Mesure de l'activité de la luciférase en fonction de la concentration de DEX

- Aucune activité sans inducteur
- Maximum d'inductibilité à une certaine [inducteur]

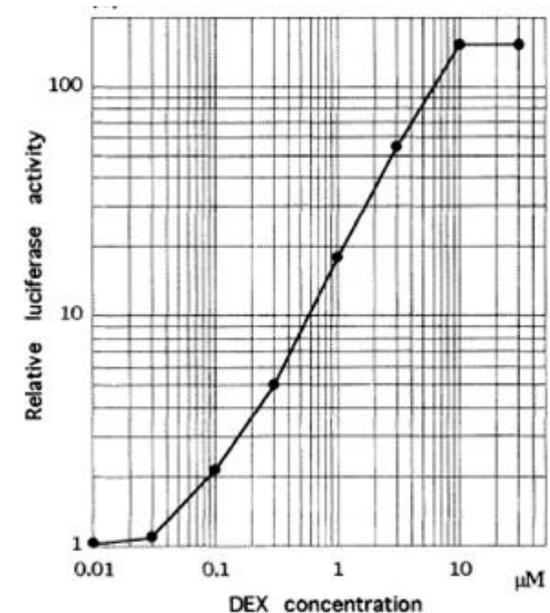


Fig 4

- Luciférase :  $\frac{1}{2}$  vie de 3h
  - étude sur une courte échelle de temps
  - mais induction par DEX : rapide + maintenue pendant longue période
- 
- Ce système GVG répond aussi à d'autres inducteurs comme le :
    - le triamcindone acétonine
    - la bétaméthasone
    - l'hydrocorticoïde
  - Mais le meilleur reste le **DEX**

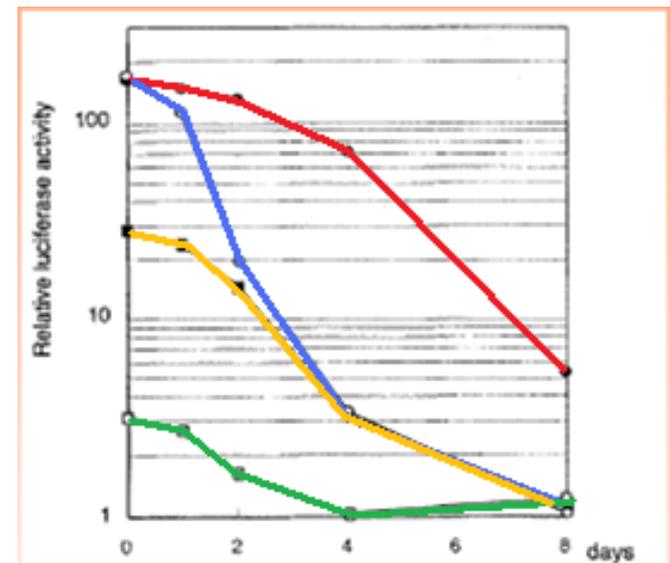


Fig 5

# Problèmes avec Système GVG

- 30% de plants de tabac présentent des effets négatifs
- Effets du système GVG sont dus à des effets non spécifiques du FT chimérique GVG exprimé constitutivement
- Lignées avec des [ transcrits GVG ] + importants, susceptibles d'avoir des effets négatifs
- Mais seulement en présence de DEX : activation de GVG



Fig 6

**DEX n'est pas la cause en lui-même des effets négatifs**

## Relation croissance – éthylène

GVG : impact inconnu et fort dans voie métabolique de l'éthylène

→ induction d'ACC oxydase quand trop de GVG exprimé  
(ACC → éthylène)

Déficiance dans la croissance d'*Arabidopsis thaliana* et  
↗ l'expression d'un gène de défense PDFI-2

→ Or ce gène + exprimé avec de l'éthylène exogène

→ Donc croissance ↘ car l'éthylène ↗

# Attention à l'intensité lumineuse appliquée sur les plantes !

Avec peu d'intensité lumineuse (LL) :

- ↘ croissance - retardée
- chlorose + retardée
- ↗ d'ACC oxydase est moins sévère

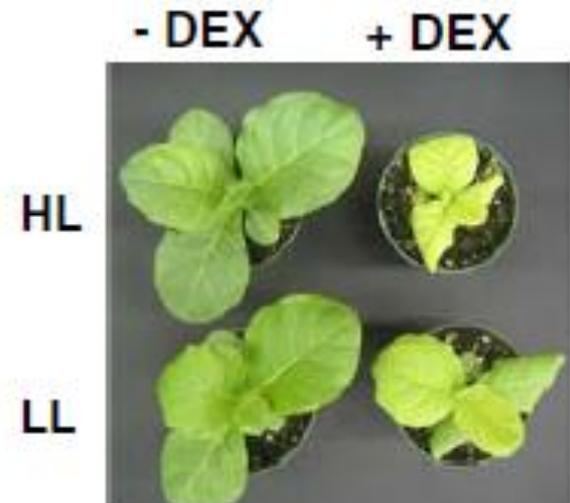


Fig 7



- Problème pour certaines lignées avec un vecteur vide induites à différentes concentration de DEX

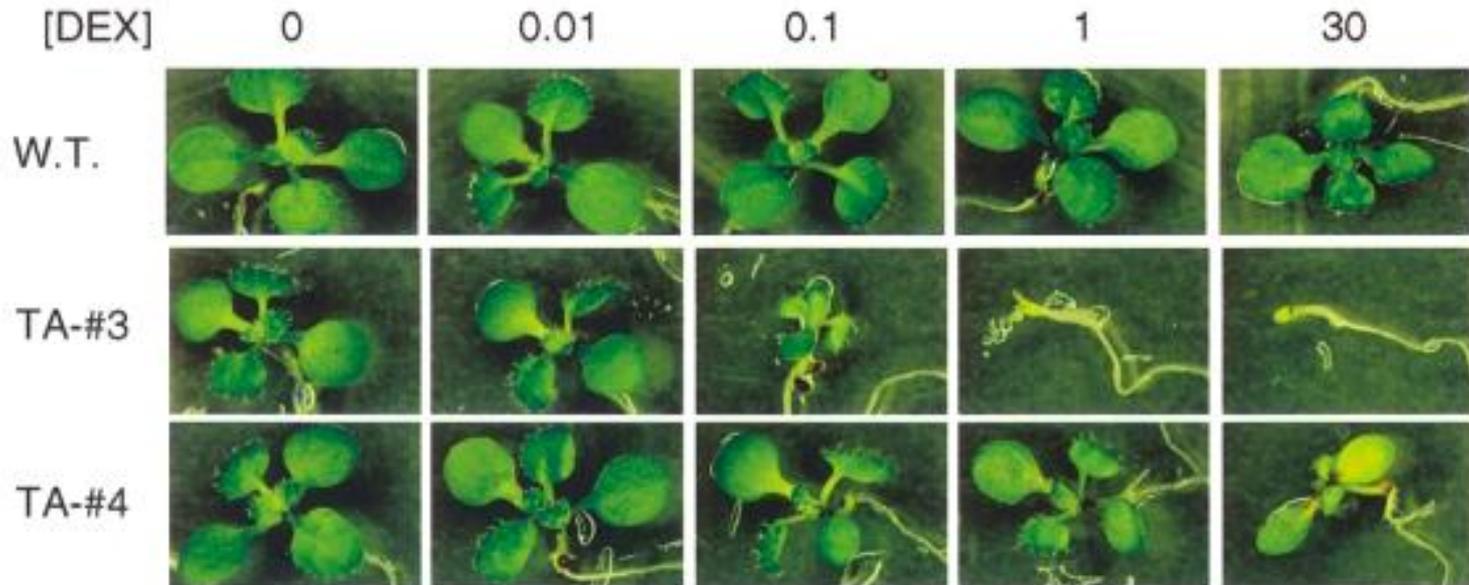


Fig 9

→ atteintes sévères du développement

Fig.8

# Exemples d'application

- Restauration de la fertilité mâle
- Détermination du rôle de certaines protéines de développement d'*Arabidopsis thaliana*
- Systèmes inductibles chimiquement sont importants pour le contrôle des transgènes (inclus la synchronisation entre floraison et cueillette des fruits)

- Floraison

Exemple avec le gène GIGANTA (GI)

→ Rôle dans photomorphogénèse et régulation de l'horloge circadienne

Utilisation d'un transgène GI-GR, avec DEX comme inducteur

→ On peut rétablir la floraison chez un mutant gi-2

# Conclusion

- **Intérêts des promoteurs inductibles**
  - Contrôlables dans espace et temps
  - Utilisables pour gènes à impacts négatifs sur plante
  - Existence de plusieurs systèmes et inducteurs
  
- **Limites**
  - CIV – culture en serre /champ
  - Promoteur inductible peut changer l'expression de certains gènes autre que le gène d'intérêt

- **Précautions à prendre :**
  - Vecteur vide comme contrôle
  - Inducteur sans effets sur plante
  - Activation que du transgène
- Une longue induction n'augmente pas forcément l'activité du transgène !
- Compromis optimal expression-effets  
2daires → traitements répétés en  
[ inducteur] ↓
- Auteurs espèrent que ces systèmes vont faire accepter les **OGMs**

# Références

- 1) I. Moorel, M. Samalova I and S. Kurup (2006) « Transactivated and chemically inducible gene expression in plants » *The Plant Journal* **45**, 651–683
- 2) J. Zuo, Q. Niu et N. Chua (2000) « An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants » *The Plant Journal* **24**(2), 265-273
- 3) T.Aoyama et N. Chua (1997) « A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants » *The Plant Journal* **11**(3), 605-612
- 4) S.Amirsadeghi et Co (2007) « A glucocorticoid-inducible gene expression system can cause growth defects in tobacco » *Planta* **226**:453-463
- 5) Hong-Gu Kang, Yiwen Fang and Karam B.Singh (1999) « A glucocorticoid-inductible transcription system causes severe growth defects in *Arabidopsis* and induces defense-related genes »- *The plant journal* **20**(1), 127-133
- 6) M. Günl, E. FungMin Liew, K. David and J. Putterill (2009) « Analysis of a post-translational steroid induction system for *GIGANTEA* in *Arabidopsis* » *BMC Plant Biology* **2009**, 9:141
- 7) Malla Padidam (2003) « Chemically regulated gene expression in plants » *Current Opinion in Plant Biology*, **6**:169–177

# Images

- Fig 1 : [1]
- Fig 2 [2]
- Fig 3 , 4 et 5 : [3]
- Fig 6 et 7 [4]
- Fig 8 et 9. [5]