

PROMOTEURS CONSTITUTIFS

CONAN CÉLINE
ETTER CORALIE
GÉNARD THAÏS

M1-VRV
2010 - 2011

- Généralités
- Promoteur CaMV35S
- Promoteur MtHP
- Promoteur CmYLCV
- Autres promoteurs constitutifs
- Limites
- Alternatives



La construction d'un transgène comprend :

- la séquence codante de la protéine d'intérêt
- un promoteur en amont
- un terminateur de transcription en aval

Les promoteurs utilisés sont de différent types :

- Constitutifs
- Inductibles
- Spécifiques



- **Promoteurs constitutifs :**

Ces promoteurs dirigent l'expression permanente dans tous les tissus.

- **Promoteurs inductibles :**

Ces promoteurs sont activés en présence d'un composé particulier.

- **Promoteurs spécifiques :**

Ces promoteurs limitent l'expression du gène à certains tissus ou organes.



Promoteur CaMV 35S

- Virus découvert dans les années 1980, responsable de la décoloration du limbe entre les nervures des feuilles de *Brassicacées*.
- L'ADN du virus comporte 2 promoteurs constitutifs : 19S et 35S
- Promoteur 35S :
 - promoteur constitutif fort
 - couramment utilisé
 - chargé de la transcription du virus dans la plante
 - entraîne des niveaux d'expression élevés chez les dicotylédones
 - moins efficace chez les monocotylédones (céréales)



Constitution du promoteur

Des expériences de délétion ont été réalisées afin de déterminer les régions responsables de l'activité du promoteur 35S :

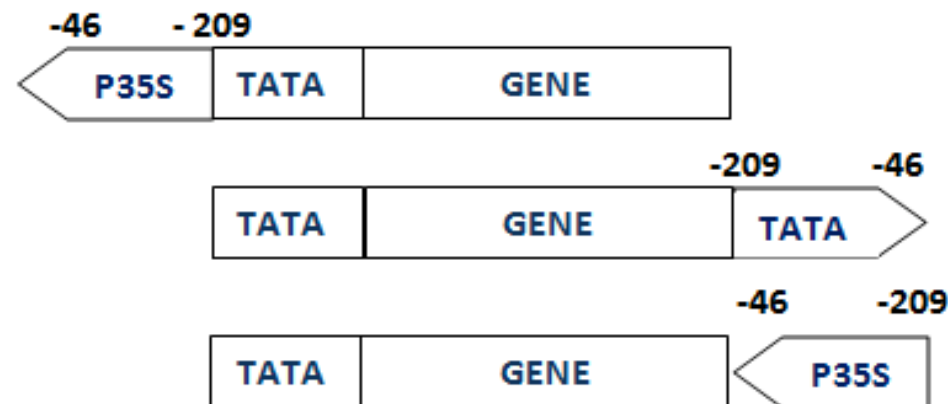


Construction	Région - 343 à - 208	Région - 90 à - 46	Région - 343 à - 208 + Région - 90 à - 46
Activité transcriptionnelle	Non détectable	Non détectable	Détectable Equivalente au promoteur entier

➔ 3 régions majeures responsables de l'activité du promoteur :

- Région - 343 à - 208 : 50% de l'activité du promoteur
 - Région -208 à - 90 : 40% de l'activité du promoteur
- } **Activité enhancer**
- Région - 90 à - 46 : accessoire mais indispensable à l'activité du Promoteur

Activité enhancer : vérifiée par des constructions sens et antisens en amont et en aval du site d'initiation de la transcription



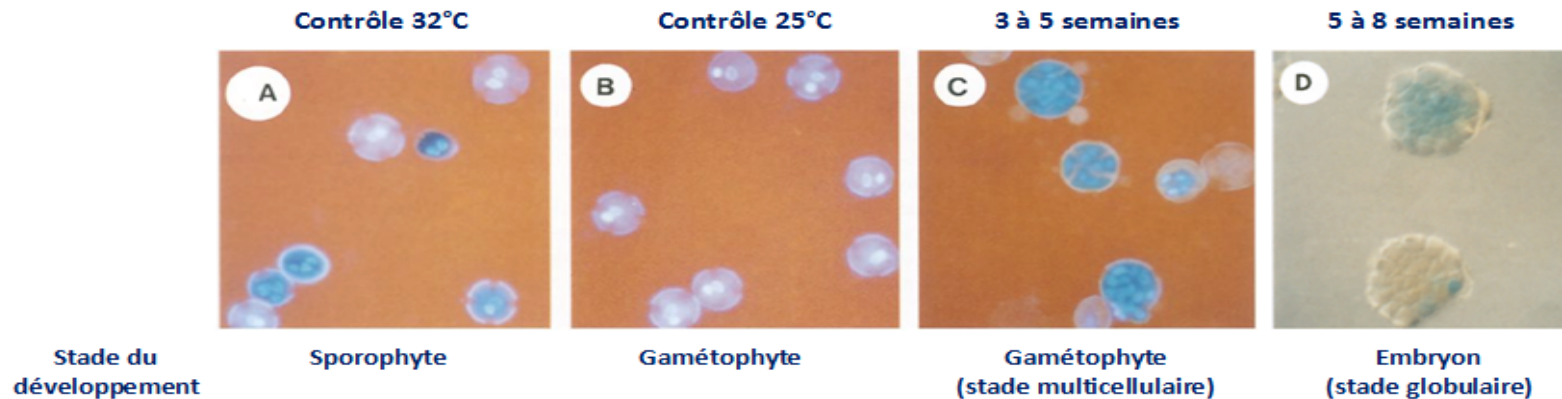
Influence du nombre de copies sur l'activité transcriptionnelle

- Activité optimale avec 4 promoteurs
- L'abus du promoteur entraîne l'inactivation de la transcription : silencing

→ L'activité maximale de transcription du promoteur 35S nécessite la coopération de ces éléments de cis-régulation

Activité du promoteur 35S au cours du développement

- Construction : promoteur 35S - gène GUS



Microspores isolées de tabac *Nicotiana tabacum*

➔ Le promoteur 35S est inactif au cours du développement embryonnaire : stade globulaire – stade mi-cotylédonaire

Le promoteur 35S : un marqueur moléculaire de l'embryogénèse

Exemple d'application : Influence des conditions de cultures sur le développement embryonnaire

	Conditions de cultures	Activité du promoteur 35S-gus au cours des différents stades du développement embryonnaire				
		pré-globulaire	globulaire	cœur	pré-cotylédonaire	mi-cotylédonaire
Tabac <i>Nicotiana tabacum</i>	microspores avec conservation anthères	–	–	+	+	+
	microspores isolées	+	–	–	+	+
Colza <i>Brassica napus</i>	microspores isolées	–	–	–	+	+

Conclusion sur le promoteur CaMV 35S

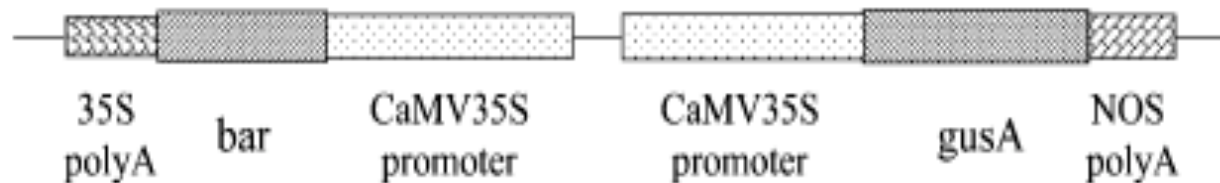
- Promoteur fort
- Constitué de régions enhancers potentialisant son activité (motifs similaires aux enhancers du virus SV40)
- Activité décuplée avec des constructions multiples
- N'est pas actif à tous les stades de développement
- Marqueur moléculaire de l'embryogénèse



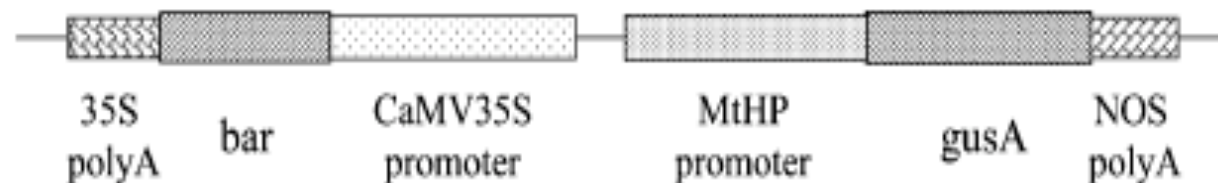
Promoteur MtHP

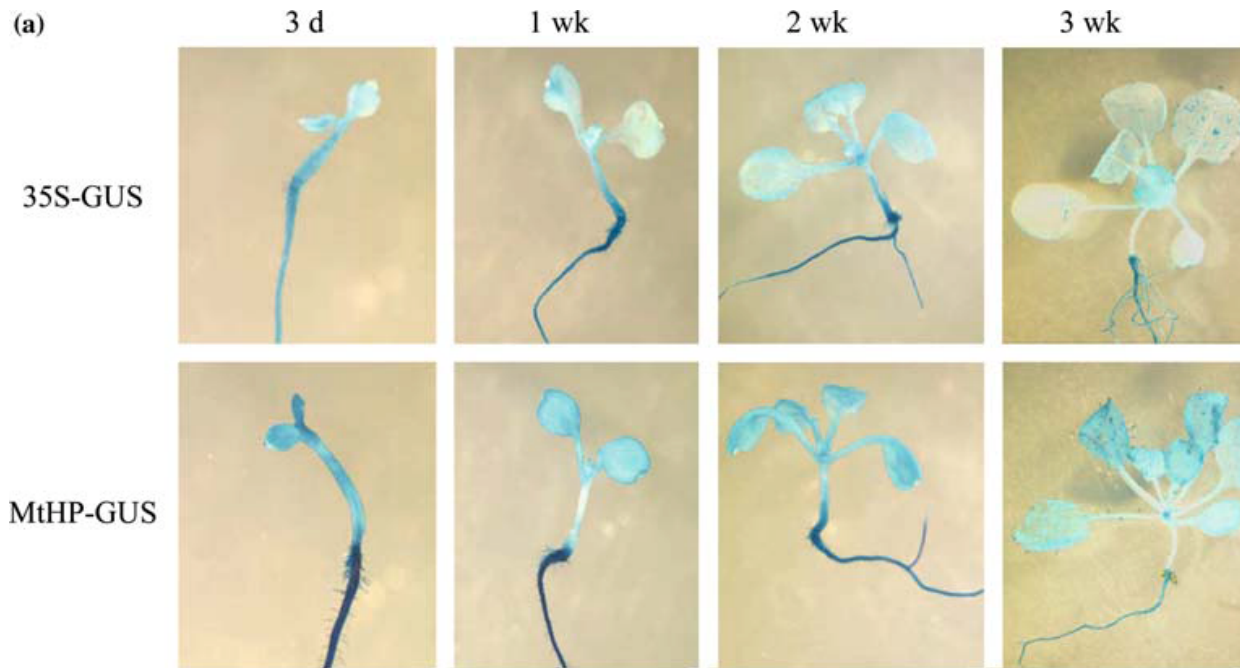
- Nouveau promoteur qui dirige une forte expression constitutive du transgène isolé chez une espèce modèle de légumineuse *Medicago truncatula* (luzerne)
- Comparaison des niveaux d'expression GUS chez Arabidopsis entre 2 constructions : 35S-GUS et MtHP-GUS.

35S-GUS



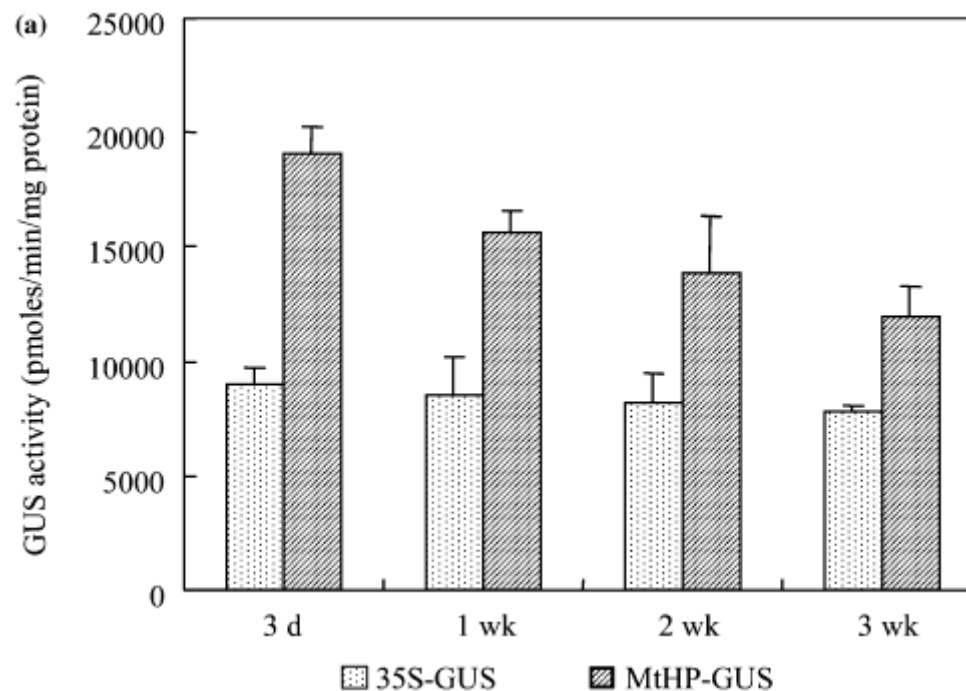
MtHP-GUS



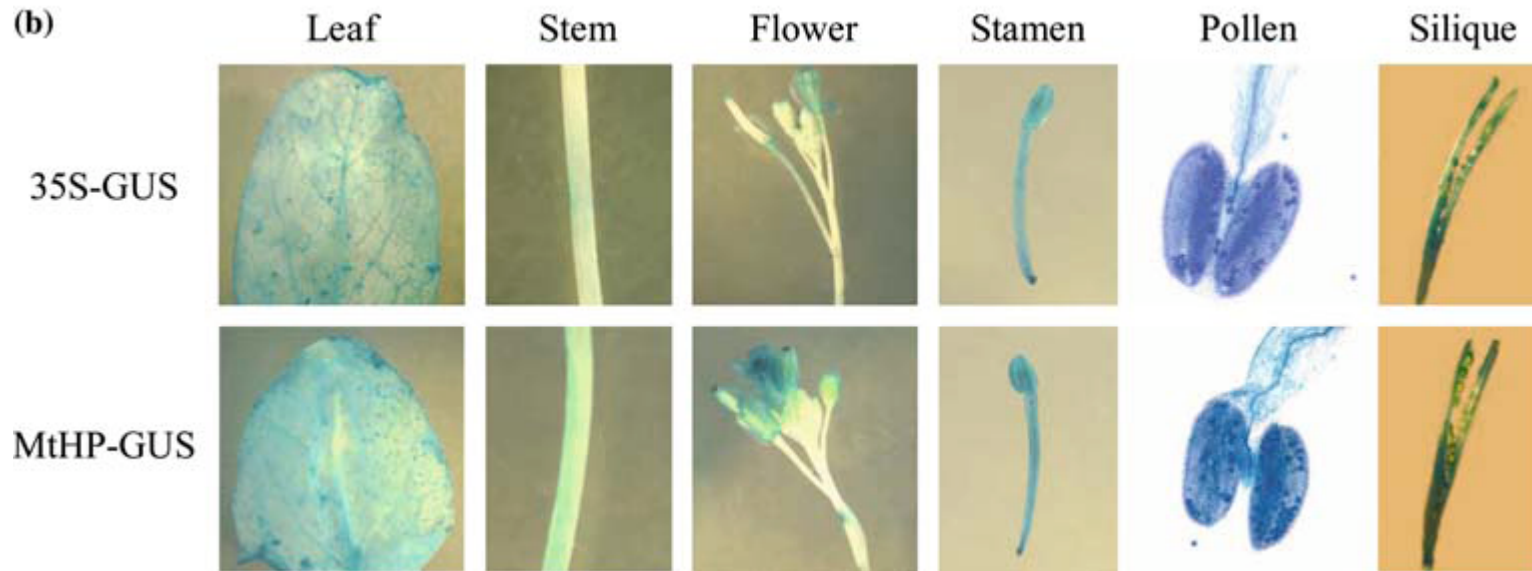


Coloration GUS à différents stades de développement

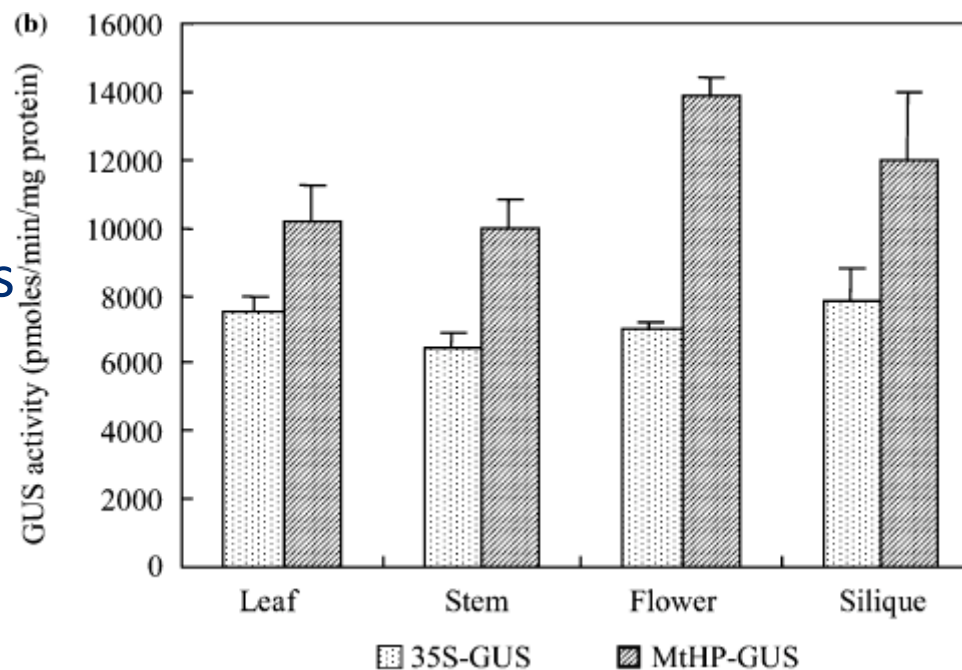
Activité GUS des plantes transgéniques
Arabidopsis à différents stades de développement



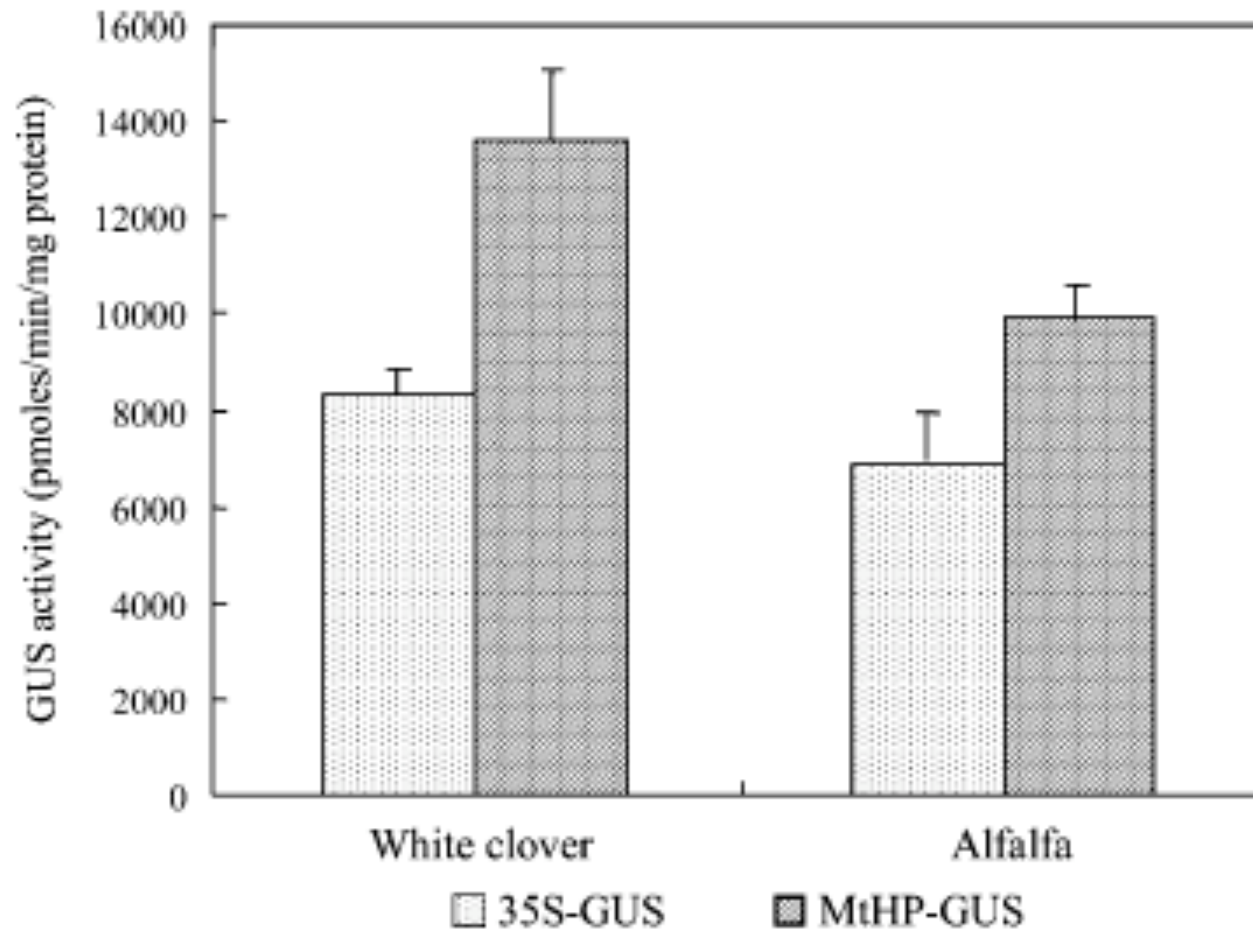
Coloration GUS dans différents tissus et organes



Activité GUS des plantes transgéniques *Arabidopsis* dans différents tissus et organes

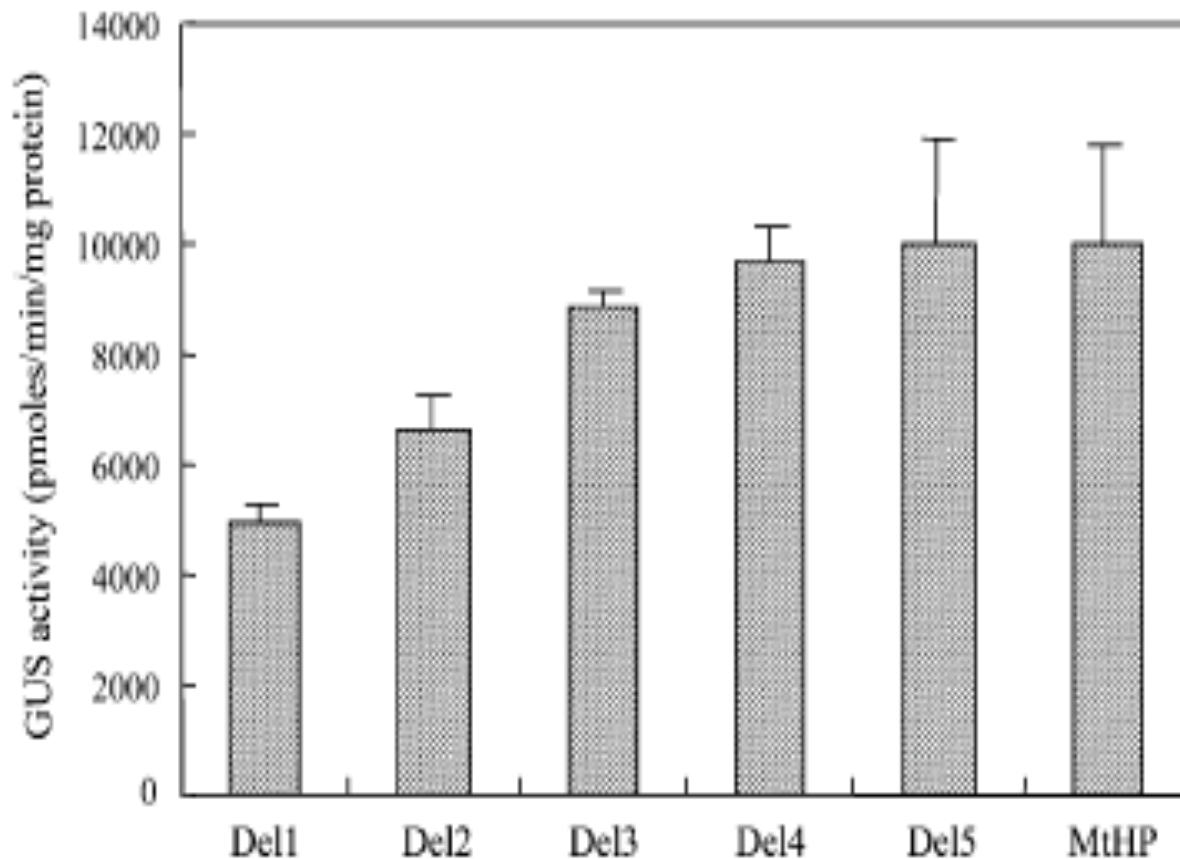


- Le promoteur MtHP a également été caractérisé chez le trèfle blanc et la luzerne.



Activité GUS du trèfle blanc et de la luzerne transformées portant les constructions 35S-GUS et MtHP-GUS

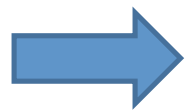
- Pour caractériser le promoteur une série de délétions ont été faite dans la région 5' du promoteur :
107 pb (Del1), 252 pb (Del2), 523 pb (Del3), 827 pb (Del4), 1118 pb (Del5).



Activité GUS d'*Arabidopsis* portant la construction MtHP-GUS avec des régions promotrices de longueurs variables

Conclusion sur le promoteur MtHP

- Profil d'expression similaire à celui du promoteur CaMV35S
- Plus fort niveau d'expression :
 - à tous les stades de développement étudiés
 - dans les différents tissus et organes
- Chez différentes espèces de dicotylédones (Arabidopsis, Luzerne, Trèfle)
- Expression modérée (47% du promoteur complet) avec un fragment très court (107 pb)



Nouvelle alternative au promoteur CaMV35S pour diriger une forte expression constitutive des transgènes.

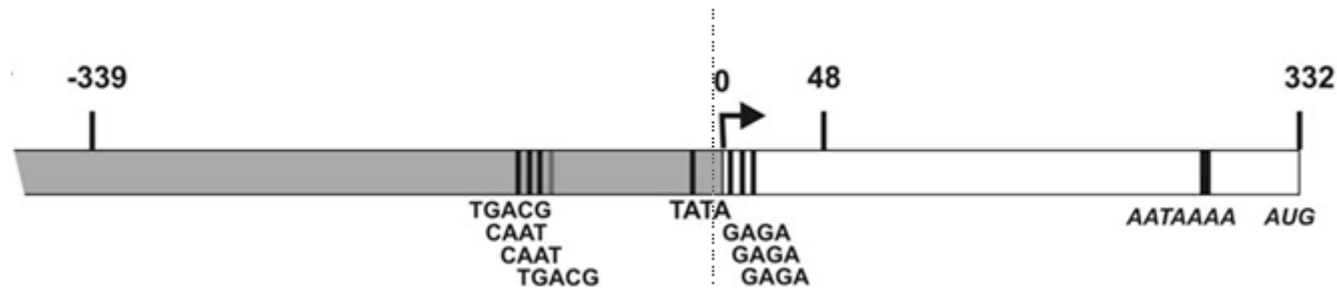


Promoteur CmYLCV

- Cestrum Yellow Leaf Curling Virus
- Fort, constitutif $\Rightarrow$ expression hétérologue de gène
- Cals, méristèmes, tissus végétatifs et reproductifs
(*A.thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Lycopersicon esculentum*,
Zea mays et *Oryza sativa*)
- Niveau $\geq$ promoteurs fréquents en biotechnologie agricole
- Activité forte, constitutive, héréditaire
- Actif chez monocotylédones et dicotylédones
- Outil intéressant $\Rightarrow$ régulation



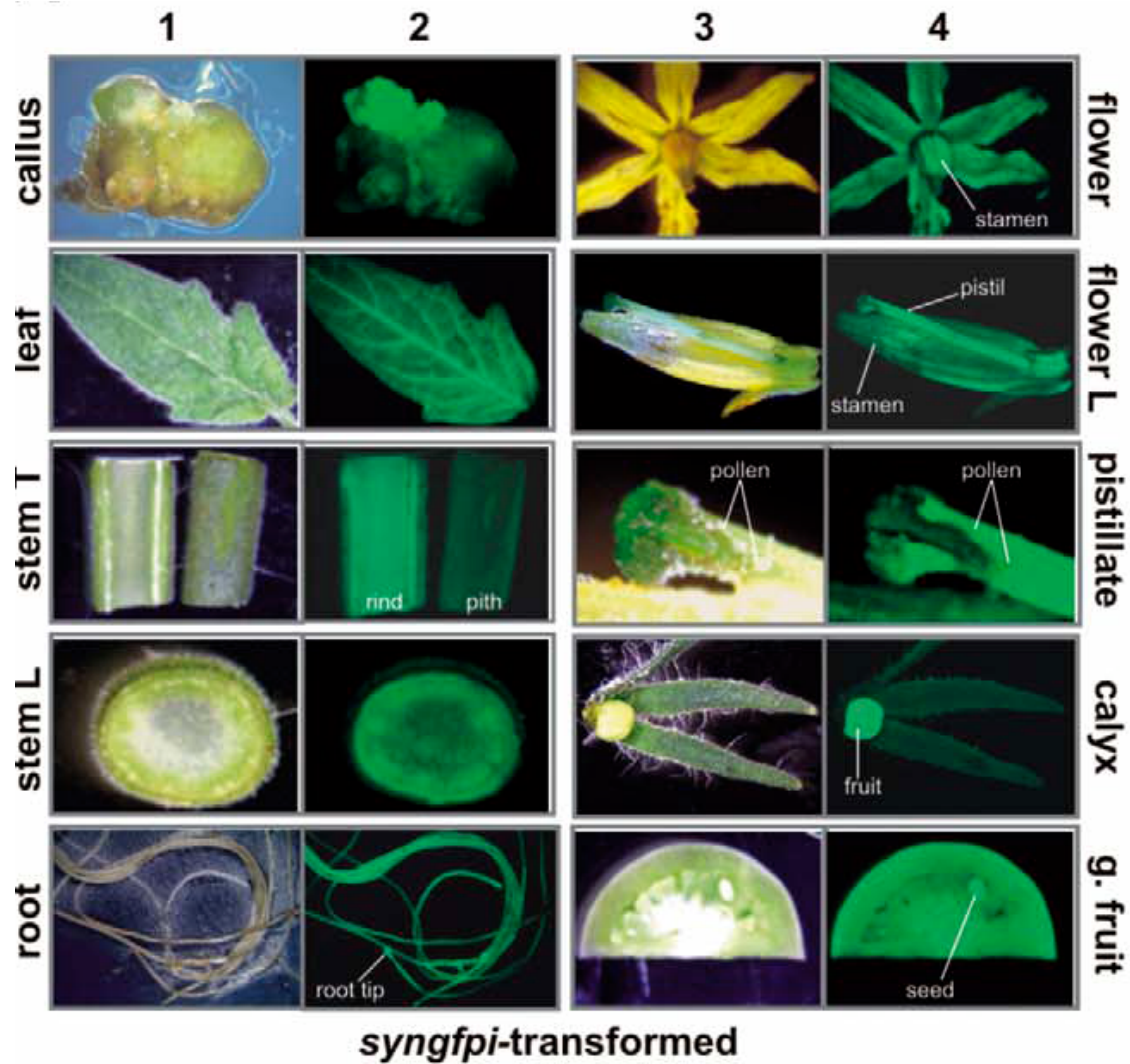
Promoteur CmYLCV : structure



CmYLCV : ADN db de 8253 pb

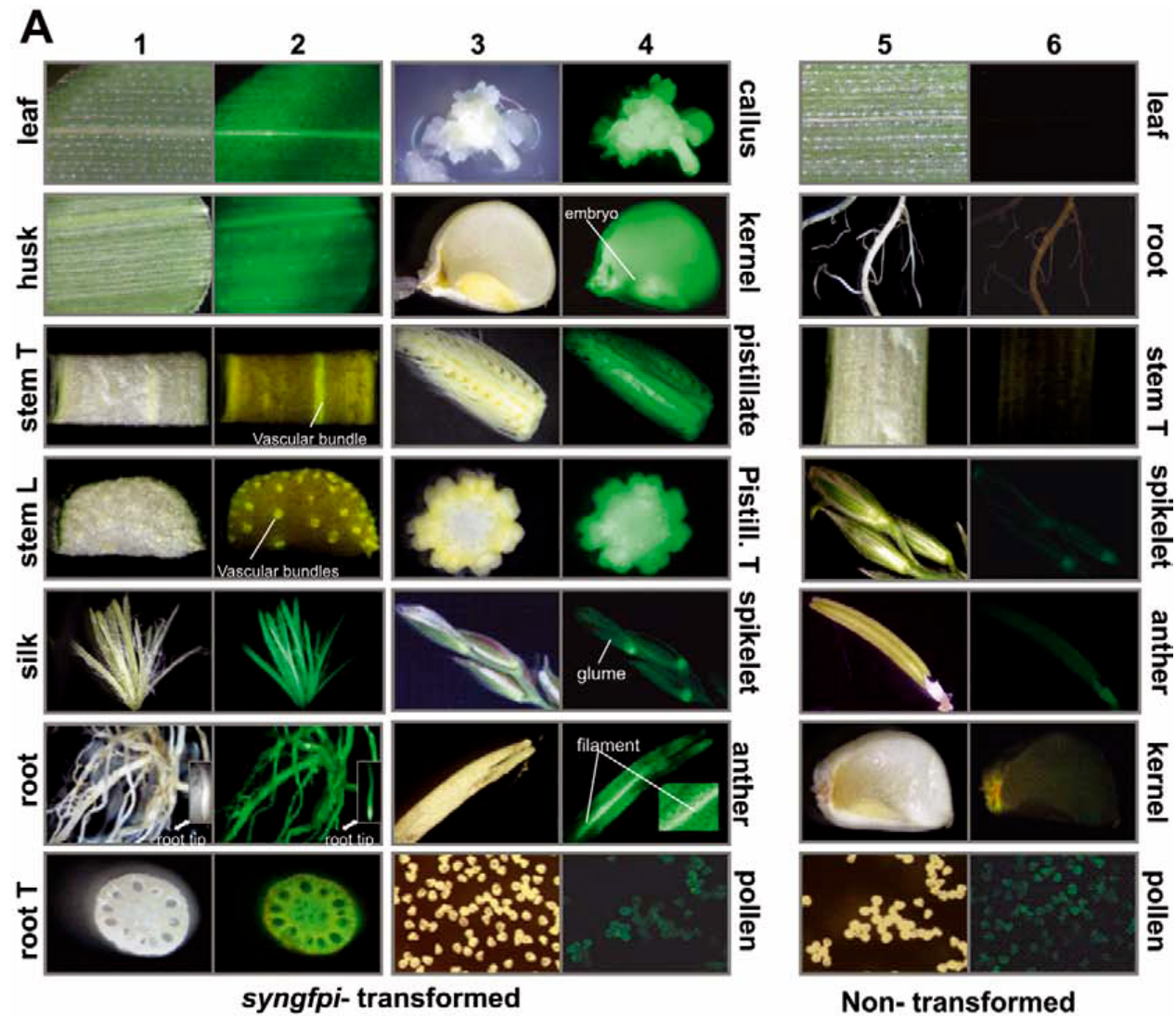
- TATA box : région 6395-6402
- 2 enhancer : TGACG
- 2 CAAT box
- 3 Motifs GAGA (+8 à +35) : fixation de facteurs de régulation

Activité de pCmYLCV chez une dicotylédone (tomate)



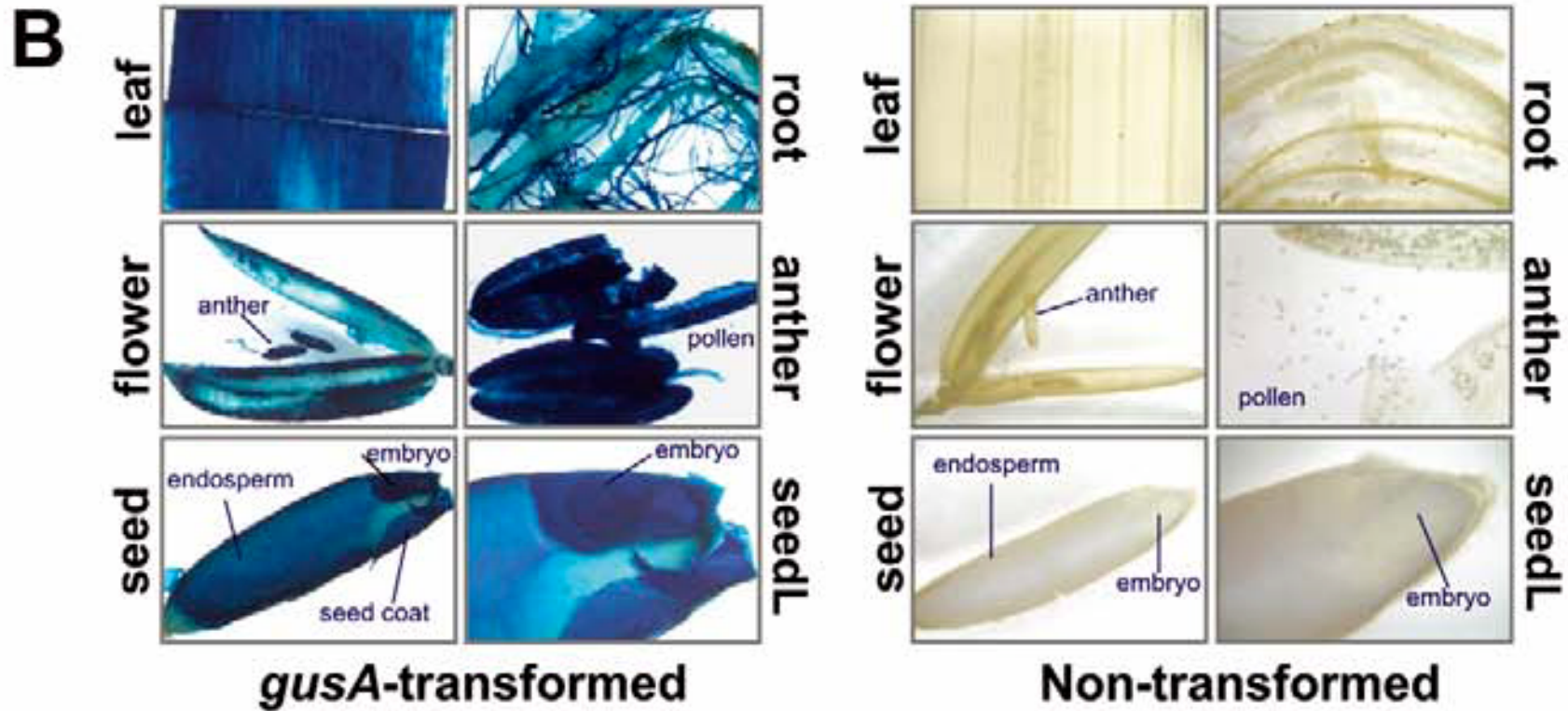
Fluorescence GFP dans différents tissus et organes de la tomate

Activité de pCmYLCV chez les monocotylédones



Fluorescence GFP : *Zea mays* transformé

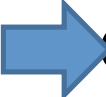
Activité de pCmYLCV chez les monocotylédones



Activité GUS chez *Oryza Sativa* (riz) transformé

Conclusion sur le promoteur CmYLCV

- Expression forte + constitutive, héréditaire
- Utilisé chez les monocotylédones et les dicotylédones
- Activité $\geq$ plupart des promoteur constitutifs
- Activité dans cellules méristématiques et calls
 - ⇒ utile pour expression dans la plupart des tissus
 - ⇒ marqueur sélection pour production de plantes transgéniques
- Effet de copies multiples, gene silencing : $\emptyset$

 Outil : recherche agro et applications biotechnologiques



Autres promoteurs constitutifs utilisés

- Promoteur actin-1 du riz :
rôle dans la formation du cytosquelette,
utilisé dans la transformation du riz
- Promoteur ubiquitin-1 de maïs :
intervient dans la dégradation des protéines,
exprimé dans les plantes transgéniques de blé, de riz et d'orge
- Promoteurs d'*Agrobacterium* de la nopaline synthase (nos), de l'octopine synthase et de mannopine synthase (mas) :
exprimés de façon permanente et faiblement stimulés par une blessure



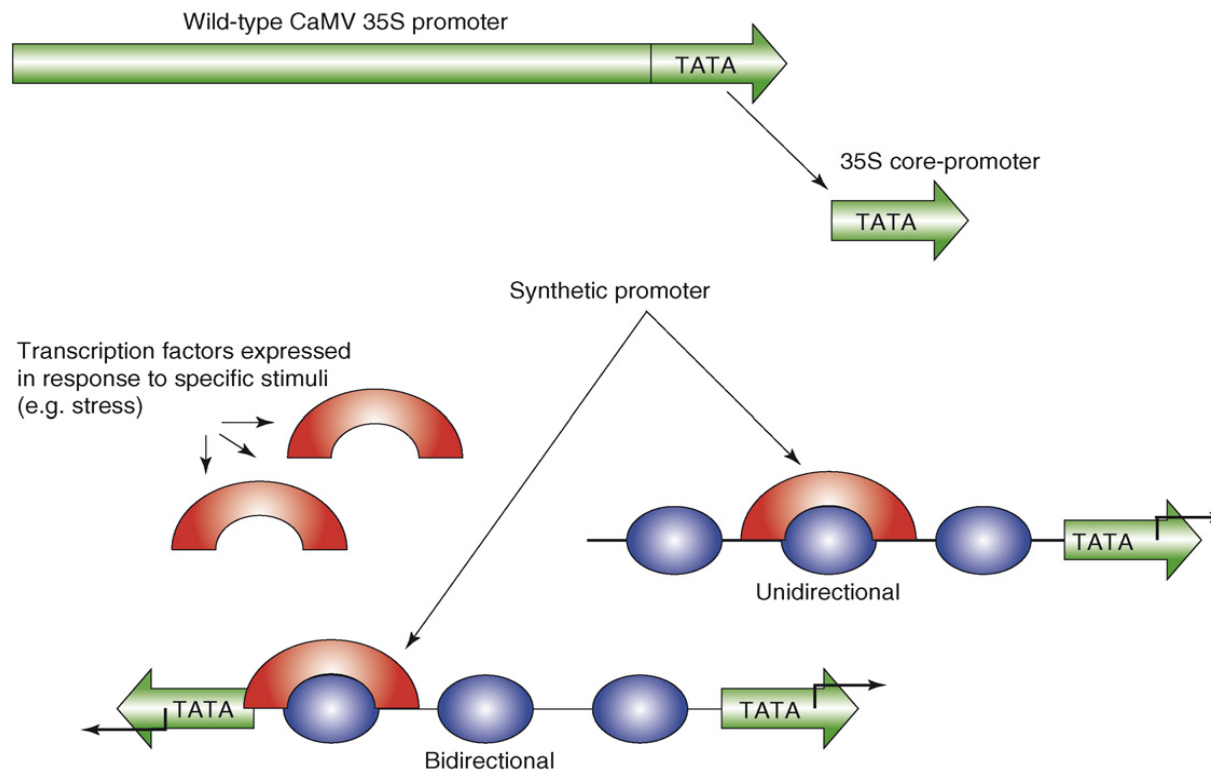
Limites des promoteurs constitutifs

- L'expression d'une protéine toxique peut entraîner la **léthalité**
- La surexpression peut conduire à de sévères **modifications métaboliques** et des **altérations dans le développement** et la **croissance**
- Un excès d'utilisation des promoteurs 35S induit du **silencing**
- **peu spécifiques** et **mal contrôlés** dans l'espace et le temps



Alternatives

- Utilisation de **promoteurs inducibles**
- Utilisation de **promoteurs synthétiques** :
modèle d'expression universel conçu pour initier la transcription des gènes eucaryotes (association région importante CaMV 35S (tata) + régions cis-régulatrices + facteurs de transcription spécifiques)



Références

- Rong-Xiang F, Ferenc N, Shanthi Sivasubramaniam, Nam-Hai C. (1989) Multiple *cis Regulatory Elements for Maximal Expression* of the Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter in Transgenic Plants. *The Plant Cell*, Vol. 1,141-150.
- B. M. Custers , S. C. H. J. Snepvangers, H. J. Jansen, L. Zhang, and M. M. van Lookeren Campagne(1999) The 35S-CaMV promoter is silent during early embryogenesis but activated during nonembryogenic sporophytic development in microspore culture *Protoplasma* 208:257-264.
- Livia Stavalone*, Maria Kononova, Sandra Pauli¹, Antonio Ragozzino³, Peter de Haan, Steve Milligan, Kay Lawton and Thomas Hohn (2003) Cestrum yellow leaf curling virus (CmYLCV) promoter: a new strong constitutive promoter for heterologous gene expression in a wide variety of Crops. *Plant Molecular Biology* 53: 703–713.
- Mariana Obertello · Carole Santi · Mame-Oureye Sy · Laurent Laplaze · Florence Auguy · Didier Bogusz · Claudine Franche (2005) Comparison of four constitutive promoters for the expression of transgenes in the tropical nitrogen-fixing tree *Albizia verticillata* *Plant Cell Rep* 24: 540–548.
- Kai Xiao^{1,3}, Celia Zhang^{1,4}, Maria Harrison² and Zeng-Yu Wang (2005) Isolation and characterization of a novel plant promoter that directs strong constitutive expression of transgenes in plants. *Molecular Breeding* 15: 221–231.
- Mauritz Venter (2007) Synthetic promoters: genetic control through cis engineering. Review *TRENDS in Plant Science* Vol.12 No.3.
- La transgénèse végétale, BioCampus, Elsevier

