



par Bertrand JORDAN

*Changement de registre :
l'actualité oblige*

**Le programme génome humain et le retard mental
lié à la fragilité du chromosome X.
La microdissection revient en force et les YACs avancent.
Et ensuite ?**

RÉFÉRENCES

1. Jordan BR, Mattei JF. Retard mental lié à la fragilité du chromosome X : où en est-on en 1989? *médecine/sciences* 1989; 7: 450-8.
2. Lubs MA. A marker X chromosome. *Ann J Hum Genet* 1969; 21: 231.
3. Riordan JR, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245: 1066-73.
4. Jordan BR. Megabase methods: a quantum jump in recombinant DNA techniques. *Bioessays* 1988; 8: 140-5.
5. Ludecke HJ, Senger G, Claussen U, Horsthemke B. Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification. *Nature* 1989; 338: 348-50.
6. Warren ST, Zhang F, Licamelli GR, Peters J. The fragile X site in somatic cell hybrids: an approach for molecular cloning of the fragile site. *Science* 1987; 237: 420-3.

Cette deuxième « chronique génomique » va illustrer, je l'espère, la façon dont les travaux menés dans le cadre des programmes généraux « Génome humain » peuvent avoir des conséquences importantes au niveau de l'étude d'une maladie génétique donnée. Comme je l'ai dit dans ma première chronique (*m/s n° 1, vol. 6, p. 66*) ces travaux portent principalement sur la cartographie (et non la séquence) du génome. Et il semble bien qu'ils soient proches d'aboutir pour le syndrome du retard mental lié à la fragilité du chromosome X (*m/s n° 7, vol. 5, p. 450*) [1] qui résiste encore aux efforts conjugués des biologistes moléculaires et des cliniciens. Pourtant l'association quasi systématique entre ce retard mental grave et un site fragile à l'interface des deux dernières bandes du bras long du chromosome X est connue depuis vingt ans puisque le premier article le démontrant date de 1969 [2]: la première étape du processus de la génétique inverse a donc été franchie il y a longtemps. A titre de comparaison, cette première étape n'a été atteinte pour la mucoviscidose qu'en 1985 et quatre ans ont suffi pour aller de ce résultat à l'isolement du gène à l'automne 1989 (*m/s n° 8, vol. 5, p. 589*) [3]. Il semble bien pourtant que des résultats acquis tout récemment laissent espé-

rer un clonage prochain de la région du site fragile, ce qui ne résoudra pas pour autant toutes les questions sur la nature et le mécanisme de cette maladie génétique, mais correspondra néanmoins à un progrès décisif dans son étude et son diagnostic. En effet, lors d'un atelier sur le chromosome X tenu récemment à Houston (USA) dans le cadre du programme « Génome Humain » sous l'égide du NIH (*national institute of health*) et du DOE (*department of energy*), il a été largement question de ce syndrome ou plutôt des moyens mis en œuvre pour l'aborder au niveau moléculaire. Le problème est apparemment simple: l'analyse génétique nous dit que le gène impliqué est dans (ou au voisinage immédiat) du site fragile présent chez les malades à l'interface des bandes q27 et q28 du chromosome X. Il s'agit alors de cloner la séquence d'ADN correspondant à ce site fragile et à son voisinage, puis d'identifier les gènes qui s'y trouvent et de rechercher lequel d'entre eux est absent, inactif ou muté chez les patients. Le problème est que l'approche en termes de clonage de ce site fragile s'est avérée très difficile et que jusqu'à tout récemment les sondes les plus proches en étaient séparées par une distance génétique de dix à quinze centimorgans, donc *a priori*

par autant de milliers de kilobases en ADN, distance énorme même avec les méthodes modernes d'analyse de l'ADN [4]. Les efforts conjugués de plusieurs équipes sont en train de réduire considérablement ces distances grâce à l'utilisation des méthodes les plus performantes (électrophorèse en champs pulsé, saut le long du chromosome, clonage dans la levure, microdissection...) et ce syndrome constitue un des « fronts » actuellement les plus actifs de la « nouvelle génétique ». Lors d'une discussion informelle sur l'échange de sondes et de réactifs touchant à ce sujet, pas moins de douze équipes étaient représentées, et il y avait quelques absents...

Qu'y a-t-il donc de nouveau depuis notre récent article dans cette revue ? Sur le plan des sondes, d'abord, le travail lourd et ingrat qui consiste à isoler des clones provenant, par exemple, de la région Xq24-Xq28 du chromosome X (car tirés d'une banque construite avec un hybride homme-hamster ne contenant que ce morceau de chromosome humain), puis à les tester l'un après l'autre contre un « panel » de cellules hybrides pour préciser leur origine, a fourni de nouvelles sondes dont les plus proches, RNI et q27, VK21 et U6.2 en q28, sont à quelques centimorgans (deux à cinq) du site fragile. Cela réduit d'autant la distance à parcourir, même si elle se compte encore en milliers de kilobases. Les efforts continuent pour engendrer de nouvelles sondes, en particulier par l'approche très séduisante qu'est la microdissection : il s'agit tout simplement de découper un petit morceau du chromosome X, puis, après amplification de l'ADN contenu, par PCR (une PCR un peu particulière puisque la séquence à amplifier étant inconnue, le choix des amorces pose problème ; mais il existe des astuces pour contourner cette difficulté), d'utiliser cet ADN comme sonde pour la suite du travail. Récemment publiée par le groupe de Bernard Horsthemke [5], cette méthode est actuellement appliquée au site fragile par l'équipe de Kay Davies (Oxford, GB) et d'une façon un peu différente faisant appel à la dissection par faisceau laser par notre groupe en collaboration avec une équipe japonaise (Joh. E. Ikeda, Tsukuba). Dans les

deux cas des clones ont été obtenus ; leur analyse s'avère délicate, mais ces difficultés techniques seront sans doute bientôt surmontées et ces sondes seront peut-être la voie d'accès privilégiée au site fragile.

Par ailleurs, et c'est le deuxième élément nouveau, l'analyse systématique de cette région du chromosome X par recouvrement de segments d'ADN clonés dans des cosmides ou mieux, dans des YAC (*yeast artificial chromosomes*) a considérablement progressé. La région Xq24-Xq28 (estimée représenter environ 50 mégabases en tout) est contenue dans une collection de 800 YACs d'une taille moyenne de 200 à 300 kilobases construite dans le laboratoire de David Schlessinger à Saint-Louis (MI, USA) ; cette banque a été étudiée de façon détaillée avec toutes les sondes disponibles sur la région, et elle est déjà plus qu'à moitié couverte par des YACs identifiés et souvent reliés les uns aux autres pour former des *contigs* couvrant jusqu'à deux mégabases. Le jour, peut-être prochain, où un tel *contig* comprendra la région du site fragile (c'est-à-dire reliera une sonde située d'un côté de ce site à une sonde située de l'autre), un grand pas aura été franchi : on ne saura peut-être pas immédiatement lequel de ces YACs porte le site fragile, mais au moins saura-t-on qu'il s'agit de l'un des cinq ou dix YACs constituant le *contig*, YACs que l'on pourra préparer et étudier en détail. Le groupe de David Schlessinger n'est d'ailleurs pas le seul dans cette affaire : les équipes de Hans Lehrach (Londres), de David Nelson (Houston, TX, USA), de Ben Costra (Rotterdam, Pays-Bas), pour ne citer qu'elles, ont construit des bibliothèques de YAC limitées à cette région du chromosome X dans le but explicite de cloner le site fragile. D'autres (Anne-Marie Poustka, Heidelberg, RFA) ont établi de telles bibliothèques à partir de l'hybride établi par Steve Warren (Atlanta, GE, USA) dans lequel la jonction homme-hamster est censée se faire dans le site fragile [6], afin de cibler encore plus cette recherche. Et par ailleurs, les « aligneurs de cosmides », les laboratoires qui recherchent avec des méthodes quasi industrielles les recouvrements entre les quelques milliers de cosmides contenus dans

une banque du chromosome X font eux aussi de rapides progrès (Steve Warren, par exemple, avec une banque de Xq28, ou Hans Lehrach pour l'ensemble du chromosome).

Tout ce travail devrait donc bientôt aboutir à l'obtention d'un ou plusieurs clones (cosmides ou, plus vraisemblablement YAC) contenant la séquence du site fragile — à moins que cette séquence ne soit décidément inconcluable dans les cosmides et dans les YAC ce qui est toujours possible. Pourra-t-on pour autant considérer que l'histoire du retard mental lié à la fragilité du chromosome X est terminée ? Certainement pas, il restera même beaucoup à faire. En ce qui concerne le site fragile, et compte tenu de notre totale ignorance sur la nature de la séquence d'ADN qui sous-tend ce phénotype cytologique, il ne sera sans doute pas évident de la reconnaître : peut-être faudra-t-il introduire les YACs susceptibles de contenir le site fragile dans des cellules en culture (ceci est maintenant possible en fusionnant des protoplastes de levure avec les cellules), en espérant pouvoir observer l'apparition d'un site fragile au point d'intégration du YAC dans le chromosome ? Quant au but le plus important de tout ce travail, l'élucidation de la nature du défaut responsable du syndrome de Martin-Bell (l'autre nom du retard mental lié à la fragilité du chromosome X), il reste difficile de prédire quand et comment il sera atteint. La génétique nous indique que la clef de cette énigme (ou une des clefs...) se trouve certainement dans (ou au voisinage immédiat) du site fragile : une fois celui-ci atteint, une fois que les quelques centaines de kilobases d'ADN constituant cette région et son voisinage immédiat seront clonés et disponibles sous forme d'une collection de cosmides ou de YACs, une étude détaillée permettra de répertorier les gènes présents dans cette zone, d'étudier leur expression dans différents tissus et de rechercher une différence à ce niveau entre l'ADN de malades et l'ADN normal. Mais cette recherche ne sera pas simple, d'autant plus que l'on n'a aucune idée du type cellulaire dans lequel peut s'exprimer le gène en question ni de la nature du produit : pour la myopathie de Duchenne

nous savions au moins qu'il fallait chercher du côté du muscle, et pour la mucoviscidose qu'il y avait une histoire de canaux ioniques défail-lants... Rien de moins spécifique, en revanche, qu'un retard mental dont la cause première peut être aussi bien l'absence d'une enzyme (comme dans la maladie de Lesch-Nyhan due à l'absence de l'enzyme HPRT) que, par exemple, une subtile modifica-tion d'une protéine d'adhérence intracellulaire impliquée dans la mise en place de connexions neuro-nales... Et les bizarreries du mode de transmission de ce syndrome font penser que nous ne sommes pas au bout de nos surprises. Une chose est certaine, en revanche, c'est que le clonage du site fragile améliorera considérablement la fiabilité du dia-gnostic prénatal de cette maladie : on pourra en effet disposer de sondes très proches du gène responsable de la maladie (même si ce gène reste à identifier) et les incertitudes de dia-gnostic dues à la possibilité de recombinaison entre le *locus* étudié par la sonde et le *locus* de la maladie devraient ainsi être levées, donnant ainsi à la génétique médicale les moyens d'apporter une réponse fia-ble aux couples « à risque ». S'agis-sant d'une maladie qui touche envi-ron un enfant mâle sur 1 500, ce ne sera pas un résultat négligeable...

Et ce résultat sera dû en grande partie aux investissements faits dans la construction de bibliothèques YAC et dans leur analyse systématique, investissements qui trouveront là (et dans d'autres cas à venir) une bonne partie de leur justification ■

Bertrand Jordan

Directeur de recherche au Cnrs, res-ponsable du groupe « génétique moléculaire humaine », CIML, Inserm/Cnrs, case 906, 13288 Mar-seille Cedex 9, France.
