

D'autres méthodologies pour le génome humain ?

médecine/sciences a fait récemment mention, dans sa rubrique *Nouvelles*, à l'excellente proposition faite par Andrei Mirzabekov de séquencer l'ADN génomique autrement [1]. Le projet de séquençage du génome humain, qui est heureusement ramené à des proportions bien plus modestes que celles qui étaient envisagées au début, passe par l'établissement de bonnes cartes génétique et physique, tout le monde s'accorde à le reconnaître aujourd'hui. Des techniques se sont développées dans les années récentes pour cloner le génome en grands fragments d'ADN de quelques centaines de kilobases grâce aux chromosomes artificiels de levure (YAC). Les cosmides gardent cependant toutes leurs chances de partager encore avec les YAC les faveurs des chercheurs de ce domaine. Si la localisation sur les chromosomes des séquences d'ADN contenues dans ces clones — cosmides ou YAC — ne pose guère de problèmes aujourd'hui, grâce aux techniques d'hybridation *in situ*, il n'en est pas de même pour l'ordonnement de ces clones les uns par rapport aux autres, ce que l'on nomme, dans le jargon de la génétique moléculaire, la construction de *contigs*. Cette opération est absolument indispensable si l'on veut savoir comment progresser dans l'analyse physique du génome. Plusieurs méthodes ont été proposées. Elles sont cependant fastidieuses à mettre en œuvre, d'application non générale et les données qui en résultent difficilement vérifiables par la communauté scientifique du domaine. Olson *et al.* [2] ont, de plus, proposé, en parallèle, une approche qui prétend à l'universalité : il s'agit de la définition de points de référence sur le génome, les *sequence tagged sites*. Sans nier l'intérêt d'une telle proposition et des méthodes actuellement utilisées, je crois cependant qu'il est possible de proposer une approche alternative qui aurait l'avantage de donner à l'initiative du génome humain un tour plus coopératif, plus efficace et plus convivial.

m/s n° 4, vol. 8, avril 92

COURRIER



Récemment, la société Biolabs a mis sur le marché une nouvelle enzyme de restriction (Bcg I) dont le site de reconnaissance et le mode de coupure de l'ADN sont indiqués sur la *figure 1*. La propriété singulière de cette endonucléase est que l'ADN est coupé deux fois, de part et d'autre de son site de reconnaissance, libérant de la sorte des fragments d'ADN génomique de 32 paires de bases, facilement séparables du reste et facilement clonables. Ces fragments d'ADN n'ont évidemment en commun que leur taille et les six nucléotides correspondant au site de reconnaissance de l'enzyme. Ils auront donc 26 nucléotides sur 32 qui seront différents, ce qui est plus que suffisant pour assurer une discrimination correcte de ces fragments, les uns des autres, par hybridation. Le site de reconnaissance de Bcg I a une répartition non biaisée dans le génome humain qui ne la distingue pas, de ce point de vue, des autres enzymes à sites de reconnaissance à 6 nucléotides, si bien que l'on obtient, en moyenne, des fragments d'ADN de 5 kilobases. Plusieurs centaines de milliers de fragments de 32 paires de bases seront donc engendrés par l'action de cette enzyme sur l'ADN du génome total humain, murin...

Notre proposition rejoint à ce point

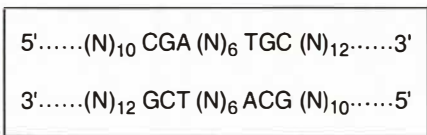


Figure 1. Site reconnu par l'enzyme Bcg1 qui coupe de part et d'autre de celui-ci, engendrant des oligonucléotides de 32 paires de bases.

celle de A. Mirzabikov. On peut constater qu'elle a également quelques points communs avec celle de Hans Lehrach, dont elle s'est partiellement inspirée [3]. Nous proposons, après clonage de ces fragments, de les fixer à hautes densités sur un support solide où ils pourront être hybridés avec les clones cosmides ou YAC que l'on veut ordonner en *contigs*. Chaque clone hybridera avec un certain nombre de fragments. Leurs chevauchements, donc leur caractère contigu, sera établi par la communauté de plusieurs points d'hybridation entre deux ou plusieurs clones (*figure 2*). Les conditions techniques d'une telle approche sont décrites dans la lettre que nous avons récemment publiée [4]. Elle offre évidemment l'avantage de pouvoir être entièrement automatisable et, autre avantage, décisif celui-là, de pouvoir faire partager à l'ensemble des chercheurs le même matériel pour la construction de *contigs*.

En effet, une fois le clonage établi, les clones seront stockés et leur répartition pourra être réalisée par un robot sur des supports solides, dupliquables à volonté et disponibles pour l'ensemble de la communauté scientifique. Chacun disposera ainsi de la même base pour la construction de *contigs*. Si l'on se fonde sur la manière de fonctionner du CEPH — et cela semble tout à fait adapté à ce projet —, les résultats pourraient être insérés dans une banque de données commune à tous les contributeurs. Chacun s'exposera de la sorte à la vérification simple de ses résultats par quiconque, ce qui constitue une bonne garantie contre un maximum de données erronées et également contre la duplication d'efforts qui, somme toute, présentent un caractère de plus en plus fastidieux et limité du point de vue strictement scientifique. De plus, la recherche de *sequence tagged sites* n'aurait plus de raison d'être puisque ces points de repère sur le génome seront disponibles physiquement pour l'ensemble des chercheurs. On pourra, de la sorte, remplir les cases du génome de façon progressive et contrôlable, la banque de données servant en permanence de référence.

Il est un autre point que je souhaite-

S E T T E M B R E

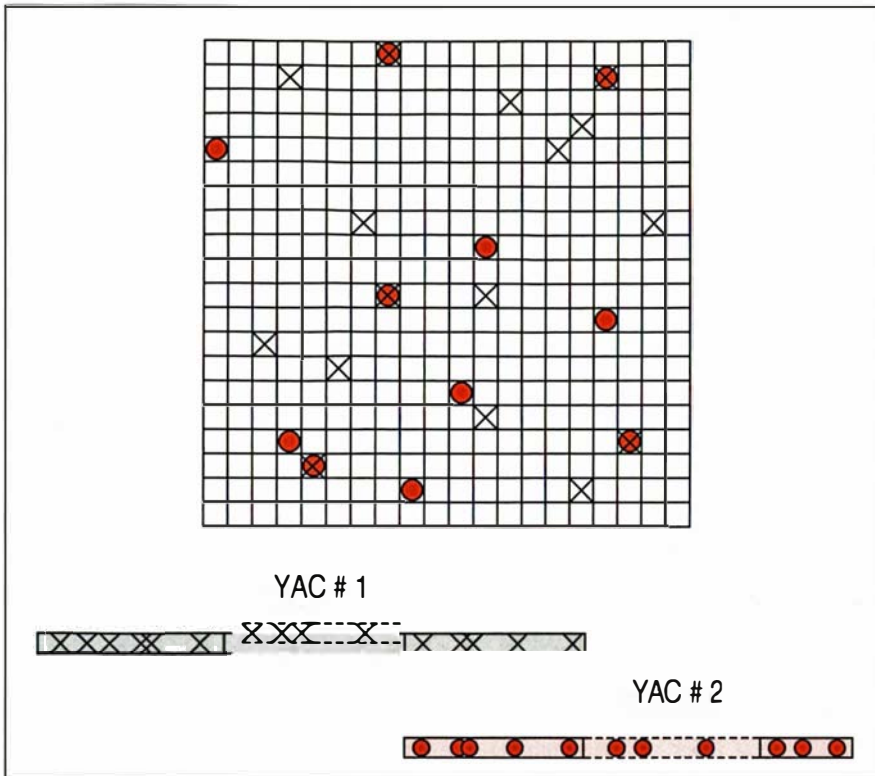


Figure 2. Exemple d'établissement de contigs de YAC par hybridation à des fragments de restriction Bcg1. Deux chromosomes artificiels de levure (YAC) sont représentés, avec leurs sites Bcg1 schématisés par des croix sur l'un et des cercles rouges sur l'autre, seules les extrémités sont développées. Ces YAC sont hybridés à des « cartes » faites de filtres sur lesquels a été immobilisé de l'ADN de fragments Bcg1 génomiques, clonés et disposés en banques « ordonnées ». L'hybridation de deux YAC à certains fragments identiques permet de mettre en évidence leur chevauchement partiel ; elle permet aussi d'ordonner les sites Bcg1.

rais particulièrement souligner et qui pose problème pour le développement du projet Génome humain. En effet, beaucoup de régions du génome sont délaissées parce qu'elles n'ont pas, pour le moment, été reconnues comme importantes. *A contrario*, certaines autres régions ont un succès fou, en particulier les chromosomes 21, X et Y pour lesquels beaucoup de collègues ont les mêmes programmes de recherches. Les régions du génome ainsi délaissées correspondront aux fragments d'ADN qui n'hybrideront pas avec les cosmides ou YAC isolés. Il serait alors possible d'utiliser ces fragments pour rechercher dans les banques existantes les clones YAC correspondants et ainsi de pouvoir explorer de façon systématique le génome dans son intégralité.

La faisabilité d'une telle démarche reste à démontrer. Si des collègues

pensent qu'une telle approche mérite d'être testée, je serais heureux d'en discuter avec eux aux fins d'examiner si une initiative dans ce sens pourrait être prise ■

1. Briand P. Le séquençage de l'ADN sur « carte à puce ». *médecine/sciences* 1992 ; 8 : 89.
2. Olson M, Hood L, Cantor C, Botstein D. A common language for physical mapping of the human genome. *Science* 1989 ; 245 : 1434.
3. Poutska A, Pohl T, Barlow DP, et al. Molecular approaches to mammalian genetics, vol. II. Cold Spring Harbor : Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 1986 ; 131-9.
4. Roizès G, Charlieu JP, Marçais B, Bellis M. Use of the DNA fragments generated by a restriction enzyme (Bcg I) for the construction of overlapping clone libraries. *DNA Sequence. J DNA Sequ Mapp* 1991 ; 2 : 65-7.

Gérard Roizès

LP 8402 Cnrs, Inserm U.249, Institut de biologie, 34060 Montpellier Cedex, France.

■■■ Dystrophie de Duchenne et dystrophie de Fukuyama : quelle relation ? La dystrophie musculaire congénitale de Fukuyama (FCMD) est une affection récessive autosomique, endémique au Japon, qui se distingue de celle de Duchenne par l'existence, en dehors du processus myopathique, d'une hypotonie souvent néonatale et d'un retard mental profond associé à des anomalies des circonvolutions cérébrales et cérébelleuses (polymicrogyrie ou pachygyrie). Le gène défectueux dans cette maladie est inconnu. Un cas de patient présentant cette affection associée à une absence totale de dystrophine musculaire avait été précédemment rapporté [1]. Après analyse de 22 autres cas de patients présentant une maladie de Fukuyama, l'équipe de Kunkel (Boston, MA, USA) et celle de Arahata (Tokyo, Japon) vient de révéler l'existence de deux nouveaux cas semblables. La fréquence de ces observations, bien supérieure à celle qu'on aurait attendue en cas d'association fortuite de ces deux maladies, fait suggérer aux auteurs une hypothèse intéressante : les patients décrits ici seraient en réalité hétérozygotes pour la maladie récessive et, comme tous les garçons myopathes de Duchenne, hémizygotés pour l'anomalie du gène de la dystrophine. Ainsi, le phénotype clinique présenté par ces patients serait plus proche de la maladie de Fukuyama que de celle de Duchenne ; cependant, tous les signes paracliniques n'y seraient pas retrouvés puisque la résonance magnétique nucléaire ne met en évidence, dans ces cas particuliers, qu'une atrophie corticale sans micropoly- ou pachygyrie. Cette hypothèse suggère par ailleurs qu'il existe un lien entre la dystrophine et le produit du gène FCMD. Quelle est la nature de ce lien ? Il est tentant d'imaginer que ces deux protéines interagissent entre elles et jouent un rôle dans le maintien de l'appareil cytosquelettique musculaire et peut-être même neuronal puisque, rappelons-le, la dystrophine est présente dans les neurones pyramidaux du cortex cérébral et dans les cellules de Purkinje.

[1. Arahata K, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 ; 86 : 7154-8.]

[2. Beggs AH, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 623-7.]