

par Bertrand JORDAN

La montée en puissance des YAC

**Les chromosomes artificiels de levure, un grand espoir... qui a mis du temps à se concrétiser. Banques incomplètes, petits clones, difficultés d'analyse... tout s'arrange avec le temps (et beaucoup de travail).
Le transfert de YAC et les études fonctionnelles...
des perspectives passionnantes.**

RÉFÉRENCES

1. Burke DT, Carle GF, Olson MV. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* 1987 ; 236 : 806-12.
2. Jordan BR. YAC Power Bioessays, in press, 1990.
3. Brownstein BH, Silverman GA, Little RD. Isolation of single-copy human genes from a library of yeast artificial chromosome clones. *Science* 1989 ; 244 : 1348-51.
4. Wada M, Little RD, Abidi F, et al. Human Xq24-Xq28 : Approaches to mapping with yeast artificial chromosomes. *Am J Hum Genet* 1990 ; 46 : 95-106.
5. Green ED, Olson M. Systematic screening of yeast artificial-chromosome libraries by use of the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990 ; 87 : 1213-7.
6. Silverman GA, Ye RE, Pollock KM, Sadler JE, Korsmeyer SJ. Use of yeast artificial chromosome clones for mapping and walking within human chromosome segment 18q21.3. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 ; 86 : 7485-9.
7. Kohara Y, Akiyama K, Isono K. The physical map of the whole *E. Coli* chromosome : application of a new strategy for rapid analysis and sorting of a large genomic library. *Cell* 1987 ; 50 : 495-508.
8. Nelson DL, Ledbetter SA, Corbo L, et al. Alu polymerase chain reaction : a method for rapid isolation of human-specific sequences from complex DNA sources. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 ; 86 : 6686-90.

Quand Burke, Carle et Olson publièrent courant 1987 [1] le premier article montrant que des grands segments d'ADN humain pouvaient être propagés sous forme de chromosomes artificiels dans la levure (Yeast Artificial Chromosome ou YAC), leurs résultats ne passèrent pas inaperçus : la possibilité ainsi ouverte de cloner des segments d'ADN longs de plusieurs centaines de kilobases (figure 1) correspondait à l'évidence à un progrès décisif pour l'étude du génome humain jusque-là très handicapée par la faible capacité des meilleurs vecteurs de clonage (45 kilobases pour les cosmides) par rapport à la taille de ce génome (3 millions de kilobases) et aux plus petites distances génétiques mesurables (en pratique quelques centimorgans soit quelques milliers de kilobases). L'enthousiasme régnait donc et de nombreux laboratoires entreprirent de construire de telles banques à l'aide des vecteurs et des souches généreusement fournis par Burke et coll. [1]. En fait les premiers résultats furent assez décevants : la levure ne se traite pas comme *Escherichia coli*, la manipulation préparative d'ADN de très grande taille est loin d'être évidente, le repérage et la vérification des clones obtenus sont assez laborieux. Les premières banques étaient donc très incomplètes, contenant un nombre de clones insuffisant pour couvrir le génome, et les segments d'ADN humain contenus dans ces chromosomes artificiels s'avèrent avoir une taille décevante, souvent de l'ordre de 50 à 150 kilobases. De plus l'analyse des clones YAC posait quelques problèmes aux chercheurs. Les difficultés se situent à deux niveaux : la taille des segments clonés qui implique l'utilisation des champs pulsés, et surtout la faible quantité d'ADN disponible : alors qu'un segment cloné dans un phage ou un cosmide peut assez facilement être produit à l'échelle du milligramme, la purification d'un YAC de 200 kilobases par rapport aux 15 000 kilobases d'ADN de levure présents dans la même cellule ne peut être réalisée que par électrophorèse préparative en champs pulsés ce qui fait qu'en pratique préparer quelques microgrammes d'un YAC demande déjà un temps et un travail non négligeables. Néanmoins, l'enjeu, les possibilités offertes par ce nouveau système de clonage étaient suffisam-

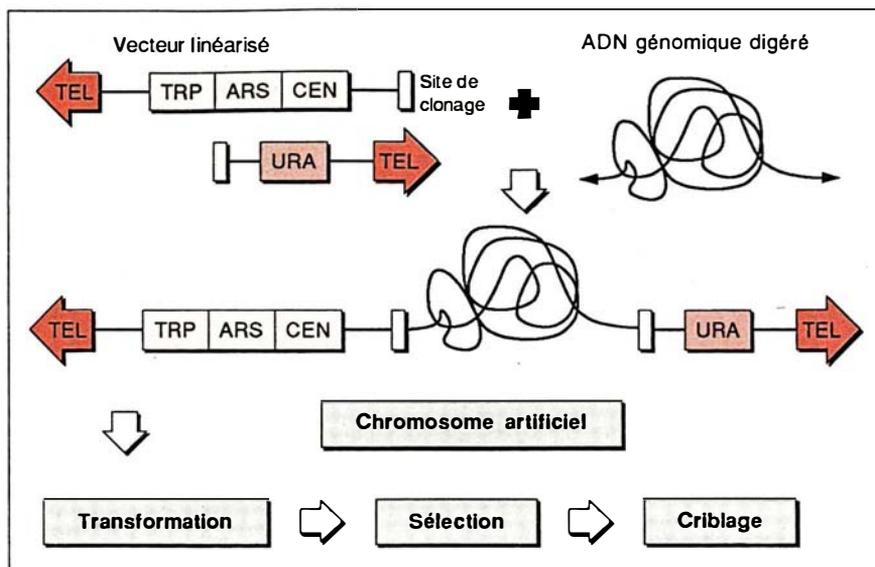


Figure 1. **Clonage de grands fragments d'ADN sous forme de chromosomes artificiels de levure (YAC, Yeast Artificial chromosomes).** Le principe de ce système consiste à munir de grands fragments d'ADN exogène (humain par exemple) de tous les éléments qui permettent leur propagation dans la levure : centromère (CEN), origine de réplication (ARS pour Autonomously Replicating Sequence), télomères (TEL). Ces éléments préalablement clonés à partir de la levure ou de Tetrahymena sont produits — associés à des marqueurs de sélection comme URA et TRP — sous forme de plasmide dans des bactéries puis, après coupure enzymatique, liés à de grands fragments d'ADN (100-1 000 kilobases) avant introduction dans des protoplastes de levure *Saccharomyces cerevisiae*. Ces constructions sont alors répliquées par la levure comme s'il s'agissait d'un chromosome endogène. On peut ainsi construire des banques dans lesquelles chaque clone de levure contient un segment d'ADN humain de grande taille propagé sous forme de chromosome artificiel [1]. Figure due à Giovanna Chimini (CIML).

ment importants pour qu'un certain nombre d'équipes persévèrent, améliorent les techniques et en arrivent peu à peu à la constitution de banques de bonne qualité dont certaines ont déjà été largement exploitées. Il paraît maintenant certain que cette méthode va jouer un rôle déterminant dans la cartographie physique du génome humain (et de quelques autres génomes, sans doute) et je vais faire rapidement le point sur son état actuel, un point largement basé sur un petit colloque tenu en décembre dernier à Houston (Texas, USA) et qui a fait l'objet d'un article plus détaillé dans BioEssays [2] et sur un atelier européen INSERM plus récent (Cartographie Physique des Génomes Complexes) qui a eu lieu fin mars à Hohwald près de Strasbourg.

Faisons d'abord le point sur les banques YAC existantes. La plus exploitée et la mieux connue est certaine-

ment celle construite à Saint-Louis (USA) par les groupes de Maynard Olson et de David Schlessinger. Il existe en fait à Saint-Louis deux banques YAC, une banque générale [3] couvrant l'ensemble du génome avec environ 60 000 clones de taille moyenne 300 kilobases (donc six fois le génome), et une banque spécifique de la région Xq24-Xq28 [4], construite à partir d'une cellule hybride, qui contient environ 800 clones de taille moyenne 200 kilobases et couvre donc trois fois cette région que l'on estime à environ 50 mégabases (50 000 kilobases). Ces banques sont exploitées sur place sur une base collaborative, criblées par hybridation ou par PCR [5]; elles ont déjà « vu » chacune plus d'une centaine de sondes et les clones YAC ainsi identifiés ont été fournis aux laboratoires d'où provenaient les sondes. Comme je l'ai indiqué récemment (*Chroniques Génomiques*, m/s n°2,

vol. 6, p. 157) les YAC identifiés représentent déjà plus de la moitié de la région Xq24-Xq28 et l'obtention de grands « contigs » de YAC la couvrant entièrement est sans doute assez proche. D'autres bonnes banques YAC ont été obtenues, à différents endroits aux USA [6], en Grande-Bretagne par Anthony Monaco et Hans Lehrach (ICRF, Londres) qui ont choisi de mettre au point le criblage à haute densité de banques contenant un grand nombre de relativement petits YAC (100 à 200 kb) et par Rakesh Anand (ICI) qui a assemblé une bonne banque humaine générale avec des inserts de 300 à 400 kb, en France et en particulier au CEPH (Centre d'Étude du Polymorphisme Humain) où là aussi une bonne banque générale (50 000 clones de taille moyenne 400 kb environ) a été obtenue.

Un élément nouveau et très intéressant est la possibilité de construire des YAC à partir de chromosomes séparés dans un appareil de tri cellulaire : bien plus rapide que la méthode à partir d'hybrides somatiques — où l'on jette littéralement 99 % des clones construits, ceux qui contiennent de l'ADN de hamster ou de souris — cette technique laisse espérer la construction d'une série de banques spécifiques de chaque chromosome humain. De telles banques auront une très grande utilité, en particulier pour l'établissement de la carte physique : l'alignement d'un millier de YACs pour couvrir un chromosome humain, à la manière de Kohara pour *Escherichia Coli* avec des phages [7], fournira une carte bien plus fiable que l'analyse par champs pulsés, bien plus utile aussi puisque chaque segment sera cloné et accessible.

Au niveau l'analyse des clones YAC, et compte tenu des difficultés évoquées ci-dessus, les méthodes ont dû être adaptées, en faisant par exemple le maximum de choses directement sur la levure entière (cartographie du clone avec utilisation de sondes spécifiques de chaque extrémité, et même hybridation *in situ* non radioactive) et en mettant au point différentes astuces à base de PCR et de sondes répétées mais spécifiques de l'ADN humain (les séquences Alu, en général nuisibles mais ici utilisées à bon escient) [8] pour obtenir

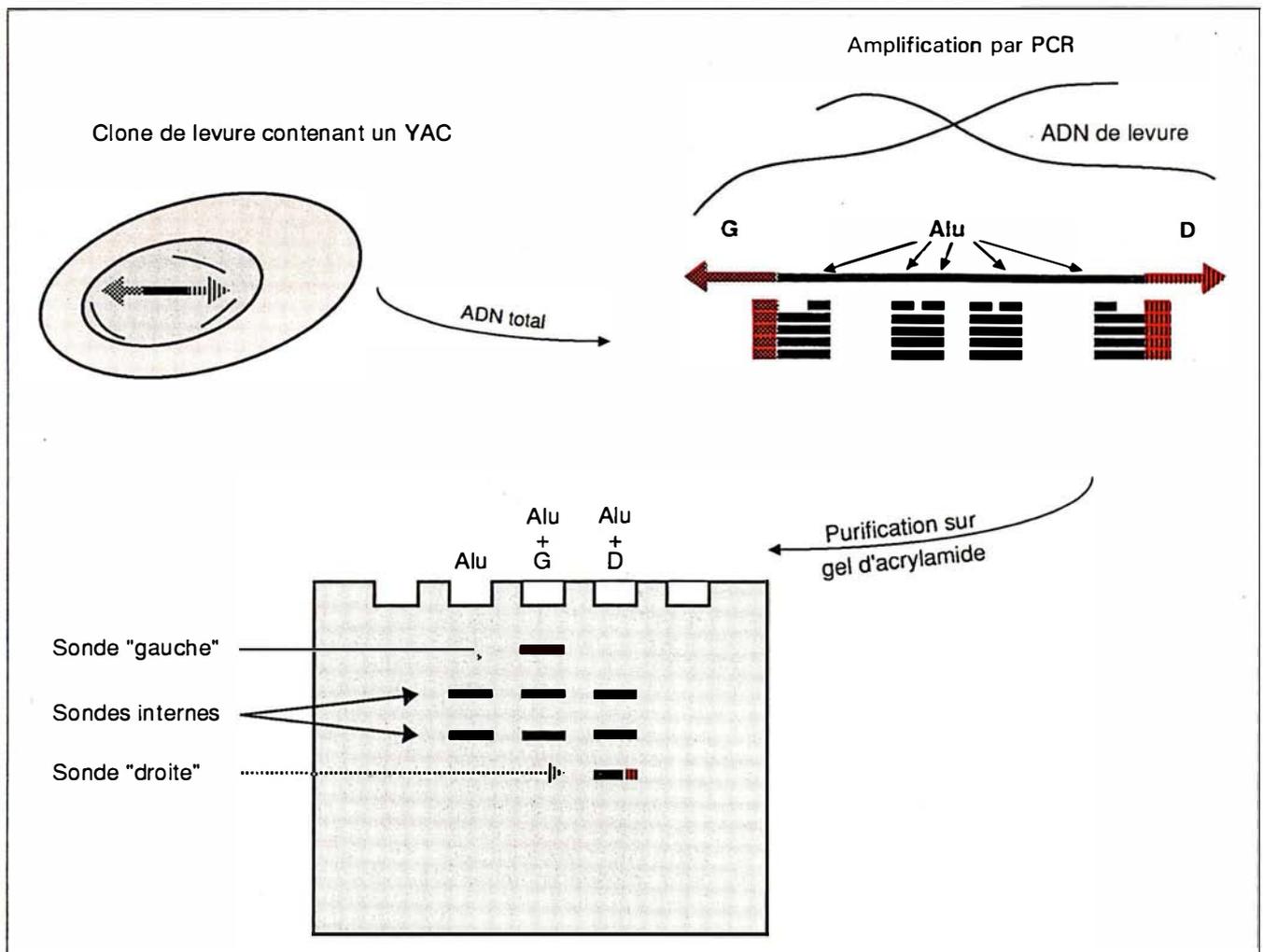


Figure 2. **Utilisation de la PCR (Polymérase chain Reaction) pour obtenir des sondes à partir de YAC sans purification préalable.** L'utilisation d'amorces (oligonucléotides) spécifiques de la séquence répétée « Alu » très fréquente dans l'ADN humain (mais absente chez la levure) permet d'obtenir diverses sondes par amplification PCR effectuée sur l'ADN total d'une levure contenant un YAC : sondes internes si la seule amorce utilisée est la séquence Alu ; dans ce cas l'amplification aura lieu s'il existe dans le clone YAC des séquences Alu suffisamment proches et correctement orientées ; sondes d'extrémité si l'on associe à l'amorce Alu une amorce spécifique du « bras » gauche ou droit du vecteur. Cette méthode présente un aspect aléatoire puisqu'elle suppose l'existence de séquences de type Alu correctement disposées dans le segment cloné (pas trop loin de chaque extrémité par exemple) mais, dans la pratique, elle permet dans la majorité des cas d'obtenir très rapidement des sondes utilisables directement après purification par électrophorèse (en bas à gauche). Figure adaptée à partir de la référence 2.

rapidement des sondes internes ou d'extrémité à partir d'un YAC sans le purifier (figure 2). Les possibilités offertes par la levure et en particulier l'utilisation de la recombinaison homologue pour rajouter une séquence dans chaque clone d'une banque déjà construite sont aussi de plus en plus exploitées.

Des études fonctionnelles ? Une des nouveautés les plus passionnantes concerne la possibilité de transférer des YACs entiers par fusion de protoplastes de levure avec des cellules

de mammifères. Il semble que dans au moins certains cas le YAC s'intègre sans remaniement (sauf aux extrémités) dans l'un ou l'autre des chromosomes de la cellule. On se prend alors à rêver aux études de régulation de gènes de grande taille qu'il devient possible de transférer avec tout leur environnement régulateur ; et s'il se confirme qu'il est possible — comme cela a été rapporté — d'injecter des YACs purifiés dans des œufs fertilisés et d'obtenir des souris « transmiques » le champ

d'expériences possibles s'élargit encore. Ceci est d'autant plus vrai que l'on peut espérer qu'en raison de la grande longueur des séquences transférées l'intégration homologue sera favorisée par rapport à l'intégration au hasard... ■

Bertrand Jordan

Directeur de recherche au Cnrs, responsable du groupe « génétique moléculaire humaine », CIML, Inserm/Cnrs, case 906, 13288 Marseille Cedex 9, France.