



par Bertrand JORDAN

*Des vecteurs
de clonage à la pelle !*

La chronique précédente, assez « politique », était d'une lecture facile ; celle-ci, au contraire, est très technique et sans doute un peu rebutante pour certains. C'est la loi du genre, le lecteur est prévenu !

Le clonage de segments d'ADN, et plus particulièrement de segments de grande taille, reste un *must* de la génétique moléculaire malgré les prodiges accomplis par les méthodes dérivées de la PCR et l'utilisation intelligente des séquences Alu comme points d'ancrage permettant d'amplifier toutes sortes de séquences humaines [1]. Comme on le sait, la mise au point des chromosomes artificiels de la levure, en 1987, a été une avancée importante dans ce domaine ; la construction et l'exploitation de banques de YAC sont activement poursuivies des deux côtés de l'Atlantique. Pour ce que j'ai pu en percevoir depuis mon arrivée aux États-Unis, il semble d'ailleurs que les options prises ici sont assez différentes de celles qui émergent en Europe. Aux États-Unis, en effet, la première librairie construite dans le laboratoire de Maynard Olson à Saint Louis (MO) a maintenant été dupliquée et transmise à cinq laboratoires dont certains ont déjà distribué des copies secondaires ; plusieurs de ces équipes s'étaient elles-mêmes lancées dans la construction de banques YAC, avec des résultats pas très concluants, et se consacrent maintenant à l'exploitation de celle de Saint Louis. Il s'agit de ce que l'on peut appeler une banque de première génération, avec des fragments insérés relativement petits (autour de

250 kb) et une proportion assez élevée de clones chimériques contenant deux segments d'ADN provenant de différentes régions chromosomiques (de 15 à 30 % selon l'interlocuteur). En revanche, les méthodes de criblage et d'étude de ces YAC sont devenues très sophistiquées : criblage tout PCR, sans aucune hybridation ; clonage d'extrémités par différentes astuces y compris un système faisant appel à la recombinaison homologue dans la levure ; et méthodes d'analyse des fragments insérés tout aussi sophistiquées faisant un large et intelligent usage de la PCR. En Europe, au contraire, et peut-être parce que l'accès à la librairie de Saint-Louis était plus difficile, plusieurs équipes se sont obstinées et ont obtenu des librairies de deuxième génération. La préparation de l'ADN en champs pulsés, et non plus sur gradients de saccharose, et le travail sur les conditions de transformation de la levure ont ainsi permis la construction de librairies dans lesquelles la taille moyenne des fragments insérés est d'environ 400 kb (Rakesh Anand, *Imperial Chemical Industries*, Grande-Bretagne), 500 kb (Hans Albertsen, Denis Le Paslier au CEPH à Paris) ou même 600-700 kb (Tony Monaco, *Imperial Cancer Research Fund*, Londres). Les stratégies divergent donc un peu, mais personne ne met en doute l'intérêt

des YAC dans tout travail à grande échelle sur le génome humain — ou sur d'autres génomes d'ailleurs puisque les premières banques YAC de souris commencent à être utilisées (David Burke, Princeton). Les YAC présentent néanmoins quelques inconvénients. La construction des librairies est longue et difficile ; l'obtention des segments insérés en quantité raisonnable est très laborieuse (il faut passer par une séparation préparative en champs pulsés) et impose donc le passage par les « astuces » mentionnées ci-dessus. De ce fait, il reste intéressant de chercher à développer d'autres systèmes de clonage plus maniables, plus « portables » comme l'on dit, permettant à tout laboratoire raisonnablement compétent de préparer « sa » librairie à partir de l'hybride somatique ou de la lignée cellulaire les plus adaptés à l'objet de sa recherche. Il y a les cosmides, me direz-vous : technologie bien maîtrisée, très répandue et répondant à ce besoin. Ces vecteurs présentent en fait deux inconvénients. La taille du fragment inséré, une quarantaine de kb, est trop faible : il faut plus de trois mille cosmides bout à bout pour couvrir le chromosome X (150 mégabases). Et, de plus, le problème de l'instabilité des segments d'ADN transportés par ces vecteurs est sérieux : même dans

les hôtes bactériens les mieux choisis (c'est-à-dire ayant perdu l'essentiel de leurs mécanismes de recombinaison et de réparation), on constate qu'au moins 30 % des cosmides sont instables... Gros problème pour toute stratégie de cartographie, et en particulier pour la construction de *contigs**. Il n'est donc pas étonnant que plusieurs équipes consacrent leurs efforts à la mise au point de nouveaux vecteurs capables de propager de grands morceaux d'ADN étranger dans *E. coli*, de préférence à l'état de copie unique (pour éviter les recombinaisons) mais rapidement amplifiables au moment où l'on veut préparer leur ADN.

Le jeu consiste à repérer un bactériophage ou épisome bactérien comportant un génome suffisamment grand, et à essayer d'en dériver un système de clonage. Historiquement, un des premiers systèmes de ce type a été un vecteur de clonage dérivé du bactériophage P1, mis au point dès 1988 par Nat Sternberg [2]. Ce système, capable en principe de cloner des segments d'ADN de 100 kb, a bénéficié d'un appui commercial puisque la firme Du Pont de Nemours commercialise depuis l'année dernière les extraits d'emballage nécessaires à la construction de banques dans ce système. Il semble cependant que les laboratoires qui ont tenté de l'utiliser aient rencontré de gros problèmes et que la plupart aient renoncé. Conclusion peut-être provisoire, mais qui résume en tous cas la situation actuelle. Il existe cependant d'autres vecteurs possibles, et nous allons les passer rapidement en revue. Une équipe de Washington (V.B. Rao *et al.*, *Catholic University of America*, Washington, DC) s'attache à la mise au point d'un système de clonage à partir du bactériophage T4 qui transporte normalement 170 kb d'ADN et devrait permettre le clonage de segments de 150 kb. Un système d'emballage *in vitro* a été mis au point, l'efficacité (10 000 clones par microgramme d'ADN) semble raisonnable pour un début, et le clonage d'un segment de 95 kb a été démontré. Mais il y a, à mon avis, encore beaucoup de travail à faire avant que

ce système puisse être envisagé pour construire des bibliothèques. La solution proposée par A. Kumamoto et P. Youderian (California Institute of Biological Research, La Jolla, CA, en collaboration avec la firme Stratagene) en est aussi à ses débuts : il s'agit de l'utilisation d'un vecteur comportant certaines séquences du bactériophage P22 de salmonelle. Ce système, baptisé *Stealth vector*, pourrait propager à l'état d'ADN circulaire amplifiable des segments de 250 kb ; il semble bien conçu, par des chercheurs qui ont une connaissance précise des problèmes d'efficacité et d'instabilité, mais là aussi il reste beaucoup à faire. Le système BAC (pour *bacterial artificial chromosome*), proposé par H. Shizuya (Caltech, Pasadena, CA), me paraît plus séduisant. Il s'agit cette fois d'utiliser comme vecteur le facteur F, épisome naturellement présent dans certaines souches d'*E. coli* et qui peut atteindre 1 400 kb sous forme circulaire, maintenue à raison d'une copie par cellule. Le travail de mise au point est très propre et systématique et, même si les premiers essais ont abouti à des clones de relativement petite taille (100 kb au maximum), l'approche me paraît très prometteuse. D'autres équipes envisagent carrément le clonage d'ADN humain dans des cellules de mammifères. C'est le cas de J. M. Vos (University of North Carolina, NC) qui a présenté d'alléchants résultats sur l'utilisation du virus d'Epstein-Barr comme vecteur de clonage. Il s'avère que, en utilisant des cellules humaines contenant déjà un virus déficient, l'on peut limiter les séquences proprement EBV à une vingtaine de kb et faire transporter à ce vecteur de 150 à 180 kb d'ADN humain, qui peut ensuite être préparé en assez grande quantité en induisant un cycle lytique au cours duquel de nombreuses particules virales contenant le segment d'ADN cloné seront produites. Système séduisant, d'autant plus qu'il se prête bien à l'étude de l'expression des gènes portés sur le segment cloné et que l'on peut même envisager des clonages par complément d'une fonction, comme dans la levure. Mais le « vecteur » le plus fou est certainement celui décrit par P. J. Hahn (State University of

New York, Syracuse, NY) : il s'agit cette fois de « cloner » des segments de 1 à 10 mégabases sous forme de minichromosomes (double minute) dans des cellules de souris. La méthode repose sur l'introduction préalable, dans la région à cloner, d'un gène de résistance à la néomycine lié à un gène de dihydrofolate réductase (DHFR) ; après irradiation, fusion avec la cellule de souris et sélection à la néomycine, l'amplification du segment introduit peut être provoquée par culture des cellules en présence de méthotrexate (rappelons que le système méthotrexate/DHFR est le premier pour lequel une amplification génique dans des cellules en culture ait été mise en évidence). L'idée, bien sûr, est de séparer ensuite les « double minute », peut-être par une électrophorèse en champs pulsés...

Comme on le voit, l'imagination est encore au pouvoir chez certains clonateurs. Il est difficile de savoir aujourd'hui si l'un de ces systèmes deviendra une méthode de clonage commode et généralisable ; ils ont fait l'objet d'études qui montrent que le concept est viable, mais de là à la mise au point d'une méthode de clonage commode et concurrentielle avec celles qui existent déjà, il reste beaucoup de chemin à parcourir. Ce bref aperçu montre bien, en tous cas, que les technologies de biologie moléculaire restent très évolutives, et qu'il est essentiel d'être attentif aux progrès qui peuvent être faits et d'en tenir compte dans toute stratégie à moyen terme. C'est le but de cette chronique sans doute un peu aride mais qui correspond à une « veille technologique » certainement utile ■

Bertrand R Jordan

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

RÉFÉRENCES

1. Nelson DL, Ledbetter SA, *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.
2. Sternberg N. Bacteriophage P1 cloning system for the isolation, amplification and recovery of DNA fragments as large as 100 kilobase pairs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 103-7.

* *Contigs* : arrangements de clones contenant des fragments chevauchants d'ADN.