médecine/sciences 1997 ; 13 : 1066-8

Chromosomes et maladies

# Après les YAC, voici les MAC/HAC, ou comment fabriquer des chromosomes artificiels humains

L'analyse des divisions cellulaires nous a depuis longtemps appris qu'un chromosome linéaire fonctionnel est généralement constitué d'un centromère, de deux télomères et d'au moins une unité de réplication lui permettant de se dupliquer. Afin de créer artificiellement un chromosome, il suffisait donc de connaître les séquences d'ADN de ces structures essentielles, ce qui fut fait pour les chromosomes de levure, et c'est ainsi que, dès 1983, furent fabriqués les YAC *(yeast artificial chromosomes)*, précieux outils de génétique moléculaire, avec le succès que l'on sait [1, 2]. Après *Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe* et les YAC, il y eut de nombreuses variations sur le thème, PAC *(P1 derived artificial chromosomes)*, BAC *(bacterial artificial chromosomes) (m/s n° 6-7, vol. 12, p. 851)* [3] mais construire des chromosomes artificiels de mammifères (MAC) ou humains (HAC), semblait jusqu'à présent inaccessible. Car, si la structure et la fonction des télomères humains sont bien connues, il n'en est pas de même des centromères, qui sont constitués de plusieurs groupes de séquences répétées (satellites α et β, et satellites 1, 2 et 3) dont l'agencement reste incertain *(m/s n° 3, vol. 12, p. 414)* [4], sans parler des réplicons, et en particulier des origines de réplication dont la localisation, la structure et la répartition demeurent énigmatiques. Néanmoins, malgré la difficulté d'isoler les éléments fonctionnels pour mieux les analyser, et malgré l'ignorance de la taille minimale nécessaire pour la réplication, plusieurs équipes imaginèrent des moyens de fabriquer artificiellement des chromosomes de mammifères. Au cours de ces dernières années, plusieurs stratégies furent proposées : (1) créer des chromosomes circulaires analogues aux « double minute » observés en oncologie dans les cellules *in vivo (m/s n° 4, vol. 12, p. 526)*, et utilisant l'origine de réplication du virus d'Epstein Barr pour la réplication des épisomes [5] ; (2) assembler les structures chromosomiques indispensables après les avoir clonées, comme c'est le cas pour la construction des YAC ; (3) enfin, « rogner » un chromosome pour n'en garder que les éléments essentiels afin de voir jusqu'où peut aller la miniaturisation. Or, il existe justement une technique de grignotage des chromosomes : la fragmentation dirigée par télomère [6]. En introduisant dans un vecteur des séquences homologues des régions télomériques et centromérique, il se produit une recombinaison entre ce vecteur et le centromère du chromosome, tandis que l'ADN télomérique incorporé dans le vecteur provoque une cassure et engendre un nouveau télomère. Si l'amenuisement est insuffisant du premier coup, il est possible de recommencer une nouvelle fragmentation. Ainsi, des minichromosomes furent obtenus par ce *knock-out* d'un nouveau genre, après deux *rounds* de fragmentation pour le chromosome X [7] et après trois *rounds* pour le chromosome Y [8]. Ce dernier, réduit à 4 Mb, était encore capable de se maintenir en culture. D'autres amenuisements pouvaient être apportés : il a été démontré qu'une région de 140 kb de l'ADN α satellite du centromère de l'Y était suffisante à elle seule pour assurer une ségrégation correcte [9]. De plus, certaines observations suscitaient encouragements et espérances. En effet, d'une part, des segments d'ADN nu non homologues peuvent facilement fusionner *in vivo* et, d'autre part, de l'ADN télomérique transfecté est capable d'induire la synthèse *de novo* de télomères. C'est pourquoi, malgré les lacunes encore énormes dans la connaissance du mécanisme fonctionnel des chromosomes humains, le temps était venu de tenter leur fabrication artificielle. L'équipe de H.F. Willard (Cleveland, Ohio), vient en tout cas d'y parvenir [10]. Des séquences télomériques humaines $(TTAGGG)_n$, des concatémères de séquences α satellites $(171\ pb)_n$ et de l'ADN génomique humain de haut poids moléculaire ont pour cela été mélangés et transférés par lipofection dans des cellules HT1080 provenant d'un fibrosarcome humain. Afin de pouvoir juger du rôle des différents éléments fonctionnels, des transfections ont été effectuées en supprimant tour à tour chacun des constituants. Si la recette paraît simple, elle comporte toutefois quelques astuces savantes, muries par ce groupe depuis longtemps concerné par ce projet [11]. L'ADN télomérique a été produit par PCR à l'aide d'amorces constituées de l'élément télomérique de base TTAGGG, et les produits d'amplification d'une taille supérieure à 1 kb ont été sélectionnés. Pour ce qui est des séquences centromériques mises en jeu, elles sont constituées de concatémères purs de séquences α satellites des chromosomes 17 et Y ; les auteurs ont en effet développé une technique permettant de construire des concatémères d'environ 1 Mb de séquences α satellites, tout en préservant leur structure en tandem ininterrompue.

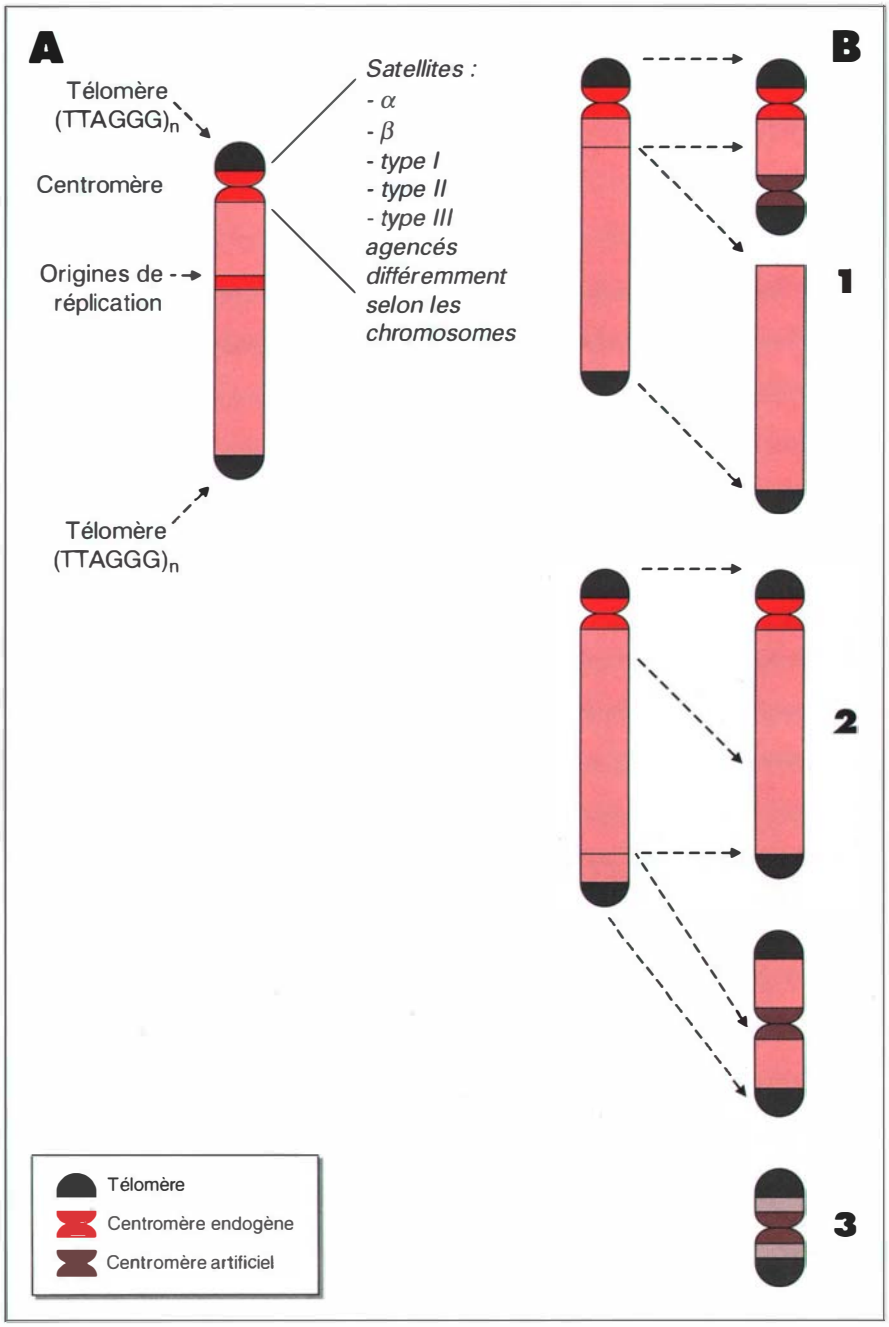


Figure 1. ***A. Éléments indispensables à la formation de chromosomes stables. B. Description des mécanismes probables ayant abouti à la formation des microchromosomes à partir d'ADN télomérique et α satellite transfectés. 1:*** *par fragmentation dirigée par télomère, il subsiste un fragment acrocentrique (perdu) et un microchromosome contenant à la fois un centromère endogène et un centromère artificiel provenant de l'ADNα satellite en concatémères.* ***2:*** *les deux fragments chromosomiques sont récupérés. Le fragment acentrique est sauvé par la formation* de novo *d'un centromère artificiel provenant de l'ADN α satellite. Le chromosome tronqué a conservé le centromère endogène.* ***3:*** *le microchromosome est ici entièrement fabriqué* de novo *à partir de l'ADN transfecté. (D'après [12].)*

Il ne restait plus aux cellules qu'à assembler correctement les différents composants pour fabriquer des microchromosomes artificiels. Dans neuf clones sur vingt-six, des microchromosomes linéaires, cytogénétiquement et mitotiquement stables furent observés, et ce, après plus de six mois de culture. Ils possèdent donc tous les éléments nécessaires au maintien et à la ségrégation mitotique, en particulier des kinétochores normaux (analysés avec les protéines CENP-C et CENP-E liant les centromères). Ils mesurent 4 à 10 mégabases et leur taille est donc cinq à dix fois plus petite que celle des plus petits chromosomes endogènes. Leur analyse révèle qu'ils n'ont pas tous la même constitution et qu'ils ont donc été fabriqués par des mécanismes différents *(figure 1)*. Certains microchromosomes contiennent à la fois de l'ADN α satellite endogène et exogène (artificiel) ; ces microchromosomes ont été engendrés par fragmentation d'un chromosome endogène *(figure 1B1)*. D'autres contiennent un centromère artificiel et ont incorporé de l'ADN provenant des chromosomes endogènes *(figure 1B2)*; ces microchromosomes proviennent du sauvetage d'un fragment acentrique produit par fragmentation d'un chromosome endogène. Enfin, un microchromosome, le seul qui soit véritablement un chromosome artificiel, s'est organisé par assemblage d'ADN α satellite formant centromère avec l'ADN génomique exogène et des télomères aux extrémités *(figure 1B3)*.

Quelles sont les conditions favorisant la formation de ce microchromosome artificiel ? Quelles sont les structures indispensables ? La présence d'ADN génomique humain semble utile à la formation des microchromosomes, puisque lorsqu'il est omis dans la transfection, la proportion de clones cellulaires contenant un microchromosome diminue fortement : 1 clone sur 13, contre 9 sur 26 lorsque l'ADN humain est ajouté. Cela peut s'expliquer par le fait que l'ADN génomique humain apporte des origines de réplication favorisant le maintien épisomique. Si l'ADN humain est remplacé par de l'ADN de souris, aucun microchromosome

n'est obtenu. Il faut noter que l'ADN transfecté peut aussi être incorporé dans n'importe quel chromosome endogène et qu'on ne connaît actuellement aucun moyen de l'en empêcher.

La recette, on le voit, n'est pas complètement maîtrisée puisque la plupart des microchromosomes formés sont le résultat d'arrangements consécutifs à la fragmentation dirigée. Il est donc hors de propos d'utiliser le système en l'état pour une application en thérapie génique, et nous sommes encore loin de posséder le vecteur de transfert de gènes idéal. Cela étant, ce travail a permis de créer pour la première fois un chromosome artificiel dans une cellule humaine et apporte deux informations fondamentales importantes. Premièrement, les résultats obtenus indiquent que les satellites α jouent bel et bien un rôle important et peut-être déterminant dans la fonction centromérique puisque, autant que l'on puisse juger, ils semblent capables, à eux seuls, de former un centromère. Notons tout de même que l'on ne peut totalement exclure que d'autres séquences, provenant de l'ADN génomique, aient été recrutées et se trouvent associées aux séquences α pour former un centromère fonctionnel. Deuxièmement, alors que l'on se demandait toujours quelle était la taille limite inférieure compatible avec la création de chromosomes artificiels humains, cette étude vient de démontrer que des microchromosomes aussi petits que 4 Mb, malgré leur taille 10 fois inférieure à celle des plus petits chromosomes humains, étaient capables de réplication stable à long terme dans les cellules.

On entrevoit déjà les prochaines étapes. D'abord, d'autres éléments potentiellement importants pour la structure des chromosomes pourront être inclus dans les HAC. Puis, les séquences minimales définies pour chacun des éléments pourront être assemblées avec les fragments d'ADN génomique souhaités avant transfection. Cela permettra l'étude de l'expression de certains gènes, de régions soumises à empreinte génomique, et de toutes sortes de combinaisons incluant des éléments régulateurs. Enfin, si la mise au point d'un transport efficace et sans danger de tels vecteurs dans les cellules somatiques *in vivo* se réalisait, les HAC deviendraient un système de choix pour la thérapie génique. En effet, le transfert dans les cellules d'un HAC portant un gène thérapeutique muni de tous ses éléments régulateurs et situé dans son environnement chromatinien propre, permettra d'obtenir une régulation physiologique de l'expression du gène, avec, de surcroît, une régulation du nombre de copies.

Peu de temps après l'émoi suscité par Dolly, l'agnelle provenant d'un clonage de cellules somatiques adultes *(m/s n° 3, vol. 13, p. 428)*, voici une nouvelle technologie prometteuse et qui n'a, pour sa part, aucune raison de susciter d'inquiétudes.

**B.A.**
**S.G.**


1. Murray AW, Szostak JW Construction of artificial chromosome in yeast. *Nature* 1983; 305: 189-93.
2. 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.
3. Monaco AP, Larin Z. YACs, BACs, PACs and MACs, artificial chromosomes as research tools. *Trends Biotechnol* 1994; 12: 280-6.
4. Roizès G, Marçais B, Yurov Y. Les centromères des chromosomes de mammifères. *Med Sci* 1994; 10: 282-95.
5. Sun TQ, Fenstermacher DA, Vos JM. Human artificial chromsomes for cloning large DNA fragments in human cells. *Nature Genet* 1994; 8: 33-41.
6. Farr C, Stevanovic M, Thomson EJ, Goodfellow PN, Cooke HJ. Telomere-associated chromosome fragmentation : applications in genome manipulation and analysis. *Nature Genet* 1992; 2: 275-82.
7. Farr CJ, Bayne RAL, Kipling D, Mills W, Critcher R, Cooke HJ. Generation of a human X-derived minichromosome using telomere associated chromosome fragmentation. *EMBO J* 1995; 14: 5444-54.
8. Heller R, Brown KE, Burgtorf C, Brown WRA. Minichromosomes derived from the human Y chromosome by telomere directed chromosome breakage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 7125-30.
9. Brown KE, Barnett MA, Burgtorf C, Shaw P, Buckle VJ, Brown WRA. Dissecting the centromere of the human Y chromosome with cloned telomeric DNA. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 1227-37.
10. Harrington JJ, van Bokkelen G, Mays RW, Gustashaw K, Willard HF. Formation of *de novo* centromeres and construction of first generation human artificial chromosomes. *Nature Genet* 1997; 15: 345-55.
11. Tyler-Smith C, Willard HF. Mammalian chromosome structure. *Curr Opin Genet Dev* 1993; 3: 390-7.
12. Rosenfeld MA. Human artificial chromosomes get real. *Nature Genet* 1997: 15: 333-5.



PHARMACOLOGIST

**RHÔNE-POULENC RORER**
**France**

*Rhône-Poulenc Rorer has an opening position for a Pharmacologist in the Oncology Programme located at Vitry-sur-Seine (south-east of Paris).*

You will be responsible for coordinating a team of 4 scientists within our **in vivo** laboratory. Your mission will be to initiate new **in vivo** animal models and to evaluate experimental anti-tumoral properties of drugs.

As our successful candidate, you have a PhD in biological sciences as well as 2-3 years postdoctoral experience in the field of **in vivo** experimental Oncology. Strong interpersonal skills and an excellent publication record are required.

Basic knowledge of French is desirable.

If you are interested in this position, please send your CV with the names of 3 referees to Isabelle Amalzieu, Rhône-Poulenc Rorer S.A., Centre de Recherche de Vitry-Alfortville, 13 quai Jules Guesde, 94403 Vitry-sur-Seine Cedex, France.

MEDIA SYSTEM

RHÔNE-POULENC RORER



SOCIÉTÉ DE BIOLOGIE

*Séance du 22 octobre 1997*

*Bases biologiques de la radioprotection : de la radiobiologie à la réglementation*

Pablo RADICELLA
*(Commissariat à l'Énergie Atomique - Fontenay-aux-Roses)*
**Lésions initiales et réparation de l'ADN**

Jean-Luc PONCY
*(Centre d'Études - Bruyères-le-Châtel)*
**Radiotoxicologie**

Patrick GOURMELON
*(Commissariat à l'Énergie Atomique - Fontenay-aux-Roses)*
**Bases biologiques des syndromes d'irradiation aiguë**

Jean-Louis LEFAIX
*(Inra - Jouy-en-Josas)*
**Pathogénie des fibroses radio-induites**

Anne FLÜRY-HÉRARD
*(Commissariat à l'Énergie Atomique - Paris)*
**Mutagenèse et cancérogenèse**

Roland MASSE
*(Office de Protection contre les Rayonnements Ionisants - Le Vésinet)*
**Quantification du risque et réglementation**

La séance aura lieu à 16 h, Institut des Cordeliers
Amphithéâtre *Bilski-Pasquier*
15-21, rue de l'École-de-Médecine
75006 Paris, France