médecine/sciences 1997 ; 13 : 1357-8

Génétique et chromosomes

Des chromosomes par morceaux

Nous avons relaté récemment la construction de microchromosomes artificiels obtenus par co-transfection d'ADN génomique humain, de séquences télomériques et de séquences alphoïdes dans des cellules humaines *(m/s n° 8-9, vol. 13, p. 1066)*. Cette construction, considérée jusqu'alors comme difficile, voire irréalisable, encourage par sa réussite de nouvelles recherches qui démontrent que les chromosomes sont finalement plus complaisants qu'on ne l'imaginait. Deux publications récentes, l'une sur la structure du centromère, l'autre sur l'incorporation de segments de chromosomes humains fonctionnels dans des souris nous en apportent la preuve.

Les centromères des chromosomes humains sont constitués de séquences de divers types répétées en tandem, mais leur structure exacte demeure énigmatique [1]. Les protéines CENP-A, CENP-B, CENP-C et CENP-D qui se lient au centromère sont probablement impliquées dans la fonction centromérique. Alors que les séquences alphoïdes (éléments de base de 171 pb) paraissaient essentielles dans la constitution des centromères, du Sart *et al.* viennent de montrer qu'un centromère fonctionnel pouvait apparaître en l'absence de celles-ci [2]. Tout est parti de l'observation d'un chromosome 10 marqueur présentant une délétion 10p12.1-10q25.2 emportant la région centromérique, mais parfaitement stable à la mitose [3]. Ce chromosome anormal possède, en fait, un centromère fonctionnel qui lie le sérum anticentromère CREST, mais pas un anticorps anti-CENP-B, suggérant que les séquences alphoïdes seraient absentes. Il s'agit, selon toute vraisemblance d'un centromère latent qui s'est réveillé et a pris le relais du centromère natif.

Grâce à une technique hautement résolutive et sensible d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), les auteurs ont pu démontrer que les séquences alphoïdes sont bel et bien absentes de ce centromère néoformé, ou, tout du moins, qu'elles ne peuvent être présentes qu'en quantité extrêmement limitée (1 à 2 kb au maximum). Toutefois, les protéines CENP-A et CENP-C, constituants importants des centromères actifs sont, quant à elles, présentes. Les auteurs ont cloné l'ensemble de la région comprenant le néocentromère avec des YAC *(yeast artificial chromosomes)* puis des cosmides. Chaque cosmide a été tour à tour hybridé en FISH à des chromosomes marqués avec des anticorps CREST, de façon à identifier les clones localisés au cœur du centromère. Une région de 80 kb incluant le noyau du centromère a ainsi été définie. On a comparé les cartes de restriction du *contig* de cosmides couvrant la région centromérique et de la région chromosomique correspondante du chromosome 10 anormal : aucune différence n'a été mise en évidence. Cela prouve que le néocentromère s'est activé sans modification génomique (telle que l'insertion de séquences « magiques » par exemple), mais plutôt par un mécanisme épigénétique : modification chimique de l'ADN ou de la chromatine avec ou sans recrutement de nouveaux facteurs protéiques, degré de compactage de la chromatine, repliement de l'ADN aboutissant à l'assemblage d'un complexe ADN-protéines fonctionnel ? Le fait que les deux protéines CENP-A et CENP-C co-localisent avec les cosmides au niveau du centromère marqueur indique que la région génomique clonée joue un rôle important dans la fonction de ce centromère. Il est toutefois possible que des domaines supplémentaires situés à proximité contribuent aussi à cette fonction.

L'absence de satellites alpha dans ce centromère latent remet donc en cause le rôle de ces séquences. Elles interviendraient dans la fonction centromérique lorsqu'elles seraient présentes en grande quantité, mais, en leur absence, d'autres séquences pourraient les remplacer. Le séquençage de l'ensemble de la région nous renseignera sur la nature de ces séquences.

D'autres centromères latents existent probablement ailleurs sur le génome. Des locus contenant juste quelques copies de séquences alphoïdes ont été observés et pourraient être la trace de centromères ancestraux persistant aujourd'hui sous forme latente. De plus, d'autres exemples de chromosomes marqueurs présentant des centromères, sans satellite alpha détectable, et localisés apparemment dans des régions euchromatiques ont été décrits. Le clonage de ce(s) né-ocentromère(s) et l'identification des séquences constituant leur noyau central ouvre des perspectives intéressantes pour l'étude de la fonction centromérique (identification des protéines se liant au centromère, analyse conformationnelle, par exemple) et pour la construction de chromosomes artificiels de mammifères, qui requièrent un centromère fonctionnel pour ségréger de façon stable à la mitose. Le centromère latent décrit ici est un bon candidat en raison de son apparente petite taille et de sa stabilité lors des clonages. Il y a fort à penser que cette possibilité sera explorée sans tarder.

Grâce à un autre travail d'une équipe japonaise, nous savons désormais qu'il est possible d'introduire des chromosomes humains conservant leur caractère fonctionnel dans des souris qui les transmettent à leur descendance à travers leur cellules germinales *(m/s n° 8/9, vol. 13, p. 1070)* [4]. Bien que la technique de transfert de chromosome par microcellules *(MMCT, microcell-mediated chromosome transfer)* soit connue depuis vingt ans, elle n'avait pas, jusqu'à présent, donné lieu à des résultats spectaculaires.

A partir de fibroblastes embryonnaires, des cellules hybrides homme-souris furent produites ne contenant qu'un seul chromosome humain porteur d'un néo-

gène lui conférant une résistance au G418. Des microcellules furent mises en contact avec des cellules A9 de souris. Sur 700 cellules hybrides ainsi obtenues, celles qui possédaient les gènes des immunoglobulines humaines (contenant tout ou partie des chromosomes humains 2, 14, et 22) furent sélectionnées. Puis, de nouvelles microcellules furent produites et mises en contact avec des cellules ES de souris. Enfin, les cellules hybrides ES, résistantes en culture au G418, furent analysées pour vérifier la présence de chromosomes humains contenant les gènes des immunoglobulines. Les cellules comportaient les 40 chromosomes murins plus un chromosome humain (qui avait souvent subi des réarrangements). Ces cellules hybrides ES furent ensuite injectées à des embryons de souris réimplantés dans l'utérus de souris pseudogestantes *(figure 1)*. Des souris chimériques furent obtenues, porteuses de chromosomes humains (vérifiés par FISH), de transcrits d'immunoglobulines μ, κ, γ, du récepteur α des cellules T. Elles produisent des immunoglobulines humaines à des concentrations beaucoup plus élevées que les souris transgéniques ayant reçu les gènes humains à partir de YAC.

Restait à voir si ces souris chimériques étaient capables de transmettre ces chromosomes ou fragments de chromosomes humains à leur descendance. On sait en effet combien la présence d'un chromosome inappariable peut compromettre la méiose, chez les mâles en particulier. La satisfaction fut grande de constater que non seulement quatre souris femelles chimériques avaient transmis du chromosome 2 humain à la génération suivante mais, phénomène tout à fait extraordinaire, qu'un mâle au moins avait fait de même. Ainsi, après la production de souris transgéniques, on est désormais capable de produire des souris transchromosomiques. En y ajoutant le système Cre-LoxP, on n'ose imaginer tout ce que ces souris transchromosomiques vont faire pour nous.

B.A.
S.G.

1. Roizès G, Marçais B, Yurov Y. Les centromères des chromosomes de mammifères. *Med Sci* 1994; 10: 282-95.
2. du Sart D, Cancilla MR, Earle E, Mao JI, Saffery R, *et al.* A functional neo-centromere formed through activation of a latent human centromere and consisting of non-alpha-satellite DNA. *Nature Genet* 1997; 16: 144-53.
3. Voullaire LE, Slater HR, Petrovic V, Choo KH. A functional marker centromere with no detectable alpha-satellite, satellite III, or CENP-B protein: activation of a latent centromere? *Am J Hum Genet* 1993; 52 : 1153-63.
4. Tomizuka K, Yoshida H, Uejima H, Kugoh H, Sato K, *et al.* Functional expression and germline transmission of a human chromosome fragment in chimaeric mice. *Nature Genet* 1997 ; 16 : 133-43.

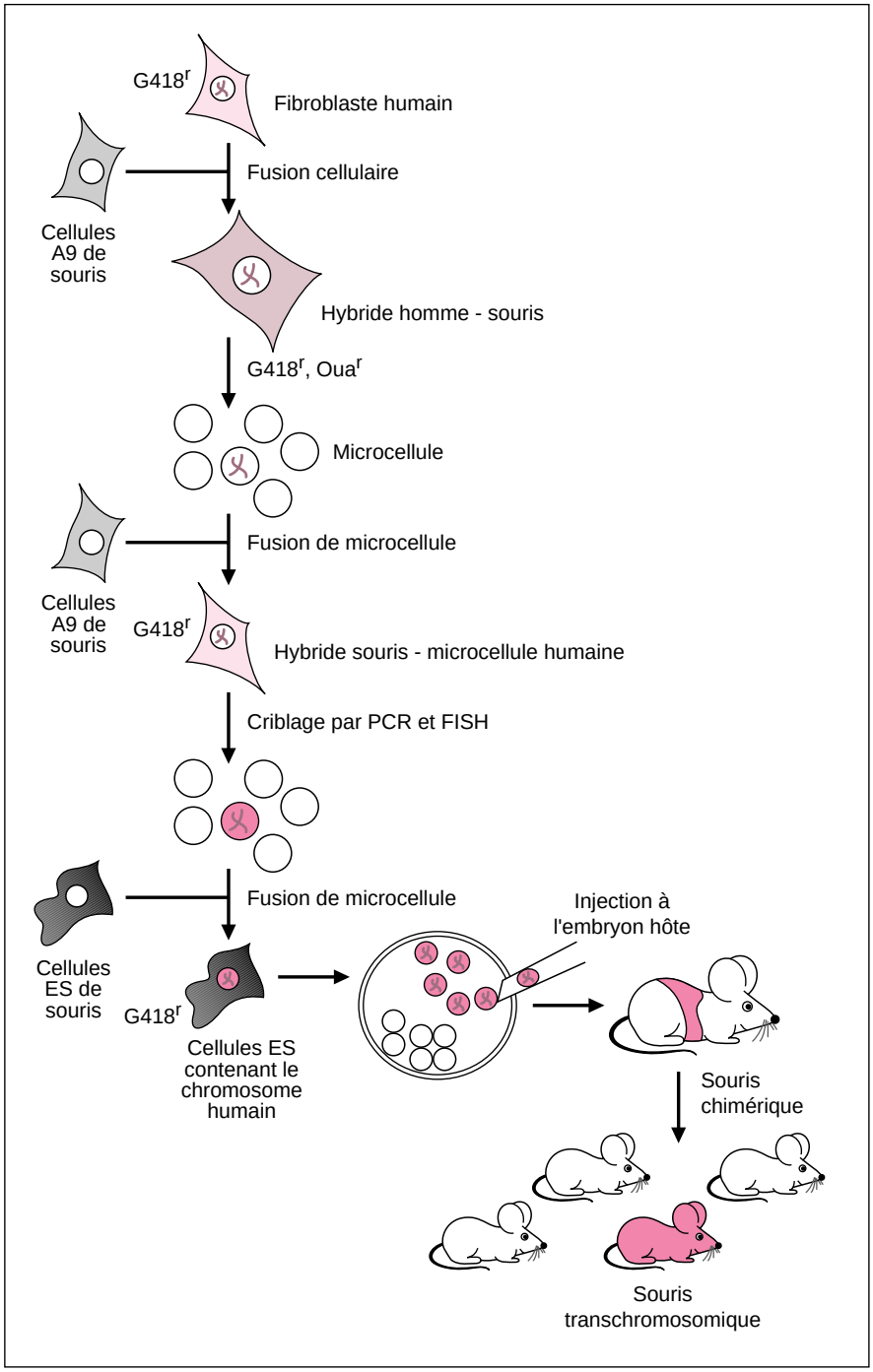

Figure 1. ***Représentation schématique de la construction de cellules ES souris-homme permettant de produire des souris transchromosomiques possédant un chromosome humain fonctionnel.*** *(D'après [4].)*