

La localisation des gènes sur les chromosomes humains reposait auparavant exclusivement sur les études familiales, effectuées à l'aide d'arbre généalogique très étendus afin de préciser le mode d'hérédité. Ceci est resté une entreprise lente et difficile, jusqu'au moment où fut découvert en 1970 que les chromosomes de mammifères, et en particulier les chromosomes humains, pouvaient ségréger dans des cellules somatiques en culture, et non pas seulement dans les cellules germinales au cours d'études familiales permettant ainsi d'utiliser ce qu'on a appelé: la cartographie physique.

La cartographie physique fait appel à une variété de méthodes cytogénétiques et moléculaires réalisées sur des cellules somatiques dans le laboratoire et capables de localiser les gènes le long des chromosomes. La position des gènes sur la carte est décrite en unité de mesure physique et réelle. La distance physique se mesure en paires de bases (pb) et kilo, mega ou giga pb.

Selon les techniques de la cartographie physique, le niveau de résolution peut varier du chromosome entier à la paire de base. Nous distinguerons deux classes de cartographie physique selon le niveau de résolution:

- **La cartographie physique à faible résolution** dont la plus petite unité de carte pouvant être résolue varie habituellement entre une et quelques mégabases d'ADN. Les techniques de la cartographie physique à faible résolution sont :
 - les hybrides cellulaires somatiques
 - les hybrides mono-chromosomiques
 - hybrides de translocation et de délétion
 - cartographie par hybrides d'irradiation
 - anomalies chromosomiques de structure
 - cartographie par dosage génique
 - cartographie des gènes par hybridation in situ
 - l'hybridation in situ en fluorescence standard (FISH)

- **La cartographie physique à haute résolution** : la résolution est habituellement très grande, de quelques centaines de kilobases jusqu'à un seul nucléotide. Les techniques de haute résolution sont :
 - La FISH à haute résolution
 - la cartographie de restriction
 - le séquençage.

1-La cartographie physique à faible résolution

1-1-Les hybrides cellulaires somatiques

C'est une méthode qui a joué un rôle important dans la localisation de nombreux gènes pathologiques. Elle exploite la propriété des cellules somatiques provenant de différentes espèces, de parfois fusionner pour former des cellules hybrides lorsqu'elles sont cultivées en présence de substance comme le polyéthylène glycol (PEG) ou le virus Sendai.

Pour la cartographie humaine, la technique consiste à construire, en général des **hybrides cellulaire** en fusionnant des cellules humaines (46 chromosomes) et des cellules de rongeurs (habituellement la souris ou le hamster, 40 chromosomes). Les produits initiaux de fusion sont appelés hétérocaryons, car les cellules contiennent à la fois un noyau humain et de rongeur. Les hétérocaryons peuvent parfois entrer en mitose, ce qui entraîne la dissolution des deux enveloppes nucléaires. Les chromosomes humains et de rongeurs sont alors mélangés en un seul noyau. La plupart des chromosomes humains ne se répliquent pas lors des cycles de division suivants et sont perdus. Cela peut donner naissance à différentes **lignées cellulaires hybrides**, contenant la totalité des chromosomes de rongeurs plus un petit nombre de chromosomes humains. La base de la perte ou de la rétention chromosomique est encore inconnue (figure 1).

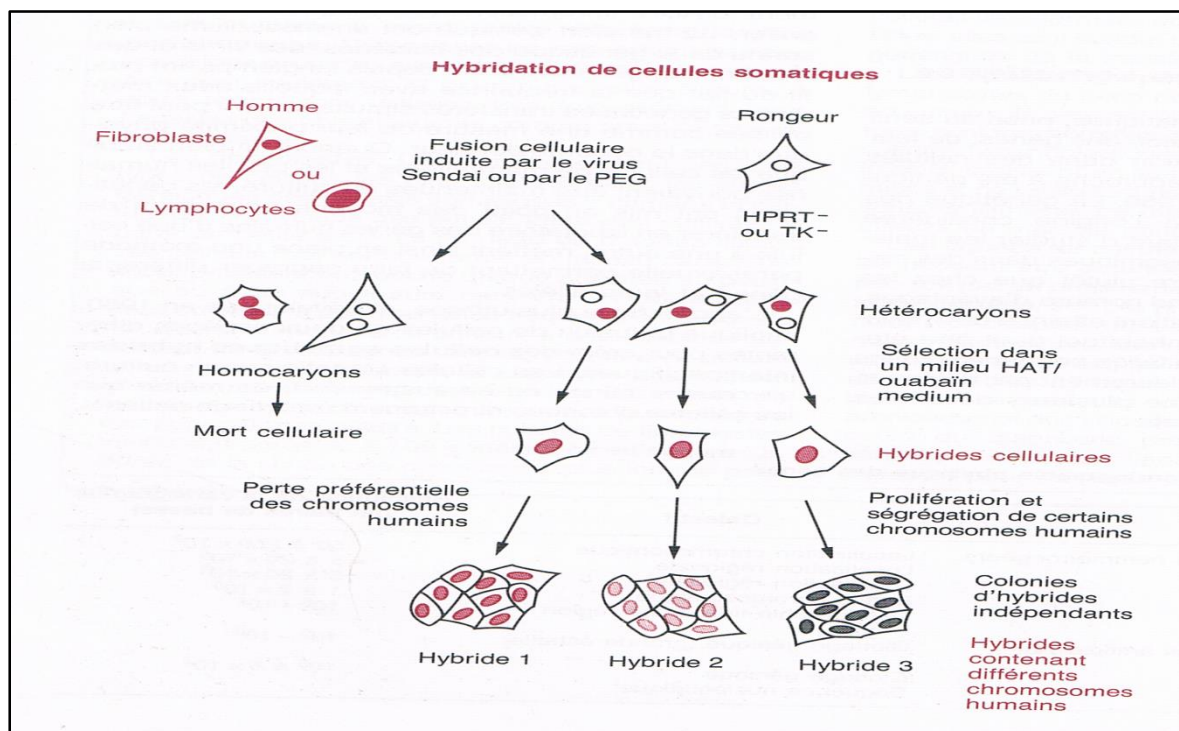


Figure 1 : technique d'hybridation interspécifique de cellules somatiques

Les cellules hybrides retiennent un nombre différent et des combinaisons différentes des chromosomes humains. La distinction des chromosomes humains des chromosomes de rongeurs peut être déterminée par les techniques de cytogénétique : **le caryotype** (figure 2).

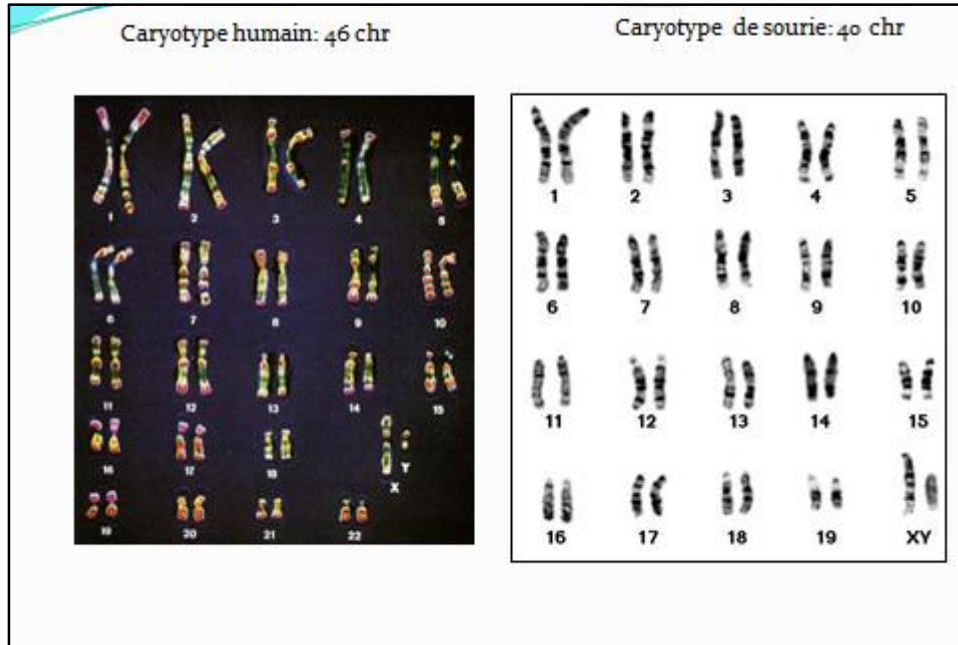


Figure 2 : distinction des chromosomes humains des chromosomes de rongeurs par le caryotype

Des panels de telles cellules sont utilisés pour établir une corrélation entre la présence d'un gène et la présence constante d'un chromosome. La présence du gène dans la cellule hybride peut être détectée de différentes manières selon que le produit du gène soit connu ou inconnu

- **le produit du gène est connu**

Si le gène code pour une enzyme qui est produite par la cellule, alors un **dosage enzymatique** peut être utilisé, une **électrophorèse de protéines** peut également être utilisée pour détecter un produit du gène humain, et pour le distinguer de la protéine de la souris.

- **le produit du gène est inconnu**

Le plus souvent aujourd'hui, les investigateurs effectuent une hybridation des lignées cellulaires fusionnées avec une sonde marquée contenant l'ADN auquel s'intéresse, en utilisant les techniques de **Southern blot**, ou de **PCR**. La présence de ce gène humain peut être corrélée avec la présence ou l'absence d'un chromosome spécifique.

- **Southern blot** est une technique mise au point par Edward M. Southern en 1975 pour rechercher des fragments d'ADN sur une électrophorèse en les hybridant avec **une sonde complémentaire**. Après avoir digéré l'ADN par **une enzyme de restriction**, on obtient un mélange de très nombreux fragments de restriction de tailles différentes. Les étapes de cette technique sont :
- l'ADN est digéré par les enzymes de restriction.
 - Les fragments d'ADN sont placés dans les puits d'un gel d'électrophorèse.
 - Une fois la migration effectuée, on trempe le gel (contenant les fragments d'ADN) dans une solution de bromure d'éthidium (BET).
 - Révélation des fragments d'ADN sous rayons UV.
 - Le gel d'électrophorèse est ensuite trempé dans une solution alcaline afin de permettre la dénaturation de l'ADN bicaténaire.
 - Une feuille de membrane en nitrocellulose (ou encore en nylon) est placée sur le gel. Une pression est appliquée au gel. Ceci va permettre le déplacement de l'ADN contenu dans le gel sur la membrane par capillarité grâce à une solution saline. L'ADN va se fixer sur la membrane.
 - La membrane est alors chauffée, dans le cas de nitrocellulose, ou exposée au rayonnement ultraviolet s'il s'agit de nylon, et ce, afin de fixer de manière permanente l'ADN sur la membrane.
 - La membrane est ensuite mise en contact avec une sonde marquée spécifique de la séquence d'ADN recherchée.
 - Après hybridation, la sonde en excès est éliminée de la membrane par différents lavages, et l'hybridation est visualisée par autoradiographie, dans le cas d'une sonde radioactive ou fluorescente.
- **La PCR** (polymerase chain reaction ou réaction de polymérase en chaîne) est une technique d'amplification in vitro. Elle permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie. Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes : **une dénaturation** d'ADN par chauffage pour séparer les deux brins qui le composent, **une hybridation** des amorces aux extrémités de la séquence à rechercher puis **une élongation** grâce à l'action d'une ADN polymérase (Taq polymérase). Ce cycle est répété un nombre de fois pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence d'ADN cible. n cycle de PCR permettent en théorie de produire 2^n copies de la séquence ciblée.

✚ Exemple d'application de la technique d'hybrides cellulaires somatiques

Un panel de cellules somatiques hybrides (tableau 1) est réalisé afin de déterminer la présence ou l'absence du gène de l'Héxosaminidase A (HEXA), dont les mutations sont responsables de la maladie de Tay-Sachs. La présence du gène de l'HEXA à put être corrélée avec la présence du chromosome 15 humain. Tous les hybrides qui retenaient un chromosome 15 humain contenaient le gène humain HEXA ; tous ceux qui ne contenaient pas le chromosome 15 ne contenaient plus le gène HEXA. Cette concordance parfaite a été observée uniquement pour le chromosome 15 et pour aucun autre chromosome humain, par conséquent cela permet de localiser le gène HEXA sur le chromosome 15. La présence du gène HEXA dans les cellules hybrides a été réalisée par une southern blot (figure 3).

Tableau 1: cartographie du gène humain HEXA en utilisant des cellules somatiques hybrides

Hybrides	Gène HEXA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
I	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-
II	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-
III	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
IV	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-
V	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
VI	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-
VII	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
VII I	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

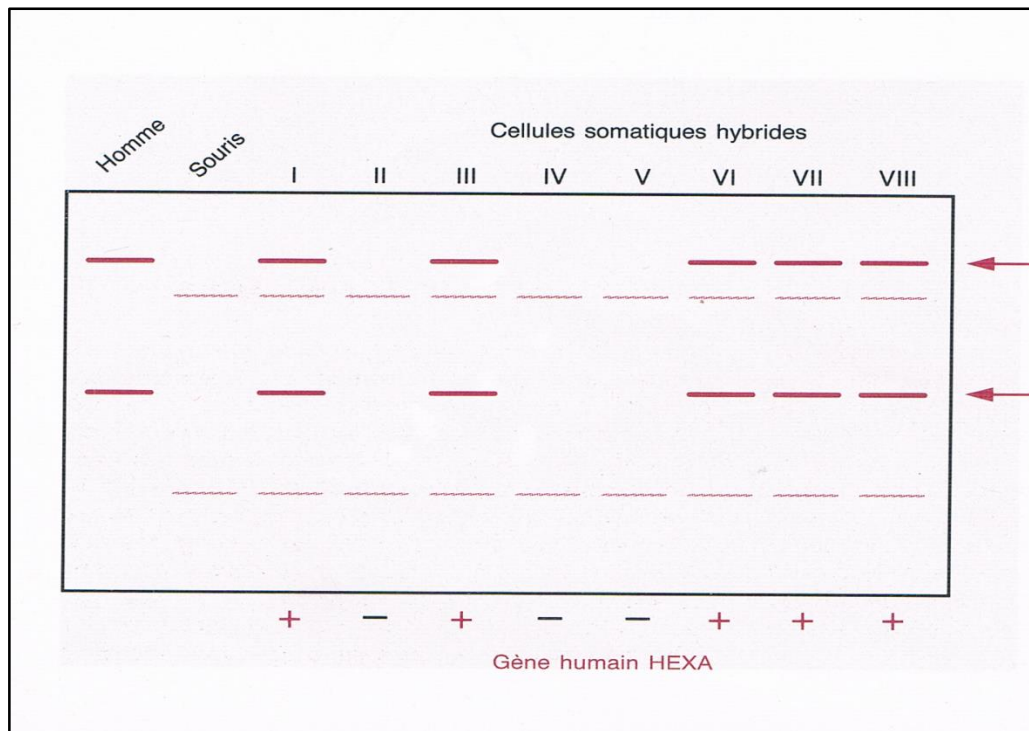


Figure 3 : expérience de southern blot pour localiser le gène HEXA sur le chromosome 15

Les résultats de la southern blot montrent que les hybrides I, III, VI, VII et VIII contiennent les séquences HEXA humaines, qui peuvent être distinguées des séquences du gène de la souris par l'existence dans le gène des deux espèces de sites de restriction différents.

1-2-Les hybrides monochromosomiques

Le désavantage des hybrides cellulaires somatiques traditionnels est que les cellules hybrides contiennent habituellement plusieurs chromosomes humains et non un seul. Afin de limiter la quantité du matériel génétique humain transféré dans la cellule receveuse de rongeur, on peut appliquer la technique de **fusion microcellulaire** :

- la première étape consiste à soumettre les cellules donneuses à un arrêt mitotique prolongé par exposition continue à un inhibiteur de la formation du fuseau mitotique comme la colcémide.
- ce traitement entraîne le fractionnement du contenu cellulaire chromosomique en paquet subnucléaire distinct formant des **micronoyaux ou des micronuclei**.
- les micronoyaux peuvent être isolés physiquement des cellules par centrifugation en présence de cytochalasine B (un inhibiteur du fuseau mitotique), entraînant la formation de **microcellules**, particules constituées d'un seul micronoyaux et d'une fine bande de cytoplasme entourée par une membrane cytoplasmique intacte.

- comme pour les cellules donneuses normales, les microcellules peuvent être fusionnées avec les cellules receveuses. Les hybrides obtenus sont appelés **hybrides microcellulaires**.
- Certains contiennent un petit nombre de chromosomes donneurs, mais les plus simples contiennent un seul chromosome donneur, il s'agit d'**hybride monochromosomique** (figure 4).

Le gros avantage des hybrides monochromosomiques est qu'ils peuvent mettre en évidence, de façon non ambiguë, la présence ou l'absence d'une séquence définie d'ADN humain sur un chromosome spécifique.

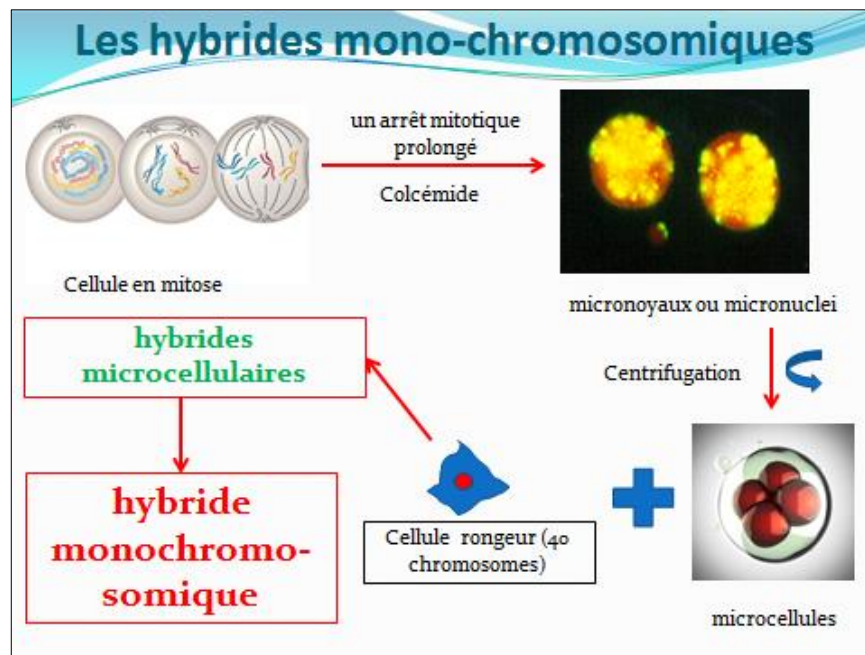
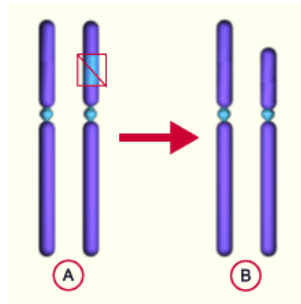


Figure 4 : technique des hybrides mono-chromosomiques

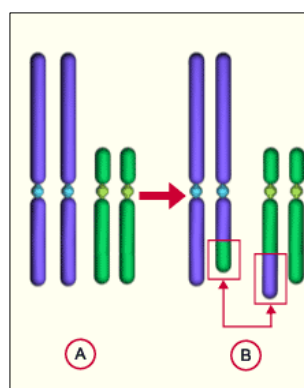
1-3-Les hybrides de translocation et de délétion

Pour obtenir une localisation **sub-chromosomique**, il est nécessaire d'utiliser des hybrides spécialisés contenant seulement une partie des chromosomes humains. Les fragments sub-chromosomiques peuvent être obtenus par la cassure spontanée des chromosomes résultant de **translocation** ou de **délétion** ou être induite artificiellement.

✚ **La délétion** est une anomalie de structure des chromosomes caractérisée par la perte de matériel génétique sur un chromosome. La taille des délétions varie d'une paire de base à toute une région chromosomique et les délétions peuvent survenir n'importe où sur le chromosome. Il s'agit toujours d'une anomalie déséquilibrée. La délétion est dite interstitielle quand il y a perte d'un fragment intermédiaire (deux points de cassure comme dans l'inversion), terminale quand l'extrémité d'un bras chromosomique est concernée (un seul point de cassure).



✚ **Une translocation** réciproque est un échange de fragments chromosomiques entre 2 chromosomes non homologues après cassure sur chacun des chromosomes impliqués. Si cet échange s'accompagne d'une perte de matériel génétique, il est déséquilibré, sinon la translocation est dite équilibrée, car la totalité de l'information génétique est présente. Les problèmes surgissent lors de la formation des gamètes.



On peut réaliser des hybrides cellulaires somatiques en fusionnant des cellules de rongeur à des cellules humaines contenant des translocations chromosomiques ou des chromosomes possédant une délétion visible cytogénétiquement. Les cellules hybrides résultantes peuvent être testées pour la présence du **chromosome anormal**. Des lignées cellulaires peuvent être ensuite réalisées à partir d'hybrides contenant le chromosome anormal, mais ne contenant pas l'homologue normal du chromosome d'intérêt (figure 5, figure 6).

Bien que l'approche d'hybride de délétion et de translocation améliore de manière importante le niveau de résolution de la localisation des gènes, les régions chromosomiques définies sont encore très larges en comparaison de la taille moyenne d'un gène.

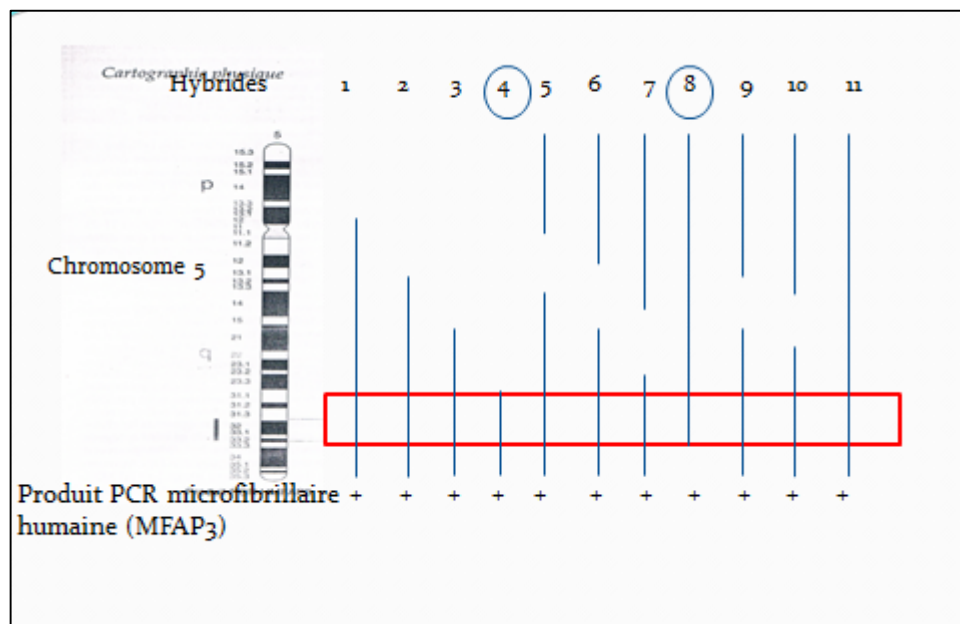


Figure 5: exemple de cartographie physique par hybrides de délétion

La figure illustre une cartographie par PCR de la protéine microfibrillaire humaine MFAP₃, utilisant une série d'hybrides de délétion, les barres bleues verticales à droite indiquent l'étendue des séquences du chromosome 5 humain retenues dans les hybrides. La barre rouge indique la région sub-chromosomique intéressée, définie par les points de cassures des hybrides 4 et 8.

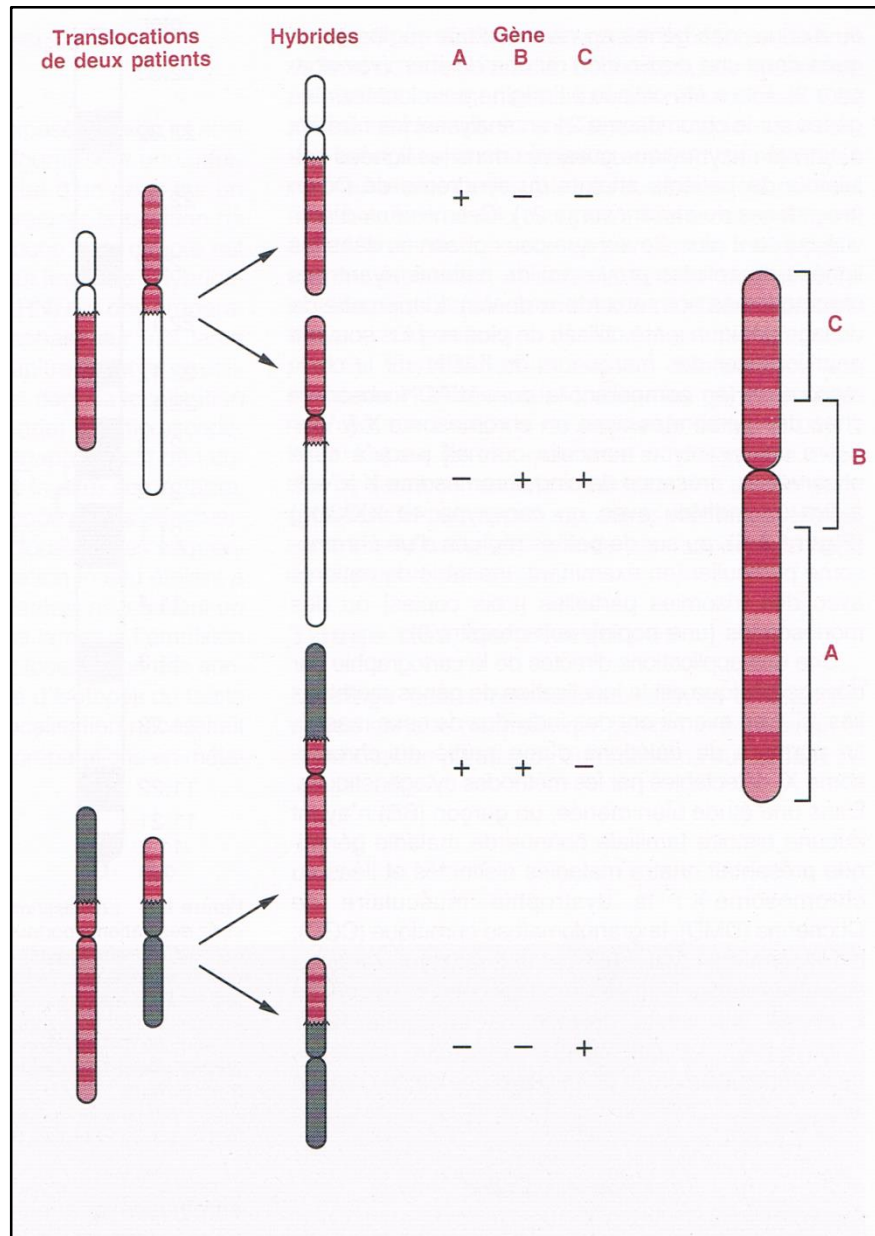


Figure 6: exemple de cartographie physique par hybride de translocation

Les produits réciproques de deux translocations X-autosome ségrègent dans les clones des cellules somatiques hybrides et peuvent être analysés pour la présence ou l'absence de gènes du chromosome X humain. Les résultats combinés permettent de localiser trois gènes sur différentes portions du chromosome X comme cela est indiqué à droite.

1-4-Cartographie par hybrides d'irradiation

C'est une technique qui commence généralement avec un hybride de cellules somatiques monochromosomique. Les cellules sont irradiées avec **les rayons X ou les rayons γ** afin d'induire de multiples cassures doubles brins dans les chromosomes

humains. Certaines cellules, dénommées **hybrides d'irradiation**, contiennent de petits fragments de chromosomes humains fusionnés à des chromosomes de rongeur.

La présence de fragments de chromosomes humains peut être détectée par la recherche des **séquences Alu**, ce sont des séquences répétées, réparties régulièrement dans les chromosomes humains, espacées de quelques kilobases, mais qui ne sont pas retrouvées dans les chromosomes de rongeur. Dans la mesure où les radiations cassent les chromosomes humains selon des intervalles aléatoires, les loci qui sont situés à proximité les uns des autres se retrouveront plus fréquemment sur le même fragment chromosomique. Des techniques comme la **PCR** peuvent alors être utilisées pour déterminer quels hybrides contiennent **des combinaisons spécifiques** de locus humains. **Des amorces spécifiques** de chaque locus sont utilisées pour déterminer si les segments d'ADN de chacun d'eux peuvent être amplifiés, indiquant leur présence dans l'hybride (figure 7).

Ensuite, des **méthodes statistiques** sont appliquées pour évaluer à quelle fréquence chaque paire de loci est retrouvée sur le même fragment chromosomique, fournissant ainsi une estimation **des distances** relatives entre les loci.

Il faut habituellement environ **100 à 200 hybrides** pour construire une carte chromosomique humaine. Ce type d'approche n'est pas réalisable en pratique pour cartographier tout le génome du fait du nombre énorme de cellules hybrides qui seraient nécessaires.

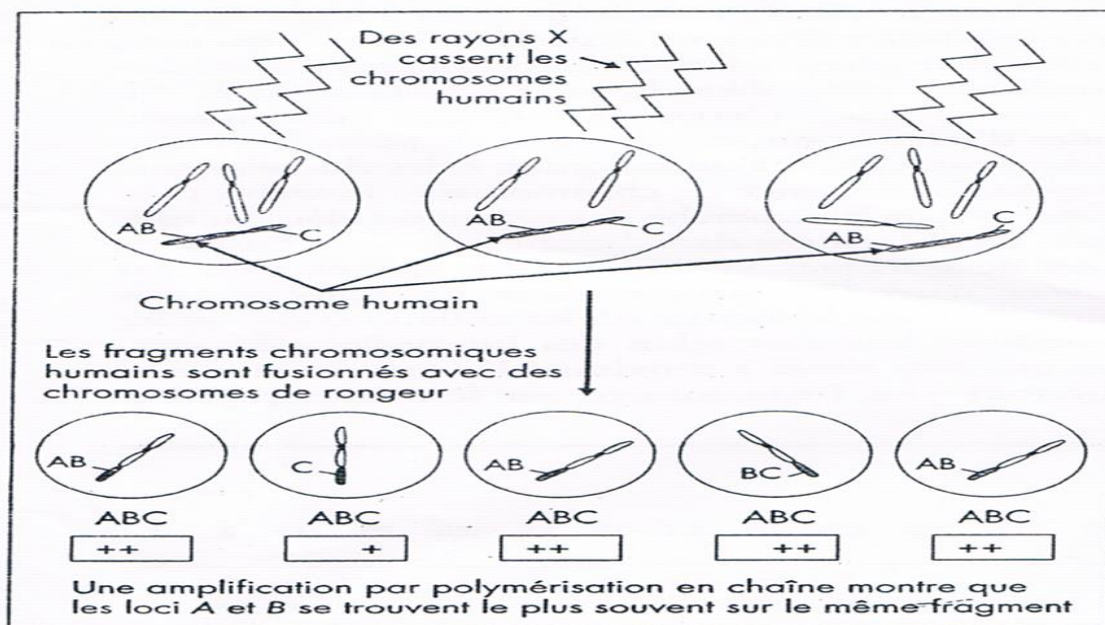


Figure 7: cartographie par hybrides d'irradiation

1-5-Les anomalies chromosomiques de structure

Des anomalies de type **délétion** et **translocation** peuvent n'avoir aucune conséquence clinique par elles-mêmes, servant ainsi de marqueurs ; ou peuvent être responsables de maladies et ainsi peuvent être utilisées en cartographie:

- lorsque le réarrangement est non équilibré, il y a perte ou gain de matériel
- lorsque l'un des points de cassures chromosomiques est à l'origine d'une maladie.

1-5-1-Les délétions

Les caryotypes des patients souffrant d'une maladie génétique révèlent occasionnellement la présence de délétions dans une région spécifique d'un chromosome. Cela induit la forte présomption que le locus provoquant la maladie peut se trouver dans la région délétée. L'amplitude d'une délétion peut varier chez différents patients souffrant de la même maladie. Les délétions doivent être comparées entre de nombreux patients afin de définir la région délétée qui est commune à tous, permettant ainsi de préciser la localisation du gène pathologique. Les délétions de matériel génétique constituent la cause directe de la maladie génétique (figure 8).

La cartographie de délétion a été utilisée pour localiser les gènes responsables du rétinoblastome, des syndromes de Prader Willi et d'Angelman, et du néphroblastome.

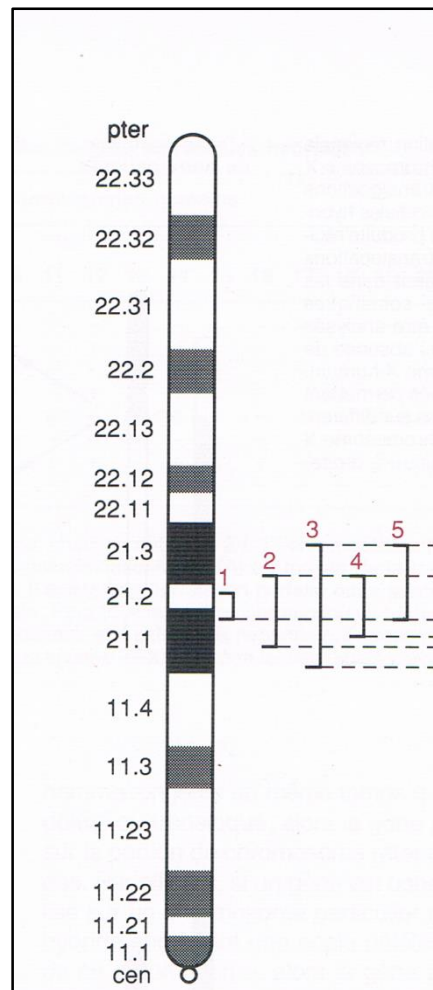


Figure 8: localisation d'un gène pathologique à l'aide d'une cartographie de délétion

Une série de délétions chevauchantes est étudiée, dans laquelle chaque délétion produit le phénotype pathologique. La région de chevauchement commune à toutes les délétions définit la localisation approximative du gène pathologique.

1-5-2-Les translocations

Les translocations chromosomiques équilibrées n'ont souvent aucun effet sur le porteur de la translocation, dans la mesure où l'individu garde une copie complète de son matériel génétique. Cependant lorsqu'une translocation a pour conséquence l'interruption d'un gène, elle peut être à l'origine d'une maladie génétique.

Des translocations ont été observées entre le chromosome X et des autosomes chez des femmes atteintes de myopathie de Duchenne. Le point de cassure de la translocation sur le chromosome X a été retrouvé à la même position (Xp21) chez plusieurs femmes atteintes, suggérant que la translocation avait interrompu le gène de la maladie de Duchenne.

1-6-Cartographie par dosage génique

C'est une approche qui tire aussi profit de chromosomes dont **la structure est anormale** pour localiser des gènes, mais ne repose pas sur la nécessité de voir les chromosomes anormaux ségréger dans des cellules somatiques hybrides. Cette approche repose sur la détection d'un effet de dose soit des produits géniques soit des séquences géniques elles-mêmes observées dans les lignées cellulaires provenant de patients et contenant un nombre anormal de copies d'un gène particulier. Bien que cette méthode nécessite une analyse et une interprétation très rigoureuses, elle a été utilisée pour localiser ou exclure des gènes au niveau d'une région impliquée dans une **duplication** ou une **délétion**.

✚ Une **duplication** désigne un fragment chromosomique dédoublé. La duplication est parfois décrite comme une "**trisomie partielle**". Lorsqu'il y a duplication, la personne possède **3 copies** du gène qui se trouve dans le segment touché. Cela sera associé à une augmentation des concentrations des produits géniques. Dans la mesure où trois gènes sont présents au lieu de deux, l'augmentation doit entraîner une concentration supérieure à la normale d'approximativement de 50 %.

Il a été observé qu'une réduction de 50 % de la concentration d'une enzyme, l'adénylate Kinase, était constamment associée à une **délétion** sur le chromosome 9, permettant de cartographier le gène de l'adénylate kinase dans cette région chromosomique.

De même, cette forme de cartographie de dosage été utilisée pour assigner le gène de la superoxyde dismutase 1(SOD-1) sur le bras long du chromosome 21 qui présente une **duplication** associée à une augmentation des concentrations des produits géniques. Dans la mesure où trois gènes sont présents au lieu de deux, l'augmentation doit entraîner une concentration supérieure à la normale d'approximativement de 50 %.

1-7-Cartographie des gènes par hybridation in situ

Les méthodes de cartographie exposées jusqu'ici sont indirectes, en ce sens qu'elles fournissent une information sur la localisation physique d'un gène sur un chromosome particulier, sans préciser la position du gène sur la carte.

Une approche plus directe est celle de **l'hybridation in situ** qui implique l'hybridation de sonde de l'ADN sur des préparations de chromosome en métaphase sur une lame dont l'ADN a été dénaturé sur place (**in situ**). La sonde s'hybride, par appariement des bases complémentaires, avec l'ADN dénaturé d'un segment de chromosome spécifique. Le marqueur indique sur le chromosome la position de la sonde hybridée. Les marqueurs radioactifs sont visualisés en plaçant un film radiographique sur la lame (autoradiographie), les marqueurs fluorescents sont visualisés avec un microscope à fluorescence (figure 9).

Cette méthode était à l'origine très laborieuse, mais très lente, nécessitant un **très long temps d'exposition** des lames à l'émulsion photographique pour détecter la localisation des sondes hybridées marquées à l'aide d'isotopes de faible intensité tel que le tritium. La localisation nécessitait l'analyse **d'un grand nombre de préparations** en métaphase afin de distinguer le signal d'hybridation du bruit de fond de la radioactivité.

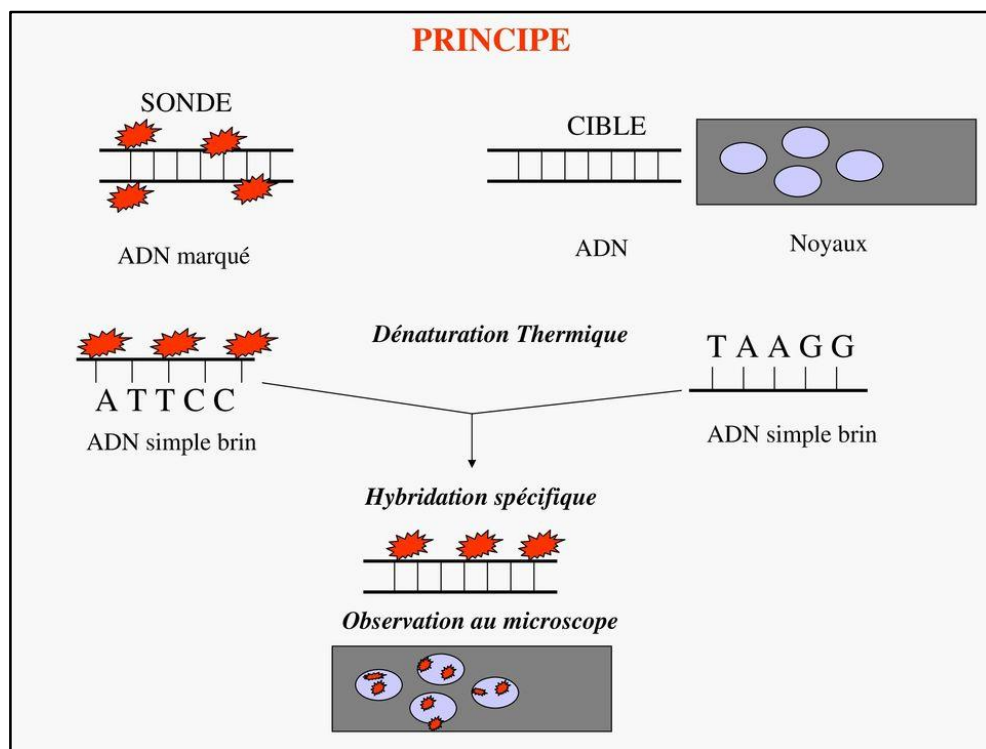


Figure 9 : cartographie d'un segment d'ADN dans une région chromosomique par hybridation in situ

1-8-L'hybridation in situ en fluorescence standard

La FISH comprend les étapes suivantes:

- marquage de sonde
- dénaturation
- préhybridation (hybridation compétitive)
- hybridation sélective
- révélation
- observation au microscope épifluorescent (figure 10).

1-8-1-Marquage des sondes

Pour la FISH, on utilise **des sondes spécifiques de régions chromosomiques** ou des sondes capables de s'hybrider sur les bras d'une paire chromosomique donnée (**les sondes de peinture chromosomique**). Pour augmenter l'intensité du signal d'hybridation, on préfère utiliser de grandes sondes d'ADN. Dans la FISH, il y a deux types de marquage de sonde :

- **Indirect:** Au début des années 80, la sonde d'ADN était marquée par incorporation de nucléotides modifiés (dUTP) couplés à une molécule rapporteuse (telle que la biotine ou la digoxigénine)
- **Direct:** Aujourd'hui, les fluorochromes sont directement fixés sur les nucléotides.

On distingue deux types de sondes :

- **Les sondes composées de séquences spécifiques répétées :** Elles sont de petite taille (moins de 1000 paires de bases ou 1 kilobase), s'hybrident sur des séquences spécifiques (centromères par exemple) répétées en tandem sur plusieurs centaines de kilobases. Elles génèrent des signaux ponctuels de forte intensité.
- **Les sondes composées de séquences uniques:** comprenant les sondes spécifiques de loci et les sondes de peinture chromosomique

Les sondes spécifiques de loci : Pour être entièrement séquencé, le génome humain fut fragmenté en segments de 100-200 kb puis clonés dans des vecteurs appelés BACs (chromosomes artificiels de bactéries).

Les sondes de peinture chromosomique : Par PCR, à partir d'ADN de lignées d'hybrides somatiques contenant chacune un exemplaire d'une paire de chromosomes humain, il est possible d'obtenir un ensemble de fragments d'ADN représentant un chromosome en entier. Ces fragments marqués vont s'hybrider sur une paire chromosomique donnée. L'ensemble de ces fragments s'appelle « sonde de peinture chromosomique ».

1-8-2-Hybridation

L'hybridation consiste à mettre en présence de la sonde dénaturée, des chromosomes de noyaux également dénaturés généralement par la chaleur. Cette hybridation sélective est précédée d'une étape **d'hybridation compétitive**.

En effet, l'ADN est composé de 40% de séquences répétées et de 60% de séquences uniques, ce qui correspond à la composition des sondes. Après marquage, ces séquences répétées vont s'hybrider sur leurs cibles génomiques engendrant **des signaux aspécifiques**. Pour les éviter, on ajoute à l'ADN de la sonde un excès d'ADN **non marqué dénaturé riche en séquences répétées**. Ainsi cet ADN s'hybride non seulement sur les séquences répétées de la sonde, mais aussi sur celles des cibles génomiques. Cette méthode est appelée **hybridation compétitive (préhybridation)**

1-8-3-Révélation

Après l'étape d'hybridation et lavage pour enlever l'excès de sonde, la révélation est l'étape finale de l'hybridation fluorescente. Elle consiste à faire reconnaître les sondes par deux façons selon le type de marquage de la sonde:

- **indirect**: schématiquement, un brin d'ADN matrice dénaturé, et une séquence sonde hybridée. La sonde comporte quelques nucléotides modifiés par la présence d'une molécule de biotine, auxquelles viennent se lier des molécules de streptavidine possédant un site fluorescent. Ces molécules sont elles-mêmes reconnues par des anticorps anti-avidine (équipés d'un site biotine et d'un site fluorescent)
- **direct**: elle consiste à faire reconnaître les sondes par des anticorps flanqués de sites moléculaires fluorescents.

1-8-4-Observation

L'observation des séquences hybridées s'effectue à l'aide d'un **microscope à épifluorescence**, qui éclaire l'échantillon avec une lumière de longueur d'onde assez spécifique, et récupère la lumière émise par les sites fluorescents, en général de longueur d'onde supérieure ce qui permet de n'observer que les sites hybridés.

Sur plaque **métaphasique**, les signaux positifs se présentent sous la forme d'une **double tache**, correspondant à l'hybridation de la sonde avec les deux chromatides sœurs.

- **Avantage la FISH :** apporte des résultats rapides qui peuvent être facilement quantifiés en utilisant un microscope à fluorescence. La résolution maximale de la FISH actuelle sur chromosome métaphasique est de plusieurs mégabases.
- **Inconvénient:** du fait du problème de repliement de la chromatine, deux signaux marqués différemment peuvent apparaître proches, bien qu'ils soient séparés par des distances pouvant être supérieures à 2 Mb.

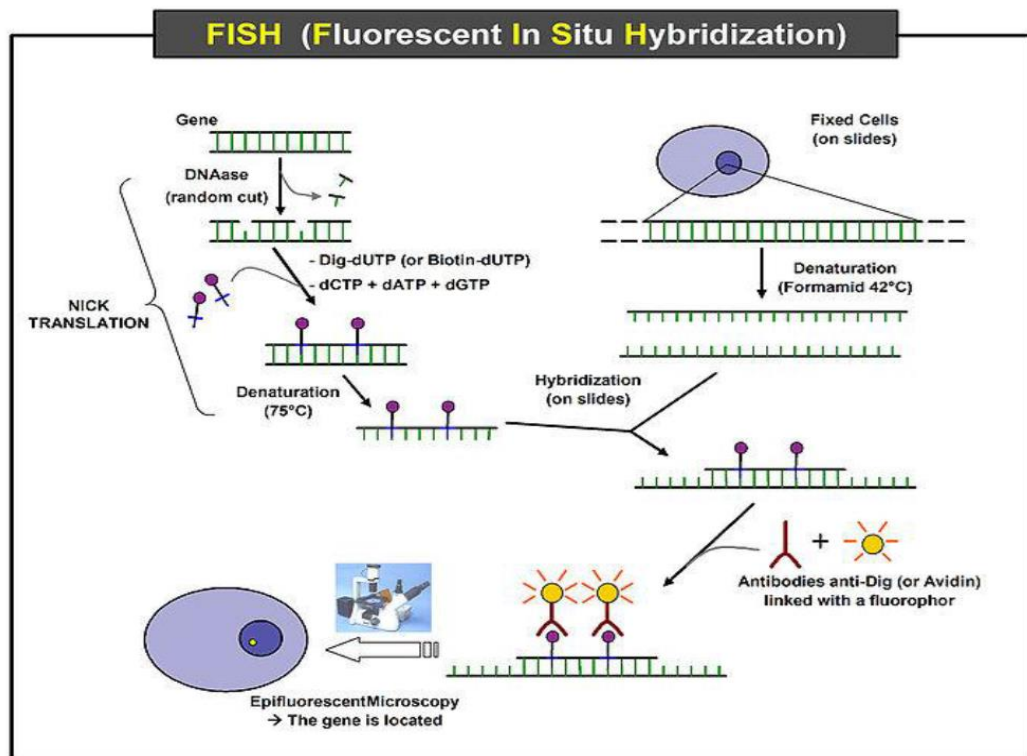


Figure 10: hybridation in situ en fluorescence standard

2-Cartographie physique à haute résolution

Les techniques décrites ci-dessus peuvent être complétées par des techniques de cartographie moléculaire qui assurent une résolution de 1 pb à plusieurs mégabases.

2-1- La FISH à haute résolution

La longueur linéaire de l'ADN d'un chromosome humain de taille moyenne est environ 5 cm, mais il est compacté par différents niveaux de repliement dans les chromosomes métaphasiques. Pour obtenir une résolution supérieure, des sondes d'ADN sont hybridées à des chromosomes interphasiques naturellement étalés, à de la chromatine artificiellement étalée ou à des fibres d'ADN préparées par différentes méthodes.

2-1-1-La FISH sur chromosome prophasique

Les chromosomes des noyaux prophasiques sont beaucoup plus étalés que les chromosomes métaphasiques ou pro-métaphasiques. Cette technique permet donc une résolution de cartographie supérieure et peut aider à déterminer l'ordre physique de certains clones d'ADN syténique. Les chromosomes étalés pouvant se replier en boucles dans certaines régions, une détermination précise de l'ordre linéaire de clones d'ADN synténiques impose une analyse statistique des résultats de la cartographie à partir de nombreux noyaux pro-phasiques différents. Même ainsi, la méthode reste surtout adaptée pour ordonner des séquences séparées per des intervalles compris entre 50 et 500 Kb.

2-1-2-La FISH sur chromatine artificiellement étalée

La FISH à haute résolution peut également être réalisée en utilisant des techniques qui permettent d'étaler l'ADN des chromosomes sur une lame de microscope avant l'hybridation. Une de ces méthodes est appelée DIRVISH (direct visual hybridization) : les cellules sont lysées avec un détergent à une extrémité de la lame ; la lame est ensuite penchée et l'ADN en solution glisse vers le bas. De telles préparations permettent des résolutions de cartographie extrêmement élevées, de 700 Kb jusqu'à 5 Kb.

2-1-3-La FISH sur fibre d'ADN

Plus récemment, le principe de l'étalement artificiel des fibres de chromatine a été étendu à l'ADN sans protéine, l'ADN cible est préparé à partir de cellules incluses dans des blocs de gel d'électrophorèse en champs pulsé. Cette méthode utilise des fibres d'ADN linéarisées non fixées sur une lame de microscope, et sa résolution est comprise entre 500 Kb et quelques kb.

2-2- La cartographie de restriction

La cartographie de restriction est l'utilisation des **enzymes de restriction** pour analyser et produire une **carte physique de restriction** des génomes, des gènes, ou d'autres segments d'ADN. **Une carte de restriction** est une suite linéaire de sites séparés par une distance réelle (en nombre de paires de bases). Ces sites correspondent à des coupures de la séquence par des enzymes de restriction. Les tailles des fragments qui résultent de ces coupures sont ensuite mesurées.

La cartographie de restriction a pour objectif de **reconstituer la séquence d'ADN en réordonnant les fragments issus des digestions**. La cartographie de restriction à

grande échelle nécessite **des enzymes qui coupent rarement l'ADN** et le fractionnement des grands fragments de restriction par **électrophorèse sur gel en champ pulsé**.

La plupart des enzymes de restriction qui reconnaissent une séquence de 4 à 6 pb coupent habituellement l'ADN des vertébrés une fois toutes les quelques centaines ou milliers de pb. Les séquences de reconnaissance pour les nucléases de restriction qui coupent rarement l'ADN sont habituellement longues de 6 à 8 pb et contiennent un ou plusieurs dinucléotides CpG qui sont rares dans l'ADN des vertébrés. Elles engendrent donc des fragments dont la taille est habituellement de quelques centaines de Kb. Les petits fragments de restriction peuvent être fractionnés selon la taille sur un simple gel d'électrophorèse en agarose. Cependant la capacité des gels d'agarose à fractionner de grands fragments d'ADN est très limitée.

L'ADN génomique préparé de façon conventionnelle ne se prête pas à la cartographie de restriction à grande échelle, car les techniques de lyse cellulaire et de purification de l'ADN utilisées entraînent une fragmentation considérable de cet ADN. L'ADN doit être isolé de façon à minimiser la cassure artificielle des grandes molécules avant la digestion avec les enzymes de restriction. Pour préparer de l'ADN de haut poids moléculaire, les échantillons de cellules, par exemple les leucocytes, sont mélangés avec de l'agarose fondu, puis transférés dans les puits d'un bloc calibré et refroidi. Les cellules sont ainsi emprisonnées dans les blocs d'agarose solide. Les blocs sont incubés avec des enzymes hydrolytiques qui diffusent à travers les pores de l'agarose et digèrent les composants cellulaires, mais laissent l'ADN chromosomique de haut poids moléculaire pratiquement intact. Ces blocs peuvent ensuite être incubés dans un tampon contenant l'enzyme de restriction coupant rarement.

Afin de séparer les grands fragments de restriction, on utilise l'électrophorèse sur gel en champ pulsé **PFGE** (pulsed field gel electrophoresis). Au cours de la PFGE, l'orientation relative du gel et du champ électrique est modifiée périodiquement, en délivrant de brèves impulsions électriques qui activent alternativement deux champs orientés différemment. Le principe du champ électrique discontinu se fait de sorte que les molécules d'ADN sont forcées de changer leur conformation et leur direction de migration périodiquement au cours de leur passage à travers le gel. Ce changement dépend strictement de la taille, des fragments d'ADN allant jusqu'à plusieurs mégabases peuvent ainsi être fractionnés efficacement (figure 11).

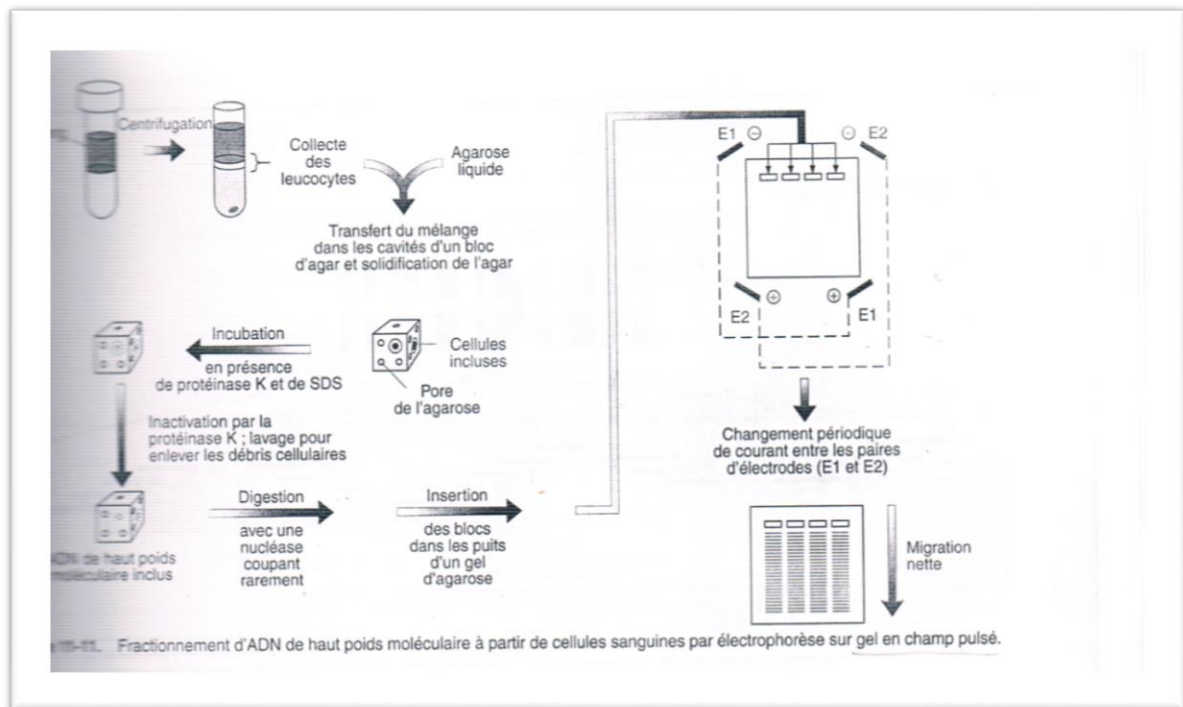


Figure 11 : électrophorèse en champ pulsé

Fractionnement d'ADN de haut poids moléculaire à partir de cellules sanguines par électrophorèse en champ pulsé

2-3- Le séquençage

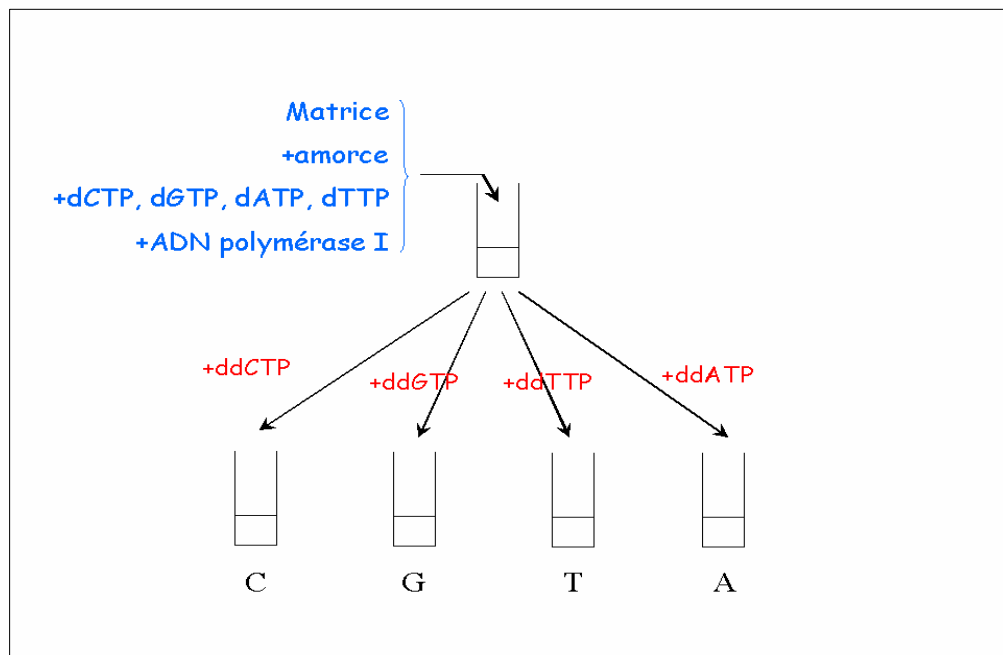
Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ADN donné.

2-3-1-Le séquençage de l'ADN par la méthode de Sanger

Le séquençage de l'ADN par la méthode de synthèse enzymatique de Sanger, a été utilisé pendant plus de 30 ans pour lire le code génétique des organismes vivants. L'approche de Sanger est une méthode par synthèse enzymatique qui consiste à initier la polymérisation de l'ADN à l'aide d'un petit oligonucléotide (amorce) complémentaire à une partie du fragment d'ADN à séquencer. L'élongation de l'amorce est réalisée par une ADN polymérase dépourvue d'activité exonucléase en présence d'un mélange des quatre désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) et une faible concentration de quatre didésoxynucléotides (ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP) chacun associé à un marqueur fluorescent différent. Une fois incorporés dans le nouveau brin synthétisé, ces didésoxynucléotides empêchent la poursuite de l'élongation. Il en résulte un mélange de

fragments d'ADN de tailles croissantes, qui se terminent à toutes les positions dans la séquence.

Ces fragments sont ensuite séparés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide ce qui permet ainsi de lire la suite de chacune des bases dans la séquence. Une dernière étape de traitement bio-informatique permet alors la reconstruction d'un génome entier à partir de tous les fragments séquencés.



Fig

re 12 : le séquençage de l'ADN par la méthode de Sanger

2-3-2-Évolution de la technique de Sanger

Des avancées ultérieures dans cette méthode ont incorporé l'utilisation de **fluorophores**, qui sont de petits composés chimiques dégageant des lumières colorées. En ajoutant un fluorophore coloré différent à chaque nucléotide, le séquençage peut être effectué en une seule réaction avec une seule colonne de gel pour représenter les brins d'ADN; la couleur de la bande indique la base située à l'extrémité du fragment d'ADN (figure13). Cette innovation en automatisation (les ordinateurs et les machines font le travail) a rendu possible le séquençage de beaucoup plus de brins d'ADN.

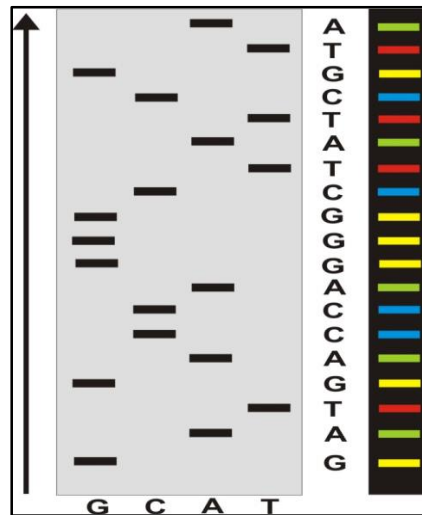


Figure 13 : profil électrophorétique en gel de polyacrylamide
 (droite) : Séquençage à l'aide de fluorophores.(gauche) : séquençage méthode Sanger.

2-3-3-Les techniques actuelles de séquençage à haut débit (automatisation)

C'est en 2007 qu'est apparue sur le marché la première génération des appareils de séquençage à haut débit. La dernière génération des séquenceurs à **capillaires**, utilisant la technique Sanger, permettait de lire jusqu'à 2 millions de bases en une demi-journée. Cependant en 2007 sont apparues sur le marché des machines dotées de débits de 50 à 1000 fois supérieures. Ce sont les séquenceurs en gel plat et les séquenceurs capillaires (figure14).

Ces séquenceurs de « nouvelle » génération ont permis de s'affranchir d'un certain nombre de biais de la méthode Sanger comme la nécessité de cloner l'ADN à séquencer. C'est grâce notamment à la lecture de plusieurs millions de séquences en parallèle que ces nouveaux séquenceurs à « haut débit » ont pu révolutionner les analyses en génomique.

Globalement, leurs technologies sont assez proches et fonctionnent en 3 étapes: la première consiste en la préparation et l'amplification des molécules d'ADN à analyser par PCR, la seconde permet l'incorporation des bases complémentaires du brin à séquencer et enfin la dernière étape comprend la lecture de la séquence proprement dite.

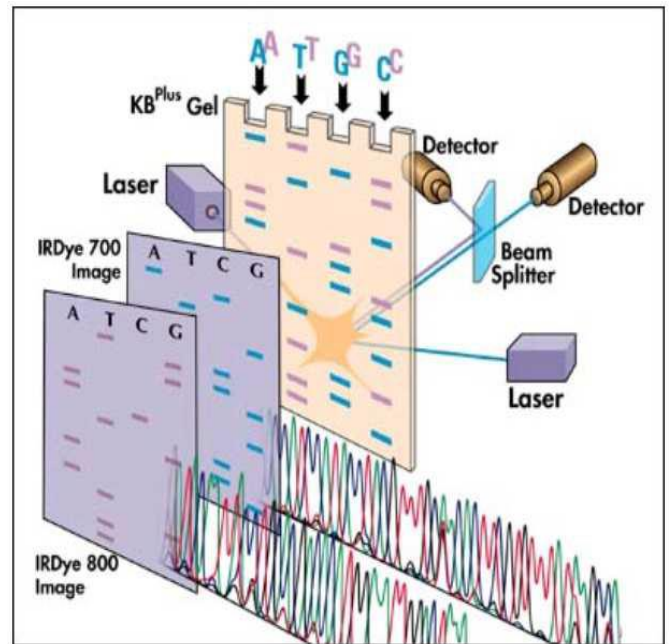
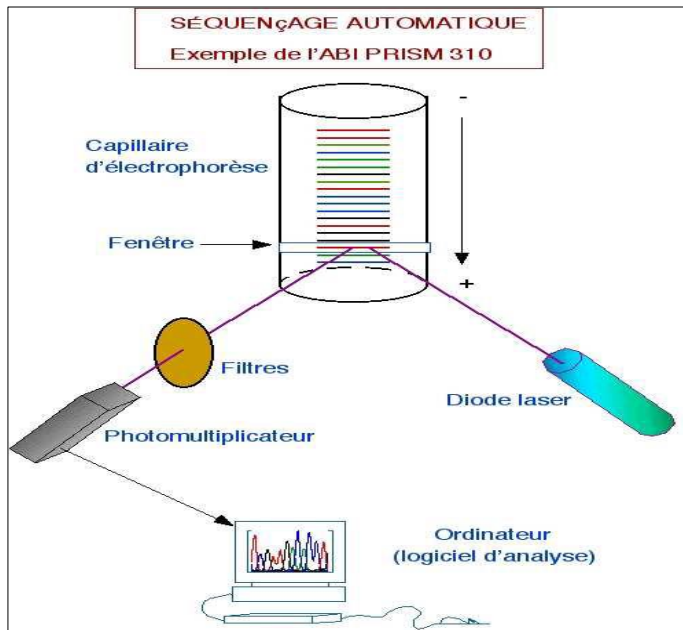


Figure 14 : les séquenceurs actuels (automatisation)

(Droite): séquenceur à plaque. (Gauche): séquenceur capillaire.