



**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET
POPULAIRE**
**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**Université des Sciences et de la Technologie d'Oran
Mohamed BOUDIAF**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Génétique Moléculaire Appliquée**



Polycopié de cours.

Matière : Cartographie du Génome.

Destiné aux étudiants Master 1 académique, Génétique Fondamentale et Appliquée.

Dr HAMOUDA Linda.
Maître de conférences B
Année universitaire 2024/2025.

PREFACE

La compréhension fine du génome humain et de celui des autres espèces constitue aujourd'hui un pilier fondamental de la recherche en génétique, en médecine, en agronomie, et dans de nombreux autres domaines scientifiques. La cartographie du génome, en tant qu'outil essentiel de localisation et d'organisation des éléments génétiques, joue un rôle clé dans cette dynamique de progrès.

Ce support de cours a été élaboré dans le cadre de l'Unité d'Enseignement Fondamentale 2, destinée aux étudiants en première année de Master en Génétique Fondamentale et Appliquée. Il s'inscrit dans une formation de 82 heures réparties sur 15 semaines, combinant cours magistraux et travaux dirigés.

L'objectif de ce polycopié est de fournir aux étudiants les connaissances théoriques et pratiques leur permettant de comprendre le rôle et les applications de la cartographie du génome. À travers l'étude des loci, des marqueurs et de la structure génomique, ce cours vise à initier les futurs chercheurs à des notions essentielles telles que l'assemblage du génome, la localisation des gènes, l'analyse comparative des génomes, et les implications évolutives et fonctionnelles des éléments génétiques.

En plus de favoriser une meilleure compréhension du génome, cette cartographie permet d'identifier des régions d'intérêt, de repérer des séquences associées à des pathologies, et de contribuer activement aux avancées en génétique évolutive. Ce document est donc un outil pédagogique destiné à former une génération de biologistes capables d'exploiter les données génomiques au service de la science et de l'innovation.

Dr HAMOUDA Linda.

Maitre de conférences B

Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed Boudiaf.

Unité d'Enseignement	VHS	V.H hebdomadaire				Coeff	Crédits	Mode d'évaluation
	14-16 sem	C	TD	TP	Autres			Continu 50%
UE fondamentales						9	18	
UEF1(O/P)								
Génétique et Pathologie Moléculaire (GPM).	45H	1H30	1H30		55H	2	4	X
Immunogénétique (IG)	45H	1H30	1H30		55H	2	4	X
UEF2(O/P)								
Cartographie du Génome (CG)	67H30	2X1H30	1H30		82H30	3	6	X
Communication Cellulaire et Signalisation (CCS)	45H	1H30	1H30		55H	2	4	X
UE méthodologie						5	9	
UEM1(O/P)								
IA-Analyse des Données Biologiques (IA-ADB) nom et prog	67H30	2X1H30	1H30		82H30	2	4	X
Epidémiologie génétique (EG).	45H	1H30	1H30		55H	3	5	X
UE découverte						2	2	
UED1(O/P)								
Cellules souches et thérapies innovantes (CSTI)	45H	1H30	1H30		5H	2	2	X
UE transversales						1	1	
UET1(O/P)								
	22H	1H30			2H30	1	1	X
Total Semestre 2	375H	202H30	135 H	16H30	377H30	17	30	

Programme

Semestre : S2

Unité d'enseignement Fondamentale

Intitulé du Master: Master académique génétique fondamentale et appliquée.

Intitulé de l'UE : UEF

Intitulé de la matière : Cartographie du génome (CG).

Crédits : 6

Coefficients : 3

Objectifs de l'enseignement

Connaissance des différents types de cartes du génome (carte chromosomique, carte génétique et carte physique de haute résolution) et leurs applications dans l'étude de la relation évolutive entre les organismes et pour transférer des connaissances d'une espèce à une autre.

Connaissances préalables recommandées

- Génétique mendélienne
- Génétique Humaine

Contenu de la matière:**I - Carte Chromosomique :**

- Hybrides Somatiques.
- Hybridation *In situ*.
- Peinture Chromosomique.
- Cytométrie de Flux
- Hybrides d'irradiation
- Degré de résolution des différentes méthodes.

II – Carte génétique :

- Analyse Génétique
- Fonction de Cartographie.
- Relation Distance Physique et Génétique

- Cartographie Génétique : Méthode de Lod score

- Analyse 2 Points
- Analyse 3 Points
- Limite de l'analyse standard de Lod score
- Cas Particulier : - Analyse de spermatozoïdes
- Etudes de liaison sans modèle

III – Cartographie Physique à Haute Résolution :

- La Cartographie par FISH à haute résolution :
- Sur chromosomes interphasiques
- Sur fibres d'ADN étirées
- Marche sur le Génome
- Macro cartographie de restriction
- Stratégie des Contigs
- Cartographie par Saut
- Saut deletionnel
- Banques de Fonctions
- Macro clonage dans les YAC

IV – Cartographie Comparée

Mode d'évaluation : Contrôle continu, exposés, examen.

Objectifs du cours

Ce polycopié est le support de cours de la matière Cartographie du Génome, Unité d'Enseignement Fondamentale 2, destiné aux étudiants en première année Master, spécialité Génétique Fondamentale et Appliquée.

Cette formation présente un volume horaire semestriel de 82 heures 30 pour 15 semaines d'enseignements entre cours et TD.

Ce manuscrit a pour but de faire connaître aux étudiants le rôle de la cartographie du génome dans la localisation de gènes, locus et marqueurs. Elle permet également de comprendre la structure et l'organisation du génome, de faciliter l'étude de la génomique, d'aider à l'assemblage du génome et de contribuer à la recherche en génétique évolutive.

La cartographie du génome est une étape essentielle pour comprendre la structure, la fonction et l'évolution du génome, et pour utiliser ces connaissances dans la recherche, la médecine, l'agriculture, et d'autres domaines.

La cartographie du génome est une méthode qui consiste à déterminer la position relative des différents éléments génétiques (comme les gènes, les marqueurs, ou les séquences spécifiques) sur un chromosome ou dans l'ensemble du génome. Elle consiste à réaliser une « carte » qui indique où se trouvent ces éléments dans le génome, en précisant leur ordre et leur proximité. Cette étape permet de mieux comprendre la structure du génome, d'identifier les régions importantes, et de faciliter des recherches sur la fonction des gènes ou leur rôle dans certaines maladies. Elle permet également d'identifier les régions conservées ou divergentes entre les génomes, ce qui aide à comprendre l'évolution, la conservation des gènes, et la structure chromosomique à travers différentes espèces.

À travers ce module, les étudiants apprendront à :

Comprendre la structure et l'organisation du génome, en abordant les concepts de cartes génétiques et physiques, ainsi que les différentes techniques de cartographie.

Faciliter l'étude de la génomique, en appréhendant les liens entre la structure génétique et les fonctions biologiques des gènes, notamment dans les mécanismes de régulation, d'expression et de mutation.

Contribuer à l'assemblage du génome, en comprenant comment les cartes génétiques servent à aligner et organiser les fragments d'ADN, et à reconstituer l'architecture complète d'un génome.

S'initier à la recherche en génétique évolutive, en comparant les cartes de différents génomes pour identifier les éléments conservés ou divergents, indicateurs de l'évolution des espèces.

Identifier les régions du génome associées à des fonctions essentielles ou à des maladies, en apprenant à utiliser la cartographie pour repérer les gènes d'intérêt biomédical.

Appliquer ces connaissances à des domaines variés, comme la médecine, la biotechnologie, l'agriculture, ou encore la conservation des espèces.

La cartographie du génome représente une étape clé pour organiser et localiser précisément les composants du patrimoine génétique d'un organisme.

Résumé du polycopié

La cartographie du génome est une démarche scientifique visant à localiser précisément des gènes, des loci, des marqueurs ou des séquences spécifiques sur les chromosomes. Elle permet d'ordonner ces éléments et de mieux comprendre l'organisation générale du génome. Cette approche joue un rôle essentiel dans la génétique moderne, car elle facilite le clonage des gènes grâce à la connaissance précise de leur position et permet d'identifier les régions génomiques influençant des caractères d'intérêt tels que des maladies génétiques ou des traits complexes à composante quantitative. Elle contribue également à la comparaison des génomes entre différentes espèces, apportant ainsi des informations précieuses sur l'évolution du génome.

Ce polycopié a pour objectif de faire découvrir aux étudiants le rôle de la cartographie du génome ainsi que leur permettre de comprendre la structure et l'organisation du génome. Cela est abordé à travers l'étude des différents types de cartographie, qui constituent les divers chapitres de ce cours et qui se déclinent comme suit :

- 1-la carte chromosomique aussi appelée carte physique de faible résolution,
- 2-la carte génétique, fondée sur les fréquences de recombinaison,
- 3-la carte physique de haute résolution, qui localise les séquences à une échelle beaucoup plus précise.
- 4-la cartographie comparée

Grace à ces outils, ce support vise à fournir une base solide pour les étudiants de première année master spécialité Génétique Fondamentale et Appliquée, tout en leur ouvrant des perspectives vers les approches les plus récentes en recherche biomédicale, en amélioration des espèces végétales et animales, en biotechnologie, ainsi que dans l'étude de l'évolution génomique. La cartographie constitue ainsi un fondement indispensable de la génomique moderne.

Mots clés : hybrides somatiques, chromosomes, corrélation positive, carte génétique, distance génétique, recombinaisons, marqueurs moléculaires, Lod score, distance physique, contigs, carte comparative, évolution.

Liste des figures

Figure 1 : Carte génétique et cartes physiques	2
Figure 2 : Technique d'hybridation interspécifique de cellules somatiques	3
Figure 3 : Culture cellulaire	3
Figure 4: Electrophorèse sur support acétate de cellulose	10
Figure 5 : Exemple d'un autoradiogramme de MPI « manose phosphate isomerase »	11
Figure 6 : Exemple d'un autoradiogramme de G6PD	11
Figure 7: Exemple d'un autoradiogramme de NP	11
Figure 8: Exemple d'un autoradiogramme de SOD	12
Figure 9 : Technique des hybrides mono-chromosomiques	14
Figure 10: Autoradiogramme par la technique du southern blot	18
Figure 11: Autoradiogramme d'une sonde spécifique à l'humain	18
Figure 12 : Autoradiogramme d'une hybridation croisée	19
Figure 13 : Autoradiogramme de résultats non informatifs	19
Figure 14: Autoradiogramme du gène humain « a »	20
Figure 15 : Marquage par transfert de coupure (Nick translation)	21
Figure 16 : Marquage par multi amorçage au hasard (random priming)	22
Figure 17 : Marquage par la biotine	24
Figure 18 : Marquage par la digoxigénine	25
Figure 19 : Hybridation fluorescente in situ FISH	26
Figure 20 : Résultats de la technique FISH	26
Figure 21 : Hybrides d'irradiation	29
Figure 22 : Carte génétique de la drosophile.	31
Figure 23 : Etablissement de la première carte génétique	31
Figure 24 : Phénomène du " <i>crossing over</i> " au cours de la méiose	31
Figure 25 : Notion de recombinant et non recombinant	40
Figure 26 : Méiose informative et non informative	40
Figure 27 : Exemple de phase connue	41
Figure 28 : Exemple de phase inconnue	41

Figure 29 : Différentes courbes de Lod score	42
Figure 30: Résultats de liaison génétique multipoint	43
Figure 31: Cartographie par homozygotie	45
Figure 32: Fréquences des allèles partagés entre germains	45
Figure 33: Stratégie de cartographie physique	46
Figure 34 : Principe de la FISH interphasique et résultat au microscope a fluorescence.	47
Figure 35 : Peignage moléculaire	48
Figure 36: Principe de la marche sur chromosome	49
Figure 37: Electrophorèse en champ pulsé PFGE	51
Figure 38: Différents systèmes d'électrophorèse en champs pulsés.	51
Figure 39: Exemple de profile d'électrophorèse en champ pulsé PFGE	52
Figure 40: Stratégie des contigs	52
Figure 41: Mise en ordre de 4 clones chevauchants à l'aide de sites de restriction	53
Figure 42: Cartographie par Saut	54
Figure 43: Organisation et criblage d'une banque	58
Figure 44: Ordonnancement par l'utilisation des STS	59

Liste des tableaux

Tableau 1 : Génotypes des parents et des cellules hybrides dans le milieu HAT	5
Tableau 2 : Génotypes des parents et des cellules hybrides dans le milieu AA	6
Tableau 3 : Composition variable en chromosomes du parent diploïde	7
Tableau 4 : Ségrégation des enzymes dans un panel d'hybrides (Corrélation marqueur / marqueur)	7
Tableau 5 : Ségrégation des enzymes dans un panel d'hybrides (Corrélation marqueur / chromosome)	9
Tableau 6 : Coefficient de corrélation ϕ	10
Tableau 7 : Composition chromosomiques des cellules hybrides	16
Tableau 8 : Composition chromosomiques des cellules hybrides	17
Tableau 9 : Analyse directe des produits de la méiose chez la levure	38
Tableau 10 : Valeurs critiques de la distribution du χ^2	39
Tableau 11 : Estimation des fréquences théoriques	39
Tableau 12 : Comparaison avec la marche sur le chromosome	55
Tableau 13 : Différence avec le chromosome jumping classique	56
Tableau 14: Equivalences du génome	57

Liste des abréviations

χ^2:	Chi deux
Φ :	Coefficient de corrélation
θ :	Taux de recombinaison
A :	Adénine
aa :	Acide aminé
AA :	Alanosine Adénine
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNg :	Acide désoxyribonucléique gnomique
APRT:	Adénine phosphoribosyltransférase
ARN :	Acide ribonucléique
BAC :	Bacterial Artificial Chromosome
°C:	Degree Celsius
CDC	Coefficient de coincidence
CH:	Hamster chinois
cM :	centiMorgan
CO:	Crossing over
cR:	centiRay
d:	Distance
dAMP:	désoxyadénosine monophosphate
dCMP :	désoxycytidine monophosphate
dGMP :	désoxyguanosine monophosphate
dUTP :	Deoxyuridine Triphosphate
DNAse :	désoxyribonucléase
dNTP :	désoxyribonucléosides triphosphates
dTMP :	désoxythymidine monophosphate
EG :	Equivalent du génome
FISH :	Fluorescence In Situ Hybridization
FR:	Fréquence de recombinaison
G:	Guanine
G6PD:	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
H:	Homme
H3:	Tritium
HAT:	Hypoxanthine Aminoptérine Thymidine
HGPRT:	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
HIS:	Hybridation in situ
Hyb :	Hybrides
I:	Interference
IDH1 :	<u>Isocitrate déshydrogénase 1</u>
IMP:	Inosine Monophosphate
Kb:	kilo base
Log:	Logarithm
Mb:	mega base
MDH1:	Malate dehydrogenase
MPI :	Manose phosphate isomerase

MT:	Marqueur de taille
NF-H:	Hyperphosphorylated neurofilament
NP :	Nucleoside phosphorylase
P :	Parent
P32/P33 :	Phosphore
pb :	Paire de base
PCR:	Polymerase Chain Reaction
PEG:	Polyéthylène glycol
PFGE:	Pulsed Field Gel Electrophoresis
QTL:	Quantitative Trait Locus
RAPD:	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP :	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNase:	Ribonucléase
S:	Souris
S35:	Soufre
SB:	Southern blot
SOD:	Superoxyde Dismutase
SNP :	Single Nucleotide Polymorphisms
STS :	Séquence-Tagged Sites
SVF :	Serum de veau feotal
T° :	Temperature
T :	Tymidine
TK :	Tymidine kinase
Xi:	Chromosome X inactif
YAC :	Yeast artificial chromosome
Z:	Lod score
Zmax:	Lod score maximum

Table des matières

Préface	I
Programme	III
Objectifs du cours	V
Résumé du polycopié	VII
Liste des figures	VIII
Liste des tableaux	X
Liste des abréviations	XI
 Introduction	 1
 I. Carte Chromosomique	 2
I.1. Hybrides Somatiques.	2
I.1.1. Culture cellulaire	3
I.1.2. Fusion cellulaire	4
I.1.3. Milieux de sélection	4
• Système sélectif complet : de Littelfield (HAT)	4
• Système semi sélectif : de Davidson et Ephinsi	5
• Milieu sélectif AA : Alanosine* Adenine	6
• Milieu AA semi sélectif	6
I.1.4. Elimination des chromosomes	6
I.1.5.Principe de la cartographie chromosomique	7
I.1.5.1. Etude de ségrégation des marqueurs génétiques des parents diploïde pour réaliser la carte chromosomique.	7
a. Corrélation marqueur/marqueur : recherche de groupes synteniques	7
b. Corrélation marqueur/chromosome	9
I.1.5.2. Méthode statistique de Chevalet et Corpet 1986	9
I.1.5.3. Etude électrophoretique des marqueurs enzymatiques	10
• Causes d'erreurs masquant une vraie syntenie	12
I.1.5.4. Localisation chromosomique fine	13
a. Hybrides monochromosomiques	13
b. Localisation fine subchromosomique	14
c. Cartographie par aberration chromosomique	17
I.1.5.5. Marqueurs d'ADN	18
I.2. Cartographie cytogénétique	20
I.2.1. Hybridation in situ (HIS) sur chromosomes métaphasique	20
I.2.2. Hybridation fluorescente in situ FISH	25
I.2.3. Peinture Chromosomique	27
I.2.4. Cytofluorométrie de flux	27
I.3. Hybrides d'irradiation	28
I.4. Degré de résolution des différentes méthodes.	30
 II. Carte génétique	 30
II.1. Historique	30
II.2. Définition de la carte génétique	32
II.3. Marqueurs génétiques	32
II.4. Analyse Génétique	35
II.4.1. Assortiment indépendant	35
II.4.2. Liaison et crossing over	35

II.5. Fonction de Cartographie.	36
II.6. Relation Distance Physique et Génétique.	37
II.7. Construction des cartes de liaison génétique	38
II.7.1. Analyse directe des produits de la méiose	38
II.7.2. Analyse génétique des descendants diploïdes	39
• Test du chi deux	39
• Méthode d'analyse de liaison chez l'Homme et les animaux d'élevage	40
II.8. Méthode de Lod score	40
II.8.1. Exigences de la cartographie génétique par calcul de Lod score	40
II.8.2. Analyse deux Points	41
II.8.2.1. Exemple d'application de la formule des Lod scores	41
II.8.2.2. Interprétation des résultats de Lod score	42
II.8.2.3. Exemple des différentes courbes qu'on peut obtenir	42
II.8.3. Analyse de liaison génétique multipoint (analyse 3 Points)	43
II.8.4. Limite de l'analyse standard de Lod score	44
• Cas Particulier : - Analyse de spermatozoïdes	44
II.9. Etudes de liaison sans modèle	44
II.9.1. Cartographie par homozygotie (homozygotie par descendance)	44
II.9.2. Méthode des paires de germain	45
II.9.3. Méthode cas/témoins	46
III. Cartographie Physique à Haute Résolution	46
III.1. Cartographie par FISH à haute résolution	47
III.1.1. FISH sur chromosomes interphasiques	47
III.1.2. FISH sur fibres d'ADN étirées	48
III.2. Marche sur le Génome	49
III.3. Macro cartographie de restriction	50
- Électrophorèse en champ pulsé PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)	50
III.4. Stratégie des contigs (carte de Contigs)	52
III.5. Cartographie par Saut	53
III.6. Saut deletionnel (Deletion Jumping)	55
III.7. Banques de Fonctions	56
III.7.1. Construction d'une banque génomique	56
III.7.2. Taille d'une banque	57
III.7.3. Banque de bonne qualité	57
III.7.4. Organisation d'une banque	57
III.8. Construction d'une carte physique par STS.	58
III.9. Macro clonage dans les YAC	59
IV. Cartographie Comparée	61
IV.1. Comparaison de cartes cytogénétiques	62
IV.2. Utilisation de la FISH en cartographie comparée (Zoo-FISH)	62
Références bibliographiques	64

INTRODUCTION

La compréhension de l'organisation et du fonctionnement du génome constitue un enjeu majeur en biologie moléculaire, en génétique et en médecine. Parmi les outils fondamentaux ayant permis d'explorer cette complexité, la **cartographie du génome** occupe une place centrale. Elle désigne l'ensemble des techniques et des méthodes permettant de **localiser avec précision les gènes, les loci (emplacements spécifiques sur un chromosome), les marqueurs génétiques et les séquences d'ADN** sur l'ensemble du génome d'un organisme. Ce travail de repérage systématique établit une représentation ordonnée de l'information génétique et sert de base à de nombreuses applications en recherche fondamentale comme appliquée.

L'un des principaux objectifs de la cartographie est de fournir une **vue structurée de la répartition des éléments génétiques sur les chromosomes**, afin d'en faciliter l'analyse fonctionnelle. En identifiant la position des gènes, il devient possible d'étudier les relations entre les régions du génome et les caractères observables (ou phénotypes), notamment dans le cas des **maladies génétiques**. Elle permet également de **cloner des gènes d'intérêt**, c'est-à-dire de les isoler et de les étudier individuellement, à partir de leur position connue. En génétique quantitative, la cartographie aide à repérer les **régions chromosomiques associées à des traits complexes**, influencés par plusieurs gènes, comme la taille, la production laitière chez les bovins, ou encore la résistance à certaines maladies.

L'intérêt de la cartographie ne se limite pas à l'espèce humaine : elle est un outil fondamental en **biologie comparée**, car elle permet de **comparer l'organisation génomique de différentes espèces**, d'identifier des séquences conservées au cours de l'évolution, et de mieux comprendre les mécanismes de divergence génétique. De plus, en **sélection animale et végétale**, la cartographie du génome est utilisée pour localiser des gènes d'intérêt agronomique, permettant de réaliser une sélection assistée par marqueurs et d'améliorer les performances des espèces cultivées ou élevées.

Il existe plusieurs types de cartes génomiques, complémentaires les unes aux autres. La **carte chromosomique**, ou carte physique de faible résolution, représente l'organisation générale des chromosomes à une échelle macroscopique. La **carte génétique**, quant à elle, repose sur l'étude des taux de recombinaison génétique observés lors de la méiose, et permet de déterminer la position relative des gènes sur un même chromosome. Enfin, la **carte physique de haute résolution** fournit des informations précises au niveau moléculaire, notamment grâce à des techniques comme l'hybridation in situ fluorescente (FISH) ou le séquençage. Ces cartes peuvent être combinées pour créer une vision intégrée et détaillée du génome (Figure 1).

Dans le contexte actuel de la génomique, où le séquençage à haut débit permet de décrypter des génomes entiers en quelques jours, la cartographie reste une étape indispensable pour **analyser, organiser et interpréter les données génétiques**. Elle permet de donner du sens aux séquences obtenues, en les reliant à des fonctions biologiques ou à des caractères d'intérêt. C'est pourquoi elle continue d'évoluer, s'enrichissant de nouvelles approches bioinformatiques et intégrant les données de transcriptomique, d'épigénétique ou de génomique comparative.

En somme, la cartographie du génome constitue une base méthodologique essentielle pour toutes les disciplines qui étudient le vivant à l'échelle moléculaire. Elle offre des perspectives immenses en matière de diagnostic médical, d'amélioration génétique, de conservation de la biodiversité, et de compréhension des mécanismes fondamentaux de l'évolution.

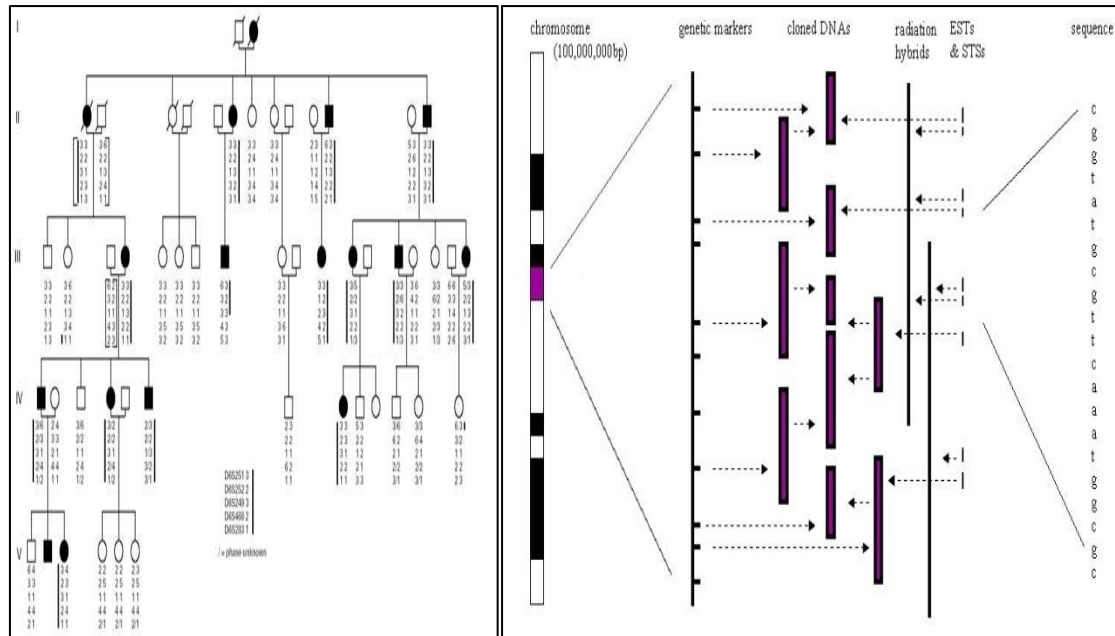


Figure 1 : Carte génétique et cartes physiques (adapté de Goff et al., 2002).

I. Carte Chromosomique

C'est la localisation physique d'un locus sur un chromosome donné et/ou sur un fragment de chromosome (localisation régionale) et recouvre deux approches différentes : les hybrides somatiques et la carte cytogénétique (Cribiu et Schibler, 2000).

I.1. Hybrides Somatiques

Ils permettent la localisation chromosomique de toute séquence d'ADN humain. Dans certaines conditions expérimentales, les cellules de différentes espèces peuvent fusionner ensemble en culture, engendrant des cultures cellulaires somatiques. Pour la cartographie génétique humaine, on construit en général des hybrides cellulaires en fusionnant des cellules humaines et des cellules de rongeurs (habituellement la souris ou le hamster) (Figure 2). Les produits initiaux de fusion sont appelés hétérocaryons car les cellules contiennent à la fois un noyau humain et un noyau de rongeur. Les hétérocaryons peuvent parfois entrer en mitose, ce qui entraîne la dissolution de deux enveloppes nucléaires. Les chromosomes humains et de rongeurs sont alors mélangés en un seul noyau. Les cellules hybrides sont initialement instables ; pour des raisons encore inconnues, 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 stables, contenant chacune la totalité des chromosomes de rongeurs plus un petit nombre de chromosomes humains. La perte des chromosomes humains se fait au hasard.

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. 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 (Saidi-Mehtar et al., 1981 ; Rettenberger et al., 1994 ; Robic et al., 1996).

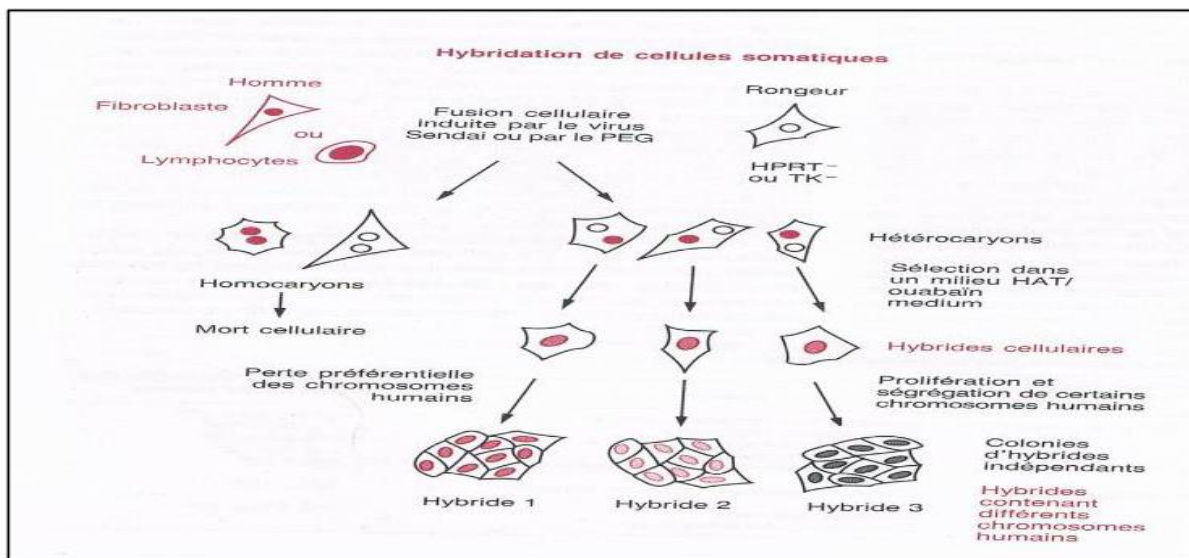


Figure 2 : Technique d'hybridation interspécifique de cellules somatiques (<https://fac.umc.edu.dz/>).

I.1.1. Culture cellulaire

Les cellules doivent être mises en culture dans un support (boîte de pétri ou Falcon) avec un milieu de culture approprié + SVF + antibiotiques > culture primaire > repiquage (culture secondaire) (Figure 3).

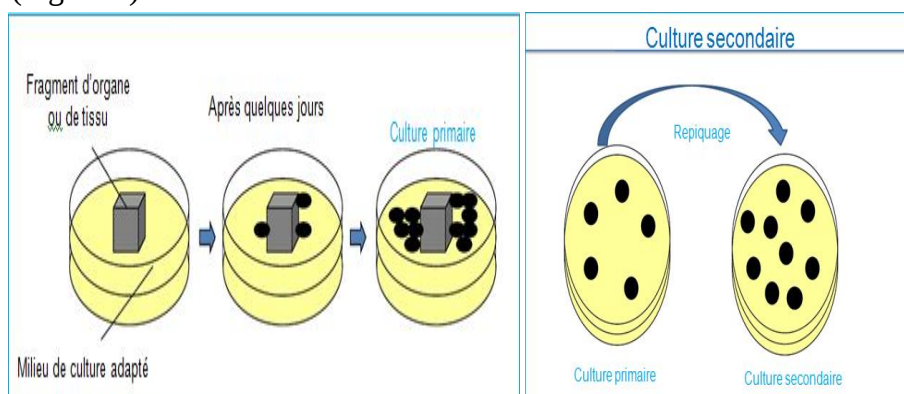


Figure 3 : Culture cellulaire (<https://elearning.centre-univ-mila.dz/a2025/pluginfile.php>).

Certaines cellules ont une croissance active puis une croissance ralentie avec émergence d'une population de cellules qui ont une capacité de division infinie (lignées établies, continues, permanentes)

Deux cellules de morphologie différente peuvent fusionner et donner naissance à un troisième type de cellules comportant les caractéristiques des espèces Parentales (mise en évidence par Barski et al 1960).

I.1.2. Fusion cellulaire

- Réaliser des fusions entre cellules diploïdes humaine et une lignée permanente en utilisant un agent fusionnant tel que PEG pour améliorer cette hybridation + un milieu sélectif afin d'éliminer les cellules parentales et ne garder que les lignées hybrides.
- leur particularité (les cellules hybrides) est la perte préférentielle des chromosomes du Parent diploïde.
- Il faut déterminer les chromosomes humains présents dans chaque lignée hybride par les marqueurs cytogénétiques

I.1.3. Milieux de sélection

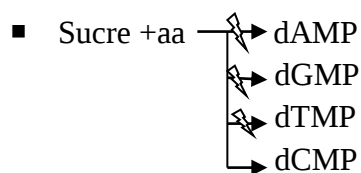
- **Système sélectif complet : de Littelfield (HAT)**

La sélection par le milieu HAT dépend du fait que les cellules de mammifères peuvent synthétiser les nucléotides par deux voies différentes : La voie de novo et la voie de récupération en incorporant directement les purines et les pyrimidines dans les nucléotides nécessaires à la synthèse de l'ADN.

On utilise des souches parentales déficientes en des enzymes qui interviennent dans la synthèse de l'ADN.

- **Voie endogène ou de novo**

Les cellules vont utiliser les sucres et les acides aminés (aa) pour la synthèse des 4 dNTP.



Le milieu HAT (Hypoxantine Aminoptérine Thymidine) bloque la synthèse de A, T et G.

L'Aminoptérine du milieu HAT bloque la synthèse des dAMP, dTMP, Dgmp.

Les cellules somatiques normales, non hybrides, ne peuvent pas survivre dans ce milieu car elles sont bloquées dans leur capacité à synthétiser l'ADN sans la voie de synthèse de novo (inhibée par l'aminoptérine) et ne disposent pas toutes des enzymes nécessaires pour utiliser la voie de récupération efficacement.

- Voie exogène ou de récupération

Les enzymes qui catalysent la voie de récupération incluent HGPRT et TK. Une mutation de l'un ou l'autre de ces deux enzymes bloque la capacité de la cellule à utiliser la voie de récupération et entraîne sa mort dans le milieu HAT. Les cellules vont utiliser des précurseurs présents dans le milieu de culture pour synthétiser leur ADN.

- Ex : thymidine qui va être incorporée dans la cellule grâce à une enzyme Thymidine Kinase pour devenir dTMP.
- Thymidine $\xrightarrow{\text{TK}}$ dTMP
- Hypoxanthine $\xrightarrow{\text{HPRT}}$ IMP $\begin{cases} \rightarrow \text{dAMP} \\ \rightarrow \text{dGMP} \end{cases}$

Dans ce milieu un des parent aura une mutation en TK^- (Déficiente en TK) et l'autre parent déficient en HPRT^- (Tableau 1).

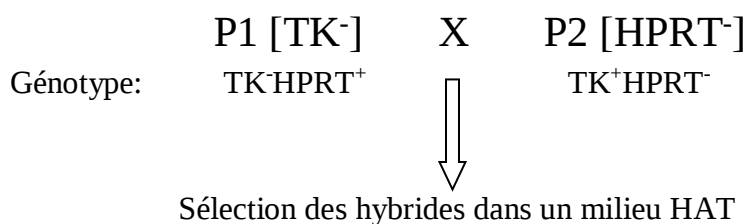


Tableau 1 : Génotypes des parents et des cellules hybrides dans le milieu HAT

Cellule	Génotype	Mil HAT
P1	$\text{TK}^- \text{HPRT}^+$	-
P2	$\text{TK}^+ \text{HPRT}^-$	-
HYB	$\text{TK}^+ \text{HPRT}^+$	+

Ce système est un système sélectif complet car il permet de sélectionner les populations hybrides contre les deux populations parentales.

L'hybride va synthétiser tout les nucléotides par complémentarité fonctionnelle.

• Système semi sélectif : de Davidson et Ephinsi

Un seul des deux parents est déficient TK^- ou HPRT^- avec croissance rapide du parent permanent, l'autre parent n'est pas déficient « normal » à une croissance lente (souche diploïde).

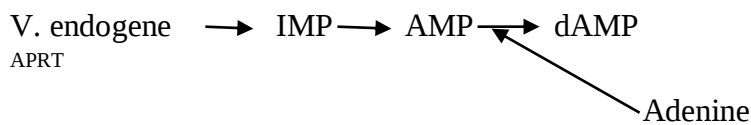
$\text{P1 HPRT}^- \text{ ou } \text{TK}^- \text{ X P2 HPRT}^+ \text{ ou } \text{TK}^+ \Rightarrow$ Sélection dans un milieu HAT.

- Le parent P2 va être éliminé parce que les cellules hybrides vont pousser plus rapidement et épuiser le milieu.
- Les cellules hybrides élimineront les cellules normales par **concurrence vitale** en raison de leur croissance plus rapide
- Il est dit semi sélectif car un seul des parents est déficient

- **Milieu sélectif AA : Alanosine* Adenine**

*elle bloque la synthèse de l'adenylates.

Alanosine est un inhibiteur de la synthèse de novo des purines. Il bloque la production de bases puriques à partir de la voie de synthèse de novo, ce qui empêche la plupart des cellules de fabriquer leur ADN à partir de cette voie.



- APRT: adenine phosphoryboxyl transferase

P1: APRT⁻ et l'autre P2: HPRT⁻/TK⁻ (Tableau 2).

Tableau 2 : Génotypes des parents et des cellules hybrides dans le milieu AA

genotype	HAT	AA	HAT+AA
P1 APRT ⁻ TK+HPRT ⁺	+	-	-
P2 APRT ⁺ TK-HPRT ⁺	-	+	-
Hyb APRT ⁺ TK+HPRT ⁺	+	+	+

- **Milieu AA semi sélectif:**

1P : APRT⁻ > croissance rapide (Lignée permanente)

2P : APRT⁺ > croissance lente (cellule diploïde) > milieu AA

} Concurrence vitale

I.1.4. Elimination des chromosomes

Dans les hybrides interspécifiques on observe de façon générale mais pas systématique qu'il ya perte préférentielle souvent des chromosomes du parent diploïde. Le génome du parent hétéroplôïde reste stable.

La perte des chromosomes du parent diploïde se fait au hasard (sauf pour certains chromosomes particulier pour lesquels l'élimination se fait pas au hasard a cause de la pression du milieu de sélection) > permet de réaliser sa carte.

Exemple :

- fusion cellule diploïde TK⁺ X Lignée permanente de souris TK⁻ > Hybrides : sélection dans un milieu HAT (TK⁺) humain, tout les hybrides ont le chromosome 17 humain qui porte le TK
- HPRT sur chromosome X
- APRT sur chromosome 16

I.1.5. Principe de la cartographie chromosomique

On réalise une fusion entre cellule diploïde et une lignée permanente de souris et étudier la ségrégation des chromosomes humains ainsi que la présence ou l'absence de marquage génétique (Les plus faciles sont les marqueurs enzymatiques) (Tableau 3).

Tableau 3 : Composition variable en chromosomes du parent diploïde.

	Hyb A	Hyb B	HybC	HybD
G6PD	+	-	+	-
NP	-	+	+	-

NP : nucleoside phosphorylase

Ces hybrides ont une composition variable en chromosomes du parent diploïde.

I.1.5.1. Etude de ségrégation des marqueurs génétiques des parents diploïde pour réaliser la carte chromosomique.

Une collection d'hybrides indépendants « composition chromosomique différente » par les deux étapes de la cartographie chromosomique (Belhadj Kacem Tabet-Aoul, 2006).

- Première étape : corrélation marqueur/marqueur
- Deuxième étape : corrélation marqueur/chromosome

a. Corrélation marqueur/marqueur : recherche de groupes synteniques

Si 2 marqueurs sont toujours simultanément présents, ou simultanément absents dans une série d'hybrides interspécifiques indépendants. On dit qu'il y'a une corrélation positive entre ces marqueurs, ils sont donc syntenique. Cela veut dire que les gènes qui les codent sont portés par le même chromosome.

Tableau 4 : Ségrégation des enzymes dans un panel d'hybrides (Corrélation marqueur / marqueur)

Hyb/marq	E1	E2	E3	E4	...	E10
hybA	+	+	+	-		
B	-	+	-	-		
C	-	-	-	-		
D	+	-	+	-		
E	-	+	-	-		
Hyb 20						

On va comparer les enzymes 2 à 2 dans un tableau de corrélation (Tableau 4)

E1			
+		-	
E3 +	a	b	
	c	d	

- a : nombre d'hybrides ++ hybrides concordants
- b : nombre d'hybrides +- hybrides discordants
- c : nombre d'hybrides +- hybrides discordants
- d : nombre d'hybrides - - hybrides concordants

		E1	
		+	-
E3	+	9	0
	-	0	11

- Sur 20 hybrides :
- 9 hyb ++
- 11hyb--
- } hyb concordants 100%
- Corrélation positive entre E1 et E3 > E1 et E3 sont synteniques

		E1	
		+	-
E4	+	10	1
	-	0	9

- Sur 20 hybrides :
- 19 hybrides concordants
- 1 hybride discordant
- Le seuil de discordants doit être $\leq 10\%$
- E1 et E4 sont synteniques
- On peut justifier par des remaniements chromosomiques (une cassure) ou une microdélétion

		E1	
		+	-
E4	+	5	6
	-	5	4

- Hybrides concordants 5 ++ et 4 -- > 9
- Hybrides discordants 6 - + et 5 + - > 11
- Corrélation négative entre E1 et E4 > asyntenie

On doit chercher sur un lot d'enzymes, les groupes synteniques

- Ex : E1 et E3
- E2-E4-E6....

Ensuite on fait une corrélation marqueur/chromosome

b. Corrélation marqueur/chromosome

Localiser les marqueurs ou les groupes synteniques sur les chromosomes correspondants (Tableau 5). Il faut identifier les chromosomes du parent diploïde dans chaque lignée hybride par marquage cytogénétique « banding G ou R » (Nguyen et al., 1986).

Tableau 5 : Ségrégation des enzymes dans un panel d'hybrides (Corrélation marqueur / chromosome)

Hyb/chr humain	1	2	3	4	...	22	X
Hyb A	-	+	+	+			
B	-	-	-	+			
C	-	-	-	+			
D	+	+	-	+			
E	-	-	-	+			
20 hyb							

E1-E3

+ -

+	9	0
Chr2 -	0	11

Il y'a une corrélation positive entre E1-E3 et le chromosome 2 > ils sont localisés sur chromosome 2 humain

Quand un marqueur et un chromosome sont simultanément présents ou simultanément absents dans une série d'hybrides interspécifiques indépendants différents, il y'a une corrélation positive entre ce marqueur et ce chromosome et donc le gène qui code pour ce marqueur est localisé sur le chromosome considéré

I.1.5.2. Méthode statistique de Chevalet et Corpet 1986

Coefficient de corrélation ϕ (Tableau 6)

$$\phi = \frac{(ad-bc)}{\sqrt{(a+b)(a+c)(d+c)(d+b)}}$$

Tableau 6 : Coefficient de corrélation ϕ

Q	P	ϕ_1	ϕ_2
0.05	0.95	0.69	0.68
...			
0.010	0.8	0.49	0.82
0.005	0.72	0.4	0.89

Q: taux d'erreur (on travail avec $Q = 0.010$)

P: probabilité de donner Une décision correcte

Si ϕ calculée $> \phi_2$ > syntenie

Si ϕ calculée $< \phi_1$ > asyntenie

Si $\phi_1 < \phi < \phi_2$ > aucune décision

1.1.5.3. Etude électrophoretique des marqueurs enzymatiques

Etude indirecte des produits de gènes

- Préparation des lysats cellulaires: suspension > trypsine (décollement des cellules) > centrifugation > lyse des cellules
- 20 hybrides Homme x Souris
- Electrophorèse sur support: acétate de cellulose (Figure 4)

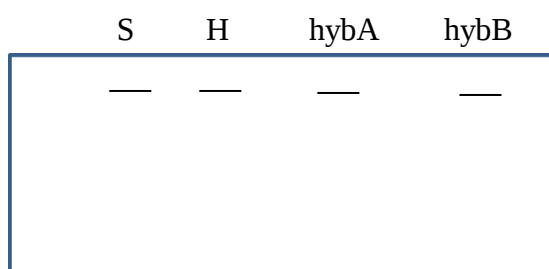


Figure 4: Electrophorèse sur support acétate de cellulose

S : Souris, H : Homme, Hyb : hybrides

On met sous champs électrique avec un voltage précis pendant une durée précise ensuite une coloration spécifique de chaque système enzymatique

L'étape de révélation est basée sur le couplage de la réaction catalysée par l'enzyme étudiée avec une réaction d'oxydo-reduction dont le produit final coloré en blanc appelé « le formazon » (Figure 5).

S H hyb A hybB

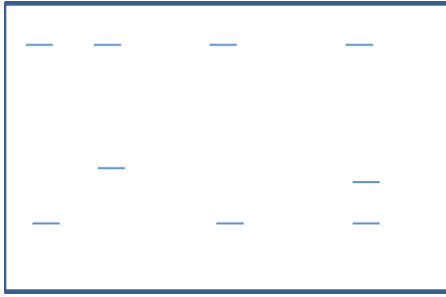


Figure 5 : Exemple d'un autoradiogramme de MPI « manose phosphate isomerase »

S : Souris, H : Homme, Hyb : hybrides

La structure quaternaire de l'enzyme: Monomère = absence de bandes intermédiaires

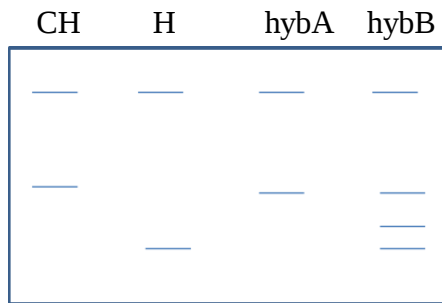


Figure 6 : Exemple d'un autoradiogramme de G6PD

CH : hamster chinois, H : Homme, Hyb : hybrides

Structure = $n+1$ = Dimère (Figure 6).

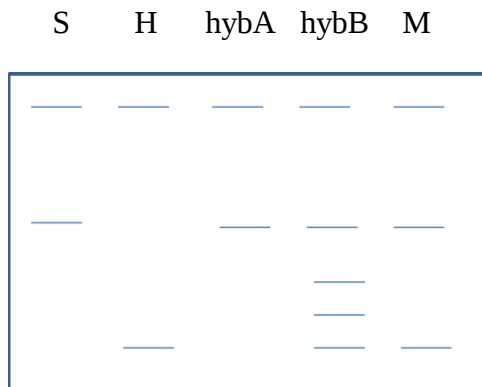


Figure 7: Exemple d'un autoradiogramme de NP

S : Souris, H : Homme, Hyb : hybrides, M : mélange

Enzyme trimerique (Figure 7).



Figure 8: Exemple d'un autoradiogramme de SOD

S : Souris, H : Homme, Hyb : hybrides, M :mélange

SOD1	+	-	+	-
SOD2	+	+	-	-

On a 2 iso-enzymes

- Première enzyme dimerique
- Deuxième enzyme tetramerique

D'après le résultat du zymogramme (Figure 8) ces 2 enzymes sont localisés sur 2 chromosomes différents.

L'analyse des zymogrammes electrophoretiques permet de:

- Suivre la ségrégation des marqueurs enzymatiques
- Structure quaternaire: nombre de Sous Unités
- Nombre de loci
- Présence ou absence de l'enzyme

❖ Causes d'erreurs masquant une vraie syntenie

a- Cassures chromosomiques:

Il existe des cassures chromosomique dans les hybrides > une corrélation même très (-) entre des marqueurs enzymatiques ne signifie pas obligatoirement l'absence de syntenie, donc seule la localisation chromosomique peut apporter la preuve absolue d'une asyntenie des marqueurs en les localisant sur des chromosomes différents.

b- Effet hétérozygote:

Due au fait que une souche parentale est silencieuse pour un des gènes

c-Effet de dilution:

On l'observe quand la sensibilité des détections utilisées est très différente, on peut réduire cette cause d'erreur quand la sensibilité de détection enzymatique peut être augmentée en augmentant la quantité d'extrait à analyser et la quantité des produits chimiques, T°, etc

d-Marqueurs qui dépendent de plus d'un chromosome

Ca concerne les enzymes polymériques, dans ce cas d'enzymes codés par deux gènes indépendants localisés sur deux chromosomes différents, on ne peut pas lier la présence de cette enzyme ni avec un des deux chromosomes ni avec l'autre chromosome car le nombre de discordants est trop important par rapport à la corrélation entre présence et absence des deux chromosomes et de l'enzyme sera parfaite et elle révélera la localisation des deux gènes sur les deux chromosomes

e- Détection enzymatique

Les résultats des zymogrammes électrophorétiques sont notés en fonction de l'intensité des bandes enzymatiques du parent diploïde, or cette intensité n'est pas toujours le reflet du nombre de gènes correspondant à ces enzymes car dans les hybrides, elle dépend:

- 1-de la conservation au froid des différentes enzymes
- 2-de la résistance de l'enzyme à la trypsine
- 3-de l'état de la cellule à la récolte

I.1.5.4. Localisation chromosomique fine

a. Hybrides monochromosomiques

Ces hybrides contiennent un seul chromosome du parent diploïde en plus des chromosomes du rongeur, on fait une fusion microcellulaire (Cuthbert et al., 1995).

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 (Figure 9) : - 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 micronucléi. - 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 micronoyau 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 (Cohen, 1993).

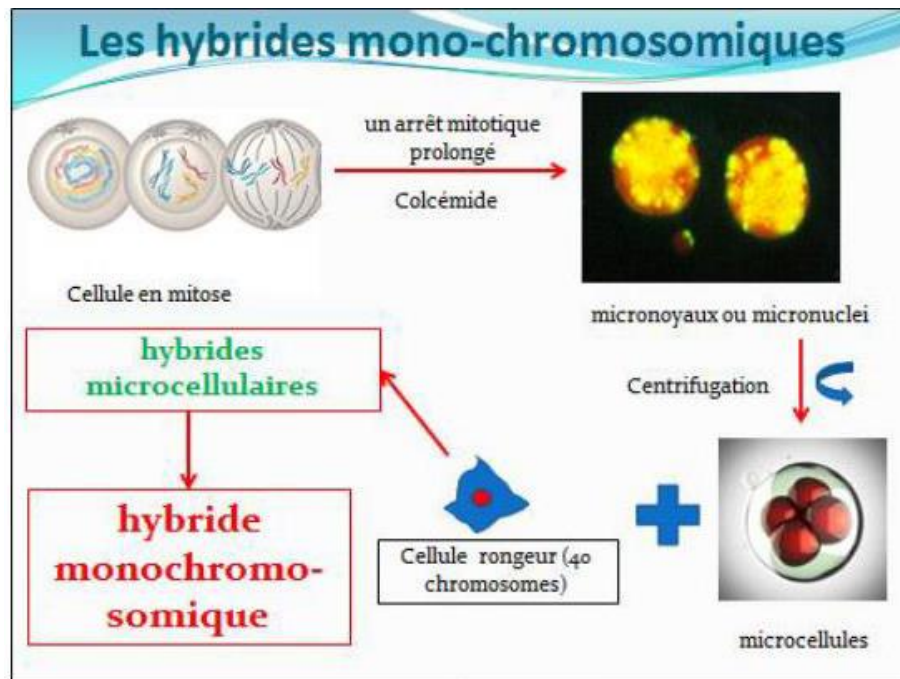


Figure 9 : Technique des hybrides mono-chromosomiques (<https://fac.umc.edu.dz>)

Avantages:

- Localisation des chromosomes sans ambiguïté de la présence ou absence d'une séquence définie de l'ADN humain sur un chromosome spécifique
- Si on connaît la séquence d'ADN et on veut la localiser, on la teste par PCR
- Un fragment d'ADN humain d'intérêt, on doit le marquer pour l'utiliser en tant que sonde pour le SB, obtenu à partir de la collection d'hybride monochromosome

Limites:

- Le degré de résolution
- Le plus grand chromosome humain c'est le chromosome 1 ($2.5 \cdot 10^8 = 250\text{Mb}$) et le plus petit est le chromosome 21 ($5.107 \text{ pb} = 50\text{Mb}$)

b. Localisation fine subchromosomique

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 (Cribiu et al., 2000, Cribiu et Schibler, 2000).

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 (Tabet Aoul, 1999).

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.

- On va utiliser les hybrides remaniés tel que les translocations et les délétions
- Ces remaniements on va les trouver dans les cellules parentales

Cellules rongeur X cellules humaines avec des translocations ou délétions > Hybrides de translocation ou de délétion. On obtiendra des hybrides informatifs qui contiennent le chromosome remanié et pas le chromosome homologue normal (pour toute translocation autosome/autosome).

Pour les translocations X/autosomes, la présence de l'Xi ne dérange pas (Philippe, 1994).

Pour que ces hybrides remaniés puissent être utilisés en cartographie subchromosomique, il faut des remaniements chromosomiques du chromosome d'intérêt.

- Ex: un marqueur sur chromosome 4 = localisation connue

Il faut des remaniements sur chromosome 4

On les obtient à partir de laboratoires de cytogénétique ou oncologique ou en dépistage de cellules de malade.

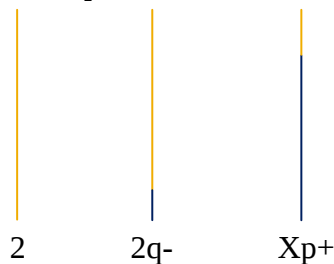
- Localisation chromosomique fine

Principe: méthode de corrélation et d'exclusion

Une cellule qui porte une Enzyme au niveau du chromosome X > on utilise une cellule normale mais a chromosome remanié

- Si le produit présent sur p > Enzyme chromosome p
- Si le produit absent sur q > enzyme absent chromosome q

Exemple: souche humaine avec t (X,2)



But: localisation fine d'IDH1, MDH1 qui sont sur le chromosome 2. Donc on s'intéresse à 2q⁻ et à Xp⁺

- Hybride Xp⁺ > MDH1⁻: donc exclusion de MDH1 du chromosome Xp⁺ sur (partie distale du bras q du chromosome 2), donc il est sur le restant du chromosome 2 alors MDH1 est localisé sur 2q⁻
- Hybride Xp⁺ > IDH1⁺: il y'a une corrélation positive entre Xp⁺ et IDH1 > IDH1 est localisé sur la partie du chromosome 2 transloquée sur l'X = partie distale de bras q du chromosome 2

Méthode d'exclusion: s'il est absent > présent dans l'autre partie

Corrélation positive s'il est présent > absent dans l'autre partie

- 2 méthodes: - d'exclusion
- de corrélation positive

L'outil: hybrides somatiques qui présentent des remaniements chromosomiques qui intéressent les chromosomes porteurs des gènes connus dont on veut préciser la localisation.

Exemple: ségrégation des chromosomes 2, 2q-, Xp+, Y

- Les remaniements chromosomiques doivent être importants (grand fragments)
- Identifiables/ caryotype du parent normal
- Les remaniements chromosomiques doivent être faciles à identifier dans les cellules hybrides
- Il faut avoir un échantillon (panel) d'hybrides somatiques variés concernant les chromosomes remaniés (Ex des cellules à 2q- et cellules a Xp+).

➤ Localisation de marqueurs autosomiques

Exemple: Lignée permanente (CH) X cellules diploïde humaines normale > 20 hybrides

		E1	
		+	-
Chr4	+	9	0
	-	0	11

Cellule humaine avec t(4,11) (q13, q22) X Lignée permanente hamster > 20 lignées hybrides (Tableau 7).

Tableau 7 : Composition chromosomiques des cellules hybrides

Hyb/chr	4	4/11	11	11/4	E1
A	-	-	-	+	+
B	+	-	-	+	+
C	-	+	-	-	-
D	-	-	+	+	+
E	-	+	-	+	+
Non info	-	-	-	-	-
Non info	+	+	+	+	+

Hybrides non informatifs:

- Hybride B porte le chromosome 4
 - Hybride E porte 11/4 et 4/11
- } ils sont toujours positifs

Hybrides informatifs:

- A (11/4), C (4/11), D (11/4)

Hybrides A et D: 11/4 (+) et E1 (+) > corrélation positive> cossegregation entre 11/4 et E1 donc E1 est localisé sur la partie du chromosome 4 transloquée sur le chromosome 11

- E1 > 4 (q13, qter) ou 4q13 > qter et on exclu E1 de la partie (4q13,pter) dans l'hybride (4/11)-

Dans l'hybride C: 4/11+ et E1- et 11/4- > cossegregation entre 11/4 et E1 (les 2 sont absents), E1 est localisé sur 4 (q13, qter). Exclusion E1-, 4/11+

- **Localisation de marqueurs sur chromosome X**

Dans les hybrides interspécifiques, l'X non remanié est l'X inactif

- X remanié (marqueur) = remaniements ou échange entre X/autosome.

Exemple:

Souche diploïde humaine 46,XX, t(X,2)(p21, q32) X lignée de parent souris (Tableau 8).

- Hybrides non informatifs: ont X/2 et 2/X > la totalité de l'information génétique de l'X (comme si on a un chromosome X complet actif) et qui n'ont ni X/2 ni 2/X.

Tableau 8 : composition chromosomique des cellules hybrides

Hyb/chr	X	X/2	2/X	2	E2
A	+	+	-	-	+
B	+	-	+	+	-
C	-	-	+	-	-
D	-	+	-	-	+
E	-	+	+	-	+

- Hybrides informatifs: hybrides qui ont soit X/2 ou 2/X ou X/2 + Xi ou 2/X + Xi
- Le Xi ne s'exprime pas

Hybrides non informatifs: E: X/2 et 2/X

Hybrides informatifs: A, B, C, D

- Les hybrides A et D ont le X/2 > X/2+ > E2+ > il y'a une co-ségrégation entre E2 et X/2 > E2 est localisé sur la partie de l'X présente en X (p21, qter) et sont 2/X- et E2+ > E2 est exclue de Xp21>Xpter
- Hybrides B et C: ils sont 2/X+, X/2- > E2- > cosegregation entre X/2- et E2- > même conclusion > E2 sur Xp21> Xqter

c. Cartographie par aberration chromosomique

Consiste à mettre à profit soit des délétions partielles ou des translocations et à rechercher si le signal d'hybridation

- est aboli > l'hybridation est présente > cas de délétion
- Ou le signal est déplacé sur un autre chromosome > c'est le cas des translocations

I.1.5.5. Marqueurs d'ADN

Principe: on fait une détection directe du gène et on oppose de façon indirecte des produits de gènes. On utilise des sondes nucléaires qui s'hybrident avec des bases complémentaires d'une façon stable et spécifique. La sonde n'est pas obligée de s'hybrider avec la totalité du gène.

La sonde va correspondre soit à la totalité soit à une partie d'un gène donné.

L'appariement entre la sonde et la cible peut s'effectuer quelque soit la proportion de la séquence cible de l'échantillon exploré. Elle est très spécifique car la sonde peut reconnaître parmi 1 million de fragments.

- Exemple: cellule diploïde humaine X lignée permanente de souris > hybrides

Localisation de gènes humains par hybridation moléculaire

Outil: sonde moléculaire du gène « a » humain

- Les ADN: -l'ADN du parent diploïde humain
- L'ADN du Parent permanent de souris
-L'ADN de toutes les lignées hybrides

Souris:

- Pas d'hybridation entre la sonde « a » humaine /ADN souris
- Hybridation entre la sonde « a » humaine et ADN de souris > c'est une hybridation croisée (gènes homologues)

+: présence du gène a humain

-: absence du gène a humain

Corrélation marqueur/marqueur et marqueur/ chromosome

Méthode: technique du southern blot

Analyse des résultats de l'autoradiogramme:

Localisation chromosomique du gène « a » humain par le couple sonde (gène a humain)/ enzyme de restriction (EcoR1) (Figure 10).



Figure 10: Autoradiogramme par la technique du southern blot

S : Souris, H : Homme, MT : marqueur de taille

Résultats de l'autoradiogramme

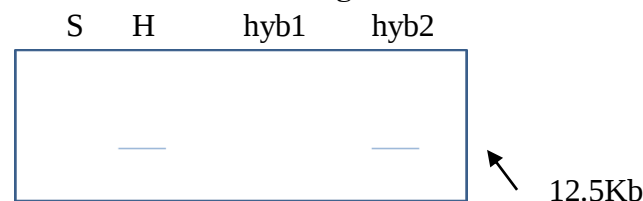


Figure11: Autoradiogramme d'une sonde spécifique à l'humain

S: Souris, H : Homme, Hyb : hybrides,

Il n'y a pas de bandes S car la sonde est spécifique à l'humain (Figure 11).

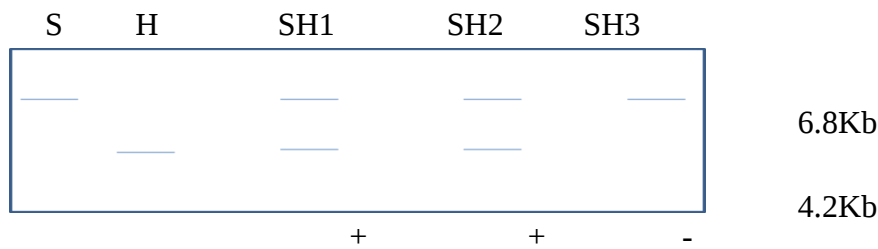


Figure 14: Autoradiogramme du gène humain « a »

S: Souris, H: Homme, SH : hybrides

Faire la localisation fine du gène humain « a » sur le chromosome 12

Les hybrides non informatifs: SH2, il a le chromosome 12 entier

Les hybrides informatifs: SH1 et SH3 n'ont qu'un type de chromosome remanié

Analyse de l'autoradiogramme: hybrides + ou – pour le gène « a » humain

Comparaison de la ségrégation du gène « a » et les chromosomes remaniés (Figure 14).

- SH1: 8/12+ et gène « a »+ > cosegregation entre les deux > le gène localisé sur la partie du chromosome 12 transloquée sur le chromosome 8 > sur 12p21> pter
- 12/8- > exclusion du gène « a » dans la partie du chromosome 12 présente dans 12/8 = 12p21> qter
- SH3: 12/8+ et gène « a »-, 8/12> confirme la localisation sur 12p21> pter

I.2. Cartographie cytogénétique

I.2.1. Hybridation in situ (HIS) sur chromosomes métaphasique

C'est une technique de localisation chromosomique régionale directe mise au point par Mary Lou Pardue et Joseph Gall. L'hybridation in situ est proche, dans son principe, des Southern et des Northern blots et repose, comme eux, sur l'hybridation moléculaire d'une sonde d'acide nucléique marquée dont la séquence est complémentaire du gène que l'on cherche à identifier et à localiser.

L'hybridation in situ s'effectue sur des chromosomes en métaphase, à partir de lymphocytes circulants, apportant ainsi des informations précises sur la localisation du gène étudié.

Le terme in situ signifie en place, ce qui veut dire que l'ADN des chromosomes est laissé sur place et qu'on le fait réagir avec une préparation particulière d'ADN marqué (sonde) qui va s'hybrider (se fixer) spécifiquement au niveau de sa séquence complémentaire. On peut alors visualiser la sonde au microscope dont l'emplacement identifie précisément la région chromosomique dont elle est complémentaire.

Les sondes utilisées sont le plus souvent :

- de l'ADN,
- un ARN messenger ou
- des oligonucléotides synthétiques.

Ainsi, pour pouvoir localiser une molécule d'ADN ou ARN, on doit:

- la dénaturer en la chauffant (la séquence double brin (en hélice) devient monobrin)
- choisir une sonde complémentaire de la séquence cible
- marquer la sonde (pour qu'on puisse la repérer et la visualiser).

- Types de marquage de la sonde

Le marquage des sondes peut être réalisé par :

- des **isotopes radioactifs** (« sondes chaudes » : comme le tritium H3, phosphore P32 ou P33, soufre S35). La révélation se fait par autoradiographie.

- Techniques de marquage

Marquage par transfert de coupure (Nick translation)

- La DNase génère quelques cassures aléatoires simples brin
- Au niveau des cassures, la DNA polymérase I détruit l'ADN par son activité exonucléasique (5'-3') et le synthétise par son activité polymérase en présence de nucléotides dont un est marqué
- obtention d'une sonde radioactive (Figure 15).

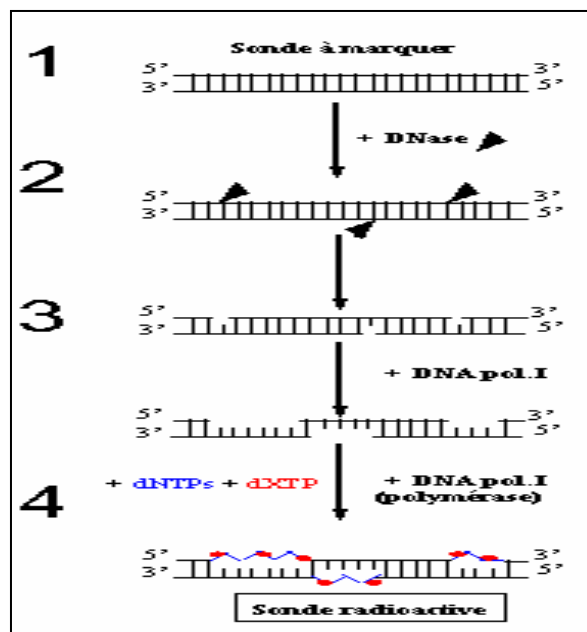


Figure 15 : Marquage par transfert de coupure (Nick translation) (<https://accres.ens-lyon.fr/biotic/biomol/techgen/html/marq3.htm>).

Marquage par multi amorçage au hasard (random priming)

- séparation des deux brins de la sonde par chauffage à 100°C puis refroidissement brutal
- ajout d'un cocktail d'oligonucléotides synthétiques qui vont servir d'amorces pour le fragment de klenow de la DNA polymérase I
- extension d'amorce avec incorporation des nucléotides marqués (Figure 16).

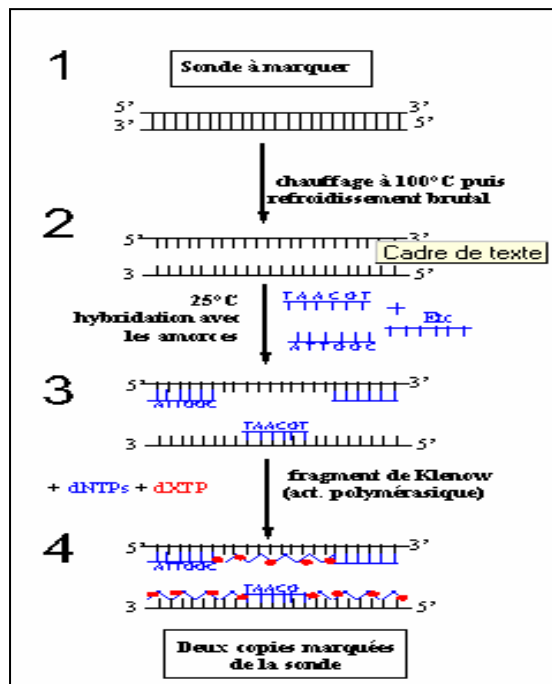


Figure 16 : Marquage par multi amorçage au hasard (random priming)
(<https://accres.ens-lyon.fr/biotic/biomol/techgen/html/marq3.htm>).

Protocole

Il existe de nombreux protocoles d'HIS qui diffèrent en fonction du type de marquage de la sonde.

1- Préparation des chromosomes métaphasiques

- mise en culture des lymphocytes circulants à 37°C en présence de phytohémagglutinine qui accélère les divisions.
- blocage au stade métaphase avec la colchicine
- fixation et étalement des chromosomes sur lame
- on obtient donc des lames métaphasiques

2- Traitement des lames métaphasiques

- Traitement par RNase pour enlever tous l'ARN endogène
- Déprotéiniser par la protéinase K la morphologie des chromosomes est préservée

3- Marquage au banding R et G

Indispensable pour connaître le chromosome et les régions chromosomiques qui se sont hybridés avec la sonde et photos des belles métaphases

4- Marquage radioactif au H3 spécifique de la sonde

Pour pouvoir être visualisées, ces sondes doivent être préalablement marquées

5- Dénaturation de l'ADN chromosomique et de la sonde moléculaire

Les brins d'ADN des chromosomes deviennent monocaténaire à la suite d'un traitement par une solution alcaline qui les sépare et les garde distincts

6- Hybridation in situ:

Au cours de l'étape d'hybridation, les chromosomes dénaturés sont incubés dans une solution contenant la sonde monocaténaire marquée, capable de s'unir sélectivement au brin d'ADN complémentaire immobilisé qui se trouve dans un chromosome. Rinçage pour éliminer les sondes non hybridées

7- Autoradiographie et analyse des résultats:

Recouvrement de la lame d'une émulsion photographique radio sensible puis exposition de plusieurs jours à plusieurs semaines

Le résultat est lu sous microscope ou les signaux positifs (d'hybridation) apparaissent sous forme de grains disposés sur les chromosomes. Le résultat doit être photographié. Il faut déterminer sur quel chromosome se trouvent les gènes ainsi que le bras et la position régionale du signal

L'avantage de cette technique est qu'elle permet de visualiser un gène unique sur un chromosome humain

L'inconvénient : faible signal du a une cible petite. 1 à 2 grains par mitose ce qui oblige à examiner un grand nombre de mitoses, accumuler le nombre de grains observés au niveau de chaque bande chromosomique et à déterminer si l'accumulation des grains en un endroit précis est statistiquement significative

La réussite de cette technique dépend principalement de la qualité des préparations chromosomiques et de la qualité des sondes employées.

Exemple : Afin de localiser le gène NF-H humain de la grande sub-unité des neuro-filaments, on a réalisé une hybridation in situ avec une sonde marquée au tritium. Un total de 200 métaphases a été examiné ou l'on a observé 620 grains dont 53 grains sur le chromosome 22 (16,7% des grains sur chromosome 22).

- le gène NF-H est localisé sur le chromosome 22
- 2/3 de ces 53 grains se trouvent sur la bande 22 q12.1-q13.1

Certains grains sont non spécifiques, localisés sur certain bras ou en dehors de la métaphase.

Attention : les sondes radioactives présentent de nombreux inconvénients :

1. nécessité de se protéger contre le rayonnement émis, la radioactivité doit être manipulée selon certaines règles de sécurité.
2. les durées d'exposition nécessaires à l'autoradiographie sont longues ; entre une et plusieurs semaines ;
3. le bruit de fond, implique l'analyse statistique d'un grand nombre de métaphases (100 à 200) ;
4. le pouvoir de résolution de la détection du signal est faible du fait de la dispersion des grains d'argent dans l'émulsion photographique.
5. décroissance rapide du P32, d'où un besoin de marquer les sondes fréquemment.

Ces inconvénients ne doivent pas occulter l'efficacité de cette technique qui a permis de localiser entre 1500 et 2000 gènes sur les chromosomes humains. Elle est également utilisée chez les espèces animales mais depuis moins longtemps.

✓ Pour pallier à ces problèmes, on peut avoir recours aux sondes froides.

- **Sondes froides**

L'utilisation de composés non radioactifs pour marquer les sondes d'ADN a beaucoup fait progresser la technique d'hybridation in situ. Ça consiste à utiliser des sondes portant des nucléotides modifiés détectés ensuite par un système d'anticorps couplés à un fluorochrome ou par réaction enzymatique (l'enzyme transforme le substrat non coloré en un substrat coloré).

- des haptènes, biotine ou digoxygénine, qu'on peut révéler avec de l'avidine ou de la streptavidine, ou encore avec des anticorps marqués par une enzyme
- des enzymes, qu'on révèle à l'aide d'anticorps.

*marquage par la biotine.

La technique combine l'incorporation de nucléotides liés à la biotine et la détection par sa grande affinité chimique avec l'avidine ou de la streptavidine (Figure 17).

Le nucléotide le plus commercialisé est le biotine-11-dUTP

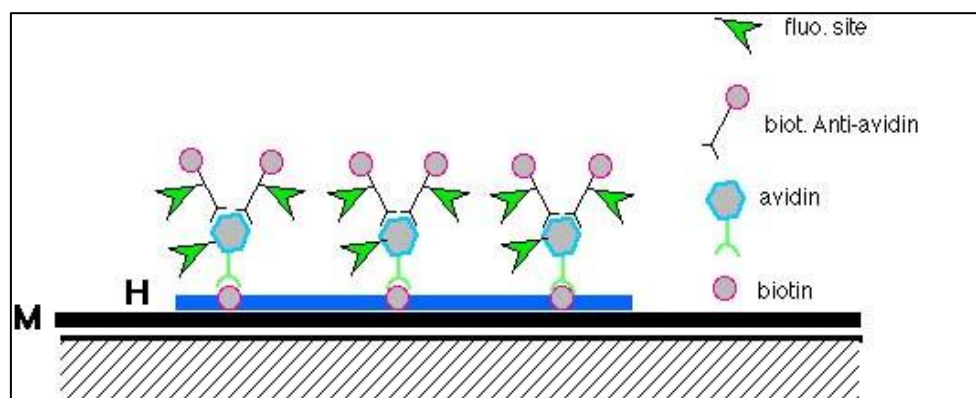


Figure 17 : Marquage par la biotine (<https://slideplayer.fr/slide/11133938/>).

*marquage par la digoxigénine.

Les propriétés antigeniques de la dig font que l'ADN marqué soit détecté par fluorochrome soit couplé avec une enzyme (peroxydase ou phosphatase alcaline) (Figure 18).

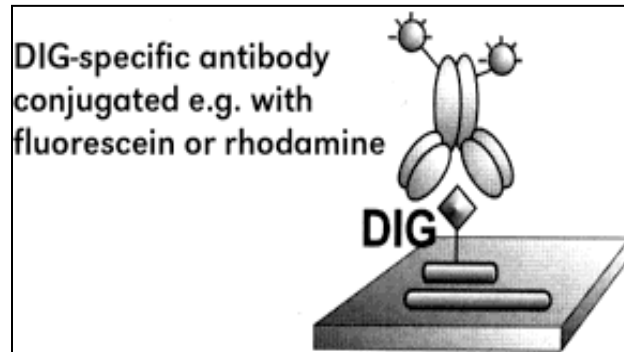


Figure 18 : Marquage par la digoxigénine (<https://slideplayer.fr/slide/11133938/>).

Le comptage des grains d'argent sur les autoradiographies permet une étude semi quantitative.

On peut également utiliser des produits fluorescents, on parle alors d'hybridation fluorescente in situ (FISH), qu'on révèle grâce à la microscopie à fluorescence.

I.2.2. Hybridation fluorescente in situ FISH

La première étape de l'hybridation in situ en fluorescence consiste en une dénaturation thermique de l'ADN cible et de la sonde si cette dernière est sous forme d'ADN double brin. La deuxième étape consiste en l'hybridation de la sonde sur l'ADN cible à 37 °C pendant une durée variable selon le type de sonde utilisé (quelques heures à plusieurs jours). La troisième étape correspond à la révélation de l'hybridation qui peut être directe ou indirecte grâce à des protéines spécifiques (molécules « signal ») couplées à des fluorochromes et à la contre-coloration du support chromosomique (Figure 19).

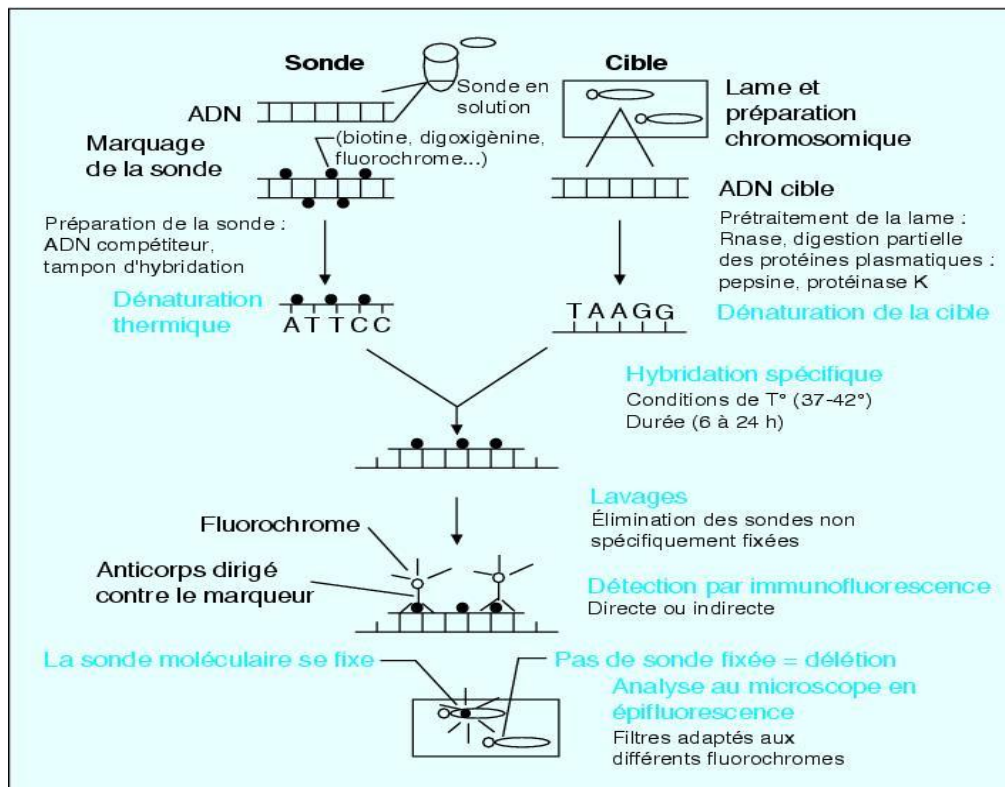


Figure 19 : Hybridation fluorescente in situ FISH
(https://isbst.rnu.tn/useruploads/cours/673_analyses-genetiques.pdf)

FISH est tous marquage non radioactif

La méthode d'hybridation in situ consiste à utiliser une sonde fluorescente (nucléotide modifié par un fluorochrome), qui reconnaît spécifiquement le gène recherché. Elle se fixe sur le gène s'il est présent dans la cellule et le signale par sa fluorescence (permet de visualiser un gène sur un chromosome) (Figure 20). Toutefois le caryotype reste l'examen de première intention.

De nombreux fluorochromes sont disponibles :

- isothiocyanate de fluorescéine (vert-jaune),
- rouge Texas,
- rhodamine (rouge),
- coumarine (bleu)

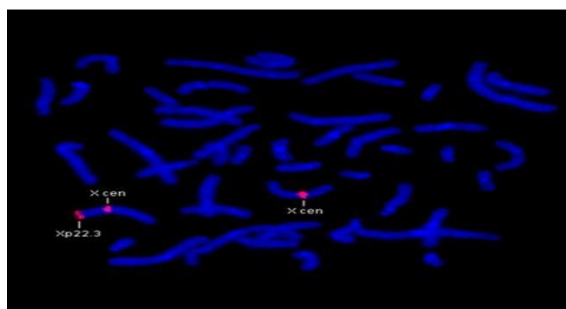


Figure 20 : Résultats de la technique FISH
(https://fr.wikipedia.org/wiki/Hybridation_in_situ_en_fluorescence)

Avantages :

Les sondes étant directement fluorescentes, la détection ne nécessite pas d'amplification du signal et se fait par microscope à fluorescence (protocole simplifié avec absence de l'étape de détection); son utilisation en est donc plus facile, plus rapide (qq jr et pas d'analyses statistiques) et moins parasitée par le bruit de fond. Elle est une méthode de choix en cartographie physique, tant pour localiser que pour ordonner les gènes. En effet, si on utilise plusieurs fluorochromes différents on peut localiser simultanément plusieurs clones d'ADN qui vont être cartographiés et ordonnés.

Inconvénients :

- la sensibilité de détection reste limitée aux séquences répétées
- leur manipulation nécessite de grandes précautions (obscurité)

L'utilisation de fluorochromes différents produit une image multicolore à partir de laquelle il est possible d'orienter, d'ordonner des contigs de YAC, BAC ou cosmides, de mesurer la taille des recouvrements et des trous et donc d'établir une carte fine de la région concernée (Sloan Bena, 1998).

Le degré de précision que l'on peut atteindre par FISH dépend principalement de l'état de la chromatine dans laquelle est situé l'ADN cible. Cet ADN cible peut être dans des chromosomes métaphasiques, ou encore interphasiques. Il peut aussi être dans une fibre étirée de chromatine. Le degré de précision de la cartographie augmente avec le degré de décondensation de l'ADN cible (Lawrence, 1990, Pellestor et al., 1996).

I.2.3. Peinture Chromosomique

La peinture chromosomique est une technique de cytogénétique qui permet de visualiser et d'identifier précisément chaque chromosome d'une cellule. C'est un ensemble de sondes de petite taille qui couvrent l'ensemble du chromosome. Après hybridation on observe un marquage de tout le chromosome. Il existe également des peintures spécifiques d'un bras ou même de quelques bandes chromosomiques. Ces sondes sont très utiles pour interpréter certaines anomalies complexes, mettre en évidence des échanges de petite taille, identifier précisément l'origine d'un fragment non identifié (Zijlstra et al., 1996).

I.2.4. Cytofluorométrie de flux

Nous permet de séparer les différents chromosomes en fonction de leur taille ou longueur (en fonction de la quantité d'ADN) et également en fonction de leur composition en CG et AT.

Les chromosomes peuvent être séparés grâce à un trieur de flux à fluorescence. Au cours de ce procédé, les chromosomes métaphasiques vont être marqués par un colorant qui se fixe à l'ADN, les cellules sont rompues pour libérer les chromosomes entiers en suspension dans le liquide. Cette suspension est pulvérisée en un jet dans lequel la concentration des chromosomes est telle que chaque gouttelette pulvérisée contient un seul chromosome. Le jet

passer au travers de faisceaux laser réglés de façon à exciter la fluorescence. Chaque chromosome émet son propre signal de fluorescence qui est reconnu électroniquement.

La quantité de fluorescéine est proportionnelle à la quantité de colorant lié elle-même à la taille de l'ADN, c'est à dire que le signal est d'autant plus intense que le chromosome est plus grand et il est possible d'imposer à l'appareil de trier les chromosomes en fonction de la fluorescence émise.

Cette fluorescence va être enregistrée par un tube photomultiplicateur puis passer par un collier de charge positif donc le chromosome sélectionné va être chargé positivement puis on les fait passer sur 2 plaques, une + et l'autre – donc le chromosome + va se fixer sur la plaque – puis on le récupère sur un tube. La fiabilité n'est pas de 100%.

Les résultats sont lus sur caryogramme de flux, chaque chromosome a un pic (les chromosomes 9 10 11 12 donnent généralement un seul pic).

L'avantage est d'avoir des collections d'ADN spécifiques de chacun des chromosomes.

I.3. Hybrides d'irradiation

Les hybrides irradiés sont obtenus de la même façon que les hybrides somatiques à la différence que les cellules de la lignée primaire sont soumises, avant la fusion, à une irradiation destinée à casser les chromosomes. Les hybrides contiennent alors des fragments de taille variable, fonction de la dose d'irradiation utilisée (Yerle et al., 1998) (Figure 21).

Plus cette dose est élevée, plus les chromosomes sont cassés en petits fragments et plus la résolution de la cartographie sera grande. Les clones obtenus sont soumis à des tests PCR destinés à détecter la présence ou l'absence de gènes ou de marqueurs. Les cartes d'irradiation sont donc basées sur l'apparition de cassures dues aux rayons X, tout comme les cartes génétiques sont basées sur l'apparition de cassures dues aux recombinaisons lors de la méiose et sur la recherche de liaisons entre loci.

L'établissement des cartes à partir de ces hybrides est obtenu par des analyses statistiques : deux marqueurs initialement localisés à proximité l'un de l'autre ont plus de chances d'être simultanément retrouvés dans les mêmes hybrides que deux marqueurs initialement éloignés (Abitbol, 2021). Les distances calculées entre les marqueurs sont exprimées en centiRays (cR). Par définition 1 cR (pour une dose d'irradiation donnée) correspond à une fréquence de cassure de 1 % entre deux marqueurs.

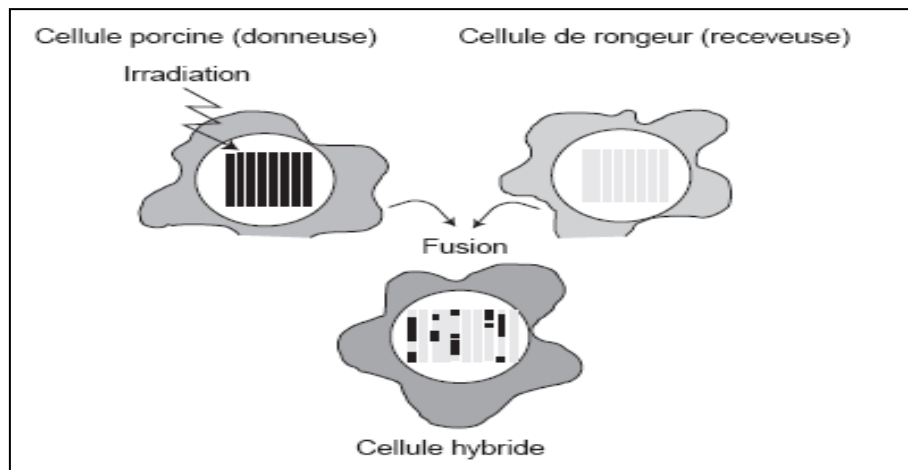


Figure 21 : Hybrides d'irradiation (https://genet.univ-tours.fr/gen001300_fichiers/GEN05D2/GEN05D2EC7.HTM)

Avantages

- pas besoin d'études familiales ou de ségrégation des recombinaisons
- Les marqueurs n'ont pas besoin d'être polymorphes pour être informatifs
- la résolution obtenue ne dépend que de la fréquence de cassure et de la fréquence de rétention (pourcentage du génome retenu dans les hybrides sous forme de fragments chromosomiques). Chaque hybride contient une portion du génome et il faut environ une centaine d'hybrides de ce type pour couvrir l'ensemble du génome.

Degré de résolution

Alors que la carte génétique donne une résolution de 1 cM (centiMorgan), soit 1 Mb en moyenne, la résolution des hybrides irradiés chez l'Homme est environ dix fois supérieure et de l'ordre de 100 kb.

Cette approche est donc extrêmement utile pour déterminer l'ordre de séquences trop proches sur la carte génétique pour être distinguées les unes des autres.

Plusieurs panels d'hybrides irradiés ont été produits chez l'Homme. A ce jour, trois collections sont utilisées : Ces collections diffèrent essentiellement par la dose d'irradiation utilisée :

- GB4 a été faiblement irradiée (à 3000 rads) et permet d'ordonner des marqueurs assez éloignés ;
- la collection G3 a été irradiée à 10 000 rads et permet d'ordonner des marqueurs proches et, enfin,
- TNG4 a été irradiée à très forte dose (50000 rads) rendant possible le classement de marqueurs très proches.

I.4. Degré de résolution des différentes méthodes

❖ Chez l'homme :

- Cytogénétique : Chromosome 1 = $2.5 \cdot 10^8$ pb
Chromosome 21 = $1.5 \cdot 10^8$ pb
Une bande = 1 à $2 \cdot 10^7$ pb
Une sous bande = 1 à $5 \cdot 10^6$ pb
- Génétique : 1 cM = 10^6 pb
- Génétique moléculaire : un fragment cloné dans un
 - cosmide = 45 – 50 Kb > $5 \cdot 10^4$ pb
 - un gène moyen = $2 \cdot 10^4$ pb
 - un exon = 0.05- $1 \cdot 10^3$ pb
 - un nucléotide = 1pb

II. Carte génétique

II.1. Historique

Les premiers travaux de cartographie ont été réalisés par Mendel qui étudie la transmission des caractères. Après la publication de ces travaux en 1865 et la découverte des chromosomes par Fleming en 1882, le substrat physique des caractères constitue toujours une énigme.

Dès 1900 Morgan commence ces études sur la drosophile. Il a remarqué avec son équipe que la transmission de quelques caractères s'accompagne de la transmission des chromosomes sexuels. Il déduit ainsi que ces caractères liés au sexe sont localisés sur les chromosomes sexuels.

La notion de carte génétique remonte à 1913 avec les travaux de Morgan sur la drosophile. Le nombre de ces caractères ne cesse d'augmenter. Alors dès 1911 Morgan parle de couplage (couplage ou bien liaison). Ils dégagèrent alors le concept de liaison génétique.

Il montre d'une part qu'il existe une liaison de certains caractères avec la ségrégation des chromosomes sexuels et d'autre part, que deux marqueurs sur le même chromosome sont en général transmis ensemble.

En 1913 Surtevant, un élève de Morgan obtient la première carte génétique qui correspond à la carte du chromosome X de la drosophile (Figure 22).



Figure 22: Carte génétique de la drosophile (d'après Sinnott et al., 1962).

Le 0 correspond arbitrairement à une extrémité déterminée de la carte, cette carte est basée sur les fréquences alléliques (Figure 23).

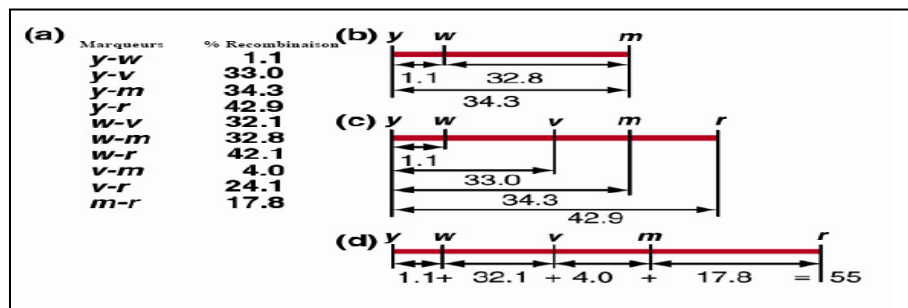


Figure 23 : Etablissement de la première carte génétique (https://www.academia.edu/26691738/Les_cartes_génétiques).

Ces résultats permettent à Morgan de proposer que les gènes occupent des emplacements fixes sur les chromosomes appelés les loci et qu'ils sont organisés d'une façon linéaire sur les chromosomes. Il avait une preuve sur l'existence des crossing over jusqu'aux travaux de Harriet CREIGHTON et Barbara Mc CLINTOCK qui démontrent en 1931 que la production de nouvelles combinaisons de gènes sur le même chromosome est en effet due à un échange physique de certaines parties des chromosomes (Figure 24).

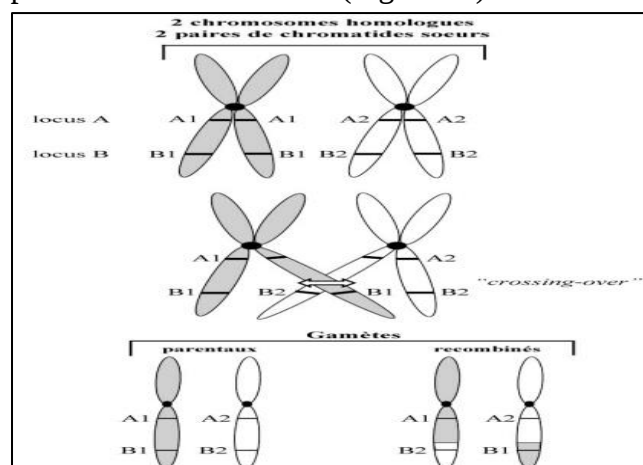


Figure 24 : Phénomène du "crossing over" au cours de la méiose (https://www.editions-ellipses.fr/PDF/9782340014763_extrait.pdf)

II.2. Définition de la carte génétique

Elle fait appel à l'étude de la ségrégation combinatoire de marqueurs résultants de recombinaisons chromosomiques accompagnant la méiose. Pendant la méiose, les « crossing-over » provoquent l'échange de matériel génétique entre chromosomes homologues.

Etablir la carte génétique d'une espèce consiste à établir la position relative des marqueurs génétiques les uns par rapport aux autres sur un chromosome et mesurer la distance qui les sépare (Elsen, 1994). On analyse alors leur capacité à se réassocier lorsqu'ils sont transmis d'une génération à une autre à la suite du brassage des chromosomes qui se fait pendant la méiose. C'est l'étude de la probabilité que deux marqueurs soient liés ou indépendants en se basant sur leur fréquence de recombinaison FR. Cette étude doit être réalisée au sein d'une famille.

Les distances génétiques sont le reflet de la fréquence de recombinaison. Plus deux gènes (deux marqueurs) sont proches, moins ils ont de chances d'être séparés par un crossing-over et plus la distance génétique entre eux sera petite.

Ces études permettent de déterminer les fréquences de recombinaison entre ces caractères et donc de construire une CARTE GÉNÉTIQUE sur laquelle ces caractères seront positionnés les uns par rapport aux autres.

Pour être informatives, ces études doivent étudier beaucoup de méioses, donc de grandes familles.

II.3. Marqueurs génétiques

Les marqueurs génétiques étudiés en cartographie résultent de mutations. Les premières cartes ont été basées sur les marqueurs morphologiques. Les premiers organismes cartographiés sont le maïs, la levure et la drosophile qui possèdent des cartes bien balisées mais le reste des organismes comme l'Homme, sa carte n'a pas connu de grands avancements à cause du petit nombre de marqueurs morphologiques dont certains peuvent s'exprimer tardivement et être influencés par les facteurs environnementaux. Cette limite a été contournée par l'introduction d'autres marqueurs. Il en existe 3 types :

-Marqueurs morphologiques : correspondent aux différences phénotypiques directement décelables au niveau des caractères des individus observés (exemple : maladie, cornes, couleur du pelage, pois lisses,...).

-Marqueurs biochimiques : Correspondent à des différences au niveau de protéines décelées par leur différence de vitesse de migration électrophorétique.

-Marqueurs moléculaires : correspondent à des différences décelées au niveau de l'ADN. À la différence des autres marqueurs, les marqueurs moléculaires caractérisés directement au niveau de l'ADN n'ont pas besoin d'être localisés dans les régions codantes pour être décelés. La transmission des caractères ne peut être étudiée que si ceux-ci sont POLYMORPHES

L'ADN humain est polymorphe. Il existe environ 3.500.000 différences entre deux individus pris au hasard (0,1% de leur génome) (Grosclaude, 1988).

Ces variations dans la séquence d'ADN n'ont pas de conséquences pathologiques.

Les polymorphismes sont le résultat de "mutations" (changement permanent et transmissible dans le matériel génétique). Ceci implique que "mutation" n'est pas synonyme de "pathologie" (Schibler et al., 2000).

- **RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism):** fragment d'ADN cloné hybridé sur ADN_g et digéré par des enzymes de restriction. Suite à la découverte des enzymes de restriction (1973), une technique d'hybridation de sondes marquées va être développée (Southern blot, 1975) pour repérer un fragment de restriction particulier dans un mélange complexe d'ADN (Botstein et al., 1980).

En 1980, on découvre que certains fragments de restriction n'ont pas la même taille chez tous les individus...

Deux régions chromosomiques homologues peuvent présenter un nombre de sites de coupure différent pour une enzyme de restriction donnée. Cette différence peut être due à la disparition, sur un des chromosomes, d'un site de restriction. Les fragments obtenus après digestion enzymatique seront donc de longueurs inégales. Ils migreront par conséquent différemment lors d'une expérience d'électrophorèse.

(Il s'agit souvent du polymorphisme d'un seul nucléotide)

Site de coupure EcoRI	GAATTC
	CTTAAG
Pas de coupure en cas	GACTTC
de modification du site	CTGAAG

Ils ont été utilisés pour établir les premières cartes génétiques chez l'homme, cartes dites de première génération. Ils ont contribué à la localisation de plusieurs gènes responsables de maladies génétiques telle que la myopathie de Duchenne (1982) ou la mucoviscidose (1985).

- **Microsatellites**

Découverts en 1989, ce type de marqueurs polymorphe va petit à petit remplacer les RFLP et devenir les marqueurs les plus utilisés en cartographie génétique.

Il s'agit de séquences d'ADN constituées de motifs répétés avec 2, 3 ou 4 nucléotides :

```
nnnnnnCACACACACACACACACACACACAnnnnnnnnn
nnnnnnGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTnnnnnnnn
nnnnnnATGGATGGATGGATGGATGGATGGATGGnnnnnn
```

Les microsatellites sont des marqueurs multi-alléliques. Les marqueurs multi-alléliques sont plus intéressants pour les applications médicales ou légales que les marqueurs bi-alléliques (Bidanel, 2008).

Le pourcentage d'hétérozygotie dans la population générale sera plus important que celui des marqueurs bi-alléliques.

Locus bi-allélique : A1, A2 (n = 2)

3 génotypes possibles : A1A1, A1A2, A2A2

$$\begin{aligned}\text{Fréquence des hétérozygotes} &= 1 - (n \times f(A1) \times f(A2)) \\ &= 1 - (2 \times 0,5 \times 0,5) \\ &= 0,5\end{aligned}$$

50% d'hétérozygotes au maximum

Locus multi-allélique : A1, A2, A3, A4..... An (n allèles)

Nombre de génotypes homozygotes = n

Nombre de génotypes possibles = $n \times (n+1) / 2$

Pour un marqueur à 8 allèles = $8 \times (8+1) / 2 = 36$ génotypes

(Avec seulement 8 génotypes homozygotes)

$$\begin{aligned}\text{Fréquence des hétérozygotes} &= 1 - (8 \times 0,125 \times 0,125) \\ &= 0,875\end{aligned}$$

87,5% d'hétérozygotes au maximum

- **SNP : Single Nucleotide Polymorphisms**

Les SNP, ou polymorphismes nucléotidiques simples, sont des variations dans la séquence d'ADN qui se produisent lorsque les nucléotides diffèrent d'un individu à l'autre. En cartographie du génome, les SNP jouent un rôle crucial car ils peuvent servir de marqueurs génétiques pour identifier des associations entre des gènes et des traits phénotypiques, comme des maladies ou des caractéristiques physiques.

Les SNP sont des outils précieux en génomique qui aident à déchiffrer les complexités de l'hérédité et de la variation génétique.

Allèle A

...AGCATAGCAGCAATCAGCGCAGCAGTCTCTCTTCGCAAGCA...
...TCGTATCGTCGTTAGTCGCGTCGTCAGAGAGAAGCGTTCGT...

Allèle B

...AGCATAGCAGCAATCAGCACAGCAGTCTCTCTTCGCAAGCA...
...TCGTATCGTCGTTAGTCGTGTCGTCAGAGAGAAGCGTTCGT...

Si un SNP modifie un site de restriction, il génère un RFLP.

- Qualités d'un bon marqueur

Pour qu'un marqueur puisse être utilisé en cartographie génétique

-il faut que les deux parents soient hétérozygotes, donc il faut que les marqueurs soient polymorphes.

-co-dominant pour pouvoir repérer rapidement les hétérozygotes.

-il est important que les marqueurs ne soient pas épistatiques.

-il faut que leur pénétrance soit complète (on déduit le génotype d'après le phénotype).

-Etre repartis de manière homogène sur l'ensemble du génome.

Les marqueurs phénotypiques répondent mal à ces critères.

II.4. Analyse Génétique

Les bases de l'établissement de la carte génétique.

Le brassage de l'information génétique a la méiose.

La méiose nous permet de déterminer si deux marqueurs sont génétiquement liés ou non. La méiose brasse de deux façons l'information génétique, un brassage intra-chromosomique du à deux échanges réciproques entre chromosomes homologues.

Ces deux types aboutissent à l'apparition de 4 gamètes avec réassociation allélique différente dont 2 sont dites parentales et 2 recombinées.

II.4.1. Assortiment indépendant

Soit deux marqueurs AB chez un individu diploïde hétérozygote, il a reçu ab de son père et AB de sa mère, à la méiose 4 associations sont possibles dans le cas de deux gènes indépendants.

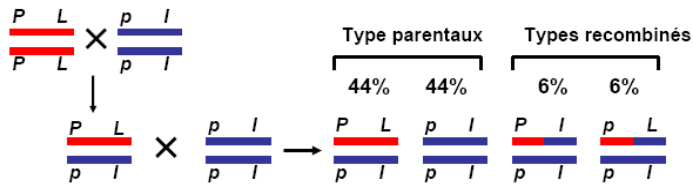
Parents	AB/ab	X	ab/ab
	Parentaux	Recombinés	
Gamètes	AB ab Ab aB	ab	
	>1/4 >1/4 <1/4 <1/4		
F1	AB/ab	>1/4	
	ab/ab	>1/4	
	Ab/ab	<1/4	
	aB/ab	<1/4	

II.4.2. Liaison et crossing over

Dans le cas où 2 marqueurs sont sur le même chromosome, ils sont dits liés. Dans ce cas chez un individu hétérozygote pour 2 marqueurs on aura 4 gamètes mais avec des pourcentages différents.

Les gamètes parentaux seront beaucoup plus supérieurs par rapport aux gamètes recombinés.

La fréquence des recombinés = 1 - fréquence des parentaux.



$$\text{Distance (P, L)} = \frac{\text{Nombre des recombinants} \times 100}{\text{Nombre total de la progéniture}} = \frac{6+6}{100} = 12 \text{ cM}$$

% recombinaison = recombinants / total des descendants multiplié par 100
 % recombinaison = unité de la carte génétique

La distance génétique se calcule à partir de la fréquence de recombinaison.

Lorsque deux marqueurs sont suffisamment proches pour n'être séparés qu'une fois sur 100, on fixe la distance génétique qui les sépare à 1 centimorgan (1cM).

Il s'agit d'une unité de mesure de la distance sur la carte génétique équivalente à 1% de recombinaison.

1 cM = 1 crossing-over pour 100 méioses

Le Taux de recombinaison (θ) détermine la distance entre 2 loci.

Plus la distance est grande, plus la probabilité d'un *crossing-over* est élevée.

Si sur le même chromosome, deux gènes sont suffisamment éloignés pour qu'il y'est un crossing over par gamètes on aura donc 50% de recombinés et 50% de parentaux.

Si deux marqueurs ne sont pas « liés » (i.e. s'ils sont situés sur deux chromosomes différents) ils seront séparés (en moyenne) une fois sur deux. La fréquence de recombinaison maximale est donc de 50% (0,5).

II.5. Fonction de Cartographie.

Dans le cas de marqueurs éloignés on a des doubles recombinaisons élevés dans le même chromosome et cela donne un gamète de génotype parentale ces gamètes ne peuvent pas être discriminé donc on aura une sous estimation de la fréquence de recombinaison et donc de la distance génétique.

Des les premières études on s'est aperçu que la distance génétique suivait généralement l'inégalité triangulaire suivante $d(A,C) < d(A,B) + d(B,C)$.

Ceci est du au crossing over multiple qui sous estime le nombre de recombinaisons ainsi la distance génétique séparant deux marqueurs.

Cela est surtout observé pour les grandes distances, donc plus la distance est grande et plus son estimation sera biaisée pour cela plusieurs fonctions ont été élaborés pour estimer le plus précisément possible la distance génétique (Haldane, 1919).

Pour le calcul de la distance entre deux marqueurs très éloignés il faut rajouter des marqueurs intermédiaires.

Fonctions de cartographie

- Distance de Haldane

→ Prend en compte les C.O. multiples

$$d_H = -50 \ln (1-2r) \quad \text{unité: cM}$$

- Distance de Kosambi

→ Prend en compte les C.O. multiples et l'existence d'interférence

$$d_K = 25 \ln \left[\frac{(1+2r)}{(1-2r)} \right] \quad \text{unité: cM}$$

La formation d'un chiasma en un endroit donné d'un chromosome diminue la probabilité d'apparition d'un second chiasma dans les régions voisines. Il peut être interprété par l'incapacité physique des chromosomes à se retourner sur elle-même sur une certaine distance.

Le nombre de double recombinaison est beaucoup moins que ce qu'on croit.

Interférence et coefficient de coïncidence

Coefficient de coïncidence ou cdc

$$\text{cdc} = \frac{\% \text{ de doubles recombinants observés}}{\% \text{ de doubles recombinants théoriques}}$$

Interférence ou I

$$I = 1 - \text{cdc}$$

II.6. Relation Distance Physique et Génétique.

Une carte complète est une carte qui regroupe les deux types: carte génétique (mesurée en centimorgans, cM) et carte physique (mesurée en mégabases, Mb ou kb).

On s'attend à ce que plus deux loci soient proches physiquement, moins ils aient de chances d'être séparés par une recombinaison, donc leur distance génétique sera faible. Cependant, cette relation n'est pas toujours linéaire ou directe, car la fréquence de recombinaison peut varier selon la région du chromosome, en raison de facteurs comme la structure chromosomique ou la présence de régions recombinantes plus ou moins actives.

En résumé, la distance physique donne une idée de la proximité réelle sur le chromosome, tandis que la distance génétique reflète la probabilité de recombinaison entre deux loci. La cartographie génétique utilise cette relation pour localiser des gènes ou des marqueurs en fonction de leur fréquence de recombinaison, même si leur position physique exacte peut varier.

En effet, la relation entre ces deux cartes n'est pas linéaire et le regroupement n'est pas simple, car la fréquence de recombinaison varie selon plusieurs facteurs, notamment le sexe, la région chromosomique, et l'espèce :

-Différences selon le sexe : La taille de la carte génétique chez la femelle est généralement 1,3 à 2 fois plus grande que chez le mâle. Par exemple, chez l'humain, la femme a une carte d'environ 4782 cM, contre 2809 cM pour l'homme. Cela reflète une différence dans le taux de recombinaison entre les sexes.

-Différences selon le génome : La taille physique du génome (en Mb) est similaire chez l'homme et la souris (~3200 Mb), mais leur carte génétique diffère (3700 cM pour l'homme, 1600 cM pour la souris). Cela montre que la densité de recombinaison n'est pas uniforme et varie selon les espèces.

-Différence selon la région chromosomique : La présence de hot spots de recombinaison complique la conversion entre cM et kb. Il n'existe pas de règle simple pour transformer une distance génétique en distance physique, car la fréquence de recombinaison dépend de régions spécifiques du génome.

Il est donc très difficile, voire impossible, d'établir une règle générale de conversion cM/kb.

II.7. Construction des cartes de liaison génétique

Pour toutes les espèces le principe de la construction de la carte de liaison est basé sur le calcul des fréquences de recombinaison, pour cela il faut déterminer les génotypes produits par la méiose. Ces génotypes sont étudiés de deux façons soit directement soit par l'analyse génétique des descendants (Vaiman, 2000).

II.7.1. Analyse directe des produits de la méiose

Cette analyse est classique chez les champignons, les algues, les levures, ou des produits de la méiose donnent directement naissance à des clones cellulaires haploïdes faciles à étudier (Tableau 9). Cette étude est devenue aussi possible chez quelques plantes diploïdes et même chez l'Homme par l'étude des spermatozoïdes.

Tableau 9 : Analyse directe des produits de la méiose chez la levure

Génotype des souches haploïdes	souche 1 × souche 2 L MAT _a × • MAT _α			
Génotype du zygote	$\frac{L MAT_a}{\bullet MAT_\alpha}$			
Génotype des spores	L MAT _a	• MAT _α	L MAT _α	• MAT _a
Effectifs observés	145	161	35	43

MAT: locus de compatibilité sexuel

L: marqueur RAPD; L: présence du fragment, •: absence du fragment

FR= $\frac{35+43}{T} \times 100 = 20.3\%$ d=20.3cM

Les travaux sur la levure ont permis de localiser 1200 marqueurs.

II.7.2. Analyse génétique des descendants diploïdes

Dans ce cas il faut analyser les génotypes des deux parents et de leur descendance. Le but est de déterminer l'haplotype reçue de chaque parent et ainsi déterminer les individus recombinants et non recombinants.

Dans ce type d'analyse on peut déterminer les gamètes recombinants reçus de chacun des deux parents (chaque individu peut être analysé à deux niveaux).

Les individus doivent être caractérisés phénotypiquement et ou génotypes

La phase doit être déterminée chez les deux parents

La phase : l'association des allèles de deux loci ou plus chez un individu sur chacun des deux chromosomes homologues

La détermination de la phase permet de déterminer les individus recombinants et non recombinants

Le pourcentage de recombinaison permettra de déterminer si les deux marqueurs sont liés ou indépendants

Dans le cas de liaison la distance est égale à la fréquence de recombinaison.

• Test du chi deux

Le test du chi deux peut être nécessaire pour trancher sur la liaison ou l'indépendance de deux marqueurs (Tableau 10).

Exemple : une étude sur 500 drosophiles dont l'un des parent et de génotype A/a B/b x a/a b/b descendance 140 A/a B/b , 135 a/a b/b, 110 A/a b/b, 115 a/a B/b.

Dans ce cas % R = 45% très proche de 50%, donc il faut faire un test de chi deux (Tableau 11).

Tableau 10 : Valeurs critiques de la distribution du χ^2

Le test du χ^2

$$\chi^2 = \sum_i^n \frac{(O_i - T_i)^2}{T_i}$$

ddl : nombre de classes phénotypiques - 1

à chaque valeur de la statistique χ^2 correspond une probabilité $P(\alpha)$ = à la probabilité pour que la différence entre l'effectif observé O_i et l'effectif théorique T_i soit simplement du au hasard

df \ p	0.995	0.975	0.95	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.05	0.025	0.01	0.005	0.001
1	0.004	0.008	0.016	0.020	0.024	0.028	0.032	0.036	0.040	0.045	0.050	0.055	0.605	0.700	1.385	1.635	2.706
2	0.010	0.016	0.024	0.029	0.034	0.039	0.043	0.047	0.051	0.056	0.061	0.066	0.717	0.838	1.678	1.900	3.000
3	0.078	0.101	0.121	0.140	0.155	0.170	0.184	0.197	0.210	0.223	0.236	0.249	0.788	0.935	1.753	1.978	3.219
4	0.215	0.236	0.257	0.277	0.293	0.308	0.322	0.336	0.349	0.362	0.375	0.388	0.853	1.000	1.761	1.983	3.357
5	0.412	0.435	0.456	0.476	0.491	0.506	0.520	0.533	0.546	0.559	0.572	0.585	0.924	1.071	1.753	1.974	3.398
6	0.637	0.660	0.681	0.701	0.716	0.730	0.744	0.757	0.770	0.783	0.796	0.809	0.983	1.130	1.735	1.956	3.437
7	0.872	0.895	0.916	0.936	0.951	0.965	0.978	0.991	1.004	1.017	1.030	1.043	1.067	1.214	1.729	1.950	3.475
8	1.134	1.157	1.178	1.198	1.213	1.227	1.240	1.253	1.266	1.279	1.292	1.305	1.329	1.476	1.724	1.945	3.513
9	1.382	1.405	1.426	1.446	1.461	1.475	1.488	1.501	1.514	1.527	1.540	1.553	1.577	1.724	1.721	1.942	3.551
10	1.602	1.625	1.646	1.666	1.681	1.695	1.708	1.721	1.734	1.747	1.760	1.773	1.797	1.794	1.941	1.942	3.589
11	1.813	1.836	1.857	1.877	1.892	1.906	1.919	1.932	1.945	1.958	1.971	1.984	2.008	2.005	1.940	1.941	3.626
12	2.000	2.023	2.044	2.064	2.079	2.093	2.106	2.119	2.132	2.145	2.158	2.171	2.195	2.192	1.937	1.938	3.663
13	2.179	2.202	2.223	2.243	2.258	2.272	2.285	2.298	2.311	2.324	2.337	2.350	2.374	2.371	1.932	1.933	3.700
14	2.352	2.375	2.396	2.416	2.431	2.445	2.458	2.471	2.484	2.497	2.510	2.523	2.547	2.544	1.927	1.928	3.737
15	2.501	2.524	2.545	2.565	2.580	2.594	2.607	2.620	2.633	2.646	2.659	2.672	2.696	2.693	1.922	1.923	3.774

H0 : les marqueurs sont libres

Tableau 11 : Estimation des fréquences théoriques

	B	b	total
A	140	110	250
a	115	135	250
total	255	245	

$$X_{2t}=0.025$$

$$X_{2calculé}=5.02$$

$X_{2cal} > X_{2t}$ H0 rejetée les marqueurs sont liés

- **Méthode d'analyse de liaison chez l'Homme et les animaux d'élevage**

Vu le petit nombre de descendants pour ces espèces et leur temps de génération élevé, l'étude de liaison ne peut se faire de la façon classique. Une méthode statistique a été mise en évidence, c'est la méthode du Lod score (logarithm of odds) fondée sur les travaux de Morton 1955 (Guérin, 2000).

Cette analyse est basée sur l'étude de familles informatives en cumulant les résultats apportés par chaque famille (ce qui augmente le nombre de méioses considérées) (Kosambi, 1944; Huttley et al., 1999 ; Montagutelli et de Vienne, 2008).

II.8. Méthode de Lod score

II.8.1. Exigences de la cartographie génétique par calcul de lod score

- les familles doivent être informatives : Au moins un des deux parents doit être hétérozygote pour le marqueur à étudier afin de déterminer les recombinants (Figure 25 et 26).
- La phase ne doit pas être nécessairement connue (sa connaissance augmente la puissance de l'étude)
- Les familles doivent comporter au moins deux enfants. Elles seront d'autant plus informatives que le nombre d'enfants est élevé
- la pénétrance doit être connue
- Il faut sélectionner les familles sans biais
- Il faut étudier au moins une centaine de méioses informatives.

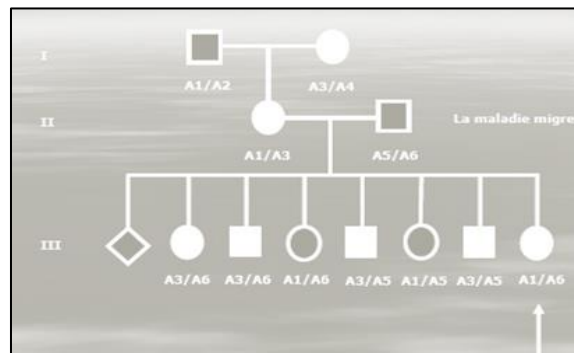


Figure 25: Notion de recombinant et non recombinant (<https://slideplayer.fr/slide/514329/>)

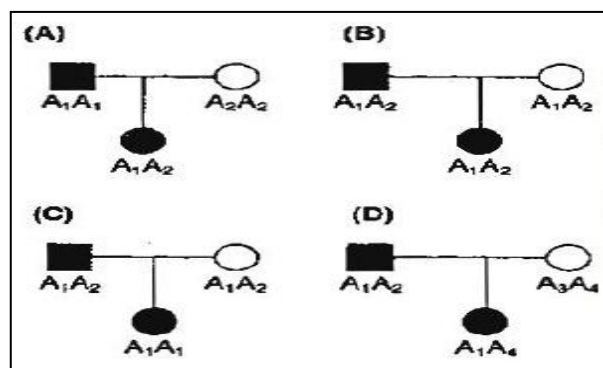


Figure 26: Méiose informative et non informative (<https://www.studocu.com/fr/document/universite-claude-bernard-lyon-i/genetique/>).

II.8.2. Analyse deux Points

Le but de cette méthode est la cumulation des informations des différentes familles informatives. Pour chacune d'entre elles il faut calculer la probabilité d'obtenir les effectifs des classes génotypiques observées, en supposant d'une part que les deux loci sont liés ($\Theta < 0.5$) d'autre part qu'ils sont indépendants $\Theta = 0.5$.

Le rapport de ces deux probabilités $L(\Theta)$ et $L(\Theta = 0.5)$

L pour likelihood pour vraisemblance est d'autant plus élevé que la liaison est forte et inversement.

La formule est :

$$\text{Lod score } (\theta) = \log_{10} \frac{L(\theta < 0.5)}{L(\theta = 0.5)}$$

Et ainsi Z des différentes familles sont additionnés

II.8.2.1. Exemple d'application de la formule des lod scores

-Phase connue (Figure 27)

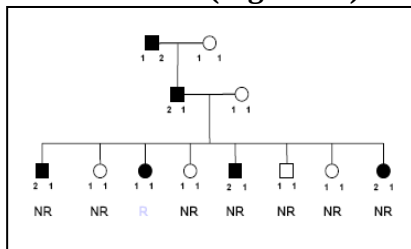


Figure 27 : Exemple de phase connue

$$Z = \log_{10} (1-\Theta)^{NR} \times \Theta^R / (0.5)^{NR+R} = \log_{10} (1-\Theta)^7 \times \Theta / (0.5)^8$$

Θ reste une valeur qu'on n'a pas encore estimé donc on donne différentes estimations de Θ (de 0 à 0.5) pour lesquelles on calcule les valeurs de Z par un simple remplacement.

Θ	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Z	$-\infty$	0.833	0.825	0.655	0.378	0

-Phase inconnue (Figure 28).

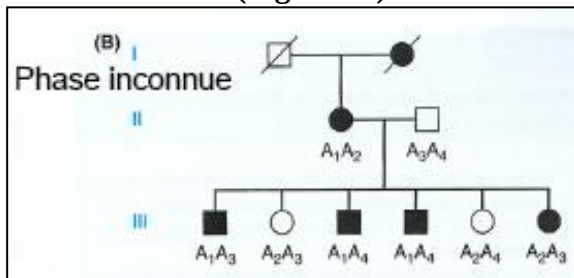


Figure 28 : Exemple de phase inconnue

$$Z = \log_{10} [1/2(1-\Theta)^{NR} \times \Theta^R / (0.5)^{NR+R} + 1/2(1-\Theta)^{NR} \times \Theta^R / (0.5)^{NR+R}]$$

II.8.2.2. Interprétation des résultats de lod score

Un lod score supérieur à 3 (souvent 3 ou plus) est considéré comme une preuve significative de liaison, car cela signifie que la probabilité de liaison est 1000 fois plus grande que celle d'une absence de liaison.

Un lod score entre -2 et 3 est considéré comme une zone d'incertitude, où la liaison n'est pas clairement établie.

Un lod score inférieur à -2 indique une forte probabilité d'absence de liaison.

Plus le lod score est élevé, plus la preuve en faveur d'une liaison génétique est forte. Cependant, il est aussi important de considérer le contexte de l'étude, la taille de l'échantillon, et d'autres facteurs statistiques pour une interprétation complète (Terwilliger, 1995).

II.8.2.3. Exemple des différentes courbes qu'on peut obtenir

Courbe 1 : évidence de liaison $Z_{\max}=4$ pour $\Theta=0$ ces deux marqueurs sont liés avec 0 recombinaison, les deux marqueurs sont très proches (Figure 29).

Courbe 2 : preuve de liaison avec un $Z_{\max}=4$ avec une valeur de $\Theta=0.2$ donc la distance la plus probable entre les deux marqueurs est de 20cM

Courbe 3 : lod score entre -2 et 3 aucune conclusion

Courbe 4 : exemple d'exclusion de liaison donc on peut exclure la liaison avec 10cM de part et d'autre du marqueur étudié car -2 correspond à $\Theta=0.1$, on ne peut rien dire pour des taux de recombinaison plus élevé car les valeurs de Z sont supérieures à -2.

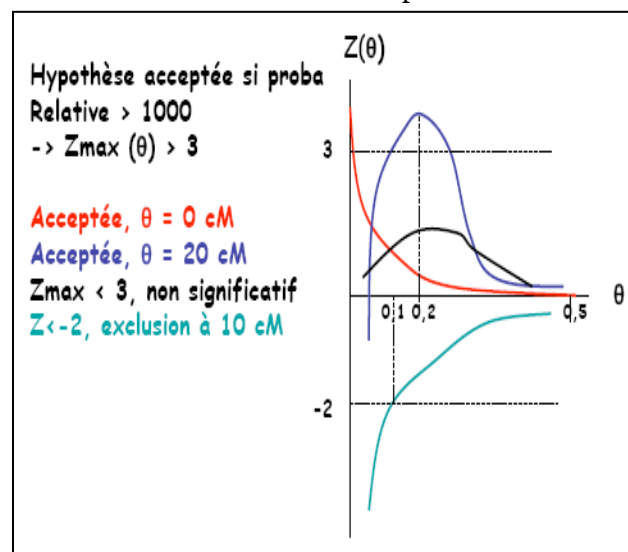


Figure 29 : Différentes courbes de Lod score
(<https://courses.washington.edu/gensc371/lecture/march5.pdf>)

Lod score positif et intervalle de confiance

Les intervalles de confiances sont difficiles à déduire de façon analytique une règle est couramment utilisée c'est la règle de Lod-1. On prend le $Z_{\max}$ comme la distance la plus probable et on prendra 2 autres valeurs de Z pour l'intervalle de confiance : $Z_{\max}-1$ et on extrapole ces deux valeurs pour trouver les deux valeurs de Θ de l'intervalle de confiance.

Plus le nombre d'information est grand plus le pic est aigu et plus le pic est aigu plus la distance estimée est plus vraisemblable et l'intervalle de confiance est plus petit.

Lod score négatif et carte d'exclusion

Un Lod score négatif exclue une liaison pour la région où le lod score est inférieur à -2 courbe 4

Bien que les généticiens espèrent obtenir des valeurs de lod score positifs, les exclusions ne sont pas sans valeurs, elles permettent de rétrécir les intervalles des régions chromosomiques susceptible de contenir le gène recherché

Si de grandes régions du génome sont exclues il n'en restera que quelques régions

Le programme EXCLUDE (Edwards, 1987) intègre les données de liaisons négatifs dans un diagramme de localisation candidates restantes.

II.8.3. Analyse de liaison génétique multipoint (analyse 3 Points)

Les généticiens se sont longtemps servis des études trois points surtout pour déterminer l'ordre des marqueurs ; l'analyse multipoint est particulièrement efficace pour localiser un gène ou un nouveau marqueur sur une carte préexistante. Le point de départ est habituellement un lod score à deux points montrant que le gène ou un nouveau marqueur se localise près d'un marqueur particulier mais il est aussi intéressant de le positionner parmi les autres marqueurs déjà localisés dans cette région.

Le test multipoint se déroule comme l'analyse précédente mais on réalise une étude séquentielle de liaison génétique à l'aide du test du lod score avec les différents marqueurs dont l'ordre et la distance génétique sont déjà connus dans cette région.

Cette analyse est facilitée par des programmes informatiques adéquats (linkmap) le type de résultats obtenu est représenté dans la figure 30.

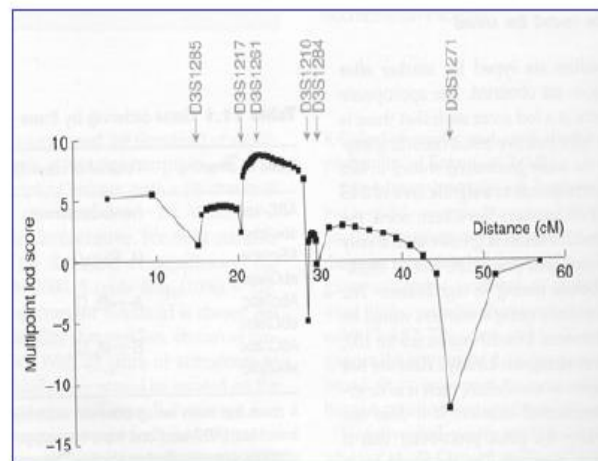


Figure 30: Résultats de liaison génétique multipoint
(<https://jiwaji.edu/pdf/ecourse/zoology/MHG-Zool-1.pdf>)

L'axe horizontal correspond aux marqueurs génétiques connus dans la région considérée et l'axe vertical correspond à la valeur du lod score $Z(\Theta)$ multipoint.

Le programme linkmap teste le locus le long des marqueurs en calculant la probabilité à chaque position et le pic maximum correspond à la position la plus vraisemblable et un lod score négatif permet d'exclure la localisation du gène dans cette région.

II.8.4. Limite de l'analyse standard de Lod score

- Elle nécessite de spécifier un modèle génétique précis, détaillant le mode de transmission, les fréquences géniques et la pénétrance de chaque génotype. De tels renseignements ne sont pas toujours disponibles.
- Limite sur la meilleure résolution possible, les régions ciblées sont généralement de 1Mb ce qui n'est pas précis et le clonage de telles régions est souvent difficile
- Risque d'erreur de faux recombinants et de faux non recombinant
- Problèmes d'hétérogénéité du locus

- **Cas Particulier : - Analyse de spermatozoïdes**

Cette analyse est réalisée directement sur des spermatozoïdes isolés après extraction de l'ADN, une amplification par PCR permet le typage direct de marqueurs moléculaires à partir d'une seule molécule d'ADN.

Cette étude présente des avantages par rapport à l'analyse de familles, analyse sur un seul individu, analyse directe des gamètes dont le nombre est illimité. La phase est directement déduite à la combinaison majoritaire des allèles.

II.9. Etudes de liaison sans modèle

-L'étude de liaison par la méthode standard de lod score ne peut être utilisée pour tous les phénotypes comme pour les maladies multifactorielles et les QTL chez les animaux d'élevage. Une des façons de résoudre ce problème est l'analyse de liaison sans modèle, cette méthode repose sur la recherche de segments partagés entre les individus ayant un même phénotype

Ex entre individus atteints à l'intérieur de famille ou population

II.9.1. Cartographie par homozygotie (homozygotie par descendance)

Repose sur l'étude d'individus issus d'une union consanguine qui sont homozygotes pour un allèle responsable d'une maladie génétique récessive. Les deux allèles récessifs présents chez ces individus sont probablement les copies d'un allèle ancestral qui était présent chez un ancêtre commun, ces individus peuvent aussi être homozygotes pour les marqueurs qui sont proches de ce gène. Il faut accumuler l'information portée par plusieurs individus consanguins atteints afin de désigner une région génomique unique pour laquelle ils sont tous homozygotes. Le locus a alors une forte probabilité de se trouver dans cette région

Cette méthode peut nous donner une localisation très fine si les individus pris sont faiblement consanguins (ancêtre commun éloigné) (Figure 31).

Plus la région est petite et donc la localisation est fine, pour cela il faut utiliser un grand nombre de marqueurs pour baliser le génome. Cette méthode est utilisée avec succès pour la localisation de l'ataxie de Friedrich sur le chromosome 8 et elle est aussi utilisée chez les animaux d'élevage.

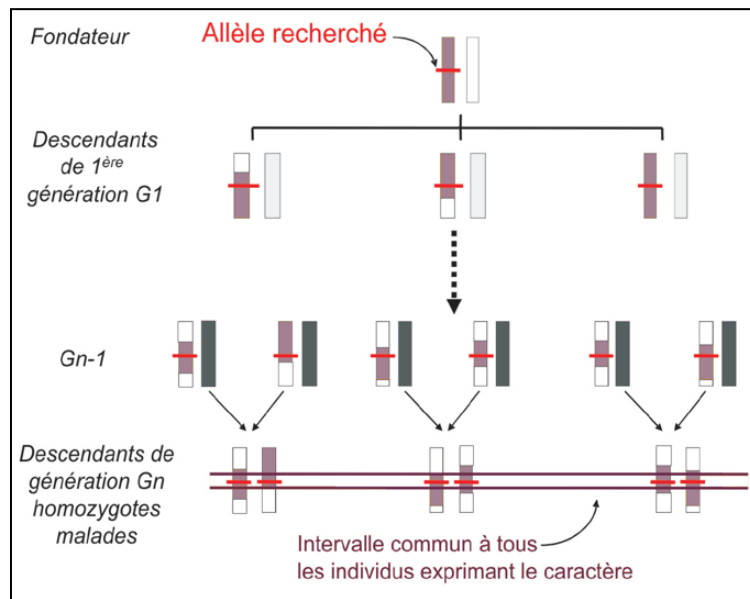


Figure 31: Cartographie par homozygotie (<https://www.onab.fr/gestion-d-une-anomalie/cartographie-par-recherche-d-homozygotie>)

II.9.2. Méthode des paires de germain

Les paires de germains atteints sont typés pour les marqueurs et lorsque la fréquence de partage est plus élevée que le taux prédit par une ségrégation au hasard, les régions chromosomiques en cause sont suspectées (Figure 32).

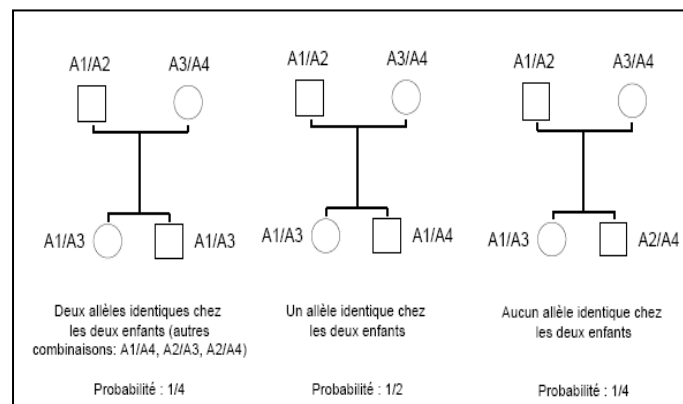


Figure 32: Fréquences des allèles partagés entre germains (<http://tiphaine.mellakh.com/these/node19.html>).

En absence de liaison les probabilités sont de $\frac{1}{4}$ qu'ils ne partagent aucun allèle, $\frac{1}{2}$ qu'ils partagent un allèle et $\frac{1}{4}$ les deux allèles

En cas de liaison les deux dernières probabilités augmentent donc cette augmentation de partage entre germains atteints (plusieurs familles) est une indication de liaison. Un test de chi deux permettra de déterminer si cette augmentation est significative ou elle est due au hasard

II.9.3. Méthode cas/témoins

C'est une étude sur deux populations (effet fondateur), une population témoin et une population d'individus atteints. Dans cette étude on recherche systématiquement les marqueurs pour lesquels les fréquences alléliques diffèrent significativement entre les deux populations

Les individus doivent être choisis au hasard dans une population panmictique (pas de consanguinité)

Il faut choisir les marqueurs très polymorphes

Ex : nouvel isolat n'est pas une bonne population pour cette étude

Il faut confirmer par un test chi deux.

III. Cartographie Physique à Haute Résolution

La cartographie physique consiste à déterminer l'ordre et la distance réelle (en pb) entre des séquences spécifiques sur l'ADN génomique. Contrairement à la cartographie génétique (basée sur la fréquence de recombinaison), elle repose sur l'analyse directe des molécules d'ADN (Yerle, 2000) (Figure 33).

Objectifs

- Localiser et ordonner des séquences spécifiques (gènes, marqueurs, séquences répétées), les uns par rapport aux autres et par rapport aux chromosomes dont ils sont issus.
- Assembler des clones génomiques en continuité (contigs).
- Reconstituer le génome dans sa globalité.
- Faciliter le séquençage et l'annotation du génome.
- Comprendre l'organisation structurale et fonctionnelle du génome.

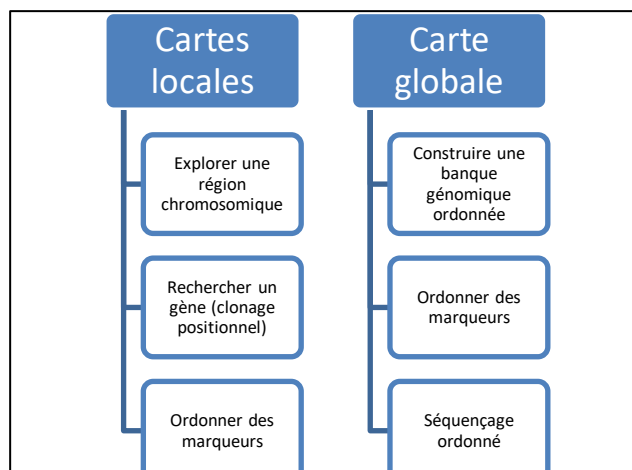


Figure 33: Stratégie de cartographie physique

Il existe plusieurs technologies différentes mais complémentaires :

III.1. Cartographie par FISH a haute résolution

On travaille sur des chromosomes étiré naturellement (chromosome interphasiques) ou étiré artificiellement (fibres d'ADN). Ce qui nous intéresse est la détermination la plus précise de l'ordre de plusieurs séquences dans une région bien donnée (Du et al., 2018 ; Rajagopalan et Doudna, 2021)

La résolution : est la distance minimale exprimée en paire de base qui doit séparer deux séquences le long de la fibre d'ADN pour qu'elle puisse être discriminée et ordonnée. Cette résolution va dépendre du degré de condensation d'ADN en outre le degré de condensation élevé = degré de résolution faible et vice versa.

III.1.1. FISH sur chromosomes interphasiques

En effet, l'utilisation des sondes pouvait se faire directement sur des noyaux en interphase, stade auquel les chromosomes sont complètement déliés dans le noyau, ouvrant ainsi la voie à ce qu'il est courant d'appeler la cytogénétique interphasique (Figure 34).

Les chromosomes sont beaucoup plus étalés que les chromosomes métaphasiques avec un degré de résolution élevé ce qui facilite la détermination de l'ordre physique de certains clones d'ADN synthéniques (Rappold et al., 1984 ; Trask et al., 1989, Xu et al., 2022).

Le degré de condensation : la chromatine est 20 X moins condensée que les chromosomes métaphasiques.

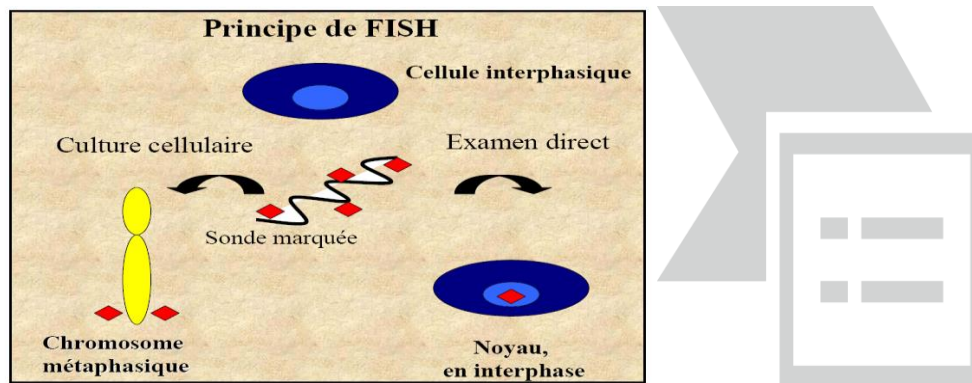


Figure 34 : Principe de la FISH interphasique et résultat au microscope a fluorescence

(Vorsanova et al., 2010).

L'inconvénient est que les chromosomes étalés peuvent se repliés en boucles ce qui va fausser l'ordre déterminé et imposer une analyse statistique des résultats de cartographie obtenus de nombreux noyaux interphasiques différents.

La cartographie sur chromosomes interphasique est délicate et nécessite de bloquer les noyaux en phase G1 d'au moins une 100aine de noyaux différents.

III.1.2. FISH sur fibres d'ADN étirées

L'utilisation de méthodes d'hybridation fluorescentes classiques en fait un outil performant pour la cartographie physique haute résolution de clones.

Une des méthodes de préparation est **la DIRVISH : direct visual hybridization**

On travaille sur des lames de microscope ou l'on étale des cellules à l'extrémité de la plaque et lyser avec un détergent puis la lame va être penchée donc l'ADN en solution va glisser vers le bas et on obtient des chromosomes étirés

Le degré de résolution va être plus élevé par rapport aux chromosomes interphasiques (de 700 Kb à 5 Kb) 100X supérieur (Stuart et Satija, 2023).

La technique de " **peignage moléculaire** " a été mise au point dès 1993, et alors testée sur de petites molécules d'ADN (ADN de bactériophages et ADN de la bactérie *Escherichia coli*). Elle consiste à obtenir à partir de la molécule d'ADN en " pelote ", forme sous laquelle elle se trouve naturellement en solution, des filaments alignés et étirés, beaucoup plus faciles à étudier que la pelote de départ. Pour ce faire, une lame de verre traitée chimiquement est plongée dans une solution contenant les molécules d'ADN. Chaque molécule se fixe par l'une de ses extrémités. La surface de verre est ensuite lentement retirée et ce mouvement, par un phénomène physique, provoque l'étirement des molécules qui se collent à la lame, sous forme de fils tendus dans la même direction (Figure 35).

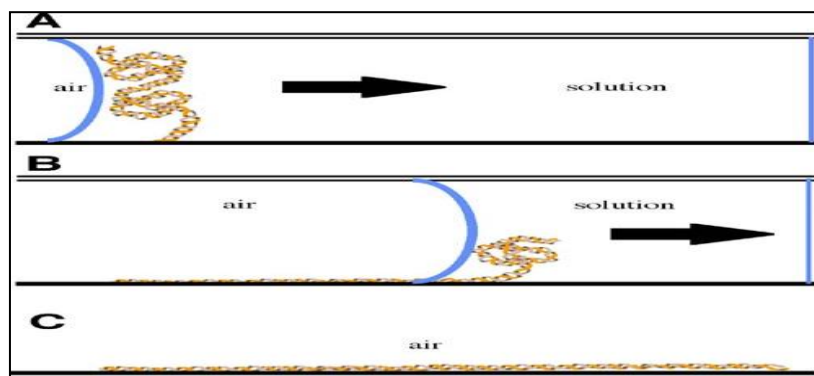


Figure 35 : Peignage moléculaire (<https://www.igmm.cnrs.fr/service/peignage-moleculaire-dadn/>)

Il est ainsi possible d'établir des cartes cytogénétiques dont la résolution maximale est la bande, soit environ 3 à 10 cM, ce qui implique, dans le meilleur des cas, une résolution d'environ une à trois Mb. En revanche, lorsque cette même technique est appliquée sur chromosomes interphasiques (Rappold *et al* 1984), la chromatine étant près de 20 fois moins condensée, la résolution peut atteindre 50 à 1000 kb (Trask *et al* 1989, Lawrence *et al* 1990). Une résolution de 10 à 200 kb peut être obtenue en hybridant les sondes directement sur la chromatine extraite des noyaux (l'ADN décondensé forme des boucles autour des restes de matrice cellulaire, donnant l'impression d'un halo). Enfin, une précision de l'ordre du kb est à présent atteinte avec l'hybridation sur chromosomes étirés (Fiber FISH et peignage

moléculaire). Les segments d'ADN, étirés au point d'atteindre un état double brin relâché, permettent l'hybridation et sont visibles sous microscope (Li et al., 2024).

III.2. Marche sur le Génome

Technique connue également sous le nom de Chromosome Walking, permet de progresser progressivement le long d'une région génomique inconnue à partir d'un point d'ancrage connu (séquence connue) vers une séquence inconnue adjacente. Elle permet d'explorer une région de 200 Kb de part et d'autre d'un marqueur connu qui est considéré comme un point de départ (Clark et Pazdernik, 2013, Li et Zhang, 2021, Lung et al., 2024) (Figure 36).

Utilise des clones chevauchants (ex. : dans des banques YAC/BAC).

Étapes :

- Identifier un clone d'ancrage contenant une séquence d'intérêt (STS ou gène).
- Séquencer les extrémités de ce clone.
- Utiliser ces extrémités comme sonde pour cribler la banque à la recherche du clone suivant (qui se chevauche). Le criblage peut être réalisé par PCR.
- Isolement des clones positifs.
- L'extrémité du clone le plus long est utilisée à son tour comme sonde pour poursuivre la marche
- La dernière étape est répétée de manière à obtenir un ensemble de clones chevauchants couvrants une région chromosomique cible.

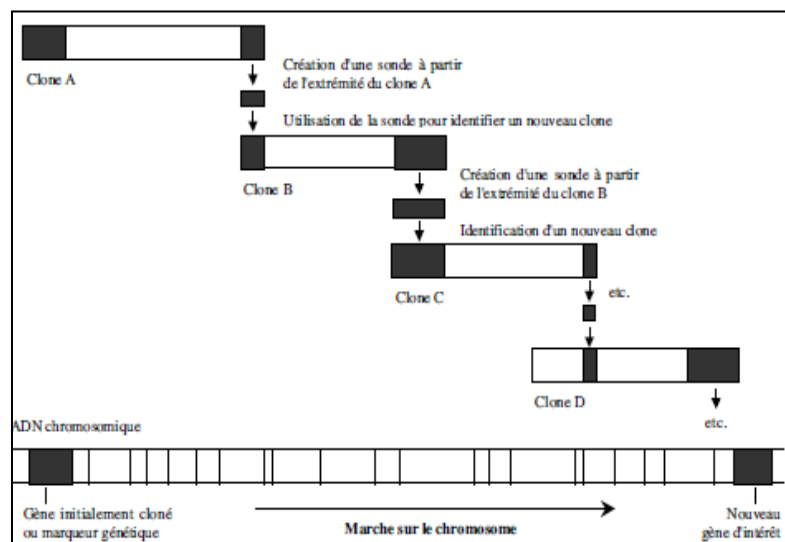


Figure 36: Principe de la marche sur chromosome (<https://quizlet.com/fr-fr/fiches-de-memorisation/chapitre-1-introduction-a-la-genomique-structurale-613672940>)

III.3. Macro cartographie de restriction

- Consiste à déterminer les empreintes de restriction ou « fingerprint » de chacun des clones, par digestion enzymatique (clivage des clones d'ADN (BAC/YAC) avec enzymes de restriction).
- Les fragments sont séparés par électrophorèse.
- En effectuant une analyse comparée des fragments de restriction entre clones afin de déterminer des fragments communs et assembler les clones en contigs par recouvrement.
- Elle donne une vue d'ensemble de la structure générale d'un fragment d'ADN, sur des distances allant de 100kb à plusieurs Mb (Clark et Pazdernik, 2013, Winden et al., 2023).

Objectifs

- Établir une **organisation topographique** des sites de restriction.
- Permettre la **localisation relative** de gènes ou de séquences spécifiques.
- Servir de **base** pour des techniques de clonage ou de cartographie plus fines.
- Comparer des régions homologues entre espèces ou individus (polymorphismes de taille).

Étapes

- A partir d'une banque génomique de grands fragments, l'ADN génomique est digéré par **des enzymes de restriction** (souvent rares cutters comme NotI, SfiI, MluI...).
- Les fragments obtenus d'environ 1000 kb, sont **séparés par électrophorèse sur gel à champ pulsé (PFGE)**, car ils sont très longs.
- Le **profil de restriction** est analysé pour déterminer les clones chevauchants grâce aux fragments en communs et déduire la **taille et l'ordre** des fragments.
- Des **sondes spécifiques** (par hybridation Southern blot) peuvent être utilisées pour **identifier** des fragments.

III.3.1. Électrophorèse en champ pulsé PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)

Les techniques classiques d'électrophorèse ne permettent pas la séparation des fragments de taille supérieure à 40 Kb. En 1988 CANTOR et al ont mis au point la PFGE, technique d'électrophorèse adaptée aux **très grands fragments** (>50 kb). Elle permet la séparation de molécules d'ADN de 1 à 10000 Kb et d'estimer la taille des fragments générés par digestion (Figure 37).

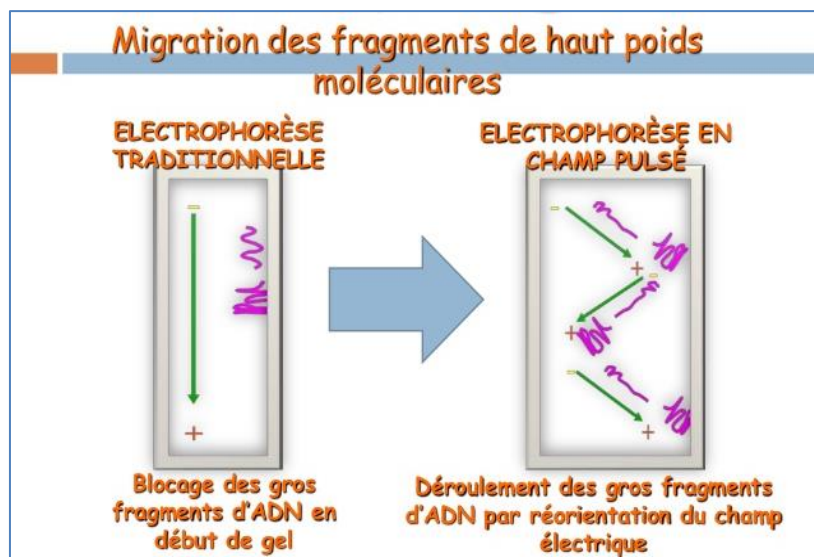


Figure 37: Électrophorèse en champ pulsé PFGE
(<https://fr.slideshare.net/slideshow/pfge/15595536>).

Principe

Il repose sur l'application alternée de deux champs électriques de directions différentes qui impose à la molécule d'ADN des étapes de réorientation. Plus la molécule est grande, plus l'étape de réorientation est longue ce qui diminue d'autant la durée effective de migration en champs pulsés (Lopez-Canovas et al., 2019 ; Shakuntala et al., 2022).

Des modèles mathématiques de la migration en champs pulsés ont été développés et l'influence des différents paramètres liés soit à la molécule soit aux champs électriques, a été étudiée.

Différents systèmes d'électrophorèse en champs pulsés existant varient en fonction de l'angle de réorientation utilisé et de l'homogénéité des champs. De nombreux appareils ont été construits pour mettre en œuvre ces différentes techniques (Egly 1993) (Figure 38).

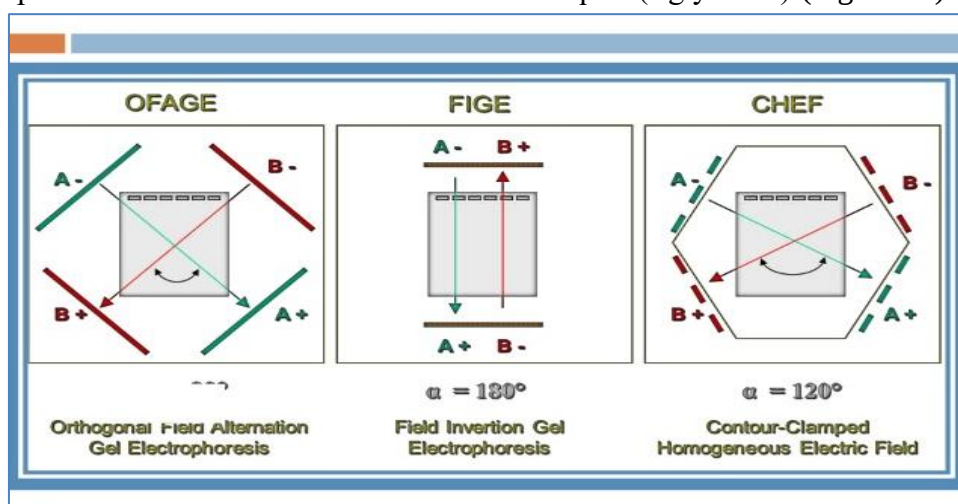


Figure 38: Différents systèmes d'électrophorèse en champs pulsés
(<https://fr.slideshare.net/slideshow/pfge/15595536>).

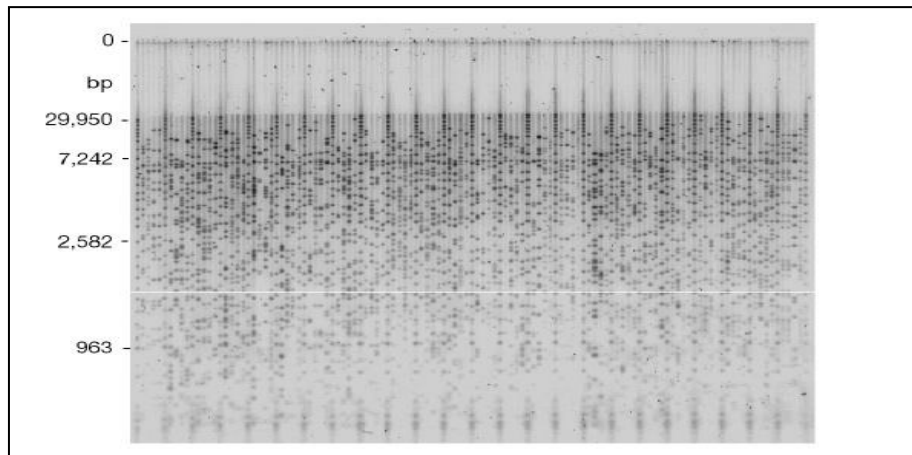


Figure 39: Exemple de profil d'électrophorèse en champ pulsé PFGE
(<https://biologynotesonline.com/pulse-field-gel-electrophoresis-pfge-protocol/>)

III.4. Stratégie des contigs (carte de Contigs)

Elle repose sur le clonage d'un génome entier ou d'une partie d'un génome dans des vecteurs de grands fragments puis à assembler et aligner ces fragments d'ADN séquencés, appelés "reads", les uns par rapport aux autres pour identifier les chevauchements, en séquences plus longues appelées "contigs" (Pereira et al., 2020 ; Pan et al., 2020 ; Belser, 2022) (Figure 40 et 41).

Cet assemblage de clones d'ADN chevauchants permet de reconstituer soit

- une portion d'un génome (carte locale)
- un génome entier (carte globale)

Un contig est un groupe ordonné de clones chevauchants qui constituent un génome entier ou une partie du génome.

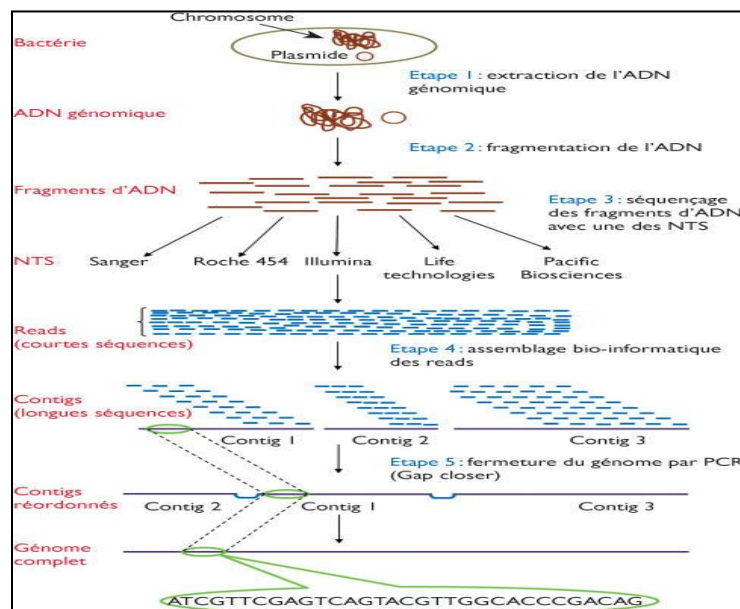


Figure 40: Stratégie des contigs (Diene et al., 2014)

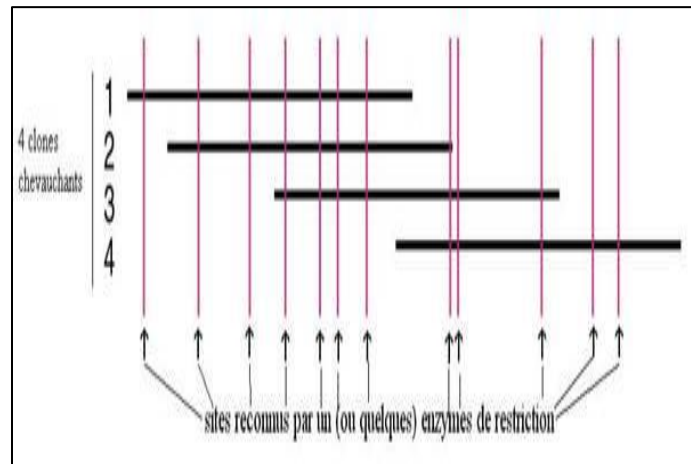


Figure 41: Mise en ordre de 4 clones chevauchants à l'aide de sites de restriction
 (<https://quizlet.com/fr-fr/fiches-de-memorisation/chapitre-1-introduction-a-la-genomique-structurale-613672940>).

Applications

- Ordonnancement des marqueurs contenus dans les clones ce qui contribue au processus globale de la cartographie génomique
- Caractérisation de régions chromosomiques et clonage positionnel
- Séquençage de l'ADN génomique

III.5. Cartographie par Saut

La cartographie par saut, ou "jumping" en anglais, est une technique de cartographie physique utilisée en cartographie du génome pour localiser des gènes ou des marqueurs génétiques sur un chromosome. Elle permet d'explorer une région de taille plus importante que celle de la marche sur chromosome. C'est une méthode puissante pour explorer efficacement le génome, notamment dans les régions difficiles à cartographier par marche (Figure 42).

Elle permet de localiser rapidement une séquence éloignée d'une séquence connue sans passer par les régions intermédiaires.

Le principe de cette méthode repose sur l'utilisation des banques de saut où deux régions distantes sur le chromosome qui sont artificiellement rapprochées (*via* circularisation, digestion, religation). Elle permet d'atteindre une région en aval de plusieurs kb à Mb, évitant ainsi les zones difficiles (Poustka, 1995 ; Gros, 2015 ; Chen et al., 2021).

Contrairement à la marche sur le chromosome (chromosome walking), qui progresse linéairement, le saut chromosomique saute au-dessus de grandes régions, notamment les régions répétées ou non clonables (Tableau 12).

Objectif

- Contourner des séquences d'ADN difficiles à manipuler (telles que les répétitions, les régions non clonables ou instables).
- Atteindre des régions plus distantes rapidement à partir d'un point connu.
- Accélérer la construction de cartes physiques et le clonage positionnel.

Étapes de la méthode

Le saut chromosomique repose sur une reconstruction artificielle de la séquence d'ADN permettant de rapprocher les extrémités distantes d'un fragment :

1. L'ADN génomique est coupé par une enzyme de restriction rare, générant de grands fragments génomiques.
2. Ces fragments sont circularisés (*via* ligation des extrémités).
3. Un nouveau site de coupure est introduit au centre du fragment (souvent par une autre enzyme).
4. Ce nouveau clivage ouvre la molécule circulaire près du centre, ce qui rapproche les extrémités d'origine.
5. Les extrémités jointes sont ensuite amplifiées (par PCR) ou utilisées comme sondes pour cribler une banque de clones et trouver les clones contenant les régions plus distales.

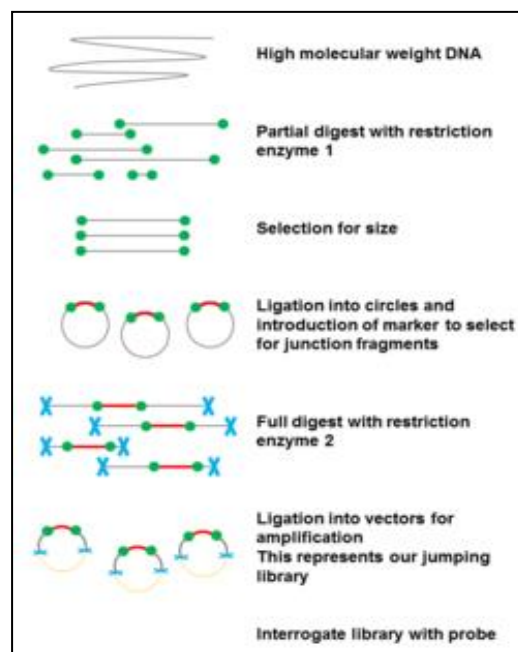


Figure 42: Cartographie par Saut
(https://fr.wikipedia.org/wiki/Saut_sur_le_chromosome).

Avantages

- Permet de passer rapidement à des séquences éloignées (plusieurs dizaines à centaines de kb).
- Contourne les régions problématiques du génome.
- Accélère la cartographie physique et le clonage positionnel de gènes responsables de maladies.

Limites

- Moins efficace pour des distances courtes (préférer alors la marche).
- Méthode techniquement exigeante (nécessite ADN de haute qualité).
- Peut parfois générer des artefacts ou lier des fragments non contigus.

Tableau 12 : Comparaison avec la marche sur le chromosome

Critère	Marche	Saut
Distance parcourue	Courte (progression locale)	Longue (plusieurs dizaines de kb)
Mode d'approche	Linéaire, clone par clone	Saut rapide, sans passer par l'intermédiaire
Utilisation	Région bien clonable	Région répétée ou difficile
Technique principale	Séquencer extrémités, criblage	Circularisation, PCR, hybridation

III.6. Saut délétionnel (Deletion Jumping)

La cartographie par saut délétionnel est une variante du chromosome jumping. Elle permet également d'atteindre rapidement des séquences distantes sur un chromosome, mais repose sur un principe de délétion contrôlée plutôt que de circularisation (Zhang et al., 2019) (Tableau 13).

Le saut délétionnel est une technique de cartographie physique dans laquelle une grande partie centrale d'un fragment d'ADN est délétée (supprimée) de manière enzymatique ou chimique, pour ne conserver que les extrémités. Ces extrémités sont ensuite reliées **ou** amplifiées, ce qui permet de « sauter » la région centrale.

Principe général

1. Fragmentation de l'ADN génomique (via enzyme de restriction ou cisaillement).
2. Sélection de fragments grands (souvent >50 kb).
3. Délétion partielle de la région centrale (enzymatique ou chimique).
4. Religation des extrémités proximales.
5. Amplification ou utilisation des extrémités jointes comme sondes.
6. Criblage de banque génomique pour identifier les clones distants.

Avantages

- Ne nécessite pas de circularisation.
- Contrôle précis de la longueur de la délétion.
- Permet une orientation et une progression ciblée vers une région d'intérêt.

Limites

- Requiert des conditions de digestion précises pour éviter perte d'information.
- Peut être techniquement délicat à optimiser.
- Nécessite ADN de très haute qualité.

Tableau 13 : Différence avec le chromosome jumping classique

Critère	Saut classique	Saut délétionnel
ADN circulaire	Oui	Non
Mode de liaison	Par circularisation	Par délétion contrôlée
Technique clé	PCR sur extrémités rapprochées	Religation des extrémités délétées
Contrôle du saut	Moins précis	Plus ciblé selon la délétion

III.7. Banques de Fonctions

III.7.1. Construction d'une banque génomique

Un ensemble de clones représentant un génome ou une région génomique (Riquet et Pitel, 2000).

- 1-Extraction d'ADN de haut poids moléculaire
- 2-digestion partiel de l'ADN par des enzymes à faible fréquence de coupure
- 3-électrophorèse en champ pulsé des fragments d'ADN et choix de la taille des inserts souhaités
- 4- Préparation des vecteurs
- 5- ligation
- 6- transformation + culture
- 7- sélection des recombinés (transformés)
- 8- ordonnancement des clones
- 9- stockage en microplaque

Les vecteurs les plus utilisés sont les BAC

Banque spécifique de chromosome, les chromosomes sont isolés par la cytométrie de flux. L'ordonnancement des clones est plus facile.

III.7.2. Taille d'une banque

- Exprimée en EG ou X

$$\text{Taille} = \frac{\text{Nombre de clones} \times \text{taille moyenne des inserts (Mb)}}{\text{Taille du génome haploïde (Mb)}}$$

EG est la représentativité d'une banque pour un génome.

La capacité maximum d'une banque est atteinte à 10 EG (Tableau 14).

Tableau 14: Equivalences du génome

EG	Chance de trouver une séquence unique
1 EG	60%
2 EG	80%
3 à 10 EG	90 à 99%

III.7.3. Banque de bonne qualité

- Contigs sans discontinuité
- Couverture complète de tout le génome
- Représentativité élevée ($EG \geq 10$)
- Grande taille des inserts
- Clones stables et non réarrangés
- Absence de contamination
- Accès facile aux clones

Une telle banque permet non seulement d'identifier rapidement les séquences d'intérêt, mais également de construire une carte physique fiable du génome, indispensable pour le clonage positionnel ou l'analyse fonctionnelle des gènes.

III.7.4. Organisation d'une banque

Homme (5EG) organisés en 2080 microplaques de 96 puits (Figure 43).

- Les Super pool sont constitués de 20 plaques
- Chaque super pool est représenté par:
 - 8 mélanges de lignes
 - 12 mélanges de colonnes
 - 20 mélanges de plaques

Les clones sont conservés dans des microplaques à -80°C .

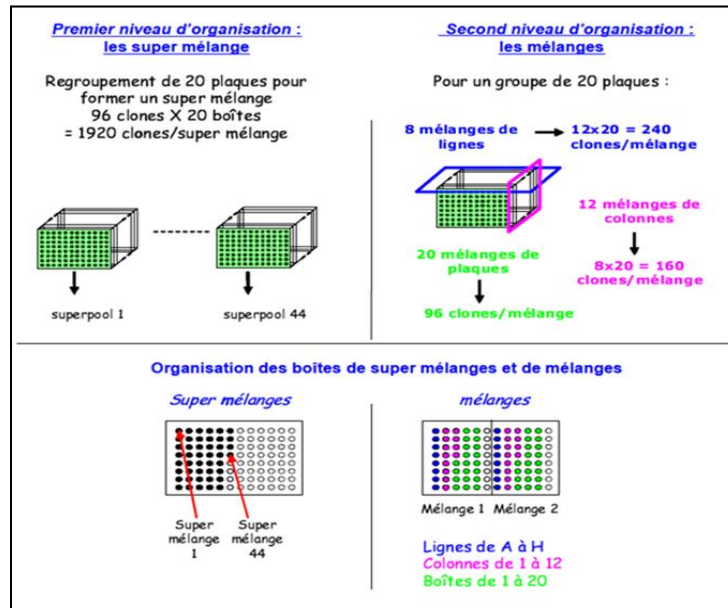


Figure 43: Organisation et criblage d'une banque
 (<https://slideplayer.fr/slide/10350034/>).

III.8. Construction d'une carte physique par STS

Les STS (Séquence-Tagged Sites) ou (étiquettes) sont des séquence d'ADN

- Uniques
- de 200 à 500 Pb
- polymorphes ou non
- Caractérisés par 2 amorces PCR d'une vingtaine de nucléotides (Olson et al. 1989).

Le développement de la cartographie génétique à l'aide de microsatellites a fourni un nombre important de marqueurs STS (Sequence-Tagged Site), faciles à utiliser par PCR (Figure 44).

Le criblage des banques avec ces marqueurs permet d'isoler des clones chevauchants et l'analyse du contenu en STS de l'ensemble des clones permet la reconstitution de l'ordre chromosomique (Peerbaye, 2004 ; Sajer et al., 2020).

Le fait de retrouver le même STS dans 2 clones indique qu'ils se chevauchent.

- Les STS, précédemment définis et positionnés le long du chromosome par analyse génétique, sont testés (par PCR) sur les YAC de la banque.
- Deux YAC, positifs pour le même STS, présentent a priori un recouvrement et l'on peut ainsi progressivement assembler des « contigs ».

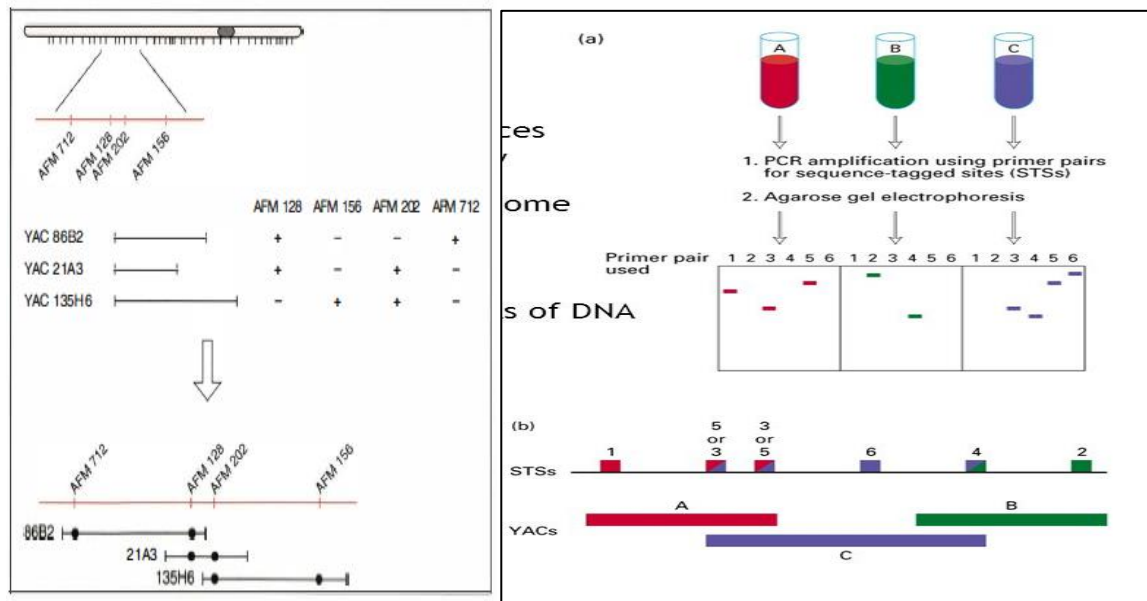


Figure 44: Ordonnement par l'utilisation des STS (Tanzi et al., 1992)

III.9. Macro clonage dans les YAC

Le macro-clonage dans les YAC (Yeast Artificial Chromosomes), une méthode puissante utilisée en cartographie physique à grande échelle du génome (Chumakov, 1995).

Le macro-clonage désigne le clonage de très grands fragments d'ADN (jusqu'à plusieurs mégabases) dans des vecteurs capables de les maintenir et de les répliquer.

Les YAC (Yeast Artificial Chromosomes) sont des vecteurs artificiels dérivés de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, conçus pour mimer un chromosome eucaryote (Weier et al., 2009).

Objectifs du macro-clonage

- Cloner et stocker des fragments génomiques de grande taille (100 kb à >1 Mb).
- Créer des banques génomiques complètes.
- Servir de base à la cartographie physique du génome.
- Étudier les réarrangements génomiques, les structures chromosomiques, etc.

Étapes du macro-clonage dans les YAC

1. Préparation de l'ADN génomique

- Extraction d'ADN de très haute qualité et non fragmenté.
- Digestion partielle ou cisaillement mécanique.

2. Préparation du vecteur YAC

- Linéarisation du vecteur au site de clonage.
- Exposition des télomères.

3. Ligation

- Insertion du fragment génomique dans le vecteur entre les télomères.

4. Transformation de la levure

- Par électroporation ou traitement chimique.
- Les cellules transformées sont sélectionnées sur milieux spécifiques.

5. Analyse des clones YAC

- Évaluation par PFGE (électrophorèse sur gel à champ pulsé) pour vérifier la taille du fragment inséré.
- Hybridation avec des sondes si nécessaire.

Avantages

- Peut accueillir des fragments très longs (jusqu'à 2 Mb).
- Reproduit des caractéristiques eucaryotes (structure chromosome-like).
- Compatible avec les techniques de cartographie physique à grande échelle (walking, jumping).
- Permet l'étude de gènes complexes ou régulés à longue distance.

Inconvénients

- Instabilité fréquente : perte de fragments ou réarrangements.
- Taux de clones chimériques élevé (clones contenant des fragments non contigus).
- Manipulation plus délicate que les vecteurs BAC ou cosmides.
- Croissance de la levure plus lente que celle de *E. coli*.

Applications

- Projet Génome Humain : cartographie initiale avec banques YAC.
- Clonage positionnel de gènes (ex : gène BRCA1, DMD...).
- Étude des régions complexes ou très répétées.
- Création de contigs YAC servant de base à la cartographie fine.

IV. Cartographie Comparée

La cartographie comparée (ou cartographie comparative) est une méthode de génomique structurale permettant de comparer l'organisation des génomes entre différentes espèces ou individus, afin d'identifier des régions homologues (syntenie), des réarrangements, ou encore des événements évolutifs (Dutrillaux, 1980 ; Bronner, 2002 ; Griffin et al., 2022).

La cartographie comparée consiste à aligner et comparer les cartes génétiques ou physiques de différentes espèces ou souches, grâce à la présence de marqueurs communs, afin de mettre en évidence :

- Des régions conservées (syntenie),
- Des réarrangements chromosomiques (translocations, inversions, duplications),
- L'homologie des gènes ou segments d'ADN.

Elle permet l'utilisation de cartes connues pour l'enrichissement d'autres cartes et l'étude de l'évolution de la structure des génomes à différentes échelles. Cependant, le terme de « cartographie comparée » s'applique en général à la comparaison de cartes entre 2 ou plusieurs espèces.

Des cartes génomiques ont été établies pour l'homme et la souris, mais aussi pour plus de 30 autres espèces de mammifères, et ceci pour 2 raisons principales :

- elles constituent une ressource pour la localisation de déterminants génétiques de caractères héréditaires
- elles permettent de comprendre et d'interpréter l'organisation et l'évolution du génome ancestral.
- différentes méthodes permettent la comparaison de génomes plus ou moins éloignés phylogénétiquement, à des échelles et des niveaux de précision variables.

Objectifs

- Étudier l'évolution des génomes.
- Transférer des connaissances d'un organisme modèle (ex. souris, drosophile) vers une espèce cible.
- Identifier des gènes candidats responsables de maladies ou de caractères d'intérêt.
- Reconstituer l'histoire évolutive des chromosomes.

IV.1. Comparaison de cartes cytogénétiques

- mettre en relation la composition des génomes en bandes cytogénétiques.
- il faut que les espèces étudiées soient suffisamment proches du point de vue évolutif, afin que les réarrangements intervenus n'aient pas changé fondamentalement l'organisation générale du génome (Nash, 1982 ; Kretschmer et al., 2021 ; Griffin et al 2024).
- De telles comparaisons ont été effectuées entre le génome humain et celui de plusieurs espèces de singes *ou entre* différentes espèces d'animaux d'élevage (bœuf, mouton et chèvre).

IV.2. Utilisation de la FISH en cartographie comparée (Zoo-FISH)

- L'hybridation fluorescente *in situ* est très utile (Zoo-Fluorescence In Situ Hybridization) et très pratique pour la cartographie comparée, en particulier le painting, qui utilise un chromosome unique entier marqué d'une espèce donneuse comme sonde d'hybridation, permet de repérer les zones d'homologie entre chromosomes d'espèces différentes (Schibler, 1998 ; Griffin et al., 2020 ; Yano et al., 2021 ; Iannuzzi et al., 2023).
- Elle permet de visualiser les homologies chromosomiques entre espèces, en d'autres termes, quels fragments de chromosomes sont conservés au cours de l'évolution.
- La possibilité d'utiliser plusieurs colorations différentes de façon simultanée autorise l'hybridation d'un génome par plusieurs chromosomes-sondes à la fois (ZOO-FISH).
- cette méthode est facilitée par l'existence de bibliothèques de clones chromosome-spécifiques pour l'homme et quelques autres mammifères.
- La ZOO-FISH permet la mise en évidence rapide de segments conservés, même entre espèces peu cartographiées et évolutivement plus éloignées.

Etapes

1. Préparation de chromosomes métaphasiques d'une espèce cible.
2. Extraction et marquage fluorescent d'ADN chromosomique entier (ou partiel) d'une espèce donneuse (ex. humain, souris).
3. Hybridation sur les chromosomes de l'espèce cible.
4. Observation au microscope à fluorescence → les régions homologues s'éclairent.

Objectifs

- Identifier les régions synteniques (homologues).
- Détecter des réarrangements chromosomiques (translocations, fusions, inversions...).
- Tracer l'évolution chromosomique entre espèces proches ou éloignées.
- Étudier les chromosomes non identifiables morphologiquement.

Les méthodes et outils précédemment décrits permettent une comparaison au niveau régional.

La comparaison à une échelle plus fine doit se faire grâce à la localisation de marqueurs homologues.

Pour certaines espèces, l'intensité des recherches dont elles font l'objet et le nombre important de marqueurs cartographiés rendent possible l'établissement de cartes assez complètes.

Les cartes comparatives n'incluant pas l'homme, ou entre 2 espèces d'ordres différents, sont moins riches. Ceci s'explique en grande partie par la nature différente des marqueurs d'intérêt chez les différentes espèces : les marqueurs que l'on cherche à localiser chez le porc, animal d'intérêt agronomique, ne sont pas les mêmes que ceux que l'on cherche à localiser chez la souris, modèle pour les maladies génétiques humaines. Ainsi, la carte comparative entre la souris et le porc ne comporte actuellement que 123 gènes.

Avantages

- Permet une extrapolation des connaissances d'un génome modèle à d'autres espèces.
- Facilite l'identification rapide de gènes candidats.
- Outil puissant pour l'analyse évolutive.
- Permet de voir directement la conservation des régions chromosomiques.
- Ne nécessite pas de séquençage.
- Très utile pour espèces non séquencées.

Exemples d'application

- Transfert des cartes de la souris vers l'humain pour étudier des maladies génétiques.
- Étude de l'évolution des chromosomes chez les mammifères ou plantes.
- Amélioration génétique en agriculture (comparaison génomes du riz, maïs, blé...).

Références bibliographiques

- Abitbol, M. (2021). Génomique féline, progrès récents et intérêts en recherche et en médecine vétérinaire. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 174, 191-198.
- Belhadj Kacem Tabet-Aoul, N. (2006). Contribution à la caractérisation chromosomique d'un panel d'hybrides somatique hamster-mouton et d'un panel d'hybrides d'irradiation hamster-mouton par PCR. Université Oran1 Ahmed Ben Bella.
- Belser, C. (2022). Approches bioinformatiques pour l'exploration des génomes et de la biodiversité. *Génomique, Transcriptomique et Protéomique [q-bio.GN]*. Université Paris-Saclay.
- Bidanel, J. P., Boichard, D. et Chevalet, C. (2008). De la génétique à la génomique. *INRAE Productions Animales*. 21. 15-32. 10.20870/productions-animales.2008.21.1.3372.
- Botstein, D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32, 314-331.
- Bronner, G. Spataro, B. Gautier, C. (2002). Cartographie génomique comparée chez les mammifères - Bio-informatique (4). *Med Sci (Paris)* 18 (6-7) 767-774.
- Cantor, C.R, Smith, C.L, Mathew, M.K. (1988). Pulsed-field gel electrophoresis of very large DNA molecules. *Annu Rev Biophys Chem* 17,287-304.
- Chen C., D'Alessandro E., Murani E., Zheng Y., Giosa D., Yang N., Wang X., Gao B., Li K., Wimmers K., Song C. (2021). SINE jumping contributes to large-scale polymorphisms in the pig genomes. *Mob DNA*. 12(1):17.
- Chumakov I.M., Rigault P., Le Gall I., Bellanne-Chantelot C., et al. (1995). A YAC contig map of the human genome. *Nature*, 377, 175-297.
- Clark D. P. Pazdernik N. J. (2013). Chapter 7 - Cloning Genes for Analysis, *Molecular Biology (Second Edition)*, Academic Press, Pages 194-226.
- Cohen D., Chumakov I.M., Weissenbach J. (1993). A first-generation physical map of the human genome. *Nature*, 366, 698-701.
- Cribiu E.P., Schibler L., Vaiman D. (2000). Cartographie fine de la région du gène PIS de la chèvre. *INRA Productions Animales*, numéro hors série « Génétique moléculaire : principes et application aux populations animales », 141-144.
- Cribiu, E. P., et L. Schibler. (2000). Introduction à la cartographie des génomes complexes. *INRA. Prod. Anim*, numéro hors série « Génétique moléculaire : principes et application aux populations animales », 69-72.

- Cuthbert A.P., Trott D.A., Ekong R.M., Jezzard S., et al. (1995). Construction and characterization of a highly stable human: rodent monochromosomal hybrid panel for genetic complementation and genome mapping studies. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 71, 68-76.
- Du P., Li L., Liu H., Fu L., Qin L., Zhang Z., Cui C., Sun Z., Han S., Xu J., Dai X., Huang B., Dong W., Tang F., Zhuang L., Han Y., Qi Z., Zhang X. (2018). High-resolution chromosome painting with repetitive and single-copy oligonucleotides in *Arachis* species identifies structural rearrangements and genome differentiation. *BMC Plant Biol.* 18(1):240.
- Diene S. M., Bertelli C., Pillonel T., Schrenzel J., Greub G. (2014). Génomique et métagénomique bactériennes : applications cliniques et importance médicale. *Rev Med Suisse*. 450 (Vol.10), p. 2155–2161.
- Dutrillaux B., Viegas-Pequignot E., Couturier J. (1980). [Great homology of chromosome banding of the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and primates, including man)]. *Annale de Génétique*, 23, 22-25.
- Elsen J.M., Mangin B., Goffinet B., Chevalet C. (1994). Optimal structure of protocol design for building genetic linkage maps in livestock. *Theoretical Applied Genetics*, 88, 129-134.
- Griffin DK., Larkin DM., O'Connor RE. (2020). Time lapse: A glimpse into prehistoric genomics. *Eur J Med Genet.* 63(2):103640.
- Griffin DK., Larkin DM., O'Connor RE., Romanov MN. (2022) Dinosaurs: Comparative Cytogenomics of Their Reptile Cousins and Avian Descendants. *Animals (Basel)*. 27;13(1):106.
- Griffin DK., Kretschmer R., Srikulnath K., Singchat W., O'Connor RE., Romanov MN. (2024). Insights into avian molecular cytogenetics-with reptilian comparisons. *Mol Cytogenet.* 31;17(1):24.
- Goff S.A., Ricke D., Lan T.H., Presting G., Wang R., Dunn M., et al (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. Japonica). *Science*, 296(5565): 92-100.
- Gros F. (2015). La génomique et ses applications : promesses et limites, *Comptes Rendus Biologies*, 338(8–9):543-546.
- Grosclaude F. (1988). Le polymorphisme génétique des principales lactoprotéines bovines. *INRA Productions Animales*, 1, 5-17.
- Guérin, G. (2000). La cartographie du génome équin. *Productions Animales*. HS 2000, pp.115-117.
- Haldane J.B.S. (1919). The combination of linkage values and the calculation of distance between the loci of linkage factors. *Journal of Genetics*, 8, 299-309.
- Huttley G.A., Smith M.W., Carrington M., O'Brien S.J. (1999). A scan for linkage disequilibrium across the human genome. *Genetics*, 152, 1711-22.

Iannuzzi A., Iannuzzi L., Parma P. (2023). Molecular Cytogenetics in Domestic Bovids: A Review. *Animals (Basel)*. 6;13(5):944.

Kosambi D.B. (1944). The estimation of map distances from recombination values. *Annals of Eugenics*, 12, 172-175.

Kretschmer R., de Souza MS., Furo IO., Romanov MN., Gunski RJ., Garnero ADV., de Freitas TRO., de Oliveira EHC., O'Connor RE., Griffin DK. (2021). Interspecies Chromosome Mapping in Caprimulgiformes, Piciformes, Suliformes, and Trogoniformes (Aves): Cytogenomic Insight into Microchromosome Organization and Karyotype Evolution in Birds. *Cells*. 7;10(4):826.

Lawrence J.B., Singer R.H., McNeil J.A., (1990). Interphase and metaphase resolution of different distances within the human dystrophin gene. *Science*, 249, 928-932.

Li C., Fu L., Wang Q., Liu H., Chen G., Qi F., Zhang M., Jia Y., Li X., Huang B., Dong W., Du P., Zhang X. (2024). Development and application of whole-chromosome painting of chromosomes 7A and 8A of *Arachis duranensis* based on chromosome-specific single-copy oligonucleotides. *Genome*. 1;67(6):178-188.

Li J., Zhang Y. (2021). Recent advances in genome walking techniques and applications in functional genomics. *Frontiers in Genetics*. 12.652219.

Lopez-Canovas L., Martinez Benitez MB., Herrera Isidron JA., Flores Soto E. (2019) Pulsed Field Gel Electrophoresis: Past, present, and future. *Anal Biochem*. 15;573:17-29. Lung J., Hung MS., Chen CY., Yang TM., Lin CK., Fang YH., Jiang YY., Liao HF., Lin YC. (2024). An optimized ligation-mediated PCR method for chromosome walking and fusion gene chromosomal breakpoints identification. *Biol Methods Protoc*. 25;9(1):bpae037.

Montagutelli, X. de Vienne, D. (2008). Les populations expérimentales de cartographie génétique. *Med Sci (Paris)*, 24(1), 77-80.

Nash W.G., O'Brien S.J. (1982). Conserved regions of homologous G-banded chromosomes between orders in mammalian evolution: carnivores and primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79, 6631- 6635.

Nguyen V.C., Weil, D., Finaz, C., Cohen-Hagenhauser O., Gross, M.S., Jegou-Foubert, C., de Tand M.F., Cochet C., de Grouchy J., Frezal J. (1986). Panel of twenty-five independent man-rodent hybrids for human genetic marker mapping. *Annales de Génétique (Paris)*, 29, 20-26.

Pan W., Jiang T., Lonardi S. (2020). OMGS: Optical Map-Based Genome Scaffolding. *J Comput Biol*. 27(4):519-533.

Peerbaye, A. (2004). La Construction de l'espace génomique en France : la place des dispositifs instrumentaux. *Sociologie. École normale supérieure de Cachan - ENS Cachan*.

Pellestor F., Quenesson I., Coignet L., Girardet A., Andréo B., Lefort G., Charlieu J.P. (1996). FISH and PRINS, a strategy for rapid chromosome screening: application to the assesement of aneuploidy in human sperm. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 72, 34-36.

Pereira R., Oliveira J., Sousa M. (2020). Bioinformatics and Computational Tools for Next-Generation Sequencing Analysis in Clinical Genetics. *J Clin Med*. 3;9(1):132.

Philippe, C. (1994). Cartographie physique du chromosome X humain : 1) contribution à la cartographie physique de la région q13-q22 du chromosome X humain, 2) analyse de deux cas de pathologies récessives liées à l'X chez des femmes porteuses de translocation (X ; Autosome) équilibrées. Médecine humaine et pathologie. Institut National Polytechnique de Lorraine, 1994. Français.

Poustka, A. (1995). Construction and Use of Chromosome Jumping Libraries, In *Selected Methods in Enzymology, Recombinant DNA Methodology II*, Academic Press, Pages 419-438.

Rajagopalan V., Doudna J.A. (2021). Advances in fluorescent in situ hybridization for genome mapping and diagnostics. *Nature reviews Genetics*.22(5) :314-327.

Rappold G.A., Cremer T., Hager H.D., Davies K.E., Muller C.R., Yang T. (1984). Sex chromosome positions in human interphase nuclei as studied by in situ hybridization with chromosome specific DNA probes. *Human Genetics*, 67, 317-325.

Rettenberger G., Fries R., Engel W., Scheit K.L.H., Dolf G., Hameister H. (1994). Establishment of a partially informative porcine somatic cell hybrid panel and assignment of the loci for transition protein 2 (TNP2) and protamine 1 (PRM1) to chromosome 3 and polyubiquitin (UBC) to chromosome 14. *Genomics*, 21, 558- 566.

Riquet J., Pitel F. (2000). Les techniques de base de la génétique moléculaire. *Productions Animales*, HS 2000, 29-35.

Robic A., Riquet J., Yerle M., Milan D., Lahbib-Mansais Y., DubutFontana C., Gellin J.(1996). Porcine genetic and cytogenetic maps integrated by mapping 100 microsatellites on somatic cell hybrid panel. *Mammalian Genome*, 7, 438-445.

Saidi-Mehtar N., Hors-Cayla M.C., Cog N.V. (1981). Sheep genome mapping by somatic cell hybridization: four syntenic groups: ENO1-PGD-, ME1-PGM3, LDHB-PEPB-TPI, and G6PD-PGKGALA. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 30, 193-204.

Sajer O., Schirmak U., Hamrit S., Horn R. (2020). Mapping of the New Fertility Restorer Gene *Rf-PET2* Close to *Rf1* on Linkage Group 13 in Sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Genes (Basel)*. 1;11(3):269.

Schibler, L. (1998). Cartographie intégrée et comparée du génome de la chèvre : application au clonage positionnel chez les ruminants : exemple du gène caprin d'intersexualité et d'absence de cornes (pis). Thèse de doctorat, Université Paris 11.

Schibler, L. Vaiman, D. Crihiu, E. (2000). Origine du polymorphisme de l'ADN. INRAE Productions Animales. 13. 37-43. 10.20870/productions-animales.2000.13.HS.3809.

Shakuntala I., Prince Milton AA., Das S., Ghatak S., Sanjukta R., Puro KU., Pegu RK., Doijad SP., Barbuddhe SB., Sen A. (2022). Pulsed-field gel electrophoresis fingerprinting of *Listeria monocytogenes* isolates recovered from foods of animal origin and fishes in North-Eastern India. Vet Res Forum. 13(1):133-139.

Sinnott, E. W. Dunn, L. C. Dobzhansky, T. (1962). Principles of Genetics 5th ed. McGraw-Hill.

Sloan Bena, F. (1998). Cartographie physique par hybridation in situ en fluorescence : Application à l'étude de remaniements du chromosome X associés à des pathologies. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy.

Stuart T., Satija R. (2023). Fluorescent labeling techniques in genomic hybridization and physical mapping. Nature Protocols. 18(1):112-129.

Tabet Aoul, K. (1999). Caractérisation régionale d'un panel d'hybrides somatiques hamster-mouton et contribution à la cartographie chromosomique du génome ovin. Thèse doctorat. Université François Rabelais, Tours.

Tanzi R.E., Romano D.M., Berger R., Buraczynska M.J., Gaston S.M., Kurnit D.M., Patterson D., Gusella J.F., Stewart G.D. (1992). Sequence-tagged sites (STSs) for a set of mapped markers on chromosome 21. Genomics. 14(2):498-502.

Terwilliger J.D. (1995). A powerful likelihood method for the analysis of linkage disequilibrium between trait loci and one or more polymorphic marker loci. American Journal of Human Genetics, 56, 777-87.

Trask B., Pinkel D., van den Engh G. (1989). The proximity of DNA sequences in interphase cell nuclei is correlated to genomic distance and permits ordering of cosmids spanning 250 kilobase pairs. Genomics, 5, 710-717.

Vaiman, D. (2000) Etablissement des cartes génétiques. Productions Animales, HS 2000, pp.73-78.

Vorsanova S.G., Yurov Y.B., Iourov I.Y. (2010). Human interphase chromosomes: a review of available molecular cytogenetic technologies. *Mol Cytogenet* 3, 1.

Weier HU., Greulich-Bode KM., Wu J., Duell T. (2009). Delineating Rearrangements in Single Yeast Artificial Chromosomes by Quantitative DNA Fiber Mapping. Open Genomics J. 9;2:15-23.

Winden E., Vasquez-Echeverri A., Calle-Castañeda S, Lian Y, Ortiz J.P.H., David C. Schwartz D.C. (2023). A database of restriction maps to expand the utility of bacterial artificial chromosomes, Gigabyte.

Xu T., Li H., Li S; et al (2022). high-throughput interphase fish for structural variation detection in clinical genetics. *Frontiers in genetics*. 13. 827395.

Yano CF., Sember A., Kretschmer R., Bertollo LAC., Ezaz T., Hatanaka T., Liehr T., Ráb P., Al-Rikabi A., Viana PF., Feldberg E., de Oliveira EA., Toma GA., de Bello Cioffi M. (2021). Against the mainstream: exceptional evolutionary stability of ZW sex chromosomes across the fish families Triportheidae and Gasteropelecidae (Teleostei: Characiformes). *Chromosome Res.* 29(3-4):391-416.

Yerle M., Pinton P., Robic A., Alfonso A., Palvadeau Y., Delcros C., Hawken R., Alexander L., Beattie C., Schook L., Milan D., Gellin J. (1998). Construction of a whole-genome radiation hybrid panel for high-resolution gene mapping in pigs. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 82, 182-188.

Yerle M. (2000). Établissement des cartes cytogénétiques et physiques. Dans INRA Prod. Anim., numéro hors série « Génétique moléculaire : principes et application aux populations animales » (pp. 87-93). INRA, Laboratoire de Génétique Cellulaire.

Zhang Z., Han H., Liu W., Song L., Zhang J., Zhou S., Yang X., Li X., Li L. (2019). Deletion mapping and verification of an enhanced-grain number per spike locus from the 6PL chromosome arm of *Agropyron cristatum* in common wheat. *Theor Appl Genet.* 132(10):2815-2827.

Zijlstra C., Bosma A.A., De Haan N.A., Mellink C. (1996). Construction of a cytogenetically characterized porcine somatic cell hybrid panel and its use as a mapping tool. *Mammalian Genome*, 7, 280-284.