

2 - Polymorphismes génétiques

Les marqueurs anonymes et la détection de leur polymorphisme

F. PITEL, J. RIQUET

INRA Laboratoire de Génétique Cellulaire, BP 27, 31326 Castanet-Tolosan cedex

e-mail : pitel@toulouse.inra.fr

Résumé. Les marqueurs génétiques les plus utilisés actuellement en génétique animale sont présentés, sans que soient développées dans le détail toutes les techniques mises en oeuvre. Nous distinguons les marqueurs utilisés avant la PCR (Polymerase Chain Reaction) et ceux qui sont employés depuis. Les marqueurs actuels sont également présentés en deux groupes : ceux qui sont utilisés pour une approche globale du génome et ceux que l'on emploie dans des approches ponctuelles, en distinguant la mise en évidence d'un polymorphisme et son exploitation à grande échelle. Nous évoquons enfin les SNP (Single Nucleotide Polymorphism), qui seront probablement des marqueurs très utilisés dans l'avenir grâce à la technologie des 'puces à ADN'.

Il existe d'autres types de marqueurs que les marqueurs moléculaires et d'autres manières de les localiser que la cartographie génétique. Nous ne nous intéresserons ici qu'aux marqueurs les plus utilisés en génétique moléculaire : les marqueurs génétiques existant sur l'ADN. Ce sont des fragments d'ADN, correspondant à des locus, pour lesquels il existe dans le génome d'une espèce plusieurs formes, plusieurs allèles : c'est le polymorphisme.

On peut les classer en deux grands types : les motifs répétés - pour lesquels le polymorphisme repose sur la variation entre allèles du nombre de répétitions d'une même séquence courte d'ADN - et les mutations ponctuelles (ou SNP : Single Nucleotide Polymorphism) - auxquelles on peut adjoindre les insertions/délétions - pour lesquelles le polymorphisme repose sur des changements de constitution de la séquence d'ADN (remplacement d'une base par une autre, insertion ou délétion d'un fragment de quelques paires de bases). Les sources de polymorphismes sont présentées en détail dans le texte de L. Schibler (2000, cet ouvrage).

En fonction du type d'analyse que l'on veut effectuer (détection d'un polymorphisme ponctuel, exploitation à grande échelle de ce polymorphisme, observation de l'ensemble du génome...), l'un ou l'autre type de marqueurs est utilisé. De plus, le même type de marqueur peut être analysé par différentes techniques, là encore suivant l'échelle du programme à mener à bien. Par abus de langage, on confond ainsi en général le marqueur étudié avec la technique utilisée pour le mettre en évidence : c'est le cas dans la suite de ce texte, qui est loin d'être exhaustif, mais présente les techniques d'analyse de polymorphisme qui nous semblent les plus importantes. Notons que certaines techniques ont plusieurs acronymes différents (notamment dans le domaine végétal), seuls les plus courants sont utili-

sés dans cet article. Des détails concernant ces différentes techniques sont disponibles dans les ouvrages répertoriés dans les références bibliographiques figurant à la fin de ce texte.

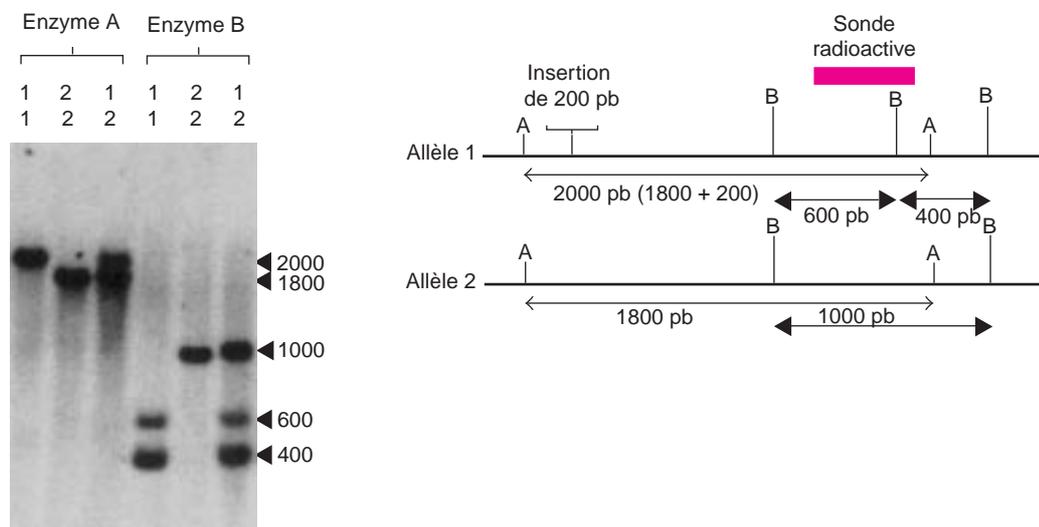
Les utilisations de ces marqueurs (élaboration des cartes génétiques, recherche de QTL, sélection assistée par marqueurs, contrôle de filiation, études de diversité génétique,...) sont présentées dans la suite de l'ouvrage.

1 / Les marqueurs les plus utilisés avant la PCR

Les deux types de marqueurs génétiques décrits dans ce paragraphe ont été très employés avant la mise au point de la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction). Ils ont été utilisés pour construire les premières cartes génétiques, mais ne sont maintenant employés que de manière occasionnelle, dans le cadre de programmes précis.

Tous deux reposent sur l'utilisation de la technique de Southern blot. L'ADN génomique est digéré, les fragments sont séparés en fonction de leur longueur par électrophorèse. Les fragments d'ADN sont ensuite dénaturés *in situ*, pour être transférés à l'état simple brin sur membrane. Ils sont alors mis en présence d'une sonde qui viendra s'hybrider avec les fragments d'ADN dont la séquence est en partie complémentaire de la sonde. Cette sonde est généralement radioactive, ce qui permet, après révélation autoradiographique, d'obtenir un profil de bandes spécifiques. Si la sonde utilisée est spécifique d'un locus unique (monolocus), on parlera de marqueur RFLP, si, en revanche, la sonde correspond à un motif répété, on révélera des marqueurs de type minisatellite.

Figure 1. Principe de mise en évidence de RFLP bi-allélique par la méthode de Southern blot : l'ADN génomique total des individus analysés est digéré par différentes enzymes (A et B) ; après migration sur gel d'agarose et transfert sur membrane, les produits de la digestion sont hybridés à l'aide d'une sonde radioactive correspondant au locus étudié. Tout fragment digéré homologue d'une partie de la sonde sera révélé sur l'autoradiographie. L'enzyme A permet de révéler un polymorphisme de type insertion, l'enzyme B correspond à un polymorphisme de type substitution, induisant la perte d'un site de reconnaissance de B dans l'allèle 2.

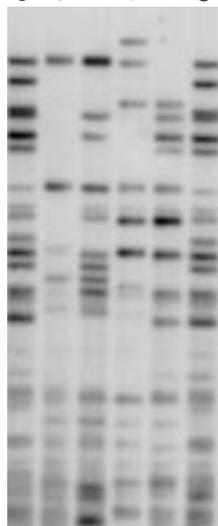


1.1 / RFLP

Les RFLP (pour Restriction Fragment Length Polymorphism) sont des marqueurs de type «mutation/insertion/délétion». Leur détection repose sur les différences éventuelles de longueur des fragments obtenus après digestion de l'ADN génomique par une enzyme de restriction (figure 1).

A l'aide d'une sonde monococus, le profil obtenu sera composé d'une ou quelques bandes, en fonction de la longueur de la sonde et du nombre de sites de restriction présents sur l'ADN génomique dans la région étudiée (au sein du fragment correspondant à la sonde, ou dans les séquences flanquantes). Toute insertion ou délétion entre deux sites enzymatiques engendre des différences de taille des fragments de restriction (sur la figure, profil généré par l'enzyme A), de même que toute mutation dans le site de coupure (profil généré par l'enzyme B).

Figure 2. ♂ ♀ F1 ♀ F1 ♂
Exemple d'empreinte génétique obtenue par hybridation de différents individus (un bélier croisé à deux femelles ayant chacune un petit) avec une sonde minisatellite.



On a ainsi, en général, des marqueurs monococus, bialléliques (présence ou absence du site de restriction), codominants.

1.2 / Minisatellites

Si la sonde est multilocus (sa séquence se retrouve en différents endroits du génome), le profil obtenu est composé d'un grand nombre de bandes. Les sondes utilisées dans ce cas sont des répétitions d'un motif d'une dizaine à une cinquantaine de bases. Ces séquences, appelées aussi VNTR (Variable Number of Tandem Repeats), sont présentes plusieurs fois dans le génome - bien que souvent réparties de manière non homogène - et sont très polymorphes, en raison de la variation du nombre de répétitions. Cependant, les polymorphismes de type minisatellite sont en général analysés de la même manière qu'un RFLP, et il est souvent impossible de déterminer dans le profil obtenu les bandes allèles. Leur gros avantage réside dans la détection simultanée d'un grand nombre de locus différents (figure 2).

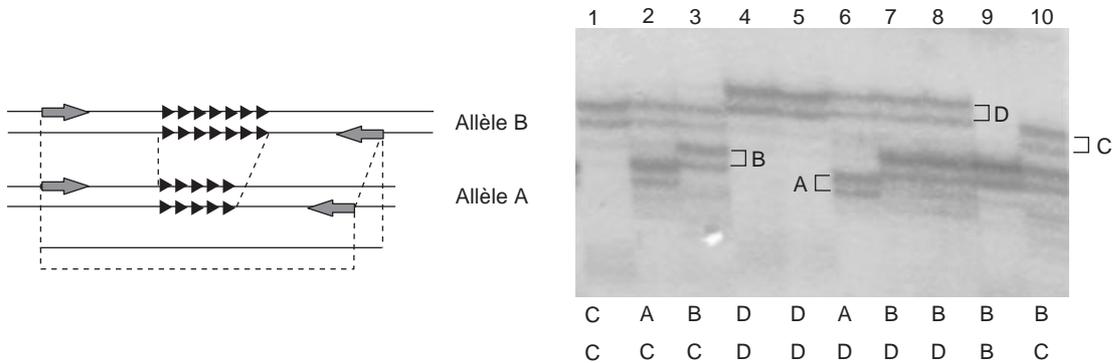
Ainsi, bien que les minisatellites soient plus polymorphes que les RFLP classiques grâce à leur nature répétée, la technique utilisée pour les analyser fait que ces marqueurs sont pour la plupart multilocus, bialléliques, dominants.

2 / Les marqueurs les plus utilisés après la PCR

A partir de 1987, la PCR a permis de s'affranchir, dans la plupart des cas, de l'utilisation des Southern blots, et a ouvert la porte à d'autres types d'analyses.

Le choix des techniques pour la détection et l'exploitation des polymorphismes dépend du type d'analyse du génome que l'on veut mettre en oeuvre : pour «cribler» le génome dans son ensemble -

Figure 3. Amplification par PCR d'un locus microsatellite. Les amorces spécifiques sont choisies de part et d'autre de la répétition et permettent l'amplification du motif répété. La taille du fragment amplifié dépend du nombre de répétitions du motif de base. Après migration sur gel de polyacrylamide, chaque allèle présente un profil double bande ; les pistes 1, 4, 5 et 9 correspondent à des individus homozygotes, les pistes 2, 3, 6, 7, 8 et 10 à des individus hétérozygotes.



recherche de QTL par exemple - on utilisera des marqueurs répartis tout au long des chromosomes ; pour s'intéresser à une région particulière du génome, on recherchera essentiellement des polymorphismes ponctuels localisés dans la zone d'intérêt.

2.1 / Approche globale

a / Microsatellites

Le polymorphisme de type VNTR à motif répété court (2 à 4 pb) a pu être analysé par PCR au moyen d'amorces choisies de part et d'autre de la répétition (figure 3).

Les microsatellites, monolocus, multialléliques et codominants, sont devenus les marqueurs de prédilection en génétique humaine et murine, puis pour la cartographie des génomes des animaux domestiques : très polymorphes, bien répartis sur le génome, d'analyse «facilement» automatisable, ils sont à l'origine de toutes les cartes génétiques mises en place et utilisées actuellement. Chaque couple d'amorces amplifiant un locus précis, ils entrent également dans les études plus restreintes de régions du génome impliquées dans des caractères particuliers.

Ces marqueurs sont évoqués tout au long de cet ouvrage, puisqu'ils interviennent dans la plupart des domaines de la génétique moléculaire animale, de l'établissement des cartes génétiques à la recherche de QTL ou à la caractérisation des ressources génétiques.

b / RAPD

Très utilisés pour construire des cartes génétiques chez les végétaux, les RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ont plutôt été employés chez les animaux pour des études de diversité.

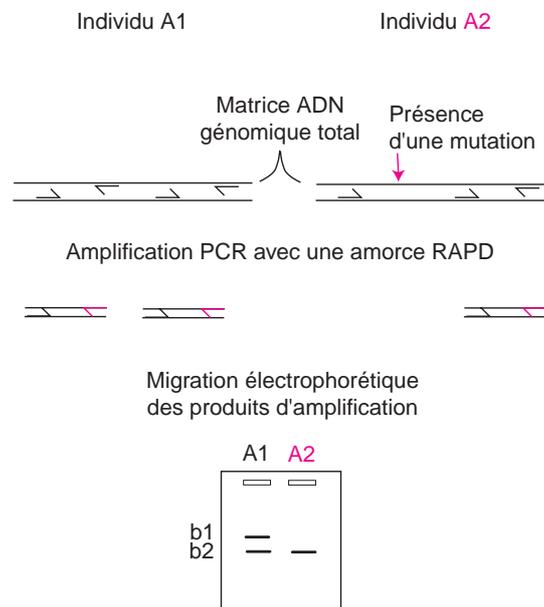
Leur principe repose sur l'utilisation pour une amplification PCR d'amorces d'une dizaine de bases, de séquence aléatoire et pouvant s'hybrider en plusieurs endroits du génome. En théorie, une séquence aléatoire de 10 bases est présente environ 3000 fois dans le génome des mammifères ($3.10^9/4^{10}$). Si l'amorce utilisée est complémentaire

de deux sites distants de moins de 1 kb et situés sur l'un et l'autre brin de l'ADN matrice, un fragment spécifique de ce locus sera amplifié. On obtient ainsi un profil multibandes (10 à 20 bandes) pour chaque individu. Le polymorphisme, qui peut être une mutation dans le site d'hybridation de l'amorce, une insertion ou une délétion, est visualisé par présence ou absence d'une même bande entre deux profils (figure 4).

Ce sont donc des marqueurs multilocus, bialléliques, dominants.

Les problèmes de reproductibilité des profils entre laboratoires (utilisation de conditions PCR non stringentes) ont défavorisé leur utilisation au profit des AFLP®, plus récents.

Figure 4. Représentation schématique d'un polymorphisme RAPD. Une amplification PCR est réalisée à partir d'une amorce de 10 bases sur de l'ADN génomique de deux individus. La présence d'une mutation en un des sites d'hybridation de l'amorce induit l'absence d'amplification d'une des bandes chez l'individu A2.



c / AFLP®

La technique AFLP® (pour Amplified Fragment Length Polymorphism, figure 5) permet de générer des marqueurs génétiques sans développement préalable. Son principe est basé sur la détection de bandes polymorphes entre individus dans un profil multi-bandes obtenu par digestion enzymatique puis amplifications PCR sélectives : après une digestion par deux enzymes de restriction, l'ADN génomique subit une ligation d'adaptateurs spécifiques, compatibles avec les extrémités générées par les digestions enzymatiques. Ces adaptateurs permettent ensuite l'hybridation d'amorces spécifiques (la séquence de l'amorce est complémentaire à celle de l'adaptateur, les conditions d'amplification sont spécifiques, la reproductibilité est donc bien supérieure à celle obtenue avec les RAPD) pour une série d'amplifications PCR sélectives : on ajoute 1 à 3 bases d'ancrage en plus de la séquence de l'adaptateur, qui vont ne permettre l'hybridation des amorces que sur un sous-ensemble des fragments d'ADN présents dans le mélange. On diminue ainsi la complexité du mélange de fragments, de manière à obtenir un profil constitué de plusieurs dizaines de bandes distinctes. Le mélange obtenu est, par exemple, analysé sur un gel de polyacrylamide sur séquenceur automatique, grâce au marquage d'une des deux amorces en fluorescence. La présence ou l'absence de certaines bandes entre individus met en évidence autant de loci polymorphes. On a donc des marqueurs multilocus, bialléliques, dominants ou codominants suivant la technique d'analyse utilisée.

Notons que l'utilisation de différentes enzymes de restriction, couplée à l'emploi de toutes les combinaisons d'amorces possibles, permet théoriquement d'obtenir une couverture du génome bien plus dense que les seuls marqueurs microsatellites.

Les marqueurs AFLP® sont bien adaptés à la réalisation de cartes génétiques d'espèces non encore cartographiées, en premier lieu en raison du gain de temps et d'argent qu'apporte leur utilisation, en comparaison des marqueurs microsatellites non encore développés.

d / Exploitation simultanée de plusieurs polymorphismes ponctuels

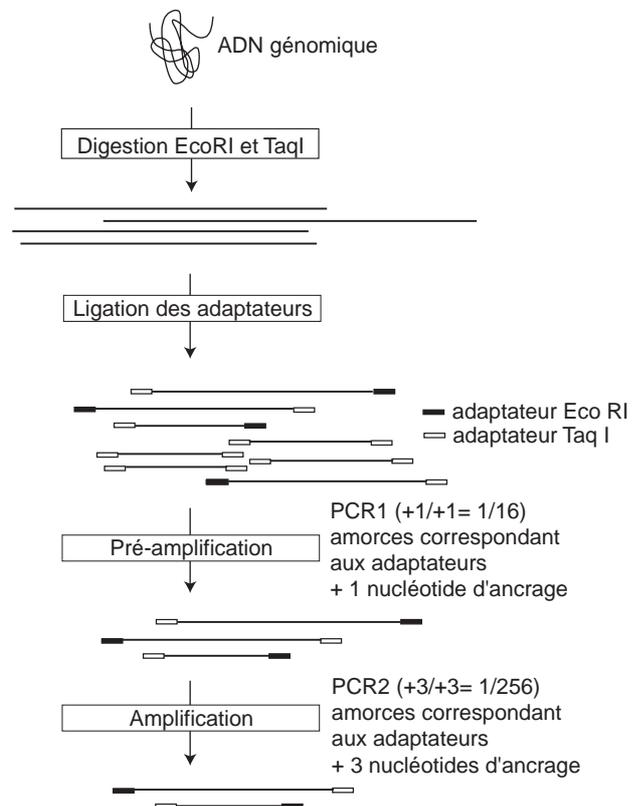
Même si les méthodes d'analyse «globale» du génome précédemment évoquées sont actuellement les plus courantes, rappelons ici qu'un criblage du génome, quels que soient le type de marqueur et la technique utilisés, repose sur l'identification de polymorphismes répartis sur l'ensemble des chromosomes. Ainsi, un réseau dense de polymorphismes ponctuels tels que ceux qui vont être évoqués ci-dessous peut être utilisé comme outil dans une approche «globale» du génome.

2.2 / Approche ponctuelle

L'approche ponctuelle correspond aux cas où l'on s'intéresse à un fragment de quelques dizaines à quelques centaines de paires de bases, pour lesquels

INRA Productions Animales, 2000, hors série Génétique moléculaire

Figure 5. Principe de la technique AFLP. L'ADN génomique d'un individu est digéré par deux enzymes de restriction, puis deux types d'adaptateurs sont fixés aux extrémités des fragments digérés. Deux amplifications PCR successives à partir d'amorces complémentaires des adaptateurs et ancrées sur une puis sur trois bases permettent alors d'obtenir un profil de bandes individualisées et interprétables.



on veut détecter un polymorphisme et mettre au point une méthode de typage à plus ou moins grande échelle. Les fragments d'ADN étudiés sont alors ciblés 'à l'échelle de la PCR'. Après amplification, plusieurs techniques de détection de polymorphisme sont disponibles, les plus courantes sont présentées ci-dessous.

a / Mise en évidence du polymorphisme

PCR-RFLP

La PCR a permis d'exploiter les marqueurs RFLP, dont il a été question précédemment, en utilisant une technique beaucoup moins lourde que le système «blot-hybridation» : on digère directement un fragment préalablement amplifié par PCR au lieu d'hybrider une sonde sur une membrane portant l'ADN génomique des individus à tester. Un polymorphisme sera mis en évidence dès qu'une mutation au sein du fragment amplifié induira l'apparition ou la disparition d'un site de restriction enzymatique. Insistons ici sur la différence d'échelle des quantités de matériel utilisé : alors qu'il faut 5 à 15 µg d'ADN au départ pour obtenir un blot exploitable, une réaction d'amplification nécessite 10 à 50 ng d'ADN. La PCR est donc plus économique, même en tenant compte du fait qu'un blot peut être suc-

cessivement hybridé avec différentes sondes. Elle est également plus rapide et moins lourde à mettre en œuvre.

Ces marqueurs restent monolocus, bialléliques, codominants.

Ce type de détection du polymorphisme n'est évidemment possible que dans les cas où la mutation ponctuelle correspond à la disparition du site de reconnaissance d'une enzyme de restriction à l'intérieur même du fragment étudié.

Si ces différences de séquences n'affectent aucun site de restriction enzymatique, d'autres méthodes peuvent permettre de mettre en évidence un polymorphisme.

SSCP

La technique de SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism, figure 6) repose sur le fait que la conformation tridimensionnelle d'une molécule d'ADN simple brin est fonction de sa séquence : deux allèles d'un même marqueur – avec une mutation ponctuelle par exemple – ne se comporteront pas de la même manière dans l'espace, à l'état simple brin. Ils auront donc des vitesses de migration différentes dans un gel d'électrophorèse respectant la conformation des molécules (absence d'agent dénaturant dans la composition du gel).

Cette technique de détection est très performante (plus de 80 % des mutations détectées) pour des

fragments de 180 à 200 pb ; son efficacité diminue pour des fragments plus grands. On aura donc le plus souvent des marqueurs bialléliques (le nombre d'allèles est limité par la présence de mutations ponctuelles au sein du fragment étudié, comme pour les PCR-RFLP, et par la puissance de la méthode de détection). Les SSCP sont également monolocus et codominants.

DGGE

Comme pour la SSCP, la méthode de DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) repose sur une migration électrophorétique dépendante de la séquence du fragment d'ADN obtenu par PCR. Cette fois, on exploite le fait que la température de fusion d'une molécule d'ADN double brin est fonction de sa séquence. En soumettant des fragments d'ADN de séquences différentes à un gradient de dénaturation croissant (créé par un gradient d'agent dénaturant (urée/formamide), ou par un gradient de température dans le cas de la TGGE, avec T pour Temperature), on observera des cinétiques de dénaturation différentes. La mobilité du fragment sera très fortement ralentie dès qu'il aura commencé à se dénaturer. Les profils de bandes obtenus après migration en gel de DGGE seront donc différents entre deux allèles (figure 7). On estime que cette technique permet de détecter jusqu'à 95 % du polymorphisme d'un fragment de 600 pb.

Comme pour la SSCP, on a ici des marqueurs bialléliques, monolocus, codominants.

Figure 6. Exemple de polymorphisme visualisé par SSCP. Après amplification PCR d'un fragment de 200 à 400 pb encadrant la mutation (allèle 1 : A-T, allèle 2 : G-T), les produits synthétisés sont dénaturés et soumis à un champ électrophorétique au travers d'un gel de polyacrylamide non dénaturant. Au cours de la migration, chaque brin se renature sur lui-même selon une structure propre à la séquence qui le compose. La présence de mutations dans la séquence amplifiée peut induire une différence de conformation de l'un ou des deux brins et donc une différence de mobilité au cours de la migration.

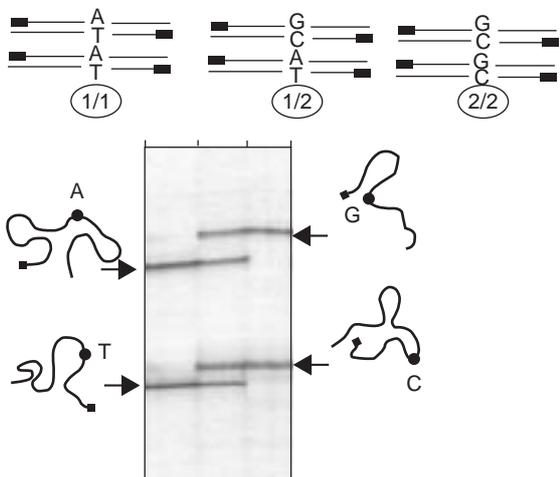
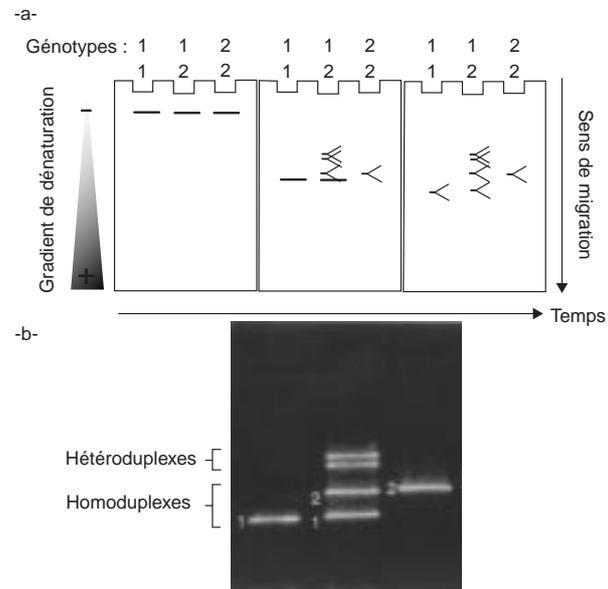


Figure 7. Au cours de la migration dans un gradient linéaire de dénaturation, le fragment d'ADN conservera sa structure double brin jusqu'à une concentration d'agents dénaturants équivalant à la température de fusion du domaine le moins stable du fragment. La dénaturation partielle du fragment induit un ralentissement de sa mobilité. Une différence dans la séquence d'une base pourra induire un comportement fusionnel différent, d'où une migration différente.

a - Comportement d'allèles différents d'un même locus dans un gel à gradient linéaire de dénaturation.
 b - Exemple de profils obtenus en fin de migration pour des individus de génotypes respectifs 1/1, 1/2 et 2/2.



Hétéroduplexes

Les bandes surnuméraires observées sur un gel de DGGE, dans le cas d'un individu hétérozygote, correspondent à l'appariement des brins complémentaires de deux allèles du même fragment, après dénaturation puis renaturation de l'ADN (brin A de l'allèle 1 apparié au brin B de l'allèle 2) : si la séquence diffère d'une base, les deux brins seront mésappariés en un site, et la boucle formée par ce mésappariement influencera la migration du double brin obtenu (figure 8).

Cette technique est parfois employée directement en gel d'électrophorèse pour repérer les individus hétérozygotes à un locus particulier. Un inconvénient de cette technique est que des fragments issus d'individus homozygotes pour des allèles différents migrent au même endroit. Pour distinguer les allèles, on doit alors mélanger le fragment issu de l'individu à tester avec des fragments correspondant à l'un ou l'autre des allèles connus ; la présence d'hétéroduplexes dans une des pistes indiquera quel était l'allèle possédé par l'individu en question (figure 8). Dans ce cas, on peut parler de marqueurs bi-alléliques, monocus, codominants.

Ce type de polymorphisme peut également être analysé après clivage des bases mésappariées par clivage chimique ou enzymatique (CFLP : Cleaved Fragment Length Polymorphism). Des hétéroduplexes peuvent également être réalisés par hybridation ADN-ARN ; outre le clivage chimique, les mésappariements peuvent être révélés par digestion des portions simples brins du complexe par la RNase A.

Séquençage

La manière la plus évidente de détecter du polymorphisme dans des fragments d'ADN est encore de regarder directement leur séquence. Mais, malgré l'utilisation de séquenceurs 'automatiques', cette méthode reste longue et coûteuse à mettre en place pour la recherche de polymorphisme génétique, et on lui préfère en général, pour l'établissement des cartes, l'utilisation des techniques plus rapides.

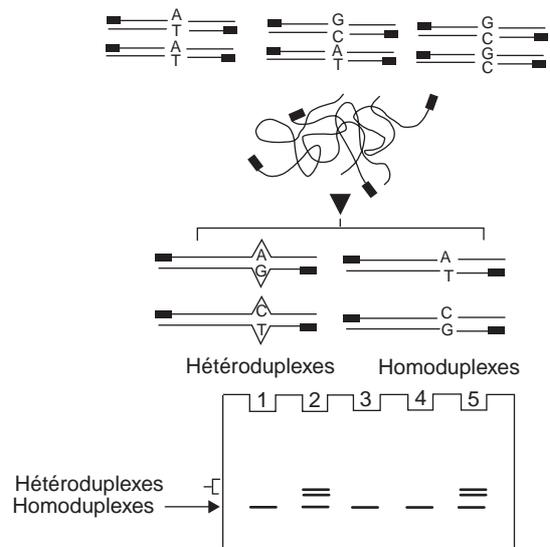
Insistons tout de même sur le fait que cette technique, contrairement à la plupart de celles qui sont présentées ici, permet théoriquement de détecter 100 % du polymorphisme d'un fragment. Elle est de plus en plus utilisée, notamment dans les programmes d'étude de biodiversité reposant sur les SNP.

b / Exploitation du polymorphisme

La mise en évidence de polymorphisme n'est pas une fin en soi et, en général, il faut ensuite déterminer le génotype d'un grand nombre d'individus pour le marqueur. Il a donc fallu mettre au point des techniques spécifiques pour effectuer le plus grand nombre de tests possible en simultané. Dans les techniques suivantes, la connaissance de la mutation est nécessaire ; elles sont le plus souvent limitées à l'exploitation de polymorphismes observés dans des séquences codantes et ne seront pas présentées en détail.

Figure 8. Si les produits PCR obtenus pour un locus à partir d'un individu hétérozygote sont dénaturés puis renaturés lentement, outre les doubles brins correspondant à chacun des deux allèles, il se forme des hétéroduplexes (fragments doubles brins hybrides des deux allèles). Les mésappariements existant dans les formes hétéroduplexes modifient la conformation structurelle des molécules doubles brins et entraînent, au cours de la migration, des mobilités différentes de celles des homo-duplexes.

Exemple de profils obtenus : 1 = homozygote A/T, 2 = hétérozygote A/T-C/G, 3 = homozygote C/G, les pistes 4 et 5 correspondent aux profils des mélanges nécessaires à l'identification de l'allèle d'un individu homozygote A/T (4 = + allèle A/T, 5 = + allèle C/G).



ASO Dot-Blot

L'ASO Dot-Blot (ASO pour Allele Specific Oligonucleotide) permet de déterminer les allèles portés par un individu à un locus particulier grâce à l'hybridation de sondes spécifiques d'allèle (ASO) sur de l'ADN préalablement fixé sur membrane (blot) sous forme de points (dot). Le principe de cette technique de génotypage est présenté dans la figure 9.

AS-PCR

Le principe de l'AS-PCR (AS pour Allele Specific) est basé sur la discrimination des deux allèles au cours d'une réaction PCR. Chaque allèle sera défini par une amorce de séquence spécifique de la base mutée. Le principe est exposé dans la figure 10.

OLA

La technique de OLA (Oligonucleotide Ligation Assay) repose, comme la technique précédente, sur l'utilisation d'oligonucléotides allèle-spécifiques de séquence identique à l'exception d'une base en 3'. Comme dans l'AS-PCR, chaque oligonucléotide allèle-spécifique est marqué par un fluorophore différent. Dans cette technique une troisième amorce est choisie sur le même brin que les précédentes, juste en aval de la mutation. Dans ces conditions, l'hybridation des amorces sur l'ADN cible n'est pas le préalable à une amplification PCR, mais à une ligation (figure 11).

Figure 9. Analyse d'un marqueur biallélique par ASO-dot blot.

1 / Une amplification PCR permet de cibler et de générer une quantité importante d'ADN du locus contenant la mutation (paire de bases A-T : allèle 1, G-C : allèle 2).
 2 / Des sondes oligonucléotidiques spécifiques de chacun des deux allèles sont choisies (les séquences de ces sondes d'une vingtaine de paire de bases sont identiques à l'exception de la base mutée).
 3 / Les produits d'amplification PCR sont dénaturés, déposés sous forme de spots sur une membrane et hybridés avec l'un ou l'autre des oligonucléotides. La présence d'un mésappariement entre la sonde et les produits PCR ne permet pas une hybridation stable.
 4 / Après lavage de la membrane, les signaux obtenus correspondent aux hybridations spécifiques. La combinaison des résultats d'hybridation obtenus avec chacun des oligonucléotides (spécifiques de chacun des allèles) permet la déduction des génotypes des individus.

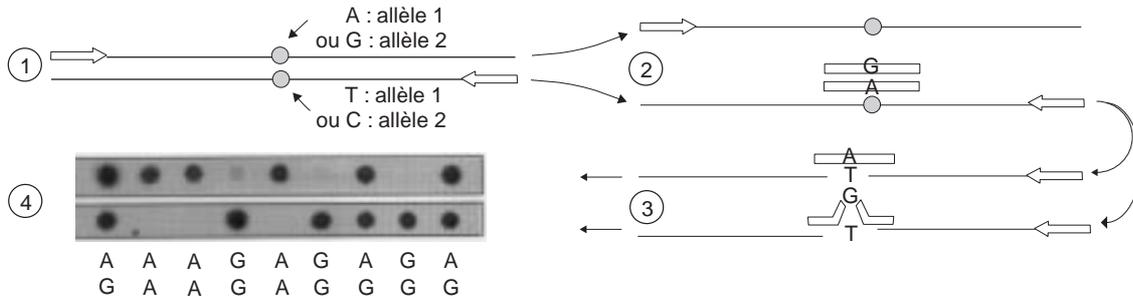


Figure 10. Principe de la technique AS-PCR. Deux amorces de même séquence excepté la base en 3' sont choisies sur un des brins. La première amorce définit l'allèle 1 (base A en 3' de l'oligonucléotide), la seconde l'allèle 2 (base G en 3'). Chacune de ces amorces peut en outre être marquée en 5' par un fluorophore différent. Sur l'autre brin, une amorce compatible pour une amplification PCR est également définie. Une amplification PCR n'est alors possible que lorsque la complémentarité en 3' entre les amorces et l'ADN cible est parfaite. Le marquage fluorescent du produit d'amplification obtenu permet de déduire le génotype de l'individu.

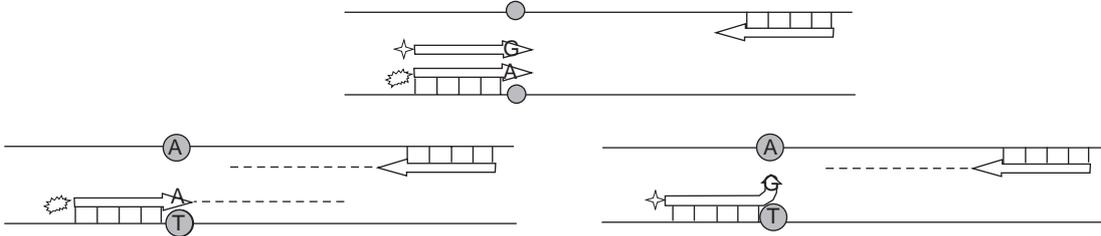
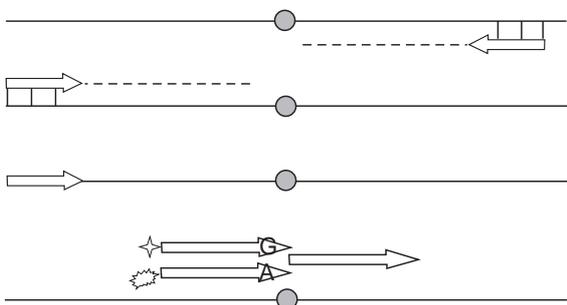


Figure 11. Principe de la OLA. Après dénaturation des produits d'amplification PCR contenant la mutation à analyser, les amorces spécifiques de chacun des deux allèles et l'amorce commune aux deux allèles sont hybridées sur le bras d'ADN dont elles sont complémentaires. L'action d'une ligase permet de fixer bout à bout les amorces positionnées en amont et en aval de la mutation ... si la complémentarité de l'amorce spécifique est totale. L'analyse de la taille des fragments après ligation est réalisée à l'aide d'un séquenceur automatique.



TaqMan®

Cette technique met à nouveau en jeu des oligonucléotides allèle-spécifiques marqués de différentes couleurs en fonction de l'allèle porté (voir figure 12). Le TaqMan® est à l'origine une technique de quantification d'un produit PCR en temps réel au cours d'une réaction d'amplification. Pour du génotypage, la couleur et l'intensité de fluorescence émise permettent de déterminer le génotype de l'individu sans équivoque. Cette technique est coûteuse mais devient rentable à partir d'un très grand nombre d'échantillons à génotyper.

Les puces à ADN

Plus qu'une technique, les puces à ADN sont surtout un nouvel outil permettant l'analyse de SNP. La technique utilisée est en fait une ASO inverse. Les oligonucléotides spécifiques d'allèle sont fixés sur un microsupport et hybridés avec le produit d'amplification du locus à génotyper. L'avantage énorme de cette technique est le nombre de locus analysés simultanément. Un exemple de SNP analysé à l'aide d'une puce à ADN est présenté à la figure 13.

Figure 12. Deux amorces de séquence identique mais spécifiques d'allèles (la base mutée est positionnée au milieu de l'oligonucléotide) sont définies. Chacune de ces amorces est marquée en 5' à l'aide d'un fluorophore et porte en 3' une molécule ('Quencher') qui réprime l'émission de fluorescence par le fluorophore lorsque l'oligonucléotide n'est pas fragmenté. Ces oligonucléotides sont hybridés à l'ADN génomique total de l'individu à génotyper et on effectue une amplification grâce à des amorces situées de part et d'autre de la mutation. Si l'oligonucléotide hybridé sur la mutation correspond à l'allèle porté par le fragment, la polymérisation du brin complémentaire au cours de la PCR va 'dégrader' l'oligonucléotide marqué qui va alors émettre de la fluorescence. Si, au contraire, il y a mésappariement de l'oligonucléotide spécifique d'allèle, il ne sera pas altéré par la polymérase et il n'y aura pas d'émission de fluorescence.

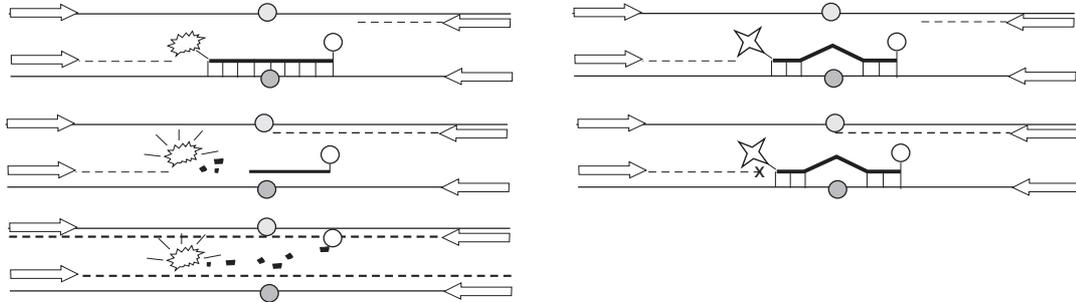
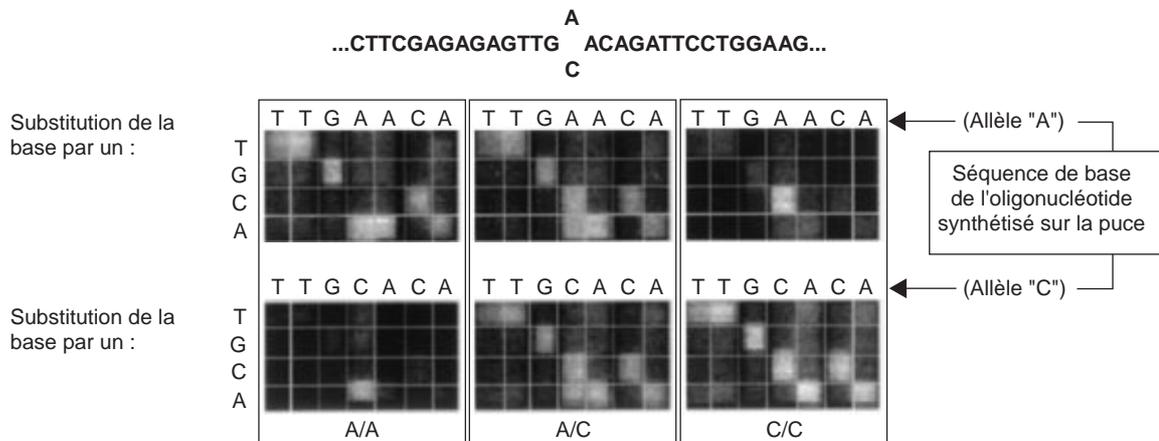


Figure 13. Exemple de résultats obtenus sur puces à ADN pour l'analyse d'un polymorphisme ponctuel. La séquence présentée correspond aux deux formes alléliques du locus étudié. Les 'grilles' présentent les signaux d'hybridation obtenus pour des individus de génotypes A/A, A/C et C/C ; les trois premières puces correspondent à la séquence de base de l'allèle A, la seconde série de trois puces à l'allèle C.

Le produit PCR d'un individu A/A sera complémentaire du motif de base de la première série et sera mésapparié sur la seconde (la base A de l'allèle ne correspond pas à la base C de l'oligonucléotide). Sur la première puce, un signal d'hybridation sera obtenu en chaque position pour la base correspondant à la séquence du locus, sur la seconde puce, seul un signal sera obtenu dans la case correspondant à une complémentarité parfaite entre le produit PCR et l'oligonucléotide fixé sur la puce. Dans le cas d'un individu homozygote C/C, un seul signal sera obtenu sur la première puce, l'allèle amplifié étant complémentaire cette fois-ci de l'oligonucléotide fixé sur la seconde puce. Pour un individu hétérozygote, des signaux d'intensités équivalentes seront observables sur les deux puces.



Conclusion et perspectives

Les méthodes de détection du polymorphisme évoluent avec les nouveaux outils qui apparaissent régulièrement en biologie moléculaire. Lors du séminaire du Département de Génétique Animale de l'INRA qui avait eu lieu à La Plagne en 1988, seuls les marqueurs de l'ère 'avant-PCR' avaient été présentés. Le texte ci-dessus insiste sur les techniques utilisées actuellement, 'l'après-PCR', mais nous pensons être à nouveau à une époque charnière de la biologie moléculaire. Les marqueurs utilisés dans les approches globales du génome ont en effet des limites : les séquences répétées, malgré toutes leurs qualités, sont en nombre limité dans le génome (un microsatellite $(CA)_n$ toutes les 25 à 100 kb chez les mammifères (Schibler 2000, cet ouvrage), toutes les 100 à 300 kb chez les oiseaux) ; même si les marqueurs AFLP® ou RAPD permettent théoriquement

de cribler une plus grande partie du génome, ils demeurent multilocus, souvent dominants et d'utilisation plus lourde que les microsatellites.

La plus grande source de polymorphisme étant les SNP (environ 100 fois plus nombreux que les $(CA)_n$ chez les mammifères), ils deviennent les marqueurs «idéaux» si nous disposons de techniques susceptibles de permettre leur analyse à grande échelle, c'est-à-dire en simultané. Il semble que ceci soit envisageable grâce à l'utilisation des 'puces à ADN'. Nous sommes encore loin de connaître la séquence du génome entier de nos espèces favorites, même si cet objectif est de moins en moins illusoire. Malgré tout, le nombre de SNP disponibles augmente très rapidement, et nous disposerons probablement, dans la décennie à venir, de puces permettant de cribler en une fois plus de locus que nous n'en avons jamais observés.

Références

Kaplan J.C., Delpech M., 1994. Biologie moléculaire et médecine (2e ed.). Flammarion Médecines-sciences, Paris.

Schibler L., Vaiman D., Cribiu E.P., 2000. Origine du polymorphisme de l'ADN. INRA Productions Animales, numéro hors

série « Génétique moléculaire : principes et application aux populations animales », 37-43.

Strachan T., Read A.P., 1998. Génétique moléculaire humaine. Flammarion Médecines-sciences, Paris.