

3 - Cartographie des génomes

M. YERLE

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

e-mail : Martine.Yerle@toulouse.inra.fr

Etablissement des cartes cytogénétiques et physiques

Résumé. Les cartes géniques des espèces domestiques sont restées très rudimentaires, voire inexistantes, jusqu'au début des années 1990. La situation a évolué à cette période avec la mise en place de vastes programmes de cartographie du génome, aussi bien au plan national (programmes de cartographie de l'INRA, programmes Génome Français) qu'europpéen (programmes Bridge) pour quelques espèces majeures dont les espèces bovine et porcine. Il est en effet apparu clairement que la connaissance du génome, indispensable pour l'isolement et le clonage des gènes d'intérêt agronomique, passait par la construction des cartes génétique (mise en place d'un réseau de marqueurs polymorphes par analyse de liaison sur des familles de référence) et cytogénétique (localisation de marqueurs et de gènes sur les chromosomes). Les principales méthodes mises au point pour établir, dans un premier temps, la carte cytogénétique puis, dans un deuxième temps, la carte physique à haute résolution sont présentées.

D'une manière générale, la cartographie génique vise à localiser les principaux gènes impliqués dans le déterminisme de caractères jugés importants. Mais les applications sont différentes selon l'espèce étudiée. Chez l'Homme, cette localisation a essentiellement un but médical : il s'agit d'identifier les gènes responsables des maladies génétiques pour mieux comprendre leur étiologie, mettre au point des méthodes de diagnostic, soigner les individus atteints ou prévenir la survenue de la maladie. Chez les animaux domestiques, la cartographie s'intéresse aux gènes intervenant dans les caractères d'intérêt zootechnique (croissance, résistance aux maladies, production de lait, de viande, de laine...) avec des applications en sélection.

La cartographie génique consiste à repérer l'emplacement des gènes ou des marqueurs génétiques, soit les uns par rapport aux autres par analyse de liaison : on construit alors la carte génétique, soit par rapport au support physique que constituent les chromosomes : on développe dans ce cas la carte cytogénétique. Il est bien sûr indispensable d'établir des jonctions entre ces deux types de carte. La localisation cytogénétique de marqueurs génétiques permet en effet d'estimer la couverture des chromosomes par la carte génétique et d'orienter les groupes de liaison sur les chromosomes.

Selon la méthode utilisée pour localiser un gène ou un marqueur, on peut construire deux types de cartes de résolution différente (figure 1) :

- la carte cytogénétique ou chromosomique, la localisation des marqueurs étant réalisée sur chromosomes. La résolution est, dans ce cas, de l'ordre de 5 à 10 mégabases (environ une bande cytogénétique). Cette résolution peut être améliorée si on réalise l'hybridation sur des chromosomes plus éti-

rés, obtenus à un stade plus précoce de la mitose (en général la prophase) ;

- la carte physique à haute résolution, qui consiste à ordonner des gènes ou marqueurs très proches (distants de quelques kilobases) pour reconstituer la carte à l'échelle de la séquence d'ADN. La localisation des marqueurs est effectuée sur l'ADN décondensé.

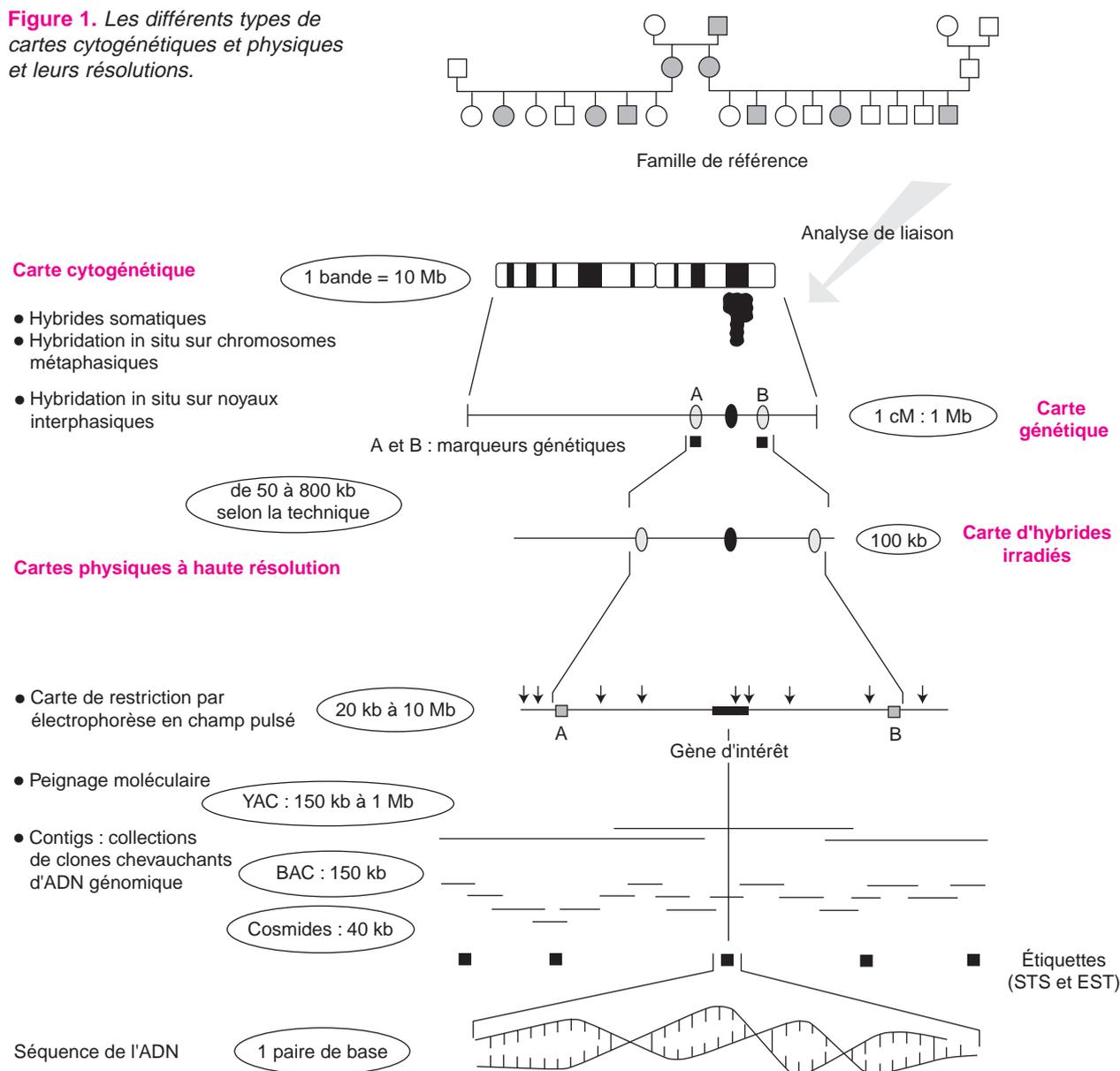
1 / Etablissement de la carte cytogénétique

Deux méthodes principales sont utilisées pour construire la carte cytogénétique : l'utilisation d'hybrides somatiques interspécifiques et l'hybridation in situ sur chromosomes.

1.1 / Les hybrides somatiques interspécifiques

L'utilisation des hybrides cellulaires a été pendant longtemps la technique la plus productive pour développer la carte cytogénétique. Les hybrides de cellules somatiques ont en effet été développés dans les années 1960, après la mise en évidence de phénomènes de fusion cellulaire spontanée. Ils permettent l'assignation de gènes à des chromosomes spécifiques et l'établissement de groupes de synténie, c'est-à-dire de groupes de gènes qui sont portés par le même chromosome sans être forcément génétiquement liés. Ils sont obtenus après fusion de cellules primaires de l'espèce étudiée avec des cel-

Figure 1. Les différents types de cartes cytogénétiques et physiques et leurs résolutions.

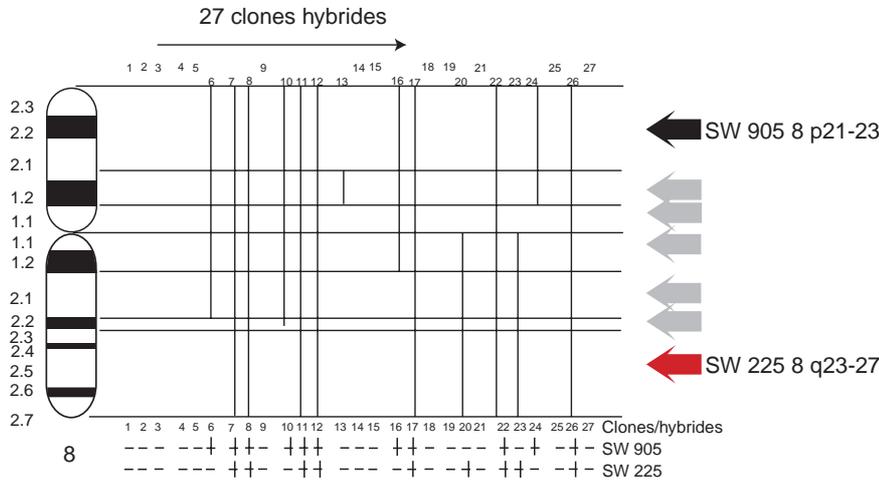


lules d'une lignée établie (de rongeur en général : souris ou hamster). La culture en milieu sélectif après fusion permet d'isoler des clones indépendants qui, au cours de leur prolifération, perdent aléatoirement des chromosomes de la lignée primaire, alors que les chromosomes de la lignée établie sont conservés. On génère ainsi une collection (dénommée «panel») de cellules hybrides contenant chacune une combinaison différente de chromosomes de la lignée primaire. L'analyse détaillée du contenu de chaque hybride permet d'identifier tous les chromosomes ou fragments chromosomiques retenus. Lorsque cette caractérisation est réalisée pour l'ensemble des hybrides constituant le panel, ce dernier peut être utilisé pour localiser un gène ou un marqueur sur une bande chromosomique. Les hybrides sont soumis à des tests d'amplification par PCR avec des amorces spécifiques du marqueur à localiser. On procède ensuite à une analyse visant à établir une corrélation entre le comportement positif ou négatif des hybrides vis-à-vis de ces tests et la présence ou l'absence d'un fragment chromosomique (figure 2).

Chez l'Homme, des panels d'hybrides couvrant l'ensemble du génome (Nguyen *et al* 1986) ou con-

tenant un seul chromosome (Cowell et Mitchell 1989) ont été construits. Pour les espèces d'élevage, trois panels ont été fabriqués pour l'étude du génome porcine (Rettenberger *et al* 1994, Yerle *et al* 1996, Zijlstra *et al* 1996). L'un d'entre eux a été caractérisé et permet d'obtenir des localisations régionales (Robic *et al* 1996, Yerle *et al* 1996). Il a été distribué dans une trentaine de laboratoires en Europe et aux Etats-Unis et a permis jusqu'à présent de localiser régionalement environ 400 marqueurs sur le génome porcine. Un programme informatique accessible sur Internet a été développé (Chevalet *et al* 1997) ; il permet l'analyse statistique des résultats expérimentaux obtenus sur ces hybrides. Dans le cas des bovins, trois panels ont également été produits (Womack et Moll 1986, Arruga *et al* 1992, Guérin *et al* 1994), mais ils n'ont pu être caractérisés de façon détaillée. Ils sont donc utilisés pour établir des groupes de synténie et assigner des marqueurs à un chromosome donné, mais ne permettent pas d'obtenir une localisation régionale. Chez le mouton, la situation est identique à celle des bovins : 350 marqueurs ont été assignés à un chromosome porteur grâce à l'un des deux panels produits (Saidi-Mehtar *et al* 1981, Burkin *et al* 1998).

Figure 2. Localisation régionale des microsatellites SW905 et SW225 sur le chromosome 8 du porc en utilisant un panel d'hybrides somatiques (Yerle et al 1996). La présence du chromosome 8 ou d'un fragment de ce chromosome dans les 27 hybrides est représentée par des traits noirs. La PCR est réalisée sur l'ADN des 27 clones hybrides en utilisant les amorces spécifiques des 2 microsatellites. Le signe + indique qu'un produit d'amplification a été obtenu. La corrélation entre la présence d'un produit d'amplification et celle d'un fragment chromosomique permet de localiser le marqueur dans une région chromosomique (flèches).



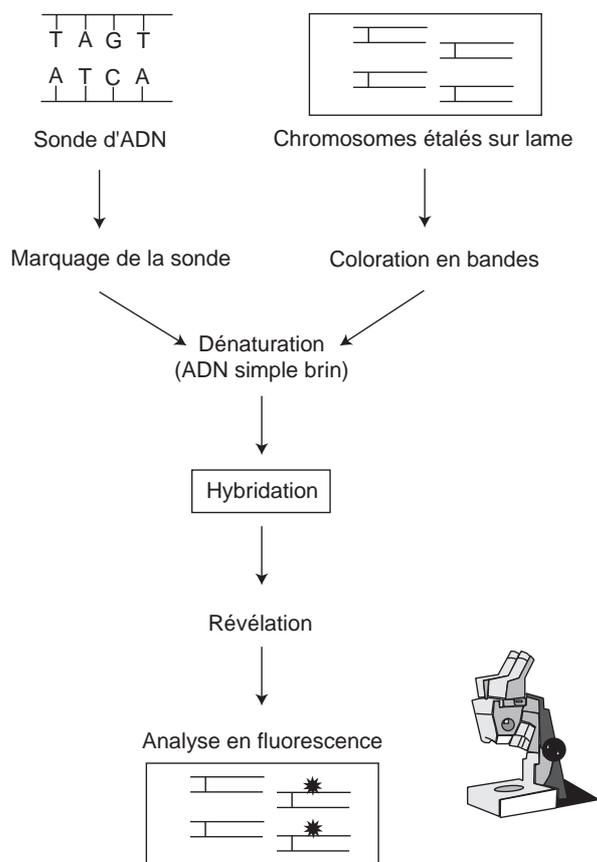
Cette technique présente de nombreux avantages : elle est simple et rapide et tous les types de marqueurs peuvent être localisés : polymorphes ou non polymorphes, de taille variable incluant ceux de petite taille. Cependant, l'inconvénient majeur est qu'elle ne permet pas d'ordonner les marqueurs avec précision. La résolution est dépendante de la taille des fragments chromosomiques retenus dans les cellules hybrides. Par ailleurs, l'analyse du contenu chromosomique des hybrides est souvent extrêmement complexe du fait des remaniements chromosomiques intraspécifiques ainsi qu'interspécifiques qui se produisent dans ces clones. Mais elle reste indispensable si l'on souhaite utiliser les hybrides pour réaliser des études de cartographie régionale. Sans cette analyse, ils ne permettent que l'établissement de groupes de synténie.

1.2 / L'hybridation moléculaire *in situ*

a / Sur chromosomes métaphasiques

L'hybridation moléculaire *in situ* sur métaphases permet de visualiser directement la position d'un gène ou d'un marqueur génétique sur un chromosome. Elle consiste à réaliser l'association (ou l'hybridation) de deux brins d'ADN de séquences totalement ou partiellement complémentaires, l'un étant la cible (le chromosome) et l'autre la sonde (séquence à localiser) (figure 3). Les conditions d'hybridation sont primordiales : si elles sont optimales, seules les séquences totalement complémentaires peuvent se réassocier et la sonde ne se fixe que sur la ou les séquences cibles. Mais, dès que l'on s'écarte de ces conditions, des mésappariements sont possibles et la sonde est susceptible de se fixer sur toute séquence présentant un degré d'homologie avec la séquence cible. Les chromosomes sont obtenus à partir de cultures de cellules primaires ou de lymphocytes arrêtés au stade de la métaphase. Ils sont étalés et fixés sur lame de microscope. Ils subissent ensuite différents traitements cytolo-

giques qui font apparaître des bandes (bandes G ou R) permettant l'identification univoque des chromosomes. La sonde est préalablement marquée afin de détecter les sites d'hybridation. Lors de la mise au point de la technique (Gall et Pardue 1969), le marquage était réalisé par incorporation de nucléotides radioactifs et détection par autoradiographie (présence de grains d'argent à l'endroit où la sonde s'est hybridée). Malgré sa grande sensibilité permettant la détection de sondes de petite taille (600 paires de bases) présentes dans le génome sous forme de copie unique, ce type de marquage des sondes est peu utilisé aujourd'hui car la présence de nombreux signaux non spécifiques impose une analyse statistique de la distribution des grains d'argent sur l'ensemble du génome. De plus, la résolution est souvent limitée (plusieurs bandes cytogénétiques) du fait du rayon d'émission de l'isotope radioactif. Le marquage froid est maintenant largement utilisé : il s'agit d'incorporer un nucléotide lié à un haptène (en général biotine ou digoxigénine) qui est ensuite repéré grâce à une molécule ayant une forte affinité pour cet haptène et elle-même liée à un fluorochrome. Un microscope à fluorescence équipé d'une caméra est utilisé pour détecter les signaux d'hybridation. Cette technique est dénommée FISH pour «fluorescence *in situ* hybridisation». Si la précision est augmentée (localisation sur une bande cytogénétique), la sensibilité est diminuée par rapport à la radioactivité. Seules les sondes de plus de 2000 paires de bases peuvent être facilement localisées par FISH. Cette technique s'est donc largement développée grâce à la mise au point des vecteurs permettant l'insertion de grands fragments d'ADN : d'abord les cosmides puis les YAC (Yeast Artificial Chromosome) et les BAC (Bacterial Artificial Chromosome) contenant des fragments d'ADN de 50 kb (kilobases), 1 Mb (Mégabase) et 150 kb respectivement. L'un des grands avantages de la FISH est qu'elle permet de localiser simultanément plusieurs sondes par l'utilisation combinée de différents fluorochromes et donc d'ordonner des gènes ou marqueurs dans une région.

Figure 3. Les différentes étapes de la FISH.

b / Sur noyaux interphasiques

La technique de FISH ne s'applique pas qu'aux chromosomes métaphasiques ou prométaphasiques (stade plus précoce de la mitose où les chromosomes sont plus étirés), mais aussi aux fibres d'ADN, qu'elles soient enfermées dans les noyaux en interphase (voir revue de Herrington 1994) ou extraites de ces noyaux et artificiellement décondensées (fiber FISH ou peignage moléculaire, détaillé plus loin). Ce qui est recherché n'est plus seulement la localisation, mais aussi la détermination d'un ordre le plus précis possible pour les séquences étudiées. La résolution est la distance minimale exprimée en paires de bases, qui doit séparer deux séquences le long de la fibre d'ADN pour qu'elles puissent être discriminées et ordonnées. Cette résolution dépend du degré de condensation de la fibre d'ADN. La cartographie sur chromosomes métaphasiques, dans lesquels la chromatine est très condensée, atteint une résolution de l'ordre de 5 à 10 Mb. Si la FISH est réalisée sur noyaux interphasiques dans lesquels la chromatine est environ 20 fois moins condensée, des sondes distantes de 50 à 1000 kb peuvent être ordonnées. Cependant la cartographie sur noyaux interphasiques reste très délicate. Les noyaux doivent être bloqués au stade G1 du cycle cellulaire, et une analyse statistique doit être réalisée sur au moins une centaine de noyaux. De plus, les signaux d'hybridation des différentes sondes sont souvent dans un plan différent, rendant l'analyse délicate et nécessitant souvent l'utilisation d'un microscope confocal.

1.3 / La PCR (Polymerase Chain Reaction) *in situ*

La FISH est une très bonne méthode de localisation de séquences répétées (présentes sous forme de nombreuses copies dans le génome) ou uniques, mais elle ne permet pas la détection de séquences de petite taille comme indiqué précédemment. C'est pour tenter de pallier cet inconvénient que plusieurs techniques basées sur l'utilisation de la PCR directement sur chromosomes ont été développées. Elles consistent à hybrider des amorces spécifiques d'un gène, d'un marqueur génétique ou d'une séquence répétée directement sur l'ADN de chromosomes métaphasiques étalés sur lame puis de procéder, en présence d'un nucléotide couplé à un haptène ou directement à un fluorochrome, soit à une élongation, soit à une série de cycles PCR. La première de ces techniques dénommée PRINS (Primed IN Situ labelling ; Koch *et al* 1989) est une méthode rapide et efficace qui permet la détection des séquences répétées en procédant seulement à une élongation. Elle est très utilisée en génétique humaine pour la détection des séquences d'ADN satellite α , spécifiques des centromères (diagnostic prénatal : détection des aneuploïdies) (Pellestor *et al* 1996).

Chez le porc, la PRINS a été utilisée pour déterminer le nombre et la taille des fragments de chromosomes porcins retenus dans les hybrides somatiques (Yerle *et al* 1998) grâce à l'utilisation d'amorces permettant l'amplification sélective de l'ADN porcine (amorces spécifiques des séquences répétées SINE). Des amorces spécifiques des séquences satellites α centromériques ont également été mises au point pour l'amplification sélective des centromères de deux groupes de chromosomes (Rogel-Gaillard *et al* 1997).

La PRINS ne permettant pas la détection de séquences présentes sous forme de copie unique dans le génome, la DISC-PCR (Direct Single Copy - PCR) basée sur la réalisation d'une 'vraie' PCR avec plusieurs cycles d'amplification a été développée par Troyer *et al* (1994). Mais cette méthode, après des premiers résultats très prometteurs, s'est révélée peu fiable (faible nombre de mitoses présentant un signal spécifique, faible reproductibilité des résultats).

2 / Etablissement de la carte physique à haute résolution

Comme nous l'avons vu précédemment, la carte cytogénétique permet de positionner un réseau de gènes et de marqueurs génétiques sur les chromosomes. Ce réseau ainsi que celui constitué par la carte génétique sont indispensables pour l'isolement ultérieur des gènes d'intérêt zootechnique. Cependant, la résolution de cette carte est de l'ordre d'une bande cytogénétique, soit quelques mégabases (1 à 10 selon la technique utilisée). Or, pour atteindre le but ultime de nos projets de cartographie (clonage de gènes d'intérêt zootechnique), une résolution supérieure est nécessaire, jusqu'à atteindre celle de la séquence d'ADN. Différentes technologies complémentaires sont développées actuellement pour établir la carte physique à haute résolution. La première étape a consisté à construire des hybrides d'irradiation qui ont permis d'augmenter la résolution de la carte cytogénétique et de la carte génétique d'au moins un facteur 10.

2.1 / Les hybrides d'irradiation

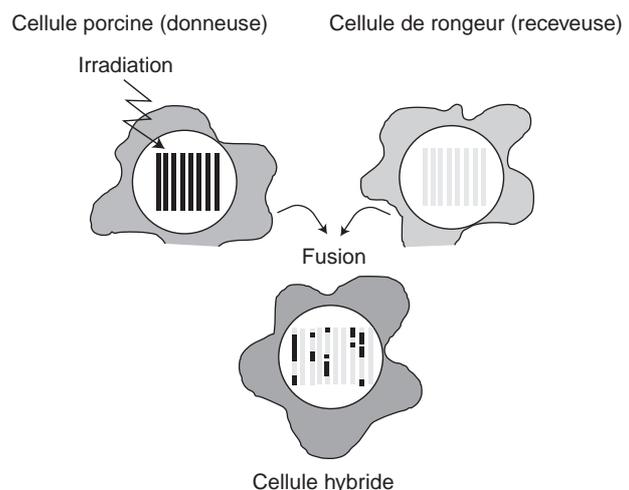
Les hybrides irradiés sont obtenus de la même façon que les hybrides somatiques à la différence que les cellules de la lignée primaire sont soumises, avant la fusion, à une irradiation destinée à casser les chromosomes. Les hybrides contiennent alors des fragments de taille variable, fonction de la dose d'irradiation utilisée (figure 4).

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. En revanche, les marqueurs n'ont pas besoin d'être polymorphes pour être informatifs et 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. 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. 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. 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 : la première a été établie grâce à une collaboration entre Cambridge et Généthon (collection GeneBridge GB4, Gyapay *et al* 1996), la deuxième a été constituée à Stanford (collection G3, Stewart *et al* 1997) et la troisième a également été produite à Stanford (TNG4). 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 (50 000 rads) rendant possible le classement de marqueurs très proches. En 1998, 30 000 étiquettes de gènes ont été localisées par un consortium d'équipes utilisant les deux panels GB4 et G3. L'utilisation de TNG4 est encore assez limitée car il faut une densité de marqueurs très élevée pour pouvoir établir des liens entre les marqueurs. Ce panel est surtout utilisé pour affiner des cartes établies dans des régions d'intérêt.

Pour les espèces d'élevage, un panel de 118 clones hybrides (irradiation : 7000 rads) a été produit pour le porc par le Laboratoire de Génétique Cellulaire - INRA Toulouse (Yerle *et al* 1998). Ce panel a été caractérisé par l'équipe de Larry Schook (Université du Minnesota) par la localisation de 750 marqueurs. Des cartes irradiées ont été établies pour l'ensemble des chromosomes porcins (Hawken *et al* 1999) avec une résolution moyenne de 10 à 15 fois supérieure à celle de la carte génétique. Chez les bovins, un panel de 100 hybrides (irradiation : 5000 rads) a été produit (Womack *et al* 1997) et est en cours de caractérisation.

Figure 4. Fabrication d'hybrides d'irradiation. Les cellules donneuses (espèce étudiée) sont irradiées puis fusionnées avec des cellules d'une lignée permanente, en général lignée de rongeur. Après fusion et sélection pour éliminer les cellules de rongeur (les cellules donneuses n'étant plus viables après irradiation), on obtient des cellules hybrides contenant le génome de la lignée receveuse en intégralité et des fragments chromosomiques de la lignée donneuse présents soit sous forme de microchromosomes, soit intégrés au génome rongeur.



2.2 / La cartographie en champ pulsé (PFGE : Pulse Field Gel Electrophoresis)

L'électrophorèse conventionnelle permet de séparer des fragments d'ADN d'une taille inférieure à 20 kb. L'électrophorèse en champ pulsé permet de séparer des fragments jusqu'à une taille de 10 Mb, soit la taille moyenne d'une bande chromosomique. La séparation des grands fragments est obtenue en faisant varier de façon cyclique l'orientation du champ électrique, ce qui force les molécules d'ADN à se réorienter à travers le gel d'agarose et permet une séparation en fonction du poids moléculaire. L'hybridation de deux sondes sur un même fragment d'ADN permet de conclure à la synténie des deux marqueurs et d'estimer la distance réelle en nombre de nucléotides. Il est alors possible d'établir une carte moléculaire très précise dans laquelle les gènes et les fragments d'ADN sont placés physiquement les uns par rapport aux autres.

2.3 / Les alignements de clones chevauchants : les contigs

L'alignement de clones chevauchants couvrant l'ensemble du génome est une étape capitale dans la construction de la carte physique à haute résolution. Mais, considérant la taille du génome des mammifères estimée à 3000 Mb, il était indispensable de mettre au point des vecteurs permettant le clonage de grands fragments d'ADN de façon à pouvoir constituer des banques ordonnées de clones et ordonner ces clones en contigs couvrant tout ou partie du génome. Ces vecteurs ont également été très utilisés pour développer la FISH : il s'agit des cosmides (contenant des fragments de 40 kb), des YAC (Yeast Artificial Chromosome, 1000 kb), des PAC (Phage Artificial Chromosome, 70 à 100 kb) et les BAC (Bacterial Artificial Chromosome, 140 kb). Pour ordonner ces clones, plusieurs méthodes peuvent être utilisées :

- les empreintes ou «fingerprints» : les clones à grands fragments sont digérés par plusieurs enzymes de restriction (deux ou trois en général). Un profil de digestion est obtenu pour chaque clone après électrophorèse, transfert et hybridation avec une séquence répétée (ce profil est dénommé «fingerprint»). Les profils sont interprétés par analyse d'image et leur comparaison deux à deux permet de définir, pour chaque paire de clones, une probabilité de chevauchement et une taille de chevauchement la plus probable. Ensuite, l'alignement est réalisé en sélectionnant les clones appariés avec une probabilité suffisante. Cette approche a été utilisée par l'équipe du Centre d'Etude du Polymorphisme Humain pour établir la première carte physique humaine (plus de 1000 contigs comportant 22 000 YAC ; Bellane-Chantelot *et al* 1992) ;

- il est possible de cribler ces banques de clones à grand insert avec des marqueurs déjà positionnés sur la carte génétique et d'isoler des clones chevauchants. L'analyse du contenu de ces clones en marqueurs permet la reconstitution de l'ordre chromosomique.

Ces deux méthodes permettent la mise en place de nombreux contigs, mais il faut ensuite les relier les uns aux autres. Pour cela, les clones d'extrémité de contigs sont utilisés comme sondes pour cribler l'ensemble de la banque et trouver les clones permettant de relier les contigs.

Combinant plusieurs méthodes (fingerprinting, marqueurs, FISH...), l'équipe du Généthon a établi la première carte du génome humain qui a été complétée pour aboutir deux ans plus tard à la publication d'une carte de deuxième génération couvrant près de 75 % du génome (220 contigs de 10 Mb ; Chumakov *et al* 1995). Cependant, ces contigs n'ap-

portent pas d'information précise sur la taille du chevauchement entre deux clones ni sur la distance exacte entre clones ou marqueurs au sein du contig. Une technique dérivée de la FISH a été développée pour positionner très finement les marqueurs sur la carte physique : le peignage moléculaire d'ADN.

Pour les espèces d'élevage, on est encore loin de cette définition, mais des projets se mettent en place actuellement pour aboutir à ce type de carte sur l'ensemble du génome. Néanmoins, des contigs de BAC ont déjà été construits dans quelques régions d'intérêt par exemple chez le porc (sur le chromosome 15 dans la région portant le gène RN et sur le chromosome 7 dans la région portant les gènes codant pour le système d'histocompatibilité) et chez la chèvre (sur le chromosome 1 autour du gène PIS).

2.4 / Le peignage moléculaire d'ADN

Le peignage moléculaire désigne un procédé de fixation de l'ADN purifié sur des surfaces (Bensimon *et al* 1994). Il consiste à ancrer spécifiquement par leurs extrémités des molécules d'ADN en solution et à les étirer à l'aide de la tension superficielle d'un ménisque en mouvement. Les molécules d'ADN sont étirées et fixées de façon irréversible sur la surface. La particularité de cet étirement réside dans son extrême régularité: toutes les molécules d'ADN sont étirées de la même façon et sur toute leur longueur et se retrouvent parallèles les unes aux autres, du fait de l'unicité de la direction du mouvement du ménisque (d'où le nom de peignage moléculaire). Il est ensuite possible de réaliser la FISH sur ces fibres d'ADN pour détecter, mesurer et positionner des sondes nucléotidiques. Il est donc possible d'ordonner des BAC ou des cosmides sur un YAC, mais aussi de travailler à l'échelle du génome entier et d'ordonner des YAC ou des BAC sur fibre d'ADN du génome avec une très grande précision, de l'ordre de quelques kilobases.

Cette technique a été utilisée avec succès dans le cadre de l'étude de contigs couvrant une région du chromosome 9 humain impliquée dans une forme de sclérose tubéreuse. La taille du génome humain diploïde après peignage représente environ trois mètres, sur lesquels seules quelques centaines de micromètres représentent la région à cartographier. Malgré cette différence, Michalet *et al* (1997) ont pu déterminer à quelques kilobases près la distance séparant deux cosmides. La FISH sur ADN peigné apparaît comme une technique de cartographie physique à haute résolution très performante, encore peu répandue car relativement délicate à mettre en œuvre.

Références

Arruga M.V., Monteagudo L.V., Tejedor M.T., 1992. Assignment of two markers carried by human chromosome 1 to different cattle synteny groups: FH to U1 and PEPC to U17 (chromosome 8). *Cytogenetics and Cell Genetics*, 59,m 45-47.

Bellane-Chantelot C., Lacroix B., Ougen P., Billault A., Beaufile S., Bertrand S., Georges I., Glibert F., Gros I., Lucotte G. *et al*, 1992. Mapping the whole human genome by fingerprinting yeast artificial chromosomes. *Cell*, 70, 1059-1068.

Bensimon A., Simon A., Chiffaudel A., Croquette V., Heslot F., Bensimon D., 1994. Alignment and sensitive detection of DNA by a moving interface. *Science*, 265, 2096-2098.

Burkin D.J., Broad T.E., Lambeth M.R., Burkin H.R., Jones C.A., 1998. New assignments using a complete, characterized sheep-hamster somatic cell hybrid panel. *Animal Genetics*, 29, 48.

Chevalet C., Gouzy J., San Cristobal-Gaudy M., 1997. Regional assignment of genetic markers using a somatic cell hybrid panel:

- a WWW interactive program available for the Pig genome. *Cabios*, 13, 69-73.
- Chumakov I.M., Rigault P., Le Gall I., Bellanne-Chantelot A., Billault A., Guillou S., Soularue S., Guasconi G., Poullier E., Gros I. *et al*, 1995. A YAC contig map of the human genome. *Nature*, 377, 175-297.
- Cowell J.K., Mitchell C.D., 1989. A somatic cell hybrid mapping panel for regional assignment of human chromosome 13 DNA sequences. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 52, 1-6.
- Gall J.G., Pardue M.L., 1969. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 63, 378-383.
- Gyapay G., Schmitt K., Fizames C., Jones H., Vega-Czarny N., Spillet D., Muselet D., Prud'Homme J.F., Dib C., Auffray C., Morissette J., Weissenbach J., Goodfellow P.N., 1996. A radiation hybrid map of the human genome. *Human Molecular Genetics*, 5, 339-346.
- Guérin G., Eggen A., Vaiman D., Nocart M., Laurent P., Bechet D., Ferrara M., 1994. Further characterization of a somatic cell hybrid panel: ten assignments to bovine genome. *Animal Genetics*, 25, 31-35.
- Hawken R., Murtaugh J., Flickinger G.H., Yerle M., Robic A., Milan D., Gellin J., Beattie G.W., Schook L.B., Alexander L., 1999. A first generation porcine whole genome radiation hybrid map. *Mammalian Genome*, 10, 824-830.
- Herrington C.S., Radcliffe J., 1994. Interphase cytogenetics: principles and applications. *Journal of Histotechnology*, 17, 219-234.
- Koch J., Kolvraa S., Petersen K.B., Gregensen N., Bolund L., 1989. Oligonucleotide-priming methods for the chromosome-specific labelling of alpha satellite DNA in situ. *Chromosoma*, 98, 259-265.
- Michalet X., Ekong R., Fougerousse F., Rousseaux S., Schurra C., Hornigold N., van Slegtenhorst M., Wolf J., Povey J.S., Beckmann J.S., Bensimon A., 1997. Dynamic molecular combing: stretching the whole human DNA for high-resolution studies. *Science*, 277, 1518-1523.
- 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.
- Pellestor F., Quenesson I., Coignet L., Girardet A., Andréo B., Lefort G., Charlier J.P., 1996. FISH and PRINS, a strategy for rapid chromosome screening: application to the assessment of aneuploidy in human sperm. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 72, 34-36.
- 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.
- Robic A., Riquet J., Yerle M., Milan D., Lahbib-Mansais Y., Dubut-Fontana C., Gellin J., 1996. Porcine genetic and cytogenetic maps integrated by mapping 100 microsatellites on somatic cell hybrid panel. *Mammalian Genome*, 7, 438-445.
- Rogel-Gaillard C., Hayes H., Coullin P., Chardon P., Vaiman M., 1997. Swine centromeric DNA repeats revealed by Primed In Situ (PRINS) labelling. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 79, 79-84.
- 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-PGK-GALA. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 30, 193-204.
- Stewart E.A., McKusick K.B., Aggarwal A., Bajorek E., Brady S., Chu A., Fang N., Hadley D., Harris M., Hussain S., Lee R., Maratukulam A., O'Connor K., Perkins S., Piercy M., Qin F., Reif T., Sanders C., She X., Sun W.L., Tabar P., Voyticky S., Cowles S., Fan J.B., Cox D.R., *et al*, 1997. An STS-based radiation hybrid map of the human genome. *Genome Research*, 5, 422-433.
- Troyer D.L., Goad D.W., Xie H., Rohrer G.A., Alexander L.J., Beattie C.W., 1994. Use of direct in situ single-copy (DISC) PCR to physically map five porcine microsatellites. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 67, 199-204.
- Womack J.E., Moll Y.D., 1986. Gene map of the cow: conservation of linkage with man and mouse. *Journal of Heredity*, 77, 2-7.
- Womack J.E., Johnson J.S., Owens E.K., Rexroad III C.E., Schläpfer J., Yang Y.P., 1997. A whole-genome radiation hybrid panel for bovine gene mapping. *Mammalian Genome*, 8, 854-856.
- Yerle M., Echard G., Robic A., Mairal A., Dubut-Fontana C., Riquet J., Pinton P., Milan D., Lahbib-Mansais Y., Gellin J., 1996. A somatic cell hybrid panel for pig regional gene mapping characterized by molecular cytogenetics. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 73, 194-202.
- 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.
- 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.