



HAL
open science

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

Christophe Philippe

► **To cite this version:**

Christophe Philippe. 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. NNT : 1994INPL037N . tel-01776586

HAL Id: tel-01776586

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01776586>

Submitted on 24 Apr 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L’archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d’enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : Génie Biologique et Médical
Mention : Biologie Moléculaire

BIU NANCY
Service Commun de Documentation
INPL
2, avenue de la Forêt de Haye - B.P. 3
54501 VANDOEUVRE Cédex FRANCE

Thèse présentée pour obtenir le titre de Docteur
de l'Institut National Polytechnique de Lorraine

par : Christophe PHILIPPE

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 translocations (X;Autosome) équilibrées.

Soutenue publiquement le 2 mars 1994 à 14 heures

Membres du jury

- | | | |
|---|-------|------------|
| - Professeur  (Directeur de thèse) | ----- | Présidente |
| - Professeur D 136 001322 2 | ----- | Rapporteur |
| - Professeur Jean-Louis Mandel | ----- | Rapporteur |
| - Professeur Michel Dauça | ----- | Examineur |
| - Professeur Hans-Hilger Ropers | ----- | Examineur |

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : Génie Biologique et Médical

Mention : Biologie Moléculaire

[M] 1994 PHILIPPE, Ch.

BIU NANCY
 Service Commun de Documentation
 INPL
 2, avenue de la Forêt de Haye - B.P. 3
 54501 VANDOEUVRE Cédex FRANCE

Thèse présentée pour obtenir le titre de Docteur
 de l'Institut National Polytechnique de Lorraine

par : Christophe PHILIPPE

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 translocations (X;Autosome) équilibrées.

Soutenue publiquement le 2 mars 1994 à 14 heures

Membres du jury

- | | | |
|---|-------|------------|
| - Professeur Simone Gilgenkrantz (Directeur de thèse) | ----- | Présidente |
| - Professeur Michel Goossens | ----- | Rapporteur |
| - Professeur Jean-Louis Mandel | ----- | Rapporteur |
| - Professeur Michel Dauça | ----- | Examineur |
| - Professeur Hans-Hilger Ropers | ----- | Examineur |

NOM et Prénom : PHILIPPE Christophe

Titre de la thèse :

CARTOGRAPHIE PHYSIQUE DU CHROMOSOME X HUMAIN :

- 1) Contribution à la cartographie physique de la région q13-q22 du chromosome X humain,
- 2) A propos de deux cas de pathologies récessives liées à l'X chez des femmes porteuses de translocations (X;Autosome) équilibrées.

Résumé en français :

Dans une première partie, nous définissons huit nouveaux points de cassure, dans la région Xq13-q22 du chromosome X humain, isolés par hybridation somatique interspécifique à partir de t(X;A) équilibrées chez des femmes présentant des troubles de la fonction ovarienne. En regroupant nos t(X;A) avec des délétions de la région Xq21 publiées précédemment, nous proposons un panel de réarrangements qui subdivise la région Xq21 en 21 segments, soit plus d'une borne par mégabase d'ADN.

La deuxième partie de ce travail consiste en la caractérisation moléculaire fine des points de cassure sur l'X pour les deux t(X;A) présentées dans cette étude qui sont associées avec des pathologies récessives liées à l'X (t(X;7)(q21;p12) et choroïdémie, t(X;13)(q13;q31) et retard mental).

Résumé en anglais :

DNA probe screening of somatic cell hybrids derived from females with t(X;A) enables us to define eight new breakpoints within the q13-q22 region of the human X chromosome. Together with other X-deletions that have been described earlier, these breakpoints subdivide the Xq21 segment into 21 intervals. This panel of X-rearrangements is estimated to contain more than one breakpoint per megabase of DNA, it provides a good framework for the construction of a YAC contig of the Xq21 region.

We report the molecular characterisation of the X-chromosomal breakpoints in the two t(X;A) associated with defined X-linked disorders (t(X;7)(q21;p12) and choroideremia, t(X;13)(q13;q31) and mental retardation).

Mots-clés : cartographie physique, choroïdémie, chromosome X humain, dysfonctionnement ovarien, hybride somatique interspécifique, retard mental lié à l'X, translocation X;Autosome.

Composition du jury

Professeur Simone Gilgenkrantz (Directeur de thèse)-----	Présidente
Professeur Michel Goossens -----	Rapporteur
Professeur Jean-Louis Mandel-----	Rapporteur
Professeur Michel Dauça-----	Examineur
Professeur Hans-Hilger Ropers-----	Examineur

Adresse de l'auteur : 60, rue de Nabécor 54000 NANCY.
Téléphone : 83-51-04-94

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier Simone Gilgenkrantz pour m'avoir accueilli (à deux reprises !) dans son laboratoire. La deuxième fois fût la bonne. J'ai beaucoup appris au cours de ces quatre années de formation doctorale, tant du point de vue scientifique que des relations humaines. La chose la plus importante que je dois à Simone Gilgenkrantz est le goût d'oser et d'entreprendre. Ah ! Décrocher la lune ! ... Merci.

Merci aux Professeurs Michel Dauça, Michel Goossens, et Jean-Louis Mandel et Hans-Hilger Ropers de me faire le grand honneur de juger ce travail.

Un grand merci à Michèle Chery pour ses conseils et son soutien constant tout au long de ces années.

Merci à Marie-José Grégoire pour la relecture impitoyable (ô combien appréciée) de ce manuscrit et pour ses conseils toujours opportuns.

Ce travail est le fruit d'une collaboration avec plusieurs laboratoires dans lesquels j'ai pu apprendre énormément. Merci aux Professeurs Guy et Christiane Branlant et à toute leur équipe (et plus spécialement à Annie Mougin) pour les "miniprép". Mes premières PCR furent réalisées dans le laboratoire du Professeur M. Goossens, avec les conseils de Bénédicte Duriez, merci à eux. Au tout début de mes travaux sur les hybrides somatiques interspécifiques, les premières sondes de l'X m'ont été fournies par l'équipe du Professeur J.L. Mandel, merci à toute l'équipe Strasbourgeoise.

Je suis extrêmement redevable à l'équipe du Professeur Hans-Hilger Ropers (Nimègue, Pays-Bas). Ce groupe m'a accueilli chaleureusement pendant quelques semaines en 1991 (sept. et oct.) et n'a pas cessé, par la suite, de me prodiguer conseils et encouragements. Je tiens à remercier plus particulièrement Frans Cremers, Irene Bach, Silvère van der Maarel et Hans van Bokhoven.

Certaines anomalies chromosomiques nous ont été fournies par des équipes extérieures. Merci au Professeur J.L. Dufier, et au Drs I. Gazhi et J. Kaplan pour nous avoir adressé la patiente TDo avec une t(X;7) associée à l'expression clinique de la choroïdérémie. Merci au Dr C. Turleau pour la lignée hybride C56N, aux Drs J. André et B. Noel pour nous avoir adressé du sang des patientes LG et SN respectivement. Merci au Professeur H.H. Ropers pour toutes les délétions de la région Xq21.

Pour les sondes de l'X, nous sommes très reconnaissants aux Drs A. Affara, I. Balazs, L.G. Brown, G.A. Bruns, H.J. Cooke, K.E. Davies, P. Edwards, R.P. Kandpal, T.A. Kruse, S.A. Latt, J.L. Mandel, A.L. Michelson, D.C. Page, K. Smith, I. Wieland, J. Weissenbach, B.N. White. Les ADNc partiels et les amorces du gène CHM nous ont été régulièrement fournis par F. Cremers.

Je remercie vivement tous les membres du laboratoire de Génétique de Nancy qui ont été, à un moment ou à un autre, mis à contribution. Merci à Frédérique Sloan pour ses "dimanches FISH"; à Cécile Arnould pour ses nombreuses PCR ; à Michèle Franck, Naïma Abbadi et Brigitte Léotard pour leur initiation aux techniques moléculaires ; à Marie-Christine Perrier et Mireille Duc pour leur aide dans les analyses chromosomiques. Merci à Alain Lebret pour les nombreux tirages photographiques. Merci à Eric Panetto pour ses lumières informatiques. Merci à Philippe Camus qui m'a souvent indiqué l'orthographe de certains mots et expliqué des règles élémentaires de grammaire. Je remercie également Géraldine Jénin et Micheline Duprez pour les nombreux fax et formulaires administratifs.

Merci à Pierre Billuart pour l'été "Southern" qu'il a passé en ma compagnie.

Merci à Chantal Andreotti pour sa gentillesse et sa grande maîtrise des postes et télécommunications.

Merci à tous ceux que j'ai, bien involontairement, oublié d'associer à ces remerciements.

Un grand merci à tous mes proches qui ont su, simplement, si souvent être là.

Je dédie ce travail à la mémoire de mon père

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 2

I) PREAMBULE 3

II) LA CARTOGRAPHIE DU GENOME HUMAIN 8

A) Le génome humain et ses anomalies 8

B) Cartographie génétique 11

1) L'analyse de liaison génétique 11

2) Les marqueurs génétiques polymorphes 12

3) L'analyse de liaison est une analyse familiale 15

4) Calcul des distances génétiques : statistique et cartographie génétique 16

5) Etablissement d'une carte génétique fine du génome humain 18

C) Cartographie physique 20

1) Les techniques cytogénétiques 20

2) Les méthodes parasexuelles 23

3) Les approches moléculaires 41

D) Cartographie fonctionnelle 47

E) Vers une carte intégrée du génome humain 48

F) Grandeur et décadence du clonage positionnel 49

G) Les applications de la cartographie du génome humain 51

III) LE CHROMOSOME X HUMAIN 52

A) Les chromosomes sexuels 52

B) Inactivation du chromosome X 53

C) La carte actuelle du chromosome X 55

IV) OBJECTIF DE NOTRE TRAVAIL 57

Première partie : Cartographie physique de la région
q13-q22 du chromosome X humain

I) PRESENTATION CYTOGENETIQUE ET CLINIQUE DES 8 CAS DE t(X;A)	61
A) Données cliniques	61
B) Données cytogénétiques	61
C) t(X;A) équilibrées et dysfonctionnement ovarien	68
II) LOCALISATION MOLECULAIRE DES POINTS DE CASSURE SUR L'X	69
A) Fabrication des hybrides somatiques interspécifiques	70
B) Tri des clones hybrides utilisables pour la caractérisation des points de cassure sur l'X	71
C) Localisation des points de cassure sur l'X par rapport aux marqueurs de la région Xq13-q22	79
D) Caractérisation du contenu en chromosomes humains des hybrides somatiques interspécifiques par FISH	87
III) UTILISATION D'UN PANEL DE TRANSLOCATIONS ET DE DÉLÉTIONS POUR LA CARTOGRAPHIE PHYSIQUE DE LA RÉGION PHYSIQUE DE LA RÉGION Xq13-q22	94
A) Cartographie physique de la région Xq13-q22	96
B) Cartographie physique de la région Xq21-q22	99

Deuxième partie : t(X;A) équilibrée et pathologie récessive
liée à l'X - à propos des cas TDo et PMI

I) t(X;7)(q21;p12) ET CHOROIDEREMIE	109
-------------------------------------	-----

II) t(X;13)(q13;q31) ET RETARD MENTAL	120
A) Observation clinique détaillée de la patiente PMI	122
B) Clonage du point de cassure sur l'X chez la patiente PMI	123

CONCLUSION-PERSPECTIVES 125

PUBLICATION 133

MATERIELS ET METHODES 140

I) CULTURE CELLULAIRE	141
A) Milieux de culture	141
B) Etablissement d'une lignée lymphoblastoïde	142
C) Réalisation d'hybrides somatiques interspécifiques	143
D) Congélation	144
II) TECHNIQUES CYTOGENETIQUES	144
A) Réalisation de caryotypes en métaphase	144
B) Réalisation de caryotypes en prométaphase	145
III) TECHNIQUES MOLECULAIRES	146
A) Amplification des sondes	146
1) Transformation des bactéries compétentes	146
2) Préparation d'ADN plasmidique	146
3) Purification de fragments d'ADN	146
B) Extraction d'ADN génomique total	147
C) Préparation de fragments d'ADN marqués au ³² P	147

1) Marquage de l'ensemble insert et plasmide par coupure-déplacement	147
2) Marquage de l'insert par élongation d'amorces	148
D) Analyse de l'ADN par la méthode de Southern	148
1) Digestion de l'ADN génomique	148
2) Séparation des fragments d'ADN	148
3) Transfert de l'ADN sur membrane de nylon	149
4) Préhybridation	149
5) Hybridation	149
6) Lavages	150
7) Autoradiographie	150
E) Amplification <i>in vitro</i> de séquences d'ADN par PCR	150
F) Marqueurs utilisés dans cette étude	151
IV) CYTOGENETIQUE MOLECULAIRE (FISH)	155
1) Préparation des lames	155
2) Marquage de la sonde	155
3) Dénaturation de la sonde et des chromosomes métaphasiques	156
4) Préhybridation	156
5) Hybridation	157
6) Lavages	157
7) Détection immunologique du signal	157
8) Microscopie	158
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	159

Liste des figures

Figure 1 :	Les deux grandes stratégies permettant d'isoler un gène à l'origine d'une maladie génétique.	9
Figure 2 :	RFLP (polymorphisme bi-allélique).	13
Figure 3 :	Microsatellite (polymorphisme multi-allélique).	13
Figure 4 :	Pouvoir résolutif des différentes méthodes d'exploration du génome humain.	19
Figure 5 :	Les différentes étapes de l'hybridation <i>in situ</i> en fluorescence (FISH).	22
Figure 6 :	Fabrication d'un hybride somatique interspécifique "homme/rongeur".	25
Figure 7 :	Les deux voies de synthèse de l'ADN.	29
Figure 8 :	Le système de sélection utilisant le milieu HAT.	28
Figure 9 :	Influence de facteurs cytoplasmiques sur la direction de ségrégation des chromosomes au sein d'hybrides "homme/rongeur".	31
Figure 10 :	Cartographie d'une sonde d'ADN à l'aide d'une collection d'hybrides somatiques interspécifiques.	33
Figure 11 :	Les hybrides irradiés et la cartographie du génome humain.	35
Figure 12 :	Fragmentation de chromosome par TACF.	38
Figure 13 :	Les différentes étapes de la technique de Southern.	40
Figure 14 :	L'amplification d'ADN <i>in vitro</i> par PCR.	42
Figure 15 :	Approche combinée pour l'identification d'un gène impliqué dans une maladie héréditaire.	50
Figure 16 :	Idiogramme des t(X;A), bandes GTG.	62
Figure 17 :	Idiogramme des t(X;A), bandes RBG.	63
Figure 18 :	Mécanisme d'une t(X;A) équilibrée, cas WD t(X;2)(q21;p25).	64
Figure 19 :	t(X;A) et dysfonctionnement ovarien.	67
Figure 20 :	Sondes utilisées pour le tri des HSI.	71
Figures 21, 22 et 23 :	Vérification moléculaire de l'absence de l'X normal et du der(X) au sein des hybrides somatiques interspécifiques.	73-75
Figure 24 :	Exemples de résultats d'hybridation.	81-82
Figure 25 :	Les différentes régions de l'X isolées par hybridation somatique interspécifique à partir des t(X;A).	83

Figures 26 et 27: Mise en évidence de matériel de l'X autre que la région q21-qter porté par le der(12) au sein de l'hybride BC c14.	85-86
Figure 28 : Mise en évidence du der(A) dans les hybrides PMI c11 et TDo c11.	88
Figure 29a et b : Evaluation, par FISH, du contenu en chromosomes humains dans les hybrides somatiques interspécifiques PMI c11 et TDo c11.	89-90
Figure 30 : Localisation moléculaire des points de cassure sur l'X.	95
Figure 31 : Localisation de la sonde 1:52 dans la région Xq22-qter.	97
Figure 32 : Localisation de pHX79 (DXS571) dans la région Xq22-qter.	98
Figure 33 : Cartographie physique de la région Xq21-q22 à l'aide d'un panel de translocations et de délétions.	100-101
Figures 34a et b : Localisation de marqueurs par PCR sur le panel de réarrangements (translocations et délétions) dans la région Xq21-q22.	102-103
Figure 35 : Pathologies récessives liées à l'X observées chez des femmes porteuses de t(X;A) équilibrées.	108
Figure 36 : Rétinographie de l'oeil droit de la patiente TDo.	110
Figure 37 : Localisation et anatomie du gène de la choroïdérémie.	112
Figure 38 : Les ADNc partiels utilisés pour la caractérisation du point de cassure sur l'X chez la patiente TDo.	115
Figures 39 et 40 : Localisation du point de cassure sur l'X chez la patiente TDo porteuse d'une t(X;7).	114 et 116
Figure 41 : Localisation du point de cassure sur l'X chez la patiente TDo dans le gène CHM entre l'exon 3 et l'exon 4.	118
Figure 42 : Choroïdérémie chez des femmes porteuses de t(X;A).	119
Figure 43 : Localisation des gènes à l'origine de RMLX dans la région proximale des bras longs du chromosome X humain.	121
Figure 44 : Cartographie des gènes de la région Xq13-q22 à l'origine de pathologies génétiques (à l'exclusion des RMLX).	127
Figure 45 : Carte consensuelle de la région cen-q27.1 du chromosome X humain.	129
Figure 46 : Les différentes étapes de la construction d'une carte physique, génétique et fonctionnelle de la région q21 du chromosome X humain.	131

Liste des tableaux

Tableau	I :	Direction de la ségrégation pour différents couples d'espèces.	30
Tableau	II :	Clonage par génétique inverse de gènes à l'origine de maladies liées au chromosome X.	56
Tableau	III :	Données cytogénétiques et cliniques.	60
Tableau	IV :	Résultats des expériences d'hybridation réalisées lors de la sélection des clones hybrides ne contenant ni le der(X) ni l'X normal.	76
Tableau	V :	Résultats des expériences d'hybridation effectuées lors de la localisation des points de cassure sur l'X par rapport aux sondes de la région q13-q22.	78
Tableau	VI :	Evaluation du contenu en chromosomes humains des hybrides somatiques interspécifiques.	91
Tableau	VII :	Evaluation du contenu en chromosomes humains de l'hybride TDo cl1.	92
Tableau	VIII :	Amélioration de la localisation physique de marqueurs du chromosome X.	105
Tableau	IX :	Marqueurs du chromosome X humain utilisés dans cette étude.	152

Abréviations

- ADN : acide désoxyribonucléique.
- ARN : acide ribonucléique.
- dNTP : désoxyribonucléotide triphosphate avec N pouvant être A (adénine), G (guanine), C (cytosine) ou U (uridine).
- der(A) : dérivé d'un autosome sur lequel un fragment d'un autre chromosome a été transloqué (dans nos cas de t(X;A), il s'agit toujours des bras longs de l'X).
- der(X) : dérivé du chromosome X sur lequel un fragment d'un autre chromosome a été transloqué.
- BrdU : 5-bromodésoxyuridine.
- CEPH : Centre d'Etude du Polymorphisme Humain.
- CHM : symbole du locus où est situé le gène (et par extension du gène) à l'origine de la choroïdérémie.
- Ci : Curie.
- cM : centiMorgan.
- DMSO : diméthyl-sulfoxyde.
- EDTA : éthylènediaminetétraacétate.
- EST : étiquette pour une séquence exprimée (Expressed Sequence Tag).
- FISH : Fluorescence *In Situ* Hybridization.
- GTG : bandes G, Trypsine, coloration par le Giemsa.
- HAT : Hypoxanthine, Aminoptérine, Thymidine.
- HSI : Hybride Somatique Interspécifique.
- kb : kilobase (millier de paires de bases).
- M : Morgan (unité de recombinaison).
- Mb : mégabase (million de paires de bases).
- MIM : Mendelian Inheritance in Man (McKusick, 1992). Catalogue regroupant l'ensemble des pathologies héréditaires (dominantes, récessives et liées à l'X) rencontrées chez l'homme. Chaque maladie possède son "numéro MIM".
- M/V : masse/volume.
- p : bras court d'un chromosome.
- pb : paire de bases.
- PCR : Polymerase Chain Reaction.
- PEG : polyéthylène glycol.
- q : bras long d'un chromosome.
- QFQ : bandes Q, Fluorescence, coloration par la Quinacrine.
- RBG : bandes R, BrdU, coloration par le Giemsa.
- RFLP : polymorphisme de longueur des fragments de restriction (Restriction Fragment Length Polymorphism).
- RHG : bandes R, dénaturation à la chaleur (Heat), coloration par le Giemsa.
- RM : retard mental.
- RMLX : retard mental lié à l'X.
- RPM : révolutions par minute.
- SDS : sodium dodécylsulfate.
- SSC : standard saline citrate.
- STS : site ciblé par sa séquence (sequence-tagged site).
- SVF : sérum de veau foetal.
- TAE : tampon tris-acétate-EDTA.
- TBE : tampon tris-borate-EDTA.
- t(X;A) : translocation réciproque entre le chromosome X et un autosome. On distingue les t(X;A) équilibrées (sans perte de matériel chromosomique) des t(X;A) déséquilibrées (avec perte de matériel chromosomique).
- UV : ultraviolet.
- X : chromosome X humain.
- Xcen : centromère du chromosome X.
- Xpter : extrémité des bras courts du chromosome X.
- Xqter : extrémité des bras longs du chromosome X.
- YAC : chromosome artificiel de levure (yeast artificial chromosome).

INTRODUCTION

I) PREAMBULE

Depuis l'aube de l'humanité, les représentants de l'espèce humaine s'interrogent

" Quel monstre est-ce, que cette goutte de semence, de quoi nous sommes produits, porte en soi les impressions non de la forme corporelle seulement, mais des pensements et des inclinations de nos pères ? Cette goutte d'eau, où loge-t-elle ce nombre infini de formes ? et comment porte-t-elle ces ressemblances, d'un progrès si téméraire et si déréglé que l'arrière-fils répondra à son bisaïeul, le neveu à l'oncle ? ". Extrait du livre II des essais, Montaigne

La génétique -le terme a été introduit et défini par Bateson en 1905- est la science de l'hérédité et de la variation. La notion d'hérédité est vieille comme l'humanité. On peut considérer que les premiers agriculteurs, en choisissant pour la reproduction les meilleurs animaux ou les plus beaux plants, pratiquaient déjà de façon empirique la génétique. Dans l'espèce humaine, on sait depuis toujours que les enfants ressemblent plus ou moins à leurs parents ou à un aïeul et que, dans certaines familles, il existe des traits caractéristiques ou des maladies héréditaires. Avant qu'une véritable science expérimentale ne permette d'appréhender réellement les mécanismes qui sous-tendent la transmission d'un patrimoine héréditaire au cours des générations successives d'êtres vivants, il était possible d'envisager toutes sortes de théories alors purement spéculatives. Il n'est bien sûr pas question d'en faire un inventaire exhaustif et les quelques phrases qui suivent sont autant de tentatives d'explications qui, pour certaines, n'ont pas résisté aux faits.

Dieu dit "Que la terre produise des êtres vivants, bétail, reptiles, animaux sauvages, selon leur espèces." Et il en fût ainsi. LA GENESE, chapitre I, verset 24

Il n'y a pas de semence femelle car la Nature dans sa sagesse ne saurait créer deux substances pour le même usage. ARISTOTE

L'oeuf d'où doit sortir une femelle contient cette femelle avec ses ovaires dans lesquels d'autres femelles sont contenues et déjà toutes formées. AVERROES

De l'hérédité particulière à la génétique moléculaire

La compréhension de la transmission d'informations pendant la reproduction asexuée ou durant la procréation sexuée est, elle, très récente.

En effet, on peut considérer que les travaux de G. Mendel sur le pois, dont les résultats furent publiés en 1865, marquent les débuts de la génétique en tant que science possédant ses propres lois. Il est bien évident que de vouloir dater la naissance d'une science relève de la mythologie. En effet, des travaux pour comprendre le monde vivant avaient été nombreux avant ceux du moine autrichien. Par exemple, Virchow avait déjà énoncé la théorie cellulaire (1855) en soulignant que toute cellule provenait d'une cellule préexistante, et ce, entre autre, grâce à l'invention du microscope au début du XVII^e siècle. D'autre part, un important verrou au développement de la génétique sautait à la fin du XIX^e siècle avec les expériences célèbres de L. Pasteur démontrant que la génération spontanée n'existait pas. Néanmoins, les expériences de croisement entre différentes lignées de pois ne différaient que par quelques caractères (tels que la couleur ou forme de la graine) permirent de jeter les bases des lois dites "de Mendel" qui furent amplement confirmées par la suite. Avec la double commande de facteurs (on parle maintenant de gènes) à l'origine des caractères héréditaires, l'hérédité devenait particulière. Les lois de Mendel sont découvertes à nouveau (ou vérifiées ?) par C. Correns, E. von Tschermak et H. de Vries toujours sur des modèles végétaux au début du XX^e siècle. L. Cuenot fût le premier à vérifier le bien fondé des lois de Mendel sur un modèle animal, à savoir la souris.

Le tout début du XX^e siècle marque une étape également très importante dans le développement de la génétique : le chromosome entre en scène. Les cytologistes notent le parallélisme qui existe entre le comportement des chromosomes au cours de la méiose et la disjonction des paires d'allèles pendant la formation des gamètes imaginée par Mendel lors de ses expériences d'hybridation. Sutton et Boveri proposent une théorie chromosomique de l'hérédité ; en 1902, Sutton concluait un article de la façon suivante :

"L'association des chromosomes paternels et maternels par paire, et leur séparation ultérieure pendant la division réductionnelle (...), pourraient représenter la base matérielle des lois mendéliennes de l'hérédité."

L'affermissement de la théorie chromosomique devait être le résultat des travaux sur la drosophile ou mouche du vinaigre au début des années 1910

effectués par l'équipe de T. Morgan (qui comprenait également A. Sturtevant et H. Muller). Grâce à l'observation de variations spontanées (les mutations chères à H. de Vries), Morgan vérifie à son tour les lois de Mendel sur la drosophile et démontre que les chromosomes sont le support des facteurs mendéliens. De plus, il découvre le phénomène de recombinaison entre les facteurs héréditaires d'une même paire de chromosomes et met à profit cette caractéristique de la méiose pour établir la première carte génétique d'un être vivant. En 1933, la découverte par Painter des chromosomes géants dans les glandes salivaires de cette même drosophile a permis d'établir la première carte physique des gènes en reliant des anomalies chromosomiques telles que des délétions avec des modifications du phénotype de l'insecte. A cette époque la théorie chromosomique de l'hérédité est solidement installée mais les gènes sont toujours des entités abstraites dont la nature reste à déterminer.

Dans les années 1940-1950, la biochimie et l'étude des micro-organismes vont venir en aide à la génétique pour déterminer la nature du support de l'hérédité. En 1941, G. Beadle et E. Tatum et leur célèbre "un gène - une enzyme" démontrent que les gènes contiennent l'information nécessaire à la fabrication d'une protéine. La nature biochimique du support de l'hérédité sera dévoilée par O. Avery, C. McLeod et M. McCarthy qui démontrèrent que le principe à l'origine de la transformation d'une souche de pneumocoque avirulent (type R) en souche virulente (type S), mis en évidence par F. Griffith en 1928, n'était autre que l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique). La génétique devenait alors moléculaire et s'intéressait à présent aux acides nucléiques.

Avant de comprendre comment l'ADN pouvait jouer son rôle de stockage de l'information génétique et comment cette information était utilisée par la cellule, il était nécessaire d'en connaître sa structure. C'est grâce à la physique, et plus particulièrement à la cristallographie aux rayons X, que J. Watson et F. Crick déterminèrent en 1953 la fameuse structure en double hélice avec la complémentarité existant entre les bases A (Adénine) et T (thymine) d'une part et les bases G (Guanine) et C (Cytosine) d'autre part. Les retombées de cette découverte furent immenses et de nombreuses recherches pour comprendre le fonctionnement des gènes pouvaient alors commencer.

Parmi les étapes importantes dans la compréhension du fonctionnement des gènes, on peut citer les travaux de F. Jacob et J. Monod qui découvrent l'existence d'un intermédiaire (ARN messenger) entre l'ADN et les protéines et décrivent le premier modèle de régulation de l'expression des gènes avec l'opéron lactose en 1961. Entre 1962 et 1966, M. Nirenberg et H. Khorana expliquent la façon dont l'information génétique est stockée sur l'ADN en décryptant le code génétique qui explique le passage de l'ADN aux protéines. Jusqu'à la fin des années 1960, l'ensemble des découvertes furent obtenues grâce à l'étude de micro-organismes (bactéries et virus) possédant un génome de petite taille. L'étude des gènes des eucaryotes nécessitera les outils et les méthodes du génie génétique.

La révolution du génie génétique

Le début des années 1970 marque le développement du génie génétique avec le premier ADN recombinant produit in vitro en 1972. A partir de cette date, de nombreuses découvertes fournissent des outils (enzymes de restriction, ADN polymérase, ligase, ...) pour isoler ou cloner des gènes. Les méthodes de séquençage permettent de lire l'information génétique contenue dans les gènes. Le génie génétique révèle la structure morcelée des gènes chez les eucaryotes (découverte des introns en 1977). La génétique humaine bénéficie, dès la fin des années 70, des formidables potentialités offertes par les techniques de l'ADN recombinant.

Le développement de la génétique humaine

Avant de devenir moléculaire, la génétique humaine a d'abord été une discipline qui a beaucoup appris de l'étude des chromosomes. Néanmoins, dès 1908, A. Garrod décrit le premier exemple d'hérédité mendélienne chez l'homme en proposant de relier une maladie métabolique (l'alcaptonurie) à une anomalie d'un gène récessif. Cette description peut être considérée comme le départ de la génétique humaine, science qui décrira par la suite une multitude de maladies héréditaires ayant pour origine un défaut dans un gène gouvernant la synthèse d'une protéine.

Bien que, dès 1891, Von Hansemann réalise la première observation de chromosomes humains, il faudra attendre plus d'un demi-siècle pour que le nombre diploïde de chromosomes de l'espèce humaine ($2n=46$) soit établi par

Tjio et Levan (1956). Depuis le début des années soixante, le développement des techniques cytogénétiques a permis de mettre en évidence un grand nombre d'aberrations chromosomiques et de relier ces anomalies à des pathologies. La première anomalie chromosomique (la trisomie 21) à l'origine d'une pathologie (le syndrome de Down) est décrite par J. Lejeune en 1959. Au début des années 70, la découverte des bandes chromosomiques et le développement de nombreuses méthodes de marquage ont permis d'augmenter la puissance des analyses cytogénétiques.

A la fin des années 70, l'application à la génétique humaine des techniques du génie génétique rend concrète l'étude d'un nombre croissant de gènes (Williamson, 1981). Les retombées sont déjà importantes et bon nombre de mécanismes physiologiques et pathologiques ont été élucidés. Citons par exemple le clonage des gènes des immunoglobulines et du système HLA (génétique et immunologie), des gènes intervenant dans les processus tumoraux (génétique et cancer), des gènes des micro-organismes à l'origine des maladies infectieuses (génétique et microbiologie) et bien sûr des nombreux gènes responsables, quand ils sont mutés, de maladies héréditaires. Pour la première fois dans l'histoire de la médecine, des possibilités de thérapie génique sont envisageables pour certaines maladies héréditaires (par exemple la mucoviscidose). Après les deux révolutions que furent les possibilités de prévenir (grâce aux vaccinations) et de guérir (à l'aide des antibiotiques) les maladies infectieuses, les possibilités offertes par la génétique moléculaire d'intervenir sur la cause du mal dans les maladies héréditaires pourraient constituer, en cette fin de millénaire, une troisième révolution en médecine.

A la base de tous ces progrès se trouve l'isolement ou "clonage" des gènes. Au début, les quelques gènes humains clonés le furent grâce à la connaissance des protéines qui en découlent (gènes des hémoglobines, du facteur VIII...). De plus en plus, la démarche "classique" d'isolement des gènes (encore appelée clonage fonctionnel) fût remplacée par une approche dite inverse où l'identification d'un gène est rendue possible en l'absence de toute connaissance sur le produit de celui-ci. La génétique inverse (ou clonage positionnel (Collins, 1992) nécessite comme prérequis indispensable une carte du génome humain la plus précise possible avec un grand nombre de balises régulièrement disposées le long des chromosomes. Bien que plus de 3000 gènes soient déjà clonés (sur les 50 000 à 100 000 que compte le génome humain) et qu'environ 10 000 fragments d'ADN anonymes soient positionnés sur les chromosomes, des améliorations de la carte du génome devront encore être réalisées pour isoler l'ensemble des gènes à l'origine des

maladies monogéniques et pour appréhender les gènes impliqués dans des maladies multifactorielles beaucoup plus difficiles d'accès à l'analyse génétique.

L'ensemble des résultats que nous présentons dans cette thèse concerne la cartographie physique du chromosome X humain. Avant d'aborder notre contribution, certes modeste, à ce vaste projet qu'est le programme Génome Humain, il nous a semblé opportun de rappeler quelles sont les différentes approches permettant de cartographier les gènes de l'espèce humaine.

II) LA CARTOGRAPHIE DU GENOME HUMAIN

A) LE GENOME HUMAIN ET SES ANOMALIES

Le génome humain est l'ensemble de l'information génétique transmise de génération en génération dont l'expression, en interaction avec les facteurs de l'environnement, permet le développement d'un être humain. Il est constitué de 50 000 à 100 000 gènes, soit 3 milliards de paires de bases (pb), réparties dans les cellules de la lignée germinale, sur 22 autosomes et un chromosome sexuel (X ou Y). Les cellules somatiques ont une garniture chromosomique formée de la réunion, au cours de la fécondation, de 23 chromosomes d'origine maternelle (22 autosomes et un chromosome X) et de 23 chromosomes d'origine paternelle (22 autosomes et un chromosome X ou Y). La formule chromosomique normale est donc 46,XX pour une femme et 46,XY pour un homme.

Un gène, dont l'emplacement ou locus est fixe sur un chromosome donné, est un fragment d'ADN contenant l'information nécessaire à la fabrication d'une protéine (à l'exception des gènes pour les ARN ribosomiaux et pour les ARN de transfert ainsi que certains gènes régulateurs). Certains gènes sont à expression ubiquitaire (gènes dits de maintenance ou de ménage comme le sont les gènes intervenant dans le métabolisme de base) alors que d'autres ne

**GENETIQUE INVERSE
CLONAGE POSITIONNEL**

**GENETIQUE CLASSIQUE
CLONAGE FONCTIONNEL**

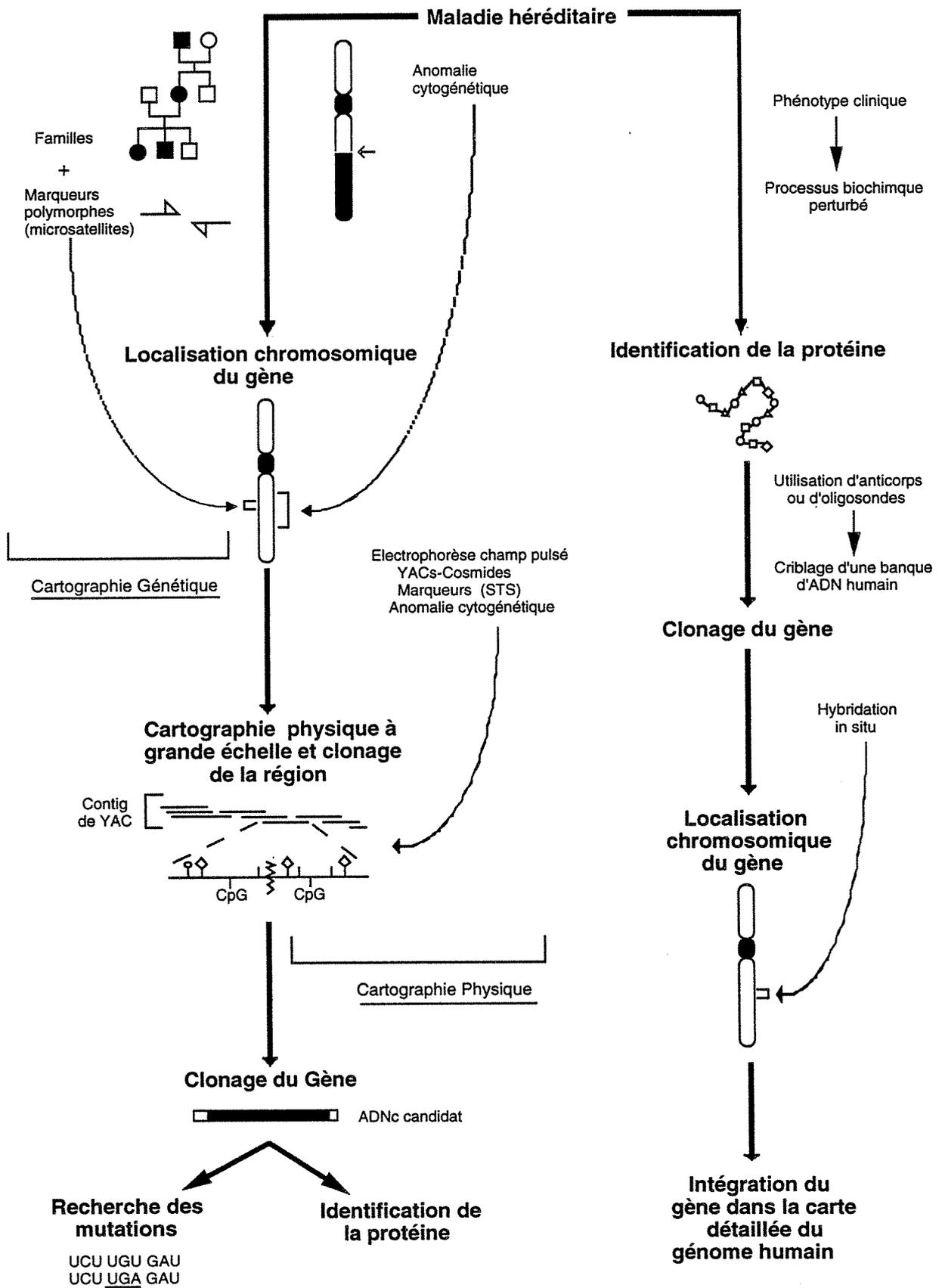


Figure 1 : Les deux grandes stratégies permettant d'isoler un gène à l'origine d'une maladie génétique.

s'expriment que dans certains tissus (gène de l'hémoglobine dans la lignée érythrocytaire par exemple).

Des mutations chromosomiques ou géniques peuvent altérer l'information génétique et dans certains cas avoir des conséquences sur le phénotype de l'individu qui en est porteur : on parle alors de maladie génétique qui, dans le cas où la mutation touche également les cellules reproductrices, sera également héréditaire.

* Les anomalies chromosomiques peuvent être :

- des anomalies de nombre (monosomie, trisomie ...),
- des anomalies de structure affectant un (délétion, duplication et inversion) ou plusieurs chromosomes (translocation et insertion).

Les anomalies chromosomiques sont souvent à l'origine de syndromes complexes car de nombreux gènes sont touchés par l'altération.

* Les mutations géniques correspondent à des variations plus fines du génome qui entraînent l'expression anormale d'un seul gène (sauf dans le cas où la mutation touche un gène régulateur). Elles sont à l'origine des pathologies mendéliennes monogéniques. Différents modes de transmission sont possibles pour les pathologies héréditaires suivant la nature de la mutation. Il existe des maladies à transmission autosomique dominante (AD), des maladies à transmission autosomique récessive (AR) et enfin des maladies qui sont liées au chromosome X.

* Les maladies héréditaires multifactorielles ont une composante génétique (avec souvent plusieurs gènes en cause intervenant à des degrés divers) doublée d'une influence du milieu.

La génétique humaine médicale a pour but ultime de guérir les sujets porteurs d'une affection génétique. Tout espoir de thérapie génique n'est envisageable que dans la mesure où le processus biochimique perturbé est connu. Pour la plupart des maladies héréditaires, le défaut biochimique n'est pas connu et la compréhension de la physiopathologie de la maladie passe d'abord par le clonage, par génétique inverse, du gène coupable (figure 1). Le clonage positionnel fait tout d'abord intervenir des techniques de cartographies génétique et physique permettant par la suite l'isolement du gène puis l'identification de la (ou des) mutation(s) à l'origine de la maladie. La connaissance de la séquence du gène permet enfin d'avoir accès à la protéine.

L'établissement de la carte du génome humain consiste à positionner et à ordonner les uns par rapport aux autres le plus grand nombre de gènes et de

séquences d'ADN anonymes sur les 23 chromosomes qui constituent le patrimoine héréditaire de l'espèce humaine. Deux approches, génétique et physique, permettent de progresser dans la cartographie du génome. La cartographie génétique sera brièvement abordée car les travaux présentés dans ce mémoire s'inscrivent dans le cadre de la cartographie physique.

B) LA CARTOGRAPHIE GÉNÉTIQUE

1) L'analyse de liaison génétique

Lorsque G. Mendel réalise ses expériences sur la transmission de deux couples de caractères allèles ("dihybridisme"), il en déduit qu'au moment de la formation des gamètes se produit une disjonction (ou ségrégation) indépendante des couples d'allèles (résultats énoncés dans la 3ème loi de Mendel). Un peu plus tard, T. Morgan et ses collaborateurs effectuent des croisements chez la drosophile pour vérifier l'hypothèse chromosomique de l'hérédité. Ils obtiennent des résultats qui font exception à la 3ème loi de Mendel : il n'y a pas disjonction indépendante des caractères pour certains couples d'allèles étudiés. Morgan en déduit que certains gènes sont liés ("linkage") et il explique facilement cette liaison en postulant que ces gènes sont portés par un même chromosome. De plus, Morgan démontre que le plus souvent les gènes portés par un même chromosome ne sont que partiellement liés : les associations recombinantes (par rapport aux génotypes parentaux) sont certes moins fréquentes que prévu par une ségrégation aléatoire mais apparaissent néanmoins dans des proportions variables en fonction du couple de gènes considérés. Les recombinants résultent d'échanges de matériel génétique entre chromatides soeurs au cours de la méiose (les chiasmas ou enchevêtrements de deux segments homologues de chromatides soeurs sont visibles au stade pachytène de la 1ère division méiotique). Morgan observe que la fréquence de recombinaison, encore nommée "crossing-over", entre deux gènes portés par un même chromosome est corrélée à la distance physique qui sépare les deux loci (ou emplacements) de ces gènes.

La première maladie dont le gène fût assigné à un chromosome a été le daltonisme (Wilson, 1911) et ce, en raison du mode de transmission

particulier des maladies liées au chromosome X. Chez l'homme, les premières ébauches de carte des gènes furent des cartes génétiques.

D'une manière générale, la localisation d'un gène, responsable quand il est muté d'une maladie héréditaire, commence par la recherche d'une liaison entre le locus de la maladie et un ou plusieurs marqueurs génétiques polymorphes.

En génétique humaine, il est nécessaire de procéder à une analyse familiale au cours de laquelle on recherche une liaison génétique entre le phénotype sain ou malade pour une pathologie donnée et l'une des formes alléliques d'un marqueur polymorphe. Il s'agit donc d'une analyse morganiennne où la distance génétique est un paramètre déterminé de façon indirecte par la fréquence de recombinaison. Pour pouvoir réaliser une analyse de liaison génétique il est nécessaire :

- de pouvoir tester un grand nombre de marqueurs polymorphes régulièrement répartis sur l'ensemble des chromosomes,
- d'être en mesure de suivre la ségrégation des loci étudiés au travers d'un grand nombre de méioses,
- de procéder à un traitement statistique des données afin de pouvoir établir les distances génétiques entre les différents loci étudiés.

2) Les marqueurs génétiques polymorphes

Un marqueur génétique est dit polymorphe s'il existe dans une population au moins deux variantes alléliques au locus de ce marqueur. L'informativité d'un marqueur est définie par la fréquence des hétérozygotes pour celui-ci dans la population (c'est-à-dire des individus présentant deux allèles différents sur leurs deux chromosomes homologues).

Avant les techniques de génétique moléculaire, seuls les polymorphismes phénotypiques, le plus souvent de nature protéique (groupes sanguins, enzymes, ...), étaient disponibles avec, comme désavantages, leur faible nombre et leur informativité médiocre. Ceci explique que, jusqu'au début des années 80, peu de gènes furent localisés sur les chromosomes humains.

L'avènement des techniques de l'ADN recombinant a permis d'avoir accès aux polymorphismes génotypiques (au niveau de l'ADN) beaucoup plus nombreux et, comme nous le verrons pour les polymorphismes de "dernière génération", très polymorphes.

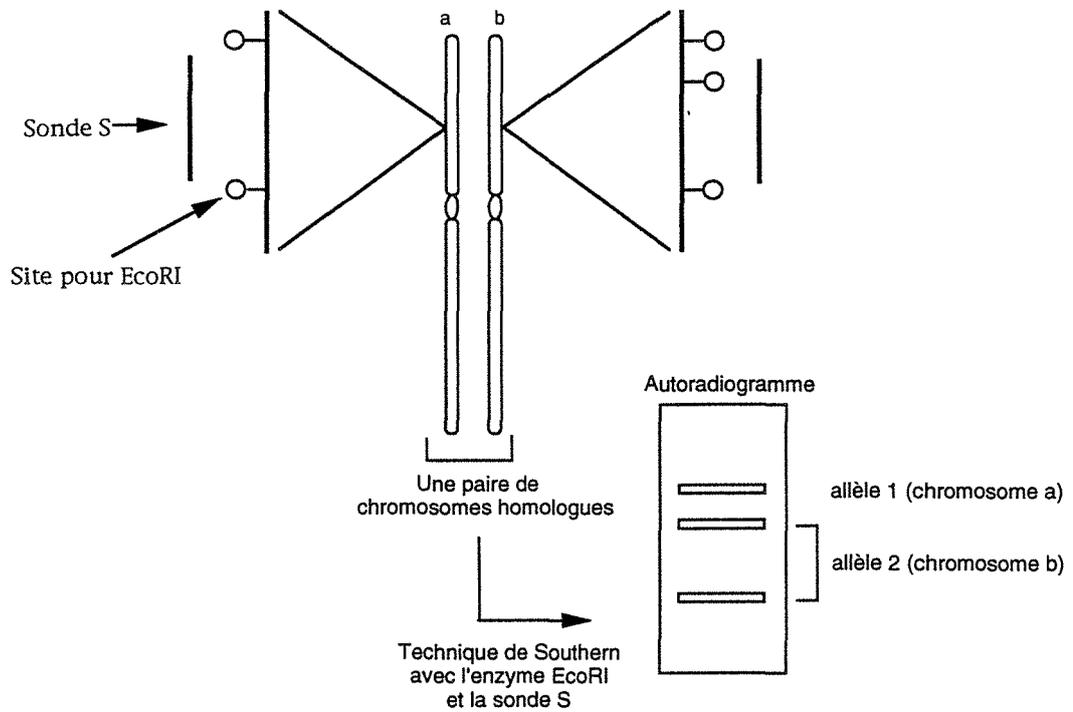


Fig. 2 : RFLP (Polymorphisme bi-allélique).

Il existe un polymorphisme de site de restriction pour l'enzyme EcoRI permettant de distinguer les deux chromosomes d'une même paire chez un individu hétérozygote au locus de la sonde S. Les deux bandes révélées par cette sonde sur le chromosome b (allèle 2) traduisent un site supplémentaire pour EcoRI non présent sur le chromosome a.

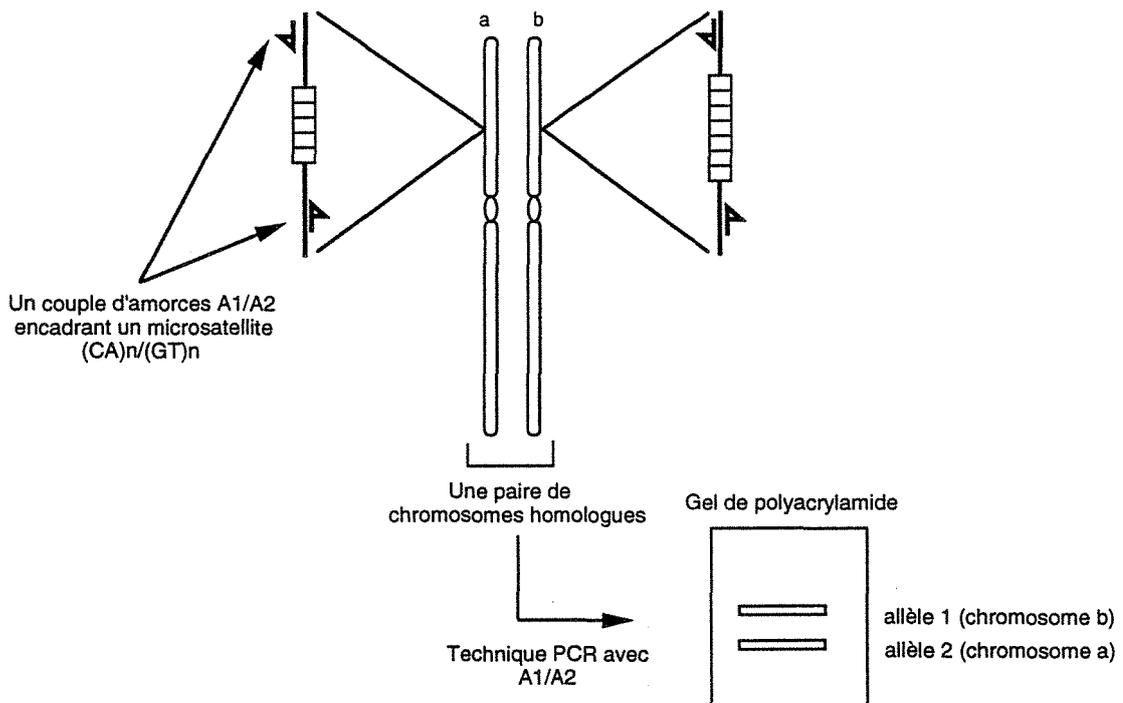


Figure 3 : Microsatellite (Polymorphisme multi-allélique).

Mise en évidence, par PCR, d'un microsatellite de type $(CA)_n/(GT)_n$. Les amorces A1/A2 sont des séquences uniques situées de part et d'autre d'un microsatellite. Dans cet exemple il existe 5 copies du motif (CA) sur le chromosome a et 7 copies sur le chromosome b. Les produits d'amplification chez cet individu hétérozygote diffèrent donc de 4 pb. Ce type de polymorphisme est multi-allélique car le nombre de répétition est très variable d'un chromosome à l'autre.

Les RFLP

(Restriction Fragment Length Polymorphism ou polymorphisme de longueur des fragments de restriction, Kan et Dozy, 1978)

Ces polymorphismes sont définis par le couple sonde d'ADN (le plus souvent anonyme)/enzyme de restriction. On estime qu'environ une paire de bases sur 100 à 200 serait polymorphe dans le génome humain (Cooper et al., 1985). De tels polymorphismes peuvent supprimer ou créer des sites de coupure pour les enzymes de restriction. L'analyse de l'ADN selon la méthode de Southern (1975), permet, grâce à l'étude des profils de restriction de distinguer chez un individu hétérozygote les deux chromosomes d'une même paire (figure 2). Bien que très fréquents dans le génome, les RFLP sont le plus souvent bi-alléliques avec une informativité limitée à 50% (loi de Hardy-Weinberg pour une population en panmixie). Avec les VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) dont font partie les minisatellites (séquences répétées en tandem avec un motif commun central de 11 à 16 pb) (Jeffreys et al., 1985), l'informativité est bien supérieure : pour un polymorphisme à n allèles de fréquence égale à a_i , la fréquence d'hétérozygotie sera $f = 1 - \sum_{i=1}^n a_i^2$.

Les microsatellites

"La carte génétique de l'homme enfin sur orbite ... de microsatellites"
(Weissenbach, 1993)

Il existe beaucoup de variations du génome non détectables à l'aide de la technique de Southern car ne modifiant pas suffisamment la taille des fragments de restriction. La mise au point de la technique d'amplification élective d'une séquence d'ADN *in vitro* (PCR pour Polymerase Chain Reaction) constitue l'innovation technologique la plus importante de ces dernières années en génétique moléculaire. Cette technique permet l'analyse de variations très fines, allant jusqu'au simple changement d'une seule paire de bases, si elle est couplée à une analyse en DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) ou en SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism).

Les microsatellites, ainsi nommés en raison de leur analogie avec les minisatellites, sont formés d'une répétition en tandem d'un motif très simple de quelques paires de bases. Ils constituent des marqueurs hyperpolymorphes (informativité très souvent supérieure à 70%) du fait de la grande variabilité, d'un chromosome à l'autre, du nombre de copies de la

séquence répétée. Dans l'espèce humaine, les microsatellites de type $(CA)_n/(GT)_n$ (n compris entre 5 et 50) ou "CA repeats" sont les plus fréquents. On estime qu'ils sont uniformément distribués sur l'ensemble du génome, même dans les introns ou à proximité des gènes, à raison d'un microsatellite tous les 10 à 100 kb (et ce à la différence des minisatellites plutôt localisés au niveau des télomères). En outre, les polymorphismes des microsatellites sont aisément mis en évidence par PCR suivie d'une analyse des produits d'amplification par électrophorèse en gel d'agarose ou, si nécessaire, en gel de polyacrylamide dénaturant (figure 3). Enfin, les microsatellites présentent également l'avantage, par rapport aux sondes d'ADN clonées, d'être disponibles très rapidement pour l'ensemble de la communauté scientifique car il suffit d'interroger une base de données ou de consulter une revue pour faire ensuite synthétiser un couple d'amorces encadrant la répétition.

Depuis leur première description par Weber et May (1989), de très nombreux microsatellites ont été caractérisés, fournissant ainsi autant de balises très utiles pour la cartographie génétique. Nous citerons comme exemple le travail systématique réalisé par J. Weissenbach à Généthon avec quelques 814 marqueurs microsatellites isolés puis localisés grâce aux familles du CEPH (voir paragraphe suivant) sur la carte du génome humain (Weissenbach et al., 1992).

3) L'analyse de liaison génétique est une analyse familiale

Pour estimer le fréquence de recombinaison entre deux ou plusieurs marqueurs polymorphes, il est nécessaire de suivre la transmission de ces marqueurs au cours d'un grand nombre de méioses. En génétique humaine, on procède à des analyses de liaison sur des familles d'autant plus "utiles" que le nombre de générations ainsi que celui d'enfants à chaque génération est plus important.

La localisation du gène à l'origine d'une pathologie héréditaire nécessite l'examen de familles où ségrège cette pathologie, d'où l'intérêt de rassembler et de conserver les génomes de telles familles sous forme de lignées lymphoblastiques qui constituent une source inépuisable de matériel génétique. D'autre part, de grandes familles ne présentant aucune maladie génétique sont également très intéressantes pour établir une carte génétique précise de l'ensemble des marqueurs polymorphes disponibles. Le CEPH (Centre d'Etude du Polymorphisme Humain) fondé par J. Dausset en

1983 a immortalisé le patrimoine génétique de quelque 58 familles comportant chacune 3 générations (les 4 grand-parents, les parents et en moyenne 6 enfants), soit au total 1212 méioses. Cet organisme a distribué l'ADN de ces familles à plus de 100 laboratoires de par le monde. Le CEPH a vite connu un franc succès car la collection de familles présente des avantages multiples. Dans ce vaste travail coopératif qu'est l'établissement d'une carte précise du génome humain, le CEPH, en collaboration avec le NIH (National Institute of Health) aux USA :

- fournit aux différentes équipes participant au consortium un matériel homogène et bien caractérisé,
- centralise les données en provenance des différents groupes et décèle d'éventuelles erreurs de génotypage,
- établit une carte génétique unique au lieu d'une multitude de cartes partielles obtenues avec des familles différentes.

4) Calcul des distances génétiques : statistique et cartographie génétique

Comme nous l'avons déjà évoqué, la localisation génétique d'un gène ou d'un marqueur d'ADN anonyme consiste à trouver une liaison entre le locus à cartographier et l'un des nombreux marqueurs polymorphes testés de façon séquentielle. Cette liaison sera déterminée de façon indirecte : plus deux marqueurs polymorphes sont proches physiquement l'un de l'autre, plus ils ont de chance, au cours des méioses successives, de co-ségréger sans changement de phase (une phase est une combinaison d'allèles portés par un même chromosome). On définit la distance génétique (d) comme étant le pourcentage de recombinaison entre deux loci. Son unité, le Morgan (ou unité de recombinaison), correspond à un intervalle statistique où se produit obligatoirement une recombinaison à chaque méiose. D'après des études de comptage de chiasmas (ou enjambements) pendant la gamétogenèse, réalisées par Morton (1991), il existe en moyenne 37 chiasmas (valeur moyenne entre les deux sexes sans compter les chromosomes sexuels) donc 37 recombinaisons au cours de chaque méiose. La longueur génétique totale du génome humain haploïde est donc estimée à 37 Morgans pour 3.10^9 pb soit une moyenne de 10^6 pb pour un centimorgan (cM) (en cartographie génétique on utilise plus couramment le cM qui équivaut à 1% de recombinaison). Pour reprendre l'expression de Kaplan et Delpech (1993), "le centimorgan est un étalon élastique puisqu'il peut fluctuer entre 5.10^5 et

1.10^7 pb". En effet, il existe des régions où les recombinaisons sont plus fréquentes (les points chauds ou "hot-spots" de recombinaison comme les régions télomériques) la relation $1cM = 10^6$ pb devient alors $1cM \ll 10^6$ pb. Inversement les régions proches des centromères sont moins propices aux échanges méiotiques et dans ce cas $1cM$ peut correspondre à beaucoup plus que 10^6 pb. Enfin, il faut noter que pour une même longueur physique la longueur génétique de l'ensemble des 22 autosomes est plus grande chez la femme (4782 cM) que chez l'homme (2809 cM), avec un record pour le chromosome 20 génétiquement 2,59 fois plus long chez la femme (Morton, 1991).

La distance génétique entre deux marqueurs est donc définie par la fréquence de recombinaison (notée θ). La formule la plus couramment utilisée est la suivante :

$$d(cM) = -\frac{1}{2} \ln(1 - 2\theta).$$

La mise en évidence d'une liaison génétique entre deux loci peut dans certains cas être le fruit du hasard. En outre, on comprend intuitivement que plus le nombre de méioses étudiées est grand, plus la distance génétique estimée est proche de la vérité. L'interprétation des résultats d'une analyse de liaison nécessite donc un traitement statistique des données.

La méthode la plus utilisée est celle des lod scores ("logarithm of odds") (Morton, 1955). La valeur de θ peut varier entre $\theta = 0$ (liaison forte) et $\theta = 0,5$ (absence de liaison traduisant une ségrégation indépendante des deux loci). Pour chaque valeur de θ (de 0 à 0,5), on teste l'hypothèse selon laquelle les marqueurs sont effectivement séparés par cette distance génétique (on note la probabilité de cette hypothèse $p(\theta)$) par rapport à l'hypothèse de non liaison génétique (probabilité $p(\theta = 0,5)$). $p(\theta = 0,5)$ correspond à la probabilité pour que les résultats de liaisons observés soient le simple fait du hasard.

En pratique, on passe aux logarithmes décimaux des rapports de vraisemblance permettant ainsi de manipuler des nombres plus petits et surtout d'additionner des résultats obtenus avec plusieurs familles et donc d'augmenter la significativité des distances calculées. Le lod score est donc défini par :

$$Z(\theta) = \text{Log} \frac{p(\theta)}{p(\theta = 0,5)}.$$

On trace ensuite une courbe $Z(\theta) = f(\theta)$. θ_{\max} est le pourcentage de recombinaison pour lequel le lod score est maximal. On estime qu'il faut un

lod score $Z(\theta) \geq 3$ pour pouvoir affirmer que la liaison est réelle ($Z(\theta) = 3$ signifie que l'hypothèse selon laquelle les marqueurs sont liés est 1000 fois plus probable que celle d'une absence de liaison), un lod score < -2 permet au contraire d'exclure toute liaison génétique entre les deux marqueurs considérés. Comme il s'agit d'une analyse statistique, il est nécessaire d'associer à toute distance génétique un intervalle de confiance d'autant plus petit que le nombre d'événements (les méioses) testés est grand.

Lorsque l'on étudie plus de deux marqueurs simultanément, on peut aussi établir l'ordre le plus probable et les distances entre les différents marqueurs, on parle alors d'analyse de liaison multipoint.

5) L'établissement d'une carte génétique fine du génome humain

Depuis la découverte des RFLP (Kan et Dozy, 1978), de très nombreux marqueurs polymorphes ont été caractérisés sur l'ensemble du génome et bien entendu la carte génétique en a grandement bénéficié. Une étude prévisionnelle (Botstein et al., 1980) envisageait déjà, au tout début des années 80, la création d'une carte comportant un RFLP tous les 20 cM en procédant à une analyse systématique de familles sélectionnées à l'aide d'un arsenal de 150 marqueurs polymorphes régulièrement espacés. En raison de leur répartition peu homogène et de leur faible informativité, ces RFLP sont vite apparus comme des outils médiocres. Néanmoins, en 1987 une carte "à 10 cM" (avec un intervalle moyen de 10 cM entre les marqueurs) est publiée (Donis-Keller et al., 1987) avec prévision d'une carte à 1 cM dans les 5 ans à venir. Mais les progrès furent plus lents que prévus, le consortium NIH/CEPH ayant fait paraître récemment une carte génétique avec 1416 loci assignés avec un écart moyen de moins de 5 cM (NIH/CEPH collaborative mapping group, 1992). Il faut également remarquer que certains chromosomes (ou certaines régions) sont beaucoup mieux loti(e)s que d'autres en raison des recherches électives réalisées pour la localisation et clonage de gènes à l'origine de maladies héréditaires fréquentes (mucoviscidose en 7q31-q32, syndrome de l'X fragile en Xq27.3 ...). La tentation est grande en effet de se focaliser sur la région spécifique où est situé un gène dont le clonage sera très "payant" en terme de publications et de renommée. La construction d'une carte génétique couvrant la totalité du génome humain nécessite une vaste collaboration internationale où le consortium CEPH/NIH devrait jouer un rôle déterminant. Le nombre toujours

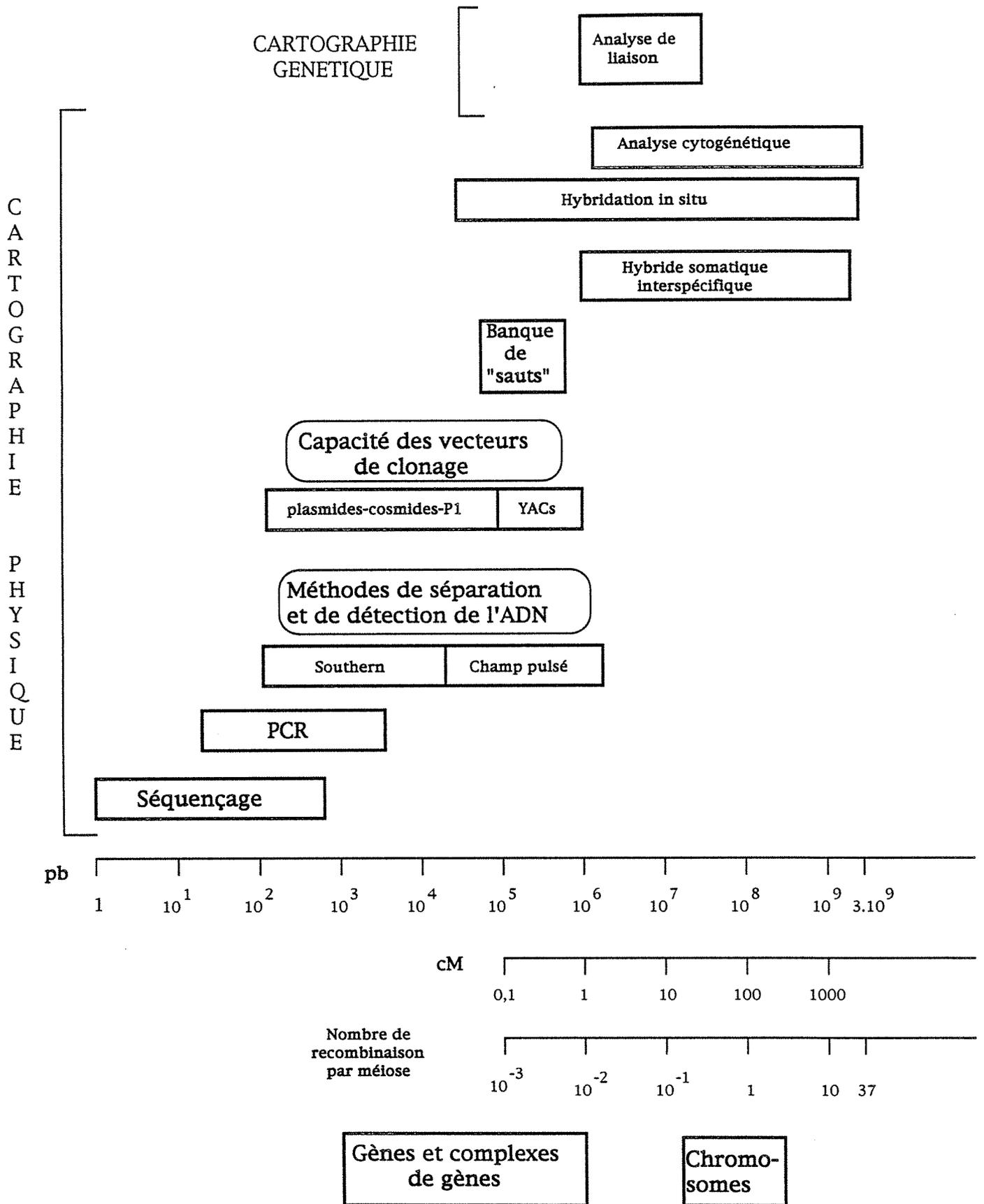


Figure 4 : Pouvoir résolutif des différentes méthodes d'exploration du génome humain. (adapté d'après J.C. Kaplan et M. Delpech, 1993)

Il a été supposé que 1 cM correspond à 1000 kb.

croissant de microsatellites disponibles pour les analyses de liaison devrait permettre, dans un avenir proche, de saturer le génome humain avec une balise tous les cM.

C) LA CARTOGRAPHIE PHYSIQUE

A la différence de l'approche génétique, l'établissement de la cartographie physique repose sur des méthodes directes de localisation car se référant à la molécule d'ADN, support physique de l'hérédité. D'autre part, il est possible d'utiliser des marqueurs ADN non polymorphes.

L'établissement de la carte physique consiste à localiser et à ordonner des séquences d'ADN (codantes ou non) au sein de régions ou intervalles dont la taille est très variable en fonction de la résolution des différentes méthodes utilisées (figure 4). La cartographie génétique n'est possible que pour des marqueurs distants de 500 à 10 000 kb (soit 0,5 à 10 cM) alors que l'approche physique permet d'appréhender des distances allant de la centaine de Mb (un chromosome) jusqu'à la pb, niveau de résolution ultime atteint grâce au séquençage. La carte physique du génome humain a grandement bénéficié du développement des cultures de cellules humaines et animales *in vitro* puis, plus récemment, des méthodes et des outils de la génétique moléculaire.

1) Les techniques cytogénétiques

Les anomalies chromosomiques au service de la cartographie
(résolution maximale : 10 à 20 Mb)

L'observation du stock chromosomique d'un individu porteur d'une maladie génétique permet quelquefois de déceler une anomalie importante (monosomie, trisomie) ou plus fine (délétion, duplication, translocation) et, par là même, de localiser le (ou les) gène(s) en cause sur la portion du chromosome remanié. L'analyse des chromosomes d'un sujet est réalisée en établissant un caryotype. Pour ce faire, il est nécessaire de pouvoir disposer de cellules somatiques (le plus souvent des lymphocytes) en division. Les chromosomes en métaphase sont étalés puis observés après coloration : chaque chromosome est alors caractérisé par une morphologie et une

séquence de bandes qui lui sont propres. Les techniques cytogénétiques de haute résolution (Yunis et al., 1976), permettent d'analyser les chromosomes en prométaphase et ainsi de détecter des microréarrangements (microduplications et surtout microdélétions). Il est parfois possible grâce à un microréarrangement d'assigner un gène dans une sous-bande soit dans quelques millions de pb seulement. Les réarrangements chromosomiques ont joué un rôle déterminant pour le clonage, par génétique inverse, d'un grand nombre de gènes à l'origine de maladies autosomiques dominantes (AD) ou récessives liées à l'X (RX). L'observation d'une translocation ou d'une insertion, même équilibrée (c'est-à-dire sans perte de matériel chromosomique) associée à une pathologie mendélienne AD indique que le gène en cause est lésé du fait de la cassure : on parle de "pathologie du point de cassure". La découverte d'un tel réarrangement pour une maladie dont le gène n'est pas encore assigné à un chromosome donné permet donc d'éviter l'étape d'analyse de liaison génétique parfois fastidieuse. De la même façon, la survenue d'une pathologie RX chez une femme porteuse d'une translocation X;Autosome (t(X;A)) positionne le gène de la maladie au niveau du point de cassure sur l'X.

Enfin, l'association de plusieurs maladies génétiques chez le même individu résulte le plus souvent d'une délétion qui emporte plusieurs gènes voisins : on parle alors de "syndrome des gènes contigus". Le syndrome WAGR (tumeur de Wilms - Aniridie - Gonadoblastome - Retard mental) avec une délétion de la région 11p13 en est un exemple autosomique (Francke et al., 1979).

Des exemples de réarrangements au service de la cartographie de pathologies liées à l'X seront décrits dans le chapitre concernant le chromosome X.

Hybridation in situ

Cette méthode de cartographie est la plus directe. Un fragment d'ADN, marqué par incorporation d'une base portant un atome radioactif (^3H) ou une molécule fluorescente, peut être hybridé à sa région complémentaire sur des chromosomes en métaphase ou en interphase. L'hybridation in situ (HIS) avec un isotope radioactif nécessite l'observation d'un grand nombre de métaphases pour s'affranchir d'un bruit de fond incontournable. On lui préfère l'HIS à l'aide de sondes fluorescentes (FISH : Fluorescence In Situ Hybridization), plus rapide et plus résolutive (figure 5). En outre, elle permet

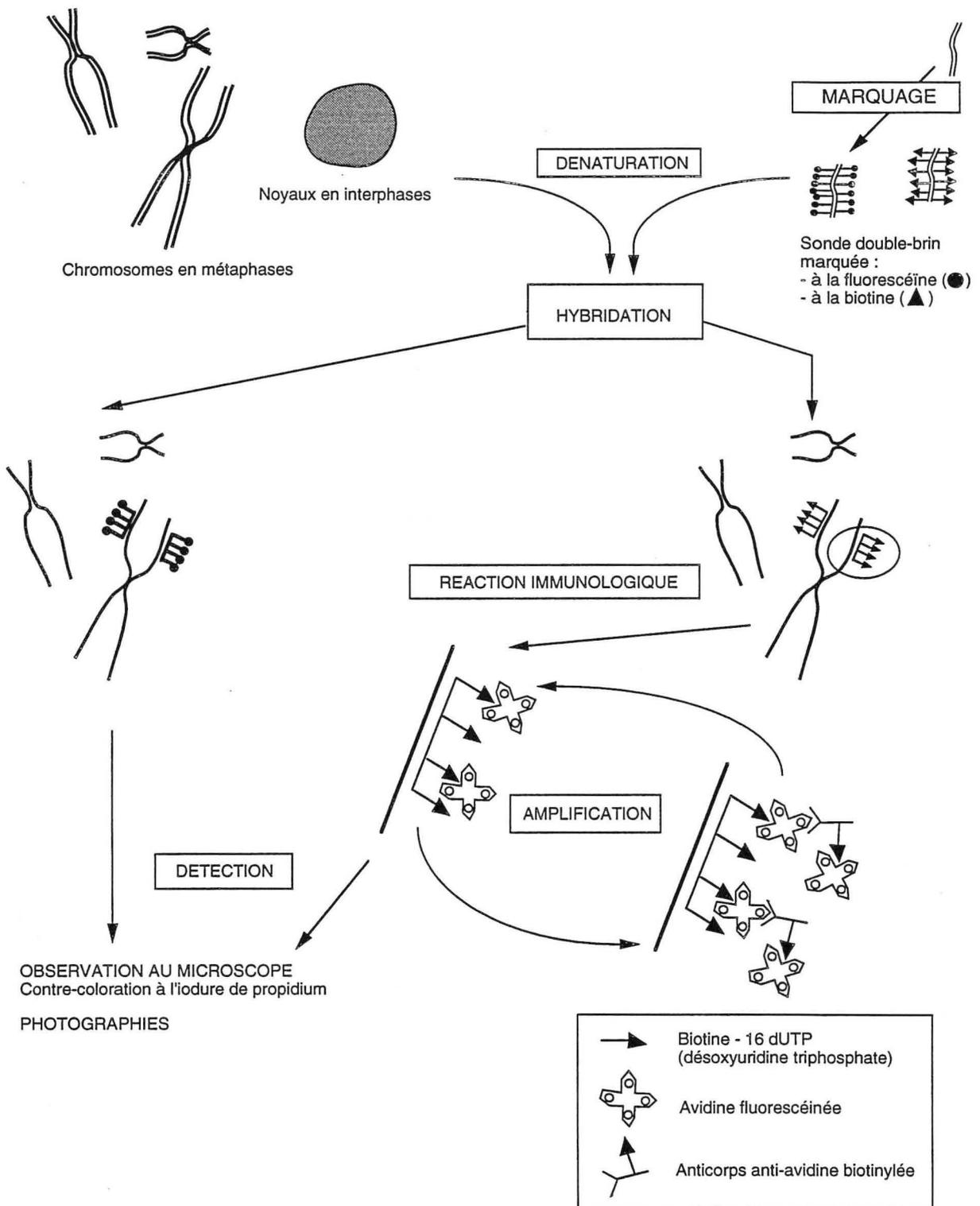


Figure 5 : Les différentes étapes de l'hybridation in situ en fluorescence (FISH).

La sonde est marquée par incorporation d'un nucléotide modifié (biotinylé ou fluorescéiné). La détection peut être directe (sonde marquée avec un nucléotide fluorescéiné) ou nécessiter une réaction immunologique (sonde marquée avec un nucléotide biotinylé). Il est possible, au cours de la détection immunologique, d'amplifier le signal.

l'hybridation et la localisation simultanée et comparative de plusieurs sondes marquées par des fluorochromes différents sur une même métaphase.

FISH sur chromosomes métaphasiques

(résolution maximale : quelques Mb)

Ce type d'approche est efficace pour localiser une sonde sur une région subchromosomique ou pour positionner un marqueur par rapport à une anomalie cytogénétique telle qu'un point de cassure ou un site fragile.

FISH sur noyaux en interphase

(résolution maximale : de 1 Mb à 20kb)

Dans les noyaux en interphase, la chromatine est beaucoup moins condensée et il est donc possible par FISH d'obtenir un pouvoir de résolution beaucoup plus grand (c'est-à-dire de distinguer des séquences plus proches). Cette technique est donc très intéressante pour ordonner les une par rapport aux autres plusieurs sondes contiguës. Classiquement, on peut distinguer des marqueurs séparés par 0,1 à 1 Mb. Des améliorations de l'approche interphasique, consistant à décondenser et à étirer l'ADN à l'extérieur du noyau, ont permis récemment d'améliorer encore le pouvoir de résolution jusqu'à quelques dizaines de kb (Bentley-Lawrence et al., 1992 ; Parra et Windle, 1993).

La microdissection

A l'aide d'un micromanipulateur, il est possible de prélever par dissection une région chromosomique d'intérêt (de la taille d'une bande). Le clonage de l'ADN ainsi isolé (à l'aide de la PCR) permet de créer des banques spécifiques d'une région donnée (MacKinnon et al., 1990).

2) Les méthodes parasexuelles

A partir du moment où les techniques de culture de cellules de mammifères furent correctement maîtrisées (notamment aux niveaux des nutriments indispensables et des précautions pour éviter toute contamination microbienne), il devenait alors possible de mettre en place des méthodes d'analyse génétique basées sur l'étude des cellules somatiques (l'ensemble des cellules du corps, par opposition aux cellules germinales, ovules et spermatozoïdes). Nous avons déjà évoqué l'immense avantage que procure l'établissement d'une lignée lymphoblastique continue, source inépuisable

d'ADN et de chromosomes. Bien avant que l'on ait découvert la possibilité d'immortaliser une lignée cellulaire, les cultures de cellules somatiques ont permis de procéder à des analyses de génétique formelle (c'est-à-dire de cartographie des gènes) chez des animaux supérieurs. Avant les techniques de l'ADN recombinant, la seule méthode pour localiser des gènes était l'analyse morganiennne qui procède à l'aide de croisements sexués. Ce type d'analyse s'est révélé efficace pour des organismes à temps de génération très court (20 minutes par exemple pour *E. coli*). Appliquée aux mammifères, l'analyse de liaison est trop lente avec en plus, pour l'espèce humaine, l'impossibilité d'orienter les croisements. Dès lors qu'il devenait possible de cultiver des cellules somatiques *in vitro*, se sont développées des méthodes parasexuelles (car tirant partie de croisement de cellules somatiques et non de cellules germinales) pour la cartographie des gènes.

Historiquement, les premières observations d'hybrides somatiques sont l'oeuvre des virologistes qui avaient remarqué que certains virus (variole, varicelle, ...) étaient capables de faire fusionner deux ou plusieurs cellules somatiques : ils voyaient en effet apparaître au sein de cultures de tissus épithéliaux infectés par ces virus, des cellules géantes à plusieurs noyaux (Henle et al., 1954 ; Okada et al., 1962). L'innovation consistant à créer volontairement et de façon dirigée des cellules hybrides revient à Barski et à ses collaborateurs Sorieul et Cornefert qui ont fusionné deux lignées tumorales de souris (Barski et al., 1960). Il s'agissait alors d'un hybride somatique intraspécifique non utilisable pour l'établissement de la carte des gènes car formé de la réunion de deux génomes provenant d'une même espèce. Les hybrides intraspécifiques ont néanmoins permis de réaliser des études de complémentation fonctionnelle et de régulation de l'expression d'un grand nombre de gènes d'espèces diverses.

Les hybrides somatiques interspécifiques (HSI) obtenus par fusion de deux cellules appartenant à deux espèces différentes sont, à l'inverse des précédents, très utiles pour les études cartographiques. En effet, comme nous le développerons par la suite, les HSI perdent préférentiellement, au cours des mitoses successives, les chromosomes de l'une de deux espèces parentales. Ils deviennent donc des outils de choix pour la localisation des gènes de l'espèce dont les chromosomes sont éliminés progressivement de l'hybride.

L'hybridation somatique interspécifique consiste en un transfert d'une proportion variable du génome d'une espèce dans une cellule d'une autre espèce. Dans la mesure où il est possible de faire la différence entre l'ADN (ou les protéines) des deux espèces parentales, on peut ensuite corréler la présence ou l'absence de tel gène (ou de telle séquence d'ADN anonyme) avec

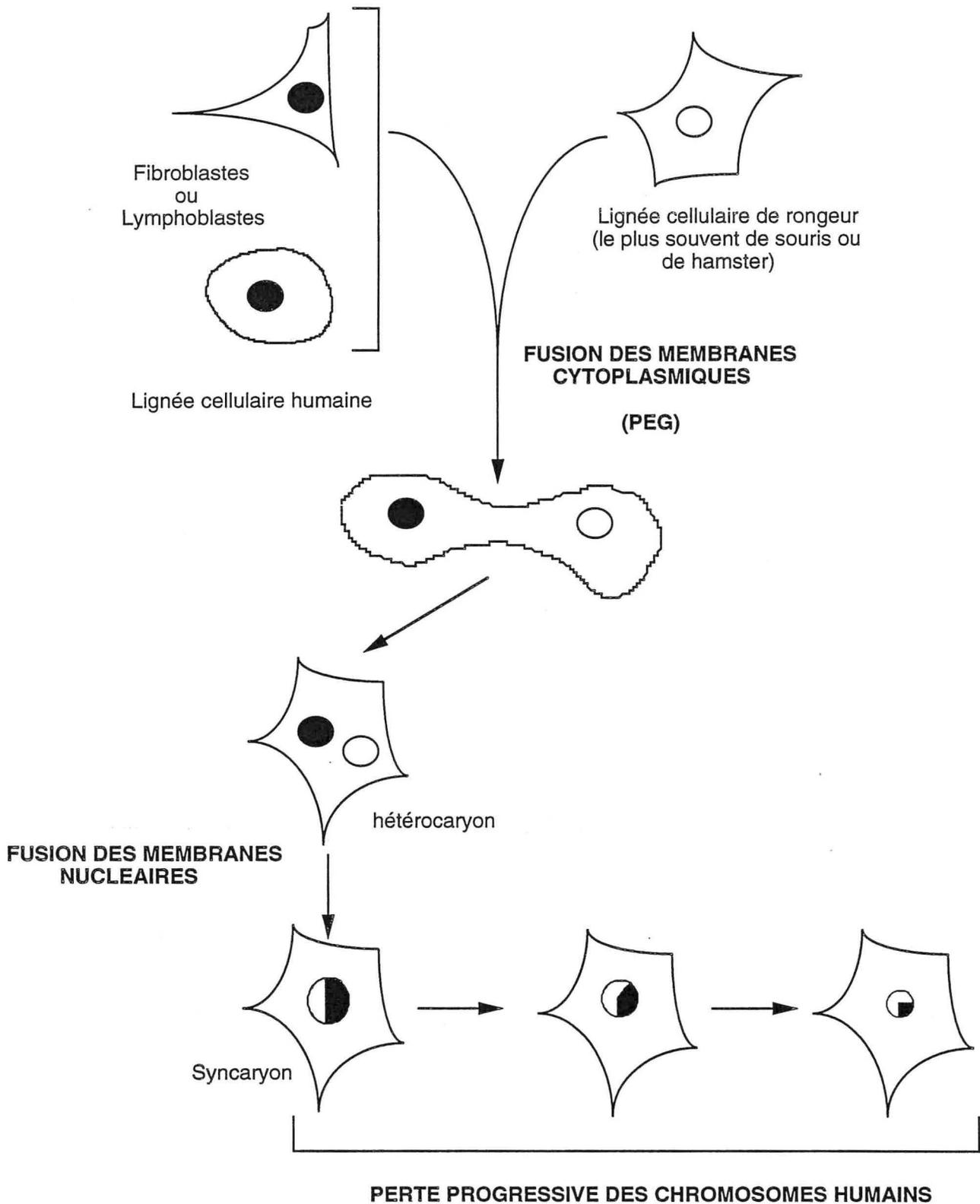


Figure 6 : Fabrication d'un hybride somatique interspécifique "homme/rongeur".

Dans le cas de la fusion d'une cellule humaine avec une cellule de rongeur, ce sont les chromosomes humains qui sont perdus préférentiellement au cours des divisions successives de l'hybride. Ces hybrides "homme/rongeur" sont donc intéressants pour la cartographie du génome de l'espèce humaine.

la garniture chromosomique de l'espèce étudiée au sein de différents clones hybrides.

a) Les hybrides somatiques interspécifiques

Formation dirigée de cellules hybrides

Il est possible, expérimentalement, de faire fusionner les membranes cytoplasmiques de deux cellules appartenant à deux espèces différentes pour obtenir dans un premier temps un hétérocaryon, c'est-à-dire une cellule où les deux noyaux parentaux sont encore visibles. Après la première division de cet hétérocaryon, on obtient un syncaryon par suite de la fusion des membranes nucléaires (figure 6). Ce processus est grandement favorisé par la présence du virus de Sendai inactivé par les rayons UV (Yerganian et Neil, 1966). Néanmoins, l'utilisation d'un virus pour favoriser la fusion cellulaire présente deux inconvénients : les différents types cellulaires ne sont pas tous sensibles au même virus et chaque "lot" de virus a une activité variable.

Pour ces raisons, Pontecorvo (1975) mit au point un procédé de fusion cellulaire utilisant le polyéthylène glycol (PEG) ; en effet, ce composé chimique était utilisé de longue date par les botanistes pour la fusion de cellules végétales. D'autres variantes furent ensuite développées comme par exemple l'utilisation du PEG couplé au diméthylsulfoxyde (DMSO). Si les syncaryons (cellules hybrides) sont mis en culture avec une densité faible, des clones cellulaires apparaissent et toutes les cellules dérivent alors d'une seule et même cellule hybride. Ces clones peuvent être ensuite "repiqués" et fournir un matériel précieux pour des analyses génétiques ultérieures.

Les premiers hybrides fabriqués par Barski avaient un avantage sur leurs espèces parentales : ils avaient une vitesse de croissance très supérieure. Ils constituaient donc très vite une fraction suffisamment importante de la population cellulaire pour pouvoir être isolés par clonage. Par contre, un problème se pose si les cellules hybrides se développent moins vite que l'une ou l'autre des espèces parentales (ce qui se produit quand les lignées d'origine ne sont pas issues de processus néoplasique). Dans tous les cas où, naturellement, l'hybride ne possède pas un avantage sélectif, il est impératif de trouver une méthode pour lui conférer un tel avantage et donc l'isoler des souches parentales.

Isolement des hybrides : les systèmes sélectifs

Au cours des années 60 et 70, de nombreux systèmes de sélection ont été mis au point. Les diverses méthodes utilisent des lignées mutantes :

- incapables de répliquer leur ADN (les plus utilisées),
- nécessitant un composé particulier (auxotrophie nutritionnelle),
- sensibles aux variations de température.

Nous expliquerons tout d'abord le principe de ces systèmes pour, par la suite, ne développer que deux exemples très utilisés (notamment dans notre travail) lors des expériences d'hybridation somatique interspécifique.

Principe des systèmes sélectifs

Les deux lignées parentales sont chacune déficientes pour une enzyme intervenant dans la synthèse de l'ADN, donc indispensable pour toute division cellulaire. Ainsi, si l'on croise une lignée (a) déficiente pour l'enzyme E_1 (notée E_1^-) avec une lignée (b) déficiente pour l'enzyme E_2 (notée E_2^-), l'hybride qui comporte les deux génomes parentaux sera, par suite de complémentation fonctionnelle, E_1^+ (grâce au génome de la lignée b) et E_2^+ (du fait de la présence du génome de la lignée a). Si, après la fusion cellulaire, les cellules sont cultivées dans un milieu sélectif n'autorisant que la croissance des cellules $E_1^+ E_2^+$, alors seules les cellules hybrides seront récoltées.

Sélection dans un milieu de culture HAT

Ce système de sélection, qui fût historiquement le premier, a été mis au point par Littelfield (1964). La sélection des cellules hybrides est effectuée dans un milieu de culture HAT (Hypoxanthine, Aminoptérine, Thymidine).

Il existe deux voies de synthèse de l'ADN pour les cellules cultivées *in vitro* (figure 7).

La voie de synthèse endogène peut être bloquée par l'aminoptérine (acide 4 amino N10 méthyl ptéroyl glutamique) qui inhibe la déhydrate folate réductase, enzyme indispensable pour l'anabolisme des nucléotides à partir de sucres et d'acides aminés.

La deuxième voie de synthèse de l'ADN, exogène, ne peut être empruntée par une cellule que sous deux conditions

- que le milieu de culture comporte deux substances, l'une permettant la synthèse des nucléotides puriques : la thymidine, et l'autre la synthèse des nucléotides pyrimidiques : l'hypoxanthine,

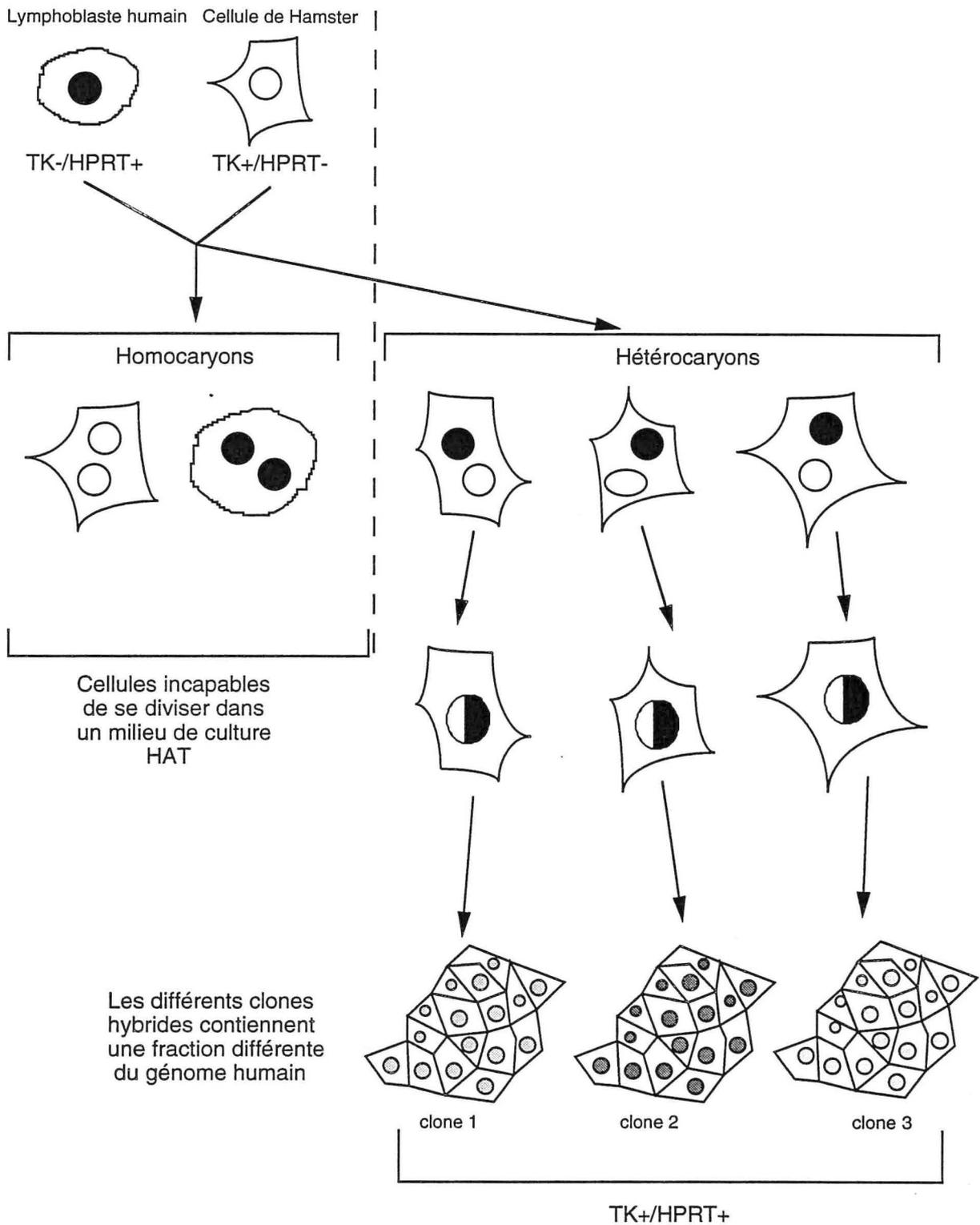


Figure 8 : Le système de sélection utilisant le milieu HAT.

Après fusion des lignées parentales, les différents types cellulaires sont mis en culture dans un milieu HAT. Les deux lignées parentales ainsi que les homocaryons, déficients pour l'une des deux enzymes indispensables à la voie de synthèse exogène de l'ADN, ne peuvent se diviser.

Seuls les hybrides interspécifiques se multiplient ; on obtient ainsi des clones contenant une fraction différente du génome humain avec néanmoins en commun le chromosome X (tout ou partie) qui porte le gène HPRT fonctionnel.

- que la cellule possède une activité thymidine kinase (TK⁺) et hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase (HPRT⁺).

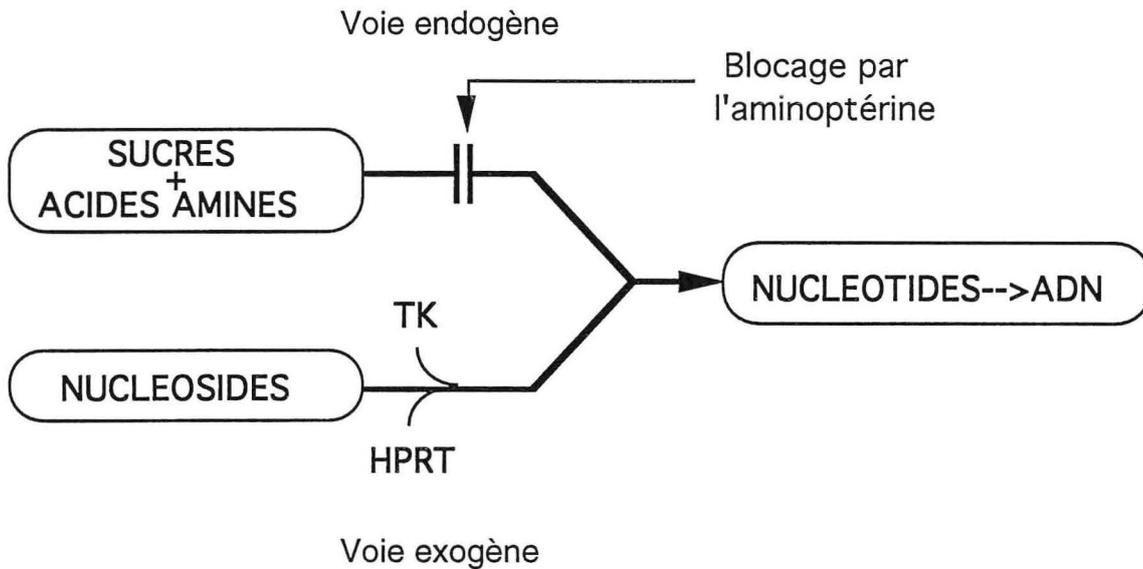


Figure 7 : Les deux voies de synthèse de l'ADN

Ainsi, une lignée cellulaire TK⁻/HPRT⁺ fusionnée avec une lignée TK⁺/HPRT⁻ donnera naissance à un syncaryon TK⁺/HPRT⁺ seul capable de se diviser dans le milieu de sélection HAT (figure 8).

Sélection dans un milieu de culture HAT + ouabaïne

Le système de Littelfield présente un inconvénient majeur : il nécessite le "croisement" de deux lignées cellulaires chacune déficiente pour une enzyme différente, les deux déficiences pouvant être abolies par complémentarité fonctionnelle dans les cellules hybrides. Or, il est beaucoup moins contraignant de pouvoir fusionner, avec une lignée de rongeur "de référence" dépourvue d'une activité enzymatique donnée, n'importe quelle lignée humaine. En effet, comme nous le verrons par la suite, la plupart des hybridations somatiques interspécifiques sont effectuées à partir d'une lignée humaine porteuse d'une anomalie chromosomique (délétion, translocation) mais sans aucune déficience enzymatique pouvant faire l'objet d'une complémentarité fonctionnelle.

Un nouveau système de sélection, dérivé de celui de Littlefield et basé sur l'utilisation de l'ouabaïne (ou strophantine G qui est un inhibiteur de la pompe Na⁺/K⁺), a été développé suite à des travaux de Mankovitz et al. (1974) et de Kucher-Lapati et al. (1975). Ce système semi-sélectif tire partie d'une

différence de sensibilité à l'ouabaïne entre la lignée de rongeur (très résistante) et la lignée humaine (beaucoup plus sensible). Un hybride issu du "croisement" d'une cellule de rongeur résistante avec une cellule humaine sensible aura une sensibilité intermédiaire à l'ouabaïne. L'adjonction, dans le milieu de sélection, d'ouabaïne à une concentration supérieure à celle supportée par la lignée humaine mais inférieure à la concentration létale pour l'hybride permettra donc de se débarrasser de la lignée humaine. Si, d'autre part, la souche de rongeur est HPRT⁻ avec pour milieu de sélection un milieu HAT, alors seuls les hybrides "homme/rongeur" seront capables de se diviser.

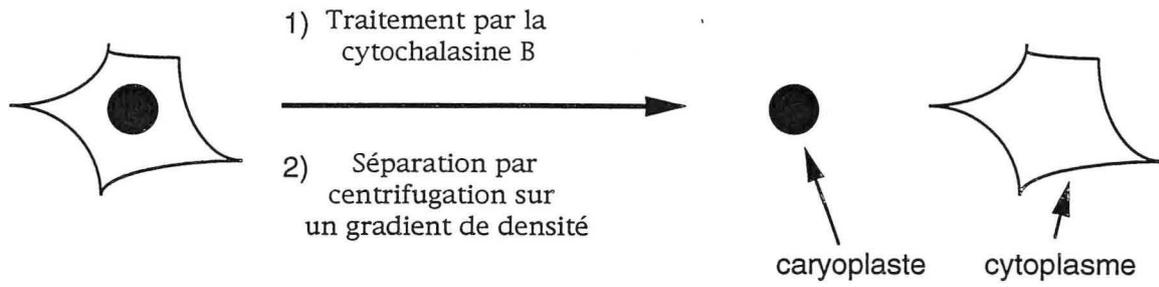
Les hybrides "homme/hamster" présentés dans cette thèse ont été sélectionnés dans un milieu de culture HAT + ouabaïne.

Les hybrides interspécifiques perdent les chromosomes de l'une des deux espèces

Nous avons déjà évoqué la tendance des HSI à perdre les chromosomes de l'une des deux espèces parentales. Il semble que cette ségrégation s'opère pendant les premières divisions de l'hybride, la garniture chromosomique devenant relativement stable par la suite. L'élimination chromosomique sera d'autant plus lente que les espèces parentales sont proches l'une de l'autre dans l'"échelle" évolutive. La direction de la ségrégation a été étudiée pour un certain nombre de couples d'espèces (tableau I).

Hybrides	Espèce perdant ses chromosomes
"rat/souris"	rat
"souris/hamster chinois"	souris
"homme/souris"	homme
"souris/hamster syrien"	souris
"homme/hamster syrien"	homme
"rat/homme"	rat
"homme/hamster chinois"	homme
"souris/chimpanzé"	chimpanzé
"hamster chinois/ gorille"	gorille

Tableau I : Direction de la ségrégation pour différents couples d'espèces



FABRICATION DES CARYOPLASTES DE HAMSTER

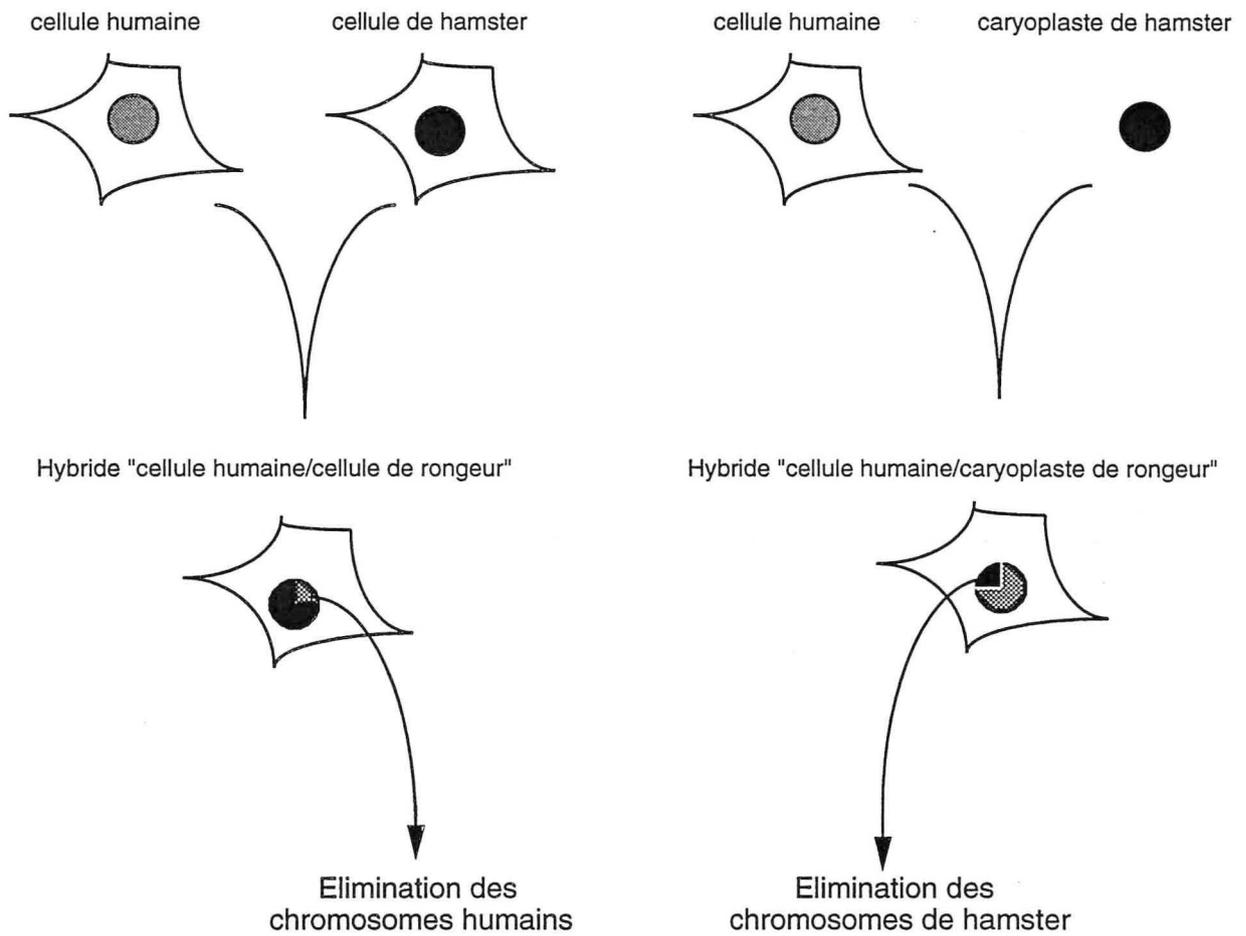


Figure 9 : Influence de facteurs cytoplasmiques sur la direction de ségrégation des chromosomes au sein d'hybrides "homme/rongeur".

On voit que le plus souvent lors de la fabrication d'hybrides "homme/rongeur", ceux-ci éliminent de façon préférentielle les chromosomes de l'espèce humaine. L'élimination sélective des chromosomes humains se fait de façon tout à fait aléatoire, ou tout du moins, s'il existe des règles présidant cette ségrégation, elles ne sont pas connues. Il n'est donc pas possible de fabriquer des HSI avec des garnitures chromosomiques "à la carte". Cependant, le milieu de sélection oblige l'HSI à conserver le chromosome humain porteur du gène qui code pour l'enzyme absente chez le rongeur. C'est ainsi que l'on peut retenir spécifiquement :

- le chromosome X porteur du gène de l'HPRT (Xq26.3),
- le chromosome 16 porteur du gène APRT (adénosine phosphoribosyl transférase) (16q24.2-qter),
- le chromosome 17 porteur du gène TK1 (17q23.2-q25.3).

La raison pour laquelle les chromosomes de l'une des deux espèces sont éliminés préférentiellement reste une énigme. Néanmoins, des expériences récentes conduites par Marshall-Graves J. et Barbieri I. (1992) ont apporté un début de réponse au phénomène de ségrégation orientée (figure 9). Il ressort de ces travaux que des facteurs cytoplasmiques seraient les déterminants majeurs de la direction de ségrégation des chromosomes. Dans le cas d'hybrides "homme/hamster", il semble exister des substances dans le cytoplasme du rongeur qui dominent les molécules équivalentes dans le cytoplasme humain. En effet, en l'absence de cytoplasme de rongeur (hybrides "cellule humaine/caryoplaste de hamster") ce sont les chromosomes du hamster qui sont perdus. Les facteurs cytoplasmiques en question n'ont pas été identifiés. Un autre exemple d'inversion de la direction de ségrégation des chromosomes au sein d'un hybride "homme/rongeur" avait déjà été décrit par Croce C. (1976) qui avait fusionné des macrophages de souris avec des cellules d'un fibrosarcome humain.

Utilisation des HSI pour la cartographie du génome humain

Il est possible de générer un éventail d'hybrides dans lequel chaque lignée clonale contient un lot différent de chromosomes humains. Une telle collection d'hybrides n'est utilisable que si, au préalable, on a caractérisé en détail la nature du matériel chromosomique humain présent dans chaque hybride. Lorsque l'on possède un tel panel d'hybrides, il devient possible de localiser physiquement n'importe quel marqueur ADN sur un chromosome donné (figure 10). Il est également possible d'utiliser les hybrides somatiques interspécifiques pour localiser des sondes d'ADN au sein de

		CHROMOSOMES HUMAINS																								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	<i>met</i> human	
HYBRIDE	A			■					■						■		■	■						■		-
	B														■		■	■					■			-
	C					■	■	■																		+
	D		■			■			■				■									■				-
	E							■																		-
	F	■		■		■		■		■					■					■			■		■	-
	G	■																								-
	H			■				■		■																-
	I	■				■		■		■					■					■			■		■	-
	J			■				■								■			■							+
	K											■					■					■		■		+
	L															■										-

Figure 10 : Cartographie d'une sonde d'ADN à l'aide d'une collection d'hybrides somatiques interspécifiques (d'après Cooper et al., 1984)

Une sonde ADN correspondant à l'oncogène humain *met* a été testée, selon la méthode de Southern, sur l'ADN d'un panel de 12 hybrides somatiques (A-L) contenant de 1 à 11 chromosomes humains en plus des chromosomes de rongeur :

- + = l'oncogène *met* est présent dans l'ADN de l'hybride,
- = l'oncogène *met* est absent.

Si l'on fait une corrélation entre la présence ou l'absence de *met* et les garnitures chromosomiques des différents clones, on en déduit que le gène *met* est localisé sur le chromosome 7.

différents intervalles d'un même chromosome : on utilise alors des hybrides contenant non plus des chromosomes entiers, mais plutôt des fragments différents d'un même chromosome. Pour le chromosome X, la littérature comporte de nombreux exemples de panel d'hybrides somatiques interspécifiques utilisés pour améliorer la carte physique de ce chromosome (Wieacker et al., 1984 ; Oberlé et al., 1986 ; Dietz-Band et al., 1990 ; Oberlé et al., 1990 ; Suthers et al., 1990 ; Rousseau et al., 1991 ; Lafrenière et al., 1991). Nous verrons qu'il est possible d'établir une carte physique relativement fine d'une petite région chromosomique (de la taille d'une bande) en utilisant des chromosomes transloqués ou délétés avec des points de cassure tous situés dans la région d'intérêt. Néanmoins, même avec une grande densité de points de cassure, il n'est guère possible avec des HSI "classiques" de descendre au-dessous d'une résolution de l'ordre de quelques Mb. Le développement plus récent de méthodes de transfert de plus petites fractions du génome de l'espèce humaine au sein de cellules hybrides permet de créer des cartes physiques encore plus fine.

b) Les hybrides somatiques interspécifiques de deuxième génération

Pour la cartographie physique, les HSI sont d'autant plus intéressants qu'ils contiennent peu de chromosomes humains. A l'extrême, il est très utile de pouvoir disposer d'hybrides ne contenant qu'un seul chromosome humain, voire même qu'un fragment de chromosome humain.

Transfert de chromosomes "nus"

(CMGT : Chromosome Mediated Gene Transfer)

McBride et Ozer (1973) ont mis au point un procédé permettant d'isoler des chromosomes à partir de cellules bloquées en métaphase ; ces chromosomes "en suspension" sont ensuite transférés dans une cellule receveuse. On peut ainsi obtenir directement un clone hybride ne contenant qu'un seul chromosome humain. Dans certain cas, de grands fragments de chromosome peuvent se stabiliser en s'intégrant dans un chromosome de la cellule hôte. Des protocoles de CMGT un peu plus élaborés ont été mis au point avec des sélections se basant sur des oncogènes, des marqueurs cellulaires de surface et des gènes de résistance exogènes intégrés dans un chromosome humain par recombinaison homologue (Porteous, 1987).

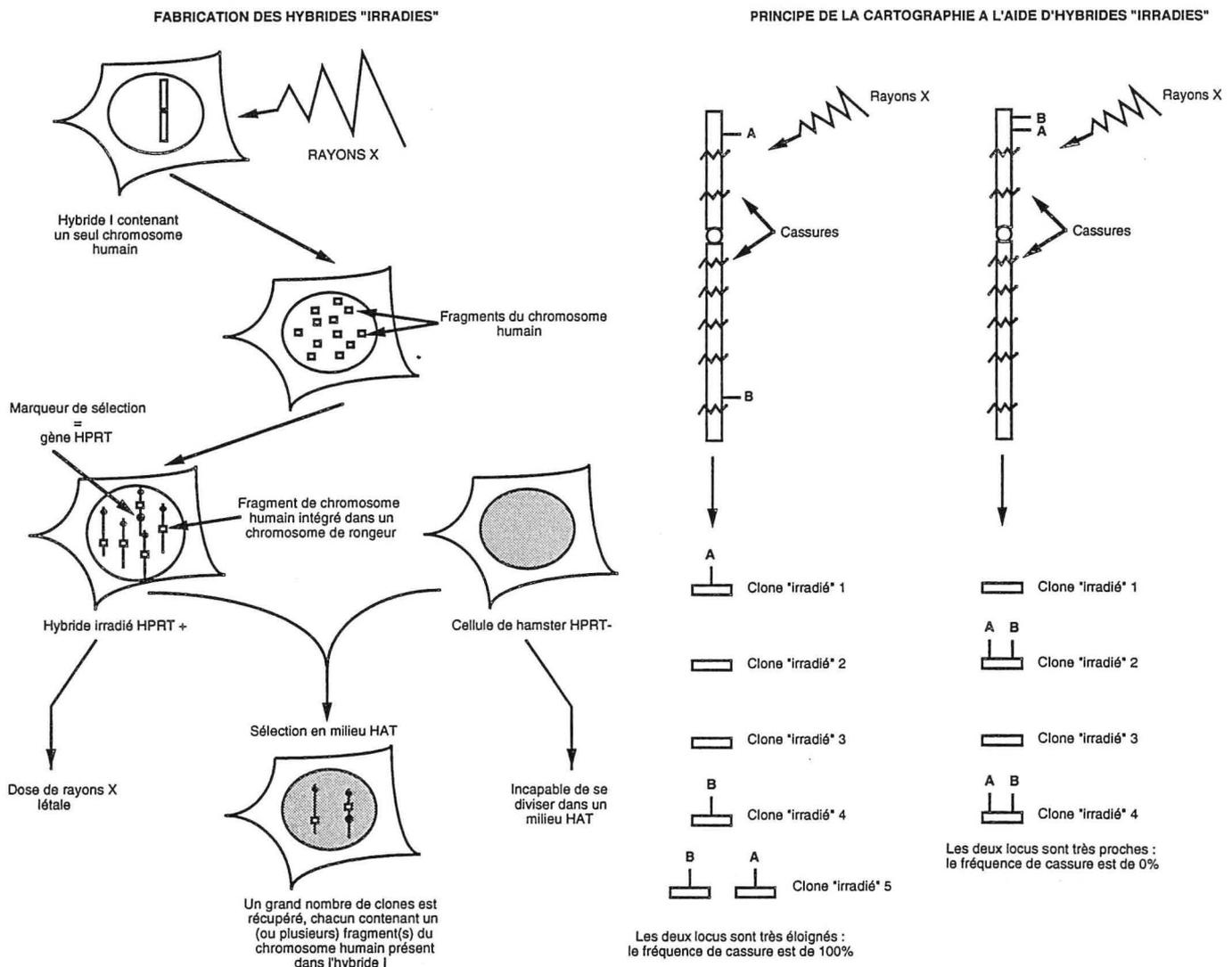


Figure 11 : Les hybrides irradiés et la cartographie du génome humain.

Comme chaque clone d'hybride "irradié" contient souvent plusieurs fragments différents des chromosomes humains, l'ordre entre les loci ne peut pas être déterminé à partir d'un seul clone. Il est donc nécessaire d'étudier un panel d'environ 100 clones. Le fait que deux marqueurs soient co-retenus dans un même clone ne permet pas à l'expérimentateur de dire si ces deux marqueurs sont contenus sur un même fragment de chromosome (donc proches l'un de l'autre) ou si ils sont portés par deux fragments différents pouvant être très éloignés sur le chromosome humain. Il est donc nécessaire d'avoir recours à une analyse statistique des données obtenues à l'aide d'hybrides "irradiés".

Transfert de chromosomes par l'intermédiaire de "microcellules"

(MMCT : Microcell-Mediated chromosome transfer)

Dans cette technique, les chromosomes sont transférés enveloppés dans un micro-noyau. Le procédé de formation de ces micro-nuclei (par centrifugation, en présence de cytochalasine B, de cellules bloquées en métaphase) a été mis au point par Ege et Ringertz (1974). C'est Fournier et Ruddle (1977) qui utiliseront les premiers ces "microcellules" pour transférer du matériel génétique d'une espèce à une autre.

Les hybrides somatiques interspécifiques "irradiés"

(IFGT : Irradiation and Fusion Gene Transfer)

La fabrication d'hybrides "irradiés" est basée sur des travaux de Goss et Harris (1975). Les chromosomes humains, avant d'être transférés dans une cellule de rongeur par hybridation somatique interspécifique, sont fragmentés sous l'action d'une forte dose de rayons X (figure 11). De nombreux clones hybrides "irradiés" sont ensuite récupérés et analysés à l'aide de marqueurs ADN humains. Le principe de la cartographie à l'aide d'hybrides "irradiés" est le suivant : plus deux marqueurs sont éloignés l'un de l'autre sur un chromosome, plus la probabilité qu'une cassure survienne entre leurs deux loci est grande. Deux marqueurs situés sur deux fragments chromosomiques différents après irradiation auront peu de chance d'être retenus simultanément dans un même clone alors que deux marqueurs très proches ne seront quasiment jamais séparés par une cassure et donc seront toujours "transmis" ensemble dans les clones hybrides. En estimant la fréquence de cassure, et donc la distance entre différents marqueurs, il est possible d'établir une carte des loci étudiés d'une façon analogue à l'analyse de liaison méiotique (pour un article de synthèse sur cette approche, voir Walter et Goodfellow, 1993). Dans ce type d'approche, les distances indirectes sont exprimées en centiRays (cR par analogie aux cM) ; elles dépendent bien sûr de la dose de rayons X appliquée. En général, la dose de rayons X appliquée est inférieure à 10 000 rad sauf dans les cas où une très haute résolution est nécessaire comme par exemple lors d'expériences de clonage positionnel. 1cR8000 (1% de cassure entre deux marqueurs à une exposition de 8000 rads) équivaut en moyenne à 50 kb (Cox et al., 1990).

Bien souvent, les hybrides "irradiés" sont fabriqués à partir d'un HSI conventionnel ne contenant que tout ou partie d'un seul chromosome

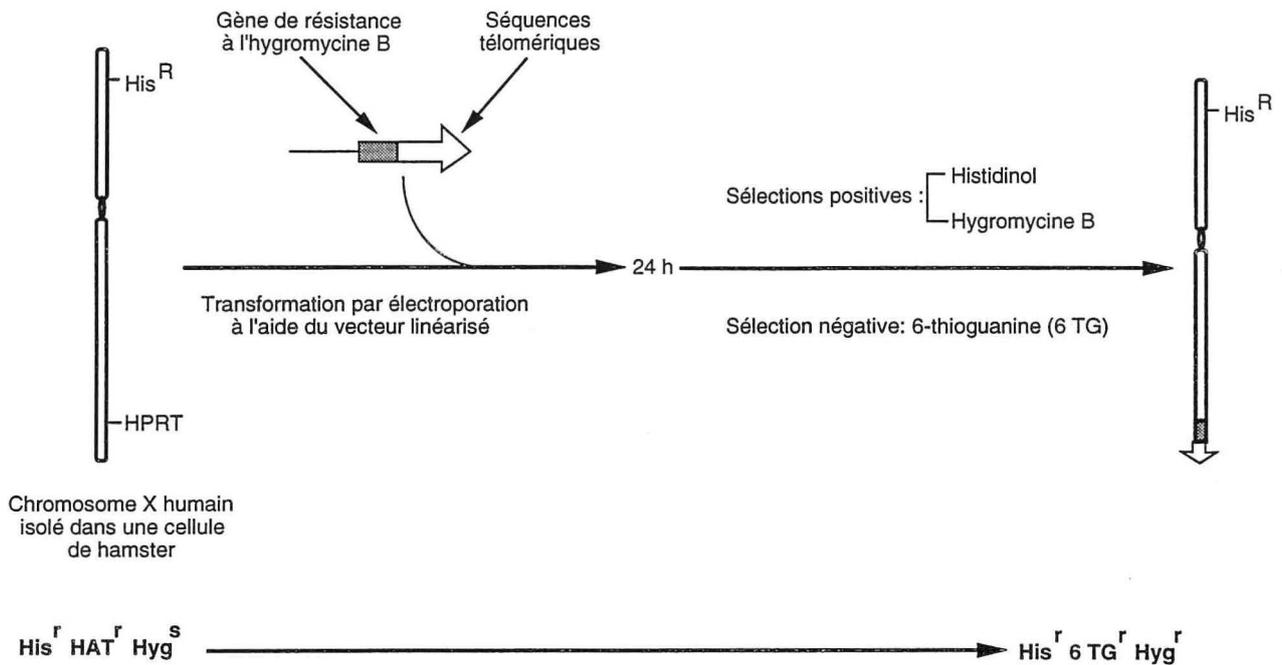
humain. Il est possible, grâce à cette méthode d'ordonner des marqueurs sur plusieurs Mb avec une résolution de 500 kb environ. Très récemment, une nouvelle méthode de cartographie dénommée "Happy mapping" utilise également un procédé mimant la méiose (Dear et Cook, 1993). Dans cette approche de cartographie physique, des cassures (analogues aux recombinaisons) sont provoquées par une irradiation aux rayons γ . L'ADN est ensuite dilué afin d'obtenir des fractions équivalentes à un génome haploïde (ou à un gamète) qui sont ensuite analysées pour tester la "co-ségrégation" de deux ou plusieurs marqueurs. Avec cette méthode, en fonction de la dilution choisie, le pouvoir de résolution peut varier de quelques kb à quelques Mb.

Les hybrides somatiques interspécifiques de "deuxième génération" sont non seulement très utiles pour la localisation de sondes d'ADN mais fournissent également un matériel de choix pour la création de banques d'ADN spécifiques, permettant ainsi de saturer avec de nombreuses nouvelles sondes une région d'intérêt du génome. Néanmoins, ils souffrent d'une part du faible nombre de marqueurs de sélection (tel que le gène de l'HPRT pour la région Xqter) et d'autre part de la survenue de réarrangements fréquents et imprévisibles de l'ADN humain transféré. Pour pallier ces limitations, des méthodes d'hybridations cellulaires plus élaborées ont été récemment développées.

c) Les hybrides somatiques interspécifiques de troisième génération

Fragmentation non ciblée d'un chromosome suivie d'intégration de séquences télomériques
(TACF : Telomere Associated Chromosome Fragmentation)

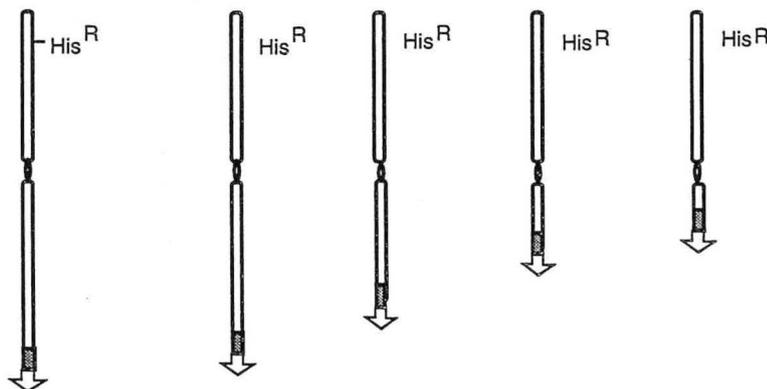
Depuis la mise au point des chromosomes artificiels (YAC pour Yeast Artificial Chromosome) pour le clonage de grands fragments d'ADN dans la levure, les séquences télomériques sont bien connues et clonées. La TACF (Farr et al., 1992) utilise la possibilité de stabiliser un chromosome "cassé" par intégration d'un vecteur porteur de séquences télomériques. Grâce à ce système, il est possible de créer artificiellement des points de cassure sur l'un des deux bras d'un chromosome donné. Il est néanmoins nécessaire de disposer d'un marqueur de sélection positive et d'un marqueur de sélection



L'hybride "homme-rongeur" de départ est capable de se diviser dans un milieu HAT car le chromosome X humain porte le gène HPRT en q26.3. De plus, le chromosome X humain porte un gène de résistance à l'histidinol en pter (ce gène a été introduit par recombinaison homologue au locus MIC2). Le vecteur recombinant porteur des séquences télomériques et d'un gène de résistance à l'hygromycine B est introduit dans l'hybride.

Quand l'hygromycine et la 6 TG sont ajoutées dans le milieu de culture, seules les cellules ayant perdu le gène HPRT (la 6 TG est un analogue de substrat de l'enzyme HPRT transformée en un composé toxique pour les cellules) et comportant le gène de résistance à l'hygromycine pourront se multiplier. Ceci se traduit au niveau chromosomique par un processus en deux temps :

- 1) une cassure sur l'X humain proximale par rapport au locus du gène HPRT,
- 2) une intégration au niveau du point de cassure du vecteur porteur des séquences télomériques.



Création d'un panel de chromosomes X porteurs de délétion terminale des bras longs par TACF.

Figure 12 : Fragmentation de chromosome par TACF. (d'après Farr et al., 1992)

négative sur un même chromosome. Une fois la cassure "provoquée" par l'application simultanée des deux pressions de sélection, la partie du chromosome portant le centromère est stabilisée à l'aide des séquences télomériques exogènes situées sur un vecteur linéarisé. C'est ainsi que les équipes de Goodfellow et Cooke ont créé, à partir d'un hybride somatique avec comme seul chromosome humain le chromosome X, un panel de clones porteurs de délétion terminale de l'X avec points de cassure situés entre Xcen et Xq26.3 (localisation du gène HPRT utilisé pour la contre-sélection à l'aide de la 6-thioguanine) (figure 12). Cette méthode permet donc de saturer un bras chromosomique par un grand nombre de points de cassure isolés au sein de clones hybrides dépourvus de réarrangement grossier (entre chromosomes humains et chromosomes de rongeurs) ou de délétion interstitielle. En outre, le vecteur utilisé pour apporter les séquences télomériques peut servir d'hameçon pour "pêcher" la séquence adjacente au site d'intégration. La présence d'une duplication (de 1 à 2 Mb) des séquences à proximité du site d'intégration du vecteur rend plus délicate l'utilisation de ces lignées hybrides pour l'établissement de carte de restriction à grande échelle.

Hybridation somatique interspécifique et intégration ciblée d'un marqueur de sélection

Comme nous l'avons déjà évoqué, les applications de la génétique des cellules somatiques sont sévèrement limitées par le faible nombre de marqueurs de sélection pour tel ou tel chromosome humain. Très récemment, ce problème a été contourné grâce au phénomène de recombinaison homologue qui permet l'introduction à un locus choisi d'un marqueur de sélection universel.

Le gène neo (conférant la résistance à l'antibiotique G418) a été introduit par recombinaison homologue sur un chromosome 7 humain (7q11) isolé au préalable dans un hybride somatique conventionnel. Ce chromosome 7 porteur du gène neo a ensuite été utilisé pour des expériences de CMGT (Chromosome Mediated Gene Transfer) (Dorin et al., 1992).

D'autre part, des expériences de TACF avec point de cassure ciblé (toujours par recombinaison homologue) au niveau du chromosome 1 ont également été réussies (Itzhaki et al., 1992).

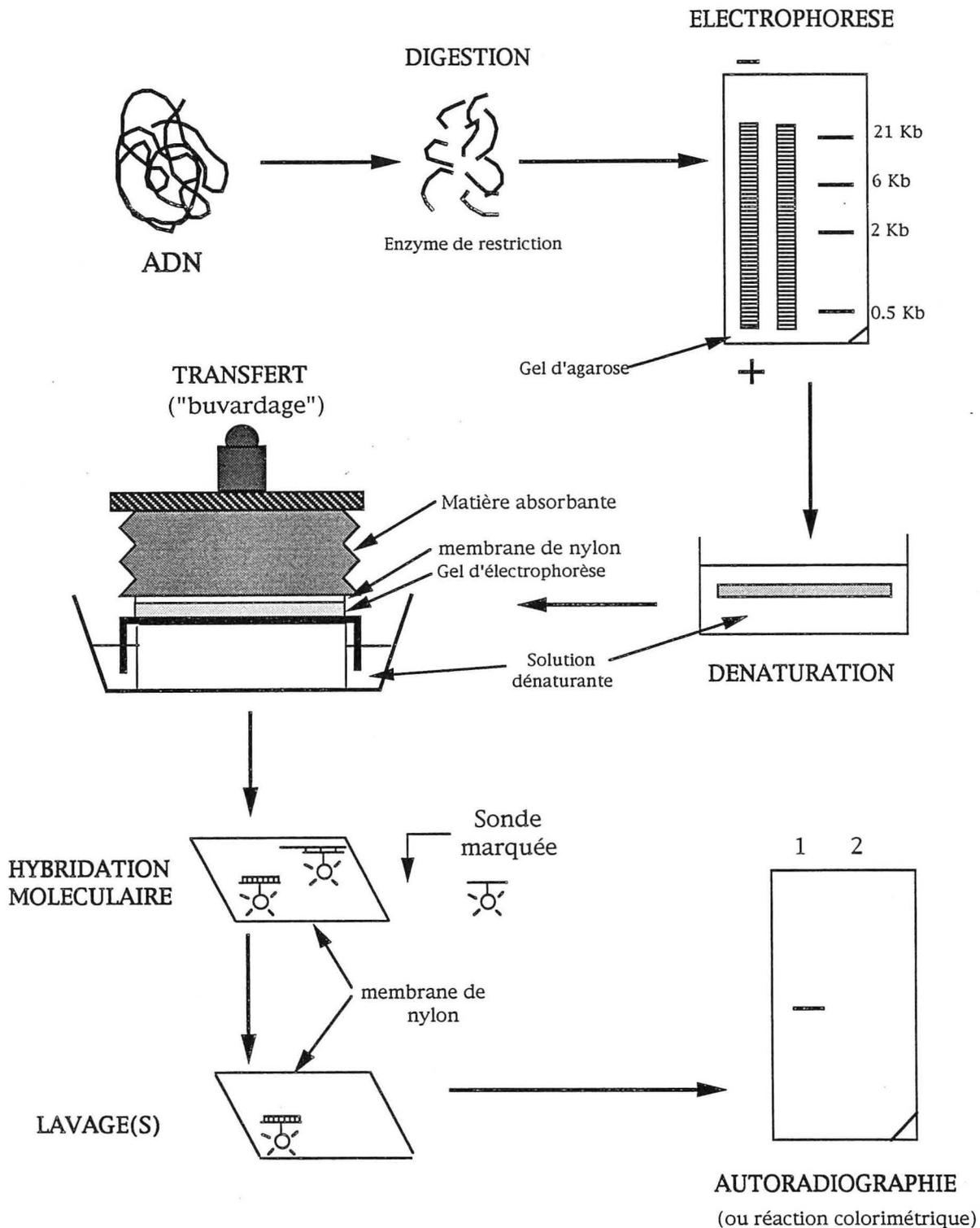


Figure 13 : Les différentes étapes de la technique de Southern .

(adapté d'après Kaplan et Delpech, 1993)

10 µg d'ADN natif débarrassés des protéines sont digérés par une enzyme de restriction choisie en fonction de la sonde utilisée. Après séparation puis transfert de l'ADN digéré, préalablement rendu simple brin, sur une membrane de nylon (l'ADN y est fixé de façon covalente), l'hybridation moléculaire avec une sonde marquée est réalisée. Le marquage peut être radioactif ou non radioactif ("froid"). Après des lavages de stringence croissante, la présence de la sonde est révélée par autoradiographie. Dans le cas d'un marquage non radioactif, des étapes de révélation immuno-enzymatiques sont nécessaires avant de mettre en évidence la sonde par autoradiographie ou par réaction colorimétrique. De plus en plus, les méthodes de marquage "froid" supplantent l'utilisation du ³²P.

3) Les approches moléculaires

Les méthodes de la génétique moléculaire utilisent un certain nombre d'outils pour explorer l'ADN même chez des organismes possédant un patrimoine héréditaire très complexe. Les outils du génie génétique offrent la possibilité notamment :

- de couper l'ADN de façon prévisible et reproductible avec les enzymes de restriction,
- de faire des copies d'un fragment d'ADN grâce aux ADN polymérases,
- de fabriquer des molécules chimères à l'aide des ADN ligases.

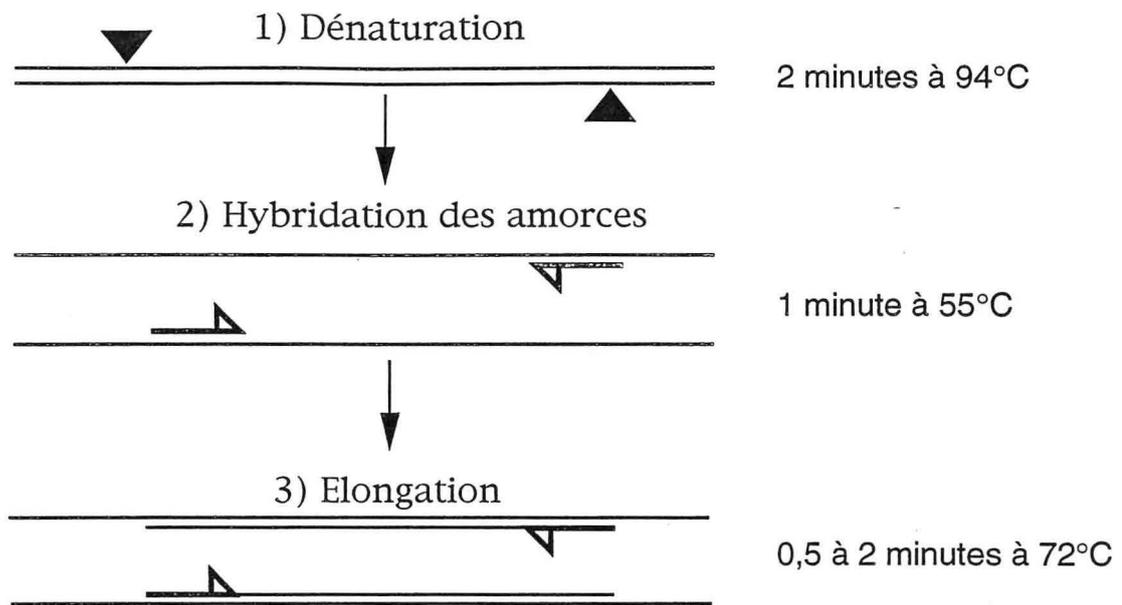
On peut ainsi cloner un fragment d'ADN en l'insérant dans un vecteur pour ensuite le faire pénétrer et l'amplifier dans une cellule hôte. Il est possible de créer des banques d'ADN où l'ensemble du génome d'une espèce est découpé en fragments qui peuvent ensuite être étudiés séparément.

A partir de ces éléments "de base", de très nombreuses approches ont été développées pour analyser le génome humain et ses variations. La cartographie du génome humain bénéficie énormément des retombées des techniques moléculaires.

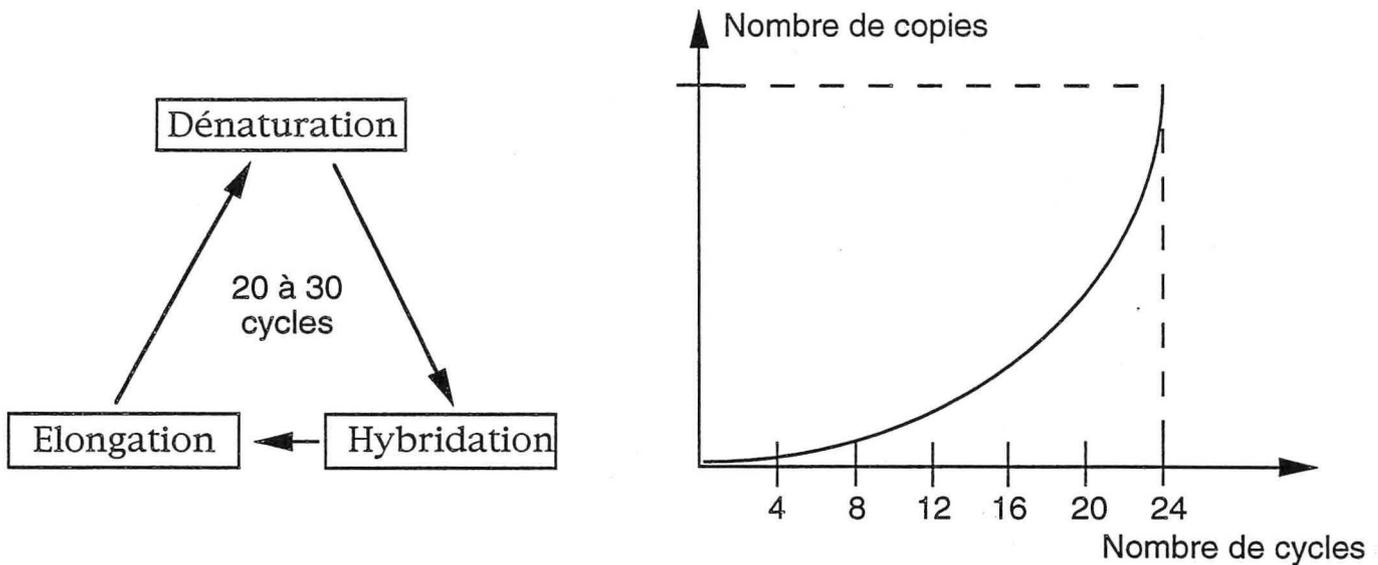
a) Les techniques de base

La méthode de Southern

Cette méthode (figure 13), mise au point par Southern (1975), permet de visualiser n'importe quelle fraction du génome pourvu que l'on possède une sonde s'hybridant spécifiquement avec la séquence que l'on veut mettre en évidence. Cette analyse de l'ADN peut être réalisée après une électrophorèse conventionnelle ou après une électrophorèse en champ pulsé (PFGE : Pulse Field Gel Electrophoresis). Lors d'une électrophorèse classique, les fragments d'ADN sont séparés sous l'effet d'un champ électrique unidirectionnel. Ce type d'approche ne permet pas, même en diluant au maximum le gel d'agarose, la séparation de fragments supérieurs à 30 ou 40 kb. L'électrophorèse en champ pulsé (Schwartz et Cantor, 1984) a permis de résoudre ce problème : en modifiant périodiquement la direction du champ électrique, on arrive à séparer des morceaux d'ADN allant jusqu'à 10 Mb. Pour une séparation en PFGE, il est nécessaire d'une part de prendre beaucoup de précautions lors de l'extraction de l'ADN afin de ne pas le casser



UN CYCLE D'AMPLIFICATION



n CYCLES D'AMPLIFICATION

AUGMENTATION EXPONENTIELLE DU NOMBRE DE COPIES

Figure 14 : L'amplification d'ADN *in vitro* par PCR.

La séquence située entre les deux triangles noirs est amplifiée de façon élective par une succession de 20 à 30 cycles d'amplification comportant chacun une étape de dénaturation, une étape d'hybridation des amorces, et une étape de synthèse. Au bout de 20 à 30 cycles, le nombre considérable de copies de la séquence encadrée par les deux amorces est tel qu'il est possible de visualiser le produit de PCR, après électrophorèse, par une simple coloration à l'aide d'un colorant spécifique de l'ADN ou de le repérer à l'aide d'une oligosonde spécifique.

mécaniquement et, d'autre part, d'utiliser une enzyme de restriction à site rare (NotI, SfiI, ...).

Le même principe d'analyse peut être appliqué à l'étude des ARN : on parle alors de Northern par analogie avec la méthode initialement décrite par Southern avec l'ADN.

La PCR

(Polymerase Chain Reaction)

Cette technique révolutionnaire a été mise au point par K. Mullis (il a été récompensé par le prix Nobel de chimie en 1993) de l'équipe de H. Erlich (Cetus Corporation) (Saiki et a., 1985). Elle permet une amplification élective *in vitro* d'un fragment d'ADN flanqué par deux séquences correspondant aux oligonucléotides utilisés comme amorces (figure 14). Dans un certain nombre de cas, la PCR remplace le Southern comme par exemple dans les analyses de liaison (avec les microsattellites) ou pour les localisations physiques de marqueurs ADN tels que les STS (Sequence Tagged Site).

Les applications de la PCR (et de ses dérivés) sont extrêmement nombreuses et on peut citer à titre d'exemples l'utilisation de la PCR :

- pour l'amplification de sondes,
- pour le clonage de nouvelles sondes,
- pour la recherche de mutation dans un gène candidat par PCR suivie d'une analyse en SSCP (Single Strand Conformation polymorphism) ou en DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis),
- pour la fabrication de banques d'ADNc (ADN complémentaire) par RT-PCR (RT pour Reverse Transcriptase ou transcriptase inverse qui copie un ARNm en son ADNc),
- etc ...

b) Les banques d'ADN humain

Les banques d'ADN humain sont des collections de clones cellulaires (bactéries, virus ou levures) renfermant chacun un (ou plusieurs) fragment(s) d'ADN humain intégré(s) dans un vecteur, la totalité des clones couvrant l'ensemble du génome de départ. Il est possible de fabriquer des banques enrichies spécifiques d'une fraction du génome humain en utilisant comme matériel de départ :

- des chromosomes purifiés par cytométrie de flux,

- des fragments de chromosomes microdisséqués,
- des hybrides somatiques interspécifiques ne contenant que tout ou partie d'un seul chromosome humain.

Avec les vecteurs de clonage classiques (plasmide : 0,1 à 10 kb, phage : 15 à 100 kb et cosmide : 35 à 45 kb), le nombre de clones nécessaire pour contenir la totalité du génome humain est considérable. La possibilité de cloner des segments d'ADN longs de plusieurs centaines de kb (voire supérieurs à la Mb avec les "Méga-YAC" développés par le CEPH) sous forme de chromosomes artificiels de levure (YAC) (Burke et al., 1987) constitue un progrès décisif pour l'étude du génome humain. Les banques de YACs sont beaucoup plus maniables car formées de moins de clones.

Enfin, il faut également noter la possibilité de fabriquer des banques d'ADNc regroupant l'ensemble des gènes exprimés dans un tissu donné.

c) Les techniques moléculaires de cartographie physique à grande échelle

L'ensemble des méthodes de cartographie physique et même génétique que nous avons passées en revue jusqu'à présent ont une résolution maximale de l'ordre de la Mb. Pour cloner par génétique inverse un gène à l'origine d'une pathologie, il est nécessaire de faire appel à des approches de cartographie physique de haute résolution.

"Marcher" et "sauter" sur un chromosome

Si on possède un marqueur dont on sait qu'il est proche d'un gène morbide, il est alors possible de se déplacer de ce marqueur vers le gène .

La "marche" sur le chromosome

"Marcher" le long d'un chromosome consiste, à partir d'un clone contenant la sonde de départ, à se déplacer de clone en clone en prenant à chaque étape les extrémités du clone de l'étape n pour isoler dans une banque le clone de l'étape n+1. Les "pas" ainsi réalisés peuvent aller de quelques dizaines de kb (avec les cosmides) à quelques centaines de kb (avec les YAC).

Le déplacement par "saut" sur le chromosome

Dans cette méthode, des fragments d'ADN situés à plusieurs centaines de kb sont réunis dans un même clone.

Ces morceaux peuvent se trouver à l'origine :

- sur un macro-fragment de restriction obtenu après coupure par une enzyme de restriction à site rare et séparation par PFGE,
- sur une portion d'ADN cloné dans un YAC,
- dans un clone comportant le point de jonction d'une délétion (on parle dans ce cas de "saut délétionnel").

On peut construire ainsi des banques de "sauts" (jumping libraries) ou des banques de liaison (linking libraries) où des séquences originellement éloignées sur le chromosome peuvent être positionnées les unes par rapport aux autres grâce notamment à l'électrophorèse en champ pulsé.

Il est ainsi possible de "marcher" ou de "sauter" de Mb en Mb d'un marqueur ADN anonyme à un locus morbide, comme ce fut le cas par exemple lors de la recherche du gène de la mucoviscidose (Rommens et al., 1989).

La stratégie des "contigs"

Quand une banque (YACs ou cosmides) pour l'ensemble du génome ou pour une portion de chromosome est disponible, une étape cruciale pour l'isolement de gènes par clonage positionnel consiste à reconstituer le puzzle afin de positionner les morceaux les uns par rapport aux autres. On établit des "contigs" dans lesquels les clones contigus sont reliés les uns aux autres. Créer un "contig" revient en fait à trouver les zones de chevauchement entre les différents clones. Dès lors qu'une région est ainsi couverte par un "contig" de YAC, il suffit de "pêcher" le YAC contenant une sonde proche d'un gène pour avoir isolé celui-ci dans un fragment d'ADN de quelques centaines de kb. Si le YAC est à nouveau découpé en fragments clonés dans des cosmides, il sera possible, de la même façon, d'isoler le gène dans quelques dizaines de kb seulement. Une grande proportion du génome humain est maintenant disponible sous forme de "contigs" de YAC. Citons par exemple les "contigs" pour la région euchromatique de l'Y (Foote et al., 1992) et les bras longs du 21 (soit 42 Mb) (Chumakow et al., 1992) qui sont les premiers atteignant la taille d'un chromosome humain.

Les STS

(Sequence -Tagged Site ou site ciblé par sa séquence)

Les informations obtenues par de nombreux laboratoires avec les méthodes de cartographie et de clonage citées précédemment (point de cassure, macro-carte de restriction, "contigs", ...) sont difficiles à intégrer dans une carte "consensus". Pour pallier ces inconvénients, Olson et al. (1989) ont proposé l'utilisation des STS. Les STS étant des balises formées d'une séquence encadrée par un couple d'amorces, elles peuvent donc être recherchées rapidement par PCR. Un grand nombre de STS régulièrement espacés tout le long des chromosomes peuvent ainsi fournir un langage commun pour une carte physique "consensus". Par exemple, Goold et al. (1993) ont publié une liste de 822 nouveaux STS pour le chromosome 4 (soit un STS par 100 kb en moyenne) dont certains correspondent à des gènes et des marqueurs déjà cartographiés, ce qui devrait faciliter l'intégration des cartes physique et génétique de ce chromosome. Il faut noter que les microsatellites et même les EST (Expressed Sequence Tag) peuvent être considérés comme des STS avec l'avantage supplémentaire, pour les microsatellites, de pouvoir être utilisés pour les analyses de liaison.

A la recherche de séquences exprimées

Dès lors qu'un fragment cloné de quelques dizaines de kb contient le locus d'une maladie, la recherche de séquences exprimées (dont une correspond au gène lésé chez les malades) peut commencer. Pour ce faire, diverses méthodes peuvent être appliquées :

- recherche d'indices de la présence d'un gène tels que les îlots CpG souvent situés en 5' d'une séquence exprimée de façon constitutive,
- sélection des séquences exprimées par hybridation d'une banque d'ADNc (du tissu approprié) sur le clone comportant le locus de la maladie,
- utilisation d'un vecteur conçu pour piéger les exons (exon trapping),
- recherche de séquences conservées au cours de l'évolution en réalisant des "zoo-blots".

La preuve ultime : les mutations

Quand on possède un gène candidat pour une pathologie héréditaire, la confirmation qu'il s'agit bien du gène impliqué dans la maladie sera obtenue si on trouve des mutations dans ce gène uniquement chez les individus

malades. La découverte de ces mutations (notamment grâce à la PCR et bien sûr aux méthodes de séquençage) constitue la fin du clonage d'un gène par génétique inverse.

D) LA CARTOGRAPHIE FONCTIONNELLE

Sur les quelques 50 000 à 100 000 gènes que compte le génome humain, à peine 4000 (3849 en mars 1993, Cuticchia et al., 1993) sont connus. D'après le dernier recensement réalisé par McKusick (1992), il existe plus de 5000 maladies génétiques monofactorielles dont seulement 10% étaient localisées en 1991 à la conférence HGM11 (Human Gene Mapping 11). Il est donc clair qu'un grand nombre de gènes restent à découvrir et que l'approche de la génétique inverse maintenant classique ne permettra pas (même avec les maladies multifactorielles) le décryptage de l'ensemble des séquences exprimées du génome humain.

Depuis la fin des années 80 est apparue une nouvelle stratégie consistant en un séquençage à grande échelle de l'ensemble des séquences exprimées (ADNc) suivie de l'intégration de ces gènes sur les cartes physique et génétique. Il s'agit donc de construire une carte fonctionnelle (ou transcriptionnelle) du génome humain.

A la différence des méthodes citées précédemment pour isoler des séquences exprimées contenues dans un fragment d'ADN cloné (et donc de localisation connue), l'approche systématique ne donne aucune indication quant à la localisation des séquences exprimées isolées. Des clones, pris au hasard dans une banque d'ADNc, sont séquencés partiellement (200 à 300 pb). On obtient ainsi des EST (Expressed Sequence Tag ou étiquette pour une séquence exprimée). Ces séquences bien que fragmentaires peuvent d'une part être comparées aux gènes connus (pour savoir ainsi s'il s'agit d'une nouvelle entité) et, d'autre part, servir à isoler par PCR le gène correspondant dans sa totalité. Depuis l'article d'Adams et al. (1991), plus de 25 000 EST ont été générés, différentes options de séquençage des ADNc ont été utilisées (Sikela et Auffray, 1993 ; Jordan, 1993).

Se pose ensuite le problème de la localisation de ces nombreux EST sur le génome. Pour l'instant, l'intégration des EST sur la carte physique ne suit pas le rythme de leur isolement ; il semble donc essentiel de développer des méthodes rapides de localisation de ces "étiquettes". Une approche élégante

consisterait, comme cela a déjà été fait pour un nématode (*Caenorhabditis elegans*) (Waterston et al., 1992), à fabriquer des "filtres polytènes" (par analogie avec les chromosomes polytènes de la drosophile si utiles pour la cartographie physique de cette espèce) où l'ensemble des YAC d'un contig recouvrant un chromosome donné sont positionnés dans l'ordre dans lequel il se trouve réellement sur ce chromosome. Il suffirait alors d'hybrider les différents EST pour les localiser rapidement et précisément sur la carte physique du génome.

E) VERS UNE CARTE INTEGREE DU GENOME HUMAIN

Comme nous venons de le voir, il existe un grand nombre d'approches pour obtenir des données sur la carte du génome humain. Le flux d'informations s'accélère et l'intégration des multiples données s'avère difficile même dans le cadre des "chromosome-specific workshops". Le problème de l'intégration des données se pose à plusieurs niveaux :

- mise en cohérence de cartes génétiques obtenues par divers groupes avec des familles et des marqueurs différents (nous avons déjà évoqué à ce sujet l'intérêt des microsatellites et du CEPH),
- intégration de données physiques très variées (points de cassure, hybrides irradiés, ...),
- positionnement des EST .

Pour ce faire, le dialogue entre biologistes et informaticiens est indispensable. L'informatique joue un rôle prépondérant pour l'établissement de la carte du génome humain (et d'autres espèces) et tout "genome center" qui se respecte comporte une véritable équipe d'informaticiens. Actuellement, la GBD (Genome Data Base) est la banque officielle qui regroupe l'ensemble des données, à l'exception des séquences ADN qui sont accessibles avec Genbank (USA) et EMBL (European Molecular Biology Laboratory) (Europe). Enfin, l'integrated data base (IGD) développée par Suhoi et Ritter (Heidelberg) semble avoir un avenir prometteur.

Il est clair que la construction de cartes physiques complètes pour chaque chromosome, fondées sur une série de YACs chevauchants, sera une étape essentielle pour la réalisation de cartes intégrant les données physiques,

génétiques et transcriptionnelles ; notons que les travaux de cartographie réalisés sur d'autres espèces (notamment la souris *Mus musculus*) contribuent également à l'amélioration de la carte des gènes de l'espèce humaine et ce, pour deux raisons :

- l'ordre des gènes sur une portion de chromosome peut avoir été conservé au cours de l'évolution,
- certaines maladies héréditaires de l'homme ont leur équivalent chez l'animal.

F) GRANDEUR ET DECADENCE DU CLONAGE POSITIONNEL?

(The rise and fall of positional cloning? Ballabio, 1993)

Depuis les premiers succès de la génétique inverse avec le clonage des gènes de la granulomatose chronique (Royer-Pokora et al., 1986), de la myopathie de Duchenne (Monaco et al., 1986) et du rétinoblastome (Friend et al., 1986), une vingtaine de maladies ont bénéficié de cette approche stricto sensu. En fait, le clonage positionnel est efficace pour les maladies répondant à l'un ou l'autre (ou souvent plusieurs) des critères suivants :

- mode de transmission lié à l'X ,
- maladie associée à des réarrangements cytogénétiques chez certains patients,
- pathologie génétique fréquente donc très étudiée et pour laquelle il existe beaucoup de familles.

Or, la plupart des pathologies héréditaires ne possèdent aucune de ces caractéristiques extrêmement favorables pour une approche inverse "pure". Pour toutes ces maladies approximativement localisées sur la carte et pour lesquelles, néanmoins, des connaissances physiopathologiques même fragmentaires sont disponibles, il est possible d'appliquer une démarche combinée à mi-chemin entre les clonages fonctionnel et positionnel. Cette approche combinée peut s'envisager selon deux directions : de la maladie au gène (gènes candidats) ou du gène à la maladie (maladies candidates) (figure 15).

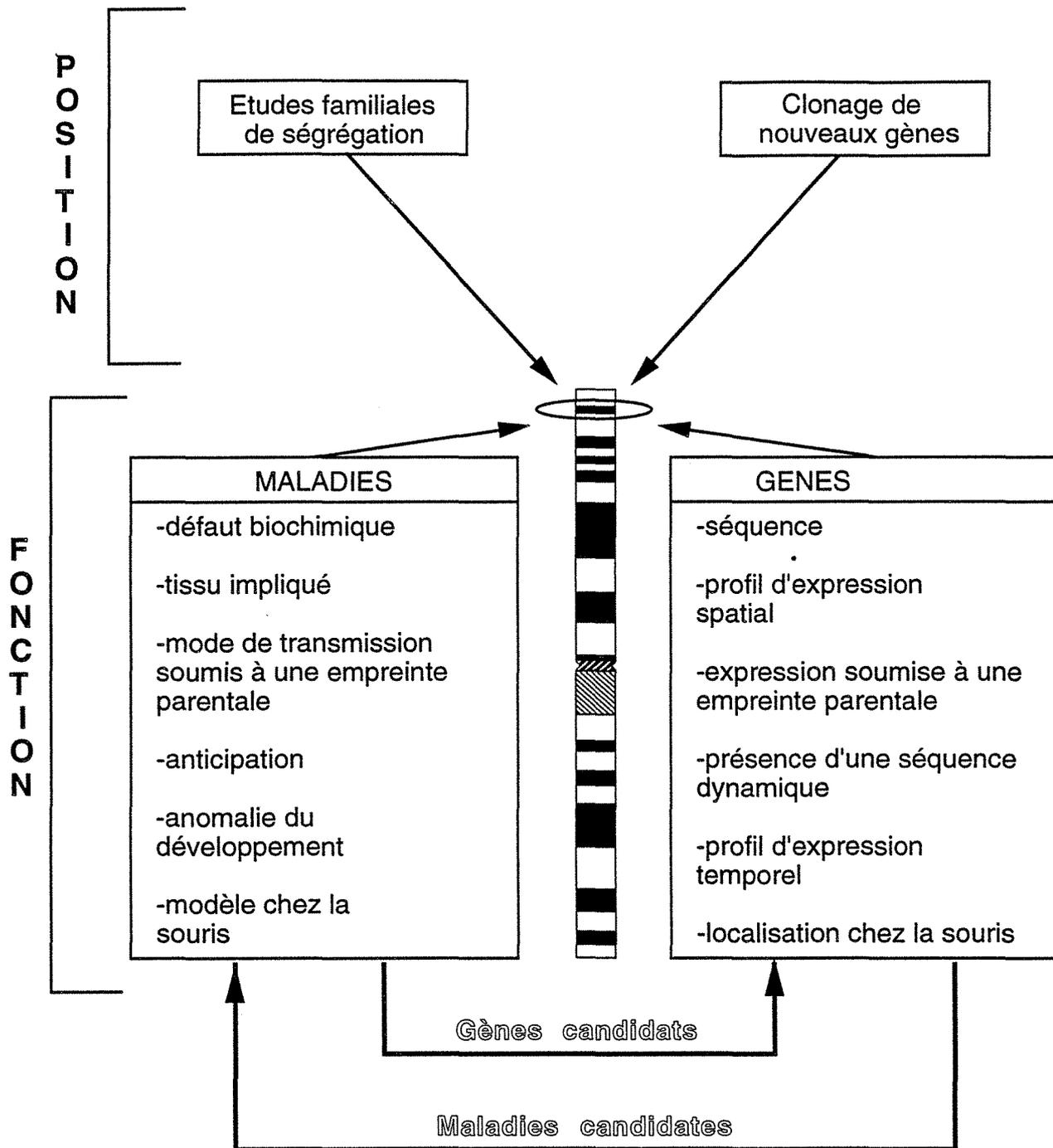


Figure 15 : Approche combinée pour l'identification du gène impliqué dans une maladie héréditaire.
(d'après Ballabio, 1993, modifié)

Quand le locus d'une nouvelle maladie est assigné à une région chromosomique donnée, les gènes candidats, car situés sur la même portion de chromosome, sont testés. Les caractéristiques des gènes candidats sont comparées à celle de la maladie. De la même façon, quand un nouveau gène est localisé sur une région donnée, les maladies candidates sont envisagées.

La méthode des gènes candidats

Quand une pathologie est localisée sur une portion de chromosome, il est possible de rechercher, parmi les gènes assignés dans cette région, celui dont les caractéristiques en font un bon candidat pour la maladie. C'est ainsi, par exemple, que le gène impliqué dans la maladie de Bruton (agammaglobulinémie liée à l'X) a été récemment cloné par Tsukada et al. (1993). En effet, le gène *atk* (agammaglobulinémie tyrosine kinase) a été isolé en recherchant, parmi les clones d'ADNc d'une lignée lymphoblastique pré-B, ceux qui correspondaient à des gènes localisés dans la région Xq22 (on savait, par analyse de liaison, que cette région contenait le locus de cette maladie).

La méthode des maladies candidates

A l'inverse, dès qu'un nouveau gène est localisé sur une région d'un chromosome donné, il est possible de rechercher une maladie candidate parmi celles qui sont assignées sur la même portion de chromosome (comme ce fût le cas pour le syndrome de Usher de type II sur lequel nous reviendrons dans les résultats). Devant le nombre croissant d'ADNc (les EST) isolés, il est probable que l'approche des maladies candidates va être très fructueuse. Il faut néanmoins insister sur le fait que, pour être utilisable, les ADNc devront être bien caractérisés : localisation, recherche des domaines structuraux connus, étude du profil d'expression spatio-temporelle,

G) LES APPLICATIONS DE LA CARTOGRAPHIE DU GENOME HUMAIN

L'ensemble des méthodes de cartographie du génome humain se conjuguent et convergent toutes vers le même but : se rapprocher d'un gène, l'isoler et le caractériser. Dès lors que l'on est très proche du gène impliqué dans une pathologie, il devient possible de faire de la prévention grâce au diagnostic prénatal et au dépistage des hétérozygotes (approche indirecte). Le clonage du gène permet tout d'abord de réaliser un diagnostic direct quand la (ou le plus souvent les) mutation(s) à l'origine de la maladie est (sont) connue(s). Il

devient également possible de caractériser la protéine qui découle du gène et donc de comprendre le mécanisme physiopathologique de la maladie. La compréhension de la maladie permet de mettre en place une thérapeutique rationnelle par substitution ou par thérapie génique, procédé qui suscite beaucoup d'espoirs pour les maladies récessives.

Actuellement, les efforts sont concentrés sur les pathologies monogéniques mais il est probable que, grâce à des cartes de plus en plus précises, les gènes impliqués dans des processus multifactoriels (plus difficile d'accès) seront à leur tour découverts.

Le génome humain comporte beaucoup plus de gènes qu'il n'existe de maladies héréditaires. Ainsi, le décryptage de l'ensemble des gènes du génome humain (soit quelques 250 Mb : 100 000 ADNc de 2,5 kb chacun) devrait révéler un bon nombre de processus biochimiques jusqu'alors inconnus.

Le séquençage de la totalité des 3.10^9 pb du génome humain n'est pas encore envisageable. Grâce aux progrès techniques futurs, l'exploration des 90% du génome dépourvu, pour l'instant bien sûr, de signification, devrait être passionnante. Mais cela sera une autre histoire!

III) LE CHROMOSOME X HUMAIN

A) LES CHROMOSOMES SEXUELS

Le chromosome X est le huitième des chromosomes humains par la taille et il représente 5 à 6% du génome total (soit 160 à 200 Mb) pour une distance génétique d'environ 240 cM (Schlessinger et al., 1993). Il forme avec le chromosome Y la paire de chromosomes sexuels. Le chromosome X est très conservé chez tous les mammifères placentaires alors que la taille et l'ordre des gènes sont très variables pour le chromosome Y. Les chromosomes sexuels étaient sans doute génétiquement équivalents chez un ancêtre vertébré (Ohno, 1967). Une suppression des recombinaisons entre les chromosomes sexuels ancestraux, pour protéger un ensemble de gènes portés

par l'Y impliqués dans la détermination du sexe, serait à l'origine de l'évolution différentielle des chromosomes X et Y chez les mammifères. La région sur l'Y dépourvue de recombinaison aurait ensuite été délétée et le processus d'inactivation de l'X chez les femelles de mammifères se serait mis en place pour compenser cette perte de gènes sur l'Y (Ohno, 1967). Il est néanmoins possible que l'inactivation des gènes portés par le proto-Y soit la cause de la suppression des recombinaisons à l'origine de la différenciation des chromosomes sexuels chez les mammifères (Marshall-Graves et Schmidt, 1992).

Dans l'espèce humaine, la région pseudo-autosomique, qui s'étend sur 2600 kb (Petit et al., 1988) à l'extrémité des bras courts des chromosomes sexuels, est le siège d'une recombinaison au cours de chaque méiose masculine. Ainsi, sur le chromosome Y, la région pseudo-autosomique a une longueur génétique de 50 cM, soit en moyenne un cM pour seulement 55 kb (contre 1 cM pour 1000 kb sur le reste du génome).

Outre cette région pseudo-autosomique où l'homologie de séquence est totale (100%), d'autres régions de l'X présentent des homologies de séquence avec le chromosome Y : Xp22.3 et Yq11, Xq21.2 et Yp et Xq28 et Ycen-q11. Très récemment, une nouvelle région pseudo-autosomique a été identifiée à proximité des télomères des bras longs de l'X et de l'Y (Freije et al., 1992).

En plus des gènes communs aux deux chromosomes sexuels, le chromosome Y porte le gène SRY (Sex-determining Region Y) (Sinclair et al., 1990) dont l'expression est nécessaire et suffisante pour entraîner la différenciation des gonades primitives en testicules. La protéine SRY est un facteur de transcription capable de se lier à l'ADN. D'après des études d'inversion de sexe ("hommes XX" ou "femmes XY"), McElreavey et al. (1993) émettent l'hypothèse suivante : le produit du gène SRY réprimerait un gène autosomique (dénommé Z) qui bloque le développement dans le sens mâle chez les mammifères.

B) INACTIVATION DU CHROMOSOME X

En raison de l'hémizygotie du chromosome X chez l'homme (46,XY), et pour maintenir constant le dosage des produits des gènes portés par ce chromosome, un des deux X est inactivé chez la femme (et chez toutes les femelles de mammifères) : l'inactivation de ce chromosome entraîne la non

transcription des gènes qui sont alors "éteints". Selon l'hypothèse de M. Lyon (1972), l'inactivation (ou "Lyonisation") permanente de l'un des deux X se produit au hasard (c'est-à-dire qu'il touche avec la même probabilité l'X paternel ou l'X maternel) à un stade précoce de l'embryogenèse féminine pour se transmettre de façon stable à chaque mitose. Le chromosome inactif se réactivera uniquement dans les ovogonies avant leur entrée en méiose.

L'inactivation d'un chromosome X chez la femme est le résultat d'une méthylation différentielle (au niveau des séquences CpG) entre chromosomes X actif (X_a) et inactif (X_i). A quelques loci près (notamment le locus DXS255), l' X_a est hypométhylé et l' X_i hyperméthylé.

Il existe un centre inactivateur noté XIC (X-inactivation center) localisé en Xq13.2 à partir duquel l'inactivation se propage en cis sur l'ensemble du chromosome. Le centre inactivateur porte le gène XIST (X inactive-specific transcript), uniquement exprimé sur l' X_i , et sans doute impliqué dans le processus d'inactivation (Brown et al., 1991). Néanmoins, on ne sait toujours pas si l'expression du gène XIST (qui ne code pas pour une protéine) est la cause ou la conséquence directe du processus d'inactivation. Quelques gènes échappent à l'inactivation et sont donc actifs même sur l' X_i (Davies, 1991 ; Yen et al., 1992 ; Ellison et al., 1992).

Nous verrons par la suite qu'une inactivation non aléatoire peut être observée chez les femmes porteuses d'anomalies cytogénétiques touchant le chromosome X.

Pour respecter la différence de dosage génique entre les gènes autosomiques et ceux liés à l'X chez les mammifères, Ohno (1967) avait postulé qu'un gène lié à l'X chez un mammifère doit être porté, chez tous les mammifères, sur le chromosome X. Il existe deux exceptions à la "loi" de Ohno (Mandel et al., 1992) : d'une part, l'absence, chez la souris, de 4 gènes situés en Xp22.3 chez l'homme, peut s'expliquer par une délétion de ces gènes chez un ancêtre de ce rongeur (les délétions de la région Xp22.3 perturbent peu le phénotype chez les hommes) ; d'autre part, l'ensemble des gènes des bras courts de l'X étudiés chez l'homme sont autosomiques chez les marsupiaux et les monotrèmes : il semble qu'une addition d'un segment autosomique sur le chromosome X se soit produit chez les mammifères euthériens.

C) LA CARTE ACTUELLE DU CHROMOSOME X

190 loci correspondant à des maladies ont été assignés sur le chromosome X, soit 5,7% des quelques 3300 pathologies génétiques monogéniques répertoriées par McKusick (1992), ce qui n'est pas étonnant pour un chromosome qui représente 5 à 6% du génome humain total.

Le chromosome X est le chromosome le plus intensément étudié, et donc le mieux cartographié de l'ensemble des chromosomes humains et ce, pour plusieurs raisons :

- le chromosome X porte un grand nombre de gènes impliqués dans des maladies génétiques fréquentes et graves, telles que la myopathie de Duchenne, le syndrome de l'X Fragile et l'hémophilie (A et B), qui posent de véritables problèmes de santé publique. Le grand nombre de sujets masculins affectés par une pathologie liée à l'X s'explique par l'expression clinique, chez les hommes, de maladies récessives (les femmes hétérozygotes et donc vectrices sont le plus souvent cliniquement normales),

- le phénomène fascinant qu'est l'inactivation de l'un des deux X chez les femelles de mammifères a suscité et suscite encore beaucoup de travaux,

- l'état hémizygote de l'X chez les hommes et la présence de nombreux réarrangements touchant le chromosome X chez les hommes et chez les femmes facilitent grandement le clonage par génétique inverse de gènes à l'origine de pathologies liées au sexe.

D'autre part, beaucoup de "premières" en génétique humaine ont été réalisées sur le chromosome X :

- la première ébauche de carte génétique chez l'homme est due à la mise en évidence d'une liaison génétique entre le locus du daltonisme et celui de l'hémophilie (Bell et Haldane, 1937 ; Haldane et Smith, 1947), tous les deux localisés plus tard en Xqter,

- comme nous l'avons déjà évoqué, le premier succès de la génétique inverse a été obtenu avec une pathologie liée à l'X (la granulomatose chronique),

- plus récemment, le premier exemple de maladie, avec ce nouveau type de mutation que sont les expansions de trinuécléotides en tandem, est là encore une pathologie liée à l'X (le syndrome de l'X Fragile ; Richards et Sutherland, 1992),

- enfin, le chromosome X porte le plus grand gène connu (le gène DMD qui s'étend sur 2,4 Mb!) et ce, toutes espèces confondues.

Année	Maladie (localisation)	Protéine	Eléments déterminant pour la localisation et le clonage
1986	Granulomatose chronique (Xp21.1)	Cytochrome b245 chaîne β	Délétion
1986	Myopathie de Duchenne (Xp21.2)	Dystrophine	Délétion Translocation
1990	Choroïdémie (Xq21)	Rab géranylgeranyl transférase II chaîne A	Délétion Translocation
1991	Syndrome de l'X fragile (Xq27.3)	?	Site fragile YAC
1991	Syndrome de Kallmann (Xp22.3)	Protéine d'adhésion	Délétion YAC
1992	Syndrome de Lowe (Xq25)	Inositol polyphosphate -5'-phosphatase	Translocation YAC
1992	Maladie de Norrie (Xp11.4)	Protéine ND (Norrie's Disease)	Délétion YAC
1993	Maladie de Menkes (Xq13)	Protéine de transport de métaux lourds (a, 1)	Translocation YAC
1993	Agammaglobulinémie de Bruton (Xq22)*	Tyrosine kinase	YAC
1993	Déficit en glycérol kinase (Xp21)	Glycérol kinase	Délétion YAC
1993	Adrénoleuco-dystrophie (Xq28)	Transporteur ABC (a, 2)	Réarrangement chromosomique complexe YAC

Tableau II : clonage par génétique inverse de gènes a l'origine de maladies liées au chromosome X.

(D'après Mandel et al.,1992, modifié)

a) fonction probable de la protéine déduite grâce à des études d'homologie de séquence :
1: Vulpe et al., 1993 et Chelly et al., 1993,
2: Mosser et al., 1993.

* : parallèlement au clonage positionnel, le gène atk a également été isolé par une approche combinant des données de position et de fonction.

Plus de 60% du chromosome X (soit environ 100 Mb) sont d'ores et déjà assemblés en "contigs" de YAC bien caractérisés (Schlessinger et al., 1993). Sur les 92 gènes portés par l'X qui ont été clonés, 85 sont précisément localisés (44 en Xp et 41 en Xq). 93 points de cassure issus de réarrangements cytogénétiques sont répartis le long du chromosome X ; les régions Xp22.3, Xp21.2 et Xcen-q21 sont particulièrement riches en délétions et translocations (Schlessinger et al., 1993). Le tableau II rassemble les nombreux succès du clonage positionnel pour des pathologies récessives liées à l'X. On voit en analysant ce tableau l'importance considérable des réarrangements cytogénétiques et des YAC (depuis qu'ils sont largement utilisés) pour la cartographie du chromosome X.

Les régions Xpter-p21.3 et Xq22-qter sont très largement recouvertes par des "contigs" de YAC, la partie terminale des bras longs de l'X (Xq24-qter) étant clonée et assemblée quasiment en totalité. Par contre, la région péricentromérique de l'X est moins bien cartographiée.

D) OBJECTIF DE CE TRAVAIL

L'hybridation somatique interspécifique est très utile pour la cartographie du chromosome X. Au cours de mon travail de thèse, j'ai transformé un certain nombre de réarrangements cytogénétiques en outils précieux pour l'amélioration de la carte physique de la région q13-q22 du chromosome X humain.

J'ai rassemblé un certain nombre de cas de femmes porteuses de t(X;A) dans le but d'isoler, par hybridation somatique interspécifique, des portions de taille différente des bras longs de l'X. J'ai ensuite utilisé ces "points de cassure" sur l'X comme des balises pour positionner le plus grand nombre de gènes et marqueurs au sein de la région proximale des bras longs du chromosome X humain. Une collaboration avec le groupe de H.H. Ropers aux Pays-Bas m'a permis d'étendre le panel de t(X;A) en y ajoutant de nombreuses délétions (chez des hommes) touchant la région Xq21.

Je relaterai également la caractérisation moléculaire de deux t(X;A) chez des femmes présentant une pathologie récessive liée à l'X (un cas de choréïdémie et un cas de retard mental).

RESULTATS
DISCUSSION

Première partie

Cartographie physique de la région q13-q22 du chromosome X humain.

Nous avons déjà évoqué le grand intérêt des génomes anormaux pour la cartographie du génome humain. Le laboratoire de génétique de Nancy conserve, depuis 1985, toutes les anomalies chromosomiques peu fréquentes sous forme de lignées lymphoblastiques. A mon arrivée au laboratoire, la banque de génomes anormaux comportait, entre autres, 5 cas de t(X;A) chez des femmes, avec point de cassure sur l'X situé cytogénétiquement dans la région proximale des bras longs. Nous avons donc décidé de localiser, à un niveau moléculaire, ces différents points de cassure sur l'X et ce, dans un double but :

- améliorer l'assignement des points de cassure et par conséquent celui des marqueurs ADN au sein de la région Xq proximale,

- établir une corrélation entre les symptômes cliniques chez ces patientes porteuses de t(X;A) et la position des différents points de cassure.

Pour procéder à ce changement d'échelle (de la cytogénétique à la génétique moléculaire), nous avons utilisé l'hybridation somatique interspécifique afin de localiser les point de cassure sur l'X en utilisant le der(A).

Avant de débiter cette étude, nous nous sommes mis en relation avec les principaux laboratoires de cytogénétique en France afin d'augmenter le nombre de cas de t(X;A) (et donc potentiellement l'intérêt d'une telle collection de réarrangements de l'X) avec point de cassure dans la région proximale des bras longs du chromosome X humain. C'est ainsi que nous avons à notre disposition 8 cas différents de t(X;A).

CAS	CARYOTYPE	SYMPTOMATOLOGIE CLINIQUE
BC (1)	46,X,t(X;12)(q21;p13) t(X;A) familiale	Aménorrhée secondaire à 17 ans
FA (1)	46,X,t(X;15)(q21;q26) t(X;A) <i>de novo</i>	Aménorrhée secondaire à 27 ans Ovaires fibreux
LG (2)	46,X,t(X;9)(q21;q33) t(X;A) <i>de novo</i>	Aménorrhée secondaire à 19 ans Fente labiale Retard intellectuel modéré
PMI (1)	46,X,t(X;13)(q13;q31) t(X;A) <i>de novo</i>	Fonctionnement ovarien normal (à 18 ans) Trouble de la pigmentation Clinodactylie, scoliose Léger strabisme <u>Retard mental</u>
SN (3)	46,X,t(X;9)(q22;q22) t(X;A) <i>de novo</i>	Aménorrhée primaire Ovaires fibreux
TDo (1)	46,X,t(X;7)(q21;p12) t(X;A) <i>de novo</i>	Aménorrhée primaire Aplasie ovarienne unilatérale Ovaire fibreux controlatéral <u>Choroïdémie</u>
WD (1)	46,X,t(X;2)(q21;p25) t(X;A) <i>de novo</i> ?	Aménorrhée primaire Ovaires fibreux Légère dysmorphie faciale
C56N (4)	46,X,t(X;5)(q21;q11) t(X;A) <i>de novo</i>	Aménorrhée primaire fente palatine

Tableau III : Données cytogénétiques et cliniques

(1) Cas nancéiens

(2) Cas fourni par le Pr. M. J. ANDRE, CHRU de Nantes

(3) Cas fourni par le Dr B.NOEL, CTS de la Savoie Chambéry

(4) Cas fourni par le Dr C. TURLEAU, Unité INSERM 173, Hôpital Necker, Paris

I) PRESENTATION CYTOGENETIQUE ET CLINIQUE DES 8 CAS DE t(X;A)

A) DONNEES CLINIQUES

Toutes les patientes (à l'exception de PMI) sont venues en consultation de génétique pour des troubles de la fonction ovarienne. PMI a été adressée en consultation en raison d'un retard mental accompagné d'anomalies mineures. TDo était suivie depuis l'âge de 9 ans pour une dystrophie tapétochoroïdienne ou choroidéremie (MIM, Mendelian Inheritance in Man, 303100). Des signes du syndrome de Turner, autres que la dysgénésie ovarienne, sont présents chez C56N (ptérygium colli) et WD (implantation basse des cheveux, petite taille). A l'époque de la consultation, un caryotype standard a révélé dans tous les cas une t(X;A) avec un point de cassure sur l'X dans la région proximale des bras longs. Dans 7 cas sur 8, la t(X;A) est une translocation *de novo*. Pour le cas BC, il s'agit d'une anomalie chromosomique familiale car la même t(X;12) est retrouvée chez la mère de cette patiente qui a présenté également une aménorrhée secondaire (à l'âge de 32 ans). La soeur de BC (BV), phénotypiquement normale, est porteuse d'un caryotype 46,XXq- car elle a reçu le der(X) et le 12 normal de sa mère. Les manifestations cliniques associées aux t(X;A) sont présentées dans le tableau III.

B) DONNEES CYTOGENETIQUES

Pour les 5 cas nancéiens, la lignée lymphoblastique a été réalisée avant mon arrivée au laboratoire. Les cas LG et SN nous ont été confiés sous forme de sang total que nous avons transformé en lignée lymphoblastique ; le cas C56N nous a été fourni directement sous forme de lignée hybride homme/rongeur.

Nous avons tout d'abord contrôlé le caryotype des lymphoblastes des différents cas de t(X;A) à l'exception de C56N pour lequel les caryotypes

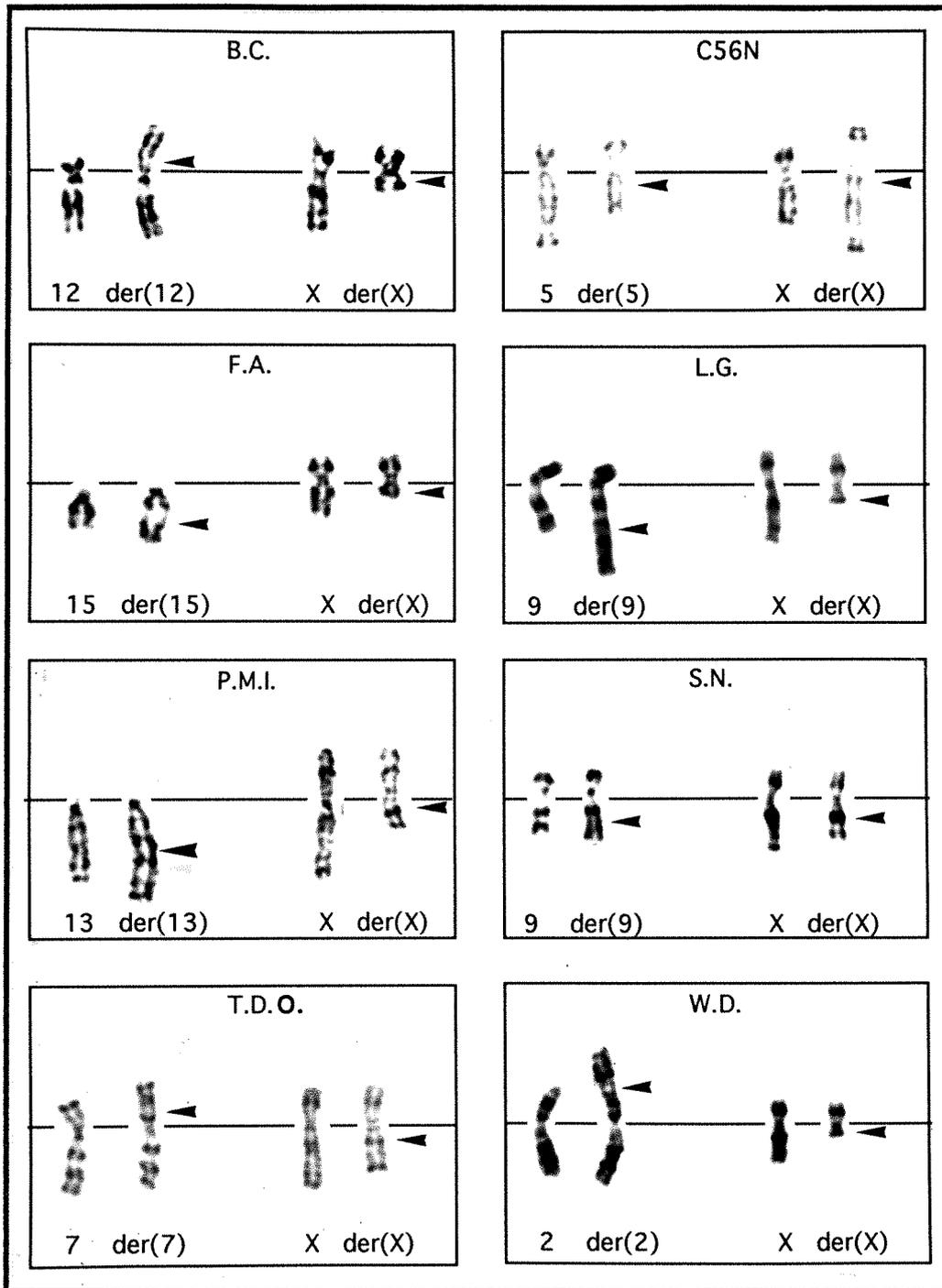


Figure 16 : Idiogramme des t(X;A), bandes GTG
 (Les flèches indiquent la position des points de cassure)

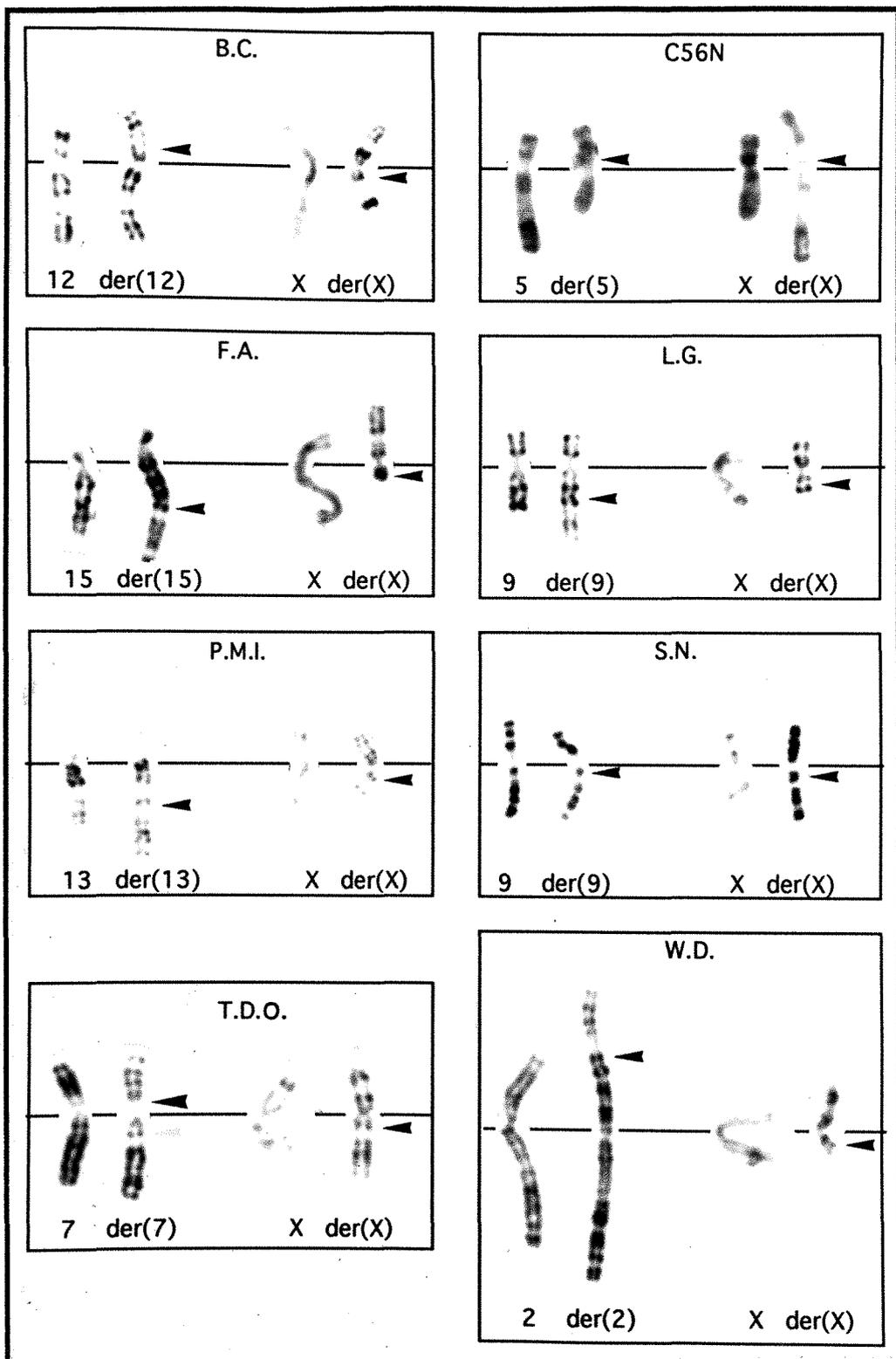


Figure 17 : Idiogramme des t(X;A), bandes RBG
 (Les flèches indiquent la position des points de cassure)
 (Le cas C56N est présenté en bandes RHG)

nous ont été fournis par C. Turleau (Unité INSERM 173, Hôpital Necker, Paris). Dans tous les cas, mis à part les deux paires de chromosomes impliqués dans la translocation, les autres chromosomes sont normaux. Nous présentons donc uniquement un idiogramme rassemblant les 8 paires de chromosomes anormaux rencontrés dans nos cas de $t(X;A)$. La figure 16 présente un idiogramme des $t(X;A)$ en bandes GTG alors que la figure 17 montre les même chromosomes en bandes RBG (à l'exception du cas C56N qui est présenté en bande RHG).

Les techniques en bandes GTG sont réalisées sur des cellules en métaphase, les chromosomes ainsi obtenus nous permettent de situer les points de cassure sur l'X de notre série de réarrangements dans la région q proximale entre Xq13 (PMI) et Xq22 (SN) ; dans tous les cas, il s'agit d'une translocation apparemment (ou "chromosomiquement") équilibrée (figure 18).

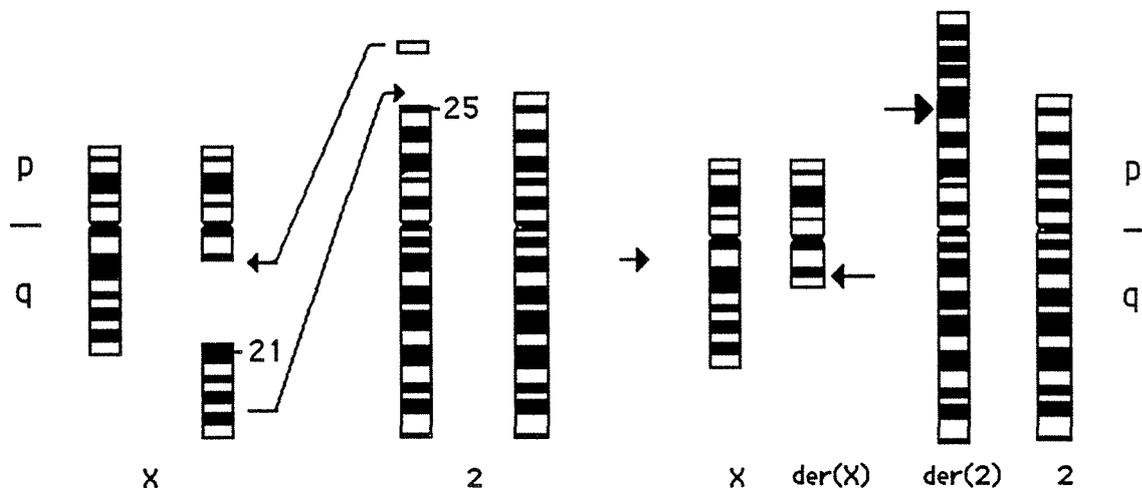


Figure 18 : Mécanisme d'une $t(X;A)$ équilibrée, cas WD $t(X;2)(q21;p25)$

L'autosome impliqué dans la $t(X;A)$ est variable puisqu'il s'agit du 2 (WD), du 5 (C56N), du 7 (TDo), du 9 (LG et SN), du 12 (BC), du 13 (PMI) ou du 15 (FA). Les formules chromosomiques des 8 cas de $t(X;A)$ sont indiquées dans le tableau III.

Notons dès à présent que dans cette étude, nous n'avons pas déterminé l'origine parentale de nos différentes $t(X;A)$. Dans les 13 cas analysés dans la littérature, les $t(X;A)$ sont toujours d'origine paternelle (Giacalone et Francke, 1992). Il semble donc que les $t(X;A)$ soient des événements post-

méiotiques, en effet, ces réarrangements bloquent la gamétogenèse masculine.

Pour tenter d'améliorer la résolution obtenue en caryotype standard, nous avons également réalisé un idiogramme des t(X;A) sur des chromosomes en prométaphase après une coloration en bandes RBG. Le nombre de bandes ainsi visualisées est augmenté car, en prométaphase, l'enroulement de la chromatine n'est pas à son maximum comme en métaphase. Néanmoins, l'obtention de prométaphases à partir de lymphoblastes est peu aisée, la résolution obtenue ne nous permet pas de préciser au niveau d'une sous-bande (Xq21.1, Xq21.2 ou Xq21.3) la localisation cytogénétique de ces points de cassure au sein de la bande Xq21.

La réalisation des caryotypes en bandes RBG met de plus en évidence le profil d'inactivation de l'X chez ces patientes porteuses d'une t(X;A). En effet, l'incorporation de BrdU en fin de cycle cellulaire fait apparaître l'X inactif (X_i), à réplication tardive, despiralisé donc plus pâle que les autres chromosomes. Dans les 7 cas de t(X;A) étudiés en bandes RBG, l'X normal (X_n) est inactif dans 100% des 50 métaphases observées. Ces résultats sont en accord avec ceux présentés par Mattei et al., (1982) dans une revue de la littérature où plus de 80% des t(X;A) équilibrées répertoriées présentent une inactivation de l' X_n dans 100% des cellules. D'une manière générale, quand un réarrangement touche le chromosome X chez une femme, l'inactivation se fait toujours de telle sorte que le patrimoine génétique de la cellule soit le plus proche possible de la normale. Ces observations ont conduit certains auteurs à émettre l'hypothèse d'une inactivation au hasard suivie d'une élimination, pendant les premiers stades du développement embryonnaire, des cellules désavantagées par un patrimoine génétique par trop délétère (Mohandas et Shapiro, 1983). L'inactivation de l' X_n dans les cas de t(X;A) équilibrée va dans ce sens puisque les cellules possèdent ainsi, tant au niveau de l'X que de l'autosome impliqué dans la translocation, un patrimoine génétique normal, exception faite des deux points de cassure sur le der(X) et sur le der(A). Le phénotype normal chez BV, porteuse d'un X délété (il s'agit en fait du der(X)), s'explique également par une inactivation dans toutes ses cellules du chromosome X anormal, l'inactivation étant probablement transmise au petit fragment de 12 porté par ce chromosome.

Les t(X;A) équilibrées, où l' X_t est inactif dans une proportion des cellules, sont très rares car elles peuvent conduire :

- à une disomie fonctionnelle du segment d'X transloqué sur l'autosome non touché par le processus d'inactivation,

- à une monosomie fonctionnelle du fragment d'autosome porté par le der(X) si le processus d'inactivation se transmet également à ce fragment autosomique.

Cette situation où l' X_t est inactivé est rencontré dans environ 20% des t(X;A) équilibrées (Mattei et al., 1982 ; Schmidt et Du Sart, 1992). Les symptômes qui en découlent sont souvent complexes (comme dans les cas d'aneuploïdies) avec de multiples anomalies congénitales et un retard mental (Du Sart et al., 1992).

Selon l'étude de Schmidt et Du Sart (1992), les quelques cas de t(X;A) équilibrées, avec une inactivation de l'X transloqué dans une partie des cellules, sont rencontrés quand le point de cassure sur l'X est situé à l'extrémité des bras longs ou des bras courts. Il semblerait donc que le processus de sélection cellulaire contre les cellules avec l' X_t inactif est orienté principalement par la longueur du segment de chromosome X transloqué sur l'autosome. Plus ce segment est grand, plus le nombre de gènes de l'X exprimés en double dose dans les cellules avec l' X_t actif est important et donc plus ces cellules sont contre-sélectionnées. Ceci explique que les t(X;A) équilibrées chez des femmes avec point de cassure situés dans la région p21-q27 de l'X montrent pratiquement toujours une inactivation totale de l'X normal (Schmidt et Du Sart, 1992).

Sur l'idiogramme en bandes RBG réalisé en prométaphase, on peut noter qu'il existe dans 4 cas sur 7 (LG, FA, SN, et TDo) sur l' X_i une courbure dans la région Xq proximale (les courbures au niveau du centromère, très fréquentes sur l'ensemble des chromosomes, ne sont pas prises en compte). Selon Van Dyke et al. (1987), le chromosome X humain inactif est courbé dans la région Xq1-q21 dans plus de 70% des cellules en prométaphase (contre 12% pour l' X_a). Ce repliement n'est pas observé sur les 8 paires de chromosomes X en bandes GTG car ces caryotypes ont été établis sur des cellules en métaphase et sans incorporation de BrdU (figure 16). Chez une femme, dans une cellule en interphase, le chromosome X_i se présente sous forme d'un corpuscule ovale situé à proximité de la membrane nucléaire : le corpuscule de Barr. La courbure dans la région Xq proximale (qui contient le centre inactivateur avec le gène XIST) pourrait correspondre à un vestige de corpuscule de Barr de l'interphase précédente (Van Dyke et al., 1987) bien que ce repliement s'observe également, mais dans une moindre mesure, sur l' X_a .

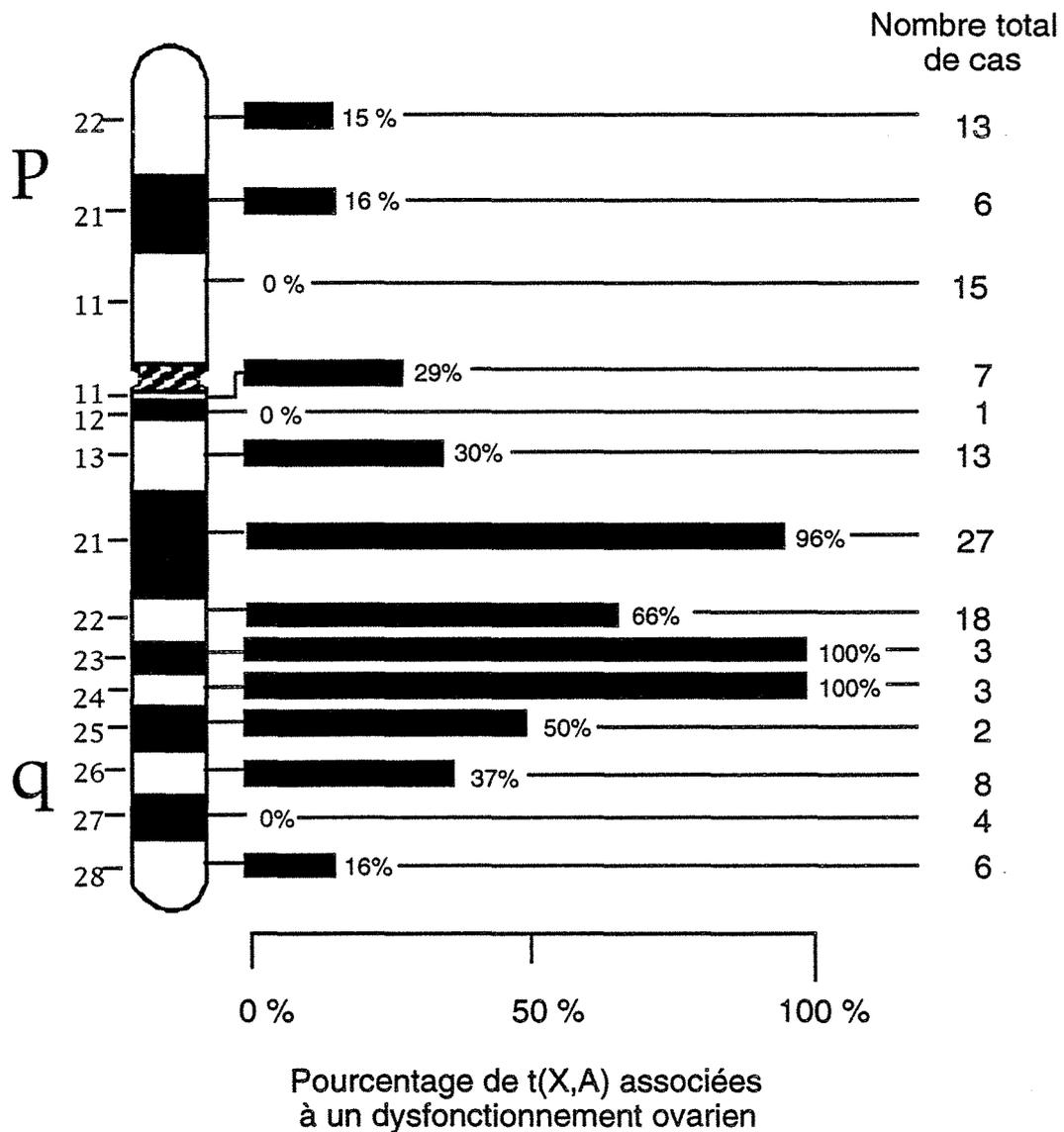


Figure 19 : t(X;A) et dysfonctionnement ovarien

126 t(X;A) chez des femmes adultes sont répertoriées dans cette figure : 118 cas rassemblés dans une revue de la littérature par Therman et al. en 1990 auxquels sont ajoutées les 8 t(X;A) caractérisées au cours de ce travail.

L'observation des données cliniques chez ces patientes porteuses de t(X;A) fait bien ressortir les deux types d'atteinte pouvant résulter d'une translocation équilibrée chez une femme quand l'X normal est inactivé dans toutes ses cellules :

- dysfonctionnement ovarien,
- maladie récessive liée à l'X.

L'association t(X;A) équilibrée et pathologies récessive liée au chromosome X chez les patientes PMI et TDo fera l'objet la deuxième partie des résultats.

C) t(X;A) EQUILIBREES ET DYSFONCTIONNEMENT OVARIEN

Dans cette étude, les aménorrhées primaires et secondaires sont regroupées sous le terme de dysfonctionnement ovarien (DO). Sur les 8 patientes avec t(X;A) étudiées, 7 présentent un DO (voir tableau III). La région Xq13-q26 est connue depuis de nombreuses années (Sarto et al., 1973) comme une région critique devant être intacte sur les deux chromosomes X chez une femme pour un développement et un fonctionnement ovarien normal. En 1983, Madan propose de séparer cette région critique en deux intervalles, Xq13-q22 et Xq22-q26, avec un segment de la bande q22 dans lequel les points de cassure n'interfèrent pas avec la fonction ovarienne.

Chez l'homme également, les t(X;A) (quelle que soit la localisation du point de cassure sur l'X) sont le plus souvent liées à des troubles de la spermatogenèse entraînant une stérilité (Madan, 1983).

Nos résultats sont en accord avec l'existence de cette région critique car sur les 7 t(X;A) avec DO, 6 points de cassure sont localisés en Xq21 et 1 en Xq22. PMI, âgée de 18 ans, a effectué une puberté normale avec depuis l'âge de 11 ans des règles régulières. Néanmoins, la survenue d'une aménorrhée secondaire chez cette patiente ne peut être exclue. Dans une revue de la littérature, Therman et al. (1990) ont répertorié 118 t(X;A) chez des femmes et les ont classées en fonction de la position du point de cassure sur l'X et du fonctionnement normal ou pathologique des ovaires. Nos 8 cas ainsi que ceux rassemblés par Therman et al. (1990) sont présentés dans la figure 19. De l'observation de cette figure, il ressort qu'un point de cassure dans la région (Xq21-q22, Xq22-q24) semble être incompatible avec un fonctionnement ovarien normal. Pour le reste de la région considérée comme critique (Xq13, Xq25-q26), plus de deux tiers des points de cassure sont associés à un

fonctionnement ovarien normal. D'autre part, sur 52 points de cassure en dehors de la région critique, 6 sont quand même associés avec un DO. Le mécanisme par lequel un point de cassure sur l'X chez une femme porteuse d'une t(X;A) équilibrée provoque un DO n'est pas encore élucidé. Therman et al. (1990) ont émis l'hypothèse de l'existence sur le chromosome X de régions (ou "supergènes") devant rester intactes pour une fonction gonadique normale (ils estiment que la région critique pourrait contenir deux de ces "supergènes"). Il ne s'agirait pas d'un effet de position classique car le dysfonctionnement ovarien ne dépend pas de la position des points de cassure sur l'X (au sein d'un "supergènes") et sur l'autosome. Un point de cassure dans ces régions modifierait l'ordre de réplication des bandes du chromosome X, ce qui aurait pour conséquence d'entraver le fonctionnement normal des supergènes. Si cette hypothèse est bonne, vu les données de la figure 19, il faut bien admettre qu'il existe d'autres "supergènes" (peut-être plus petits que ceux de la région critique) répartis tout le long du chromosome X. Ce concept un peu "flou" traduit notre ignorance quant aux facteurs liés au chromosome X impliqués dans le développement et le fonctionnement des gonades.

II) LOCALISATION MOLECULAIRE DES POINTS DE CASSURE SUR L'X

La transformation de ces 8 t(X;A) en outil pour la cartographie physique de la région Xq13-q22 a été réalisée par hybridation somatique interspécifique. Pour situer le point de cassure sur l'X, par rapport aux segments d'ADN clonés de la région déterminée par analyse cytogénétique, il est nécessaire de pouvoir isoler le der(A) (ou le der(X)) en se débarrassant de tout autre matériel de l'X. Nous avons vu dans l'introduction que l'hybridation somatique interspécifique homme/rongeur permet de sélectionner le chromosome X porteur du gène HPRT (en Xq26) et ce, à l'aide du milieu de sélection HAT. Dans les cas de t(X;A) équilibrées, l'X normal est inactif, la copie exprimée du gène HPRT est donc portée par le der(A) (si le point de cassure, sur les bras longs de l'X, est proximal par rapport au locus

de ce gène, ce qui est le cas pour nos 8 réarrangements). Tout au long des résultats, pour deux marqueurs (A et B) portés par le même bras d'un chromosome, nous dirons que A (le locus de A) est proximal par rapport à B si A est plus proche du centromère que B. Dans le cas contraire, on dira que A est distal par rapport à B.

Nous avons donc dans un premier temps réalisé des hybrides somatiques interspécifiques (HSI) à partir des différents cas de $t(X;A)$ afin d'isoler le $der(A)$. La garniture en chromosomes humains des HSI n'étant pas prévisible (l'expulsion des chromosomes humains est aléatoire), il était donc indispensable de procéder, dans un deuxième temps, à un tri des clones hybrides ayant retenu comme seul matériel de l'X la région transloquée sur l'autosome.

A) FABRICATION DES HYBRIDES SOMATIQUES INTERSPECIFIQUES

Les clones hybrides pour les cas PMI et SN ont été réalisés avant mon arrivée au laboratoire. L'HSI C56N nous a été fourni par C. Turleau.

Pour les 5 autres cas, nous avons donc fusionné les différentes lignées lymphoblastiques porteuses de $t(X;A)$ avec une lignée de hamster chinois délétée pour le gène HPRT. En choisissant une lignée de rongeur (RJK 88, Fuscoe et al., 1983) délétée pour le marqueur de sélection, on s'affranchit des réversions (mutation dans le sens mutant --> sauvage) possibles lorsque le gène est inactivé par une mutation ponctuelle. Comme nous le verrons par la suite, il est indispensable pour des études moléculaires sur des HSI de sélectionner pour chaque cas de $t(X;A)$ un grand nombre de clones différents. Pour ce faire, nous avons choisi d'utiliser des boîtes de culture de grande surface (75 cm^2) dans le but d'isoler plusieurs clones par boîte. Nous nous sommes alors aperçus qu'après avoir récupéré le premier clone sur une boîte, il apparaissait des clones "fils" issus des quelques cellules hybrides résiduelles provenant du premier clone. Il devenait alors impossible de distinguer un nouveau clone d'un clone "fils". Nous avons finalement choisi de répartir le produit de fusion dans un plus grand nombre de boîtes de 25 cm^2 , pour ne sélectionner qu'un seul clone par boîte.

Nous avons ainsi obtenu 4 clones pour BC et TDo, 5 clones pour LG, 7 clones pour FA et 9 clones pour WD.

B) TRI DES CLONES HYBRIDES UTILISABLES POUR LA CARACTERISATION DES POINTS DE CASSURE SUR L'X

La localisation des points de cassure sur l'X de nos différentes t(X;A) ne peut être effectuée que sur des clones HSI qui contiennent comme seul matériel de l'X celui présent sur le der(A). Il faut donc s'assurer de l'absence de l'X normal et du der(X) au sein d'un clone hybride avant de débiter les analyses de cartographie du point de cassure sur l'X. Notons dès à présent que, dans cette étude, nous ne nous sommes pas intéressés aux points de cassure sur les autosomes.

Pour la vérification moléculaire de l'absence du der(X) et de l'X normal dans les HSI, nous avons testé (par technique de Southern) tous les clones hybrides avec 4 sondes de l'X (figure 20):

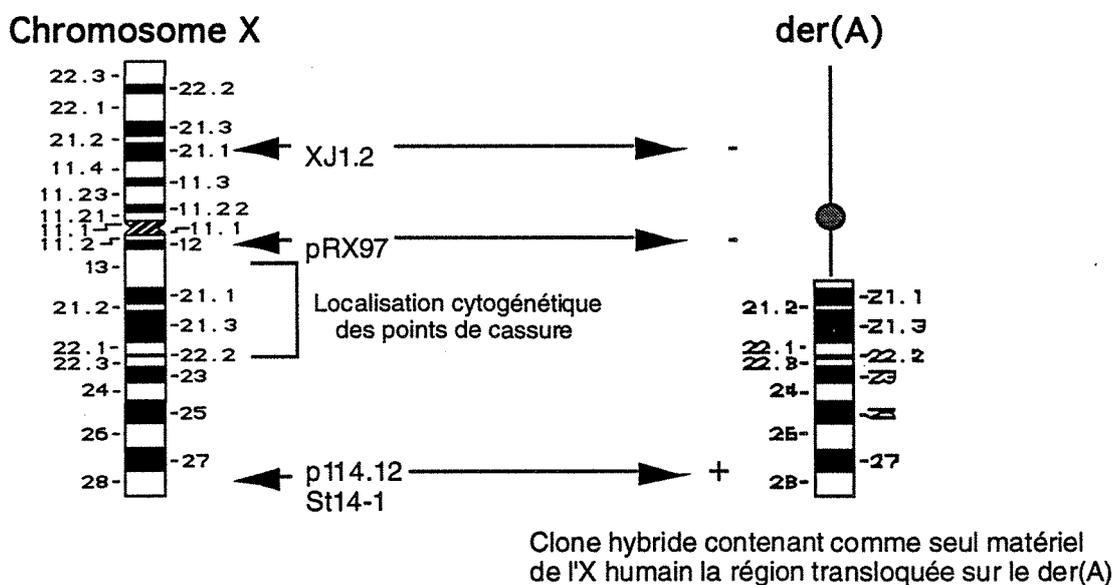


Figure 20 : Sondes utilisées pour le tri des HSI

-p114.12 (F8C) et St14-1 (DXS52) situées en Xq28, donc en position distale par rapport aux points de cassure,

-pRX97 (DXS348, Xq12-q13.1) et XJ1.2 (DXS206, Xp21.1) situées en position proximale par rapport aux points de cassure.

Les clones hybrides contenant, pour le chromosome X humain, la garniture adéquate sont ceux qui donnent une réponse positive avec les deux sondes distales par rapport aux points de cassure, c'est-à-dire situées entre le point de cassure et Xqter (Acen - point de cassure - p114.12 et St14-1 - Xqter) sans

contenir le locus des sondes pRX97 et XJ1.2, présentes uniquement sur le der(X) et sur l'X normal (figure 20).

Le tri a été effectué en deux temps. L'ensemble des clones (y compris ceux réalisés avant mon arrivée au laboratoire à savoir PM.I. cl1, C56N cl1 et SN cl1) ont d'abord été étudiés avec les sondes p114.12, St14-1 et XJ1.2 (sur un même blot). Les clones retenus ont ensuite été testés avec pRX97.

Les autoradiogrammes obtenus lors du tri de clones hybrides sont présentés dans les figures 21, 22 et 23. Les résultats sont regroupés dans le tableau IV, les clones retenus pour la suite du travail sont les suivants :

- | | |
|------------------------|----------------------|
| - PMI cl1 | - LG cl3, cl4 et cl5 |
| - C56N cl1 | - FA cl2, cl5 et cl7 |
| - TDo cl1 et cl3 | - BC cl2 et cl4 |
| - WD cl3, cl 8 et cl10 | - SN cl1 |

Toutes les recherches de la présence du locus d'une sonde (par technique de Southern ou, dans la suite des résultats, par PCR) dans des lignées hybrides sont effectuées en présence d'un ADN témoin de la lignée de rongeur (RJK88) utilisée pour l'hybridation somatique interspécifique. Ce témoin permet d'affirmer qu'un signal obtenu avec une sonde donnée dérive bien de la composante humaine du génome de l'hybride homme/rongeur. Lorsque la sonde utilisée correspond à une séquence exprimée, des signaux sont détectés avec l'ADN de hamster car les gènes sont relativement conservés au cours de l'évolution.

La plupart des clones écartés l'ont été car ils contenaient le locus de la sonde XJ1.2, attestant de la présence de la région Xp21.1 donc sans doute du der(X) et/ou de l'X normal. Dans certains clones, on peut détecter la présence de l'X normal en plus du der(A) quand une des sondes distales utilisées permet de distinguer l'X normal de l'X transloqué dans la lignée parentale (LB). Par exemple, la sonde St14-1 détecte deux fragments (2,1 et 2,8 kb) dans la lignée LB LG. Le fragment de 2,1 kb correspond au der(A) seul présent dans les hybrides LG cl3, cl4 et cl5. L'hybride LG cl7 contient en plus du fragment de 2,1 kb celui de 2,8 kb, ceci prouve que l'X normal est toujours présent dans ce clone (ce qui est confirmé par la présence de la bande de 1,7 kb détectée par la sonde XJ1.2). On ne peut néanmoins pas savoir si, dans l'hybride LG cl 7, le der(X) est présent ou absent. Par contre, dans l'hybride LG cl2, le der(A) est présent (comme l'atteste le fragment de 2,1 kb), l'X normal est absent (le fragment de 2,8 kb n'est pas présent) mais le der(X) cette fois-ci est présent, au moins dans une proportion des cellules (en effet, le signal à 1,7 kb qui

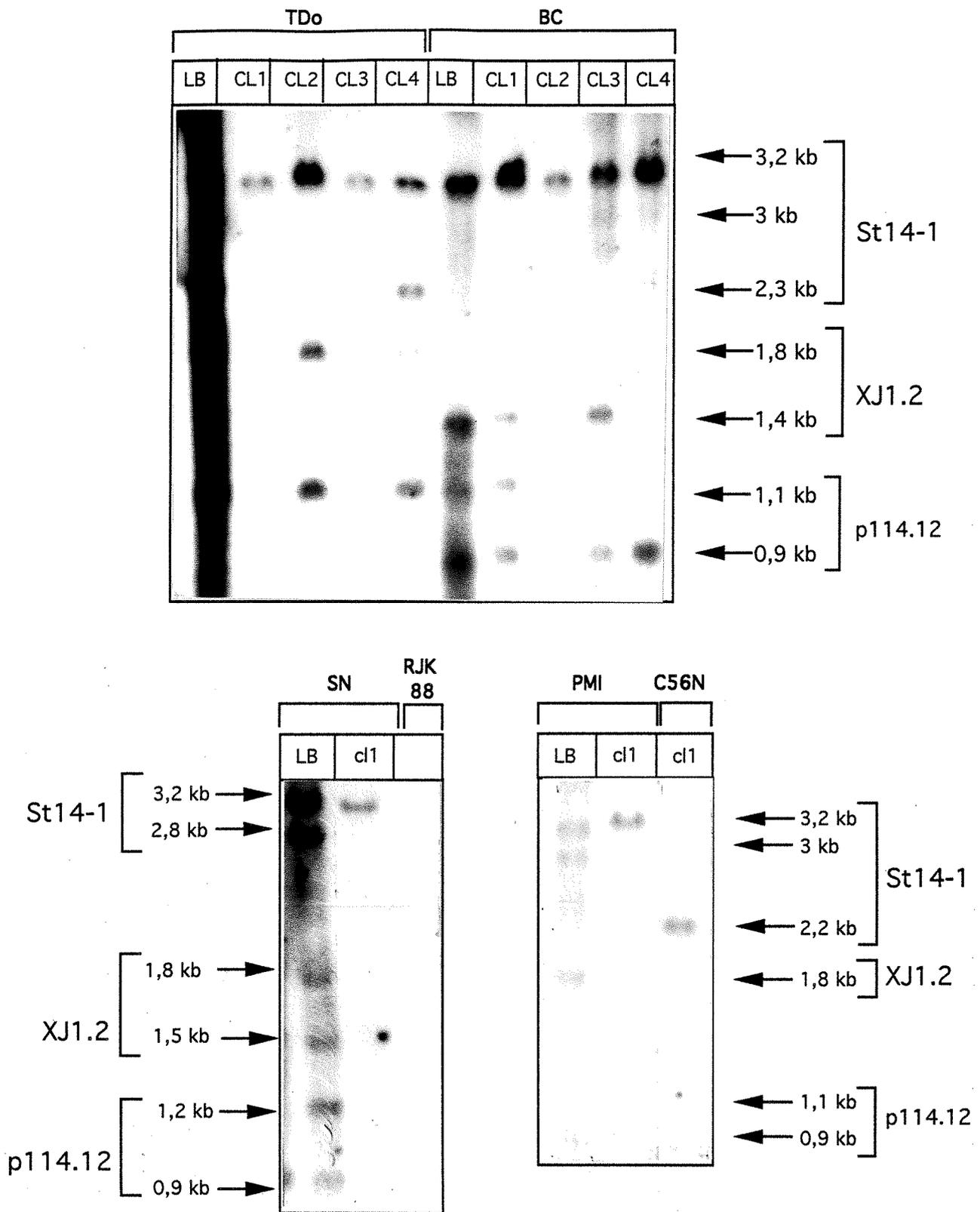


Figure 22 : Vérification moléculaire de l'absence de l'X normal et du der(X) au sein des hybrides somatiques interspécifiques

Autoradiogrammes obtenus avec les sondes St14-1, XJ1.2 et p114.12.
ADN digérés par Bcl1.

LB : lignée lymphoblastique parentale ; RJK 88 : lignée de rongeur utilisée pour l'hybridation somatique interspécifique ; cl1 : hybride cl1.

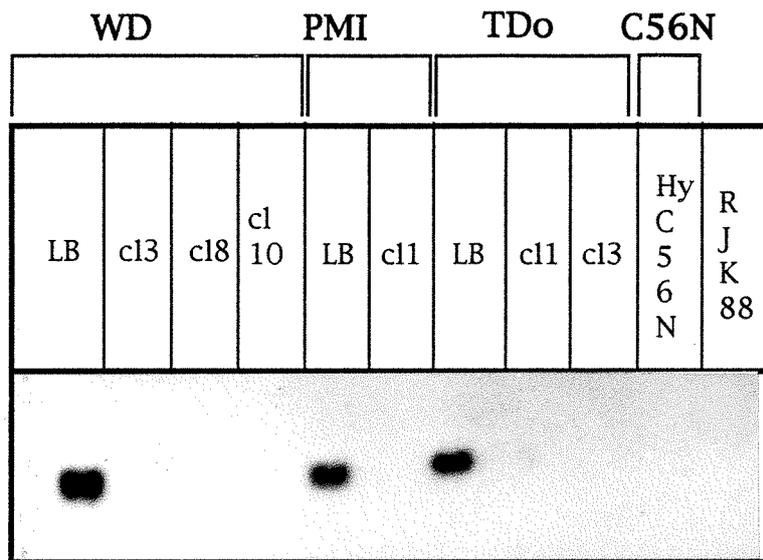
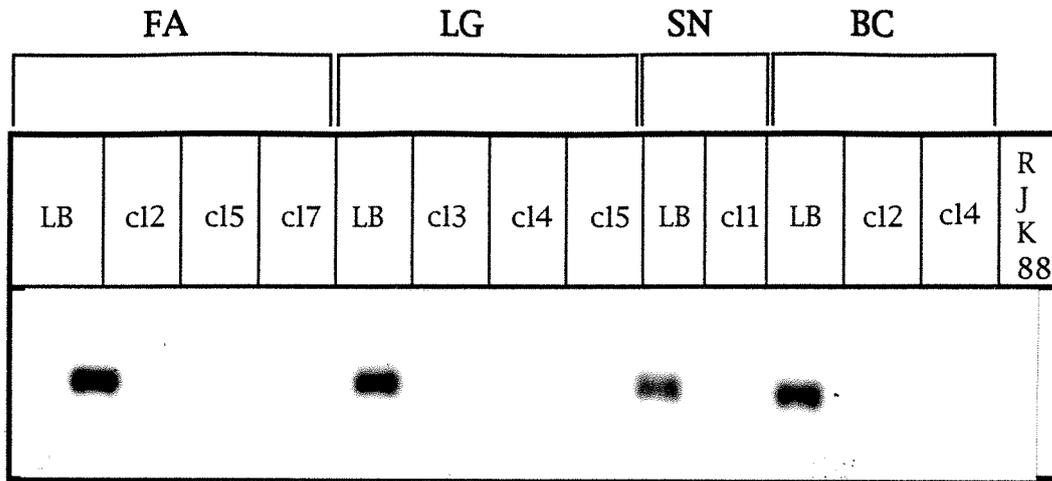


Figure 23 : Vérification moléculaire de l'absence de l'X normal et du der(X) au sein des hybrides somatiques interspécifiques

Autoradiogrammes obtenus avec la sonde pRX97 (DXS348)
ADN digérés par Taq 1.

LB : lignée lymphoblastique parentale ; RJK 88 : lignée de rongeur utilisée pour l'hybridation somatique interspécifique ; c11 : hybride c11.

La taille en kb du fragment détecté par pRX97 n'a pas pu être calculée car, après l'électrophorèse, les distances de migration des différents fragments du marqueur de taille n'ont pas été mesurées (par omission).

	LG						FA									BC					SN	
	LB	c12	c13	c14	c15	c17	LB	c12	c13	c14	c15	c16	c17	c19	LB	c11	c12	c13	c14	LB	c11	
XJ1.2	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	
pRX97	+	ND	-	-	-	ND	+	-	ND	ND	-	ND	-	ND	+	ND	-	ND	-	+	-	
st14.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	
p114.12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	

	PMI		C56N	TDo					WD									
	LB	c11	c11	LB	c11	c12	c13	c14	LB	c11	c12	c13	c14	c15	c16	c17	c18	c110
XJ1.2	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
pRX97	+	-	-	+	-	ND	-	ND	+	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	-	-
st14.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	(?)	+	+	+	-	+	+
p114.12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	(?)	+	+	-	-	+	+

Tableau IV : Résultats des expériences d'hybridation réalisées lors de la sélection des clones hybrides ne contenant ni le der(X) ni l'X normal.

LB : lignée lymphoblastique parentale.

c11 : clone hybride numéro 1.

+

- : le locus de la sonde est absent de l'ADN extrait de la lignée lymphoblastique ou de l'hybride.

Les sondes utilisées pour la vérification des hybrides sont les suivantes de Xqter vers Xpter :

- p114.12 (F8C) et St14-1 (DXS52) localisées en Xq28,

- pRX97 (DXS348) localisée en Xq12-q13.1,

- XJ1.2 (DXS206) localisée en Xp21.1 (dans le gène de la myopathie de Duchenne).

ND : non déterminé

Les clones contenant le der(A) comme seul matériel de l'X humain sont encadrés par un trait gras.

correspond au locus de la sonde XJ1.2 est faible). Selon le même raisonnement, on peut dire que l'X normal est présent dans les hybrides WD CL4, TDo cl4 et BC cl1.

Une première remarque s'impose concernant le tri des hybrides basé sur la technique de Southern. L'absence de signal avec la sonde située en Xp21.1 prouve seulement que la grande majorité des cellules du clone en question ne contient pas la région Xp21.1 de l'X humain. En effet, Drwinga et al. (1993) estiment que, quand un chromosome humain est détecté par analyse cytogénétique dans seulement 20 à 25% des cellules d'un clone hybride, le signal en Southern blot est faible voire indétectable suivant la sonde (localisée sur ce chromosome) utilisée. Il aurait sans doute été préférable d'opérer ce tri à l'aide de marqueurs ADN par PCR, une méthode plus sensible pour la détection d'un chromosome présent dans une faible proportion de cellules (et beaucoup plus rapide et économique que la technique de Southern). Or, au moment de ce tri, le laboratoire ne disposait pas d'appareil pour la PCR. Toutefois, par la suite, des marqueurs testés par PCR sur notre panel d'hybrides sont venus confirmer les résultats obtenus par Southern blot.

Au sein des hybrides somatiques interspécifiques, les remaniements chromosomiques sont fréquents (Drwinga et al., 1993 ; Dubois et Naylor, 1993). Très souvent, un clone hybride contient des petits fragments d'ADN humain (non identifiables par cytogénétique) ainsi que des chromosomes chimères comportant des fragments chromosomiques humains transloqués sur (ou insérés dans) des chromosomes de rongeur. Dans certains clones hybrides, les réponses obtenues avec les sondes testées en Southern suggèrent de tels remaniements. Par exemple, les hybrides WD cl1, FA cl4 et cl9 ne donnent aucun signal avec les sondes situées en Xq28 et Xp21.1. Ceci semble donc indiquer que l'X normal, le der(X) et le der(A) sont absents. Or, ces clones ont été sélectionnés dans un milieu HAT, ils contiennent donc forcément le gène HPRT humain localisé en Xq26. On peut donc penser que ces hybrides comportent au moins un fragment de l'X humain (libre ou dans un chromosome de hamster) porteur du gène de l'HPRT. Nous reviendrons sur cette notion de réarrangements dans les HSI à deux reprises dans la suite des résultats.

Locus	Sonde	HYBRIDE							
		PMI cl 1	C56N cl 1	TDo cl 1	WD cl 10	LG cl 4	FA cl 2	BC cl 2	SN cl 1
DXS153	cX37.1	-							
DXS132	cpX23	-							
DXS135	cpX93	-							
PGKP1	pHPGK-7e	-	-						
DXS159 *	cpX289	-		-	-			-	
DXS131	cpX21	+							
DXS128	cX65.3	+							
XIST	pG1aX2.2	+	-						
DXS171	cpX63.c	+	-						
PGK1	pHPGK-7e	+	-						
DXS56	pL2.98	+	-		-				
DXS227	p1bB4	+	-						
DXS72	pX65H7	+	+	-	-	-	-	-	-
DXS26 *	pHU16	+	+	-	-	-	-	-	-
DXS232	pJL68	+	+	-	-	-	-	-	-
DXS121	p784	+	+	-	-	-	-	-	-
DXS165 *	p1bD5				-	-			
DXS540	pZ11c	+	+	-	-	-	-	-	-
DXS95	pXG7.c				-				
DXS110 *	p722	+	+	+	+	-	-	-	-
- *	pXG8b				+	+			
DXYS1X *	pDP34	+	+	+	+	+	-	-	-
DXYS5X *	p47b	+	+	+	+	+	-	-	-
DXYS7X *	13d	+	+	+	+	+	-	-	-
DXYS12X*	pst25.2	+	+	+	+	+	-	-	-
DXYS13X	pTAK2	+	+	+	+	+	-	-	-
DXYS31X	GMGX5	+	+	+	+	+	-	-	-
DXYS32X	GMGX6	+	+	+	+	+	-	-	-
DXYS34X	GMGX8	+	+	+	+	+	-	-	-
DXYS35X	GMGX9	+	+	+	+	+	-	-	-
DXYS42X*	pDP307	+	+	+	+	+	-	-	-
DXS214 *	pPA20	+	+	+	+	+	-	-	-
DXS3	p19.2	+	+	+	+	+	-	-	-
DXS112 *	p753	+	+	+	+	+	-	-	-
DXS73 *	pX20R42	+	+	+	+	+	+	-	-
DXS87 *	pA13R1	+	+	+	+	+	+	+	-
DXS88	pG3-1	+	+	+	+	+	+	+	-
DXS96 *	pX63.b		+			+	+	+	-
DXS118*	p776		+			+	+	+	-
- *	pF1		+			+	+	+	-
- *	pF8		+			+	+	+	-
DXS211	pD3								-
DXS94 *	pXG12		+			+	+		-
DXS17	pS9								-
DXS111	p733								+

Tableau V : Résultats des expériences d'hybridation effectuées lors de la localisation des points de cassure sur l'X par rapport aux sondes de la région q13-q22.

+ : le locus de la sonde est présent sur le der(A).
- : le locus de la sonde n'est pas présent sur le der(A).

* : Pour ces sondes, les différents clones disponibles pour les cas TDo (cl1 et cl3), WD (cl3, cl8 et cl10), LG (cl3, cl4 et cl5), FA (cl2, cl5 et cl7) et BC (cl2 et cl4) ont été testés. Pour les autres sondes, un seul clone par point de cassure a été testé.

C) LOCALISATION DES POINTS DE CASSURE SUR L'X PAR RAPPORT AUX MARQUEURS DE LA REGION Xq13-q22

Nous avons donc débuté la caractérisation moléculaire des points de cassure de nos huit cas de t(X;A) à l'aide des clones hybrides contenant le der(A) comme seul matériel de l'X humain. Ces études de cartographie physique à l'aide d'hybrides somatiques interspécifiques (HSI) permettent d'une part de préciser la localisation de points de cassure par rapport aux marqueurs de la région de l'X et, d'autre part, d'améliorer la carte physique des sondes et des gènes en les positionnant les uns par rapport aux autres dans cette même région. Les deux intérêts de cette approche sont indissociables car dès lors qu'un point de cassure est distal par rapport au locus d'une sonde, on positionne par là même le locus de ce marqueur entre le centromère et le point de cassure. Cependant, deux étapes peuvent être distinguées lors de la caractérisation d'un panel de réarrangements de l'X (ou d'un autre chromosome) à l'aides d'HSI :

- 1ère phase : au début, les points de cassure sont localisés par rapport aux marqueurs de la région en utilisant des sondes bien ordonnées et relativement espacées, au niveau moléculaire, les unes par rapport aux autres,

- 2ème phase : quand les points de cassure sont précisément situés par rapport à des marqueurs au sein d'une région donnée d'un chromosome, le panel est alors utilisé pour préciser la localisation de sondes encore mal assignées.

La première phase de la caractérisation de nos points de cassure dans la région Xq13-q22 a été réalisée en grande partie au cours d'un stage de 2 mois (septembre/octobre 1991) dans le laboratoire de H.H. Ropers à Nimègue (Pays-Bas). Il nous a été donné d'employer le grand nombre de sondes de la région Xq proximale alors disponibles dans ce laboratoire. Au total, 44 sondes (tableau V) ont été testées par technique de Southern sur nos huit points de cassure. Pour les différents clones hybrides retenus après la sélection, nous avons réalisé une culture massive (sur au moins deux boîtes de 175 cm²) afin d'extraire une grande quantité d'ADN. Il nous a été ainsi possible de rechercher le locus d'un grand nombre de marqueurs de la région au sein d'ADN d'hybrides à un instant donné en nous libérant de l'instabilité du contenu chromosomique des HSI en culture au cours du temps (réarrangements secondaires et variation du pourcentage de cellules

hybrides contenant le der(A)) (Oberlé et al., 1986). Des économies en temps et en matériel ont été réalisées en hybridant plusieurs sondes sur une même membrane (grâce à des cycles hybridation/ déshybridation).

Au départ, les sondes sont testées sur l'ensemble du panel c'est-à-dire sur les huit points de cassure. Au fur et à mesure de l'avancement de la localisation des points de cassure par rapport à certains marqueurs, et en fonction des données cartographiques alors disponibles, certaines sondes ne sont hybridées que sur une partie du panel. Pour les cas TDo, WD, LG, FA et BC, les localisations moléculaires des points de cassure sur l'X sont le plus souvent obtenues avec plusieurs clones hybrides.

La figure 24 présente les exemples typiques des trois situations possibles :

- A : cas d'une sonde testée uniquement sur deux points de cassure (les plus proches du centromère),
- B : cas d'un marqueur testé sur les 8 points de cassure, un seul clone pour chaque cas de $t(X;A)$ est utilisé,
- C et D : cas de sondes hybridées avec l'ensemble des clones disponibles pour les 8 points de cassure.

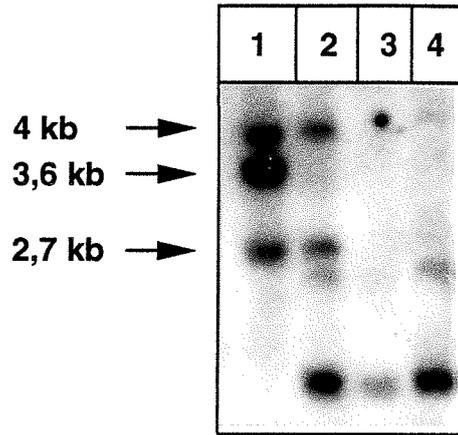
Des résultats identiques pour différents clones dérivés d'un même cas de $t(X;A)$ tendent à prouver l'absence de réarrangements secondaires (survenus *in vitro* au sein de l'hybride) au niveau du point de cassure sur le der(A). Par contre, la localisation du point de cassure pour PMI, C56N et SN est le résultat de l'analyse d'un seul clone hybride. Il n'est donc pas possible de savoir avec certitude si la localisation déduite reflète la position du point de cassure *in vivo* chez ces patientes. Cette restriction n'est pas très gênante si le point de cassure est uniquement utilisé comme balise pour la cartographie physique. La situation est totalement différente si la $t(X;A)$ est associée à une pathologie récessive liée au chromosome X et que l'on veut se servir de l'hybride pour isoler le gène lésé par le réarrangement. Nous verrons par la suite que c'est le cas de l'hybride PMI c11 utilisé dans l'espoir d'isoler un gène à l'origine d'un des nombreux retard mentaux liés à l'X que compte la région Xq proximale.

Ainsi, à la fin de cette première phase, nos huit points de cassure sont ordonnés de la façon suivante :

Xcen - PMI - C56N - TDo - WD - LG - FA - LG - BC - SN-Xqter

PMI est localisé en Xq13 et SN en Xq22, les six autres points de cassure sont situés dans la bande Xq21 (figure 25).

A

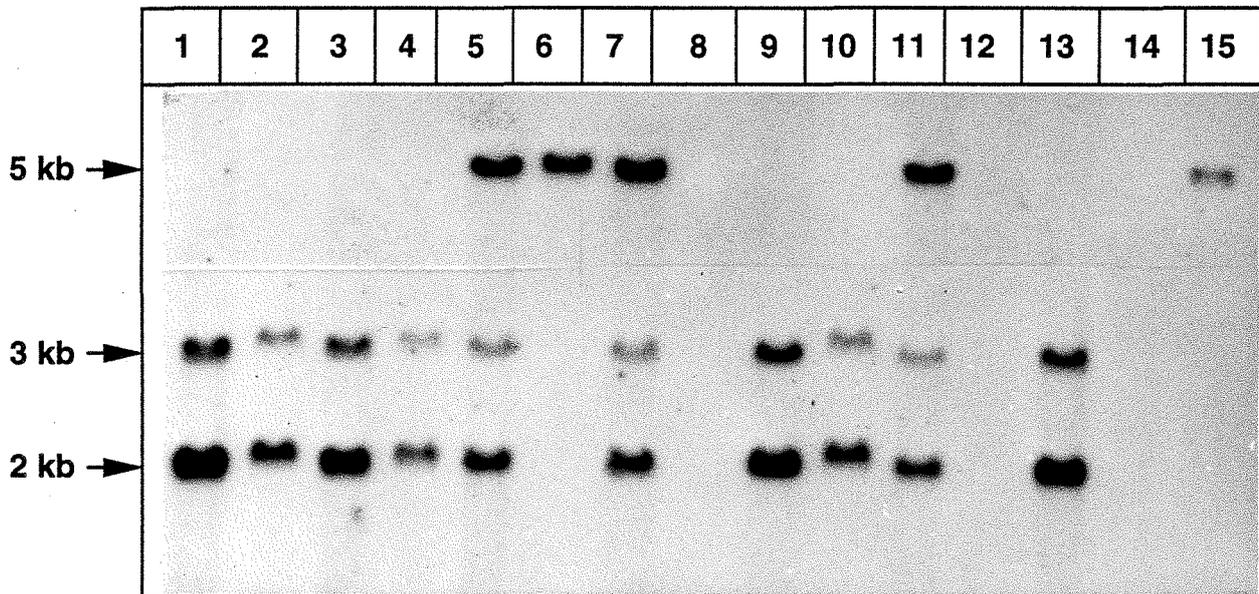


pHPGK-7 e (PGKP1 et PGK1) / ADN digérés par EcoRI

1 : LB PMI ; 2 : Hy PMI cl1 ; 3 : Hy C56N cl1 ; 4 : RJK 88

La sonde pHPGK-7e est l'ADNc du gène humain porté par l'X de la phosphoglycérate kinase. La bande de 3,6 kb correspond au pseudogène (PGKP1), celles de 4 kb et 2,7 kb indiquent la présence du gène fonctionnel (PGK1) (Michelson et al., 1985)

B



p19.2 (DXS3) / ADN digérés par Taq 1

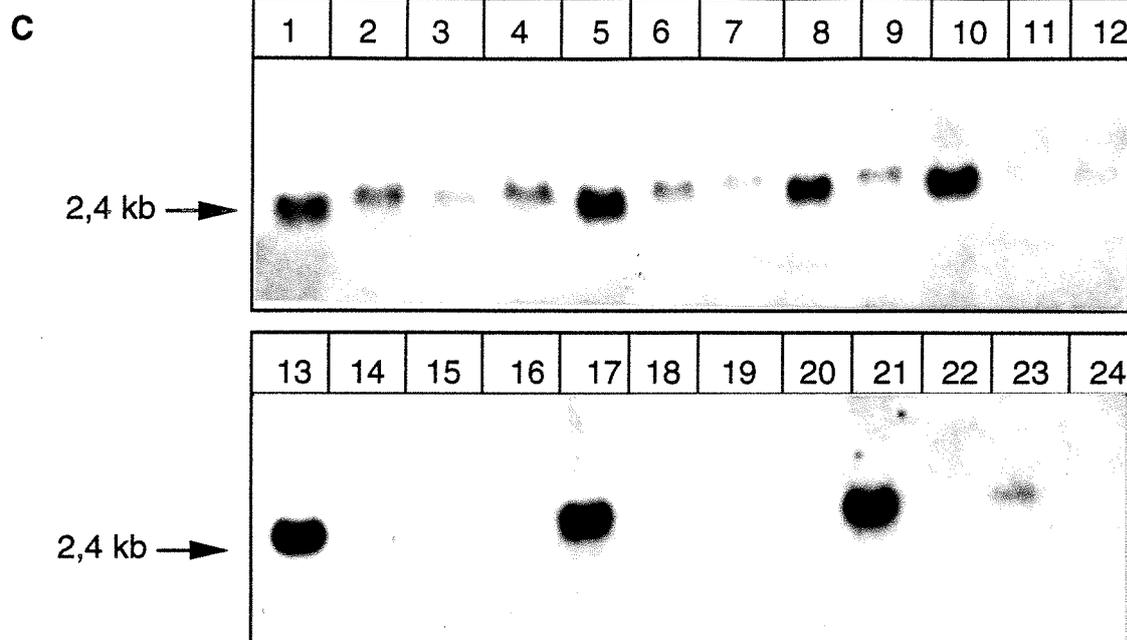
1 : LB WD ; 2 : Hy WD cl10 ; 3 : LB PMI ; 4 : Hy PMI cl1 ; 5 : LB TDo ; 6 : Hy TDo cl1 ; 7 : LB FA ; 8 : Hy FA cl2
9 : LB LG ; 10 : Hy LG cl4 ; 11 : LB SN ; 12 : Hy SN cl1 ; 13 : LB BC ; 14 : Hy BC cl2 ; 15 : Hy C56N

Figure 24: Exemples de résultats d'hybridation.

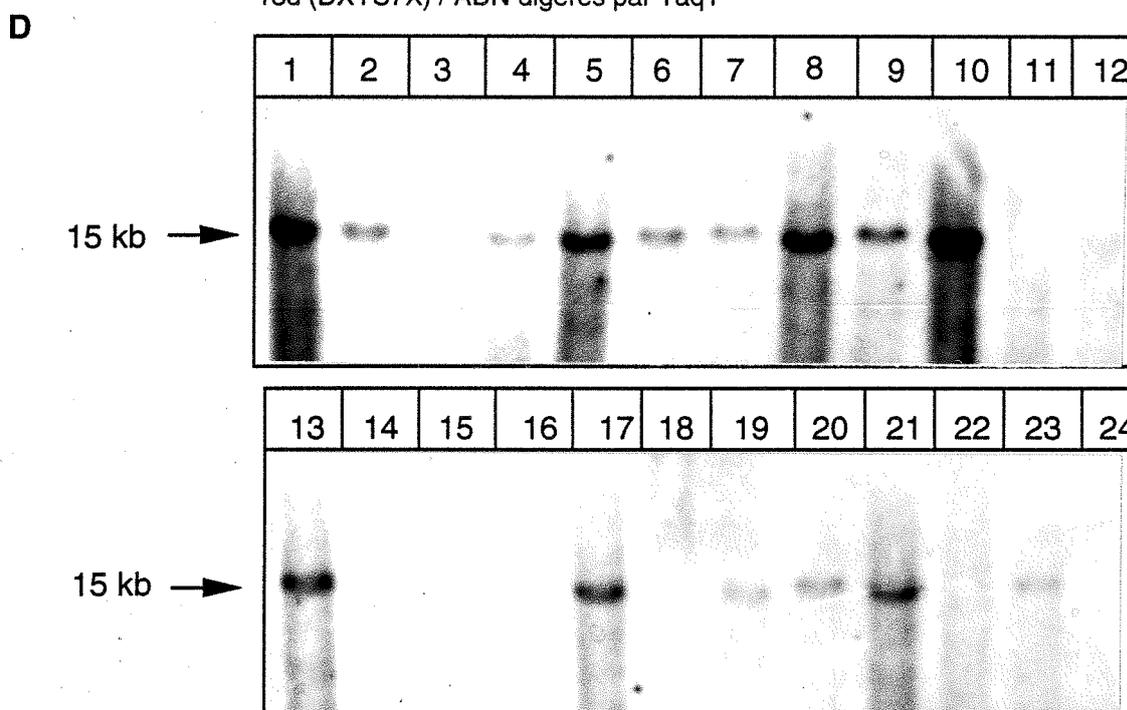
A : utilisation d'un ADNc.

B : utilisation d'une sonde anonyme.

p722 (DXS110) / ADN digérés par HindIII



13d (DXYS7X) / ADN digérés par Taq1



Sur le blot utilisé pour la sonde 13d (DXYS7X), L'ADN de l'hybride LG cl3 n'est pas digéré par Taq1, ceci explique l'absence de signal à 15 kb.

1 : LB WD ; 2 : Hy WD cl3 ; 3 : Hy WD cl8 ; 4 : Hy WD cl10 ; 5 : LB TDo ; 6 : Hy TDo cl1
 7 : Hy TDo cl3 ; 8 : LB PMI ; 9 : Hy PMI cl1 ; 10 : LB BC ; 11 : Hy BC cl 2 ; 12 : Hy BC cl4
 13 : LB FA ; 14 : Hy FA cl2 ; 15 : Hy FA cl5 ; 16 : Hy FA cl7 ; 17 : LB LG ; 18 : Hy LG cl3
 19 : Hy LG cl4 ; 20 : Hy LG cl5 ; 21 : LB SN ; 22 : Hy SN cl1 ; 23 : Hy C56N ; 24 : RJK 88

Figure 24: Exemples de résultats d'hybridation.

C et D : utilisation de sondes anonymes.

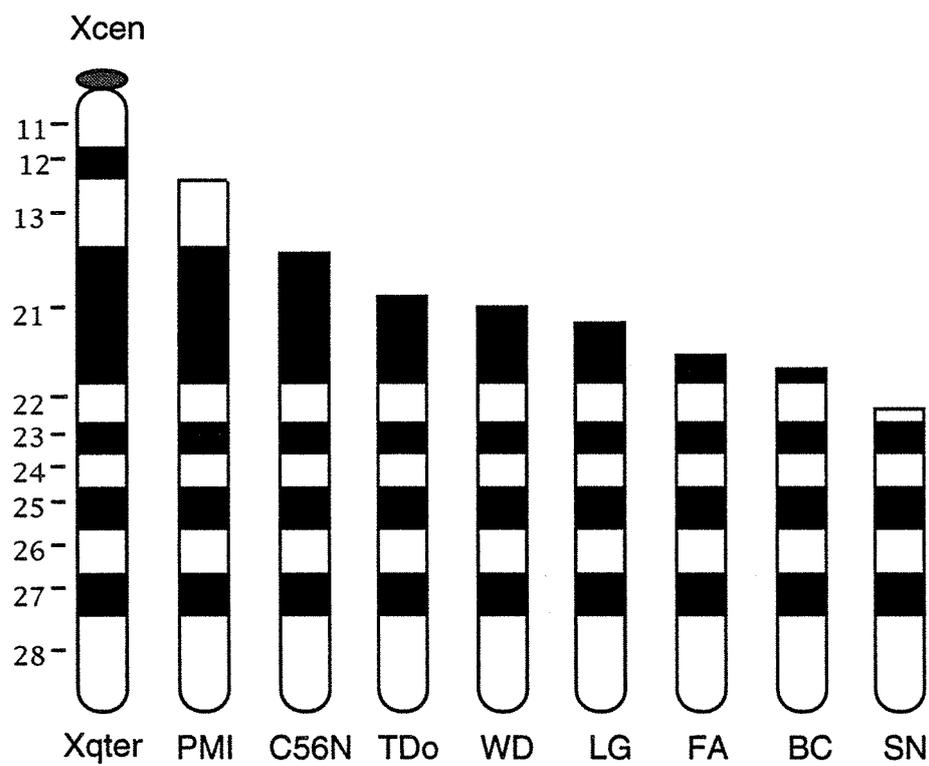


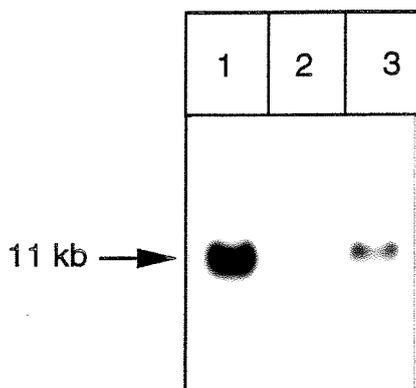
Figure 25 : Les différentes régions de l'X isolées par hybridation somatique interspécifique à partir des t(X;A).

Des résultats contradictoires obtenus avec le clone BC cl4 révèlent, au sein de cet hybride somatique, la présence de matériel de l'X en plus de la partie q21-pter porté par le der(12). En effet, un certain nombre de marqueurs situés entre le point de cassure FA et C56N (donc en position proximale par rapport au point de cassure BC, tel qu'il est déduit du clone 2) sont présents au sein de l'ADN de l'hybride BC cl4 (figures 26 et 27). Le clone BC cl4 n'est donc plus utilisé pour la cartographie physique de la région Xq proximale.

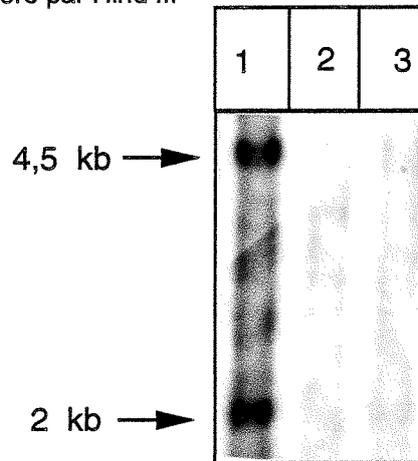
Un réarrangement secondaire d'un autre type a été mis en évidence dans l'hybride BC cl2. En effet, le chromosome d'intérêt (le der(12)) est porteur d'une délétion interstitielle puisque le locus DXS424 (Xq24-q25) est absent de l'hybride BC cl2 (D. Vetrie, Londres GB, communication personnelle) (nous avons envoyé les hybrides FA cl2, BC cl2 et SN cl1 au groupe de M. Bobrow qui travaille sur la carte de la région Xq22). Nous ne pouvons pas dire de façon certaine qu'il s'agit là d'une délétion survenue *in vitro* car nous n'avons pas exclue la possibilité que le der(12) soit délété chez la patiente BC. Cependant, cette délétion dans la région Xq24-q25 n'est pas gênante pour une utilisation de l'hybride BC cl2 à des fins de cartographie physique de la région Xq13-q22. Des microdélétions "secondaires" au sein d'hybrides ont déjà été décrites par d'autres auteurs (Dubois et Naylor, 1993 ; Bernard et al., 1993).

Par la suite, un seul clone (et toujours le même) sera utilisé pour la cartographie physique du chromosome X humain : Hybride (Hy) PMI cl1, Hy C56N cl 1, Hy TDo cl1, Hy WD cl10, Hy LG cl4, Hy FA cl2, Hy BC cl2 et Hy SN cl1. Nos résultats indiquent que, selon toute vraisemblance, ces clones contiennent, comme seul matériel dérivé du chromosome X humain, la région portée par le der(A). Pour savoir quels sont les autres chromosomes humains (en plus du der(A)) contenus dans ces différents clones, nous avons utilisé l'hybridation *in situ* à l'aide de sondes fluorescéinées (FISH).

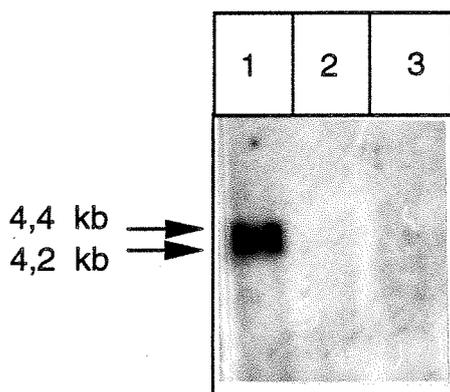
Sonde pHU16 (DXS26)
ADN digéré par PstI



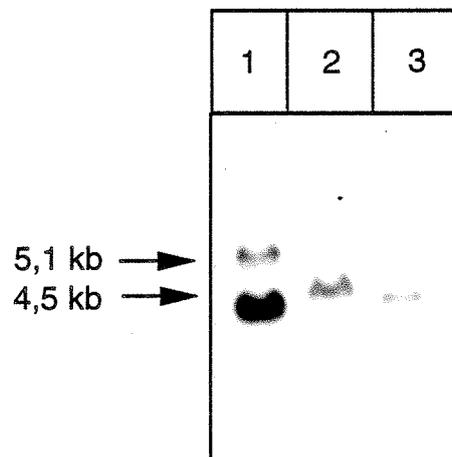
Sonde pX20R42 (DXS73)
ADN digéré par Hind III



Sonde pDP34 (DXYS1X)
ADN digéré par Taq I



Sonde pA13RI (DXS87)
ADN digéré par Bgl II



Sonde p753 (DXS112)
ADN digéré par EcoRI

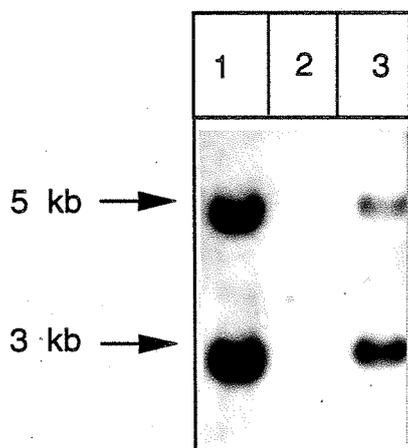


Figure 25: Mise en évidence de matériel de l'X autre que la région q21-qter portée par le der(12) au sein de l'hybride BC clone 4.

Autoradiogrammes obtenus avec les sondes suivantes : pHU16, pDP34, p753, pX20R42, et pA13RI.

Xcen - DXS26 - TDo - WD - LG - DXYS1X - DXS112 - FA - DXS73 - BC - DXS87 - Xqter

1 : LB BC ; 2 : Hy BC cl2 ; 3 : Hy BC cl4.

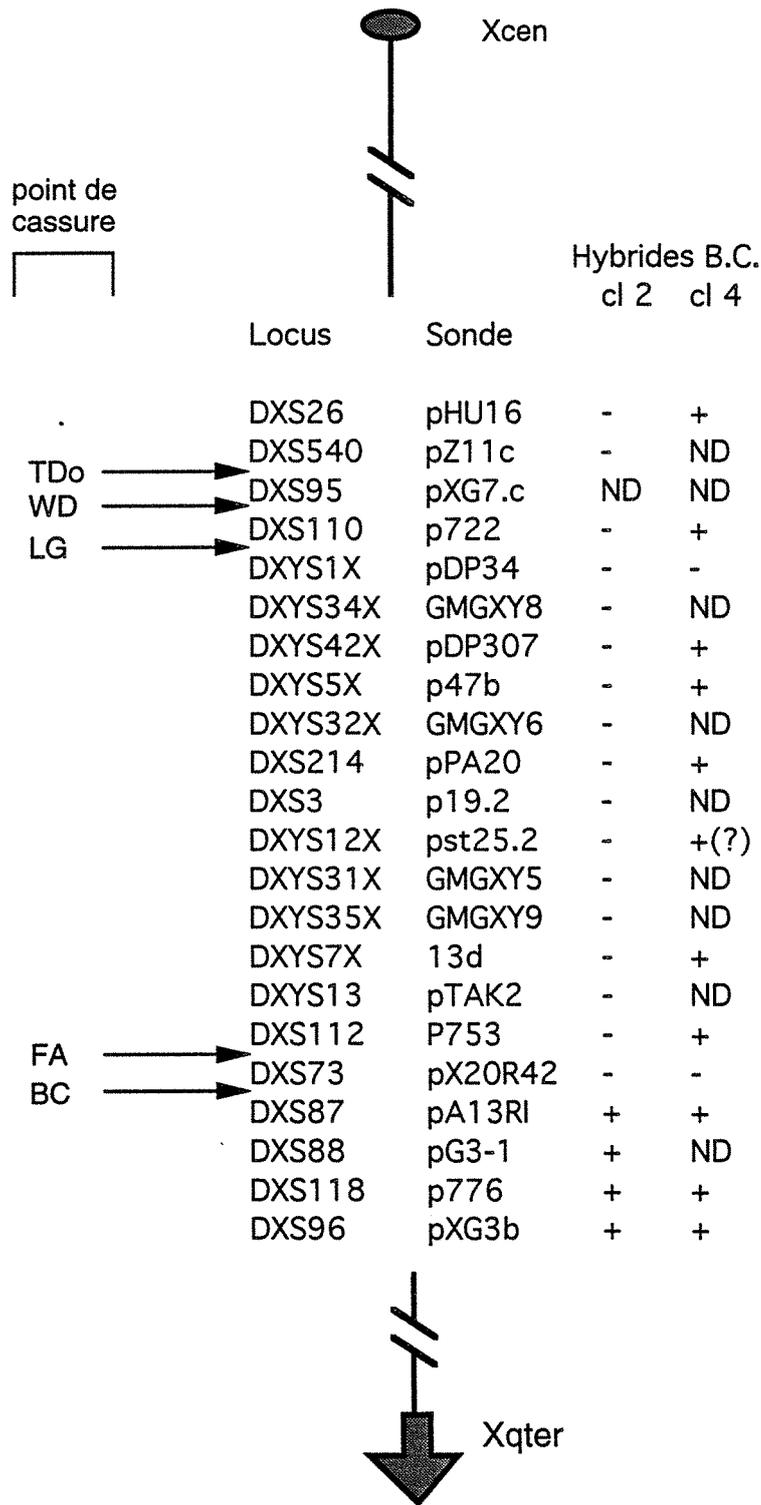


Figure 26 : Mise en évidence de matériel de l'X autre que le der(12) au sein de l'hybride BC clone 4.

+ : le locus de la sonde est présent dans l'ADN extrait de l'hybride.
 - : le locus de la sonde est absent de l'ADN extrait de l'hybride.
 ND : non déterminé

D) Caractérisation du contenu en chromosomes humains des hybrides somatiques par FISH

Les analyses par FISH ont été réalisées par Frédérique Sloan (laboratoire de génétique, Nancy).

Nous avons choisi de visualiser les chromosomes humains retenus dans les différents clones utilisés pour la cartographie de la région Xq13-q22 par "chromosome painting" (c'est-à-dire en FISH), car le repérage des chromosomes humains sur des métaphases hybrides n'est pas aisé après une technique cytogénétique classique. Il est possible de réaliser une technique cytogénétique dite de G-11 (les chromosomes sont colorés dans une solution de Giemsa à pH 11) (Bobrow et Cross, 1974). En bandes G-11, les chromosomes humains sont plus pâles que ceux du rongeur ; néanmoins, il est difficile de localiser et d'identifier des fragments de matériel humain libres ou remaniés avec les chromosomes du rongeur.

Nous avons un double objectif en utilisant le FISH pour repérer le matériel humain présent dans nos 8 clones hybrides :

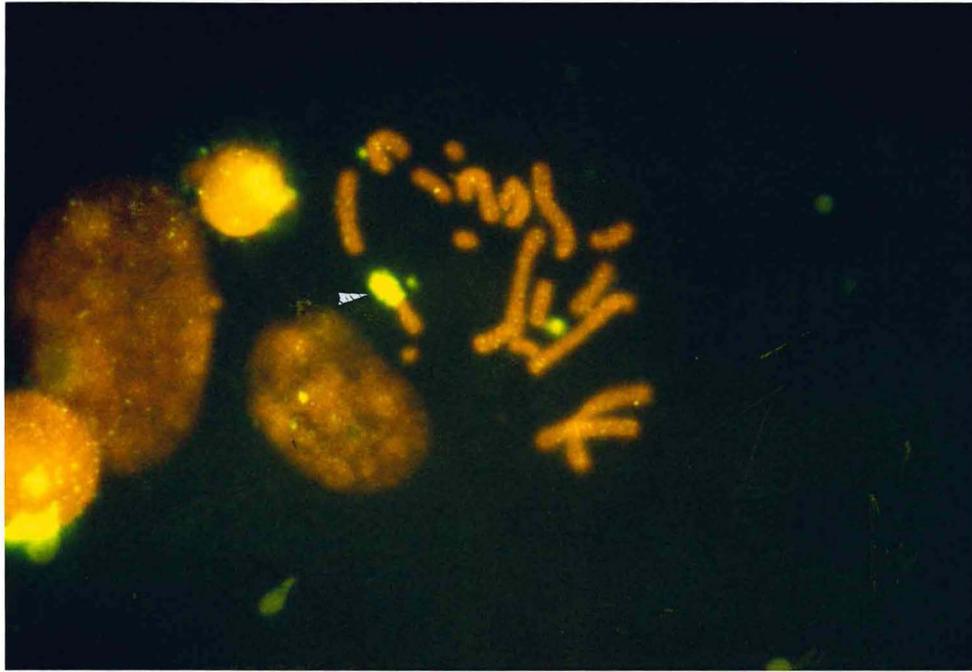
- s'assurer que le contenu en matériel de l'X est bien conforme aux données moléculaires en utilisant une sonde spécifique du chromosome X humain,
- détecter les autres autosomes par "chromosome painting" à l'aide d'une sonde d'ADN humain total puis identifier les chromosomes ou fragments de chromosomes humains par coloration en bandes QFQ. Pour ce faire, les mêmes métaphases sont successivement colorées en bandes QFQ puis analysées par FISH à l'aide d'ADN humain total.

Nous avons étudié les 8 clones employés pour la cartographie physique du chromosome X humain à savoir : Hy PMI cl1, Hy C56N cl 1, Hy TDo cl1, Hy WD cl10, Hy LG cl4, Hy FA cl2, Hy BC cl2 et Hy SN cl1.

Dans tous les cas, la sonde spécifique du chromosome X humain ne détecte qu'un fragment de chromosome sur les métaphases hybrides observées (figure 28). Comme ces hybrides sont cultivés dans un milieu de culture HAT, il est très probable que ce fragment détecté correspond à la région de l'X portée par le der(A).

L'analyse par "chromosome painting", avec l'ADN génomique total humain, nous démontre la rétention d'un assortiment variable de chromosomes humains au sein de nos 8 clones hybrides (tableaux VI et VII). Les figures 29a et b présentent les résultats obtenus avec les hybrides TDo cl1 et PMI cl1. Il ne s'agit pas ici de caractériser précisément les différents clones car

A



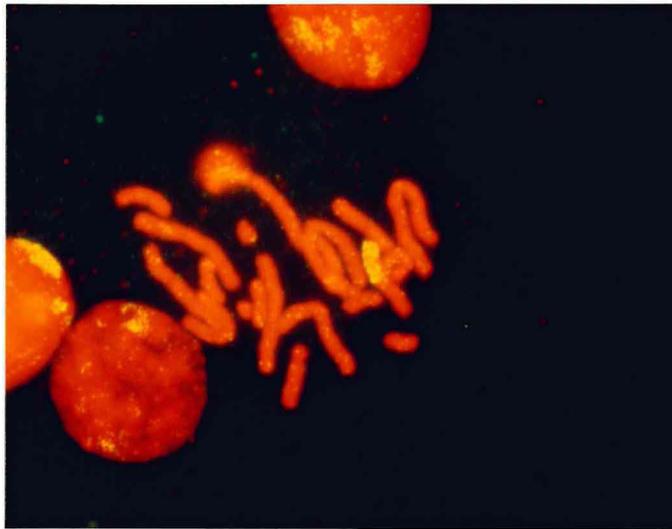
B



Figure 28 : Mise en évidence du der(A) dans les hybrides PMI c11 et TDo c11.

Analyse, par FISH, avec une sonde spécifique du chromosome X humain sur une métaphase de l'hybride TDo c11 (A) et PMI c11 (B). L'ADN humain apparaît en jaune, les chromosomes de hamster sont colorés en rouge. Dans les deux cas, seule la portion de l'X humain porté par le der(A) (indiquée par une flèche) est détectée.

A



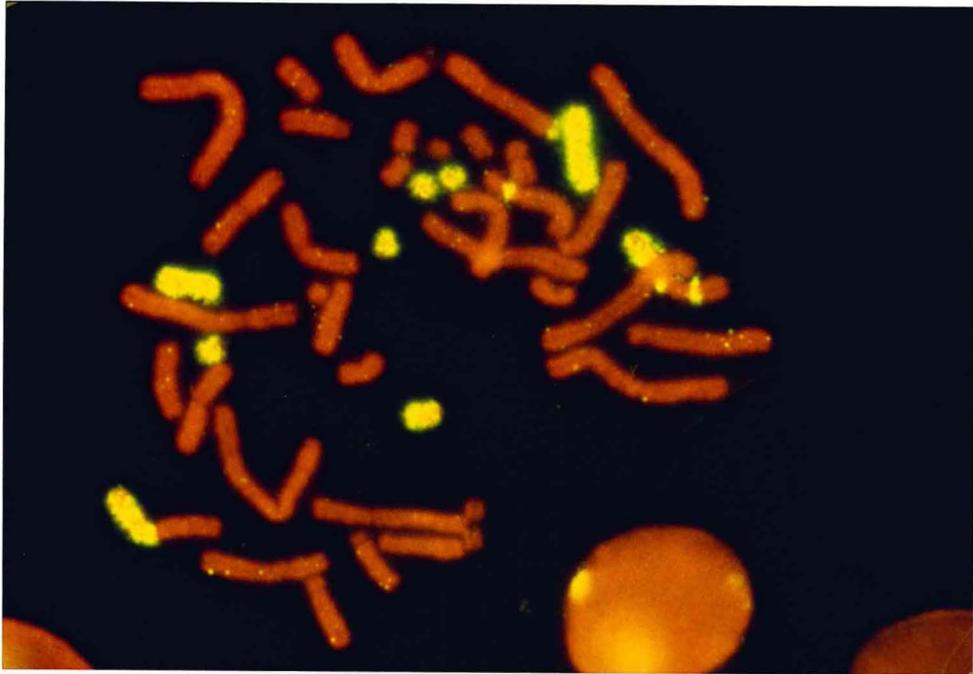
B



Figure 29a : Evaluation, par FISH, du contenu en chromosomes humains de l'hybride somatique interspécifique TDo c11.

Analyse par FISH avec de l'ADN génomique total humain sur une métaphase de l'hybride TDo c11 (A), la même métaphase en bandes QFQ (B). Sur cette métaphase hybride, la seule composante humaine détectée est la région 7p14::Xq21-qter du der(7) transloqué sur un chromosome de hamster.

A



B

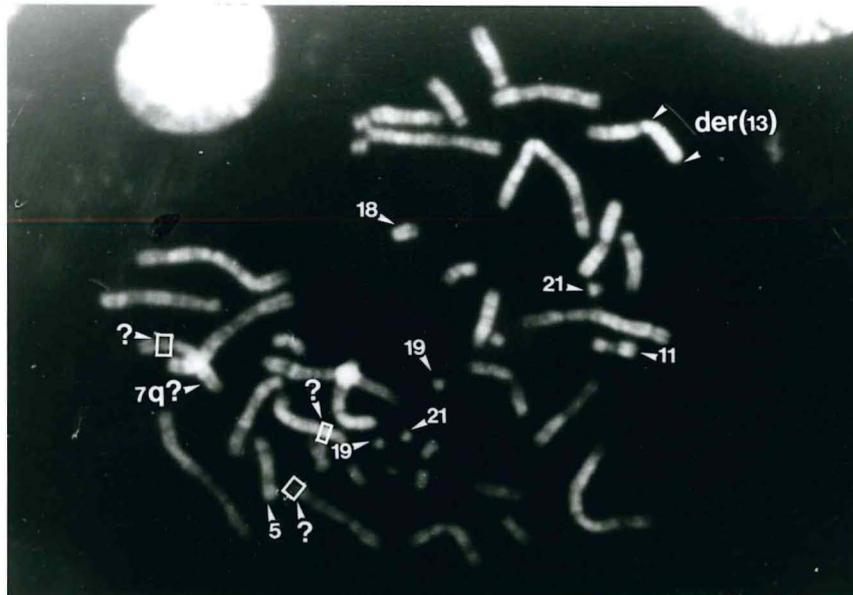


Figure 29b : Evaluation, par FISH, du contenu en chromosomes humains de l'hybride somatique interspécifique PMI c11.

Analyse par FISH avec de l'ADN génomique total humain sur une métaphase de l'hybride PMI c11 (A), la même métaphase en bandes QFQ (B). On repère ainsi des chromosomes humains libres, transloqués sur des chromosomes de rongeur (der(13), 7q?) et des fragments de chromosomes humains intégrés dans des chromosomes de rongeur (?).

CHROMOSOMES HUMAINS																										
Hybride	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X (a)	der (A)	F	T
PMI cl 1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	++	-	++	-	-	+(b)	-	+
C56N cl 1	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	++	-	+	-	-
WD cl 10	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	++	-	-	+	-	-
LG cl 4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+
FA cl 2	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-
BC cl 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+
SN cl 1	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-

Tableau VI : Evaluation du contenu en chromosomes humains des hybrides somatiques interspécifiques.

Pour chaque clone, quelque métaphases ont été analysées en bandes QFQ puis par FISH à l'aide d'ADN génomique total humain 46,XX.

- : le chromosome humain est absent de l'hybride.

+ : le chromosome humain (tout ou partie) est présent dans l'hybride.

++ : la paire de chromosomes homologues est présente dans l'hybride.

F : fragment(s) de chromosome(s) humain(s) libre(s) non identifié(s) en bandes QFQ.

T : fragment(s) de chromosome(s) humain(s) transloqué(s) sur un (des) chromosome(s) de rongeur non identifié(s) en bandes QFQ.

(a) : X normal ou der(X)

(b) : le der(13) est transloqué sur un chromosome de hamster dans l'hybride PMI cl1.

	CHROMOSOMES HUMAINS				
	A	B	C	D	E
	der (7) libre seul 7pter-7p12::Xq21-Xqter	Fragment du der (7) transloqué sur un chromosome de rongeur chr. rongeur::7p14::Xq21-Xqter	der(7) libre + 1 chr.	der(7) libre + 2 chr.	der(7) transloqué + 1 chr.
Hybride TDo cl 1	17% (8/47)	55% (26/47)	6% (3/47)	2% (1/47)	19% (9/47)

Tableau VII : Evaluation du contenu en chromosomes humains de l'hybride TDo cl1.

Les chromosomes humains sont repérés sur des métaphases hybrides par HIS à l'aide d'une sonde d'ADN génomique total (46,XX). Un total de 47 mitoses hybrides ont été observées, les chromosomes autres que le der(7) n'ont pas été identifiés.

chr. : chromosome.

l'analyse n'est effectuée que sur quelques métaphases pour chacun des 8 clones hybrides. Cette étude par FISH donne une idée quant au nombre plus ou moins important de chromosomes humains encore présents dans nos hybrides, mais ne permet pas de juger de la stabilité du caryotype de ces hybrides. Très souvent, nous remarquons des remaniements secondaires comme en témoignent les fragments de chromosomes humains transloqués (ou insérés) sur (dans) des chromosomes de hamster.

Pour chaque t(X;A), le der(A) est repéré à l'aide de la sonde génomique totale, confirmant les résultats obtenus avec la sonde spécifique de l'X.

Nous avons voulu en savoir plus pour l'hybride TDo cl1 car, sur les premières métaphases hybrides observées, seul le der(A) était présent. De l'analyse de 47 métaphases par FISH (tableau VII), il ressort que cet hybride n'est pas "pur". En effet, on peut considérer qu'il est constitué de 5 sous-clones, dont deux (sous-clones A et B) pourraient être très utiles pour la cartographie physique des bras courts du chromosome 7. Il serait nécessaire de procéder à un sous-clonage, à partir de l'hybride TDo cl1, pour isoler le der(7) seul d'une part (sous-clone A) et la partie du der(7) transloquée sur un chromosome de rongeur (sous-clone B) d'autre part.

Cette analyse par FISH directe, c'est-à-dire par hybridation de l'ADN génomique total humain sur des métaphases hybrides, n'identifie pas l'origine de l'ensemble du matériel humain présent dans les hybrides somatiques. Certains petits fragments insérés dans des chromosomes de rongeur ne sont pas identifiables, même avec un profil en bandes QFQ (figure 29b, Hy PMI cl1). Toutefois, ces fragments détectés dans nos différents hybrides sont tous d'origine autosomique, car aucun n'est "allumé" avec la sonde spécifique de l'X.

L'hybridation in situ indirecte (hybridation de l'ADN d'un hybride somatique sur une métaphase humaine) est une bonne technique pour connaître le contenu exact en ADN humain d'un hybride somatique interspécifique (Kievits et al., 1990). Toutefois, il est nécessaire d'avoir recours à une pré-association entre l'ADN hybride utilisé comme sonde et un excès d'ADN humain total fragmenté par ultrasons. Le temps d'hybridation nécessaire peut alors atteindre 3 à 4 jours (Kievits et al., 1990). Lors d'essais d'HIS indirecte, nous avons rencontré des problèmes sans doute liés à la viscosité importante de la sonde (du fait de la quantité importante d'ADN compétiteur) et au blocage incomplet des séquences humaines répétées.

L'IRS-PCR (Interspersed Repetitive Sequence-PCR) (Nelson et al., 1989 ; Lichter et al., 1990 ; Desmazes et al., 1992) est un procédé qui élimine une majeure partie des séquences répétées humaines contenues dans l'ADN d'un

hybride somatique (ou d'un YAC). Par Alu-PCR par exemple, seules les séquences humaines encadrées par deux motifs Alu correctement orientés et pas trop éloignés, seront amplifiées. Le produit d'amplification obtenu à partir de l'ADN d'un hybride somatique par IRS-PCR peut donc être utilisé comme sonde pour une HIS indirecte. La mise au point de l'HIS à l'aide de produits d'Alu-PCR (ou LINE-PCR) fait actuellement l'objet du DEA de Cécile Arnoud dans le laboratoire. L'HIS avec des produits d'IRS-PCR est très utilisée pour la caractérisation et la localisation physique de YACs (Lengauer et al., 1992 ; Breen et al., 1992 ; Baldini et al., 1992 ; Flejter et al., 1993).

III) UTILISATION D'UN PANEL DE TRANSLOCATIONS ET DE DELETIONS POUR LA CARTOGRAPHIE PHYSIQUE DE LA REGION Xq13-q22

L'équipe de H.H. Ropers travaille depuis le début des années 1980 sur la cartographie du chromosome X humain. En 1984, elle réussit à établir une carte physique comportant 16 marqueurs ADN de l'X à l'aide d'un panel d'hybrides somatiques interspécifiques (Wieacker et al., 1984). L'analyse moléculaire de délétions observées chez des hommes porteurs de plusieurs pathologies (pathologie des gènes contigus) s'est avérée très utile pour le clonage positionnel de gènes impliqués dans des pathologies récessives liées à l'X (Monaco et al., 1985 ; Royer-Pokora et al., 1986 ; Legouis et al., 1991 ; Franco et al., 1991). L'équipe hollandaise a caractérisé un grand nombre de délétions emportant tout ou partie de la région Xq21. Ces délétions ont permis l'isolement du gène de la choroïdémie (Cremers et al., 1990 b) et devraient contribuer dans un avenir proche au clonage des gènes à l'origine d'une surdité (DFN3, MIM 304400) et d'un retard mental, deux pathologies récessives liées à l'X également localisées en Xq21 (Bach et al., 1992a ; Bach et al., 1992b). Treize microdélétions, touchant la région Xq21, nous ont été confiées par H.H. Ropers.

En regroupant ces microdélétions avec les t(X;A) caractérisées au cours de ce travail, nous obtenons ainsi un panel de 21 réarrangements avec points de

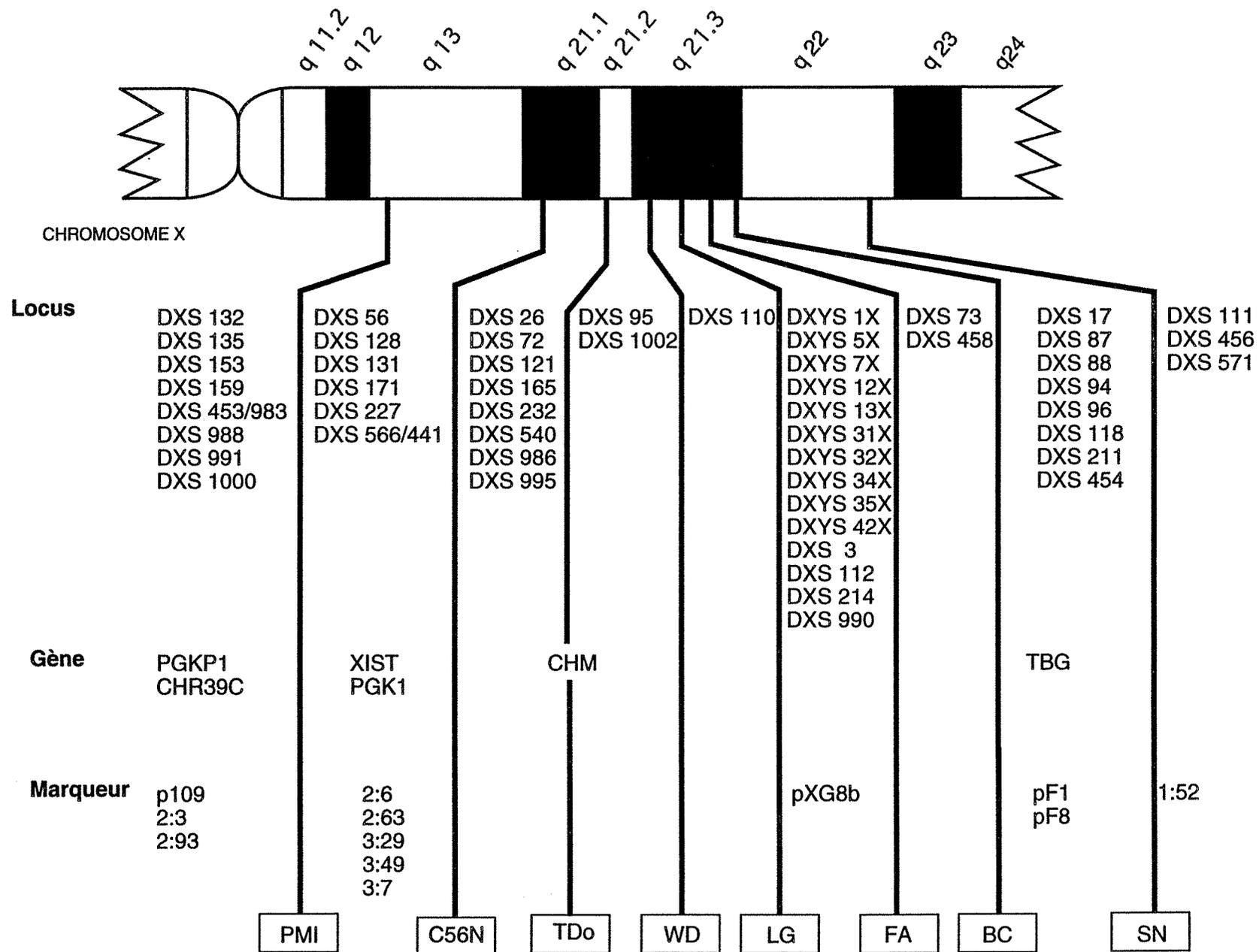


Figure 30 : Localisation moléculaire des points de cassure sur l'X.

cassure répartis entre Xq13 et Xq22. La cartographie physique des marqueurs de l'X est réalisée en deux temps :

- dans un premier temps, localisation par rapport aux 8 points de cassure, dérivés des t(X;A), situés entre Xq13 (PMI) et Xq22 (SN),
- puis, pour les sondes situées entre les points de cassure C56N et SN, localisation plus fine au sein de la région Xq21-q22 en utilisant les 13 délétions.

Au total, nous avons positionné 24 marqueurs supplémentaires de l'X par rapport aux différents points de cassure disponibles dans la région Xq proximale, 10 par technique de Southern et 14 par PCR. Sur ces 24 nouveaux loci, 16 sont soit proximaux au point de cassure C56N, soit distaux au point de cassure SN et ne sont donc pas testés sur les délétions car aucune information supplémentaire ne peut être obtenue (à l'exception de DXS566). Les 9 autres marqueurs sont testés sur les t(X;A) puis, en fonction des résultats, sur certaines délétions pouvant améliorer la localisation physique au sein de la région Xq21-q22.

A) CARTOGRAPHIE PHYSIQUE DE LA REGION Xq13-q22

Par rapport aux 8 points de cassure caractérisés lors de ce travail, 70 sondes anonymes ou gènes ont été positionnées (figure 30). Peu de sondes sont localisées dans les intervalles TDo-WD, WD-LG et FA-BC. Ceci peut être dû au fait que ces points de cassure (TDo, WD et LG d'une part, FA et BC d'autre part) sont proches les uns des autres ; il se peut également que les régions qui séparent ces points de cassure soient sous-représentés dans l'échantillon de sondes de la région utilisées jusqu'à présent. Les gènes XIST et PGK1 sont localisés entre PMI et C56N ; PGKP1 et CHR39C (cholesterol-repressible protein 39C) sont situés au-dessus du point de cassure PMI. Le point de cassure TDo, localisé dans le gène CHM (gène de la choroidémie), a fait l'objet d'une étude plus précise qui sera relatée dans la suite des résultats. Les sondes de la région Xq proximale détectant des séquences homologues sur les bras courts du chromosome Y sont situées entre FA et LG.

La grande majorité de nos résultats sont en accord avec les données de la littérature. Dans un certain nombre de cas, des petites divergences peuvent être relevées. De plus, nous pouvons lever des ambiguïtés quant à la position

relative de certains marqueurs. Nous aborderons d'abord les marqueurs testés uniquement sur les 8 t(X;A).

Les 8 marqueurs (1:52, 2:3, 2:6, 2:63, 2:93, 3:29, 3:49 et 3:7) étaient localisés par Arenstorff et al. (1991) entre Xp11.2 (point de cassure de la lignée GM10501) et Xq21.3 (point de cassure de la lignée GM11172). Le point de cassure GM11172 (encore dénommé Ben3B, Luty et al., 1990) est positionné entre DXS72 et CHM (Xcen - DXS72 - GM11172 - CHM - Xqter) par Lafrenière et al. (1991). Pour les marqueurs (2:3, 2:6, 2:63, 2:93, 3:29, 3:49 et 3:7), nos résultats sont compatibles avec la localisation fournie par Arenstorff et al. (1991). Nous pouvons même préciser la localisation de ces marqueurs grâce aux points de cassure PMI et C56N. Par contre, notre localisation pour le clone 1:52 est en contradiction avec celle présentée par Arenstorff et al. (1991). En effet, nous situons 1:52 en position distale par rapport au point de cassure SN (figure 31), donc en position distale par rapport au locus du gène CHM, alors que pour Arenstorff et al. (1991) cette sonde serait proximale par rapport au gène CHM.

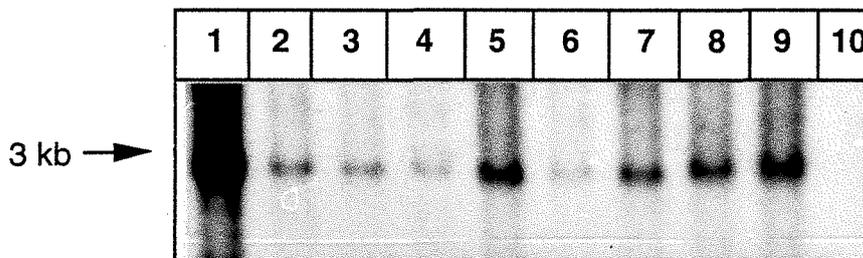


Figure 31 : Localisation de la sonde 1:52 dans la région Xq22-qter.

Autoradiogramme obtenu avec la sonde 1:52, ADN digérés par EcoRI.
 1 : (46, XX) ; 2 : Hy PMI c11 ; 3 : Hy C56N c11 ; 4 : Hy TDo c11 ; 5 : Hy WD c10
 6 : Hy LG c14 ; 7 : Hy FA c12 ; 8 : Hy BC c12 ; 9 : Hy SN c11 ; 10 : RJK88

D'après nos résultats, il est très peu probable que le clone 1:52 soit proximal au gène CHM car nous avons obtenu une réponse positive pour 5 hybrides différents (WD c10, LG c14, FA c12, BC c12 et SN c11) correspondant à 5 points de cassure tous distaux par rapport au locus du gène CHM. Cette contradiction pourrait s'expliquer par une microdélétion survenue *in vitro* emportant le locus de la sonde 1:52 sur le der(2) isolé dans l'hybride GM11172 (cet hybride a été réalisé à partir d'une t(X;2)). Il faut néanmoins souligner qu'un contrôle fait défaut pour la localisation de 1:52 à l'aide de notre panel de points de cassure : nous n'apportons pas la preuve formelle que le signal d'environ 3 kb détecté par cette sonde est bien spécifique du chromosome X.

Pour ce faire, il aurait fallu utiliser en parallèle une lignée hybride contenant l'X comme seul chromosome humain. Ce contrôle supplémentaire sera effectué pour les marqueurs testés par PCR.

Dans une étude de liaison effectuée par Huang et al. (1991) à l'aide de microsatellites de la région Xq proximale, la localisation relative de PGK1 par rapport à DXS453 ne pouvait pas être déterminée car ces deux marqueurs ne sont séparés que par 0,8 cM. Rider et Monaco (1993) ont montré que les microsatellites correspondant aux loci DXS453 et DXS983 sont identiques. D'après nos résultats, nous pouvons conclure que DXS453 (ou DXS983) est situé entre le centromère de l'X et PGK1 : Xcen - DXS453/983 - PMI - PGK1 - Xqter (nous avons testé DXS453 et DXS983 sur le point de cassure PMI).

Notre localisation pour DXS571 est plus distale que celle fournie par Curtis et al. (1992). En effet, le locus DXS571 est distal par rapport au point de cassure SN situé en Xq22 (figure 32) alors que Curtis et al. (1992) positionne ce même marqueur en Xq21. De plus, Vetrie et al. (1993) situent DXS87 dans la partie télomérique de la bande Xq22 et, d'après nos résultats, le point de cassure SN est distal au locus DXS87.

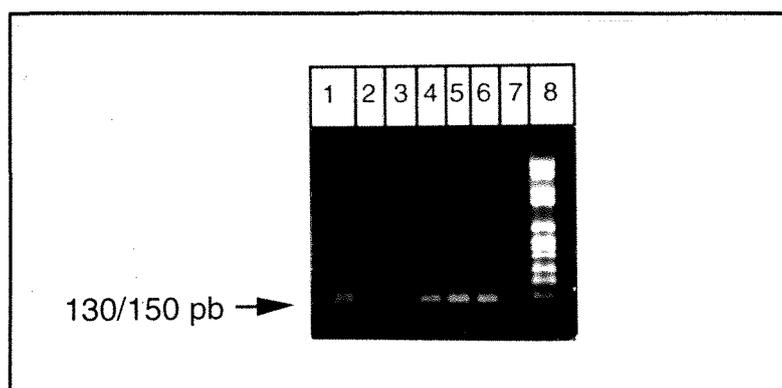


Figure 32 : Localisation de pHX79 (DXS571) dans la région Xq22-qter.

Visualisation des produits de PCR après séparation sur gel d'agarose 1% et coloration par le bromure d'éthidium.

1 : (46,XX) ; 2 : RJK88 ; 3 : Hy GMO6318B ; 4 : HY PMI cl1 ; 5 : Hy C56N cl1 ; 6 : Hy SN cl1 ; 7 : pas d'ADN ; 8 : pBR328/BglI + pBR328/HinfI.

B) CARTOGRAPHIE PHYSIQUE DE LA REGION Xq21-q22

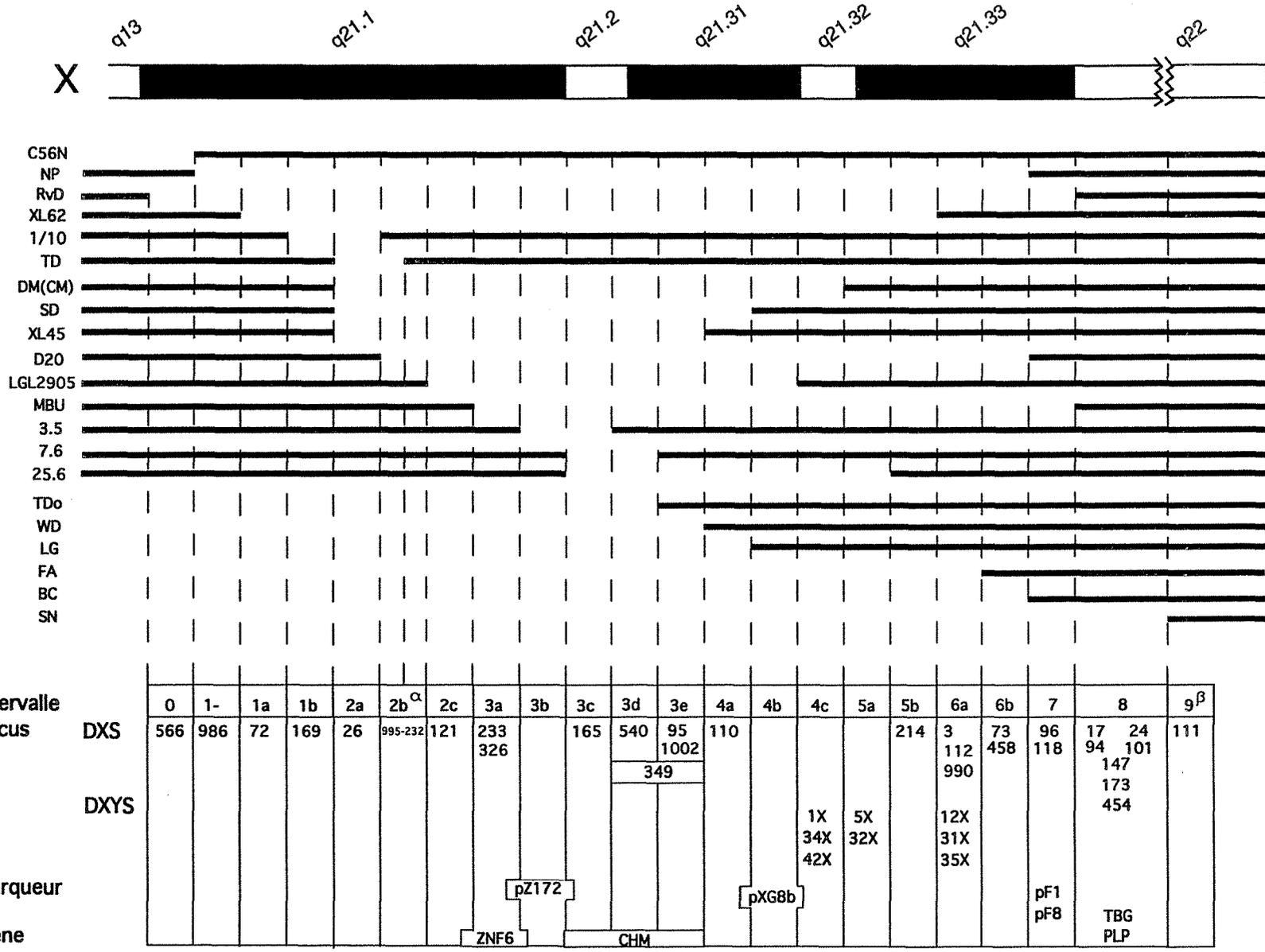
Les sondes situées entre les points de cassure C56N et SN sont ensuite ordonnées à l'intérieur de la région Xq21-q22 grâce au panel de délétions. Les loci suivants sont testés par PCR : DXS454, DXS458, DXS566/441, DXS986, DXS990, DXS995, DXS1002 et TBG (DXS441 et DXS566 correspondent au même microsatellite (Lindsay et al., 1993)).

En regroupant les données de cette étude avec celles publiées précédemment par le groupe de Nimègue (Cremers et al., 1988, 1989, 1990a ; Bach et al., 1992a, 1992b), nous localisons 48 marqueurs (dont 4 gènes) dans 23 intervalles au sein de la région Xq21-q22 (figure 33).

Par rapport à la collection de réarrangements publiée récemment (Philippe et al., 1993), les cas CN, KM, 33.1 et CIII-1 n'apparaissent plus sur la figure 33 car nous n'avons pas les lignées lymphoblastiques correspondantes à Nancy. La délétion 1/10, elle aussi non disponible, n'aurait pas été supprimée car elle définit la borne entre l'intervalle 1a et 1b.

Les figures 34 a et b présentent des exemples de résultats obtenus pour 4 des 10 loci cartographiés par PCR dans la région Xq21-q22. Pour toutes les localisations par PCR, en plus du témoin ADN de rongeur (RJK88), un deuxième contrôle est effectué afin de s'assurer que le produit d'amplification correspond bien à un fragment dérivé du chromosome X. Pour ce faire, nous avons amplifié en parallèle l'ADN de l'hybride homme/rongeur GMO6318B (National Institute of General Medical Sciences (NIGMS), human genetic mutant cell repository) contenant le chromosome X comme seul chromosome humain. Ce contrôle n'a pas été réalisé pour les localisations effectuées par technique de Southern car nous ne disposions pas, à l'époque, de la lignée GMO6318B.

Nous divisons la région Xq21-q22 en 23 intervalles, soit 2 intervalles de plus que dans le panel publié en 1993 (Philippe et al.). En effet, les microsatellites HX60 (DXS566) et AFM116xg1 (DXS986) définissent les intervalles 0 et 1 respectivement. D'autre part, l'intervalle 2b est en fait scindé en deux parties puisque le point de cassure distal de la délétion TD (TD "dist") est situé entre les marqueurs AFM207zg5 (DXS995) et pJL68 (DXS232) : Xcen - DXS995 - TD "dist" - DXS232 - Xqter. Le gène DFN3 a été localisé entre DXS26 et DXS232 par Bach et al. (1992a) ; le locus DXS995, sans doute proche du locus du gène DFN3 est donc potentiellement très utile pour le clonage de celui-ci. Nos résultats séparent également les points de cassure proximaux ("prox") des délétions NP, RvD et XL62 (Xcen - RvD"prox" - DXS566 - NP"prox" - DXS986 - XL62"prox"



Les résultats obtenus avec la sonde pRX98H3 sur l'ADN de l'hybride TDo c11 n'ont pas permis de positionner le locus DXS349 par rapport au point de cassure TDo.

α : le marqueur AFM207zg5 (DXS995), proximal à DXS232, n'a pas été testé sur la délétion 1/10

β : la borne distale de l'intervalle 9 (Philippe et al., 1993) est définie par la duplication CN (Cremers et al., 1988 et 1989a).

Figure 33.

Figure 33 : Cartographie physique de la région Xq21-q22 à l'aide d'un panel de translocations et de délétions

En haut de la figure, la région q21-q22 du chromosome X humain est schématisée en bandes G. Le segment de chromosome X présent dans chaque lignée cellulaire est indiqué par un trait horizontal épais. Pour les t(X;A), le der(A) a été isolé par hybridation somatique interspécifique ; les délétions de l'X chez des hommes sont étudiées directement sur les lignées lymphoblastiques.

Le bas de la figure regroupe les données de cartographie physique obtenues avec 48 marqueurs ADN permettant de découper la région Xq21-q22 en 23 intervalles. Cette figure regroupe les données obtenues lors de ce travail avec des localisations publiées précédemment :

- C56N, TDo, WD, LG, FA, BC et SN sont 7 des 8 t(X;A) caractérisées dans cette étude,

- les autres cas sont des délétions chez des hommes emportant tout ou partie de la région Xq21. Les données cytogénétiques et cliniques ainsi que les analyses moléculaires ont été décrites précédemment :

- NP et RvD (Cremers et al., 1988 et 1989),
- XL62, DM, XL45 et MBU (Cremers et al., 1989),
- 1/10 et TD (Bach et al., 1992a),
- SD et D20 (Bach et al., 1992b),
- LGL2905, 3.5, 7.6, 25.6 (Cremers et al., 1990a).

La localisation du marqueur pZ172 est déduite de données publiées par van de Pol et al. (1990).

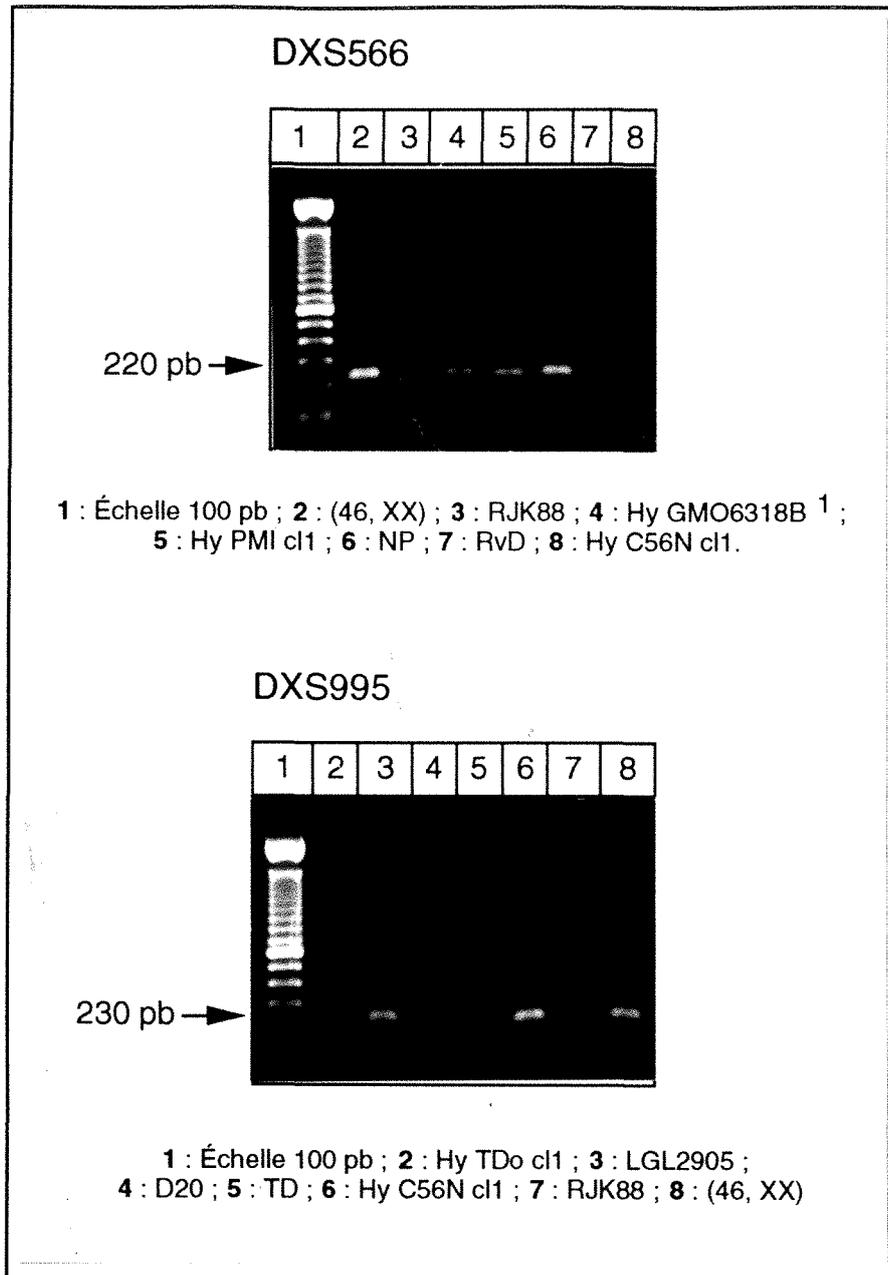


Figure 34 a : Localisation de marqueurs par PCR sur le panel de réarrangements (translocations et délétions) dans la région Xq21-Xq22.

Les produits de PCR sont séparés sur gel d'agarose 1% et visualisés sous UV après coloration au bromure d'éthidium (le marqueur de taille est constitué de bandes de 100 pb, 200 pb, ...).

1) L'hybride GMO6318B provient de la banque de cellules "NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository". Le chromosome X est le seul chromosome humain contenu dans cet hybride.

DXS566 est ainsi localisé dans l'intervalle 0, DXS995 dans l'intervalle 2b.

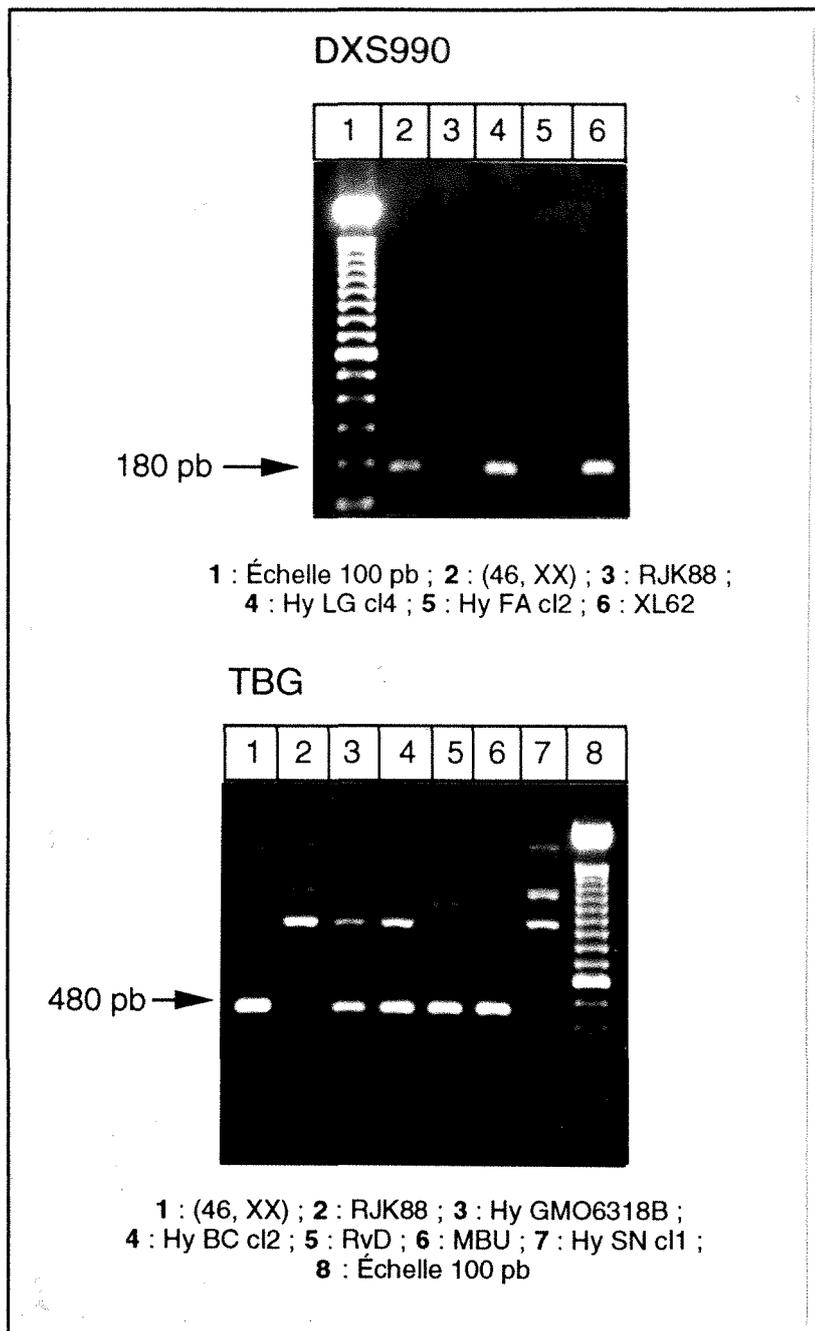


Figure 34 b : Localisation de marqueurs par PCR sur le panel de réarrangements (translocations et délétions) dans la région Xq21-Xq22.

Les produits de PCR sont séparés sur gel d'agarose 1% et visualisés sous UV après coloration au bromure d'éthidium (le marqueur de taille est constitué de bandes de 100 pb, 200 pb, ...). L'hybride GMO6318B provient de la banque de cellules "NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository". Le chromosome X est le seul chromosome humain contenu dans cet hybride.

DXS990 est ainsi localisé dans l'intervalle 6a, TBG dans l'intervalle 8.

- Xqter) qui étaient tous les trois situés entre p1bB4 (DXS227) et pX65H7 (DXS72) par Cremers et al. (1989).

Nous avons cartographié 8 microsattellites développés par J. Weissenbach à Généthon. Ces marqueurs avaient été ordonnés par analyses de liaison avec des familles du CEPH comme suit (Weissenbach et al., 1992) : Xpter - (DXS988 , DXS991 , DXS1000) - 7cM - DXS983 - 3cM - (DXS986 , DXS995 , DXS1002) - 9cM - (DXS990) - Xqter. A l'aide de notre panel de réarrangements, nous éliminons l'ambiguïté concernant l'ordre relatif des loci DXS986, DXS995 et DXS1002 :

Xpter - (DXS988 , DXS991 , DXS1000) - (DXS983/453) - PMI - C56N - DXS986 - XL62"prox" - D20"prox" - DXS995 - TD "dist" - TDo - DXS1002 - WD - XL62 "dist" - DXS990 - FA - Xqter.

Dans l'étude de liaison de Huang et al. (1991) citée précédemment, les loci DXS454 et DXS458 sont trop proches pour être positionnés l'un par rapport à l'autre. Dans notre étude, le point de cassure BC (entre autres), dicte l'ordre suivant : Xcen - DXS458 - BC - DXS454 - Xqter.

Les loci DXS566 et PGK1 sont génétiquement très proches ($\theta_{\max} = 0,0$ avec un LOD score de 10,84 (Lindsay et al., 1993)). PGK1 n'est pas délété chez le patient RvD (Cremers et al., 1989) alors que le locus DXS566 est compris dans la région de l'X délétée chez ce même patient. PGK1 est donc proximal à DXS566 : Xcen - PGK1 - RvD "dist" - DXS566 - Xqter.

Les loci DXS287, DXS1105, DXS1120 et DXS1153 ont été localisés par D. Vetrie (Londres GB, communication personnelle) en position distale par rapport au point de cassure BC .

Le tableau VIII regroupe les marqueurs pour lesquels notre étude améliore la localisation sur le chromosome X.

Pour les 8 t(X;A), notre étude porte uniquement sur la localisation du point de cassure sur l'X à l'aide du der(A). Quand le locus d'une sonde de l'X n'est pas présent sur le der(A), on ne sait pas si celui-ci est présent sur le der(X). De plus, nous ne nous sommes pas intéressés, pour nos t(X;A), aux points de cassure sur les autosomes. Autrement dit, on ne peut pas affirmer, qu'à un niveau moléculaire, les différentes t(X;A) présentées dans ce travail sont des translocations totalement équilibrées. Quelques cas de t(X;A) ont été caractérisées très précisément au niveau des jonctions sur le der(X) et sur le der(A). Une caractérisation moléculaire précise des points de cassures sur l'X et sur l'autosome dans 2 cas de t(X;A) (chez des filles atteintes de myopathie de Duchenne) n'a montré aucune homologie de séquences autour des points de cassure (Bodrug et al., 1991). Ces deux t(X;A) sont associées avec des

Locus	Sonde	Localisation avant cette étude	Localisation après cette étude
DXS26	pHU16	Xq11-q22	Xq21
DXS326	pQST38M1	Xq13-q21.1	Xq21.1
DXS349	pRX98H3	Xq13-q21.2	Xq21.1-q21.2
DXS453/983	Mfd66/ AFM078za1	Xp11.23-q21.1	Xp11.23-q13
DXS454	Mfd72	Xq21.1-q23	Xq21.3-q22
DXS456	XG30B	Xq21-q22	Xq22
DXS458	Mfd79	Xq21.1-q23	Xq21.1-q22
DXS571	pXH79 B1/B2	Xq21.1-q21.3	Xq22-qter
DXS986	AFM116xg1	X	Xq13-q21
DXS988	AFM123xd4	X	Xpter-q13
DXS990	AFM136yc7	X	Xq21
DXS991	AFM151xf6	X	Xpter-q13
DXS995	AFM207zg5	X	Xq13-q21
DXS1000	AFM248te9	X	Xpter-q13
DXS1002	AFM249vh5	X	Xq21
DXYS7X	13d	Xq13-q22	Xq21
DXYS31X	GMGXY5	Xq13-q24	Xq21
DXYS32X	GMGXY6	Xq13-q24	Xq21
DXYS34X	GMGXY8	Xq13-q24	Xq21
DXYS35X	GMGXY9	Xq13-q24	Xq21
DXYS42X	pDP307	Xq13-q21	Xq21
CHR39C	39C	Xq13-q21	Xq13
-	p109	X	Xpter-q13
-	2:3	Xp11.2-q21.3	Xp11.2-q13
-	2:93	"	"
-	2:6	Xp11.2-q21.3	Xq13-q21
-	2:63	"	"
-	3:29	"	"
-	3:49	"	"
-	3:7	"	"
-	1:52	Xp11.2-q21.3	Xq22-qter

Tableau VIII : Amélioration de la localisation physique de marqueurs du chromosome X.

Les localisations déduites de l'utilisation de notre panel de réarrangements sont indiqués, dans la région Xq13-q22, au niveau des bandes q13, q21 ou q22. Pour la bande q21, nous ne précisons pas les localisations au niveau des sous-bandes.

additions ou des délétions de quelques pb. Par contre, Giacolone et Francke (1992) ont trouvé, dans le cas d'une t(X;4), une courte séquence homologue de 5 pb (5'-GGAAT-3') située exactement au niveau des points de cassure sur les chromosomes X et 4. Ces auteurs proposent, dans leur cas de t(X;4), un mécanisme de recombinaison homologue, faisant intervenir la séquence 5'-GGAAT-3', compatible avec la translocation et la délétion de 5 kb sur le der(X) qui lui est associée.

Pour rechercher une éventuelle microdélétion (ou une microduplication) associée au point de cassure sur l'X, il aurait été nécessaire de tester chaque sonde en parallèle (comme cela a été fait par exemple par Aerssens et al., in press) :

- sur un clone hybride contenant le der(A) comme seul matériel de l'X humain,
- et sur un hybride avec comme seule composante de l'X le der(X).

Notons que seul le séquençage des jonctions X-Autosomes sur le der(X) et sur le der(A) permet de savoir exactement ce qui est associé à la translocation.

Les hybrides somatiques que nous avons construits sont utilisés comme des balises physiques dans la région q13-q22 du chromosome X humain. Il n'est pas gênant, pour cette application, de ne pas disposer, pour chaque t(X;A), du clone "complémentaire" porteur du der(X). Nous reviendrons par la suite sur la caractérisation précise du point de cassure sur l'X pour les deux translocations, t(X;7) chez la patiente TDo et t(X;13) chez PMI, associées à une pathologie récessive liée à l'X. Nous verrons que, pour ces deux points de cassure sur l'X, l'absence de données dérivées de l'étude du der(X) peut être problématique.

Deuxième partie

t(X;A) équilibrée et pathologie récessive liée à l'X : à propos des cas TDo et PMI .

En général, les femmes hétérozygotes, pour une mutation dans un gène à l'origine d'une pathologie récessive liée au chromosome X, n'expriment pas la maladie car l'X non muté est actif dans environ 50% de leurs cellules. Ainsi, chez une femme vectrice de myopathie de Duchenne, la dystrophine sera produite dans 50% environ de ses fibres musculaires, expression suffisante pour éviter la dégénérescence musculaire survenant chez les garçons myopathes. Néanmoins, le pourcentage de survie des cellules avec l'X muté actif peut être variable d'un tissu à l'autre et d'une femme à l'autre ; par conséquent, le phénotype clinique chez une femme hétérozygote peut varier de l'état normal à une atteinte modérée, voire sévère. Beaucoup plus rarement, l'expression clinique d'une maladie récessive liée à l'X chez une femme est due à un état homozygote pour le gène muté.

Nous avons montré qu'une femme porteuse d'une t(X;A) équilibrée inactive l'X normal dans toutes ses cellules. Tous les gènes de l'X, exprimés uniquement sur l'X actif (c'est-à-dire la grande majorité) sont donc sous le contrôle de l'X transloqué. C'est pourquoi une femme porteuse d'une t(X;A) équilibrée pourra être atteinte d'une pathologie récessive liée à l'X si le point de cassure sur le chromosome X lèse le gène de la maladie.

Ainsi, la survenue d'une t(X;A) associée à une pathologie récessive liée à l'X chez une femme permet de situer très rapidement le locus du gène de la maladie dans la région du point de cassure sur l'X (il est en effet peu probable que, chez cette femme porteuse d'une t(X;A), la pathologie soit due à une autre mutation ponctuelle). Le clonage de la région du point de cassure sur l'X dans un YAC, puis dans un cosmide, est une méthode de choix pour l'identification du gène de la maladie. Les premières associations t(X;A)-pathologies récessives liées à l'X ont été observées chez des filles atteintes de

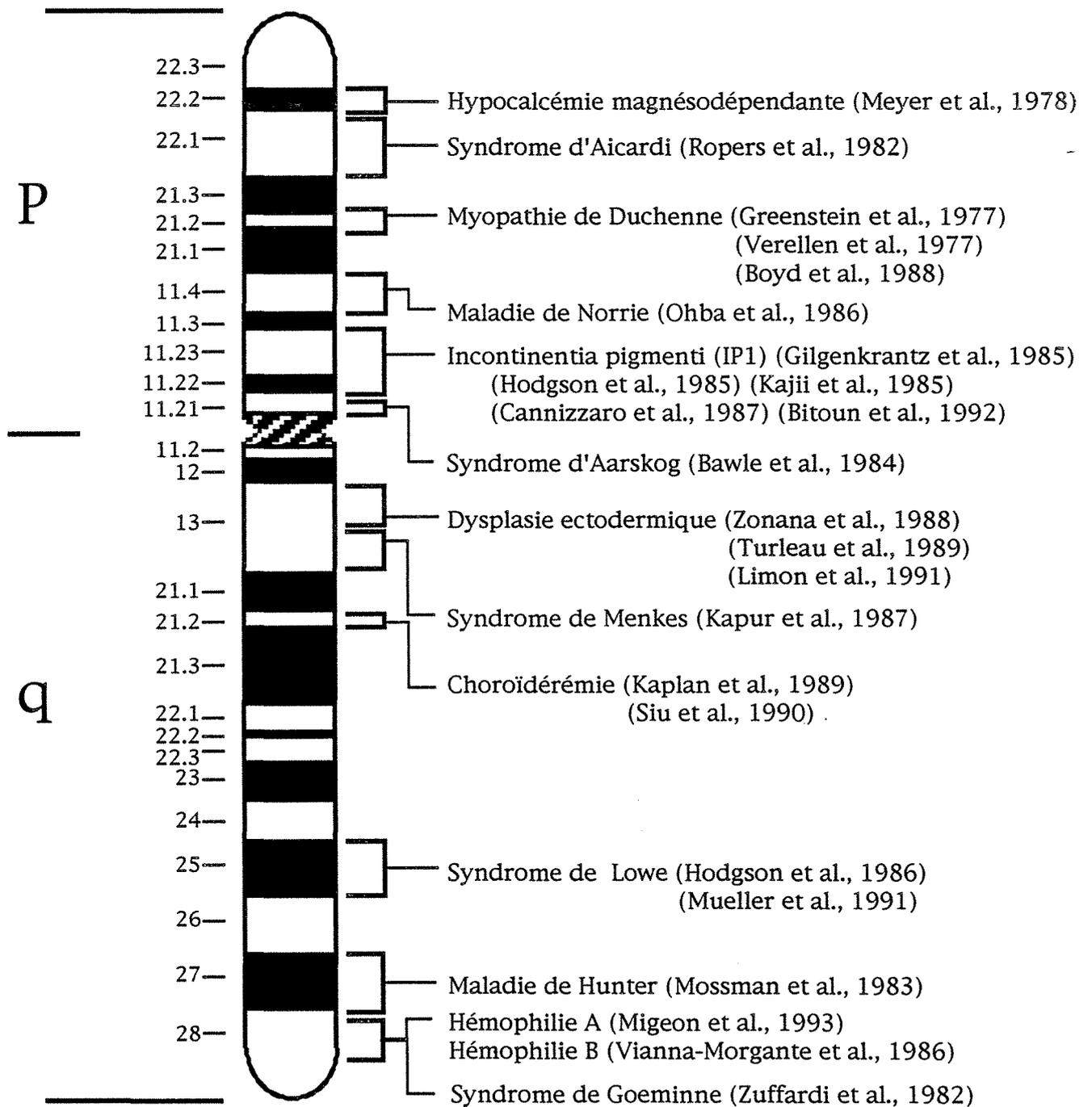


Figure 35 : Pathologies récessives liées à l'X observées chez des femmes porteuses d'une t(X;A) équilibrée.

myopathie de Duchenne et porteuses de t(X;A) avec point de cassure en Xp21.2 (Greenstein et al., 1977 ; Verellen et al., 1977). De très nombreux cas sont venus s'ajouter (figure 35) ; un certain nombre de ces translocations ont été déterminantes dans les nombreux succès de la génétique inverse pour les gènes portés par l'X (voir tableau II). D'autres gènes, comme celui de la dysplasie ectodermique (Kere et al., 1993a ; Thomas et al., 1993 ; Kere et al., 1993b), ne devraient pas tarder à être isolés selon la même stratégie. On peut remarquer que, de la même façon, les délétions chez les hommes, associées avec une (ou plusieurs) pathologie(s) liée(s) à l'X, sont également de très bons outils pour la cartographie des gènes portés par le chromosome X. D'autre part, un point de cassure sur un autosome peut également indiquer la position d'un gène à l'origine d'une pathologie autosomique dominante, comme ce fût le cas par exemple pour la neurofibromatose de type I sur le chromosome 17 (Schmidt et al., 1987 ; Ledbetter et al., 1989) ou pour l'aniridie de type II sur le chromosome 11 (Pettenati et al., 1989).

Parmi les 8 t(X;A) étudiées dans ce travail, deux sont associées à une pathologie récessive liée au chromosome X :

- la patiente TDo porteuse d'une t(X;7)(q21;p12) est atteinte de choroïdérémie,
- PMI présente un retard mental en association avec une t(X;13)(q13;q31).

I) t(X;7)(q21;p12) ET CHOROÏDEREMIE

La choroïdérémie (ou dystrophie tapétochoroïdienne, MIM 303100) fait partie du groupe des rétinites pigmentaires. Il s'agit d'une dystrophie rétinienne touchant le neuro-épithélium et l'épithélium pigmentaire et entraînant une héméralopie ainsi qu'une diminution du champ visuel (pouvant conduire à une cécité complète vers la 4ème ou la 5ème décade de la vie). Elle est transmise sur le mode récessif lié à l'X et n'affecte donc généralement que les garçons hémizygotés. Les femmes vectrices ne présentent pas d'anomalie de la vision bien que souvent l'examen du fond d'oeil révèle une pigmentation irrégulière (qui reflète l'inactivation au



Figure 36 : Rétinographie de l'oeil droit de la patiente TDo.

Il existe des zones de coloration jaunâtre d'atrophie de l'épithélium pigmentaire et de la choriocapillaire, faisant apparaître les gros vaisseaux choroïdiens (la macula et le calibre des artères de la rétine sont relativement bien respectés).

Cliché et commentaires fournis par J.L. Dufier et I. Ghazi, Hôpital Laennec, Paris.

hasard de l'X normal dans environ 50% des cellules) et une atrophie autour du disque optique. La patiente TDo porteuse d'une translocation équilibrée (X;7)(q21;p12) présente depuis l'âge de 9 ans les troubles caractéristiques de cette rétinite pigmentaire (voir figure 36).

Dès 1985, et ce, grâce à des études de liaison, le gène CHM (d'abord symbolisé par TCD) est situé dans la région Xq13-q21 proche du locus DXYS1 (Nussbaum et al., 1985). A partir de 1986, la découverte de patients masculins atteints de choroïdérémie et porteurs d'une délétion pour tout ou partie de la région Xq21 fournit une approche alternative pour localiser précisément le gène CHM.

A l'aide de la technique PERT (Phenol Enhanced Reassociation Technique), Nussbaum et al. (1987) clonent des sondes de la région Xq21 délétées chez un patient porteur d'un syndrome des gènes contigus associant choroïdérémie, surdité et retard mental.

Notre cas de t(X;7) associée à l'expression de la choroïdérémie chez une femme est le premier publié dans la littérature (Kaplan et al., 1989). Il sera suivi l'année suivante par un deuxième cas (t(X;13)) décrit par Siu et al. (1990). Dans ces deux t(X;A), le point de cassure sur l'X est situé dans la région q21 alors que l'autosome impliqué dans la translocation est différent. Nous avons expliqué comment une pathologie récessive liée à l'X peut apparaître chez une femme porteuse d'une t(X;A). Il s'agit là encore d'une confirmation de la localisation du gène CHM en Xq21. Le grand nombre de réarrangements de l'X associés avec cette rétinite pigmentaire allait conduire à l'isolement du gène en 1990.

Un ADNc candidat (n'incluant pas les extrémités 5' et 3') est isolé par clonage positionnel à l'aide d'une collection de microdélétions de la région Xq21 chez des hommes atteints de choroïdérémie (Cremers et al., 1990b). Un deuxième ADNc correspondant au gène CHM est isolé par Merry et al. (1992). La détection de mutations ponctuelles dans ce gène candidat uniquement chez les individus porteurs de cette cécité liée à l'X est venue apporter la preuve ultime que le gène candidat isolé en 1990 est bien le gène impliqué dans cette pathologie (van der Hurk et al., 1992 ; Sankila et al., 1992 ; Schwartz M. et al., 1993 ; Pascal et al., 1993).

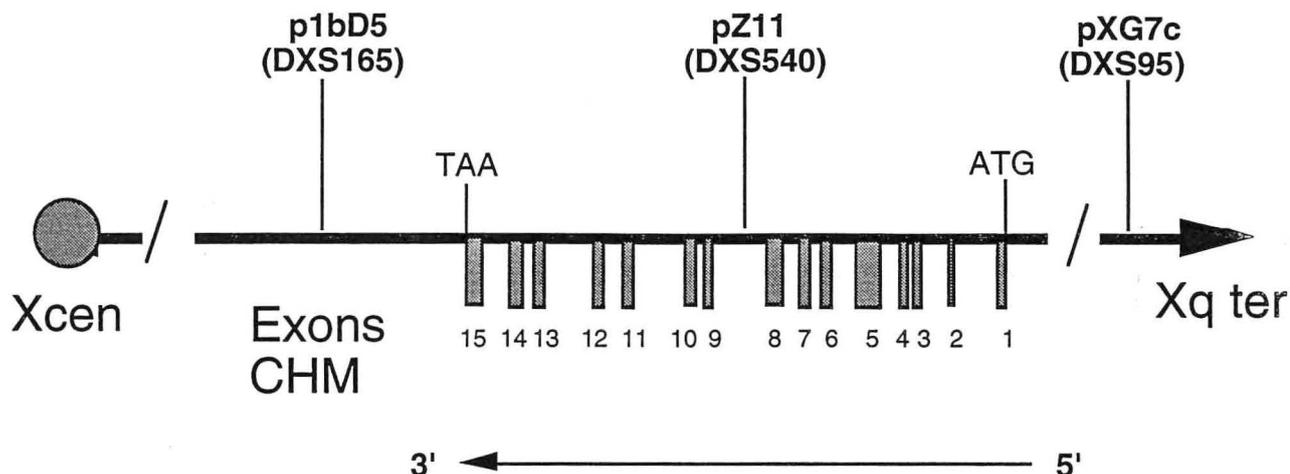


Figure 37 : Localisation et anatomie du gène CHM.

(van Bokhoven et al., soumis ; F.P.M. Cremers : communication personnelle)

La quasi-totalité de l'ADNc du gène CHM est à présent clonée. En effet, l'ensemble des clones d'ADNc chevauchants couvre 5,4 kb pour un ARN messager d'environ 5,6 kb (van Bokhoven et al., soumis). Il est probable que seules manquent encore des régions non codantes en 5' (avec les bases AT du codon d'initiation de la traduction) et en 3' de l'ADNc du gène CHM (van Bokhoven et al., soumis). Le gène CHM est constitué d'au moins 15 exons (figure 37). Si la partie 5' non clonée ne contient pas d'exon(s) supplémentaires(s), le gène CHM code pour une protéine de 653 acides aminés. La séquence du gène CHM déterminée par van Bokhoven et al. (soumis) diffère notablement de celle publiée par Merry et al. (1992). La portion entre les nucléotides 17 et 190 (Merry et al., 1992) est retrouvée, dans une orientation opposée, entre les nucléotides 695 et 868 dans la séquence déterminée par van Bokhoven et al. (soumis).

L'identification de la fonction du gène CHM a été rendue possible grâce à des travaux portant sur la caractérisation des enzymes impliquées dans la prénylation (accrochage d'unité polyisoprène de 20 carbones) de protéines telles que celles de la famille Rab. Les protéines Rab sont des entités membranaires capables d'hydrolyser le GTP en GDP ; liées au GTP, elles favorisent le processus de fusion membranaire. Des études de comparaison de séquences (Seabra et al., 1992 et 1993a) ont mis en évidence une forte homologie entre le gène CHM et le gène pour la sous-unité A de la Rab géranylgeranyl transférase II (GGT II) du rat. Cette sous-unité A est maintenant dénommée REP-1 pour Rab escort protein-1 (Seabra et al., 1993b ; Andres et al., 1993). La GGT II catalyse l'accrochage d'un résidu à 20 carbones

sur les cystéines situées à l'extrémité carboxy-terminale des protéines Rab1A et Rab3A. Le mécanisme par lequel l'absence de REP-1 provoque les manifestations cliniques de la choroïdérémie n'est pas encore clairement démontré.

Un gène autosomique homologue du gène CHM a été isolé par Cremers et al. (1992). Ce gène dénommé CHML (CHM like) est localisé en 1q42-qter, région du génome qui porte également le locus du syndrome de Usher de type II (MIM 276900). L'absence d'introns dans le gène CHML est une indication quant à son origine : il s'agirait d'une intégration, à l'extrémité des bras longs du chromosome 1, d'un ADNc issu de la transcription inverse de l'ARNm du gène CHM. Les manifestations cliniques du syndrome de Usher de type II (rétinite pigmentaire et perte de l'ouïe) sont très proches de celles de la choroïdérémie. La co-localisation du gène CHML et du syndrome de Usher de type II d'une part, la similitude des manifestations cliniques entre ce syndrome et la choroïdérémie d'autre part, faisaient du gène CHML un gène candidat pour le syndrome de Usher de type II. Cependant, l'étude de patients atteints par ce syndrome n'a révélé aucune mutation dans le cadre de lecture de ce gène, rendant peu probable l'implication du gène CHML dans le syndrome de Usher de type II (van Bokhoven et al., 1994).

Il existe sans doute une famille de gènes pour le composant A de la GGT II avec ainsi plusieurs GGT II "organe ou tissu spécifique" (McInnes et Byers, 1992). On voit, travers l'exemple du gène CHM, que l'isolement d'un gène par clonage positionnel n'est pas un aboutissement en soi. L'après-clonage (qui peut grandement bénéficier des bases de données) fait intervenir des disciplines telles que la biologie cellulaire, la biochimie, etc. Il est ainsi possible de mieux comprendre la physiopathologie de la maladie et, dans certains cas, d'appréhender des processus biochimiques encore insoupçonnés.

La réalisation d'un hybride somatique interspécifique à partir de la lignée lymphoblastique porteuse de la t(X;7) (dérivée de la patiente TDo) nous a permis d'isoler le der(7). La localisation du point de cassure sur l'X, chez cette patiente atteinte de choroïdérémie, entre p784 (DXS121) et p722 (DXS110), est en accord avec la localisation du gène CHM en Xq21.2 (Cremers et al., 1990a).

Grâce aux hybrides TDo clone 1 (Hy TDo cl1) et clone3 (Hy TDo cl3) d'une part et aux ADNc partiels du gène CHM (figure 38) qui nous viennent de l'équipe de H.H. Ropers d'autre part, nous avons exploré en détail le point de cassure sur l'X chez la patiente TDo.

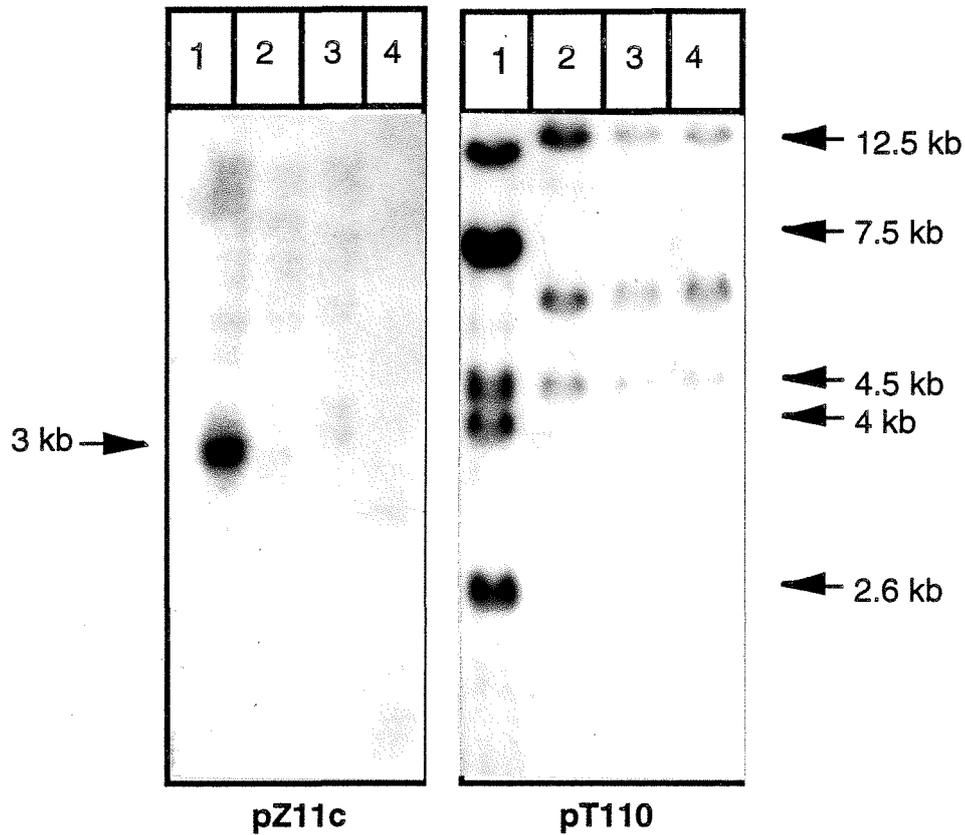


Figure 39 : Localisation du point de cassure sur le chromosome X chez la patiente TDo porteuse d'une t(X;7).

Autoradiogrammes obtenus avec les sondes pZ11c¹ (DXS540) et pT110², ADN digérés par EcoRI.

1 : LB TDo ; 2 : Hy TDo cl1 ; 3 : Hy TDo cl3 ; 4 : RJK 88

Pour la sonde pT110, seuls les fragments humains sont indiqués sur la droite de la figure.

LB : lignée lymphoblastique. RJK 88 : lignée de rongeur utilisée pour l'hybridation somatique interspécifique. Hy cl1 : hybride somatique interspécifique, clone numéro 1.
 1 : la sonde pZ11c est située entre les exons 8 et 9 (voir figure 37).
 2 : la sonde pT110 correspond à la partie interne de l'ADNc du gène CHM. Cet ADNc partiel détecte les exons 6, 7 et 8 (bande à 7,5 kb), 9 et 10 (bande à 4,5 kb), 11 (bande à 12,5 kb), 12 (bande à 2,6 kb) et 13 (bande à 4,0 kb) (voir figure 38).

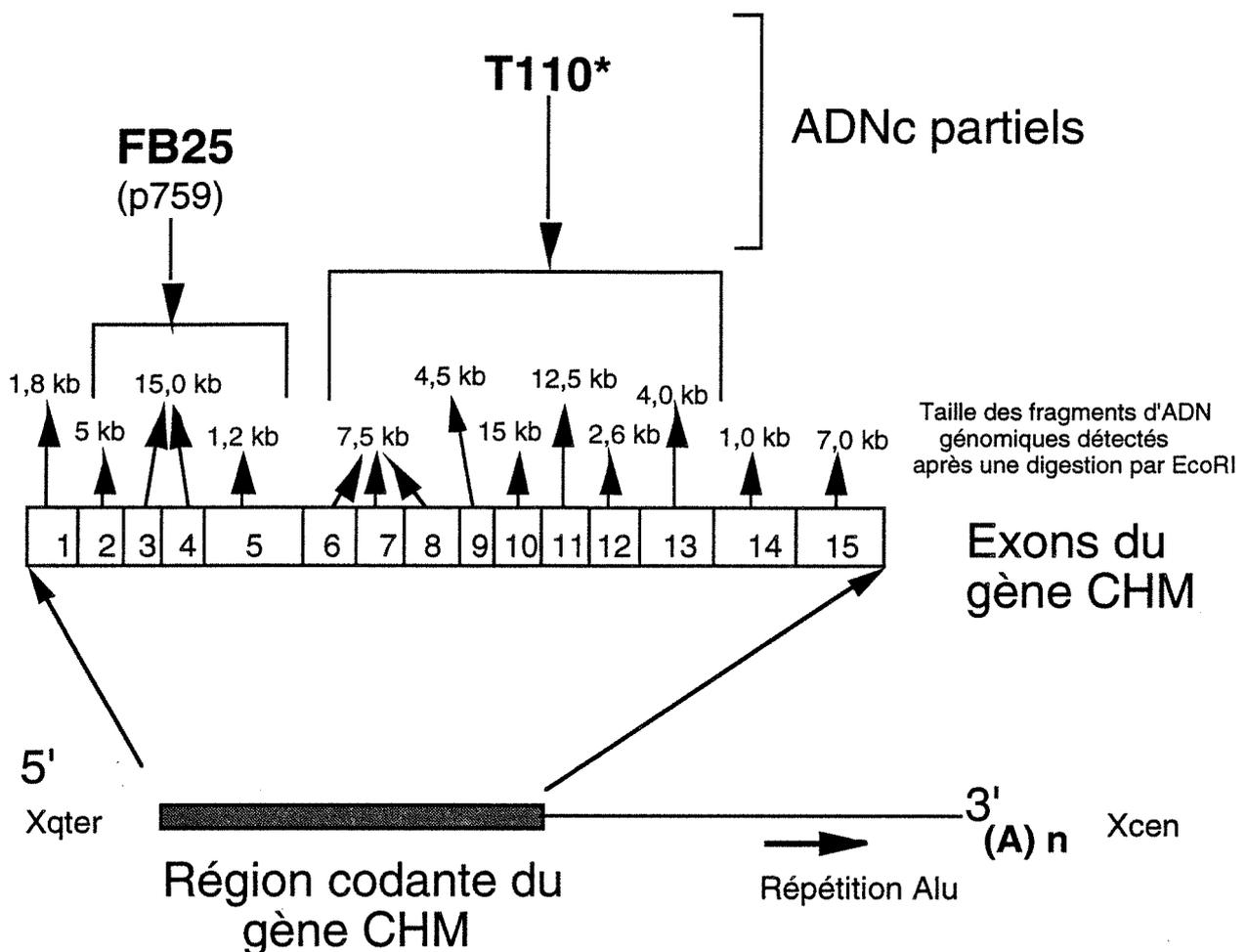


Figure 38 : Les ADNc partiels utilisés pour la caractérisation du point de cassure sur l'X chez la patiente TDo.

* la bande de 15 kb n'est pas détectée par le clone T110
(adaptée d'après van Bokhoven et al., soumis)

Les résultats avec la sonde pZ11c (DXS540) et de l'ADNc partiel pT110 (figure 39) ne nous permettaient pas de localiser de façon certaine le point de cassure sur l'X dans le gène CHM (Philippe et al., 1993). En effet, l'absence des séquences détectées par ces deux sondes dans l'ADN des Hy TDo c11 et c13 situait la cassure sur l'X en position proximale par rapport à l'exon 6 du gène CHM. On pouvait alors penser que le point de cassure était situé dans la partie 5' du gène CHM (ou dans des régions régulatrices en amont de celui-ci) sans pour autant pouvoir l'affirmer.

L'utilisation de l'ADNc partiel FB25 (p759) nous apporte la preuve définitive de la localisation du point de cassure sur l'X chez la patiente TDo dans le gène CHM. En effet, comme on peut le voir sur la figure 40, l'exon 2 (visualisé par

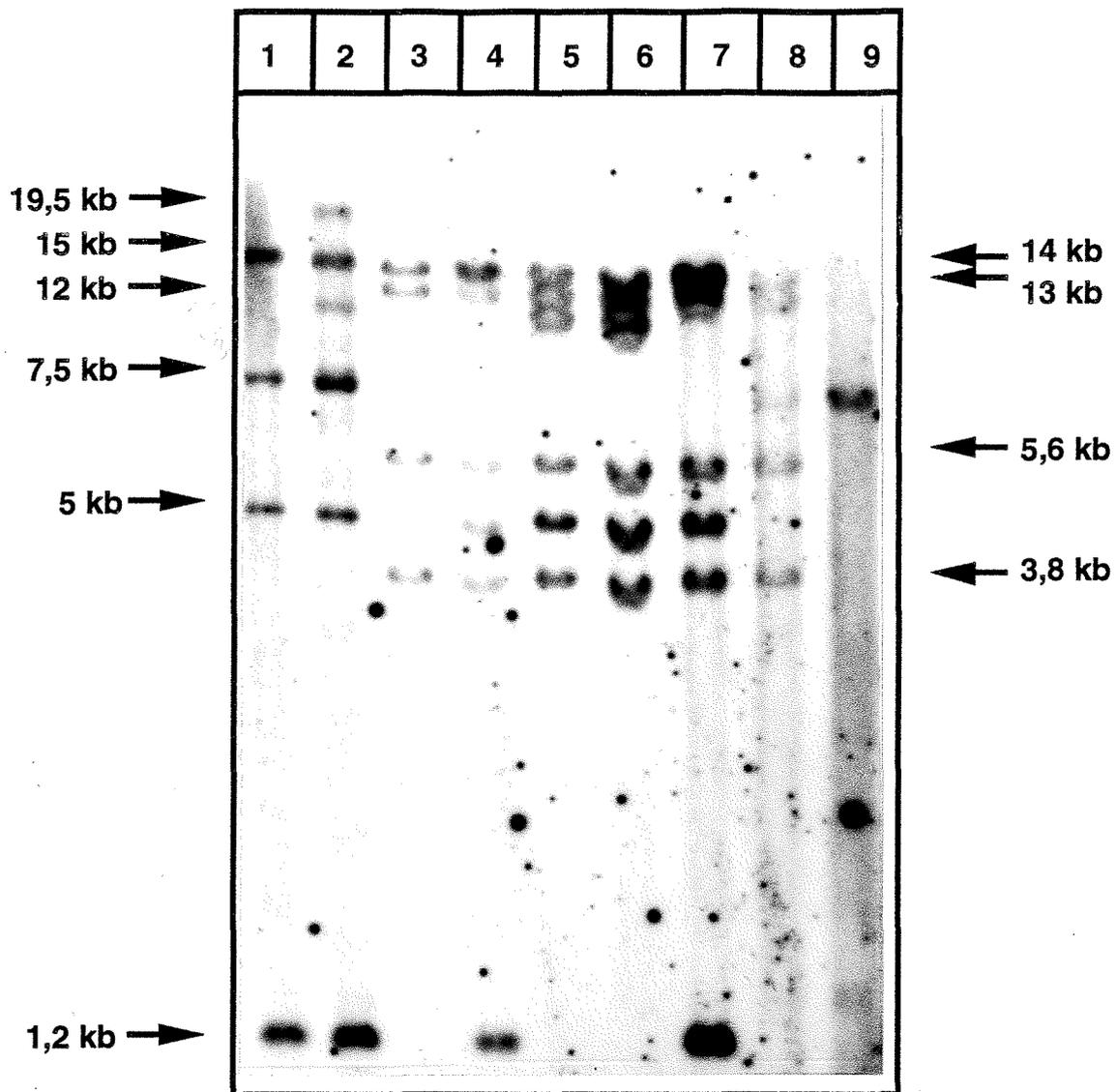


Figure 40 : Localisation du point de cassure sur le chromosome X chez la patiente TDo porteuse d'une t(X;7).

Autoradiogramme obtenu avec la sonde pT759 (FB25)^a, ADN digérés par EcoRI.

1 : Témoin 46,XX ; 2 : LB TDo ; 3 : RJK 88 ; 4 : Hy GMO6318B^b ; 5 : Hy TDo cl1
6 : Hy TDo cl3 ; 7 : Hy PMI cl1 ; 8 : Hy WD cl10 ; 9 : LB 25.6^c

Les fragments humains détectés par pT759 sont indiqués sur la gauche de la figure, ceux provenant du génome du hamster sont indiqués sur la droite.

LB : lignée lymphoblastique. RJK 88 : lignée de rongeur utilisée pour l'hybridation somatique interspécifique. Hy cl1 : hybride somatique interspécifique, clone numéro 1.

a : la sonde pT759 correspond à la partie 5' de l'ADNc du gène CHM (ce fragment ne contient pas les 70 premières bases de la phase de lecture de ce gène), cette sonde détecte les exons 2, 3, 4 et 5 (voir figure 38). De plus, pT759 détecte également un fragment de 7,5 kb correspondant au gène homologue (CHML) situé en 1qter (Cremers et al., 1992).

b : L'hybride GMO6318B provient de la banque de cellules "NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository". Le chromosome X est le seul chromosome humain contenu dans cet hybride.

c : lignée lymphoblastique établie à partir d'un homme porteur d'une délétion de l'X emportant le gène CHM.

une bande de 5 kb sur un blot EcoRI) est présent sur le der(7) retenu dans les hybrides TDo c11 et c13 alors que l'exon 5 en est absent. En comparant les réponses obtenues avec l'ADN témoin 46,XX d'une part et avec l'ADN de la lignée parentale TDo (LB TDo) d'autre part, on note la présence de deux bandes supplémentaires (19,5 kb et 12 kb) au sein de l'ADN de la lignée TDo. Comme l'exon 2 est présent dans son intégrité sur le der(7) et l'exon 5 absent, ces deux bandes supplémentaires contiennent donc chacune une partie de la région comprise entre le début de l'exon 3 et la fin de l'exon 4. La sonde p759 détecte un fragment de 12 kb au sein de l'ADN des hybrides TDo c11 et c13. L'exon 3 (en totalité ou en partie), ou l'exon 3 plus une partie de l'exon 4, est donc encore présent sur le der(7) (retenu dans l'hybride). L'absence de la bande de 19,5 kb dans ces deux hybrides confirme l'absence du der(X).

Par ailleurs, la bande de 7,5 kb, absente de l'hybride GMO6318B (ne contenant que le chromosome X) et présente dans la lignée 25.6 (délétée pour l'ensemble du gène CHM), correspond à une séquence du gène CHML situé sur le chromosome 1. On peut donc également déduire de la figure 40 que la région qter du chromosome 1 n'est pas retenue dans les hybrides TDo c11, TDo c13 et PMI c11.

Depuis peu, des amorces spécifiques pour chacun des exons du gène CHM sont disponibles (van Bokhoven et al., soumis). Nous avons donc recherché, par PCR, les exons 3 et 4 au sein des hybrides TDo c11 et c13. Les résultats obtenus démontrent clairement que seul l'exon 3 est présent sur le der(7) (figure 41). Le point de cassure sur le chromosome X chez la patiente TDo est donc très probablement localisé dans l'intron situé entre les exons 3 et 4 du gène CHM (on ne peut néanmoins pas exclure formellement une situation entre les amorces 719 et 739 utilisées pour amplifier l'exon 4).

D'après les résultats obtenus avec la sonde p759 (FB25), le der(X) porte tout (ou partie) de l'exon 4. Il est donc probable que le chromosome X transloqué (actif) chez la patiente TDo n'est pas porteur d'une délétion associée au point de cassure en Xq21.2, une micro-délétion touchant les séquences introniques entre les exons 3 et 4 est néanmoins possible.

Il s'agit du deuxième cas de t(X;A) chez une femme présentant une choroidémie dont le point de cassure est localisé dans le gène CHM (figure 42). Pour le premier cas décrit par Siu et al. (1990), le point de cassure sur l'X avait été localisé dans le gène CHM par Cremers et al. (1990b). Il est à présent plus précisément situé entre les exons 12 et 13 (van Bokhoven et al., soumis). Notre t(X;7) apporte une preuve supplémentaire (après beaucoup d'autres) que le gène cloné par Cremers et par Merry est bien le gène responsable, quand il est muté, de la choroidémie.

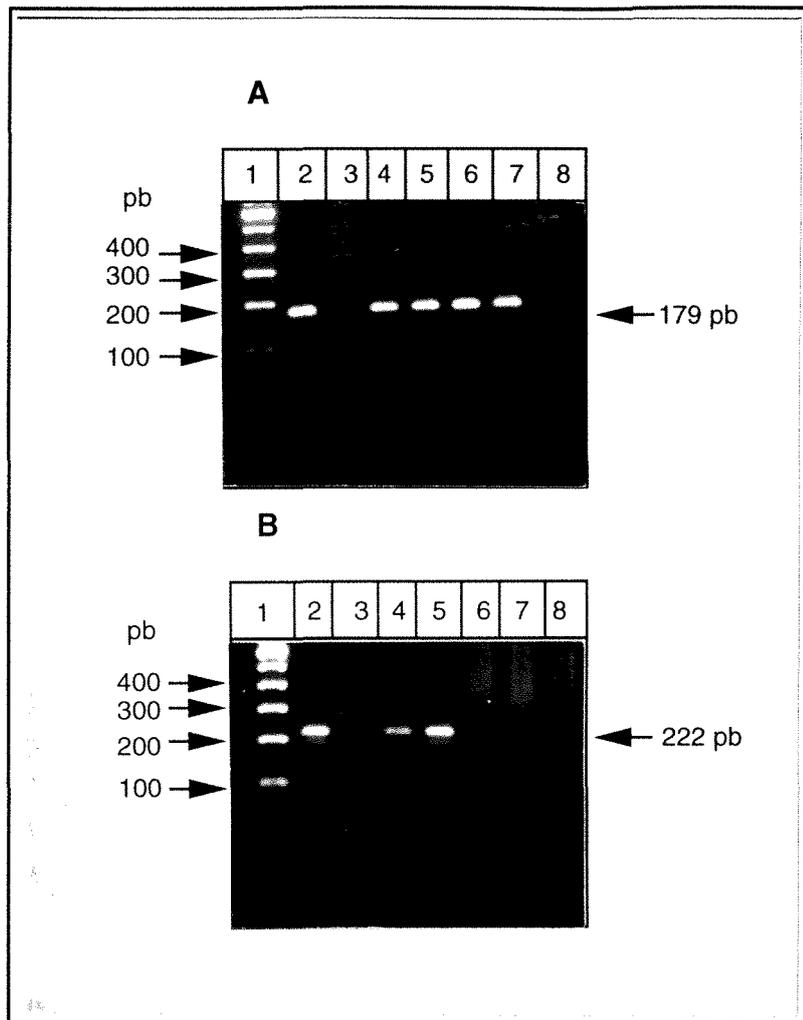


Figure 41 : Localisation du point de cassure sur l'X chez la patiente TDo dans le gène CHM entre l'exon 3 et l'exon 4.

1 : Marqueur de taille ; 2 : Témoin (46, XX) ; 3 : RJK 88 ; 4 : Hy GMO6318B¹ ;
5 : LB TDo 6 : Hy TDo cl1 ; 7: Hy TDo cl3 ; 8 : LB 25.6²

A) Recherche de l'exon 3 du gène CHM par PCR à l'aide des amorces 708/709.

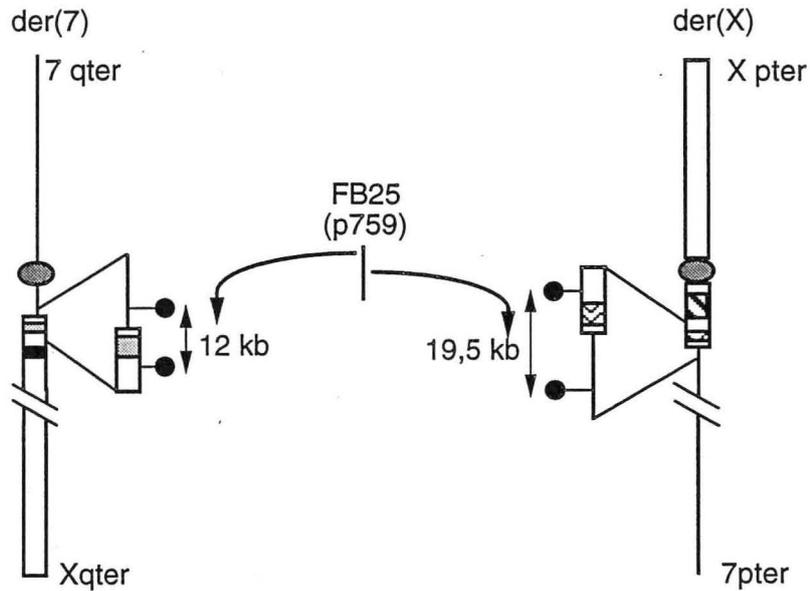
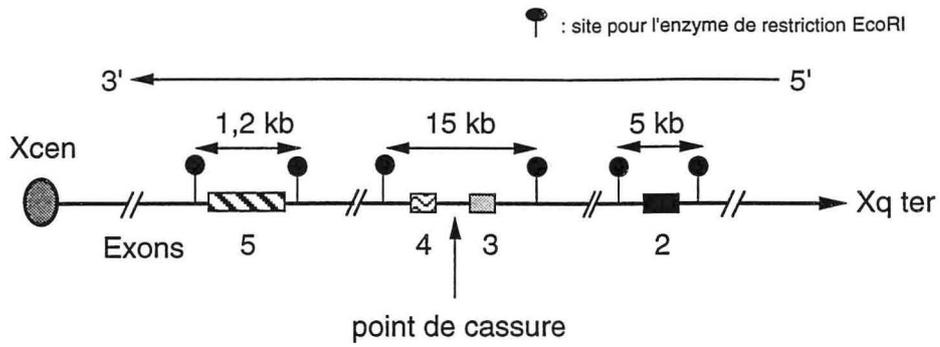
B) Recherche de l'exon 4 du gène CHM par PCR à l'aide des amorces 719/739.

Visualisation des produits de PCR sur gel d'agarose 2%, coloration par le bromure d'éthidium.

1 : L'hybride GMO6318B provient de la banque de cellules "NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository". Le chromosome X est le seul chromosome humain contenu dans cet hybride.

2 : lignée lymphoblastique établie à partir d'un homme porteur d'une délétion de l'X emportant la totalité du gène CHM (Cremers et al., 1990a).

A)



B)

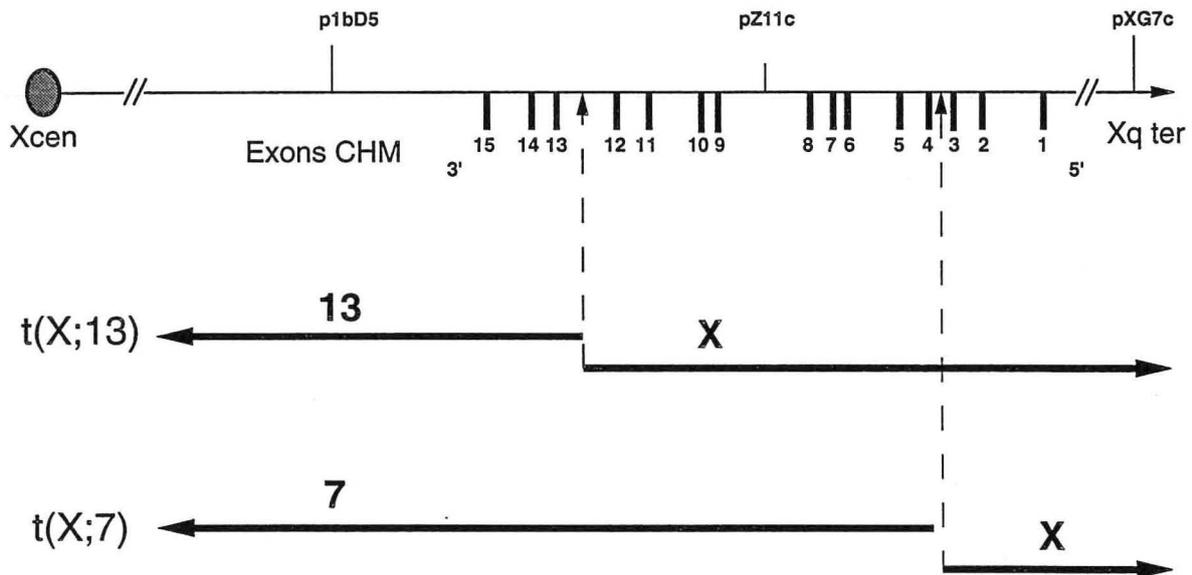


Figure 42 : Choroïdérémie chez des femmes porteuses de $t(X;A)$.

A) Le point de cassure sur l'X chez la patiente TDo est localisé entre l'exon 3 et l'exon 4 du gène CHM.

B) Dans les deux cas de $t(X;A)$ associée à une choroïdérémie, le point de cassure sur l'X est situé dans le gène CHM.

II) t(X;13) (q13;q31) ET RETARD MENTAL

L'histoire des retards mentaux liés à l'X (RMLX) a débuté avec la description par Martin et Bell en 1943 d'une famille dans laquelle se transmettait un retard mental sur le mode lié au chromosome X. Ce retard mental (RM) est maintenant dénommé syndrome de l'X fragile (FRAXA) en raison d'une fragilité du chromosome X, dans la région q27.3, visible en cytogénétique dans certaines conditions de culture. Nous avons déjà évoqué le bouleversement occasionné par le clonage du gène à l'origine de ce RMLX avec le nouveau pan de la génétique humaine que sont les mutations dynamiques à expansion de triplets.

Les RMLX constituent la première cause de RM chez les sujets masculins avec une fréquence de 1,8/1000 (Glass, 1991). A côté du syndrome de l'X fragile (le plus fréquent), on dénombre actuellement au moins 95 maladies liées à l'X dans lesquelles le RM est une caractéristique essentielle (Schwartz, C.E. 1993).

Les RMLX sont subdivisés en deux groupes :

- les syndromes: le RM est associé à un phénotype particulier caractéristique. Par exemple, le syndrome de l'X fragile associe un RM, un visage allongé, de grandes oreilles et une macroorchidie.

- les RMLX non spécifiques : le RM lié à l'X n'est associé à aucun signe clinique particulier, les sujets ont une apparence physique normale.

En 1992, Neri et al. proposent d'exclure des RMLX les déficiences mentales pour lesquelles le déficit primaire est clairement métabolique ainsi que les RM associés à une duplication ou à une délétion de l'X, considérant que, pour ces derniers, le trouble résulte de l'altération de l'expression de plusieurs gènes (comme c'est le cas dans une aneuploïdie) plutôt que d'une entité unique.

Il semble qu'il existe, dans certaines régions de l'X (Xq12-q21 et Xq28), des regroupements de gènes dont les produits sont impliqués dans le fonctionnement cérébral. La figure 43 rassemble les RMLX de la région Xq proximale. Les difficultés rencontrées dans la cartographie des gènes à l'origine des RMLX viennent du fait que la plupart des données dérivent de l'étude de très peu de familles (dans certains cas, l'analyse de liaison a été réalisée à partir d'une seule famille dans laquelle ségrège un RMLX), et ce, avec peu de marqueurs, eux-mêmes moyennement polymorphes. Cela se

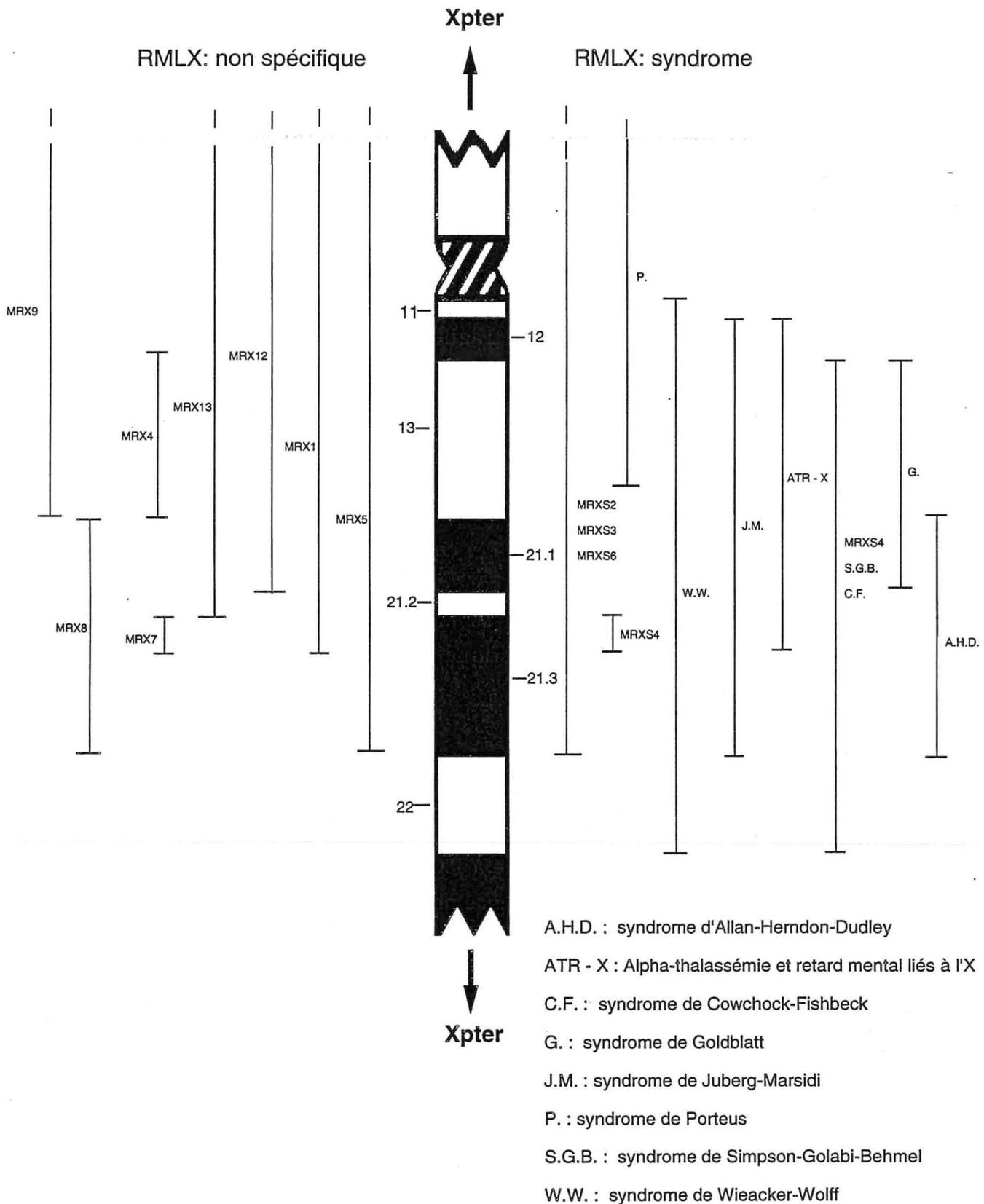


Figure 43 : Localisation des gènes à l'origine de RMLX dans la région proximale des bras longs du chromosome X humain

Les localisations des différents RMLX sont celles fournies par Neri et al. (1992) à l'exception du syndrome de Juberg- Marsidi (Saugier-veber et al., 1993), du syndrome de Porteus (Porteus et al., 1992b), du syndrome ATR-X (Gibbons et al., 1993) et du retard mental non spécifique MRX9 (Willems et al., 1993).

traduit par des localisations grossières avec beaucoup de chevauchements. La cartographie des RMLX devrait progresser de façon spectaculaire avec le nombre croissant de microsattellites (les "CA repeat") hyperpolymorphes de l'X désormais disponibles.

La concentration de RM dans la région Xq proximale pourrait refléter dans certains cas des formes alléliques touchant un même gène ou, parfois, des expressions variables pour une même mutation. Certains syndromes ayant en commun, en plus du RM, un autre symptôme, pourraient s'inscrire dans le cadre de la pathologie des gènes contigus. D'autre part, pour toutes les familles avec un RMLX non spécifique, chaque cas doit être considéré comme un RMLX propre, et ce, tant que les différents gènes impliqués ne sont pas isolés. Seule l'identification des gènes permettra de dire si plusieurs RMLX situés dans une même région de l'X sont ou non des entités distinctes. La tendance actuelle consistant à séparer au maximum les RMLX devrait dans un avenir proche s'inverser et ainsi simplifier une carte des RMLX devenant très complexe.

PMI, porteuse d'une $t(X;13)(q13;q31)$ survenue *de novo* et apparemment équilibrée (d'un point de vue cytogénétique) présente un retard mental sévère. Initialement, le point de cassure sur l'X chez PMI avait été positionné en q21 (Téboul et al., 1989). L'analyse moléculaire sur le $der(13)$ situe le point de cassure sur l'X chez cette patiente dans la région q13.1, une nouvelle analyse cytogénétique est venue confirmer la localisation moléculaire. On peut considérer le RM chez PMI comme une pathologie récessive liée à l'X qui se manifeste du fait de la $t(X;13)$ et d'une inactivation de l'X normal dans toutes les cellules de cette patiente.

A) Observation clinique détaillée de la patiente PMI

PMI, née le 24-12-1975, est la deuxième enfant d'une fratrie de deux. Ses parents, non apparentés, ainsi que son frère aîné sont bien portants. L'arbre généalogique ne montre pas d'éléments notables.

En 1976, commence une série d'hospitalisations pour des convulsions hyperthermiques.

A 11 mois, on note chez PMI une attitude scoliotique ; en 1988, la scoliose est nette (38° entre les vertèbres D6 et D10 et 46° entre D11 et L3). Le traitement chirurgical de cette scoliose est reporté en raison de réticences de la part des parents.

En outre, l'examen clinique montre une discrète asymétrie faciale (sans asymétrie corporelle), une amblyopie (1/10 à l'oeil gauche), une clinodactylie ainsi qu'un trouble de la pigmentation sur l'ensemble du corps, sous forme de taches achromiques et pigmentées dans les régions abdominale et lombaire, qui respectent les lignes de Blaschko.

En 1984, un retard psychomoteur nécessite une scolarisation en milieu spécialisé. En 1991, le quotient intellectuel ou Q.I. est estimé inférieur à 45 (test WISC-R, échelle d'intelligence de Wechsler pour enfants, forme révisée, 1981), situant donc PMI dans la zone de la débilité profonde. Malgré les anomalies mineures associées avec le RM chez cette patiente, il semble que l'on puisse considérer qu'il s'agit d'un RMLX non spécifique.

Comme nous l'avons déjà évoqué, la fonction ovarienne est normale chez cette patiente actuellement âgée de 18 ans.

B) Clonage du point de cassure sur l'X chez la patiente PMI

La région proximale des bras longs de l'X est potentiellement riche en gènes à l'origine de RMLX. 15 des 43 RMLX relativement bien localisés sont liés à des marqueurs de la région Xq12-q21 (Schwartz C.E., 1993). Il est probable que le retard mental chez la patiente PMI est le résultat de la lésion, par la t(X;A), d'un gène sur le chromosome X impliqué dans le fonctionnement cérébral. Selon cette hypothèse, l'isolement du segment d'ADN contenant le point de cassure sur le chromosome X chez PMI serait un moyen extrêmement rapide de cloner un gène à l'origine d'un RMLX.

Grâce à l'hybride PMI cl1, qui contient comme seul matériel de l'X la région q13.1-qter portée par le der(13), le point de cassure sur l'X chez la patiente PMI est situé entre les locus des gènes GJB1 (gap junction protein, beta 1 ou connexin 32) et CCG1 (cell cycle, G1 phase defect) :

Xcen - DXS348 - GJB1 - PMI (t(X;13)) - CCG1 - Xqter (Schlessinger et al., 1993).

4 YACs chevauchants contenant deux loci situés de part et d'autre du point de cassure (DXS348 et CCG1) sont isolés. Parmi ces 4 YACS, l'un montre clairement, par HIS sur des métaphases de la lignée lymphoblastique PMI, un signal à la fois sur l'X normal, sur le der(X) et sur le der(13). Ces résultats démontrent que ce YAC contient la région de l'X où est situé le point de cassure chez PMI. Ce YAC est ensuite sous-cloné dans des cosmides ; de la même façon, un cosmide englobant le point de cassure sur l'X chez PMI est isolé. Ce cosmide est ensuite hybridé avec une banque d'ADNc spécifiques du cerveau foetal humain. Parmi les ADNc "positifs" (c'est-à-dire contenu dans

le cosmide), l'un correspond à un gène interrompu par la t(X;13) chez la patiente PMI. La caractérisation de ce gène est en cours (van de Maarel et al., 1993 ; van de Maarel, communication personnelle). Le clonage positionnel du gène sur l'X interrompu, chez la patiente PMI, par le t(X;13) est l'oeuvre du groupe de Nimègue.

Le gène sur l'X lésé par la translocation (X;13)(q13-q21) est probablement l'une des nombreuses entités à l'origine d'un RMLX que compte la région Xq12-q21. Néanmoins, il n'est pas exclu que le RM chez PMI soit le résultat de la lésion d'un gène au niveau du point de cassure sur le chromosome 13. D'autre part, nous ne pouvons pas affirmer que la t(X;13) est une translocation totalement équilibrée. Même si l'analyse cytogénétique ne détecte aucune modification du matériel chromosomique, il est possible qu'au niveau moléculaire une microdélétion (ou une microduplication) accompagne cette t(X;13). Ce microréarrangement, situé à proximité du point de cassure sur le 13 ou sur l'X, pourrait également être la cause du retard mental et des anomalies mineures observés chez PMI.

Malgré tout, l'hypothèse d'une pathologie du point de cassure chez PMI expliquant l'apparition d'un retard mental récessif lié à l'X est l'hypothèse la plus probable. Si c'est le cas, ce gène de l'X, interrompu par la t(X;13), est potentiellement un gène candidat pour tous les RMLX non spécifiques localisés, par analyse de liaison, dans la région Xq12-q21.

CONCLUSION PERSPECTIVES

Notre travail s'inscrit dans le vaste projet qu'est l'établissement d'une carte détaillée du génome humain. Nous avons mis à profit, dans cette thèse, des réarrangements touchant le chromosome X pour améliorer la carte physique de la région Xq13-22. Cette région contient un certain nombre de gènes à l'origine de pathologies génétiques dont 50% environ ne sont pas encore clonés (figure 44). De plus, outre le centre inactivateur situé en q13.2, la région proximale des bras longs de l'X contient sans doute un grand nombre de gènes à l'origine, quand ils sont mutés, de RMLX. Enfin, la région Xq13-q22 est impliquée dans la mise en place d'une fonction gonadique normale.

A partir de translocations (X;A), nous avons fabriqué des hybrides somatiques interspécifiques pour isoler 8 nouveaux points de cassure dans la région proximale des bras longs du chromosome X humain. Ces points de cassure délimitent 9 intervalles sur l'X dont 7 dans la région q13-q22 ; nous avons positionné 70 marqueurs dans ces intervalles. Les points de cassure PMI, TDo, FA et BC sont d'ores et déjà répertoriés dans la liste, regroupant 89 points de cassure de l'X, publiée dans le compte-rendu de la quatrième réunion sur la cartographie du chromosome X qui s'est tenue à St. Louis (Missouri, USA) (Schlessinger et al., 1993).

Nous avons vu que les hybrides somatiques interspécifiques (HSI) sont sujets à de nombreux remaniements secondaires pouvant biaiser les localisations physiques obtenues. Sans remettre en cause la grande utilité des HSI pour la cartographie physique, les données déduites de leur utilisation doivent être interprétées avec prudence. Il semble néanmoins que nos différents hybrides somatiques ne soient pas porteurs de réarrangements secondaires touchant la région du point de cassure sur le chromosome X. En effet, un grand nombre de marqueurs ont été utilisés sans jamais donner de résultats incohérents (comme ce fût le cas avec l'hybride BC clone 4 que nous avons écarté des analyses ultérieures). De plus, la carte physique de la région Xq13-q22 ainsi établie est quasiment toujours en accord avec les données de la littérature, nous avons analysé les quelques divergences observées.

Pour les 8 t(X;A), l'ensemble des clones hybrides disponibles, y compris ceux écartés lors du tri des hybrides pour la caractérisation du point de cassure sur l'X, pourraient également contribuer à la cartographie des régions autour des différents points de cassure sur les autosomes. Il serait alors nécessaire, dans chaque cas, de s'assurer de l'absence de l'autosome homologue normal avant de débiter la localisation moléculaire du point de cassure sur ces autosomes. L'hybride TDo c11 semble très intéressant pour la cartographie physique des bras courts du chromosome 7. Les 4 clones

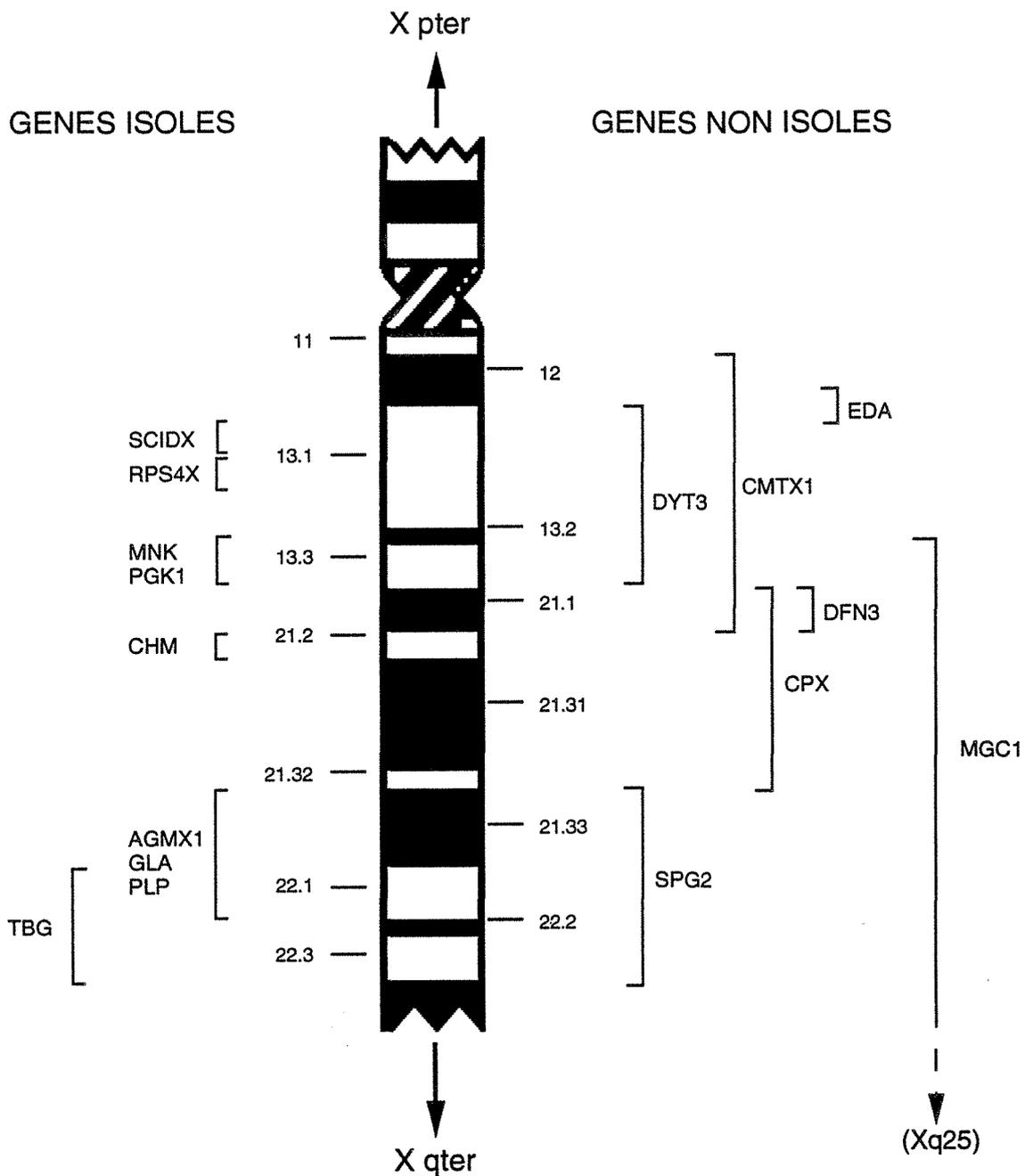


Figure 44 : Cartographie des gènes de la région Xq13-q22 à l'origine de pathologies génétiques (à l'exclusion des RMLX)

localisations d'après Mandel et al. (1993) et Schlessinger et al. (1993).

AGMX1 : Agammaglobulinémie de Bruton ; CHM : Choroidérémie ; CMTX1 : Neuropathie de Charcot-Marie-Tooth liée à l'X (dominante) ; CPX : Fente palatine liée à l'X ; DFN3 : Surdité li e à l'X ; DYT3 : Dystonie Parkinsonienne ; EDA : Dysplasie ectodermique anhidrotique ; MGC1 : Megalocorn e li e à l'X ; MNK : syndrome de Menk es ; PGK1 : Anémie hémolytique ; PLP : Syndrome de Pelizaeus-Merzbacher ; RPS4X : Protéine ribosomale li e à l'X (impliqu e dans le phénotype Turner) ; SCIDX : Immunodéficience combin e sévère li e à l'X ; SPG2 : Paraplégie spastique li e à l'X ; TBG : Déficience en thyroxine-binding globulin.

hybrides obtenus pour la $t(X;12)(q21;p13)$ (cas BC) ont été envoyés à P. Marynen (Louvain, Belgique) qui travaille sur la région 12p13 probablement impliquée dans la genèse ou l'évolution des mésothéliomes (Aerssens et al., in press).

L'étude du point de cassure sur l'X chez la patiente TDo porteuse d'une $t(X;7)$ en association avec la choroidémie confirme l'altération du gène CHM sur l'X transloqué actif. Le point de cassure en Xq13 chez la patiente PMI a été déterminant pour le clonage positionnel, par le groupe de Ropers, d'un gène candidat pour l'un des nombreux retards mentaux liés à l'X.

Pour la région Xq21-q22, nous présentons un panel de 21 réarrangements comportant 7 $t(X;A)$ et 14 délétions. Les points de cassure dérivés des $t(X;A)$ et les bornes des différentes délétions définissent 23 intervalles au sein desquels nous avons placés 48 marqueurs.

Dans la région Xq21, notre panel de réarrangements définit 21 segments, soit plus d'une balise par Mb d'ADN car la longueur physique de cette bande est estimée entre 15 et 20 Mb.

A de nombreuses occasions au cours de ce travail, nous avons pu nous rendre compte de la complémentarité des approches de cartographie physique et de cartographie génétique. En effet, quand plusieurs marqueurs sont génétiquement très proches, des balises physiques (telles que points de cassure ou bornes de délétions) sont d'excellents outils pour les ordonner les uns par rapport aux autres.

La région q11.1-q23 est la portion du chromosome X humain la moins bien cartographiée puisque seulement un tiers est cloné sous forme de contigs de YAC chevauchants contre, par exemple, 95% des 50 Mb de la région Xq24-qter (Schlessinger et al., 1993). Pour le segment Xq13-q22, entre les bandes q13 et q22 déjà bien cartographiées avec de nombreux contigs de YAC disponibles, la bande q21 fait encore figure de "parent pauvre" (figure 45). La région Xq21 est une bande G "sombre" donc relativement pauvre en gènes (Gardiner et al., 1990). Elle contient essentiellement des gènes exprimés dans certains tissus seulement (comme par exemple le gène CHM) et peu de gènes de ménage (exprimés dans tous les types tissulaires). C'est la raison pour laquelle les délétions de toute la région Xq21 chez les hommes, entraînant ainsi une nullisomie partielle pour l'X, ne sont pas létales (Cremers et al.,

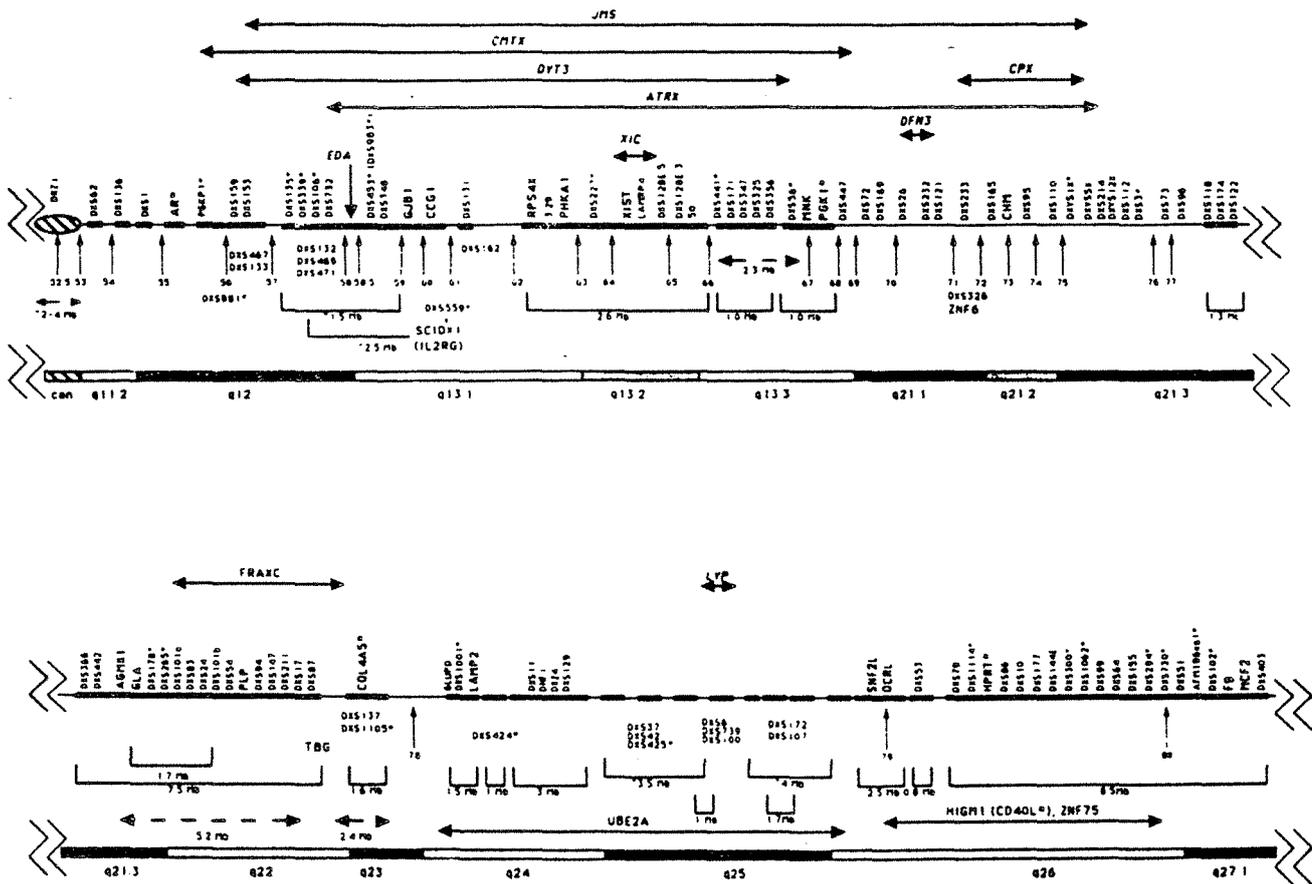
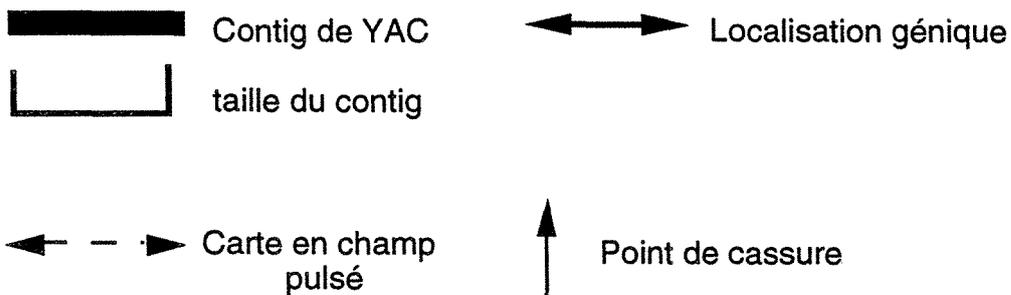


Figure 45 : Carte consensuelle de la région cen-q27.1 du chromosome X humain (extrait de Schlessinger et al., 1993).



Quatre des huit points de cassure décrits dans ce travail sont inclus dans cette carte : PMI (numéro 60), TDo (numéro 73), FA (numéro 76) et BC (numéro 77).

1988). Quelques loci de pathologies héréditaires, dont les gènes correspondant ne sont pas encore clonés, sont néanmoins situés dans la région Xq21 (figure 44). Pour ces pathologies, mais également afin d'établir une carte de l'ensemble du chromosome X humain, il est important de construire une carte physique, génétique et fonctionnelle détaillée de cette portion des bras longs du chromosome X humain.

Notre panel de réarrangements avec 48 marqueurs répartis dans 21 intervalles constitue un très bon point de départ pour la construction d'une carte détaillée de la région q21 du chromosome X humain. Dans ce sens, une demande de subvention a été effectuée auprès de la Communauté Européenne dans le cadre du programme BIOMED 1 (1991-1994) dans la section Analyse du Génome Humain. Une subvention est accordée pour une durée de 30 mois pour la construction d'une carte physique, génétique et fonctionnelle de la région q21 du chromosome X humain. Dans ce projet, notre laboratoire est associé aux groupes de H.H. Ropers (Nimègue, Pays-Bas) et de A.P. Monaco (Oxford, Angleterre).

Ce projet peut être décomposé en quatre parties (figure 46) :

- 1) construction d'un contig de YAC pour la région Xq21.1-q21.3,
- 2) isolement de microsatellites hautement informatifs contenus dans les YAC du contig,
- 3) identification et localisation de séquences exprimées,
- 4) étude du profil d'expression spatiale (sur différents tissus) et temporelle (études sur des tissus embryonnaires et adultes) des gènes clonés.

Certains des gènes ainsi isolés seront, de par leur localisation par rapport aux marqueurs de la région et en fonction des tissus où ils sont exprimés, testés comme gènes candidats pour les pathologies héréditaires de la région Xq21. La surdité liée à l'X (DFN3), une fente palatine à transmission récessive liée à l'X (CPX) et un (ou plusieurs) retard(s) mental(aux) sont autant de pathologies qui devraient bénéficier d'une carte intégrée précise de la région Xq21. Les maladies situées dans la région Xcen-q23, dont les gènes ne sont pas encore isolés, pourront également bénéficier des nouveaux microsatellites développés au cours de la cartographie de la région Xq21.

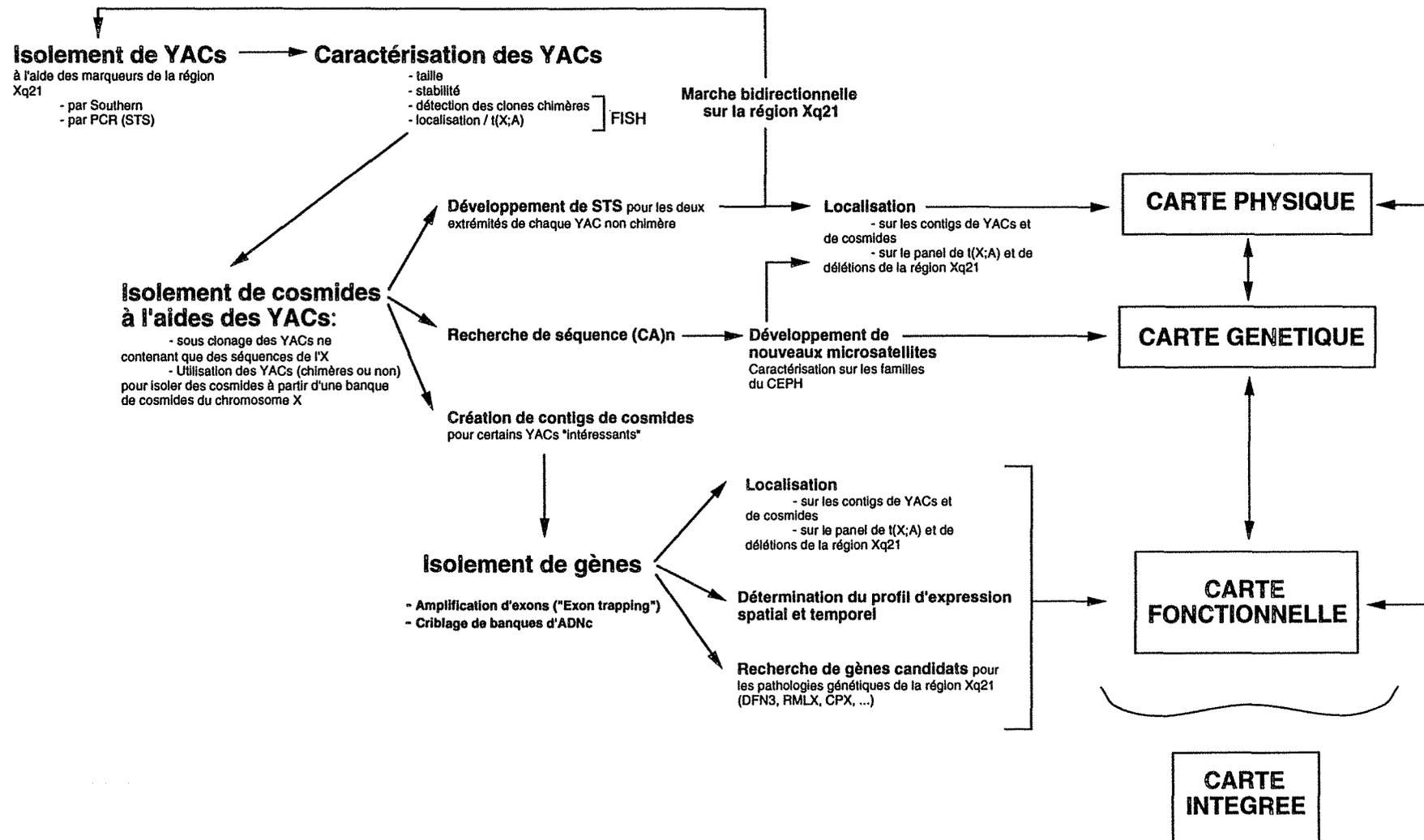


Figure 46 : les différentes étapes de la construction d'une carte physique, génétique et fonctionnelle de la région q21 du chromosome X humain.

Tout au long du projet, le laboratoire de génétique de Nancy interviendra à plusieurs reprises (figure 46) pour :

- caractériser les YAC de la région Xq21 par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH). Les différents YACs seront testés en FISH sur des métaphases humaines pour détecter les clones chimères c'est-à-dire ne contenant pas uniquement des séquences de la région Xq21. Les YAC seront également positionnés par rapport aux points de cassure TDo, WD, LG, FA, BC par FISH sur les métaphases porteuses des t(X;A) correspondantes.

- localiser tous les nouveaux marqueurs à l'aide du panel de translocations et de délétions défini dans cette thèse. Ces marqueurs pourront être des STS (définissant les extrémités des YAC lors de la marche sur la région Xq21), des microsatellites ou des séquences exprimées.

PUBLICATION

Physical Mapping of DNA Markers in the q13-q22 Region of the Human X Chromosome

CHRISTOPHE PHILIPPE,*¹ FRANS P. M. CREMERS,† MICHÈLE CHERY,* IRÈNE BACH,†
 NAÏMA ABBADI,* H. HILGER ROPERS,† AND SIMONE GILGENKRANTZ*

laboratoire de Génétique Humaine, Centre Régional de transfusion Sanguine, Avenue de Bourgogne, 54511 Vandoeuvre-les-Nancy cedex, France; and †Department of Human Genetics, University Hospital Nijmegen, P.O. Box 9101, 6500 HB Nijmegen, The Netherlands

Received November 30, 1992; revised April 5, 1993

DNA probe screening of somatic cell hybrids derived from females with X;autosome translocations has enabled us to define eight new breakpoints within the q13-q22 region. Together with other X-chromosome arrangements that have been described earlier, these breakpoints subdivide the Xq21-q22 region into 20 intervals. Our panel refines the physical assignment of DNA probes in the Xq21-q22 segment. Thus, these X-chromosome rearrangements are useful tools for ordering X-linked markers and genes on the proximal long arm of the human X chromosome. © 1993 Academic Press, Inc.

INTRODUCTION

Physical mapping of the human X chromosome for a long time relied on the molecular characterization of deletions and X;autosome translocations, the former of which were found almost exclusively in bands p22.3 (TS, Kallmann syndrome), p21 (DMD), and q21 (HM). The availability of an increasing number of DNA markers and the introduction of YAC technology have resulted in the construction of YAC contigs spanning approximately 40% of the human X chromosome (Fandel *et al.*, 1992).

During the past 3 years, we (S.G. and co-workers) have collected eight cases of female patient carriers of X;autosome translocations (t(X;A)) with the X-chromosomal breakpoint located in the q proximal region. In seven of these patients, clinical features include gonadal dysgenesis and, in two cases, clinical findings were suggestive of defined X-linked disorders: TDo, a female with a balanced t(X;7)(q21;q13;p12) translocation (Kanan *et al.*, 1989), had characteristic signs of choroideremia, and PMI, a girl with a t(X;13)(q13;q34), was markedly mentally retarded (Téboul *et al.*, 1989).

In the present report, these eight X-chromosomal breakpoints are precisely assigned in the q13-q22 region using molecular and somatic cell genetic approaches.

In this way, closely linked probes have been identified on either side of the translocation breakpoints. The correlation between the localization of the different X-chromosomal breakpoints and the resulting phenotypes in these female patients is discussed.

As part of the studies of genes that map to the Xq21 band (the CHM gene, the DFN3 gene, and a gene for MRX), we (Hilger Ropers and co-workers) have characterized a large number of X rearrangements in the q proximal region (Cremers *et al.*, 1988, 1990a; Bach *et al.*, 1992a,b). By combining these X rearrangements with the X-chromosomal breakpoints reported here, we were able to construct a physical mapping panel that consists of 26 X-chromosome rearrangements and defines 20 intervals inside the q21-q22.1 region. This mapping panel will be a useful tool for ordering X-linked markers and genes on the proximal long arm of the human X chromosome and should facilitate positional cloning of genes underlying deafness (DFN3) and nonspecific mental retardation (MRX).

MATERIALS AND METHODS

We present the cytogenetic and molecular findings in eight patients investigated in this study (PMI, C56N, TDo, WD, LG, FA, BC, and SN). For the other cases, the clinical and cytogenetic data as well as Southern blot analysis of the rearranged X chromosomes has been described elsewhere; i.e., CN, KM, NP, and RvD (Cremers *et al.*, 1988, 1989a); XL62, DM, XL45, MBU, and HR10 (Cremers *et al.*, 1989a); 1/10 and TD (Bach *et al.*, 1992a); SD and D20 (Bach *et al.*, 1992b); LGL2905, 3.5, 7.6, 25.6, and 33.1 (Cremers *et al.*, 1990a); CIII-1 (Cremers *et al.*, 1989b, 1990b).

Clinical and cytogenetic data. Karyotypes and phenotypes from the patients are shown in Table 1. Lymphoblastoid cell lines were established from peripheral blood using Epstein-Barr virus (EBV) according to standard methods.

Construction of somatic cell hybrids. Somatic cell hybrids between hamster RJK88 cells (Fuscoe *et al.*, 1983) and lymphoblastoid cell lines were obtained with PEG according to the procedure described by Pontecorvo (1975).

Southern blot analysis. DNA was extracted from the lymphoblastoid cell lines and from the derived hybrid clones according to the method described by Jeanpierre (1987). Methods for Southern blot analysis have been published previously (Cremers *et al.*, 1988).

Screening of hybrid clones. To refine the cytogenetic localization of the X breakpoints using Southern blot analysis, we have used so-

¹ To whom correspondence should be addressed. Telephone: (33) 83 62 62.

TABLE 1
Cytogenetic and Clinical Features

Patient	Cytogenetic examination	Clinical features
BC	46,X,t(X;12)(q21;p13)	Secondary amenorrhoea
FA	46,X,t(X;15)(q21;q26)	Secondary amenorrhoea
LG	46,X,t(X;9)(q21;q33)	Secondary amenorrhoea, slight mental retardation
PMI	46,X,t(X;13)(q13;q31)	Mental retardation, scoliosis, skin pigmentation disturbance
SN	46,X,t(X;9)(q22;q22)	Primary amenorrhoea
TDo	46,X,t(X;7)(q21;p12)	Primary amenorrhoea, choroideremia
WD	46,X,t(X;2)(q21;p25)	Primary amenorrhoea
C56N	46,X,t(X;5)(q21;q11)	Amenorrhoea

matic cell hybridization to isolate the der(A) bearing the Xq21-qter region. A preliminary screening was necessary to confirm both the presence of the der(A) and the absence of the normal X and the der(X). Thus, the X-chromosome content of hybrid clones was determined by scoring for Xp and Xq probes. XJ1.2 (DXS206) and RX-97 (DXS348), located at Xp21.1 and Xq12-q13.1, respectively, are proximal to the X breakpoints, whereas FVIII (F8c) and St14-1 (DXS52), located at Xq28, are distal. The HAT-selected clones that gave the appropriate signals after Southern blot analysis (a signal with St14-1 and FVIII and no signal with XJ1-2 and RX-97), suggesting retention of the der(A) but not the der(X) and the normal X, were used for the characterization of the X-chromosomal breakpoints by making use of suitable DNA markers from the proximal Xq region. The presence of

other human autosomes in the hybrid cell lines has not been investigated.

DNA markers. Information concerning most of the DNA probes used in this study can be found in the report of the committee on the genetic constitution of the X chromosome (Davies *et al.*, 1991). Probe pXG8b was provided by P. Szabo; pF1 and pF8 were gifts from T. A. Kruse (Aarhus). Probes 1:52, 2:30, 2:6, 2:63, 2:93, 3:29, 3:49, and 3:7 were provided by R. P. Kandpal (New-Haven, CT); CR39 (Clarke *et al.*, 1987) was provided by P. Edwards (Los Angeles, CA), p109 by I. Wieland (Essen, FRG). CMPX1 (ZNF6) by C. A. Sargent (Cambridge, UK), CR3 by M. G. Persico (Napoli, Italy), and DXYS42 by L. G. Brown (Cambridge, MA). Probes from the X-Y homologous region, 13d, GMGXY5, GMGXY6, GMGXY8, and GMGXY9, were gifts from N. A. Affara.

RESULTS

Characterization of X Breakpoints in Females with t(X;A)

In the eight females with balanced X;autosome translocations studied, the breakpoints on the X had been localized cytogenetically in the q13-q22 interval (the karyotypes and phenotypes of these individuals are described in Table 1). In each case, X-inactivation studies showed a nonrandom pattern of inactivation: the normal X was late replicating in all cells, as is the rule in females with balanced X;autosome translocations (Mattei *et al.*, 1982). In all of these cases but one (PMI), gonadal dysgenesis was observed. In addition, patient TDo suffers from choroideremia, and PMI is mentally retarded.

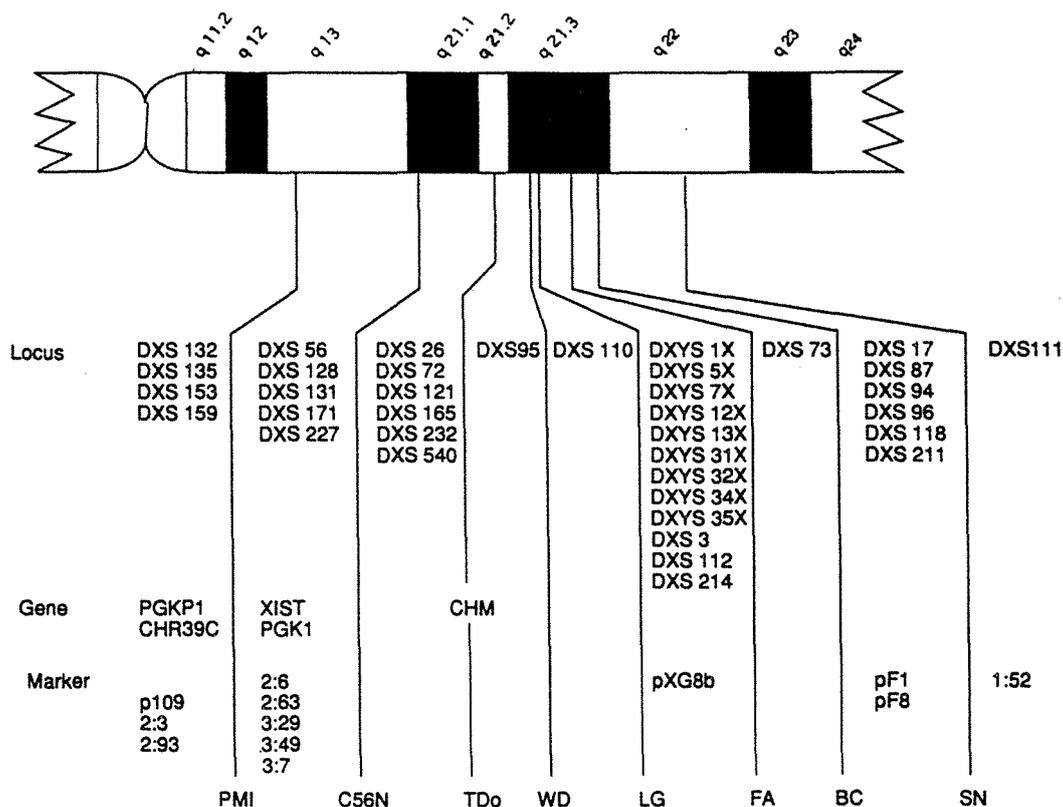


FIG. 1. Molecular localization of X-chromosomal breakpoints in the q proximal region according to DNA markers. The order of probes within each interval is arbitrary.

TABLE 2
Results of Hybridization Experiments

Locus	Probe	Hybrid cell line							
		PMI cl 1	C56N cl 1	TDo cl 1	WD cl 10	LG cl 4	FA cl 2	BC cl 2	SN cl 1
S153	cX37.1	-							
S132	cpX23	-							
S135	cpX93	-							
KP1	pHPGK-7e	-	-						
S159	cpX289	-							
S131	cpX21	+							
S128	cX65.3	+							
3T	pG1aX2.2	+	-						
S171	cpX63.c	+	-						
K1	pHPGK-7e	-	-						
S56	pL2.98	+	-						
S227	p1bB4	+	-						
S72	pX65H7	+	+	-	-	-	-	-	-
S26	pHU16	+	+	-	-	-	-	-	-
S232	pJL68	+	+	-	-	-	-	-	-
S121	p784	+	+	-	-	-	-	-	-
S165	p1bD5			-	-	-	-	-	-
S540	pZ11c	+	+	-	-	-	-	-	-
S95	pXG7.c			-	-	-	-	-	-
S110	p722	+	+	+	+	-	-	-	-
-	pXG8b				+	+			
YS1	pDP34	+	+	+	+	+	-	-	-
YS 5X	p47b	+	+	+	+	+	-	-	-
YS 7X	13d	+	+	+	+	+	-	-	-
YS 31X	GMGX5	+	+	+	+	+	-	-	-
YS 32X	GMGX6	+	+	+	+	+	-	-	-
YS 34X	GMGX8	+	+	+	+	+	-	-	-
YS 35X	GMGX9	+	+	+	+	+	-	-	-
YS 13X	pTAK2	+	+	+	+	+	-	-	-
S214	pPA20	+	+	+	+	+	-	-	-
YS 12X	pst25.2	+	+	+	+	+	-	-	-
S3	p19.2	+	+	+	+	+	-	-	-
S112	p753	+	+	+	+	+	-	-	-
S73	pX20R42	+	+	+	+	+	+	-	-
S87	pA13RI		+			+	+	+	-
S96	pX63.b		+			+	+	+	-
S118	p776		+			+	+	+	-
-	pF1		+			+	+		-
-	pF8		+			+	+		-
S211	pD3								-
S94	pXG12		+			+	+		-
S17	pS9								-
S111	p733								+

Note. A + indicates that the hybridization signal detected by the probe is present in the DNA from the hybrid clone (cl1, clone one; cl2, clone 2, . . .). A - indicates that the hybridization signal is absent.

To refine the localization of these X breakpoints, southern blot analysis with 42 Xq proximal probes was performed (the data obtained are summarized in Table 2 and depicted in Fig. 1).

The finding of a balanced translocation (X;7)(q21;q22) associated with choroideremia, an X-linked recessive disorder, in female TDo strongly suggests that the X breakpoint disrupts the CHM gene. The localization of the X breakpoint between p784 (DXS121) and p722 (DXS110) is in agreement with the previous assignment of the CHM gene (Cremers *et al.*, 1989a, 1990a). Recently, a part of the gene for choroideremia has been

isolated by making use of positional cloning strategies (Cremers *et al.*, 1990b). Neither pZ11c (DXS540), an intronic clone located in the middle part of the CHM gene, nor pT110, a CHM cDNA probe corresponding to the central and 3' portion of the gene, is present in the hybrid cell lines derived from patient TDo. Probe pT110 detects five human *EcoRI* bands from Xqter to Xcen: 7.5, 4.5, 12.5, 2.6, and 4 kb (in addition, three *EcoRI* bands are detected in the rodent genome). None of the human bands is present in the hybrid cell lines derived from patient TDo. From these data, we conclude that the X breakpoint in this patient with choroideremia is

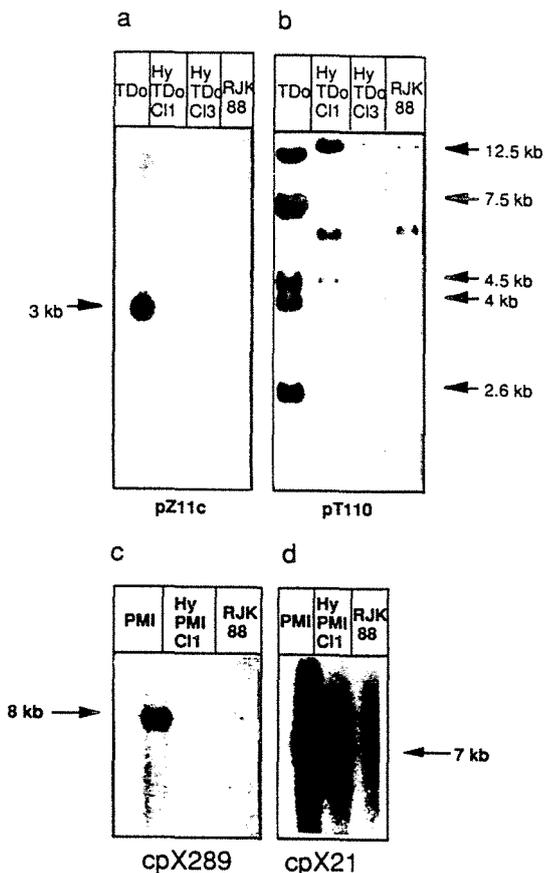


FIG. 2. Characterization of the X breakpoints in female TDo with probes pZ11c (DXS540) and pT110 (CHM) and in female PMI with probes cpX289 (DXS159) and cpX21 (DXS131). Southern blot analysis of *Eco*RI-digested DNA. TDo: parental lymphoblastoid cell line TDo; Hy TDo C1, Hy TDo C13: hybrid clones 1 and 3 derived from the parental cell line TDo; PMI: parental lymphoblastoid cell line; Hy PMI C11: hybrid clone 1 derived from the parental cell line PMI; RJK 88: rodent cell line used for interspecific hybridization.

located in the distal part (i.e., the 5' end) of the CHM gene, which has not yet been cloned.

The translocation breakpoint of PMI, which had been cytogenetically localized to Xq21 (Téboul *et al.*, 1989), is located distal to cpX289 (DXS159) (Fig. 2c) and proximal to cpX21 (DXS131) (Fig. 2d). Both DXS162 and DXS131 have been mapped previously by Lafreniere *et al.* (1991) between two X-chromosomal breakpoints that are located in band Xq13.1, suggesting that our previous cytogenetic assignment of the PMI breakpoint was erroneous. Indeed, cytogenetic reexamination has shown that the X-chromosomal breakpoint in this patient is located in the q13.1 band. Given the fact that PMI is markedly mentally retarded, this may indicate that the translocation in this patient has disrupted one of the several genes involved in nonspecific mental retardation (MRX) that are known to be located on the proximal Xq (Davies *et al.*, 1991; Glass, 1991; Neri *et al.*, 1992).

Regional Mapping of X Probes

Our panel of eight X-chromosomal breakpoints, which defines nine distinct physical intervals on the

proximal long arm of the human X chromosome, was used to regionally assign X-chromosomal probes previously mapped to the pericentromeric region of the X (Table 3). Ten probes were hybridized to the hybrid panel. Figure 1 shows the localization of these probes in relation to the different X breakpoints.

A Physical Mapping Panel of the Xq21-q22 Region

When combined with previously described X-chromosomal rearrangements in the vicinity of the CHM locus, the translocation breakpoints described here define 20 intervals in the Xq21-q22 region (see Fig. 3).

DISCUSSION

This report describes the characterization of a set of eight t(X;A) translocations in females. Hybridization experiments with Xq probes allowed us to precisely localize the X-chromosomal breakpoints in the Xq13.1 to Xq22 segment and to dissect this region into nine intervals. Our physical mapping data are consistent with the current consensus map (Davies *et al.*, 1991). This panel was subsequently used to improve the localization of probes from the pericentromeric region of the X chromosome. Numerous probes flanking the respective X-chromosomal breakpoints allowed us to assess the presence and integrity of the X-chromosomal portion of the der(A), although tiny rearrangements in the hybrids could not be firmly excluded.

In all female patients but one, the X;autosome translocation is associated with ovarian dysgenesis. These results are in agreement with the concept that the Xq13-q26 region must be present and intact to allow normal ovarian development and function (Sarto *et al.*, 1973; Therman *et al.*, 1990).

Several disease loci have been mapped precisely through the study of females with X;autosome translocations that were associated with X-linked diseases (Davies *et al.*, 1991). As first proposed for girls with balanced X;autosome translocations and full-blown Duchenne muscular dystrophy (Greenstein *et al.*, 1977; Verellen *et al.*, 1977), clinical symptoms in these cases can be ex-

TABLE 3

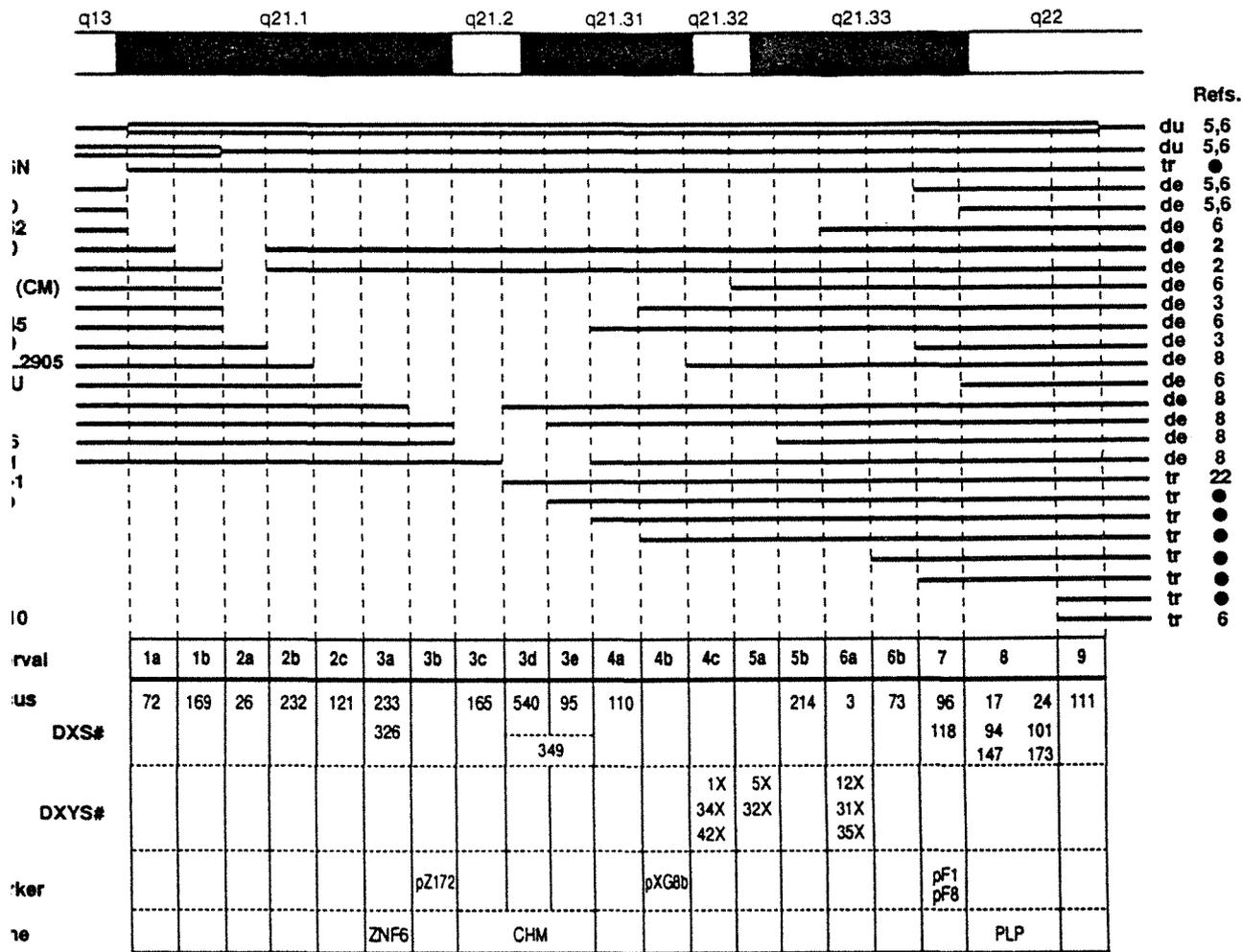
Improvement of the Localization of 10 X Probes Using a Panel of 8 X Breakpoints

Probe designation (locus symbol)	Regional assignment	
	Before this study	This study
CR39 (CHR39C)	Xq13-q21 ^a	Xq13.1
p109	X ^b	Xpter-q13.1
2:3, 2:93	Xp11.2-q21.3 ^c	Xp11.2-q13.1
2:6, 2:63, 3:29, 3:49, 3:7	Xp11.2-q21.3 ^c	Xp11.2-q21.1
1:52	Xp11.2-q21.3 ^c	Xq22-qter

^a Davies *et al.* (1991).

^b Wieland *et al.* (1992).

^c Arenstorff *et al.* (1991).



G. 3. Physical mapping panel of the Xq21-q22 region generated by integrating data presented in this study (●) and elsewhere. At the top diagram of the Xq21-q22 region in G-banding is presented. The segment of the X chromosome present in cell lines is indicated by a single line for translocations (tr) and deletions (de); a double line indicates the duplicated region in the cases of a duplication (du). In the lower part of figure the regional location of 40 DNA markers in 20 subregions of the Xq21-q22 region is shown. At the right side, the respective references indicated.

ned by the disruption of the respective disease gene the rearranged X chromosome and by preferential activation of the (gene on the) normal X chromosome. Our present study, clinical symptoms in at least two of it females studied may also be due to the disruption specific genes. First, the X-chromosomal breakpoint patient TDo, who is affected by choroideremia, maps al to the most telomeric portion of the CHM gene t is currently known (Cremers *et al.*, 1990b); thus, chromosome breakage in this patient may affect the proper region of this gene. Cloning of the 5' end of the M gene, which is in progress, and further molecular characterization of this breakpoint should soon clarify s point. Similarly, molecular characterization of the chromosomal breakpoint in patient PMI could be an important step toward the cloning of one of the genes underlying X-linked mental retardation. Further characterization of this X-chromosomal breakpoint using radiation-reduced cell hybrids and YAC technology is in progress.

Recently, Lafreniere *et al.* (1991) reported a physical mapping panel that provided a very detailed map for the Xp11.3-q13.3 region with no less than 12 X breakpoints. Here, we have extended these studies and established a physical mapping panel for the Xq21-q22.1 region. Since, in the Xq21-q22.1 region, this mapping panel is estimated to contain 1 breakpoint per megabase of DNA, it provides an excellent framework for the construction of a YAC contig of this chromosomal region and for the isolation of disease genes located therein. DNA samples from the panel of hybrids described in this study, and individual hybrid cell lines, are available upon request.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the Association Française contre les Myopathies (AFM), by the Ministère de la Recherche et de la Technologie (MRT, grant 89C0835), and by the Netherlands Organization for Scientific Research (NWO). The authors are indebted to

Drs. N. A. Affara, I. Balazs, L. G. Brown, G. A. Bruns, H. J. Cooke, K. E. Davies, P. Edwards, R. P. Kandpal, T. A. Kruse, S. A. Latt, J. L. Mandel, A. M. Michelson, D. C. Page, M. G. Persico, J. R. Riordan, C. A. Sargent, K. Smith, I. Wieland, J. Weissenbach, and B. N. White for supplying DNA probes. We also thank Dr. C. Turleau for establishing hybrid cell line C56N. Drs. J. Andre and B. Noel for supplying blood sample for patients L.G. and S.N., respectively, and S. v. d. Maarel for mapping experiments. Furthermore, we thank M. Franck for technical assistance.

REFERENCES

- Arenstorff, H. P., Kandpal, R. P., Baskaran, N., Parimoo, S., Tanaka, Y., Kitajima, S., Yasukochi, Y., and Weissman, S. (1991). Construction and characterization of a *NotI*-*BsuE* linking library from the human X chromosome. *Genomics* **11**: 115-123.
- Bach, I., Brunner, H. G., Beighton, P., Ruvalcaba, R. H. A., Reardon, W., Pembrey, M. E., van der Velde-Visser, S. D., Bruns, G. A. P., Cremers, C. W. R. J., Cremers, F. P. M., and Ropers, H. H. (1992a). Microdeletions in patients with Gusher-associated, X-linked mixed deafness (DFN3). *Am. J. Hum. Genet.* **51**: 38-44.
- Bach, I., Robinson, D., Thomas, N., Ropers, H. H., and Cremers, F. P. M. (1992b). Physical fine mapping of genes underlying X-linked deafness and non fra(X)-X-linked mental retardation at Xq21. *Hum. Genet.* **89**: 620-624.
- Clarke, C., Tanaka, R. D., Svenson, K., Wamsley, M., Fogelman, A. M., and Edwards, P. A. (1987). Molecular cloning and sequence of a cholesterol-repressible enzyme related to phenyltransferase in the isoprene biosynthetic pathway. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 3138-3146.
- Cremers, F. P. M., van de Pol, T. J. R., Wieringa, B., Hofker, M. H., Pearson, P. L., Pfeiffer, R. A., Mikkelsen, M., Tabor, A., and Ropers, H. H. (1988). Molecular analysis of male-viable deletions and duplications allows ordering of 52 DNA probes on proximal Xq. *Am. J. Hum. Genet.* **43**: 452-461.
- Cremers, F. P. M., van de Pol, D. J. R., Diergaarde, P. J., Wieringa, B., Nussbaum, R. L., Schwartz, M., and Ropers, H. H. (1989a). Physical fine mapping of the choroideremia locus using Xq21 deletions associated with complex syndromes. *Genomics* **4**: 41-46.
- Cremers, F. P. M., van de Pol, D. J. R., Wieringa, B., Collins, F. S., Sankila, E. M., Siu, V. M., Flintoff, W. F., Brunsmann, F., Blonden, L. A. J., and Ropers, H. H. (1989b). Chromosomal jumping from the DXS165 locus allows molecular characterization of four microdeletions and a *de novo* chromosome X/13 translocation associated with choroideremia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 7510-7514.
- Cremers, F. P. M., Sankila, E. M., Brunsmann, F., Jay, M., Jay, B., Wright, A., Pinckers, A., Schwartz, M., van de Pol, D. J. R., Wieringa, B., de la Chapelle, A., Pawlowitzki, I. H., and Ropers, H. H. (1990a). Deletions in patients with classical choroideremia vary in size from 45 to several megabases. *Am. J. Hum. Genet.* **47**: 622-628.
- Cremers, F. P. M., van de Pol, D. J. R., van Kerkhoff, L. P. M., Wieringa, B., and Ropers, H. H. (1990b). Cloning of a gene that is rearranged in patients with choroideremia. *Nature* **347**: 674-677.
- Davies, K. E., Mandel, J. L., Monaco, A. P., Nussbaum, R. L., and Willard, H. F. (1991). Report of the committee on the genetic constitution of the X chromosome. *Cytogenet. Cell Genet.* **58**: 853-966.
- Fusco, J. C., Fennick, R. G., Ledbetter, D. H., and Caskey, C. T. (1983). Deletion and amplification of the HGPRT locus in chinese hamster cells. *J. Mol. Cell. Biol.* **3**: 1086-1096.
- Glass, I. A. (1991). X linked mental retardation. *J. Med. Genet.* **28**: 361-371.
- Greenstein, R. M., Reardon, M. P., and Chan, T. S. (1977). An X;autosome translocation in a girl with Duchenne muscular dystrophy (DMD): Evidence for DMD gene localisation. *Pediatr. Res.* **11**: 475A.
- Jeanpierre, M. (1987). A rapid method for the purification of DNA from blood. *Nucleic Acids Res.* **15**: 22.
- Kaplan, J., Gilgenkrantz, S., Dufier, J. L., and Frezal, J. (1989). Choroideremia and ovarian dysgenesis associated with an X;7 *de novo* balanced translocation. *Cytogenet. Cell Genet.* **51**: 1022.
- Lafreniere, R. G., Brown, C. J., Powers, V. E., Carrel, L., Davies, K. E., Barker, D. F., and Willard, H. F. (1991). Physical mapping of 60 DNA markers in the p21.1-q21.3 region of the human X chromosome. *Genomics* **11**: 352-363.
- Mandel, J. L., Monaco, A. P., Nelson, D. L., Schlessinger, D., and Willard, H. F. (1992). Genome analysis and the human X chromosome. *Science* **258**: 103-109.
- Mattei, M. G., Mattei, J. F., Ayme, S., and Giraud, F. (1982). X-Autosome translocations: Cytogenetic characteristics and their consequences. *Hum. Genet.* **61**: 295-309.
- Neri, G., Chiurazzi, P., Arena, F., Lubs, H. A., and Glass, I. A. (1992). XLMR GENES: Update 1992. *Am. J. Med. Genet.* **43**: 373-382.
- Pontecorvo, G. (1975). Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethylene glycol treatment. *Somatic Cell Genet.* **1**: 503-517.
- Sarto, G. E., Therman, E., and Patau, K. (1973). X inactivation in man: A woman with t(Xq-;12q+). *Am. J. Hum. Genet.* **25**: 262-270.
- Siu, V. M., Gonder, J. R., Jung, J. H., Sergovich, F. R., and Flintoff, W. R. (1990). Choroideremia associated with an X-autosomal translocation. *Hum. Genet.* **84**: 459-464.
- Téboul, M., Mujica, P., Chéry, M., Léotard, B., and Gilgenkrantz, S. (1989). Translocations X-Autosomes équilibrées et retard mental. Contribution à la cartographie des retards mentaux liés à l'X (à l'exclusion de l'X FRA). *J. Genet. Hum.* **37**: 179-195.
- Therman, E., Laxova, R., and Susman, B. (1990). The critical region on the human Xq. *Hum. Genet.* **85**: 455-461.
- Verellen, C., Meyer, R., de Freund, M., Laterre, C., and Scholberg, B. (1977). Progressive muscular dystrophy of the Duchenne type in a young girl associated with an aberration of chromosome X. Fifth International Congress of Birth Defects, p. 42, Excerpta Medica, Amsterdam.
- Wieland, I., Böhm, M., and Bogatz, S. (1992). Isolation of DNA sequences deleted in lung cancer by genomic difference cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 9705-9709.

MATERIEL
ET
METHODES

I) CULTURE CELLULAIRE

A) MILIEUX DE CULTURE

* Milieu de culture I :

- RPMI 1640
- SVF (sérum de veau foetal) 15%
- kanamycine 50 µg/ml

* Milieu de culture II (HAT) :

- RPMI 1640
- SVF 20%
- kanamycine 50mg/ml
- Hypoxanthine 10^{-4} M
- Aminoptérine $4 \cdot 10^{-7}$ M
- Thymidine $1,6 \cdot 10^{-5}$ M
- Ouabaine 10^{-6} M
- Glycine $3 \cdot 10^{-6}$ M

* Milieu de congélation :

- milieu de culture I
- DMSO (diméthyl-sulfoxyde) 12%
- plasmagel glucosé désodé 30% (Labo. R. Bellon)

Rq : les cellules adhérentes peuvent être décollées du support par action de la trypsine pure (DIFCO, bacto trypsin). Quelques gouttes de trypsine sont déposées sur le tapis de cellules adhérentes. Au bout de quelques minutes, les cellules se décrochent. Elles sont récoltées par aspiration puis lavées avec du sérum physiologique. Le culot cellulaire est récupéré par centrifugation pendant 5 min à 1200 RPM.

B) ETABLISSEMENT D'UNE LIGNEE LYMPHOBLASTOIDE

Les lymphocytes B sont transformés en cellules lymphoblastoïdes sous l'action du virus Epstein-Barr (EBV).

Préparation du virus EBV

On utilise la lignée lymphoblastoïde B95.8 de singe Marmouset (Miller et Lipman, 1973) productrice de virus EBV non pathogène. Cette lignée nous a été fournie par Généthon (Evry - France). Une culture en phase exponentielle de croissance est entretenue pendant 10 jours dans du milieu de culture pauvre en SVF (RPMI contenant 5% de SVF). Dans ces conditions défavorables, les cellules produisent un grand nombre de particules virales. Pour extraire les virus, on fait subir un choc thermique aux cellules : elles sont placées à -80°C pendant au moins 24 heures puis décongelées rapidement à 37°C . Après une centrifugation pendant 30 min à 5000 RPM, le surnageant est filtré sur une membrane de porosité $0,45\ \mu\text{m}$ afin d'éliminer les débris cellulaires. La solution de virus est conservée à -80°C dans le milieu de culture.

Transformation lymphoblastoïde

Une lignée lymphoblastoïde est établie à partir de 10 à 20 ml de sang veineux prélevé sur "héparine-lithium". Le sang est dilué avec du sérum physiologique (1 volume de sang pour un volume de sérum physiologique) puis déposé délicatement sur un volume égal de milieu de séparation des lymphocytes (MSL). Après une centrifugation pendant 20 min à 2000 RPM à température ambiante, l'anneau lympho-monocytaire est recueilli à l'interface entre le MSL et le plasma. Les cellules sont lavées deux fois dans du milieu de culture I. Une moitié du culot cellulaire est congelée à -196°C dans l'azote liquide dans un milieu de cryoconservation. L'autre moitié est mise en culture dans 5 ml de milieu de culture I (à raison de 10^6 cellules par ml) contenant une goutte de phytohémaglutinine. Le lendemain, 1 ml de solution de virus Epstein-Barr est ajouté à la culture. Les lymphocytes B subissent une transformation blastique et prolifèrent alors de façon continue après 15 à 30 jours.

C) REALISATION D'HYBRIDES SOMATIQUES INTERSPECIFIQUES

La technique décrite par Pontecorvo (1975) est basée sur l'utilisation du polyéthylèneglycol (PEG).

Lignées cellulaires utilisées :

- lignées lymphoblastiques porteuses de t(X;A), cellules en suspension cultivées dans le milieu I,
- lignée de hamster RJK88 (Fusco et al., 1983), cellules adhérentes cultivées dans le milieu I.

Jour J-1: On stimule les cultures en changeant le milieu ou en divisant les boîtes si celles-ci sont à confluence.

Jour J : Les cellules sont récoltées (après décollement par action de la trypsine pour les cellules de rongeur) puis lavées dans du milieu I. Après centrifugation 5 mn à 1200 RPM, le surnageant est éliminé.

Les cellules de hamster et les cellules humaines sont remises en suspension dans le même tube (environ deux fois plus de cellules humaines) puis centrifugées 5 min à 1200 RPM. Après élimination du surnageant, on ajoute :

- au temps 0 : 0,3 ml PEG 1000 (50% m/v dans du milieu I) à 37°C,
- au temps 1 min : 0,5 ml de milieu de culture I,
- au temps 3 min : 1 ml de milieu de culture I ,
- au temps 7 min : 2 ml " " " " ,
- au temps 11 min : 4 ml " " " " .

On centrifuge alors 5 min à 800 RPM. Le culot de cellules est remis en suspension dans 10 ml de milieu de culture I. Les cellules sont réparties dans 10 boîtes de culture contenant 5 ml de milieu de culture I et placées à l'étuve à 37°C, 5% de CO₂.

Jour J+1 : remplacer le milieu par 5 ml de milieu de culture II (HAT)

Par la suite, le milieu HAT est changé régulièrement (tous les 4 à 5 jours).

Au bout de 2 à 3 semaines, des clones de cellules hybrides apparaissent. On récupère chaque clone avec une pipette après décollement par action de la trypsine. Après dissociation du clone, les cellules hybrides sont remises en culture dans du milieu HAT.

Dès que les cellules hybrides sont confluentes, la culture est divisée en plusieurs boîtes.

D) CONGELATION

Après avoir changé le milieu de culture la veille, on récolte les cellules par centrifugation 5 min à 1200 RPM. Le culot cellulaire est remis en suspension dans quelques millilitres de milieu de congélation froid (4°C) et réparti dans des tubes de cryoconservation (1 ml/tube). La congélation se fait de façon progressive: 1 heure à -20°C, 24 heures à -80°C et enfin dans l'azote liquide à -196°C.

Lors d'une utilisation ultérieure des différentes lignées, la décongélation doit être rapide. Un lavage immédiat des cellules, pour éliminer le DMSO toxique, est effectué avec du sérum physiologique avant la mise en culture.

II) TECHNIQUES CYTOGENETIQUES

A) REALISATION DE CARYOTYPES EN METAPHASE.

Technique cytogénétique classique

- blocage des cellules en métaphase par action de la colchicine (0,01 µg/ml) pendant 1 h,
(les cellules hybrides étant des cellules adhérentes, elles sont décollées du support avant le choc hypotonique)
- gonflement des cellules par un choc hypotonique dans du KCl 0,075 M à 37°C pendant 15 min,
- fixation de la suspension cellulaire par le liquide de Carnoy (3 volumes d'éthanol/1 volume d'acide acétique) pendant 10 min (l'opération est répétée 3 fois).
- étalement des mitoses sur des lames dégraissées,
- coloration des chromosomes.

L'idiogramme des 8 t(X;A) réalisé sur des chromosomes en métaphase est présenté en bandes GTG (bandes G, Trypsine, Giemsa) (Seabright, 1971).

Les chromosomes des métaphases d'hybrides somatiques interspécifiques sont montrés en bandes QFQ (bandes Q, Fluorescence, Quinacrine) (Caspersson et al., 1970).

B) REALISATION DE CARYOTYPES EN PROMETAPHASE

Obtention de prométaphases par technique de synchronisation (Yunis, 1976).

- stimuler la culture en renouvelant le milieu de culture I tous les jours pendant 5 jours consécutifs.
- Jour J-1: synchroniser les cellules (blocage en phase S du cycle cellulaire) par un apport du méthotrexate 10^{-7} M (50 ng/ml) pendant 17 heures.
- Jour J : après deux lavages avec du milieu de culture I, ajouter 10 μ g de BrdU (5-bromodéoxyuridine) par ml de milieu de culture I.

On débute la technique cytogénétique classique 5 heures 30 après l'ajout de BrdU. Les chromosomes en bandes RBG (bandes R, BrdU, Giemsa) sont colorés par la technique FPG (Fluorescence Plus Giemsa) (Perry et Wolff, 1974). L'incorporation de BrdU s'effectue donc au niveau des bandes G à réplication tardive, les bandes R seront donc foncées après une coloration au Giemsa. A l'inverse, l'X inactif à réplication tardive apparaîtra despiralisé et pâle du fait de l'incorporation massive de BrdU.

Les techniques de bandes sont réalisées selon les protocoles décrits par Dutrillaux et Couturier (1981).

III) TECHNIQUES MOLECULAIRES

A) AMPLIFICATION DES SONDDES

Les sondes sont des fragments d'ADN humain (ou insert) de quelques centaines de bases à quelques kb clonés dans un plasmide (pBR322, pUC9...) qui porte un gène de résistance à un antibiotique.

1) Transformation des bactéries compétentes par un plasmide

Les bactéries (HB101, DH5) sont rendues compétentes par un traitement au CaCl₂ (Sambrook et al., 1989 page 1.82).

2) Préparation d'ADN plasmidique

Les "minipréparations" d'ADN plasmidique sont réalisées par lyse alcaline (Sambrook et al., 1989 page 1.25).

3) Purification de fragments d'ADN

Le plus souvent, seul le fragment humain contenu dans un clone recombinant est utilisé comme sonde pour l'analyse de l'ADN selon la méthode de Southern.

L'insert est libéré de son vecteur par digestion à l'aide de (des) l'enzyme(s) de restriction appropriée(s). Les produits de digestion sont séparés par une électrophorèse dans un gel contenant 0,7% (m/v) d'agarose à bas point de fusion dans du tampon TBE 1X (TBE 10X : tris base 0,89 M, acide borique 0,89 M et EDTA 0,01M ; pH 8,2). Quand le vecteur et l'insert humain sont bien séparés, la bande correspondant à l'insert est découpée sous UV puis récupérée dans un tube stérile. L'agarose à bas point de fusion est dilué avec de l'eau distillée (1 volume d'agarose + 3 volumes d'eau). L'insert dans l'agarose dilué est prêt à l'emploi pour l'incorporation de ³²P (isotope radioactif de l'atome de phosphore) par élongation d'amorces.

B) EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE TOTAL

Nous avons utilisé la méthode décrite par Jeanpierre (1987).

Les cellules (lymphoblastes humains, cellules de hamster ou cellules hybrides), après trypsination éventuelle, sont récoltées par centrifugation 5 mn à 1200 RPM. Après élimination du surnageant, le culot cellulaire est repris dans 7 ml de guanidine 6 M + 0,5 ml d'acétate d'ammonium 7,5 M puis agité pendant 1 heure à température ambiante. Puis sont ajoutés la protéinase K à 100 µg/ml et 1 ml de sarcosyl 10% (m/v), le tout est placé 1 heure à 60°C sous agitation douce. Après refroidissement, 2,5 volumes d'éthanol absolu froid sont ajoutés. L'ADN précipité est alors récupéré et lavé deux fois dans de l'éthanol absolu. Après évaporation de l'éthanol, l'ADN est resuspendu dans un volume adéquat de tampon TE 10:1 (Tris 10 mM, EDTA 1 mM ; pH 7,5). La concentration en ADN est estimée par mesure de la densité optique (DO) à 260 nm. Pour détecter une éventuelle contamination protéique, on effectue une seconde mesure de DO à 280 nm. Un ADN de bonne qualité doit avoir un rapport DO₂₆₀/DO₂₈₀ compris entre 1,7 et 2.

C) PREPARATION DE FRAGMENTS D'ADN MARQUES AU ³²P

1) Marquage de l'ensemble insert et plasmide par "coupure-déplacement"

(Rigby et al., 1977)

Cette méthode est utilisée pour le marquage de l'ADN recombinant circulaire (insert et vecteur).

40 ng de plasmide recombiné sont marqués par incorporation de (α ³²P) dCTP (désoxycytidine 5' triphosphate) (2 µl à 25 µCi/ml, 3000 Ci/mme, Amersham) par la méthode de "coupure-déplacement" ou "nick-translation" selon les instructions du système Boehringer Mannheim. Une chromatographie d'exclusion stérique, sur une colonne Séphadex G50 équilibrée par du SSC 2X, est réalisée pour éliminer les nucléotides non incorporés.

2) Marquage de l'insert par élongation d'amorces

(Feinberg et Vogelstein, 1984).

L'ADN linéaire est dénaturé pour permettre un multi-amorçage au hasard à l'aide d'un mélange d'hexanucléotides synthétiques.

30 ng d'insert sont marqués par incorporation de ($\alpha^{32}\text{P}$) dCTP ($4\mu\text{l}$ à $25\mu\text{Ci/ml}$, 3000 Ci/mmol , Amersham) par multi-amorçage au hasard selon les instructions du système Boehringer Mannheim. Pour les mêmes raisons que précédemment, une chromatographie d'exclusion stérique est réalisée.

D) ANALYSE DE L'ADN PAR LA METHODE DE SOUTHERN

(Southern, 1975)

1) Digestion de l'ADN génomique

$10\mu\text{g}$ d'ADN génomique sont digérés pendant une nuit à l'aide de l'enzyme de restriction adéquate (2 unités d'enzyme de restriction par μg d'ADN) dans les conditions conseillées par le fournisseur (Boehringer Mannheim). Un contrôle de digestion (sur $1\mu\text{g}$ d'ADN) est effectué par électrophorèse sur un gel d'agarose 0,8% dans du tampon TBE 1X.

2) Séparation des fragments d'ADN

L'ADN digéré est déposé sur un gel d'agarose à 0,8% contenant $0,5\mu\text{g/ml}$ de bromure d'éthydiu. L'électrophorèse est réalisée sous une tension de 2 à 4 V par cm de gel dans du tampon TAE 1X (TAE 10X : Tris base 0,4 M, acide acétique glacial 1,14% (v/v) et EDTA 10 mM ; pH 7,2).

En fin de séparation, le gel est observé sur une table UV. Les distances de migration des différents fragments du marqueur de taille ($\lambda/\text{HindIII}$) sont mesurées.

3) Transfert de l'ADN sur membrane de nylon

Le gel est plongé dans une solution dénaturante de soude 0,4 N pendant 30 min. Le transfert de l'ADN devenu simple brin (sb), sur une membrane de nylon Hybond N+ (Amersham) chargée positivement, est assuré par un phénomène de capillarité: les fragments d'ADN sb sont entraînés par la circulation d'une solution de soude 0,4N pendant une durée de 4 heures ; l'ADN sb se fixe sur la membrane par des liaisons électrostatiques.

4) Préhybridation

La membrane de nylon est scellée dans un sac plastique en présence de quelques ml de solution Hybond (NaCl 3M, héparine 50 mg/ml, SDS 1%, sulfate de dextran 50%, ADN de saumon 50 µg/ml), une préhybridation de 2 h à 65°C est réalisée. Le but de la préhybridation est de bloquer, avec de l'ADN de sperme de saumon, tous les sites de la membrane qui ne sont pas liés avec de l'ADN humain. Ceci permet d'éviter toute fixation aspécifique de la sonde sur des sites libres du support.

5) Hybridation

La sonde est dénaturée par chauffage pendant 15 min à 100°C puis refroidie brutalement sur la glace. L'hybridation est réalisée pendant une nuit à 65°C dans la solution Hybond précitée contenant la sonde d'ADN marquée au ^{32}P ($2 \cdot 10^6$ cpm/ml).

Remarque : quand la sonde utilisée contient des séquences répétées, une pré-association avec de l'ADN humain total soniqué (fragmenté par ultrasons) est nécessaire (Litt et White, 1985). Après la chromatographie d'exclusion stérique, la sonde est pré-associée avec un excès d'ADN humain soniqué (100 µg d'ADN humain soniqué pour 40 ng de sonde) pendant 2 heures à 65°C dans la solution suivante : Na_2HPO_4 0,125 M, NaCl 0,25 M, EDTA 1 mM, SDS 7% (m/v), PEG 10% (m/v).

6) Lavages

La membrane de nylon est lavée pour éliminer la sonde fixée de façon aspécifique sur des séquences partiellement homologues.

Classiquement, les différents lavages suivants sont effectués :

- 10 min à 65°C : sous agitation dans du tampon SSC 1X + SDS 0,1%,
- 10 min à 65°C : sous agitation dans du tampon SSC 0,5X + SDS 0,1%,
- 10 min à 65°C : sous agitation dans du tampon SSC 0,1X + SDS 0,1%.

Entre chaque lavage, la radioactivité retenue sur la membrane est mesurée à l'aide d'un compteur Geiger. Le plus souvent, les trois lavages sont effectués. Néanmoins, il arrive que, pour certaines sondes, le lavage avec du SSC 0,1X (ou même SSC 0,5X), trop stringent, ne soit pas réalisé.

7) Autoradiographie

La révélation par autoradiographie est réalisée pendant 1 à 3 jours à -80°C.

E) AMPLIFICATION *in vitro* DE SEQUENCES D'ADN PAR PCR

(Saiki et al., 1985)

Les amplifications par PCR d'une séquence encadrée par deux amorces sont réalisées dans un volume réactionnel de 50 µl à l'aide d'un automate Perkin-Elmer.

La composition standard du mélange réactionnel est la suivante :

- Taq Polymérase : 1 unité,
- dNTP (désoxyribonucléotides triphosphate : dATP, dTTP, dGTP et dCTP) (Boehringer Mannheim) : 100 µM,
- Amorces : 0,25 µg de chacune des deux amorces,
- ADN : 0,5 µg.

Le tampon utilisé est celui fourni par le fournisseur de l'enzyme (Perkin-Elmer et Boehringer Mannheim). Le MgCl₂ a un effet sur la spécificité et le rendement de la réaction d'amplification. La concentration optimale de MgCl₂ peut varier d'un couple d'amorces à l'autre de 0,5 à 10 mM.

Le plus souvent, nous avons suivi les conditions d'amplification (températures et durées des trois étapes pour un cycle d'amplification, nombre de cycles) données dans l'article où est décrit le marqueur.

Dans certains cas, nous avons adapté les conditions d'amplification pour obtenir, avec notre appareil PCR et la Taq polymérase utilisée, des résultats interprétables. Trois paramètres ont été modifiés : la température d'hybridation des amorces, la concentration en $MgCl_2$ et le nombre de cycle d'amplification.

Après PCR, les produits d'amplification sont séparés par électrophorèse (tampon de migration : TBE 1X) sur un gel d'agarose (0,8% à 2%) contenant 0,5 μg de bromure d'éthidium par ml de gel. Ils sont ensuite visualisés sous UV, la taille des produits d'amplification est déterminée grâce à un marqueur de taille.

Les conditions d'amplification pour la recherche des exons 3 et 4 du gène CHM sont les suivantes :

- exon 3 (amorces 708/709) :

Dénaturation : (5 min à 94°C) 1 cycle, amplification : (1 min à 94°C ; 1 min à 54°C ; 2 min à 72°C) 35 cycles et élongation terminale : (5 min à 72°C) 1 cycle.

Concentration en $MgCl_2$ dans le milieu réactionnel : 3 mM.

- exon 4 (amorces 719/739) :

Dénaturation : (5 min à 94°C) 1 cycle , amplification : (1 min à 94°C ; 1 min à 61°C ; 2 min à 72°C) 35 cycles et élongation terminale : (5 min à 72°C) 1 cycle.

Concentration en $MgCl_2$ dans le milieu réactionnel : 3 mM.

F) Marqueurs utilisés dans cette étude

Le tableau IX regroupe l'ensemble des marqueurs de l'X étudiés dans ce travail par Southern ou par PCR. Les informations concernant la plupart des marqueurs utilisés dans cette étude sont disponibles dans le rapport de la commission sur la constitution génétique du chromosome X humain (Mandel et al., 1993). Quand le marqueur n'est pas mentionné dans ce rapport, la référence où est décrit celui-ci est indiquée. Les amorces ainsi que les conditions d'amplification, pour les exons 3 et 4 du gène CHM, sont détaillées car elles ne sont pas encore publiées.

Tableau IX : Marqueurs du chromosome X humain
utilisés dans cette étude

1) Marqueurs étudiés par Southern blot

Marqueurs anonymes avec un symbole "DXS" (ou "DXYS")

Locus	Sonde	Localisation	Référence (1)
DXS3	p19-2	Xq21.3	CCM 92
DXS17	pS9	Xq22	CCM 92
DXS26	pHU16	Xq11-q22	CCM 92
DXS56	pL2.98	Xq13.2-q13.3	CCM 92
DXS72	pX65H7	Xq21.1	CCM 92
DXS73	pX20R42	Xq21.3	CCM 92
DXS87	pA13.RI	Xq21.33-q22	CCM 92
DXS88	pG3-1	Xq21.33	CCM 92
DXS94	pXG-12	Xq22	CCM 92
DXS95	pXG- 7c	Xq21.2-q21.3	CCM 92
DXS96	pXG-3 b	Xq21.3-q22.1	CCM 92
DXS110	p722	Xq21	CCM 92
DXS112	p753	Xq21	CCM 92
DXS118	p776	Xq21.3-q22.1	CCM 92
DXS111	p733	Xq22.3	CCM 92
DXS121	p784	Xq21	CCM 92
DXS128	cX65.3	Xq13.2	CCM 92
DXS131	cpX21	Xq13.1	CCM 92
DXS132	cpX23	Xq12	CCM 92
DXS135	cpX93	Xq12	CCM 92
DXS153	cX37.1	Xq12	CCM 92
DXS159	cpX289	Xq12	CCM 92
DXS165	p1bD5	Xq21.1-q21.2	CCM 92
DXS171	pX63C	Xq13-q21.1	CCM 92
DXS211	pD3	Xq22	CCM 92
DXS214	pPA20	Xq21	CCM 92
DXS227	p1bB4	Xq13.1	CCM 92
DXS232	pJL68	Xq21.1-q21.2	CCM 92
DXS326	pQST38M1	Xq13-q21.1	CCM 92
DXS349	pRX98H3	Xq13-q21.2	CCM 92
DXS540	pZ11c	Xq21.1-q21.3	CCM 92
DXYS1X	pDP34	Xq21.31	CCM 92
DXYS5X	47b	Xq21	CCM 92
DXYS7X	13d	Xq13-q22	CCM 92
DXYS12X	st25-2	Xq21.31-q21.33	CCM 92
DXYS13X	pTAK2	Xq21.3	CCM 92
DXYS31X	GMGXY5	Xq13-q24	CCM 92
DXYS32X	GMGXY6	Xq13-q24	CCM 92
DXYS34X	GMGXY8	Xq13-q24	CCM 92
DXYS35X	GMGXY9	Xq13-q24	CCM 92
DXYS42X	pDP307	Xq13-q21	CCM 92

Gènes

Locus	Sonde	Localisation	Référence
CHM (choroïdérémie)	ADNc partiels T110 FB25	Xq21.2 Xq21.2	Cremers et al., 1990b van Bokhoven et al., soumis
CHR39C (cholesterol repressible protein 39C)	39C	Xq13-q21	CCM 92
PGKP1 (phosphoglycérate kinase, pseudo- gène 1)	pHPGK7-e	Xq11.2-q12	CCM 92
PGK1 (phosphoglycérate kinase, gène 1)	pHPGK7-e	Xq13.3	CCM 92
XIST (X inactive-specific transcript)	14A	Xq13.2	CCM 92

Marqueurs anonymes dépourvus de symbole "DXS"

Locus	Sonde	Localisation	Référence
-	pF1	Xq21.33	Bach et al., 1992b
-	pF8	Xq21.33	Bach et al., 1992b
-	pXG8b	Xq21	Bach et al., 1992b
-	p109	X	Wieland et al., 1992
-	1:52	Xp11.2-q21.3	Arenstorf et al., 1991
-	2:3	Xp11.2-q21.3	Arenstorf et al., 1991
-	2:6	Xp11.2-q21.3	Arenstorf et al., 1991
-	2:63	Xp11.2-q21.3	Arenstorf et al., 1991
-	2:93	Xp11.2-q21.3	Arenstorf et al., 1991
-	3:29	Xp11.2-q21.3	Arenstorf et al., 1991
-	3:49	Xp11.2-q21.3	Arenstorf et al., 1991
-	3:7	Xp11.2-q21.3	Arenstorf et al., 1991

1) CCM92 : Chromosome Coordinating Meeting (1992), Mandel et al., 1993.

2) Marqueurs étudiés par PCR

Locus	Amorces	Localisation	Référence
TBG (thyroxine-binding globulin)	C/D exon 2	Xq21-q22	CCM 92 Yamamori et al., 1991
DXS453	Mfd66	Xp11.23-q21.1	Weber et al., 1990
DXS454	Mfd72	Xq21.1-q23	CCM 92
DXS456	XG30B	Xq21-q22	CCM 92
DXS458	Mfd79	Xq21.1-q23	CCM 92
DXS566	1:5'/2:5' (HX60)	Xq13	Porteus et al., 1992
DXS571	pHX79 B1/B2	Xq21.1-q21.3	Curtis et al., 1992
DXS983	AFM078za1	X	CCM 92
DXS986	AFM116xg1	X	CCM 92
DXS988	AFM123xd4	X	CCM 92
DXS990	AFM136yc7	X	CCM 92
DXS991	AFM151xf6	X	CCM 92
DXS995	AFM207zg5	X	CCM 92
DXS1000	AFM248te9	X	CCM 92
DXS1002	AFM249vh5	X	CCM 92

1) CCM92 : Chromosome Coordinating Meeting (1992), Mandel et al., 1993.

Oligonucléotides utilisés lors de la caractérisation
du point de cassure sur l'X chez la patiente T.Do.

Locus	Amorces	Localisation	Référence
CHM	708/709	Exon 3 du gène CHM	van Bokhoven et al., soumis
CHM	719/739	Exon 4 du gène CHM	van Bokhoven et al., soumis

Exon	Oligonucléotide (5' --> 3')	Orientation	Code	Taille (pb)
3	TTgATgAAgATCAGTgAATTg	Sens	708	179
3	CAAAGCAAATTA AAAggTCAG	Antisens	709	
4	TTgCATgTTTCACACTgCCCAC	Sens	719	222
4	AgTCATTAATTTAgTTTACCTgCAG	Antisens	739	

IV) CYTOGENETIQUE MOLECULAIRE

Hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)

La détection des chromosomes humains contenus dans les hybrides somatiques interspécifiques est réalisée par FISH. Deux sondes sont utilisées :

- ADN génomique total (46,XX) humain,
- séquences dérivées du chromosome X humain. Nous avons utilisé la sonde "X total" XB10TT (Cambio - BIOSYS, Compiègne France).

La technique FISH avec l'ADN génomique total est réalisée selon le protocole décrit par Pinkel et al. (1986) avec quelques modifications. Pour la sonde "X total", nous appliquons le protocole conseillé par Cambio.

Les métaphases hybrides sont obtenues par une technique cytogénétique standard.

1) Préparation des lames

- Traitement des lames par la RNase

Les lames sont plongées dans une solution à 37°C de SSC 2X contenant 0,1 mg/ml de ribonucléase pancréatique. Elles sont ensuite rincées pendant 2 min dans un bain de SSC 2X à température ambiante.

- Déshydratation des lames

Les lames sont plongées successivement pendant 2 min dans des bains d'éthanol à 70% , 85% et 100% (préparé à partir d'éthanol absolu à 96°) à température ambiante. Les lames sont ensuite séchées à l'air libre.

2) Marquage de la sonde

10 µg d'ADN génomique total sont digérés par l'enzyme de restriction EcoR1 selon les instructions du fournisseur (Boehringer Mannheim). La digestion est contrôlée en déposant une fraction (1/10 du volume initial) sur un gel d'agarose 0,8%. L'ADN digéré est marqué par incorporation de biotine-16-

dUTP (Boehringer Mannheim) à l'aide d'un kit de coupure-déplacement (Rigby et al., 1977) selon les instructions du fournisseur (Boehringer Mannheim). Une chromatographie d'exclusion stérique (sur Séphadex G50) est réalisée pour éliminer les nucléotides marqués non incorporés. L'ADN génomique marqué est ensuite précipité (Sambrook et al., 1989) puis remis en suspension dans du tampon d'hybridation (50% formamide, 0,1% SDS, Denhardt's 1X) (Denhardt's 1X : 1% (m/v) Ficoll 400, 1% (m/v) polyvinylpyrrolidone, 1% (m/v) albumine de sérum de bovin).

3) Dénaturation de la sonde et des chromosomes métaphasiques

- sonde

L'ADN génomique total (marqué par la biotine-16-dUTP), en solution dans le tampon d'hybridation, est dénaturé pendant 2 min à 70°C puis refroidi rapidement et conservé sur la glace jusqu'à l'hybridation.

- chromosomes métaphasiques

Les lames sont plongées dans une solution de SSC 2X (pH 7) contenant 70% de formamide à 70°C pendant 10 min. Elles sont ensuite refroidies rapidement par immersion dans un bain de SSC 2X à 4°C. Ensuite, les lames sont déshydratées dans des bains d'éthanol (70%, 85% et 100%) et séchées à l'air libre.

4) Préhybridation

Il n'est pas nécessaire de procéder à une préhybridation avec la sonde d'ADN génomique total lors d'une HIS directe (ADN humain sur une métaphase hybride). Par contre, avec la sonde de l'X (XB10TT, Cambio), une préhybridation est réalisée pendant 1 heure à 37°C pour bloquer les séquences répétées de l'X humain qui pourraient s'hybrider sur les autosomes humains contenus dans l'hybride somatique.

5) Hybridation

100 ng d'ADN génomique total marqué sont déposés sur la lame qui est ensuite recouverte d'une lamelle en verre. Les lames sont incubées dans une chambre humide à 42°C pendant une nuit.

6) Lavages

Les lavages sont réalisés à 37°C pendant 2 min dans les bains suivants :

- SSC 2X (pH 7) 50% formamide,
- SSC 2X (pH 7),
- Tampon BN1 (bicarbonate de sodium 0,1M, 0,05% (m/v) Nonidet P-40 ;pH 8).

Au delà de cette étape, les lames devront toujours être humides

7) Détection immunologique du signal

100 µl de tampon BN2 (tampon BN1 contenant 5% (m/v) de lait en poudre qui empêche une fixation aspécifique des anticorps (Ac) utilisés par la suite) sont déposés sur chaque lame. Les lames sont recouvertes d'un fragment de Parafilm^R et incubées 5 min à température ambiante.

Le Parafilm^R est enlevé et l'excès de liquide est éliminé.

100 µl d'une solution, à 3 µg d'avidine fluorescéinée (Vector Laboratories) par ml de tampon BN2, sont déposés sur chaque lame qui est recouverte d'un fragment de Parafilm^R et incubée à 37°C pendant 20 min. Afin d'éliminer l'avidine marquée non fixée sur la biotine, 3 lavages de 3 min sont réalisés à 37°C dans du tampon BN1.

Le signal fluorescent peut être amplifié par deux incubations (20 min à 37°C) successives avec d'abord un Ac anti-avidine biotinylé (Vector Laboratories) (5 µg/ml de tampon BN2) puis l'avidine fluorescéinée (3 µg/ml de tampon BN2). A nouveau, 3 lavages de 3 min sont réalisés à 37°C dans du tampon BN1.

Après avoir drainé l'excès de liquide, la lame est incubée avec 100 µl d'une solution à 0,5 mg/ml d'iodure de propidium pendant 5 min à température ambiante. Un rinçage est ensuite effectué dans du tampon PBS 1X (NaH₂PO₄ 0,2M, Na₂HPO₄ 0,2M et NaCl 0,13 M).

Pour éviter l'extinction de la fluorescence, il est nécessaire de déposer sur la lame 100 µl d'une solution de Tris 0,12 M (pH 8,5) contenant 12% (m/v) de polyvinyl alcool 40000.

8) Microscopie

Les lames sont observées à l'aide d'un microscope à fluorescence (ZEISS, AXIOPHOT). La sonde apparaît en jaune (la fluorescéine émet à 520 nm) et la contre-coloration par l'iodure de propidium ($\lambda_e = 580$ nm) visualise l'ensemble des chromosomes en rouge. Les deux émissions sont observées simultanément à l'aide d'un filtre combinaison (FT 510). Les mitoses sélectionnées sont ensuite photographiées sur une pellicule Ektachrome 400 ASA (Kodak).

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, Dubnik M, Polymeropoulos MH, Xiao H, Merrill CR, Wu A, Olde B, Moreno RF, Kerlavage AR, McCombie WR and Venter JC (1991). Complementary DNA sequencing: Expressed sequence tags and human genome project. *Science* **252**:1651-1656.

Aerssens J, Chaffanet M, Baens M, Matthijs G, van den Berghe H, Cassiman JJ and Marynen P (1994). Regional assignment of seven loci to 12p13.2-pter by PCR analysis of somatic cell hybrids containing the der(12) or the der(X) chromosome from a mesothelioma showing t(X;12) (q22;p13). *Genomics* (in press).

Andres DA, Seabra MC, Brown MS, Armstrong SA, Smeland TE, Cremers FPM and Goldstein JL (1993). cDNA cloning of component A of Rab geranylgeranyl transferase and demonstration of its role as a Rab escort protein. *Cell* **73**:1091-1099.

Arenstorff HP, Kandpal RP, Baskaran N, Parimoo S, Tanaka Y, Kitajima S, Yasukochi Y and Weissman S (1991). Construction and characterization of a NotI-BsuE linking library from the human X chromosome. *Genomics* **11**:115-123.

Bach I, Brunner HG, Beighton P, Ruvalcaba RHA, Reardon W, Pembrey ME, van der Velde-Visser SD, Bruns GAP, Cremers CWRJ, Cremers FPM and Ropers HH (1992a). Microdeletions in patients with gusher-associated, X-linked mixed deafness (DFN3). *Am. J. Hum. Genet.* **51**:38-44.

Bach I, Robinson D, Thomas N, Ropers HH and Cremers FPM (1992b). Physical fine mapping of genes underlying X-linked deafness and non fra(X)-X-linked mental retardation at Xq21. *Hum. Genet.* **89**:620-624.

Baldini A, Ross M, Nizetic D, Vatcheva R, Lindsay EA, Lehrach H and Siniscalco M (1992). Chromosomal assignment of human YAC clones by fluorescence *in situ* hybridization: Use of single-yeast-colony PCR and multiple labeling. *Genomics* **14**:181-184.

Ballabio A (1993). The rise and fall of positional cloning? *Nature Genet.* **3**:277-279.

Barski G, Sorieul S and Cornefert F (1960). Production, dans des cultures *in vitro* de deux souches cellulaires en association, de cellules de caractère "hybride". *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **251**:1825-1827.

Bawle E, Tyrkus M, Lipman S and Bozimoski D (1984). Aarskog syndrome : full male and female expression associated with an X-autosome translocation. *Am. J. Med. Genet.* **17**:595-602.

Bell J and Haldane JBS (1937). The linkage between the genes for color blindness and haemophilia. *Proc. Roy. Soc. London B* **123**:119-150.

Bentley-Lawrence J, Carter KC and Gerdes MJ (1992). Extending the capacities of interphase chromatin mapping. *Nature genet.* **2**:171-172.

Bernard LE, McPherson JD, Wasmuth JJ, Kreklywich CN, Brzustowicz LM and Wood S (1993). Linkage mapping detects two secondary microdeletions in cell hybrid HHW1064, used to isolate DNA probes from within 5q11.2 -> q13.3. *Cytogenet. Cell Genet.* **64**:46-48.

Bitoun P, Philippe C, Chery M, Mulcahy MT and Gilgenkrantz S (1992). Incontinentia pigmenti (TYPE 1) and X;5 translocation. *Ann. Genet.* **35**:51-54.

Bobrow M and Cross J (1974). Differential staining of human and mouse chromosomes in interspecific cell hybrids. *Nature* **251**:77-79.

Bodrug SE, Holden JJA, Ray PN and Worton RG (1991). Molecular analysis of X-autosome translocations in females with Duchenne muscular dystrophy. *EMBO J.* **10**:3931-3939.

Botstein D, White RL, Skolnick M and Davis RW (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* **32**:314-331.

Boyd Y, Cockburn D, Holt S, Munro E, van Ommen GL, Gillard B, Allara N, Ferguson-Smith M and Craig I (1988). Mapping of 12 translocation breakpoints in the Xp21 region with respect to the locus of Duchenne muscular dystrophy. *Cytogenet. Cell Genet.* **48**:28-34.

Breen M, Arveiler B, Murray I, Godsen JR and Porteous DJ (1992). YAC mapping by FISH using Alu-PCR-generated probes. *Genomics* **13**:726-730.

Brown CJ, Ballabio A, Rupert JL, Lafreniere RG, Grompe M, Tonlorenzi R and Willard HF (1991). A gene from the region of the human X inactivation center is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature* **349**:38-44.

Burke DT, Carle GF and Olson MV (1987). Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vector. *Science* **236**:806-812.

Cannizaro LA and Hecht F (1987). Gene for incontinentia pigmenti maps to band Xp11 with an (X;10) (p11;q22) translocation. *Clin. Genet.* **32**:66-69.

Caspersson T, Zech L and Johnsson C (1970). Differential banding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp. Cell Res.* **60**:315-319.

Chelly J, Tümer Z, Tonnesen T, Petterson A, Ishikawa-Brush Y, Tommerup N, Horn N and Monaco AP (1993). Isolation of a candidate gene for Menkes disease that encodes a potential heavy metal binding protein. *Nature Genet.* **3**:14-19.

Chumakow I, Rigault P, Guillou S et 33 collaborateurs (1992). Continuum of overlapping clones spanning the entire human chromosome 21q. *Nature* **359**:380-386.

Collins FS (1992). Positional cloning: Let's not call it reverse anymore. *Nature genet.* **1**:3-6.

Cooper CS, Park M, Blair DG, Tainsky MA, Huebner K, Croce CM and van de Woude GF (1984). Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature* **311**:29-33.

Cooper DN, Smith BA, Booke HJ, Niemann S and Schmidtke J (1985). An estimate of unique DNA sequence heterozygosity in the human genome. *Hum. Genet.* **69**:201-205.

Cox DR, Burmeister M, Price ER, Kim S and Myers RM (1990). Radiation hybrid mapping: a somatic cell genetic method for constructing high-resolution maps of mammalian chromosomes. *Science* 250:245-250.

Cremers FPM, van de Pol TJR, Wieringa B, Hofker MH, Pearson PL, Pfeiffer RA, Mikkelsen M, Tabor A and Ropers HH (1988). Molecular analysis of male-viable deletions and duplications allows ordering of 52 DNA probes on proximal Xq. *Am. J. Hum. Genet.* 43:452-461.

Cremers FPM, van de Pol DJR, Diergaarde PJ, Wieringa B, Nussbaum RL, Schwartz M and Ropers HH (1989). Physical fine mapping of the choroideremia locus using Xq21 deletions associated with complex syndromes. *Genomics* 4:41-46.

Cremers FPM, Sankila EM, Brunsmann F, Jay M, Jay B, Wright A, Pinckers A, Schwartz M, van de Pol DJR, Wieringa B, de la Chapelle A, Pawlowitzki IH and Ropers HH (1990a). Deletions in patients with classical choroideremia vary in size from 45 to several megabases. *Am. J. Hum. Genet.* 47:622-628.

Cremers FPM, van de Pol DJR, van Kerkhoff LPM, Wieringa B and Ropers HH (1990b). Cloning of a gene that is rearranged in patients with choroideremia. *Nature* 347:674-677.

Cremers FPM, Molloy CM, van de Pol DJR, van den Hurk AJM, Bach I, Geurts van Kessel AHM and Ropers HH (1992). An autosomal homologue of the choroideremia gene colocalizes with the Usher syndrome type II locus on the distal part of the chromosome 1q. *Hum. Mol. Genet.* 1:71-75.

Croce C (1976). Loss of mouse chromosomes in somatic cell hybrids between HT-1080 human fibrosarcoma cells and mouse peritoneal macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:3248-3252.

Curtis ARJ, Roustan P, Kamakari S, Thiselton D, Lindsay S and Bhattacharya SS (1992). Two dinucleotide repeat polymorphisms at the DXS571 locus. *Hum. Mol. Genet.* 1:776.

Cuticchia AJ, Fasman KH, Kinsbury DT, Robbins RJ and Pearson PL (1993). The GDBTM human genome data base anno 1993. *Nucleic Acids Res.* 21:3003-3006.

Davies K (1991). The essence of inactivity. *Nature* 349:15-16.

Dear PH and Cook PR (1993). Happy mapping: linkage mapping using a physical analogue of meiosis. *Nucleic Acids Res.* 21:13-20.

Desmaze C, Zucman J, Delattre O, Thomas G and Aurias A (1992). In situ Hybridization of PCR Amplified Inter-Alu Sequences from a Hybrid Cell Line. *Hum. Genet.* 88:541-544.

Dietz-Band JN, Turco AE, Willard HF, Vincent A, Skolnick MH and Barker DF (1990). Isolation, characterisation, and physical localization of 33 human X-chromosome RFLP markers. *Cytogenet. Cell Genet.* 54:137-141.

Donis-Keller H et 32 collaborateurs (1987). A genetic linkage map of the human genome. *Cell* 51:319-337.

- Dorin JR, Emslie E, Hanratty D, Farrall M, Gosden J and Porteous DJ (1992). Gene targeting for somatic cell manipulation: rapid analysis of reduced chromosome hybrids by Alu-PCR fingerprinting and chromosome painting. *Hum. Mol. Genet.* 1:53-59.
- Drwina HL, Toji LH, Kim CH, Greene AE and Mulivor RA (1993). NIGMS human/rodent somatic cell hybrid mapping panels 1 and 2. *Genomics* 16:311-314.
- Du Sart D, Kalitsis P and Schmidt M (1992). Noninactivation of a portion of Xq28 in a balanced X-autosome translocation. *Am. J. Med. Genet.* 42:156-160.
- Dubois BL and Naylor SL (1993). Characterization of NIGMS human/rodent cell hybrid mapping panel 2 by PCR. *Genomics* 16:315-319.
- Dutrillaux B and Couturier J (1981). *La pratique de l'analyse chromosomique. (Techniques de laboratoire)* Masson Paris 12 86.
- Ege T and Ringertz NR (1974). Preparation of microcells by enucleation of micronucleate cells. *Exp. Cell Res.* 87:378-382.
- Ellison J, Passage M, Lo-Chung Y, Yen P, Mohandas TK and Shapiro L (1992). Directed isolation of human genes that escape X inactivation. *Somat. Cell Mol. Genet.* 18:259-268.
- Farr JC, Stevanovic M, Thomson EJ, Goodfellow PN and Cooke HJ (1992). Telomere-associated chromosome fragmentation: applications in genome manipulation and analysis. *Nature Genet.* 2:275-282.
- Feinberg AP and Vogelstein B (1984). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 137:266-267.
- Flejter W, Barcroft CL, Guo SW, Lynch ED, Boehnke M, Chandrasekhappa S, Collins FS, Weber BL and Glover TW (1993). Multicolor FISH mapping with Alu-PCR-amplified YAC clone DNA determines the order of markers in the BRCA1 region on chromosome 17q12-q21. *Genomics* 17:624-631.
- Foote S, Vollrath D, Hilton A and Page DC (1992). The human Y chromosome: overlapping DNA clones spanning the euchromatic region. *Science* 258:60-66.
- Fournier REK and Ruddle FH (1977). Microcell-mediated transfer of murine chromosomes into mouse, chinese hamster and human somatic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:6349-6353.
- Francke U, Holmes L, Atkins L and Riccardi V (1979). Aniridia-Wilms' tumor association: evidence for specific deletion of 11p13. *Cytogenet. cell genet.* 24:185-192.
- Franco B, Guioli S, Pragliola A, Incerti B, Bardoni B, Tonlorenzi R, Carrozzo R, Maestrini E, Pieretti M, Taillon-Miller P, Brown CJ, Willard HF, Lawrence C, Persico MG, Camerino G and Ballabio A (1991). A gene deleted in Kallmann's syndrome shares homology with neural cell adhesion and axonal path-finding molecules. *Nature* 353:529-536.

Freije D, Helms C, Watson MS and Donis-Keller H (1992). Identification of a second pseudoautosomal region near the Xq and Yq telomeres. *Science* **258**:1784-1787.

Friend SH, Bernardis R, Rogelji S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM and Dryja TP (1986). A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* **323**:643-646.

Fusco JC, Fennick RG, Ledbetter DH and Caskey CT (1983). Deletion and amplification of the HGPRT locus in chinese hamster cells. *J. Mol. Cell Biol.* **3**:1086-1096.

Gardiner K, Horisberger M, Kraus J, Tantravahi U, Korenberg J, Rao V, Reddy S and Patterson D (1990). Analysis of human chromosome 21: correlation of physical and cytogenetic maps; gene and CpG island distribution. *EMBO J.* **9**:25-34.

Giacalone JP and Francke U (1992). Common sequence motifs at the rearrangements sites of a constitutional X/Autosome translocation and associated deletion. *Am. J. Hum. Genet.* **50**:725-741.

Gibbons RJ, Suthers GK, Wilkie AOM, Buckle VJ and Higgs DR (1992). X-linked α -thalassemia/mental retardation (ATR-X) syndrome: localization to Xq12-q21.31 by X inactivation and linkage study. *Am. J. Hum. Genet.* **51**:1136-1149.

Gilgenkrantz S, Tridon P, Pinel-Briquel N, Beurey J and Weber M (1985). Translocation (X;9)(p11;q34) in a girl with incontinentia pigmenti (IP) : implication for the regional assignment of the IP locus to Xp11 ? *Ann. Génét.* **28**:90-92.

Glass IA (1991). X Linked Mental Retardation. *J. Med. Genet.* **28**:361-371.

Goold RD, diSibio GL, Xu H, Lang BD, Dadgar J, Magranne GG, Dugaiczky A, Smith KA, Cox DR, Masters SB and Myers RM (1993). The development of sequence tagged sites for human chromosome 4. *Hum. Mol. Genet.* **2**:1271-1288.

Goss SJ and Harris H (1975). New method for mapping genes in human chromosomes. *Nature* **255**:680-684.

Greenstein RM, Reardon MP and Chan TS (1977). An X;autosome translocation in a girl with Duchenne muscular dystrophy (DMD): evidence for DMD gene localisation. *Pediatr. Res.* **11**:475A.

Haldane JBS and Smith CAB (1947). A new estimate of the linkage between the genes for haemophilia and color blindness. *Ann. Eugen.* **14**:10-31.

Henle G, Deinhardt F and Girardi A (1954). Cytolytic effects of mumps virus in tissue cultures of epithelial cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **87**:386.

Hodgson SV, Neville B, Jones RWA, Fear C and Bobrow M (1985). Two cases of X/autosome translocation in females with incontinentia pigmenti. *Hum. Genet.* **71**:231-234.

Hodgson SV, Heckmatt JZ, Hugues E, Crolla JA, Dubowitz V and Bobrow M (1986). A balanced de novo X/autosome translocation in a girl with manifestations of Lowe syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **23**:837-847.

Huang THM, Cottingham RW, Ledbetter DH and Zoghbi HY (1992). Genetic mapping of four dinucleotide repeat loci, DXS453, DXS458, DXS454, and DXS424, on the X chromosome using multiplex polymerase chain reaction. *Genomics* 13:375-380.

Itzhaki JE, Barnett MA, MacCarthy AB, Buckle VJ, Brown WRA and Porter ACG (1992). Targeted breakage of a human chromosome mediated by cloned human telomeric DNA. *Nature Genet.* 2:283-287.

Jeanpierre M (1987). A rapid method for the purification of DNA from blood. *Nucleic Acids Res.* 15:22.

Jeffreys AJ, Wilson V and Thein SL (1985). Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature* 314:67-73.

Jordan BR (1993). Le festival des ADNc. *médecine/sciences* 9:211-216.

Kajii T, Tsukahara M, Fukushima Y, Hata A, Matsuo K and Kuroki Y (1985). Translocation (X;13)(p11.21;q12.3) in a girl with incontinentia pigmenti and bilateral retinoblastoma. *Ann. Génét.* 28:219-223.

Kan YW and Dozy AM (1978). Polymorphism of DNA sequence adjacent to human b-globin structural gene : relationship to sickle mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:5631-5635.

Kaplan J, Gilgenkrantz S, Dufier JL and Frezal J (1989). Choroideremia and ovarian dysgenesis associated with an X;7 de novo balanced translocation. *Cytogenet. Cell Genet.* 51:1022.

Kaplan JC and Delpech M (1993). *Biologie moléculaire et médecine* (2ème édition). Médecine-Sciences Flammarion Paris.

Kapur S, Higgins JV, Delp K and Rogers B (1987). Menkes syndrome in a girl with X;autosome translocation. *Am. J. Med. Genet.* 26:503-510.

Kere J, Grzeschik KH, Limon J, Gremaud M, Schlessinger D and de la Chapelle A (1993a). Anhidrotic ectodermal dysplasia gene region cloned in yeast artificial chromosomes. *Genomics* 16:305-310.

Kere J, Peiffer S, Saarialho-Kere U, Grzeschik KH, Limon J, Zuo L, Chen EY, de la Chapelle A and Schlessinger D (1993b). Cloning of the ectodermal dysplasia gene: identification of candidate mRNAs associated with CpG islands near translocation breakpoints in two females patients. *Cytogenet. Cell Genet.* 64:180.

Kievits T, Devilee P, Wiegant J, Wapenaar MC, Cornelisse CJ, Ommen GJBv and Pearson PL (1990). Direct nonradioactive in situ hybridization of somatic cell hybrid DNA to human lymphocyte chromosomes. *Cytometry* 11:105-109.

Kucher-Lapati RS, Baker RM and Ruddle FH (1975). Ouabain as a selective agent in the isolation of somatic cell hybrids. *Cytogenet. Cell Genet.* 14:192-193.

Lafreniere RG, Brown CJ, Powers VE, Carrel L, Davies KE, Barker DF and Willard HF (1991). Physical mapping of 60 DNA markers in the p21.1-->q21.3 region of the human X chromosome. *Genomics* 11:352-363.

Ledbetter D, Rich D, O'Connell P, Leppert M and Carey J (1989). Precise localization of NF1 to 17q11.2 by balanced translocation. *Am. J. Hum. Genet.* **32**:117-119.

Legouis R, Hardelin JP, Levilliers J, Claverie JM, Compain S, Wunderle V, Millasseau P, Le Paslier D, Cohen D, Caterina D, Bougueleret L, Delemarre-van de Waal H, Lutfalla G, Weissenbach J and Petit C (1991). The gene for the X-linked Kallman syndrome encodes a protein related to adhesion molecules. *Cell* **67**:423-435.

Lengauer C, Green ED and Cremer T (1992). Fluorescence in situ hybridization of YAC clones after Alu-PCR amplification. *Genomics* **13**:826-828.

Lichter P, Ledbetter S, Ledbetter D and Ward DC (1990). Fluorescence in situ hybridization with Alu and L1 polymerase chain reaction probes for rapid characterization of human chromosomes in hybrid cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:6634-6638.

Limon J, Filipiuk J, Nedoszytko B, Mrozek K, Castren M, Larramendy M and Roszkiewicz J (1991). X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia and de novo t(X;1) in a female. *Hum. Genet.* **87**:338-340.

Lindsay S, Curtis AJR, Roustan P, Kamakari S, Thiselton DL, Stephenson A and Battacharya SS (1993). Isolation and characterization of three microsatellite markers in the proximal long arm of the human X chromosome. *Genomics* **17**:208-210.

Litt M and White RL (1985). A highly polymorphic locus in human DNA revealed by cosmid-derived probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:6206-6210.

Littlefield JW (1964). Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. *Science* **145**:709-710.

Luty JA, Guo Z, Willard HF, Ledbetter DH, Ledbetter S and Litt M (1990). Five polymorphic microsatellite VNTRs on the human X chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* **46**:776-783.

Lyon MF (1972). X-chromosome inactivation and developmental patterns in mammals. *Biol. Rev.* **47**:1-35.

MacKinnon RN, Hirst MC, Bell MV, Watson JEV, Claussen U, Ludecke HJ, Senger G, Horsthemke B and Davies KE (1990). Microdissection of the fragile X region. *Am. J. Hum. Genet.* **47**:181-187.

Madan K (1983). Balanced structural changes involving the human X: Effect on sexual phenotype. *Hum. Genet.* **63**:216-221.

Mandel JL, Monaco AP, Nelson DL, Schlessinger D and Willard H (1992). Genome analysis and the human X chromosome. *Science* **258**:103-109.

Mandel JL, Monaco AP, Nelson D, Schlessinger D and Willard HF (1993). Report of the committee on the genetic constitution of the X chromosome, 588-640, Chromosome coordinating meeting (1992). A. J. Cuticchia, P. L. Pearson and H. P. Klinger (Genome priority reports, vol 1) Basel, Karger, 1993.

Mankovitz R, Buchwald M and Baker RM (1974). Isolation of ouabain-resistant human diploid fibroblasts. *Cell* 3:221-226.

Marshall-Graves JA and Barbieri I (1992). Chromosome segregation from cell hybrids. VII. Reverse segregation from karyoplast hybrids suggests control by cytoplasmic factors. *Genome* 35:537-540.

Marshall-Graves JA and Schmidt MM (1992). Mammalian sex chromosomes: design or accident? *Current Opinion in Genetics and Development* 2:890-901.

Martin JP and Bell J (1943). A pedigree of mental defect showing sex-linkage. *J. Neurol. Psychiatry* 6:154-157.

Mattei MG, Mattei JF, Ayme S and Giraud F (1982). X-Autosome translocations: Cytogenetic characteristics and their consequences. *Hum. Genet.* 61:295-309.

McBride OW and Ozer HL (1973). Transfer of genetic information by purified metaphase chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:1258-1262.

McElreavy K, Vilain E, Abbas N, Herskowitz I and Fellous M (1993). A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3368-3372.

McInnes RR and Byers PH (1993). Biochemical genetics: examples of life after cloning. *Current Opinion in Genetics and Development* 3:475-483.

McKusick VA (1992). *Mendelian Inheritance in man* (tenth edition). The Johns Hopkins Univ. Press Baltimore.

Merry DE, Janne PA, Landers JE, Lewis RA and Nussbaum RL (1992). Isolation of a Candidate Gene for Choroideremia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2135-2139.

Meyer M, Mattei JF, Viillard JL, Goumy P, Dastugue B and Malpuech G (1978). Hypocalcémie magnesodépendante par trouble spécifique de l'absorption du magnésium, associée à une anomalie chromosomique. *Rev. Franç. Endocrinol. Clin.* 19:101-108.

Michelson AM, Bruns GAP, Morton CC and Orkin SH (1985). The human phosphoglycerate kinase multigene family. *J. Biol. Chemistry* 260:6982-6992.

Migeon BR, McGinniss MJ, Antonarakis SE, Axelman J, Stasiowski BA, Youssoufian H, Kearns WG, Chung A, Pearson PL, Kazazian HH and Muneer RS (1993). Severe hemophilia A in a female by cryptic translocation: order and orientation of factor VIII within Xq28. *Genomics* 16:20-25.

Miller G and Lipman M (1973). Release of infectious Epstein-Barr virus by transformed marmoset leucocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:190-194.

Mohandas T and Shapiro LJ (1983). Factors involved in X-chromosome inactivation. *Cytogenetics of the Mammalian X chromosome, Part A Basic mechanism of the X chromosome behavior:271-297.* (Progress and topics in cytogenetics, 3A). A. A. Sandberg Alan R. Liss New York.

Monaco AP, Bertelson CJ, Middlesworth W, Coletti CA, Aldridge J, Fishbeck KH, Bartlett R, Pericak-Vance MA, Roses AD and Kunkel LM (1985). Detection of deletions spanning the Duchenne muscular dystrophy locus using a tightly linked DNA segment. *Nature* 316:842-845.

Monaco AP, Neve RL, Colletti-Feener C, Bertelson CJ, Kurnit DM and Kunkel LM (1986). Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* 323:646-650.

Morton NE (1955). Sequential tests for the detection of linkage. *Am. J. Hum. Genet.* 7:277-318.

Morton NE (1991). Parameters of the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7474-7476.

Mosser J, Douar AM, Sarde CO, Kioschis P, Feil R, Moser H, Poutska AM, Mandel JL and Aubourg P (1993). Putative X-linked adrenoleucodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* 361:726-730.

Mossman J, Blunt S, Stephens R, Jones E and Pembrey M (1983). Hunter's disease in a girl: association with X;5 chromosomal translocation disrupting the Hunter gene. *Arch. Dis. Child* 58:911-915.

Mueller OT, Hartsfield JK, Gallardo LA, Essig YP, Miller KL, Rapenhausen PR and Tedesco TA (1991). Lowe oculocerebrorenal syndrome in a female with a balanced X;20 translocation: mapping of the X chromosome breakpoint. *Am. J. Hum. Genet.* 49:804-810.

Nelson D, Ledbetter S, Corbo L, Victoria MF, Ramirez-Solis R, Webster TD, Ledbetter DH and Caskey CT (1989). Alu polymerase chain reaction: a method for rapid isolation of human specific sequences from complex DNA sources. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6686-6690.

Neri G, Chiurazzi P, Arena F, Lubs HA and Glass IA (1992). XLMR genes: Update 1992. *Am. J. Med. Genet.* 43:373-382.

NIH/CEPH collaborative mapping group (1992). A comprehensive genetic linkage map of the human genome. *Science* 258:67-86.

Nussbaum RL, Lewis RA, Lesko JG and Ferrel R (1985). Choroideremia is linked to the restriction fragment length polymorphism DXYS1 at Xq13-q21. *Am. J. Hum. Genet.* 37:473-481.

Nussbaum RL, Lesko JG, Lewis RA, Ledbetter SA and Ledbetter DH (1987). Isolation of anonymous DNA sequences from within a submicroscopic X chromosomal deletion in a patient with choroideremia, deafness, and mental retardation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:6521-6525.

Oberlé I, Camerino G, Kloepfer C, Moisan JP, Grzeshik KH, Hellkuhl B, Hors-Cayla MC, Van Cong N, Weil D and Mandel JL (1986). Characterization of a set of X-linked sequences and of a panel of somatic cell hybrids useful for the regional mapping of the human X chromosome. *Hum. Genet.* 72:43-49.

Oberlé I, Vincent A, Abbadi N, Rousseau F, Hupkes PE, Hors-Cayla MC, Gilgenkrantz S, Oostra BA and Mandel JL (1990). New polymorphism and a new chromosome breakpoint establish the physical and genetic mapping of DXS369 in the DXS98-FRAXA interval. *Am. J. Med. Genet.* 38:1-7.

Ohno S (1967). Sex chromosomes and sex-linked genes. Springer Verlag Berlin.

Okada Y and Tadokoro J (1962). Analysis of giant polynuclear cell formation caused by HV J virus from Ehrlich's ascites tumors cells II. Quantitative analysis of giant polynuclear cell formation. *Exp. Cell Res.* 26:108.

Olson M, Hood L, Cantor C and Botstein D (1989). A common language for physical mapping of the human genome. *Science* 245:1434-1435.

Parra I and Windle B (1993). High resolution visual mapping of stretched DNA by fluorescent hybridization. *Nature Genet.* 5:17-21.

Pascal G, Donnelly P, Fouanon C, Herbert O, Le Roux MG and Moisan JP (1993). A new (old) deletion in the choroideremia gene. *Hum. Mol. Genet.* 2:1489.

Pery P and Wolff S (1974). New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 251:156-158.

Petit C, Levilliers J and Weissenbach J (1988). Physical mapping of the human pseudo-autosomal region; comparaison with genetic linkage map. *EMBO J.* 7:2369-2376.

Pettenati M, Weaver R and Burton B (1989). Translocation t(5;11)(q13.1;p13) associated with familial isolated aniridia. *Am. J. Med. Genet.* 34:230-232.

Philippe C, Cremers FPM, Chery M, Bach I, Abbadi N, Ropers HH and Gilgenkrantz S (1993). Physical mapping of DNA markers in the q13-q22 region of the human X chromosome. *Genomics* 17:147-152.

Pinkel D, Straume T and Gray JW (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:2934-2938.

Pontecorvo G (1975). Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethylen glycol treatment. *Somat. Cell Genet.* 1:503-517.

Porteous DJ (1987). Chromosome mediated gene transfer: a functional assay for complex loci and an aid to human genome mapping. *Trends Genet.* 3:177-182.

Porteus MEM, Curtis A, Lindsay S, Williams O, Goudie D, Kamakari S and Bhattacharya SS (1992a). The gene for Aarskog syndrome is located between DXS255 and DXS566 (Xp11.2-Xq13). *Genomics* 14:298-301.

Porteus MEM, Johnson H, Burn J, Curtis A, Lindsay S, Bhattacharya SS and Goodship JA (1992b). A new mental retardation syndrome mapping to the pericentromeric region of the X chromosome. *Am. J. Hum. Genet. Suppl* 51:A106.

Richards RI and Sutherland GR (1992). Heritable unstable DNA sequences. *Nature Genet.* 1:7-9.

Rider SH and Monaco AP (1993). Primers for the dinucleotide repeat at the DXS453 locus also recognizes the DXS983 locus. *Hum. Mol. Genet.* 2:1510.

Rigby PNJ, Diechmann M, Rhodes C and Berg P (1977). Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick-translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* **113**:237-251.

Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumn ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel M, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, Zsiga M, Buchwald M, Riordan JR, Tsui LC and Collins F (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* **245**:1059-1065.

Ropers HH, Zuffardi O, Bianchi E and Tiepolo L (1982). Agenesis of corpus callosum, ocular and skeletal anomalies (X-linked dominant Aicardi's syndrome) in a girl with balanced X/3 translocation. *Hum. Genet.* **61**:364-368.

Rousseau F, Vincent A, Rivella S, Heitz D, Triboli C, Maestrini E, Waren T, Suthers G, Goodfellow P, Mandel J, Toniolo D and Oberlé I (1991). Four chromosomal breakpoints and four new probes mark out a 10-cM region encompassing the fragile-X locus (FRAXA). *Am. J. Hum. Genet.* **48**:108-116.

Royer-Pokora B, Kunkel LM, Monaco AP, Goff SC, Newburger PE, Baehner RL, Cole FS and al. (1986). Cloning the gene for an inherited human disorder-chronic granulomatous disease on the basis of its chromosomal location. *Nature* **322**:32-38.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA and Arnheim N (1985). Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**:1350-1354.

Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual* / E.F. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sankila EM, Tolvanen R, van den Hurk JAJM, Cremers FPM and de la Chapelle A (1992). Aberrant splicing of the CHM gene is a significant cause of choroideremia. *Nature Genet.* **1**:109-113.

Sarto GE, Therman E and Patau K (1973). X inactivation in man: a woman with t(Xq;⁻12q⁺). *Am. J. Hum. Genet.* **25**:262-270.

Saugier-veber P, Abadie V, Moncla A, Mathieu M, Puissan C, Turleau C, Mattei JF, Munnich A and Lyonnet S (1993). The Juberg-Marsidi syndrome maps to the proximal long arm of the X chromosome (Xq12-q21). *Am. J. Hum. Genet.* **52**:1040-1045.

Schlessinger D, Mandel JL, Monaco AP, Nelson DL and Willard HF (1993). Report of the fourth international workshop on human X chromosome Mapping 1993. *Cytogenet. Cell Genet.* **64**:147-194.

Schmidt MA, Michels VV and Dewald GW (1987). Cases of neurofibromatosis with rearrangements of chromosome 17 involving band 17q11.2. *Am. J. Med. Genet.* **28**:771-777.

Schmidt M and Du Sart D (1992). Functional disomies of the X chromosome influence the cell selection and hence the X inactivation pattern in females with balanced X-Autosome translocations. *Am. J. Med. Genet.* **42**:161-169.

Schwartz DA and Cantor CR (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* **37**:67-75.

Schwartz CE (1993). Invited editorial: X-linked mental retardation: In pursuit of a gene map. *Am. J. Hum. Genet.* **52**:1025-1031.

Schwartz M, Rosenberg T, van den Hurk JA, van de Pol DJ and Cremers FPM (1993). Identification of mutations in Danish choroideremia families. *Hum. Mut.* **2**:43-47.

Seabra MC, Brown MS, Slaughter CA, Sudhof TC and Goldstein JL (1992). Purification of a component A of Rab geranylgeranyl transferase: possible identity with the choroideremia gene product. *Cell* **70**:1049-1057.

Seabra MC, Brown MS and Goldstein JL (1993a). Retinal degeneration in choroideremia: deficiency of Rab geranylgeranyl transferase. *Science* **259**:377-381.

Seabra MC, Brown MS, Armstrong SA, Smeland TE, Cremers FPM and Goldstein JL (1993b). cDNA cloning of component A of Rab geranylgeranyl transferase and demonstration of its role as a Rab escort protein. *Cell* **73**:1091-1099.

Seabright M (1971). A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* **2**:971-972.

Sikela JM and Auffray C (1993). Finding new genes faster than ever. *Nature genetics* **3**:189-191.

Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-badge R and Goodfellow PN (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* **346**:240-244.

Siu VM, Gonder JR, Jung JH, Sergovich FR and Flintoff WR (1990). Choroideremia associated with an X-autosomal translocation. *Hum. Genet.* **84**:459-464.

Southern EM (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **88**:503-517.

Suthers G, Hyland V, Callen D, Oberlé I, Rocchi M, Thomas NS, Morris CP, Schwartz CE, Schmidt M, Ropers HH, Baker E, Oostra BA, Dahl N, Wilson PJ, Hopwood JJ and Sutherland GR (1990). Physical mapping of new DNA probes near the fragile X mutation (FRAXA) by using a panel of cell lines. *Am. J. Hum. Genet.* **47**:187-195.

Téboul M, Mujica P, Chery M, Léotard B and Gilgenkrantz S (1989). Translocations X-Autosomes équilibrées et retard mental. Contribution à la cartographie des retards mentaux liés à l'X (à l'exclusion de l'X FRA). *J. Génét. Hum.* **37**:179-195.

Therman E, Laxova R and Susman B (1990). The critical region on the human Xq. *Hum. Genet.* **85**:455-461.

Thomas NST, Chelly J, Zonana J, Davies KJP, Morgan S, Gault J, Rack KA, Buckle VJ, Brockdorff N, Clarke A and Monaco A (1993). Characterisation of molecular DNA rearrangements within the Xq12-q13.1 region, in three patients with X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia (EDA). *Hum. Mol. Genet.* **2**:1679-1685.

Tjio JH and Levan A (1956). The chromosome number of man. *Hereditas* 42:1-6.

Tsukada S, Saffran DC, Rawlings DJ, Parolini O, Allen RC, Klisak I, Sparkes RS, Kubagawa H, Mohandas T, Quan S, Belmont JW, Cooper MD, Conley ME and Witte ON (1993). Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell* 72:279-290.

Turleau C, Niaudet P, Cabanis MO, Plessis G, Cau D and Grouchy J de (1989). X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia and t(X;12) in a female. *Clin. Genet.* 35:462-466.

van Bokhoven H, Genderen CV, Molloy CM, van de Pol DJR, Cremers CWR, Aarem AV, Schwartz M, Rosenberg T, Geurts van Kessel AHM, Ropers HH and Cremers FPM (1994). Mapping of the choroideremia like (CHML) gene at 1q42-qter and mutation analysis in patients with Usher syndrome type II. *Genomics* 19:in press.

van Bokhoven H, Schwartz M, Philippe C, Bogerd L, Rosenberg T, Andreasson, R  ther K, de Jonk P, Ropers HH and Cremers FPM (Submitted). Fine structure of the human choroideremia gene and mutation analysis in CHM patients. *Hum. Mol. Genet.*

van de Maarel S, Bach I, Rohme D, Philippe C, Kere J, Berger W, Suijkerbuijk J, Roper HH and Cremers FPM (1993). Cloning of the Xq13.1 breakpoint of a balanced X;13 translocation associated with mental retardation in female patient. *Cytogenet. Cell Genet.* 64:175.

van de Pol TJR, Cremers FPM, Brohet RM, Wieringa B and Ropers HH (1990). Derivation of clones from the choroideremia locus by preparative field inversion gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 18:725-731.

van den Hurk JAJM, van de Pol TJR, Molloy CM, Brunsmann F, R  ther K, Zrenner E, Pinckers AJLG, Pawlowitzki IH, Bleeker-Wagemakers EM, Wierenga B, Ropers HH and Cremers FPM (1992). Detection and characterization of point mutations in the choroideremia candidate gene by PCR-SSCP analysis and direct DNA sequencing. *Am. J. Hum. Genet.* 50:1195-1202.

Van Dyke DL, Worsham MJ and Weiss L (1987). The human inactivated X chromosome folds in early metaphase, prometaphase, and prophase. *Hum. Genet.* 77:57-59.

Verellen C, Meyer R, de Freund M, Laterre C and Scholberg B (1977). Progressive muscular dystrophy of the Duchenne type in a young girl associated with an aberration of chromosome X. *Fifth International Congress of Birth Defects, Amsterdam.* 42.

Vetrie D, Kendall E, Coffey A, Lehrach H, Bobrow M, Bentley DR and Harris A (1993). Towards a complete PFGE and YAC map of the human Xq22 region. *Cytogenet. Cell Genet.* 64:172.

Vianna-Morgante A, Batista D, Levisky R and Zatz M (1986). X;autosome translocations in females with X-linked recessive diseases. *7th International Congress of Human Genetics, Berlin.* 97 A.

Vulpe C, Levinson B, Whitney S, Packman S and Gitschier J (1993). Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase. *Nature Genet.* **3**:7-13.

Walter MA and Goodfellow PN (1993). Radiation hybrids: irradiation and fusion gene transfer. *Trends genet.* **9**:352-356.

Waterston R, Martin C, Craxton M, Huynh C, Coulson A, Hillier L, Durbin R, Green P, Shownkeen R, Halloran N, Metzstein M, Hawkins T, Wilson R, Berks M, Du Z, Thomas K, Thierry-Mieg J and Sulston J (1992). A survey of expressed genes in *Caenorhabditis elegans*. *Nature genetics* **1**:114-123.

Weber JL and May PE (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* **44**:388-396.

Weber JL, Kwitek AE, May PE, Polymeropoulos MH and Ledbetter S (1990). Dinucleotide repeat polymorphisms at the DXS453, DXS454 and DXS458 loci. *Nucleic Acids Res.* **18**:4037.

Weissenbach J, Gyapay G, Dib C, Vignal A, Morissette J, Millasseau P, Vaysseix G and Lathrop M (1992). A second-generation linkage map of the human genome. *Nature* **359**:794-801.

Weissenbach J (1993). La carte génétique de l'homme enfin sur orbite ... de microsattellites. *Médecine/Sciences* **9**:84-85.

Wieacker P, Davies KE, Cooke HJ, Pearson PL, Williamson R, Bhattacharya S, Zimmer J and Ropers HH (1984). Toward a complete linkage map of the human X chromosome: regional assignment of 16 cloned single-copy DNA sequences employing a panel of somatic cell hybrids. *Am. J. Hum. Genet.* **36**:265-276.

Wieland I, Böhm M and Bogatz S (1992). Isolation of DNA sequences deleted in lung cancer by genomic difference cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:9705-9709.

Willems P, Vits L, Buntink I, Raeymaekers P, Van Broeckhoven C and Ceulemans B (1993). Localization of a gene responsible for nonspecific mental retardation (MRX9) to the pericentromeric region of the X chromosome. *Genomics* **18**:290-294.

Williamson B (1981). The cloning revolution meets human genetics. *Nature* **293**:10-12.

Wilson EB (1911). The sex chromosomes. *Arch. Mikr. Anat.* **77**:249-271.

Yamamori I, Mori Y, Seo H, Hirooka Y, Imamura S, Miura Y, Matsui N and Yutaka O (1991). Nucleotide deletion resulting in frameshift as a possible cause of complete thyroxine-binding globulin deficiency in six Japanese families. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **73**:262-267.

Yen PH, Ellison J, Salido EC, Mohandas T and Shapiro L (1992). Isolation of a new gene from the distal short arm of the human X chromosome that escapes X-inactivation. *Hum. Mol. Genet.* **1**:47-52.

Yerganian G and Neil MB (1966). Hybridization of dwarf hamster cells by UV inactivated Sendai virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)* **55**:1066-1073.

Yunis JJ (1976). High resolution of human chromosomes. *Science* 191:1268-1270.

Zonana J, Roberts SH, Thomas NST and Harper PS (1988). Recognition and reanalysis of a cell line from a manifesting female with X linked hypohidrotic ectodermal dysplasia and an X;autosome balanced translocation. *J. Med. Genet.* 25:383-386.

Zuffardi O and Fraccaro M (1982). Gene mapping and serendipity. The locus for torticollis, keloids, cryptorchidism and renal dysplasia (31430), McKusick) is at Xq28, distal to G6PD locus. *Hum. Genet.* 62:280-281.

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE**

o o o

BIU NANCY
Service Commun de Documentation
INPL
2, avenue de la Forêt de Haye - B.P. 3
54501 VANDOEUVRE Cédex FRANCE

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Monsieur GOOSSENS Michel, Professeur, Hopital Henri Mondor
Créteil,**

**Monsieur MANDEL Jean-Louis, Professeur, Institut de Chimie
Biologique Strasbourg.**

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur PHILIPPE Christophe

à soutenir devant l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"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 translocations (X;Autosome)
équilibrées"**

en vue de l'obtention du titre de :

**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE
LORRAINE**

Spécialité : **"GENIE BIOLOGIQUE"**



NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDŒUVRE CEDEX

Fait à Vandoeuvre le, **14 Février 1994**

Le Président de l'I.N.P.L.,

M. LUCIANO





MEDICOOP
COOPERATIVE

en Conservation des Enseignes des Facultés
et Sociétés de Médecine
Société Anonyme au capital variable

FACULTE DE MEDECINE
2, Avenue de la Porticière
93164 LESBOIS Villetaneuse Cedex

Tel : 83-44-66-33 ou 83-59-25-27

Résumé

Ce travail contribue à l'établissement de la carte physique de la région q13-q22 du chromosome X humain.

Nous avons rassemblé huit translocations X;Autosomes (t(X;A)) équilibrées chez des femmes présentant des troubles de la fonction ovarienne.

Dans une première partie, nous définissons huit nouveaux points de cassure dans la région Xq13-q22. Ces balises sont tout d'abord isolées par hybridation somatique interspécifique à partir des t(X;A) ; elles sont ensuite localisées par rapport aux marqueurs de la région proximale des bras longs du chromosome X humain. En regroupant nos t(X;A) avec des délétions de la région Xq21 publiées précédemment, nous proposons un panel de réarrangements qui subdivise la région Xq21 en 21 segments, soit plus d'une borne par mégabase d'ADN. Cette collection constitue donc un bon canevas pour la construction d'une carte physique, génétique et fonctionnelle détaillée de la région q21 du chromosome X humain.

La deuxième partie de ce travail consiste en la caractérisation moléculaire fine des points de cassure sur l'X pour les deux t(X;A) présentées dans cette étude qui sont associées avec des pathologies récessives liées à l'X. D'une part, chez la patiente TDo, atteinte de choroïdérémie et porteuse d'une t(X;7)(q21;p12), nous confirmons la localisation du point de cassure sur l'X dans le gène CHM, entre le troisième et le quatrième exon. D'autre part, le point de cassure sur le chromosome X chez la patiente PMI, porteuse d'une t(X;13)(q13;q31) en association avec un retard mental, a permis le clonage positionnel d'un gène qui pourrait être un bon candidat pour l'un des nombreux retards mentaux non spécifiques liés à l'X que compte la région proximale des bras longs du chromosome X humain.

mots-clés :

cartographie physique,
choroïdérémie,
chromosome X humain,
dysfonctionnement ovarien,
hybride somatique interspécifique,
retard mental lié à l'X,
translocation X;Autosome.