

FORMATION CONTINUE - ARTICLE DE SYNTHESE

La traçabilité dans la filière viande.

II. Les marqueurs génétiques

CHINA B., EVRARD V., NOIRFALISE R., CLINQUART A., DAUBE G.

Département des Sciences des Denrées Alimentaires, Faculté de Médecine Vétérinaire,
Université de Liège, Sart Tilman Bâtiment B43bis, 4000 Liège.

Correspondance :

Dr. Bernard China

Tél. 04 366 40 29 - Fax : 04 366 47 53 - Email : bchina@ulg.ac.be

RESUME : Afin d'assurer une transparence tout le long de la chaîne de transformation de la viande, il faut disposer d'un système de traçabilité performant. La traçabilité administrative montre des limites que l'utilisation de marqueurs génétiques pourrait surmonter. Le génome de chaque individu possède des différences de séquences, à la base du polymorphisme génétique, dont les marqueurs génétiques sont les témoins. Parmi ceux-ci, deux classes semblent s'imposer en matière de traçabilité : les microsatellites et les polymorphismes simple nucléotide. Les microsatellites sont caractérisés par un degré de polymorphisme important avec de nombreux allèles pour un même locus. De plus, leur détection se fait directement par amplification itérative. Techniquement, le problème se pose lors de la détection simultanée de plusieurs microsatellites où le patron obtenu est difficile à interpréter. Les polymorphismes simple nucléotide sont représentés par des mutations ponctuelles dans la séquence nucléotidique. Ils sont fréquents, stables, répartis de façon aléatoire et généralement bialléliques. La détection se fait soit par hybridation sur des biopuces, soit par spectrométrie de masse ou par d'autres techniques facilement automatisables. Cette automatisation est nécessaire pour pouvoir tester un grand nombre de polymorphismes simultanément sur un grand nombre d'échantillons, permettant ainsi de diminuer les coûts. L'avantage majeur des polymorphismes simple nucléotide est le signal binaire obtenu, son désavantage est le caractère population-spécifique de ce type de marqueur.

INTRODUCTION

Les récentes crises de la "vache folle" ou encéphalopathie spongiforme bovine et de la "dioxine" ont accentué les besoins de disposer d'un système efficace de traçabilité de nos animaux d'élevage, de leur naissance à leur transformation en viande. Lors de la crise de la dioxine, des milliers d'animaux furent détruits entraînant des pertes énormes pour l'ensemble du secteur. Le nombre de ces pertes aurait pu être réduit si un système de traçabilité efficace avait existé. En effet, les systèmes de traçabilité existants (SANITEL et autres) permettent difficilement de remonter l'ensemble de la filière et les fraudes restent pos-

sibles (Evrard et al., 2001).

Récemment cependant, les progrès dans le domaine de la génétique moléculaire des eucaryotes sous l'impulsion de vastes programmes de séquençage ont permis, d'une part d'obtenir un nombre grandissant de séquences d'ADN disponibles dans des banques de données et d'autre part, le développement de technologies permettant l'analyse génétique.

Si on excepte le cas des vrais jumeaux, le génome de chaque individu est unique. En d'autres termes, au sein d'une espèce, il est possible de distinguer des individus différents car ils possèdent des différences dans la séquence de leur ADN. Ces varia-

tions sont générées par des mutations qui au niveau de la population sont le moteur de l'évolution. Bien que ces mutations puissent se traduire phénotypiquement, la plupart sont neutres. Elles peuvent affecter des régions importantes du génome (remaniements chromosomiques) ou des régions plus petites (mutations ponctuelles, insertions, délétions).

Un marqueur génétique est une séquence d'ADN, polymorphique, dépendant d'un locus spécifique localisé à un endroit précis du génome, facile à étudier et utilisé à l'origine pour localiser des gènes associés à des pathologies mais aussi comme signature (empreinte) du génome étu-

dié. Pour des raisons de facilité, les premières études portèrent sur les protéines plutôt que sur les gènes. Elles concernaient les groupes sanguins, les protéines sériques, ... (Juneja et Vogeli, 1998). Mais les techniques s'étant affinées depuis le début des années 1980, les marqueurs génétiques sont directement étudiés à partir de l'ADN (tableau I).

Essentiellement trois types majeurs de polymorphismes génétiques peuvent être utilisés comme marqueurs génétiques : l'ADN satellite, les mutations " simple polymorphisme " et l'amplification aléatoire d'ADN polymorphe.

Tableau I : Types de marqueurs génétiques

| Type | nombre/génon | polymorphisme | Répartition | Détection | Automatisation |
|------|--------------|---------------|--|---|----------------|
| VNTR | >10 000 | +++ | localisés aux extrémités des chromosomes | Southern Blot | non |
| STR | >100 000 | +++ | aléatoire | PCR | oui |
| SNP | >1 000 000 | + | aléatoire | Méthodes Diverses* | oui |
| RFLP | >100 000 | + | aléatoire | PCR | non |
| RAPD | ? | ++ | aléatoire | PCR/restriction Restriction/hybridation | oui |
| AFLP | ? | ++ | aléatoire | Restriction/ PCR | oui |

*: voir tableau II

VNTR: Variable Number of Tandem Repeat

STR: Short Tandem Repeat

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

RAPD: Random Amplification of Polymorphic DNA

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism

LES MARQUEURS GENETIQUES

L'ADN satellite.

Dans le génome, on trouve des séquences répétées. Celles-ci sont classées en fonction du nombre de répétitions, de la taille du motif répété et de la dispersion de ces séquences répétées dans le génome. L'ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium a été depuis des années la technique de prédilection pour isoler de l'ADN génomique. On constate que l'ADN génomique forme une bande majeure dans le gradient et une bande plus fine appelée ADN satellite qui possède une densité différente due à des différences dans la composition en bases. L'analyse de cet ADN satellite révèle de petites séquences répétées plusieurs centaines ou milliers de fois. Cet ADN répété peut être localisé à des endroits précis du chromosome (centromère, télomère) ou dispersé de façon plus homogène dans le géno-

me. Ces répétitions peuvent être groupées en tandem à un endroit précis du génome. Les minisatellites ont des unités répétées de 9 à 64 nucléotides, voire d'avantage (Moran, 1998). Décrits initialement chez l'homme (Jeffreys et al., 1985), ils ont été ensuite mis en évidence chez de nombreuses autres espèces. Le nombre de répétitions varie très fort à un endroit particulier entre individus ce qui en fait potentiellement une source de marqueurs génétiques. Le polymorphisme est dû à des différences dans le nombre de répétitions. En raison de l'hypervariabilité dans le nombre de copies répétées en tan-

dem, les minisatellites sont aussi appelés VNTRs (Variable Number Tandem Repeats) (Nakamura et al., 1987). Bien qu'ils soient très polymorphes, les minisatellites ne sont guère utilisés comme marqueur génétique principalement car ils ne sont pas de bonnes cibles pour l'amplification itérative (Polymerase Chain Reaction ou PCR) en raison de la taille importante des répétitions et du nombre important de répétitions. En d'autres termes, les fragments à amplifier sont très longs et le nombre d'allèles si important que l'interprétation du patron s'avère difficile. Leur technique d'étude est basée sur l'hybridation ADN-ADN après Southern Blot (figure. 1A) (Coppeters et al., 1990 ; 1994 ; Davies et al., 1992 ; Signer et al., 1994, Coppeters et al., 1994). De plus, leur distribution ne semble pas aléatoire. On leur préfère les microsatellites qui comme les minisatellites sont des VNTRs. Cependant, ils ont l'avantage d'avoir

des unités répétées plus petites (de 1 à 10 nucléotides), d'où leur appellation de STR (Short Tandem Repeat), pour une longueur totale de 10 à 100 pb et un nombre de copies raisonnablement bas ce qui en fait des cibles idéales pour l'amplification par PCR (figure 1B). Les microsatellites sont répartis de façon relativement aléatoire le long du génome. On en compte en moyenne 50 000 par génome. Ils constituent donc de bons candidats comme marqueurs génétiques. De plus, de nombreux microsatellites ont été identifiés chez les principaux animaux de rente. Ainsi, si on recherche dans la banque de séquences d'ADN (Genbank), on obtient les résultats suivants pour la recherche conjointe du terme " microsatellite " et de l'animal : *Bos taurus* (1345 références), *Gallus gallus* (749 références), *Sus scrofa* (348 références), *Ovis aries* (191 références) et *Capra hircus* (54 références). Une fois, un microsatellite identifié, il faut encore déterminer son degré de polymorphisme, ainsi que la fréquence des différents allèles dans la population étudiée et ce à partir d'un échantillon de celle-ci. A partir de là, on peut calculer l'hétérozygotie (Nei et Roychoudhury, 1974) d'un marqueur qui est la chance qu'un individu choisi au hasard soit hétérozygote pour le marqueur :

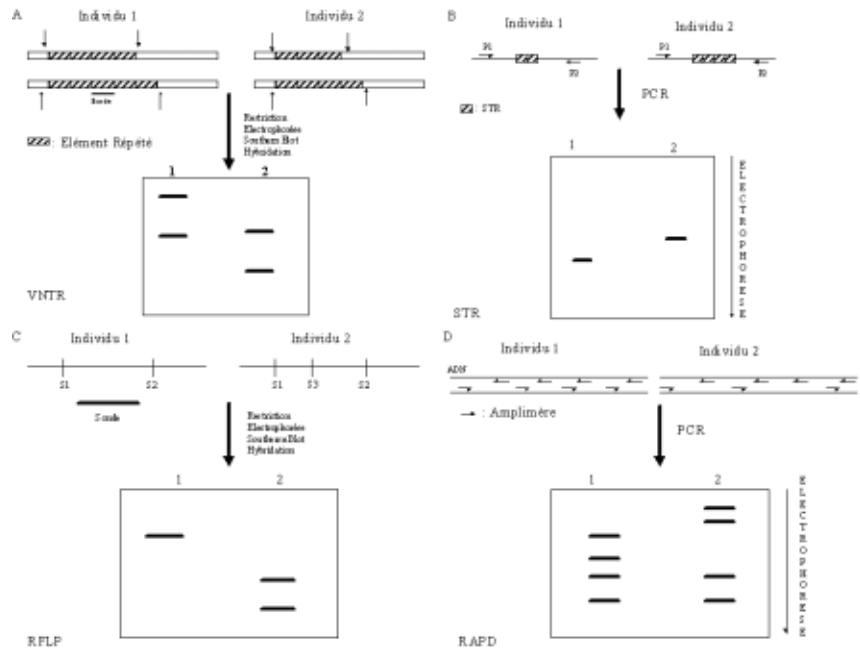
$$(1) H=1-\sum_{i=1}^n p_i^2$$

où p_i est la fréquence du i ème allèle dans la population. Une façon plus sophistiquée d'estimer le polymorphisme d'un marqueur est le PIC (polymorphism information content) (Botstein et al., 1980). Pour des parents hétérozygotes A1A2, la moitié des enfants seront aussi hétérozygotes et donc sans information nouvelle. Le PIC pour un marqueur est donné par :

$$(2) PIC=1-\sum_{i=1}^n p_i^2-\sum_{i=1}^n \sum_{j=1, j \neq i}^n p_i^2 p_j^2 .$$

Le dernier terme retranche la moitié des croisements de même hétérozygotie. Pour les marqueurs liés au chromosome X, l'hétérozygotie et le PIC sont identiques. Pour les marqueurs autosomaux, l'hétérozygotie surestime parfois le contenu informationnel surtout dans les systèmes à deux allèles (ce qui est rarement le

Figure 1. Technique de détection des marqueurs génétiques. A. Les minisatellites. VNTR (Variable Number of Tandem Repeat). Au même locus l'individu 1 et l'individu 2 diffèrent par le nombre d'éléments répétés. L'ADN total est restreint par un enzyme de restriction, les fragments de restriction sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose. Les fragments sont transférés sur une membrane de nylon. Celle-ci est hybridée avec une sonde correspondant à l'élément d'ADN répété. B. Les microsatellites. STR (Short Tandem Repeat). L'individu 1 et 2 présentent un nombre de répétitions différentes au même locus. La région comprenant le microsatellite est amplifiée par PCR avec les mêmes amorces. La taille des produits d'amplification est analysée par électrophorèse. C. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). Au même locus, l'individu 1 et l'individu 2 montrent une carte de restriction différente pour un enzyme donné. Après restriction de l'ADN total, les produits de restriction sont analysés par électrophorèse, transférés sur une membrane de nylon et hybridés avec une sonde correspondant à la région analysée. Selon la position des sites de restriction, la taille des fragments allumés sera différente. Il est à noter qu'alternativement, on peut amplifier la région d'intérêt par PCR et restreindre les produits d'amplifications. Les fragments de restriction sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose. D. Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD). Le même amplimère est utilisé pour réaliser une réaction de PCR sur le génome de l'individu 1 et 2. Selon les endroits où l'amorce vient s'hybrider, la taille des fragments d'amplification varie.



cas pour les microsatellites). Ainsi pour deux allèles de fréquences égales l'hétérozygotie est de 0,5 alors que le PIC vaut 0,375. Pour les microsatellites on obtient souvent des valeurs de PIC plus élevées témoignant du caractère polymorphe de ce type de marqueur. Ainsi, Peelman et collaborateurs (1998) ont étudié la variabilité de 23 microsatellites dans 4 populations de bovins en Belgique. Ils obtinrent des valeurs de H de $(0,69 \pm 0,12)$ et de PIC de $(0,65 \pm 0,13)$. Il est également possible de calculer la probabilité que deux individus appartenant à la même population ou à des populations différentes soient identiques pour les marqueurs étudiés. Ainsi, on constate que plus le nombre d'allèles pour un marqueur est important, plus le contenu en information est important et plus il sera facile de distinguer deux individus sur base de ce marqueur (Peelman et al., 1998). En pratique, on est amené à combiner différents microsatellites pour obtenir un test suffisamment discriminant. Mais ceci n'est pas sans poser des problèmes d'ordre technique. En effet, il faut choisir des amplimères pour la PCR tel que la température optimale d'annealing soit proche pour chaque paire, de plus, il faut que la taille des produits de PCR générés ne se chevauche pas d'un microsatellite à l'autre. Il en résulte un patron de produits d'amplification assez

complexe et difficile à interpréter. Cependant, la demande aidant, les appareils de séquençage automatique sont maintenant équipés notamment au niveau des logiciels pour pouvoir analyser ce genre de patron (ALFwin Fragment Analyser 2.00, Allelelocators, Amersham Pharmacia Biotech, ...). Ainsi, des trousse commerciales existent déjà pour certaines espèces animales (Applied Biosystems). Le degré de multiplexation ne dépasse pas 4 STRs pour la PCR (Heyen et al., 1997, Peelman et al., 1998). Mais des produits d'amplification marqués par le même fluorochrome peuvent être analysés simultanément par un appareil de séquençage automatique si les tailles des fragments sont suffisamment différentes. En utilisant cette stratégie, Heyen et collaborateurs (1997) ont pu analyser simultanément 22 microsatellites bovins.

Les "single nucleotide polymorphism".

Définition

Les SNPs pour "single nucleotide polymorphism" sont définis par la coexistence d'au moins deux bases différentes à la même position, chacun avec une fréquence $> 1\%$ (Krawczak, 1999). Ils affectent une seule paire de base soit par substitution (remplacement d'un nucléotide

par un autre) soit par délétion ou insertion d'une base. Ces mutations ponctuelles sont fréquentes dans le génome ($1/1000$ pb). On estime leur nombre à environ 3 106 pour le génome humain (Wang et al., 1998 ; Sauer et al., 2000). Les SNPs sont répartis uniformément tout le long du génome et sont, au même titre que les microsatellites, utilisés pour construire des cartes de linkage. Ces cartes fournissent des outils puissants pour la localisation et la caractérisation de facteurs génétiques (Collins et al., 1997). Les SNPs sont relativement stables de génération en génération (Krawczak, 1999), mais ils ont tendance à être spécifiques d'une population. Le risque étant que les marqueurs développés pour une race au sein d'une espèce animale ne soient pas utilisables pour une autre race. Un des avantages majeurs des SNPs est leur capacité à être typés de façon rapide et semi-automatique (Landergrén et al., 1998). Les stratégies utilisées (tableau II) regroupent d'une part les techniques basées sur des différences de mobilités électrophorétiques (DGGE, SSCP, ...) ou de temps de résolution (DHPLC) qui ne permettent que de tester une ou deux mutations à la fois et qui sont peu automatisables et d'autre part, les techniques plus facilement automatisables et qui permettent de tester un grand nombre de SNPs en même

Tableau II : Méthodes d'analyse des SNPs

| Technique d'analyse | Méthode de base | Références |
|---|--|--|
| Electrophorèse en gradient de gel dénaturant (DGGE) | PCR/électrophorèse | Myres <i>et al.</i> , 1985 Sheffield <i>et al.</i> , 1989 |
| Polymorphisme de conformation simple brin (SSCP) | PCR/électrophorèse | Hayashi <i>et al.</i> , 1991 |
| Analyse des hétéroduplex | PCR/électrophorèse | Keen <i>et al.</i> , 1991 |
| Electrophorèse en gradient de température (TGGE) | PCR/électrophorèse | Henco <i>et al.</i> , 1994 |
| HPLC dénaturante | PCR/HPLC | Underhill <i>et al.</i> , 1997 |
| Clivage chimique des mauvais appariements (CCM) | PCR/clivage/électrophorèse | Cotton <i>et al.</i> , 1988 |
| Modification à la carbodiimide (CDI) | PCR/modification chimique/électrophorèse | Ganguly et Prockop, 1990 |
| Clivage enzymatique des mauvais appariements (ECM) | PCR/clivage/électrophorèse | Youil <i>et al.</i> , 1995 |
| Polymorphisme de fragments de clivage (CFLP) | PCR/traitement/électrophorèse | Brow <i>et al.</i> , 1996 |
| UNG-mediated T Scan | PCR/ traitement/électrophorèse | Hawkins et Hoofman, 1997 |
| Séquençage direct | PCR/Séquençage/électrophorèse | Kwok <i>et al.</i> , 1994 |
| Puces à ADN | PCR/hybridation/détection fluorescente | Pease <i>et al.</i> , 1994 |
| Extension d'amorce allèle-spécifique (GBA, TDI) | PCR/séquençage/détection fluorescente | Nikiforov <i>et al.</i> , 1994 Chen <i>et al.</i> , 1997 |
| Ligation d'oligonucléotides (OLA, DOL) | PCR/ligation/détection fluorescente | Tobe <i>et al.</i> , 1996 Chen <i>et al.</i> , 1997 |
| PCR temps réel | PCR/hybridation/détection fluorescente | Livak <i>et al.</i> , 1995 |
| Polymorphisme de fragments de restriction (RFLP) | PCR/restriction/électrophorèse restriction/électrophorèse/hybridation | Botstein <i>et al.</i> , 1980 |

temps : les puces à ADN, la spectrométrie de masse et le OLA (Oligonucleotide Ligation Assay).

Détection

a. Les Puces à ADN.

De nombreuses analyses en biologie moléculaire reposent sur l'hybridation d'une sonde d'ADN sur des fragments d'ADN immobilisés sur un support solide (nylon,...). Ces séquences cibles ont été déposées ou transférées sur ces membranes, appelées maintenant " macroarray ". Ceux-ci doivent être distingués des " microarrays ", terme réservé aux " arrays " miniaturisés appelés aussi biopuces ou puces à ADN. Les biopuces répondent, entre-autres, à la nécessité de pouvoir analyser les polymorphismes d'un génome (Wilgenbus et Lichter, 1999). L'hybridation couplée à l'utilisation de puces à ADN (Chee *et al.*, 1996) permet de tester un grand nombre (plusieurs milliers) de SNPs à la fois (Wang *et al.*, 1998). Les technologies actuelles permettent la fabrication de biopuces de 1,28 cm de côté pouvant contenir 400 000 oligonucléotides, chacun occupant 20 sur 20 µm et contenant plus de 107 copies de la sonde (Chee *et al.*, 1996). Parmi les diverses solutions techniques disponibles sur le marché ou en développement (Marshall et Hodgson, 1998), la technique de choix pour la détection des SNPs consiste en des oligonucléotides courts synthétisés directement sur un support solide en utilisant la chimie des nucléotides photo-

labiles masqués séquentiellement (Fodor *et al.*, 1991 ; Pease *et al.*, 1994). L'ADN cible marqué par un fluorochrome et constitué de produits de PCR ou d'ADN génomique est appliqué et la détection des fluorochromes est effectuée. L'avantage des fluorochromes est que l'on peut utiliser simultanément différents marqueurs (figure 2A). Le dépôt des oligonucléotides et la détection du signal peuvent être automatisés. Les biopuces ont été utilisées pour la détection de SNPs (Wang *et al.*, 1998, Winzeler *et al.*, 1998 ; Cargill *et al.*, 1999 ; Halushka *et al.*, 1999). Pour éviter les problèmes de bruit de fonds dus au fait qu'il s'agit de distinguer des cibles différant par un seul nucléotide, deux types d'approches semblent prometteuses. D'une part, coupler l'hybridation à une réaction d'extension d'amorce (; Patinen *et al.*, 1997, Dubiley *et al.*, 1999, Patinen *et al.*, 2000). D'autre part, cette technologie peut être couplée à celles des " balises " moléculaires (" molecular beacons ") (Tyagi et Kramer, 1996 ; Tyagi *et al.*, 1998) ce qui permettrait de diminuer les problèmes de bruit de fond en rendant l'hybridation plus spécifique. Les balises moléculaires sont des oligonucléotides qui ont la forme d'une épingle à cheveux avec un fluorophore masqué dont la fluorescence est restaurée quand elle lie un ADN cible. Ces molécules sont particulièrement utiles dans des situations où on travaille en excès de sonde. Pour la détection des SNPs, on pourrait

charger le microarray avec plusieurs beacons marqués avec un fluorochrome différent ce qui permet de détecter plusieurs SNPs à la fois. Actuellement, environ 20 fluorochromes différents peuvent être utilisés (Eurogentec, Seraing, Belgique). Mais leur multiplexation est encore problématique.

b. La spectrométrie de masse.

En invoquant la présence d'un bruit de fond important si on se contente d'appliquer de l'ADN génomique et la nécessité donc de passer par une étape de purification avant l'analyse en puce à ADN qui limite la capacité de la méthode, Sauer et collaborateurs (2000) proposent une nouvelle approche basé sur la spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight) (Karas *et al.*, 1988) pour détecter les SNPs. La spectrométrie de masse (MS) time-of-flight (TOF) est simple, peu coûteuse, avec une grande sensibilité et une gamme pratiquement illimitée de masse. Cette technique révèle un intérêt tout particulier pour l'analyse des macromolécules biologiques comme les protéines, les hydrates de carbone et les oligonucléotides. La spectrométrie de masse TOF (TOFMS) n'est pas une technique nouvelle. Cependant, un intérêt nouveau dans cette technique a vu le jour grâce à l'introduction de la " matrix assisted laser desorption " (MALD) en 1988 par Karas et Hillenkamp d'une part et Tanaka et collaborateurs, d'autre part. En TOFMS, les ions sont formés dans

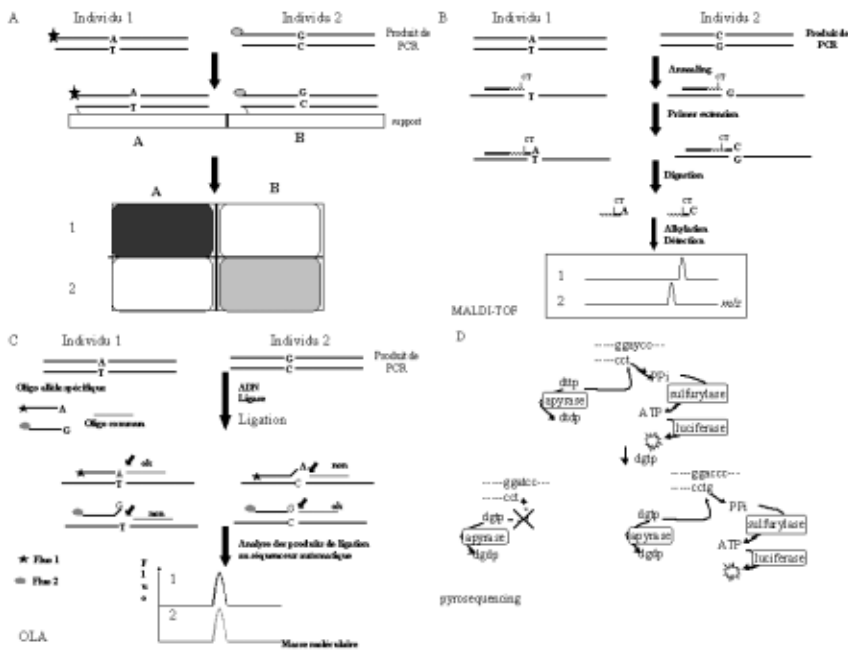


Figure 2. Méthode de détection des SNPs. A. Les biopuces. La région contenant le SNP est amplifiée par PCR. Le produit de PCR est marqué spécifiquement avec un fluorochrome différent selon la mutation. Le fragment marqué est hybridé sur un support sur lequel est fixé un oligonucléotide spécifique de l'allèle. L'hybridation est analysée par la présence ou l'absence de la fluorescence de la longueur d'onde correspondant aux fluorochromes utilisés. B. La spectrométrie de masse "Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight" ou MALDI-TOF. La région contenant la mutation est amplifiée par PCR. Sur le produit de PCR, une expérience d'extension d'amorce est menée, en utilisant une amorce chargée et modifiée. Après extension, la partie modifiée résiste à la digestion par la phosphodiesterase et le produit est alkylé avant d'être analysé par spectrométrie de masse. Le spectre détermine la différence de masse en fonction de l'allèle présent chez l'individu 1 ou 2. C. Oligonucleotide Ligation Assay (OLA). Les régions contenant la mutation sont amplifiées par PCR. On réalise une expérience de ligation à l'aide d'une ADN ligase et de trois oligonucléotides, l'un commun pour les deux allèles et les deux autres spécifiques de chaque allèle et marqués par un fluorochrome spécifique (fluo 1 ou fluo 2). Si l'hybridation des oligonucléotides est parfaite, la ligation a lieu et un produit de ligation est détecté. Dans le cas contraire, la ligation n'a pas lieu et aucun produit de ligation n'est observé. D. Le "pyrosequencing". Une expérience d'extension d'amorce est réalisée sur le produit de PCR. Si le nucléotide ajouté est incorporé par l'ADN polymérase, les molécules de pyrophosphates (PPi) générées réagissent en présence d'adénosine-5'-phosphosulfate (APS) pour générer de l'ATP en présence de sulfurylase. L'ATP réagit avec la luciférase pour générer de la lumière en présence de luciférase. La quantité de lumière émise est directement proportionnelle à la quantité de nucléotide incorporé. Les nucléotides non-incorporés ainsi que l'ATP sont dégradés par l'apyrase.

une courte région de résonance en présence d'un champ électrique qui accélère les ions dans une plus longue région de dérive. Idéalement, tous les ions entrant dans la région de dérive ont la même énergie cinétique et ils ont une vitesse qui dépend de leur masse. Le temps nécessaire pour traverser la région de dérive dépend aussi de la masse de l'ion de sorte que le spectre de temps peut être converti en un spectre de masse. Les ions sont générés par des impulsions électriques à intervalles réguliers qui ouvrent ou ferment un faisceau d'ions sur l'échantillon ou qui contrôlent un laser pulsé (Cotter, 1992). Cette technique a été appliquée pour la détection des SNPs (Ross et al., 1997 ; Li et al., 1999). Sauer et collaborateurs (2000) proposent une technique en un seul tube complètement automatisée (figure 2B). En bref, (i) la région contenant le SNP est amplifiée par

PCR, (ii) les nucléotides restant sont inactivés par une phosphatase, (iii) l'étape suivante est une expérience d'extension d'amorce (primer extension) sur le produit de PCR. L'amorce utilisée contient, près de l'extrémité 3', un nucléotide chargé. Des didéoxynucléotides modifiés (α-S-ddNTP) sont utilisés lors de cette expérience. Les produits d'extension sont clivés par une endonucléase libérant les trois derniers nucléotides. Les bases sont alkylées et analysées en spectrométrie de masse.

c. La Ligation d'oligonucléotides.

Les tests de ligation tirent profit de la capacité d'une ADN ligase à joindre deux oligonucléotides adjacents quand ils sont hybridés sur un ADN cible (Landergren et al., 1988 ; Nickerson et al., 1990). La ligation se déroule seulement quand les oligonucléotides sont parfaitement com-

plémentaires de l'ADN cible. Dans le cas où on teste les deux allèles associés avec une SNP biallélique, trois oligonucléotides sont utilisés : deux oligonucléotides allèle-spécifique et un oligonucléotide commun (figure 2C). La nature exacte des modifications pour les trois oligonucléotides dépend du mode de détection et du format de la réaction. La stratégie de base est de déterminer quel oligonucléotide allèle-spécifique se lie à l'oligonucléotide commun afin de révéler l'allèle présent dans un échantillon d'ADN donné. En choisissant les amplimères de PCR et les oligonucléotides de ligation qui s'hybrident à des températures différentes, on peut combiner tous les réactifs pour réaliser la PCR et la ligation dans un seul tube (Eggerding, 1995). De plus, les tests de ligation peuvent être multiplexés (Grossman et al., 1994 ; Samiotaki et al., 1994, Iannone et al., 2000).

d. Autres méthodes

D'autres alternatives comme la PCR en temps réel (Livak et al., 1995) sont aussi prometteuses. La PCR en temps réel permet de quantifier l'ADN cible mais aussi de détecter des mutations ponctuelles. Cette technique permet de réaliser la PCR et l'hybridation dans le même tube. Cette technique (i) diminue les risques de contamination (ii) ne nécessite pas de manipulation post-PCR (iii) est une méthode rapide permettant une discrimination facile. L'analyse de deux allèles simultanément est possible. Cependant, cette technique est actuellement limitée par la faible possibilité de multiplexation. Quoique de constants progrès soient effectués (Germer et al., 2000) et le "pyrosequencing" (Ronaghi et al., 1996) s'avère également une technique de choix pour la détection des SNPs (Nyren et al., 1997). Elle est basée sur un séquençage avec une détection fluorescente des bases incorporées. Le pyrosequencing est très intéressant pour évaluer la fréquence des allèles dans une population (Kruglyak, 1999). La détection simultanée de plusieurs SNPs restent problématique, même si la technique peut être automatisée (figure 2D).

En résumé, les trois techniques d'avenir pour la détection automatisée des SNPs sont : la spectrométrie de masse et la OLA. En pratique, la figure 3 résume une stratégie

possible pour la recherche et le développement d'une plateforme de génotypage basée sur les SNPs. Cette approche est actuellement utilisée dans le cadre d'une étude chez le porc, mais pourra être étendue à d'autres espèces en cas de succès.

Le polymorphisme de restriction

Un cas particulier de ce polymorphisme " simple nucleotide " apparaît quant la mutation entraîne l'apparition ou la disparition d'un site de restriction. On appelle site de restriction, une séquence de nucléotide reconnue et clivée par une endonucléase de restriction. Il en résulte, après restriction, des différences dans la taille des fragments générés. Ce polymorphisme particulier est appelé RFLP pour " Restriction Length Fragment Polymorphism " (figure 1C).

Le polymorphisme aléatoire.

Un troisième type de polymorphisme correspond à la détection dans le génome de différences dont on ne connaît ni l'emplacement, ni la séquence. Parmi ceux-ci, on trouve principalement la RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) et l'AFLP (Amplified fragment length polymorphism). Dans la RAPD, un oligonucléotide de séquence aléatoire sert d'amorce pour la PCR. Il va s'acrocher sur le génome à des endroits présentant une séquence complémentaire à la sienne. L'amplification par PCR produit une série de fragments de tailles différentes (figure 1D). Le patron obtenu est caractéristique d'un individu. Le problème de la RAPD réside dans la reproductibilité des résultats qui varient en fonction des conditions de PCR, de l'enzyme ou de l'appareil utilisé (Meunier et Grimont, 1993), mais aussi d'une fois à l'autre toute chose étant égale (Perez et al., 1998). De plus, les résultats observés et les résultats théoriques déduits de la séquence du phage lambda ne correspondaient pas (Perez et al., 1998). Par conséquent, la nature de la variation génétique mise en évidence par la RAPD n'est pas claire. Compte tenu de ces considérations, la prudence devrait guider les conclusions basées sur la seule RAPD. L'AFLP (Vos et al., 1995) se déroule en trois étapes. L'ADN génomique est digéré par deux enzymes et les fragments générés sont ligaturés à des adapta-

Procédure de sélection et de détection des SNPs

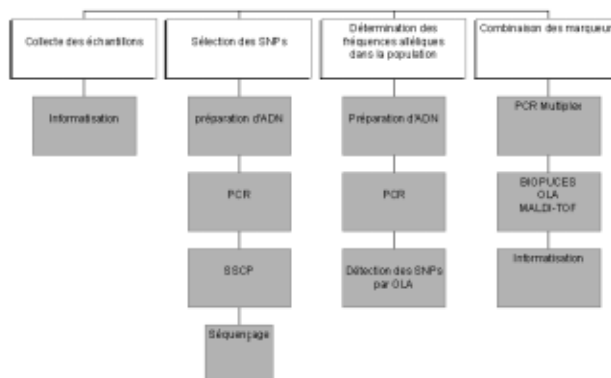


Figure 3. Stratégie pour la mise au point d'une plateforme de génotypage basée sur les SNPs. Un échantillonnage de la population est effectué. Ces échantillons sont introduits dans une base de données. L'ADN génomique de ces échantillons est préparé en utilisant un robot d'extraction. Pour la sélection des SNPs, on utilise les séquences présentes dans les banques (Genbank, ...). Sur base de celles-ci, on choisit des amplimères permettant l'amplification de fragments de 100 à 300 pb. Les différents produits d'amplification issus d'individus différents sont analysés par SSCP. Si un polymorphisme est observé, le fragment d'amplification de chaque type est séquencé afin d'identifier et de localiser la mutation ponctuelle. La fréquence de chaque allèle est étudiée sur l'ensemble des échantillons de la base de données par OLA. Les SNPs les plus intéressantes sont retenues. L'étape suivante consiste en une détection simultanée des SNPs sélectionnées soit par OLA, MALDI-TOF ou Biopuces. Les résultats obtenus pour un individu sont traduits en code binaire. Ce code sera l'empreinte génétique de l'individu.

teurs oligonucléotidiques. La deuxième étape est une étape de PCR en deux phases : d'abord une amplification non sélective de chaque fragment de restriction en utilisant des primers complémentaires aux adaptateurs et ensuite une amplification sélective en utilisant des primers complémentaires des adaptateurs, du site de restriction et de un ou deux nucléotides en aval du site, afin de diminuer la complexité du patron obtenu. La troisième étape est une analyse électrophorétique des fragments générés avec obtention d'un patron spécifique de l'ADN étudié. Cette technique a été utilisée avec succès dans la caractérisation d'ADN porcins notamment (Ovilo et al., 2000).

DISCUSSION

Puisque le patrimoine génétique contenu dans chacune des cellules des individus est identique et puisque deux individus présentent des variations dans leur séquence en ADN, un individu peut être caractérisé par la séquence de son ADN. Ainsi, l'utilisation des marqueurs génétiques permet de suivre, à la trace, l'individu ou n'importe quelle cellule nucléée de celui-ci. C'est pourquoi cette approche devrait permettre de suivre un animal de rente de l'étable à la table tout au long de la filière de

transformation. Quelles sont les qualités requises pour une plateforme de génotypage ? Il faut que les analyses soient rapides et peu coûteuses et que les marqueurs génétiques choisis soient discriminants (entre espèces, entre races et entre individus). Les résultats doivent être facilement interprétables et transformables en un génotype tenant en une formulation simple éventuellement ajoutable aux systèmes de traçabilité administratives déjà existants.

Il résulte de cette première analyse que les marqueurs génétiques les plus efficaces semblent être les microsatellites et les SNPs. L'utilité des SNPs en tant que marqueurs génétiques reste un sujet de discussion. Il est important d'en apprécier les avantages et d'en connaître les limites. L'intérêt des SNPs s'est focalisé sur les technologies potentielles pour tester cette classe de marqueurs génétiques qui engendrent des tests simples du type oui/non pouvant être réalisés en parallèle et automatisés. Les SNPs sont généralement bialléliques, il y a deux allèles qu'un individu peut avoir pour chaque marqueur. Cela signifie que l'information contenue par SNP est relativement faible si on la compare à l'information contenue dans les marqueurs

de type microsatellites qui peuvent avoir 10 allèles ou plus (selon le nombre de fois que l'unité de base est répétée). On estime qu'il faut en moyenne 5 marqueurs SNPs pour égaler l'information contenue dans un microsatellite (Chakraborty et al., 1999). Il faut donc un nombre suffisant de marqueurs (au moins 20) pour distinguer des individus. Ceci pose le problème de la multiplexation de la PCR qui est souvent l'étape limitante (Pastinen et al., 2000). Les SNPs ont tendance à être spécifiques d'une population ; un marqueur qui est polymorphe dans une population peut ne pas l'être dans une autre. Cela signifie que les marqueurs SNPs devront être générés spécifiquement pour la population étudiée. En comparaison, les marqueurs microsatellites sont polymorphes à travers diverses populations ce qui signifie qu'une fois générés, ils sont d'usage universel. Mais si on étudie une population où les croisements consanguins sont fréquents comme c'est le cas des élevages porcins en Belgique, les mêmes SNPs peuvent être utilisés. De plus, si on sélectionne un nombre suffisant de marqueurs (40-50) le pouvoir discriminant en sera augmenté. De plus, les SNPs sont fréquents (tous les 1000 bases) dans la plupart des génomes offrant le potentiel pour générer des cartes génétiques très denses qui peuvent être très utiles pour le repérage de gènes ou de régions d'intérêt. De par la nature des SNPs, ils peuvent être

associés avec les phénotypes pathologiques étudiés. Le taux de mutation bas des SNPs en font également de bons marqueurs pour étudier des traits génétiques complexes. Le défi futur sera d'intégrer au mieux ces deux types de marqueurs génétiques (SNPs et microsatellites) pour développer des outils de génotypages à la fois puissants et flexibles.

REMERCIEMENTS

Bernard China et Raphaël Noirfalise sont des boursiers First-Europe

SUMMARY :

Tracability in meat processing. The genetic markers.

In order to assure a tracability along the meat transformation chain, a powerful tracability system is required. The administrative tracability shows limits that the use of genetic markers could overcome. The individual genome contains sequence differences, basis of the genetic polymorphism of which the genetic markers are the witnesses. Among them, two classes seem to dominate on the tracability field : the microsatellites and the single nucleotide polymorphisms.

Microsatellites are characterized by a high level of polymorphism with a lot of alleles for the same locus. Moreover, their detection is directly possible by polymerase chain reaction. Technically, the problem raised when simultaneous detection of several microsatellites is achieved due to the complexity of the obtained pattern. Single nucleotide polymorphisms are single nucleotide mutations in the nucleotidic sequence. They are frequent, stable, randomly scattered and generally biallelic. Their detection is performed either by hybridization on biochips or by mass spectrometry or by other easily automatable technics. This automation is required to test simultaneously a great number of polymorphisms in a large number of samples allowing to decrease the cost. The major advantage of single nucleotide polymorphism is the binary signal obtained and its major drawback is its population specific character of this genetic marker type.

REFERENCES

- BOTSTEIN D., WHITE R. L., SKOLNICK M. DAVIES R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, 1980, 32, 314-331.
- BROW M.A., OLDENBURG M.C., LYAMICHEV. V., HEISLER L.M., LYAMICHEVA. N., HALL J.G., EAGAN N.J., OLIVE D.M., SMITH L.M., FORS L., DAHLBERG J.E. Differentiation of bacterial 16S rRNA genes and intergenic regions and mycobacterium tuberculosis katG genes by structure-specific endonuclease cleavage. *J. Clin. Microbiol.*, 1996, 34, 3129-3137.
- CARGILL M., ALTSHUER D., IRELAND J., SKLAR P., ARDLIE K., PATIL N., LANE C. R., LIM E. P., KALAYANARAMAN N., NEMESH J., ZIAUGRA L., FRIEDLAND L., ROLFE A., WARRINGTON J., LIPSHUTZ R., DALEY G. Q., LANDER E. S. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat. Genet.*, 1999, 22, 231-238.
- CHAKRABORTY R, STIVERS DN, SU B., ZHONG Y., BUDWOLE B. The utility of short tandem repeat loci beyond human identification : implications for development of new DNA typing systems. *Electrophoresis*, 1999, 20, 1682-1696.
- CHEE M., YANK R., HUBBELL E., BERNO A., HUANG X. C., STERN D., WINKLER J., LOCKHART D. J., MORRIS M. S., FODOR S. P. A. Accessing Genetic information with high-density arrays. *Science*, 1996, 274, 610-613
- CHEN X., KWOK P.Y. Template-directed dye-terminator incorporation (TDI) assay : a homogeneous DNA diagnostic method based on fluorescence resonance energy transfer. *Nucleic. Acids. Res.*, 1997, 25, 347-353.
- COLLINS F. S., GUYER M. S., CHAKRAVARTI A. Variations on a theme : cataloging human DNA sequence variations. *Science*, 1997, 278, 1580-1581.
- COPPIETERS W., VAN DE WEGHE A., DEPICKER A., BOUQUET Y., VAN ZEVEREN A. A hypervariable pig DNA fragment. *Animal Genetics*, 1990, 21, 29-38.

- COPPIETERS W., ZIJLSTRA C., VAN DE WEGHE A., BOSMA A. A., PEELMAN L., VAN ZEVEREN A., BOUQUET Y. A porcine minisatellite located on chromosome 14q29. *Mammalian Genome*, 1994, 5, 591-593.
- COTTER R.J. Time-of-flight mass spectrometry for the structural analysis of biological molecules. *Anal. Chem.*, 1992, 64, 1027A-1039A.
- COTTON R.G., RODRIGUES N.R., CAMPBELL R.D. Reactivity of cytosine and thymine in single-base-pair mismatches with hydroxylamine and osmium tetroxide and its application to the study of mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, 85, 4397-4401.
- DAVIES W., KRAN S., KRIESTEN T., HARBITZ I. Characterization of a porcine variable number tandem repeat sequence specific for the glucosephosphate isomerase locus. *Animal Genetics*, 1992, 23, 437-441.
- DUBILEY S., KIRILOV E., MIRZABEKOV A. Polymorphism analysis and gene detection by minisequencing on an array of gel-immobilized primers. *Nucl. Ac. Res.*, 1999, 27, e19EGGERDING F.A. A one-step coupled amplification and oligonucleotide ligation procedure for multiplex genetic typing. *PCR Methods Appl.*, 1995, 4 : 337-345.
- EVRARD, V., CHINA, B., NOIRFALISE, R., DAUBE G., CLINQUART, A. La traçabilité dans la filière viande. I. La traçabilité administrative. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 2001, 145, 15-24.
- FODOR S. P. A., READ J. L., PIRRUNG M. C., STRYER L., LU A. T., SOLAS D. Light-directed spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science*, 1991, 251, 767-773.
- GANGULY A., PROCKOP D. J. Detection of single base mutations by reaction of DNA heteroduplexes with water soluble carbodiimide followed by primer extension : application to products from the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.*, 1990, 18, 3933-3939.
- GERMER S., HOLLAND M. J., HIGUCHI R. High-throughput SNP allele-frequency determination in pooled DNA samples by kinetic PCR. *Genome Res.*, 2000, 10, 258-266.
- GRIFFIN T., HALL J. G., PRUDENT J. R., SMITH L. M. Direct genetic analysis by matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci ; USA*, 1999, 96, 6301-6306.
- GROSSMAN P. D., BLOCH W., BRINSON E., CHANG C. C., EGGERDING A., FUNG S., IOVANNISCI D. A., WOO S., WINN-DEEN S. High-density multiplex detection of nucleic acid sequences : oligonucleotide ligation assay and sequence-coded separation. *Nucl. Ac. Res.*, 1994, 22, 4527-4534.
- HALUSHKA M. K., FAN J. B., BENTLEY K., HSIE L., SHEN N., WEDER A., COOPER R., LIPSHUTZ R., CHAKRAVARTI A. Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. *Nat. Genet.*, 1999, 22, 239-247.
- HAWKINS G.A., HOFFMAN L.M. Base excision sequence scanning. *Nat. Biotechnol.*, 1997, 15, 803-804.
- HAYASHI K. PCR-SSCP : a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Appl.*, 1991, 1, 34-38.
- HENCO K., HARDERS J., WIESE U., RIESNER D. Temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for the detection of polymorphic DNA and RNA. *Methods Mol. Biol.*, 1994, 31, 211-228.
- HEYEN D. W., BEEVER J. E., DA Y. et al. Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellite markers in fluorescent multiplexes for semi-automated parentage testing. *Anim. Genet.*, 1997, 28, 21-27.
- IANNONE M.A., TAYLOR J.D., CHEN L., LI M.S., RIVERS P., SLENTZ-KESLER K.A., WEINER MP. Multiplexed single nucleotide polymorphism genotyping by oligonucleotide ligation and flow cytometry. *Cytometry*, 2000, 39, 131-140.
- JEFFREYS A. J., WILSON V., THEIN S. L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 1985, 314, 67-73.
- JUNEJA R. K., VOGELI P. Biochemical genetics In : Rotschild M. F., Ruvinsky A. (Eds.), *The genetics of the pig*. CAB International : Wallingford, 1998, 105-134.
- KARAS M., HILLENKAMP F., Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.*, 1988, 60, 2299.
- KEEN J., LESTER D., INGLEHEARN C., CURTIS A., BHATTACHARYA S. Rapid detection of single base mismatches as heteroduplex by hydrolysis gel. *Trends Genet.*, 1991, 7, 5.
- KRAWCZAK M. Informative assessment for biallelic single nucleotide polymorphisms. *Electrophoresis*, 1999, 20, 1676-1681.
- KRUGLYAK L. Prospects for the whole genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. *Nat. Genet.*, 1999, 22, 139-144.
- KWOK P.Y., CARLSON C., YAGER T.D., ANKENER W., NICKERSON D.A. Comparative analysis of human DNA variations by fluorescence-based sequencing of PCR products. *Genomics*, 1994, 23, 138-144.
- LANDERGREN U., KAISER R., SANDERS J., HOOD L. *Science*, 1988, 241, 1077-1080.
- LANDERGREN U., NILSSON M., KWOK P. Y. *Genome Res.*, 1998, 8, 769-776.
- LI J., BUTLER J. M., LIN H., ROYER S., OHLER L., SHALER T. A., HUNTER J. M., POLLART D. J., MONFORTE J. A., BECKER C. H. Single nucleotide polymorphism determination using primer extension and time-of-flight mass spectrometry. *Electrophoresis*, 1999, 20, 1258-1285.
- LIVAK K. J., MARMARO J. A. Towards fully automated genome-wide polymorphism screening. *Nature Genetics*, 1995, 9, 341-342.
- MARSHALL A., HODGSON J. DNA chips : an array of possibilities. *Nat. Biotechnol.*, 1998, 16, 27-31.
- MEUNIER J. R., GRIMONT P. A. Factors affecting reproductibility of random amplified polymorphic DNA. *Res. Microbiol.*, 1993, 144, 373-379.
- MORAN C. Molecular genetics. In : Rotschild M. F., Ruvinsky A. (Eds.), *The genetics of the pig*. CAB International : Wallingford, 1998, 135-162.
- MYERS R.M., LARIN Z., MANIATIS T. Detection of single base substitutions by ribonuclease cleavage of mismatches in RNA :DNA duplexes. *Science*, 1985, 230, 1242-1246.

- NAKAMURA Y., LEPPERT M., O'CONNELL P., WOLFF R., HOLM T., CULVER M., FUJIMOTO E., HOFF M., KUM-LIN E., WHITE R. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science*, 1987, 235, 1616-1622.
- NEI M., ROYCHOUDHURY A. K. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*, 1974, 76, 379-390.
- NICKERSON D.A., KAISER R., LAPPIN S., STEWART J., HOOD L., LANDERGREU U. Automated DNA diagnostics using ELISA-based oligonucleotide ligation assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87, 8923-8927.
- NIKIFOROV T.T., RENDLE R. B., GOEBLET P., ROGERS Y. H., KOTEWICZ M. L., ANDERSON S., TRAINOR G. L., KNAPP M. R. Genetic bit analysis : a solid phase method for typing single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acides Res.*, 1994, 22, 4167-4175.
- NYREN P., KARAMOHAMED S., RONAGHI M. Detection of Single-base changes using bioluminometric primer extension assay. *Anal. Biochem.*, 1997, 244, 366-373.
- OVILO C., CERVERA MT, CASTELLANOS C., MARTINEZ-ZAPATER JM. Characterisation of iberian pig genotypes using AFLP markers. *Animal Genetics*, 2000, 31, 117-122.
- PASTINEN T., KURG A., METSPALU A., PELTONEN L., SYVANEN A.-C. Minisequencing : a specific toll for DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide arrays. *Genome Research*, 1997, 7 :606-614.
- PASTINEN T., RAITIO M., LINDROSS K., TAINOLA P., PELTONEN L., SYVANEN A.-C. A system for specific, high-throughput genotyping by allele-specific primer extension on microarrays. *Genome Research*, 10 :1031-1042.
- PEASE A. C., SOLAS D., SULLIVAN E. J., CRONIN M. T., HOLMES C. P., FODOR S. P. A. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 5022-5026.
- PEELMAN L. J., MORTIAUX F., VAN ZEVEREN A., DAN-SERCOER A., MOMMENS G., COOPMAN F., BOUQUET Y., BURNY A., RENAUVILLE R., PORTETELLE D. Evaluation of the genetic variability of 23 bovine microsatellite markers in four belgian cattle breeds. *Animal Genetics*, 1998, 29, 161-167.
- PEREZ T., ALBORNOZ J., DOMINGUEZ A. An evaluation of RAPD fragment reproductibility and nature. *Mol. Ecol.*, 1998, 7 , 1345-1357
- RONAGHI M. et al. Real-Time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal. Biol. Chem.*, 1996, 242, 84-89.
- ROSS P. L., LEE K., BELGRADER. P. Discrimination of single-nucleotide polymorphisms of human DNA using peptide nucleic acid probes detected by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 1997, 69, 4197-4202.
- SAMIOTAKI M., KWIATKOWSKI M., PARIK J., LANDERGREU U. Dual-color detection of DNA sequence variants by ligase-mediated analysis. *Genomics*, 1994, 20, 238-242.
- SAUER S., LECHNER D., BERLIN K., LEHRACH H., ESCARY J. L., FOX N., GUT I. G. A novel procedure for efficient genotyping of single nucleotide polymorphisms. *Nucl. Acid Res.*, 2000, 28, e13.
- SHEFFIELD V.C., COX D.R., LERMAN L.S., MYERS R.M. Attachment of a 40-base-pair G+C rich sequence (GC clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86, 232-236.
- SIGNER E. N., GU F., GUSTAVSSON I., ANDERSSON L., JEFFREYS A. J. A pseudoautosomal minisatellite in the pig. *Mammalian Genome*, 1994, 5, 48-51.
- TANAKA K., WAIKI H., IDO Y., AKITA S., YOSHIDA Y., YOSHIDA T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1988, 2, 151.
- TYAGI S., BRATU D, KRAMER F.R. Multicolor beacons for allele discrimination. *Nature Biotechnol.*, 1998, 16, 49-53.
- TYAGI S., KRAMER F.R. Molecular Beacons : probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnol.*, 1996, 14, 303-308.
- UNDERHILL P.A., JIN L., LIN A.A., MEHDI S.Q., JENKINS T., VOLLRATH D., DAVIS R.W., CRAVALI-SFORZA L.L., OEFNER P.J. Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography. *Genome Res.*, 1997, 7, 996-1005.
- VOS P., HOGERS R., BLEEKER M. et al. AFLP : a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Ac. Res.*, 1995, 23, 4407-4414.
- WANG D. G., FAN J. B., SIAO C. J., BERNO A., YOUNG P., SAPOLSKY R. , GHANDOUR G., PERKINS N., WINCHESTER E., SPENCER J., KRUGLYAK L., STEIN L., HSIE L., TOPALOGLOU T., HUBBELL E., ROBINSON E., MITTMANN M., MORRIS M. S., SHEN N., KILBURN D. ? RIOUX J., NUSBAUM C., ROZEN S., HUDSON T. J., LIPSHUTZ R., CHEE M., LANDER E. S. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*, 1998, 280, 1077-1082.