**La FISH (HYBRIDATION IN SITU EN FLUORESCENCE)**

1. **L'hybridation moléculaire**

C’est l'opération qui consiste à mettre en présence la sonde dénaturée généralement par la chaleur et l'ADN des chromosomes et des noyaux également dénaturés. Son efficacité dépend du temps d'hybridation et de la concentration de la sonde. Le temps d'hybridation varie de 5 minutes pour des sondes centromériques, a 24 ou 48 heures pour les sondes plus complexes comme les sondes de peinture.

Dans la grande majorité des cas, l'hybridation est dite ≪ compétitive ≫. En effet, l'ADN est compose de 40% de séquences répétées et de 65% de séquences uniques, ce qui correspond a la composition des sondes (a l’exception des sondes centromériques et telomériques).

Apres marquage, ces séquences répétées vont s’hybrider sur leurs cibles génomiques engendrant des signaux aspécifiques. Pour les éviter, Lengoer et al. En 1986 ont eu l'idée d'ajouter a l’ADN de la sonde un excès d'ADN non marque riche en séquences répétées (appelé aujourd'hui ADN Cot1). Ainsi cet ADN s’hybride non seulement sur les séquences répétées de la sonde mais aussi sur celles des cibles génomiques. Cette méthode appelée hybridation « compétitive » permet d'éviter les signaux aspécifiques

1. **Dissociation ou dénaturation**

Lorsque l'ADN double brin est chauffé à une température dite de fusion, ou Tm (pour « melting temperature »), les deux brins se séparent suite à la rupture des liaisons hydrogènes qui les maintiennent appariés. La double hélice se défait, il y a perte de la structure secondaire, on dit que l'ADN est dénaturé. Ce terme est employé pour toutes les macromolécules. Par exemple, lorsqu’on détruit les liaisons faibles d’une protéine, il y a perte de la structure tridimensionnelle, la protéine est dénaturée.

Le Tm dépend de deux facteurs principaux : du nombre de liaisons hydrogènes et de la composition du milieu.

Le nombre de liaisons hydrogène lui-même dépend :

- **de la longueur du fragment** : le Tm augmente avec la longueur. Toutefois, le nombre de liaisons hydrogènes est important en dessous de 150-200 liaisons. Au-delà, la dénaturation devient principalement un phénomène coopératif, et le nombre de bases n’est plus important. On tiendra donc compte de la longueur des fragments principalement pour l’hybridation des oligonucléotides.

**- de la composition en bases** : l'augmentation de la proportion en GC augmente le Tm. Il y a en effet 3 liaisons hydrogènes entre les bases G et C et 2 entre les bases A et T. Donc plus la proportion en GC est importante, plus la température de fusion sera élevée.

- **de la présence de mésappariements** : Les mésappariements abaissent le Tm, puisque au niveau du mésappariement, il n’y a pas de liaison hydrogène.

Plusieurs éléments du milieu contribuent à l’établissement des liaisons hydrogènes et seront utilisés pour faire varier le Tm.

- **la force ionique**. L’augmentation de la concentration en cations monovalents tel que le NaCl joue sur le Tm. Le NaCl masque les charges négatives des phosphates et ainsi diminue les forces de répulsion électrostatique entre les deux brins. Ainsi moins il y a de sel, plus les forces de répulsion sont importantes, plus le Tm est bas.

- Certains composés tels que la formamide ou l'urée abaissent le Tm. Ces composés forment des liaisons hydrogènes avec les bases et donc entrent en compétition avec les liaisons interbases.

- le pH est aussi important. Aux pH extrêmes, l’ADN est dénaturé. A température ambiante, on utilise souvent le NaOH pour dénaturer l'ADN.

**3- Les sondes et leurs marquages**: Une sonde nucléotidique est un segment de nucléotide qui permet de rechercher de manière spécifique un fragment d’acide nucléique que l’on désire étudier. Cette réaction sonde –fragment correspond a une  réaction d’hybridation moléculaire. Avec les progrès des techniques, il est possible de générer aujourd‘hui des fragments d‘ADN de tailles variées correspondant à différentes parties d‘un chromosome. Le marquage est l’étape qui permet d’introduire des fluorochromes dans un fragment d’ADN. Au début des années 80, on utilisait des nucléotides, le plus souvent le dUTP, couplé aux haptènes que sont la digoxigénine et la biotine. Les sondes étaient alors révélées grâce à des anticorps antidigoxigénine ou de la streptavidine (substance se fixant spécifiquement sur la biotine) couplés à des fluorochromes.

Aujourd’hui, les fluorochromes sont directement fixés sur les nucléotides. Différents procédés sont utilisés pour incorporer un fluorochrome dans un fragment d’ADN. Les plus connues sont le Random-priming et la Nick-translation.

**a- Les fluorochromes**

Les fluorochromes sont des molécules capables d’être excitées (accumulation d’énergie) par une longueur d’onde donnée, appelée longueur d’onde d’excitation (λ exc) et de restituer une partie de cette énergie sous l’aspect d’une longueur d’onde de moindre énergie appelée longueur d’onde d’émission (λ em). Ils sont donc tous caractérisés par une longueur d’onde d’excitation et une longueur d’onde d’émission.

Les fluorochromes couramment utilisés sont :

· **Le DAPI (4’,6-diamidino-2-phenylindole)** (310nm – 372nm) se fixe sur les régions riches en AT de l’ADN et est appliqué directement sur les préparations chromosomiques après l’hybridation pour colorer de façon aspécifique tous les chromosomes, ce qui permet de les repérer.

· **Le FITC (Fluorescein isothiocyanate)** (exc 495nm – λem 519nm) fluoresce dans le vert

· **La Cyanine 3** (Cy3) (λexc 495nm – λem 519nm) fluoresce dans l’orange

· **Le Texas red** (λexc 589nm – λem 615nm) fluoresce dans le rouge

· **La Cyanine 5** (λexc 650nm – λem670nm) fluoresce dans le rouge

· **La Cyanine 5.5** (λexc 675nm – λem 694nm) fluoresce dans le rouge

**4- Différents types d’hybridation**

1. **Hybridation en phase liquide**

Dans ce cas les deux brins sont en solution. On utilise l’hybridation en phase liquide dans plusieurs cas, par exemple :

**a)** Pour mesurer le Tm, en utilisant le fait que les acides nucléiques simples brins absorbent plus que les doubles brins.

**b)** Pour délimiter les introns et les exons d’un gène.

On utilise ici un fragment d’ADN génomique qui est cloné (inséré dans un plasmide). On peut donc en avoir une grande quantité.

- L’ADN est marqué de manière spécifique en général à une extrémité. Il est ensuite dénaturé puis hybridé avec une population d’ARN messager provenant d’une population de cellules (tissus, individu ou culture cellulaire)

- Seules les parties complémentaires s’hybrident, les autres restent simple brin.

- L’ADN simple brin est digéré par la nucléase S1 qui ne digère que le simple brin (ARN ou ADN).

Les fragments d’ADN sont visualisés sur gel après autoradiographie.

**c)** Comparaison des tailles de génome sans séquence répétitive. On met dans un tube une préparation d’ADN d’un organisme. Du fait des manipulations effectuées lors de la purification, le génome est représenté par des fragments d’environ 100 kilobases (kb). On chauffe l’échantillon au-dessus du Tm puis on le refroidit à une température en dessous du Tm. Plus le génome est grand, ou plus exactement plus il est complexe, moins deux brins complémentaires auront de chance de se rencontrer pour une concentration d’ADN donnée. A l’inverse, moins le génome est complexe, plus la concentration des brins complémentaires sera élevée, plus l’hybridation sera rapide. On a donc ici un moyen d’estimer la complexité relative d’un ADN.

**d)** Hybridation d'une amorce (les DNA polymérases ont besoin d'une amorce. *In vivo,* cette amorce est fournie par la primase qui est une RNA polymérase. *In vitro*, l'amorce est le plus souvent un oligonucléotide qui est synthétisé chimiquement).

- Hybridation d'extrémités cohésives.

Les DNases de restriction génèrent souvent des fragments complémentaires. Ces fragments peuvent s'hybrider ce qui va faciliter une ligation.

Le phage λ présente à ses extrémités des bouts complémentaires (extrémités cohésives ou cos

qui peuvent s'hybrider sur 12 bases)

***2)* Hybridation sur support solide**

L'immobilisation de l'une des séquences complémentaires facilite certaines manipulations quoiqu’elle soit souvent moins sensible du fait que le support masque souvent une partie des bases.

**a) Fixation sur gel de chromatographie :**

On utilise par exemple la chromatographie d'affinité sur oligodT pour purifier les ARN polyA+. On utilise un support de chromatographie sur lequel on a fixé des oligonucléotides ne comportant que des T (oligodT).

On passe sur la colonne une solution d’ARN totaux eucaryotes, dans des conditions inférieures au Tm. Les ARN messagers polyadénylés en 3’ s’hybrident aux oligodT de la colonne.

Par contre, les ARN ribosomiques et ARN de transfert passent à travers sans être retenus. Pour décrocher les ARN messager hybridés dans la colonne, il suffit d’augmenter le Tm par exemple en diminuant la concentration de sel de la phase mobile et en chauffant. A partir d’une solution d’ARN totaux, on obtient une solution fortement enrichie en ARN polyadénylés c’est à dire en ARN messager. La fraction retenue correspond aux ARN polyA+, la fraction non retenue aux polyA-.

**b) Fixation sur membrane**:

Il y a plusieurs sortes de membranes : la nitrocellulose, le Nylon ou la lamelle de verre. La fixation de l’ADN sur la nitrocellulose s’effectue par cuisson à 80°C, et l’irradiation aux UV (254 nm) permet de réaliser des liaisons covalentes entre les acides nucléiques et le Nylon. La fixation sur lamelle de verre s’effectue grâce à des linkers, des molécules fonctionnalisées qui permettent de lier des fragments d’ADN par leur extrémité à l’aide de liaisons chimiques covalentes.

Le Southern, le northern et la puce à ADN sont quelques exemples d’utilisation de ce type support.

**La FISH (HYBRIDATION IN SITU EN FLUORESCENCE)**

1. **Historique**

L'hybridation in situ fut appliquée à l'homme au début des années 70 pour localiser des séquences d'ADN satellite, jusqu'en 1981, seules les séquences hautement répétées purent être localisées.

Le principe consistait à hybrider une sonde d'ADN marquée par un radio isotope sur une préparation chromosomique ; la détection était réalisée par autoradiographie. L'analyse s'effectuait par comptage des grains d'argent sur les chromosomes colorés au Giemsa.

Au début des années 80 des améliorations techniques permirent la mise en évidence de séquence unique : utilisation de sondes clonées, introduction du sulfate de dextran dans la solution d'hybridation permettant d'augmenter le signal d'hybridation. Cependant, malgré leur réelle efficacité, la lourdeur de ces techniques nécessitant l'utilisation de la radioactivité en limitait l’exploitation : précautions liées à la manipulation de radio-isotopes, durée des temps d'exposition (2 à 3 semaines), longueur de l'analyse, manque de précision dans la localisation des signaux.

L'introduction de marqueurs non radioactifs par modification chimique ou physique des acides nucléiques (marquage enzymatique des sondes par la biotine ou la digoxigénique détectées indirectement par des anticorps spécifiques) et le développement de systèmes de détection efficace, notamment la fluorescence (sonde marquée directement par un fluorochrome) a permis aux laboratoires de diagnostics une utilisation en routine devenue indispensable au début des années 90.

Les multiples progrès ont permis l'apparition de nouveaux outils spécialisés basés sur les mêmes principes. : FISH multicouleurs, CGH (hybridation génomique comparative), biopuces à ADN...Utilisées pour des applications particulières et exploitées par certains centres.

1. **Définition de FISH** : L'hybridation in situ fluorescente ("fluorescent in situ Hybridization": FISH) est une méthode d’analyse du génome très éclectique puisqu' elle peut s' appliquer aussi bien aux noyaux interphasiques qu'aux préparations chromosomiques. En outre, elle permet de cibler des chromosomes entiers, des régions chromosomiques spécifiques (centromères) voire des "loci" uniques. On parle d'hybridation in situ quand l'expérience d'hybridation est faite directement sur des préparations cytogénétiques ou cytologiques sans que 1'architecture du chromosome ou de la cellule ne soit modifiée.
2. **Principe du (FISH)**

Cette toute première technique de cytogénétique moléculaire repose sur trois propriétés de l’ADN :

\*\* La complémentarité obligatoire des bases azotées (Adénine—Thymin, Cytosine—Guanine).

\*\* Les liaisons hydrogènes faibles (covalente) qui assurent la cohésion des deux brins de la double hélice.

\*\* Les liaisons phosphodiester (40 fois plus fortes que les liaisons hydrogènes) qui assurent la stabilité de l’enchainement des nucléotides de chaque brin d’ADN.

Dans certaines conditions de température, de pH ou de salinité, les deux brins d’une molécule d’ADN peuvent se séparer (phénomène appelé dénaturation) puis se réassocier de façon spécifique (étape appelée la renaturation).

En 1981, l’équipe de David Ward intègre par voie chimique un nucléotide (du dUTP) couplé à de la biotine dans un fragment d’ADN (cette opération s’appelle le «marquage ») qui est alors appelé « sonde ». Dénaturée, puis hybridée sur des préparations chromosomiques, elles aussi préalablement dénaturées (cette étape est la formation d’hybrides).

Les hybrides non spécifiques et les sondes non hybridées sont éliminés par des lavages. La sonde hybridée est révélée par des anticorps anti-biotine couplés à un fluorochrome, le FITC.

Grâce à un microscope qui émet un faisceau lumineux excitant le FITC, David Ward visualisa directement sur des chromosomes la localisation de la sonde.

Ainsi naquit l’hybridation in situ fluorescente, permettant l’observation de loci sur des métaphases ou des noyaux, d’ou le terme in situ (à la différence du Southern blot qui est l’hybridation d’une sonde sur de l’ADN fixé sur une membrane de nylon).

L’utilisation de plusieurs fluorochromes et de filtres microscopiques ainsi que le développement de système de numérisation des signaux fluorescents ont permis d’hybrider plusieurs sondes de façon concomitante. Grâce à ces progrès, il est possible aujourd’hui d’étudier de façon simultanée plus de 20 loci sur des chromosomes.



**Principe de la FISH**

1. **Substrats de la FISH**

Le substrat habituel est une préparation chromosomique de métaphase ou d’interphase obtenue par caryotype classique (culture, blocage, choc, fixation, étalement).

Pour l’analyse des métaphases, les lames fraîches permettent d’obtenir un meilleur résultat que les lames congelées, mais les culots fixés de manière prolongée à -20°C sont également analysables.

Des noyaux interphasiques de préparations cellulaires totales (étalement de sang, de moelle osseuse,…) ou des sections minces de tissu paraffiné peuvent être également utilisées.

**4-Sondes utilisées**

Pour la FISH, on utilise des sondes spécifiques de régions chromosomiques ou des sondes capables de s’hybrider sur les bras d’une paire chromosomique donnée ou loci particuliers.

On distingue deux grandes catégories de sondes :

● **Les sondes composées de séquences spécifiques d’ADN répété** : Elles sont de petite taille (moins de 1000 paires de bases ou 1 kilo base), mais s’hybrident sur des séquences spécifiques (séquences alphoides des centromères ou séquence d’hétérochromatine) répétées en tandem sur plusieurs centaines de kilo bases. Elles génèrent des signaux ponctuels de forte intensité.

● **Les sondes composées de séquences uniques** : On distingue les sonde spécifiques de loci et les sondes spécifiques d’un bras chromosomique ou d’un chromosome entier.

Les différents types de sondes commercialisées sont :

Les sondes centromériques, locus spécifiques, telomériques et subtélomériques et les sondes de peinture chromosomiques.

**Les sondes CEP (Chromosome Enumeration Probe)**: elles s'hybrident au niveau des centromères des chromosomes. Les séquences dont elles sont complémentaires sont naturellement présentes en un grand nombre d'exemplaires au niveau des centromères ; le signal obtenu est donc en général intense car la sonde s'hybride sur chacune des séquences complémentaires présentes. Ces sondes sont surtout utiles pour dénombrer les chromosomes, aussi bien en métaphase qu'en interphase et pour identifier l'origine de chromosomes marqueurs.

**Les sondes LSI (Locus Specific Identifier)** : comme leur nom l'indique, ces sondes de petite taille permettent d'identifier une région très précise du génome.

Elles sont obtenues par marquage de l'ADN cloné dans différents vecteurs (plasmides, cosmides, YACS, BACs...).

Leur intérêt principal réside dans la mise en évidence rapide de remaniements impliquant une région chromosomique précise (microdélétions, translocations, inversions ...)

La sonde LSI est souvent associée à une sonde contrôle correspondant à un locus du même chromosome afin d’être sur que l’hybridation a eu lieu d’une part et pouvoir localiser le chromosome étudié d’autre part.

Pour être bien détectée, cette sonde doit avoir une taille>25kb et recouvrir plus de 50% de sa cible.

Le télomère localisé à chacune des deux extrémités d’une chromatide maintient l’intégrité du chromosome, il est constitué d’une répétition en tandem de6 paires de base 5’TTAGGG3’ d’une longueur jusqu’à 30kb. Ces sondes peuvent alors détecter tous les télomères.

Les régions subtélomériques sont constituées aussi d’une répétition de séquences mais avec une périodicité et longueur spécifiques de chaque chromosome. L’utilisation de sondes spécifiques permettra de mettre en évidence des anomalies cryptiques à ce niveau.

**Les sondes WCP (Whole Chromosome Painting)** : sonde peinture chromosomique ; elles sont constituées d'un ensemble de sondes de petite taille qui couvrent l'ensemble du chromosome.

Ces sondes sont obtenues après isolement et marquage de l'ADN d'un chromosome ; leur réalisation ne nécessite pas de connaître la séquence de cet ADN.

Après hybridation, on observe un marquage de tout le chromosome. Il existe également des peintures spécifiques d'un bras ou même de quelques bandes chromosomiques.

Vue que ce type de sonde s’hybride avec toutes les séquences d’un chromosome, alors elles contiennent en plus des séquences spécifiques du chromosome cible, des séquences communes à tous les chromosomes donc il y’a un risque d’hybridation non spécifique ; ce problème a été résolu en réalisant une préhybridation de la sonde avec un ADN (dit compétiteur) comprenant uniquement les séquences communes, alors à la fin, la sonde sera constituée essentiellement des séquences spécifiques d’un chromosome donné.

Ces sondes sont très utiles pour interpréter certaines translocations complexes, mettre en évidence des échanges de petite taille, identifier précisément l'origine d'un fragment non identifié.

Les sondes ‘’réarrangements chromosomiques spécifiques‘’ ; permettent de détecter des réarrangements connus dans certaines pathologies.

**NB** : en fonction de la taille de la sonde souhaitée, différents types de vecteurs sont utilisés pour son clonage :

Plasmide (0,5 à 5kb) ; Phages (9 à 23kb) ; Cosmides (35 à 50kb) ; PAC (100 à 120kb) ; BAC (120 à 150kb) ; YAC (100 à 2Mb)

Les sondes utilisées en FISH > 35kb.

L’ensemble de ces sondes peuvent être employées seules ou être combinées entre elles pour obtenir un marquage multi couleur permettant une interprétation plus aisée de certains remaniements.

1. **La multi fluorescence**

La FISH offre la possibilité d'étudier plusieurs loci simultanément lors d’une seule hybridation. Il suffit pour cela d'hybrider des sondes marquées avec des fluorochromes différents dont les spectres d'excitation et d'émission ne se chevauchent pas. Il est également possible de marquer une sonde avec plusieurs fluorochromes. On obtient alors une sonde dont la fluorescence est complexe, composée des longueurs d'émission des différents fluorochromes. Le signal de ce type de sonde ne peut être analysé qu'après numérisation.

1. **Les étapes de FISH**
2. **Dénaturation / Hybridation**

C'est l'opération qui consiste à mettre en présence la sonde dénaturée généralement par la chaleur et l'ADN des chromosomes et des noyaux également dénaturés. Cette hybridation se déroulera dans des conditions précises de température, pH et salinité.

Un appareil nommé « thermobrite » est utilisé pour garder la préparation à s’hybrider à la température requise.

L’efficacité de cette étape dépend du temps d’hybridation et de la concentration de la sonde. Le temps d’hybridation varie de 5 minutes pour des sondes centromériques, à 24 ou 48 heures pour les sondes plus complexes comme les sondes de peinture.

Un traitement à la pepsine avec des lavages post hybridation sont nécessaires pour éliminer les hybridations non spécifiques et diminuer le bruit de fond de la préparation.

1. **Visualisation et analyse des hybrides**

Après contre coloration des noyaux, l’analyse des lames est faite à l’aide d’un microscope à épi-fluorescence équipé de filtres appropriés aux nombreux fluorochromes disponibles : isothiocyanate de fluorescéine (vert-jaune), rouge Texas, rhodamine (rouge), coumarine (bleu),…

Les molécules émettent une lumière lorsqu'elles sont excitées par une longueur d'onde appropriée. Des filtres sont disponibles avec plusieurs bandes passantes permettant de détecter plusieurs couleurs durant la même observation.

L'observation de couleurs difficilement perceptibles par l'œil humain (cyanine, rouge sombre) ou la distinction de combinaisons nombreuses couleurs (Multi-FISH) bénéficient indéniablement de l'avantage des caméras numériques de capture couplées au microscope. Il en est de même des logiciels adaptés au traitement de l'image.

7 **- Les paramètres influençant la FISH**

Plusieurs paramètres interviennent dans la qualité du résultat de la technique FISH.

**a- La taille et la nature de la sonde**

Si la sonde est constitué d’ADN génomique ; plus sa séquence est longue, plus l’hybride formé sera stable et donc facile à détecter. Cependant, plus la sonde est grande, plus elle risque de contenir des séquences répétées susceptibles de générer un bruit de fond. Les sondes de petite taille sont difficiles à visualiser sauf si leur séquence est répétée en tandem un grand nombre de fois dans l’ADN cible.

Si la sonde est constituée d’ADN complémentaire (contenant uniquement des exons), l’intensité du signal dépendra de l’organisation des séquences exoniques dans l’ADN cible : avec certaines limites, le signal sera d’autant plus fort que ces séquences sont dispersées sur une plus grande distance d’ADN cible. Ce type de sonde donne un signal d’hybridation très propre vue l’absence de séquences répétées.

**b- La concentration de la sonde**

La concentration de la sonde est à adapter en fonction de sa taille et la nature de la séquence cible

**c- La température de fusion « Tm »**

Elle correspond à la température à laquelle la moitié des molécules d’ADN et des sondes sont dénaturés (ADN simple brin). A adapter en fonction de la sonde utilisée

**d- La température et la durée d’incubation**

La température d’incubation détermine la vitesse de réassociation des séquences complémentaires de l’ADN de la sonde avec la cible. Ce paramètre est très dépendant de la Tm.

**e- Le pH du milieu**

Les solutions du milieu doivent avoir un pH entre 7 et 7.5 ce qui correspond au pH physiologique compatible avec la préservation du matériel biologique

**f- Les lavages post hybridation**

Ils permettent d’éliminer l’excès de sonde non hybridée et les hybrides non spécifiques. Leur efficacité est liée à leur stringence laquelle dépendant de : la température du lavage (37°C et 60°C), la durée de chaque bain (quelques minutes à 30minutes) et la concentration en sels de sodium.

**g- Le contenu de l’hybride en CG**

Plus le nombre des séquences CG est important plus l’hybride est stable du fait de l’importance des triples liaisons d’hydrogène générées.

**8- Les limites de la FISH**

* La réalisation de la technique FISH nécessite souvent la réussite d’une culture cellulaire (noyaux interphasiques et métaphases), ce qui n’est pas toujours obtenue.
* La FISH avec des sondes spécifiques de loci est une technique d’étude ciblée, donc la connaissance préalable de l’anomalie à rechercher est indispensable, à la différence du caryotype qui permet d’explorer l’ensemble du génome (On ne trouve que ce qu’on cherche)
* La FISH avec les sondes de peinture a une résolution de 1,5Mb pour la détection des translocations télomériques. En cas d’insertion chromosomique, elles ne permettent pas de déterminer la région chromosomique impliquée. Enfin, elles ne sont pas d’une grande utilité pour la détection des duplications.

**9- Les dérivés de la FISH**

Le développement de la biologie moléculaire a permis à la cytogénétique de prendre un nouvel essor par les techniques d’hybridation in situ fluorescente. Les techniques permettant l’analyse spécifique d’un chromosome ou d’une région chromosomique sont dénommées techniques FISH ciblées. Parmi ces sondes, nous distinguons les peintures chromosomiques, les sondes centromériques et les sondes locus spécifiques. l’apparition des procédés de multi hybridation avec plusieurs sondes sur la même préparation cellulaire a permis d’analyser l’ensemble des chromosomes en une seule expérimentation . Ces techniques permettant l’analyse simultanée de tous les chromosomes sont définies comme globales.