

# Ce que le PRINS peut faire pour vous

Franck Pellestor

Le développement des techniques d'hybridation *in situ* fluorescente (FISH) a constitué une véritable révolution méthodologique dans le domaine de la cytogénétique, et a conduit à l'émergence d'une nouvelle pratique, la cytogénétique moléculaire. La technique FISH et son vaste champ d'applications ont été présentés récemment dans ces colonnes [1]. La FISH n'est cependant pas la seule innovation qu'ait connue la cytogénétique au cours des 10 dernières années. Une approche radicalement différente de l'identification chromosomique *in situ* a été introduite en 1989 par Jorn Koch (Aarhus, Danemark), sous l'appellation de *PRImed IN Situ labeling* ou PRINS [2]. Lentement, mais sûrement, la technique PRINS suscite l'intérêt des laboratoires de cytogénétique. Le nombre de ses applications ne cesse de croître, tant en recherche qu'en diagnostic, car cette méthode présente des avantages qui en font un complément, voire une alternative intéressante aux techniques FISH.

## Principe et avantages du PRINS

L'originalité du PRINS réside dans l'utilisation de courtes amorces oligonucléotidiques de synthèse (de 18 à 35 nucléotides) qui, une fois appariées *in situ* à leurs séquences complémentaires sur l'ADN cible dénaturé, vont servir de points d'initiation à une réaction d'élongation catalysée par une polymérase, en présence d'un mélange de nucléotides. La

visualisation des fragments d'élongation engendrés *in situ* résulte de l'incorporation enzymatique dans ces fragments d'un nucléotide fluorescent ou couplé à un haptène détectable par chimio-luminescence (figure 1). La réaction PRINS combine donc la forte spécificité d'une réaction de PCR à la localisation cytotogique de séquences cibles. Comme pour toutes les réactions de PCR, il est possible de moduler à l'infini la séquence des amorces PRINS, leur synthèse pouvant être réalisée rapidement et à faible coût sur un synthétiseur automatique. A l'opposé, la réaction FISH est conditionnée par

la nécessité de disposer de sondes génomiques spécifiques, puis de marquer ces sondes avant l'hybridation. La production des sondes reste un processus délicat qui n'est pas à la portée de tous les laboratoires de cytogénétique.

La technique PRINS n'est encore pleinement efficace que pour la détection *in situ* des séquences répétées. C'est donc dans ce « créneau » que le PRINS connaît son développement le plus significatif. L'utilisation d'amorces de courte taille confère une très forte spécificité à la réaction PRINS, et permet d'éviter les problèmes de marquages croisés rencon-

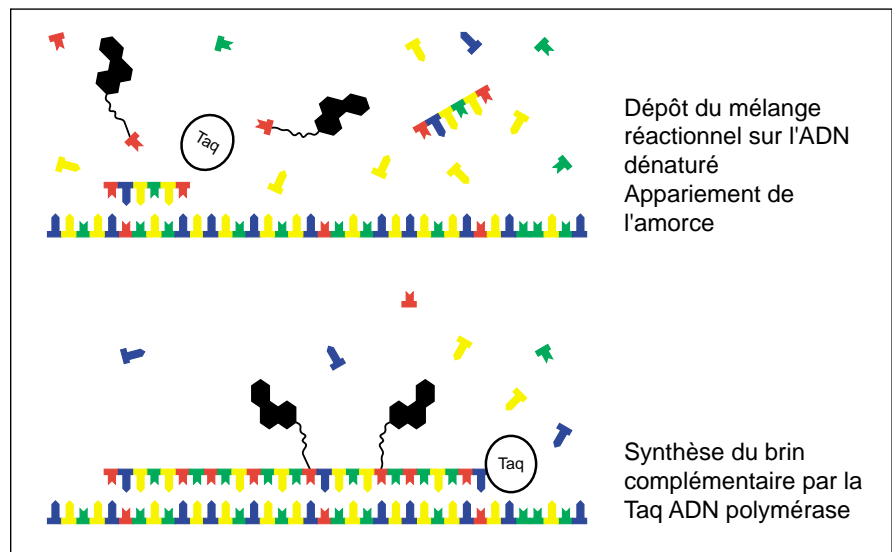


Figure 1. **Principe de la technique PRINS.** De courtes séquences oligonucléotidiques de synthèse sont utilisées comme amorces de la réaction. Une fois appariées *in situ* à leurs séquences génomiques complémentaires, elles vont servir de point de démarrage à une réaction d'élongation catalysée par la Taq DNA polymérase, en présence de nucléotides libres. La visualisation du fragment d'élongation est liée à l'incorporation d'un nucléotide marqué.

trés en FISH avec les sondes centromériques. En effet, l'essentiel des sondes utilisées pour l'identification chromosomique est produit à partir des séquences de l'ADN répété des régions centromériques ou péricentromériques. Or, la forte homologie de ces séquences dans certains chromosomes (99,7% d'homologie pour les séquences d'ADN alpha-satellite des chromosomes 13 et 21) conduit à des phénomènes d'hybridation croisée, préjudiciables à l'identification chromosomique *in situ* [3, 4]. La technique PRINS permet de contourner ce problème puisque les séquences des amorces peuvent être définies avec précision en dehors des zones d'homologie. Des amorces spécifiques ont ainsi été définies et testées pour la majorité des chromosomes humains [5, 6]. Des amorces consensus pour les différentes familles d'ADN répétés centromériques (alpha-satellite, bêta-satellite, satellite II, satellite III) et télomériques sont disponibles, ainsi que plusieurs amorces spécifiques des séquences Alu, réparties sur l'ensemble du génome humain. L'utilisation de thermocycles programmables, adaptés à la technique PRINS, permet un contrôle très précis des températures d'appariement et d'élongation, qui conditionnent le succès du marquage chromosomique par PRINS. Grâce à ces appareillages, le PRINS est aujourd'hui une technique simple, efficace et reproductible. Hormis la facilité d'application et la spécificité de la réaction, le PRINS présente d'autres avantages. Les amorces n'étant pas marquées, il est possible d'en utiliser de fortes concentrations afin d'augmenter la cinétique de la réaction, sans risque de bruit de fond parasite et sans que la structure chromosomique ou nucléaire soit endommagée. Contrairement à l'hybridation *in situ*, l'intensité du signal n'est pas liée à la taille de l'amorce. De plus, la réaction est extrêmement rapide puisque la détection *in situ* d'un chromosome par PRINS peut être réalisée en moins de 10 minutes [7]. Des protocoles PRINS multi-couleurs ont été mis au point permettant la détection de plusieurs chromosomes sur une même préparation. Le marquage de

plusieurs chromosomes se fait de manière séquentielle, en utilisant divers fluorochromes et en intercalant entre chaque réaction PRINS, une réaction de blocage du fragment d'élongation. Enfin, il a été démontré que les marquages par FISH et PRINS pouvaient être appliqués conjointement sur une préparation, soulignant ainsi le caractère complémentaire des deux techniques.

### Applications et perspectives

Diverses applications cytogénétiques de la technique PRINS ont d'ores et déjà été développées chez les mammifères (souris, hamster, porc) et les végétaux (seigle, pois, haricot, blé) [8, 9]. Toutefois, c'est dans le cadre de la cytogénétique humaine que cette technique connaît le développement le plus remarquable. Ainsi, le marquage par PRINS de métaphases humaines avec une amorce spécifique des séquences Alu engendre un marquage chromosomique du type bande R qui permet l'identification de chaque chromosome (*figure 2A*). Ce processus extrêmement rapide et spécifique s'avère particulièrement intéressant pour la détection et la caractérisation du matériel chromosomique humain contenu dans des hybrides somatiques interspécifiques (*figure 2B*). L'utilisation d'amorces Alu a aussi été mise à profit pour la détection de l'euchromatine dans les remaniements des bras courts des chromosomes acrocentriques et les petits marqueurs chromosomiques [10]. De même, les amorces consensus télomériques sont utilisées pour l'étude des translocations complexes (*figure 2C*) et des chromosomes en anneau [11]. La taille du signal engendré par PRINS étant directement proportionnelle au nombre de séquences répétées cibles, l'équipe de Aarhus s'est servie des amorces consensus télomériques pour mettre en évidence *in situ* les variations du marquage télomérique en fonction de l'âge [12]. L'identification précise des chromosomes humains constitue l'application majeure de la technique PRINS, du fait de l'existence de nombreuses amorces spécifiques (parfois plu-

sieurs pour un même chromosome). Cette approche a été adaptée à de nombreux domaines d'investigation cytogénétique. Ainsi, la technique a été utilisée pour l'identification de diverses anomalies constitutionnelles de type translocation, chromosome en anneau ou marqueur chromosomique. Plusieurs équipes ont testé avec succès la technique PRINS en diagnostic prénatal, sur lymphocytes, amniocytes ou villosités choriales, en utilisant les amorces spécifiques des chromosomes les plus fréquemment impliqués dans la pathologie chromosomique [13, 14]. Au même chapitre, des travaux prometteurs ont été réalisés par Orsetti *et al.* [15] sur l'analyse chromosomique par PRINS des cellules fœtales isolées de la circulation maternelle. De nombreuses études sont menées dans cette voie, qui laissent penser que de telles approches non invasives pourraient constituer une avancée importante en matière de diagnostic prénatal dans un avenir relativement proche (*m/s n° 1, vol. 13, p. 129*).

Des résultats satisfaisants ont aussi été obtenus pour l'analyse chromosomique sur cellules embryonnaires isolées (*figure 2D*). Dans le cadre particulier du diagnostic chromosomique pré-implantatoire, la spécificité et la rapidité de la réaction PRINS peuvent constituer des atouts majeurs car ce type d'examen pratiqué sur une ou 2 cellules, doit être réalisé en un minimum de temps pour être compatible avec les protocoles de fécondation *in vitro*.

Une application particulièrement efficace de la technique PRINS est l'analyse chromosomique des spermatozoïdes humains. Compte tenu de l'origine méiotique de la plupart des anomalies chromosomiques de nombre, l'analyse cytogénétique des gamètes constitue l'approche la plus directe pour estimer la fréquence de ces anomalies et en étudier l'étiologie. Plusieurs études FISH utilisant des sondes centromériques sur des étalements de spermatozoïdes ont été publiées, rapportant l'estimation directe du taux d'aneuploïdie pour divers chromosomes. Toutefois, l'extrême compaction du noyau spermatique et la taille des sondes centromériques imposent le recours à des

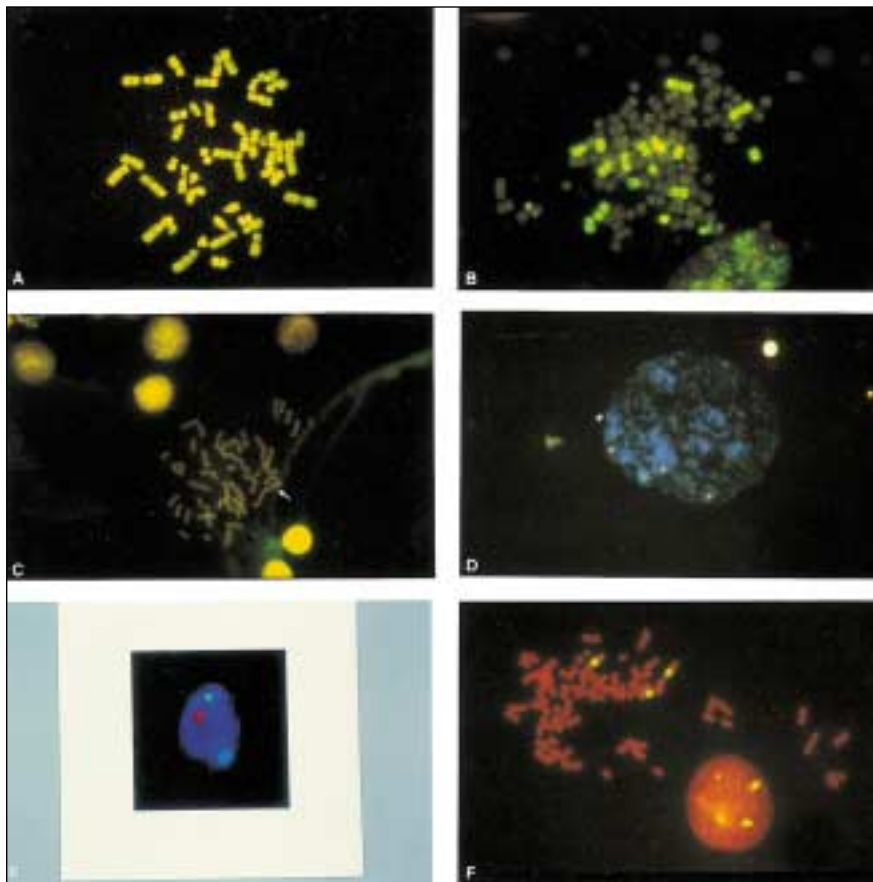


Figure 2. **Exemples de marquages chromosomiques in situ réalisés par PRINS.** **A.** Marquage chromosomique de type bande R obtenu sur une métaphase humaine en utilisant une amorce spécifique des séquences Alu. Ce marquage permet l'identification des chromosomes. **B.** Détection par PRINS avec une amorce Alu du matériel chromosomique humain présent dans un hybride somatique homme-hamster. **C.** Marquage des séquences répétées télomériques. Ici, cette approche est utilisée dans l'étude d'une translocation complexe par la détection de séquences télomériques interstitielles (flèche). **D.** Double marquage chromosomique réalisé sur un noyau blastomérique, mettant en évidence une double aneuploïdie des chromosomes 16 (en rouge) et 21 (en vert). **E.** Triple marquage PRINS sur un noyau de spermatozoïde humain. Trois fluorochromes, fluorescéine (vert), rhodamine (rouge) et coumarine (bleu), ont été utilisés pour le marquage séquentiel de trois chromosomes. **F.** Identification du chromosome 1 sur un noyau et une métaphase de la lignée tumorale colique Caco-2, en utilisant une amorce spécifique de l'ADN répétitif satellite II situé dans la région péricentromérique du chromosome 1.

prétraitements de décondensation nucléaire *in situ* quelque peu drastiques. La combinaison de ces éléments fait que les taux d'aneuploïdie rapportés sont très fluctuants, ce qui laisse subsister un doute sur l'efficacité de la technique FISH pour de telles investigations. L'alternative PRINS présente l'avantage d'une bien meilleure accessibilité des amorces

aux séquences centromériques cibles et d'une réactivité supérieure (figure 2E), obtenue après une très légère décondensation du noyau spermatique [16]. Les résultats obtenus par PRINS apparaissent beaucoup plus homogènes et reproductibles comme l'ont confirmé des tests mettant en parallèle les marquages FISH et PRINS sur spermatozoïdes humains.

Plus récemment, l'application du PRINS s'est étendue à la cytogénétique tumorale. Deux types de travaux ont été menés. D'une part, l'examen cytogénétique interphasique de plusieurs lignées tumorales coliques et l'analyse de l'hétérogénéité caryotypique de ces lignées ont été effectués en utilisant les amorces spécifiques d'une dizaine de chromosomes (figure 2F). D'autre part, le suivi d'allogreffes de moelle osseuse réalisées avec un donneur de sexe opposé a été rapporté par Marie *et al.* [17]. En corollaire à ce travail, l'efficacité du marquage centromérique par PRINS a été testé sur des coupes de tissus sains et pathologiques (carcinomes bronchiques, lymphomes, tumeurs gliales), ce qui permet d'envisager de nouvelles applications du PRINS en anatomie et cytologie pathologique.

Parmi les perspectives, l'adaptation de la technique PRINS à la détection *in situ* des séquences uniques constitue un challenge important, car cette approche permettrait de s'affranchir des protocoles fastidieux de préparation des sondes, voire de disposer d'une plus grande indépendance vis-à-vis des sociétés commercialisant les sondes, du fait de la facilité d'obtenir des amorces oligonucléotidiques de synthèse. Plusieurs équipes travaillent sur ce projet et, après que des résultats préliminaires ont été obtenus chez le porc [18], des détections de séquences uniques par PRINS sur le génome humain ont été rapportées ces derniers mois [19]. Parallèlement, le développement récent de la technique du *Padlock* (ou « sondes-cadenas ») souligne une fois de plus la complémentarité des approches FISH et PRINS, puisque les courtes sondes utilisées dans la méthode *Padlock* sont directement issues des amorces synthétisées pour les réactions PRINS [20].

## Conclusions

La technique PRINS s'avère un outil particulièrement bien adapté à l'analyse chromosomique *in situ*. Bien que n'ayant pas encore un champ d'applications aussi vaste et diversifié que l'hybridation *in situ* fluorescente, elle fournit un complément, voire

une alternative intéressante pour l'identification chromosomique. La multiplicité des applications déjà développées dans ce domaine et les nouvelles possibilités qui se profilent, soulignent l'intérêt de cette méthode en cytogénétique, comme outil de recherche ou de diagnostic ■

## Franck Pellestor

Chargé de recherche au Cnrs. Cnrs UPR 1142, route de Mende, BP 5051, 34293 Montpellier Cedex 05, France.

## RÉFÉRENCES

1. Gilgenkrantz S, Schröck E, Liyanage M, du Manoir S, Ried T. Tout ce que la FISH peut faire pour vous. *Med Sci* 1997; 13: 1294-8.
2. Koch JE, Kolvraa S, Petersen KB, Gregeresen N, Bolund L. Oligonucleotide-priming methods for the chromosome-specific labeling of alpha satellite DNA *in situ*. *Chromosoma* 1989; 98: 259-65.
3. Willard HF, Wayne JS. Hierarchical order in human chromosome-specific human alpha satellite DNA. *Trends Genet* 1997; 3: 192-8.
4. Verma RS, Luke S. Variations in alphoid DNA sequences escape detection of aneuploidy at interphase by FISH technique. *Genomics* 1992; 14: 113-6.
5. Koch J, Hindkjaer J, Kolvraa S, Bolund L. Construction of a panel of chromosome-specific oligonucleotide probes (PRINS-primers) useful for the identification of individual human chromosomes *in situ*. *Cytogenet Cell Genet* 1995; 71: 142-7.
6. Pellestor F, Girardet A, Lefort G, Andréo B, Charliou JP. Selection of chromosome-specific primer and their use in simple and double PRINS techniques for rapid *in situ* identification of human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 1995; 70: 138-42.
7. Gosden J, Lawson D. Instant PRINS: a rapid method for chromosome identification by detecting repeated sequences *in situ*. *Cytogenet Cell Genet* 1995; 68: 57-60.
8. Russo A, Tommasi AM, Renzi L. Detection of minor and major satellite DNA in cytokinesis-blocked mouse splenocytes by a PRINS tandem labelling approach. *Mutagenesis* 1996; 11: 547-52.
9. Abbo S, Dunford RP, Miller TE, Reader SM, King IP. Primer-mediated *in situ* detection of the B-hordein gene cluster on barley chromosome 1H. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11821-4.
10. Callen DF, Yip MY, Eyre HJ. Rapid detection of euchromatin by Alu-PRINS: use in clinical cytogenetics. *Chrom Res* 1997; 5: 81-5.
11. Brandt CA, Kierkegaard O, Hindkjaer J, Jensen PKA, Pedersen S, Therkelsen AJ. Ring chromosome 20 with loss of telomeric sequences detected by multicolour PRINS. *Clin Genet* 1993; 44: 26-31.
12. Therkelsen AJ, Nielsen A, Koch J, Hindkjaer J, Kolvraa S. Staining of human telomeres with primed *in situ* labeling (PRINS). *Cytogenet Cell Genet* 1995; 68: 115-8.
13. Hindkjaer J, Brandt CA, Stromkjaer H, Koch J, Kolvraa S, Bolund L. Primed *in situ* labelling (PRINS) as a rational procedure for identification of marker chromosomes using a panel of primers differentially tagging the human chromosomes. *Clin Genet* 1996; 50: 437-41.
14. Pellestor F, Girardet A, Lefort G, Andréo B, Charliou JP. Use of the primed *in situ* labelling (PRINS) technique for a rapid detection of chromosomes 13, 16, 18, 21, X and Y. *Hum Genet* 1995; 95: 12-7.
15. Orsetti B, Lefort G, Boulot P, Andréo B, Pellestor F. Fetal cells in maternal blood: PRINS technique for efficient fetal cell detection and sex assessment. *Am J Hum Genet* 1996; 59: A327.
16. Pellestor F, Girardet A, Coignet L, Andréo B, Charliou JP. Assessment of aneuploidy for chromosomes 8, 9, 13, 16 and 21 in human sperm by using primed *in situ* labeling technique. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 797-802.
17. Marie B, Antunes L, Baylac F, Gremillet S, Pialoux A, Guerci A, Bordinoni P, Plénat F, Vignaud JM. La technique PRINS. Application à la détection des chromosomes X et Y pour le suivi des allogreffes de moelle osseuse réalisées avec un donneur de sexe opposé. *Ann Pathol* 1997; 1: 11-6.
18. Troyer DL, Xie H, Goad DW, Skinner DZ. Use of a new technique to map the porcine alpha interferon gene to chromosome 1. *Mamm Genome* 1994; 5: 112-4.
19. Mennicke KC, Harrer T, Schuermann M, Mueller A, Schwinger E. Primed *in situ* labeling (PRINS) for the detection of single copy sequences and gene polymorphism on human chromosomes. *Am J Hum Genet* 1997; 61: A134.
20. Nilsson M, Krejci K, Koch J, Kwiatkowski M, Gustavsson P, Landegren U. Padlock probes reveal single-nucleotide differences, parent of origin and *in situ* distribution of centromeric sequences in human chromosomes 13 and 21. *Nat Genet* 1997; 16: 252-5.

## TIRÉS À PART

F. Pellestor.

## Summary

### What PRINS can do for you

The primed *in situ* labeling (PRINS) technique constitutes an alternative to conventional fluorescence *in situ* hybridization (FISH) procedure for chromosomal identification and aneuploidy detection. Based on the use of chromosome-specific primers for repeated DNA sequences, the PRINS reaction combines the high sensitivity of the PCR reaction with the cytological localization of DNA sequences. PRINS method presents several advantages (specificity, rapidity, low background, low cost) that makes it very attractive for a number of cytogenetic purposes. Various applications have already been developed on lymphocytes, amniocytes, gametes, tumoral cells, somatic hybrids and tissue sections. Now, the adaptation of PRINS technique to the *in situ* detection of unique sequences is an important challenge.



**BiDOCS**  
L'Association des Étudiants-Chercheurs en Biologie

**Vous voulez faire un DEA, une thèse ?  
Vous cherchez un laboratoire  
de recherche ?**

**Vous êtes inquiet pour votre statut  
et votre avenir dans la recherche ?**

**Vous êtes inquiet sur les débouchés  
dans la recherche ?**

**BioDocs vous invite**

à consulter le serveur web (Internet)  
<http://157.136.20.60>

Contactez-nous également par e-mail  
([analenn@pasteur.fr](mailto:analenn@pasteur.fr))