

Les techniques de cytogénétique moléculaire : principes et progrès

Nouha Bouayed Abdelmoula, Marie-France Portnoï, François Vialard, Ahlem Amouri, Jacqueline Van den Akker, Jean-Louis Taillemite

La cytogénétique moléculaire est une nouvelle approche morphologique qui utilise à la fois les outils de la biologie moléculaire et de la cytogénétique. La principale technique utilisée actuellement est l'hybridation in situ fluorescente (FISH) qui consiste en l'hybridation de sondes froides d'ADN sur des lames de préparations cytogénétiques de cellules métaphasiques ou interphasiques et sa révélation par fluorescence. Initialement

utilisée pour localiser certaines séquences répétées de l'ADN sur des chromosomes métaphasiques, son champ d'application s'est progressivement diversifié. Elle constitue actuellement un outil puissant et performant dans l'établissement de la carte du génome humain, l'analyse des processus tumoraux et le diagnostic chromosomique prénatal et post-natal.

Les premières techniques d'hybridation *in situ* sur chromosomes datent de 1969 lorsque Gall et Pardue ont utilisé un ARN ribosomique radioactif pour détecter la présence de gènes d'ADN ribosomique sur des chromosomes d'amphibiens [1]. Plus tard, Saender, en 1972 [2] et Jones en 1973 [3] utilisèrent des sondes radioactives complémentaires de l'ADN satellite pour hybrider les régions centromériques des chromosomes métaphasiques. L'hybridation *in situ* sur chromosomes d'une séquence d'ADN non répétée et radioactive a été réalisée, pour la première fois par Harper et Saender [4] ainsi que par Gerhard [5] en 1981, grâce à l'adjonction d'une macromolécule, le sulfate de dextran, dans le milieu d'hybridation.

L'hybridation *in situ* s'est ensuite développée grâce au clonage de l'ADN à l'aide de vecteurs plasmidiques qui a permis de produire de grandes quantités d'ADN et des sondes de meilleure qualité. Toutefois, l'utilisation de nucléotides radioactifs et de méthodes d'autoradiographie pour marquer et révéler les sondes a limité le champ d'application de l'hybridation *in situ*.

Le véritable essor de la cytogénétique moléculaire date des années 1986-1988 avec l'utilisation de sondes dites froides non radioactives et le développement de l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) [6] par les équipes de Pinkel [7, 8] et de Cremer [9]. Depuis, de grands progrès techniques en cytogénétique moléculaire ont été réalisés et mis à profit aussi bien dans la recherche en génétique que dans le diagnostic clinique. Technique rapide et simple d'analyse chromosomique, l'hybridation *in situ* en fluorescence a conduit à introduire la biologie moléculaire dans l'arsenal des techniques d'analyse cytogénétique dont le caryotype reste toutefois l'examen de première intention.

Elle a contribué à l'augmentation de la spécificité et du pouvoir de résolution (c'est-à-dire la capacité de distinguer un segment chromosomique d'un segment contigu). En effet, avec la cytogénétique classique, le segment unitaire détectable est constitué par la plus petite bande individualisable après marquage des chromosomes, ce qui correspond à 10^6 - 10^7 paires de bases (pb), et ce sur des chromosomes en prométaphase sur lesquels on peut définir 800 à

1 000 bandes contiguës par génome haploïde. En cytogénétique moléculaire, le pouvoir de résolution peut varier – selon différentes approches qu'on abordera plus loin – de 1 mégabase (Mb) jusqu'à quelques kilobases (kb). Cela dépend en partie de l'état de condensation de la chromatine.

Une interprétation de plus en plus fine est rendue possible grâce à de nombreuses avancées technologiques réalisées dans ce domaine, telles que la possibilité d'hybrider simultanément plusieurs sondes d'ADN marquées différemment, l'existence d'un panel de plus en plus large de sondes spécifiques et, enfin, le développement d'outils informatiques et numériques de plus en plus puissants. Ces derniers permettent de capter les signaux fluorescents avec des caméras vidéos à haute résolution et de les transformer en images digitalisées manipulables sur analyseur d'images afin d'obtenir une meilleure résolution et une augmentation du rapport signal/bruit de fond.

La technique d'hybridation *in situ* en fluorescence a aussi rendu possible l'exploration des cellules au stade interphasique du cycle cellulaire, augmentant ainsi le nombre de cel-

lules analysables et permettant dans certains cas un diagnostic direct d'anomalies chromosomiques sur des cellules non cultivées.

Principes de l'hybridation *in situ* en fluorescence

La technique d'hybridation *in situ* en fluorescence comporte trois étapes. La première consiste en une dénaturation de l'ADN de la cible chromosomique et de l'ADN de la sonde si cette dernière est sous forme double brin. La sonde est ensuite hybridée sur l'ADN cible. La troisième étape correspond à la révélation de l'hybridation qui peut être directe ou indirecte et à la contre-coloration du support, c'est-à-dire les chromosomes ou les noyaux interphasiques. La sonde hybridée avec la cible est révélée par un signal fluorescent [10, 11].

Les résultats sont étudiés avec un photomicroscope à épifluorescence équipé de filtres spécifiques des différents fluorochromes et éventuellement d'un analyseur d'images. Il est ainsi possible, en analysant les signaux fluorescents, de déterminer la présence, la localisation et le nombre de copies d'une séquence cible et de détecter les remaniements de nombre ou de structure.

Les cibles

Il existe deux types majeurs de cibles, les chromosomes métaphasiques et les noyaux interphasiques.

Les métaphases sont obtenues selon les protocoles standards de cytogénétique conventionnelle nécessitant une étape préalable de culture cellulaire. Il peut s'agir de lymphocytes, de fibroblastes cutanés, de cellules chorales ou amniotiques, de cellules tumorales ou médullaires en division. L'hybridation *in situ* fluorescente sur chromosomes métaphasiques permet la mise en évidence des remaniements infra-cytogénétiques telles que les microdélétions (figure 1), l'interprétation des remaniements de structure les plus complexes et l'identification des marqueurs chromosomiques non identifiables en cytogénétique conventionnelle.

L'hybridation *in situ* fluorescente sur noyaux interphasiques permet l'ana-

lyse rapide d'un grand nombre de cellules en évitant l'étape de culture préalable, ce qui permet des diagnostics directs avec des délais de réponses plus courts, particulièrement utiles dans le domaine du diagnostic prénatal. Il est possible de déterminer les anomalies de nombre en quantifiant les copies d'un chromosome donné, d'explorer les aneuploïdies en mosaïque aussi bien au niveau constitutionnel que somatique acquis au cours des processus tumoraux et aussi de mettre en évidence certains remaniements chromosomiques acquis dont les points de cassure clonés ont été utilisés pour produire des sondes (figure 2).

La limite de résolution de l'hybridation *in situ* en fluorescence dépend de l'état de condensation de la chromatine. Plus la chromatine est condensée, plus deux séquences proches d'un point de vue moléculaire apparaîtront proches sur la chromatine. La possibilité de discriminer et d'ordonner des séquences proches par hybridation *in situ* en fluorescence sur chromosomes métaphasiques dépend du locus étudié du fait des différences de condensation à l'intérieur même de l'euchromatine. Toutefois, le niveau de résolution semble être compris dans une

fourchette allant de 1 à 3 Mb [10]. L'hybridation *in situ* en fluorescence sur noyaux interphasiques ne permet pas d'ordonner ni d'estimer la distance entre deux sondes séparées par plus de quelques Mb. Il est seulement possible d'ordonner trois sondes dans un domaine de 800 kb à 1 Mb. Le niveau de résolution, en raison de la bien moindre compaction de la chromatine, est de l'ordre de 100 kb, soit 20 fois supérieure à la résolution obtenue sur chromosome métaphasique. Cependant, pour recueillir l'information la plus ponctuelle possible, il est nécessaire de recourir à la reconstitution tridimensionnelle, par le microscope confocal, évitant ainsi le problème du halo dû à la fluorescence qui diffuse à partir des couches supérieures et inférieures de la préparation.

Pour augmenter encore le niveau de résolution, il a été proposé de réaliser de l'hybridation *in situ* en fluorescence sur des molécules d'ADN étirées. Plusieurs techniques ont été décrites: les techniques d'étirement chromosomique soit par cyto-centrifugation, soit par micromanipulation, les techniques de la chromatine étirée, en particulier celle des halos, et, enfin, la technique du peignage moléculaire. En dehors de cette der-

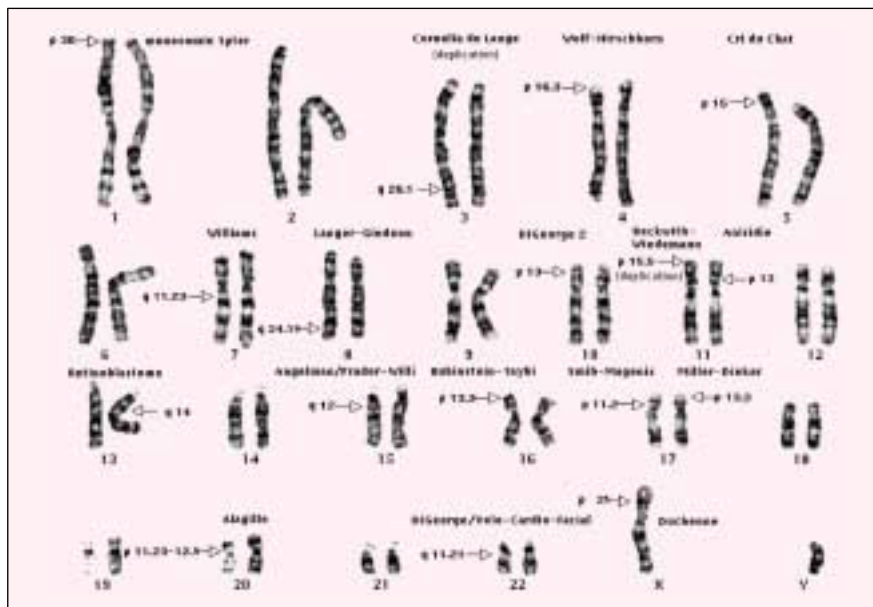


Figure 1. Localisation chromosomique des syndromes avec aneusomies segmentaires: microdélétions et duplications.

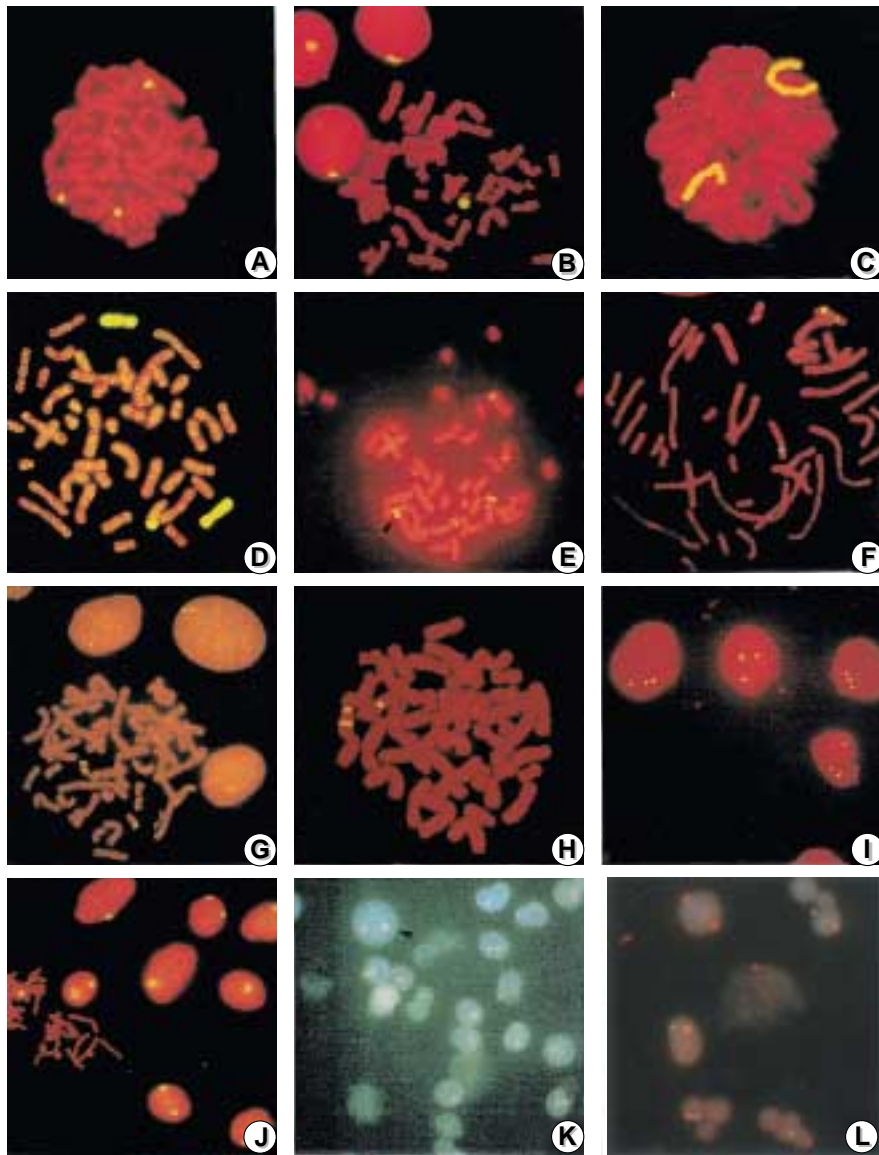


Figure 2. **FISH sur métaphases et noyaux interphasiques avec différentes sondes chromosomiques.** **A.** FISH d'une sonde de séquences alphasatellites centromériques spécifique du chromosome X sur métaphase montrant une triple X. Révélation indirecte (FITC); contre-coloration PI. **B.** FISH d'une sonde de séquences satellites II spécifique de la région d'hétérochromatine du bras long du chromosome Y (Yqh) sur métaphase et noyaux interphasiques d'un homme normal (46,XY). Révélation indirecte (FITC); contre-coloration PI. **C.** Peinture du chromosome 3 sur métaphase normale. Révélation indirecte (FITC); contre-coloration PI. **D.** Peinture du chromosome 8 sur métaphase montrant une trisomie 8 partielle résultante d'une translocation déséquilibrée. Révélation indirecte (FITC); contre-coloration PI. **E.** FISH d'une sonde de type YAC, spécifique de la région terminale du bras long du chromosome 3 (3q29) sur métaphase montrant, à côté de l'hybridation normale au niveau des bras longs des deux chromosomes 3, l'illumination des deux extrémités d'un petit marqueur acentrique formé par inversion duplication 3q. Révélation indirecte (FITC); contre-coloration PI. **F.** FISH d'une sonde du locus D15S10 localisé en 15q11-q13 et d'une sonde témoin du locus PML (plus télomérique) montrant une microdéletion de la région 15q11-q13 sur une métaphase d'un patient atteint du syndrome de Prader-Willi. Révélation indirecte (FITC); contre-coloration PI. **G.** FISH d'une sonde du locus D22Z75 localisé en 22q11.2 et d'une sonde témoin du locus D22S39 en 22q13.3

montrant une microdéletion de la région 22q11.2 sur une métaphase d'un patient atteint du syndrome de DiGeorge. Révélation indirecte (FITC); contre-coloration PI. **H.** FISH d'une sonde de séquences alphasatellites spécifiques du chromosome X sur métaphase montrant un chromosome X dicentrique. Révélation indirecte (FITC); contre-coloration PI. **I.** FISH d'une sonde du locus D21S55 localisé en 21q22.2 sur noyaux interphasiques montrant une trisomie 21 « homogène ». Révélation indirecte (FITC); contre-coloration PI. **J.** FISH d'une sonde de séquences alphasatellites spécifiques du chromosome X sur noyaux interphasiques montrant une mosaïque lymphocytaire X/XX. Révélation indirecte (FITC); contre-coloration PI. **K.** FISH bicolore : détection de la translocation t(9;22)(q34;q11) sur noyaux interphasiques d'un patient atteint d'une leucémie myéloïde chronique. Co-hybridation de la sonde du locus M-bcr localisé en 22q11 (rhodamine) et de la sonde du locus abl localisé en 9q34 (FITC). Le signal bicolore (flèche) correspond au gène de fusion; contre-coloration DAPI. **L.** FISH bicolore : détection de chimérisme dans un suivi post-greffe médullaire avec une sonde centromérique du chromosome X (rhodamine) et une sonde centromérique de l'Y (FITC); contre-coloration DAPI.

nière qui nécessite l'extraction de l'ADN, les deux autres techniques sont réalisées sur des préparations cytogénétiques suivies de procédés physiques particuliers [12-16].

Les sondes

Plusieurs types de sondes sont disponibles pour la détection des remaniements chromosomiques. Elles peu-

vent être classées en quatre catégories : les sondes spécifiques d'un locus donné, les sondes de séquences répétées centromériques ou télomériques, les sondes de peinture chromo-

mosomique spécifiques d'un chromosome entier ou d'un bras chromosomique et, enfin, l'ADN génomique total pouvant être utilisé comme sonde dans une approche particulière qui est l'hybridation génomique comparative.

Les sondes froides, utilisées dans l'hybridation *in situ* en fluorescence, sont marquées par incorporation dans l'ADN de dérivés nucléotidiques couplés par des méthodes enzymatiques ou chimiques à des haptènes. Les haptènes les plus utilisés sont la biotine et la digoxigénine. La détection des sondes après hybridation se fait à l'aide de protéines ayant une affinité particulière pour l'haptène couplé à la sonde : avidine ou anticorps anti-biotine pour la biotine, anticorps anti-digoxigénine pour la digoxigénine. Avidine et anticorps sont couplés à différents types de fluorochromes : la fluorescéine (FITC) et la rhodamine étant les plus utilisées. Plusieurs sondes peuvent être analysées simultanément par couplage de chacune avec un système de révélation différent. La sensibilité de la révélation doit être souvent augmentée par des systèmes d'amplification des signaux qui consistent à stratifier plusieurs couches de molécules marquées. Citons pour exemple un système à trois couches pour une sonde couplée à la biotine : avidine marquée, anti-avidine biotinylée et, enfin, avidine marquée. Les sondes peuvent aussi être marquées directement par incorporation de nucléotides couplés à une molécule fluorescente lors de leur synthèse, leur détection étant alors directe.

Le marquage des sondes peut se faire par trois méthodes différentes : *nick-translation*, *random-priming* ou PCR (*polymerase chain reaction*). Le choix de la méthode dépend du type et de la longueur de la sonde [17-19]. La *nick-translation* est le procédé le plus approprié à un ADN d'une taille supérieure à 500 pb inséré dans son vecteur de clonage. Le *random-priming* ou amorçage aléatoire est réservé aux fragments d'ADN linéaires extraits de leur vecteur de clonage. La PCR a un rendement supérieur à celui de la *nick-translation* et elle offre une plus grande sensibi-

lité dans la détection des petites sondes. La DOP-PCR (*degenerate oligo-nucleotide primer-PCR*) est particulièrement utile pour les sondes de peinture chromosomique.

Les sondes de séquences uniques ont une taille de 0,5 kb à 1-2 Mb [20]. Elles correspondent à des séquences spécifiques d'une bande chromosomique ou d'un locus. Elles sont clonées dans des vecteurs de types phage, plasmide, cosmide ou YAC (*yeast artificial chromosomes*) et nécessitent dans certains cas une hybridation compétitive afin d'empêcher l'hybridation non spécifique liée à la présence de séquences répétées dans la cible et la sonde.

Les sondes de séquences répétées reconnaissent un motif très répété en tandem qui peut correspondre :

- à des séquences alphasatellites communes à tous les centromères. Ce sont des motifs de 171 pb répétés en tandem dont la taille approximative est de 3 Mb. D'autres séquences alphasatellites caractérisées par une organisation supérieure sont spécifiques des chromosomes. Chaque chromosome a en effet une séquence alphasatellite propre, à l'exception du 13 et du 21, ainsi que des chromosomes 14 et 22 qui partagent les mêmes séquences alphasatellites spécifiques ;

- à des séquences β -satellites localisées dans la région péri-centromérique des chromosomes 1, 9 et Y et sur les bras courts des chromosomes acrocentriques ;

- aux séquences satellites II ou *classical satellite*, spécifiques de l'hétérochromatine des chromosomes 1, 9, 15 et 16 et de l'hétérochromatine du bras long du chromosome Y. Ce sont de courts motifs répétés de type (AATGG)_n ;

- à des télomères universels, communs à tous les chromosomes, où existent des séquences (TTAGGG) répétées en tandem ;

- aux séquences répétées associées aux télomères (TAR), qui sont des séquences répétées en bloc de 30 à 40 pb associées aux télomères. Chaque type de TAR est spécifique de quelques chromosomes.

Il est à noter qu'il existe des sondes spécifiques des régions subtélomériques propres à certains chromosomes qui visualisent l'extrémité ter-

minale d'un chromosome donné, mais ces sondes correspondent en fait à des séquences uniques non répétées, différentes des séquences télomériques.

L'hybridation *in situ* en fluorescence, avec ces deux types de sondes (sondes spécifiques de séquences répétées et de séquences uniques), permet d'obtenir un signal fluorescent correspondant à une région complémentaire, limitée et particulière de l'ADN de la cible (*figure 2, A,B,E,F,G,H*). Une amplification du signal est souvent nécessaire pour l'observation des sondes biotinylées hybridées à ces séquences.

Les sondes de peinture chromosomique, reconnaissant un chromosome entier, peuvent être obtenues par triage chromosomique, par microdissection ou le plus souvent par Alu-PCR de l'ADN des hybrides somatiques conservant un seul chromosome humain [20, 21]. La peinture chromosomique nécessite aussi une hybridation compétitive dite CISS (*chromosome in situ suppression hybridization*). Elle permet de mettre en évidence un chromosome particulier en entier (ou seulement un bras chromosomique) par hybridation sur toute sa longueur (*figure 2, C,D*).

Approches techniques récentes en cytogénétique moléculaire

Synthèse *in situ* amorcée ou PCR *in situ*

La technique PRINS (*primed in situ labelling*) [22] décrite par l'équipe de Koch en 1989 [23] est une réaction de polymérisation *in situ*. Elle est fondée sur l'hybridation spécifique d'une séquence d'ADN non marquée (amorce) sur les chromosomes fixés, suivie d'une élongation *in situ* en présence de nucléotides modifiés. Elle permet de synthétiser *in situ* la séquence complémentaire d'une séquence cible présentant obligatoirement un certain nombre de motifs répétés. Pour cela, on utilise des amorces oligonucléotidiques bien sélectionnées, des nucléotides marqués par des fluorochromes et une polymérase. La séquence est amplifiée par une succession d'étapes de

synthèse-dénaturation toujours *in situ*, ce qui permet de marquer le chromosome directement.

Cette méthode est particulièrement efficace pour la détection de régions hautement répétées. Les amorces utilisées peuvent correspondre aux séquences alphas centromériques pour mettre en évidence les centromères [24] ou aux séquences Alu, ce qui est tout à fait pertinent pour l'analyse des hybrides somatiques [25].

Depuis la description du PRINS, des procédures variantes ont été développées tels que le PRINS multi-couleur et l'« hybridation *in situ* d'oligonucléotides marqués » (HISOMA). Cette dernière utilise des amorces marquées par un fluorochrome de couleur différente de celle des nucléotides d'élongation. Elle permet d'augmenter l'intensité des signaux obtenus par PRINS car, au cours de la synthèse *in situ*, l'élongation est souvent courte [26].

Hybridation génomique comparative

L'hybridation génomique comparative (CGH) est une approche globale d'analyse des anomalies chromosomiques en une seule étape sans la nécessité d'une culture cellulaire. Elle a été décrite pour la première fois par l'équipe de Pinkel en 1992 [27]. Son principe repose sur l'hybridation simultanée et compétitive d'ADN test et d'ADN témoin normal, marqués par deux fluorochromes différents, sur des métaphases lymphocytaires normales. Elle permet ainsi de détecter et de localiser sur les chromosomes métaphasiques normaux les différences relatives du nombre de copies de séquences d'ADN entre les deux génomes, test et témoin. Les images de fluorescence sont reprises par une caméra vidéo à haute résolution associée à un système d'analyse d'image. Celui-ci calcule le rapport d'intensité de fluorescence (ou ratio d'hybridation) de chacun des ADN le long de chaque chromosome et dessine le caryogramme du génome testé. Ainsi, un rapport de 0,5 est établi pour les monosomies, de 1,5 pour les trisomies et ainsi de suite [28, 29] (figure 3). Cette approche technique permet une analyse globale des ano-

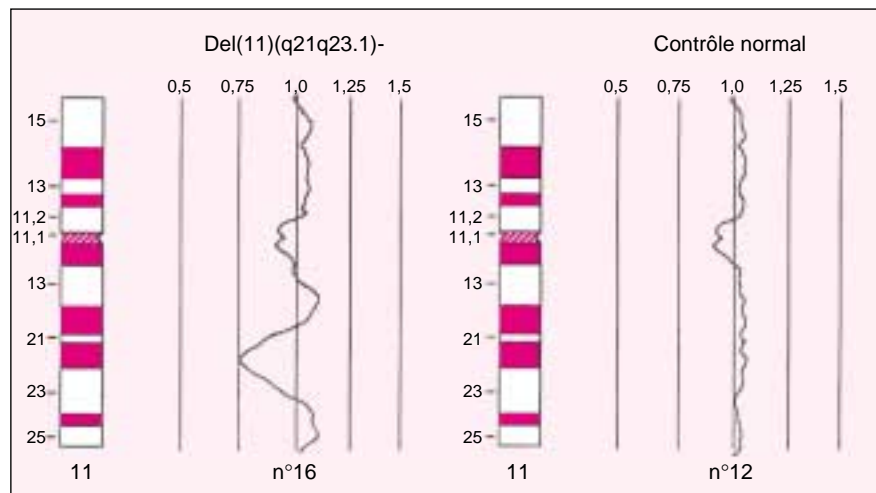


Figure 3. **Hybridation génomique comparative (CGH).** Profil de fluorescence d'un chromosome 11 délété en 11q21q23.1 et de son homologue normal. Le ratio de fluorescence calculé dans ce cas de délétion est de 0,75 car la délétion est présente en mosaïque.

malies déséquilibrées survenant dans l'ensemble du génome. Cependant, son niveau de résolution est limité puisqu'une délétion (ou une amplification) n'est mise en évidence que si elle est supérieure à 10-15 Mb.

Hybridation *in situ* fluorescente en 24 couleurs

C'est une approche qui permet l'identification et l'analyse simultanées de tous les chromosomes en attribuant à chaque paire d'autosomes, à l'X et à l'Y, une couleur propre et distincte.

A la différence des autres approches d'hybridation *in situ* en fluorescence ciblées, elle a l'avantage d'être à la fois globale, sensible et spécifique. Elle ne nécessite pas d'avoir une idée préalable sur les chromosomes impliqués pour détecter des remaniements chromosomiques ambigus et complexes (figure 4), mettre en évidence des remaniements cryptiques et identifier des chromosomes marqueurs non identifiés. Cependant, elle ne permet pas de reconnaître avec précision les régions chromosomiques impliquées. C'est la raison pour laquelle une image en contre-coloration DAPI, donnant un marquage de type bandes G, est toujours acquise.

Elle a été décrite pour la première fois en 1996 par Speicher *et al.* [30, 31] et Schröck *et al.* [32]. Les deux équipes

ont développé deux techniques d'hybridation *in situ* en fluorescence en 24 couleurs, qui diffèrent au niveau de la méthode d'acquisition des images permettant la classification des chromosomes métaphasiques, mais qui utilisent toutes deux la technique de combinaisons des fluorochromes proposée en 1989 par Nederlof [33]. Cette dernière a surmonté la difficulté majeure qui se posait et qui est la non-disponibilité de fluorochromes de spectre distinct en nombre suffisant. Ainsi avec n fluorochromes on peut obtenir 2n-1 teintes différentes. Les sondes de peinture des 22 autosomes et des gonosomes X et Y, engendrées par cytométrie de flux sont alors marquées par DOP-PCR en faisant des combinaisons de 5 fluorochromes. Chaque combinaison fournit à la sonde de peinture correspondante une signature spectrale distincte selon sa composition fluorochromique.

L'équipe de Speicher a décrit la M-FISH (*Multiplex-FISH*) mise au point en 1996 et améliorée en 1998 [34]. Après hybridation, l'analyse des métaphases se fait à l'aide d'un microscope à épifluorescence muni d'un jeu de filtres (de 5 à 8), et d'une caméra monochrome à haute résolution. Celle-ci permet l'acquisition de chacune des images correspondant à chaque fluorochrome ainsi qu'une image en contre-coloration DAPI donnant un marquage de type

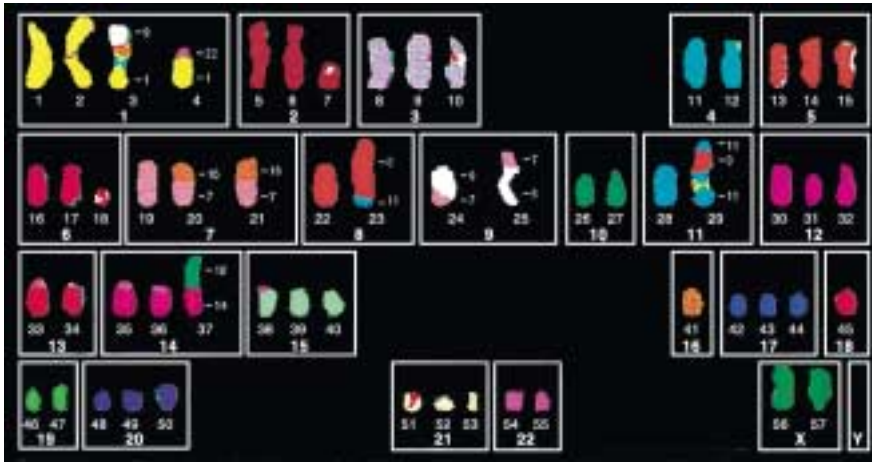


Figure 4. **Caryotype d'une métaphase d'une lignée cellulaire d'un carcinome ovarien par SKY.** Hyperploïdie avec nombreux remaniements de structure. À chaque paire chromosomique correspond une couleur particulière. Les segments chromosomiques remaniés sont visibles par la juxtaposition de segments de couleurs différentes.

bandes G permettant de reconnaître les chromosomes et segments chromosomiques identifiables. Les images simples captées sont ensuite superposées, ce qui donne une image composite qui sera traitée par un algorithme spécifique pour attribuer des pseudocouleurs aux chromosomes et les classer en un caryotype.

L'équipe de Schröck a développé le SKY (*spectral karyotyping*) fondé sur le système de traitement d'images utilisant un spectroscope de Fourier, Spectracube[®] mis au point par Bell en 1972 [35-36], couplé à un microscope à épifluorescence adapté. Celui-ci est muni d'un seul filtre triple bandes passantes. Un flux lumineux à large spectre, émis par une lampe à xénon du microscope, traverse le filtre qui sélectionne les longueurs d'ondes spécifiques excitatrices des 5 fluorochromes. Les chromosomes émettent chacun un signal lumineux complexe caractéristique de sa composition fluorochromique. Ces signaux traversent alors un interféromètre de Sagnac au niveau duquel est engendrée une multitude d'interférogrammes. Chacun correspond à une fonction de longueurs d'ondes au niveau d'un point donné de la préparation ou pixel. L'interférogramme caractéristique de chaque pixel est capté par une caméra CCD (*charged cooled device*) puis décomposé par transformation mathématique de

Fourier en ondes constitutives fournissant un spectre spécifique de la lumière émise au niveau de chaque pixel. Ce dernier sera transformé par un algorithme en une pseudocouleur spectrale au niveau de tous les pixels de l'image ayant le même spectre. La classification des chromosomes donne alors un caryotype spectral. Pour faciliter l'interprétation, une image en contre-coloration DAPI donnant un marquage de type bandes G est aussi acquise.

Actuellement certaines équipes développent des techniques de *banding* multicolore selon le même principe de la M-FISH mais en utilisant des sondes de peinture spécifiques de région (POP, *partial chromosome paint*) engendrées par microdissection chromosomique [37].

Conclusions

La cytogénétique moléculaire sous ses différents aspects techniques est actuellement un outil puissant en diagnostic chromosomique en étant toujours complémentaire à la cytogénétique conventionnelle. Avec l'avènement des avancées techniques, elle devrait permettre de découvrir de nombreuses nouvelles anomalies chromosomiques récurrentes et par conséquent d'ouvrir la voie à la découverte de nouveaux gènes aussi bien en cytogénétique tumorale qu'en cytogénétique constitutionnelle ■

RÉFÉRENCES

- Gall JG, Pardue ML. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytogenetical preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1969 ; 63 : 378-83.
- Saunders GF, Hsu TC, Getz MJ, *et al.* Localisation of human satellite DNA in human chromosomes. *Nature* 1972 ; 236 : 244.
- Jones KW, Prosser J, Corneo G, Ginelli E. The chromosomal location of human satellite DNA III. *Chromosoma* 1973 ; 42 : 445-51.
- Harper ME, Saunders GF. Localization of single copy DNA sequences on G-banded human chromosomes by *in situ* hybridization. *Chromosoma* 1981 ; 831 : 431-9.
- Gerhard DS, Kawasaki ES, Bancroft FC, Szabo P. Localization of a unique gene by direct hybridization *in situ*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981 ; 78 : 3755-9.
- 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.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986 ; 83 : 2934-8.
- Pinkel D, Landegent J, Collins C, *et al.* Fluorescence *in situ* hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988 ; 85 : 9138-42.
- Cremer T, Landegent J, Bruckner A, *et al.* Detection of chromosome aberration in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non-radioactive *in situ* hybridization techniques. *Hum Genet* 1986 ; 741 : 346-52.
- Muleris M, Richard F, Apiou F, Dutrillaux B. *Hybridation in situ en cytogénétique moléculaire : principes et techniques*. Collection Génie génétique G2. Paris: Tec et Doc Lavoisier et Cachan Éditions médicales, 1996.
- Wilkinson DG. *In situ* hybridization: a practical approach. The practical approach series. In: Rickwood D, Hames BD, eds. New York: IRL Press-Oxford University Press, 1994.
- Wiegant J, Kalle W, Mullenders L, *et al.* High resolution *in situ* hybridization using DNA halo preparations. *Hum Mol Genet* 1992 ; 1 : 587-91.
- Heiskanen M, Karhu R, Hellsten E, *et al.* High resolution mapping using fluorescence *in situ* hybridization to extended DNA fibers prepared from agarose-embedded cells. *Bio-techniques* 1994 ; 17 : 928-9/932-3.
- Parra I, Windle B. High resolution visual mapping of stretched DNA by fluorescent hybridization. *Nat Genet* 1993 ; 5 : 17-21.

RÉFÉRENCES

15. Michalet X, Ekong R, Fougerousse F, *et al.* Dynamic molecular combing : Stretching the whole human genome for high resolution studies. *Science* 1997 ; 277 : 1518-23.

16. Michalet X, Bensimon A. Peignage moléculaire d'ADN : cartographie physique du génome et diagnostic génétique. *Med Sci* 1997 ; 13 : 1299-305.

17. Langer PR, Waldrop AA, Ward DC. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides : novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981 ; 78 : 6633-7.

18. Feinberg P, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction enzyme fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 1984 ; 137 : 266-7.

19. Richard F, Vogt N, Muleris M, *et al.* Increased FISH efficiency using APC probes generated by direct incorporation of labeled nucleotides by PCR. *Cytogenet Cell Genet* 1994 ; 65 : 169-71.

20. Lemieux N, Dutrillaux B, Viegas-Pequignot E. A simple method for simultaneous R or G-banding and fluorescence *in situ* hybridization of small single-copy genes. *Cytogenet Cell Genet* 1992 ; 59 : 311-2.

21. Feingold J, Fellous M, Solignac M. *Principes de génétique humaine*. Paris : Hermann, 1998.

22. Pellestor F. Ce que le PRINS peut faire pour vous. *Med Sci* 1998 ; 14 : 935-8.

23. Koch JE, PETERSen KB, Gregersen N, Bolund L. Oligonucleotide-priming methods for chromosome-specific labelling of alpha satellite DNA *in situ*. *Chromosoma* 1989 ; 98 : 259-65.

24. Pellestor F, Girardet A, Lefort G, *et al.* 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.

25. Lichter P, Ledbetter SA, Ledbetter DH, Ward DC. Fluorescence *in situ* hybridization with Alu and Ll polymerase chain reaction probes for rapid characterization of human chromosomes in hybrid cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 6634-8.

26. Volpi EV, Muresu R, Baldini A. Multicolor primed *in situ* labeling. In : Verma RS, Babu A, eds. *Human chromosomes, principles and techniques*. New York : McGraw-Hill, 1995.

27. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, *et al.* Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992 ; 258 : 818-21.

28. Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, *et al.* Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1994 ; 19 : 231-43.

29. Lapiere JM, Cacheux V, Da Silva F, *et al.* Comparative genomic hybridization :

technical development and cytogenetic aspects for routine use in clinical laboratories. *Ann Genet* 1998 ; 41 : 56-62.

30. Speicher MR, Ballard SG, Ward DC. Computer image analysis of combinatorial multi-fluor FISH. *Bioimaging* 1996 ; 4 : 52.

31. Speicher MR, Ballard SG, Ward DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 1996 ; 12 : 368-75.

32. Schrock E, Du Manoir S, Veldman T, *et al.* Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 1996 ; 273 : 494-7.

33. Nederlof PM, Robinson D, Abuknesha R, *et al.* Three color fluorescence *in situ* hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences. *Cytometry* 1989 ; 10 : 20-7.

34. Eils R, Uhrig S, Saracoglu K, *et al.* An optimized, fully automated system for fast and accurate identification of chromosomal rearrangements by multiplex-FISH (M-FISH). *Cytogenet Cell Genet* 1998 ; 82 : 160-71.

35. Bell RJ. *Introductory fourier transform spectroscopy*. Londres : Academic Press, 1972.

36. Rothmann C, Bar-Am I, Malik Z. Spectral imaging for quantitative histology and cytogenetics. *Histol Histopathol* 1998 ; 13 : 921-6.

37. Chudoba I, Plesch A, Lorch T, *et al.* High resolution multicolor-banding : a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 1999 ; 84 : 156-60.

Summary

Molecular cytogenetic techniques: principles and advances

The use of molecular cytogenetic approaches based on fluorescence *in situ* hybridization (FISH) has increased in recent years. They are a powerful tool for basic research on genome organization and mapping as well as for diagnosis applications. In prenatal, constitutional and cancer genetics, detection and identification of chromosomal rearrangements that are causally related to genetic diseases improve diagnosis and contribute to therapy decision. However numerical and structural chromosome aberrations that escape conventional chromosome banding analysis such subtle translocations, small markers and complex chromosomal rearrangements need exploration with FISH techniques. Using specific DNA probes (whole chromosome painting, subchromosomal regions or gene-specific probes), it is possible to analyse a fraction of the genome and to confirm the presence of already suspected chromosomal aberrations. More recently global approaches for detection of chromosomal material imbalances of the entire genome have been developed : comparative genomic hybridization (CGH) and multicolor FISH (M-FISH, SKY...). In this paper we review the principles of molecular cytogenetic approaches and the advances established by improved techniques of fluorescence *in situ* hybridization.

*** GLOSSAIRE ***

- CCD** : charged cooled device.
- CGH** : hybridation génomique comparative.
- DOP-PCR** : degenerated oligonucleotide primer-polymerase chain reaction.
- FISH** : hybridation *in situ* en fluorescence.
- FITC** : isothiocyanate de fluorescéine.
- HISOMA** : hybridation *in situ* d'oligonucléotides marqués.
- IP** : iodure de propidium.
- M-FISH** : multiplex FISH.
- Nick-translocation** : marquage par déplacement de coupures par la Dnase I, suivies par l'activité de l'ADN polymérase I.
- PCP** : partial chromosome paint.
- PRINS** : synthèse *in situ* amorcée, primed *in situ* labeling.
- Random-priming** : marquage par amorçage aléatoire (après dénaturation de l'ADN, un mélange d'hexanucléotides ajoutés vont s'hybrider et servir d'amorces pour la synthèse d'un nouveau brin en présence de nucléotides modifiés).
- SKY** : spectral karyotyping.

TIRÉS À PART

M.F. Portnoi.