

## Les nouveaux outils de l'analyse génétique et cytogénétique

# Tout ce que la FISH peut faire pour vous

Simone Gilgenkrantz, Evelin Schröck, Marek Liyanage, Stan du Manoir, Thomas Ried

**L**a FISH rouge..., jaune, bleue, multicolore connaît désormais un succès qu'étaient loin d'imaginer Jean-François et Marie-Geneviève Mattei dans la synthèse au demeurant exhaustive qu'ils consacraient ici même à cette technique en 1986 [1]. De la « peinture » de chromosomes au marquage par de petites sondes de séquence unique, l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) est actuellement en mesure de répondre à une multitude de besoins, en recherche comme en routine, dans les anomalies constitutionnelles comme dans les anomalies acquises, en culture comme sur cellules ou coupes tissulaires *ex vivo*, sur noyaux en interphase comme sur métaphases. Utilisée sur noyaux interphasiques, elle est en passe de devenir une technique de coloration à la portée de tout laboratoire de routine, à condition d'être utilisée par des observateurs expérimentés (par exemple en anatomie pathologique) ou d'en connaître les limites et les dangers (en particulier pour le diagnostic prénatal de la trisomie 21 sur amniocytes).

La méthode est simple et rapide, quoique parfois délicate. Elle repose sur la propriété d'hybridation de deux brins d'ADN complémentaires, le marquage des sondes consistant à fixer, sur le brin d'ADN choisi, un haptène qui sera révélé, après l'hybridation directe sur métaphase ou sur noyau préalablement traités, par un

anticorps marqué par un fluorochrome. Le même principe peut aussi être utilisé dans le système biotine-avidine.

La FISH a su combler la solution de continuité existant jadis entre cytogénétique et génétique moléculaire, sans compter les services rendus dans l'élaboration de la carte génétique qui constituent, en eux-mêmes, un chapitre insigne de la cartographie qui dépasse notre propos.

### Les sondes de l'ADN humain total

Dans l'exploration du caryotype, le choix des sondes est déterminant selon l'objectif à atteindre. Une sonde fluorescente peut être réalisée avec de l'ADN humain total. Elle reconnaît tout segment d'ADN humain, dans des hybrides somatiques, par exemple, où il est prudent de vérifier que seul le chromosome ou le segment de chromosome qu'on souhaitait isoler a bien été retenu. Dans les hybrides irradiés, les remaniements étant plus complexes, une telle vérification s'avère encore plus utile.

### Le coloriage des chromosomes

Des bibliothèques d'ADN spécifiques de chaque paire chromosomique furent réalisées après séparation des chromosomes, soit par cytométrie de

flux, soit par microdissection, ce qui permit d'obtenir de meilleurs résultats, en particulier pour les paires de taille analogue que le cytomètre n'est pas en mesure de discriminer. Ces bibliothèques spécifiques de chromosome furent marquées directement par des nucléotides conjugués à des fluorophores différents. Puis, selon le but recherché, de très nombreuses sondes furent proposées, permettant d'analyser sur métaphases des remaniements chromosomiques constitutionnels ou acquis. Comme nous l'allons voir, le caryotype spectral est sans conteste le « bouquet final » de ces techniques.

### Une paire chromosomique, une couleur

Quand on suspecte une duplication interstitielle d'un segment chromosomique, il est facile et rapide de s'en assurer en utilisant une sonde correspondant à la totalité de l'ADN de la paire chromosomique incriminée. S'il s'agit d'une duplication, le chromosome s'allumera entièrement alors que s'il s'agit d'une insertion, une partie du chromosome ne sera pas colorée.

### Deux paires chromosomiques, deux couleurs

Il est possible de colorer deux chromosomes hétérologues avec des fluorochromes différents, lorsqu'on soupçonne, par exemple, une translocation réciproque, parfois difficile à mettre en évidence par les tech-

niques cytogénétiques standard si les segments échangés ont une taille équivalente.

#### Une couleur pour chaque bras

Par microdissection, tous les bras courts et tous les bras longs des chromosomes métacentriques furent prélevés (cinq à dix copies pour chaque bras, ensuite amplifiées par PCR) [2]. Ces sondes permettent de reconnaître une inversion péricentrique, impossible à voir avec les sondes de chromosome entier. De même, elles garantissent l'intégrité d'un chromosome en hybride somatique ou après radiations ionisantes ou action de clastogènes. Mentionnons qu'en raison du caractère artisanal de la microdissection, il existe un léger chevauchement des deux fluorochromes dans la région centromérique.

#### Le caryotype spectral

Le nombre des fluorochromes n'étant pas illimité, il semblait impossible de fabriquer des sondes en 24 couleurs (une couleur pour chacune des 22 paires d'autosomes et pour les deux gonosomes, X et Y). C'est pourtant ce que viennent de réaliser deux équipes, en optant chacune pour des procédés d'analyse d'images un peu différents [3, 4].

L'idée de mélanger plusieurs fluorochromes pour marquer les sondes fut proposée pour la première fois en 1990 et, dès 1992, plusieurs équipes obtenaient des résultats prometteurs [5, 6] : le marquage combiné, mélangeant chaque fluorochrome en proportion différente permet d'obtenir une gamme de couleurs dont le nombre théorique est fonction du nombre de colorants ( $n$ ) suivant la formule  $(2^n) - 1$ . Ainsi, avec quatre fluorochromes, 15 cibles peuvent être discriminées; avec cinq fluorochromes, 31 combinaisons sont possibles, et ainsi de suite. En 1992, l'équipe de David Ward (New Haven, CN, USA), en combinant trois fluorochromes réussit à obtenir sept sondes, identifiables simultanément sur la même métaphase [7]. Ce n'était qu'un début. La même équipe vient de réussir à construire un programme d'analyse spectrale reconnaissant 27 sondes différentes obtenues par mélange de fluorochromes. Pour cette FISH *multiplex*, six fluoro-

chromes furent sélectionnés (la fluorescéine et les colorants cyanine Cy3, Cy 3,5, Cy 5, Cy 5,5, et Cy7), le DAPI (4'-6-diamidino-2-phénylindole) servant de contre-coloration pour distinguer les métaphases et le contour des chromosomes. Pour chacun de ces colorants utilisés en mélange dans les sondes spécifiques de chaque paire chromosomique, un jeu de filtres interférentiels soigneusement sélectionnés parmi tous ceux existant sur le marché fut construit, aboutissant à une discrimination supérieure à 90 % entre les colorants dont les spectres sont les plus proches. Pour chaque paire chromosomique, les jeux de filtres prennent en compte l'intensité de fluorescence de chacun des colorants utilisés en mélange dans chacune des sondes. Le programme enregistre leur image spectrale en intensité de gris (après correction de divers paramètres) et les transforme en pseudo-couleurs réalisant ainsi un très joli coloriage du caryotype normal : le caryotype spectral [8].

Un résultat tout aussi esthétique vient d'être obtenu dans un travail collaboratif réunissant les équipes de Ferguson-Smith (GB), de Ledbetter (MD, USA) et un groupe israélien [4]. Là encore, le programme attribue une pseudo-couleur à chaque sonde en utilisant un algorithme fondé sur le spectre (*system SD200, Applied Spectral Imaging*). Mais la mesure se fait à travers un seul système de triple filtre vers un interféromètre. L'interférogramme engendré pour chaque pixel est analysé par transformation de Fourier (procédé permettant d'évaluer le spectre de la lumière) puis transmis à une caméra CCD (*charge coupled device*). Les spectres mesurés sont alors traduits en couleurs convenues. On obtient alors un SKY (pour *spectral karyotype*). Mais à quoi peut servir ce « coloriage » du caryotype, terme qui semble préférable à la « peinture », traduction un peu lourde du *painting* anglais? Les auteurs en font une application très élégante en coloriant, avec les sondes humaines, le caryotype du gibbon où peuvent se lire d'un seul coup d'œil les analogies et les modifications survenues entre ce primate et nous au cours de millions d'années. Indiscutablement, la technique peut être utilisée

avec profit en phylogénèse. Mais c'est surtout dans les remaniements acquis, les leucémies et les tumeurs, que le caryotype spectral devient un outil très performant. Le plus souvent, les techniques de cytogénétique traditionnelles ne permettent pas d'interpréter complètement les évolutions clonales, les marqueurs ou les HSR (pour *homogeneous staining regions*) qui présentent, pourtant, un grand intérêt pour la compréhension de la tumorigénèse. La *figure 1* démontre amplement la puissance d'analyse cytogénétique moléculaire qu'apporte le caryotype spectral aux remaniements complexes dans les lignées tumorales.

Plus récemment, a été mis au point le caryotype spectral de la souris [9]. Les tumeurs induites peuvent donc être analysées dès leur apparition avec une extrême précision et fournir de précieux renseignements sur la carcinogénèse humaine (après invalidation de gènes, par exemple) (*figure 2*).

Toutefois, il n'est pas certain que le caryotype spectral puisse passer facilement en routine. L'étude des anomalies constitutionnelles ne nécessite pas un tel luxe. Quant à l'analyse spectrale des remaniements dans les leucémies et les tumeurs, elle exige une qualité des métaphases difficile à obtenir dans ces populations cellulaires. Enfin, le coût de l'appareil risque de n'être pas à la portée de tous les laboratoires de cytogénétique. Sa diffusion prendra du temps, mais, grâce à la puissance d'analyse de SKY (on est vraiment au septième ciel!), nul doute que le caryotype spectral ne finisse par s'imposer.

#### Les sondes centromériques

Produites à partir de séquences répétitives des régions centromériques et péricentromériques, elles sont spécifiques de chaque paire chromosomique et donnent un signal intense permettant de les utiliser facilement sur noyaux en interphase. Elles servent à évaluer la répartition des populations cellulaires en cas de mosaïque, à suivre l'évolution d'une greffe de moelle osseuse lorsque le donneur est de sexe différent du receveur, ou à dépister rapidement des aneuploïdies, comme la trisomie 21 sur cel-

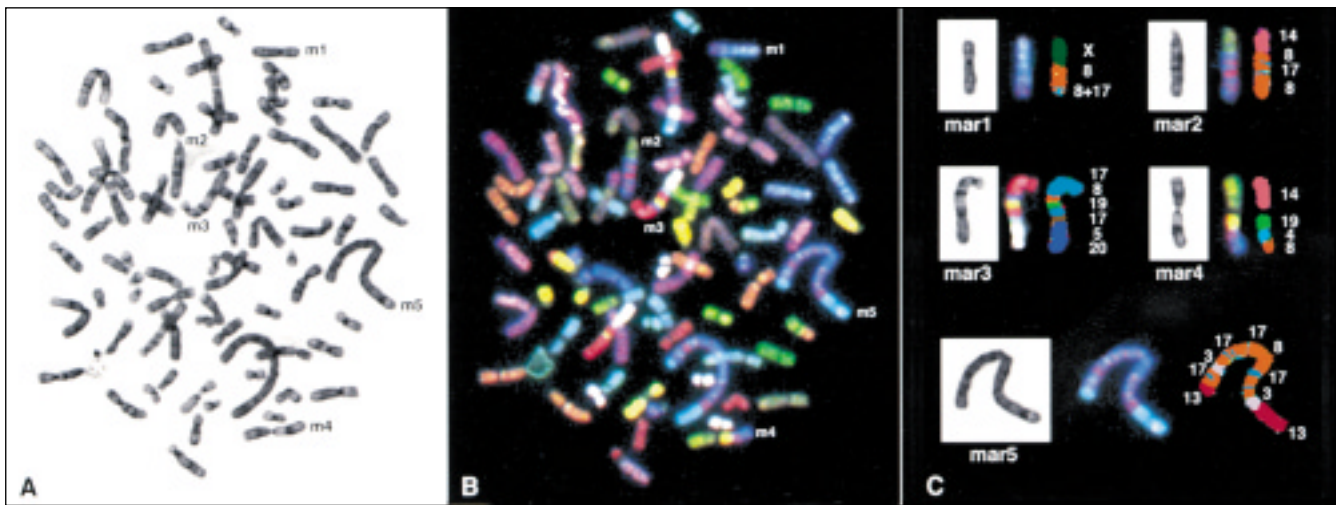


Figure 1. **Analyse cytogénétique d'une métaphase de la lignée SKBR3, provenant d'un cancer du sein.** **A.** Métaphase à 80 chromosomes en bandes G. Parmi les nombreux chromosomes remaniés, certains peuvent être identifiés. Mais l'origine de marqueurs (répertoriés de m1 à m5) pratiquement sans bandes (HSR, homogeneously staining regions) ne peut être retrouvée. **B.** Le caryotype spectral permet de visualiser les chromosomes en 24 couleurs et dévoile, au sein des chromosomes, la complexité des remaniements survenus et la nature des HSR. **C.** L'observation des marqueurs, bandes G et transformation de couleur SKY, fournit une analyse précise de leur composition. Les chromosomes d'où proviennent les différents segments sont inscrits en marge de chaque marqueur. Le marqueur m1 contient des segments provenant des chromosomes X, 8 et 17. L'étude comparative des bandes G et des couleurs montre que le point de cassure est situé en Xq21. Le marqueur 2 dérive des chromosomes 8 et 14 entrecoupés par des segments de 17. Le grand marqueur 5 (en double dans la métaphase) contenait un HSR ; il est constitué de segments des chromosomes 8 et 17 (ce qui correspond aux résultats de l'hybridation génomique comparative ou CGH). Les HSR des extrémités contiennent du matériel appartenant aux chromosomes 3 et 13.

lules amniotiques, par exemple (mais elles sont évidemment incapables de déceler un remaniement de structure, ce qui limite leur utilisation en diagnostic prénatal).

Dans les tissus tumoraux, sur coupes ou frottis, elles permettent d'évaluer directement le degré d'aneuploïdie, alors qu'une pression de sélection peut s'exercer sur certaines lignées en culture.

Enfin, elles ont permis de mieux comprendre les mécanismes de fusion de chromosomes acrocentriques des translocations robertsoniennes. Rappelons qu'il s'agit de fusions de deux chromosomes par leurs extrémités (*m/s n° 9, vol. 5, p. 694*). Dans un article récent, il apparaît clairement que les translocations robertsoniennes entre chromosomes hétérologues ne procèdent pas toutes du même mécanisme [10]. Alors que dans les plus fréquentes, c'est-à-dire les translocations rob (13q;14q) et rob (14q;21q), les points de cassure se produisent

presque toujours aux mêmes sites et semblent correspondre à des recombinaisons homologues ; dans les autres translocations, la variabilité des points de cassure, particulièrement dans la translocation rob (14q;15q), suggère leur caractère stochastique.

### Les sondes télomériques

On avait de bonnes raisons de penser que les régions subtélomériques étaient le siège de remaniements chromosomiques. On savait, d'une part, que 40 % des retards mentaux sévères et 20 % des retards mentaux modérés étaient dus à des remaniements chromosomiques et, d'autre part, que des petits remaniements dans les régions subtélomériques pouvaient survenir et passer inaperçus sur le caryotype standard. L'an dernier, sur 99 enfants atteints de retards mentaux inexpliqués, une équipe anglaise avait pu dépister trois translocations cryptiques subté-

lomériques en utilisant seulement les sondes de 28 télomères (18 de bras longs et 8 de bras courts autosomiques et 2 de gonosomes) [11]. On dispose à présent d'un lot complet de sondes spécifiques pour tous les télomères des chromosomes humains (les 44 extrémités télomériques des autosomes, plus une sonde unique pour chacune des extrémités – dites pseudo-autosomiques – des gonosomes), fruit d'une collaboration entre des équipes anglaises et américaines [12]. Il était relativement facile de cloner les fragments télomériques des chromosomes humains contenus dans des YAC par la technique dite « half-YAC-cloning », qui utilise la complémentation par la fonction télomérique de la levure pour sélectionner ces fragments. Mais la plupart des régions clonées contenaient des bandes de séquences répétitives partagées par bon nombre de chromosomes. Il fallut donc recourir à des sous-clonages en cosmides, à un criblage de biblio-

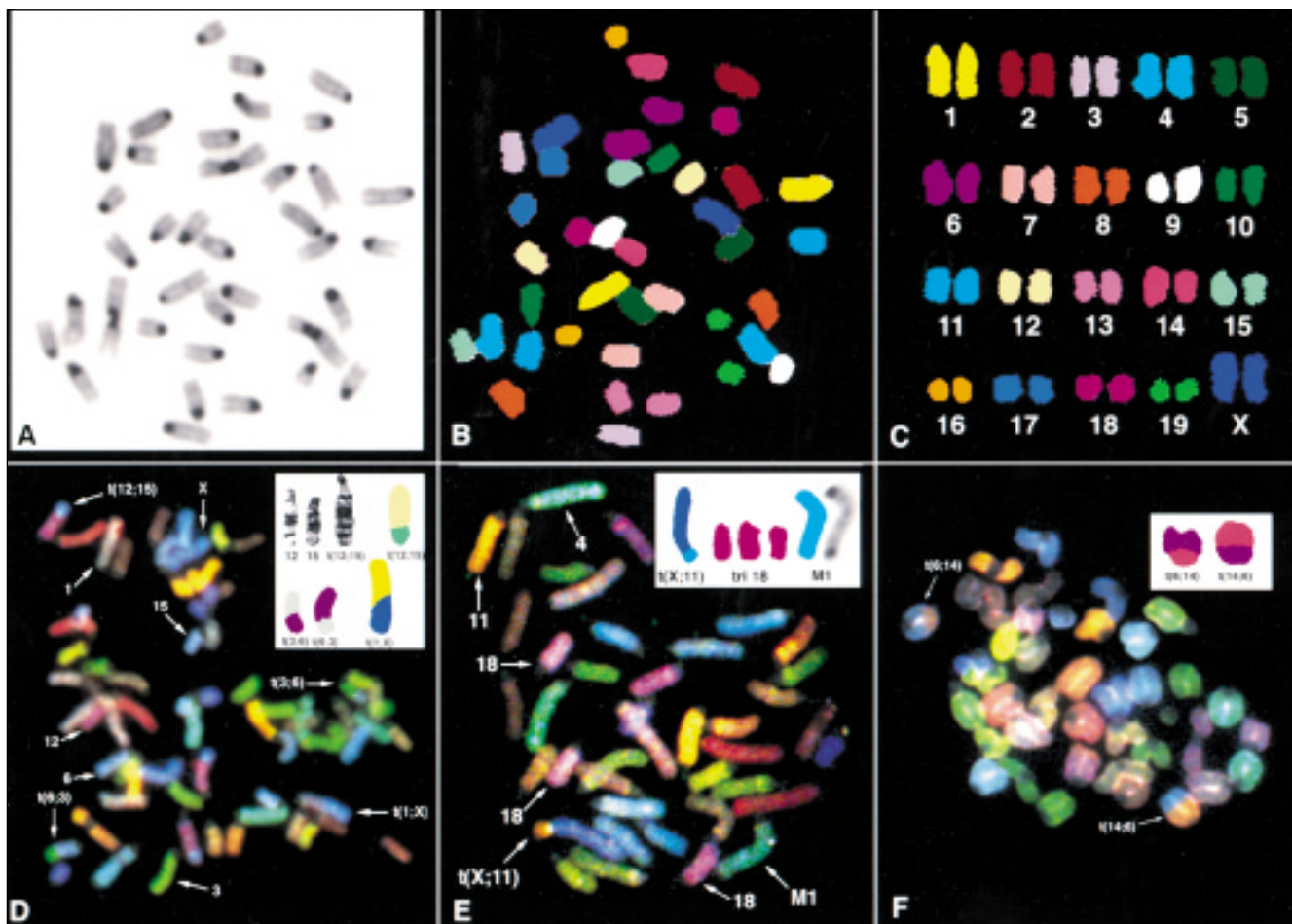


Figure 2. **Métaphases de cellules de souris.** **A.** Métaphase d'une cellule splénique de souris (coloration DAPI). **B.** et **C.** Métaphase et caryotype spectraux. **D.** Métaphase provenant d'un plasmocytome, avec une translocation 12;15 préalablement identifiée par bandes G (dans l'encadré) et trois autres translocations. Les flèches indiquent les chromosomes remaniés et leurs homologues normaux. **E.** Métaphase d'un carcinome mammaire apparu chez une souris transgénique (invalidation de c-myc) avec une translocation X;11 (encore jamais décrite) et un marqueur M1, dérivé d'un chromosome 4. **F.** Métaphase de culture primaire d'un thymome, apparu chez une souris dont le gène de l'ataxie télangiectasie (Atm) a été invalidé. L'implication des chromosomes 12 et 14 murins, qui portent les gènes codant pour les chaînes  $\alpha$  et  $\delta$  des récepteurs TcR, correspond aux observations faites chez l'homme, dans les lymphomes de sujets atteints d'ataxie télangiectasie (AT), ce qui suggère un mécanisme génétique commun entre l'AT et la déficience de Atm chez la souris. (Cette figure provient d'un article de Liyanage et al. publié dans Nature Genetics [9], et reproduit ici avec l'aimable autorisation de Nature Genetics.)

thèques de PAC (dérivé de P1 : pCY-PAC-2) (*m/s n° 6, vol. 12, p. 851*) ainsi qu'à une « marche » à la recherche de séquences spécifiques. La plupart de ces séquences spécifiques sont situées entre 100 et 300 kb de l'extrémité du chromosome. Comparé aux techniques cytogénétiques de haute résolution, le recours à ces sondes spécifiques est dix fois plus puissant dans la détection des réarrangements cryptiques télomériques.

*m/s n° 11, vol. 13, novembre 97*

### Les petites sondes de séquence unique pour des cadres pathologiques spécifiques

La FISH est désormais utilisée en routine dans certains types de remaniements, soit constitutifs, soit acquis. Dans la recherche de syndromes dus à des microdélétions ou à des microduplications comme les syndromes de Prader-Willi et

d'Angelman (*m/s n° 2, vol. 9, p. 232; n° 6, vol. 12, p. 835*), de Di George (*m/s n° 6, vol. 12, p. 836*), ou de Williams-Beuren, par exemple, les petites sondes, spécifiques de la plus petite délétion commune, permettent un diagnostic prénatal sur cellules amniotiques alors même qu'on ignore encore le ou les gènes en cause dans ces maladies.

Dans les remaniements acquis, avec création d'un gène de fusion, l'acco-

lement des deux sondes correspondant aux gènes fusionnés observé sur noyaux en interphase, apporte rapidement la preuve de la fusion, sans avoir besoin de recourir à l'analyse des métaphases (*m/s n° 10, vol. 6, p. 1024*).

## Les sondes-cadenas

Enfin, tout récemment, une équipe suédoise a trouvé le moyen d'ancrer solidement une sonde à son ADN cible: grâce à une ligase thermolabile, elle a réussi, en effet, à circulariser une sonde par ses deux extrémités exactement complémentaires, un peu comme un cadenas posé *in situ*, ou un anneau fixé sur une tringle à rideau [13]. Avec un groupe hollandais, démonstration fut faite de la grande stabilité et de l'extrême spécificité de ces sondes-cadenas, puisqu'il fut possible de distinguer deux séquences alphoides sur les centromères 13 et 21, ne différant que par un seul nucléotide [14]. Dans un proche avenir, il ne devrait pas être impossible d'identifier des mutations ponctuelles, directement sur les caryotypes par FISH, grâce à des sondes-cadenas spécifiques, colorées différemment. Les cytogénéticiens vont alors pouvoir réaliser un vieux rêve jusqu'alors inaccessible: se substituer aux biologistes moléculaires!

## Conclusions

Ce tour d'horizon nous montre l'importance croissante de la FISH dans la cytogénétique qui devient désormais de plus en plus moléculaire. Les sociétés commerciales, qui fournissent de très nombreuses sondes, en sont bien conscientes. Mais ces sondes du commerce ne donnent pas toujours des résultats

constants. Il est donc souhaitable que s'exerce sur elles un contrôle de qualité comme celui qui vient d'être réalisé dans une étude aux USA [15]. Quant au caryotype spectral, il devrait remplacer les techniques traditionnelles pour la cytogénétique des hémopathies et des tumeurs [16], mais à condition d'en avoir les moyens. Et rien n'est moins sûr, hélas, dans la conjoncture actuelle ■

## RÉFÉRENCES

1. Mattei MG, Mattei JF. L'hybridation *in situ* en cytogénétique. *Med Sci* 1986 ; 2 : 35-41.
2. Guan XY, Zhang H, Bittner M, Jiang Y, Meltzer P, et al. Chromosome arm painting probes. *Nature Genet* 1996 ; 12 : 10-1.
3. Speicher MR, Ballard SG, Ward DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nature Genet* 1996 ; 12 : 368-75.
4. Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, et al. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 1996 ; 273 : 494-7.
5. Nederlof PM, van der Flier S, Vrolijk J, Tanke HJ, Raap AK. Fluorescence ratio measurements of double-labeled probes by *in situ* hybridization by digital imaging microscopy. *Cytometry* 1992 ; 13 : 839-45.
6. Dauwerse JG, Wiegant J, Raap AK, Breuning MH, van Ommen GJB. Multiple colors by fluorescence *in situ* hybridization using ratio-labeled DNA probes create a molecular karyotype. *Hum Mol Genet* 1992 ; 1 : 593-8.
7. Ried T, Landes G, Dackowski W, Klinger K, Ward DC. Multicolor fluorescence *in situ* hybridization for the simultaneous detection of probe sets for chromosomes 13, 18, 21, X and Y in uncultured amniotic fluid cells. *Hum Mol Genet* 1992 ; 1 : 307-13.
8. Le Beau MM. One FISH, two FISH, red FISH, blue FISH. *Nature Genet* 1996 ; 12 : 341-4.
9. Liyanage M, Coleman A, du Manoir S, Veldman T, McCormack S, Dickson RB, et al. Multicolour spectral karyotyping of mouse chromosomes. *Nature Genet* 1996 ; 14 : 312-5.
10. Page SL, Shin JC, Han JY, Choo KHA, Shaffer LG. Breakpoint diversity illustrates

distinct mechanism for Robertsonian translocation formation. *Hum Mol Genet* 1996 ; 5 : 1279-88.

11. Flint J, Wilkie AOM, Buckle VJ, Winter RM, Holland AJ, McDermid HE. The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nature Genet* 1996 ; 9 : 132-9.

12. National Institutes of Health and Institute of Molecular Medicine Collaboration. A complete set of human telomeric probes and their clinical application. *Nature Genet* 1996 ; 14 : 86-9.

13. Nilsson M, Malmgren H, Samiotaki M, Kwiatkowski M, Chowdhary BP, Landegren U. Padlock probes: circularizing oligonucleotides for localized DNA detection. *Science* 1997 ; 265 : 2085-8.

14. Nilsson M, Krejci K, Koch J, Kwiatkowski M, Gustavson 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. *Nature Genet* 1997 ; 16 : 252-5.

15. Dewald G, Stallard R, Bader PI, et al. Toward quality assurance for metaphase FISH: a multi-center experience. *Am J Med Genet* 1996 ; 64 : 539-45.

16. Yung JF. New FISH probes- the end in sight. *Nature Genet* 1996 ; 14 : 10-2.

## Simone Gilgenkrantz

9, rue Basse, 54330 Clercy-Brenon, France.

Evelin Schröck  
Marek Liyanage  
Stan du Manoir  
Thomas Ried

Diagnostic Development Branch, National Center for Human Genome Research, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892-4470, États-Unis.

## TIRÉS À PART

S. Gilgenkrantz.

# Cours de Biologie Moléculaire de la Cellule

Enseignement Pratique

9 mars-10 avril 1998

Responsables du cours : A. Dautry-Varsat et D. Louvard

Renseignements et Inscriptions, date limite le 1<sup>er</sup> décembre 1997 - Mme Banisso

Secrétariat des Enseignements et des Stages

Institut Pasteur, 28, rue du Docteur-Roux, 75724 Paris Cedex 15, France

Tél. : 01 45 68 81 41 ou 01 40 61 33 62 - Fax : 01 40 61 30 46