

Cartographie à haute résolution par hybridation *in situ* fluorescente sur fibres d'ADN décondensées

Karine Monier, Mira Hazzouri, Fabien Mongelard, Sophie Rousseaux, Claire Vourc'h, Michel Robert-Nicoud

Récemment, plusieurs techniques de préparation de fibres d'ADN décondensées sur des lames de verre ont été décrites dans la littérature. Ces méthodes, couplées à l'hybridation *in situ* fluorescente, permettent de réaliser de la cartographie des génomes à haute résolution sur des fibres d'ADN génomique obtenues, soit directement à partir de cellules traitées, soit à partir d'ADN cloné. Trois types de fibres d'ADN peuvent être obtenus : (1) fibres déployées ou « halos », obtenues à partir de cellules entières, restant attachées à une structure nucléaire résiduelle ;

(2) fibres orientées ; et (3) fibres linéaires ou ADN « peigné », obtenues à partir d'ADN purifié en solution ou d'ADN de haut poids moléculaire préparés dans des blocs d'agarose. Seule la technique du peignage moléculaire permet la conversion instantanée des distances mesurées en microns (μm) en une longueur en kilobases (kb) car le degré de décondensation des fibres est reproductible. Un facteur de conversion de 0,5 $\mu\text{m}/\text{kb}$ peut être appliqué à toutes les types de molécules d'ADN d'une taille comprise entre 1 et 500 kb.

La carte physique des génomes constitue l'une des bases indispensables à l'analyse des anomalies génétiques. Elle facilite l'identification de régions délétées ou remaniées, dans le cas de maladies liées à des modifications du génome, et contribue ainsi à l'identification des gènes responsables des affections associées. Dans ce contexte, l'hybridation *in situ* fluorescente (FISH), qui permet de visualiser directement des séquences d'ADN sur des chromosomes métaphasiques ou interphasiques à l'aide de sondes fluorescentes, constitue un outil de choix pour la cartographie *in situ*.

La limite de résolution de la cartographie par FISH, c'est-à-dire la distance minimale en kilobases (kb) séparant deux séquences le long de la fibre d'ADN qui permette encore de les ordonner, dépend essentiellement du

degré de condensation de l'ADN dans les échantillons analysés. En effet, la cartographie sur chromosomes métaphasiques, dans lesquels l'ADN est très fortement condensé, ne permet de distinguer des séquences que lorsque leur éloignement est supérieur à une ou deux mégabases (Mb) ; en revanche, dans les noyaux interphasiques, l'ADN est moins condensé, et on peut distinguer des séquences éloignées de 50 à 100 kb (figure 2A). Grâce au développement de nouvelles méthodologies pour réaliser des hybridations *in situ* sur l'ADN décondensé artificiellement, le fossé qui séparait, il y a encore peu de temps, les approches de la biologie moléculaire, d'une part, et les approches *in situ*, d'autre part, tend aujourd'hui à se combler. La cartographie par FISH sur l'ADN décondensé permet en effet de distinguer des séquences nucléiques distantes de quelques kilobases.

Plusieurs techniques de production de fibres d'ADN décondensées ont été décrites dans la littérature (figure 1). Les méthodes de préparation à partir de cellules entières ou isolées permettent (fibres déployées ou « halo », figures 1A et 2B) [1, 2] ou ne permettent pas (fibres orientées, figures 1B et 2C) [3-5] de maintenir une structure nucléaire résiduelle. A partir d'ADN en solution ou d'ADN de haut poids moléculaire extrait de cellules lysées dans des blocs d'agarose, on obtient des préparations de fibres orientées [6] ou linéaires (figures 1C et 2D) [7]. Ces procédures utilisent des traitements chimiques (force ionique élevée, détergents, soude...) qui induisent une lyse ménagée ou totale des cellules, dissocient les complexes nucléoprotéiques et libèrent la fibre d'ADN. Dans certains cas (fibres orientées et fibres linéaires) un traitement mécanique

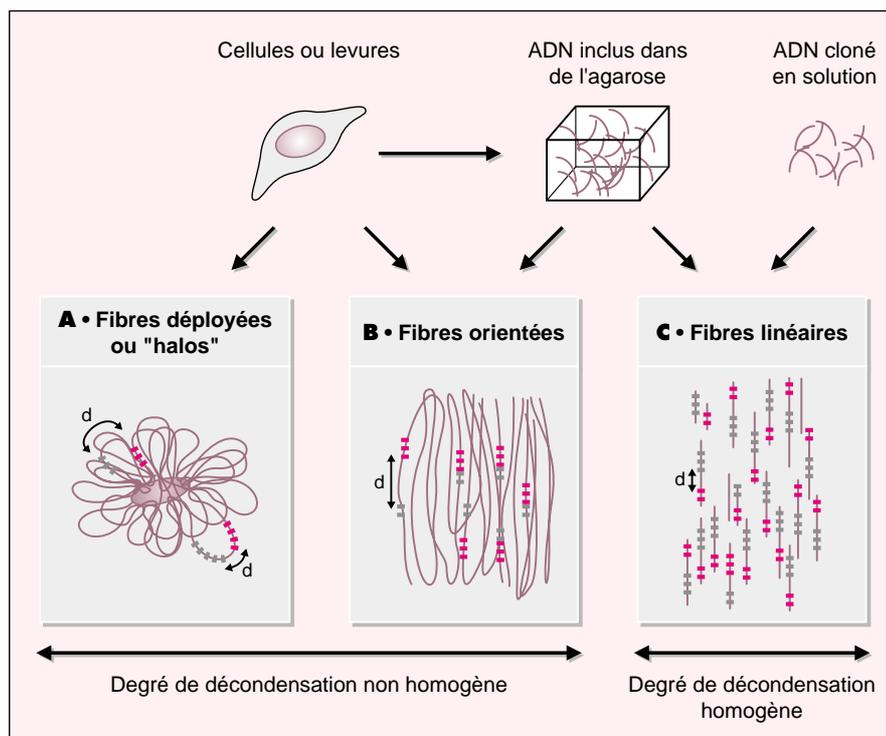


Figure 1. **Les différentes techniques de décondensation de l'ADN.** Trois types de préparations peuvent être obtenus en utilisant des techniques de décondensation différentes. Les fibres d'ADN peuvent, soit rester ancrées à un résidu nucléaire (A-fibres déployées ou « halos »), soit être libérées de leur ancrage et se distribuer suivant une direction privilégiée (B-fibres orientées), soit encore être parfaitement alignées dans la même direction (C-fibres linéaires). Ces préparations s'obtiennent, soit à partir de cellules ou de levures libres ou incluses dans de l'agarose, soit à partir d'ADN cloné en solution. Seules les préparations de fibres linéaires permettent d'obtenir un degré de décondensation reproductible.

est appliqué à la suite des traitements chimiques pour étirer et orienter les fibres. Le caractère unidirectionnel de l'orientation des fibres et l'homogénéité de leur degré de décondensation varient fortement selon la technique utilisée. Nous exprimerons dans cette revue le degré de décondensation des fibres d'ADN et de chromatine en micromètres (μm) par kilobase. Selon la méthode utilisée, le degré de décondensation varie entre 0,014 et 0,5 $\mu\text{m}/\text{kb}$.

Les signaux d'hybridation obtenus sur l'ADN décondensé se présentent sous la forme d'une succession de signaux ponctuels (collier de perles). Lorsque le degré de décondensation est proche de celui de la double hélice dans sa conformation B (0,34 $\mu\text{m}/\text{kb}$), on observe en moyenne une perle toutes les kilo-

bases. On ne sait pas exactement quelle signification donner à ces interruptions régulières du signal fluorescent. Elles ne sont pas engendrées par la présence de séquences répétées [3], mais elles pourraient correspondre à des régions de forte interaction entre la fibre d'ADN et la lame qui échapperaient à l'hybridation.

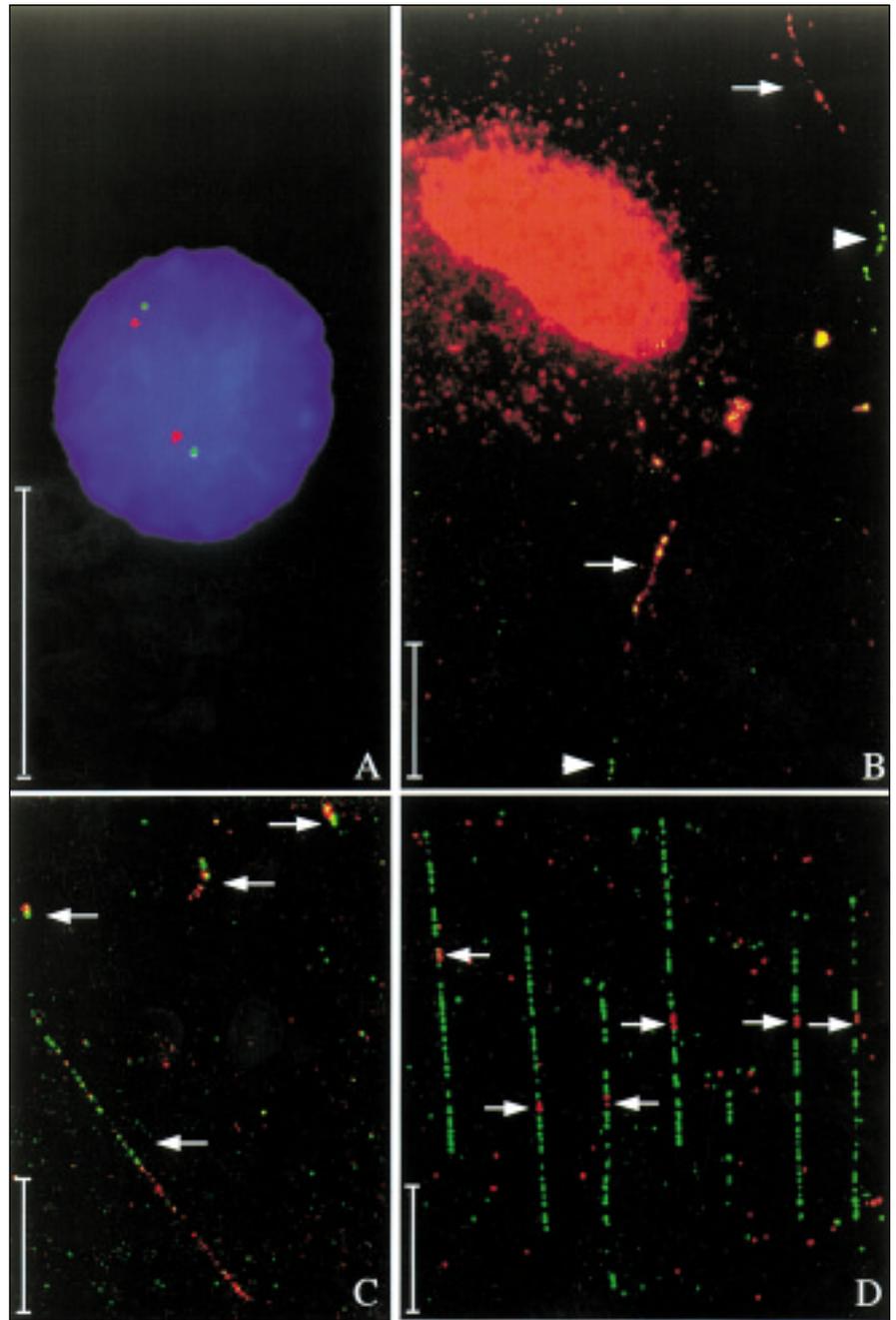
Méthodes de préparation d'ADN décondensé (figure 1)

Fibres déployées ou « halo »

On obtient les préparations de fibres déployées à partir de cellules non fixées qui permettent de maintenir une structure nucléaire résiduelle. Deux méthodes ont été décrites dans

la littérature [1, 2]. La première, mise au point par Wiegant *et al.* [1], repose sur un traitement des cellules à des concentrations salines élevées en présence de détergents non-ioniques. Elle s'inspire directement d'une technique de décondensation de la chromatine développée il y a une quinzaine d'années par Vogelstein *et al.* [8]. Ces auteurs ont, pour la première fois, utilisé le terme de « halo » pour désigner les structures nucléaires caractérisées par des boucles d'ADN de 100 à 200 kb attachées à un résidu nucléaire. La deuxième méthode repose sur l'utilisation combinée d'un inhibiteur de la topoisomérase II et d'un traitement alcalin [2], qui libère des boucles d'ADN ancrées à un noyau résiduel. Le degré de décondensation des fibres d'ADN, obtenu dans ces deux cas, est variable. La méthode des halos [1] permet d'obtenir, pour les boucles les plus décondensées (figure 2B), un degré de décondensation proche de celui de la double hélice dans sa conformation B (0,34 $\mu\text{m}/\text{kb}$). La méthode utilisant un inhibiteur de la topoisomérase et un traitement alcalin [2] ne permet pas d'obtenir un degré de décondensation aussi élevé (0,014 $\mu\text{m}/\text{kb}$). L'avantage de ces méthodes réside dans leur simplicité d'application. Les cellules directement cultivées ou déposées par centrifugation sur des lames de verre sont ensuite traitées par simple immersion de la lame dans une succession de solutions. Ces deux procédures maintiennent une certaine cohérence spatiale entre les boucles d'un même noyau et permettent, dans la plupart des cas, d'analyser les signaux noyau par noyau et de déterminer le nombre d'allèles en présence ainsi que leur structure. En revanche, l'attachement de certaines régions au résidu nucléaire constitue un obstacle à la cartographie de ces régions et rend plus difficile la mesure des distances entre des signaux distribués sur des fibres fortement courbées. La persistance d'un ancrage des boucles d'ADN a d'ailleurs été exploitée comme approche indirecte pour rendre compte de l'organisation de la fibre d'ADN au sein du noyau interphasique [9].

Figure 2. **Exemples d'hybridations in situ fluorescentes réalisées sur noyau interphasique (A), sur fibres d'ADN déployées ou « halos » (B) D'après [1], sur fibres d'ADN orientées (C), D'après [3] et linéaires (D).** Hybridation en double couleur (signaux rouges et verts) de deux sondes cosmides distantes de 160 kb (A), distantes de 20 kb (B) [1], ou se recouvrant de 1,5 kb (C) [3]. Hybridation en double couleur d'une sonde d'ADNc de 3 kb (en rouge) et d'une sonde de 50 kb (en vert) (D). Les signaux d'hybridation sur noyau interphasique (A) sont ponctuels, alors que sur l'ADN décondensé les signaux d'hybridation sont formés d'une succession de signaux ou collier de perles (B, C, D). Sur halo, c'est-à-dire sur des cellules entières, les signaux sont distribués sur des fibres courbes et ne se chevauchent pas (B). Sur fibres orientées, les signaux rouges et verts sont accolés mais sont de taille extrêmement variable (C). En revanche, sur fibres linéaires (ici de l'ADN génomique cloné dans le phage lambda), les signaux sont orientés parallèlement les uns par rapport aux autres et de taille homogène. Le signal rouge, correspondant à la sonde de trois kilobases, est visible sur toutes les fibres (D). L'ensemble de ces hybridations a été réalisé en utilisant des sondes marquées à la digoxygénine ou à la biotine par Nick translation ou random priming. Les sondes (environ 100 ng) ont été hybridées une nuit entre lame et lamelle dans un mélange contenant 50 % de formamide en présence d'ADN compétiteur. Sauf en ce qui concerne la figure 2A, les sondes ont été révélées par l'utilisation de plusieurs couches successives d'anticorps couplés à des fluorochromes. Par exemple, dans la figure 2D la sonde biotinylée (signal vert) a été révélée par une première couche de streptavidine couplée à du vert de rhodol, une deuxième couche d'anticorps antistreptavidine biotinylée et une troisième couche identique à la première. La sonde marquée à la digoxygénine (signal rouge) a été



révélée par un anticorps monoclonal de souris anti-digoxygénine et par un anticorps anti-souris couplé à de la cyanine 3. La barre représente 10 microns. La figure 2D a été réali-

sée en collaboration avec le laboratoire de A. Bensimon, Institut Pasteur, Paris. Les figures 2B et 2C ont été reproduites avec la permission de « Oxford University Press ».

Fibres orientées

Les préparations de fibres orientées [3-6] nécessitent une lyse cellulaire totale. Celle-ci est réalisée, soit directement sur la lame à partir d'une suspension de cellules fixées [3] ou non [4, 5], soit à partir de cellules incluses dans des blocs d'agarose [6]. Les lyses sur lame reposent sur un traitement à base de soude [3], ou sur l'utilisation combinée de SDS (sodium dodécyl sulfate), Triton et EDTA [4], ou de sel, SDS et Triton [5]. L'orientation des fibres est obtenue par l'écoulement des différentes solutions sur la lame inclinée. Dans l'agarose, la lyse est obtenue avec de la N-lauroylsarcosine et de l'EDTA en présence de protéinase K [6], puis les molécules sont étirées mécaniquement à l'aide d'une deuxième lame. Ces méthodes produisent des fibres plus longues que les méthodes décrites précédemment. En effet, les fibres d'ADN, libérées du corps nucléaire, peuvent atteindre une longueur allant jusqu'à 1 Mb [5]. Dans toutes ces préparations, l'orientation des fibres facilite la mesure des distances et la totalité du génome est accessible en raison de l'absence de résidu nucléaire. Toutefois, la perte d'ancrage des fibres à un corps nucléaire empêche une analyse cellule à cellule. Les degrés de décondensation moyens obtenus par ces approches sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus par la méthode des halos et varient également très fortement d'une fibre à l'autre (figure 2C). La fréquence des cassures augmente avec la taille des molécules, ce qui rend difficiles les mesures entre des séquences éloignées de plusieurs centaines de kilobases. A cet égard, il peut être intéressant, en fonction de la distance qui sépare les couples de sondes, d'utiliser des préparations dans lesquelles le degré moyen de décondensation peut être contrôlé. Cela est possible, par exemple, avec la méthode décrite par Haaf et Ward [5], dans laquelle le degré de décondensation est fonction de la concentration en Triton utilisée.

Fibres linéaires

Les préparations d'ADN linéaires sont réalisées avec de l'ADN de haut poids

moléculaire extrait de cellules incluses dans des blocs d'agarose, ou bien avec de l'ADN purifié en solution. Cette technique utilise des lamelles en verre spécialement traitées, sur lesquelles les molécules d'ADN s'ancrent spontanément par leurs extrémités. L'ancrage des molécules est réalisé en incubant les lamelles verticalement dans une solution d'ADN, et l'étirement de ces molécules est obtenu par l'application d'une force de traction produite par le déplacement du ménisque à l'interface air-eau, en retirant la lamelle de la solution à une vitesse constante. Il s'agit de la méthode de peignage moléculaire décrite par A. Bensimon *et al.* [7]. Les molécules peignées, de différentes origines (ADN génomique total non cloné, chromosomes artificiels de levure, cosmides, phage lambda...) sont linéaires, et décondensées de façon homogène et reproductible (voir l'article de X. Michalet et A. Bensimon, p. 1299 de ce numéro). Des molécules d'une longueur maximum de 500 à 700 kb, peuvent être étirées sans que le risque de cassure ne soit trop élevé.

L'avantage considérable du peignage moléculaire est de produire un degré de décondensation beaucoup plus reproductible que celui obtenu par les autres méthodes (figure 2D). Ce degré de décondensation est d'environ 0,5 $\mu\text{m}/\text{kb}$, ce qui correspond à un étirement plus élevé que celui de l'ADN dans sa conformation B (facteur de 1,5).

Applications (figure 2)

L'ensemble des méthodes que nous avons décrites permettent de déterminer la distribution relative des séquences nucléiques avec une haute résolution. Un degré de décondensation élevé [1, 3, 4, 6, 7] est préférable pour ordonner des séquences très proches les unes des autres ou se recouvrant partiellement. Inversement, un faible degré de décondensation [2, 5] est mieux adapté à l'ordonnement de séquences de grande taille (clonées dans des YAC) ou séparées par plusieurs centaines de kilobases.

Le seuil de détection de la technique, c'est-à-dire la taille minimale en kilo-

bases, que doit avoir une séquence pour être visualisée sous la forme d'un signal ponctuel, dépend de l'intensité du signal et de la sensibilité du système d'observation. L'intensité du signal est liée à la nature du fluorochrome utilisé et à la méthode d'amplification du signal. Cette amplification peut être obtenue par l'utilisation de systèmes enzymatiques ou de couches successives d'anticorps. Il est aujourd'hui difficile de déterminer le seuil de détection des techniques d'ADN décondensé. En utilisant la méthode du peignage moléculaire, des fragments d'une kilobase peuvent être détectés visuellement en utilisant trois couches successives d'anticorps (Monier *et al.*, manuscrit en préparation).

Pour réaliser des mesures de distances il est nécessaire d'acquérir les images des signaux fluorescents. Les systèmes d'acquisition numériques les plus performants sont constitués d'une caméra de type CCD refroidie montée sur un microscope à fluorescence. Les images numériques obtenues avec ces systèmes d'acquisition possèdent un rapport signal/bruit élevé et une dynamique de niveaux de gris étendue. Des procédures de restauration peuvent être, dans certains cas, appliquées pour éliminer le flou associé à l'observation d'objets fluorescents en microscopie conventionnelle. Nous avons, par exemple, décrit une procédure de déconvolution itérative permettant d'accroître la résolution de la cartographie par FISH [10].

La plupart des méthodes permettent de réaliser des études qualitatives (ordonnement de *contigs* de sondes), mais elles ne sont pas toutes adaptées à des études quantitatives (détermination de la taille en kilobases du chevauchement ou de l'espacement entre deux sondes). Obtenir des données quantitatives nécessite de déterminer un facteur qui permette de convertir les distances mesurées en une taille en kilobases. Plus le degré de décondensation est reproductible et plus l'estimation de la taille en kilobases est précise et fiable. Les distances mesurées (n : nombre de mesures) se distribuent autour d'une valeur moyenne (M), et leur distance moyenne par rapport à la moyenne

est caractérisée par un écart-type (S) qui peut être exprimé sous la forme d'un pourcentage par rapport à la moyenne ou coefficient de variation. Le coefficient de variation est le seul paramètre qui rend compte de la distribution des mesures, alors que l'erreur standard sur la moyenne, souvent la seule valeur indiquée par les auteurs, ne rend pas compte de la variabilité des mesures, mais seulement de la variabilité de la moyenne. Avec la plupart des méthodes décrites, la taille du signal obtenu pour un insert cloné dans un cosmide, peut varier de 1 à 30 fois au sein d'une même préparation (figure 2C) [3]. Afin d'augmenter la fiabilité des résultats, différentes procédures sont utilisées. Elles reposent (1) sur une sélection des signaux d'hybridation les plus allongés et/ou, (2) sur une linéarisation des fibres observées et/ou (3) sur l'utilisation d'une sonde de taille connue localisée au niveau du locus d'intérêt, ce qui permet de normaliser les mesures. Néanmoins, ces procédures alourdissent considérablement le traitement des données. Les résultats les plus reproductibles sont obtenus avec la méthode de peignage moléculaire, qui est la seule méthode offrant un degré de décondensation homogène. En effet, en utilisant des fibres d'ADN peignées, on a obtenu un degré de décondensation moyen de 0,5 $\mu\text{m}/\text{kb}$ ($n = 50$) avec un coefficient de variation de 5,6 % pour une séquence de 50 kb (figure 2D). Sur les fibres d'ADN orientées, le degré de décondensation n'est pas homogène ; certains auteurs ont décrit un degré de décondensation moyen de 0,29 $\mu\text{m}/\text{kb}$ ($n = 48$) avec un coefficient de variation de 20 % pour une séquence de 38 kb [6]. Quelle que soit la méthode de décondensation utilisée, l'erreur relative sur la mesure augmente pour les petites distances. Par exemple, l'hybridation sur des molécules d'ADN peignées de séquences de 3 kb (signaux constitués de 2 à 4 perles, figure 2D) et de 17,6 kb (signaux constitués de 11 à 21 perles) donnent des erreurs absolues respectives de 0,7 et 0,8 kb, par rapport à la taille réelle des fragments, correspondant à des erreurs relatives de 23 %

et 4,5 % (Monier *et al.*, manuscrit en préparation). La limite de résolution de l'analyse dépend non seulement du degré de décondensation de la fibre d'ADN, mais aussi de la résolution du système optique. En effet, si l'on veut estimer la précision de la cartographie sur l'ADN peigné, il est nécessaire de prendre en compte les performances des systèmes d'analyse. La résolution latérale théorique d'un microscope conventionnel étant d'environ 0,25 μm (pour une longueur d'onde d'émission de 520 nm et un objectif avec une ouverture numérique de 1,3) et le degré de décondensation étant de 0,5 $\mu\text{m}/\text{kb}$ dans le cas du peignage moléculaire, la limite de résolution peut être estimée dans ces conditions à environ 500 pb. Les analyses sont toutefois difficiles à réaliser à ce niveau de résolution en raison de la structure en collier de perles des signaux. Certains auteurs, en utilisant des méthodes d'ADN décondensé qui ne produisent pas un degré de décondensation reproductible, ont pu mettre en évidence des chevauchements d'un kilobase entre deux séquences [3], ordonner des séquences distantes d'une kilobase, ou des séquences contiguës d'une taille d'une kilobase [11]. Cependant, les coefficients de variation obtenus pour ces distances sont élevés (supérieurs à 200 % [3, 11]), et indiquent que l'estimation de la taille de réarrangements génétiques impliquant des petites régions reste très difficile avec les méthodes ne produisant pas un degré de décondensation homogène.

Conclusions

Les techniques de cartographie à haute résolution sur l'ADN décondensé ont considérablement amélioré la résolution de la cartographie des génomes par FISH. La plupart d'entre elles offrent la possibilité de détecter des séquences de quelques kilobases et de distinguer des séquences distantes de moins de cinq kilobases. Elles ont été appliquées à l'ordonnement de fragments clonés dans des YAC [5], de cosmides [1-3, 12], et de fragments de restriction [4, 13]. Elles ont également permis d'étudier des réarrangements

génétiques [14], des amplifications [4] et des délétions de gènes [11, 15]. La conversion directe d'une distance mesurée en μm sur la lame en une longueur en kilobases n'est possible que si le degré de décondensation est reproductible. Cette contrainte donne à la technique de peignage moléculaire un avantage certain (voir l'article de X. Michalet et A. Bensimon, p. 1299 de ce numéro) par rapport aux autres techniques de décondensation que nous avons décrites dans cette revue ■

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier tous les membres du laboratoire de biophysique de l'ADN dirigé par A. Bensimon à l'Institut Pasteur de Paris, pour leur collaboration à l'ensemble des résultats obtenus avec la méthode de peignage moléculaire. Les auteurs remercient également J. Wiegant et D. Sheer pour avoir accepté la reproduction de leurs travaux. Les auteurs expriment leur reconnaissance à l'Association Française contre les Myopathies pour son soutien financier à ce projet.

RÉFÉRENCES

1. Wiegant J, Kalle W, Mullenders L, Brookes S, Hoovers JNM, van Ommen JGB, Raap AK. High resolution *in situ* hybridization using DNA halo preparations. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 587-91.
2. Heng HHQ, Squire J, Tsui LC. High-resolution mapping of mammalian genes by *in situ* hybridization to free chromatin. *Genetics* 1992; 89: 9509-13.
3. Senger G, Jones TA, Fidlerova H, Sanszau P, Trowsdale J, Duff M, Sheer D. Released chromatin: linearized DNA for high resolution fluorescence *in situ* hybridization. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 1275-80.
4. Para I, Windle B. High resolution visual mapping of stretched DNA by fluorescent hybridization. *Nature Genet* 1993; 5: 17-21.
5. Haaf T, Ward DC. High resolution of YAC contigs using extended chromatin and chromosomes. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 629-33.
6. Heiskanen M, Karhu R, Hellsten E, Peltonen L, Kallioniemi OP, Palotie A. High resolution mapping using fluorescence *in situ* hybridization to extended DNA fibers prepared from agarose-embedded cells. *Bio-Techniques* 1994; 17: 928-34.
7. Bensimon A, Simon A, Chiffaudel A, Croquette V, Heslot F, Bensimon D. Alignment and sensitive detection of DNA by a moving interface. *Science* 1994; 265: 2096-8.

TIRÉS À PART

K. Monier.

8. Vogelstein B, Pardoll DM, Coffey DS. Supercoiled loops and eukaryotic DNA replication. *Cell* 1980; 22: 79-85.

9. Gerdes MG, Carter KC, Moen PT, Lawrence JB. Dynamic changes in the higher-level chromatin organization of specific sequences revealed by *in situ* hybridization to nuclear halos. *J Cell Biol* 1994; 126: 289-304.

10. Monier K, Usson Y, Mongelard F, Szeptewsky P, Robert-Nicoud M, Vourc'h C. Metaphase and interphase mapping by FISH: improvement of chromosome banding and signals resolution by means of iterative deconvolution. *Cytogenet Cell Genet* 1995; 72: 200-4.

11. Florijn RJ, Blonden LAJ, Vrolijk H, Wiegant J, Vaandrager JW, Baas F, den Dunnen JT, Tanke HJ, van Ommen GJB, Raap AK. High-resolution DNA fiber-FISH for genomic DNA mapping and colour bar-coding of large genes. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 831-6.

12. Houseal TW, Dackowski WR, Landes GM, Klinger KW. High resolution mapping of overlapping cosmids by fluorescence *in situ* hybridization. *Cytometry* 1994; 15: 193-8.

13. Weier HUG, Wang M, Zhu Y, Cheng JF, Greulich KM, Bensimon A, Gray JW. Quantitative DNA fiber mapping. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 1903-10.

14. Heiskanen M, Hellsten E, Kallioniemi OP, Mäkelä TP, Alitalo K, Peltonen L, Palotie A. Visual mapping by fiber-FISH. *Genomics* 1995; 30: 31-6.

15. Tocharoentanaphol C, Cremer M, Schröck E, Blonden L, Kilian K, Cremer T, Ried T. Multicolor fluorescence *in situ* hybridization on metaphase chromosomes and interphase halo-preparations using cosmid and YAC clones for the simultaneous high resolution mapping of deletions in the dystrophin gene. *Hum Genet* 1994; 93: 229-35.

Karine Monier

Étudiante en thèse de génie biologique et médical.

Mira Hazzouri

Étudiante en thèse de biologie cellulaire et moléculaire.

Fabien Mongelard

Étudiant en thèse de biologie cellulaire et moléculaire.

Sophie Rousseaux

Maître de conférence universitaire-praticien hospitalier.

Claire Vourc'h

Maître de conférence universitaire.

Michel Robert-Nicoud

Professeur d'université. Laboratoire DyOGen, UPR-ES EA20-21, Inserm U. 309, Institut Albert-Bonniot, Université Joseph-Fourier, Faculté de Médecine de Grenoble, 38706 La Tronche Cedex, France.

Summary

High resolution DNA mapping by fluorescent *in situ* hybridization on stretched DNA fibers

Several techniques for preparing decondensed DNA fibers on glass surfaces have recently been described in the literature. These techniques allow high resolution genome mapping by fluorescent *in situ* hybridisation on genomic DNA fibers obtained either directly from lysed cells or from cloned DNA. Using these methods, three types of DNA fibers can be obtained: 1) DNA loops or «halo-like» fibers, 2) oriented fibers and 3) linear fibers, also known as «combed» DNA. In the first category, DNA fibers are obtained from whole cells and are anchored to a residual nuclear structure. Linear or oriented fibers are obtained by using purified DNA in solution or high molecular weight DNA prepared in agarose blocks. For each of these methods, the degree and reproducibility of DNA stretching as well as the linearity of the resulting fibers are assessed. The advantages and drawbacks of each technique are discussed according to its efficiency for genome mapping and genomic rearrangement analysis, especially for the study of small size regions. The direct conversion of distance measurements from microns (μm) into kilobases (kb) is only possible if the degree of stretching of the DNA fiber is reproducible. In this respect molecular combing is more reliable than the other methods, since a reproducible conversion factor of $0.5 \mu\text{m}/\text{kb}$ can be applied to any DNA molecule in the range of 1 kb to 500 kb.

Symposium International d'Immunité Néonatale Annecy-France 17-19 novembre 1997

SOINS ET SANTÉ DEMAIN: VERS UNE SANTÉ HORS MURS, LYON, FRANCE

8-10 décembre 1997

Cette réunion s'inscrit dans le cadre des 10^{es} Entretiens Jacques Cartier

Contact: Betty Dodet, Fondation Marcel-Mérieux, 17, rue Bourgelat, BP 2021,
69227 Lyon Cedex 02, France. Fax: (33) 72 73 79 93

E-mail: 100765.1401@Compuserve.Com