

La microdissection chromosomique ou le paradigme de la cytogénétique moléculaire : de la caractérisation des anomalies chromosomiques complexes à l'identification de gènes

Nora Chelloug, Cécile Arnould, Nathalie Koehler, Philippe Jonveaux

La microdissection chromosomique est une technique de cytogénétique moléculaire très performante dans l'analyse des aberrations chromosomiques complexes associées aux malformations congénitales, aux affections accompagnées d'un retard mental

ou observées au cours des cancers. Elle occupe, en outre, une place à part entière dans le domaine de la recherche en génétique chromosomique et tout particulièrement dans la cartographie physique du génome et l'isolement de nouveaux gènes.

Il était une fois la cytogénétique... Jadis, le cytogénéticien était parfois considéré, à tort par certains, comme un découvreur et un collectionneur d'anomalies chromosomiques dont la formulation ésotérique ne pouvait que décourager le novice. Néanmoins, l'identification précise de certaines de ces anomalies chromosomiques, corrélée à une analyse clinique fine, a permis de définir avec succès des entités dans les domaines des malformations congénitales, des affections associées au retard mental et au cours des cancers. Toutefois certaines aberrations chromosomiques restaient difficilement identifiables à l'aide des techniques de cytogénétique conventionnelle, tout particulièrement les chromosomes marqueurs et certaines anomalies déséquilibrées complexes. L'œil de lynx et les ciseaux du cytogénéticien ne suffisaient plus. Au fil des années, l'application des outils du génie génétique et l'optima-

lisation des systèmes d'analyse d'image ont ouvert la voie à une imagerie qui éclaire d'une lumière nouvelle la cytogénétique. Parallèlement, outre l'intérêt dans l'établissement du diagnostic et l'évaluation du pronostic, les analyses cytogénétiques ont maintes fois prouvé leur efficacité dans l'identification de sites chromosomiques susceptibles d'être la cible de mutations. L'avènement et le perfectionnement des techniques de cartographie, dont l'hybridation *in situ* sur chromosomes, ont permis de localiser un gène ou une séquence d'ADN sur une bande précise. La survenue d'un accident chromosomique (translocation, inversion, délétion) au niveau d'une telle bande autorise alors l'utilisation de sondes génomiques préalablement situées en cette région, pour cerner au mieux le remaniement et isoler le ou les gènes responsables du phénotype. Cependant, là encore, le chemin à parcourir entre l'anomalie chromosomique et

le gène délétère demeure particulièrement long et nécessite d'avoir obtenu, au préalable, un certain nombre de marqueurs de la région impliquée.

La microdissection chromosomique est une des applications les plus brillantes de la cytogénétique moléculaire, tant pour le diagnostic en génétique chromosomique que pour la recherche sur la cartographie physique du génome. Initialement développée par Scalenghe en 1981 [1], la microdissection permet de fabriquer une banque d'ADN des fragments chromosomiques microdisséqués, assurant ainsi un degré supplémentaire de purification des séquences spécifiques d'intérêt. Récemment, ont été mises au point de nouvelles conditions de dissection (permettant une meilleure identification des chromosomes) et de clonage moléculaire (en utilisant l'amplification par *polymerase chain reaction* ou PCR) [2, 3].

La microdissection chromosomique

Deux étapes peuvent être distinguées dans le déroulement de cette technique. L'étape cytogénétique comprend la préparation des chromosomes métaphasiques et la microdissection chromosomique. L'étape moléculaire correspond à l'amplification *in vitro* par PCR et au clonage éventuel du matériel microdisséqué.

Un point essentiel de la technique cytogénétique est la réduction du temps de fixation des chromosomes métaphasiques afin de minimiser la dépurination de l'ADN, ce qui gêne considérablement l'étape de PCR, tout en conservant un étalement optimal et en respectant la morphologie des chromosomes : il faut obtenir des chromosomes suffisamment longs pour permettre une dissection fine et reproductible. Les chromosomes sont étalés sur une lamelle puis traités par une solution de trypsine afin d'obtenir un profil de marquage en bande G.

La microdissection est réalisée à l'aide d'un microscope inversé, d'un micromanipulateur et de fines aiguilles étirées au diamètre final d'environ 1 µm. L'extrémité de l'aiguille est amenée perpendiculairement à l'axe du chromosome et la dissection est obtenue en poussant délicatement l'aiguille au travers de la bande ou du chromosome cible (figure 1). L'ADN chromosomique, qui adhère à l'extrémité de l'aiguille, est déposé dans une solution de collection. Cette opération est répétée précisément sur 5 à 10 chromosomes cibles. Le tampon de collection contient des amorces oligonucléotidiques dont la séquence est partiellement dégénérée [4] afin de reconnaître le plus grand nombre de sites dans le génome. L'ADN chromosomique étant d'emblée amplifié, ce procédé évite le clonage. L'amplification se fait nécessairement en deux étapes (DOP-PCR ou *degenerate oligonucleotide primed-PCR*) : une première étape de 8 cycles à basse température, permettant l'hybridation aléatoire de ce type d'amorce, suivie d'une préamplification de l'ADN microdisséqué, et une deuxième étape utilisant les conditions clas-

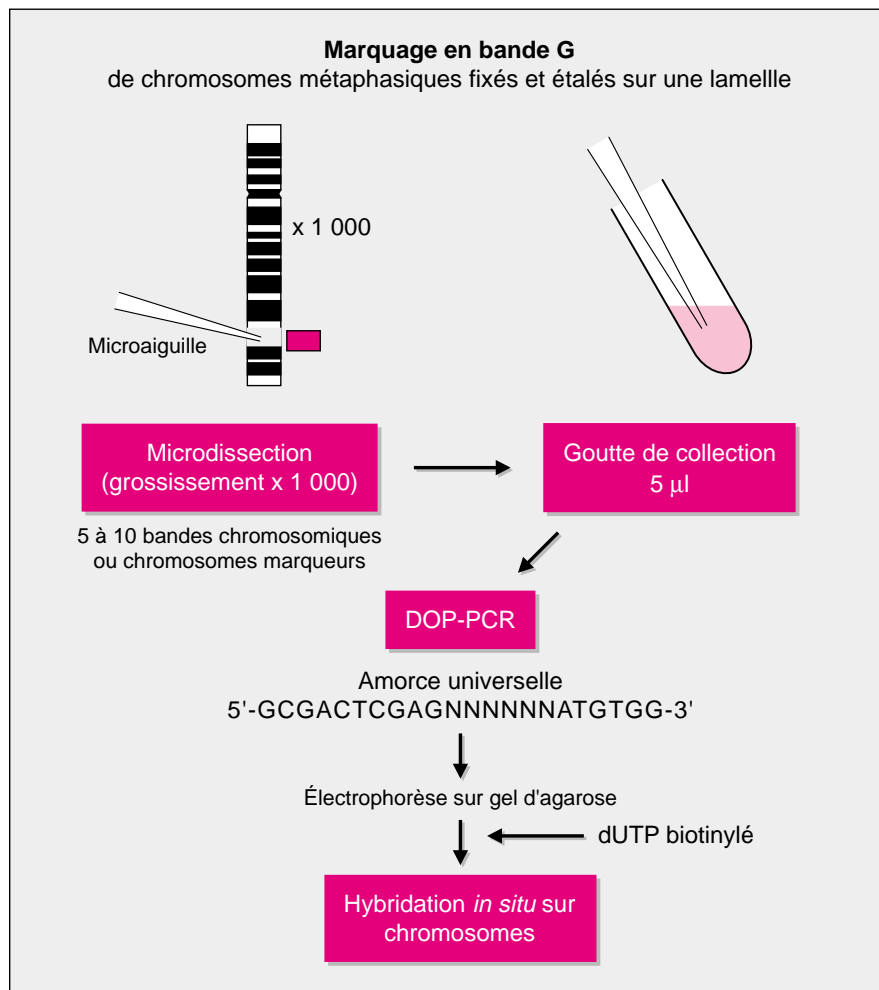


Figure 1. **Principe de la microdissection chromosomique utilisant la technique de DOP-PCR.** Elle repose sur l'amplification au hasard des séquences d'ADN disséquées à l'aide d'amorces oligonucléotidiques dont la séquence est partiellement dégénérée. L'électrophorèse en gel d'agarose a pour but de vérifier par rapport à un témoin négatif de dissection (sans ADN) que le produit obtenu après PCR est indemne de contamination. La validation de la microdissection est le plus souvent réalisée après incorporation de dUTP biotinyllé lors d'une deuxième réaction PCR et hybridation *in situ* sur des chromosomes métaphasiques normaux.

siques de la PCR. En outre, la présence de sites de restriction dans l'amorce permet éventuellement la construction d'une microbanque de l'ADN chromosomique disséqué. Il est nécessaire de vérifier que le matériel amplifié est bien d'origine humaine et qu'il provient bien de la région microdisséquée. Certains clones recombinants sont prélevés au hasard, les inserts isolés et testés pour la présence éventuelle de séquences répétitives humaines. Les inserts *a priori* à séquence unique sont ensuite

« validés » par hybridation sur des *Southern blots* d'hybrides somatiques inter-espèces contenant un chromosome (ou une partie de chromosome) humain donné. Une alternative est l'utilisation de la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) sur chromosomes métaphasiques. Une partie du produit de la PCR est soumise à une deuxième amplification de 15 cycles en présence de dUTP biotinyllé assurant un marquage de la sonde obtenue par microdissection. La sonde est ensuite

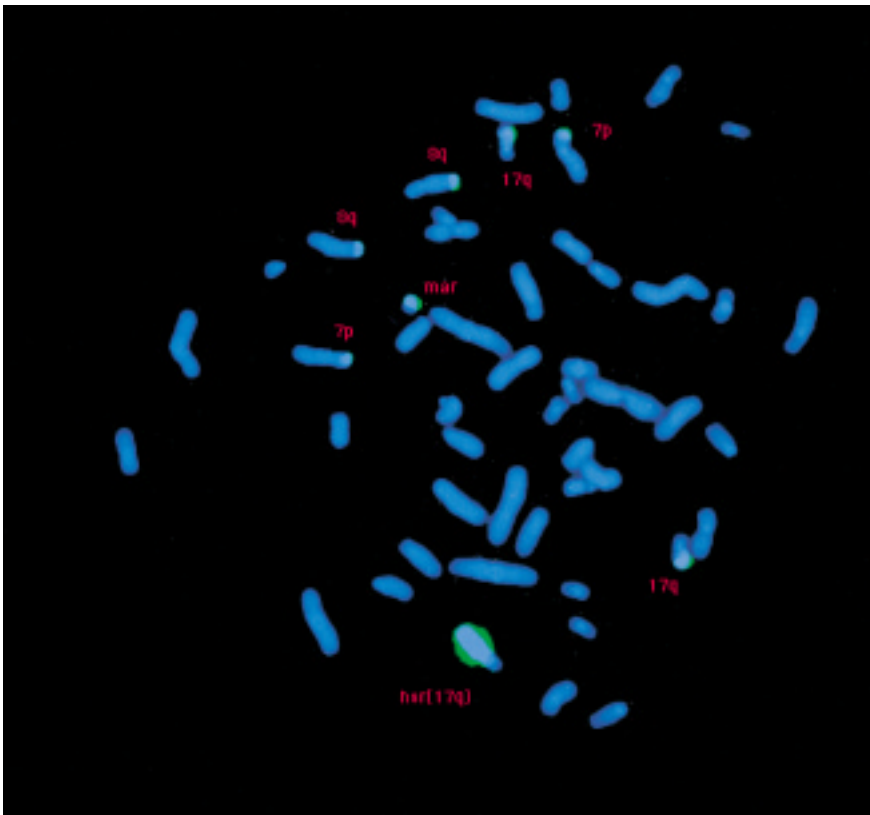


Figure 2. Résultats de l'hybridation *in situ* du produit PCR, issu de la microdissection de la région colorée de façon homogène (HSR, homogeneously stained region) du chromosome 17, sur une métaphase de la lignée possédant cette HSR. Les signaux apparaissent de façon intense sur l'HSR mais aussi clairement sur les régions chromosomiques 8q et 7p ainsi qu'au niveau d'un chromosome marqueur, soulignant la complexité moléculaire des amplicons constituant les HSR.

hybridée sur des chromosomes métaphasiques normaux confirmant l'origine et la localisation précise de l'ADN disséqué.

Applications et perspectives

La microdissection et le diagnostic chromosomique

La microdissection chromosomique est applicable à tous les domaines de la cytogénétique constitutionnelle (prénatale et postnatale) et oncologique. Tout particulièrement, elle apporte au cytogénéticien une meilleure définition de certaines anomalies chromosomiques. L'origine de certains marqueurs chromosomiques surnuméraires et de certains chromosomes impliqués dans des remaniements complexes (non

identifiables à l'aide des techniques de marquage en bande) peut être largement facilitée par cet abord. Ainsi, la microdissection de ces marqueurs, suivie de l'amplification par PCR du matériel chromosomique et de l'hybridation *in situ* de ce produit sur des métaphases normales, ont permis de dévoiler leur constitution chromosomique et de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de leur formation [5, 6]. Une telle information a un impact considérable dans la prise en charge du diagnostic prénatal chromosomique. En outre, l'identification précise du matériel chromosomique participera de ce fait à une meilleure définition chromosomique de certains tableaux cliniques enrichissant la compréhension de la pathologie malformative et du retard mental. Dans la même

optique, la microdissection peut produire à volonté tous types de sondes spécifiques d'un chromosome entier, d'un bras, voire d'une bande donnée. Ces sondes peuvent être utilisées pour colorier tout ou partie de chromosome, aidant là encore à la caractérisation d'anomalies chromosomiques [7-10].

La microdissection chromosomique est aussi l'approche la plus directe pour l'étude des amplifications géniques détectables en cytogénétique sous l'aspect de chromosomes *double minute* (DM) et de régions se colorant de manière uniforme (HSR ou *homogeneously stained region*) [11]. La figure 2 illustre l'exemple d'une HSR situé sur le chromosome 17, observée dans une lignée tumorale issue d'un cancer du sein, révélant après dissection et hybridation *in situ* de cette HSR sur des métaphases de la lignée elle-même, la constitution complexe du matériel génomique amplifié provenant des régions chromosomiques 8q, 7p et 17q.

La microdissection, outil de recherche en génétique chromosomique

Outre l'intérêt diagnostique, la microdissection a déjà fait ses preuves dans le domaine de la cartographie physique du génome et dans l'isolement et la caractérisation de nouveaux gènes impliqués dans les maladies génétiques constitutionnelles et les cancers.

Certaines régions chromosomiques ont bénéficié d'une microdissection aboutissant à la construction de microbanques d'ADN spécifiques d'une bande chromosomique ciblée dans certaines affections génétiques (2p23, 2q35, 3p14, 6q21, 10q11, 11q23, 21q...). Ainsi, chaque clone reconnaissant une séquence unique et spécifique dans le génome est utilisé comme marqueur dans l'étude de certaines maladies (marqueurs polymorphes utiles dans les études de liaison génétique ou dans la définition de certaines pertes d'hétérozygotie). C'est ainsi que la fameuse sonde PW71, utilisée couramment pour le diagnostic des syndromes de Prader-Willi/Angelman, a été isolée [12]. Secondairement, ces clones peuvent servir à cribler d'autres banques d'ADN génomique : l'isole-

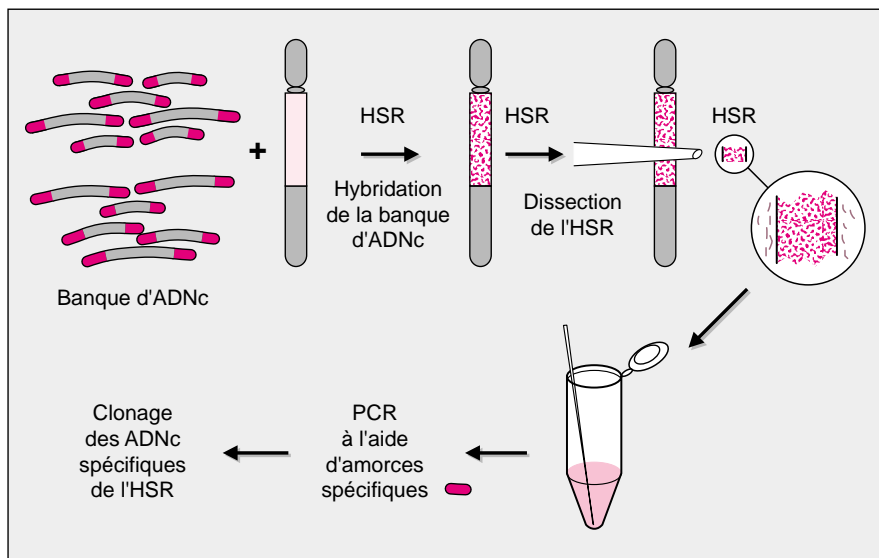


Figure 3. **Principe de la technique couplant la microdissection à la sélection d'ADNc.** Une banque d'ADNc est construite à partir d'ARNm issus d'une lignée dans laquelle existe une région colorée de façon homogène (HSR, homogeneously stained region). Cette banque d'ADNc est réalisée grâce à la ligation de doubles brins d'oligonucléotides. La banque est ensuite hybridée sur des chromosomes métaphasiques de la lignée et l'HSR ayant capturé les molécules d'ADNc est disséquée. Le produit est finalement amplifié à l'aide des amorces initialement utilisées pour la construction de la banque d'ADNc. Les ADNc spécifiques de l'HSR sont clonés et séquencés.

ment de cosmides, de YAC (*yeast artificial chromosomes*) contribuent à la construction de cartes physiques des régions microdisséquées. La mise en évidence d'un transcrite sur *Northern blot* autorise le criblage d'une banque d'ADNc spécifique d'un tissu à l'aide une telle microsonde. A titre d'exemple, tout récemment, grâce à cette approche de microdissection, ont été isolés 12 ADNc issus de la région 21q11-21, région au niveau de laquelle très peu de gènes avaient été préalablement cartographiés [13]. Il est parfois difficile de cartographier une sonde de très petite taille (< 70 pb) en hybridation *in situ*, surtout si elle possède des séquences relativement répétitives. La dissection permet d'assigner cette sonde à une bande chromosomique déterminée [14]. Le chromosome est alors découpé en plusieurs « bandes » selon le profil caractéristique des bandes G et chacune d'entre elles sert de matrice pour une PCR à l'aide d'amorces spécifiques de la sonde à localiser. La microdissection a été utilisée avec profit pour comparer le contenu en bases GC et en séquences Alu/Kpn

entre les bandes claires et les bandes sombres [15].

Toujours plus loin dans la recherche en génétique chromosomique, la microdissection a été couplée avec audace et succès à la technique de sélection d'ADNc (figure 3) [16]. En effet, il est possible d'hybrider une banque d'ADNc (banque obtenue après ligation d'un double brin d'oligonucléotides sur des molécules d'ADNc issues d'ARNm d'une lignée dans laquelle une HSR a été mise en évidence) sur les propres chromosomes métaphasiques de lignée. Puis on microdissèque l'HSR au niveau de laquelle sont venus s'hybrider spécifiquement les ADNc. Ce n'est plus l'ADN matrice qui sera la cible de la PCR mais, cette fois, ce sont les molécules d'ADNc, correspondant donc à des gènes potentiellement inclus dans les amplicons, qui seront secondairement clonés. Cette approche a conduit à la découverte de plusieurs ADNc spécifiques des régions 12q13-21, fréquemment amplifiées dans les sarcomes et les tumeurs cérébrales [17]. Si la mise au point de la capture d'ADNc par microdissection a

utilisé, comme dans toute approche expérimentale, des conditions optimales, à savoir la dissection d'une HSR enrichie en séquences d'ADNc, il est dorénavant possible d'isoler par cette technique des ADNc à partir de régions chromosomiques représentées en simple copie [18]. L'ensemble de ces résultats prouve clairement deux choses : d'une part, le dynamisme de la recherche en cytogénétique et, d'autre part, que cette recherche est en grande partie dans les mains des cytogénéticiens. Il était une fois la cytogénétique... L'histoire de la cytogénétique pourrait se poursuivre comme bien d'autres : elle rencontra son génie (génétique), ils vécurent ensemble et créèrent la « cytogénétique moléculaire » ■

Nora Chelloug

Interne des hôpitaux

Cécile Arnould

Étudiante au doctorat

Nathalie Koehler

Technicienne bio-médicale

Philippe Jonveaux

Maître de conférences des universités-praticien hospitalier
Laboratoire de Génétique Médicale, CHU Nancy-Brabois, rue du Morvan, 54511 Vandœuvre-les-Nancy, France.

RÉFÉRENCES

- Scalenghe RD, Turco E, Edstrom JE, Pirrot V, Melli M. Microdissection and cloning of DNA from a specific region of drosophila melanogaster polytene chromosome. *Chromosoma* 1981; 82: 205-16.
- Ludecke HJ, Senger G, Claussen U, Horsthemke B. Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification. *Nature* 1989; 56: 27-30.
- Senger G, Ludecke HJ, Horsthemke B, Claussen U. Microdissection of banded human chromosomes. *Hum Genet* 1990; 84: 507-11.
- Guan XY, Trent JM, Meltzer PS. Generation of band specific painting probes from a single microdissected chromosome. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1117-21.

RÉFÉRENCES

5. Müller-Navia J, Nebel A, Schleiermacher E. Complete and precise characterization of marker chromosomes by application of microdissection in prenatal diagnosis. *Hum Genet* 1995; 96: 661-7.
6. Fang Y, Eyre H, Bohlander S, Estop A, McPherson E, Träger T, Riess O, Callen G. Mechanisms of small ring formation suggested by the molecular characterization of two small accessory ring chromosomes derived from chromosome 4. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 1137-42.
7. Guan XY, Meltzer PS, Trent JM. Rapid generation of whole chromosome painting probes by chromosome microdissection. *Genomics* 1994; 22: 101-7.
8. Guan XY, Meltzer PS, Burgess AC, Trent JM. Coverage of chromosome 6 by chromosome microdissection: generation of 14 subregion-specific probes. *Hum Genet* 1995; 95: 637-40.
9. Jonveaux P, Le Coniat M, Derre J, Flexor MA, Daniel MT, Berger R. Chromosome microdissection in leukemic patients: a powerful tool for complex rearrangements analysis. *Gene Chrom Cancer* 1996; 15: 26-33.
10. Tigaud I, Charrin C, Berger R, Jonveaux P. Chromosome 5q deletions: a FISH study using band-specific painting probes generated by chromosome microdissection. *Cancer Genet Cytogenet* 1996; 89: 125-8.
11. Guan XY, Meltzer PS, Dalton WS, Trent JM. Identification of cryptic sites of DNA sequence amplification in human breast cancer by chromosome microdissection. *Nature Genet* 1994; 8: 155-61.
12. Buiting K, Neumann M, Ludecke HJ, Senger G, Claussen, Antich J, Passarge E, Horsthemke B. Microdissection of Prader-Willi syndrome chromosome region and identification of potential gene sequences. *Genomics* 1990; 6: 521-7.
13. Yu J, Tong S, Shen Y, Kao FT. Gene identification and DNA sequence analysis in the GC-poor 20 megabases region of human chromosome 21. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 6862-7.
14. Spielvogel H, Hennies HC, Claussen U, Washington SS, Chakravarti A, Reis A. Band-specific localization of the microsatellite D13S71 by microdissection and enzyme amplification. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 1031-7.
15. Yoshiura K, Kubota T, Soejima H, Tamura T, Izumkawa Y, Nikawa N. A comparison of GC content and the proportion of Alu/Kpn-repetitive sequences in a single dark and light band region from a human chromosome. *Genomics* 1994; 20: 243-8.
16. Hozier J, Graham R, Wesfall M, Siebert P, Davis L. Preparative *in situ* hybridization: selection of chromosome region-specific libraries on mitotic chromosomes. *Genomics* 1994; 19: 441-7.
17. Garcia E, Fischer U, Elkahloum A, Trent JM, Meese E, Meltzer PS. Isolation of genes amplified in human cancers by microdissection mediated cDNA capture. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 595-600.
18. Garcia E, Ray ME, Polymeropoulos MH, Dehejia A, Meltzer PS, Trent JM. Isolation of chromosome-specific ESTs by microdissection-mediated cDNA capture. *Genome Res* 1997; 7: 100-7.

Summary

Chromosome microdissection or the paradigm of molecular cytogenetics: from the characterization of complex chromosomal rearrangements to genes identification

Chromosome microdissection is a powerful molecular cytogenetic tool for complex rearrangements analysis associated with multiple congenital anomaly syndromes, mental retardation and cancer. In addition, several strategies based on chromosome microdissection have been successfully employed to the identification of region-specific genes.

TIRÉS À PART

P. Jonveaux.