FISH
Fluorescence In Situ Hybridization

Dossier technique
année 2010/2011.

FISCHER Maude
PETIT Marie-Eléonore
SCHLAEFLIN Delphine

Introduction

FISH :

Méthode d'hybridation « in situ » entre de l'ADN et une sonde fluorescente

Création : 1988 : mise en évidence des arrangements chromosomiques

Utilisation dans le séquençage et la cartographie

1er organisme diploïde étudié : *Arabidopsis thaliana* pris comme modèle.

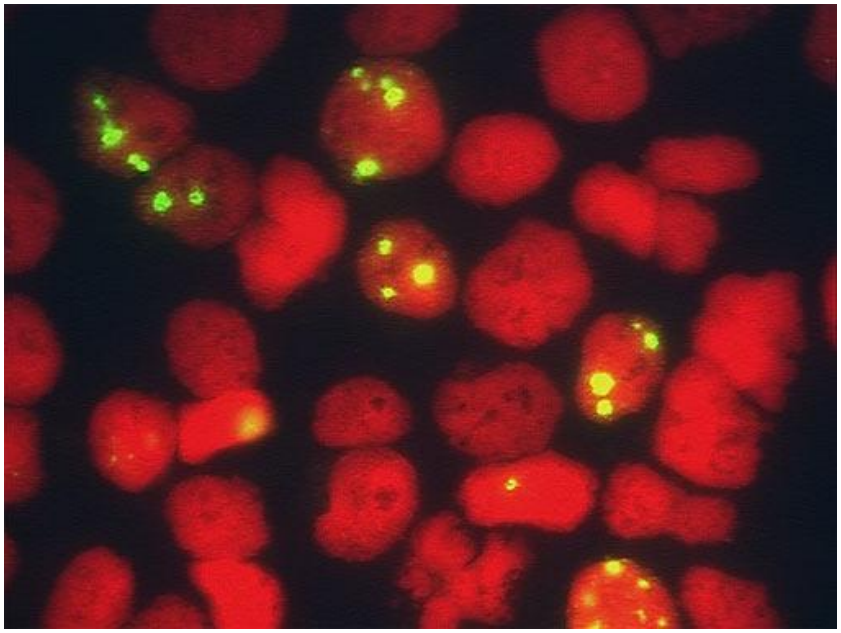
Exemple de méthode FISH : «chromosome painting »

- Résolution améliorée des séquences
- Possibilité d'utiliser plusieurs fluorochromes dans la même préparation
- Structure et organisation de la chromatine non perturbées

Domaine lié : la bioinformatique

Plan

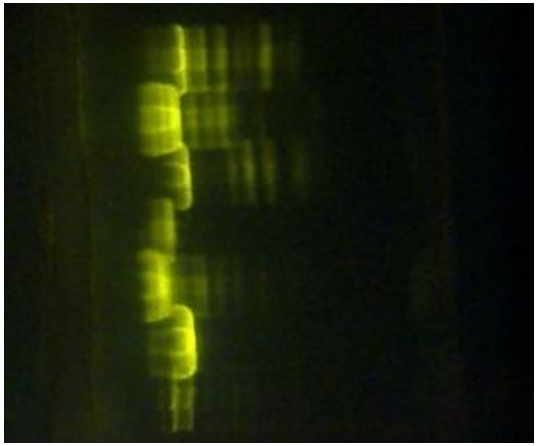
1) Préparation du matériel
2) Méthode sur lame
3) Applications
4) Avantages et inconvénients



http://www.med.upenn.edu/gtp/morphology_gallery.shtml

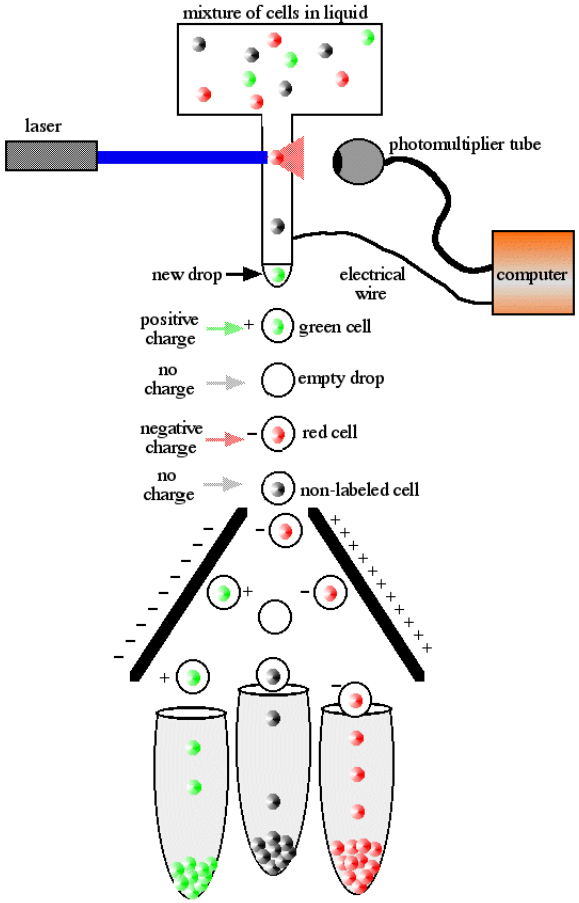
1) Préparation du matériel :

- choix de tissus
- choix de la sonde



http://www.lyc-mansart-st-cyr.ac-versailles.fr/disciplines/SVT/lexBio.htm

Fluorescence Activated Cells Sorting (FACS)



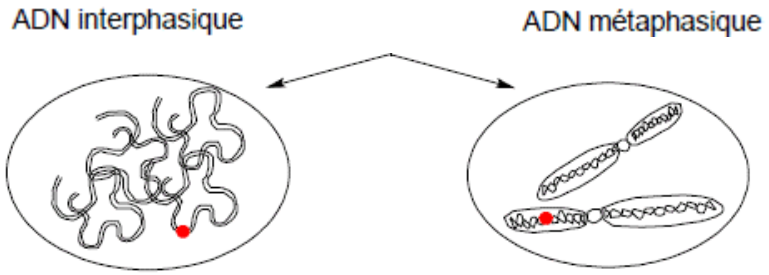
http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/FACS.html

Technique d'isolement:

- spreading : éclatement
- flow sorting (FACS) séparation des cellules

Digestion de la paroi

Fixation de la préparation sur lame



Choix de la sonde

Nature :

ARN ou ADN

⇒ actuellement : possibilité de microdissection

Système BAC = Bacterial Artificial Chromosome : vecteur de clonage

=> majoritaire , idéal

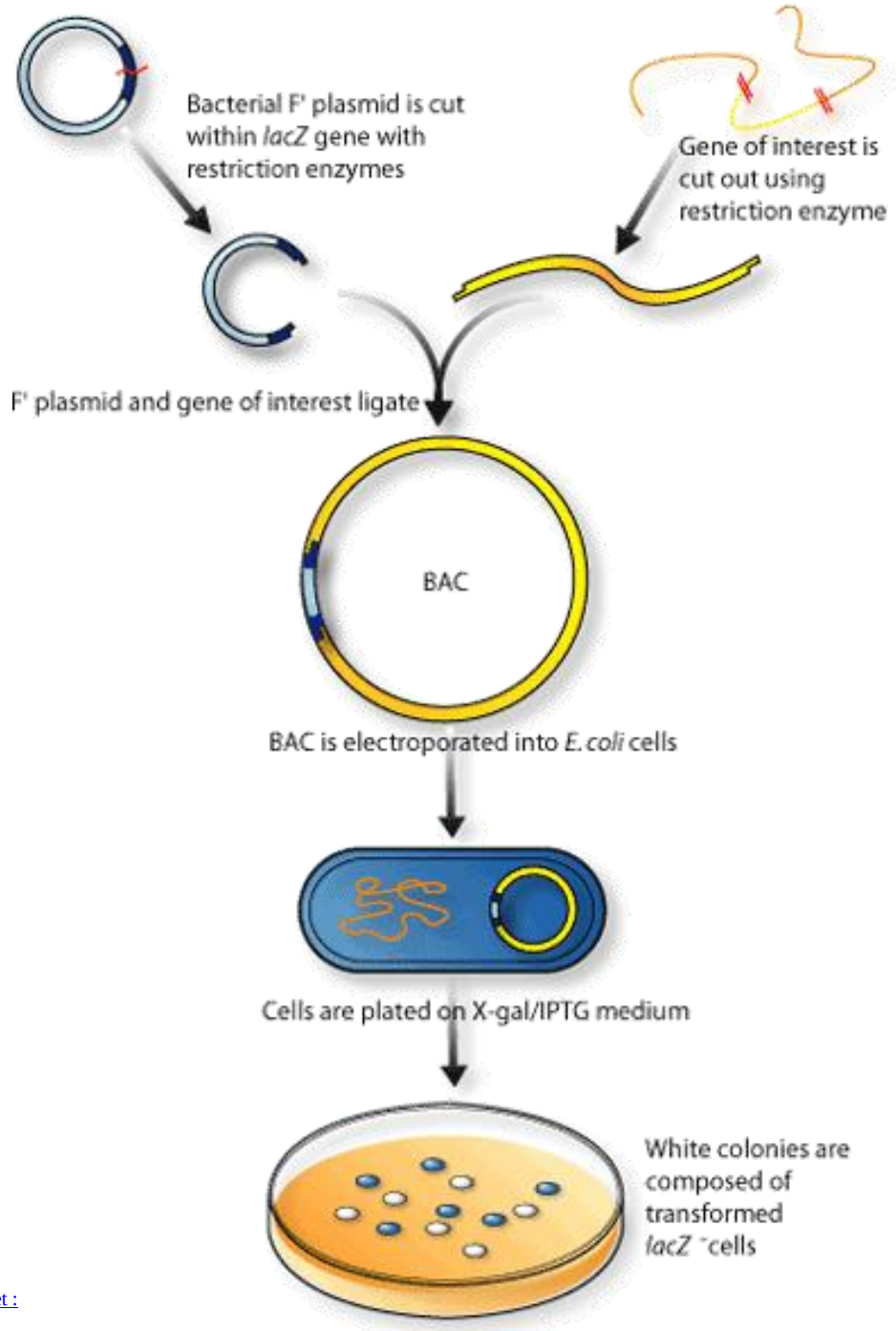
Type :

Sonde à séquence unique

Sonde à séquences multiples : peinture des chromosomes

Sonde à ADN α-satellite

Système BAC



Organisme d'intérêt

↓

Etapes répétées pour recouvrir tout le génome d'intérêt

↓

Obtention d'une collection de BAC

Image issue du site internet :
http://www.scq.ubc.ca/wp

A partir de la collection de BAC…

1) Recherche des séquences les moins répétées

⇒ Technique « dot plot » : analyse de l'intensité du signal

2) Marquage

Principe

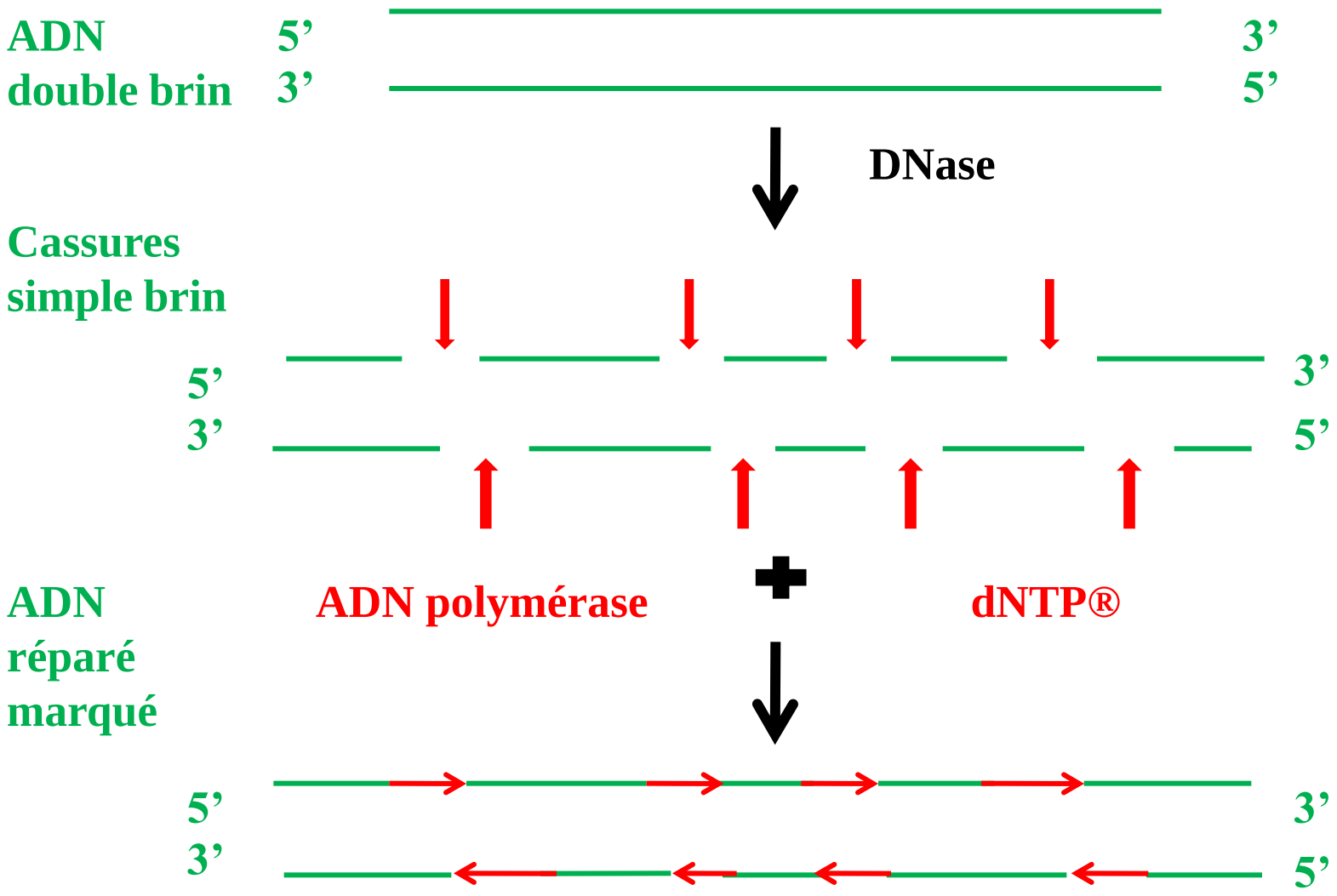
⇒ Technique « nick translation »

Méthode

⇒ directe ou indirecte

3) Traitement sur lame avec l'échantillon à analyser

Technique « nick translation »



Obtention de la sonde marquée

dNTP® : méthode directe ou indirecte

® molécule de reconnaissance :

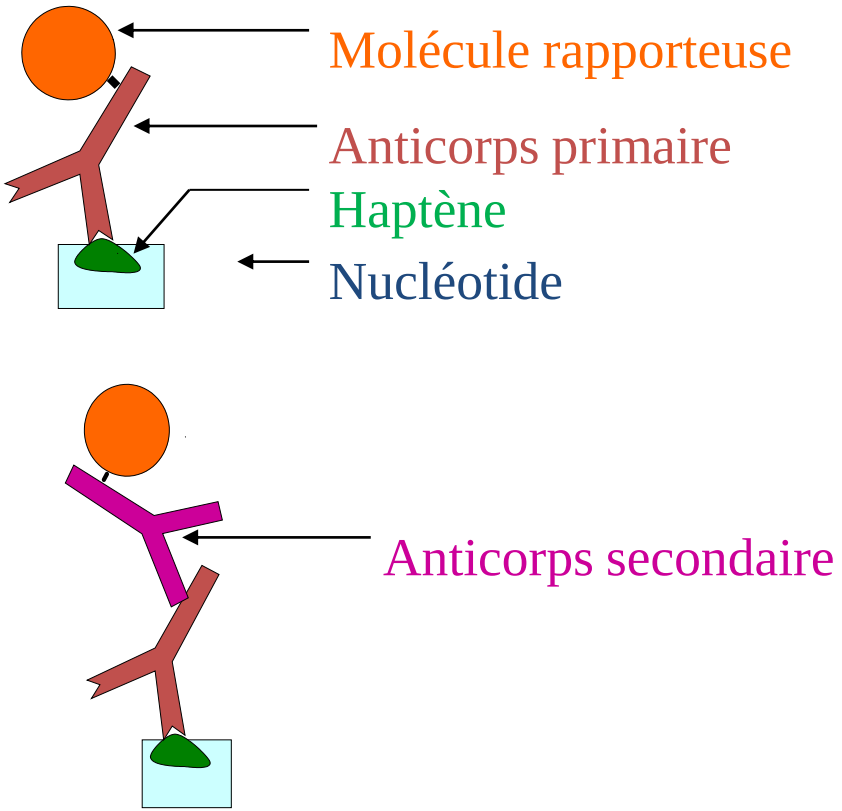
Nucléotide couplé à un fluorochrome = marquage direct

Nucléotide associé à un haptène
(ex : digoxigénine)

ET reconnu par un anticorps couplé à un fluorochrome (ou autre molécule rapporteuse)

= marquage indirect

Amplification du signal :
Utilisation du système
« anticorps Iaire/anticorps IIaire »



A partir d'un document en ligne :
myrte.u-strasbg.fr/IHC/IHC_en_ligne/.../Marqueurs.ppt -

2) Méthode sur lame

traitement à la pectinase

↓

dénaturation de la sonde et de l'échantillon à 75°

↓

choc thermique

↓

lavages

↓

incubation de la sonde et de l'échantillon

↓

hybridation dans une chambre à 37°

↓

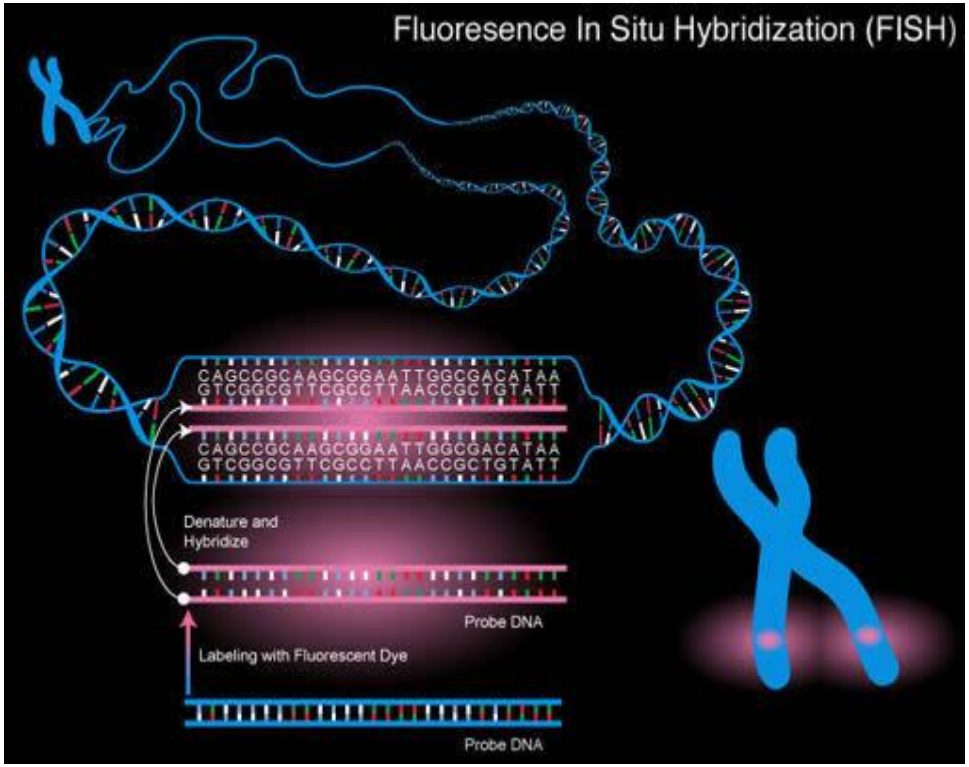
lavages post hybridation

↓

révélation de l'hybridation , contre coloration au DAPI

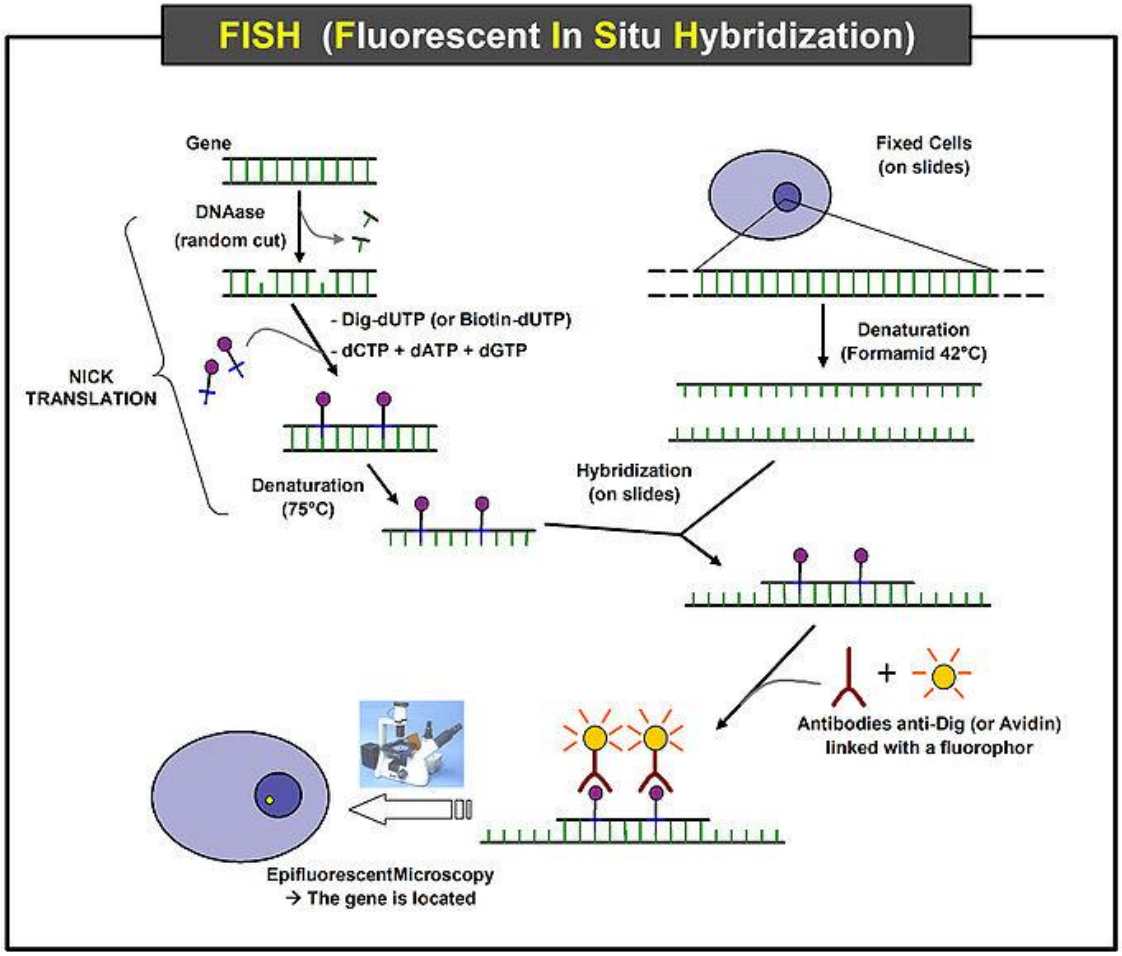
↓

lecture au microscope à épifluorescence



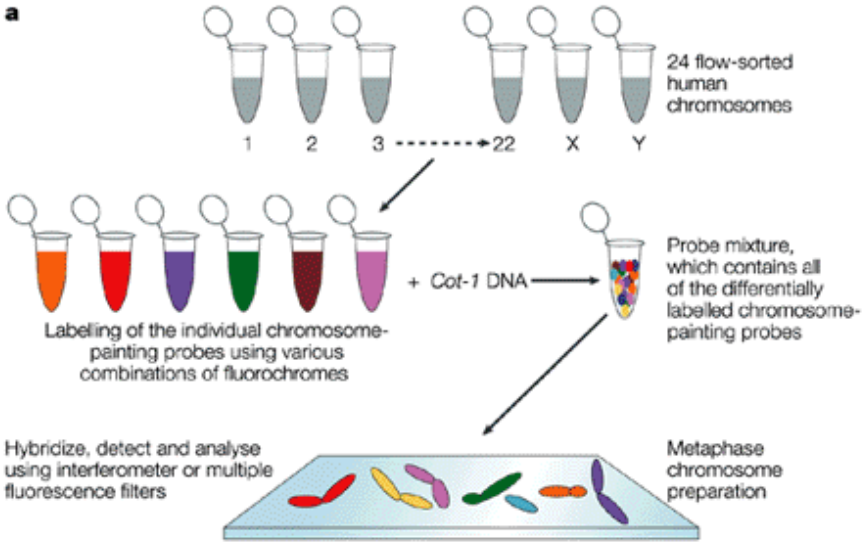
http://www.genome.gov/10000206

Il existe deux types de fluorescence : indirect et direct



http://www.lookfordiagnosis.com/images.php?term=Techniques+De+Diagnostic+Mol%C3%A9culaire&lang=4

Spectral karyotyping and multifluor FISH paint each human chromosome in one of 24 colors.



http://www.magnard.fr/compagnons/svt/Chapitre-1-ressource-page-18

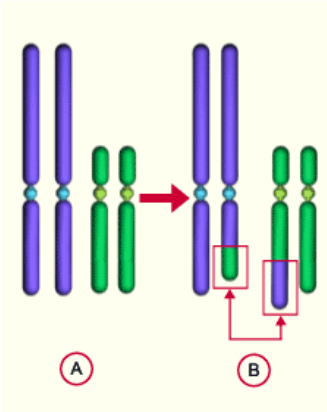
3) Un exemple d'application de FISH

La phylogénie:

- Etude des remaniements chromosomiques

translocation

Translocation réciproque



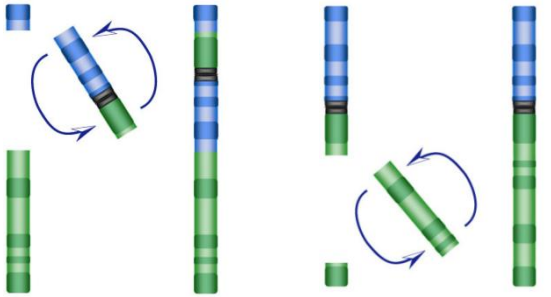
http://www.embryology.ch/francais/kchromaber/abweichende03.html

fusion

délétion

duplication

inversions



péricentrique

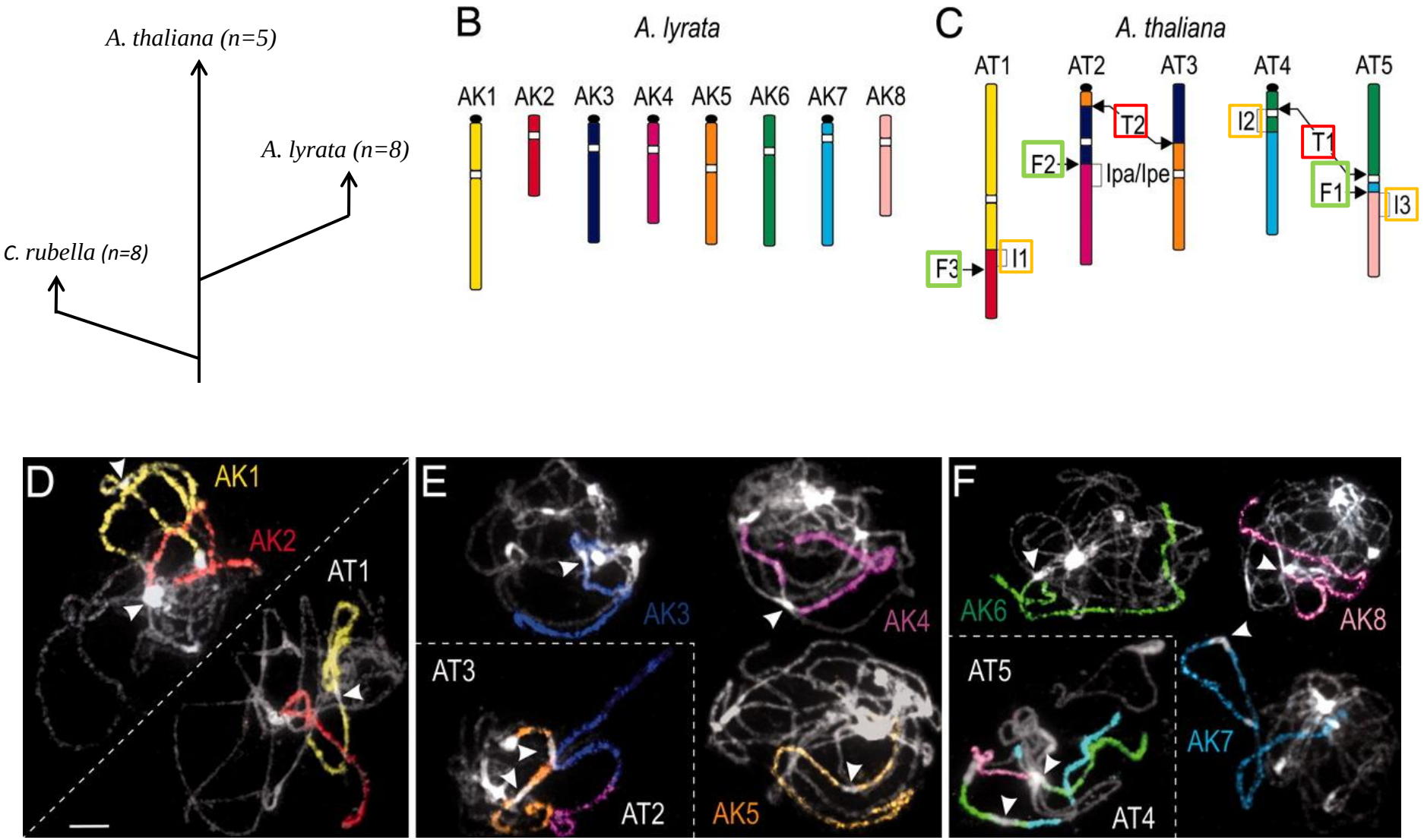
paracentrique

http://cvirtuel.cochin.univ-paris5.fr/cytogen/2-1.htm

- Etablissement d'un arbre phylogénétique selon les homologies de séquences.

➡ L'arbre phylogénétique de séquences est donc une proposition parmi d'autres arbres phylogénétiques dont les informations peuvent être complémentaires ou très différentes.

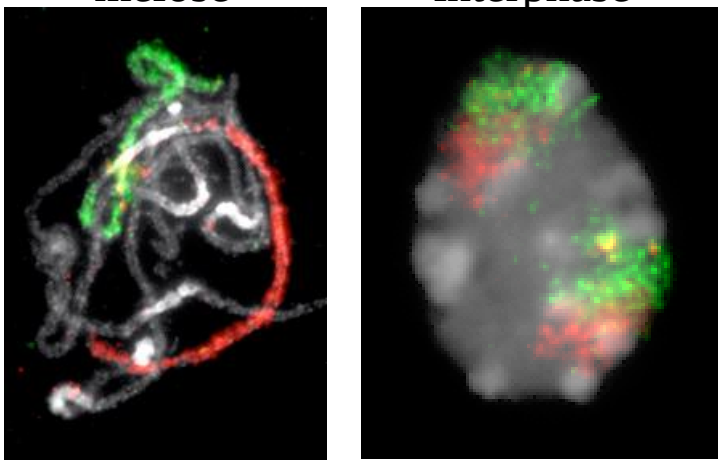
Etude de l'évolution des caryotypes avec le "chromosome painting"



Lysak M A et al. PNAS 2006;103:5224-5229

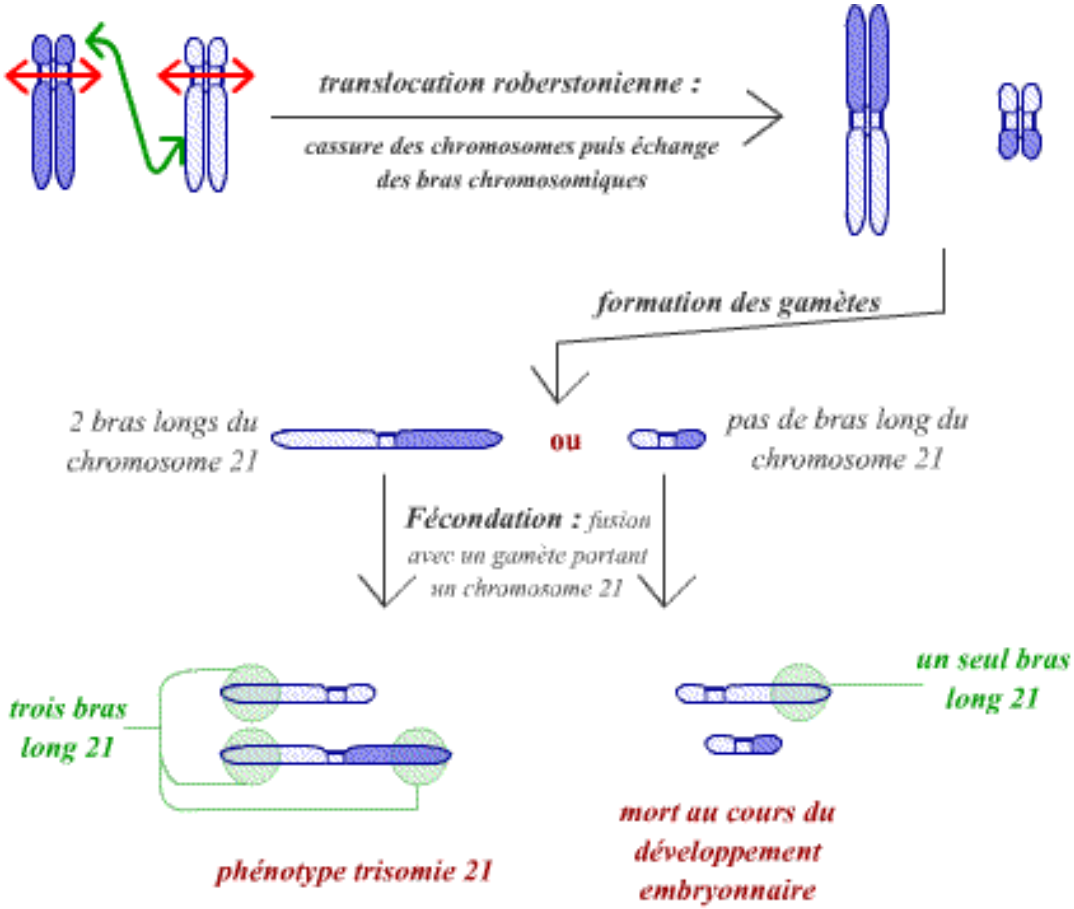
Autres applications :

méiose interphase



Images M BERR

• CTs = “chromosome territories”
Détection de la position spécifique des chromosomes en interphase dans le noyau.



• Diagnostics cytogénétiques
Mise en évidence de maladies génétiques
(trisomies, tumeurs…)

Ex de la trisomie 21

4) Avantages et inconvénients de la technique

(+) - FISH fournit des informations supplémentaires par rapport à la carte génétique. Elle situe les réarrangements chromosomiques.

- FISH permet l'analyse des chromosomes sur noyau interphasique.

- L'utilisation d'haptène couplé à un anticorps diminue le risque d'aspécificité

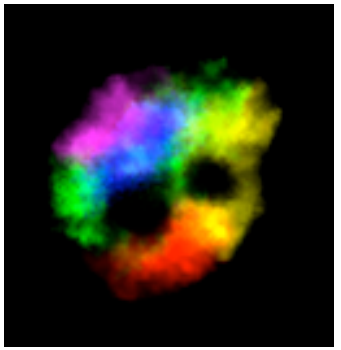
- FISH utilise des fragments de 100 kpb et cela cause ainsi peu de contraintes spatiales au niveau du noyau.

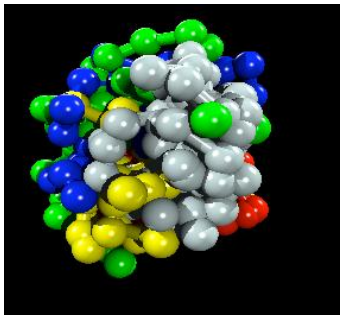
(-) - Application FISH : uniquement pour des cellules non viables.

- Technique coûteuse (sondes).

- Perte de la fluorescence donc du signal au cours du temps.

- Manque d'informations lors de l'analyse des résultats FISH en 2D
→ microscope 3D à déconvolution





Images M BERR

CONCLUSION

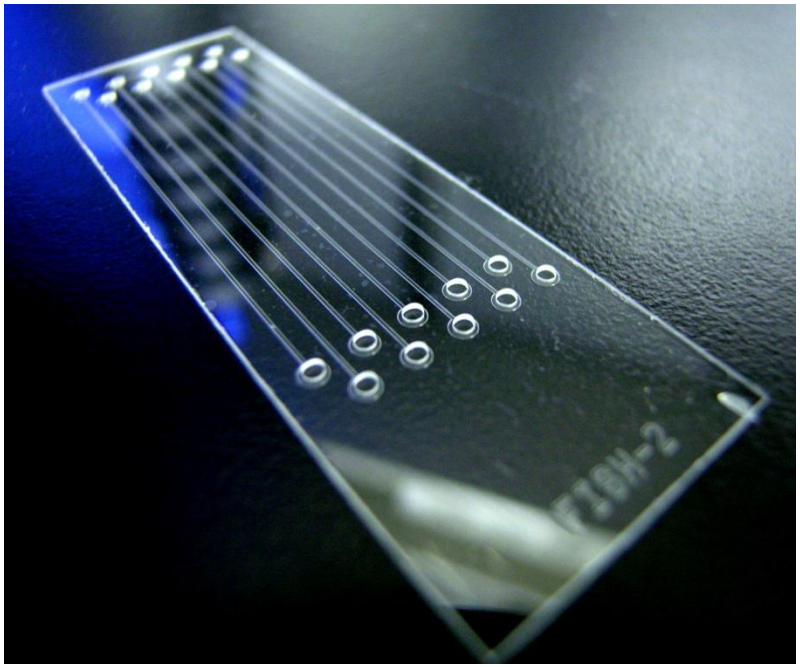
- Technique qui doit être transmise

- Des améliorations en cours : des sondes plus petites et des fluorochromes plus performants limitant le bruit de fond

- Baisse du coût

- Technique simplifiée

Microfluidic chip



http://en.wikipedia.org/wiki/File:FISHchip.jpg

Bibliographie :

•Alexandre Berr and Ingo Schubert (2007) Interphase Chromosome Arrangement in Arabidopsis thaliana Is Similar in Differentiated and Meristematic Tissues and Shows a Transient Mirror Symmetry After Nuclear Division. *Genetics* 176 : 853-863

• Eric Lam,Naohiro Kato, and KoichiWatanabe (2004) Visualizing chromosome structure/organization. Annu.Rev. *Plant Biol*. 55 : 537-554

• Martin A. Lysak, Alexandre Berr, Ales Pecinka, Renate Schmidt, Kim McBreen and Ingo Schubert (2006) Mechanisms of chromosome number reduction in Arabidopsis thaliana and related Brassicaceae species. *PNAS* 103: 5224-5229

• Ales Pecinka,Veit Schubert, Armin Meister, Gregor Kreth, Marco Klatte, Martin A. Lysak, Jörg Fuchs and Ingo Schubert (2004) Chromosome territory arrangement and homologous pairing in nuclei of Arabidopsis thaliana are predominantly random except for NOR-bearing chromosomes. *Chromosoma* 113 : 258-269

•Emanuela V. Volpi and Joanna M. Bridger (2008) FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique. *BioTechniques* 45 : 385-409

• Livres : - Liehr, Thomas. *Fluorescence in situ hybridization (FISH): application guide* 2009. Springer. ISBN 9783540705802
-Wilkinson, D. G. *In situ hybridization: a practical approach.* 1998. Oxford University Press. ISBN 9780199636587

• Rudkin, George T. , Stollar, B. D. (1977) High resolution detection of DNA–RNA hybrids in situ by indirect immunofluorescence. Nature 265: 472-473

• Speicher, Michael, Ballard, Stephen, Ward, David C. (1996) Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. Nature genetic. 12: 368-375

• Schrock, E., Du Manoir, S, Velman, T., Schoell, B., Wienberg, J., Fergus, Ning, Y. (1996) Multicolor Spectral Karyotyping of Human Chromosomes. Science. 273: 494-497

• Michael R. Speicher & Nigel P. Carter (2005) The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. Nature Reviews Genetics. 6: 782-792

•Andrea Zanardi1, Dario Bandiera1, Francesco Bertolini2, Chiara Antonia Corsini2, Giuliana Gregato2, Paolo Milani3, Emanuele Barborini1, and Roberta Carbone1 (2010). Miniaturized FISH for screening of onco-hematological malignancies. BioTechniques 49:497-504

FORETAY, Didier. *Mise au point des techniques FISH*. Lausanne, 1997. Disponible en ligne <http://www.angelfire.com/de/dforetay/Diplome.pdf>

Remerciements particuliers à :

M.BERR