

Peignage moléculaire d'ADN. Cartographie physique du génome et diagnostic génétique

Xavier Michalet, Aaron Bensimon

Le peignage moléculaire permet la préparation reproductible de surfaces couvertes d'une haute densité de molécules d'ADN, parallèles les unes aux autres et étirées selon un taux constant et uniforme. L'utilisation des méthodes d'hybridation fluorescente classiques en fait un outil performant pour la cartographie physique à haute résolution de clones, permettant notamment de lever les

ambiguïtés subsistant dans les cartes de restriction, mais aussi de se dispenser de l'établissement de ces dernières. Enfin, dans le domaine du diagnostic génétique, la détection de microdélétions de quelques dizaines de kilobases à partir d'ADN génomique de patients illustre les potentialités de la technique pour l'étude du génome humain.

Avec les progrès techniques de la biologie moléculaire, l'augmentation du nombre de scientifiques impliqués dans la recherche génétique académique ou industrielle et, depuis quelques années, les investissements considérables du Projet Génome Humain, la connaissance du rôle des gènes et de leurs éventuelles mutations dans l'apparition et le développement de nombreuses maladies a progressé de façon exponentielle [1].

L'étude du génome

Il existe diverses stratégies de recherche et d'étude des gènes, et leur liste n'est sans doute pas close. Elles cherchent toutes à obtenir la séquence d'une partie du génome contenant le gène impliqué dans la maladie étudiée. L'une de ces stratégies est le « clonage positionnel » qui permet, en partant d'un ensemble de familles de patients, d'aboutir à la localisation physique sur l'un des 22 chromosomes autosomiques ou

des 2 chromosomes sexuels d'un ou plusieurs vecteurs de clonage contenant le gène (de type cosmide, par exemple). Cette localisation précise permet ensuite de procéder au séquençage et à l'identification du gène, à sa mutagenèse dirigée dans des modèles animaux, à l'étude de son profil d'expression en présence de différents traitements, ou à l'élaboration de diagnostics génétiques. Le clonage positionnel comprend quatre étapes successives [2]: (1) l'analyse de la liaison génétique à l'aide de marqueurs chromosomiques permettant de déterminer une région chromosomique impliquée dans la maladie; (2) la recherche de clones recouvrant la région chromosomique en question; (3) l'établissement d'une carte physique des clones obtenus; (4) le séquençage systématique et le criblage d'ADNc candidats conduisant *in fine* à l'identification d'un gène. Malgré des progrès dans l'ensemble des techniques employées pour le clonage positionnel, consistant aussi bien en développements nouveaux

(développement de cartes génétiques denses [3], développement de banques de clones couvrant le génome humain [4]), qu'en l'automatisation ou l'informatisation de techniques classiques, la découverte d'un gène représente encore une entreprise de longue haleine, demandant des moyens humains et financiers très lourds. Les résultats de ces efforts sont toutefois d'un intérêt considérable pour la mise au point de thérapies ou de diagnostics. Dans le cas des maladies détectées tardivement (phénotype à évolution lente), le diagnostic génétique laisse envisager la possibilité d'un traitement préventif plus efficace.

Parmi les nouvelles techniques d'étude du génome [5-8], permettant en principe d'accélérer le clonage positionnel ou, au moins, de lever certaines ambiguïtés, le « peignage moléculaire » que nous avons développé au laboratoire de biophysique de l'Institut Pasteur, est une technique de visualisation directe de la position de clones, susceptible d'améliorer considérable-

ment la précision et de simplifier la cartographie physique. Nous montrons ici son application à la cartographie directe à haute résolution et au diagnostic génétique de micro-délétions grâce à l'utilisation de techniques classiques d'hybridation fluorescente.

Le peignage moléculaire ou comment étirer l'ADN de façon contrôlée

Le peignage moléculaire désigne un procédé de fixation d'ADN purifié sur des surfaces, découvert en 1993 à l'Institut Pasteur et à l'École Normale Supérieure [9, 10]. Il consiste à ancrer spécifiquement par leurs extrémités des molécules d'ADN en solution, et à les étirer à l'aide de la tension superficielle d'un ménisque en mouvement.

La *figure 1* illustre la mise en œuvre la plus simple de ce principe. Des molécules d'ADN « déprotéinisées », c'est-à-dire débarassées de toute protéine liée à elles, par un traitement par la protéinase K sont mises en solution tamponnée de MES (acide 2-N[morpholino]éthane sulfonique) 50 mM pH 5,5, et déposées sur une surface de verre traitée de façon à ne permettre qu'une adsorption spécifique de l'ADN par ses extrémités [9-11]. Pendant la durée d'incubation de quelques minutes, les molécules d'ADN qui adoptent en solution une conformation de globule (ou pelote statistique), animées d'un mouvement brownien, entrent de façon aléatoire en contact avec la surface traitée et, éventuellement, finissent par s'ancrer spontanément par l'une de leurs extrémités sur la surface.

La deuxième étape du procédé consiste à retirer de façon contrôlée la solution d'ADN, de façon à provoquer un déplacement régulier du ménisque sur la surface. Lors du passage du ménisque, c'est-à-dire de la ligne frontière entre la solution, l'air et la surface, la partie non ancrée de la molécule qui se présente sous la forme d'une pelote statistique (représentée par des boucles sur les *figures 1A* et *1B*) reste en solution et est donc entraînée dans la direction de déplacement du ménisque. La molécule étant ancrée par l'extrémité, qui se trouve désormais hors de la solution, il

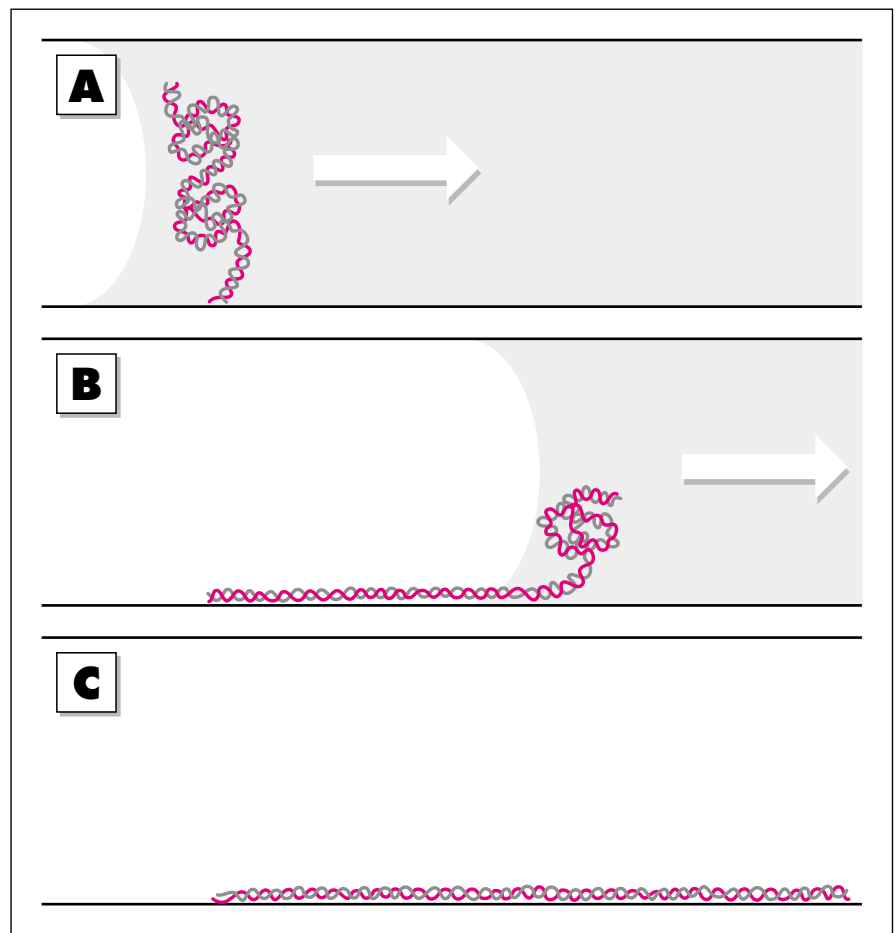


Figure 1. Principe du peignage moléculaire. **A.** Dans cette expérience schématisée, la solution d'ADN purifié est simplement déposée sur une surface traitée, et couverte par une surface de verre qui crée un mince film aqueux. Certaines molécules viennent spontanément s'ancrer par leurs extrémités sur la surface traitée. **B.** Par simple évaporation de la solution par les bords, le volume de la solution diminue, et la frontière air-eau se rétracte, entraînant avec elle les parties non fixées des molécules d'ADN. **C.** Après la disparition complète de la solution, les molécules d'ADN se retrouvent fixées sur la surface, et étirées d'une manière uniforme. La distance entre les deux surfaces (quelques microns) et la molécule d'ADN schématisée ne sont évidemment pas représentées à la même échelle.

en résulte un débobinage de la pelote statistique. La force exercée par le ménisque étant supérieure à la résistance élastique de l'ADN, la molécule est, de surcroît, étirée par rapport à sa longueur non contrainte (ou longueur cristallographique). Enfin, une fois le ménisque passé, on constate une fixation irréversible de la molécule étirée sur la surface (*figure 1C*).

La particularité de cet étirement ainsi réalisé réside dans son extrême régularité, d'une part, en direction :

toutes les molécules étirées se retrouvent parallèles les unes aux autres du fait de l'unicité de la direction de déplacement du ménisque (d'où le nom de « peignage moléculaire » donné à la technique) et, d'autre part, en taux d'extension : toutes les molécules sont étirées de la même façon et sur toute leur longueur, l'origine de la force d'extension étant la forme du ménisque, fixée par la nature de la surface et de la solution tampon utilisées.

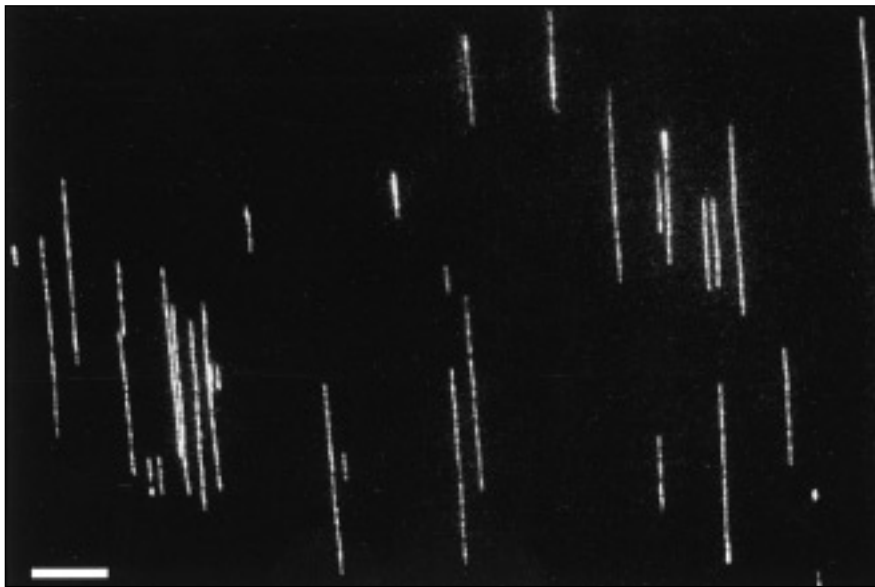


Figure 2. **ADN peigné observé par microscopie d'épifluorescence.** Une solution d'ADN purifié de phage λ (0,25 $\mu\text{g/ml}$) préalablement incubée avec des molécules fluorescentes s'intercalant dans l'ADN, a servi pour le peignage sur des surfaces traitées à l'aide de dérivés du silane. Le champ de vue photographié à l'aide d'une caméra intensifiée contient une majorité de segments de 25 microns environ. Les fragments plus petits sont dus à des cassures aléatoires qui ont lieu avant ou lors de la préparation. La barre de mesure représente 10 microns.

La figure 2 montre une surface de verre (traitée à l'aide d'un dérivé de silane [9-11]), sur laquelle a été peignée une solution d'ADN de phage λ , visualisé à l'aide de molécules fluorescentes s'intercalant partiellement entre les bases de l'ADN (YOYO-1, *Molecular Probes*). L'ensemble des molécules est orienté dans une direction unique et leur taille, de l'ordre de 25 micromètres (μm), est constante. La taille du génome du phage λ étant précisément connue (48,5 milliers de bases (kb)), on en déduit une extension d'environ 2 kb/ μm . Cette extension est indépendante de la taille et elle est parfaitement reproductible. Comparé à la taille cristallographique de 16,2 μm , le procédé permet un étirement d'un facteur 1,54 (figure 2).

Grâce à quelques perfectionnements, cette technique de peignage moléculaire peut être maintenant utilisée avec tous les types de génome, du plus petit au plus grand, comme l'ADN génomique humain qui représente environ trois mètres

d'ADN peigné par cellule [12]. A partir d'un échantillon de quelques μg d'ADN, préservé dans un bloc d'agarose à bas point de fusion, plusieurs centaines de génomes peuvent être peignés sur une surface de 22x22 mm^2 en quelques minutes et un nombre quasi illimité de surfaces peuvent être préparées de façon reproductible [12].

Hybridation fluorescente sur ADN peigné

Les perspectives d'utilisation de ce procédé dans le domaine génétique sont nombreuses. En particulier, l'ADN peigné étant irréversiblement fixé sur la surface de peignage, il est possible d'utiliser les protocoles d'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) [13] pour détecter, mesurer et positionner des sondes nucléotidiques particulières dans n'importe quel génome [12].

Les techniques de FISH consistent dans le marquage d'ADN sonde ou d'ARN par des nucléotides modifiés

reconnaissables par des systèmes d'anticorps fluorescents. Dans un second temps, ces sondes sont incubées avec l'ADN cible, pour permettre leur hybridation avec les séquences cibles. La révélation de ces sondes par des systèmes spécifiques d'anticorps fluorescents permet de repérer leur position.

A la différence des techniques classiques utilisant la FISH (sur chromosomes métaphasiques, ADN interphasique, halo, etc.) [14-16], la mesure de la taille ou de la distance des signaux d'hybridation est directement traduisible en une distance physique en kilobases, en utilisant l'échelle de 2 kb/ μm obtenue par des mesures exhaustives dans le cas des surfaces silanisées utilisées au laboratoire (voir figure 3 et l'article de Monier *et al.* dans ce numéro). En tenant compte de la résolution théorique d'un microscope qui ne dépasse pas 0,20 à 0,25 micron, une précision des mesures sur ADN peigné de l'ordre de 0,50 kb est en principe accessible. En pratique, du fait de la variabilité de l'hybridation, il est nécessaire de prendre des mesures sur un échantillon représentatif de quelques dizaines de signaux d'hybridation. L'ensemble des mesures donne une distribution statistique des tailles ou des distances, caractérisée par une valeur modale (pic de la distribution) et une certaine dispersion, donnant la précision de la mesure qui est en général de quelques kilobases (figure 3).

Cartographie physique du génome

L'application de ces techniques (peignage moléculaire et FISH) à la cartographie physique est sans doute la plus évidente. En collaboration avec Françoise Fougerousse, du groupe de Jacques Beckmann au Généthon, nous avons ainsi cherché à déterminer l'orientation transcriptionnelle du gène de la calpaine 3, situé sur le chromosome 15q15.2, dont des mutations sont responsables d'une dystrophie musculaire des ceintures (LGMD 2A) (*m/s n° 4, vol. 11, p. 637*) [12, 17, 18].

Dans ce but, des cosmides appartenant à deux *contigs* déjà ordonnés à

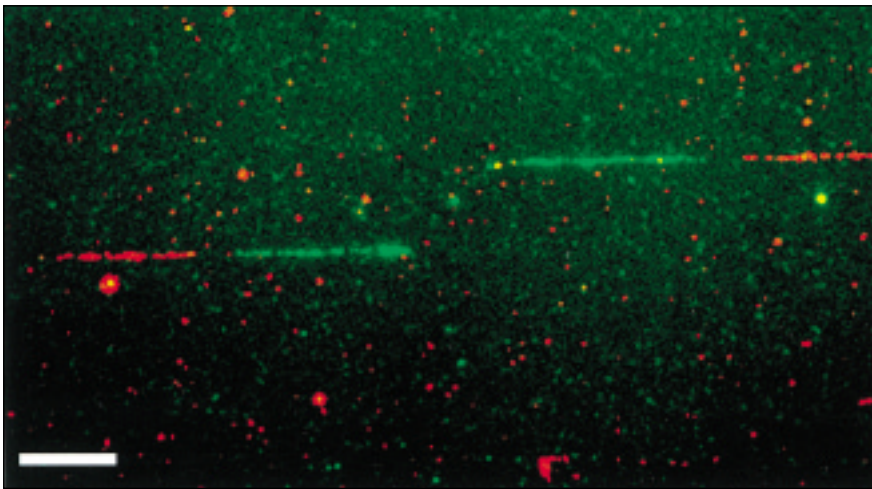


Figure 3. **Exemple de FISH sur ADN peigné.** L'ADN peigné est constitué par le génome d'une souche de levure contenant un chromosome artificiel (YAC 774G4) incluant 1,6 Mb de génome humain. Ce YAC couvre une région du chromosome 15q15.2 dans laquelle a été découvert le gène CAPN3 responsable de la dystrophie musculaire des ceintures de type 2A. L'hybridation simultanée de deux cosmides révélés en deux couleurs différentes (1F11: vert, 3A4: rouge) permet la mesure précise de leurs tailles et de leur distance par l'analyse d'un échantillon statistique de quelques dizaines de mesures. La barre de mesure représente 10 microns.

l'aide de marqueurs STS (*sequenced tag site*) dont l'un contenait le gène et l'autre était d'orientation chromosomique connue, ont été hybridés deux par deux sur l'ADN peigné d'une souche de levure contenant un insert d'ADN génomique humain de 1,6 Mb (YAC 774G4) couvrant la région du gène. La densité de peignage obtenue permet en effet de se dispenser d'isoler préalablement le chromosome artificiel à étudier, qui ne représente pourtant qu'un faible pourcentage du génome total (12,6 Mb). Dans cette expérience, l'ADN de levure est en quelque sorte un ADN muet où ne sont hybridées que des séquences spécifiques du génome humain.

Pour chaque paire de cosmides, l'un est révélé à l'aide d'un système d'anticorps couplé à la FITC (fluorescence verte), l'autre étant couplé au Texas Red™ (fluorescence rouge). La figure 3 montre un champ de vue caractéristique d'une lame observée au microscope à épifluorescence équipé d'un objectif $\times 100$ et d'une caméra CCD (*charge coupled device*) refroidie.

Dès qu'un nombre suffisant d'hybridations est utilisé, la mesure directe des tailles et des distances sur quelques dizaines de couples de cosmides permet la construction immédiate d'une carte précise de la région, sans ambiguïté sur l'orientation des cosmides et la taille des intervalles éventuels. La carte résultante de la région étudiée (environ 200 kb) est représentée sur la figure 4. Il est intéressant de noter qu'aucun des deux *contigs* n'avait l'orientation supposée dans les travaux précédents (fondés sur des marqueurs STS), ce qui montre ainsi la puissance de la méthode pour lever des ambiguïtés difficilement résolubles par les méthodes de biologie moléculaire standard.

Par ailleurs, l'ensemble des mesures obtenues avec une précision de quelques kilobases a permis de vérifier l'autonomie de cette nouvelle technique de cartographie physique, les résultats ayant pu être obtenus sans connaissance préalable ni des tailles des cosmides, ni de leurs distances, c'est-à-dire sans contrôle interne. Pour vérifier la cohérence

de ces mesures, nous avons effectué un certain nombre d'hybridations redondantes qui nous ont permis de vérifier que les mesures surnuméraires correspondaient à celles prédites par notre carte, sans aucun besoin de renormalisation ou d'adaptation des mesures.

Nous avons étendu cette méthode de cartographie de cosmides à l'ADN génomique humain peigné, à l'occasion de l'étude de *contigs* de cosmides recouvrant une région du chromosome 9 impliquée dans l'une des formes de la sclérose tubéreuse (TSC1) [12]. Pour donner une idée de la différence avec l'expérience précédente, il suffit de rappeler la taille d'un génome diploïde humain après peignage: environ trois mètres, sur lesquels seuls quelques centaines de micromètres représentent la région à cartographier (soit $1/10\,000^e$). Malgré cette différence de « rendement » de l'ADN peigné, nous avons pu obtenir des mesures statistiques d'intervalle ou de distance entre cosmides sur une seule surface de $22 \times 22 \text{ mm}^2$ avec une précision de quelques kilobases, en augmentant considérablement la densité d'ADN peigné [12].

La FISH sur ADN peigné apparaît, de ce fait, comme la seule technique de cartographie physique permettant d'obtenir directement et sans ambiguïté une carte physique à haute résolution, sans la nécessité de faire appel à d'autres techniques. Toutefois, si des distances de quelques kilobases à plusieurs centaines de kb sont accessibles sans difficulté, les échelles de distance supérieures nécessitent de faire appel à des techniques moins précises mais plus adaptées, comme la FISH sur chromosomes métaphasiques. La limite supérieure dépend en fait non seulement des manipulations de l'ADN (réduites au minimum) préalables au peignage, celles-ci pouvant conduire à des cassures importantes des fibres, mais aussi à la distance physique (en micromètres) des signaux. En effet, plus les signaux d'hybridation sont éloignés, plus il est difficile de les associer sans ambiguïté par paire, et donc de mesurer leur distance.

L'extension de la technique à l'ADN génomique ouvre d'importantes

perspectives puisqu'il permet, en principe, de se dispenser des clones de grande taille, comme les YAC ou les BAC, pour réaliser la cartographie physique de clones plus petits (cosmides, PAC, etc.). Ces clones, qui sont d'une grande utilité pour cartographier à grands traits une région chromosomique, sont cependant sujets à des remaniements qui peuvent parfois fausser les résultats obtenus. Grâce aux développements que nous avons décrits, un ADN humain standard peut désormais servir à l'étude de n'importe quelle région du génome. Il n'est donc pas exclu que de nouvelles stratégies de clonage positionnel performantes résultent de cette extension des potentialités du peignage moléculaire.

Diagnostic génétique de microdélétions

Le peignage moléculaire d'ADN génomique n'est pas intéressant uniquement du point de vue de la cartographie physique. L'ADN génomique de chaque individu diffère sensiblement de l'ADN d'un autre individu, par des mutations ponctuelles, des répétitions de motifs, mais parfois aussi, par des modifications plus importantes, de l'ordre de quelques kilobases à plusieurs mégabases. Ce sont précisément ces modifications génétiques de plusieurs kilobases (souvent pathologiques) que le peignage moléculaire et les techniques décrites dans le cadre de la cartographie physique, sont susceptibles de détecter de manière extrêmement efficace et rapide.

En collaboration avec Rosemary Ekong et Sophie Rousseaux, du groupe de Sue Povey, du Medical Research Council de Londres, nous avons ainsi appliqué notre technique

* GLOSSAIRE *

STS: *sequence tagged site*, repérage d'une séquence exprimée.
YAC: *yeast artificial chromosome*.
BAC: *bacterial artificial chromosome*.
PAC: *P1 artificial chromosome*.
FISH: *fluorescence in situ hybridisation*.
PFGE: *pulsed field gel electrophoresis*.

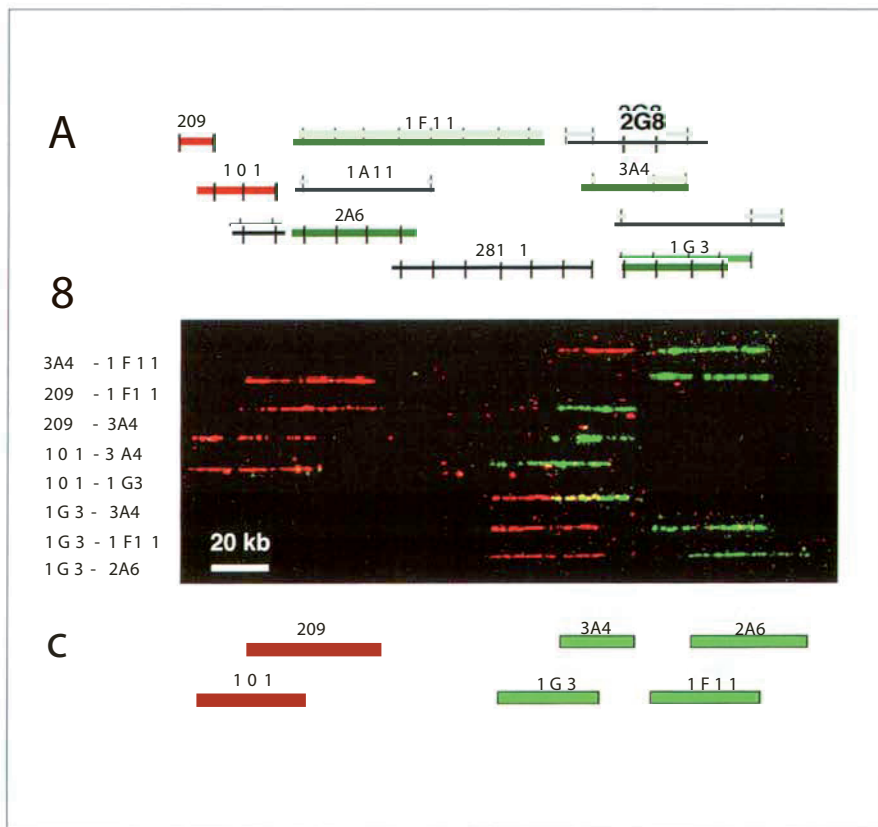


Figure 4. **Cartographie physique sur ADN peigné.** **A**. Carte STS de la région du gène CAPN3 contenu dans les cosmides 1F11 et 1G3. La direction centromérique est à gauche, le télomère à droite. Chaque graduation représente un STS. Les STS sont représentés équidistants par convention, leur distance physique étant inconnue. Les cosmides utilisés dans notre étude sont représentés en couleur, chaque couleur correspondant à un contig distinct. **B**. Cartographie physique par FISH sur ADN peigné avec une résolution de quelques kilobases. La figure montre des hybridations typiques, avec le nom des cosmides utilisés. **C**. Carte schématisée de la région, à partir des résultats de la FISH sur ADN peigné. Les deux contigs sont donc retournés par rapport à leur positionnement hypothétique dans la carte STS figurée en (A).

à l'étude de microdélétions du gène TSC2 impliqué dans l'une des formes de la sclérose tubéreuse (*m/s n° 4, vol. 11, p. 636*) [12, 19]. Cette première expérience visait à vérifier la possibilité de réaliser un diagnostic génétique de délétions connues.

La connaissance précise de la région 16p13.3 impliquée, et la détermination par électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE) de la nature des délétions de plusieurs patients nous a permis de sélectionner deux cosmides encadrant la région concernée. Le principe du diagnostic est explicité sur la figure 5, qui montre le résultat de l'hybridation de ces deux

cosmides sur l'ADN d'un individu sain et sur celui d'un patient atteint de sclérose tubéreuse. Dans le cas de l'individu sain, la distance mesurée entre tous les couples de sondes est unique et est d'environ 150 kb. Pour l'échantillon d'ADN peigné provenant du patient TSC2, deux types de mesures sont possibles: une partie des couples de cosmides donne le résultat précédent (qui correspond aux hybridations s'effectuant sur le chromosome 16 non délété), mais une autre partie donne une valeur inférieure, de l'ordre de 90 kb. Cette dernière valeur permet de déterminer la taille précise de la délétion

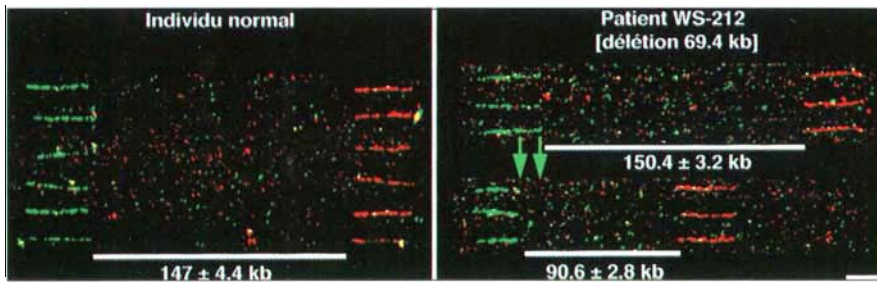


Figure 5. **Diagnostic de microdélétions sur ADN génomique peigné.** La sclérose tubéreuse TSC2 a pour origine une microdélétion d'une partie du chromosome 16. Le principe du diagnostic de ces délétions consiste à hybrider simultanément deux cosmides encadrant la région critique. Six exemples d'hybridations représentatives parmi les dizaines de mesures effectuées sont présentées pour chaque patient étudié. L'individu normal possède un locus intact sur les deux chromosomes 16 et présente donc une seule figure d'hybridation des deux cosmides distants d'environ 150 kb. Dans le cas du patient atteint de TSC2, une partie des signaux d'hybridation donne une distance entre les sondes d'environ 150 kb qui correspond à l'allèle normal, l'autre partie donnant une distance de 90 kb, qui correspond à l'allèle délété. De surcroît, la taille du signal correspondant à l'une des sondes est systématiquement inférieure à sa taille normale (flèches vertes), indiquant qu'une partie de la cible correspondante a également été délétée dans le chromosome du patient.

(environ 70 kb) qui, en l'occurrence, emporte une partie de la séquence correspondant à l'un des cosmides utilisés (figure 5).

Le diagnostic est donc obtenu de façon immédiate, une seule surface d'hybridation étant suffisante pour accumuler les quelques dizaines de mesures nécessaires à un diagnostic précis avec, en sus, une information sur l'hétérozygotie du patient pour ce locus.

L'ADN d'autres patients a été étudié de cette façon, avec des délétions variant d'une dizaine de kilobases à près de 150 kb, en accord avec les résultats obtenus par PFGE. Cette distance de 150 kb ne constitue évidemment pas un maximum, tout autre choix pour les cosmides entourant la région cible ayant pu convenir. Toutefois, comme nous l'avons déjà noté, les cassures aléatoires de l'ADN au cours des manipulations augmentent avec la taille de la région cible et jouent un rôle dans la limitation de la taille maximale mesurable; de même, une trop grande distance entre les sondes peut rendre les mesures difficiles.

De façon similaire, la technique de peignage moléculaire permet, en principe, d'étudier des microduplications ou des micro-insertions au sein d'une région connue du génome.

Perspectives

Les applications que nous avons présentées n'épuisent pas les potentialités du peignage moléculaire. En ce qui concerne les applications utilisant l'hybridation fluorescente, nous avons, par exemple, étudié en collaboration avec le laboratoire de Thomas Cremer de l'Institut de Génétique Humaine et d'Anthropologie de Munich, la possibilité d'étendre les techniques d'hybridation comparative pour le dosage d'amplifications de séquences au sein du génome [20]. Cette étude ne représente toutefois que l'une des approches possibles utilisant le peignage moléculaire pour l'analyse des amplifications de gènes, un phénomène qui intervient notamment dans la carcinogenèse.

Différentes études sont également en cours sur l'application de l'hybridation fluorescente sur ADN peigné à la cartographie de très petites sondes, comme les ADNc: la très nette distinction entre bruit de fond et signal, illustrée sur la figure 3, permet en effet d'envisager la cartographie de sondes de quelques kilobases ou moins (voir l'article de Monier *et al.*, p. 1306 de ce numéro) et leur éventuelle utilisation pour le diagnostic. A l'autre extrémité du spectre, les très grandes distances

sont une voie de recherche prometteuse pour essayer de faire le lien entre la très haute résolution de la FISH sur ADN peigné, et les distances de quelques Mb et davantage habituellement estimées par hybridation sur chromosomes métaphasiques.

Enfin, la possibilité d'utiliser directement l'ADN génomique de n'importe quel organisme offre un outil important pour l'étude comparative des espèces et de leur syténie, un domaine particulièrement important à l'heure où la recherche thérapeutique s'effectue souvent sur des modèles animaux.

Dans le domaine du diagnostic, un vaste champ complémentaire à celui occupé par la PCR ou les techniques se focalisant sur les modifications ponctuelles ou très petites du génome (séquençage, puce ADN [4]) est ouvert. Mais les caractéristiques du peignage moléculaire permettent d'espérer que d'autres types de diagnostics pourront être mis en place, qui tireront parti de sa reproductibilité, de sa précision et de son caractère d'observation directe qui le garantit contre des ambiguïtés de techniques indirectes. Ces caractéristiques, ajoutées à la possibilité d'automatisation des étapes de préparation et d'analyse font assurément du peignage moléculaire d'ADN une technologie d'avenir ■

Xavier Michalet

Docteur ès sciences, chercheur contractuel, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.

Aaron Bensimon

PhD, chef du laboratoire de biophysique de l'ADN, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.

Remerciements

Nous tenons à remercier Catherine Schurra pour son inappréciable aide technique.

RÉFÉRENCES

- Collins FS. Positional cloning moves from periditonal to tapoditonal. *Nature Genet* 1995; 9: 347-50.
- Primrose SB. *Principles of genome analysis*. Oxford: Blackwell Science, 1995.
- Hudson TJ, Stein LD, Gerety SS, Ma J, Castle AB, Shiva J, Slonim DK, Baptista R, Kruglyak L, Xu SH, et al. An STS-based map of the human genome. *Science* 1995; 270: 1945-54.
- Chumakov IM, Rigault P, Le-Gall I, Bellanné-Chantelot C, Billaut A, Guillou S, Soularue P, Guasconi G, Poullier E, Gros I, et al. A Yac contig map of the human genome. *Nature* 1995; 377 (suppl 6547): 175-297.
- Meng X, Benson K, Chada K, Huff EJ, Schwartz DC. Optical mapping of lambda bacteriophage clones using restriction endonucleases. *Nature Genet* 1995; 9: 432-8.
- Hacia JG, Brody LC, Chee MS, Fodor SPA, Collins FS. Detection of heterozygous mutations in BRCA1 using high density oligonucleotide arrays and two-colour fluorescence analysis. *Nature Genet* 1996; 14: 441-7.
- Nelson SF, McCusker JH, Sander MA, Kee Y, Modrich P, Brown PO. Genomic mismatch scanning: a new approach to genetic linkage mapping. *Nature Genet* 1993; 4: 11-8.
- Shalon D, Smith JS, Brown PO. A DNA microarray system for analysing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res* 1996; 6: 639-45.
- 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.
- Bensimon D, Simon JA, Croquette V, Bensimon A. Stretching DNA with a receding meniscus: experiments and models. *Phys Rev Lett* 1995; 74: 4754-7.
- Allemand JF, Bensimon D, Jullien L, Bensimon A, Croquette V. pH dependent binding and combing of DNA. *Biophys J* 1997 (sous presse).
- Michalet X, Ekong R, Fougerousse F, Rousseaux S, Schurra C, Hornigold N, van Slegtenhorst M, Wolfe J, Povey S, Beckmann JS, Bensimon A. Dynamic molecular combing: stretching the whole human genome for high-resolution studies. *Science* 1997; 277: 1518-23.
- Weier HUG, Wang M, Mullikin JC, Zhu Y, Cheng JF, Greulich KM, Bensimon A, Gray JW. Quantitative DNA fiber mapping. *Hum Mol Gen* 1995; 4: 1903-10.
- Lichter P, Tang CJ, Call K, Hermanson G, Evans GA, Housman D, Ward DC. High-resolution mapping of human chromosome 11 by *in situ* hybridization with cosmid clones. *Science* 1990; 247: 64-9.
- Wiegant J, Kalle W, Mullenders L, Brookes S, Hoovers JMN, Dauwerse JG, van Ommen GJB, Raap AK. High-resolution *in situ* hybridization using DNA halo preparations. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 587-91.
- Parra I, Windle B. High resolution visual mapping of stretched DNA by fluorescent hybridization. *Nature Genet* 1993; 5: 17-21.
- Richard I, Broux O, Allamand V, Fougerousse F, Chiannilkulchai N, Bourg N, Brenguier L, Devaud C, Pasturaud P, Roudaut C, Hillaire D, Passos-Bueno M, Zatz M, Tischfield JA, Fardeau M, Jackson CE, Cohen D, Beckmann JS. Mutation in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell* 1995; 81: 27-40.
- Richard I, Roudaut C, Fougerousse F, Chiannilkulchai N, Beckmann JS. An STS map of the limb girdle muscular dystrophy type 2A. *Mammalian Genome* 1995; 6: 754-6.
- The European chromosome 16 tuberous sclerosis consortium. Identification and characterisation of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16. *Cell* 1993; 75: 659-61.
- Kraus J, Weber RG, Cremer M, Seebacher T, Fisher C, Schurra C, Jauch A, Lichter P, Bensimon A, Cremer T. High-resolution comparative hybridization to combed DNA fibers. *Hum Genet* 1997; 99: 374-80.

Summary

DNA molecular combing. Physical mapping and genetic diagnostics

Molecular combing allows for the reproducible preparation of surfaces covered with a high density of DNA molecules, parallel to one another and stretched with a constant and uniform yield. Standard hybridization and fluorescent detection techniques make it a powerful tool for high resolution physical mapping of clones, allowing to raise ambiguities remaining in restriction maps, but also to avoid building such maps. Finally, in genetic diagnostics, detection and precise measurements of micro-deletions a few tens of kilobases show the possibilities of the technique for human genome studies.

TIRÉS À PART

A. Bensimon.

DIPLÔME D'UNIVERSITÉ DE CHRONOBIOLOGIE

Année Universitaire 1997-1998

- Un enseignement de Chronobiologie est organisé à la Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière, sous la direction du Professeur Yvan Touitou. Il a pour but de donner une formation théorique et pratique aux étudiants pour leur permettre l'utilisation des méthodes chronobiologiques. Le diplôme est ouvert aux médecins, pharmaciens, chirurgiens-dentistes, internes des hôpitaux, maîtres ès sciences et, sur proposition du directeur d'enseignement, aux candidats intéressés par la Chronobiologie ayant tous autres titres et travaux. L'enseignement se déroule sous la forme de 5 séminaires de 2 jours chacun, en novembre, décembre, janvier, février et mars. Il est dispensé à la Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière à Paris. Les étudiants salariés peuvent s'inscrire dans le cadre de la formation permanente (prise en charge de l'inscription par l'employeur). La date limite des inscriptions est fixée au 12 novembre 1997.
- L'enseignement porte sur les aspects fondamentaux et appliqués des rythmes biologiques, de la cellule à l'homme. Il est sanctionné par un examen écrit et oral permettant l'obtention du Diplôme d'Université.

Le programme des cours est le suivant :

- Mercredi 12 et jeudi 13 novembre 1997** : Propriétés fondamentales et méthodes d'étude des rythmes biologiques.
- Lundi 8 et mardi 9 décembre 1997** : Rythmes à l'échelon cellulaire et moléculaire : mécanismes. Rythmes endocriniens et neuroendocriniens.
- Lundi 12 et mardi 13 janvier 1998** : Rythmes en pharmacologie et toxicologie.
- Lundi 9 et mardi 10 février 1998** : Pathologie et chrono-thérapeutique en endocrinologie, en cancérologie, en psychiatrie, etc.
- Lundi 9 et mardi 10 mars 1998** : Développement, vieillissement et adaptation. Photopériodisme et régulation des rythmes biologiques.

Les candidats intéressés doivent faire une demande écrite précisant leur formation universitaire au Professeur Yvan Touitou, DU de Chronobiologie, Faculté de médecine Pitié-Salpêtrière, 91, boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France.