

## Le peignage moléculaire : un outil à haute résolution

Le peignage moléculaire de l'ADN, découvert en 1994 (1, 2), repose sur deux principes simples : l'ancrage spécifique, dans des conditions physico-chimiques précises (3), de molécules individuelles d'ADN par leur(s) extrémité(s) sur des surfaces traitées ou non ; la force de traction développée par un ménisque en mouvement ; c'est-à-dire la force exercée sur tout objet placé sur la ligne de contact d'une solution avec une surface, lors du déplacement de cette ligne. Ces deux principes sont combinés dans un pro-

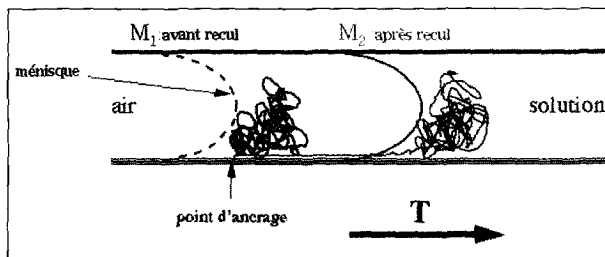


Fig - Principe du peignage moléculaire.

tole de mise en œuvre et de réalisation aisée, applicable à tout type d'ADN, du phage à l'ADN génomique humain en passant par les BAC, YAC et l'ADN de bactéries comme *E. coli*. Une solution, tamponnée à pH 5,5, d'ADN pur est déposée entre deux lamelles de verre, la lamelle inférieure étant silanisée (le silane est un dérivé hydrogéné de silicium). La surface libre de la solution est vue de profil (voir figure) et dessine une courbe représentée en tireté, notée  $M_1$  en position initiale. Une molécule en solution ancrée sur la surface inférieure adopte spontanément une forme moyenne de globule, centré autour de son point d'ancrage. La solution s'évapore, entraînant le recul du ménisque, à une vitesse de l'ordre de 100 à 200 micromètres par seconde, jusqu'à la position notée  $M_2$ . Lorsque le ménisque atteint le point d'ancrage de la molécule, le globule est entraîné par la force de traction constante  $T$  du ménisque dans la direction du recul de celui-ci. Comme la force n'est suffisante ni pour casser la molécule, ni pour la décrocher de la surface, le ménisque laisse à l'air libre sur son passage une portion de la molécule étirée. Le phénomène se déroule jusqu'au débobinage complet du globule. Une fois l'expérience terminée, les molécules d'ADN sont alignées parallèlement les unes aux autres dans la direction de recul du ménisque. Des mesures systématiques permettent de déterminer un taux d'étirement constant. Dans le cas de surfaces couvertes de silane, le taux d'extension est de 1,5 par rapport à la longueur cristallographique de l'ADN (qui est de 0,33 nanomètre par base). Une molécule de phage (48,5 kb) mesure ainsi, après peignage, environ 25 micromètres. Le peignage moléculaire sur ce genre de surface peut donc être caractérisé par la relation suivante : 1 micromètre = 2 kb (1).

Cependant, seule l'accumulation de mesures rend possible une détermination statistique des tailles et distances avec une précision de quelques kilobases. La fixation irréversible de l'ADN peigné permet de le dénaturer, d'hybrider des sondes nucléotidiques et d'effectuer une révélation de ces hybridations à l'aide de systèmes d'anticorps fluorescents, c'est-à-dire d'appliquer les protocoles standard de FISH (4).

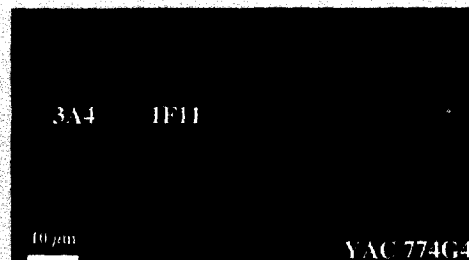
Les avantages du peignage moléculaire dans le domaine de la cartographie physique sont nombreux : l'uniformité de l'extension et la densité des molécules peignées permettent une détermination, indépendante de toute autre

méthode, des tailles et des distances entre sondes hybridées. La précision statistique des mesures sur les sondes hybridées est d'environ 1 à 2 micromètres, ce qui se traduit par la possibilité d'effectuer une cartographie physique de clones avec une précision de quelques kilobases. La visualisation directe des tailles et positions des clones assure l'absence totale d'ambiguïté de la carte physique obtenue. Enfin il est possible d'effectuer ces expériences sur de l'ADN génomique humain, comme nous l'avons montré lors d'une collaboration avec le groupe de S Povey (Medical Research Council, Londres) (6) portant sur la cartographie du gène *TSC1* (tuberous sclerosis I). Le peignage moléculaire associé à la FISH a de multiples autres applications : cartographie d'ADNc, diagnostic de délétions sur ADN génomique humain (6), hybridation comparative (7), dosage génétique... ■

Xavier MICHALET et Aaron BENSIMON

Laboratoire de biophysique de l'ADN, Département des biotechnologies, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, 75724 Paris cedex 15. Tél : (33) 01 40 60 32 40. Fax : (33) 01 46 68 87 90. E-mail : michalet&abensim@pasteur.fr

- (1) A Bensimon *et al* (1994) *Science* 265, 2096.
- (2) D Bensimon *et al* (1995) *Phys Rev Lett* 76, 4754.
- (3) JF Allemand communication personnelle.
- (4) HU Weier *et al* (1995) *Hum Mol Genet* 10, 1903.
- (5) X Michalet communication personnelle.
- (6) R Ekong communication personnelle.
- (7) J Kraus *et al* (1997) *Hum Genet* (sous presse).
- (8) I Richard *et al* (1995) *Cell* 81, 27-40.



#### Cartographie physique sur ADN peigné

La dystrophie musculaire des ceintures de type 2A est une maladie génétique dont est responsable le gène de la calpaïne 3 (*Capn3*) (8), conduisant progressivement (10 à 20 ans) à une perte de la capacité locomotrice. Le gène *Capn3* est localisé sur le chromosome 15q15.2. L'hybridation de six cosmides répartis sur 200 kb de la région impliquée, nous a permis de préciser la cartographie de celle-ci et de déterminer l'orientation chromosomique du gène en collaboration avec l'équipe de JS Beckmann du Généthon. La photo présente l'hybridation de deux cosmides (3A4 et 1F11) sur un ADN de YAC (774G4), peigné avec le génome de la levure hôte (5). Le YAC contient une partie du chromosome 15q15.2, le cliché révèle deux hybridations de deux cosmides (l'un révélé en vert, au FITC, et l'autre en rouge, au Texas red) sur deux YAC voisins ; il montre l'absence d'ambiguïté des signaux observés et l'uniformité de l'extension. L'un des deux cosmides 1F11 est hybridé sur un YAC cassé, et apparaît pour cette raison plus court que son homologue.