

Typage génique des spermatozoïdes : application à l'étude du génome

Le concept de typage génique des spermatozoïdes a été proposé en 1988 par l'équipe de N. Arnheim [1]. Il repose sur l'analyse directe du contenu génétique des spermatozoïdes, cellules haploïdes (n chromosomes) issues de la méiose. Cette technique permet d'étudier un certain nombre de mécanismes génétiques jusqu'ici inabordable par les stratégies classiques fondées sur les études familiales.

Le typage génique de spermatozoïdes repose sur l'amplification unicellulaire *in vitro* par PCR [2] de polymorphismes de séquence de l'ADN. Les polymorphismes étudiés initialement étaient des marqueurs bi-alléliques peu informatifs de type RFLP (*restriction fragment length polymorphisms*). L'amélioration des techniques d'amplification et de détection des produits issus de la PCR a rendu possibles l'analyse de minisatellites et de microsatellites et la suppression de l'utilisation de radioactivité [3].

Divers domaines d'étude ont bénéficié du développement de la technique de typage génique des spermatozoïdes.

Cette technique permet tout d'abord de mesurer des fréquences de recombinaison entre des marqueurs polymorphes proches, en vue d'améliorer la cartographie du génome. Ces études sont traditionnellement fondées sur des analyses de ségrégation dans des familles informatives. Par l'analyse des *pedigrees*, il est possible de mesurer des distances génétiques de l'ordre de 1cM (1cM = 1% de recombinaison). Cependant, les données sont limitées par le nombre d'individus disponibles dans une même famille. Au sein d'une généra-

tion, il y a peu de chances de trouver des individus présentant une recombinaison entre deux marqueurs séparés par une très petite distance génétique. La résolution ne peut donc généralement pas se faire en deçà de 1 à 2 cM. En revanche, la quantité de spermatozoïdes présents dans le sperme étant de plusieurs millions, il n'y a pas de limitation quant au nombre de produits méiotiques analysables. Chaque spermatozoïde contient une information génétique unique due aux nombreuses recombinaisons ayant lieu lors de la prophase de la première division méiotique. L'amplification de 100 spermatozoïdes revient à étudier la contribution paternelle à une descendance de 100 individus, ce qui représente l'équivalent d'une fratrie très importante (*figure 1*). La comparaison de l'haplotype d'un gamète aux haplotypes paternels (établis à partir de

l'ADN somatique), permet de déterminer s'il y a eu une recombinaison entre les locus étudiés. La fraction de recombinaison correspond au nombre de spermatozoïdes recombinants divisé par le nombre total de spermatozoïdes analysés.

Les études de recombinaison réalisées à partir de l'ADN des spermatozoïdes permettent ainsi d'augmenter la résolution de la carte génétique établie par analyse de liaison, grâce à une meilleure estimation des fréquences de recombinaison et donc des distances génétiques [4].

D'autre part, à l'inverse des analyses de généalogies où les marqueurs génétiques doivent avoir un PIC (*polymorphism information content*) élevé afin d'avoir accès à un nombre suffisant de familles informatives, l'étude des spermatozoïdes n'est pas limitée par le PIC, puisqu'un seul donneur hétérozygote pour les mar-

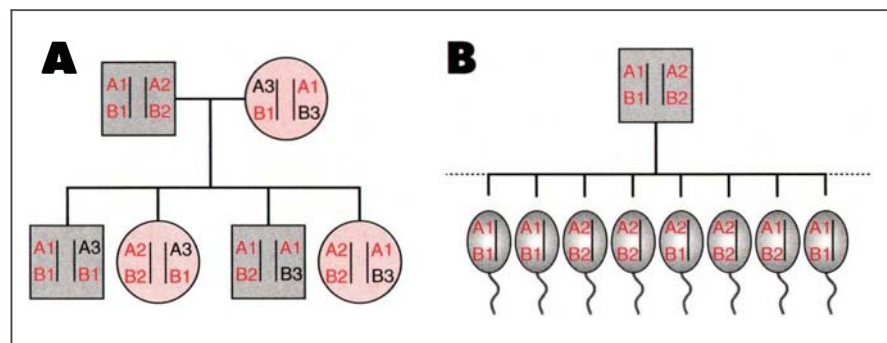


Figure 1. Représentation schématique du principe du typage génique de spermatozoïdes comparé aux études classiques de généalogies. A. La fréquence de recombinaison entre deux marqueurs polymorphes A et B est déterminée en suivant la ségrégation de ces marqueurs dans des familles informatives. B. L'analyse des spermatozoïdes d'un individu hétérozygote pour ces deux marqueurs permet d'avoir accès à un grand nombre de produits méiotiques et d'affiner ainsi la valeur de la fréquence de recombinaison.

Tableau I		
COMPARAISON DES INFORMATIONS FOURNIES PAR LES ÉTUDES MENÉES PAR ANALYSE FAMILIALE ET PAR TYPAGE GÉNIQUE DE SPERMATOZOÏDES		
	Analyse familiale	Typage génique des spermatozoïdes
Résolution des distances génétiques	> 1-2 cM	0,1 cM
Nombre d'individus disponibles pour l'étude	< 200	illimité
Structure familiale requise	au moins deux générations	1 seul donneur de sperme
Mesure des fréquences de recombinaison dans les deux sexes	oui	non (uniquement chez le mâle)
Nature des marqueurs polymorphes analysés	traits phénotypiques; polymorphismes d'ADN	polymorphismes d'ADN uniquement
Nécessité d'étudier des marqueurs avec un PIC élevé	oui	non

queurs étudiés peut fournir des informations sur les phénomènes de recombinaison.

En revanche, les distances génétiques étudiées par typage génique de spermatozoïdes ne peuvent être évaluées que chez l'homme et ne donnent pas accès aux phénomènes de recombinaison se déroulant lors de l'ovogenèse chez la femme. De plus, les marqueurs analysés ne sont que des polymorphismes de l'ADN et non des traits phénotypiques comme c'est le cas pour l'analyse familiale (Tableau I). L'amplification de l'ADN spermatique ne peut donc servir qu'à améliorer une carte génétique issue d'une analyse de liaison et non à la remplacer. Le typage génique des spermatozoïdes permet également de préciser l'ordre de locus très étroitement liés sur un chromosome, à condition que les spermatozoïdes analysés proviennent d'un sujet hétérozygote pour tous les marqueurs étudiés. L'ordre sur un chromosome de trois marqueurs est déduit en observant les deux haplotypes paternels (les plus fréquents), les deux haplotypes les

moins représentés (résultant d'une double recombinaison lors de la méiose) et les haplotypes résultant d'une simple recombinaison (moyennement représentés). Cette stratégie a été appliquée pour étudier une région du bras court du chromosome 3, fréquemment remaniée dans de nombreux cancers [5]. Les quelques polymorphismes disponibles ayant une mauvaise informativité, la cartographie de cette région n'avait pu être établie que grossièrement. Trois RFLP ont ainsi pu être ordonnés grâce à l'analyse de 300 spermatozoïdes.

Une autre application du typage génique de spermatozoïdes est l'étude des phénomènes de distorsion de ségrégation d'allèles. L'étude de la transmission de certaines maladies révèle une prédominance d'enfants porteurs d'une mutation dans le gène responsable de ces maladies [6, 7]. Afin de vérifier cette hypothèse avec une bonne fiabilité statistique, il faut pouvoir analyser un grand nombre d'individus. Des études de transmission familiale de

l'allèle muté $\Delta F508$ (délétion de 3 pb dans l'exon 10 du gène de la mucoviscidose) ont suggéré que les hommes hétérozygotes $\Delta F/N$ transmettraient préférentiellement l'allèle muté à leurs enfants et qu'ils auraient davantage de garçons que de filles [6, 8]. La co-amplification de la région dans laquelle siège la délétion et d'une séquence spécifique aux chromosomes sexuels a été réalisée à partir des spermatozoïdes d'un homme hétérozygote pour la mutation $\Delta F508$. Les résultats ont montré que les allèles mutés étaient autant associés au chromosome X qu'au chromosome Y, et que la répartition allèles mutés/allèles normaux suivait une ségrégation Mendélienne [9]. L'étude par typage génique de spermatozoïdes a donc permis de montrer que le biais observé n'était vraisemblablement pas dû à une production de spermatozoïdes porteurs de l'allèle muté différente de celle des spermatozoïdes porteurs de l'allèle normal, mais à des mécanismes post-méiotiques.

Récemment, la technique du typage génique de spermatozoïdes a été appliquée à l'étude de la fréquence des mutations germinales de gènes comportant des répétitions de trinucleotides (CAG, CTG, CCG, CGG, GGA). Plusieurs maladies neurodégénératives humaines sont liées à une expansion instable de ces trinucleotides. Les plus connues parmi ces maladies sont le syndrome de l'X-fragile (CCG ou CGG), la dystrophie myotonique de Steinert (CTG), le syndrome de Kennedy (CAG), la chorée de Huntington (CAG), diverses formes d'ataxie spinocérébelleuse (CAG), et, incluse depuis peu dans cette catégorie, l'ataxie de Friedreich (GAA)*. Les connaissances sur les fréquences des expansions ou des contractions de ces triplets sont limitées à cause du nombre restreint de descendants dans ces familles. L'analyse des spermatozoïdes de patients normaux et de patients atteints du syndrome de Kennedy a permis d'estimer de façon beaucoup plus précise que par les analyses familiales, les taux de mutation des

* Voir aussi l'article de C. Néri, et al., p. 1361 de ce numéro.

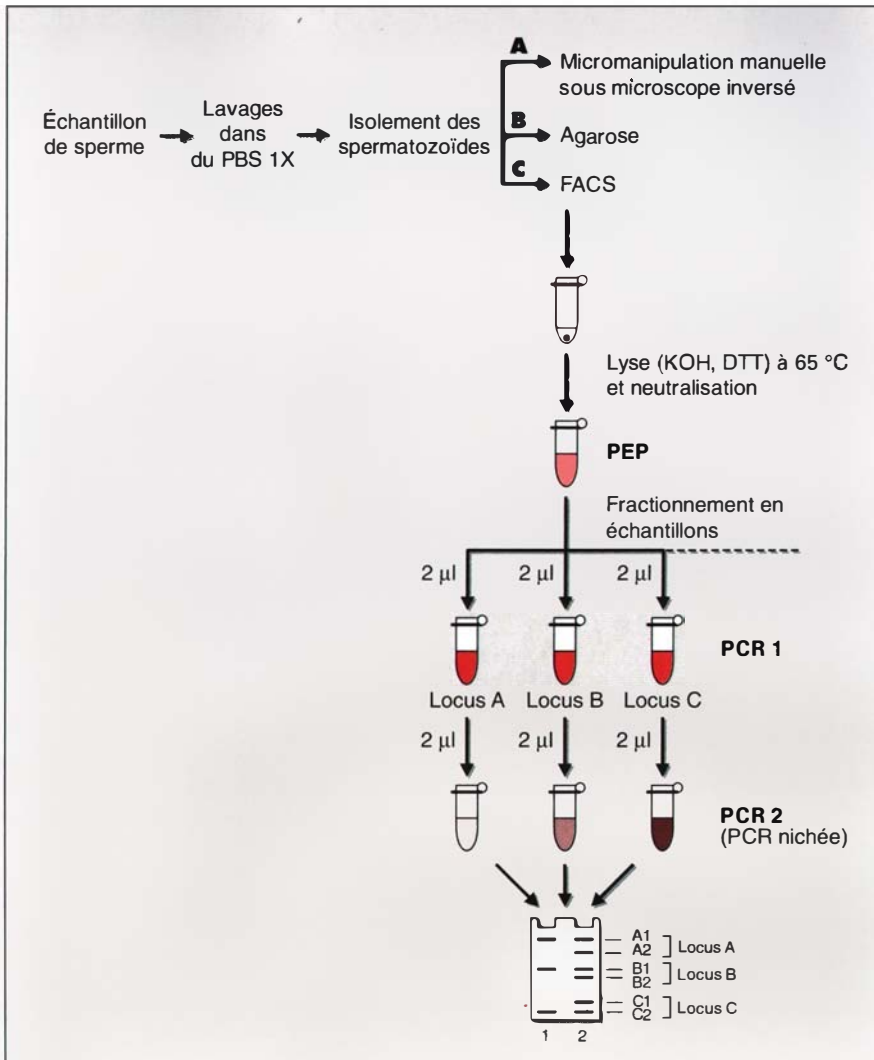


Figure 2. Déroulement de la technique de typage génique de spermatozoïdes chez un sujet hétérozygote pour trois locus (A, B, C). Après recueil de l'échantillon de sperme, une fraction du prélèvement (100 µl) est lavée plusieurs fois par centrifugations successives dans du PBS. Le tri des spermatozoïdes peut ensuite se faire de différentes manières. **A.** La micromanipulation manuelle sous un microscope inversé est une technique relativement longue et délicate compte tenu du nombre élevé de spermatozoïdes à isoler. Des micropipettes de petit diamètre (environ 15 µm de diamètre interne) sont étirées spécialement pour cette étape. La difficulté vient du fait que les spermatozoïdes ont tendance à rester accrochés aux parois de la micropipette une fois qu'ils ont été aspirés et que le rejet dans le tube contenant la solution de lyse n'est pas visualisable à cause de l'épaisseur du tube. **B.** Le coulage des spermatozoïdes dans de l'agarose a également été tenté mais le rendement d'isolement n'a guère été satisfaisant [19]. Cette technique consiste à mélanger un échantillon de la solution de spermatozoïdes à de l'agarose (0,5%) à faible point de fusion. Une fois que l'agarose s'est solidifié, des petits morceaux contenant une cellule sont découpés sous microscope inversé et transférés dans les tubes de lyse. **C.** L'utilisation d'un FACS (fluorescence-activated cell sorting) permet de faire un tri plus rapide et plus sûr [20]. L'échantillon à trier est soumis

aux ultrasons pour retirer les flagelles des spermatozoïdes, afin qu'ils n'obstruent pas l'orifice du trieur de cellules. Le FACS est fondé sur le tri des cellules en fonction de leur taille et de la quantité de fluorescence émise par le spermatozoïde après coloration au préalable de son ADN. Les colorants utilisés sont l'iodure de propidium (PI), le bromure d'éthidium (BET) et le colorant Hoechst 33342. Une fois individualisés, les spermatozoïdes sont ensuite lysés dans 5 µl d'une solution alcaline (200 mM KOH, 50 mM DTT) pendant 10 min à 65 °C. La réaction est neutralisée en ajoutant dans les différents tubes 5 µl d'un mélange de Tris-HCl (900 mM pH 8,3), KCl (300 mM) et HCl (200 mM). Le spermatozoïde isolé subit une PEP (préamplification par extension d'amorce, primer extension preamplification) puis des PCR nichées pour chacun des locus analysés. Les produits PCR obtenus sont déposés sur gel de polyacrylamide (ligne 1) à côté du produit d'amplification de l'ADN somatique (ligne 2).

séquences de triplets au niveau du gène du récepteur des androgènes [10, 11], du locus de la dystrophie myotonique de Steinert [10] et du gène impliqué dans la chorée de Huntington [12].

En pratique, le typage génique de spermatozoïdes se déroule en plusieurs étapes (figure 2). La première étape consiste à isoler les spermatozoïdes; c'est l'un des facteurs limi-

tants, car il est essentiel de n'avoir qu'un seul spermatozoïde par tube. Une fois isolés, les spermatozoïdes sont lysés, afin de libérer et de décondenser leur molécule d'ADN. La région polymorphe à étudier est ensuite amplifiée en deux réactions successives. Lors de la première réaction d'amplification, deux amorces spécifiques du marqueur étudié sont utilisées, puis une PCR nichée est

réalisée à l'aide de deux amorces internes. Ces deux PCR sont nécessaires afin d'augmenter le rendement et la spécificité de la réaction. Les produits issus de l'amplification sont analysés après électrophorèse en gel d'agarose ou de polyacrylamide, coloration au bromure d'éthidium et irradiation par les UV. Dans le cas de l'étude de microsatellites, les produits d'amplification peuvent être

analysés sur un séquenceur automatique grâce à l'incorporation, lors de l'amplification, d'une amorce ou de dUTP marqués par un fluorochrome. Cette analyse permet non seulement de suivre la ségrégation des allèles présents dans les spermatozoïdes par rapport aux allèles de l'ADN somatique, mais également de connaître précisément la taille de chaque allèle grâce à la migration d'un marqueur de taille dans le même puits que l'échantillon étudié.

Idéalement, on ne devrait observer que des haplotypes parentaux ou recombinants si l'on considère que le rendement de l'amplification est de 100 % et que chaque tube ne contient qu'un seul gamète. Toutefois, des haplotypes inattendus sont parfois observés résultant d'erreurs expérimentales. Des modèles mathématiques ont donc été élaborés pour traiter les données obtenues [5, 13]. Les programmes informatiques créés à partir de ces modèles prennent en compte différents paramètres d'erreurs tels que la probabilité d'avoir isolé 0, 1 ou 2 spermatozoïdes dans les tubes, la probabilité d'amplifier et de détecter chacune des régions polymorphes, la probabilité qu'il y ait des contaminations, ainsi que la fraction de recombinaison entre les différents locus étudiés. On estime enfin que tous les tubes sont statistiquement indépendants les uns des autres.

En 1992, une technique de pré-amplification de la totalité du génome a été décrite [14]. Elle permet d'amplifier plusieurs locus sans avoir recours à des PCR multiplex souvent sujettes à une amplification préférentielle de l'un des locus étudiés. Cette technique, appelée PEP (*primer-extension preamplification*) permet de contourner certaines limitations inhérentes à l'étude d'une seule molécule d'ADN. Plusieurs cycles d'extension sont réalisés par une *Taq* polymérase en présence d'un mélange d'oligonucléotides de 15 pb (A, C, G, T pouvant occuper n'importe quelle position dans les oligonucléotides). Le résultat de la PEP est une amplification d'au moins 78 % du génome en une trentaine de copies [14]. On peut ensuite étudier un marqueur particulier en prélevant un échantillon du produit d'amplifi-

cation qui est alors utilisé comme matrice et subit des cycles de PCR à l'aide d'amorces spécifiques du locus d'intérêt.

Les principaux avantages de la PEP sont de pouvoir vérifier un haplotype en prenant un autre échantillon du produit PEP et en relançant une PCR spécifique du polymorphisme analysé, ainsi que d'étudier des marqueurs supplémentaires; cela représente un atout considérable par rapport à l'amplification directe unicellulaire d'une séquence donnée où, une fois la PCR réalisée, il n'est plus possible d'amplifier une autre séquence du génome. Cette technique a été utilisée pour mieux estimer la taille d'une région située près du gène de la chorée de Huntington en 4p16.3, où la fréquence de recombinaison est supérieure à ce qui est généralement observé pour le reste du génome [15]. Deux marqueurs (*D4S10* et *D4S125*) séparés par 550 kb ont été étudiés par ségrégation familiale; les résultats ont montré qu'il y avait entre eux un taux élevé de recombinaison. L'étude de plus de 700 spermatozoïdes a permis de trouver des recombinants pour deux autres marqueurs relativement éloignés l'un de l'autre, et ces recombinants ont été testés à nouveau à partir d'autres échantillons de la PEP avec des marqueurs internes. La taille de la région où siège le point chaud de recombinaison a ainsi pu être circonscrite à un intervalle de 280 kb grâce à l'étude de deux marqueurs polymorphes (*D4S10* et *D4S126*). Si d'autres marqueurs polymorphes sont découverts dans cette région, ils pourront être étudiés à partir d'autres échantillons de la PEP afin d'affiner encore davantage la localisation de ce point chaud de recombinaison.

L'inconvénient majeur rencontré lors des amplifications unicellulaires est le problème des contaminations. Puisqu'il n'y a initialement dans le milieu de lyse qu'une seule molécule d'ADN (environ 3 pg), toute contamination provenant par exemple de précédentes amplifications, sera au moins aussi abondante que la cible réelle. Il est donc nécessaire de désigner dans le laboratoire des postes de travail spécifiques pour préparer les mélanges réactionnels et d'autres pour analyser les produits d'amplifi-

cation, d'utiliser des échantillons autoclavés de chaque réactif intervenant dans la lyse cellulaire et les PCR, et d'inclure dans les techniques de nombreux témoins négatifs.

Cette méthodologie est applicable chez l'homme, mais également chez toutes les espèces animales ou végétales où des gamètes peuvent être recueillis. Dans les populations animales caractérisées par de longs temps de génération, le typage génique de spermatozoïdes peut aider à l'élaboration d'une carte génétique, comme cela a été fait chez le bovin [16].

L'amplification unicellulaire de l'ADN des spermatozoïdes représente un énorme potentiel pour étudier divers mécanismes génétiques et améliorer la cartographie du génome. Cependant, peu de laboratoires l'ont jusqu'ici exploitée en raison des difficultés d'ordre technique. Il reste néanmoins certain que la maîtrise de la technique du typage génique de spermatozoïdes et la découverte de nouveaux polymorphismes de l'ADN peuvent permettre de construire des cartes génétiques de haute résolution.

Par ailleurs, la mise au point de techniques d'amplification d'une quantité infime de matériel génétique a permis d'ouvrir les portes à d'autres applications, que ce soit dans le domaine de la médecine légale, ou encore du diagnostic préimplantaire fondé sur le génotypage d'un seul blastomère d'embryons issus d'une fécondation *in vitro* [17, 18].

**Anne Girardet
Mireille Claustres
Franck Pellestor**

A. Girardet, F. Pellestor: Cnrs UPR 9008, route de Mende, B.P. 5051, 34033 Montpellier Cedex, M. Claustres: Laboratoire de biochimie génétique, Institut de biologie, boulevard Henri-IV, 34060 Montpellier Cedex, France.

TIRÉS À PART

A. Girardet.

RÉFÉRENCES

1. Li H, Gyllensten U, Cui X, Saiki R, Erlich H, Arnheim N. Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. *Nature* 1988; 335: 414-7.
2. Saiki R, Scharf S, Faloona F, Mullis K, Horn G, Erlich H, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350-4.
3. Hubert R, Weber J, Schmitt K, Zhang L, Arnheim N. A new source of polymorphic DNA markers for sperm typing: analysis of microsatellite repeats in single cells. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 985-91.
4. Hubert R, Stanton V, Aburatani H, Warren J, Li H, Housman D, Arnheim N. Sperm typing allows accurate measurement of the recombination fraction between D3S2 and D3S3 on the short arm of human chromosome 3. *Genomics* 1992; 12: 683-7.
5. Goradia T, Stanton V, Cui X, Aburatani H, Li H, Lange K, Housman D, Arnheim N. Ordering three DNA polymorphisms on human chromosome 3 by sperm typing. *Genomics* 1991; 10: 748-55.
6. Kitzis A, Chomel JC, Kaplan JC, Giraud G, Labbe A, Dastugue B, Dumur V, Farriaux JP, Roussel P, Williamson R, Feingold J. Unusual segregation of cystic fibrosis allele to males. *Nature* 1988; 333: 215.
7. Munier F, Spence M, Pescia G, Balmer A, Gailloud C, Thonney F, Van Melle G, Rutz H. Paternal selection favoring mutant alleles of the retinoblastoma susceptibility gene. *Hum Genet* 1992; 89: 508-12.
8. Pritchard D. Why cystic fibrosis is on the increase. *Nature* 1987; 330: 319-???
9. Williams C, Davies D, Williamson R. Segregation of ΔF 508 and normal CFTR alleles in human sperm. *Hum Mol Genet* 1993; 2, 4: 445-8.
10. Zhang L, Leeflang E, Yu J, Arnheim N. Studying human mutations by sperm typing: instability of CAG trinucleotide repeats in the human androgen receptor gene. *Nature Genet* 1994; 7: 531-5.
11. Zhang L, Fischbeck K, Arnheim N. CAG repeat length variation in sperm from a patient with Kennedy's disease. *Hum Mol Genet* 1995; 4, 2: 303-5.
12. Leeflang E, Zhang L, Tavaré S, Hubert R, Srinidhi J, MacDonald M, Myers R, De young M, Wexler N, Gusella J, Arnheim N. Single sperm analysis of the trinucleotide repeats in the Huntington's disease gene: quantification of the mutation frequency spectrum. *Hum Mol Genet* 1995; 4, 9: 1519-26.
13. Cui X, Li H, Goradia T, Lange K, Kazazian H, Galas D, Arnheim N. Single-sperm typing: determination of genetic distance between the γ -globin and parathyroid hormone locus by using the polymerase chain reaction and allele-specific oligomers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 9389-93.
14. Zhang L, Cui X, Schmitt K, Hubert R, Navidi W, Arnheim N. Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 5847-51.
15. Hubert R, Mac Donald M, Gusella J, Arnheim N. High resolution localization of recombination hot spots using sperm typing. *Nature Genet* 1994; 7: 420-4.
16. Lewin H, Schmitt K, Hubert R, Van Eijk M, Arnheim N. Close linkage between bovine prolactin and BoLA-DRB3 genes: genetic mapping in cattle by single sperm typing. *Genomics* 1992; 13: 44-8.
17. Handyside A, Kontogianni E, Hardy K, Winston R. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990; 344: 768-70.
18. Viville S, Ray P, Wittemer C, Ohl J, Delenbach P, Gerlinger P. Le diagnostic génétique préimplantatoire: législation et aspects éthiques. *médecine/sciences* 1996; 12: 1394-7.
19. Lien S, Kaminski S, Aleström P, Rogne S. A simple and powerful method for linkage analysis by amplification of DNA from single sperm cells. *Genomics* 1993; 16: 41-4.
20. Li H, Cui X, Arnheim N. Analysis of DNA sequence variation in single cells. In: Abelson J, Simon M, eds. *Methods-a companion to Methods in Enzymology*. San Diego: Academic Press, 1991: 49-59.

SÉMINAIRE D'IMMUNODERMATOLOGIE

Lyon

Lundi 5 et Mardi 6 mai 1997

Organisé par le Groupe de Recherche en Auto-immunité de Lyon (GRAAL)
Inserm Unité 80 et Faculté RTH Laennec

Les Séminaires d'Immuno-Dermatologie sont une mise au point régulière des progrès réalisés en immunologie fondamentale et clinique indispensables à la compréhension de la physiologie et de la pathologie dermatologique. Les Séminaires durent 2 jours et comportent une succession de cours sur des sujets modernes d'immunologie dermatologique qui associent des rappels de bases, des mises au point sur des notions plus récentes et des revues sur des maladies dermatologiques, des techniques diagnostiques ou des méthodes thérapeutiques. Les Séminaires d'Immuno-Dermatologie s'adressent aux médecins, scientifiques, internes de spécialité, étudiants du 3^e cycle ainsi qu'à toute personne qui s'intéresse à la physiologie de la peau, à l'immunologie ou à la dermatologie. Les conférences auront lieu tous les ans. Le Séminaire 1997 s'intéressera plus particulièrement à la physiologie du système immunitaire cutané et muqueux, aux phénomènes de tolérance immunologique cutanée, aux mécanismes de présentation d'haptènes et d'allergènes aux lymphocytes T, à la détection des cytokines dans les tissus et dans le sérum, aux techniques d'immunothérapie de contact et à l'intérêt des modèles animaux pour comprendre la physiopathologie des dermatoses inflammatoires et auto-immunes.

Organisation : Jean-François NICOLAS
Inserm U. 80 et Université Claude Bernard Lyon I
Adresse : SÉMINAIRE D'IMMUNODERMATOLOGIE/SIV
Inserm U. 80, 7^e Étage, Faculté Laennec, 69372 Lyon Cedex, France.
Secrétariat : Mme Rose Doroumian
Renseignements : Tél. : +33 4 72 11 01 71 - Fax : +33 4 78 77 87 70
E-mail : jfnicola@cimac-res.univ-lyon.fr
Internet : <http://laennec1.univ-lyon1.fr> (actualisation du programme)

Erratum

Dans le numéro de novembre 1996, n° 11, vol. 12, p. 1269, plusieurs erreurs doivent être corrigées dans la nouvelle par Armin Ruf, Josiane Ménissier-de Murcia, Georg Schulz, Gilbert de Murcia :
Titre : « Poly (ADP-ribose) polymérase : la structure cristallographique permettra-t-elle de développer de nouveaux médicaments antitumoraux ? »
Shall, et al. : lire Brighton et non Birmingham based excision repair: lire base excision repair
Nous prions les auteurs et les lecteurs de bien vouloir nous excuser.