

50376
1979
11

N° d'Ordre : 758

50376
1979
11

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

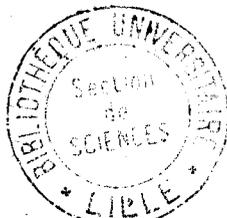
pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE TROISIÈME CYCLE

Spécialité : Biochimie

par

Jean-Luc LAÏ



ÉTUDE MORPHOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE DU CHROMOSOME MÉTAPHASIQUE HUMAIN

Soutenue le 25 Septembre 1979, devant la COMMISSION D'EXAMEN

Membres du Jury : MM. J. MONTREUIL, Président
M. DEMINATTI, Rapporteur
P. SAUTIERE, Examineur
J. KREMBEL, Examineur

DOYENS HONORAIRES De l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R.DEFRETIN, H.LEFEBVRE, M.PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit
et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P.GERMAIN, GLACET, GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOUGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARO, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R.DEFRETIN, M.PARREAU, J.LOMBARD.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. M.MIGEON.

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique
M. DERCOURT Jean	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique

M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEBRUN André	Electronique
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie
M. LINDER Robert	Biologie et Physiologie Végétales
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. PAQUET Jacques	Géologie Générale
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie Végétale
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
Mme DACHARRY Monique	Géographie
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M. JOURNAL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MAIZIERES Christian	Automatique
Mle MARQUET Simone	Probabilités
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. RACZY Ladislav	Electronique
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. SLIWA Henri	Chimie Organique
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale

MAITRES DE CONFERENCES (et Chargés d'Enseignement)

M. AL FAKIR Sabah	Algèbre
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie Animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BOBE Bernard	Sciences Economiques
M. BONNELLE Jean-Pierre	Chimie
M. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COQUERY Jean-Marie	Psychophysologie
M. COURBIS Bernard	Sciences Economiques
M. COUTURIER Daniel	Chimie Organique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie Animale
M. DE PARIS Jean-Claude	Mathématiques
M. DHAINAUT André	Biologie Animale
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M. DUBOIS Henri	Physique
M. DUBRULLE Alain	Physique
M. DUEE Gérard	Géologie
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M. FLAMME Jean-Marie	Technologie de Construction
M. FONTAINE Hubert	Physique
M. GAMBLIN André	Géographie
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GREVET Patrick	Sciences Economiques
M. JACOB Gérard	Informatique
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT François	Automatique
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
M. LEVASSEUR Michel	Sciences Economiques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. MACKE Bruno	Physique
M. MIGNOT Fulbert	Analyse Numérique
M. N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. PARSY Fernand	Mécanique
Mlle PAUPARDIN Colette	Biologie Physiologie Végétales
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M. PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M. POVY Lucien	Automatique
M. RICHARD Alain	Biologie
M. RIETSCH François	Chimie
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean-Claude	Psychophysologie
M. SALAMA Pierre	Sciences Economiques
Mme SCHWARZBACH Yvette	Mathématiques
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SOMME Jean	Géographie

Mle SPIK Geneviève
M. STERBOUL François
M. TAILLIEZ Roger
M. TOULOTTE Jean-Marc
M. TREANTON Jean-René
M. VANDORPE Bernard
M. WALLART Francis
Mme ZINN-JUSTIN Nicole

Biochimie
Informatique
Biologie
Automatique
Sociologie
Chimie Minérale
Chimie
Algèbre

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Cytogénétique
de la Faculté de Médecine de Lille, sous la direction du
Professeur M. DEMINATTI.

Remerciements :

Nous remercions Monsieur le Professeur M. DEMINATTI, d'avoir accepté de diriger ce travail.

Nous remercions aussi Monsieur C. LAGROU, de l'Institut de Virologie, qui nous a fourni la souche de cellules KB.

Nous remercions Messieurs P. SAUTIERE et J.P. KERCKAERT, ainsi que Monsieur G. BISERTE pour leurs précieux conseils et interprétations de nos résultats.

TABLE DES MATIERES

	Pages
HISTORIQUE	2
PREAMBULE	3
INTRODUCTION	5
A/ Méthodes d'approche	6
1. Techniques cytologiques et cytochimiques ...	6
a) Méthodes optiques	6
1) Coloration	6
2) Méthodes d'identification	7
3) Incorporation d'analogues structu- raux	9
4) Méthodes immunologiques	10
b) Méthodes électroniques et physiques ...	11
1) La fibre chromosomique	11
2) Les nucléosomes	14
2. Méthodes biochimiques	15
a) Chromatine interphasique	15
1) Préparations	16
2) Composition	16
b) Chromosome métaphasique	20
3. Méthodes fonctionnelles et expérimentales ..	22
4. Modifications physiologiques du chromosome..	22
B/ Résultats	23
1. Schémas proposés pour la chromatine	23
2. Schémas proposés pour le chromosome	24
C/ Notre objectif	26

MATERIEL ET METHODES	27
1/ Cultures	28
a) Cultures de sang périphérique	28
b) Cultures de cellules KB	28
1) Culture en nappe	29
2) Culture en suspension	30
2/ Incorporation de 5 Br dU	30
3/ Isolement de chromosomes à pH acide	30
4/ Isolement de chromosomes à pH basique	34
5/ Contrôles morphologiques	36
a) A partir de cultures de sang	36
b) A partir de cellules KB	36
c) A partir de chromosomes isolés	36
d) Dénaturations thermiques	37
e) Colorations	37
1) Coloration courante	37
2) Coloration après dénaturation thermique.	38
3) Coloration à la "quinacrine moutarde"...	38
4) Coloration après incorporation de 5 BrdU	39
- mise en évidence après dénaturation	
thermique	39
- mise en évidence par la technique de	
fluorescence	39
f) Contrôles en microscopie électronique	40
6/ Dosages biochimiques	41
7/ Extraction des protéines acido-solubles	44
8/ Electrophorèse en gel de polyacrylamide	46
RESULTATS	47
A/ Résultats cytologiques	48
1. Observations en microscopie optique	48
a) Chromosomes métaphasiques "in situ"	48
b) Influence de la dénaturation saline sur	
le chromosome "in situ" : observation	
des bandes G	49

c) Isolement de chromosomes métaphasiques.	50
d) Incorporation de 5 Br dU : mise en évidence par les techniques de coloration.	52
e) Aspect des chromosomes ayant incorporé la 5 Br dU puis traités pour l'observation des bandes G et Q	54
2. Observations en microscopie électronique ...	54
a) Observation du chromosome "in situ" : examen de cellules entières dans le milieu hypotonique	55
b) Observation de chromosomes isolés et purifiés à pH acide	55
c) Observation de chromosomes isolés et purifiés à pH acide après incorporation de 5 Br dU	56
d) Examen de chromosomes purifiés et isolés à pH basique	57
B/ Résultats biochimiques	58
1. Dosage des constituants des chromosomes isolés à pH acide	58
2. Etude des protéines acido-solubles	60
a) Chromosomes ou noyaux isolés à pH acide	60
b) Chromosomes ou noyaux isolés à pH basique	61
c) Chromosomes ou noyaux isolés à pH acide après incorporation de 5 Br dU	62
Conclusions	62
DISCUSSION	63
1/ Technique d'isolement	64
2/ Fixation	65
3/ Modifications du chromosome	66
a) Phénomène de "banding"	66
b) Incorporation de 5 Br dU	69
4/ Observation de chromosomes en microscopie électronique	72
5/ Apport des études biochimiques	74

CONCLUSION 77

BIBLIOGRAPHIE 81

Liste des publications pour la soutenance de Thèse de Troisième Cycle

- Technique d'isolement et de purification de chromosomes métaphasiques de cellules KB.
Par M. DEMINATTI, J.L. LAI, X. DESBIENS et N. JACQUELOOT
(1975), C.R. Soc. Biol., 169, n° 4, 981.

- Le chromosome métaphasique : Etude morphologique et biochimique.
Par M. DEMINATTI, X. DESBIENS, J.L. LAI et N. JACQUELOOT
(1975), Lille Méd., 20, 5, 494-501.

- Etude cytologique comparée des chromosomes métaphasiques "in situ" et isolés à partir de cellules KB après incorporation de 5 - Bromodésoxy - uridine (5 Br DU).
Par M. DEMINATTI, J.B. SAVARY et J.L. LAI
(1976), Ann. Genet., 19, n° 2, 91-94.

- Etude des protéines acido-solubles de chromosomes métaphasiques isolés de cellules KB, avant et après incorporation de 5 - Bromodésoxy - uridine (5 Br DU).
Par J.L. LAI et M. DEMINATTI.
(1977), Ann. Genet., 20, n° 1, 25-29.

Nous avons en outre collaboré à d'autres travaux :

- Trisomie partielle 12 et 8 en mosaïque, avec translocation t (8 ; 12) (p 21 ; q 13).
J.B. SAVARY, J. COUSIN, J.L. LAI et M. DEMINATTI.
(1977). Ann. Genet., 20, n° 2, 122-127.

HISTORIQUE

La première description des chromosomes date de cent ans environ, en 1882, FLEMMING le premier décrit le chromosome. Puis, en 1903, BOVERI montra que c'est au stade métaphase que le chromosome se présentait sous une forme plus condensée, mais la confusion était totale quant au nombre de chromosomes chez l'Homme. Il a fallu attendre les cultures de tissus humains pour mieux visualiser ces chromosomes.

Ce n'est qu'en 1956 que TJIO et LEVAN, utilisant la culture des tissus et surtout le choc hypotonique, fixèrent à 46 le nombre exact de chromosomes chez l'Homme. Cette mise au point technique montre les chromosomes métaphasiques dispersés dans le cytoplasme et formés chacun de deux chromatides réunies au niveau du centromère.

Puis, trois ans plus tard, l'étude des aberrations chromosomiques dans l'espèce humaine s'imposa après la découverte par LEJEUNE et coll, en 1956, de la première anomalie autosomique de nombre ; la trisomie 21 libre, responsable du mongolisme. FORD, la même année, montre la première anomalie gonosomique correspondant au syndrome de Turner : le 45 X 0.

A partir de là, il est possible de trouver une relation entre le caryotype d'un individu et le phénotype, le déséquilibre génique entraînant des anomalies phénotypiques. Les grands syndromes humains, en rapport avec une aberration chromosomique sont découverts : trisomies autosomiques, gonosomiques ou haplosomie de l'X et aussi des anomalies structurales. Se posent alors les problèmes du fonctionnement et de la structure du chromosome ainsi que les problèmes de la mécanique chromosomique.

PRÉAMBULE

- DEFINITION DYNAMIQUE DU CHROMOSOME

C'est un organite intracellulaire présent dans toute cellule nucléée. Dans les cellules interphasiques, les chromosomes ne sont pas individualisables et représentent la chromatine nucléaire. Au cours du cycle cellulaire, des modifications physiologiques transforment ce matériel en entités individualisables : les chromosomes métaphasiques, de nombre et de morphologie constante pour une espèce donnée. Ce matériel nucléaire représente le support de l'hérédité par l'intermédiaire des gènes répartis tout au long des chromosomes.

La morphologie et la composition biochimique intimes de ce chromosome ont fait l'objet de nombreuses investigations. Pourtant, nos connaissances sur la structure chromosomique se résument à quelques hypothèses bien incomplètes. Le plus souvent, les données ultrastructurales, biophysiques et chimiques ne présentent pas la complémentarité souhaitée. Plus importante encore est la discordance entre la structure hypothétique et la "physiologie" du chromosome.

- POSITION DES PROBLEMES :

Les schémas proposés doivent en effet être en accord avec les propriétés fondamentales du chromosome :

- . Pérennité de sa structure à travers les étapes des cycles cellulaires mitotiques ou méiotiques avec disparition lors de l'interphase sous forme de chromatine, morphologies variées lors de la méiose et de la mitose.
- . Mobilité lors de la méiose et de la mitose.
- . Constance de la position des gènes le long du chromosome.
- . Formation de deux chromatides résultant de la replication de l'ADN* per-

* ADN : acide désoxyribonucléique
DNA dans la littérature anglosaxone.

mettant les divisions cellulaires.

- . Variation de son activité métabolique au cours des cycles cellulaires : phases G₁, S, G₂ et mitose.
- . Possibilités d'accidents structuraux : translocation, délétions, formations annulaires,

INTRODUCTION

Pour aborder les problèmes concernant la structure du chromosome, il existe de nombreuses méthodes d'approche qui ont permis de préciser certains éléments structuraux à partir desquels peuvent découler certaines hypothèses de structure du chromosome métaphasique.

A. MÉTHODES D'APPROCHE

Ces méthodes, nombreuses, peuvent être regroupées en :

- méthodes cytologiques et cytochimiques,
- méthodes biochimiques et physiques,
- méthodes fonctionnelles.

1. TECHNIQUES CYTOLOGIQUES ET CYTOCHIMIQUES

a/ MÉTHODES OPTIQUES

1) Coloration

Les techniques de coloration cytochimiques sont variées : parmi les plus courantes, nous trouvons la coloration de FEULGEN (54). Cette méthode comprend une hydrolyse acide modérée séparant la guanine de l'adénine de l'ADN spécifiquement et quantitativement, laissant un corps privé de bases puriques appelé acide apurinique, celui-ci donnant une réaction positive avec le réactif de Schiff. Ce colorant, utilisé très souvent en histochimie, colore en rose pâle le chromosome après fixation.

Il est possible de colorer les histones du chromosome ; ALFERT et GESCHWIN (4) en 1953 décrivent une méthode dans laquelle les groupements basiques des chaînes polypeptidiques des histones peuvent se lier à

des colorants acides à pH élevé, c'est la coloration au Fast Green (FCF pH 8). Mais les acides nucléiques entrent en compétition pour la capture du colorant, d'où un prétraitement à l'A.T.C.A.* à 5 % pour extraire les acides nucléiques. Les protéines sont colorées en vert.

Actuellement, c'est la coloration au GIEMSA dans un tampon phosphaté à un pH voisin de 6,8 qui est la plus couramment employée. Ce colorant, de composition très complexe, Bleu de méthylène, Azur A, Azur B, Azur C sous forme de cation et d'éosine sous forme anionique, colore spécifiquement en violet les chromosomes ou les noyaux par fixation au niveau des groupements phosphates de la chaîne d'ADN.

2) Méthodes d'identification

Des techniques récentes permettent une identification beaucoup plus fine des chromosomes, car les seuls critères employés jusqu'alors pour la classification des chromosomes de l'espèce humaine étaient :

- la taille du chromosome,
- la position du centromère.

A partir des différentes techniques de dénaturation décrites et utilisées, les chromosomes, après traitement et coloration au GIEMSA, présentent une succession de bandes transversales claires et sombres dont le nombre et la répartition sont caractéristiques d'une paire de chromosomes homologues d'où l'intérêt pour la classification.

Différents traitements et colorants appliqués aux préparations permettent d'identifier des bandes transversales colorées ou fluorescentes aux ultra-violets, de localisations différentes mais spécifiques du prétraitement. Elles sont appelées bandes G, Q, C et R.

L'incubation dans une solution saline à 60° C permet l'apparition sur les chromosomes, après coloration au GIEMSA, d'une alternance de bandes sombres ou bandes G+ et de bandes claires ou bandes G-. (SUMNER et coll.

* A.C.T.A. : Acide trichloracétique.

(155), SCHNEDL (142), RIDLER (126), et DRETS et coll (42)). Il est possible d'obtenir ces mêmes bandes par digestion enzymatique (55).

CASPERSSON et coll. (25) ont établi la carte cytologique des chromosomes par fluorescence, sans traitement préalable, l'agent fluorescent employé étant la quinacrine qui permet l'obtention de bandes Q. L'observation se fait ensuite au microscope à U.V. Il est possible de supprimer le "banding" Q par montage dans des solvants organiques (157).

FINAZ C. et DE GROUCHY J. (55), WANGH C. et FEDOROFF S. (171), EVANS H.J. et coll (53), comparent la répartition des bandes G obtenues après dénaturation en solution saline ou par digestion enzymatique, avec celle des bandes Q ; les résultats obtenus par ces techniques sont pratiquement superposables (Fig. 1a). En effet, la répartition du colorant (Giemsa), après traitement, sur le chromosome est la même qu'après coloration à la quinacrine (Fig. 1b). On note quelques exceptions, surtout au niveau du chromosome Y fortement coloré à la quinacrine ou à l'atébrine.

On peut obtenir une coloration spécifique des centromères et des constriction secondaires après dénaturation alcaline, techniques décrites par PARDUE et GALL en 1970 (117) et ARRIGHI et HSU en 1971 (6). Les bandes colorées sont appelées bandes C ou bandes centromériques mettant en évidence ce qu'on appelle l'ADN satellite ou hétérochromatine sur les chromosomes. L'urée en solution tamponnée induit aussi l'apparition, au niveau des centromères et constriction secondaires, des bandes de type C, SHIRAISHI et YOSIDA (146).

Il est possible d'observer un marquage chromosomique de type R par dénaturation thermique dans une solution saline de Earle à 87°C, phénomène décrit par DUTRILLAUX et LEJEUNE (45), ce marquage étant inverse du marquage de type G. Ces bandes sont dites "réverses" (Bandes R).

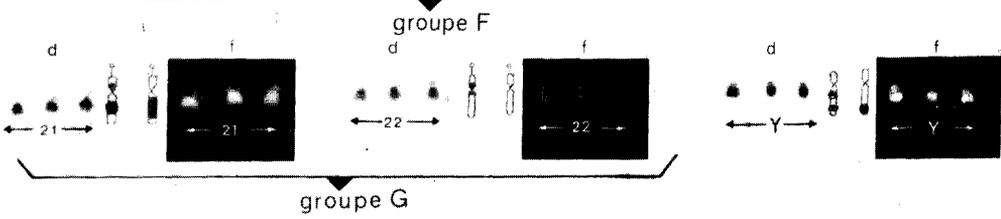
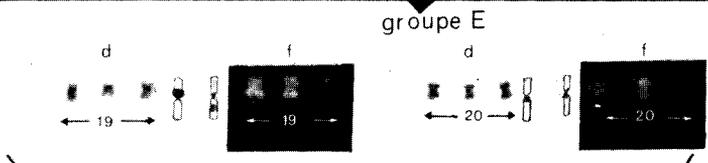
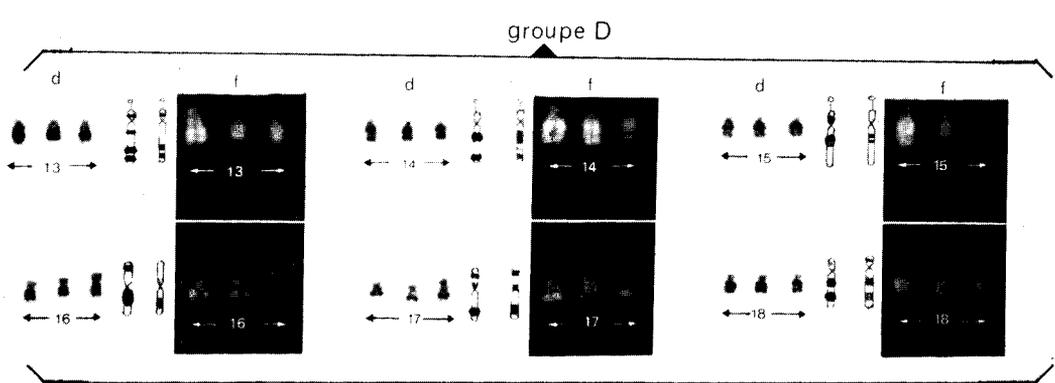
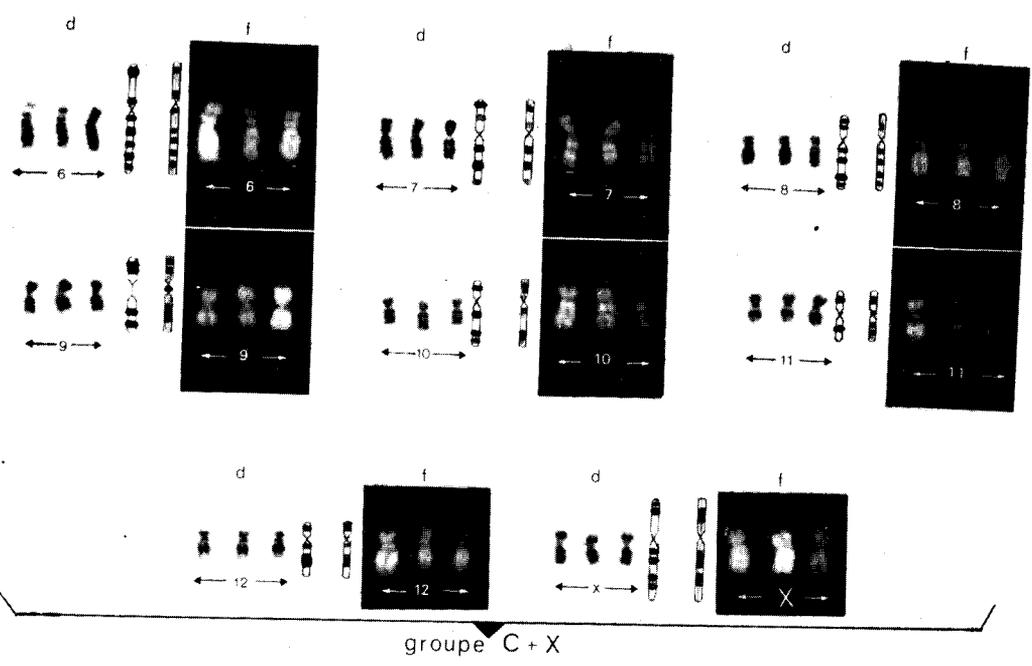
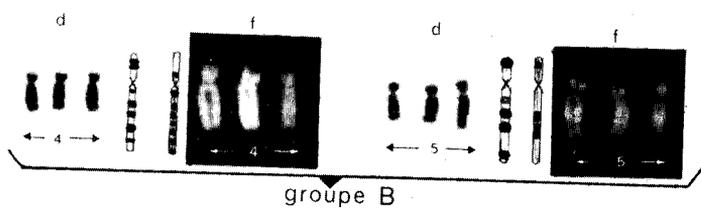
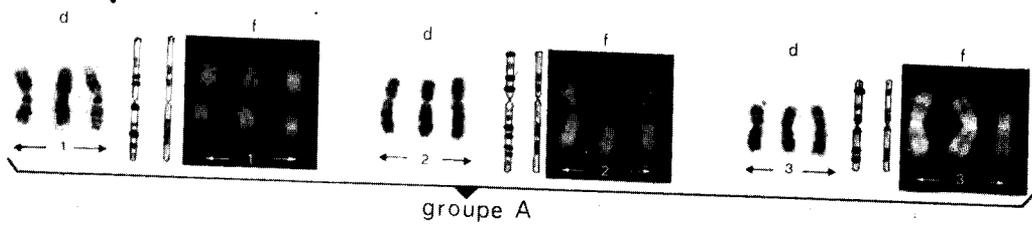
On remarque donc que de très nombreuses techniques d'étude permettent une analyse morphologique et cytologique des chromosomes métaphasiques qui apparaissent hétérogènes. Du fait de la multiplicité des résultats obtenus, la conférence de Paris, 1971*, a permis de poser les princi-

* PARIS CONFERENCE (1971) : Standardization in human cytogenetics. Original art., Ser. VIII, n° 7. The National Foundation, New-York.

Fig. 1a :

Identification chromosomique et dénaturation dans le 2 x SSC des chromosomes humains.

La répartition des bandes QM + et Giemsa + est identique (36).



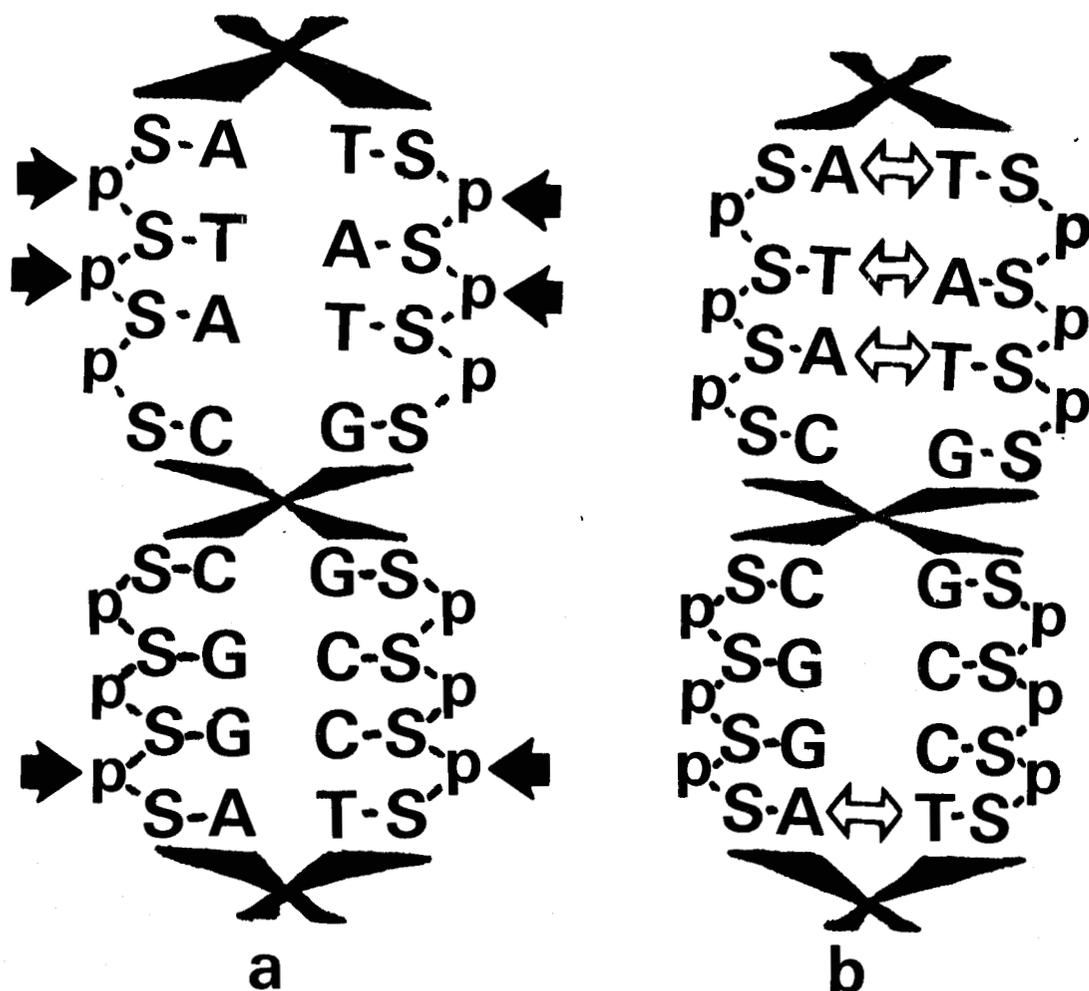


Fig. 1b :

Schéma hypothétique sur le mécanisme de fixation des colorants : GIEMSA (a) et "quinacrine moutarde" (b) pour l'observation des bandes G et Q (96)

A : Adénine
T : Thymine
C : Cytosine
G : Guanine

S : désoxyribose
P : acide phosphorique
➔ : Giemsa
↔ : quinacrine

Le Giemsa se fixe sur les groupements phosphates de la chaîne d'ADN au niveau des régions riches en Adénine Thymine, tandis que la "quinacrine" se fixe entre les bases Adénine - thymine.

pes de base de la nomenclature. Nous avons appliqué les techniques des bandes G et Q, au Laboratoire (36) ; la figure 1a illustre les résultats obtenus.

3) Incorporation d'analogues structuraux

L'étude structurale peut être également réalisée après incorporation par le chromosome d'analogues structuraux des bases puriques et pyrimidiques. En présence de 5 Br dU*, analogue structural de la thymidine, on constate l'incorporation de cet analogue lors de la réplication de l'ADN chromosomique, la 5 Br dU prenant la place de la thymidine.

De nombreux travaux mettent en évidence l'incorporation de 5 Br dU dans les chaînes d'ADN chromosomique, ainsi que les perturbations occasionnées. ZAKHAROV et EGOLINA (182), après incorporation de 5 Br DU montrent l'existence d'une affinité tinctoriale différente entre les deux chromatides d'un même chromosome lorsque les préparations cytologiques sont colorées au Giemsa. On remarque alors qu'une chromatide va fixer fortement le colorant tandis que l'autre apparaît pâle. LATT (91) décrit le même phénomène après coloration par un fluorochrome, l'acridine orange ; une chromatide étant fortement fluorescente, tandis que l'autre ne l'est pas. Après coloration par l'acridine orange et exposition en lumière ultraviolette, DUTRILLAUX et coll. (46) signalent un marquage des chromosomes sous forme de bandes de type R.

A côté de ces variations tinctoriales, des modifications structurales peuvent être observées au niveau des chromosomes. Après incorporation de 5 Br DU, on note une augmentation de fréquence des cassures chromosomiques, un allongement des régions centromériques et des constriction secondaires signalées par PALMER (115), HSU et SOMERS (74). Lorsque ce précurseur est ajouté, quelques heures avant l'arrêt de la culture cellulaire, ZAKHAROV et coll (182) (183) mettent en évidence au niveau des chromatides soeurs des chromosomes, des variations de condensation symétriques, qui apparaissent sous forme de bandes sombres et claires après coloration à l'azur-éosine. Celles-ci correspondent vraisemblablement à un retard de

* 5 Br dU : 5 Bromodésoxyuridine.

condensation des segments qui effectuent tardivement leur réplication d'ADN (47). Cette modification est fugace car elle n'apparaît plus quand on prolonge le traitement. L'incorporation de 5 Br dU pendant plusieurs cycles de division fait apparaître au niveau des chromosomes des variations de taille entre les chromatides soeurs, LATT (91) et ZAKHAROV (182). La chromatide qui fixe fortement le colorant apparaît plus courte que la chromatide qui reste pâle et l'on constate des échanges de portions chromosomiques (46) (119) (91) (182).

Les variations morphologiques et cytologiques observées en substituant la thymidine de l'ADN par la 5 Br dU laissent donc sous-entendre, d'une part l'induction par la 5 Br dU de modifications structurales au niveau des chromosomes. D'autre part, il est plus difficile de mettre en évidence soit une modification éventuelle des protéines chromosomiques due à l'incorporation du précurseur dans l'ADN du chromosome, soit une mauvaise association entre ces protéines, modifiées ou non, et l'ADN ayant incorporé la 5 Br dU, pour expliquer les modifications tinctoriales observées.

4) Méthodes immunologiques

L'immunologie a permis aussi d'obtenir des informations sur la structure du chromosome. Des auteurs comme DEV et coll (39), MILLER et coll (106) ont observé des bandes fluorescentes le long du chromosome en utilisant des anticorps antinucléosides spécifiques (anti A, G, C, T)*. Ceux-ci réagissent sur des chromosomes dénaturés (2 x SSC** avec formaldéhyde), de manière à obtenir une chaîne simple d'ADN. Ces auteurs parviennent à obtenir des bandes comparables à celles obtenues après coloration par la quinacrine moutarde (26), ou le Giemsa (144) après traitement à la trypsine ou le 2 x SSC**. Les anti A et T mettent en évidence les régions riches en Adénine-Thymine correspondant aux bandes Q ou bandes G, tandis que les anti G et C correspondent aux bandes réverses R décrites par DUTRILLAUX et LEJEUNE (45). Ces méthodes permettent de déterminer les régions du chromosome suivant la composition en base mais ne donnent au-

* A = adénine, T = thymidine, G = guanine, C = Cytosine.

** 2 x SSC = Sodium Saline Citrate.

cune information sur les protéines.

D'autres auteurs, DESAI et coll (38) ont utilisé le fait que certaines histones f1 (H1) et f3 (H3) possédaient des propriétés antigéniques (154). Ils ont pu obtenir des bandes fluorescentes dans certaines régions du chromosome polyténique de *Drosophile* ou du noyau interphasique (87).

Enfin, SILVER et ELGIN en 1978 (147), toujours à partir de chromosomes polyténiques de *Drosophile*, en utilisant des anticorps anti-non-histone, fluorescents, mettent en évidence une répartition en bandes fluorescentes le long du chromosome.

En conclusion, on peut dire que les techniques d'immunofluorescence, en utilisant des anticorps hautement spécifiques de certains nucléotides ou nucléoprotéines, peuvent contribuer à l'analyse de la structure et de la fonction du chromosome. Celles-ci mettent en évidence des variations de composition en bases, histones et même non histones, ce qui n'est pas sans rappeler les observations cytologiques : bandes claires et bandes sombres, et conduisent à admettre une hétérogénéité longitudinale de la composition et de la structure des chromosomes.

b/ METHODES ELECTRONIQUES :

1) La fibre chromosomique

Les premiers résultats sont obtenus à partir de coupes ultrafines qui ont l'avantage de fixer le matériel "in situ" évitant ainsi un éventuel prétraitement. On préserve ainsi la structure de la fibrille. Les images de coupes obtenues montrent la constitution fibrillaire du chromosome mitotique ou méiotique : (RIS (128), GRASSE et coll (68), KAUFMAN et M.C. DONALD (82), WOLFE et GRIM (175), ZIRKIN et WOLFE (184) et SOLARI (150)).

Les fibrilles observées ont une taille variant de 20 à 30 Å, jusqu'à 100 Å. La fibrille élémentaire, de 20 à 30 Å, peut être comparée à la double hélice de l'ADN qui a un diamètre de 22 Å, mais il reste difficile d'affirmer que cette fibrille représente la molécule d'ADN nue associée aux protéines. Néanmoins, LAMPERT et LAMPERT (88) suggèrent que cette fibre de 30 Å représente la fibre d'ADN associée aux protéines basiques, qui par repliements successifs se transforme en une fibrille plus épaisse de 70 à 100 Å.

La modification de la technique de KLEINSCHMIDT (83) par GALL (59) permet de visualiser la chromatine interphasique et aussi le chromosome métaphasique dans leur ensemble. Le principe de cette technique est de provoquer la rupture des membranes cellulaires au contact d'une surface liquide ; la chromatine ou les chromosomes ainsi libérés peuvent être recueillis directement sur une grille, et déshydratés par la technique du point critique d'ANDERSON (5) et enfin observés "in toto".

Tous les auteurs [GALL (59), DUPRAW (43), WOLFE (174), WOLFE et GRIM (175), BARNICOT (10), WOLFE et MARTIN (176), ABUELO et MOORE (1), DUPRAW et BAHR (44), BAHR (7), LAMPERT (90), MOURIQUAND (108) et coll] décrivent les mêmes fibres, d'environ 250 Å qui sont agencées en filets pour la chromatine ou pelotonnées en écheveaux très serrés pour les chromosomes. Dans ce dernier cas, les fibres connectent les chromatides soeurs, d'autres semblent sortir du chromosome, celui-ci paraissant emprisonné dans un réseau de fibres interchromosomiques relié aux pores de l'enveloppe nucléaire, COMINGS et OKADA (30), LAMPERT (90). Cet aspect désorganisé a été confirmé depuis par la technique de microscope à balayage: GOLOMB et BAHR (64) suivent l'évolution de la fibre chromosomique de l'interphase à la métaphase.

TANAKA (159) constate que cette fibre est capable de s'enrouler plusieurs fois sur elle même, augmentant ainsi son diamètre, et confirme les observations de BASTIA (11).

On retrouve donc plusieurs théories, quant à la disposition de la fibre d'ADN dans la fibre de chromatine et des différents types de spira-

lisation de cette fibre unitaire pour obtenir un chromosome métaphasique.

Suivant BÄHR (7), la chromatine contient une fibre chromatiniene de 20 Å qui décrit des spires de troisieme ordre pour obtenir la fibre de chromatine avec un diametre de 250 Å.

Pour DUPRAW (44), la chromatide contient comme précédemment une seule fibre de chromatine de 250 Å de diametre, repliée sur elle même, dont la disposition serait caractéristique de chaque chromosome.

Suivant ces deux hypothèses, la fibre de chromatine est le seul constituant du chromosome. Le chromosome métaphasique ne contiendrait qu'une fibre d'ADN par chromatide, l'unité chromosomique ne serait qu'une simple fibre nucléoprotéique qui correspond à une hélice de WATSON et CRICK.

Cette hélice d'ADN est enrobée dans les polypeptides et s'enroule ensuite sur elle même plusieurs fois pour former une fibre de 250 Å.

RUZICKA (130) (132) a utilisé plusieurs méthodes pour étudier les fibrilles, éléments principaux du chromosome :

- coupes ultrafines,
- méthode du point critique.

Il constate l'existence de fibres de 20 à 40 Å, de 100 Å et 250 Å et même des fibres de 500 à 1 000 Å.

Il lui a été possible d'observer des chromosomes dénaturés par des solutions salines (131). Ceux-ci montrent toujours des fibrilles bien visibles, mais au niveau des bandes G positives, on remarque des fibrilles épaisses de 1 000 Å environ, les boucles denses de fibrille s'arrangent en paquets dans ces régions, l'observation du centromère montrant des fibres parallèles. BURKHOLDER (19) obtient des résultats identiques sur des chromosomes traités à la trypsine après coloration à l'acétate d'uranyle. Néanmoins, ces zones épaisses préexistent même sans traitement.

Quelles que soient les hypothèses de structure et d'arrangement des fibrilles constituant la chromatine et permettant le passage au chromosome, il existe une fibrille élémentaire de nature nucléoprotéique qui a une taille de 25 à 40 Å qui ne doit contenir qu'une double hélice d'ADN

(20 Å de diamètre) et non pas plusieurs. C'est cette fibrille qui donnera la fibre chromatidienne de diamètre 250 Å observée le plus habituellement par la méthode d'ANDERSON (5) (121).

2) Les nucléosomes

Toujours dans le domaine de la microscopie électronique, il a été montré que la fibre unitaire de chromatine était sensible à l'attaque des nucléases. La dégradation de la chromatine par des endonucléases (28) (110) (135) a permis de progresser dans la connaissance de la structure de ce système.

En effet, une partie seulement de l'ADN est dégradée par les endonucléases, l'autre partie étant protégée car elle n'est pas accessible à ces enzymes. Dans tous les cas, la digestion de la chromatine donne naissance à des fragments contenant à la fois de l'ADN et des histones. L'ADN privé d'histones est totalement dégradé par les nucléases.

Il a été possible d'observer ces fragments résistants à l'action enzymatique. Ils correspondent à des multiples d'une particule de base, et il semble donc que la chromatine soit constituée de particules élémentaires composées à la fois d'ADN et d'histones. Ces travaux sont confirmés par la microscopie électronique : ces particules sont appelées "bodies" par OLINS et OLINS (112) (113) ou nucléosomes par OUDET et coll (114). Elles donnent l'image d'un collier de perles, chaque perle représentant un body ou un nucléosome. Les auteurs se sont ensuite attachés à connaître la composition de ces particules. Pour OUDET et coll (114) qui ont travaillé sur de la chromatine d'érythrocyte de poulet, ces particules mesurent 128 ± 12 Å de diamètre et sont constituées de quatre histones H2A, H2B, H3 et H4, les histones H1 et H5 sont éliminées par des lavages dans NaCl 0,7 M ; l'ADN de ces particules est constitué de 200 paires de bases, tandis que pour OLINS et OLINS (112) (113) ou WOODCOCK (177), ces particules mesurent de 80 à 100 Å de diamètre et sont reliées entre elles par des fibrilles de 100 Å de longueur. Il faut signaler quand même que WOODCOCK (177) a trouvé des fragments d'ADN plus petits, dans les particules isolées, de 115 à 200 paires de bases. La composition en histones des nucléosomes est encore controversée.

Des résultats plus récents nous permettent maintenant d'avoir une idée plus précise encore sur la forme et les dimensions du nucléosome.

PARDON et coll (124) par analyse des diagrammes de diffraction des neutrons considèrent que les particules de chromatine ne peuvent avoir une forme sphérique. Les particules auraient une forme de disque (56) (164), de 100 Å de diamètre et de 55 Å d'épaisseur. FINCH et coll (56) par étude combinée, diffraction aux rayons X et microscopie électronique, fournissent une preuve directe en faveur de ce modèle.

Les "core particles" ont la forme de 100 Å sur 57 Å avec un profil ondulé. Le modèle consiste donc en un noyau protéique mal défini autour duquel est enroulé un tour deux tiers d'ADN avec un pas de 27 Å à l'extérieur du disque. Le diamètre de la molécule d'ADN est de 20 Å (14).

On peut donc dire que la microscopie électronique couplée aux méthodes physiques a permis de progresser dans l'étude de la fibre de chromatine ou du chromosome. A partir des images observées, il est possible d'imaginer plusieurs modèles de structure avec un arrangement entre la fibre d'ADN et les protéines. Les méthodes biochimiques ont permis de mieux connaître ces complexes ADN - protéines, notamment les interactions ADN - histones, car les interactions ADN - non histones sont encore mal connues.

2. METHODES BIOCHIMIQUES

a/ CHROMATINE INTERPHASIQUE

Chez les Eucaryotes, l'ADN, support de l'information génétique, ne se présente jamais seul dans le noyau, mais sous forme d'un complexe ADN protéines, l'ensemble constituant la "chromatine". Cette "chromatine" peut s'organiser, surtout par des spiralizations successives, en chromosome, dont la structure de base reste une fibre élémentaire de 200 Å.

Dans la chromatine, l'ADN est lié à des protéines basiques ou histones et à des protéines acides appelées aussi non-histones. Les histones sont riches en acides aminés basiques : Lysine, arginine, dont les charges positives permettent leur fixation sur les charges négatives des groupements phospho-

tes de l'ADN. Le rapport en poids des histones sur l'ADN est toujours voisin de 1 dans les organismes des Eucaryotes.

Si l'on exprime la composition moyenne de la chromatine en pourcentage de poids sec, on obtient les résultats suivants :

ADN	: 25 %
Histones	: 25 %
Protéines non histoniques	: 45 %
ARN	: 5 %.

1) Préparations de la chromatine

Les moyens les plus courants, pour préparer la chromatine utilisent des solutions salines et de l'urée (80) (81) :

Na Cl : de 0,1 M à 2 M

Urée : de 2 M à 8 M.

Autre moyen employé, la sonication des noyaux (33) purifiés.

En présence de solution saline tamponnée, Na Cl 0,35 M, il est possible de solubiliser la chromatine extraite des noyaux interphasiques. OUDET et coll (114) utilisent une solution de Na Cl 0,7 M, puis par un gradient discontinu de glycérol, ils mettent en évidence les nucléosomes.

2) Composition

On rencontre trois constituants principaux de la chromatine

l'ADN

les histones

les non-histones.

L'association des quatre histones H₂A, H₂B, H₃ et H₄ pour former des nucléosomes obéit à certaines règles.

Tout d'abord, il a été possible de reconstituer la chromatine à partir des constituants ADN-histone sauf pour l'histone H₁. OUDET et coll (114) ont pu reconstituer des nucléosomes à partir d'ADN et d'histones de thymus de veau, mais les longueurs des fibres reliant deux nucléosomes sont

plus grandes.

Mais même en l'absence d'ADN, les histones en solution s'associent fortement les unes aux autres. KORNBERG et THOMAS (85) en utilisant le diméthylsubérimate (agent de pontage entre protéines) démontrent que les histones H₄ et H₃ s'associent pour former un tétramère (H₄)₂(H₃)₂, tandis que les histones H_{2A} et H_{2B} forment des oligomères de tailles moins définies.

Les derniers résultats (163) permettent de mettre en évidence la formation d'octamères après traitement de la chromatine par le diméthylsubérimate, dont les caractéristiques sont compatibles avec la présence de deux copies de chacune des fractions H_{2A}, H_{2B}, H₃ et H₄.

La diffusion de neutron, méthode nouvelle d'analyse de la structure de la chromatine, a permis d'apporter d'autres précisions sur la structure de la chromatine.

Cette méthode utilise la différence de contraste que présentent les acides nucléiques et les protéines d'une part, l'eau légère (H₂O) et l'eau lourde (D₂O) d'autre part. Les premiers résultats de BALDWIN et coll (9) seraient en faveur d'un modèle où l'ADN serait enroulé autour des histones ; l'association des histones entre elles se ferait par leurs parties hydrophobes alors que les parties polaires chargées positivement interagiraient avec les groupements phosphates de l'ADN. L'histone H₁ se situerait à l'extérieur de ces unités multimériques et servirait de lien entre les sous-unités d'une même chaîne ou à deux chaînes différentes, car les résultats de diffraction ne sont pas modifiés de façon marquante après extraction de cette histone. Le schéma proposé par BALDWIN et coll (9) est comparable au schéma de BRAM et coll (16).

S'il est possible actuellement d'imaginer des schémas quant à la position des histones par rapport à la chaîne d'ADN, il est plus difficile de situer l'autre groupe de protéines appartenant aussi à la structure de la chromatine : les non-histones. Ces protéines font actuellement l'objet de nombreuses études et il semble nécessaire tout d'abord de les définir. Ce sont les protéines (en excluant les histones) qui sont extraites avec l'ADN à partir de chromatine purifiée. Elles sont différentes des protéines acides nucléaires et des phospho-protéines nucléaires.

Leur étude est difficile car elles ont tendance généralement à

former des agrégats avec l'ADN, les histones et autres protéines. De nombreux procédés d'extraction ont été décrits (12, 31, 65, 102, 138, 160, 161, 162, 168, 172, 173, 180), mais aucun de ceux-ci n'est valable pour obtenir une séparation complète de ces protéines entre l'ADN et les histones. En plus, des difficultés de préparation de ces protéines s'ajoutent des problèmes de solubilisation : il est généralement nécessaire d'utiliser du SDS* de 1 % à 10 % pour les solubiliser de manière à pouvoir les étudier en électrophorèse.

Les moyens les plus courants, employés pour les séparer de la chromatine sont les solutions salines :

Na Cl de 0,35 M à 2 M en présence ou non
d'urée 2 M à 5 M.

L'élimination de l'ADN peut s'effectuer soit par ultracentrifugation, soit par chromatographie sur hydroxylapatite ou par chromatographie sur échange d'ions. Ces classes de protéines sont à la fois plus complexes et différentes des histones. Elles sont riches en acides aminés acides Asp et Glu (170) avec un rapport résidus acides sur résidus basiques variant de 1,2 à 1,6 (52).

Leur poids moléculaire varie de 10 000 à plusieurs centaines de milliers de daltons, les points isoélectriques se situent entre 3,7 et 9.

Quant au rôle biologique de ces protéines, on décèle tout d'abord des activités enzymatiques. Les unes sont en rapport avec le métabolisme de l'ADN, polymérases d'acides nucléiques (ARN polymérase et ADN polymérase (73, 92, 165), les nucléases (ADN endonucléase) (167), ADN ligase (62) et DNase (111), d'autres sont liées au métabolisme des histones (61, 120).

A côté de ces enzymes, certaines protéines ont un rôle fonctionnel en agissant au niveau de la transcription, notamment au niveau de la régulation de l'expression des gènes (151, 152, 153). Des protéines non

* SDS : Sodium Dodécyl Sulfate.

histoniques interviennent dans le passage du stade inactif G_0 au stade actif G_1 en début d'interphase (51) (93). Il faut ensuite souligner la spécificité de ces protéines selon les espèces et les tissus (97), bien que des non-histones soient communes à différents tissus (58).

Une étude électrophorétique de ces protéines par COMINGS et TACK en 1973 (31) montre que celles-ci sont similaires aux stades interphasiques et métaphasiques et surtout que les quelques différences observées sont le résultat d'adsorption de protéines cytoplasmiques sur le chromosome pendant l'isolement. Il faut donc être très prudent vis-à-vis des résultats obtenus à partir des chromosomes isolés. Les protéines non-histoniques supplémentaires obtenues à partir des chromosomes métaphasiques peuvent être des impuretés cytoplasmiques et membranaires.

Des travaux récents décrivent des méthodes permettant de préparer des protéines non histoniques pures (66) (78), JOHNS met en évidence des protéines appelées HMG_1^* et HMG_2 qui interviendraient au niveau de la structure hélicoïdale de l'ADN (78).

Les propriétés antigéniques des protéines décrites par BUSCH et coll (21) permettront dans un avenir proche de localiser par immunologie dans la chromatine ou sur le chromosome métaphasique ces protéines non-histoniques. SILVER et ELGIN (147) montrent la distinction particulière de trois protéines non histoniques sur le chromosome.

Ces derniers travaux permettent de faire la transition entre les stades G_1 , S et G_2 de l'interphase et un autre stade bien particulier, le stade métaphasique du chromosome qui a l'avantage de visualiser la fibre unitaire de chromatine, répartie en organites cellulaires de nombre constant, de la rendre colorable et observable au microscope ordinaire comme au microscope électronique. Il devient alors possible d'associer l'étude biochimique à l'étude cytologique du chromosome.

* HMG : High Mobility Group.

b/ LE CHROMOSOME METAPHASIQUE

L'étude biochimique du chromosome humain passe tout d'abord par l'isolement de ce matériel.

De nombreux auteurs ont décrit des méthodes que l'on peut classer suivant le pH utilisé :

A pH acide, on retiendra les méthodes de CANTOR et HEARST (24) travaillant sur des cellules tumorales de souris, HUBERMAN et ATTARDI à partir de cellules Hela (75), SALZMAN et MENDELSON (136) sur des cellules de Hamster.

A pH neutre, MAIO et SCHILDKRAUT (103) à partir de cellules Hela et WRAY et STUBBLEFIELD (178) sur des cellules de hamster chinois.

A pH basique, la méthode de CORRY et COLE (34) et WRAY et STUBBLEFIELD (179).

Le pH ainsi que la présence d'ions bivalents (Mg, Ca) influent sur la structure et la conservation des chromosomes obtenus. Le chromosome isolé et purifié, c'est-à-dire débarrassé d'éléments cytoplasmiques ou membranaires, devient alors, si sa structure est conservée, un élément de choix pour l'étude de la composition biochimique de ce chromosome ainsi que l'étude des différents éléments constituant ce chromosome. Il devient possible de visualiser en microscopie optique ou électronique des manipulations pratiquées en tube.

Les auteurs se sont tout d'abord attachés à connaître la composition biochimique du chromosome. Notamment SADGOPAL et BONNER (133) (134) comparant les protéines du chromosome métaphasique et les protéines du noyau interphasique ne relèvent que des différences mineures.

L'étude comparée, par électrophorèse (51) (133) (134) (148), des fractions protéiques de noyaux interphasiques et de chromosomes métaphasiques montre, au niveau des protéines non histoniques de chromosomes métaphasiques de cellules Hela (31) (51) une modification quantitative de deux protéines de poids moléculaire 78 000 - 80 000 daltons au profit de deux autres protéines de 50 000 et 200 000 daltons par rapport aux protéines de noyaux interphasiques.

La séparation des chromosomes selon la taille en utilisant des gradients de densité a fait l'objet de nombreux travaux (103) (137) (148).

SKINNER et OCKEY (148) montrent que les petits chromosomes contenus dans la fraction supérieure du gradient contient un fort pourcentage de protéines et d'ARN par rapport aux chromosomes de grande taille et de taille moyenne. Les dosages ont toujours montré un pourcentage faible d'ARN celui-ci semble être du ARNr, 28 S et 18 S, ce qui fait penser que cet ARN ribosomal est en fait dû à des contaminations de ribosomes de débris cytoplasmiques (103) (136). En effet, WRAY et STUBBLEFIELD (178) décrivent une méthode permettant d'isoler des échantillons de chromosomes ne possédant pas d'ARN.

Parallèlement à ces observations, d'autres auteurs (33) (72) (79) (93) ont trouvé dans les chromosomes des non-histones de même mobilité électrophorétique que l'actine, la myosine et la tropomyosine. Une augmentation de la teneur en tropo-myosine et actine est observée au stade métaplasique. Il semble donc que ces filaments puissent avoir un rôle dans le mouvement et la condensation du chromosome.

ADOLPH et coll (2) (3), PAULSON et LAEMMLI (118) montrent que la stabilisation de la structure du chromosome est due à un petit nombre de non-histones appelées "Scaffolding proteins". En effet, à partir de chromatine débarrassée d'histones (en utilisant la compétition vis-à-vis des polyanions), ils montrent qu'un certain nombre de protéines non histoniques permettent de conserver la structure et la conformation de la chaîne d'ADN et par suite la structure du chromosome.

Le chromosome posséderait donc un squelette constitué de protéines non histoniques qui donne la forme du chromosome entouré d'un halo d'ADN dans lequel on retrouve peu de protéines. Cette matrice protéique, observée au microscope électronique, possède la même forme que le chromosome en métaphase, à partir de celui-ci on peut voir sortir des boucles d'ADN.

Cet ADN, chez les Eucaryotes doit être replié en boucles qui sont maintenues ensemble par des protéines non encore caractérisées.

3. METHODES FONCTIONNELLES ET EXPERIMENTALES

On peut voir dans le chromosome, en plus de l'aspect morphologique et biochimique, l'aspect fonctionnel. En effet, celui-ci possède de l'ADN fonctionnel susceptible de "fonctionner" "in vitro". A partir de chromosomes de larve de chironome (69), il a été possible de mettre en évidence par autoradiographie, en utilisant des produits radioactifs (UTP tritié) et des ARN polymérase, la synthèse d'ARN in vitro. L'intérêt de ces travaux est de visualiser au niveau des chromosomes des régions actives (qui synthétisent) et des régions inactives ou moins actives.

Les travaux actuels sont faits à partir de chromosomes de grande taille, de larve de chironome (69) ou de larve de diptères (145), ou de chromosomes de mammifères (29) (86). Les larves de chironome ou de diptère ont des chromosomes de grande taille, ce qui permet de localiser plus facilement les zones d'activité. Un nombre important de zones actives est observé, et l'on peut faire un rapprochement avec le "banding" observé à partir de ces mêmes chromosomes.

Ces techniques ont aussi l'avantage d'étudier les produits susceptibles d'inhiber la synthèse d'ARN (actinomycine D ou alpha amanitine) (145), et l'action éventuelle de protéines nucléaires sur la synthèse in vitro d'ARN.

En conclusion, si on possède beaucoup de données sur la structure de la chromatine, il reste beaucoup de points obscurs quant au fonctionnement du génome. Le contrôle de l'activité génique fait vraisemblablement intervenir des protéines chromosomales autres que les histones.

4. MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES DU CHROMOSOME

Alors que l'étude des cellules somatiques a fait l'objet de nombreux travaux, à l'inverse la morphologie et le comportement des chromoso-

mes de la lignée germinale chez l'Homme ont été très peu étudiés. Cette carence d'investigation est due à des difficultés techniques rencontrées dans le traitement de fragments biopsiques testiculaire ou ovarien. L'introduction du chlorure de potassium comme agent hypotonique (101) a permis des progrès techniques dans ce domaine. L'étude cytologique des différents stades de la méiose ; la morphologie et la structure des chromosomes méiotiques en microscopie est maintenant connue (99) (101) (101). Nous retiendrons le comportement particulier des chromosomes métaphasiques pendant les différents stades de la prophase de première division méiotique montre des bivalents, au nombre de 23 chez l'homme, chaque bivalent étant constitué de deux chromosomes homologues.

Enfin, au stade de métaphase de deuxième division méiotique, les chromosomes sont visibles et peuvent être identifiés de la même façon que les chromosomes somatiques, seul l'écartement des chromatides plus important entraîne une morphologie particulière.

Ces observations révèlent l'existence d'une unité structurale des chromosomes quels que soient les aspects morphologiques observés. La constriction secondaire du chromosome 9, observée au niveau des métaphases somatiques, se retrouve au niveau de tous les stades de la méiose malgré les différences morphologiques existantes (100).

B. RÉSULTATS

1. SCHEMAS PROPOSES POUR LA STRUCTURE DE LA FIBRE CHROMATINIENNE

Nous retiendrons les schémas proposés par THOMAS et KORNBERG (163) (Fig. 2), le modèle de BALDWIN et coll (9) (fig. 3) et le modèle de BRAM et coll (16) (fig. 4).

Les résultats apportés par la microscopie électronique sont en faveur du modèle de THOMAS et KORNBERG, notamment le fait que chaque particule isolée par OLINS (113) ou OUDET et coll (114) contient deux molécules de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4.

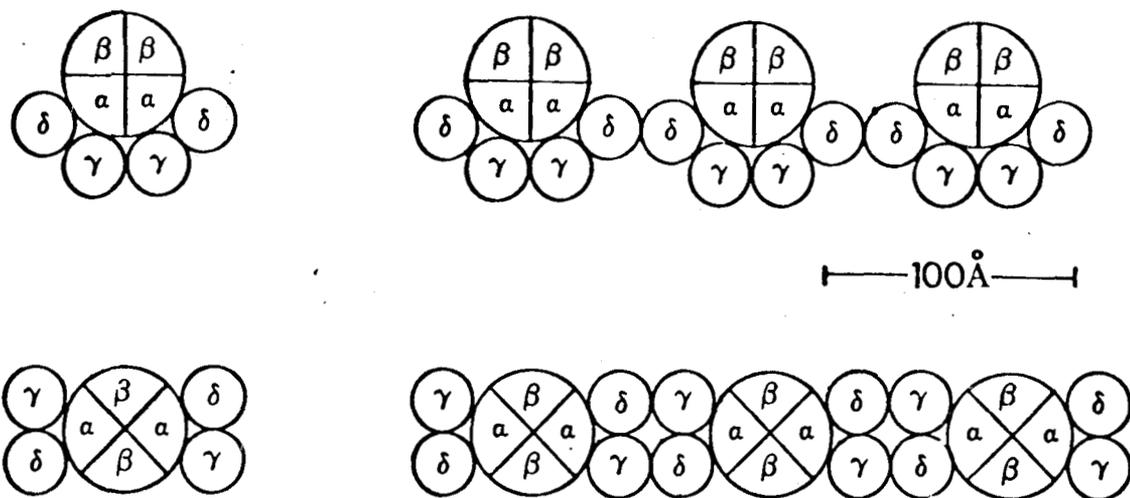


Fig. 2 :

Position des histones dans la chromatine selon THOMAS
et KORNBERG (163).
Répartition en octamères.

α β γ δ représentent respectivement H4, H3, H2A, H2B

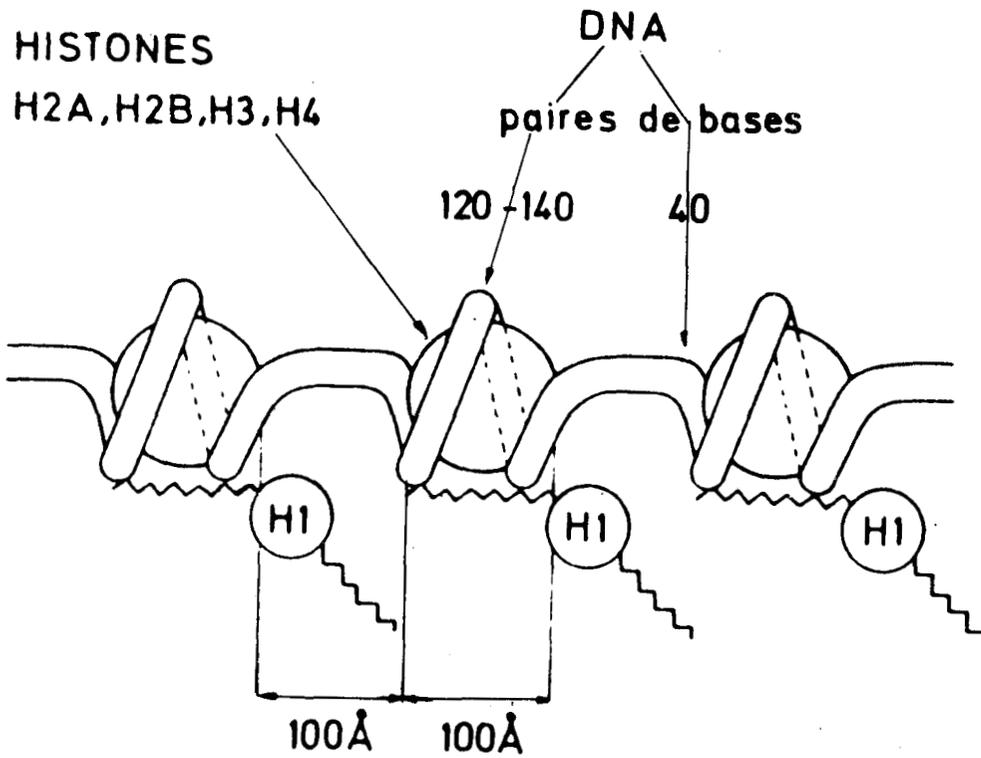


Fig. 3 :

Représentation schématique de l'organisation de la chromatine en sous unités selon BALDWIN et coll (9).

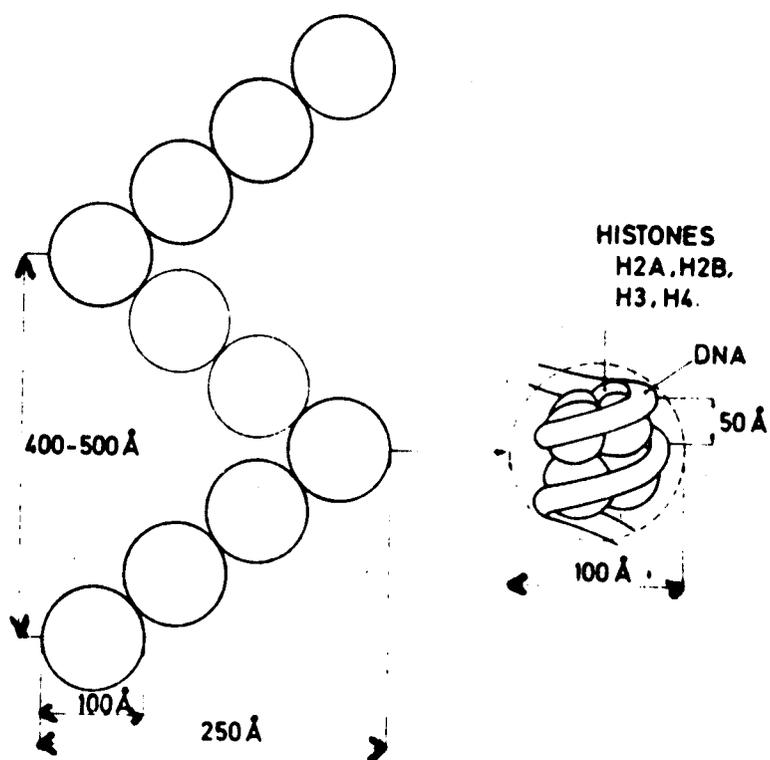


Fig. 4 :

Modèle structural de la chromatine en superhélice selon BRAM et coll (16).

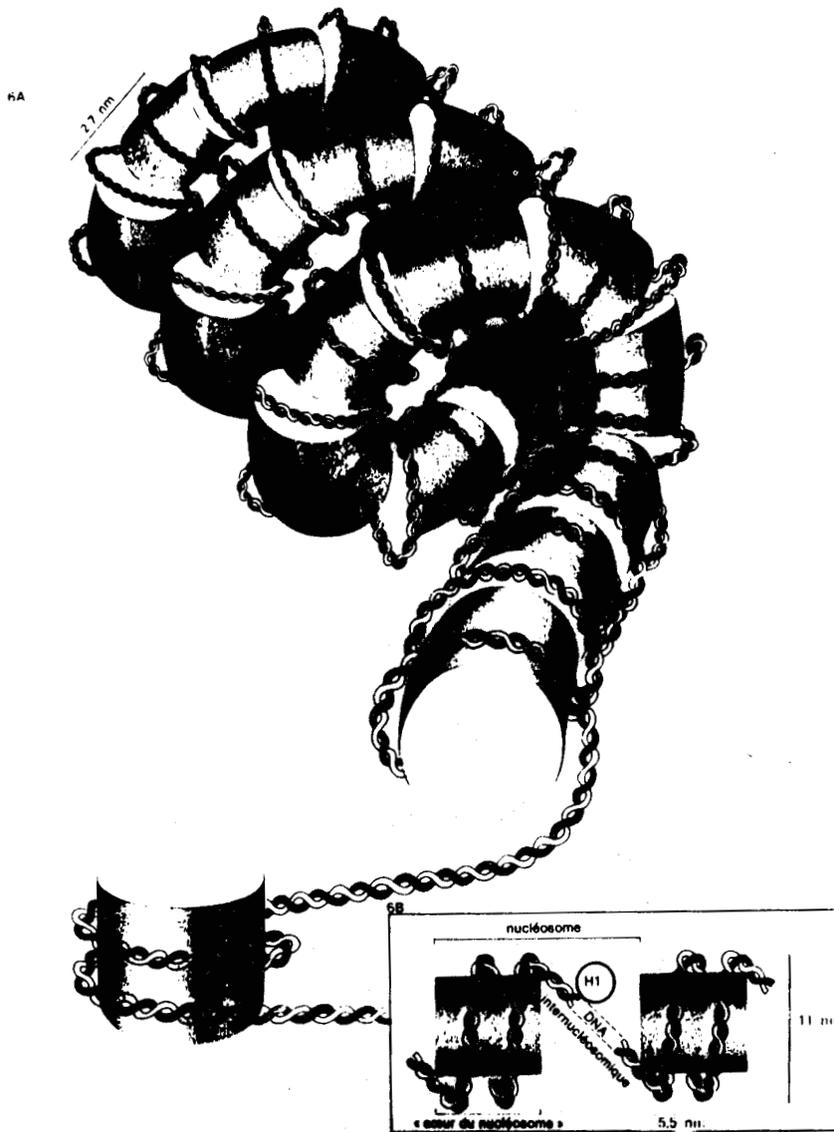


Figure 5 :

Données actuelles sur le nucléosome (14).

Dans ce modèle on a toujours un collier de perles, formé de solénoïdes dont le diamètre est compris entre 25 et 30 nm, formant le cœur du nucléosome, séparé par de l'ADN internucléosomique (56).



Cette association particulière des histones entre elles est due à l'asymétrie que présente la répartition de leurs résidus basiques concentrés dans la moitié N terminale de la chaîne polypeptidique. Elle fournit le maximum d'interactions avec l'ADN. L'autre moitié, riche en résidus apolaires, permet des liaisons hydrophobes entre fractions d'histones, d'où les angles doubles $(H_3 H_4)_2$ ou simples $H_2A H_2B$ et $H_3 H_2B$, accompagné d'une structuration progressive en hélice alpha.

Dans les modèles de BALDWIN et coll (9), et de BRAM et coll (16) les quatre histones H_2A , H_2B , H_3 et H_4 sont associées entre elles et autour d'elles s'enroule la fibre d'ADN. L'histone H_1 est à l'extérieur de la chaîne, sa structure est plus désordonnée et sa liaison moins forte à l'ADN. Elle pourrait avoir un rôle de lien entre sous unités d'une même chaîne ou entre chaînes différentes, notamment au cours des phases de la mitose. Sa position externe vis-à-vis de la chaîne explique la labilité de celle-ci aux solutions salines entre autres.

Dans un modèle plus récent (14) (fig. 5), FINCH et coll (56), par une étude combinée de microscopie électronique et de diffraction aux rayons X montre que la chromatine est formée d'une série de nucléosomes de nature protéique mais sous forme discoïdale, ceux-ci étant empilés en colonnes avec un profil ondulé. Autour de ce noyau de nature protéique s'enroule l'ADN, lui aussi fortement replié, car le diamètre du nucléosome est environ 8,5 fois plus petit que la longueur réelle de l'ADN. Donc ce modèle de fibre de chromatine est aussi une super hélice. Mais si dans ce nucléosome, la structure du cœur ou "core particle" est assez bien connue, on ne sait rien de précis sur la position de l'ADN internucléosomique et de l'histone H_1 en position externe dans ce modèle.

2. SCHEMAS PROPOSES POUR LE CHROMOSOME

L'examen au microscope électronique de chromosomes métaphasiques ou de chromatine interphasique montre, après étirement, l'existence d'une fibrille nucléoprotéique élémentaire de l'ordre de 25 à 40 Å (1) qui doit contenir une double hélice d'ADN de 20 Å de diamètre.

Comment passe-t-on de cette fibre élémentaire à la fibre chromatidienne de 250 Å observée le plus souvent par la méthode d'ANDERSON (5)

Nous n'avons pour réponse que des hypothèses basées sur des arguments physico-chimiques ou ultrastructuraux.

Toutes ces hypothèses admettent une spiralisation progressive de la fibre nucléoprotéique.

Certains utilisent les résultats de la diffraction aux rayons X ; RICHARD et PARDON (123) pensent que la fibrille nucléohistonique élémentaire est formée d'une spirale de 120 Å de pas et 130 Å de diamètre, cette fibre pouvant s'épaissir jusqu'à 200 à 250 Å soit par addition de protéines non histoniques soit par formation d'un double brin engrené l'un dans l'autre (Fig. 6a). BRAM et RIS (15) pensent à une fibre de 100 Å de diamètre formée de la spiralisation d'une fibrille élémentaire avec un pas plus serré de 45 Å (Fig. 6b).

D'autres auteurs utilisent plutôt les résultats de microscopie électronique, RIS (129) explique que la fibre de 250 Å est formée de deux fibres de 100 Å d'épaisseur. D'autres comme BAHR (7) (Fig. 7b) envisagent une organisation de cette fibrille en au moins deux ordres de spiralisation, ce qui se rapproche de la théorie de LAMPERT (89) (fig. 8).

Par la technique d'ombrage, TANAKA (159) constate que la fibre est capable de s'enrouler plusieurs fois sur elle même permettant d'augmenter son diamètre jusqu'à 700 Å (Fig. 7a).

En conclusion, quelque soient les théories proposées, il existe une fibrille nucléoprotéique élémentaire d'une épaisseur de 25 à 40 Å, de nature nucléoprotéique, qui ne doit contenir qu'une double hélice d'ADN (20 Å de diamètre). Le passage de cette fibre élémentaire à la fibre de 250 Å généralement observée se fait par des spiralisations successives. Les idées exprimées par les différents auteurs sont diverses mais en définitive peu éloignées, les unes des autres, quand on tient compte des méthodes de préparation des fibres.

En dehors du processus de condensation de la fibre, il n'y a pas lieu d'envisager de différences fondamentales entre fibres interphasiques chromatiques et fibres chromosomiques.

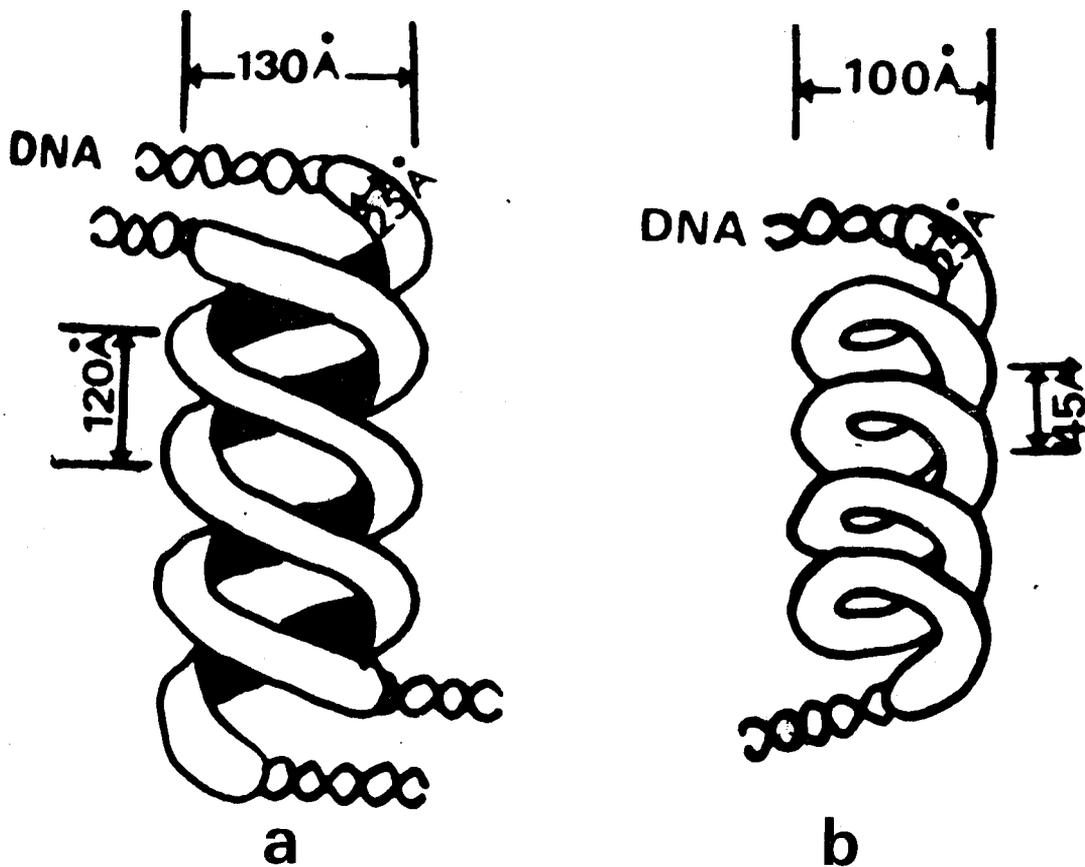


Fig. 6 :

Hypothèses sur l'organisation de la fibre chromatidienne (109).

a. Schéma de RICHARD et PARDON (123) d'après DUPRAW (43).

La fibre creuse de 130 Å serait formée d'un double brin dont chaque élément est enroulé l'un dans l'autre. Par addition de protéines non histoniques, cette fibre s'épaissirait jusqu'à une taille de 200 à 250 Å.

b. Le schéma de BRAM et RIS (15)

La spiralisation de la fibre élémentaire donne naissance à une fibre de 100 Å.

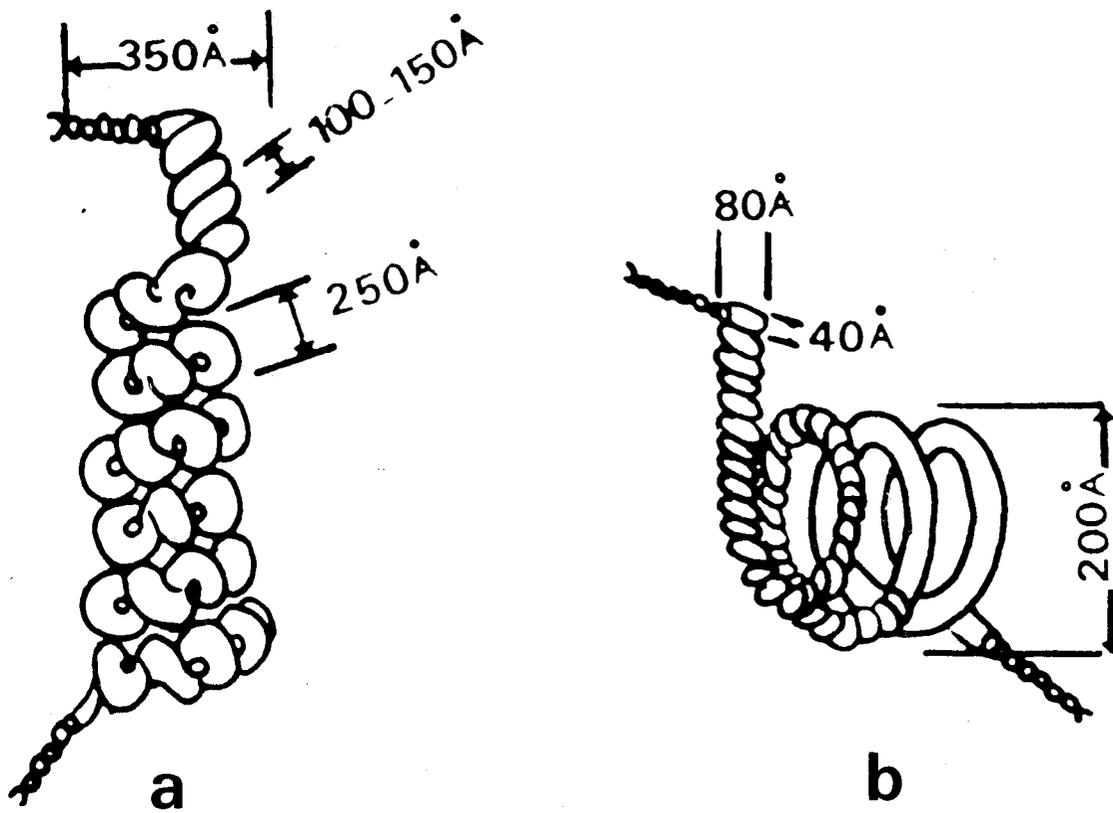


Fig. 7 :

- a. Hypothèse sur l'organisation de la fibre chromatidienne (109).

Schéma de TANAKA (159).

La fibre élémentaire s'enroule sur elle même pour former une fibre de 350 Å et parfois même de 700 Å.

- b. Schéma de BAHR (7).

On peut noter deux ordres de spiralisation, le premier permet de passer à une fibre de 80 Å de diamètre, le second le passage à une fibre de 200 Å.

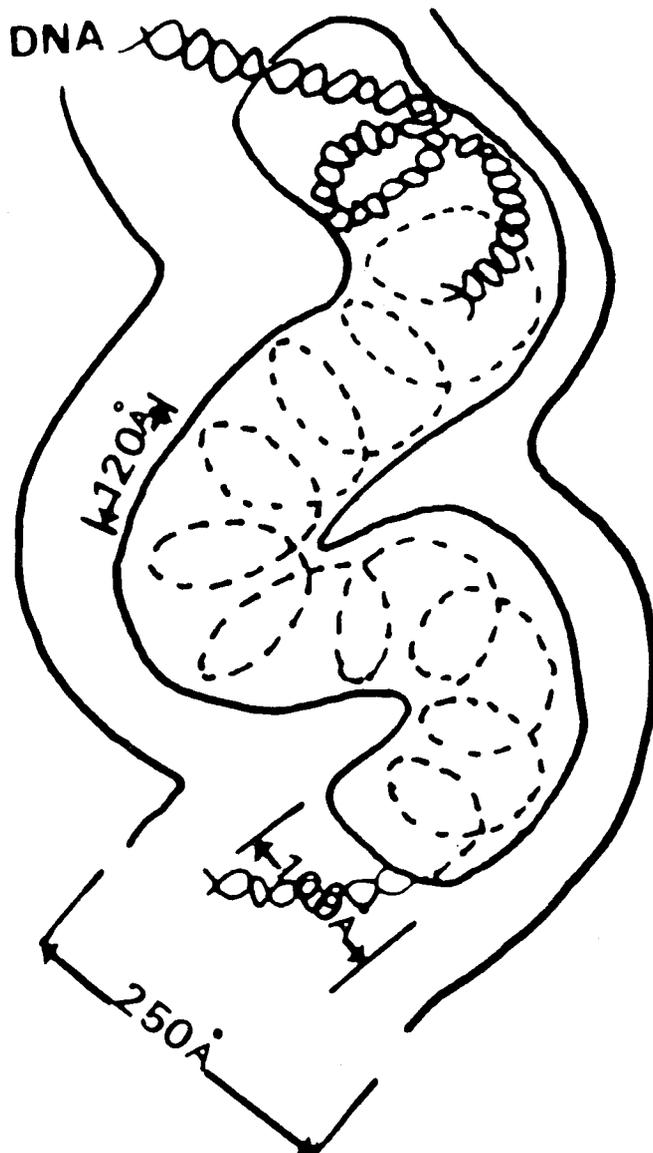


Fig. 8 :

Hypothèses sur l'organisation de la fibre chromatidienne (109).

Schéma de LAMPERT (89).

L'ADN forme déjà une spiralisation dans la fibre élémentaire permettant le passage à une fibre de 100 Å, une seconde spiralisation donne une fibre de 250 Å.

C. NOTRE OBJECTIF

Pour l'étude de la structure du chromosome, nous avons tout d'abord mis au point une technique d'isolement de chromosomes métaphasiques permettant d'obtenir en grande quantité du matériel chromosomique. L'obtention de ces chromosomes nous oblige à pratiquer des cultures cellulaires. Les premiers résultats ont été obtenus à partir de cellules KB cultivées en nappes unicellulaires dans des flacons, mais très rapidement, nous avons adopté la culture en suspension qui avait un double avantage : tout d'abord une augmentation très importante du nombre de cellules métaphasiques et ensuite une diminution des manipulations pour la culture, d'où augmentation très nette du rendement.

La cellule KB est une cellule cancéreuse (Cf. matériel et méthodes) qui présente un nombre anormal de chromosomes, aussi avons-nous comparé les résultats cytologiques obtenus à partir de ces cellules à ceux de cellules normales : nous avons choisi des cultures de lymphocytes sanguins qui nous servent de témoins.

A partir de ces chromosomes isolés, il nous a été possible d'étudier les constituants de ces chromosomes, tout d'abord la composition en ADN, ARN et protéines, puis d'étudier par électrophorèse un groupe de protéines appartenant au chromosome : les histones.

L'incorporation d'un précurseur de la thymidine, la 5 Br DU provoque des modifications tinctoriales de ce chromosome dans les cultures de sang comme dans les cultures de cellules KB. Il nous a été possible d'isoler ces chromosomes ayant incorporé et de rechercher si ce produit qui modifie l'ADN et la coloration du chromosome avait une influence sur les histones constituant le chromosome métaphasique.

MATERIEL ET METHODES

I. CULTURES

Trois types de cultures ont pu être utilisés.

A. LA CULTURE DE SANG PERIPHERIQUE

Les cultures de sang humain total sont réalisées selon la technique dérivant de celle de MOORHEAD et coll (107) :

0,4 à 0,5 ml de sang veineux sont placés stérilement dans 6 ml de milieu de culture (Mac Coy) contenant 20 % de sérum foetal de veau. La culture est placée à 37° C pendant 72 heures:

L'addition, 2 heures et demi avant l'arrêt de la culture, d'1 ml d'une solution isotonique de colchicine à 0,04 % permet d'augmenter le nombre de cellules en métaphase (166).

La dispersion intracytoplasmique des chromosomes est obtenue par une solution hypotonique :

KCl 0,3 % - citrate trisodique 0,5 % (1-1)

12 mm à 37° C.

Les cellules sont ensuite fixées, deux fois, dans une solution fraîchement préparée d'acide acétique-méthanol (1-3) à 4° C, puis sont déposées sur lames humides et séchées rapidement à l'air chaud.

B. LA CULTURE DE CELLULES KB

Nos premiers résultats, notamment la mise au point de la technique de chromosomes métaphasiques à pH acide, ont été réalisés à partir de cultures de cellules KB (souche KB 3 de chez GREEN) en nappe unicellulaire. La lignée de cellules KB dérive d'un carcinome de l'épiderme du plancher buccal d'un homme adulte, souche mise en culture par EAGLE en 1954.

Une étude faite par l'American Type Culture Collection (ATCC n° CCL 17) montre un nombre de chromosomes variant de 63 à 93, alors que le caryotype humain normal comprend 46 chromosomes.

L'étude de la courbe de fréquence du nombre de chromosomes dans les cellules KB montre un maximum entre 73 et 78 chromosomes. La cellule KB dérive de cette souche, elle a pu être adaptée par la suite à la culture en suspension dans un milieu sans calcium, car la cellule KB de départ se cultive en nappe unicellulaire.

1) Cultures en nappe

Le milieu, utilisé pour la culture en nappe est du HLEG, supplémenté par 10 p. 100 de sérum de veau ; la composition du milieu est la suivante :

Sels	{ PO ₄ H ₂ Na (2H ₂ O)	1,125 g
	{ Mg SO ₂ (7H ₂ O)	1,8 g
	{ CaCl ₂ (2H ₂ O)	2,385 g
	{ KCl	3,6 g
	{ NaCl	61,2 g
	{ Na H CO ₃	33,3 g
	Glucose	40,5 g
	Yestolate	9 g
	Hydrolysate de lactalbumine	45 g
	Rouge de phénol 1 %	9 ml
	qsp 10 litres avec H ₂ O	

Le milieu contient en outre 40 ml d'un mélange d'antibiotiques : Pénicilline, Streptomycine et Néomycine.

Deux fois par semaine, on introduit dans chaque flacon de la trypsine (2,5 ‰ dans le milieu HLEG). Puis le contenu cellulaire, après décollement et lavage dans le milieu HLEG, est transplanté dans deux autres flacons contenant 30 ml du milieu. Chaque flacon contient environ 200 000 cellules par ml.

2) La culture en suspension

Pour augmenter le nombre de cellules et diminuer les manipulations de cultures, nous avons utilisé la culture de cellules KB en suspension.

Le milieu employé F₁₃ est dépourvu de calcium MEM (JOKLIK Modified de chez GIBCO) avec un supplément de 5 p. 100 de sérum de cheval. Le rendement est alors considérablement accru puisque le nombre de cellules est multiplié par deux chaque jour et qu'il est possible d'obtenir des litres de suspension cellulaire contenant de 200 à 400 000 cellules par ml.

2. INCORPORATION DE 5 BR DU

Nous avons utilisé comme témoin des cultures de sang périphérique total selon la technique classique de MOORHEAD et coll (107).

Dans ces cultures, la 5Br dU (KOCHLIGHT Laboratories Ltd) est ajoutée pendant 72 heures à la dose de 200 µg/ml. Les cultures de cellules KB entretenues en suspension, reçoivent pendant trois jours de la 5 Br DU à la dose de 10 µg/ml, soit vingt fois moins que dans les cultures de sang.

3. ISOLEMENT DE CHROMOSOMES À PH ACIDE

Nous avons retenu et adapté la technique de SALZMAN et MENDELSON en pH acide (136).

Les cellules KB, en mitose, provenant soit de culture en nappe, soit de culture en suspension, sont bloquées au stade métaphase par addition de colchicine (Colchicinéos HOUDE) pendant 15 heures à raison de 0,1 µg par ml de suspension cellulaire.

La technique d'isolement est résumée dans le tableau (1).

Les cellules KB sont centrifugées à 1 000 tours/mn (JOUAN) pendant 10 minutes, puis sont lavées par mise en suspension dans du milieu MEM sans sérum (deux lavages).

Puis ces cellules subissent un choc hypotonique dans une solution :

Citrate de sodium	0,5 %
Mg Cl ₂	10 ⁻³ M
Ca Cl ₂	10 ⁻³ M.

Les cellules sont mises en suspension deux fois à l'aide d'une pipette Pasteur, à 37° C, pendant 20 à 30 minutes suivant la concentration cellulaire. Elles sont ensuite récupérées par centrifugation à 1000 t/mn dix minutes, le culot obtenu est repris par 60 ml d'une solution acide :

Acide citrique	2,5 p. 100
Sucrose	0,1M
Saponine	0,1M.

Cette solution, de pH 2,1, est préalablement refroidie et l'ensemble des opérations suivantes se déroule à 4°C.

La suspension cellulaire obtenue est transférée dans un broyeur à piston "Loose" et "Tight" de type DOUNCE. Par 20 à 30 allers et retours des pistons, on obtient une solution contenant un mélange de chromosomes métaphasiques et de noyaux interphasiques.

Une première centrifugation à 1 000 t/mn (5 mn) permet une élimination importante des noyaux interphasiques. Le surnageant est récupéré à la pipette Pasteur puis est de nouveau centrifugé dans les mêmes conditions, de manière à éliminer presque complètement les noyaux. S'il subsiste, après contrôle au microscope du surnageant quelques noyaux, il est possible de parfaire la séparation noyaux-chromosomes par une filtration sur filtre en verre frité (SOVIREL, taille n° 4) qui ne permet que le passage des chromosomes et non des noyaux. Les chromosomes ainsi obtenus sont centrifugés à 2 500 t/mn, 1 h 30, puis sont lavés dans un milieu de pH 3 dont la composition est la suivante :

Solution 1	(Sucrose	0,1M
	(Mg Cl ₂	10 ⁻³ M
	(Ca Cl ₂	10 ⁻³ M

Solution 2 { HCl N
 { Acétate de Na 1 M

La solution 1 est ajustée à pH 3 à l'aide de la solution 2.

Après lavage, les chromosomes sont centrifugés à 2 500 t/mn quinze minutes, le culot ainsi obtenu est remis en suspension dans 30 ml d'une solution de sucrose 2,2 M dans le tampon de pH 3. La suspension étant déposée sur 7 ml environ de sucrose 2,2 m dans le même tampon. Le dépôt a lieu dans un tube de nitrocellulose de 37 ml, puis les chromosomes subissent une ultracentrifugation à 20 000 RPM pendant une heure, SPINCO L2 (rotor SX 27). Cette opération permet une purification de ces chromosomes, débarrassés des éléments cytoplasmiques et membranaires relargués en surface.

Le culot obtenu est remis en suspension dans le tampon de pH 3 pour être lavé, la centrifugation à 2 500 t/mn, 15 minutes, permettant d'éliminer tout excès de sucrose, donne un culot de chromosomes purifiés.

Il est possible d'obtenir de la même manière un culot de noyaux:

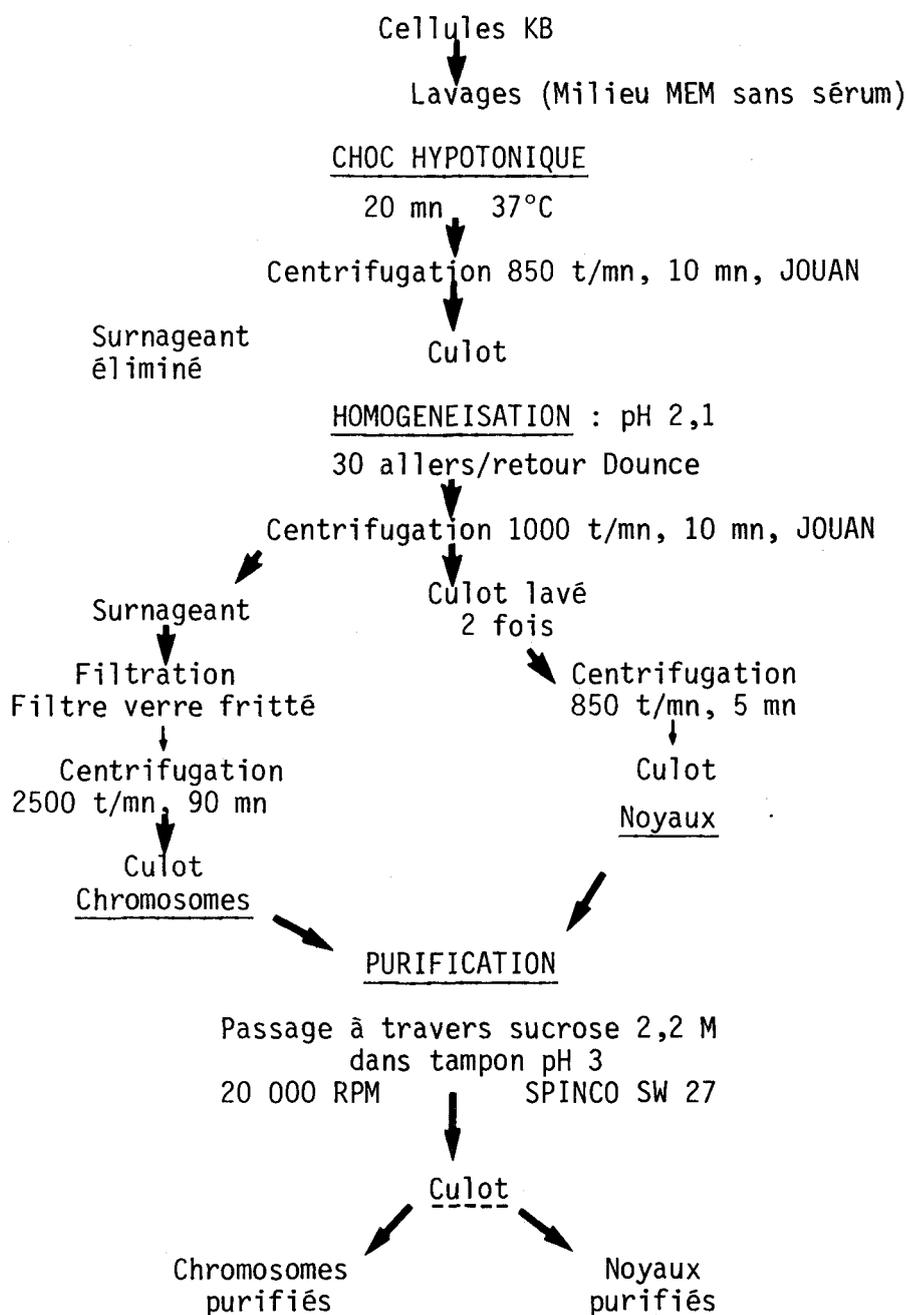
La technique est la même, mais dans la culture nous n'ajoutons pas de colchicine de manière à obtenir un maximum de cellules en interphase. Les cellules subissent un choc hypotonique dans les mêmes conditions puis sont homogénéisées dans le même milieu, mais cette fois après centrifugation, 1 000 t/mn cinq minutes, c'est le surnageant contenant des chromosomes qui est éliminé.

Le culot est lavé de nouveau dans le milieu d'homogénéisation, puis centrifugé dans les mêmes conditions. Le culot obtenu est purifié comme les chromosomes par passage à travers une solution de sucrose 2,2M dans le tampon de pH 3, puis est lavé. Une dernière centrifugation nous donne un culot de noyaux purifiés.

Les noyaux, comme les chromosomes, sont conservés dans le tampon de pH 3 pendant plusieurs mois sans altération de leur morphologie.

TABLEAU 1

TECHNIQUES D'OBTENTION DE CHROMOSOMES ET NOYAUX ISOLES A pH ACIDE



4. ISOLEMENT DES CHROMOSOMES À PH BASIQUE

Nous avons retenu et adapté la technique d'EBINA et coll (49) (50) à notre culture et à un pH fixé à 9 (tableau 2).

Les cellules, préalablement colchicinées, sont lavées dans du milieu sans sérum, puis subissent un choc hypotonique dans le milieu utilisé pour la technique à pH acide (citrate de sodium, $MgCl_2$, $CaCl_2$).

Cette étape est suivie, après centrifugation des cellules à 1 000 t/mn, 10 minutes, d'une homogénéisation, à l'aide du broyeur de type DOUNCE, dans le milieu suivant de pH 9 :

TRIS	0,02 M, HCl
$CaCl_2$	$5 \times 10^{-3}M$
Sucrose	0,1 M
Saponine	

Le passage des cellules du milieu hypotonique au milieu d'homogénéisation basique doit se faire progressivement.

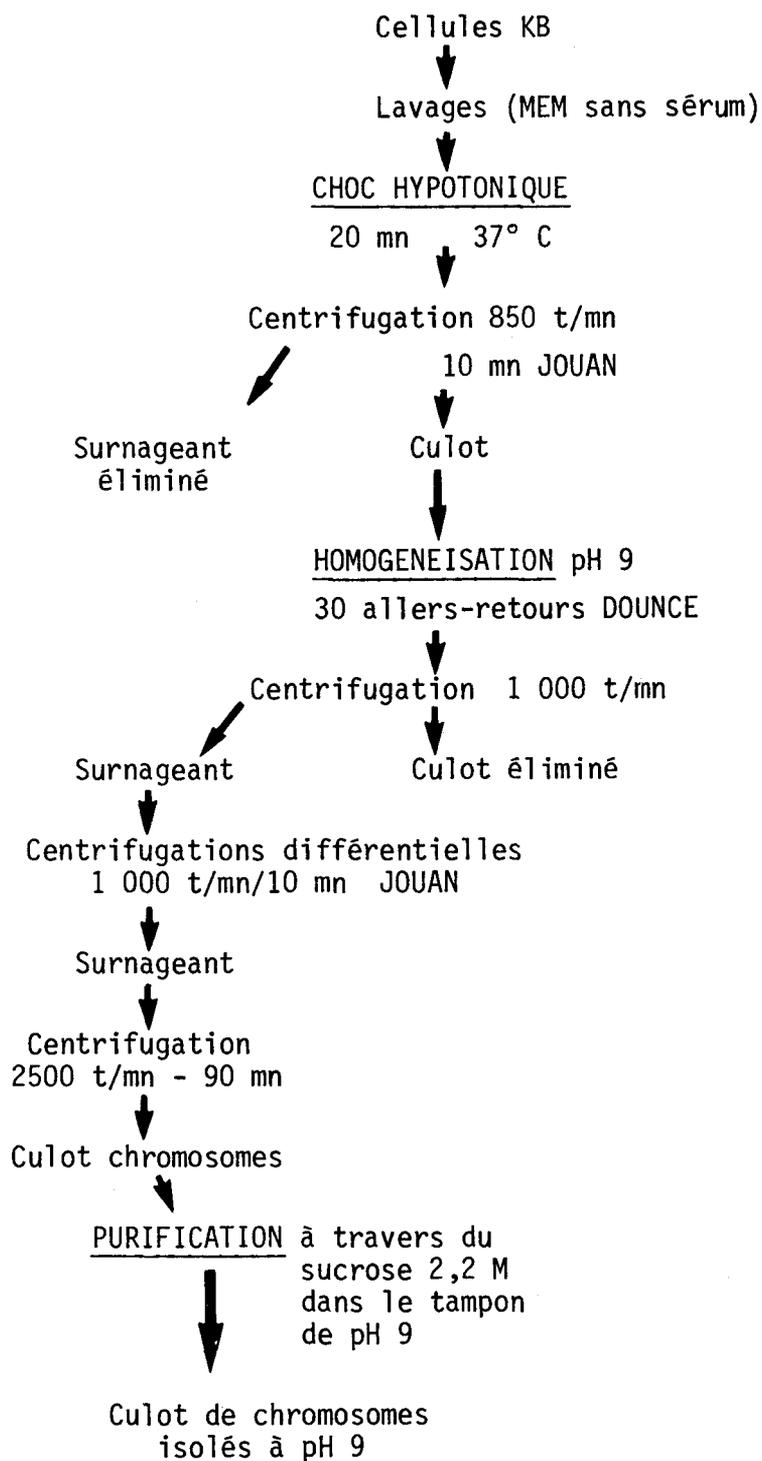
Le culot de cellules est, tout d'abord, mis en suspension dans du TRIS 0,02 M pH 9, $CaCl_2$ $5 \times 10^{-3}M$ à 4° C, puis agité pendant dix minutes.

Après ces dix minutes d'agitation, le sucrose est ajouté, puis la saponine, de manière à obtenir une concentration finale de 0,1 M Sucrose, et 0,1 % de saponine.

Les cellules sont ensuite homogénéisées à l'aide d'un "Dounce" (20 allers retours des pistons). Une double centrifugation, 1 000 t/mn cinq minutes, permet une séparation noyaux-chromosomes. Par centrifugation à 2 500 t/mn, 1 h 30, il est possible de récupérer les chromosomes isolés, ceux-ci sont ensuite purifiés par ultracentrifugation (20 000 RPM SPINCO SW 27, 1 heure) à travers une solution de sucrose 2,2M dans le même tam-

TABLEAU 2

TECHNIQUE D'OBTENTION DE CHROMOSOMES ET NOYAUX ISOLES A pH BASIQUE



pon TRIS 0,02M, CaCl_2 $5 \times 10^{-3}\text{M}$ de pH 9. Le culot obtenu est lavé dans ce même tampon additionné de la quantité de sucrose nécessaire pour obtenir 0,1 M en sucrose. Il est possible de préparer des noyaux interphasiques de la même manière mais à partir de culture sans colchicine.

5. CONTRÔLES MORPHOLOGIQUES

A. A PARTIR DE CULTURES DE SANG

Après trois jours de culture, le sang est centrifugé à 800 t/mn cinq minutes, le surnageant est éliminé. Un mélange de KCl 0,3 % citrate trisodique 0,5 % permet de réaliser un choc hypotonique de 20 mn à 37° C. Puis le culot obtenu, après centrifugation 5 mn à 800 t/mn et fixation deux fois par le mélange acide acétique-méthanol 1:3, est déposé sur lames histologiques humides préalablement refroidies.

B. A PARTIR DE CULTURE DE CELLULES KB

Les cellules KB, après action de la colchicine, sont centrifugées à 800 t/mn, cinq minutes, subissent un choc hypotonique (KCl 0,3 % - citrate trisodique 0,5 % ou citrate trisodique 0,5 % MgCl_2 et CaCl_2 10^{-3}M), puis sont fixées par le mélange acide acétique-méthanol 1:3 et déposées sur lames humides à 4° C.

C. A PARTIR DE CHROMOSOMES ISOLES

Les chromosomes métaphasiques isolés, obtenus selon les protoco-

Les techniques exposés antérieurement (tableaux 1 et 2), sont étalés sur lame selon la technique du frottis sanguin, séchés à l'air puis fixés par le mélange : acide acétique - méthanol 1:3.

D. DENATURATIONS THERMIQUES

Les lames obtenues précédemment sont dénaturées par la chaleur, 1 heure à 60° C, dans une solution de 2 SSC suivant le protocole décrit par SUMNER (155) et coll.

Les lames sont placées une heure à 60° C dans un mélange (1:1)
de : NaCl 0,6 M
 Citrate trisodique 0,06 M.

Puis elles sont enlevées et très rapidement plongées une minute dans une solution d'eau distillée préalablement refroidie à 4° C. Les lames sont ensuite séchées à l'air avant d'être colorées.

E. COLORATIONS

1) Coloration courante

Après étalement sur lame et séchage à l'air, les différentes préparations, soit cellules métaphasiques après choc hypotonique, soit chromosomes isolés après homogénéisation, soit chromosomes purifiés, sont colorées dix minutes par une solution de Giemsa dans un tampon phosphaté à pH 6,7.

Solution A	KH_2PO_4	9,08 g/litre
Solution B	Na_2HPO_4	9,47 g/litre.

81,4 ml de solution A, mélangés à 18,6 ml de solution B donnent un pH final de 6,7.

Préparation du colorant :

6 ml de Giemsa R,
6 ml de tampon pH 6,7
qsp 200 ml d'eau permutée.

2) Coloration après dénaturation

Les lames dénaturées sont colorées 1 heure 30 dans une solution à 0,5 % (V:V) de Giemsa (GURR R 66) dans du tampon à pH 6,8 (36).

Préparation du tampon :

Solution A { 50 ml eau distillée,
 { 1,5 ml méthanol,
 { 1,5 ml acide acétique 0,1 M.

Solution B : $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ 0,2M.

La solution A étant ensuite ajustée à pH 6,8 à l'aide de la solution B.

3) Coloration à la moutarde de Quinacrine, obtention des bandes Q

Les lames sont plongées dix minutes dans un tampon phosphaté
(acide citrique 0,1M
(phosphate disodique 0,2M
ajusté à pH 7 à l'aide de phosphate-mono-sodique 0,2M,
puis sont colorées 20 minutes à température ambiante dans le mélange fluorescent

(1,25 ml Quinacrine moutarde 2 mg/ml
+ (48,75 ml de tampon pH 7.

Puis la lame est rincée une minute dans ce même tampon recouverte d'une lamelle et observée au microscope à fluorescence.

Cette coloration, technique de CASPERSSON et coll (25), qui utilise la quinacrine comme agent fluorescent permet, après exposition au rayonnement ultraviolet, d'obtenir des bandes fluorescentes le long du chromosome appelées bandes Q.

4) Coloration après incorporation de 5 Br dU

- Mise en évidence par dénaturation thermique

Afin de visualiser les caractéristiques induites par l'incorporation de 5 Br dU pendant 72 heures, les lames sont traitées suivant le protocole suivant :

Les lames sont plongées dix minutes à 87° C dans la solution suivantes, suivant la technique de KORENBERG et FREEDLENDER (84) :

Na H₂ PO₄ M ajustée à pH 8
par Na OH 10 N.

Puis, après refroidissement rapide à 4° C, elles sont colorées au Giemsa GURR 66 1 h 30 :

Giemsa 0,5 p. 100 dans du tampon phosphaté de pH 6,8
(décrit précédemment).

- Mise en évidence par fluorescence

Les préparations de chromosomes in situ et isolés sont colorées par l'acridine orange selon la technique de COUTURIER et coll (35). L'acridine orange, colorant du groupe des thiazines qui fixé sur un support, les chromatides du chromosome, est fluorescent durant l'exposition aux rayons UV.

Les lames sont réhydratées dans les bains d'alcool de degré décroissant (5 mn pour chaque bain)

95 - 90 - 80 - 70 - 50 - 30 - 20 - 10 - eau

puis plongées dix minutes dans une solution d'Acridine orange.

Acridine orange 5 mg,
Tampon phosphaté 100 ml.

Composition du tampon phosphaté employé :

Solution A : KH₂ PO₄ M/15,

Solution B : Na₂HPO₄ M/15.

Le tampon est obtenu par le mélange (V:V) de 57 % de solution A avec 43 % de solution B.

Les lames sont plongées dans un tampon phosphaté de pH 7 cinq minutes.

Coloration ensuite vingt minutes dans la solution d'acridine tamponnée (50 µ/ml).

Rinçage et montage entre lame et lamelle dans une goutte de tampon. Composition du tampon de pH 7 :

(100 ml H₂O,
{ 3 ml acide citrique 0,1M
{ ajusté à pH 7 avec Na₂ H PO₄ 0,2M

L'observation se fait en fond noir (objectif x 100 muni d'un diaphragme à iris) avec un microscope à UV équipé d'un filtre d'excitation BG 12 et d'un filtre d'arrêt à 530 nm. La source lumineuse est une lampe à vapeur de mercure HBO 200. Les clichés sont réalisés avec des films "Rayoscope " RY 135-50 (Kodak, développés dans du révélateur LX 24 (Kodak).

F. CONTROLES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Pour l'analyse en microscopie électronique, nous utilisons 3 à 5 gouttes du matériel en suspension, soit dans le milieu hypotonique pour les cellules entières, soit dans le milieu d'homogénéisation pour les chromosomes débarrassés des noyaux, soit dans la solution tampon de pH 3 pour les chromosomes purifiés.

La suspension est déposée sur des grilles recouvertes d'une membrane de Formvar. Les grilles déshydratées dans des bains d'alcool éthylique de degré croissant (30 - 50 - 70 - 80 - 90 - 100), puis dans un bain d'acétate d'amyle, sont séchées à l'air avant d'être observées au microscope électronique (ZEISS-EM 9).

Nous n'utilisons pas de dispositif d'ANDERSON (5) pour parfaire la déshydratation.

Les observations et photographies ont été réalisées sans fixation, ni coloration préalable des grilles.

6. DOSAGES BIOCHIMIQUES

A partir de chromosomes métaphasiques isolés à pH acide, les différents constituants : ADN, ARN, et protéines, ont été extraits selon la méthode de SCHMIDT-THANNAUSER (141) adaptée à notre matériel. Les différentes étapes de cette extraction sont données dans le tableau 3.

Les chromosomes métaphasiques sont lavés deux fois dans du tampon de pH 3 (4° C), les deux lavages étant suivis d'une centrifugation à 3 500 t/mn, dix minutes.

Le culot est ensuite précipité par de l'ATCA* à 10 p. 100, l'opération se déroulant à + 4° C dans de la glace pilée.

La quantité d'ATCA utilisée représente environ quinze fois le volume de chromosomes à doser. Dans toutes les opérations suivantes, cette proportion sera respectée. La suspension est ensuite centrifugée à 3 500 t/mn pendant dix minutes. Le culot obtenu est alors repris trois fois par de l'éther froid et travaillé mécaniquement à l'aide d'une baguette de verre de manière à éliminer l'ATCA résiduel. Puis le culot est traité trois fois par le mélange alcool-éther (1:1) à 40° C pour le délipider. Après chaque traitement, le culot est remis dans la glace pilée avant d'être centrifugé à 3500 t/mn dix minutes.

Le culot est ensuite repris par une solution de NaOH 0,5N (5 ml) puis est placé à 37° C pendant 18 heures, ce qui permet l'hydrolyse sodique de l'ARN.

La suspension est ensuite placée dans de la glace pilée puis acidifiée par de l'acide formique concentré jusqu'à pH 4,2. On laisse précipiter pendant une heure dans la glace pilée, puis une centrifugation à 5500 t/mn, trente minutes permet de séparer ADN-protéines de la solution d'ARN hydrolysée.

* ATCA : Acide Trichloracétique.

En même temps, 10 mg d'ARN de levure est hydrolysé par 20 ml de NaOH 0,5N, puis la solution est amenée à pH 4,2 par de l'acide formique concentré. Cette solution nous servira de témoin pour les dosages colorimétriques.

Le culot ADN-protéines est hydrolysé par 5 ml de PCA* 0,5N à 90° C pendant vingt minutes, puis la suspension obtenue est replacée dans de la glace pilée avant d'être centrifugée 5500 t/mn (JOUAN) pendant vingt minutes.

Le culot obtenu contient les protéines et il est repris par de la soude 2N (1 volume) puis, après dissolution, un volume d'eau est ajouté pour obtenir une concentration finale de soude normale, les protéines étant solubilisées.

Le surnageant contient une solution d'ADN hydrolysé.

Le témoin cette fois est un mélange ADN-protéines et

50 mg ADN

150 mg sérum albumine

sont dissouts dans 50 ml d'eau distillée.

A 2,5 ml de cette solution, soit 2,5 mg d'ADN et 7,5 mg de protéines, sont ajoutés 2,5 ml de PCA**N. La solution ainsi obtenue est chauffée dans les mêmes conditions, 90° C pendant 20 minutes, puis refroidie et centrifugée. Le surnageant contient une solution d'ADN nous servant de témoins et le culot protéique est repris par de la soude normale pour être dissout.

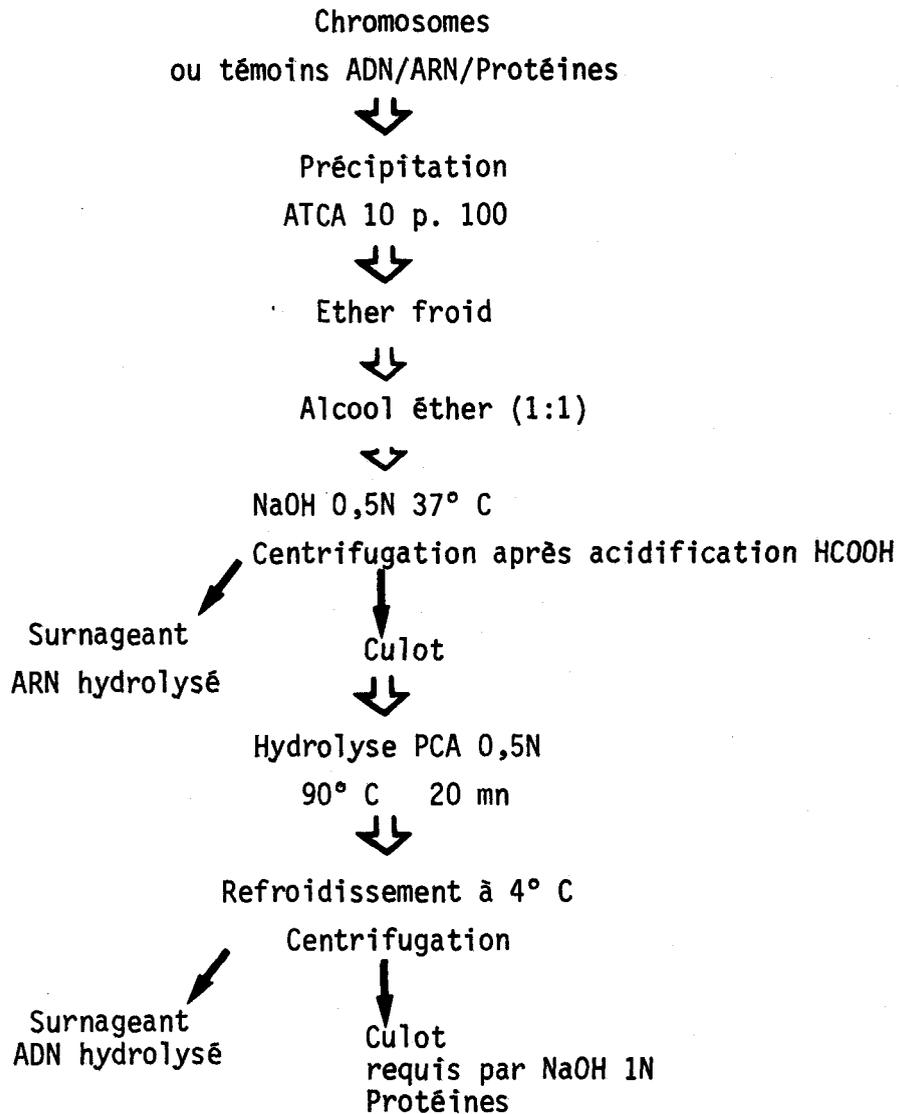
Nous obtenons donc trois solutions contenant les différents éléments du chromosome :

- une solution de ribonucléotides (NaOH 0,5N)
- désoxyribonucléotides (PCA 0,5N)

* PCA : Acide perchlorique.

** PCA N : Acide perchlorique normal.

TABLEAU 3



SCHEMA RECAPITULATIF DE LA TECHNIQUE D'EXTRACTION DES DIFFERENTS COM-
POSANTS DU CHROMOSOME, EN VUE DES DOSAGES COLORIMETRIQUES

de protéines (NaOH N),
- et les solutions témoins correspondantes.

Chacune des fractions extraite selon le protocole décrit dans le tableau 3 est dosée par la technique de BURTON (22) pour l'ADN, de LOWRY (98) pour les protéines insolubles et par la technique à l'Orcinol de TILLMANS et PHILIPPI, modifiée par RIMINGTON (127) pour l'ARN.

7. EXTRACTION DES PROTÉINES ACIDO-SOLUBLES

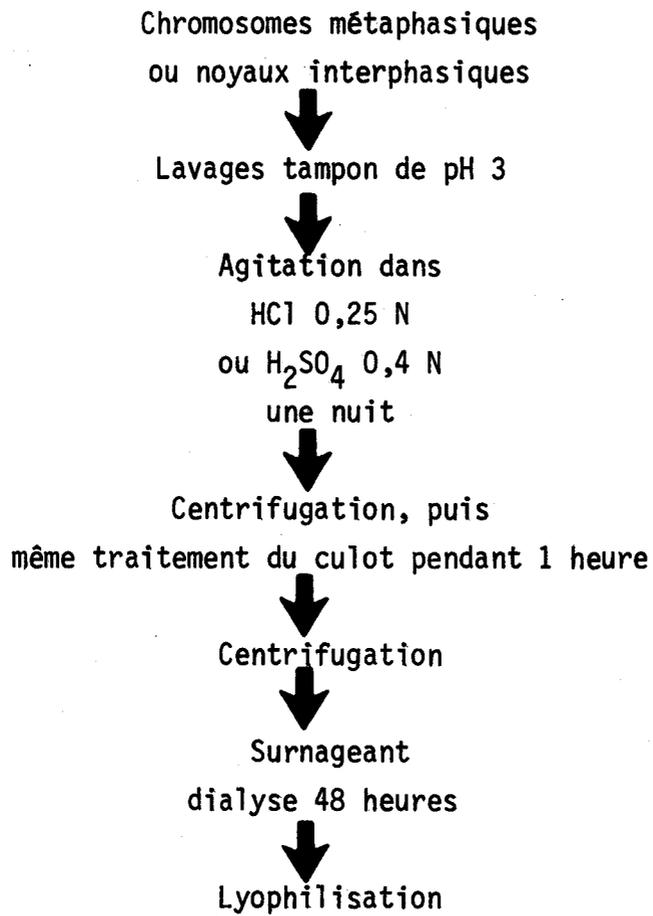
Les chromosomes métaphasiques ou noyaux interphasiques après lavages dans du tampon de pH 3 sont mis en suspension dans l'HCl 0,25N ou H₂SO₄ 0,4N (25 fois le volume du culot), puis mis en agitation pendant une nuit. Après centrifugation 5500 t/mn vingt minutes (JOUAN), le culot est remis en suspension dans un même volume d'acide chlorhydrique ou d'HCl 0,25N pendant une heure, puis centrifugé dans les mêmes conditions, les deux surnageants obtenus sont mélangés puis dialysés pendant 48 heures avec des changements fréquents des bains. Les boudins à dialyse sont préalablement traités par l'EDTA (10⁻³M) et bouillis dix minutes.

Après dialyse, la solution de protéines acido-solubles est lyophilisée.

Les milieux d'homogénéisation après sédimentation des chromosomes (pH acide ou pH basique) sont centrifugés à 5500 t/mn pendant vingt minutes de manière à éliminer les quelques chromosomes résiduels. Les surnageants sont précipités par addition d'ATCA à 100 p. 100 de façon à obtenir une concentration finale de 20 p. 100 en ATCA. Les précipités obtenus sont centrifugés à 5500 t/mn vingt minutes, les culots obtenus sont lavés trois fois à l'acétone ou à l'éther éthylique pour éliminer les restes d'ATCA puis partiellement dissouts dans une solution d'urée 8M, HCl 0,01N. La partie soluble dans l'urée est étudiée par électrophorèse en gel de polyacrylamide. La technique d'extraction est résumée dans le tableau 4.

TABLEAU 4

TECHNIQUE D'EXTRACTION DES PROTEINES ACIDO-SOLUBLES DE CHROMOSOMES OU DE NOYAUX



8. ELECTROPHORÈSES EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

Les protéines acido-solubles de chromosomes métaphasiques ou de noyaux interphasiques isolés à pH acide ou à pH basique, ainsi que les protéines solubles dans l'urée 8M sont analysées en électrophorèse en gel de polyacrylamide selon la technique de PANYIM et CHALKLEY (116).

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide à 17 %, urée 2,5M, le tampon de migration étant de l'acide acétique 0,9N, la migration dure 4 h 30 à raison de 1,5 mA par gel. Une électrophorèse en "prérin" d'une nuit 1,5 mA/gel, précède la migration électrophorétique.

Les gels sont ensuite enregistrés au microdensitomètre (JOYCE-LOEBL) après coloration préalable à l'amido-schwartz. Les échantillons de protéines sont dissouts dans l'urée 8M, HCl 0,01N à raison de 1 mg par ml.

Certains échantillons ont été dissouts dans une solution d'urée 8M, HCl 0,01N, bêta-mercapto-éthanol à 1 %, pour permettre de visualiser l'histone H₃ présente dans notre matériel sous forme oxydée. Le bêta mercapto-éthanol permet la réduction de celle-ci et son passage de la forme dimère à la forme monomère.

RESULTATS

Les résultats peuvent être groupés en deux parties :

- des résultats cytologiques : ceux-ci portent soit sur des contrôles du matériel étudié en biochimie, soit sur l'influence de la 5 Br dU au niveau de la morphologie et la coloration du chromosome,
- des résultats biochimiques qui concernent tout d'abord le dosage biochimique des constituants des chromosomes isolés, puis l'étude électrophorétique des protéines acido-solubles de chromosomes métaphasiques ou de noyaux interphasiques. Les résultats sont ensuite comparés à ceux de chromosomes obtenus soit à partir de cultures traitées par la 5 Br dU soit suivant les techniques d'isolement de ces constituants cellulaires.

A/ RESULTATS CYTOLOGIQUES

1. OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE OPTIQUE

A. CHROMOSOMES METAPHASIQUES "IN SITU"

Les chromosomes métaphasiques, après choc hypotonique et fixation présentent la même morphologie que les chromosomes humains de cellules somatiques normales en métaphase. Ils sont constitués de deux chromatides réunies au niveau du centromère. Celui-ci, point d'attache du chromosome au fuseau de division, permet d'individualiser au niveau de chaque chromosome un bras court et un bras long. Suivant la position du centromère et aussi suivant la longueur du chromosome, il est possible de classer les chromosomes deux par deux de 1 à 22 pour les autosomes et de mettre en évidence les chromosomes sexuels X et Y.

Le classement des chromosomes humains après dénaturation saline

a été établi à la Conférence de Paris en 1971. Chaque chromosome possède une répartition des bandes claires et sombres spécifique, identique pour deux chromosomes homologues (Fig. 9), ce qui permet un meilleur classement des chromosomes (fig. 10).

Le caryotype de cellules KB, cellules dites hétéroplôïdes, présente en général de 70 à 75 chromosomes, mais s'il est possible de compter les chromosomes, il est impossible de les classer, sinon en plusieurs groupes de chromosomes numérotés A, B, C, D, E, F, G suivant la taille et la position du centromère, selon la classification de DENVER en 1962 (126).

B. INFLUENCE DE LA DENATURATION SALINE SUR LE CHROMOSOME "IN SITU" : OBSERVATION DES BANDES G

La classification de DENVER ne nous permet pas une comparaison valable des chromosomes de cellules somatiques normales avec ceux des cellules KB. Il est nécessaire d'avoir recours à des techniques récentes dites de dénaturation qui permettent de faire apparaître sur les chromosomes, après traitement et coloration, des bandes horizontales claires, bandes G-, et sombres ou bandes G+ (Giemsa +) dont les répartitions sont spécifiques pour chacune des 23 paires de chromosomes homologues du caryotype humain normal.

Ces techniques de dénaturation salines, décrites précédemment, permettent de comparer les caryotypes, établis à partir de cultures de lymphocytes (Fig. 10), avec ceux des cellules KB (Fig. 11).

Tous les chromosomes d'une cellule humaine normale sont présents dans la cellule KB à l'exception du chromosome Y, mais le nombre de chacun d'entre eux est variable. Nous remarquons aussi les chromosomes dits "marqueurs" c'est-à-dire spécifiques d'une souche donnée, ces chromosomes sont différents des chromosomes que l'on rencontre dans le caryotype humain normal et ils sont particuliers à la souche de cellules KB que nous utilisons, Travaux faits par LIN en 1974 (94) (95).



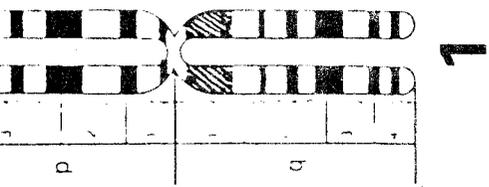
Fig. 9 :

Réprésentation schématique de la classification des chromosomes après la Conférence de Paris, 1971, selon HAMERTON (70).

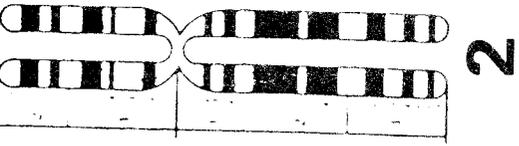
Negative or pale staining Q and
Positive R bands

Positive Q and G bands
Negative R bands

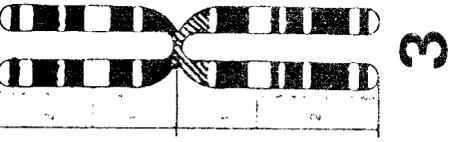
Variable bands



1



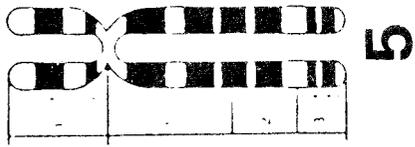
2



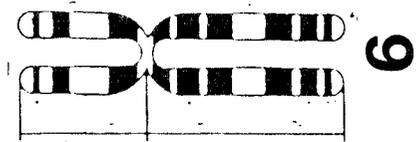
3



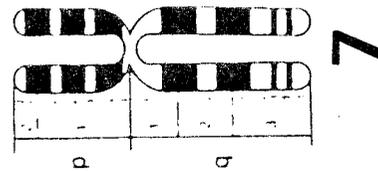
4



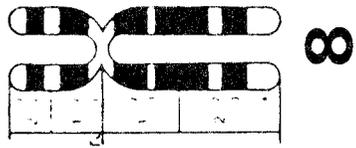
5



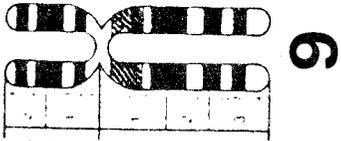
6



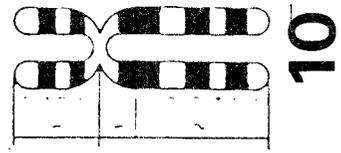
7



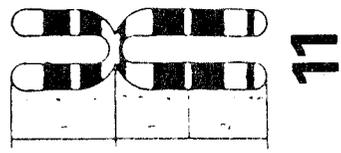
8



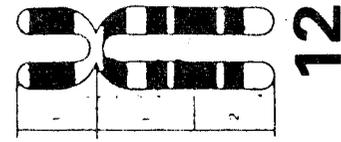
9



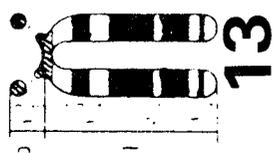
10



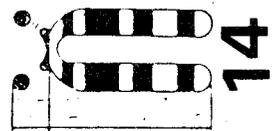
11



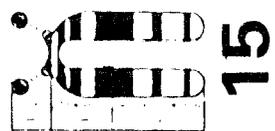
12



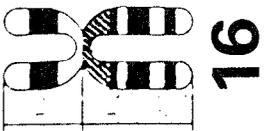
13



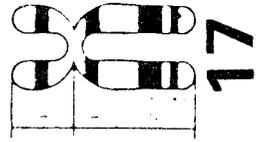
14



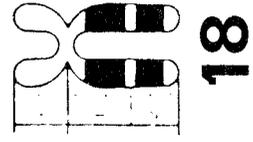
15



16



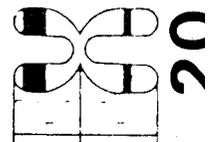
17



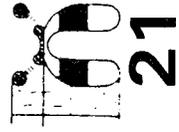
18



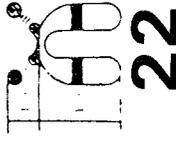
19



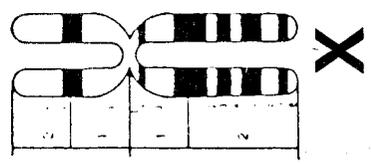
20



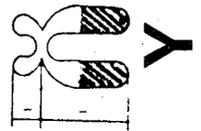
21



22



X



Y



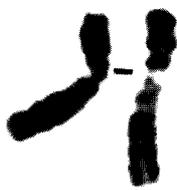
Fig. 10 :

Caryotype de lymphocyte sanguin après dénaturation au
2 - SSC, 60° C, 1 heure.

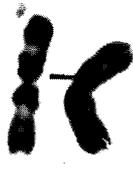
Coloration au Giemsa dans un tampon phosphaté de pH 6,8.



1



2



3



4



5



6



7



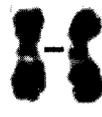
8



9



10



11



12



13



14



15



16



17



18



19



20



21



22



X



Y

Fig. 11 :

Caryotype monté d'une cellule KB, après dénaturation thermique (2 SSC, 60 ° C, 1 heure).

On voit l'apparition des bandes G (Giemsa positives), comparables pour une partie des chromosomes aux bandes G observées à partir de cultures de lymphocytes humains. On peut aussi noter l'existence de chromosomes supplémentaires (→) dont les bandes G ne correspondent pas aux chromosomes humains connus, et aussi la présence d'isochromosomes des bras longs et des bras courts (⇐⇐).

Enfin, un chromosome particulier très grand est comparable à celui décrit par LIN en 1974 (94) après coloration à la quinacrine ; il semble être spécifique de la souche de cellule KB. ▲



1 2 3 4 5
A B C D E

6 7 8 9 10 11 12
F G H I J K L

13 14 15 16 17 18
M N O P Q R

19 20 21 22
S T U V W X Y Z



Parmi les 30 chromosomes supplémentaires, nous trouvons les autosomes dits "marqueurs". Ce sont parfois des isochromes de bras courts ou de bras longs, c'est-à-dire des chromosomes symétriques par rapport au centromère. D'autres chromosomes sont porteurs de portions chromosomiques transloquées, ces chromosomes, suite à des phénomènes de cassures et réparations, sont porteurs de portions chromosomiques appartenant à d'autres chromosomes. Tous ces chromosomes peuvent être plus facilement identifiés après traitement des lames par les techniques de dénaturation et observation des bandes G (70) (Fig. 11).

C. ISOLEMENT DE CHROMOSOMES METAPHASIQUES

A chaque étage de l'isolement, des contrôles optiques en contraste de phase du matériel fixé ou non fixé, indiquent que la morphologie du chromosome est préservée.

Le choc hypotonique est une étape importante au cours des manipulations d'isolement. Cette étape facilite l'homogénéisation par suite de l'augmentation du volume cellulaire (Fig. 12) et de la dispersion du volume cellulaire qui libère les chromosomes métaphasiques dans le cytoplasme tout en laissant intacte la membrane cytoplasmique.

Cette étape, pour les deux types d'isolement (Ph acide ou basique), s'effectue à 37° C pendant 20 à 30 minutes dans une solution saline hypotonique à pH neutre. On constate alors une augmentation du culot cellulaire après centrifugation.

Après fixation et coloration au Giemsa, qui permet la coloration du matériel nucléaire (chromosome métaphasique ou noyau interphasique), il devient possible de visualiser le chromosome, les résultats de ces observations sont donnés dans les fig. 13 a. et 14 a.

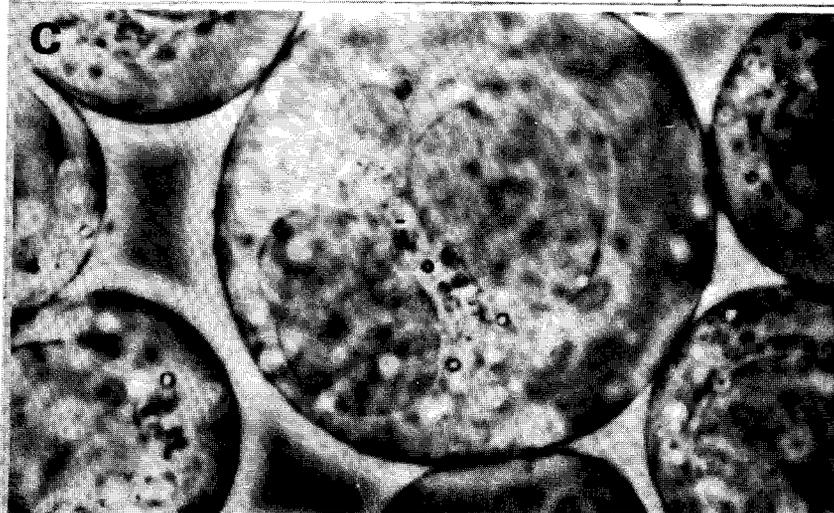
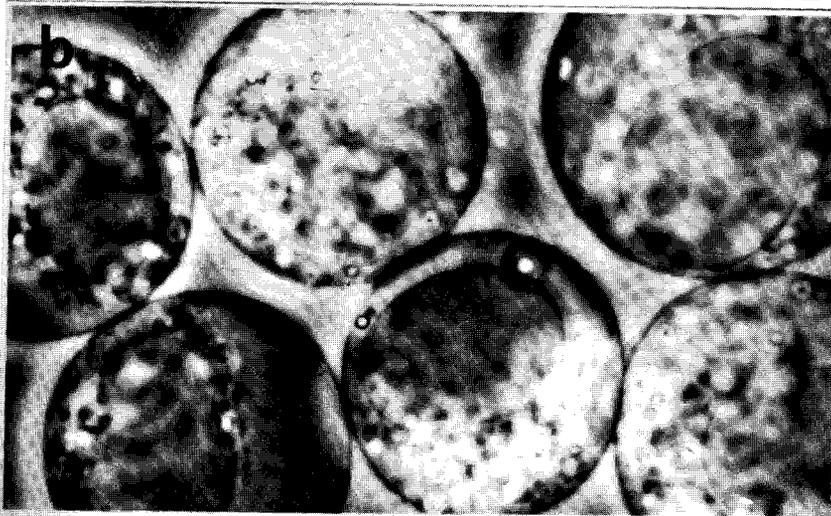
On remarque un pourcentage important (30 à 50 %) de cellules métaphasiques dû à l'addition de colchicine à la culture.

Fig. 12 :

Influence du milieu hypotonique sur la cellule KB.

- a. Cellules KB dans le milieu de culture.
- b. Cellules KB dans le milieu hypotonique
KCl 0,3 %, citrate 0,5 %.
5 mn à température ambiante.
- c. Cellule KB dans le milieu hypotonique
15 mn à température ambiante.

Photographies prises au microscope à contraste de phase - grossissement x 2 800.



BHS
LILLE

Après homogénéisation à l'aide d'un broyeur de type "DOUNCE", on peut observer la libération des chromosomes dans le milieu. Par broyage et surtout grâce à l'action de la saponine et de l'acide citrique, on obtient un mélange de chromosomes métaphasiques, de noyaux interphasiques et de débris cellulaires. Après fixation et coloration, la structure du chromosome est préservée, il reste formé de deux chromatides réunies au niveau du centromère de façon comparable au chromosome "in situ" (fig. 13 b. et 14 b.).

Par centrifugation différentielle dans du milieu d'homogénéisation ou par filtration à travers des filtres en verre fritté, il est possible de séparer chromosomes et noyaux en utilisant leur différence de taille (Fig. 13 c. et 14 c.).

L'ultracentrifugation (50 000 g - 1 h) à travers du sucrose 2,2M dans du tampon de pH 3 ou de pH 9 permet d'éliminer les contaminants cytoplasmiques et membranaires.

Le chromosome métaphasique, isolé à pH acide (Fig.15b) ou à pH basique (Fig. 15 c), conserve malgré les manipulations d'isolement une morphologie comparable à celle d'une cellule entière, ayant subi un choc hypotonique (Fig. 15a). Le chromosome reste formé de deux chromatides, et on observe que toutes des catégories de chromosomes sont présentes et rares sont les fragments acentriques.

Néanmoins, on peut remarquer que les chromosomes isolés à pH basique paraissent plus globuleux et plus contractés que ceux isolés à pH acide. D'autre part, il est difficile de conserver longtemps en solution les chromosomes isolés à pH basique, contrairement aux chromosomes isolés à pH acide que l'on garde dans le tampon acide plusieurs mois.

En conclusion, on peut dire que la technique d'isolement de chromosomes permet d'obtenir un matériel purifié, celui-ci peut être visualisé après coloration. Il est donc possible de faire des études parallèles cytologiques et biochimiques. L'isolement de chromosomes doit permettre d'expliquer les différentes modifications tinctoriales observées sur le chromosome après traitements dénaturants ou incorporation de précurseurs

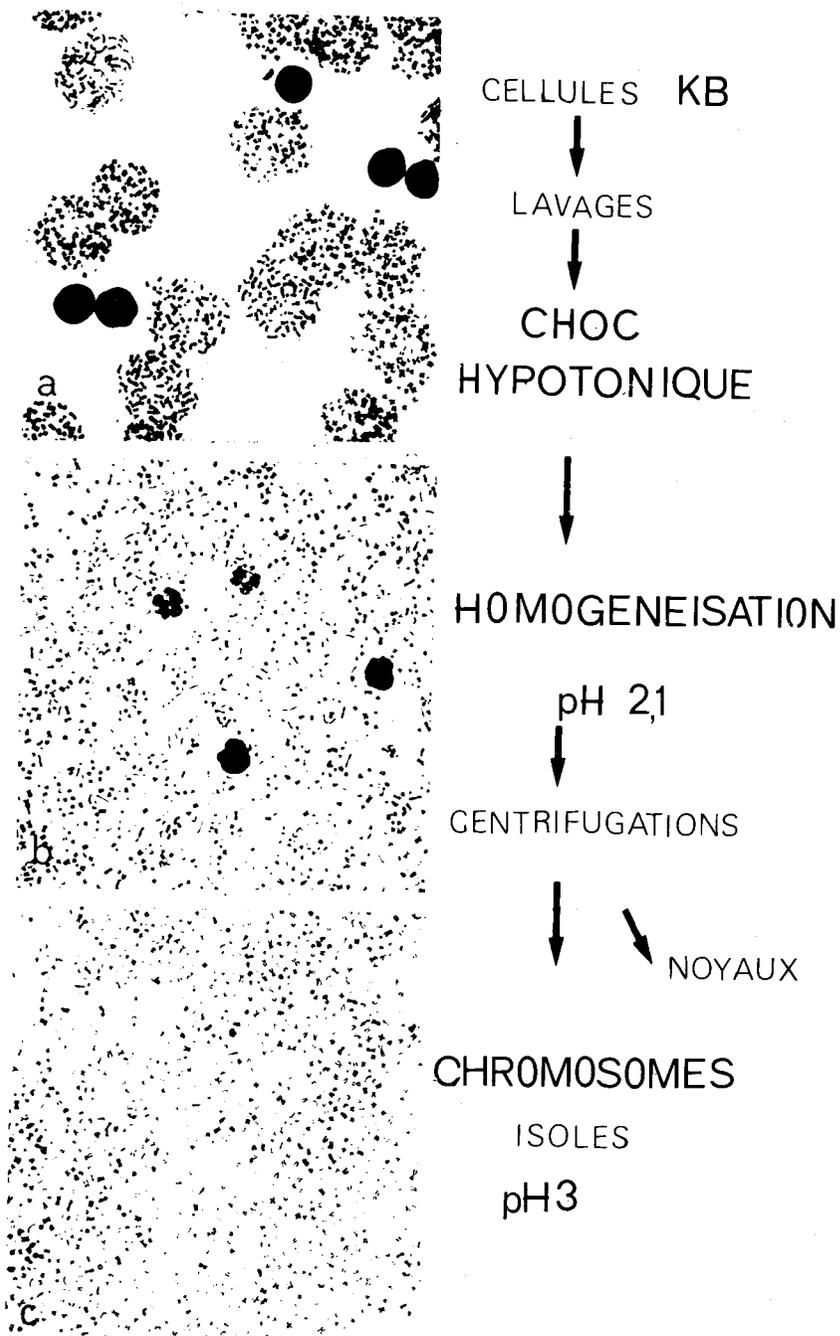


Fig. 13 a., b., c. :

Etapes de l'isolement de chromosomes métaphasiques à pH acide.

Après un choc hypotonique (citrate de sodium 0,5 % - $MgCl_2$ et $CaCl_2$ $10^{-3}M$), homogénéisation (acide citrique 2,5 % - sucrose 0,1M et saponine 0,05 % pH 2,1) et purification par centrifugation (20 000 RPM) à travers une solution de sucrose 2,2M dans un tampon de pH 3 (sucrose 0,1M, $MgCl_2$ et $CaCl_2$ $10^{-3}M$ ajusté à pH 3 par une solution d'acétate de sodium 1M dans HCl 1M).

Grossissement x 250. Fixation : méthanol/acide acétique (3:1).



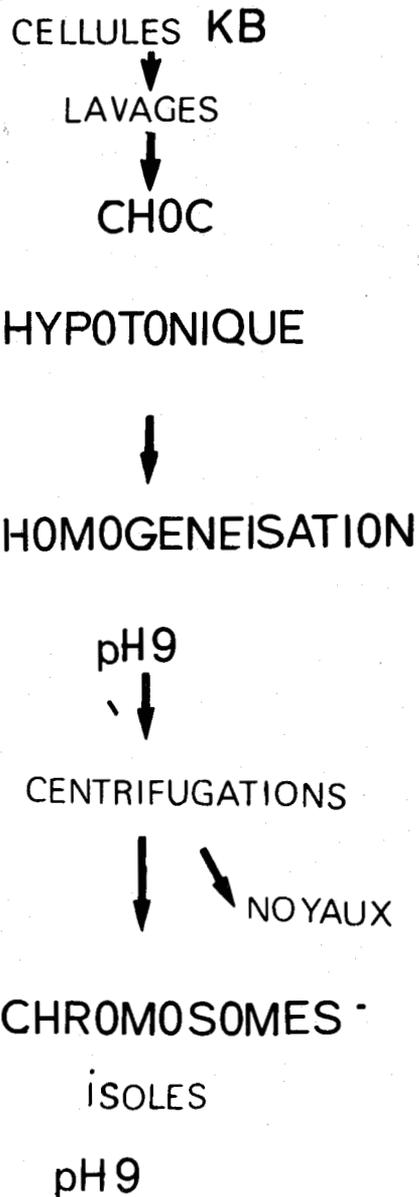
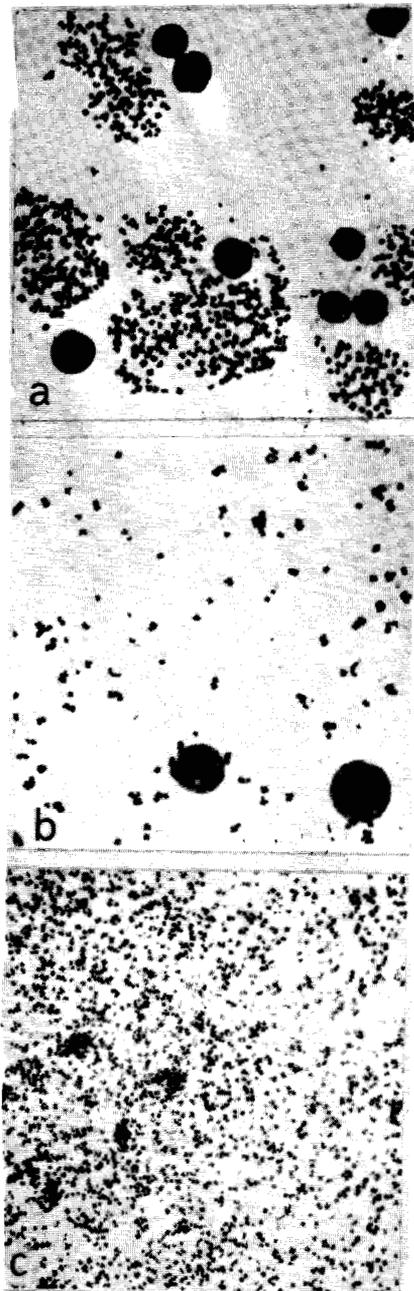


Fig. 14 a., b., c. :

Etapes de l'isolement de chromosomes à pH basique.

après un choc hypotonique (citrate de sodium 0,5 %, $MgCl_2$ et $CaCl_2$ $10^{-3}M$), homogénéisation (tris 0,02M, $CaCl_2$ $5 \times 10^{-3}M$, triton 0,05 % pH 9) et purification par centrifugation (20 000 RPM 1heure) à travers une solution de sucrose 2,2M dans ce même tampon sans triton.

Grossissement x 250.

Fixation : méthanol : acide acétique (3:1).

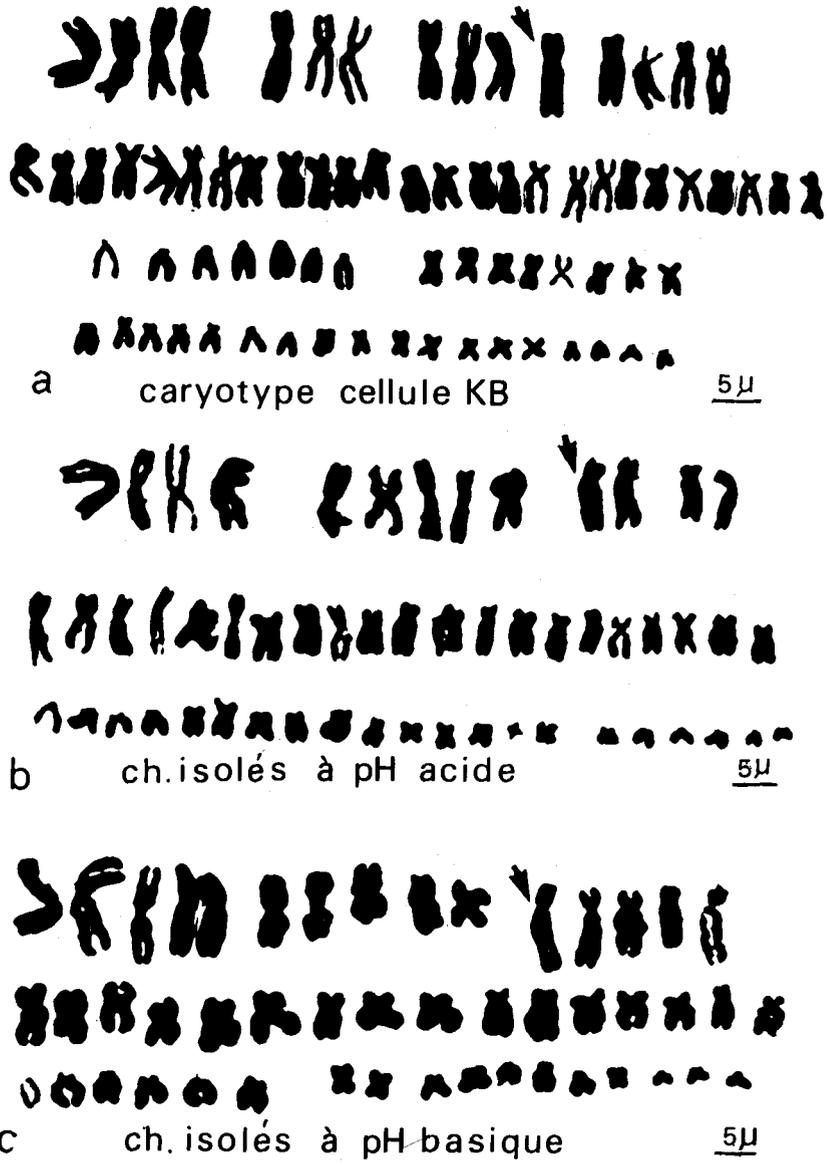


Fig. 15 :

- a. Caryotype d'une cellule KB métaphasique après choc hypotonique (citrate de sodium 0,5 %, MgCl₂ et CaCl₂ 10⁻³, 20 mn à 37° C). Fixation par le mélange méthanol/acide acétique (3:1).
- b. Reconstitution du caryotype de cellules KB à l'aide de chromosomes métaphasiques isolés à pH acide (CH pH3) (même fixation après étalement sur lame).
- c. Reconstitution du caryotype de cellules KB à l'aide de chromosomes métaphasiques isolés à pH basique (CH pH9) (même fixation après étalement sur lame).

Grossissement x 1 200. Au niveau des flèches, on remarque un chromosome marqueur des cellules KB.



d'acides nucléiques.

D. INCORPORATION DE 5 Br dU : MISE EN EVIDENCE PAR LES TECHNIQUES DE COLORATION

Les préparations de chromosomes métaphasiques in situ et isolées sont colorées, soit par le GIEMSA après dénaturation thermique et observées en microscopie optique, soit par l'acridine orange et observées ensuite en lumière UV selon la technique de COUTURIER

Ces chromosomes métaphasiques in situ et isolés de cellules KB ayant incorporé la 5 Br dU présentent des aspects comparables à ceux des lymphocytes humains traités dans des conditions identiques (46) (47) (91) (182) (183).

En effet, dans la cellule KB (fig. 16 a), comme dans le lymphocyte humain (fig. 18 b), l'incorporation du précurseur pendant 72 heures fait apparaître, après dénaturation et coloration par le Giemsa, ou par coloration à l'acridine orange et observation en lumière UV (Fig. 17 a, 18 a) une affinité différente des chromatides d'un même chromosome pour le colorant utilisé. Certains chromosomes présentent une chromatide fortement colorée tandis que l'autre chromatide fixe moins le colorant et reste terne. (Cellules KB, fig. 16 a, 17 a) (Lymphocytes fig. 18 a, 18 b).

L'isolement des chromosomes de cellules KB ne perturbe pas cette coloration différentielle des chromatides.

Nous retrouvons des chromosomes isolés formés de deux chromatides dont l'une homogène est fortement colorée, l'autre également homogène, fixant peu le colorant (Fig. 16 b et 17 b).

Il est possible aussi de voir des différences de taille de chromatide. En effet, au niveau des deux chromatides soeurs, la chromatide fortement colorée apparaît plus courte (Fig. 16 c). Après coloration à l'acridine orange, les chromosomes montrent une fluorescence jaune intense au ni-

veau d'une chromatide, tandis que l'autre rougeâtre apparaît terne et parfois plus longue.

Ces techniques de coloration, après incorporation de 5 Br dU permettent aussi de mettre en évidence des échanges de portions chromosomiques entre deux chromatides soeurs. Ces fragments échangés peuvent être de petite ou de grande taille (Fig. 16 c). Nous observons en lumière UV après coloration à l'acridine orange les mêmes échanges entre deux chromatides soeurs qui se traduisent soit par la fusion longitudinale de fragments chromatidiens de brillance différente, soit plus rarement par l'insertion au niveau d'une chromatide d'un fragment de brillance différente (Fig. 17 c).

Enfin, il nous a été possible de trouver des chromosomes dont l'ADN des deux chromatides a incorporé la 5 Br dU. Le chromosome présente alors deux chromatides uniformément pâles après coloration au Giemsa (Fig. 16 c) ou peu fluorescentes après coloration à l'acridine orange (Fig. 17 c).

Ces observations, coloration différentielle, échange de portions chromosomiques, chromosomes dont les deux chromatides ont incorporé ou différences de taille de chromatides sont indépendantes du matériel employé car nous retrouvons les mêmes résultats, soit à partir de cultures de lymphocytes humains, soit de culture de cellules KB. La différence essentielle se situe au niveau de la quantité de 5 Br dU ajoutée à la culture ; en effet, il faut vingt fois plus de précurseur pour une culture de sang que pour une culture de cellule KB. Ceci est dû vraisemblablement tout d'abord à une différence de vitesse de division, les cellules KB se divisent plus vite que les lymphocytes humains et aussi à une différence de perméabilité de la membrane cytoplasmique.

On peut voir aussi un rôle de la composition du milieu de culture. Les cellules KB sont cultivées dans un milieu pauvre (Minimum Essential Medium) sans thymidine ce qui favorise l'incorporation de 5 Br dU, tandis que les cultures de lymphocytes utilisent un milieu plus riche, le milieu de Mac Coy qui nécessite l'addition d'une quantité supérieure de 5 Br dU.

Fig. 16 :

- 16 a. : Chromosomes métaphasiques in situ de cellules KB ayant incorporé la 5 Br dU pendant 72 h. Après coloration au Giemsa, il existe une affinité tinctoriale différentielle entre les chromatides.
- 16 b. : Chromosomes métaphasiques isolés de cellules KB ayant incorporé la 5 Br dU pendant 72 h. Coloration au Giemsa.
- 16 c. : Principaux types de chromosomes observés après incorporation de 5 Br dU pendant 72 h et coloration au Giemsa :
- a) Mise en évidence de l'affinité tinctoriale différentielle entre les chromatides d'un même chromosome. La chromatide dont l'ADN contient de la 5 BrdU apparaît pâle et plus longue que la chromatide dont l'ADN n'est pas substitué.
 - b) Mise en évidence d'échanges de portions chromosomiques entre chromatides soeurs.
 - c) Chromosomes qui ont une faible affinité pour le Giemsa. Leurs deux chromatides contiennent un ADN dans lequel la thymidine est remplacée par la 5 Br dU.

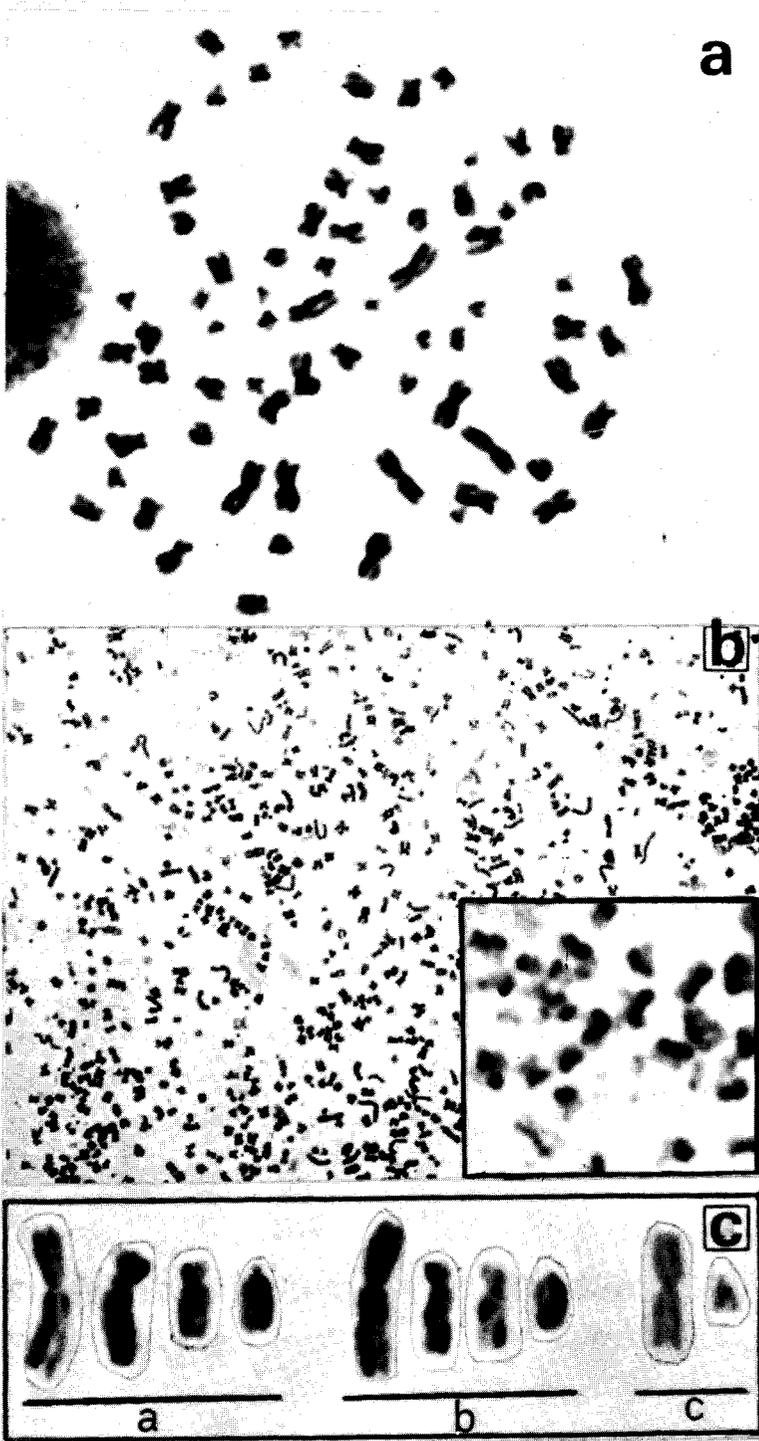
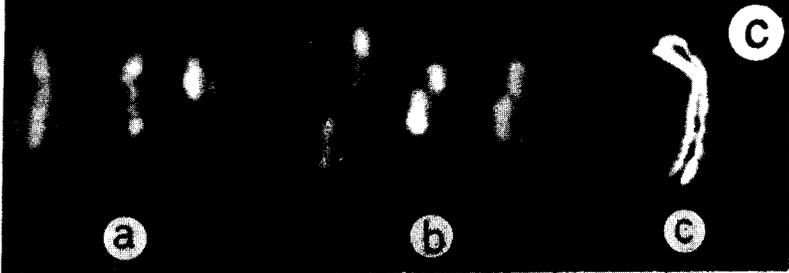
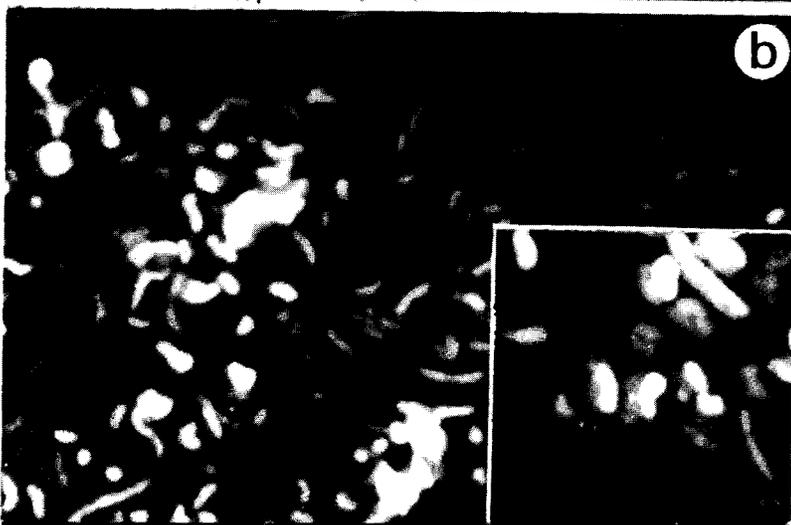
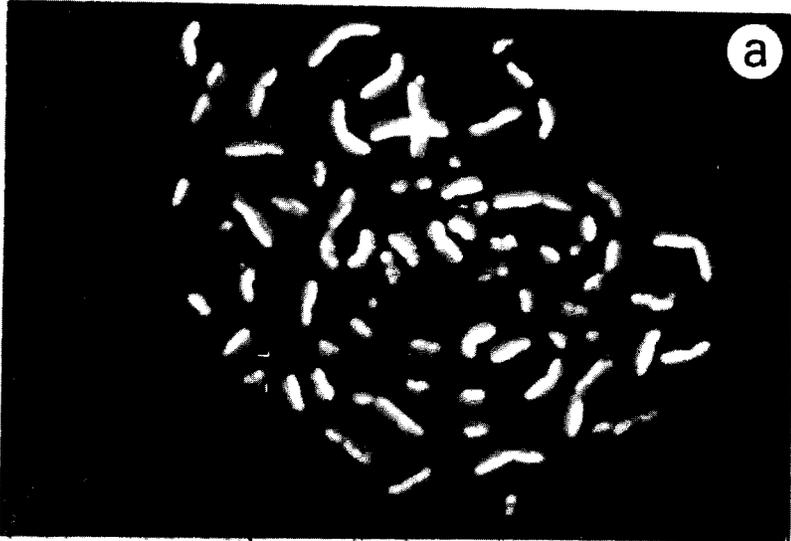


Fig. 17 :

- Fig. 17 a. : Métaphase de cellule KB après incorporation de 5 Br dU pendant 72 heures. Coloration à l'acridine et observation au microscope à fluorescence. Les chromosomes présentent une chromatide fortement fluorescente et une chromatide dite "éteinte". Cette dernière contenant la 5 Br dU.
- Fig. 17 b. : Les différents aspects observés par coloration à l'atébrine sur les métaphases sont retrouvés sur les chromosomes isolés. C'est-à-dire une coloration différentielle des deux chromatides soeurs.
- Fig. 17 c. : a) Chromosome présentant une chromatide fortement fluorescente et une chromatide "éteinte".
b) Mise en évidence d'échanges de portions chromosomiques entre chromatides soeurs.
c) Chromosome provenant d'une cellule endorédupliquée. Chaque chromatide est constituée de deux sous-unités de brillance différente. La partie interne de chaque chromatide est fortement fluorescente contrastant avec la partie externe pâle.





BUS
LILLE

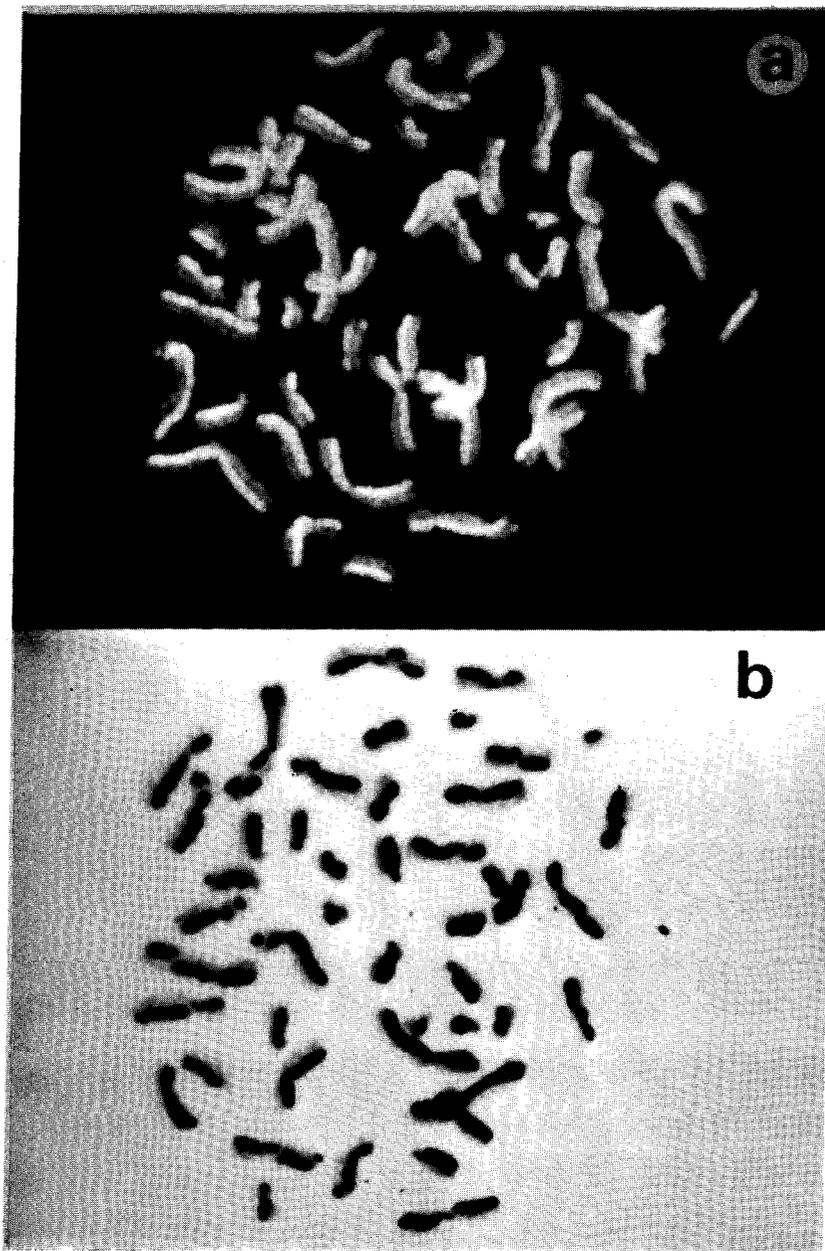


Fig. 18 :

- a. Métaphase de lymphocytes sanguins humains après incorporation de 5 Br dU pendant 72 heures (200 µg/ml). Coloration à l'atébrine et observation au microscope à fluorescence. On note la présence d'une chromatide fortement fluorescente et d'une chromatide éteinte, cette dernière contient la 5 Br dU.
- b. Métaphase de lymphocytes sanguins humains après incorporation de 5 Br dU pendant 72 heures (200 µg/ml). Mise en évidence des échanges chromatidiens par coloration au Giemsa après dénaturation thermique. On remarque la présence d'une chromatide fortement colorée et d'une chromatide faiblement colorée.



E. ASPECT DES CHROMOSOMES AYANT INCORPORÉ LA 5 Br dU PUIS TRAITÉS POUR L'OBSERVATION DES BANDES G ET Q

L'ADN du chromosome étant modifié ainsi qu'en témoigne la coloration différentielle des deux chromatides, il était alors nécessaire de vérifier si la 5 Br dU modifiait l'apparition des bandes G et Q.

L'incorporation de 5 Br dU au niveau de l'ADN chromosomique ne perturbe pas l'apparition des bandes G comme le montre la figure 19 a. En effet, les chromosomes isolés, ayant incorporé la 5 Br dU, gardent la possibilité de marquage de type G, identique à celle observée sur des chromosomes témoins n'ayant pas incorporé de précurseur (Fig. 19 b).

De même, après coloration à la "quinacrine moutarde", on retrouve une analogie de nombre et de répartition des bandes Q entre les témoins chromosomes in situ et isolés et les chromosomes ayant incorporé la 5 Br dU (Fig. 20 a et 20 b).

On peut donc dire que l'apparition de la coloration différentielle entre les chromatides d'un même chromosome, après incorporation de 5 Br dU et l'apparition des bandes G et Q, semblent être deux phénomènes indépendants quant à leurs causes, bien que dans les deux cas, on assiste à une modification tinctoriale du chromosome.

2. OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

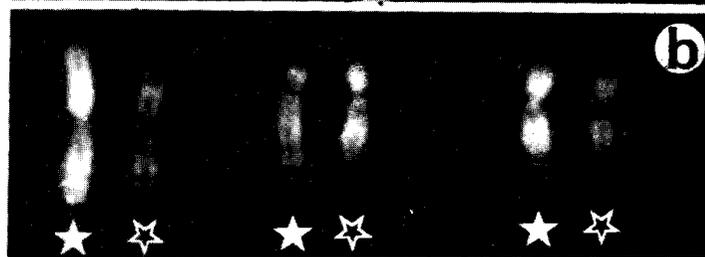
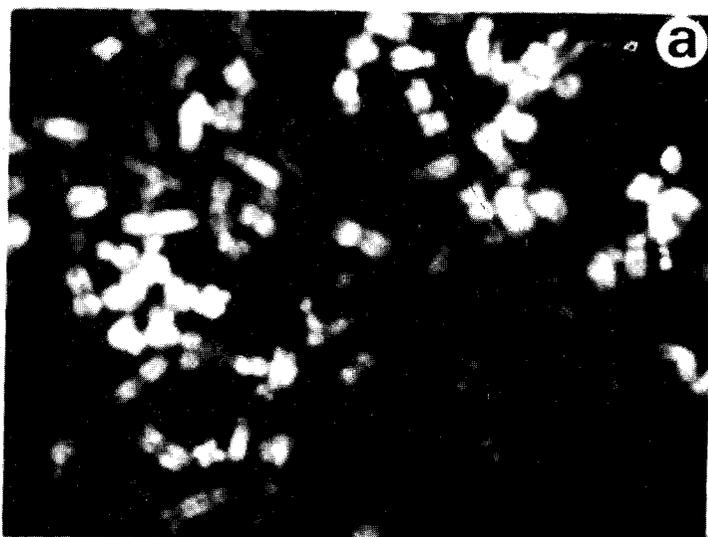
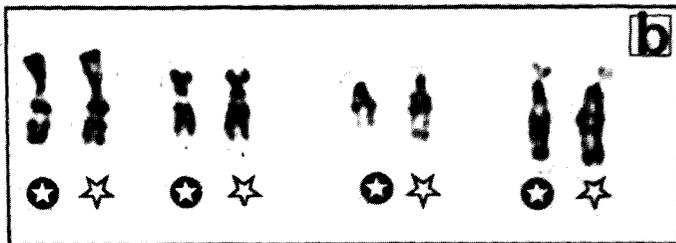
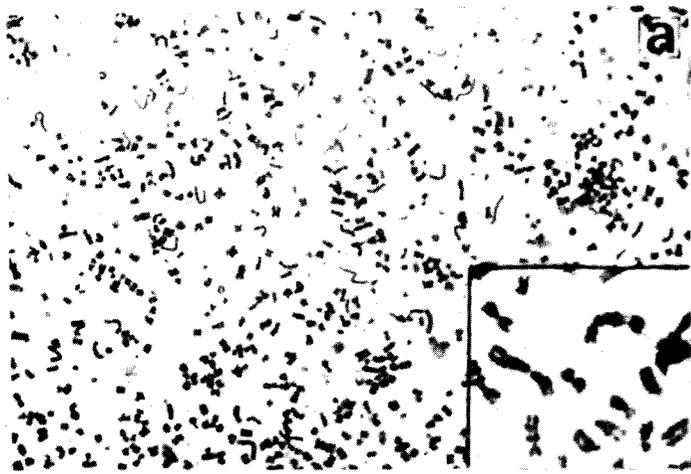
Après les différents contrôles optiques montrant que le chromosome isolé à pH acide gardait sa structure malgré les différents traitements au cours de l'isolement, il était nécessaire de vérifier si ce chromosome isolé gardait son intégrité ultrastructurale.

Fig. 19 :

- a. Chromosomes métaphasiques isolés de cellules KB après incorporation de 5 Br dU pendant 72 heures, puis traités par le 2 SSC pour l'observation des bandes G après coloration au Giemsa (GURR).
- b. Comparaison des bandes G avant et après incorporation de 5 Br dU. Le nombre et la répartition des bandes étant identiques entre chromosome témoin  et chromosomes ayant incorporé la 5 Br dU  , on sait que celle-ci ne perturbe pas l'apparition des bandes G.

Fig. 20 :

- a. Chromosomes isolés après incorporation de 5 Br dU, puis colorés à la "quinacrine moutarde" pour l'obtention des bandes Q.
- b. La comparaison des bandes "Q" obtenues avant et après incorporation de 5 Br dU montre qu'il existe une identité du nombre et de la répartition des bandes Q entre chromosomes témoins  et chromosomes ayant incorporé la 5 Br dU  .



BUS
LILLE

A. COLORATION DE CHROMOSOME "IN SITU" : EXAMEN DE CELLULES ENTIERES
DANS LE MILIEU HYPOTONIQUE

A ce stade de l'isolement, les cellules métaphasiques restent mélangées aux cellules interphasiques. Le choc hypotonique permet de libérer les chromosomes de fuseau, ceux-ci sont alors libres dans le cytoplasme de la cellule. Les cellules métaphasiques observées, en microscopie électronique, montrent à faible grossissement des chromosomes ayant une structure comparable à celle observée en microscopie optique (Fig. 21 a), c'est-à-dire un chromosome formé de deux chromatides réunies au niveau du centromère. Mais à plus fort grossissement, on constate que le chromosome métaphasique est constitué d'un réseau fibrillaire que l'on peut différencier en :

- réseau chromosomique : les fibres sont condensées et forment la structure globale du chromosome ou des chromatides (Fig. 21 a).
- un réseau interchromatidien : les fibres observées connectent transversalement les deux chromatides d'un même chromosome (Fig. 21 b).
- un réseau interchromosomique : le réseau fibrillaire relie alors deux chromosomes voisins (Fig. 21 a).

Le diamètre moyen de ces fibres interchromatidiennes est d'environ 200 Å. Il est possible d'observer des fibres du réseau interchromosomique d'un diamètre de 420 Å à 800 Å.

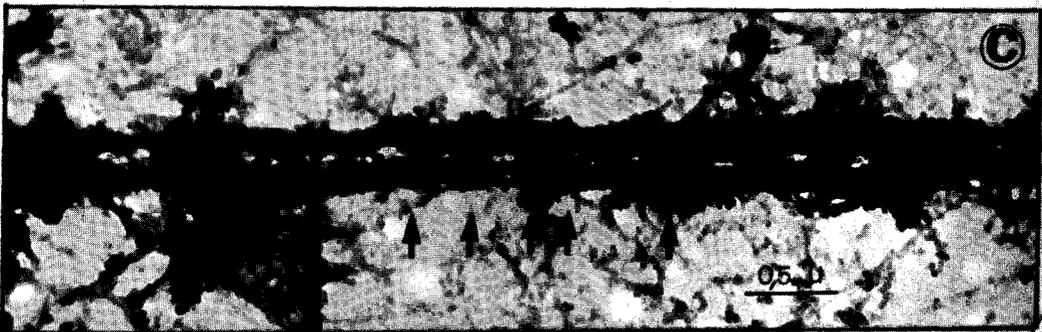
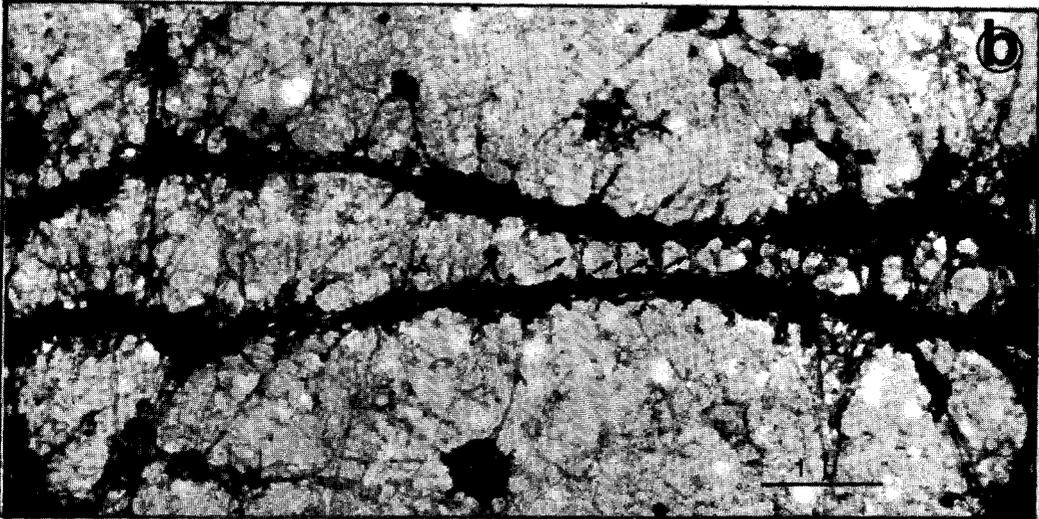
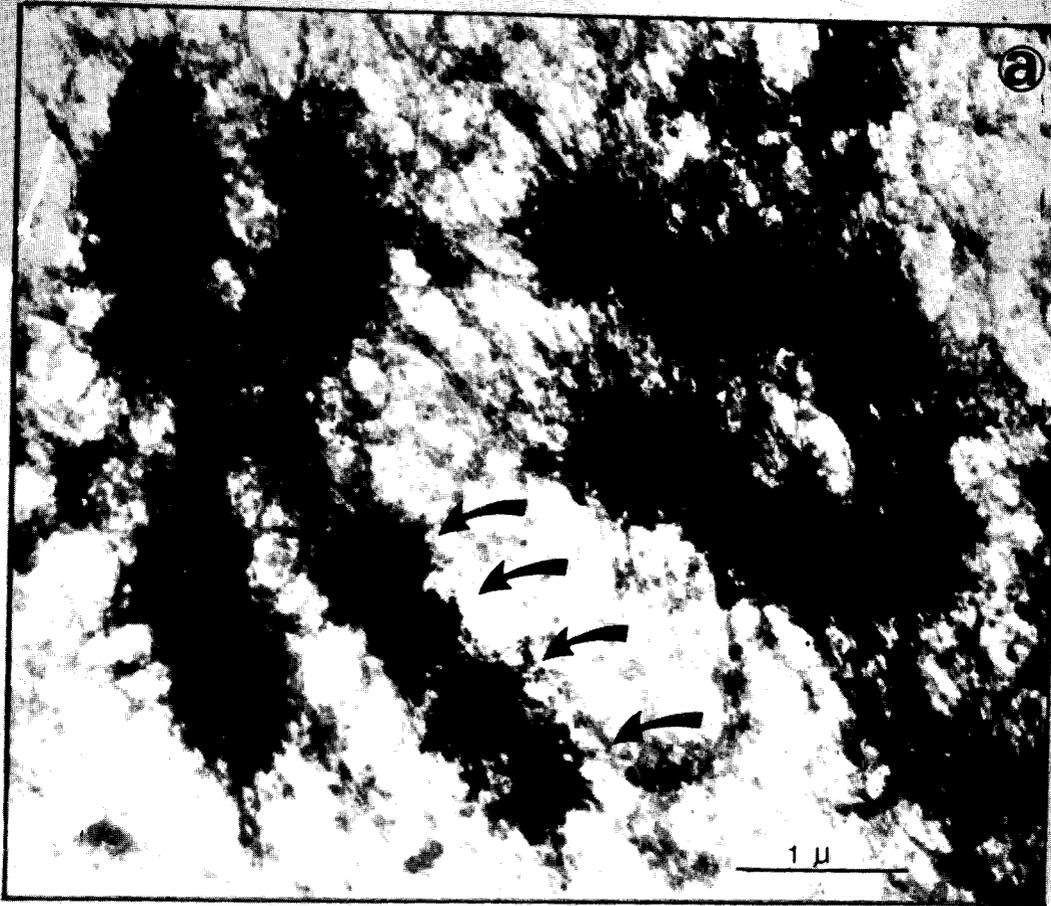
Nous observons aussi des épaisissements des fibres chromatidiennes (Fig. 21 c).

B. OBSERVATION DE CHROMOSOMES ISOLEES ET PURIFIEES A pH ACIDE

Dans ces préparations, les chromosomes sont, soit isolés (Fig. 22 b), soit agglutinés (Fig. 22 a), ils sont contractés et les chromatides apparaissent formées d'une zone axiale compacte. On observe aussi une

Fig. 21 : Chromosomes "in situ".

- a. Les deux chromatides sont constituées d'un réseau fibrillaire très dense. Mise en évidence d'un réseau interchromosomique.
- b. Chromosomes métaphasiques étirés. Mise en évidence des fibres interchromatidiennes.
- c. Mise en évidence d'épaississements similaires aux bandes G.



BIIS
LILLE

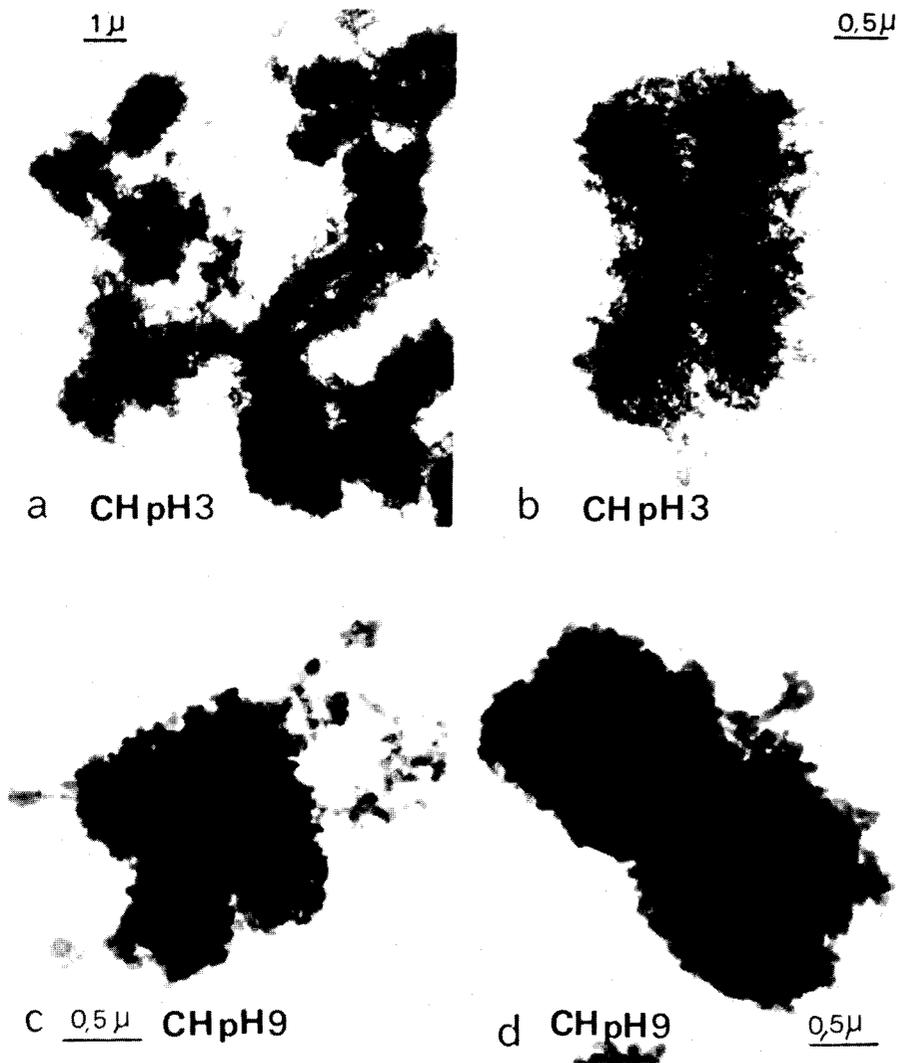


Fig. 22 : Etude au microscope électronique de :

a et b : chromosomes métaphasiques isolés à pH acide (CH pH3).

c et d : chromosomes métaphasiques isolés à pH basique (CH pH9).

Grossissement : a x 5 900
 b x 13 200
 c et d x 22 000.

zone périphérique formée de fibres enchevêtrées dont le diamètre mesurable est de 180 à 230 Å. Ces fibres marginales forment des boucles qui reviennent vers la zone axiale du bras chromosomique, tandis que d'autres longent l'axe chromatidien.

Nous retrouvons donc dans le chromosome in situ un réseau de fibres chromosomiques, un réseau de fibres interchromatidiennes, mais le réseau interchromosomique a pratiquement disparu et on observe encore ces fibres formant des faisceaux rectilignes entre des chromosomes regroupés.

En conclusion, on peut dire que le chromosome métaphasique isolé à pH acide résiste aux manipulations d'isolement. Le chromosome isolé possède les caractéristiques du chromosome in situ, c'est-à-dire une composition fibrillaire, même après conservation plusieurs mois dans un tampon de pH 3. Seul le réseau interchromosomique est affecté par les manipulations d'isolement ; il est rarement observable.

C. OBSERVATION DE CHROMOSOMES ISOLES ET PURIFIES A pH ACIDE APRES INCORPORATION DE 5 Br dU

Le même travail a été réalisé à partir de chromosomes ayant incorporé le précurseur. Il est à remarquer que le chromosome isolé à pH acide a une structure comparable à celle du chromosome témoin décrit précédemment, c'est-à-dire une structure fibrillaire. La taille des fibres marginales est la même 180 à 230 Å, nous n'observons pas de différences significatives à ce niveau malgré l'incorporation de 5 Br dU. Néanmoins, il est possible parfois de retrouver des chromosomes présentant un allongement de l'une des chromatides soeurs (Fig. 23 a), ce qui se rapproche des résultats obtenus après coloration, une chromatide paraissant plus courte que l'autre (Fig. 23 b).

Chaque chromatide est aussi dense aux électrons que sa voisine et rien ne laisse supposer l'existence de cassures ou d'échanges entre matériel chromosomique comme on peut les mettre en évidence après coloration.

D. EXAMEN DE CHROMOSOMES ISOLES ET PURIFIES A pH BASIQUE

Il nous a été possible d'observer en microscopie électronique des chromosomes isolés à pH basique qui présentent quelques différences morphologiques par rapport aux chromosomes isolés à pH acide.

La comparaison des chromosomes suivant le pH d'isolement montre (Fig. 22 c, d) que le chromosome isolé à pH basique paraît plus globuleux, plus contracté que celui isolé à pH acide (Fig. 22 a, b).

L'observation de ces chromosomes est plus difficile, car les deux axes chromatidiens sont très denses. La périphérie du chromosome montre peu de fibres marginales, le diamètre de celles-ci : 230 à 370 Å est supérieur à celui de chromosomes isolés à pH acide : 180 à 230 Å.

L'influence du pH d'isolement sur le chromosome se situe d'une part au niveau de la taille des fibres, le chromosome isolé à pH basique possède des fibres plus épaisses que le chromosome isolé à pH acide ; d'autre part, au niveau de la structure globale du chromosome, le chromosome isolé à pH basique a une structure fibrillaire plus serrée dans la partie axiale comme en périphérie et de ce fait il est impossible d'observer ce qui se passe à l'intérieur des fibres chromosomiques.

En conclusion, le chromosome métaphasique conserve sa morphologie malgré les manipulations des techniques d'isolement. Les résultats de la microscopie électronique confirment ceux de la microscopie optique.

C'est le chromosome isolé à pH acide qui est le plus comparable au chromosome in situ avec ou sans coloration préalable. Nous retrouvons aussi après incorporation de 5 Br dU un chromosome de structure fibrillaire comparable au chromosome témoin isolé à pH acide.

Mais la microscopie électronique ne nous permet pas de mettre en évidence des modifications possibles de l'unité fibrillaire chromosomique après incorporation de 5 Br dU. Seules des différences de taille de chro-

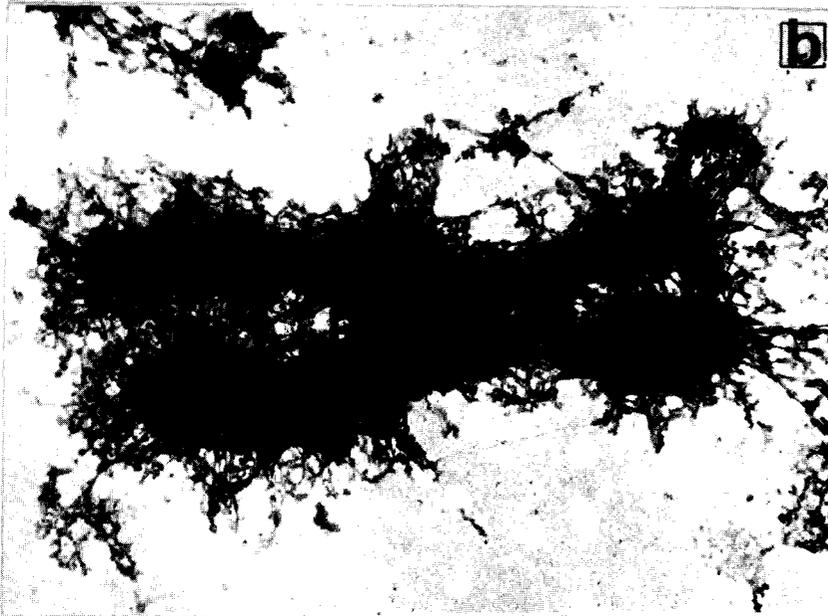
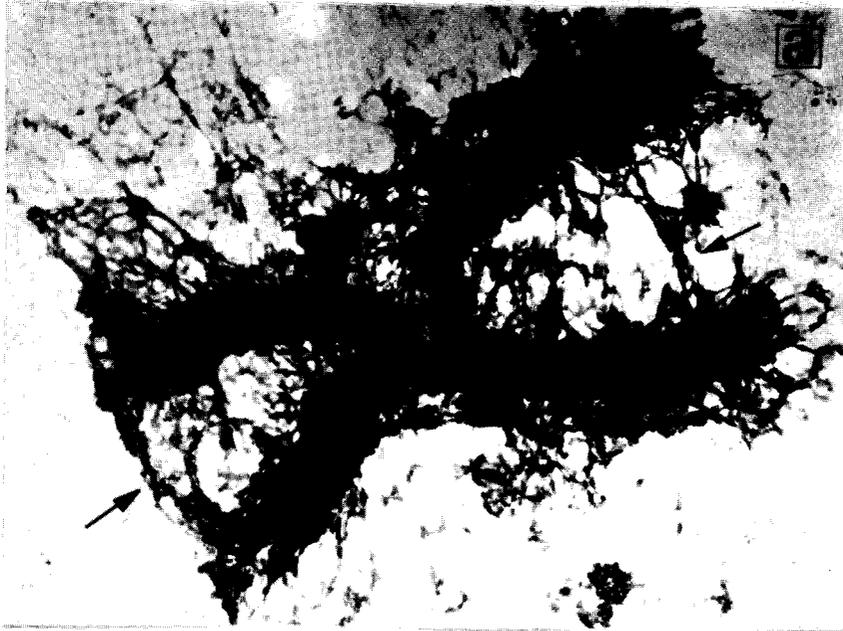


Fig. 23 :

- a. Après incorporation de 5 Br dU 72 heures, le chromosome métaphasique isolé garde les mêmes caractéristiques ultrastructurales que le chromosome "in situ". Il reste constitué de deux chromatides opaques aux électrons et réunies par un réseau interchromatidien (voir flèche) formé de fibres perpendiculaires à l'axe du chromosome.
- b. Quelques chromosomes isolés, après incorporation de 5 Br dU sont constitués de deux chromatides de taille différente mais celles-ci sont toutes deux aussi denses aux électrons.



matides ont pu, parfois, être observées. Par contre, le pH d'isolement influe sur l'épaisseur de la fibre chromosomique, le chromosome isolé à pH acide possédant des fibres plus fines que celles de chromosomes isolés à pH basique.

B/ RESULTATS BIOCHIMIQUES

1. DOSAGE DES CHROMOSOMES ISOLÉS À PH ACIDE

En disposant d'une quantité suffisante de chromosomes métaphasiques ayant conservé leur intégrité morphologique, il nous a été possible de procéder à l'analyse de leur composition globale en dosant successivement l'ARN, l'ADN et les protéines.

Chacune de ces fractions a été extraite suivant le protocole décrit dans le tableau 3 et dosé par colorimétrie par rapport à des témoins : ARN de levure, ADN de thymus de veau et sérum albumine pour les protéines. Les résultats sont consignés dans le tableau n° 5. On peut comparer nos résultats obtenus à partir de chromosomes de cellules KB isolés à pH acide par rapport aux résultats relatifs aux différentes techniques et matériels utilisés par les auteurs, résultats rapportés par HEARST et BOTCHAN (71).

L'ADN représente de 13 à 21 % du chromosome, l'ARN de 8 à 16 % et les protéines de 66 à 76 %.

L'importance de la fraction protéique nous a conduit à une étude plus fine de certains composants protéiques, ceci par des techniques électrophorétiques.

TABLEAU 5

ANALYSE BIOCHIMIQUE DE CHROMOSOMES METAPHASIQUES

Préparation et matériel	ADN	ARN	Proteines
CANTOR et HEARST Ascites de souris	13,5	13,5	68
HUBERMAN et ATTARDI Cellules Hela	15,7	10,4	73,9
MAIO et SCHILDKRAUT Cellules Hela	16,4	11,6	72
Cellules de hamster chinois	15,7	15,3	69
Cellules de hamster syrien	16,7	15	68,3
Cellules L	17	13,4	69,6
SADGOPAL et BONNER Cellules Hela : isolement et dosage d'après HUBERMAN et ATTARDI	15,6	8,7	75,7
d'après MAIO et SCHILDKRAUT	16,2	10,9	72,9
SALZMAN et coll Cellules Hela	20	14	66
RESULTATS PERSONNELS Cellules KB	21	10	69



2. ETUDE DES PROTÉINES ACIDO-SOLUBLES

A. CHROMOSOMES OU NOYAUX ISOLES A pH ACIDE

Par agitation une nuit, à 4° C, dans de l'HCl 0,25N ou H₂ SO₄ 0,4N, il est possible de solubiliser les protéines acido-solubles de chromosomes métaphasiques ou de noyaux interphasiques (tableau 4).

La figure 24 a. nous montre la migration électrophorétique des histones totales de thymus de veau témoin* : H₁, H_{2B}, H_{2A}, H₃ et H₄. Après isolement, la majorité des protéines acido-solubles extraites par HCl 0,25N des chromosomes métaphasiques ou des noyaux interphasiques correspondent aux fractions histoniques connues sous forme monomérique, sauf pour l'histone H₃.

Les figures 24 b. et 24 c. montrent respectivement les électrophorèses des protéines acido-solubles de noyaux et de chromosomes isolés à pH acide. Leurs enregistrements densitométriques correspondants présentent une grande similitude. Dans les deux cas, on note l'absence d'histone H₁ et une réduction importante des histones H_{2B} et H_{2A} par rapport à l'histone H₄. L'histone H₃ apparaît surtout sous forme de dimère, c'est-à-dire sous forme oxydée, de mobilité électrophorétique plus faible que celle de l'histone H₁. La forme dimère de H₃ disparaît après traitement de la préparation par le bêta mercapto-éthanol (Fig. 24 d. et 24 e.). L'histone H₃ apparaît alors sous forme monomère ou réduite.

L'extraction par H₂ SO₄ 0,4N au lieu d'HCl 0,25N des protéines acido-solubles (Fig. 25 b. et 25 c.) donne des profils électrophorétiques sensiblement identiques. Néanmoins, avec un dépôt plus important, des différences sont observées dans la zone de migration comprise entre les formes dimères et monomères de l'histone H₃. Nous remarquons quelques pro-

* P. SAUTIERE. Institut de Recherche sur le Cancer de LILLE.

Fig. 24 :

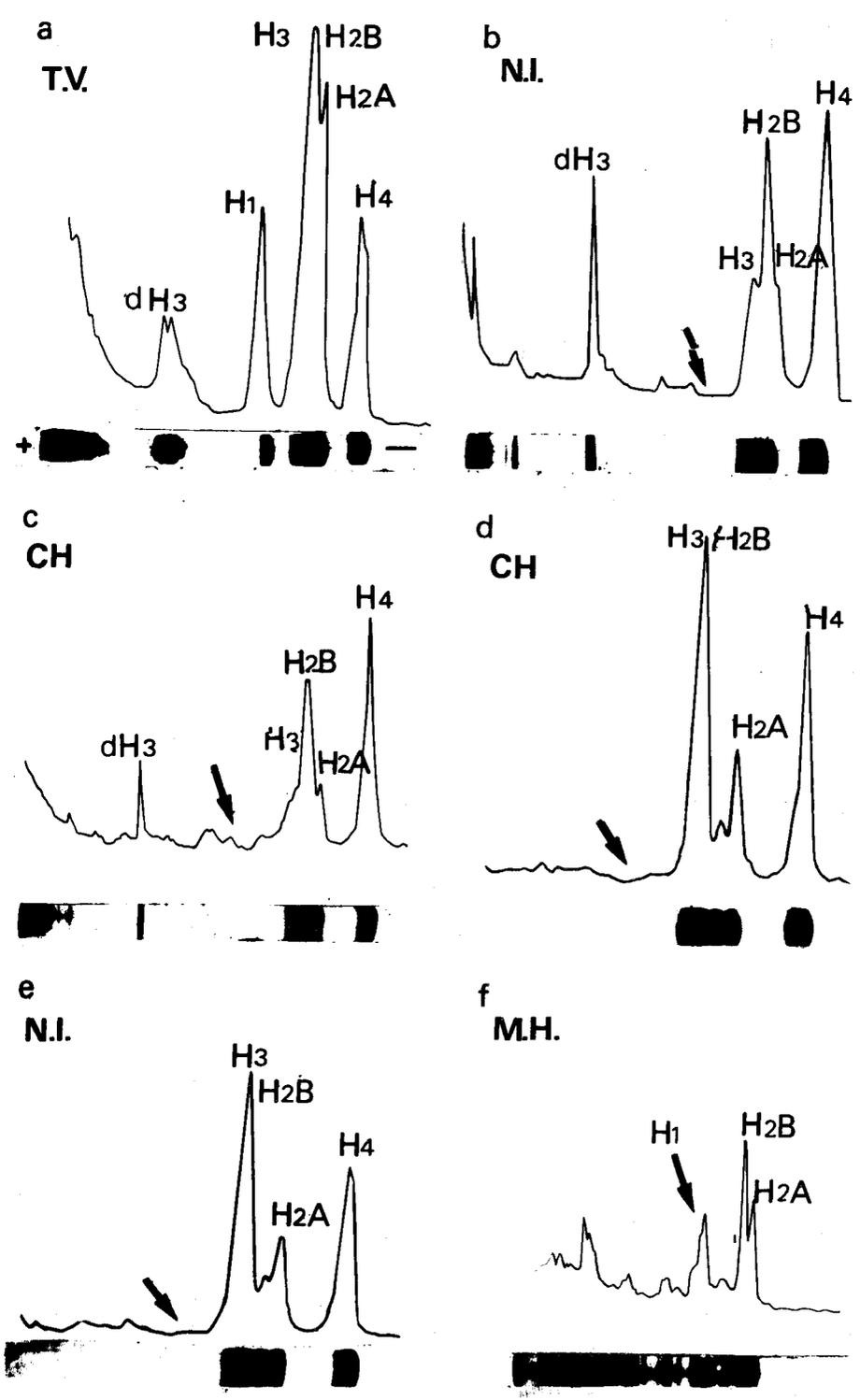
Analyse des protéines solubles dans HCl 0,25N par "disc" électrophorèse en gels de polyacrylamide à 17 p. 100 (dépôts 20 ul).

- a. Témoin : histones totales de T.V.
- b. Protéines acido-solubles de noyaux interphasiques isolés à pH acide.
- c. Protéines acido-solubles de chromosomes métaphasiques isolés à pH acide (CH pH3).
- d. Protéines acido-solubles de chromosomes métaphasiques isolés à pH acide, après traitement au bêta-mercapto-éthanol.
- e. Protéines acido-solubles de noyaux interphasiques isolés à pH acide après traitement au bêta-mercapto-éthanol.
- f. Protéines du milieu d'homogénéisation (pH 2,1) précipitables par l'A. T.C.A. à 20 p. 100 et solubles dans l'urée 8M, HCl 0,01N.

Nomenclature comparative des histones /

CIBA Symposium, Londres, 1974 : H1, H2B, H2A, H3, H4.

JOHNS (80) : F1, F2b, F2a2, F3, F2a1.



téines présentes dans le chromosome métaphasique et absentes dans le noyau. Ces protéines, en faible quantité, sont soit des protéines basiques acido-solubles, soit des protéines non-histoniques.

L'absence d'histone H_1 et la diminution des histones H_{2B} et H_{2A} ne sont pas liées à une extraction imparfaite des protéines acido-solubles mais doivent être imputées à la technique d'isolement des chromosomes et des noyaux en milieu acide. En effet, dans le milieu d'homogénéisation à pH acide 2,1 (Fig. 24 f.), nous avons identifié les histones H_1 , H_{2B} et H_{2A} ainsi que des protéines d'origine cytoplasmique, membranaire ou non histoniques acido-solubles. Par contre, les histones H_3 et H_4 ne sont pas retrouvées dans le milieu d'homogénéisation. Nous n'avons mis en évidence aucune protéine dans le tampon de lavage acide des chromosomes par précipitation à l'ATCA à 20 %.

Cette différence de comportement entre les histones peut être due à leur sensibilité différente aux solutions salines et acides dilués. L'histone H_1 est la plus sensible, puis l'histone H_{2B} et H_{2A} , tandis que les histones H_3 et H_4 sont plus résistantes. Ce fait explique sans doute leur disposition dans la fibre chromosomique, l'histone H_1 étant en position externe donc plus facilement extraite.

B. CHROMOSOMES OU NOYAUX ISOLES A pH BASIQUE

L'étude électrophorétique des protéines acido-solubles de noyaux et de chromosomes isolés à pH basique (Fig. 26 b et 26 c) montre la présence de toutes les histones H_1 , H_{2B} , H_{2A} , H_3 et H_4 , dans des proportions comparables aux histones de thymus de veau témoin (Fig. 26 a). On note aussi la diminution importante de l'histone H_3 sous forme dimère. Le contrôle électrophorétique des protéines extraites du milieu d'homogénéisation fait ressortir l'absence de toutes fractions histoniques (Fig. 26 d). Ce résultat montre une meilleure conservation des protéines acido-solubles du chromosome à pH basique.

Fig. 25 :

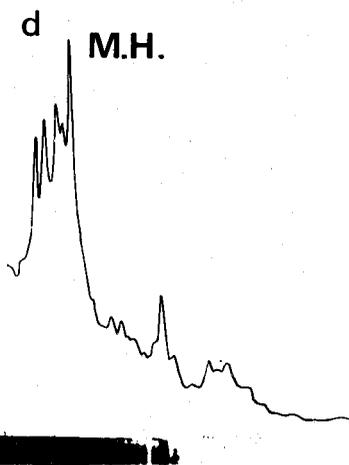
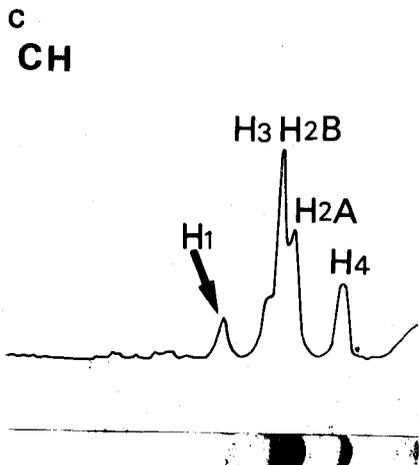
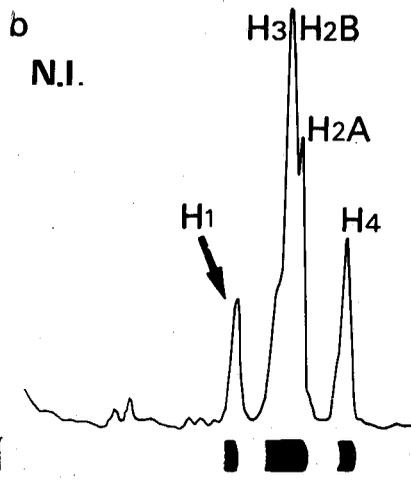
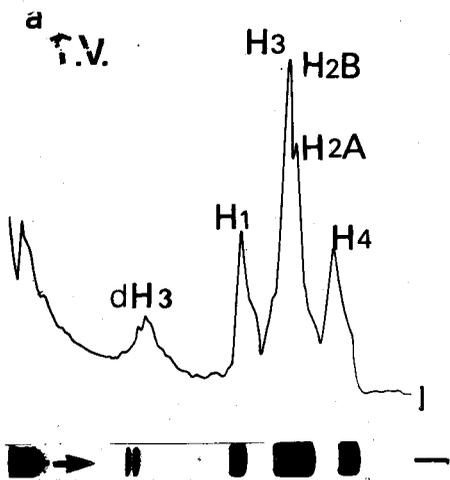
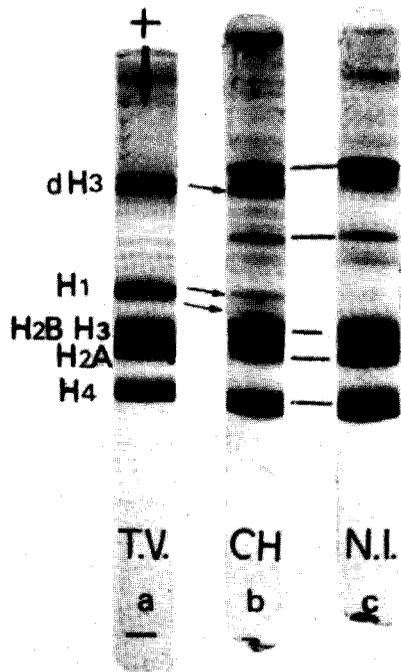
"Disc" électrophorèse d'histones extraites par H_2SO_4 0,4N de chromosomes et de noyaux isolés à pH acide.

- a. Histones de thymus de veau.
- b. Histones de chromosomes isolés en milieu acide.
- c. Histones de noyaux interphasiques.

Fig. 26 :

Analyse des protéines solubles dans HCl 0,25N, par "disc" électrophorèse en gels de polyacrylamide à 17 p. 100.

- a. Témoins histones totales de thymus de veau.
- b. Protéines acido-solubles de noyaux interphasiques isolés à pH 9.
- c. Protéines acido-solubles de chromosomes métaphasiques isolés à pH 9
- d. Protéines du milieu d'homogénéisation basique précipitables par l'A. C.T.A. à 20 p 100 et solubles dans l'urée 8M, HCl 0,01N.



C. CHROMOSOMES OU NOYAUX ISOLES A pH ACIDE APRES INCORPORATION DE
5 Br dU

Il est possible de réaliser le même travail à partir de chromosomes ou noyaux isolés après incorporation de 5 Br dU pendant 72 heures. Les enregistrements densitométriques des gels montrent que le précurseur ne modifie pas la composition en histones H₃, H_{2B}, H_{2A} et H₄ (Fig. 27 c) des chromosomes ou des noyaux (Fig. 27 b). L'histone H₁ reste absente du chromosome.

CONCLUSION

Quel que soit le pH utilisé pour la technique d'isolement, il n'existe pas de différences qualitatives entre noyaux interphasiques et chromosomes métaphasiques au niveau des histones. Seules quelques différences sont observées, surtout quand l'extraction des protéines est réalisée avec H₂SO₄ 0,4N (Fig. 25) et sont situées dans la zone de migration comprise entre les formes dimère et monomère de l'histone H₃. L'incorporation de 5 Br dU provoque des modifications tinctoriales du chromosome mais aucune modification des histones ne peut être décelée.

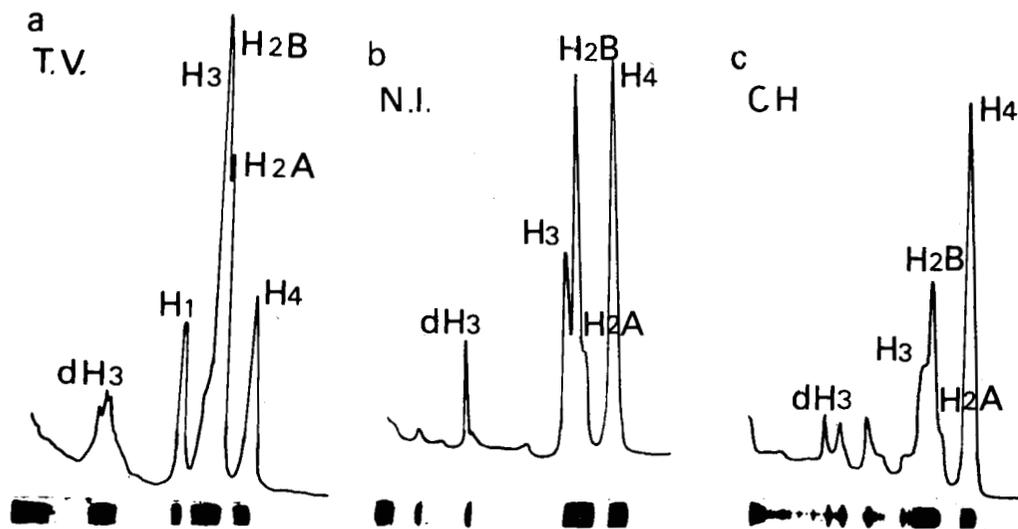


Fig. 27 :

Analyse des protéines solubles dans HCl 0,25N par "disc" électrophorèse en gel de polyacrylamide à 17 p. 100.

- a. Témoins histones totales de thymus de veau.
- b. Protéines acido-solubles de noyaux interphasiques après incorporation de 5 Br dU, isolés à pH acide.
- c. Protéines acido-solubles de chromosomes métaphasiques après incorporation de 5 Br dU, isolés à pH acide.

DISCUSSION

1. TECHNIQUE D'ISOLEMENT

La technique d'isolement de chromosomes métaphasiques permet donc d'obtenir un matériel dont il est possible de vérifier la pureté (absence de contaminants cytoplasmiques et membranaires). Ce matériel est colorable par les colorants du groupe des thiazines auquel appartient le Giemsa. Il est possible de visualiser ce matériel, après coloration, ou sans coloration, en contraste de phase en microscopie optique ou en microscopie électronique.

L'isolement pose néanmoins quelques problèmes. Le premier est l'aspect quantitatif. Les différentes étapes de l'isolement, notamment la séparation chromosomes métaphasiques et noyaux interphasiques, soit par filtration à travers des filtres en verre fritté, soit par centrifugation différentielle nous fait perdre beaucoup de matériel. Par purification à travers du sucrose 2,2 M tamponné, nous constatons aussi une diminution du culot de chromosomes.

Il est possible de préparer des chromosomes lyophilisés à partir de chromosomes isolés à pH acide, après dialyse contre l'eau permittée à 4° C, d'une suspension de chromosomes (de 5 à 10 mg de chromosomes purifiés et lyophilisés sont préparés à partir de 5 litres de culture cellulaire). Ces mêmes chromosomes lyophilisés sont capables de reprendre leur structure lorsqu'ils sont placés dans le tampon de pH 3.

On remarque donc la stabilité structurale de ce matériel isolé à pH acide.

Le second point est le choix de la technique d'isolement. En effet, à pH basique, ou même à pH neutre, le chromosome isolé conserve l'intégralité de ses composants histoniques mais il devient difficile d'obtenir une séparation noyau-chromosome d'une part, on note alors l'-

augmentation du phénomène d'aggrégation entre chromosomes ou même entre chromosomes et noyaux. D'autre part, à ce pH, la conservation est impossible un ou plusieurs mois car il est probable que les protéases et nucléases liées au matériel chromosomique dégradent celui-ci.

Dans la technique d'isolement à pH acide, l'homogénéisation (pH 2,1) dans l'acide citrique à 2,5 %, fait perdre au chromosome les histones H₁, H_{2B} et H_{2A} mais aussi des protéines non histoniques acido solubles mélangées à des protéines d'origine cytoplasmique et membranaire. L'électrophorèse des protéines précipitables à l'A.T.C.A. montre, dans la région de migration située au dessus de l'histone H₁, un nombre très important de protéines. Malgré ces pertes en protéines, le chromosome conserve toujours sa structure globale. C'est pour cette raison que nous avons choisi la méthode d'isolement à pH acide pour toutes nos techniques cytologiques car c'est à ce pH que le chromosome isolé possède l'aspect le plus comparable à celui observé à partir de métaphases fixées (ou chromosome "in situ"). La comparaison des chromosomes isolés à pH acide avec les chromosomes "in situ" en microscopie optique après coloration, comme en microscopie électronique après déshydratation, nous montre une structure comparable.

2. LA FIXATION

Toutes les observations cytologiques peuvent être faites sans fixation ni coloration en contraste de phase, mais généralement, il est préférable de fixer le matériel. L'emploi de solvants organiques, le plus souvent employé : méthanol - acide acétique 3 : 1 comme fixateur, entraîne une perte de fractions protéiques. BRODY (17) montre que 80 % des histones sont enlevées par le fixateur méthanol - acide acétique. Les histones les plus résistantes au solvant organique sont f₁ (H₁) et f_{2b} (H_{2B}), histones les plus labiles au cours des manipulations d'isolement. Mais ces résultats sont variables suivant le fixateur employé, car DICKS et JOHNS (40) ont montré que l'acide acétique à 45 % extrait prin-

ciatement les histones f₁ (H₁) et f_{2a2} (H_{2A}) tandis que l'alcool éthylique - acide acétique 3:1 enlève les histones f_{2a2} (H_{2A}) et f_{2a1} (H₄), ce dernier fixateur solubilise en plus des non-histones. Ces travaux ont été réalisés à partir de nucléoprotéines de thymus de veau.

On peut donc dire que toutes nos observations cytologiques, au microscope optique, après fixation et coloration, sont faites à partir de matériel altéré. La fibre unitaire, complexe ADN - histones et non - histones, est modifiée par perte de protéines suivant le fixateur employé. Notre fixateur est un mélange de méthanol et d'acide acétique (3:1) qui solubilise, en partie, les histones H₄, H_{2A} et H₃.

3. MODIFICATIONS DU CHROMOSOME

A. PHENOMENE DE "BANDING"

Les différentes techniques de "banding" du chromosome font apparaître sur celui-ci des modifications tinctoriales, visibles en microscopie optique après fixation et coloration au Giemsa (42) (55) (171) et parfois même après coloration et observation en microscopie électronique (19) (131).

L'apparition de bandes claires et sombres, spécifiques pour chaque chromosome, exige un traitement préalable dénaturant : enzymatique, chaleur, solutions salines, urée, soude diluée, etc... L'observation de ces bandes est possible sur des prophases et montre un "banding" très fin (181).

C'est en 1928 que HEITZ découvre dans le chromosome des parties plus colorées, ces régions sont appelées hétérochromatine. Depuis, COMINGS (33) montre que ces parties contiennent de l'ADN répétitif, c'est-à-dire présentant plusieurs fois les mêmes séquences de bases répétées. Sa loca-

lisation montre la non-uniformité de structure le long du chromosome. Cette hétérochromatine est formée d'ADN synthétisé en dernier durant la phase S, elle est plus condensée que le reste du chromosome.

Par coloration aux dérivés de la "quinacrine", CASPERSSON et coll en 1968 (25) montrent un "banding" très fin au niveau des chromosomes après observation au microscope à fluorescence ; ces bandes, qui adsorbent plus ou moins fortement ces colorants, sont appelées bandes Q. Les dérivés de la "quinacrine" colorent fortement les régions de l'ADN riches en Adénine et Thymines. Ces observations sont confirmées par les résultats immunologiques (39) (106), des anticorps anti A anti T font apparaître des bandes comparables à celles observées après coloration à la quinacrine.

On admet donc que les régions hétérochromatiques, d'un chromosome contiennent une forte proportion de groupements AT, d'où l'observation de bandes fluorescentes plus ou moins intenses suivant la répartition de ces groupements le long du chromosome. Il est possible d'observer une très forte fluorescence sur les bras longs du chromosome Y, chez l'homme, riches en séquences répétitives AT. On peut donc affirmer que l'apparition des bandes Q est due essentiellement à la composition en bases de l'ADN, les bandes Q⁺ correspondent aux régions riches en adénine et thymine (105).

Les derniers travaux de SILVER et ELGIN (147), utilisant des anticorps anti non-histones et mettant en évidence des bandes fluorescentes le long du chromosome, font penser qu'il doit exister un rapport entre la composition en bases de l'ADN le long du chromosome et sa composition en protéines. D'où un rôle probable des non-histones dans le "banding" observé sur le chromosome (169).

En effet, la comparaison entre bandes G et bandes Q montre que le Giemsa et la Quinacrine colorent les mêmes parties du chromosome (Fig. 1). On peut donc penser qu'il existe des différences, soit dans la composition de la chromatine : séquences de bases ou composition en protéines, soit dans la condensation de la fibre le long du chromosome.

Les travaux de MATSUI et SAZAKI (104) montrent, par électropho-

rèse comparative entre chromosomes traités par différents traitements dénaturants et chromosomes témoins, que le "banding" G est lié à l'existence de certaines protéines non-histoniques. Les bandes G+ représentent une chromatine thermostable formée d'ADN et de molécules de non-histones contenant beaucoup de ponts disulfures. Le rôle de ces protéines riches en groupements S-S est aussi remarqué par SUMNER (156). Dans ces travaux, ni les histones ni l'ARN ne seraient impliqués.

Nous abordons maintenant l'influence des autres protéines du chromosome : les histones. Les résultats des auteurs sont assez controversés. Il est possible d'obtenir des bandes G sur les chromosomes après traitement des lames à l'acide chlorhydrique dilué (32), donc ces protéines n'interviendraient pas dans le phénomène de "banding". Mais plus récemment, BOBROW et coll (18) montrent que l'obtention des bandes G nécessite seulement la perte des histones H₁ et H_{2A}, qui sont perdues dans la fixation, les autres histones ne seraient pas impliquées. En effet, des travaux récents (37) montrent, d'une part qu'il y a fixation régulière et uniforme de l'histone H₁ le long du chromosome ne permettant pas de déceler une alternance de bandes claires et sombres et surtout qu'il y a persistance de cette fixation régulière après traitement des préparations par les techniques de "banding". D'autre part, il existe une compétition H₁-Giemsa, ces deux composants ayant les mêmes sites de fixation le long du chromosome. Le dépôt d'histone H₁ empêche la coloration du chromosome. Ces résultats sont confirmés par les terniers travaux * effectués au laboratoire à partir de l'histone H₅ d'érythrocyte de poulet, protéine très basique riche en arginine et lysine de composition voisine de l'histone H₁ (60) (139) (140). Il est possible de scinder et d'isoler à partir de cette histone H₅ deux fractions : l'une polaire, l'autre hydrophobe dont la composition et la séquence en acides aminés est pratiquement connue*.

Il s'avère que la fraction polaire, très riche en lysine et en arginine possède une spécificité de fixation le long du chromosome plus forte que l'histone H₁, d'où un rôle possible dans le "banding" d'une

* Résultats non publiés.

fraction d'histone.

Nous avons pu constater que le chromosome isolé à pH 3, malgré les pertes en protéines histoniques H_1 et H_{2B} , donc au niveau de la fibre de chromatine, conserve ses propriétés de "banding" (bandes G et Q). On peut donc penser que ce phénomène n'est pas altéré par la structure unitaire de la fibre chromosomique, car, en plus, lorsque nous modifions l'ADN par incorporation de 5 Br dU, le chromosome conserve toujours ces propriétés de "banding".

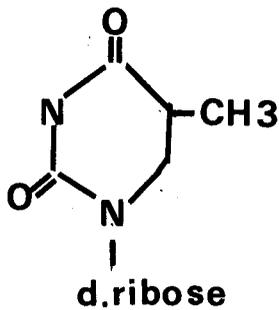
La répartition des histones le long de la fibre chromosomique n'est pas uniforme, les histones riches en arginine s'associent préférentiellement avec les régions de l'ADN riches en groupements G-C (27) d'une part, les histones riches en lysine s'associent plutôt avec les régions riches en A-T d'autre part. Cette non uniformité peut être mise en évidence par un sérum anti-histone (23) (38) (154), de plus il faut signaler le rôle attribué à l'histone H_1 dans la condensation de la chromatine (13), il est possible d'obtenir un effet inverse par compétition après addition de polyanions.

En conclusion, le phénomène de "banding" est complexe. Il fait intervenir deux constituants du chromosome : l'ADN car on obtient un "banding" Q sans traitement préalable, et les protéines car un traitement enzymatique fait apparaître un "banding" G. Il est très probable que seules certaines non-histones aient un rôle dans ce phénomène. Mais nous pensons que, quelles que soient les zones G+ ou G- du chromosome, celui-ci possède toujours des groupements PO_4 - libres, ce qui permet la fixation de l'histone H_1 ou d'une autre protéine basique (37).

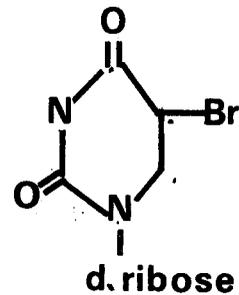
B. INCORPORATION DE 5 Br dU

Une autre modification possible du chromosome peut être obtenue par addition au milieu de culture d'analogues structuraux. La 5 Br dU, analogue de la thymidine, prend la place de celle-ci dans la chaîne d'ADN et a pour propriété, suite à l'incorporation pendant trois cycles cellu-

lares, de modifier les propriétés tinctoriales du chromosome, mais cette fois de façon linéaire tout au long du chromosome.



Thymidine



5 Br-dU

Sous sa forme cétonique la plus courante, la 5 Br dU prend la place de la thymidine (Fig. 28) (il existe une forme énol, plus rare, qui permet son appariement avec la guanidine).

Cette intégration dans la molécule d'ADN se produit au moment de la replication du chromosome (en phase S). Lors de la première mitose, les deux chromatides du chromosome métaphasique répliqué possèdent un ADN dont l'une des chaînes contient la 5 Br dU à la place de la thymidine. Ce chromosome, après un cycle cellulaire, conserve l'aspect du chromosome non soumis à l'incorporation. (Fig. 29).

Le cycle cellulaire normal aboutit à la disjonction des chromatides qui vont ensuite se répliquer au cours d'une deuxième mitose. Les chromosomes métaphasiques obtenus seront formés de deux chromatides dont l'une possèdera un ADN extrêmement substitué, l'autre chromatide possédant encore une chaîne d'ADN non substituée (Fig. 29). Cette incorporation, lors du deuxième cycle cellulaire, se traduit sur des préparations cytologiques, par une modification de la coloration entre les chromatides d'un même chromosome. En effet, en utilisant des fluorochromes de type acridine, qui ont une grande affinité pour les régions de l'ADN riche en liaisons A-T, on constate que la chromatide entièrement substituée n'est pas fluorescente et reste rougeâtre, assez terne, tandis que l'autre chromatide qui contient encore quelques paires de liaisons A-T ne perd pas de sa brillance et se colore en jaune sous lumière ultraviolette.

Nous retrouvons, par ailleurs, cette affinité différentielle

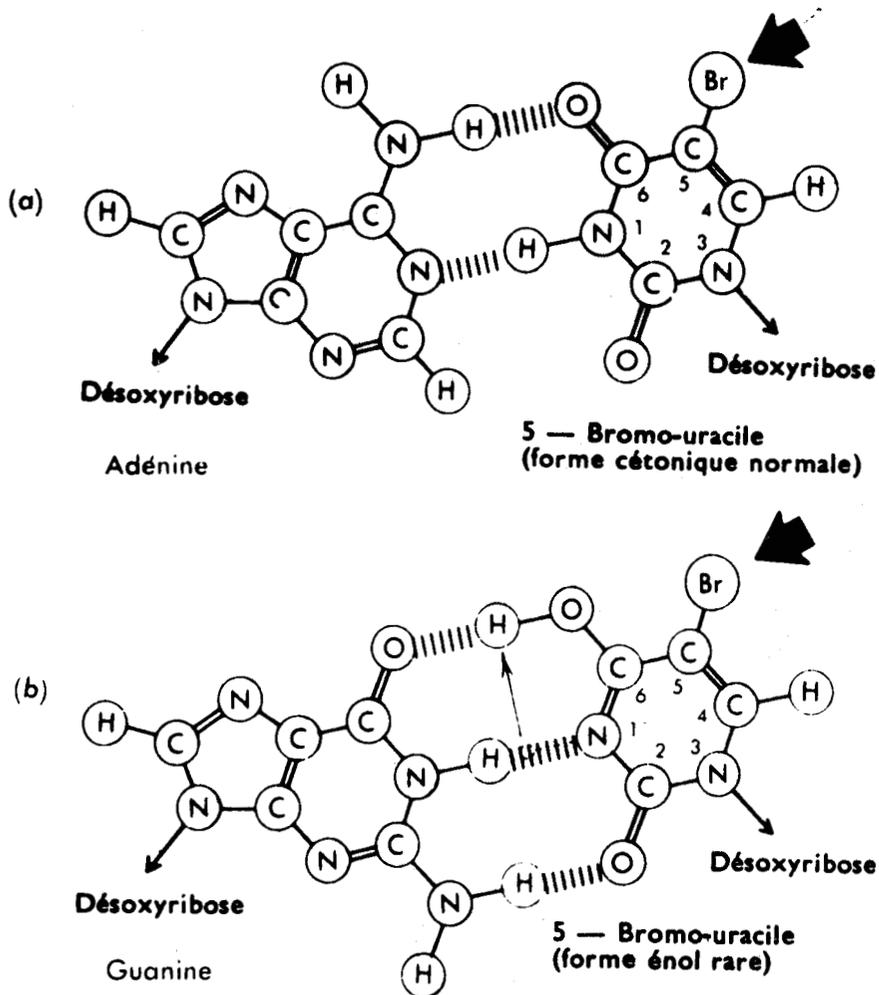
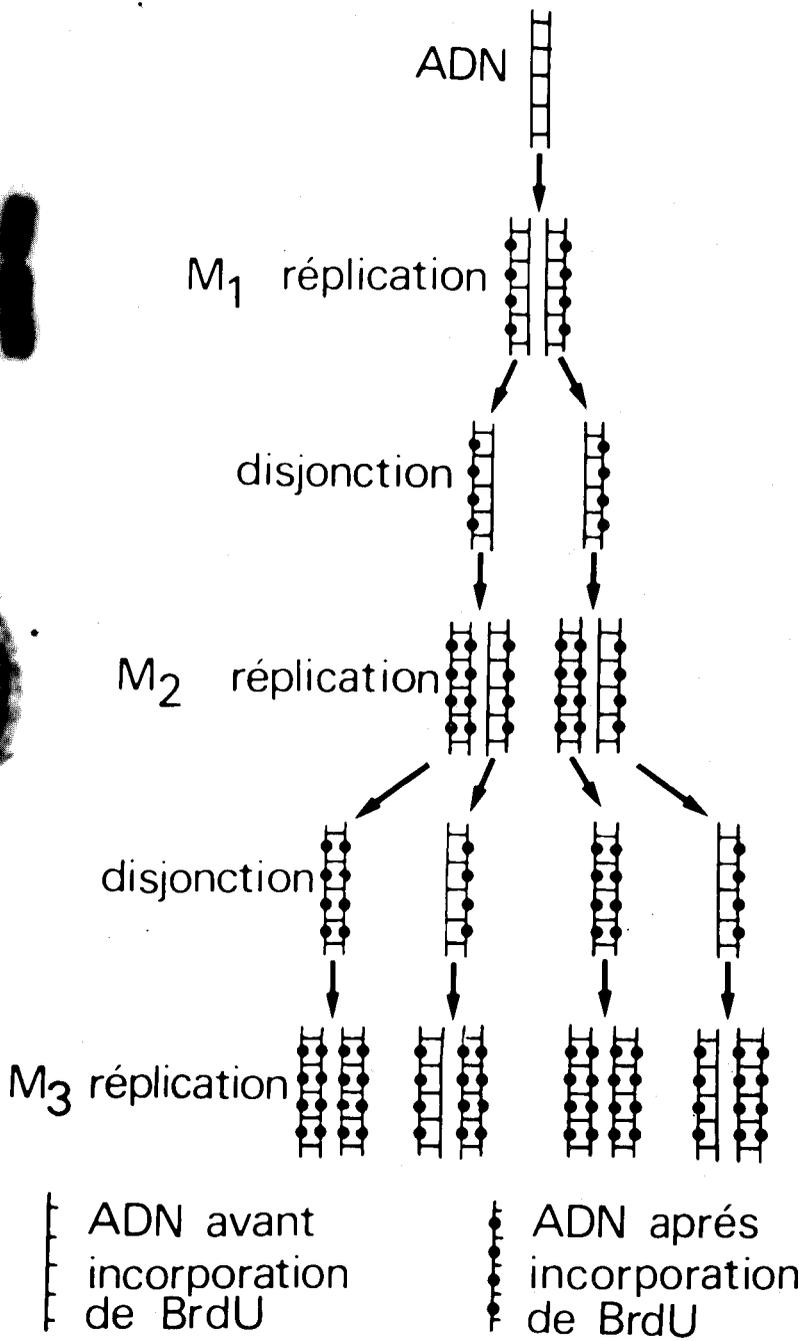


Fig. 28 : La 5-Bromo-désoxy-uridine, analogue de la Thymidine peut s'apparier avec l'adénine sous forme cétonique dans la chaîne d'ADN (a).

Il existe une forme énolique plus rare, qui permet l'appariement avec la Guanine (b).

Fig. 29 :

Schéma théorique montrant l'incorporation de la 5 BrdU au cours de la réplication de l'ADN du chromosome. Lors d'une première mitose M₁, chaque chromatide du chromosome métaphasique répliqué, possède un ADN dont l'un des brins contient la 5BrdU. Après coloration au Giemsa, le chromosome conserve l'aspect du chromosome non soumis à l'incorporation. Au cours du deuxième cycle mitotique M₂, le chromosome métaphasique répliqué présente une chromatide dont l'ADN est entièrement substitué. Après coloration au Giemsa, cette chromatide apparaît pâle. Les cycles cellulaires ultérieurs conduisent à des chromosomes dont les deux chromatides contiennent un ADN entièrement substitué. Ces chromosomes sont uniformément pâles.



après traitement à la chaleur et coloration au Giemsa ou après irradiation U.V. et coloration au Giemsa (67). On pense donc que la 5 Br dU, par son incorporation à la place de la thymidine, empêche la fixation du colorant, probablement par un renforcement des liaisons ADN substitué par la 5 Br dU et les protéines, ces dernières venant masquer les groupements $-PO_4^-$ sur lesquels doivent se fixer les groupes $-CH_3^+$ des différents constituants du GIEMSA.

Si au cours d'un troisième cycle cellulaire, la chromatide, déjà substituée, se replique, elle conduit à un chromosome métaphasique repliqué dont tout l'ADN bicatenaire est substitué par la 5 Br dU, ce chromosome n'a plus d'affinité pour le GIEMSA et reste uniformément pâle (Fig. 29).

Le phénomène de "banding", comme l'incorporation de 5 Br dU, provoque des modifications tinctoriales, mais dans le premier cas, on modifie surtout les protéines. En effet, une digestion enzymatique modérée à la trypsine ou à la chymotrypsine, après coloration, fait apparaître le "banding" G. Mais le Giemsa se fixe au niveau de l'ADN (96), donc la modification des protéines provoque une modification de l'accessibilité de l'ADN au colorant. Dans l'autre cas, c'est surtout une modification de l'ADN qui provoque la coloration différentielle des deux chromatides. Celle-ci n'est pas observée après coloration à l'amido schwartz (colorant spécifique des protéines).

L'incorporation de 5 Br dU après traitement thermique (37) ne perturbe pas la fixation de l'histone H_1 sur les deux chromatides d'un même chromosome. La modification tinctoriale fait suite à une modification de l'ADN, mais les deux phénomènes sont indépendants car les chromosomes isolés avant ou après incorporation conservent les propriétés de "banding" Banding G ou Q.

Quant aux histones, elles ne semblent pas modifiées par l'incorporation, nous retrouvons le même profil électrophorétique avant et après incorporation d'une part, d'autre part, l'histone H_1 absente dans les chromosomes isolés semble intervenir ni dans le "banding", ni dans l'obtention de coloration différentielle après incorporation.

4. OBSERVATION DE CHROMOSOMES EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

Toute observation sur lame, après coloration, se fait généralement à partir de chromosomes in situ ou isolés fixés par un mélange d'alcool (méthanol) et d'acide acétique. Cette opération permet de mieux colorer et par suite de mieux visualiser le chromosome. Mais nous avons vu que la fixation faisait perdre au chromosome des protéines notamment des histones, donc nous observons après coloration un chromosome modifié. Il est donc nécessaire d'avoir recours à des techniques qui conservent la composition en protéines du chromosome. La préparation de grilles pour l'observation de chromosomes en microscopie électronique évite la fixation dans de l'alcool acétique car la technique employée utilise des bains d'alcool éthylique de degré croissant permettant une déshydratation du matériel chromosomique.

L'observation de chromatides de chromosomes métaphasiques in situ montre toujours des fibrilles d'environ 200 \AA (8) (121) (122). Ce réseau fibrillaire est très dense mais parfois, il est possible de voir des étirements affectant les deux chromatides d'un même chromosome. Sans traitement, il est possible de voir une similitude entre la répartition de ces bandes et celles observées après action d'agents dénaturants (bandes G par exemple) en microscopie optique. L'action d'agent dénaturant sur les chromosomes a fait l'objet d'un travail de RUZICKA (131). Celui-ci décrit une méthode de dénaturation du chromosome par la chaleur ou par traitement à la soude diluée et coloration au Giemsa. L'observation en microscopie électronique fait alors apparaître des bandes G+ qui correspondent à des concentrations de la structure fibrillaire du chromosome (158). Le diamètre des fibrilles dans les régions G+ du chromosome varie de 300 \AA à 600 \AA , le reste des chromatides G- est constitué de fibrilles plus étirées. Il est possible d'expliquer ce phénomène, soit par adsorption plus importante de colorant au niveau des bandes G+, soit par une perte de la substructure, soit enfin, par une précipitation des fibres par traitement à la chaleur ou à la soude. La microscopie électronique montre donc que les bandes G+ sont constituées de paquets fibrillaires

fortement serrés et condensés qui correspondraient aux régions hétérochromatiques du chromosome.

On peut noter que d'autres auteurs ont remarqué ce phénomène de "banding" à partir de prophases (170) et même à partir de stades pachytènes de première division méiotique (77).

L'existence du "banding", le nombre important de bandes observées le long du chromosome, permet de faire un rapprochement entre le nombre de gènes et le nombre de bandes dans le chromosome humain et par suite, l'existence de zones inactives et actives dans le chromosome. Toutes ces hypothèses ne sont pas encore prouvées expérimentalement.

Autre point souvent discuté, le chromosome est-il formé d'une ou plusieurs chaînes d'ADN ? La structure très complexe d'un chromosome isolé ne permet pas d'y répondre même s'il est possible de voir parfois plusieurs fibrilles sortant du chromosome, ceci peut être dû à la technique de préparation.

Les études morphologiques sont plutôt en faveur d'un modèle de chromatine formée d'une chaîne d'ADN (143) ; cette hypothèse est en accord avec le phénomène de "crossing over", les cassures chromosomiques en même temps que le mode de replication semi-conservatif.

Mais les autoradiogrammes d'HUBERMAN et RIGGS (76) ne dépassent pas 1,6 à 1,8 mm alors qu'ils estiment à 9 cm la longueur théorique d'une molécule d'ADN pour un chromosome de taille moyenne chez le Hamster. On ne peut donc rejeter l'hypothèse que la fibre chromosomique unitaire est formée soit d'une succession de chaînes d'ADN (57), soit une juxtaposition d'un nombre variable de ces chaînes.

En effet, certains auteurs (41) isolent des protéines résiduelles non histoniques, que le thioglycollate de sodium scinde en deux groupes par destruction des ponts disulfures, or ces protéines obtenues sont liées aux extrémités des molécules d'ADN. D'où l'hypothèse d'une juxtaposition de fibres d'ADN, ces molécules étant liées entre elles par des protéines non histoniques riches en cystine.

L'unité fibrillaire chromosomique, visible en microscopie électronique est semblable avant et après incorporation de 5 Br dU bien que l'affinité tinctoriale du chromosome visible en microscopie optique soit considérablement perturbée. GENEIX et coll (63), après incorporation de 5 Br dU dans des cultures de lymphocytes neuf heures avant la fixation, décrivent des fibres chromosomiques filamenteuses, phénomène provoqué par une altération probable des nucléoprotéines chromosomiques. Par ailleurs, ces auteurs signalent une redistribution de masse provoquée par la 5 BrdU et qui affecte la morphologie du chromosome. Sur nos préparations de chromosomes de cellules KB, aucune modification ne peut être imputée avec certitude à l'effet du précurseur. BURKHOLDER et WANG observent une différence en microscopie électronique mais après traitement par la chaleur en présence de phosphate de sodium (20).

En conclusion, il apparaît donc que si la 5 Br dU entraîne des remaniements, non décelables par les techniques classiques de microscopie électronique, ces remaniements restent stables et se maintiennent au cours des manipulations d'isolement.

5. APPORT DES ÉTUDES BIOCHIMIQUES

La technique d'isolement de chromosomes permet d'analyser plus finement les divers phénomènes observés, soit en microscopie optique, soit en microscopie électronique.

Tout d'abord, nous mettons en évidence une perte sensible en protéines acido-solubles, signalée par différents auteurs, à partir de noyaux interphasiques (31) (104) (148) (149) ou de chromosomes métaphasiques (75) (134) (137), sans modifier la structure globale du chromosome. Au contraire, nous remarquons que c'est le chromosome isolé à pH acide qui conserve le mieux la structure comparable à celle de chromosome in situ parce que la technique d'isolement, comme la fixation, fait perdre aux chromosomes des histones permettant une meilleure coloration.

D'autre part, le pH acide (pH3) empêche l'action des protéases et nucléases qui peuvent dégrader le chromosome, tandis qu'à pH neutre ou basique, le chromosome ne conserve pas longtemps sa structure en raison de possibles actions enzymatiques.

Nos travaux nous permettent d'admettre que la perte en protéines acido-solubles modifie la fibre chromosomique, car la fibre d'un chromosome isolé à pH basique (contenant les cinq histones) apparaît plus épaisse (230 à 370 Å) que celle de chromosomes isolés à pH acide (180 à 230 Å). On remarque en plus l'aspect plus globuleux, plus compact du chromosome isolé à pH basique ; ce phénomène s'explique, entre autre, par la perte totale de l'histone H₁ responsable de la condensation du chromosome, dans l'isolement à pH acide.

La labilité de cette histone aux agents tels que les acides dilués ou les solutions salines peut s'expliquer par sa position externe à la fibre chromosomique, l'histone H₁ se trouvant à la périphérie, dans les différents modèles proposés par les auteurs (9).

Celle-ci serait liée à l'ADN externe qui entoure les octamères des autres histones et permettrait de maintenir la conformation de la fibre chromosomique et sa spiralisation. La perte de cette histone expliquerait la diminution du diamètre des fibres observées après isolement à pH acide. Il faut souligner qu'en aucun cas la présence (à pH basique) ou l'absence (à pH acide) de l'histone H₁ ne modifie les affinités tinctoriales (Giemsa ou fluorochromes) du chromosome isolé. De même, la différence de composition en histones du chromosome, suivant la technique d'isolement, est sans action sur la colorabilité.

L'étude des fractions histoniques de chromosomes métaphasiques ayant incorporé la 5 Br dU pendant 72 heures ne montre pas de différences par rapport à ces mêmes protéines de chromosomes normaux. Ceci nous conduit à admettre, quant au rôle des histones dans le phénomène de coloration différentielle par le Giemsa ou les fluorochromes, après incorporation de 5 Br dU, entre les chromatides d'un même chromosome, soit leur non participation, soit une participation indirecte due à des remaniements des liaisons ADN-histones par suite d'une modification structurale de l'ADN en

accord avec les travaux de DUTRILLAUX (48).

Enfin, l'isolement de chromosomes métaphasiques purifiés devrait aussi permettre de mettre en évidence les protéines non histoniques qu'il faudra séparer des histones et phosphoprotéines. Aucun procédé d'extraction actuellement ne permet d'obtenir une séparation totale de toutes les protéines non histoniques de l'ADN. Les derniers travaux de RICKWOOD et Mc GILLIVRAY (125) ne permettent de préparer qu'une fraction des protéines non histoniques. Ce sont des protéines, spécifiques de l'espèce, et qui ont tendance à former des agrégats avec les histones et l'ADN, d'où des difficultés à leur isolement. Toutes les classes de protéines se chevauchent, il est difficile de les différencier des protéines acides nucléaires et des phosphoprotéines nucléaires.

CONCLUSION

Le matériel nucléaire, support de l'hérédité, se présente sous forme de chromatine dans le noyau interphasique. Au cours de la division cellulaire, des modifications physiologiques transforment ce matériel en chromosomes métaphasiques de nombre et de morphologie constante pour une espèce donnée.

La formation et la constance du nombre de chromosomes à chaque cycle cellulaire, les variations numériques ou structurales intraspécifiques ou interspécifiques sont autant de problèmes dont l'explication repose sur une meilleure connaissance de la structure de cet organite cellulaire.

Pour faciliter cette approche, la première étape consiste à obtenir ce matériel nucléaire synchronisé au stade métaphase en quantité suffisante. A partir de ce matériel peuvent être réalisées des études morphologiques et biochimiques : visualisation de la fibre chromosomique, élément du chromosome, étude des affinités tinctoriales pour le Giemsa et d'autres colorants, enfin la possibilité de comparer la composition du chromosome isolé et du chromosome in situ.

Néanmoins, notre étude a ses limites. En effet, nos résultats sont obtenus à partir de cellules néoplasiques (cellules buccales transformées : cellules KB), donc remaniées et ne devraient être comparés qu'avec un matériel analogue (cellules utérines néoplasiques : cellules HeLa par exemple). L'obtention de matériel en quantité suffisante, à partir de cellules non transformées, cellules de Hamster par exemple, ou transformées expérimentalement, est possible, mais la comparaison serait faussée du fait de l'appartenance à une espèce différente.

Malgré ces restrictions, nous pouvons tirer un certain nombre de conclusions de nos observations.

- A partir de chromosomes isolés, à pH acide, nous observons une fibre chromosomique qui a les mêmes caractéristiques que celle de chromosomes in situ, c'est-à-dire une épaisseur variant de 180 à 230 Å. Cette fibre

est partiellement altérée par la technique d'isolement : par une étude électrophorétique des protéines acido-solubles, nous constatons que le chromosome isolé à pH acide, perd totalement l'histone H_1 et une partie des histones H_{2B} et H_{2A} .

La même étude faite à partir de chromosomes isolés à pH basique, contenant cette fois toutes les histones H_1 , H_{2B} , H_{2A} , H_3 et H_4 , montre des fibres chromosomiques d'un diamètre supérieur : 230 à 370 Å.

Nous en concluons que l'histone H_1 , présente dans le chromosome isolé à pH basique, joue un rôle dans la spiralisation du chromosome, donc sur l'épaisseur des fibres chromosomiques.

- Nous avons vu que des traitements enzymatiques thermiques ou par des solutions salines font apparaître, sur les chromosomes après coloration au Giemsa, une alternance de bandes claires et sombres correspondant au "banding". Ce phénomène peut résulter d'une modification des protéines chromosomales (traitement trypsique), laquelle entraîne une modification par masquage des PO_4 de l'ADN qui sont les sites de fixation du Giemsa le long des chromatides montrant l'hétérogénéité structurale du chromosome.

L'intervention des protéines dans la réalisation du "banding" est qualitative puisqu'il n'est pas possible de visualiser ce "banding" par utilisation de colorants protéiques (Amido Schwartz).

Enfin, le "banding" G ou Q, au niveau des chromosomes isolés à pH acide, n'est pas altéré par la perte de l'histone H_1 . Dans ces conditions, il apparaît que l'histone H_1 , absente du chromosome isolé à pH acide, n'intervient pas dans le phénomène de "banding".

- Nous savons que l'incorporation d'un analogue structural de la thymidine (5 Br dU) modifie la séquence primaire de l'ADN. Néanmoins, cette substitution de la thymidine par la 5 Br dU n'altère pas la morphologie de la fibre chromosomique observée en microscopie électronique. Par ailleurs, les propriétés tinctoriales du chromosome isolé ou in situ, après colo-

ration par le Giemsa, sont conservées en absence de traitement préalable. Ceci confirme que les groupements PO₄ libres de l'ADN, sites de fixation des colorants thiaziniques auxquels appartient le Giemsa, sont conservés le long du chromosome.

L'affinité du chromosome, après substitution de la thymidine par la 5 Br dU, pour le Giemsa peut-être modifiée par un prétraitement thermique. Il apparaît donc que le "banding" chromosomique semble indépendant de la modification de la séquence en bases de l'ADN. Enfin, l'étude électrophorétique des chromosomes isolés à pH acide, après incorporation de 5 Br dU, ne montre aucune modification significative de leur composition en histone, malgré l'existence d'un ADN modifié.

Nous pouvons conclure que la substitution de la thymidine n'altère ni la morphologie, ni l'affinité normale, ni le phénomène de "banding" du chromosome ni sa composition en histones.

En conclusion, l'étude morphologique et biochimique du matériel chromosomique passe par l'isolement de chromosomes. Ce travail n'est qu'une étape préliminaire de la connaissance de la structure du chromosome. Après l'analyse biochimique des protéines acido-solubles, doit être entreprise l'étude des protéines non-histoniques afin de mieux comprendre l'arrangement structural des trois composants fondamentaux du chromosome : ADN, histones et non histones pour aborder, dans un deuxième temps, l'étude fonctionnelle du chromosome.

BIBLIOGRAPHIE



1. ABUELO J.G. et MOORE D.E. (1969).
J. Cell. Biol., 41, 73-90.
2. ADOLPH K.W., CHENG S.M. et LAEMMLI U.K. (1977).
Cell., Vol. 12, 805-816.
3. ADOLPH K.W., CHENG S.M., PAULSON J.R., LAEMMLI U.K. (1977)
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., n° 11, 4937-4941.
4. ALFERT M. (1954).
Ann. Biol. State-Oregon., 5è Colloque.
5. ANDERSON T.F. (1951).
Trans. N.Y. Acad. Sci., 13, 130-134.
6. ARRIGHI F.E. (1971).
Cytogenetics, 10, 81-86.
7. BAHR G.F. (1970).
Exp. Cell. Res., 62, 39-49.
8. BAHR G.F. (1970).
Chromosoma (Berl.), 46/3, 247-254.
9. BALDWIN, BOSELEY P.G., BRADBURY E.M. et IBEL L. (1975).
Nature, 253, 245-249.
10. BARNICOT N.A. (1967).
J. Cell. Biol., 32, 585-603.
11. BASTIA D. et SWAMINATHAN M.S. (1967).
Exp. Cell. Res., 48, 18-24.
12. BHORGE E.J. et PEDERSON T. (1972).
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., vol. 69, n° 11, 3345-3349.
13. BILLET M.A. et BARRY J.M. (1974).
Eur. J. Biochem. (Berl.), 49/3, 477-484.
14. BRADBURY M. (1978).
La Recherche, n° 91, 644-653.
15. BRAM S. et RIS H. (1971).
J. Mol. Biol., 55, 325-336.

16. BRAM S., BUTLER-BROWN E.G., BAUDY P. et IBEL K. (1975).
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 72, 1043-1045.
17. BRODY T. (1974).
Exp. Cell. Res., 85, 255-264.
18. BROWN R.L., PATHAK S. et HSU T.C. (1975).
Science, 189, 1090-1091.
19. BURKHOLDER G.D. (1974).
Nature (London), 247/5439, 292-294.
20. BURKHOLDER G.D. et WANG H.C. (1978).
Chromosoma (Berl.), 70, 101-107.
21. BUSCH H., YEOMAN L.C., BUSCH R.K., JORDAN J.J., RAO M.S., TAYLOR C.W.
et WU B.C. (1976).
Cancer Res., 36, 3399-3408.
22. BURTON K. (1956).
Biochem. J., 62, 315.
23. BUSTIN M., YAMASAKI H., GOLDBLATT D., SHANI M., HUBERMAN E., et SACHS
L. (1976).
Exp. Cell. Res., 97, 440-441.
24. CANTOR K.P. et HEARST J.E. (1966).
Proc. N.A.S., 55, 642-649.
25. CASPERSSON T., ZECH L. et JOHANSSON C. (1970).
Exp[†] Cell. Res., 62, 490-492.
26. CASPERSSON T., LOMAKKA G. et ZECH L. (1971).
Hereditas, 67, 89-92.
27. CLARCK R.J. et FELSENFELD G. (1972).
Nat. New. Biol., 240.
28. CLARCK R.J. et FELSENFELD G. (1974).
Biochem., 13, 3622-3628.
29. COHEN B.B. et DEANE D.L. (1976).
J. Cell. Sci., 20, 215-219.
30. COMINGS D.E. et OKADA T.A. (1970).
Exp. Cell. Res., 63, 62-68.

31. COMINGS D.E. et TACK L.O. (1973).
Exp. Cell. Res., 82, n° 1, 175-191.
32. COMINGS D.E. et AVELINO(1974).
Exp. Cell. Res., 86, n° 1, 202-206.
33. COMINGS D.E. et HARRIS D.C. (1975).
Exp. Cell. Res., 96, 161-179.
34. CORRY P.M. et COLE A. (1968).
Rad. Res., 36, 528-548.
35. COUTURIER (1973).
C.R. Acad. Sci. (Paris), 276, 339-342.
36. DEMINATTI M. et SAVARY J.B. (1974).
Rev. Cytol. Clin., t. VII, n° 1, 1-7.
37. DEMINATTI M., SAVARY J.B. et STROZYK F. (1977).
Ann. Genet., 20, n° 3, 199-202.
38. DESAI L.S., POTHIER L., FOLEY G.E. et ADAMS R.A. (1972).
Exp. Cell. Res., 70/2, 468-471.
39. DEV V.G., WARBURTON D., MILLER O.J. (1972).
Exp. Cell. Res., 74/1, 288-293.
40. DICK et JOHNS (1968).
Exp. Cell. Res., 51, 626-632.
41. DOUNCE A.L. et HILLGARTNER C.A. (1964).
Exp. Cell. Res., 36, 228-238.
42. DRETS M.E. et SHAW M.W. (1971).
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.), 68, 2027-2077.
43. DUPRAW E.J. (1965).
Proc. Nat. Acad. Sci., 53, 161-168.
44. DUPRAW E.J. et BAHR G.F. (1969).
Acta Cytol., 13, 188-205.
45. DUTRILLAUX B. et LEJEUNE J. (1971).
C.R. Acad. Sci., 272, 2638-2640.

46. DUTRILLAUX B., LAURENT C., COUTURIER J. et LEJEUNE J. (1973).
C.R. Acad. Sci. (Paris), 276, 3179-3181.
47. DUTRILLAUX B., AURIAS A., FOSSE A.M. (1976.)
Exp. Cell. Res., 97, 313-321.
48. DUTRILLAUX B. (1977).
Human Genet., 35, 247-253.
49. EBINA K., TAKAHASHI H. et ISHIDA H. (1970).
Exp. Cell. Res., 62, 384-392.
50. EBINA M. et WATANA B.E. (1974).
Exp. Cell. Res., 88, 203-206.
51. ELGIN S.C., BOYD J.B., HOOD L.E., WRAY W. et WU F.C. (1973).
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 38, 821-833.
52. ELGIN S.C. et WEINTRAUB H. (1975).
Ann. Rev. Biochem., 44, 726-774.
53. EVANS H.J., BUCKTON K.E. et SUMNER A.T. (1971).
Chromosoma (Berl.), 35, 310-325.
54. FEULGEN R. et VOIT K. (1924).
Arch. Ges. Physiol., 206, 389.
55. FINAZ C. et DEGROUCHY J. (1971).
Ann. Genet., 14, n° 4, 309-311.
56. FINCH J.T., LUTTER L.C., RHODES D., BROWN R.S., RUSHTON B., LEVITTI M., KLUG A. (1977).
Nature, 269, 29.
57. FREESE S. (1958).
Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 23, 13.
58. FUJITANI H. et HOLOUBEK V. (1974).
Experientia, 30/5, 474-476.
59. GALL J.G. (1963).
Science, 139, 120-121.
60. GAREL A., MALEN A., CHAMPAGNE M., SAUTIERE P., KMIECIK D., LOY O. et BISERTE G. (1975).
Febs letters, 50, 195-199.

61. GARRELS J.I., ELGINS C.R. et BONNER J. (1972).
Biochem. Biophys. Res. Commun, 46, n° 2, 2545-551.
62. GAZIEV A.I., KUZIN A.M. (1973).
Eur. J. Biochem., 37, 7-11.
63. GENEIX A., FELLMAN N. et JAFFRAY J.Y. (1975).
C.R. Acad. Sci. (Paris), 280, 1151-1153.
64. GOLOMB H.M. et BAHR G.F. (1974).
Exp. Cell. Res., 84, 79-87.
65. GOODWIN et JOHNS (1973).
Eur. J. Biochem., 40, 215-219.
66. GOODWIN G.H., NICOLAS R.H., JOHNS E.W. (1975).
Biochem. Biophys. Acta, 405, 280-291.
67. GOTO K., MAEDA S., KANO Y. et SUGIYAMA T. (1978).
Chromosoma (Berl.), 66, 351-359.
68. GRASSE P.P., CARASSO N. et FAVARD P. (1956).
Ann. Sci. Nat. Zool. et Biol. Animale, 18, 339.
69. HAMEISTER H. (1977).
Chromosoma, 62, 217-242.
70. HAMERTON J.L. (1973).
Nobel 23 Chromosome identification, 90-96.
71. HEARST J.E. et BOTCHAN M. (1970).
Ann. Rev. Biochem., 39, 151-182.
72. HINKLEY R. et TELSER A. (1974).
Exp. Cell. Res., 86, 161-164.
73. HOWK R. et WANG T.Y. (1970).
Arch. Biochem. Biophys., 133, 238-246.
74. HSU T.C. et SOMERS C.E. (1971).
Proc. Nat. Acad. Sci., 47, 396-403.
75. HUBERMAN J.A. et ATTARDI G. (1966).
J. Cell. Biol., 31, 95-105.

76. HUBERMAN J.A. et RIGGS A.D. (1966).
Proc. Acad. Sci., 55, 599-603.
77. HUNGERFORD D.A. (1971).
Cytogenetics, 10, 23-32.
78. JAVAHERIAN K., LIU L.F. et WANG J.C. (1978).
Science, 199, 1345-1346.
79. JOCKUSCH B.M., BECKER M., HINDENNACH I., JOCKUSCH H., (1974).
Exp. Cell. Res., 89, 241-246.
80. JOHNS E.W. et BUTLER J.A. (1962).
Biochem., 82, 15-18.
81. JOHNS E.W. et FORRESTER S. (1969).
Eur. J. Biochem, 8, 547.
82. KAUFMAN B.P. et Mc DONALD M.R. (1956).
Cold Spring Harbor. Symp. Quant. Biol., 21, 233.
83. KLEINSCHMIDT A.K., LANG D., JACHERTS D., et ZAHN R.K. (1962).
Biochem. Biophys. Acta, 61, 857-864.
84. KORENBERG J.R. et FREELENDER E.F. (1974).
Chromosoma, 48, 355-360.
85. KORNBERG R.D. (1974).
Science, 184/4139, 868-871.
86. KUO M.T., HSU T.C. et SAUNDERS G.F. (1974).
Exp. Cell. Res., 88, 424-427.
87. KURTH P.D., MOUDRIANAKIS E.W. et BUSTIN M. (1978).
J. Cell. Biol., 78, 910-918.
88. LAMPERT F. et LAMPERT P. (1970).
Humangenetik, 11, 9-17.
89. LAMPERT F. (1971).
Nature (New Biology), 49, 187-188.
90. LAMPERT F. (1971).
Humangenetik, 13, 285-295.

91. LATT S.A. (1973).
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.), 70, 3395-3399.
92. LENTFER D. et LEZIUS A.G. (1972).
Eur. J. Biochem., 30, 278-284.
93. LESTOURGEON W.M., WRAY W. et RUSH H.P. (1973).
Exp. Cell. Res., 79, 487-492.
94. LIN C.C. (1974).
Cytogenet. Cell. Genet., 13/1-2, 117-122.
95. LIN C.C. et GOLDSTEIN S. (1974).
J. Nat. Cancer Inst., 53/2, 298-301.
96. LOBER et coll (1976).
Biol. Zbl., 95, 169-191.
97. LOEB J.E., RITZ E., CREUZET C. et JAMI J. (1976).
Exp. Cell. Res., 103, 450-454.
98. LOWRY D.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A., et RANDALL R.J. (1951).
J. Biol. Chem., 193, 267-275.
99. LUCIANI J.M. (1970).
Ann. Genet., 13, 101-111.
100. LUCIANI J.M., CARLON N. et STAHL A. (1970).
Bull. Ass. Anat., 55^e Congrès Nancy, 148, 423-432.
101. LUCIANI J.M., DEVICTOR-VUILLET M., STAHL A. (1971).
Clin. Genet., 2, 32-36.
102. Mac GILLIVRAY, CAMERON K. et RICKWOOD P. (1972).
Biochem. Biophys. Acta, 277, 384-402.
103. MAIO J.J. et SCHILDKRAUT C.L. (1967).
J. Biol., 24, 29-39.
104. MATSUI S.I. et SASAKI M. (1975).
Japan J. Genet., 50, 189-204.
105. MAYFIELD J.E. et Mc KENNA J.F. (1978).
Chromosoma, 67, 157-164.
106. MILLER O.J., SCHRECK R.R., BEISER S.M. et ERLANGER B.F. (1973).
Nobel 23, Chromosome identification, 43-48.

107. MOORHEAD P.S., NOXELL P.C., MELLMAN W.J., BATTIPS D.P. et HUNGERFORD D.A. (1960).
Exp. Cell. Res., 20, 613-616.
108. MOURIQUAND C., GILLY C. et WOLFF C. (1972).
Ann. Genet, 15, 249-256.
109. MOURIQUAND C., GILLY C. et WOLFF C. (1975).
Lyon Méd., 233/3, 287-295.
110. NOLL M. (1974).
Nature, 251, 249-251.
111. O'CONNORS P.J. (1969).
Biochem. Biophys. Res. Commun., 35, 805-810.
112. OLINS A.L. et OLINS D.E. (1973).
J. Cell. Biol., 59, 252 a.
113. OLINS A.L., CARLSON R.D. et OLINS D.E. (1975).
J. Cell. Biol., 64/3, 528-537.
114. OUDET P., GROSS BELLAR D.M. et CHAMBON P. (1975).
Cell., 4/4, 281-300.
115. PALMER C.G. (1970).
Canad. J. Genet. Cytol., 12, 816-830.
116. PANYI M. et CHALKLE Y. (1969).
Arch. of Biochem. and Biophys., 130, 337-346.
117. PARDUE M.L. et GALL J.G. (1970).
Science, 168, 1356-1358.
118. PAULSON J.R. et LAEMMLI U.K. (1977).
Cell., 12, 817-828.
119. PERRY P. et WOLFF S. (1974).
Nature, 251, 156-158.
120. RACEY L.A. et BYVOET P. (1971).
Exp. Cell. Res., 64, 366-370.
121. RATTNER J.B. et HAMKALAO B.A. (1978).
Chromosoma, 69, 363-372.

122. RATTNER J.B. et HAMKALAO B.A. (1978).
Chromosoma, 69, 373-380.
123. RICHARDS B.M. et PARDON J.F. (1970).
Exp. Cell. Res., 62, 184-196.
124. RICHARDS B.M., PARDON J.F., LILLEY D., COTTER R. et WOOLEY J.C.
(1977).
Cell. Biol. Int. Rep., 1, 107.
125. RICKWOOD D. et Mac GILLIVRAY (1975).
Eur. J. Biochem., 51, 593-603.
126. RIDLER M.A.C. (1971).
The Lancet, 354-356.
127. RIMINGTON C. (1940).
Biochem. J., 34, 931.
128. RIS H. (1961).
Can. J. Genet. Cytol., 3, 95-98.
129. RIS H. (1969).
The molecular organization of chromosomes.
in "Handbook of molecular cytology".
A. Lima de Faria (1969).
North Holland Publish. C.O., Amsterdam.
130. RUZICKA F. et BOLTZMAN L. (1971).
Humangenet. , 13/3, 199-204.
131. RUZICKA F. (1974).
Humangenet. , 22/2, 119-126.
132. RUZICKA F. (1974).
Humangenet. , 23/1, 1-22.
133. SADGOPAL et BONNER (1970).
Biochim. et Biophys. Acta, 207, 206-226.
134. SADGOPAL et BONNER (1970).
Biochim. et Biophys. Acta, 207, 227-239.
135. SAHASRABUDDHE C.G. et VANHULDE K.E. (1970).
J. Biol. Chim., 249, 152-156.

136. SALZMAN N.P., MOORE D.E. et MENDELSON J. (1966).
Proc. N.A.S., 56, 1449-1456.
137. SALZMAN N.P. et MENDELSON J. (1968).
Muk. Cell. Physiol., 3, 277-292.
138. SANDERS L.A. (1974).
Biochem., 13, 527-534.
139. SAUTIERE P., KMIECIK D., LOY O., BRIAND G., BISERTE G., GAREL A. et
CHAMPAGNE M. (1975).
Febs. Letters, 50, 200-203.
140. SAUTIERE P., BRIAND G., KMIECIK D., LOY O., BISERTE G., GAREL A. et
CHAMPAGNE M. (1976).
Febs Letters, 63, 164-166.
141. SCHMIDT G. et THANNHAUSER S.J. (1945).
J. Biol. Chim., 161, 83.
142. SCHNEDL W. (1971).
Nature, 233, 93-94.
143. SCHWARZACHER H.G. (1976).
Path. Europ., 11, 5-13.
144. SEABRIGHT M. (1971).
Lancet II; 971.
145. SEDEROFF R., CLYNES R., PONCZ M., et HACHTEL S. (1973).
J. Cell. Biol., 57, 538-550.
146. SHIRAIISHI Y. et YOSIDA T.H. (1972).
Chromosoma, 37, 75-83.
147. SILVER L.M. et ELGINS C.R. (1978).
Chromosoma, 68, 101-114.
148. SKINNER et OCKEY (1971).
Chromosoma, 35, 125-142.
149. SMART J.E. et BONNER J. (1971).
J. Mol. Biol., 58/3, 661-674.
150. SOLARI A.J. (1968).
Exp. Cell. Res., 53, 553-562.

151. STEIN G.S., STEIN J.S. et KLEINSMITH L.J.
Chromosomal proteins and gene regulation, 47-57.
152. STEIN G., PARK W., THALL C. et coll. (1975).
Nature, 257/5529, 764.
153. STEIN J.L., REED K. et STEIN G.S. (1976).
Biochem. (Wash.), 15/15, 3291-3295.
154. STOLLAR B.D. et WARD M. (1970).
J. Biol. Chem., 245, 1261-1266.
155. SUMNER A.T., EVANS H.J. et BUCKLAND R.A. (1971).
Nature New Biology, 232, 31-32.
156. SUMNER A.T. (1974).
Exp. Cell. Res., 83/2, 438-442.
157. SUMNER A.T. (1977).
Chromosoma, 64, 337-342.
158. TAKAYAMA S. (1976).
Chromosoma, 56, 47-54.
159. TANAKA K. et IINO A. (1973).
Exp. Cell. Res., 81, 40-46.
160. TASHIRO K., MIZOBE A. et KUROKAWA K. (1974).
Fels Letters, 38, 121-124.
161. TATA J.R. et BAKER B. (1974).
Exp. Cell. Res., 83, 111-124.
162. TAYLOR C.W., YEOMAN L.C., DASKAL I., et BUSCH H. (1973).
Exp. Cell. Res., 82, 215-226.
163. THOMAS O.J. et KORNBERG R.D. (1975).
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 72, 2626-2630.
164. TRIFONOV E. (1978).
Nucl. Ac. Res., 5, 1371-1380.
165. TSURUO T. et UKITA T. (1974).
Biochim., Biophys. Acta, 353, 146-159.
166. TURPIN R. et LEJEUNE J. (1965).
Les chromosomes humains, Edit. Gauthier Villars, Paris, p. 16.

167. URBANCZYK J. et STUDZINSKI G.P. (1974).
Biochem. Biophys. Res. Commun., 59, 616-622.
168. VANDENBROEK H.W.J., NOODEN L.D., SANDERS SEVALL J. et BONNER J.
(1973).
Biochem., 12, 229-236.
169. VOGEL W., FAUST J., SCHMID M. et SIEBERG G. (1974).
Humangenet., 21/3, 227-236.
170. WALKER J.M., HASTINGS J.R.B. et JOHNS E.W. (1978).
Nature, 271, 281-282.
171. WANG H.C. et FEDOROFF S. (1972).
Nature New Biol., 235, 52-54.
172. WARNEKE P., KRUIZE K. et HARBER S.E. (1973).
Biochim. Biophys. Acta, 331, 295-304.
173. WILSON E.M. et SPELSBERG R.C. (1973).
Fed. Proc. 32/608, 2213.
174. WOLFE S.L. (1965).
J. Ultrastruct. Res., 12, 104-116.
175. WOLFE S.L. et GRIM J.N. (1967).
J. Ultrastruct. Res., 19, 382-397.
176. WOLFE S.L. et MARTIN P.G. (1968).
Exp. Cell. Res., 50, 140-150.
177. WOODCROCK C.L.F. (1973).
J. Cell. Biol., 59, 368 a.
178. WRAY W. et STUBBLEFIELD (1970).
Exp. Cell. Res., 59, 469-478.
179. WRAY W. (1973).
Meth. Cell. Biol., 6, 307-315.
180. WU F.C., ELGIN S.C., WOOD L.E. (1973).
Biochem., 12, 2792-2797.
181. YUNIS J.J., SAWYER J.R. et BALL D.W. (1978).
Chromosoma, 67, 293-307.
182. ZAKHAROV A.F. et EGOLINA N.A. (1972).
Chromosoma, 38, 341-365.

183. ZAKHAROV A.F. et coll. (1974).

Chromosoma, 44, 343-359.

184. ZIRKIN B.R. et WOLFE S.L.

J. Ultrastruct. Res., 39, 496-502.

