

50376
1981
76

50376
1981
76

N° d'ordre : 878

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

THÈSE

présentée

à l'Université des Sciences et Techniques de Lille

pour obtenir

le titre de Docteur de troisième cycle

Spécialité : Biochimie

par

Francis VASSEUR



Le Chromosome Métaphasique : Essai d'Identification des non Histones et de leur Rôle Structural et Fonctionnel

soutenue le 27 Janvier 1981, devant la Commission d'Examen

Membres du Jury :

MM. J. MONTREUIL, Président

M. DEMINATTI, Rapporteur

J. KREMBEL, Examineur

J. GUILLAUME, Examineur

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

Nous remercions Monsieur le Professeur
M. DEMINATTI de nous avoir accueilli
dans son Laboratoire et d'avoir accepté
de diriger ce travail.

*Nous remercions Messieurs J. MONTREUIL,
J. KREMBEL
et J. GUILLAUME
d'avoir accepté de juger ce travail.*

Nous remercions Monsieur D. PETITE qui nous a fourni la souche de cellules KB, et le Docteur CHOUROULINKOV de nous avoir procuré les fibroblastes de hamster chinois.

Nous remercions Messieurs F. STROZYK pour la mise en oeuvre et la réalisation des autoradiographies, et synthèses *in vitro* et J.P. TIETARD pour sa précieuse collaboration technique.

Nous remercions aussi tout le personnel du Laboratoire de Cytogénétique, Mesdemoiselles E. BELOT et M.A. HANOTTE, Madame G. DELASSUS, Messieurs F. FONTAINE, J.L. LAI et J.B. SAVARY et tous ceux qui m'ont permis de mener à bien ce travail, qu'ils soient assurés de ma profonde amitié.

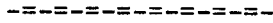
P L A N

PREAMBULE	P. 1
HISTORIQUE	P. 3
INTRODUCTION	P. 6
A - STRUCTURE DE L'ADN DANS LA FIBRE CHROMOSOMIQUE	P. 8
B - LES GRANDS TYPES DE MODELES PROPOSES POUR LA STRUCTURE DU CHROMOSOME	P. 12
1 - Condensation de la fibre chromosomique par enrou- lements successifs	P. 12
2 - Modèles faisant intervenir un squelette chromosomi- que	P. 15
- Modèle de LAEMLI	P. 15
- Modèle de STUBBLEFIELD	P. 18
3 - Critiques formulées à l'encontre de ces modèles ...	P. 18
C - MAINTIEN DE LA STRUCTURE COMPACTE DU CHROMOSOME	P. 22
1 - Rôle de l'ADN	P. 22
2 - Rôle des histones	P. 23
3 - Rôle des non histones	P. 24
4 - Rôle de l'ARN	P. 24
D - DYNAMIQUE DE LA FIBRE CHROMOSOMIQUE	P. 25
1 - Reproductibilité dans l'organisation des chromosomes	P. 25
2 - Problème de la condensation des chromosomes	P. 25
E - LES PROTEINES NON HISTONIQUES DU CHROMOSOME	P. 28
F - ACTIVITE "TEMPLATE" DU CHROMOSOME METAPHASIQUE	P. 29
NOTRE OBJECTIF	P. 30
MATERIEL ET METHODES	P. 32
A - CULTURES	P. 34
1 - Culture de cellules KB	P. 34
2 - Culture de fibroblastes de hamster chinois (<i>Cricetulus griseus</i>)	P. 34

B - INCORPORATION DE 5-BROMODESOXYURIDINE	P. 34
C - ISOLEMENT DE CHROMOSOMES METAPHASIQUES ET DES NOYAUX INTERPHASIQUES	P. 35
1 - Isolement de chromosomes métaphasiques de cellules KB	P. 35
2 - Isolement de chromosomes de fibroblastes de hamster chinois	P. 37
3 - Isolement de noyaux interphasiques de cellules KB	P. 39
D - COLORATIONS DU MATERIEL NUCLEAIRE	P. 39
E - ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE SDS	P. 39
F - SYNTHES D'ARN <i>in vitro</i> ET AUTORADIOGRAPHIE	P. 41
G - TRAITEMENTS SUR LAME AVANT SYTHESE D'ARN	P. 41
H - TRAITEMENT DES CHROMOSOMES ET RECUPERATION DES PROTEINES EXTRAITES	P. 42
1 - Traitement au mélange méthanol-acide acétique (3:1)	P. 42
2 - Traitement à l'acide chlorhydrique 0,25 N	P. 43
3 - Traitements au 2 SSC, et à la RNase pancréatique ..	P. 43
RESULTATS	P. 44
A - ETUDE BIOCHIMIQUE DU CHROMOSOME METAPHASIQUE	P. 45
I - Les non histones du chromosome métaphasique	P. 45
1 - Analyse électrophorétique des non histones du chro- mosome métaphasique	P. 45
2 - Comparaison entre les non histones de la chromatine du noyau interphasique et du chromosome métaphasique	P. 48
3 - Analyse des non histones du chromosome métaphasique de hamster chinois (<i>Cricetulus griseus</i>)	P. 48
II - Etude des non histones du chromosome métaphasique après incorporation de 5-bromodesoxyuridine	P. 51

B - ETUDE FONCTIONNELLE DU CHROMOSOME METAPHASIQUE HUMAIN	P. 55
I - Activité "template" du chromosome métaphasique	P. 55
II - Restauration de l'activité "template" du chromosome métaphasique	P. 55
C - LES NON HISTONES ET L'ACTIVITE "TEMPLATE"	P. 59
I - Etude électrophorétique des protéines non histoniques après les traitements restaurant l'activité "template" .	P. 59
II - Analyse des fractions protéiques extraites par les traitements restaurant l'activité "template"	P. 68
DISCUSSION	P. 74
A - PROBLEMES STRUCTURAUX	P. 75
I - Les non histones du noyau interphasique et du chromosome métaphasique	P. 75
II - Les non histones du chromosome métaphasique humain et du chromosome métaphasique de hamster chinois	P. 76
III - Les non histones chromosomiques après modification de la structure primaire de l'ADN	P. 78
B - PROBLEMES DE L'INACTIVITE FONCTIONNELLE	P. 81
I - Activité "template" du chromosome métaphasique	P. 81
II - Restauration de l'activité "template"	P. 81
III - Le chromosome après traitement restaurant son activité "template"	P. 82
IV - Protéines extraites après traitement restaurant l'acti- vité "template"	P. 84
CONCLUSION	P. 85
BIBLIOGRAPHIE	P. 88

P R E A M B U L E

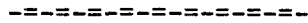


Le matériel nucléaire d'une cellule vivante se présente sous deux états fondamentaux selon le cycle cellulaire.

En interphase, sous forme de chromatine dispersée, et lors de la division cellulaire, sous forme condensée : les chromosomes métaphasiques. Ces organites cellulaires de forme et de nombre constants pour une espèce donnée et à l'intérieur d'une espèce pour un sujet donné, assurent lors de la mitose, la répartition égale du patrimoine génétique transmis aux cellules filles. Ils assurent également lors de la méiose, la transmission du patrimoine génétique à la descendance, on parle alors de chromosome méiotique.

Rappelons que le chromosome métaphasique est visible en microscopie optique et qu'il est formé de deux chromatides reliées au niveau du centromère. Les deux chromatides se séparent lors de la mitose, pour reconstituer le matériel nucléaire dans les deux cellules filles.

HISTORIQUE



Les travaux sur les chromosomes métaphasiques datent des années 1870 par la description de leur comportement dans la division cellulaire.

Les premières données cytologiques relatives au comportement des chromosomes furent celles d'HERTWIG (1875) qui montra le doublement du nombre des chromosomes lors de la fusion des gamètes, et celles de FLEMING (1880), montrant la division longitudinale du chromosome lors de la mitose, chaque moitié (chromatide) passant dans une cellule fille. C'est la même année que FLEMING définit la chromatine comme étant la substance colorable du noyau et avança qu'elle représentait l'état interphasique des chromosomes.

Toutes ces observations devaient ouvrir la voie à la mise en évidence de l'implication des chromosomes dans la transmission des caractères héréditaires.

WEISMANN en 1887, en s'appuyant sur tous les résultats obtenus auparavant établit la première théorie mettant en jeu le rôle des chromosomes dans l'hérédité : *"La substance contenue dans le noyau contrôle la forme et la fonction de chaque cellule. En mitose, cette substance se divise, donnant deux produits équivalents. Les oeufs avant d'être fécondés, perdent la moitié de leur substance nucléaire et celle-ci est remplacée exactement par la substance nucléaire apportée par le sperme. La reproduction sexuelle dépend de l'addition de deux noyaux à chaque génération. Puisque le nombre de chromosomes et la quantité de substance nucléaire ne peuvent être doublés à chaque génération sans qu'il y ait une compensation, il doit y avoir une diminution de moitié de la quantité de cette substance dans les cellules germinales mâles et femelles"*.

On voit que WEISMANN prédisait des phénomènes fondamentaux qui n'avaient pas encore été démontrés comme la division réductionnelle et le rôle du noyau dans l'expression cellulaire.

C'est vers 1903, que, redécouvrant les travaux de MENDEL datant de 1866, DE VRIES reconnut que les chromosomes avaient un comportement analogue aux "*particules de l'hérédité*" postulées pour la transmission des caractères héréditaires. On avait donc trouvé un support physique à l'hérédité : le chromosome. Ce résultat, exprimé dans l'hypothèse de SUTTON (1903), BOVERI (1904), représentait la synthèse de tous les travaux effectués pendant vingt-cinq années de recherches et d'observations.

Dès lors, l'étude des chromosomes et les études génétiques n'allaient plus être des disciplines séparées.

INTRODUCTION



La structure du chromosome est restée pendant longtemps un mystère malgré les progrès réalisés dans les disciplines biologiques. C'est au cours de ces dix dernières années que sa connaissance a progressé grâce à l'application de techniques nouvelles. Technique d'isolement permettant de réaliser l'analyse biochimique globale des constituants des chromosomes ou de groupes de chromosomes. Colorations délimitant des régions d'affinités tinctoriales différentes le long du chromosome : phénomène de banding (CASPERSON et coll. 1968, COMINGS, 1978) qui permet d'identifier les différents types de chromosomes. Colorations spécifiques de certaines zones du chromosome, comme la coloration des organisateurs nucléolaires : NOR s (DENTON et coll. 1976) qui sont situés sur les bras courts des chromosomes acrocentriques 13 - 14 - 15 - 21 - 22 chez l'homme. Ces régions chromosomiques contiennent l'ADN ribosomal codant les r ARN 18 S et 28 S, et elles s'associent pour former le nucléole. D'autres techniques comme l'hybridation *in situ* et l'immunologie ont permis de localiser des séquences nucléotidiques et des constituants protéiques sur le chromosome.

La microscopie électronique a également permis des progrès considérables dans la connaissance de l'ultrastructure de cet organe.

Tous ces résultats récents font apparaître la complexité d'organisation des constituants fondamentaux du chromosome (ADN, ARN, protéines) au sein de cet organe, ainsi que les problèmes posés par la pérennité de sa structure au cours des divers cycles cellulaires et des générations.

De plus, la dynamique chromosomique demeure encore assez obscure : peu de choses sont connues quant aux mécanismes assurant la formation des chromosomes par condensation de la chromatine, la réplication des chromosomes et leur ségrégation lors de la division cellulaire.

A - STRUCTURE DE L'ADN DANS LA FIBRE CHROMOSOMIQUE

Le problème de la condensation de l'ADN dans la fibre chromosomique, peut être facilement mis en évidence si l'on compare la quantité d'ADN contenue dans un chromosome et la taille de celui-ci. En effet, le plus grand des chromosomes humains contient environ $1,5 \cdot 10^{11}$ dalton d'ADN, soit une longueur correspondant à une double hélice de 7,3 cm. Toute cette quantité d'ADN est ramenée à un chromosome de 10μ de long, donc une condensation de 7300 fois.

De nombreuses études réalisées sur la chromatine interphasique, peuvent être prises en considération pour la fibre chromosomique (BAK et ZEUTHEN, 1977).

Dans la chromatine interphasique, l'ADN est associé aux histones pour former une structure dite en "collier de perles" (KORNBERG, 1974 ; OUDET et coll., 1975), où les perles sont les nucléosomes (Fig. 1), contenant deux exemplaires des histones H_2A ; H_2B ; H_3 ; H_4 (octamères d'histones) et 140 à 200 paires de bases nucléotidiques enroulées autour du noyau histonique (TRIFONOV, 1978).

Ce complexe ADN-histones donne naissance à une structure sept fois plus condensée que la fibre d'ADN (GRIFFITH, 1975 ; RIS, 1975).

Une seconde étape de condensation est réalisée par l'enroulement de la chaîne de nucléosomes en un solénoïde de 300 Å de diamètre (FINCK et KLUG, 1976 ; SPERLING et KLUG, 1977) comportant six nucléosomes par tour (Fig. 2), ce qui donne naissance à une structure 42 fois plus condensée.

Toutes ces structures sont présentes dans la fibre chromosomique et participent à la condensation de l'ADN dans le chromosome, en effet, il a été possible de mettre en évidence sur des chromosomes isolés, la fibre résultant de l'enroulement de la chaîne de nucléosomes (MOURIQUAND et coll., 1972 ; DEMINATTI et coll., 1975 a).

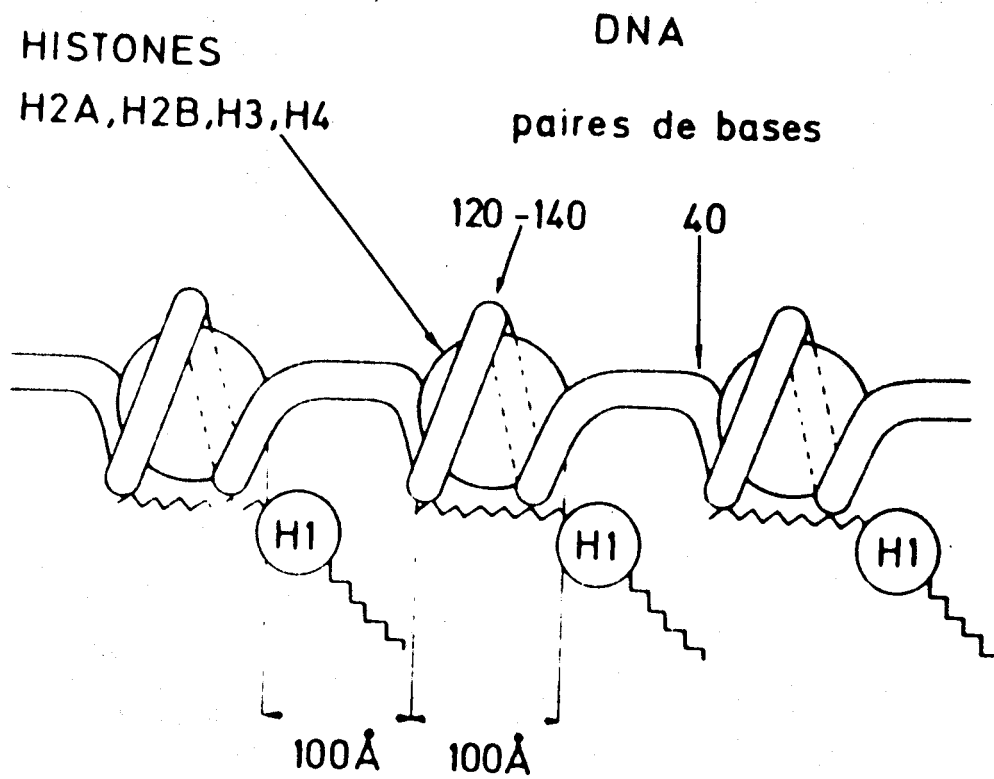


FIGURE 1 : Représentation schématique de la chromatine, faisant apparaître la structure en "collier de perles".

D'après BALDWIN et coll. (1975).

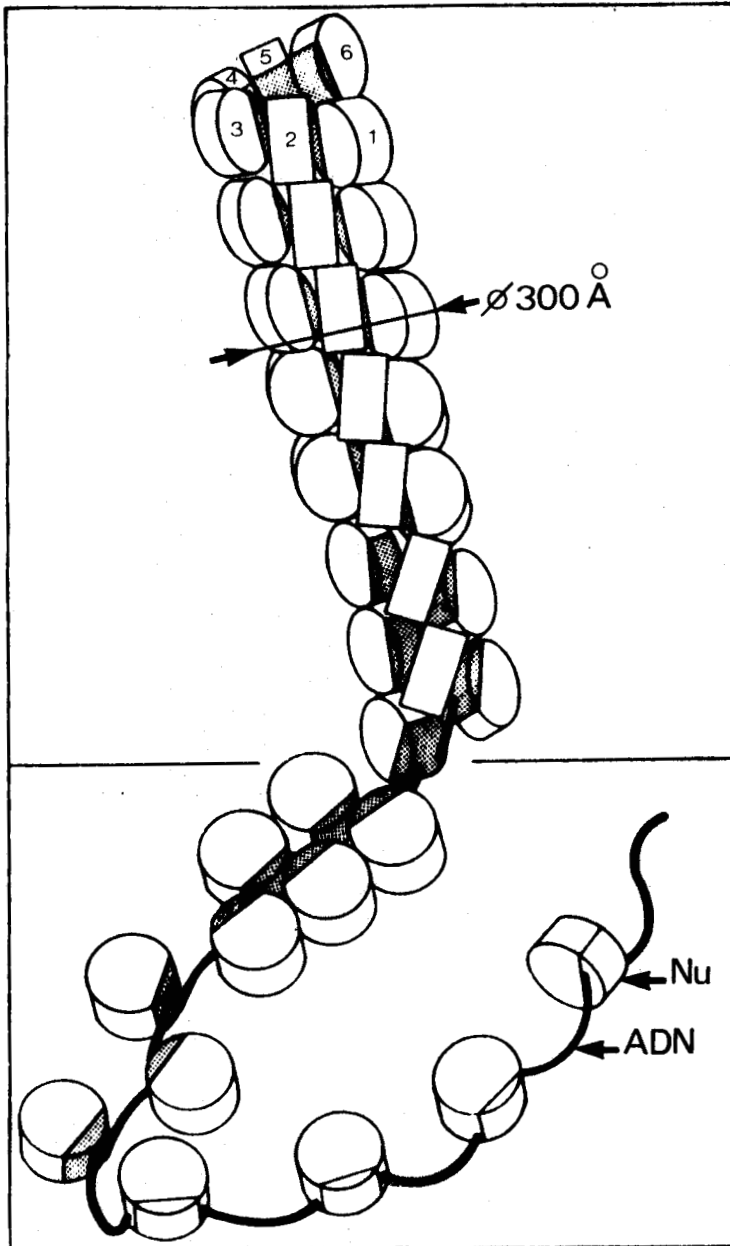


FIGURE 2 : Enroulement de la structure en "collier de perles" pour donner naissance à la fibre de 300 Å comportant six nucléosomes (Nu) par tour.

D'après THOMA et coll. (1979).

La condensation de la fibre d'ADN dans le chromosome métaphasique est beaucoup plus importante et divers modèles se proposent d'expliquer ce phénomène. On peut les classer en deux groupes : les modèles faisant intervenir un squelette central rigide sur lequel viennent s'attacher les fibres de chromatine et les modèles basés uniquement sur des enroulements ou des repliements successifs, sans intervention d'un squelette.

La différence fondamentale entre ces deux types de modèles est que dans les premiers, la rigidité est assurée par un squelette différent de la chromatine par sa nature et sa structure, alors que dans les seconds, la rigidité du chromosome est due à un arrangement des fibres de chromatine selon une structure plus ou moins complexe.

B - LES GRANDS TYPES DE MODELES PROPOSES POUR LA STRUCTURE DU CHROMOSOME

Parmi les modèles concernant la structure du chromosome citons pour mémoire le modèle de TAYLOR (1958) qui fut l'un des premiers auteurs à proposer un squelette chromosomique et le modèle de BAHR (1970) qui est basé sur des repliements successifs de la fibre de chromatine. Nous ne traiterons ici que des trois modèles actuels : deux d'entre eux faisant intervenir un squelette : le "*scaffold model*" de LAEMLI (1977), le "*core fiber model*" de STUBBLEFIELD (1971), le troisième étant basé sur des enroulements successifs, sans intervention d'un squelette : le modèle de BAK et ZEUTHEN (1976).

1 - Condensation de la fibre chromosomique par enroulements successifs (modèle de BAK et ZEUTHEN, 1976).

De nombreux auteurs ont proposé pour la fibre chromosomique, une structure compacte résultant d'enroulements successifs (KAUFMAN 1926, MANTON, 1950). Ce type de structure semblerait être confirmé par l'observation de la "*fibre unitaire*" du chromosome (BAK et coll. 1977) qui résulterait de l'enroulement de la structure en solénoïde de 300 Å, en un super solénoïde (Fig. 3), formant un cylindre de 4000 Å de diamètre (BAK et coll., 1979).

Cet enroulement donnerait naissance à une structure 30 à 40 fois plus condensée que la fibre de 300 Å. La contraction de la fibre d'ADN dans ce modèle serait de 1300 à 1500 fois. Il est donc nécessaire qu'il y ait encore une condensation d'un facteur 5 pour que la longueur de la fibre d'ADN soit compatible avec la taille du chromosome.

Cette condensation pourrait être réalisée par un enroulement de la fibre unitaire dans les chromatides. Ce type d'enroulement a déjà pu être observé par OHNUKI (1968) en microscopie optique (Fig. 4) grâce à des traitements qui dénaturent partiellement le chromosome.

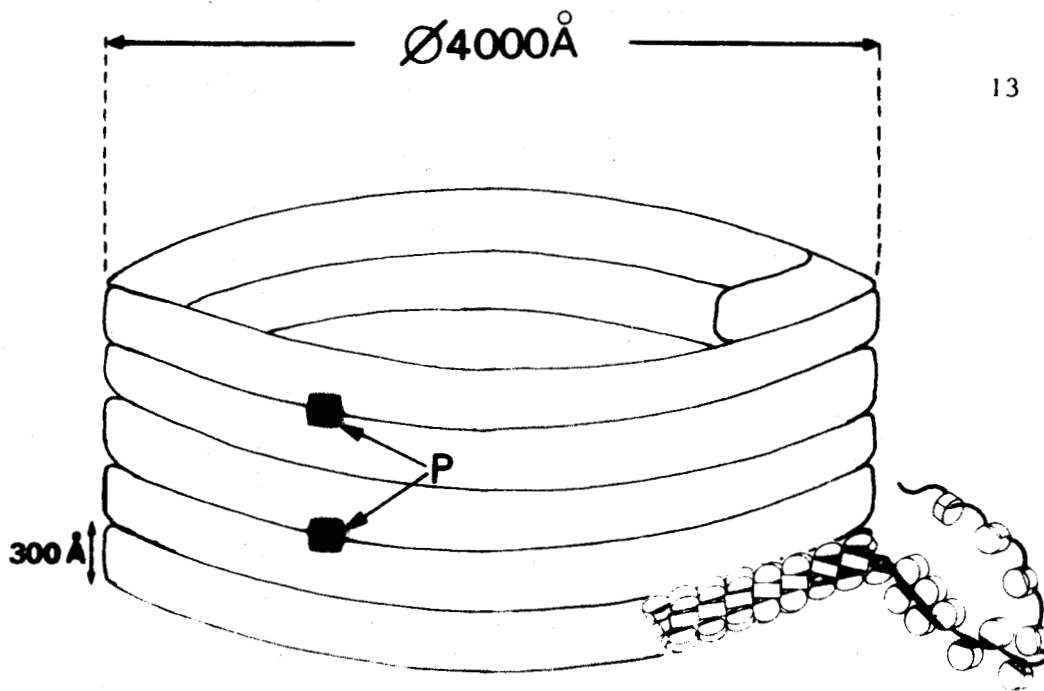


FIGURE 3 : Représentation schématique de la "fibre unitaire" de 4000 Å de diamètre, intervenant dans le modèle de BAK et ZEUTHEN (1977). Ce super-solénoïde résulterait de l'enroulement de la fibre de 300 Å, et serait maintenu compact par des ponts (P) entre les spires.



FIGURE 4 : Chromosomes de Hamster chinois faisant apparaître une structure hélicoïdale des chromatides.

D'après STUBBLEFIELD (1973).

Cependant, la structure hélicoïdale de la chromatide n'est pas admise par tous les auteurs, car elle n'apparaît pas sur les préparations observées en microscopie électronique.

2 - Modèles faisant intervenir un squelette chromosomique

Le repliement de la fibre chromosomique avancé par BAK (1970) et COMINGS (1972) a été repris par les deux modèles faisant intervenir un squelette chromosomique : le "*scaffold*^{*} model" de LAEMLI et le "*core*^{**} fiber model" de STUBBLEFIELD.

2.1. - Modèle de LAEMLI

L'élimination des histones par traitement de chromosomes métaphasiques à l'héparine et au sulfate de dextrane (ADOLPH et coll. 1977a) a permis de mettre en évidence en microscopie électronique, un noyau central (Fig. 5) ayant la forme du chromosome, entouré d'un halo d'ADN (PAULSON et LAEMLI, 1977). Ce noyau a pu être isolé par digestion enzymatique de l'ADN (ADOLPH et coll. 1977b), il est constitué de protéines non histoniques et serait responsable de la forme du chromosome métaphasique (Fig. 6). Les boucles d'ADN partant de cette matrice non histonique ont pu être mesurées par LAEMLI et ses collaborateurs, leur longueur est de 25 μ . Combinées aux octamères d'histones, les boucles d'ADN se trouveraient ramenées à une longueur de 0,6 μ , ce qui est en accord avec les résultats de SPERLING et KLUG (1977) qui donnent une condensation de l'ordre de 40 fois pour la fibre nucléohistonique.

Le diamètre du "*scaffold*", mesuré par LAEMLI et coll. étant de 0,4 μ , l'ensemble de la chromatide aurait un diamètre de 1 μ , ce qui est en accord avec les valeurs trouvées pour des chromosomes non traités.

* Echafaudage

** Noyau.



FIGURE 5 : Chromosome de cellule HeLa débarassé de ses histones par la méthode d'ADOLPH et coll. (1977), et montrant la matrice centrale (M) de nature protéique ("scaffold") et les boucles d'ADN qui l'entourent (B).

D'après LAEMLI et coll. (1977).

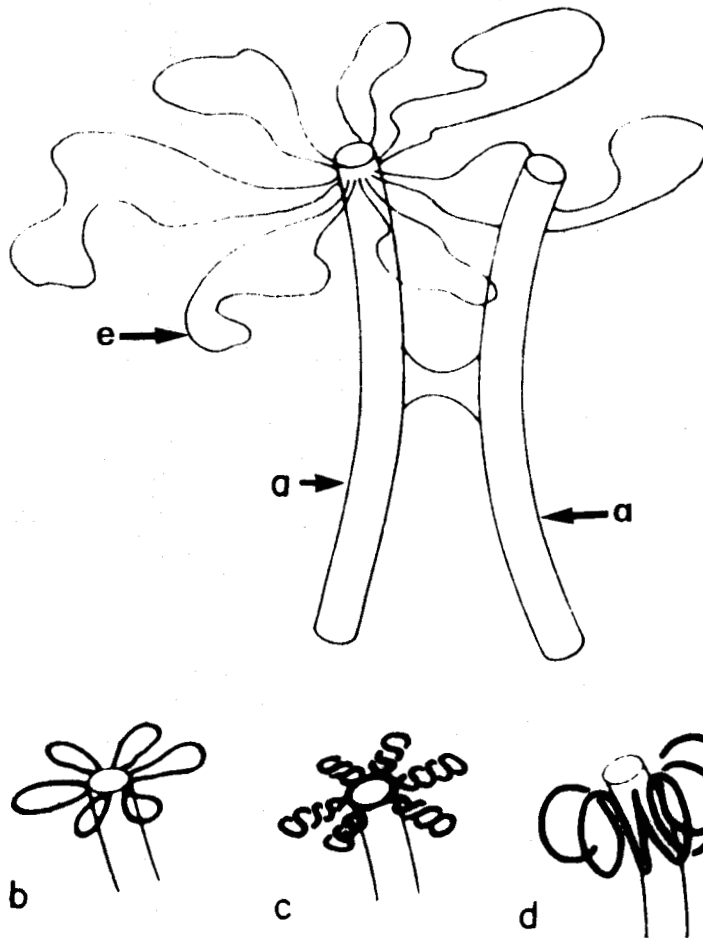


FIGURE 6 : "Scaffold Model" de LAEMLI.

L'architecture des chromatides est réalisée grâce à un squelette de nature protéique (non histonique) (a), sur lequel viennent s'attacher les boucles de chromatine (e).

(b, c, d) divers arrangements possibles de la fibre nucléoprotéique, condensée par interaction avec les histones.

D'après LAEMLI et coll. (1977).

2.2. - Le modèle de STUBBLEFIELD

STUBBLEFIELD et WRAY (1971), en utilisant une technique d'isolement de chromosomes à pH 6,8 (WRAY et STUBBLEFIELD, 1970) ont étudié l'ultrastructure du chromosome métaphasique.

Quand l'isolement est effectué de manière trop drastique, les chromosomes sont étirés jusqu'à 6 fois leur longueur initiale (Fig. 7 a), ce qui leur a permis de mettre en évidence deux fibres dans chaque chromatide (Fig. 7 b).

Ces fibres semblant parcourir la chromatide d'une extrémité à l'autre, ont été assimilées au squelette chromosomique (core fibers). Sur ce squelette viendraient s'attacher les fibres de chromatine, formant des boucles (Fig. 8). Il a été possible d'extraire la chromatine par dégradation de l'ADN et traitement à l'urée (WRAY et coll., 1972) ou par sonnication (STUBBLEFIELD et WRAY, 1971), et d'isoler ainsi les "cores". Ce sont des fibres de 500 Å de diamètre et de nature nucléoprotéique. Lorsque l'on emploie la sonnication, cette fibre se déroule et révèle sa structure. Elle est formée de deux rubans de 4000 Å de large et de 50 Å d'épaisseur (STUBBLEFIELD, 1973). Ces deux rubans sont enroulés entre eux, formant le "core" ou squelette de la chromatide (Fig. 8).

Il semble que la longueur d'un ruban nucléoprotéique intervenant dans la formation du "core" soit de 5 à 6 fois celle d'une chromatide, ce qui rappelle la structure hélicoïdale de la chromatide, observée en microscopie optique par OHNUKI (1968) et intervenant dans la dernière étape de condensation du modèle de BAK et ZEUTHEN (1977).

3 - Critiques formulées à l'encontre de ces modèles

Cependant, des travaux récents de GOYANES et coll. (1980), utilisant le pontage chimique entre ADN et protéines, grâce au formaldéhyde, semblent montrer qu'il n'existe pas dans le chromosome, d'autre structure hautement organisée que la fibre résultant de l'enroulement de la chaîne de

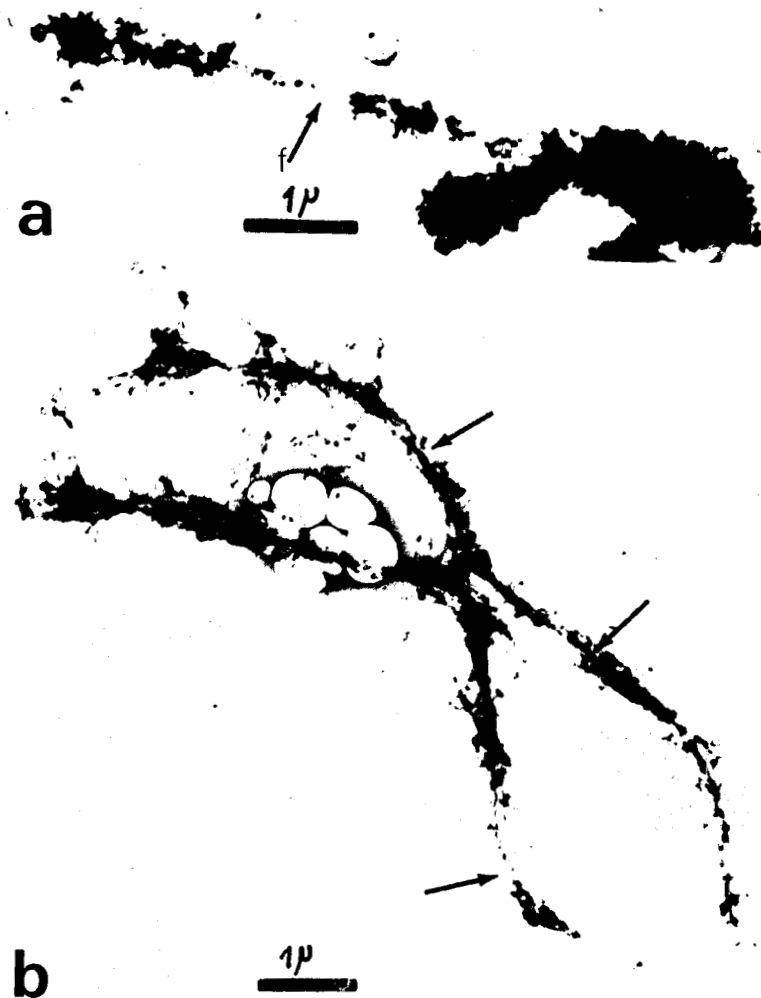


FIGURE 7 : Chromosomes de Hamster chinois isolés à pH 6,8, montrant la présence d'une fibre axiale dans chaque chromatide.

a : Chromosome montrant un bras anormalement étiré : on peut y observer la fibre axiale (f).

b : Chromosome après extraction de l'épichromatine à l'urée, noter la présence de fibres axiales (→) dans chaque chromatide.



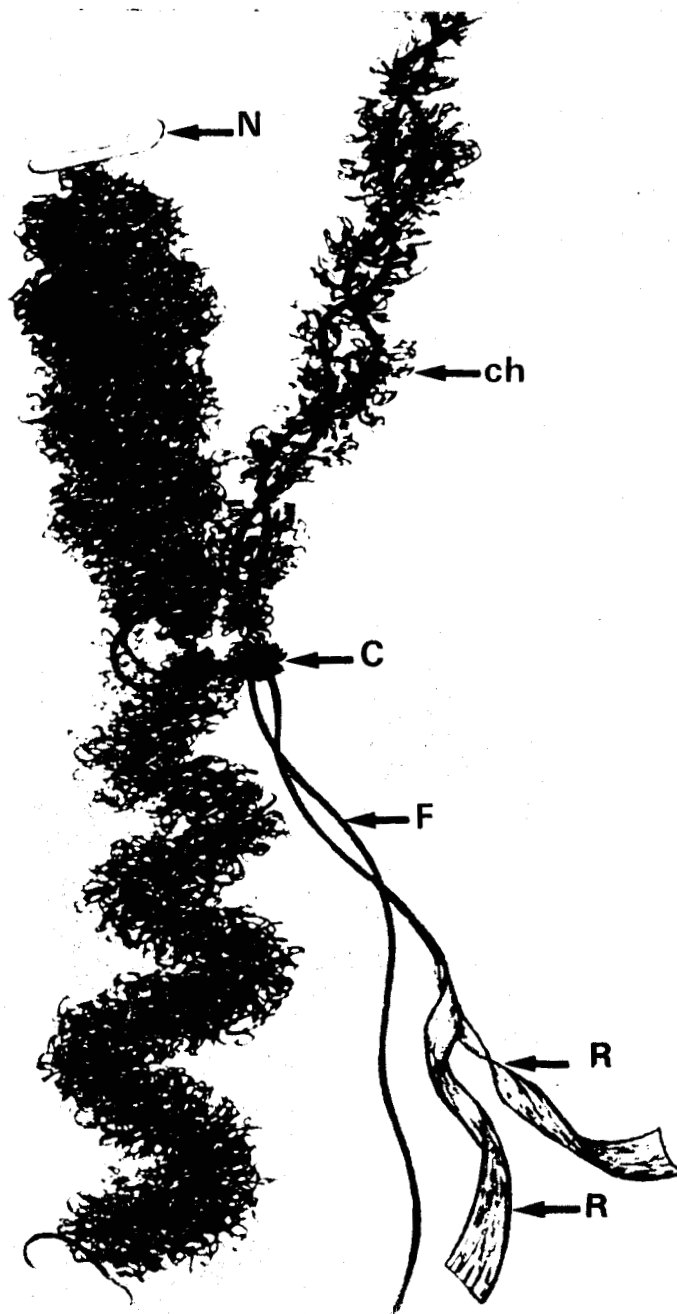


FIGURE 8 : "Core Fiber Model" de STUBBLEFIELD.

Représentation schématique de la structure du chromosome métaphasique d'après STUBBLEFIELD (1973).

Le squelette d'une chromatide est formé de deux fibres de 500 Å de diamètre (F), résultant de l'enroulement de deux rubans nucléoprotéique (R). Les fibres de chromatine (ch) viennent s'y attacher en formant des boucles, et leur condensation résulte des interactions ADN/histones.

C : centromère ; N : fragment de membrane nucléaire attachée au niveau de l'extrémité d'une chromatide.



nucléosomes (fibre de 250-300 Å). Ce qui serait en accord avec le modèle de DU PRAW (1968) dans lequel la formation du chromosome résulterait de repliements successifs de fibres de chromatine, plutôt que leur arrangement en un super-solénoïde ou l'attachement sur un squelette rigide. Selon OKADA et COMINGS (1979), le "scaffold" observé par LAEMLI et coll. serait un artéfact dû à l'agrégation de non histones par interactions hydrophobes causées par l'extraction des histones.

Il est donc clair que les techniques d'isolement et de traitements en vue de l'analyse des chromosomes peuvent induire des modifications de l'organisation du chromosome. En effet, la fibre de 500 Å, observée par STUBBLEFIELD et WRAY ne se rencontre que dans les chromosomes isolés selon la technique de WRAY et STUBBLEFIELD (1970), utilisant de l'hexylène glycol ainsi que dans toutes les techniques utilisant ce composé (DASKAL et coll., 1976 ; RIS, 1976).

Selon MARSDEN et LAEMLI (1979), la fibre de 250 Å, s'enroulerait pour former une fibre plus épaisse, de 500 Å, dans les techniques d'isolement utilisant de l'héxylène glycol.

C - MAINTIEN DE LA STRUCTURE COMPACTE DU CHROMOSOME

Tous les éléments structuraux présents dans le chromosome métaphasique, peuvent jouer un rôle dans le maintien de la structure compacte (ADN, ARN, histones, non histones).

L'accent a surtout été porté sur les composants protéiques (BENYAJATI et WORCEL, 1976 ; BAK et ZEUTHEN, 1977 ; LAEMLI et coll., 1977 ; JEPPENSEN et coll., 1978), mais il ne faut pas pour autant négliger les composants structuraux de nature nucléique : ADN, ARN.

1 - Rôle de l'ADN

Il est difficile d'admettre un rôle structural à la molécule d'ADN, elle a toujours été considérée comme un élément passif.

Cependant, il est possible de montrer qu'une modification de la molécule d'ADN, entraîne une modification du chromosome (DEMINATTI et coll., 1975) : l'incorporation de 5 Bromodesoxyuridine à la place de la thymidine, induit des modifications au niveau de la chromatide. Lorsque l'incorporation dure 72 h, une chromatide a incorporé le précurseur sur ses deux brins d'ADN, l'autre chromatide, sur un seul brin d'ADN.

Il est possible de différencier les deux chromatides, par les techniques de KORENBERG et FREEDLENDER (1974) ou de COUTURIER (1973), qui font apparaître une coloration différentielle. On constate alors que la chromatide entièrement substituée est plus longue que la chromatide substituée à 50 %. Cette asymétrie des chromatides est également visible au microscope électronique.

Il est difficile d'affirmer que ce résultat est dû à un rôle purement structural de l'ADN, mais il est très probable qu'une modification au niveau de l'ADN, change son comportement vis-à-vis des autres éléments structuraux, en modifiant les interactions ADN-protéines, ARN-protéines.

En effet, GENEIX et coll. (1975) décrivent des fibres chromosomiques filamenteuses après incorporation de 5 Br dU, phénomène qu'ils expliquent par une altération des nucléoprotéines chromosomiques.

2 - Rôle des histones

Le rôle des histones dans le maintien de la structure compacte du chromosome métaphasique, est de condenser la fibre d'ADN au niveau des nucléosomes, et de former ainsi la fibre de 300 Å (cf. Fig. 2).

Il a été montré le rôle des histones dans la condensation de la fibre chromosomique (LAI et DEMINATTI, 1977) en utilisant deux techniques d'isolement de chromosomes, l'une à pH acide l'autre à pH basique (DEMINATTI et coll., 1975b). La méthode à pH acide s'est avérée enlever une partie des histones H_2A , H_2B ainsi que la totalité de l'histone H_1 . Les chromosomes isolés en milieu basique présentent en microscopie électronique, des fibres de 230 à 270 Å de diamètre, alors que dans le chromosome isolé en milieu acide, elles ne sont que de 180 à 230 Å. La perte d'histones altère donc la condensation de la fibre chromosomique. Ces résultats sont confirmés par les travaux de HSIANG et COLE (1977) qui ont montré que l'histone H_1 forme *in vitro* avec de l'ADN bicaténaire un complexe globuleux très condensé. Cependant, le chromosome isolé à pH acide conserve sa morphologie malgré la perte de l'histone H_1 , ce qui est en accord avec les données récentes sur l'histone H_1 (THOMA et coll., 1979) qui tendent à montrer que son rôle est de favoriser la condensation dans la fibre de chromatine.

Le rôle des histones dans la condensation de la fibre chromosomique est donc certain, et dans tous les modèles proposés elles interviennent pour condenser la molécule d'ADN. Dans le modèle de BAK et ZEUTHEN, il s'agit des premières étapes de condensation donnant la structure en collier de perles puis la fibre de 300 Å, dans les modèles de LAEMLI et de STUBBEFIELD, qui font intervenir un squelette chromosomique, le rôle des histones est d'assurer la condensation des boucles d'ADN fixées sur le squelette.

3 - Rôle des non-histones

Selon les modèles proposés, le type d'action des non histones est différent. Dans le modèle de LAEMLI, les non histones intervenant dans la structure du "scaffold" ont un rôle évident dans le maintien de la structure car elles constituent un squelette rigide sur lequel peut s'échafauder le chromosome.

Dans le modèle de STUBBLEFIELD, les non histones interviendraient dans la formation des rubans nucléoprotéiques qui constituent les "cores".

Dans le modèle de BAK et ZEUTHEN, leur rôle serait d'assurer la stabilité de la fibre de 4000 Å : certaines non histones joueraient le rôle de ponts entre les différentes spires du supersolénoïde.

4 - Rôle de l'ARN

Dans le cadre de leur modèle, BAK et ZEUTHEN ont avancé le fait que les ponts qui maintiennent jointives les spires du supersolénoïde, pourraient être de nature ribonucléoprotéique. Cette hypothèse semble expliquer certains résultats récents (STROZYK et coll., 1981) qui montrent que la transcription *in vitro* sur des chromosomes métaphasiques de cellules KB, n'est effective que si du matériel est enlevé au chromosome par divers traitements dont la ribonucléase. Si l'on considère que la transcription est impossible sur du matériel trop condensé, à cause de l'encombrement stérique, on peut avancer le fait que le traitement à la ribonucléase a pour résultat de dégrader les ponts inter-spires, provoquant une certaine décondensation de l'édifice et par là même, facilitant l'action de l'ARN polymérase.

Il a d'ailleurs été récemment montré (PEDERSON et BHORJEE, 1979) la présence dans le chromosome, d'ARN de petites tailles (environ 200 nucléotides) liés à l'ADN de manière covalente. Ces ARN ne sont ni l'ARN ribosomal 5 S ni des amorces de réplication (fragments d'OKAZAKI). Ils peuvent donc avoir un rôle dans la structure du chromosome.

D - DYNAMIQUE DE LA FIBRE CHROMOSOMIQUE

1 - Reproductibilité dans l'organisation des chromosomes

Le chromosome se condense lors de la mitose, à partir de la chromatine dispersée, interphasique. Il faut supposer que ce phénomène ne s'effectue pas de manière aléatoire, car il y a reproductibilité du chromosome au cours des diverses mitoses.

Il a été démontré par hybridation *in situ* que certaines zones chromosomiques appelées organisateurs nucléolaires contiennent toujours les séquences nucléotidiques codant les rARN 18 S et 28 S (HENDERSON et coll., 1972). On voit donc que ces gènes ribosomiaux se retrouvent toujours à la même position sur les chromosomes.

D'autres résultats confirment la position constante de séquences nucléotidiques : la détermination de cartes de gènes sur les chromosomes en utilisant la fusion cellulaire (RUDDLE, 1970), montre la constance de la position des gènes sur les chromosomes. De plus, le phénomène de banding chromosomique présentant une très haute reproductibilité le long des chromosomes, est une preuve de l'organisation non aléatoire du chromosome.

2 - Problème de la condensation des chromosomes

La fusion *in vitro* entre une cellule mitotique et une cellule interphasique, permet de provoquer la condensation prématurée de la chromatine interphasique. Les chromosomes ainsi obtenus sont plus longs et plus fins que les chromosomes métaphasiques (SCHWARZACHER, 1976).

Toutes les structures chromosomiques existent sur ces chromosomes prématurément condensés : les centromères, les constriction secondaires, les satellites. Il est de plus possible d'y faire apparaître un banding analogue à celui des chromosomes mitotiques ainsi que méiotiques (UNAKUL et coll., 1973).

Toutes ces données montrent que l'organisation du chromosome existe à l'état potentiel lors de l'interphase, et qu'il doit exister dans la cellule mitotique des facteurs capables de provoquer la condensation de la chromatine de la cellule interphasique. Mais la nature de ces facteurs et les phénomènes qui président à la condensation du chromosome sont encore très mal connus.

LAEMLI et coll. ont tenté d'expliquer ce phénomène dans le cadre de leur "*scaffold model*". Ils avancent l'idée que le squelette non histonique formerait un réseau dispersé à l'interphase, réseau qui serait capable de se rassembler pendant la phase de condensation, entraînant avec lui les fibres de chromatines qui lui sont attachées, afin de former un chromosome condensé.

Dans le modèle de STUBBLEFIELD, la condensation du chromosome serait aussi en relation avec le squelette chromosomique : l'enroulement progressif des rubans nucléoprotéiques étant l'agent qui assurerait la contraction.

Quel que soit le modèle, la présence d'un squelette chromosomique ("*scaffold*" ou "*core*") implique que les boucles de chromatine doivent avoir des points d'ancrages spécifiques sur ce squelette. Il faut donc supposer qu'il existe toujours une relation étroite entre les fibres de chromatine et les éléments qui constituent le squelette (WRAY et coll., 1972) si l'on veut expliquer la position constante des gènes sur un chromosome donné ainsi que la reproductibilité d'individualisation des différents chromosomes.

L'intervention de protéines contractiles dans le mécanisme actif de condensation a souvent été avancé (COMINGS et HARRIS, 1975). Des auteurs ont mis en évidence des protéines de type actine (JOCKUSCH et coll., 1971) et myosine (JOCKUSCH et coll., 1973) chez les eucaryotes inférieurs et chez les eucaryotes supérieurs (LESTOURGEON et coll., 1975 ; DOUVAS et coll., 1975). Ces protéines ont pu être assimilées aux protéines contractiles car elles ont d'une part la même mobilité électrophorétique et donnent les mêmes fingerprints (JOCKUSCH et coll., 1973) que l'actine et la myosine du muscle.

Il est très probable que ces protéines contractiles aient un rôle dans le mécanisme de condensation de la chromatine, car l'augmentation de leur concentration intranucléaire est concomitante de la condensation de la chromatine et de son inactivation (COMINGS et HARRIS, 1975).

Cependant, leur présence dans le noyau des eucaryotes reste assez discutée car des techniques analytiques précises semblent indiquer qu'elles ne comigrent pas exactement avec les protéines contractiles de référence (COMINGS et HARRIS, 1976).

Le problème de l'intervention des protéines contractiles reste donc entier et il n'a pas été possible de les mettre en évidence dans les chromosomes métaphasiques.

Il est envisageable que leur présence soit due à une contamination, par les protéines du fuseau et des microtubules qui contiennent des protéines contractiles (HERMAN et POLLARD, 1978.).

E - LES PROTEINES NON HISTONIQUES DU CHROMOSOME

Les non-histones, ne forment pas une classe de protéines, au sens où sont considérées les histones, mais plutôt un ensemble de plusieurs groupes de protéines qui diffèrent par leurs propriétés. Elles sont très hétérogènes, on a pu dénombrer jusqu'à 500 protéines différentes (PEDERSON et MAC CONCKEY, 1976) dans un type cellulaire donné, mais l'on peut en fait, retenir une vingtaine de protéines majeures (ELGIN et BONNER, 1972). Toutes les non-histones ont en commun leur caractère acide, ce qui les différencie des histones.

Alors que de nombreuses études portent sur les non-histones du noyau interphasique (SADGOPAL et BONNER, 1970 ; WU et coll., 1973 ; COMINGS et HARRIS, 1976), peu de travaux ont été réalisés sur les non-histones participant à la structure et la fonction du chromosome mitotique.

La plupart de ces travaux portent sur le chromosome du hamster chinois (*Cricetulus griseus*), ce sont ceux de WRAY et WRAY (1979), JEPPESEN et coll. (1978), qui ont notamment étudié la répartition des non-histones dans différentes classes de chromosomes séparées en fonction de la taille.

Ces auteurs ont montré que les protéines non-histoniques des chromosomes ne sont pas réparties de manière identique sur les différents chromosomes. Certains travaux portent sur les chromosomes de souris comme ceux de MATSUKAMA et UTAKOJI (1977) , qui montrent la présence de non-histones spécifiques dans les régions centromériques du chromosome murin.

On ne rencontre en fait que peu de travaux sur les non-histones du chromosome métaphasique humain.

F - ACTIVITE "TEMPLATE" DU CHROMOSOME METAPHASIQUE

Le chromosome isolé peut être utilisé comme matrice pour la synthèse d'ARN : mis en présence de précurseurs et d'ARN polymérase, il peut dans certaines conditions être transcrit. Cette faculté est dénommée activité "template".

La plupart des études réalisées sur ce sujet portent sur les chromosomes géants des larves de diptères (HAMEISTER, 1977, SEDEROFF et coll., 1973). Peu de travaux portent sur l'activité "template" des chromosomes métaphasiques humains et sur les facteurs responsables de l'inhibition de l'activité "template" au stade métaphasique. Les travaux de COHEN et DEANE, (1976) montrent que la chromatine interphasique peut être transcrite par une polymérase exogène, alors que la chromatine métaphasique (chromosome métaphasique) ne possède pas cette faculté. Ces auteurs ne précisent cependant pas les causes de cette inertie qui correspond à la métaphase, laquelle est caractérisée par une inactivité génique.

NOTRE OBJECTIF

Ce travail a pour objectif d'élucider la structure du chromosome, soit en faisant varier *in vivo* l'un de ses constituants, soit en analysant *in vitro* les conditions de variation de son activité fonctionnelle "template".

Aussi nous avons étudié la composition en protéines non histoniques du chromosome métaphasique humain et recherché d'éventuelles modifications de ces protéines après incorporation d'un analogue structural de la thymidine, au sein de la molécule d'ADN.

Dans une seconde partie, nous avons utilisé le chromosome métaphasique comme substrat pour la synthèse d'ARN en présence d'une ARN polymérase exogène. Le chromosome métaphasique isolé, s'étant révélé inerte vis-à-vis de la transcription, nous avons examiné les divers traitements capables de restaurer cette activité "template", ainsi que les éventuelles modifications protéiques du chromosome, consécutives à ces traitements.

MATERIEL et METHODES

A B R E V I A T I O N S

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
5-BrdU	5 bromodésoxyuridine
EDTA	Acide éthylène-diamino-tétracétique
GTP	Guanosine 5'triphosphate
MEM	Milieu essentiel minimum
SDS	Dodecyl sulfate de sodium
SSC	"Standard saline citrate"
TEMED	N, N, N', N'-tétraméthyl éthylènediamine
Tris	trishydroxyméthylaminométhane
PMSF	α toluène sulfonyl fluorure
UTP	uridine 5'-triphosphate

A - CULTURES CELLULAIRES

Deux types de cultures de cellules ont été utilisés : la culture en suspension pour les cellules KB et la culture en nappe pour les fibroblastes de hamster chinois.

1 - Culture de cellules KB

Les cellules KB (souches KB₃ de chez GREEN) dérivant d'un carcinome de l'épiderme du plancher buccal d'un homme adulte, sont cultivées en suspension dans du milieu "MEM Joklik modified" sans calcium (GIBCO) supplémenté de 5 % de sérum de cheval décomplémenté.

2 - Culture de fibroblastes de hamster choisis (*Cricetulus griseus*)

Les fibroblastes de hamster chinois sont cultivés en nappe dans des bouteilles Falcon. Le milieu utilisé est du milieu de EAGLE modifié par DULBECCO (GIBCO), additionné de 10 % de sérum de veau foetal décomplémenté.

B - INCORPORATION DE 5-BROMODESOXYURIDINE (5 BrdU)

La 5-BrdU (KOCHLIGHT) est ajoutée dans les cultures à la dose de 10 µg/ml pendant 72 h ou 96 h avant l'isolement des chromosomes.

L'incorporation est mise en évidence par la technique de fluorescence à l'acridine orange selon la technique de COUTURIER et coll. (1973). Après fixation au mélange méthanol-acide acétique (3 : 1), la préparation de chromosomes est réhydratée dans des bains d'alcool éthylique décroissants : 95 - 90 - 80 - 70 - 50 - 30 - 20 - 10 - eau, puis colorée dix minutes dans une solution d'acridine orange à 50 µg/ml dans du tampon phosphate M/15 pH 6,8.

La préparation est ensuite rincée dans le tampon phosphate puis montée entre lame et lamelle dans ce même tampon.

L'observation au microscope à UV se fait en fond noir avec un objectif x 100 muni d'un diaphragme à iris. L'illumination de la préparation est réalisée par une lampe à vapeur de mercure HBO 200 ; nous utilisons un filtre d'excitation BG 12 et un filtre d'arrêt à 530 nm.

L'incorporation est réalisée pendant 72 h et 96 h (Fig. 9) afin d'obtenir d'une part des chromosomes dont l'ADN d'une chromatide est substitué sur les deux fibres, l'autre chromatide étant substituée sur une seule fibre d'ADN, d'autre part des chromosomes dont l'ADN est entièrement substitué.

C - ISOLEMENT DE CHROMOSOMES METAPHASIQUES ET DE NOYAUX INTERPHASIQUES

Nous utilisons la méthode d'isolement à pH acide de SALZMAN et coll. (1966) adaptée à notre matériel cellulaire. Toutes les solutions contiennent un inhibiteur de protéases (PMSF) à la concentration de 10^{-4} M.





1 - Isolement de chromosomes métaphasiques de cellules KB

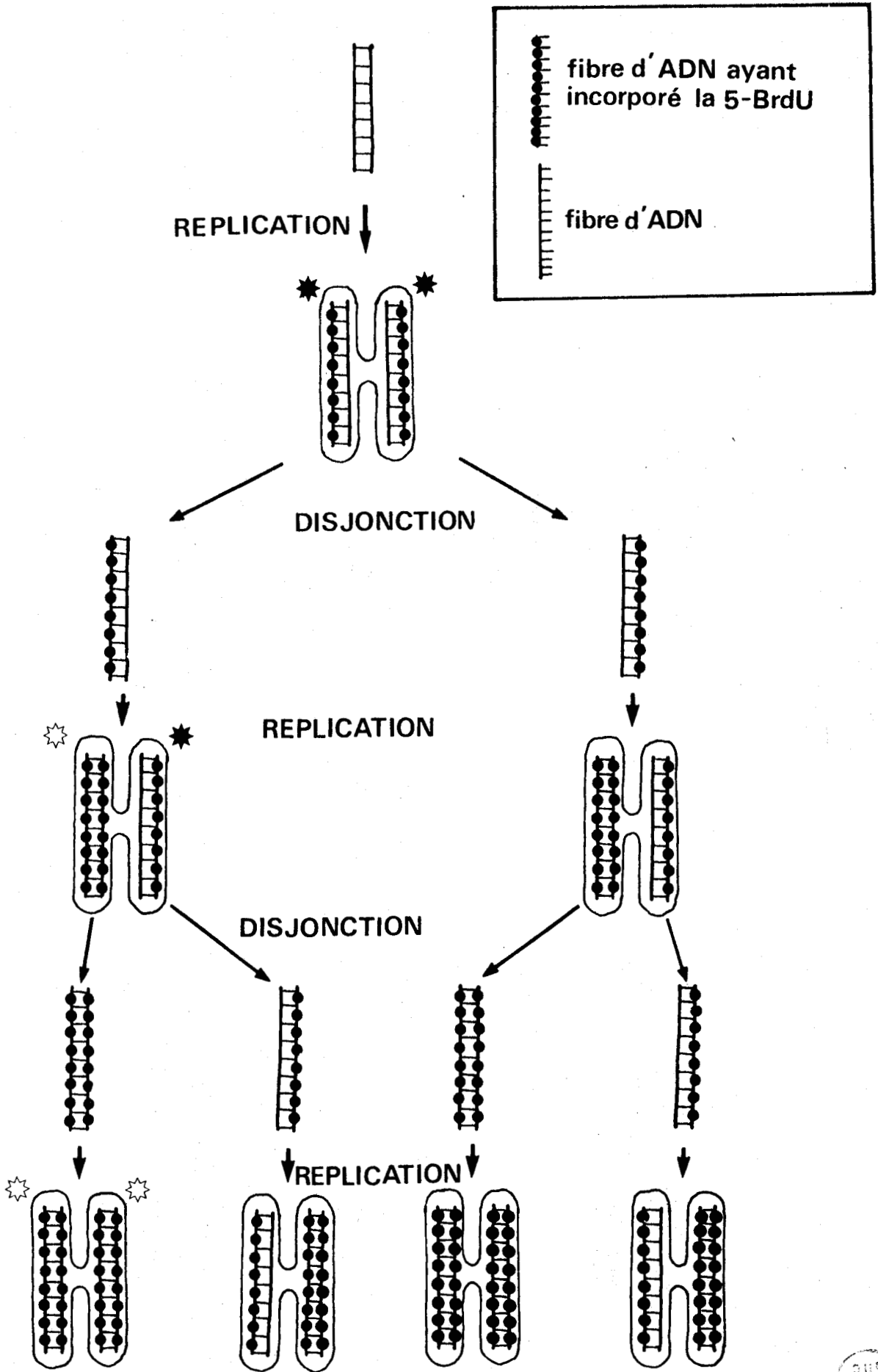
Les cellules en suspension sont bloquées en métaphase par l'action de la colchicine (colchinéos HOUDE) à 0,1 μ g/ml pendant 16 heures. Les cellules sont ensuite lavées dans du milieu MEM sans sérum puis subissent un choc hypotonique pendant 25 mn à 37° dans une solution de citrate trisodique $1,7 \cdot 10^{-2}$ M, $MgCl_2$ 10^{-3} M, $CaCl_2$ 10^{-3} M. Les cellules sont ensuite centrifugées à 80 g pendant 10 mn, reprises dans une solution d'acide citrique 0,12 M, saccharose 0,1 M, saponine 0,1 M, à 4°C, puis broyées dans un homogénéiseur de type DOUNCE.

A ce stade, nous avons un mélange de noyaux et de chromosomes métaphasiques.

7

FIGURE 9 : Schéma montrant l'incorporation de 5-BrdU au cours de la réplication de l'ADN du chromosome.

Lors de la première réplication, chaque chromatide possède un ADN substitué par le précurseur, sur une seule fibre. Les propriétés tinctoriales après coloration à l'acridine orange selon la méthode de COUTURIER et coll. (1973) sont identiques à celles du chromosome non substitué : les deux chromatides apparaissent fortement fluorescentes . Après disjonction des deux chromatides et réplication, une chromatide possède un ADN entièrement substitué, l'autre chromatide un ADN substitué sur une seule fibre. Il apparaît à ce niveau une asymétrie tinctoriale après coloration à l'acridine orange : une chromatide est très fluorescente  l'autre peu fluorescente . Après un troisième cycle de réplication, une population de chromosomes a son ADN totalement substitué par le précurseur, les deux chromatides apparaissent alors peu fluorescentes .



Les chromosomes sont séparés des noyaux par une série de centrifugations différentielles à 80 g pendant 10 mn.

Les chromosomes métaphasiques sont sédimentés à 700 g pendant 90 mn. Ils sont lavés dans le tampon pH₇ de conservation des chromosomes, et purifiés sur saccharose 2,2 M dans le tampon de conservation à 65000 g pendant 90 mn afin d'éliminer les contaminants cytoplasmiques et membranaires.

Tampon de conservation des chromosomes :

Solution A	:	Saccharose	0,1 M
		MgCl ₂	10 ⁻³ M
		CaCl ₂	10 ⁻³ M
Solution B	:	HCl	1 N
		Acétate de sodium	1 M

La solution A est ajustée à pH₇ à l'aide de la solution B.

2 - Isolément de chromosomes de fibroblastes de hamster chinois

Les fibroblastes de hamster chinois sont bloqués en métaphase par addition de colchicine à 5 µg/ml pendant 16 heures. Les cellules en métaphase sont bien visibles au microscope inversé car elles sont rondes et n'adhèrent presque plus au support (Fig. 10), il est facile de les détacher par des chocs mécaniques sur la boîte Falcon. Nous obtenons alors une suspension cellulaire contenant environ 95 % de cellules en métaphase.

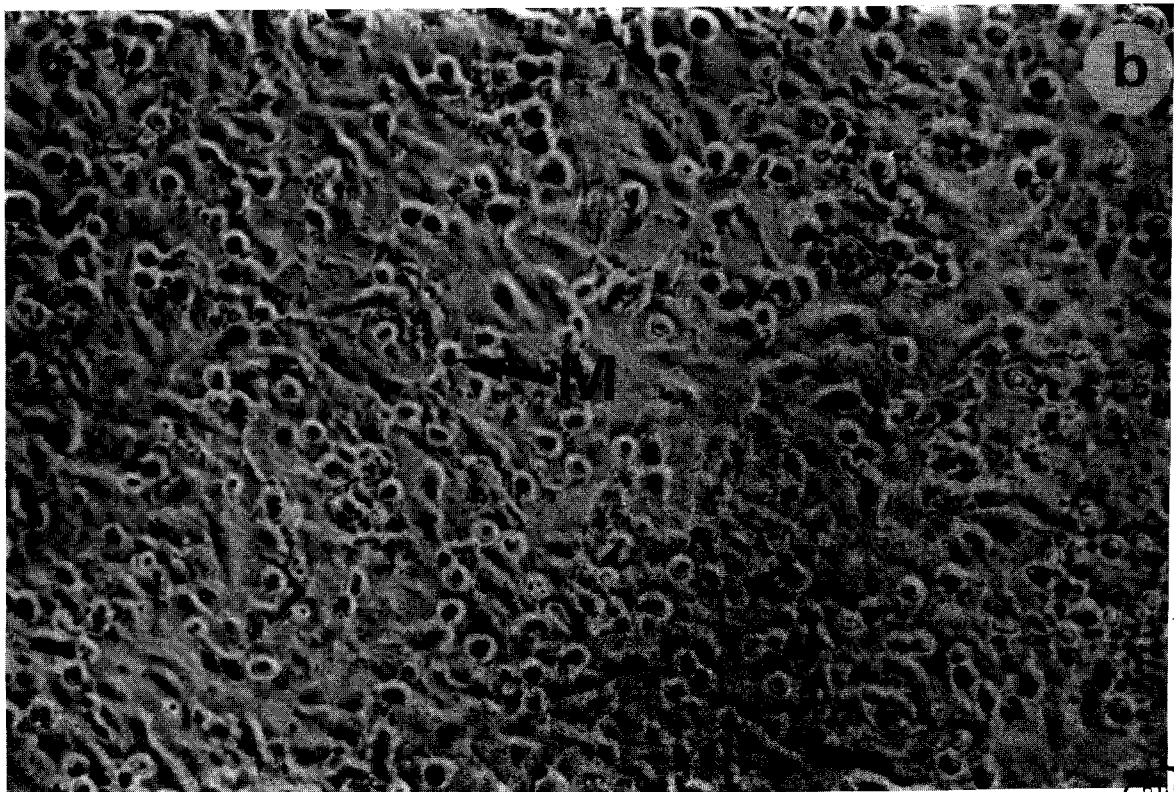
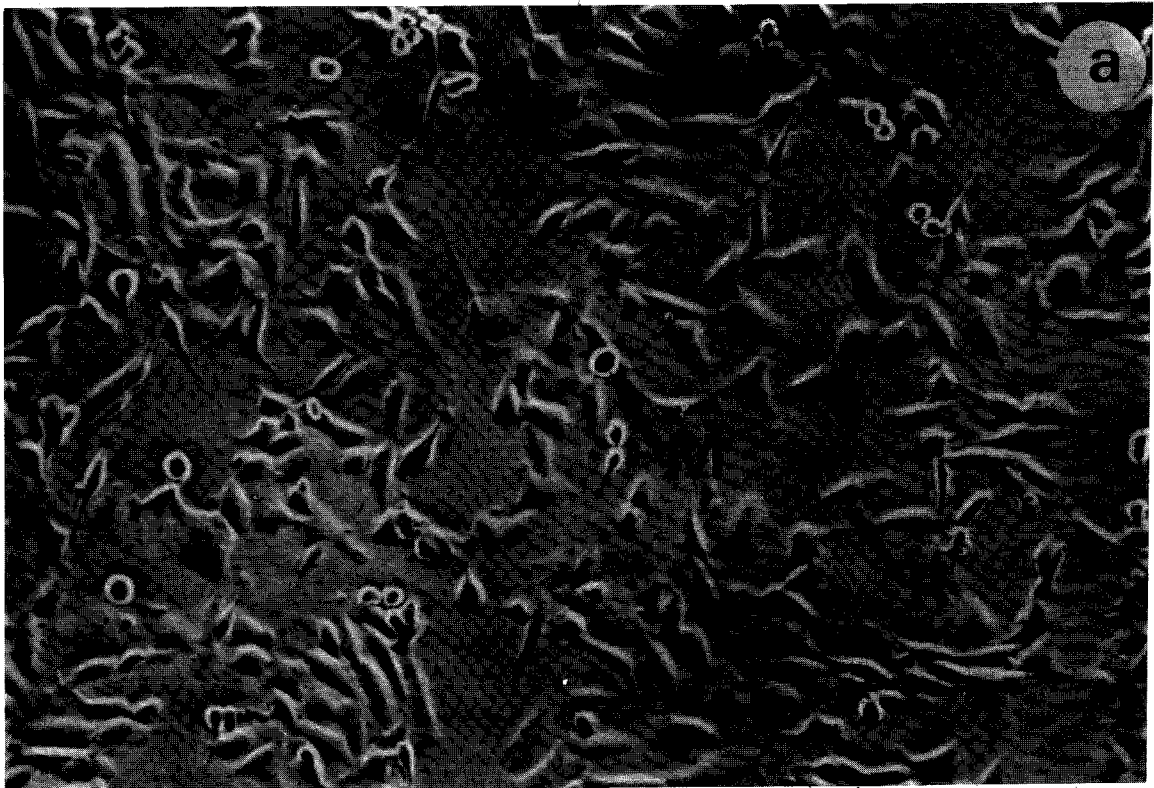
Le mode opératoire est ensuite identique à l'isolement de chromosomes de cellules KB en suspension.

FIGURE 10 : Cultures de fibroblastes de Hamster chinois observées au microscope inversé en contraste de phase.

a : Culture avant action de la colchicine.

Les fibroblastes (F) forment un tapis où l'on peut observer certaines cellules en métaphase (M) qui se caractérisent par un aspect arrondi.

b : Culture après action de la colchicine à 5 µg/ml pendant 16 h. La proportion de cellules en métaphase (M) est beaucoup plus importante.



BUS
LILLE

3 - Isolement de noyaux interphasiques de cellules KB

La technique d'isolement est identique à celle décrite pour les chromosomes, excepté que nous n'ajoutons pas de colchicine. Les noyaux sont également purifiés sur saccharose 2,2 M dans le tampon de conservation à pH₇, 65000 g pendant 90 mn.

D - COLORATION DU MATERIEL NUCLEAIRE

Les préparations de chromosomes et de noyaux sont colorées 10 mn dans du GIEMSA R (R.A.L.) à 4 % (v/v) tamponné à pH 6,8.

Après autoradiographie, le matériel est coloré 30 mn dans du GIEMSA GURR R 66 (SEARLE) à 2 % (v/v) tamponné à pH 6,8.

Préparation du colorant au GIEMSA R.

- . 4 ml GIEMSA R
- . 4 ml tampon phosphate M/15 pH 6,8
- . qsp 100 ml d'eau distillée.

Préparation du colorant au GIEMSA GURR R 66

Le colorant est une solution de GIEMSA R 66 à 2 % (v/v) dans du tampon pH 6,8 qui est réalisé en ajustant une solution de méthanol 3 % (v/v), acide citrique $2,6 \cdot 10^{-3}$ M avec une solution de Na_2HPO_4 0,2 M.

E - ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE SDS

Les protéines sont analysées sur gel de polyacrylamide SDS selon la technique de LAEMLI (1970) en utilisant un appareillage décrit par KERCKAERT (1978). Des gels d'acrylamide à 10 % (w/v) et en gradient de 5 à 12 % ont été employés. Les deux méthodes donnent des résultats équivalents.

Gel de concentration

=====

- . Acrylamide 3 % (w/v)
- . bis-acrylamide 0,08 % (w/v)
- . urée 2,5 M
- . SDS 1 % (w/v)
- . Tris/HCl 80 mM pH 6,8

Gel de séparation

=====

- . Acrylamide 10 % (w/v) ou gradient 5-12 % (w/v)
- . Bisacrylamide 0,26 % (w/v)
- . urée 2,5 M
- . SDS 1 % (w/v)
- . Tris/HCl 0,4 M pH 8,8

L'acrylamide est polymérisé par addition de persulfate d'ammonium à 0,5 mg/ml final et de TEMED 0,05 ‰ (v/v). Le tampon de migration est du tris 25 mM pH 8,8, glycolle 0,2 M, SDS 1 % (w/v).

Les échantillons à analyser ou les chromosomes sont dissouts dans du tris/HCl 0,15 M pH 6,8, SDS 5 % (w/v), β mercapto-éthanol 5 % (v/v), urée 8 M. Le bleu de bromophénol est utilisé comme marqueur de front de migration. La migration est réalisée sous 50 mA pendant 4 à 6 heures.

Les gels sont ensuite colorés une nuit au bleu de coomassie à 0,5 % (w/v) dans une solution d'alcool à 43 % (v/v) et d'acide acétique à 9,5 % (v/v), puis décolorés par diffusion dans des bains successifs d'alcool à 30 % (v/v), acide acétique 12,5 % (v/v).

Les enregistrements sont effectués au microdensitomètre ISCO.

Les poids moléculaires sont déterminés d'après la méthode de WEBER et OSBORN (1969) qui relie dans une relation linéaire la mobilité électrophorétique ou logarithme décimal du poids moléculaire.

F - SYNTHÈSE D'ARN *in vitro* ET AUTORADIOGRAPHIE

Le matériel dont on veut tester l'activité "template" est déposé sur lame histologique puis recouvert de 50 μ l de la solution de tris/HCl 40 mM pH 7,9 ; MgCl₂ 10 mM, dithiothreitol 1 mM, EDTA 0,1 mM, KCl 50 mM, ATP 0,4 mM, GTP 0,4 mM, CTP 0,4 mM, UTP 0,4 mM, ARN polymérase (SIGMA) d'*E. coli* 31 unités*/ml, UTP³H 90 μ Ci/ml, et incubé une heure à 37°C en chambre humide.

Les lames sont ensuite lavées dans trois bains successifs de NaCl 0,3 M, Citrate tri-sodique 0,03 M (2 x SSC), pyrophosphate de sodium 10 mM ajustés à pH 7, puis rincées à l'eau distillée et passées dans un bain d'alcool à 70 % et un bain d'alcool à 95 %. Après séchage à l'air les lames sont plongées dans de l'émulsion liquide Kodak NTB₂ (Eastman Kodak) et stockées en boîtes étanches à la lumière. Le temps d'exposition varie de 4 à 10 jours.

Les lames sont révélées à 18°C dans du révélateur Kodak D 19 B et traitées au fixateur Kodak UNIFIX.

Après rinçage à l'eau distillée et séchage à l'air, les lames sont colorées au GIEMSA GURR R 66 comme décrit au paragraphe D.

G - TRAITEMENTS SUR LAMES AVANT SYNTHÈSE D'ARN

Avant de tester l'activité "template" *in vitro*, différents traitements sont effectués afin de modifier le comportement du chromosome dans notre système de synthèse d'ARN *in vitro*.

- Fixation : Les lames sont plongées 10 mn dans un mélange de méthanol-acide acétique 3 : 1 (v/v) puis séchées à l'air.

*Une unité incorpore 10⁻⁹ mole d'ATP dans le matériel acidoprécipitable, en 10 mn à pH 7,9 et à 37°C, en utilisant l'ADN de thymus de veau comme substrat.

- Traitement à 1'HCl 0,25 N : les lames sont recouvertes de 200 μ l d'HCl 0,25 N et incubées en chambre humide une nuit à 37 ° C.
- Traitement au 2 x SSC : les lames sont recouvertes de 200 μ l d'une solution de NaCl 0,3 M, citrate tri-sodique 0,03 M (2 x SSC) et incubées 1 h à 37°C en chambre humide.
- Traitement à la RNase pancréatique : Les lames sont recouvertes de 200 μ l d'une solution de RNase A (WORTHINGTON) à 100 μ g/ml dans du 2 x SSC ou dans le tampon de conservation des chromosomes, et incubées à 37°C pendant une heure en chambre humide.
- Traitement à la DNase I : Les lames sont recouvertes de 200 μ l d'une solution de DNase (WORTHINGTON) à 25 μ g/ml dans un tampon tris/HCl 0,02 M pH 7,4, MgCl₂ 10 mM, et incubées une heure à 37° C en chambre humide.

H - TRAITEMENT DES CHROMOSOMES ET RECUPERATION DES PROTEINES EXTRAITES

Les divers traitements cités au paragraphe G, ont été également réalisés sur des quantités importantes de chromosomes afin de pouvoir recueillir les fractions protéiques extraites et de les analyser ainsi que d'étudier les protéines du chromosome traité.

1 - Traitement au mélange méthanol - acide acétique (3 : 1)

Les chromosomes sont centrifugés à 80 g pendant 10 minutes et repris par du fixateur froid. Ils sont laissés en contact du fixateur pendant 2 h à + 4°C. Les chromosomes sont récupérés par centrifugation à 80 g pendant 10 mn et le surnageant (fixateur) est évaporé sous vide.

Le résidu d'évaporation contenant les protéines extraites par la fixation au mélange méthanol-acide acétique est repris à l'eau distillée, dialysé contre de l'eau distillée et lyophilisé. Les chromosomes ainsi que les protéines extraites par la fixation sont analysés en électrophorèse.

2 - Traitement à l'acide chlorhydrique 0,25 N

Les chromosomes sont centrifugés à 80 g pendant 10 minutes et repris dans de l'HCl 0,25 N. La suspension est mise en agitation à + 4°C pendant 20 heures. Après centrifugation pendant 10 mn à 80 g les chromosomes sont remis en contact de l'HCl 0,25 N pendant 5 heures puis sédimentés à 80 g 10 mn. Les surnageants des deux extractions sont rassemblés, dialysés contre de l'eau distillée et lyophilisés. Les chromosomes et les protéines acido-solubles sont analysés en électrophorèse.

3 - Traitements au 2 SSC et à la RNase pancréatique

Les chromosomes sont centrifugés à 80 g pendant 10 minutes et repris soit dans du 2 x SSC, soit dans de la RNase pancréatique (WORTHINGTON) à 100 µg/ml dans du 2 x SSC ou dans le tampon de conservation des chromosomes (tampon pH 3). La suspension est incubée une heure à 37°C avec agitation intermittente. Les chromosomes sont ensuite sédimentés à 80 g 10 mn et lavés dans le tampon pH3. Le surnageant contenant les protéines extraites par le 2 x SSC ou la RNase A, est dialysé contre de l'eau distillée puis lyophilisé.

Les chromosomes ainsi que les protéines extraites sont analysés en électrophorèse.

RESULTS

A - ETUDE BIOCHIMIQUE DU CHROMOSOME METAPHASIQUE

I - Les non histones du chromosome métaphasique

1 - Analyse électrophorétique des non histones du chromosome métaphasique

L'étude des protéines totales du chromosome métaphasique en électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS, montre une vingtaine de protéines (Fig. 11), comprenant les histones H₂A ; H₂B ; H₃ (fraction 2), H₄ (fraction 1), et les protéines non histoniques du chromosome métaphasique (fractions 3 à 20).

L'histone H₁ est absente de nos préparations de chromosomes car elle est perdue pendant le processus d'isolement de chromosomes métaphasiques (LAI et DEMINATTI, 1977). Aux variations expérimentales près, la composition protéique du chromosome métaphasique est constante, des profils identiques ont pu être obtenus sur huit préparations différentes de chromosomes.

La détermination des poids moléculaires des vingt fractions non histoniques décelées par notre méthode, montre une grande disparité entre elles. Les poids moléculaires sont compris entre 16000 et 130000 (tableau 1), ce qui est en accord avec les résultats obtenus par divers auteurs, tant au niveau des non histones du chromosome métaphasique (ADOLPH et coll., 1977 ; JEPPENSEN et coll., 1978 ; OKADA et COMINGS, 1979), que du noyau interphasique (COMINGS et TACK, 1973 ; WU et coll., 1973 ; COMINGS et HARRIS, 1976).

L'hétérogénéité des non histones s'explique par le fait qu'elles ne représentent pas une classe de protéines, au sens où sont considérées les histones, mais un mélange de diverses classes de protéines qui doivent avoir des fonctions et des propriétés très différentes.

FIGURE 11 : Analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide SDS, des protéines totales du chromosome métaphasique de cellule KB. Nous pouvons identifier les histones H₂A ; H₂B ; H₃ (pic 2) et l'histone H₄ (pic 1).

Les fractions 3 à 20 représentent les vingt non histones majeures que nous avons étudiées.

L'histone H₁ est absente de nos préparations de chromosomes métaphasiques ce qui est en accord avec les résultats de LAI et DEMINATTI (1977).

Chromosomes isolés

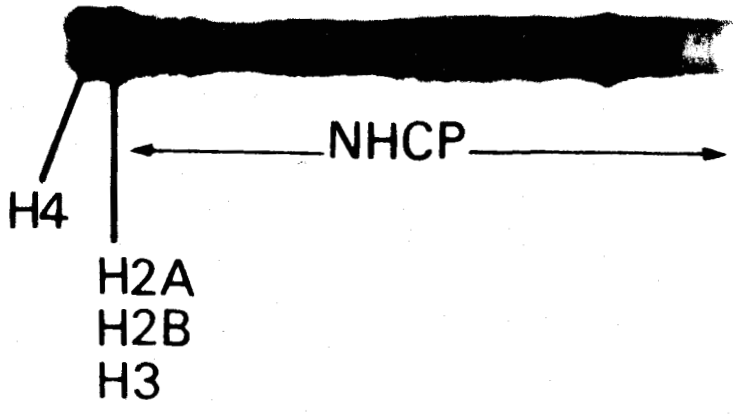
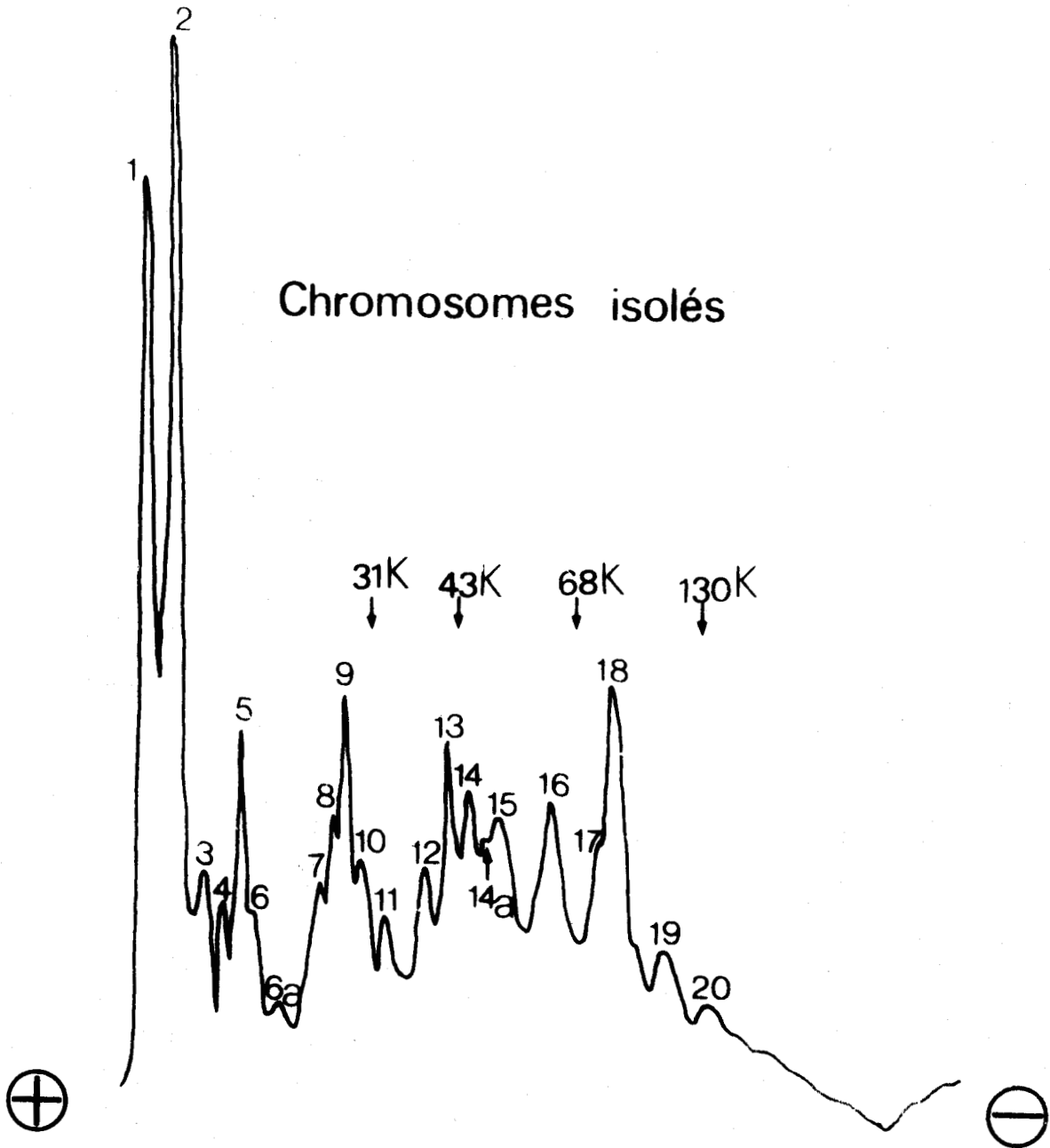


TABLEAU 1 : Poids moléculaires des fractions non histoniques majeures, déterminés par la méthode de WEBER et OSBORN (1969).

Fraction n°	Poids moléculaire
3	16000
4	17600
5	18100
6	18800
6a	20300
7	24300
8	26000
9	27400
10	30800
11	34700
12	37500
13	41000
14	44500
14a	47500
15	51000
16	59300
17	70300
18	74700
19	101000
20	134000



2 - Comparaison entre les non histones de la chromatine du noyau interphasique et du chromosome métaphasique

L'analyse électrophorétique des protéines de la chromatine interphasique (Fig. 12), montre un profil similaire à celui obtenu avec les protéines du chromosome métaphasique (Fig. 11) : les fractions protéiques présentes au stade métaphase se retrouvent en interphase. De plus, il ne semble pas y avoir de différences quantitatives entre les fractions non histoniques du chromosome métaphasique et leurs homologues au niveau de la chromatine interphasique (Fig. 12).

Il n'y a vraisemblablement pas, au niveau de la chromatine, lors de la mitose, de protéines ayant des caractères particuliers, décelables par la technique utilisée.

3 - Analyse des non histones du chromosome métaphasique de hamster chinois (*Cricetulus griseus*)

L'analyse électrophorétique des protéines du chromosome métaphasique de hamster chinois (Fig. 14), présente un profil analogue à celui obtenu à partir de chromosomes humains (Fig. 11). Nous retrouvons les fractions 1 et 2 correspondant aux histones et les vingt non histones majeures (fractions 3 à 20) dont les mobilités électrophorétiques sont sensiblement identiques à celles des non histones du chromosome humain.

Les proportions relatives des différentes fractions non histoniques du hamster chinois sont, aux variations expérimentales près, comparables à celles du chromosome humain (Fig. 15). Il semble donc que les protéines non histoniques majeures du chromosome métaphasique humain et du hamster chinois, présentent des caractères communs, aussi bien du point de vue qualitatif que quantitatif.

FIGURE 12 : Analyse électrophorétique des protéines du noyau interphasique isolé à pH acide. Nous retrouvons les histones (fractions 1 et 2) ainsi que les vingt non histones majeures (fractions 3 à 20) présentes au niveau du chromosome métaphasique.

L'histone H₁ est absente de nos préparations de noyaux interphasiques, ce qui est en accord avec les résultats de LAI et DEMINATTI (1977).

FIGURE 13 : Histogramme représentant les proportions relatives des différentes fractions non-histoniques, exprimées en pourcentages par rapport à la totalité des non histones. Les traits gras représentent les valeurs extrêmes trouvées pour les noyaux interphasiques, en pointillé, les valeurs extrêmes pour les chromosomes métaphasiques. Aux variations expérimentales près, les proportions relatives des différentes non histones, sont les mêmes pour le noyau interphasique et le chromosome métaphasique.

Nombre d'expériences prises en compte pour le calcul des pourcentages :

- chromosomes métaphasiques : 8
- noyaux interphasiques : 3

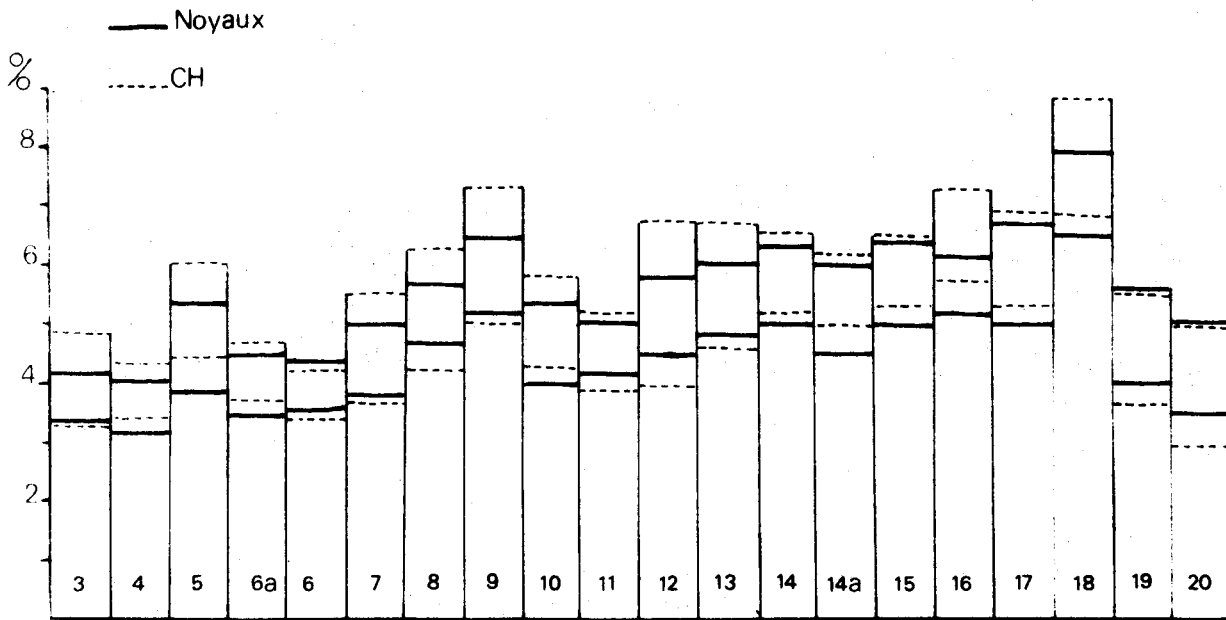
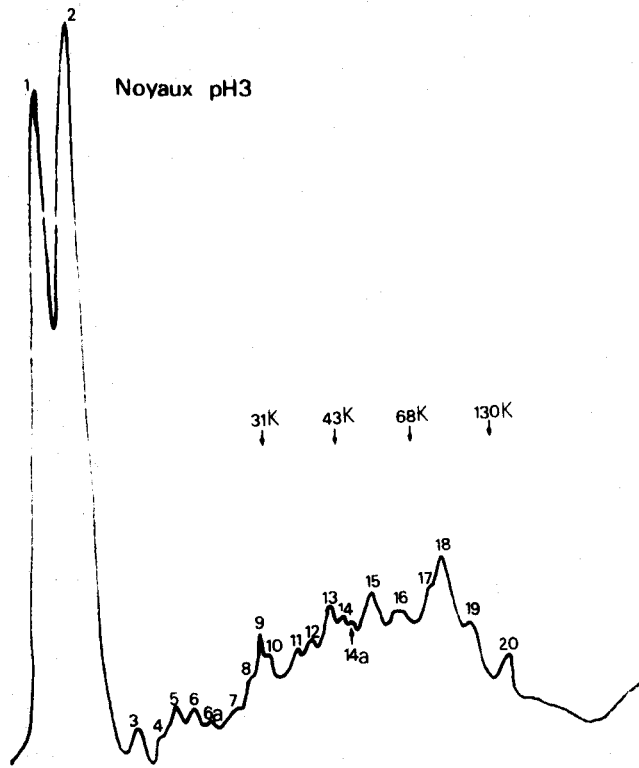
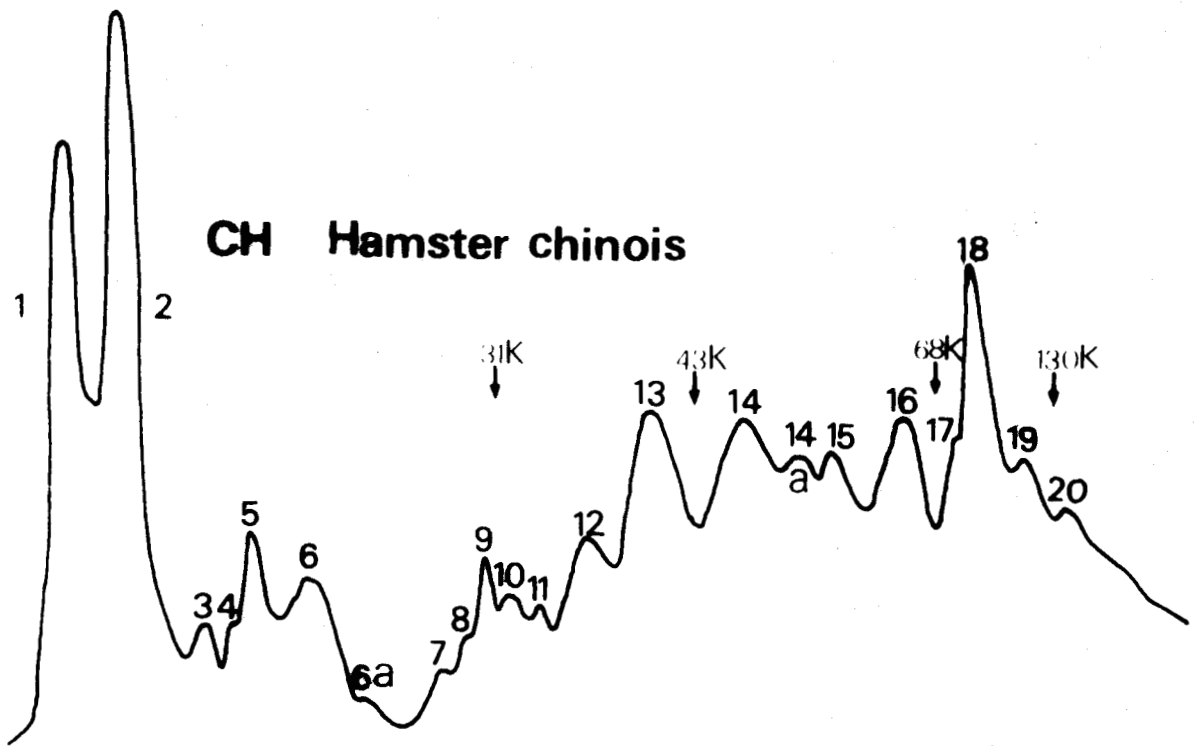


FIGURE 14 : Analyse électrophorétique des protéines du chromosome métaphasique de hamster chinois (*Cricetulus griseus*). Le profil est analogue à celui des chromosomes humains (Fig. 11) et nous retrouvons les mêmes entités protéiques.

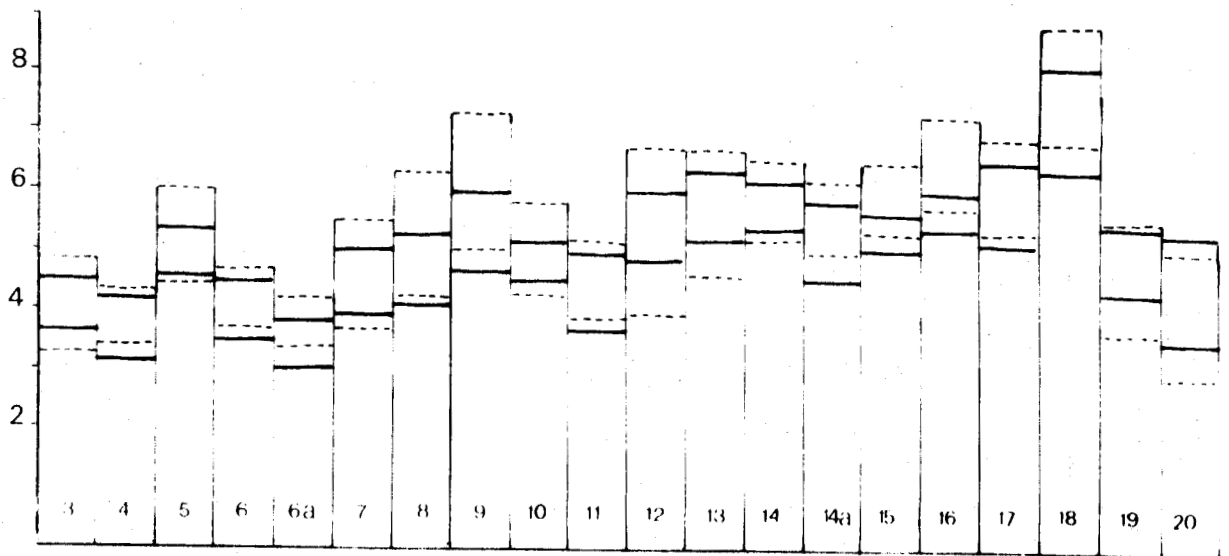
FIGURE 15 : Histogramme représentant les proportions relatives des différentes fractions non histoniques exprimées en pourcentages par rapport à la totalité des non histones. Les proportions relatives des différentes non histones sont aux variations expérimentales près, identiques pour le chromosome humain (pointillé) et le chromosome de hamster chinois (trait plein).

Nombre d'expériences prises en compte pour le calcul :

- chromosomes métaphasiques de hamster chinois : 3
- chromosomes humains (cellules KB) : 8



— CH hamster chinois
 - - - CH humain

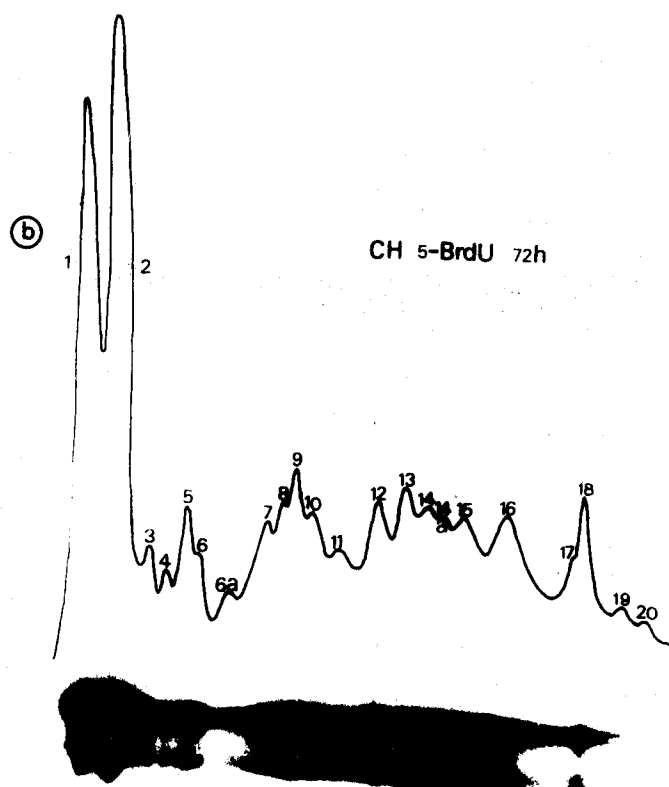
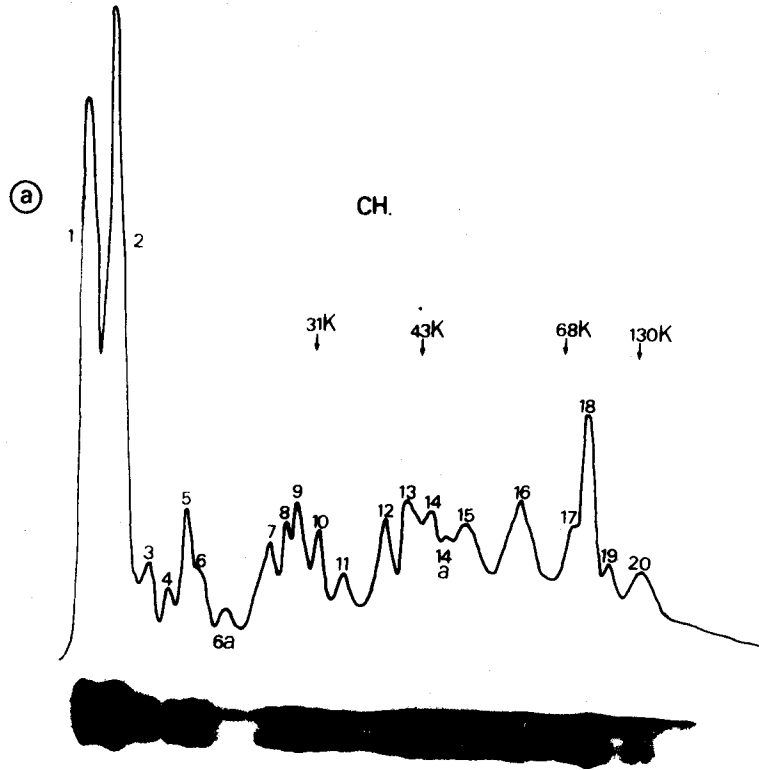


II - Etude des non histones du chromosome métaphasique après incorporation de 5-Bromodesoxyuridine

Une étude électrophorétique des protéines du chromosome métaphasique après incorporation de 5-Bromodesoxyuridine *in vivo* montre qu'il n'y a pas de modifications de la composition en non histones après 72 h (Fig. 16 et 17) et 96 h d'incorporation (Fig. 18 et 19). En effet, les profils électrophorétiques et la répartition des protéines non histoniques sont identiques à ceux des chromosomes de référence.

L'incorporation *in vivo* du précurseur analogue de la thymidine ne semble pas avoir de répercussions sur la composition en non histones du chromosome métaphasique humain.

FIGURE 16 : Comparaison des profils électrophorétiques des protéines du chromosome (a) et des protéines du chromosome ayant incorporé la 5-bromodesoxyuridine pendant 72 h (b). Aucune variation qualitative n'est décelée par notre technique d'analyse. Nous retrouvons les histones (fractions 1 et 2) et les vingt non histones majeures (fractions 3 à 20).



BUS
LILLE

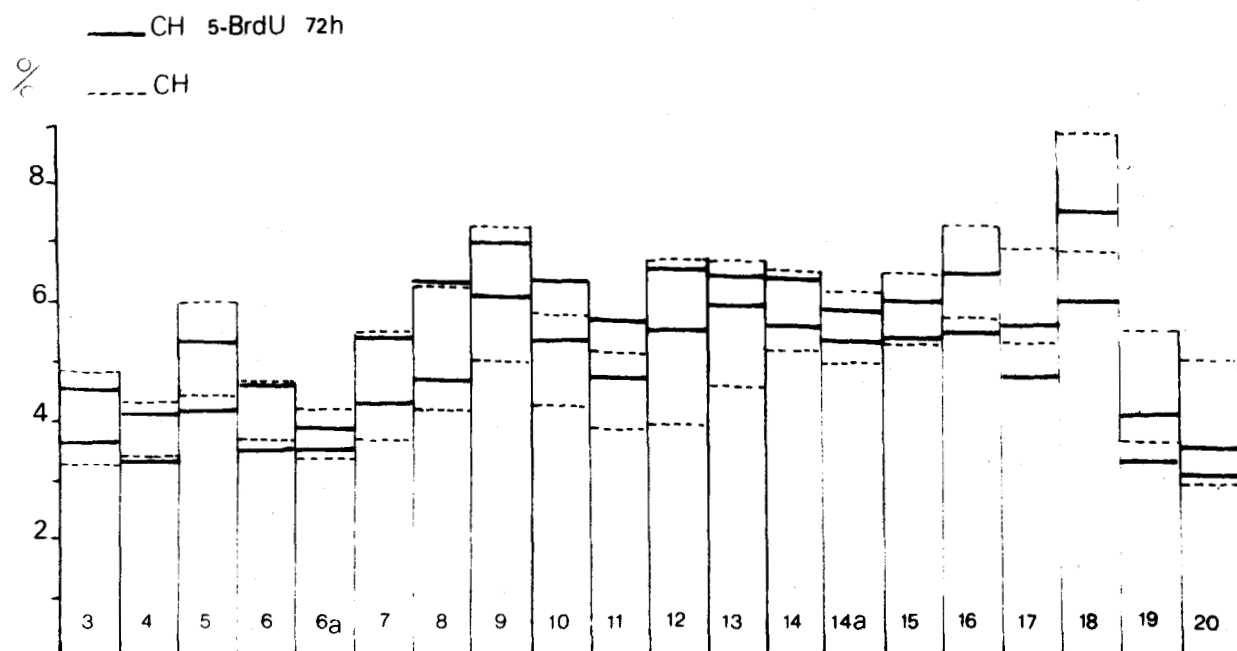


FIGURE 17 : Histogramme représentant les proportions relatives des différentes fractions non histoniques, exprimées en pourcentages par rapport à la totalité des non histones.

Les proportions des différentes fractions non histoniques, sont, aux variations expérimentales près, identiques pour le chromosome métaphasique de référence (pointillé) et le chromosome ayant incorporé la 5-BrdU pendant 72 heures (trait plein).

Aucune variation quantitative des non histones étudiées n'est décelée, après incorporation du précurseur pendant 72 h.

Nombre d'expériences prises en compte pour le calcul des pourcentages :

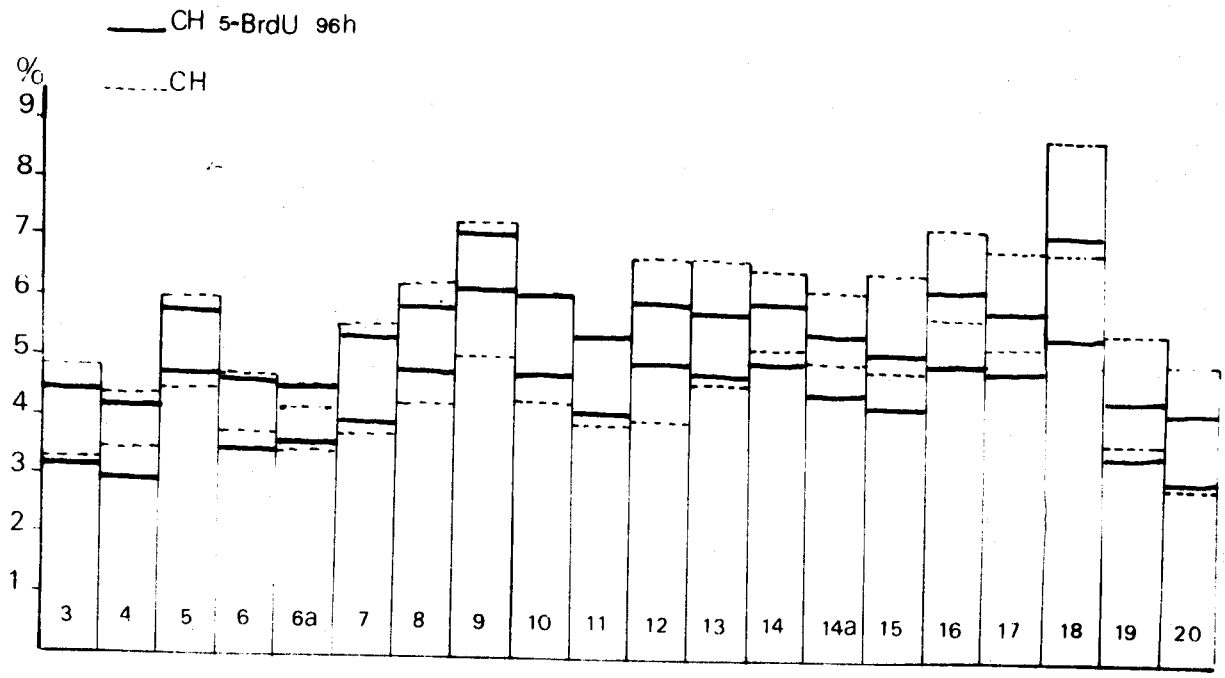
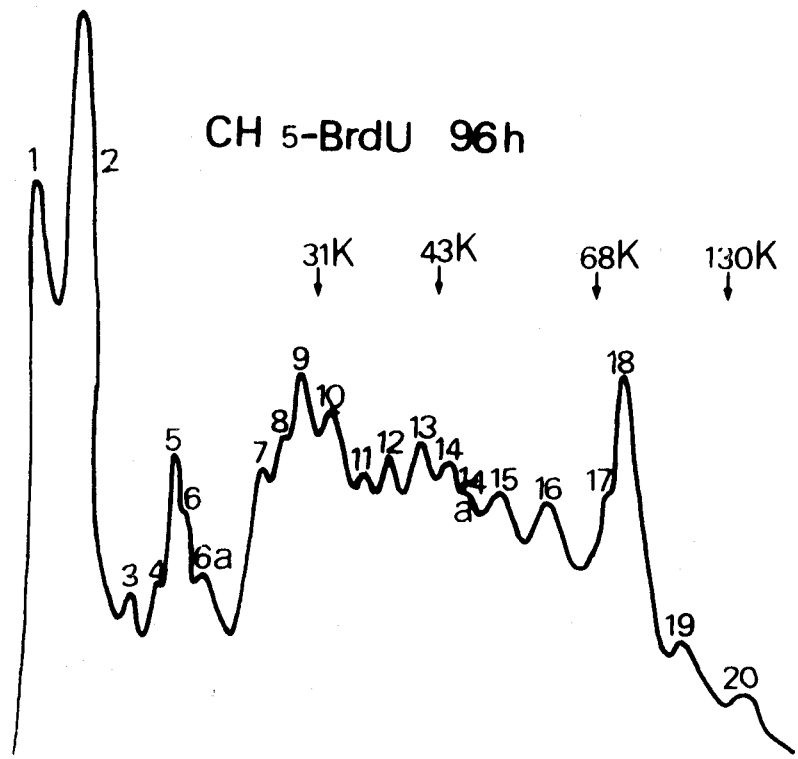
- chromosomes de référence : 8
- chromosomes 5-BrdU 72 h : 4

FIGURE 18 : Analyse électrophorétique des protéines du chromosome métaphasique après 96 h d'incorporation de 5-BrdU. Nous retrouvons les mêmes fractions protéiques que dans le chromosome métaphasique de référence (fig. 11). Aucune variation qualitative n'est décelée après incorporation du précurseur pendant 96 h.

FIGURE 19 : Histogramme représentant les proportions relatives des différentes fractions non histoniques, exprimées en pourcentages par rapport à la totalité des non histones. Les proportions des différentes fractions non histoniques sont, aux variations expérimentales près, identiques pour le chromosome métaphasique de référence (pointillé) et le chromosome ayant incorporé la 5-BrdU pendant 96 h (trait plein). Aucune variation quantitative des non histones étudiées n'est décelée après incorporation du précurseur.

Nombre d'expériences prises en compte pour le calcul des pourcentages :

- chromosomes métaphasiques de référence : 8
- chromosomes 5-BrdU 96 h : 3



B - ETUDE FONCTIONNELLE DU CHROMOSOME METAPHASIQUE HUMAIN

I - Activité "template" du chromosome métaphasique

Le chromosome métaphasique humain, peut être utilisé comme substrat pour la synthèse d'ARN *in vitro* en présence d'une ARN polymérase exogène, comme il est décrit dans matériel et méthodes.

Le chromosome métaphasique isolé s'est avéré être réfractaire vis-à-vis de cette synthèse d'ARN *in vitro*. En effet, nous ne détectons aucune incorporation de précurseur radioactif après une heure d'incubation en présence de la polymérase exogène (Fig. 20 b). Le chromosome métaphasique se présente donc comme un organe inerte vis-à-vis de la synthèse d'ARN en présence d'une polymérase exogène, cette inertie semble correspondre à la métaphase, laquelle est caractérisée par une inactivité génique.

Sur nos préparations la chromatine interphasique des noyaux isolés, est inerte vis-à-vis de la transcription *in vitro*, cependant ceci correspond à la présence de la membrane nucléaire qui fait écran entre la chromatine et les éléments du système de transcription *in vitro*.

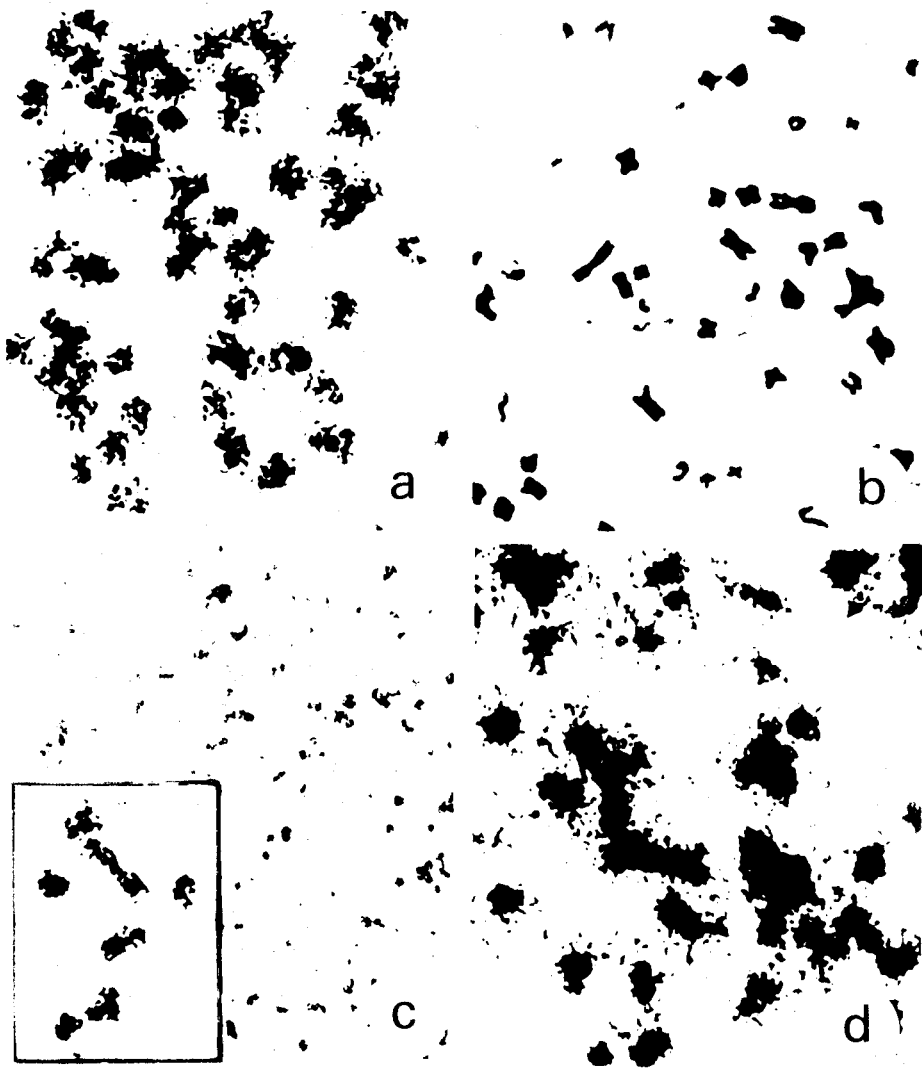
II - Restauration de l'activité "template" du chromosome métaphasique

Il est possible de lever l'inhibition de l'activité "template", par divers traitements préalables à l'incubation en présence de l'ARN polymérase.

Le premier traitement à avoir été mis en oeuvre est la fixation par le mélange méthanol, acide acétique (3 : 1) : lorsque des chromosomes isolés sont traités par ce mélange, on observe sur les autoradiographies une quantité importante de grains d'argent répartis au niveau des chromosomes métaphasiques (Fig. 20 a), ce qui montre qu'il y a eu incorporation du précurseur radioactif. Cette incorporation correspond à une synthèse d'ARN car il est possible de faire disparaître la radioactivité par un traitement à la ribonucléase pancréatique (tableau 2 b), et cette synthèse d'ARN se fait en

FIGURE 20 : Analyse de l'activité "template" par autoradiographie.

- a : Chromosomes isolés, traités au mélange méthanol-acide acétique avant la synthèse d'ARN *in vitro*. Les chromosomes sont recouverts de grains d'argent ce qui indique qu'il y a eu synthèse d'ARN.
- b : Chromosomes non traités, soumis à la synthèse d'ARN *in vitro*. Il n'y a aucune incorporation de précurseur radioactif, ce qui indique l'inactivité "template" du chromosome métaphasique.
- c : Chromosomes traités à l'HCl 0,25 N préalablement à la synthèse d'ARN *in vitro*. Il y a restauration de l'activité "template", mais la synthèse d'ARN semble moins importante que sur des chromosomes traités au mélange méthanol-acide acétique.
- d : Chromosomes traités à la RNase pancréatique avant la synthèse d'ARN *in vitro*. Noter l'importante radioactivité au niveau des chromosomes, indiquant une synthèse d'ARN intense.



BUS
LILLE

utilisant l'ADN chromosomique comme matrice car un traitement à la DNase I avant la synthèse d'ARN *in vitro*, empêche toute incorporation de précurseur radioactif au niveau du chromosome (tableau 2 b).

TABLEAU 2 : Expériences de transcription *in vitro* sur des chromosomes métaphasiques isolés : variations de l'activité "template" du chromosome en fonction des divers traitements effectués avant (prétraitement) et après (posttraitement) la synthèse d'ARN.
Les conditions expérimentales sont décrites dans Matériel et Méthodes.

a

Prétraitement	Radioactivité au niveau des chromosomes
Aucun	-
Fixation au mélange méthanol acide acétique	+++
HCl 0,25 N	++
RNase A dans le 2 SSC (1 h 37°)	+++++
2 SSC (1 h 37°)	+++
RNase A dans le tampon de conservation	+++++

b

Contrôles

Prétraitement	Posttraitement	Radioactivité au niveau des chromosomes
Fixation au mélange méthanol acide acétique	RNase A 1 h 37°	-
Tampon de conservation des chromosomes 1 h 37°	Aucun	-
DNase I	Aucun	-

D'autres traitements préalables à la synthèse se sont avérés capables de restaurer l'activité "template" du chromosome métaphasique: le traitement à l'acide chlorhydrique 0,25 N (Fig. 20 c) et à la RNase A en solution dans le 2 SSC (tableau 2 a).

Cependant, nous avons pu montrer (tableau 2 a) qu'un simple traitement au 2 SSC permet de restaurer l'activité "template".

C'est pourquoi, afin de préciser le rôle éventuel du traitement à la RNase, nous avons soumis nos préparations à l'action de la RNase en solution dans le tampon de conservation des chromosomes (tampon pH₃), ce tampon de conservation s'étant montré ne pas altérer la structure et la composition du chromosome métaphasique (DEMINATTI et coll., 1975 a, 1975 b).

Sur les préparations de chromosomes ainsi traitées, l'activité "template" se trouve être restaurée (fig. 20 d). Il semble donc que la dégradation de l'ARN contenu dans le chromosome métaphasique ait une action directe ou indirecte sur la restauration de l'activité "template" (tableau 2 a). Le tampon de conservation des chromosomes est sans action puisqu'aucune activité "template" n'est décelée après une heure de prétraitement à 37° avec ce tampon (tableau 2 b).

Il faut cependant noter qu'il ne semble pas y avoir de zones chromosomiques ni même de chromosomes où la synthèse d'ARN *in vitro*, se fasse préférentiellement.

C - LES NON HISTONES ET L'ACTIVITE "TEMPLATE"

I - Etude électrophorétique des protéines non histoniques après les traitements restaurant l'activité "template"

L'analyse électrophorétique des protéines totales de chromosomes métaphasiques isolés, soumis aux traitements restaurant l'activité "template" montre toujours un profil de protéines non histoniques comparable au profil témoin des chromosomes non traités.

Après fixation au mélange méthanol - acide acétique, nous retrouvons les vingt protéines non histoniques majeures (Fig. 21 b) rencontrées dans le chromosome non traité. Ces protéines sont toujours présentes dans des proportions relatives, identiques à celles du chromosome métaphasique de référence (Fig. 22).

Des résultats similaires sont obtenus après traitement au 2 SSC (Fig. 23 et 25) à la RNase A dans le 2 SSC (Fig. 24 et 26) à la RNase dans le tampon de conservation des chromosomes (Fig. 27 et 28).

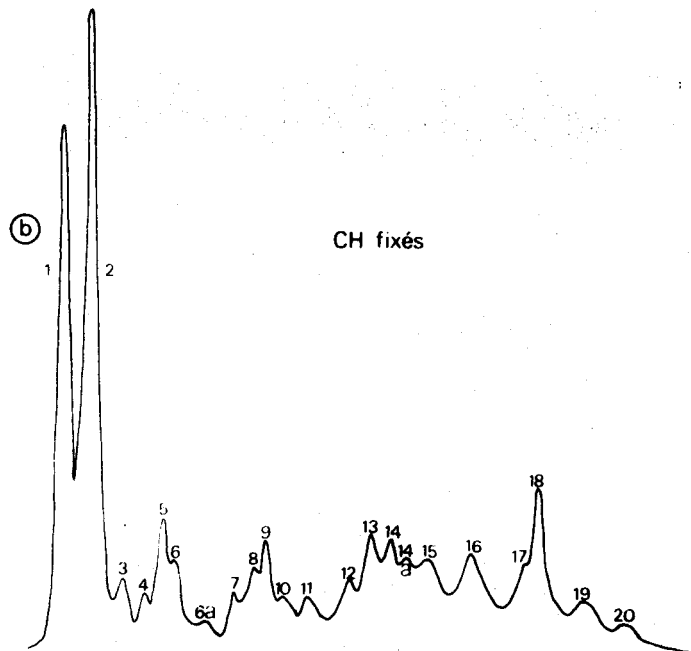
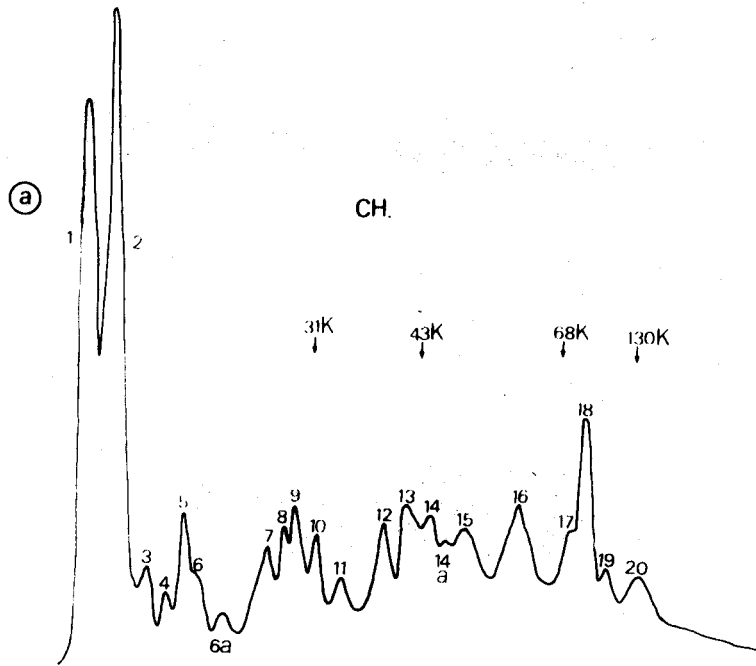
Après traitement à 1'HCl 0,25 N, nous observons une quasi disparition des pics 1 et 2 (Fig. 29), ces deux pics correspondent aux histones H_2A ; H_2B ; H_3 et H_4 ; protéines basiques qui sont extraites par les solutions acides. En ce qui concerne les non histones, aucune modification notable n'est décelée après traitement à 1'HCl 0,25 N (Fig. 30), les vingt non histones majeures sont présentes, dans des proportions relatives, analogues à celles de chromosomes métaphasiques de référence.

Après incubation 1 h à 37°, dans le tampon de conservation des chromosomes, la composition protéique reste inchangée (Fig. 31 et 32), ce qui confirme l'inactivité de ce tampon vis-à-vis de notre matériel biologique.

Les traitements restaurant l'activité "template", ne modifient peu ou pas la composition en non histones du chromosome métaphasique, cependant il est à noter que de très légères modifications ne pourraient être décelées par cette technique d'analyse des non histones totales.

FIGURE 21 : Comparaison des profils électrophorétiques des protéines du chromosome (a) et du chromosome fixé au mélange méthanol-acide acétique (b).

Aucune variation qualitative n'est décelée par notre technique d'analyse. Nous retrouvons dans le chromosome fixé, les histones (fractions 1 et 2) et les vingt fractions non histoniques majeures (3 à 20).



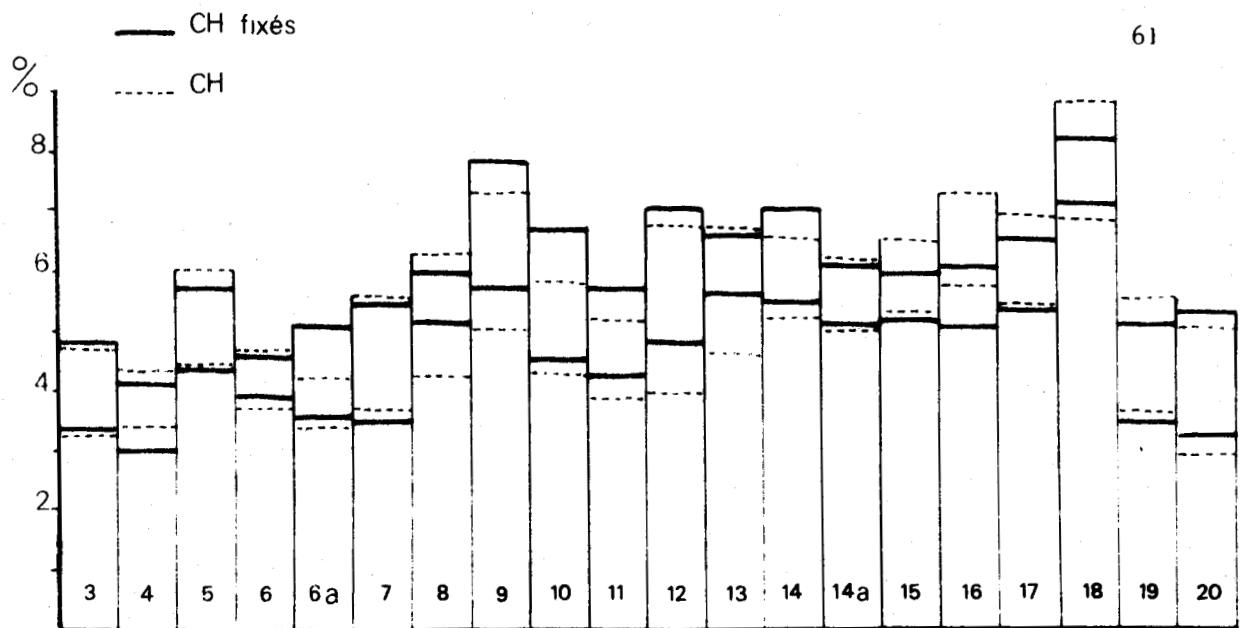


FIGURE 22 : Histogramme représentant les proportions relatives des différentes fractions non histoniques, exprimées en pourcentage par rapport à la totalité des non histones.

Les proportions des différentes fractions non histoniques, sont, aux variations expérimentales près, identiques pour le chromosome métaphasique (pointillé) et le chromosome fixé (trait plein). Aucune variation quantitative des non histones étudiées, n'est décelée après fixation.

Nombre d'expériences prises en compte pour le calcul des pourcentages :

- chromosomes métaphasiques de référence : 8
- chromosomes fixés : 4

FIGURE 23 : Analyse électrophorétique des protéines de chromosomes métaphasiques traités au 2 SSC. Aucune différence qualitative n'est décelée par rapport au profil électrophorétique des protéines du chromosome non traité (Fig. 11).

FIGURE 24 : Analyse électrophorétique des protéines de chromosomes métaphasiques traités à la RNase pancréatique en solution dans le 2 SSC. Aucune différence qualitative n'est décelée par rapport au profil électrophorétique des protéines du chromosome non traité (Fig. 11).

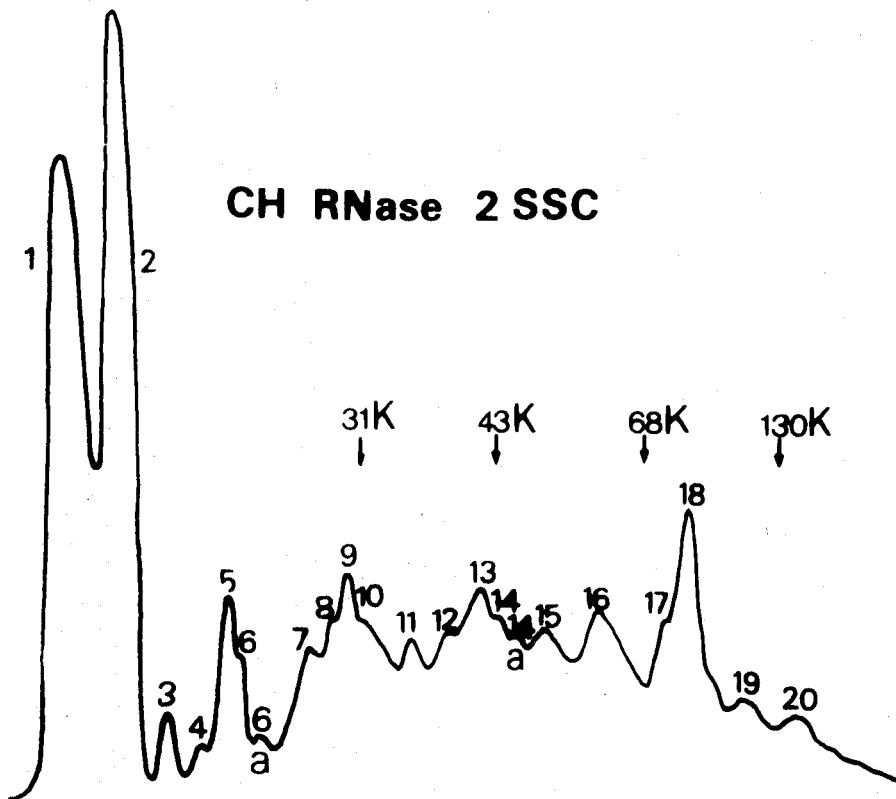
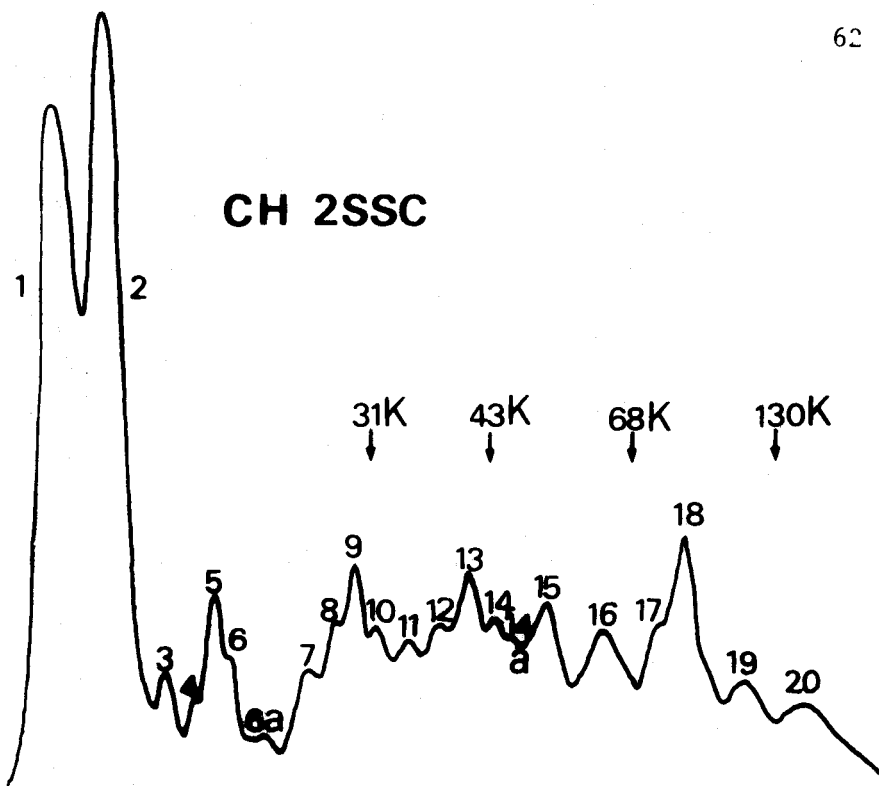


FIGURE 25 : Histogramme représentant les proportions relatives des différentes fractions non histoniques, exprimées en pourcentages par rapport à la totalité des non histones. Les proportions des différentes fractions non histoniques sont, aux variations expérimentales près, identiques pour le chromosome métaphasique de référence (pointillé) et le chromosome traité au 2 SSC (trait plein). Aucune variation quantitative des non histones étudiées n'est décelée après traitement au 2 SSC.

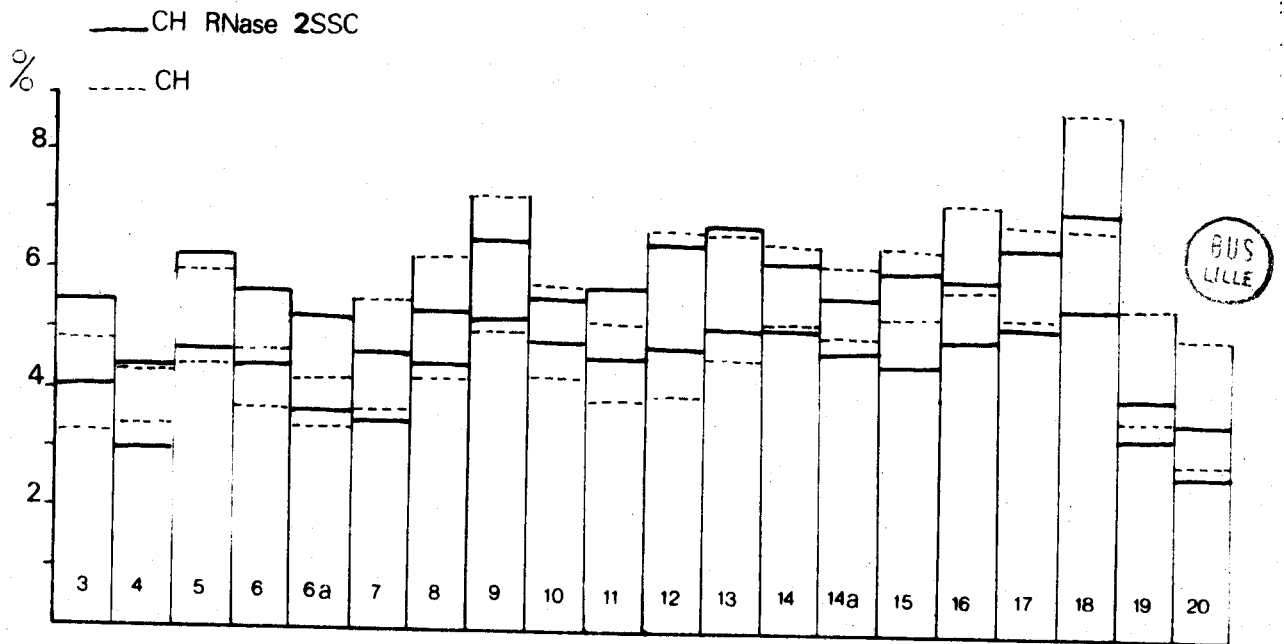
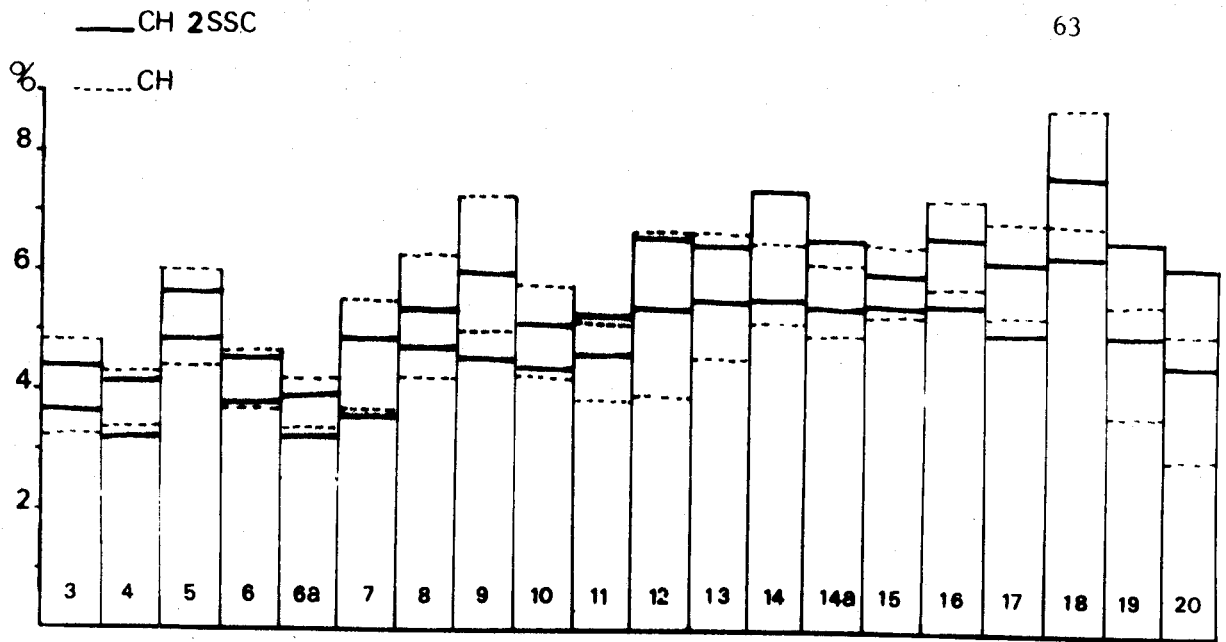
Nombre d'expériences prises en compte pour le calcul des pourcentages :

- chromosomes métaphasiques de référence : 8
- chromosomes traités au 2 SSC : 3

FIGURE 26 : Comparaison des proportions des différentes fractions non histoniques entre les chromosomes de référence (pointillé) et les chromosomes traités à la RNase pancréatique en solution dans le 2 SSC (trait plein). Aucune variation quantitative n'est décelée après traitement.

Nombre d'expériences prises en compte pour le calcul des pourcentages :

- chromosomes métaphasiques de référence : 8
- chromosomes traités à la RNase dans le 2 SSC : 3



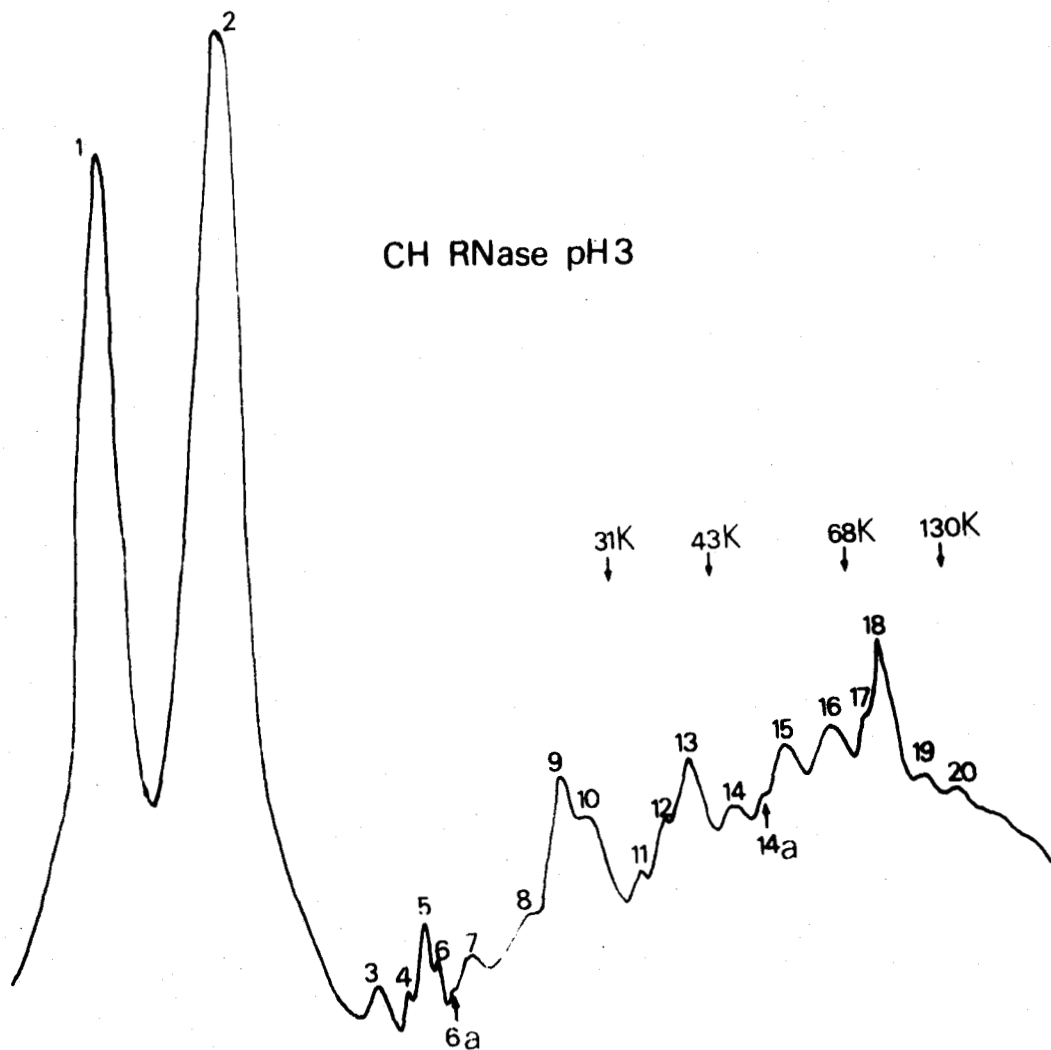


FIGURE 27 : Analyse électrophorétique des protéines de chromosomes traités à la RNase pancréatique en solution dans le tampon de conservation des chromosomes (tampon pH3).

Le profil électrophorétique est analogue à celui obtenu avec les chromosomes de référence (Fig. 11).

Aucune modification qualitative n'est décelée après action de la RNase dans le tampon pH3.



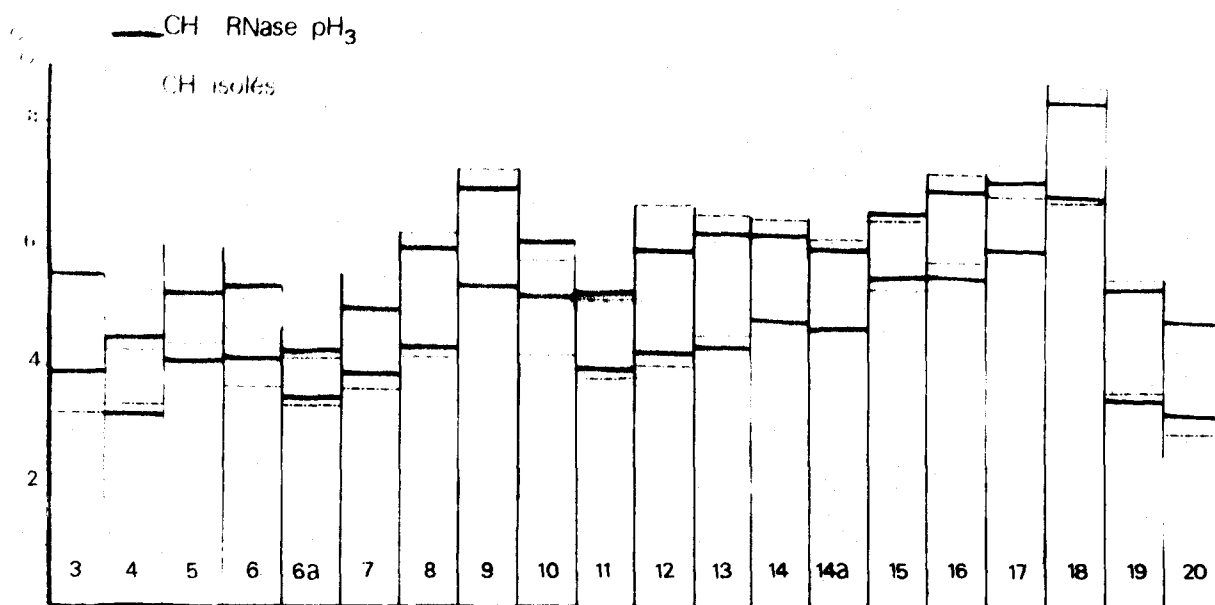


FIGURE 28 : Histogramme représentant les proportions relatives des différentes fractions non histoniques, exprimées en pourcentages par rapport à la totalité des non histones.

Les proportions des différentes fractions non histoniques, sont, aux variations expérimentales près, identiques pour le chromosome métaphasique de référence (pointillé) et le chromosome traité à la RNase dans le tampon pH₃ (trait plein).

Aucune variation quantitative des non histones étudiées, n'est décelée après traitement à la RNase dans le tampon pH₃.

Nombre d'expériences prises en compte pour le calcul des pourcentages :

- chromosomes métaphasiques de référence : 8
- chromosomes traités à la RNase dans le tampon pH₃ : 3

FIGURE 29 : Analyse électrophorétique des protéines du chromosome après traitement à l'HCl 0,25 N. L'extraction des histones (fractions 1 et 2) est presque totale, mais les vingt fractions non histoniques (3 à 20) sont encore présentes.

FIGURE 30 : Histogramme représentant les proportions relatives des différentes fractions non histoniques, exprimées en pourcentages par rapport à la totalité des histones. Les proportions des différentes fractions non histoniques, sont, aux variations expérimentales près, identiques pour le chromosome métaphasique de référence (pointillé) et le chromosome traité à l'HCl 0,25 N (trait plein).

Aucune variation quantitative n'est décelée après traitement à l'HCl 0,25 N.

Nombre d'expériences prises en compte pour le calcul des pourcentages :

- chromosomes métaphasiques de référence : 8
- chromosomes traités à l'HCl 0,25 N : 3

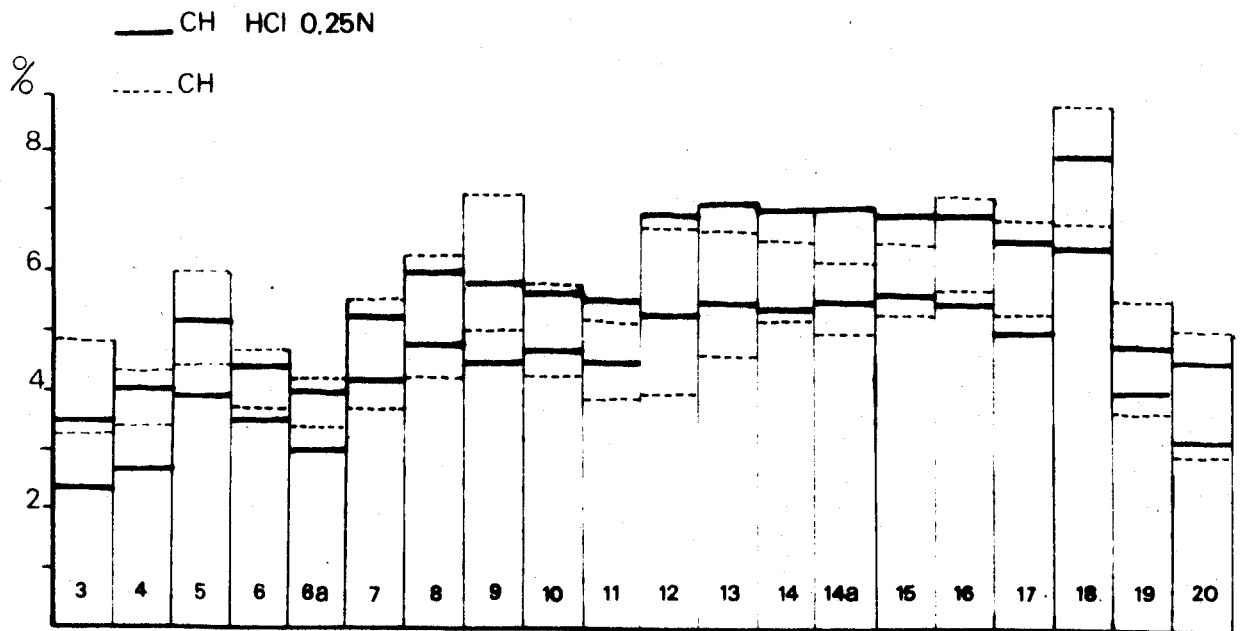
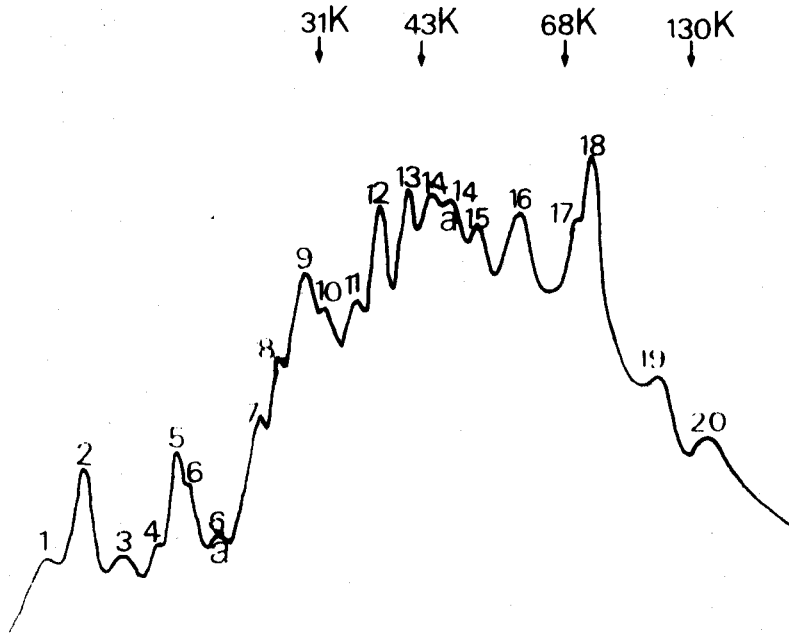


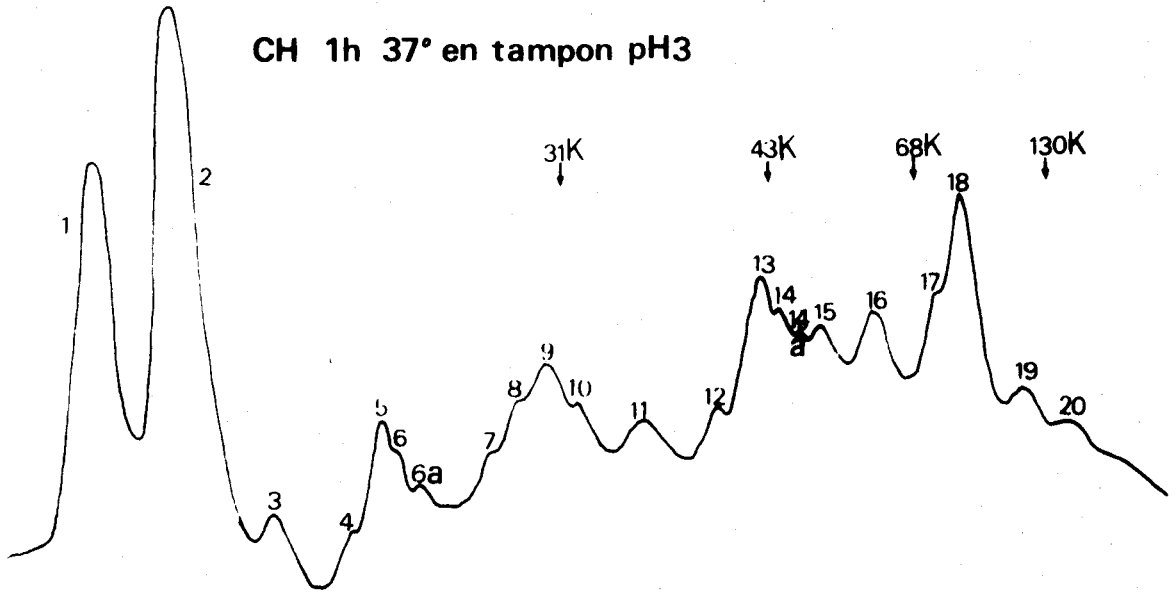
FIGURE 31 : Analyse électrophorétique des protéines du chromosome métaphasique après une heure d'incubation à 37° dans le tampon de conservation. Aucune variation qualitative n'est décelée par rapport au chromosome de référence (Fig. 11).

FIGURE 32 : Histogramme représentant les proportions relatives des différentes fractions non histoniques, exprimées en pourcentages par rapport à la totalité des non histones. Les proportions des différentes fractions non histoniques sont, aux variations expérimentales près, identiques pour le chromosome de référence (pointillé) et le chromosome incubé 1 h à 37° dans le tampon de conservation des chromosomes (trait plein).

Nombre d'expériences prises en compte pour le calcul des pourcentages :

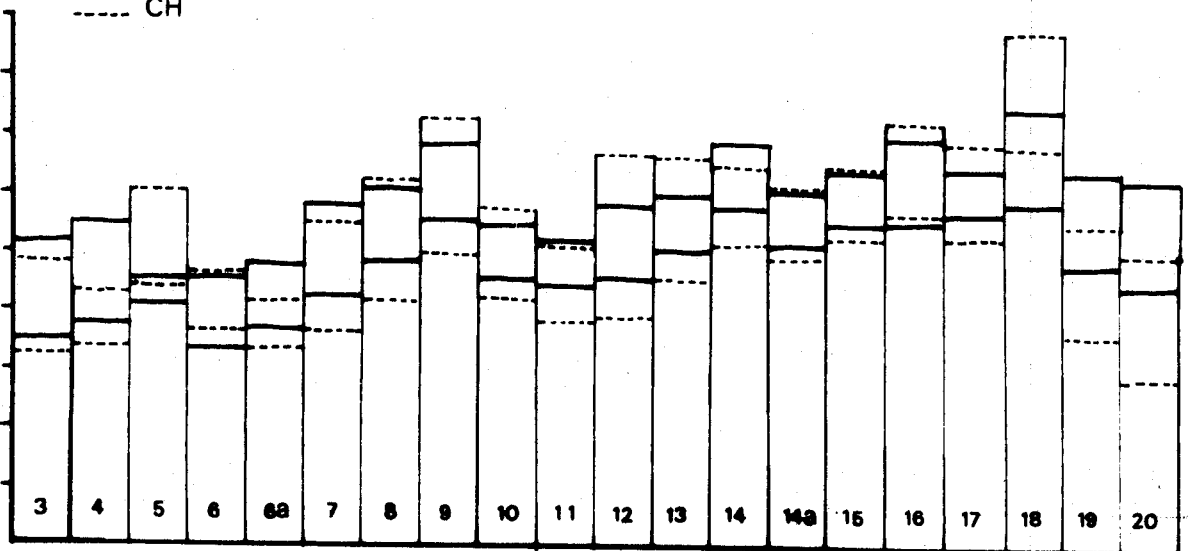
- chromosomes métaphasiques de référence : 8
- chromosomes incubés 1 h à 37° dans le tampon pH₃ : 4

CH 1h 37° en tampon pH3



— CH 1h à 37° en tampon pH3

- - - CH



II - Analyse des fractions protéiques extraites par les traitements restaurant l'activité "template".

S'il n'y a pas de modifications importantes de la composition en protéines non histoniques du chromosome après traitement restaurant l'activité "template", il est cependant possible de déceler certaines protéines qui sont extraites après traitement. Ces protéines sont retrouvées en quantités peu importantes, ce qui explique l'absence de modifications notables au niveau du chromosome métaphasique.

Les résultats résumés dans le tableau 3 montrent que les traitements mettant en jeu du 2 SSC n'ont aucune spécificité puisque l'on retrouve les vingt non histones majeures, ainsi que les deux pics 1 et 2 correspondant aux histones (Fig. 33).

TABEAU 3 : Fractions protéiques extraites par les traitements restaurant l'activité "template" du chromosome métaphasique

Traitement	Fractions extraites
Fixation (méthanol acide acétique)	1 2 3 15 18 20
RNase dans le 2 SSC	1 à 20
2 SSC	1 0 20
RNase dans le tampon pH ₃	9 14 14a 15 18 19
HCl 0,25 N	1 2 5 9 11 13 16 18

Les autres traitements ont une spécificité plus grande, et ont tous en commun le fait d'extraire une partie de la fraction protéique 18 de poids moléculaire 74700 (Fig. 34, 35, 36). Il est donc envisageable que cette fraction protéique soit impliquée de manière directe

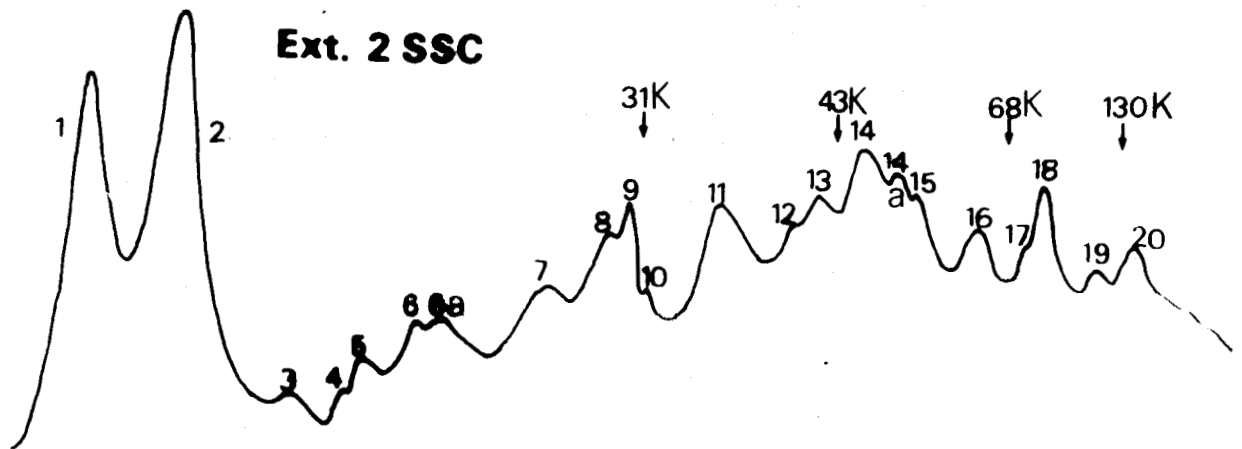


FIGURE 33 : Analyse des protéines extraites après traitement des chromosomes métaphasiques au 2 SSC.
Des résultats identiques sont obtenus après traitement à la RNase pancréatique dans le 2 SSC.

FIGURE 34 : Analyse électrophorétique des protéines du chromosome métaphasique, extraites par la fixation au mélange méthanol acide acétique (b). Par comparaison avec le profil électrophorétique des protéines du chromosome (a), les fractions protéiques extraites comigrent avec les fractions 1 et 2 (histones) et les fractions non histoniques 3, 15, 18, 20. L'extraction des fractions histoniques est en accord avec les résultats de SUMNER et coll. (1973).

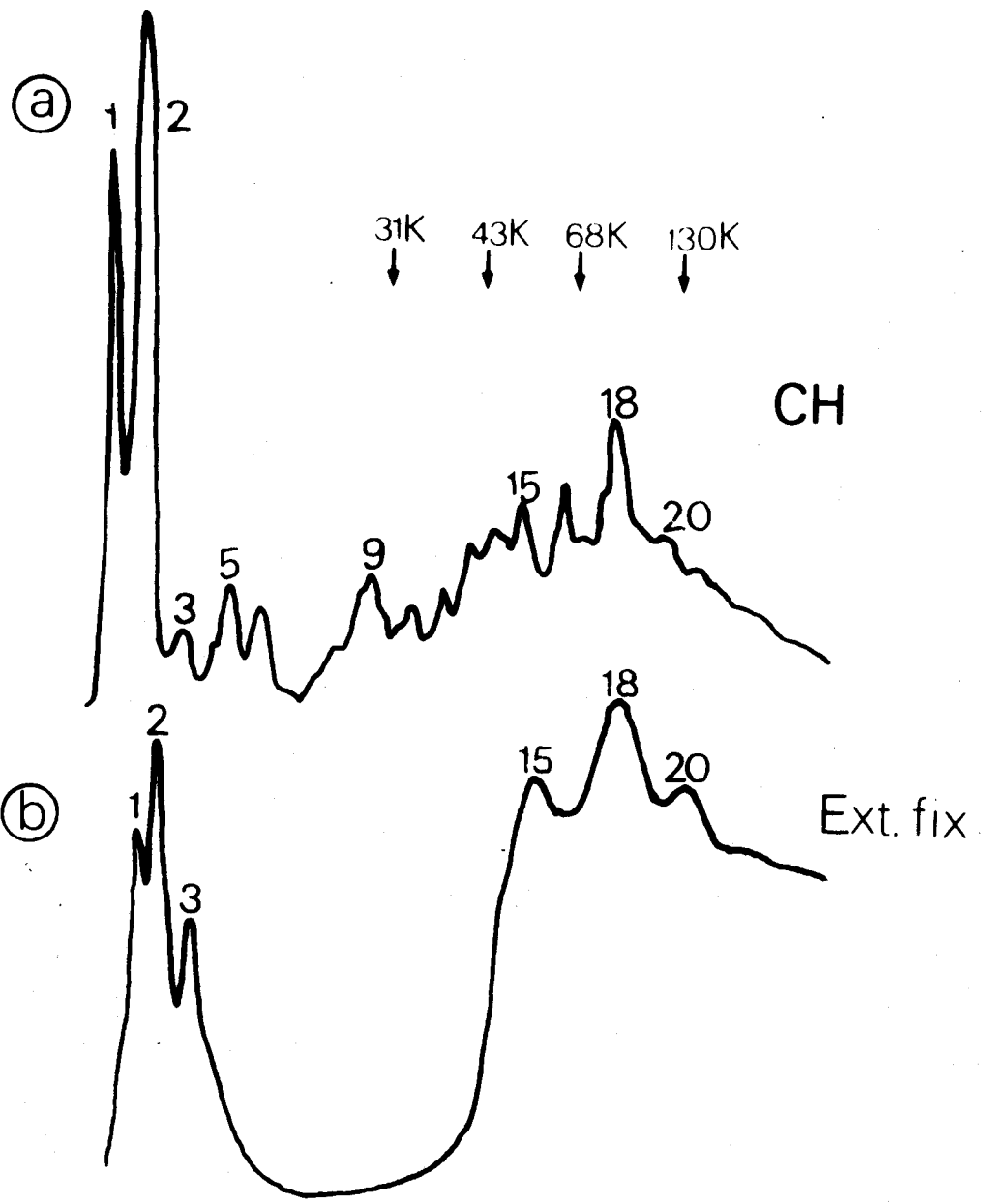


FIGURE 35 : Analyse électrophorétique des protéines extraites par le traitement à l'HCl 0,25 N (a). Par comparaison, au profil électrophorétique des protéines du chromosome (b), les fractions extraites comigrent avec les fractions 1 et 2 (histones) et les fractions non histoniques 5, 9, 11, 13, 16, 18. L'extraction des histones est en accord avec les résultats de SUMNER et coll. (1973).

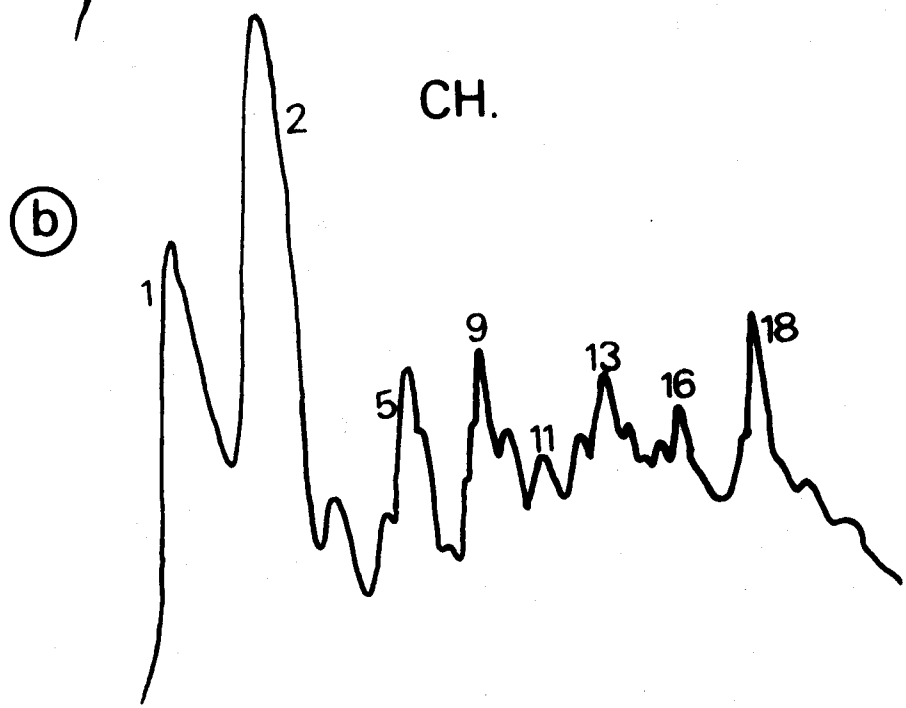
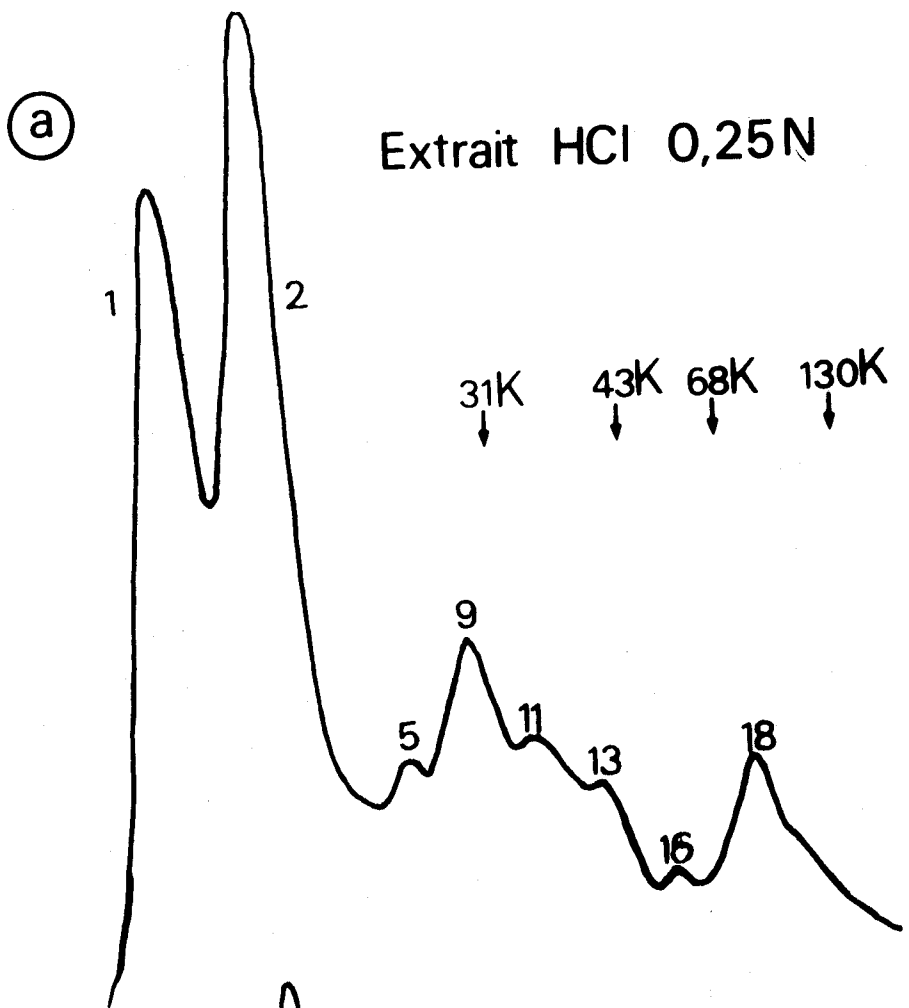
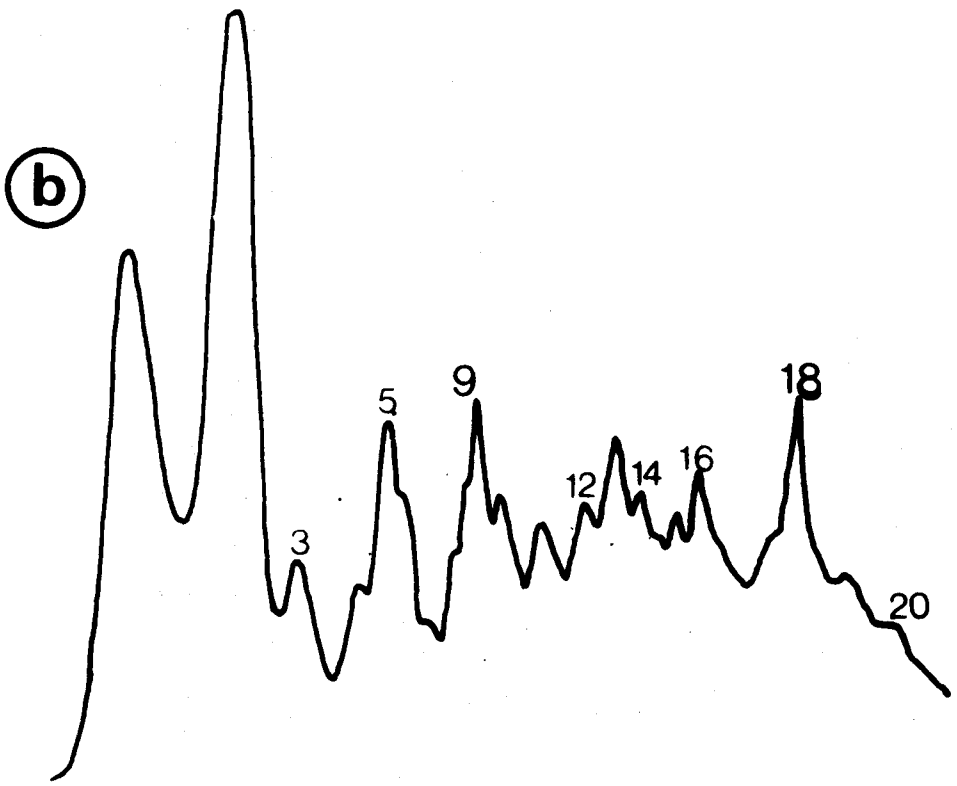
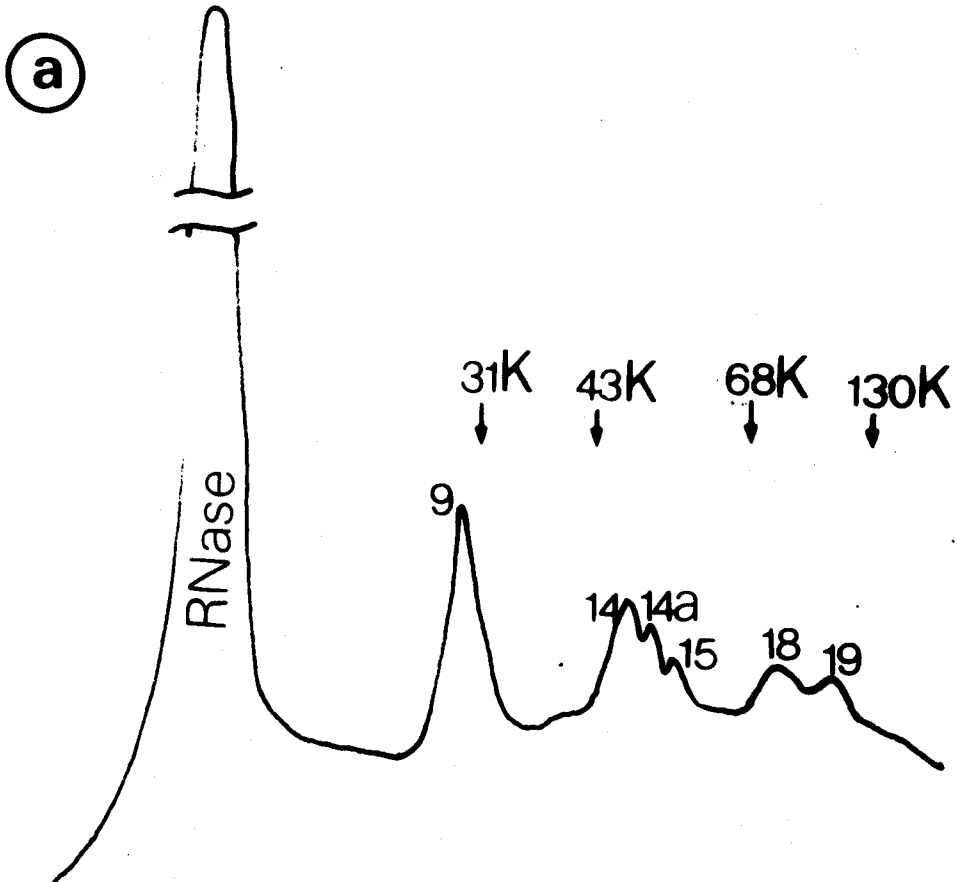


FIGURE 36 : Analyse électrophorétique des protéines extraites après traitement des chromosomes à la RNase pancréatique dans le tampon de conservation des chromosomes (a). Par comparaison avec le profil électrophorétique des protéines du chromosome métaphasique (b), les fractions extraites comigrent avec les fractions non histoniques 9, 14, 14 a, 15, 18, 19.



(dérépression) ou indirecte (modification conformationnelle) dans le processus de levée de l'inhibition de l'activité "template" du chromosome métaphasique.

L'analyse après une heure d'incubation à 37°C dans le tampon de conservation des chromosomes, indique qu'aucune protéine n'est extraite. Ce résultat montre la totale inertie de ce tampon vis-à-vis de notre matériel biologique.

DISCUSSION

Nos observations concernant l'inactivité du chromosome métaphasique posent le problème des facteurs structuraux responsables de cette inactivité. Nous verrons respectivement le rôle éventuel des non histones et le rôle possible de l'ARN.

A - PROBLEMES STRUCTURAUX

I - Les non histones du noyau interphasique et du chromosome métaphasique

Les deux états distincts du matériel nucléaire des cellules eucaryotes : chromatine interphasique dispersée et chromatine métaphasique condensée sous forme de chromosomes métaphasiques, n'apparaissent pas différer quant à leur composition protéique, aussi bien d'un point de vue qualitatif que quantitatif. En effet, nous obtenons des profils électrophorétiques analogues entre protéines nucléaires et protéines chromosomiques des cellules KB, et les proportions relatives des différentes non histones majeures étudiées sont similaires. Il ne semble donc pas y avoir de protéines non histoniques en quantité suffisante pour être décelables par notre technique, qui soient spécifiques de la mitose et par conséquent, responsables du phénomène de condensation de la chromatine en chromosomes métaphasiques. Ces résultats relatifs à du matériel humain sont en accord avec les travaux de COMINGS et TACK (1973) sur le hamster chinois. Des études antérieures réalisées sur la composition en histones du noyau interphasique et du chromosome métaphasique (SADGOPAL et BONNER, 1970 ; LAI et DEMINATTI, 1977) ont montré qu'il n'y a aucune variation quantitative et qualitative de ces histones entre le stade interphase et le stade métaphase. La condensation du chromosome n'est donc vraisemblablement pas due à des variations au niveau des histones. Ceci est d'autant plus certain que des chromosomes métaphasiques traités par des solutions acides qui extraient les histones, conservent leur morphologie.

Si les histones interviennent dans les premières étapes de condensation de la chromatine pour donner naissance à la fibre de 300 Å, les étapes suivantes seraient dues à l'intervention de non histones. Selon certains auteurs (SADGOPAL et BONNER, 1970) la condensation du chromosome interviendrait par polymérisation des non histones grâce à des ponts disulfure.

Cependant, il a été montré des modifications mineures des protéines de la chromatine. Ces modifications portant sur certains acides aminés sont du type méthylation, acétylation, phosphorylation pour les histones (DIXON et coll., 1975 ; ALFRAY et coll., 1964 ; KLEINSMITH et coll., 1966) et phosphorylation pour les non histones (KLEINSMITH, 1975). La fixation de résidus acétyl, méthyl, phosphate, sur les histones ferait varier la charge électrique de la protéine et par conséquent les interactions ADN-protéines dans la chromatine. Certaines modifications comme la phosphorylation des histones sont concomitantes de la division cellulaire (GUITIERREZ et HNILICA, 1967) et font penser qu'elles pourraient jouer un rôle dans les variations de structure et de fonction de la chromatine (BOSTOK et SUMNER, 1978). Selon KLEINSMITH (1975), la phosphorylation - déphosphorylation de certaines non histones jouerait un rôle au niveau de la régulation génique et serait concomitante des variations de structure et d'activité de la chromatine.

De telles modifications des protéines ne sont pas décelées par notre système d'analyse mais leur rôle n'est cependant pas à exclure.

II - Les non histones du chromosome métaphasique humain et du chromosome métaphasique de hamster chinois

L'étude comparative des protéines non histoniques du chromosome métaphasique humain et de celui du hamster chinois montre qu'il y a identité protéique entre ces deux espèces. Alors que les caryotypes du hamster chinois et de la cellule KB sont très différents, aussi bien par le nombre que par la morphologie des chromosomes (Fig. 37), nous ne décelons aucune différence significative au niveau des non histones majeures étudiées. Ces protéines chromosomiques semblent donc des composants "permanents" des chromosomes et ont certainement des rôles similaires dans les deux espèces animales étudiées. De plus, WRAY et WRAY (1979), après avoir fractionné les différents chromosomes du hamster chinois, en fonction de la taille, ont montré qu'il n'y avait que peu de variations au niveau des non histones des différents chromosomes.

Tous ces résultats laissent penser que la composition en non histones majeures doit présenter de fortes analogies d'une espèce à l'autre, et qu'elles ont des fonctions identiques au sein des différents chromosomes.



a



b



FIGURE 37 : Caryotype de cellules KB (a) et de fibroblaste de hamster chinois (b) montrant la différence fondamentale aussi bien du point de vue nombre que morphologie des chromosomes.

III - Les non histones chromosomiques après modification de la structure primaire de l'ADN

Après incorporation de 5 BrdU dans les deux brins d'ADN d'une chromatide et dans un seul brin d'ADN de l'autre chromatide (72 h d'incorporation), et après incorporation dans les deux brins d'ADN des deux chromatides (96 h d'incorporation), nous ne décelons aucune variation significative dans la composition en non histones. Toutefois le chromosome ayant incorporé la 5 BrdU pendant 72 h présente une asymétrie des chromatides : asymétrie tinctoriale (DUTRILLAUX et coll., 1973) (KORENBERG et FREEDLENDER, 1974), une chromatide prenant plus la coloration que l'autre (Fig. 38) et asymétrie morphologique, la chromatide totalement substituée étant plus allongée que la chromatide partiellement ou non substituée, ce qui confère au chromosome une forme incurvée (DEMINATTI et coll., 1976 ; BUYS et STIENSTRA, 1980). Puisqu'il a été montré qu'il n'y a de variation ni au niveau de l'aspect de la fibre chromosomique en microscopie électronique (DEMINATTI et coll., 1976) ni au niveau de la composition en histones (LAI et DEMINATTI, 1977) et que nos résultats indiquent des compositions identiques en non histones avant et après incorporation de 5 BrdU, la différence morphologique observée est certainement imputable à une modification de l'arrangement spatial de certains constituants de la fibre chromosomique au sein de la chromatide.

Ces modifications peuvent être engendrées par la présence du précurseur, soit directement, ce qui supposerait un rôle actif de l'ADN dans la structure du chromosome, soit indirectement par l'intermédiaire d'une modification des interactions ADN-protéines ou protéines-protéines.

Des résultats récents de BUYS et STIENSTRA (1980) laissent entrevoir que la chromatide entièrement substituée par la 5 BrdU, contiendrait un taux de groupements SH libres, supérieur aux chromatides non substituées et partiellement substituées.

On peut admettre que l'augmentation du nombre de groupements SH libres est le reflet d'une réduction des ponts disulfures. Cette diminution des ponts disulfures serait responsable de l'allongement de la chromatide entièrement substituée, par un phénomène de décondensation partielle.

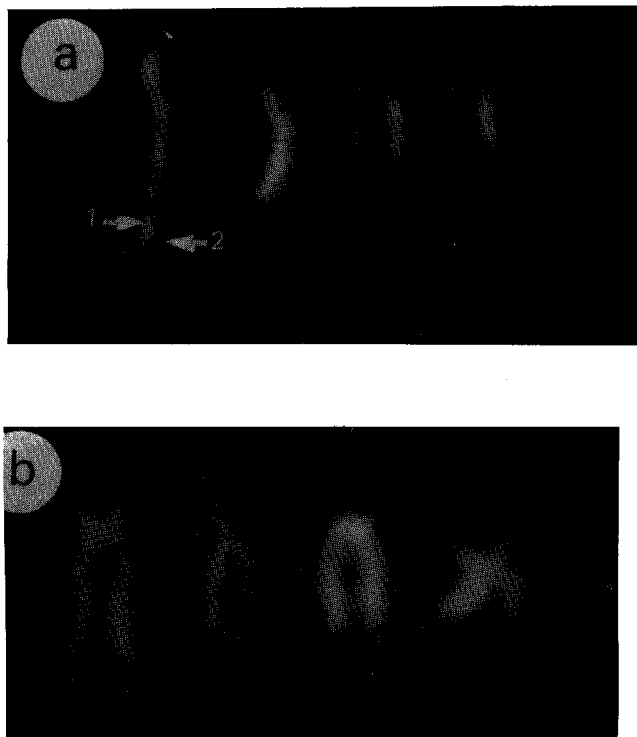


FIGURE 38 : Coloration de chromosomes métaphasique d'après la technique de COUTURIER (1973).

Après incorporation de 5-BrdU pendant 72 h, la chromatide ayant incorporé le précurseur sur les deux fibres de sa molécule d'ADN (2) est moins fluorescente que la chromatide ayant incorporé le précurseur sur une seule fibre de sa molécule d'ADN (1) (asymétrie tinctoriale).

Après 96 h d'incorporation (b), le précurseur a substitué les deux fibres d'ADN des deux chromatides qui apparaissent peu fluorescentes.

Grossissement : X 2000.



Cette hypothèse cadre bien avec le modèle de SADCOPAL et BONNER (1970) où la structure condensée du chromosome métaphasique est assurée par des ponts disulfures interprotéiques. Il est fort probable que le pontage soit réalisé entre protéines non histoniques et non entre les histones, car des chromosomes débarrassés de leurs histones, conservent leur morphologie (ADOLPH et coll., 1977). Ces observations sont en accord avec l'absence de variations des non histones du chromosome substitué.

B - PROBLEMES DE L'INACTIVITE FONCTIONNELLE

I - Activité "template" du chromosome métaphasique

Dans les cellules eucaryotes, le stade métaphase se caractérise par une inactivité génique : la synthèse d'ARN étant minimale à ce stade (KING et BARNHISEL, 1967).

Il est possible de caractériser cette inactivité génique par un test de synthèse d'ARN *in vitro* utilisant une ARN polymérase exogène : l'ARN polymérase d'*E. coli* (COHEN et DEANE, 1976). L'utilisation d'une polymérase procaryote sur de la chromatine eucaryote peut paraître sujette à caution. Cependant s'il a été montré que l'on obtient dans ce cas, des ARN de taille inférieure à ceux résultant de l'action d'une polymérase d'eucaryote, cette technique donne cependant des résultats satisfaisants quant à la faculté de la chromatine, d'être ou de ne pas être transcrite (O'MALLEY et coll., 1977).

Nos résultats sont en accord avec ceux de COHEN et DEANE (1976) car l'on observe bien une inactivité du chromosome métaphasique vis-à-vis de la synthèse d'ARN *in vitro* par une polymérase exogène.

II - Restauration de l'activité "template"

Quels sont les déterminants de cette inactivité génique ? Différents auteurs ont tenté de répondre à cette question en opérant des traitements susceptibles de restaurer l'activité "template" (SEDEROFF et coll., 1973 ; COHEN et DEANE, 1976). Le traitement le plus communément utilisé a été la fixation au mélange méthanol-acide acétique. Nous avons expérimenté d'autres traitements chimiques tels que l'acide chlorhydrique 0,25 N, le 2 SSC, qui se sont avérés restaurer l'activité "template". Il est décrit dans la littérature que les traitements par des solutions acides extraient les protéines basiques de la chromatine (SUMNER et coll., 1973) : les histones. C'est pourquoi cette classe de protéines a souvent été avancée comme responsable de l'inactivité génique en métaphase.

Cependant, nos expériences montrent qu'un traitement enzymatique à la RNase pancréatique est capable de restaurer l'activité "template" sur des chromosomes métaphasiques isolés.

L'idée d'effectuer ce traitement enzymatique provient du fait que le chromosome contient une proportion non négligeable d'ARN (BRACHET, 1957) dont le rôle au sein du chromosome n'est pas encore bien précisé. Nos résultats semblent indiquer que l'ARN chromosomique joue un rôle direct ou indirect dans le processus d'inactivation génique durant la mitose.

III - Le chromosome après traitement restaurant son activité "template"

Tous les traitements effectués sur le chromosome pour restaurer son activité "template" ont en commun : tout d'abord, qu'aucune modification morphologique n'est observée en microscopie optique (Fig. 39), ensuite que l'analyse des protéines non histoniques montre des profils électrophorétiques et des compositions relatives, identiques aux chromosomes non traités. L'altération chromosomique restaurant l'activité "template" est donc un phénomène très discret. Retenons le fait que le traitement par l'HCl 0,25 N extrait la quasi totalité des histones mais que les autres traitements ne semblent pas altérer la quantité d'histones de manière importante.

Ce résultat indiquerait que l'extraction des histones n'est pas le facteur de restauration de l'activité "template". Les histones ne seraient donc pas responsables de l'inactivité génique au stade métaphase. De plus, les chromosomes isolés par notre technique à pH acide, étant dépourvus d'histone H₁, sont inactifs vis-à-vis de la transcription *in vitro*. On peut donc affirmer que l'histone H₁ n'intervient pas dans le processus d'inactivation génique.

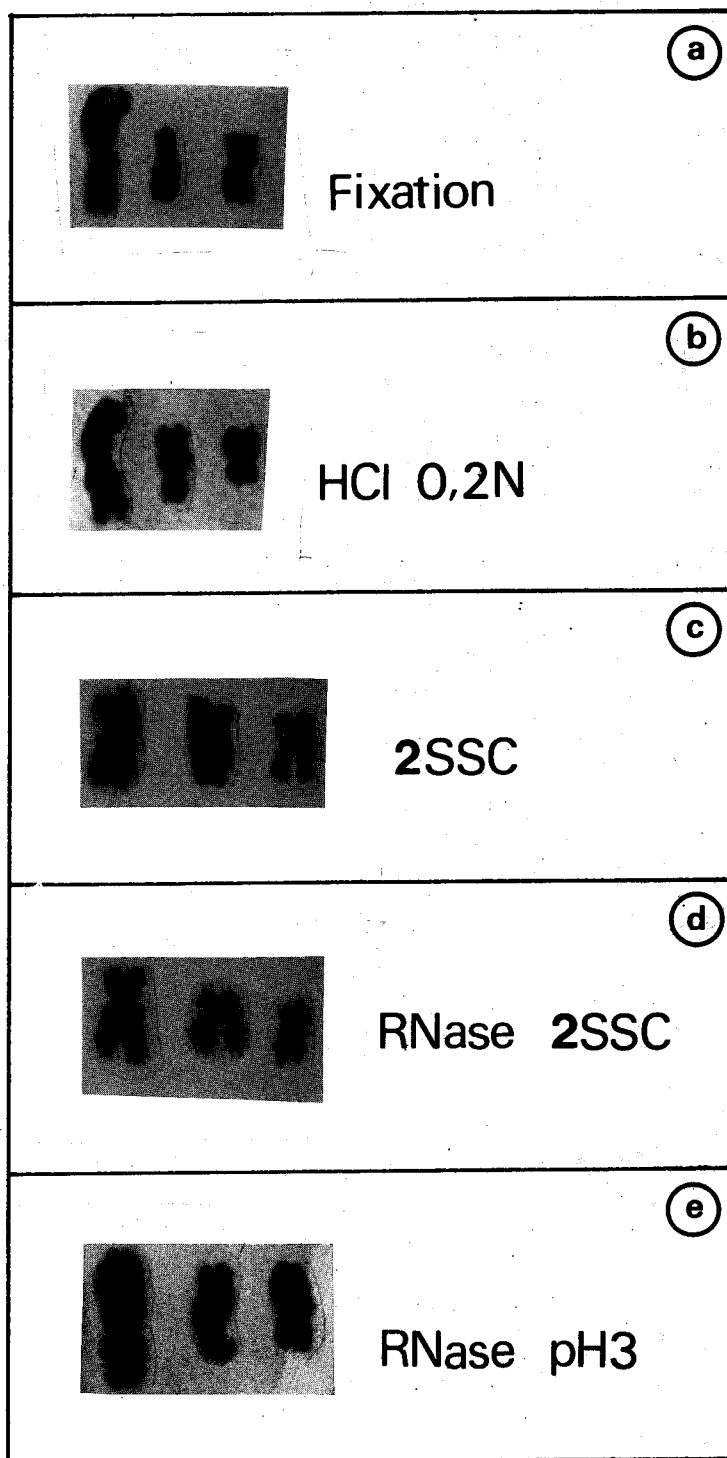


FIGURE 39 : Observation en microscopie optique de chromosomes métaphasiques après les traitements restaurant l'activité "template".
 Coloration au GIEMSA (RAL),
 Grossissement : X 1300.

IV - Protéines extraites après traitement restaurant l'activité "template"

L'analyse de ces fractions protéiques conduit tout d'abord à la confirmation du résultat précédent, c'est-à-dire que les histones ne semblent pas impliquées dans le processus d'inactivation : après traitement à la RNase pancréatique, aucune histone ne semble être libérée du chromosome métaphasique, toutefois la fraction d'histones n° 2 pourrait être masquée par le pic RNase (Fig. 36) ; mais il est fort probable que la libération d'histones H₂A, H₂B, H₃ (fraction 2) serait accompagnée de celle de l'histone H₄ (fraction 1), vraisemblablement à cause des interrelations très étroites entre les histones H₂A, H₂B, H₃, H₄ au sein du nucléosome. La libération d'histones après fixation au mélange méthanol-acide acétique, action de l'HCl 0,25 N, du 2 SSC, semble n'être qu'un phénomène accessoire dans la restauration de l'activité "template".

Tous les traitements que nous avons effectués ont en commun le fait d'extraire une partie de la fraction protéique n° 18 de poids moléculaire 74700. Il est donc possible que cette fraction protéique ait un rôle dans l'inhibition de l'activité génique au stade métaphase.

Cette fraction protéique n'est retrouvée qu'en quantités assez faibles, ce qui explique que l'analyse des protéines chromosomiques après traitement ne révèle aucune modification. Ce résultat confirme également que la restauration de l'activité "template" est due à des modifications peu importantes au niveau du chromosome métaphasique.

Il est vraisemblable que la fraction protéique 18 soit en relation assez étroite avec l'ARN chromosomique. Actuellement, il est difficile de conclure que l'inactivation génique soit due à l'ARN ou à une fraction non histonique, quoique certains travaux indiquent des modifications d'activité "template" qui semblent dépendre des non histones (STEIN et FARBER, 1972) : des expériences de reconstitution de chromatine montrent une activité "template" supérieure lorsque les protéines utilisées sont des non histones provenant du stade interphase, par rapport à la reconstitution avec des non histones provenant du stade métaphase. Cependant, à notre connaissance, il n'y a pas de travaux où le rôle inhibiteur de l'ARN chromosomique ait été recherché ou évoqué.

CONCLUSION

Le matériel nucléaire des cellules eucaryotes se présente sous deux formes : une forme dispersée, la chromatine interphasique, et une forme condensée, lors de la division cellulaire, le chromosome métaphasique. Du point de vue de l'étude structurale, nous n'avons pas décelé entre ces deux états de modifications de la nature et de la quantité de protéines, ce qui nous conduit à admettre que la condensation de la chromatine lors de la mitose ne résulte pas de l'apparition en quantité décelable d'une nouvelle protéine structurale, mais sans doute d'une modification des relations et des interactions entre les divers éléments qui préexistent dans la chromatine interphasique ; modifications induites soit par l'apparition d'un composé agissant à dose catalytique, non décelé par notre méthode, soit par une modification d'activité(s) enzymatique(s).

Les modifications morphologiques du chromosome métaphasique après incorporation de 5 BrdU, n'altèrent pas la composition protéique ce qui est également en faveur du modèle cité plus haut où ce sont plus les interactions que les variations de composition qui confèrent au chromosome sa structure.

L'analyse comparative des non histones de chromosomes métaphasiques humains de chromosomes de hamster chinois, montre la quasi identité de ces protéines, du moins pour les non histones majeures que nous avons étudiées. Ceci semblerait indiquer que malgré les différences observées entre ces deux espèces, au niveau du caryotype (chromosomes différents tant par leur nombre que par leur morphologie), la composition en protéines non histoniques serait identique, ce qui sous-entend qu'elles joueraient des rôles identiques, même au sein de chromosomes ayant des morphologies très différentes. Une étude systématique parmi les grands groupes d'animaux permettrait de savoir si les non histones majeures sont des composants ubiquitaires de tous les chromosomes.

Au niveau de l'analyse fonctionnelle, les études de l'activité "template" du chromosome métaphasique ont confirmé son inactivité. Les analyses protéiques nous ont montré que la restauration de l'activité "template" n'est pas due à la perte des histones mais à des modifications discrètes du chromosome métaphasique, modifications induites par le départ d'ARN et d'une fraction non histonique.

Il est donc probable que ces éléments soient impliqués dans le processus d'inactivation génique de la chromatine pendant la mitose.

L'étude des protéines non histoniques devra se prolonger par leur fractionnement et la préparation des fractions protéiques, particulièrement celles qui semblent jouer un rôle dans l'inactivation génique, afin de préciser par des expériences de reconstitution, leurs rôles dans les modifications de l'activité "template". Des expériences de localisation des protéines par immunofluorescence permettront de vérifier si les protéines non histoniques sont situées à des endroits précis ou réparties sur tous les chromosomes.

Une étude en microscopie électronique devrait permettre de déceler d'éventuelles modifications de la fibre chromosomique après les traitements restaurant l'activité "template" afin de préciser si la levée de l'inhibition est due au départ des éléments inhibiteurs (RNA, non histones) engendrant des modifications de la configuration spatiale.

BIBLIOGRAPHIE

- ADOLPH, K.W., CHENG, S.M. et LAEMLI, U.K. (1977 a)
Cell 12, 805.
- ADOLPH, K.W., CHENG, S.M. et LAEMLI, U.K. (1977 b)
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 74, 4937.
- ALLFREY, V.G., FAULKNER, R. et MIRSKY, A.E. (1964)
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 51, 786.
- BAHN, G.F. (1970)
Exp. Cell Res. 62, 39.
- BAK, A.L. et ZEUTHEN, J. (1976)
Hereditas 82, 1.
- BAK, A.L., et ZEUTHEN, J. (1977)
Symp. Quant. Biol. XLII, 367.
- BAK, A.L., ZEUTHEN, J. et CRICK, F.H.C. (1977)
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 73, 1595.
- BAK, P., BAK, A.L. et ZEUTHEN, J. (1979)
Chromosoma 73, 301.
- BALDWIN, B.P.G., BRADBURY, E.M. et IBEL, M. (1975)
Nature 253, 245.
- BENYAJATI, C. et WORCEL, A. (1976)
Cell 9, 393.
- BOSTOCK, C.J. et SUMNER, A.T. (1978)
in "The Eukaryotic Chromosome" North Holland Publishing Company.
- BOVERI, T. (1904)
in "Zusammenstellung und Ausblicke" p. 113, Gustav Fischer Ed. (Iena).

- BRACHET, J. (1957)
in "Biochemical Cytology" p. 145. Academic Press (New York).

- BUYS, C.H.C.M. et STIENSTRA, S. (1980)
Chromosoma 77, 325.

- CASPERSSON, T., FARBER, S., FOLEY, G.E., KUDYNOWSKI, J., MODEST, E.J.,
SIMONSSON, E., WAGH, U. et ZECH, L. (1968)
Exp. Cell Res. 49, 212.

- COHEN, B.B. et DEANE, D.L. (1976)
J. Cell Sci. 20, 215.

- COMINGS, D.E. (1972)
Adv. Hum. Genet. 3, 237.

- COMINGS, D.E. et TACK, L.O. (1973)
Exp. Cell. Res. 82, 175.

- COMINGS, D.E. et HARRIS, D.C. (1975)
Exp. Cell Res. 96, 161.

- COMINGS, D.E. et HARRIS, D.C. (1976)
J. Cell Biol. 70, 440.

- COMINGS, D.E. (1978)
Meth. Cell Biol. XVII, 115.

- COUTURIER, J. (1973)
C. R. Acad. Sci. (Paris) 276, 339.

- DASKAL, Y., MACE, Jr M.L., WRAY, W. et BUSCH, H. (1976)
Exp. Cell Res. 100, 204.

- DEMINATTI, M., DESBIENS, X., LAI, J.L. et JACQUELOOT N. (1975 a)
Lille Med. 20, 494.

- DEMINATTI, M., LAI, J.L., DESBIENS, X. et JACQUELOOT, N. (1975 b)
C. R. Soc. Biol. 169; 981.

- DEMINATTI, M., SAVARY, J.B. et LAI, J.L. (1976)
Ann. Genet. 19, 91.

- DENTON, T.E., HOWEL, W.M. et BARRET, J.V. (1976)
Chromosoma 55, 81.

- DIXON, G.H., CANDIDO, E.P.M., HONDA, B.M., LOUIE, A.J. , Mc LEOD, A.R.
et SUNG, M.T. (1975)
in "The Structure and Function of Chromatin" Ciba Found. Symp. 28, 229.

- DOUVAS, A.S., HARRINGTON, C.A. et BONNER, R.J. (1975)
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 72, 3902.

- DU PRAW, E.J. (1968)
in "Cell and Molecular Biology" p. 558, Academic Press (New York)

- DUTRILLAUX, B., LAURENT, C., COUTURIER, J. et LEJEUNE, J. (1973)
C.R. Acad. Sci. (Paris) 276, 3179.

- ELGIN, S.C.R. et BONNER, J. (1972)
Biochemistry 11, 772.

- FINCH, J.T. et KLUG, A. (1976)
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 73, 1897.

- FLEMMONG, W. (1880)
Arch. Mikrosk. Anat. Entwicklungsmech 18, 151.

- GENEIX, A., FELLMAN, N. et JAFFRAY, J.Y. (1975)
C. R. Acad. Sci. (Paris), 280, 1151.

- GOYANNES, V.J., MATSUI, S. et SANDBERG, A.A. (1980)
Chromosoma 78, 123.

- GRIFFITH, J.D. (1975)
Science 187, 1202?

- GUITIERREZ, R.M. et HNILICA, L.S. (1967)
Science 157, 1324.

- HAMEISTER, H. (1977)
Chromosoma 62, 217.

- HARRIS, H. et WATKINS, J.F. (1965)
Nature 205, 640.

- HENDERSON, A.S., WARBURTON, D. et ATWOOD, K.C. (1972)
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 69, 3394.

- HERMAN, I.M. et POLLARD, T.D. (1978)
Exp. Cell. Res. 114, 15.

- HERTWIG, O. (1875)
Morphol. Jahrb. 1, 347.

- HOWEL, W.M. et HSU, T.C. (1979)
Chromosoma, 73, 61.

- HSIANG, M.W. et COLE, R.D. (1977)
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 74, 4852.

- JEPPENSEN, P.G.N., BANKIER, A.T. et SANDERS, L. (1978)
Exp. Cell. Res. 115, 293.

- JOCKUSCH, B.M., BROWN, D.F. et RUSH, H.P. (1971)
J. Bact. 108, 705.

- JOCKUSH, B.M., RYSER, U. et BEHNKE, O. (1973)
Exp. Cell Res. 76, 464.

- KAUFMAN, B.P. (1926)
Amer. J. Bot. 13, 52.

- KERKAERT, J.P. (1978)
Anal. Biochem. 84, 354.

- KING, D.W. et BARNHISEL, M.L. (1967)
J. Cell Biol. 33, 265.

- KLEINSMITH, L.J., ALLFREY, V.G. et MIRSKY, A.E. (1966)
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 55, 1182.

- KLEINSMITH, L.J. (1975)
J. Cell Physiol. 85, 459.

- KORENBERG, J.R. et FREEDLENDER, E.F. (1974)
Chromosoma 48, 355.

- KORNBERG, R.D. (1974)
Science 184, 868.

- LAEMLI, U.K. (1970)
Nature 227, 680.

- LAEMLI, U.K., CHENG, S.M., ADOLPH, K.W., PAULSON, J.R., BROWN, J.A. et
BAUMBACH, W.R. (1977).
Symp. Quant. Biol. XLII, 351.

- LAI, J.L. et DEMINATTI, M. (1977)
Ann. Genet. 20, 25.

- LESTOURGEON, W.M., FORER A., YANG, Y.Z., BERTRAM, J.S. et RUSH, H.P. (1975)
Biochim. Biophys. Acta 77, 529.

- MANTON, I. (1950)
Biol. Rev. 25, 486.

- MARDSEN, M.P.F. et LAEMLI, U.K. (1979)
Cell 17, 849.

- MATSUKUMA, S. et UTAKOJI, S. (1977)
Exp. Cell. Res. 105, 217.

- MOURIQUAND, C., GILLY, C. et WOLFF, C. (1972)
Ann. Genet. 15, 249.

- OHNKI, Y. (1968)
Chromosoma 25, 402.

- OKADA, T.A. et COMINGS, D.E. (1979)
Chromosoma, 72, 1.

- O'MALLEY, B.W., TOWLE, H.C. et SCHWARTZ, R.J. (1977)
Ann. Rev. Genet. 11, 239.

- OUDET, P., GROSS-BELLARD, M. et CHAMBON, P. (1975)
Cell 4, 281.

- PAULSON, J.R. et LAEMLI, U.K. (1977)
Cell 12, 817.

- PEDERSON, J.L., et Mac CONCKEY, E.H. (1976).
J. Biol. Chem. 251, 548.

- PEDERSON, T. et BHORJEE, J.S. (1979)
J. Mol. Biol. 128, 451.

- RIS, H. (1975)
Ciba Found. Symp. 28, 7.

- RIS, H. (1976)
VIth Europ. Congr. Elec. Microsc. p. 21.

- RUDDLE, F.H. (1970)
Symp. Int. Soc. Cell Biol. 9, 233.

- SADGOPAL, A. et BONNER, j. (1970)
Biochim. Biophys. Acta 207, 206.

- SALZMAN, N.P., MOORE, D.E. et MENDELSON, J. (1966)
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 56, 1449.

- SCHWARZACHER, H.G. (1976)
in "Handbuch der Mikroskopischen, Anatomie des Menschen : Chromosomes"
Springer Verlag (Berlin, Heidelberg, New York)

- SEDEROFF, R., CLYNES, R., PONCZ, M. et HACHTEL, S. (1973)
J. Cell Biol. 57, 538.

- SPERLING, L. et KLUG, A. (1977)
J. Mol. Biol. 112, 253.

- STEIN, G. et FARBER, J. (1972)
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 69, 2910.

- STROZYK, F., VASSEUR, F. et DEMINATTI, M. (1981)
Manuscrit soumis pour publication.

- STUBBLEFIELD, E. et WRAY, W. (1971)
Chromosoma, 32, 262.

- STUBBLEFIELD, E. (1973)
Int. Rev. Cytol. 35, 1

- SUMNER, A.T., EVANS, H.J. et BUCKLAND, R.A. (1973)
Exp. Cell Res. 85, 255.

- SUTTON, W.S. (1903)
Biol. Bull. Mar. Biol. Lab., Woods Hole 4, 231.

- TAYLOR, J.H. (1958)
Sci. Am. 198, 36.

- THOMA, F., KOLLER, T. et KLUG, A. (1979)
J. Cell Biol. 83, 403.

- TRIFONOV, E. (1978)
Nucl. Acid Res. 5, 1371.

- UNAKUL, W., HSU, T.C., RAS, P.N. et JOHNSON, R.T. (1973)
Nature New Biol. 242, 106.

- WEBER, K. et OSBORN, M. (1969)
J. Biol. Chem. 244, 4406.

- WRAY, W. et STUBBLEFIELD, E. (1970)
Exp. Cell Res. 59, 469.

- WRAY, W., STUBBLEFIELD, E. et HUMPHREY, R. (1972)
Nature New Biol. 238, 237.

- WRAY, W. et WRAY, V.P. (1979)
J. Histochem. Cytochem. 27, 454.

- WU, F.C., ELGIN, S.C.R. et HOOD, L.E. (1973)
Biochemistry 12, 2792.

