

PHYSIOLOGIE CELLULAIRE ANIMALE. — *Le chromosome métaphasique : inertie et capacité fonctionnelles liées à la présence de séquences d'ADN monocaténares.* Note de **Francis Vasseur, François Fontaine, Jean-Bernard Savary et Marc Deminatti**, présentée par Maurice Durchon.

Les chromosomes métaphasiques isolés de cellules KB ont été utilisés comme matrice dans un système de synthèse d'ADN *in vitro*. Dans ces conditions aucune synthèse n'a pu être observée, confirmant l'inertie fonctionnelle du chromosome isolé. Une synthèse d'ADN a été mise en évidence après action préalable soit du mélange méthanol-acide acétique, soit de la RNase A. L'analyse des polydésoxyribonucléotides synthétisés *in vitro* montre deux entités de 4 S et de 7 à 8 S. Les résultats suggèrent la présence de séquences d'ADN monocaténares dans le chromosome métaphasique. De telles séquences ont pu être mises en évidence dans l'ADN extrait de chromosomes métaphasiques. Elles préexisteraient donc au sein de cet organite et seraient démasquées par les traitements restaurant l'activité matrice du chromosome métaphasique.

ANIMAL CELLULAR PHYSIOLOGY. — Isolated metaphase chromosome: inactivity and template ability related with single stranded DNA.

Isolated metaphase chromosomes from KB cells were used as template in an in vitro DNA synthesis assay. In these conditions, no synthesis was noticed, confirming template inactivity of isolated metaphase chromosomes. DNA synthesis was noticed after a pretreatment with either methanol-acetic acid or RNase A. Analysis of in vitro synthesized polydeoxyribonucleotides showed two fractions of 4 S and 7-8 S. These results suggest the presence in metaphase chromosome of single stranded DNA sequences. Such sequences are shown in DNA extracted from chromosomes. They would preexist in this organite and would be unmasked by the treatments that restaure template activity of metaphase chromosome.

I. INTRODUCTION. — La synthèse d'ARN *in vitro*, utilisant le chromosome métaphasique isolé à pH acide, n'est effective qu'après traitement des préparations de chromosomes par la RNase notamment [1]. Cette inertie fonctionnelle *in vitro* correspondrait à l'inactivité transcriptionnelle de la chromatine observée lors de la mitose [2]. Les déterminants de cette inactivité chromosomique sont encore obscurs. Grâce à un système de synthèse d'ADN *in vitro* et par l'étude du matériel synthétisé *in vitro* ainsi que des matrices d'ADN chromosomique, nous avons recherché une meilleure compréhension du phénomène de restauration de l'activité matrice et de la nature de l'ADN des chromosomes métaphasiques.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES. — *Cultures cellulaires.* — Les cellules KB sont cultivées en suspension dans du « MEM Joklik modifié » (F13) additionné de 5% de sérum de cheval.

Isolement de chromosomes. — Les chromosomes métaphasiques sont isolés à partir de cellules KB selon une technique à pH 3 décrite antérieurement [3].

Synthèse d'ADN in vitro. — Des chromosomes métaphasiques isolés sont déposés sur des lames histologiques. Certaines préparations subissent soit une fixation au mélange méthanol-acide acétique (3:1), suivie ou non d'un traitement enzymatique à la DNase I (Worthington), soit un traitement à la RNase A (Worthington) exempt de DNase, dans les conditions expérimentales définies antérieurement [1]. Sur ce matériel la synthèse d'ADN est effectuée à 37°C en chambre humide en présence de 20 mM de chacun des désoxynucléotides triphosphates, de dTTP³H (53 Ci/mmole, C.E.A., Saclay) à 150 µCi/ml, d'ADN polymérase de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma) à 30 unités/ml, dans un tampon Tris 20 mM, MgCl₂ 2 mM, mercaptoéthanol 2 mM, pH 7,4. Après incubation, le milieu réactionnel est conservé pour l'extraction des polydésoxyribonucléotides synthétisés *in vitro*. Certaines lames sont ensuite traitées par une solution de NaOH 0,3 M, NaCl 0,9 M, EDTA 0,01 M pour isoler les polydésoxyribonucléotides encore adsorbés sur les lames histologiques. Toutes les lames sont soumises à l'étude autoradiographique avec l'émulsion « Kodak NTB2 », selon des temps d'exposition de 15 jours.

Étude du matériel synthétisé. — Les polydésoxyribonucléotides synthétisés *in vitro* et recueillis dans le milieu de synthèse, sont purifiés selon la technique de Varmus et coll. [4], puis séparés des nucléotides par chromatographie sur Séphadex G50.

Les gradients de saccharose neutres (NaCl 0,1 M, EDTA 0,01 M, Tris 0,02 M pH 7,4) et alcalins (NaOH 0,3 N, NaCl 0,9 M, EDTA 0,01 M) sont réalisés à 270 000 g pendant 16 h dans un rotor « Beckman SW 60 ». Les fractions sont ensuite collectées, précipitées à l'acide trichloracétique sur des filtres GF/C; leur radioactivité est déterminée en scintillation liquide. L'électrophorèse des polydésoxyribonucléotides est réalisée sur gel de polyacrylamide selon la technique de Maxam et Gilbert [5] en présence d'urée 5 M dans les conditions

dénaturantes. Les gels sont découpés en fragments de 1,5 mm et leur radioactivité est analysée en scintillation liquide selon la méthode de Tishler et Epstein [6].

Préparation de l'ADN moncaténaire. — L'ADN de chromosomes métaphasiques a été préparé selon la technique de Leibovitch et coll. [7]. L'ADN moncaténaire a été isolé selon la méthode de Bernard [8] modifiée par Fanshier et coll. [9].

Traitement à la nucléase S₁. — Le traitement à la nucléase S₁ a été réalisé selon la méthode de Leong et coll. [10].

Gradients de CsCl. — Les échantillons de DNA à analyser sont dissouts en Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8. Du chlorure de césium est ajouté pour obtenir une densité de 1,7. Les échantillons sont centrifugés à 26000 tr/mn dans un rotor SW60Ti, à 18°C pendant 72 h. Les tubes sont percés par le fond, les fractions sont collectées. La densité optique à 254 nm ainsi que la densité de CsCl sont analysées pour chaque fraction.

III. RÉSULTATS. — (a) *Étude de l'ADN synthétisé in vitro.* — Les études autoradiographiques des essais de synthèse d'ADN *in vitro* à partir de chromosomes métaphasiques isolés ne font apparaître aucune synthèse confirmant l'inertie déjà signalée de cet organite [1]. Par contre, lorsque les chromosomes isolés sont prétraités au méthanol-acide acétique (3:1) ou à la ribonucléase pancréatique, une synthèse intense d'ADN est observée à leur niveau (tableau). Différents temps de synthèse ont été réalisés (de 0 à 1 h), le maximum de synthèse étant atteint au bout de 15 mn d'incubation à 37°C. Sur des chromosomes fixés, un prétraitement à la DNase empêche toute synthèse ultérieure. Après synthèse sur du matériel fixé, un post-traitement à la RNase est sans action, alors qu'un post-traitement à la DNase fait disparaître toute radioactivité chromosomique (tableau). Ces résultats indiquent que l'ADN chromosomique, rendu fonctionnel par un prétraitement, sert de matrice à la synthèse *in vitro* de polydésoxyribonucléotides.

Le matériel synthétisé, recueilli puis étudié en gradient de saccharose neutre 5-20% (fig. 1) et sur gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes (fig. 2a) apparaît constitué de polydésoxyribonucléotides dont la plupart ont une taille correspondant à 4S. Leur analyse en gradient de saccharose alcalin 5-20% (fig. 1) ou sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (fig. 2b) montre deux entités respectivement de 4S (100 nucléotides) et de 7 à 8 S (200-250 nucléotides). Ces différents résultats sont en faveur d'une structure bicaténaire de l'ADN synthétisé, ce que confirme la chromatographie sur hydroxylapatite où 95% de l'ADN synthétisé *in vitro* se trouve sous la forme bicaténaire.

(b) *Isolement et caractérisation des séquences d'ADN moncaténaire.* — L'ADN de chromosomes métaphasiques isolés, analysé par la chromatographie sur hydroxylapatite (HAP) montre deux fractions. Une fraction majeure éluée en tampon phosphate 0,4 M, et une fraction mineure éluée en tampon phosphate 0,15 M comme de l'ADN dénaturé.

Cette fraction mineure se trouve être sensible à la DNase I, à la nucléase S₁ qui dégrade spécifiquement les acides nucléiques moncaténaires, et résistante à la RNase A. Son analyse en gradients de CsCl (fig. 4) montre qu'elle présente une densité apparente supérieure à celle de l'ADN total de chromosomes métaphasiques, et identique à celle de l'ADN dénaturé de chromosomes isolés. Ces résultats permettent d'interpréter la fraction mineure comme étant de l'ADN moncaténaire (ssDNA).

EXPLICATIONS DE LA PLANCHE

Fig. 1. — Gradients de saccharose 5-20%, neutre (○—○) et alcalin (○...○) de l'ADN synthétisé *in vitro*.

Fig. 1. — 5-20% (○—○) and alkaline (○...○) sucrose gradients of *in vitro* synthesized DNA.

Fig. 2. — Electrophorèse sur gel de polyacrylamide, en conditions non dénaturantes (a) et dénaturantes (b), de l'ADN synthétisé *in vitro*.

Fig. 2. — Polyacrylamide gel electrophoresis of *in vitro* synthesized DNA, in non denaturing (a) and denaturing conditions (b).

TABLEAU

Résultats de synthèse d'ADN *in vitro* sur les chromosomes métaphasiques.
 Results of *in vitro* DNA synthesis on metaphase chromosomes.

Pré-traitement (avant synthèse <i>in vitro</i>)	Post-traitement (après synthèse <i>in vitro</i>)	Synthèse observée (par autoradiographie)
Aucun	Aucun	0
Méthanol-acide acétique (3 : 1)	Aucun	+++
RNase A	Aucun	+++
Méthanol-acide acétique (3 : 1)	RNase A	+++
RNase A	DNase	0
RNase A	RNase A	+++
Méthanol-acide acétique (3 : 1) puis DNase	Aucun	0

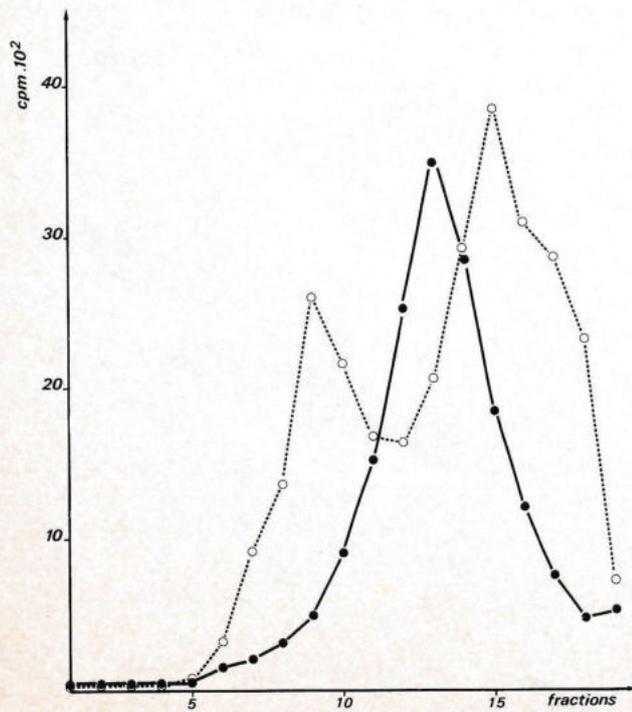
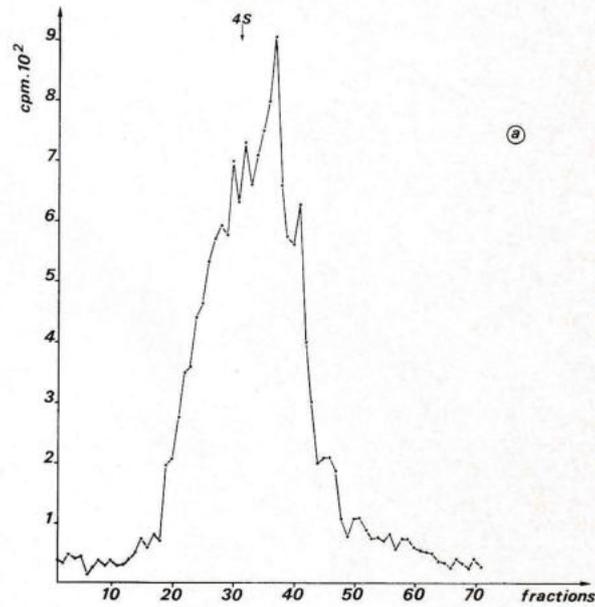
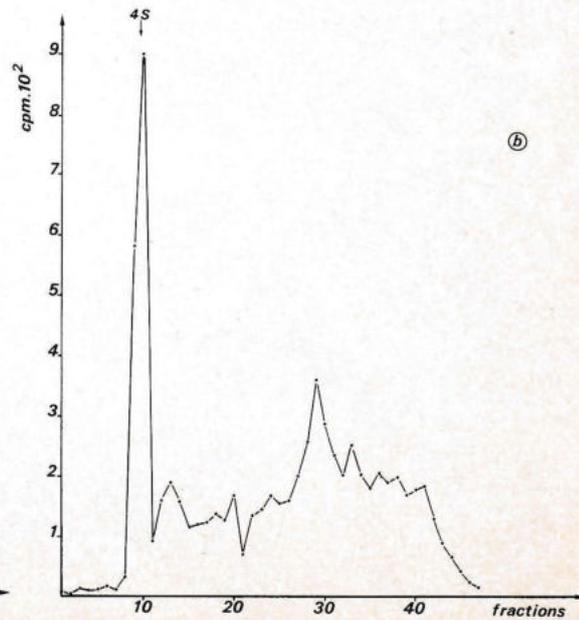


Fig. 1



Ⓐ



Ⓑ

Fig. 2

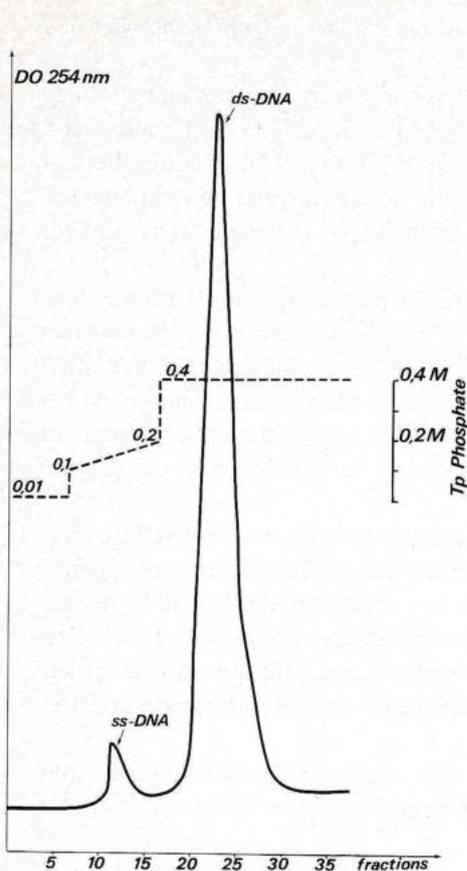


Fig. 3

Fig. 3. — Chromatographie sur hydroxylapatite de l'ADN de chromosomes métaphasiques, montrant l'ADN monocaténaire (ss-DNA) élué par un gradient de tampon phosphate 0,1-0,2 M, et l'ADN bicaténaire (ds-DNA) élué en tampon phosphate 0,4 M.

Fig. 3. — Hydroxylapatite chromatography of metaphase chromosome DNA, showing single stranded DNA (ss-DNA) eluted by a 0.1 to 0.2 M phosphate gradient, and double stranded DNA (ds-DNA) eluted by a 0.4 M phosphate buffer.

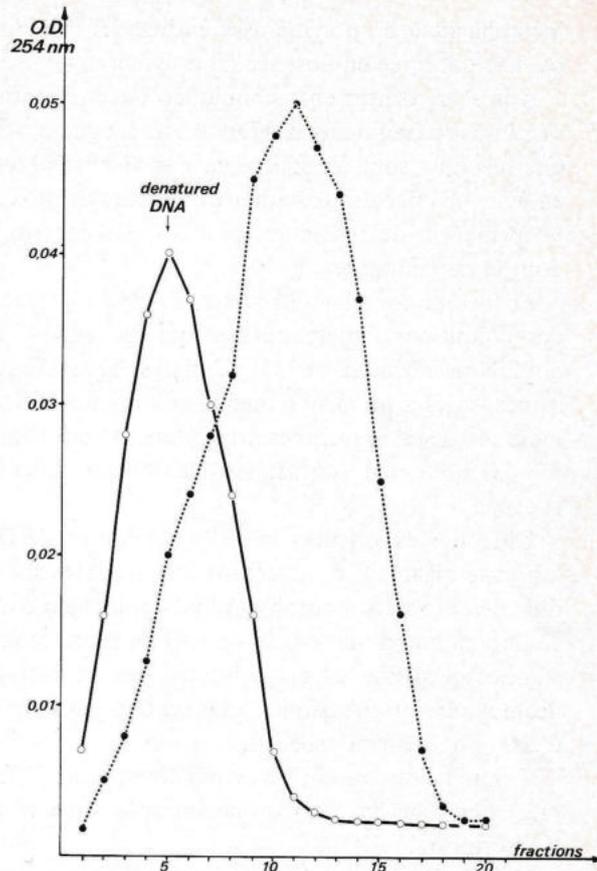


Fig. 4

Fig. 4. — Analyse sur gradient de CsCl de la fraction mineure éluée sur hydroxylapatite en tampon phosphate 0,15 M (○—○) et de l'ADN total des chromosomes métaphasiques isolés (●...●). La fraction mineure présente une densité apparente supérieure à celle de l'ADN total du chromosome, et identique à celle de l'ADN chromosomique dénaturé.

Fig. 4. — CsCl density gradient of hydroxylapatite minor fraction eluted by 0.15 M phosphate buffer (○—○) and of whole metaphase chromosomal DNA. Minor fraction bands at a higher buoyant density than total chromosomal DNA, and has the same buoyant density as denatured chromosomal DNA.

Cependant, une proportion non négligeable (28%) de l'ADN isolé dans un premier temps, se trouve être résistante à la nucléase S_1 . L'analyse sur HAP de cette fraction montre un ADN bicaténaire, suggérant ainsi une réassociation rapide d'une partie des séquences monocaténares.

IV. DISCUSSION. — L'inertie fonctionnelle du chromosome peut être levée facilement par divers traitements qui sont capables de démasquer des zones d'ADN, permettant d'obtenir une synthèse *in vitro* d'ADN, ou d'ARN [1]. Ces traitements (RNase, 2XSSC, NaCl 0,35 M, HCl 0,2 N) sont réputés agir sur l'ARN ou les protéines, ou provoquer des modifications, voire des pertes importantes de matériel comme la fixation au méthanol-acide acétique (3:1). Par ailleurs il ne semble pas exister dans le chromosome

métaphasique de polymérase endogènes fonctionnelles car aucune synthèse *in vitro* n'a pu être observée en absence de polymérase exogène.

Après les traitements chimiques ou enzymatiques, nous avons observé une synthèse continue de fragments d'ADN d'une longueur de 100 (4 S) et 200/250 (7-8 S) nucléotides. Ces résultats sont à rapprocher des valeurs obtenues par Nuzzo et coll. [11] qui mettent en évidence par des expériences de transcription *in vitro* sur des noyaux de lymphocytes, la formation de molécules de 4 S qui sont ensuite maturées en molécules plus grandes dont le maximum est de 10 S.

En ce qui concerne les zones d'ADN matriciel, l'ADN polymérase a été utilisée dans des conditions expérimentales qui la rendent active spécifiquement sur des matrices d'ADN monocaténaire [12]. L'analyse biochimique de l'ADN des chromosomes métaphasiques isolés a permis de mettre en évidence des séquences d'ADN monocaténaire, ce qui indique que ces séquences préexistent et sont démasquées par nos traitements, notamment par le traitement spécifique à la RNase. Elles serviraient de matrice à la polymérase exogène.

Dans nos expériences la quasi totalité de l'ADN synthétisé *in vitro* se trouve être sous la forme bicaténaire, suggérant une synthèse sur des matrices d'ADN hautement répétitif dont les produits s'autohybrident rapidement. Cette hypothèse est étayée par la réassociation rapide d'une partie de l'ADN monocaténaire extrait des chromosomes métaphasiques isolés. Elle est à rapprocher des résultats d'Okada et coll. [13] qui obtiennent sur des noyaux interphasiques, une synthèse *in vitro* de molécules de 5 S à partir de matrices d'ADN hautement répétitif.

Comme l'ont montré Leibovitch et coll. [7] de telles séquences monocaténaires sont présentes dans la chromatine interphasique et correspondent à des zones en cours de transcription.

Un tel rôle ne peut être envisagé pour le chromosome métaphasique puisque la synthèse d'ARN est quasi inexistante en métaphase [2]. Nous pouvons envisager que ces séquences monocaténaires chromosomiques constituent des zones d'instabilité chromosomiques ou chromatidiennes, d'échanges de chromatides (SCE), de translocations. Leur rôle structural ou fonctionnel reste cependant à préciser.

Nous remercions Didier Petite (I.N.S.E.R.M. U 233, Lille, professeur Pierre Boulanger) pour nous avoir fourni les cellules KB.

Remise le 21 octobre 1985, acceptée après révision le 10 mars 1986.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] F. VASSEUR, F. FONTAINE, F. STROZYK et M. DEMINATTI, *Comptes rendus*, 294, série II, 1982, p. 223-226.
- [2] B. B. COHEN et D. E. DEANE, *J. Cell Sc.*, 20, 1976, p. 215-219.
- [3] M. DEMINATTI, J. L. LAI, X. DESBIENS et N. JACQUELOOT, *C.R. Soc. Biol.*, 169, 1975, p. 981-992.
- [4] H. E. VARMUS, N. QUINTREL, R. NOWINSKY, E. MEDEIROS, N. SARKAR et J. M. BISHOP, *J. Mol. Biol.*, 79, 1973, p. 663-679.
- [5] A. M. MAXAM et W. GILBERT, *Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.A.*, 74, 1977, p. 560-564.
- [6] P. V. TISHLER et C. J. EPSTEIN, *Anal. Biochem.*, 22, 1968, p. 89-98.
- [7] S. A. LEIBOVITCH, L. TICHONICKY, J. KRUEH et J. HAREL, *Exp. Cell. Res.*, 133, 1981, p. 181-189.
- [8] G. BERNARDI, *Biochim. Biophys. Acta*, 174, 1969, p. 435-448.
- [9] L. FANSHIER, A. C. GARAPIN, J. MCDONNELL, A. FARAS, W. LEVINSON et J. M. BISHOP, *J. Virol.*, 7, 1971, p. 77-86.
- [10] J. A. LEONG, A. C. GARAPIN, N. JACKSON, L. FANSHIER, W. LEVINSON et J. M. BISHOP, *J. Virol.*, 9, 1972, p. 891-902.
- [11] F. NUZZO, A. BREGA et A. FALLASCHI, *Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.A.*, 65, 1970, p. 1017-1024.
- [12] B. K. ZIMMERMAN, *J. Biol. Chem.*, 241, 1966, p. 2035-2041.
- [13] N. OKADA, K. SAKAMOTO et A. KONDO, *J. Biochem. (Tokyo)*, 93, 1983, p. 723-731.

Service de Cytogénétique, Faculté de Médecine,
1, place de Verdun, 59045 Lille Cedex.