

TECHNIQUES ACTUELLES D'IDENTIFICATION CHROMOSOMIQUE

par M. DEMINATTI et J. SAVARY (*)

De nombreuses techniques récentes permettent une identification fine des chromosomes dans l'espèce humaine, qui n'était jusqu'alors basée que sur des critères morphologiques (longueur et indice centrométrique) (27), ou autoradiographiques (incorporation de 3 H thymidine) (17).

Quelles que soient les techniques utilisées, les chromosomes présentent une succession de bandes claires et sombres dont le nombre et la répartition caractérisent chacune des paires de chromosomes. Les différents traitements appliqués aux préparations permettent d'identifier des bandes sombres dites Q, C, R et G.

CASPERSON et coll. (7) ont établi la carte cytologique des chromosomes par fluorescence et obtenu des bandes de type Q.

Une coloration spécifique des centromères et des constriction secondaires est obtenue après dénaturation alcaline (1-20). De même, SHIRAISHI et YOSIDA (25) montrent que l'urée en solution tamponnée induit l'apparition au niveau des centromères et constriction secondaires de bandes de type C.

DUTRILLAUX et LEJEUNE (12) obtiennent un marquage chromosomique par dénaturation thermique. Les chromosomes présentent des bandes R.

L'incubation dans une solution saline fait apparaître sur les chromosomes après coloration au Giemsa une alternance de zones sombres ou bandes G (SUMMER et coll. (26), SCHNEDL (24), RIDLER (23), DRETS et coll. (10)).

Ces bandes G, dont la localisation est inverse de celle des bandes R, sont également obtenues par digestions enzymatiques (11-15-28).

EVANS et coll. (14) comparent la répartition des bandes G obtenues après dénaturation en solution saline à celle des bandes Q observées en fluorescence. Les résultats obtenus par ces techniques sont superposables.

Des variations de pH sont également utilisées pour l'identification des chromosomes (3-21). Nous rapportons dans ce travail, les résultats obtenus après dénaturation saline, fluorescence et digestion enzymatique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les préparations chromosomiques sont obtenues à partir de sang périphérique selon la technique classique (18).

1 - Dénaturation saline

Nous avons appliqué la technique de SUMMER et coll. (26) pour l'obtention des bandes G.

1 - Les cultures de sang sont traitées par un milieu hypotonique (KCl 0,3 p. 100, citrate trisodique 0,5 p. 100) 10 mn, fixées dans méthanol-acide acétique 3:1, puis étalées sur lames et séchées à l'air.

2 - Les lames sont incubées 1 h à 60° C dans du 2 × SSC (Saline Citrate Solution = NaCl 0,3 M - citrate trisodique 0,03 M).

3 - Plonger les lames dans de l'eau à 0° C 1 mn.

4 - Colorer 1 h 30 dans une solution de Giemsa tamponnée à pH 6,8 selon ARRIGHI et HSU (1), (50 ml d'eau distillée, 1,5 ml d'acide citrique 0,1 M, ajuster à pH 6,8 avec Na₂HPO₄ 0,2 M, 1,5 ml de méthanol, 5 ml de Giemsa GURR R 66).

5 - Rincer brièvement et sécher.

L'observation se fait à l'immersion (× 100) sous un microscope classique (photo microscope ZEISS).

(*) Service de Génétique et Embryologie (Professeur M. DEMINATTI), Faculté de Médecine, 1, place de Verdun, 59 - Lille.

2 - Technique de fluorescence

Nous appliquons la technique de CASPERSSON et coll. (7) en utilisant comme agent fluorescent l'Atébrine (G.T. GURR) pour obtenir les bandes Q.

1 - Plonger les lames dans un tampon phosphate pH 6,8 5 mn.

2 - Colorer les lames 20 mn à 20° C dans la solution de fluorochrome tamponnée à pH 6,8 (concentration finale 50 γ /ml).

3 - Rincer brièvement et monter dans le tampon.

L'observation se fait en fond noir (avec un objectif $\times 100$ muni d'un diaphragme à iris), sous un microscope à UV équipé d'un filtre d'excitation BG 12 et d'un filtre d'arrêt de 530 nm. La source lumineuse est une lampe à vapeur de mercure HBO 200. Les clichés sont photographiés sur film « Rayoscope » RY 135-50 (KODAK) et développés dans le révélateur L $\times 24$ (KODAK).

3 - Digestion enzymatique

Pour obtenir les bandes G, les lames sont traitées selon la technique de FINAZ et DE GROUHY (15) 4 nm à 37° C par une solution aqueuse d' α -chymotrypsine (MERCK) à 0,05 mg/ml.

Après rinçage à l'eau, les lames sont colorées au Giemsa pH 6,8.

RÉSULTATS

Les planches I et II montrent la répartition des bandes obtenues par dénaturation saline, par fluorescence et par digestion enzymatique. Un schéma permet de mieux les visualiser afin d'en comparer leur nombre et leur position sur les chromosomes.

Si les différences apparaissent dans la taille et dans l'intensité de la coloration des bandes, la comparaison des images observées montre que les résultats sont à quelques exceptions près superposables en ce qui concerne les bandes fluorescentes (QM⁺) et colorées au Giemsa (G⁺). Les différences essentielles se situent au niveau des chromosomes 9 et Y. La constriction secondaire du 9 est G⁻ mais QM⁺. Par fluorescence le chromosome Y présente une bande fluorescente caractéristique sur la portion dis-

tales des bras longs, tandis que la dénaturation révèle deux bandes G⁺ sur les bras longs.

APPLICATIONS

Ces techniques nouvelles permettent aujourd'hui l'identification exacte des chromosomes dans les cas d'anomalies chromosomiques numériques et structurales.

Ainsi, CASPERSSON et coll. (6) confirment par fluorescence une délétion des bras courts du chromosome 5 dans le syndrome « du cri du chat ». Dans la leucémie myéloïde chronique, le chromosome Philadelphie (Ph₁) est identifié par cette même technique comme un chromosome 22 (5-19). Des cas de trisomies 21 ont été mis en évidence par fluorescence et dénaturation (19-13). De nombreux exemples d'anomalies structurales ont également été étudiés par ces techniques (13). Nous présentons sur la planche III des cellules trisomiques 21 analysées en fluorescence (fig. 1) et dénaturation saline (fig. 2). La figure 3 montre le caryotype ordonné d'un sujet 47, XX, G⁺; le chromosome surnuméraire apparaît, par dénaturation par le 2 \times SSC, comme étant un 21.

Par ailleurs, la fluorescence caractéristique du chromosome Y permet sa mise en évidence dans des noyaux interphasiques (2-8-9-22). La planche IV montre le corpuscule fluorescent Y obtenu à partir d'un étalement de sang (fig. 1), d'une cellule endobuccale (fig. 2), d'une cellule amniotique pour la recherche du sexe fœtal (fig. 3). Ce test combiné avec le test chromatinien de BARR permet la détection rapide des anomalies gonosomiques numériques (fig. 4).

DISCUSSION

Dans l'espèce humaine, l'étude en fluorescence introduite par CASPERSSON (4), ZECH (29) et GEORGE (16), montre une répartition de bandes fluorescentes Q caractéristiques des paires de chromosomes homologues. Leurs travaux démontrent que la quantité de DNA n'est pas augmentée au niveau de ces bandes, mais

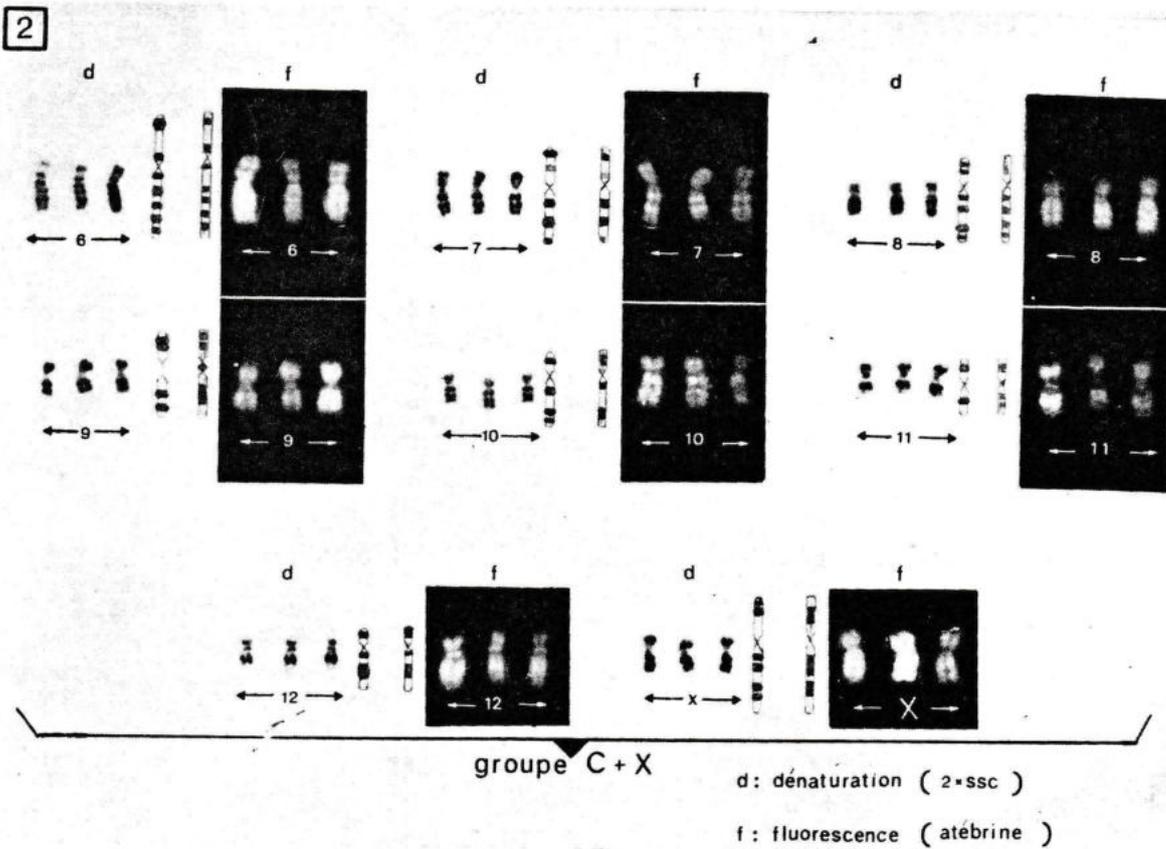
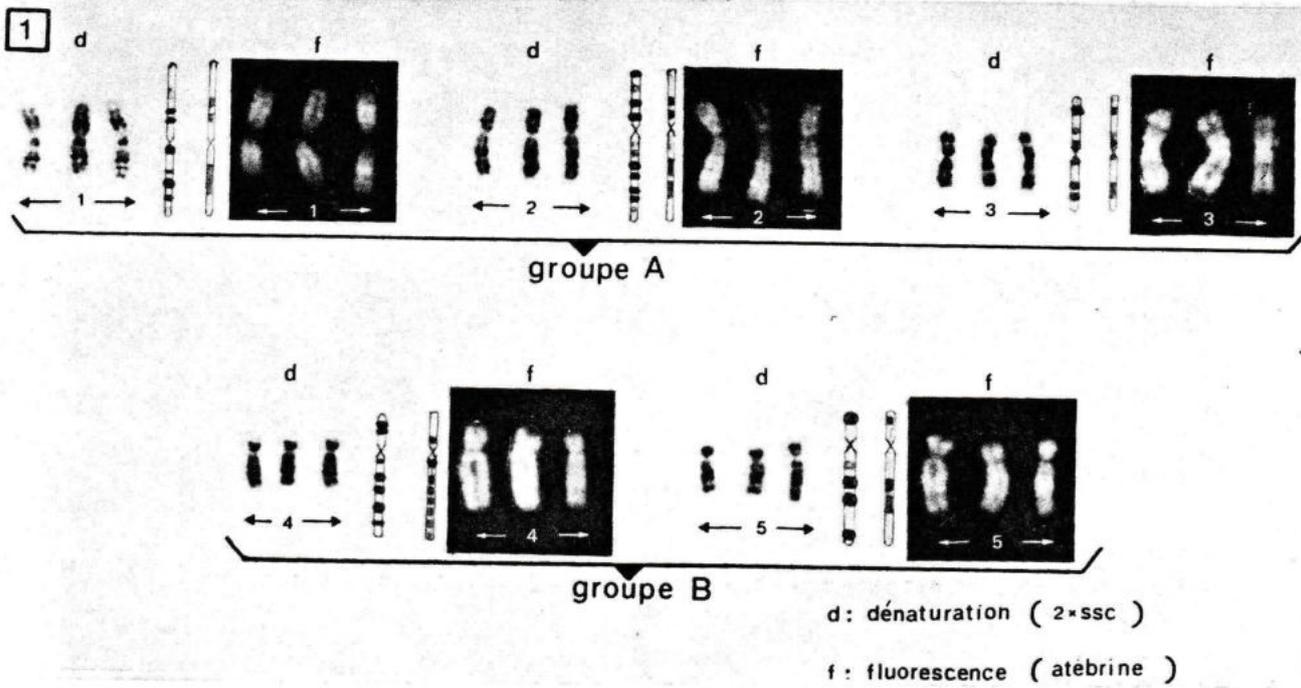


PLANCHE 1

Identification chromosomique par fluorescence et dénaturation dans le 2 × SSC des chromosomes des groupes A et B (fig. 1), C + X (fig. 2). La répartition des bandes QM+ et Giemsa+ est identique.

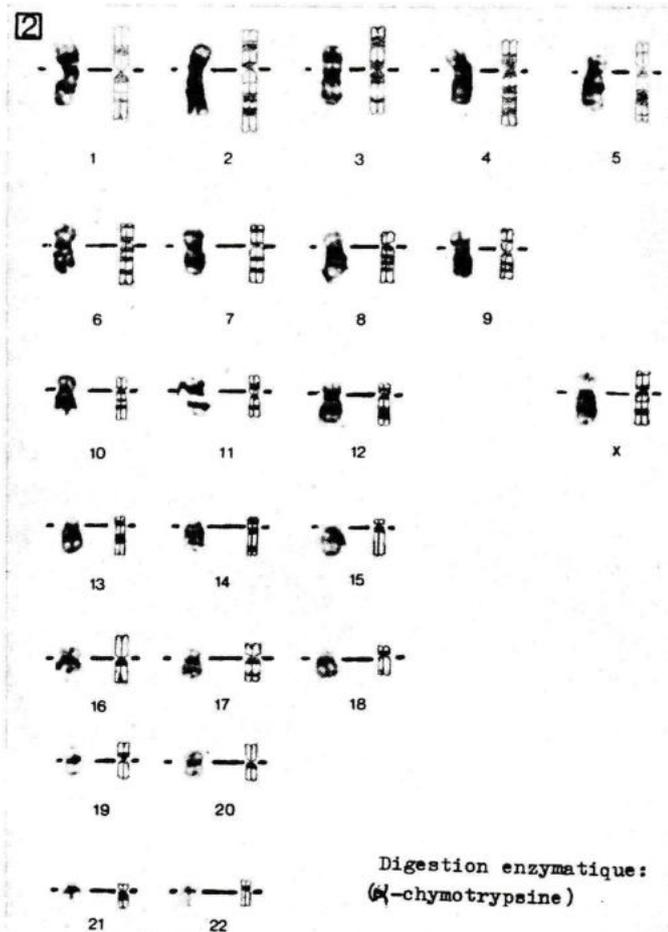
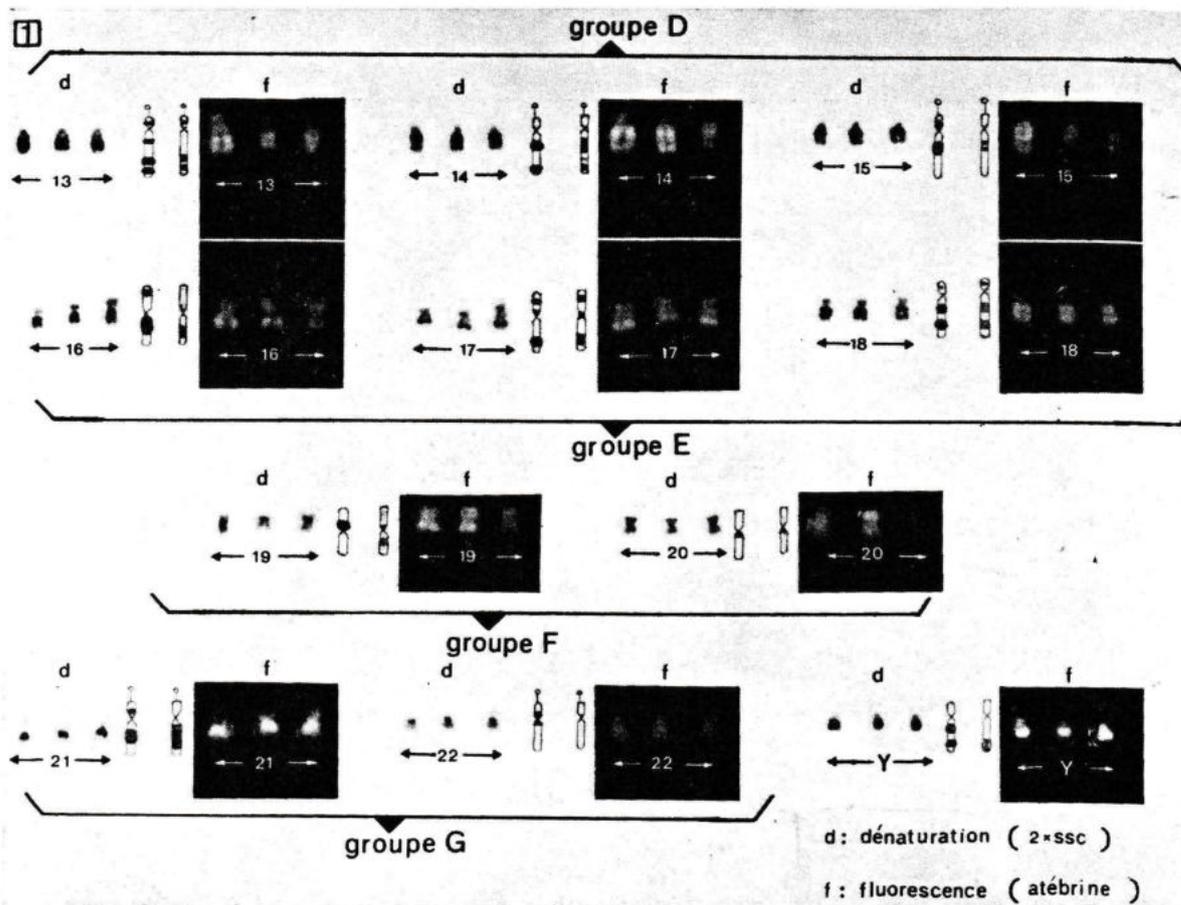


PLANCHE 2

Fig. 1. — Identification chromosomique par fluorescence et dénaturation dans le 2 × SSC des chromosomes des groupes D, E, F, G.
Fig. 2. — Caryotype ordonné d'une cellule 46, XX obtenue après digestion enzymatique ménagée.

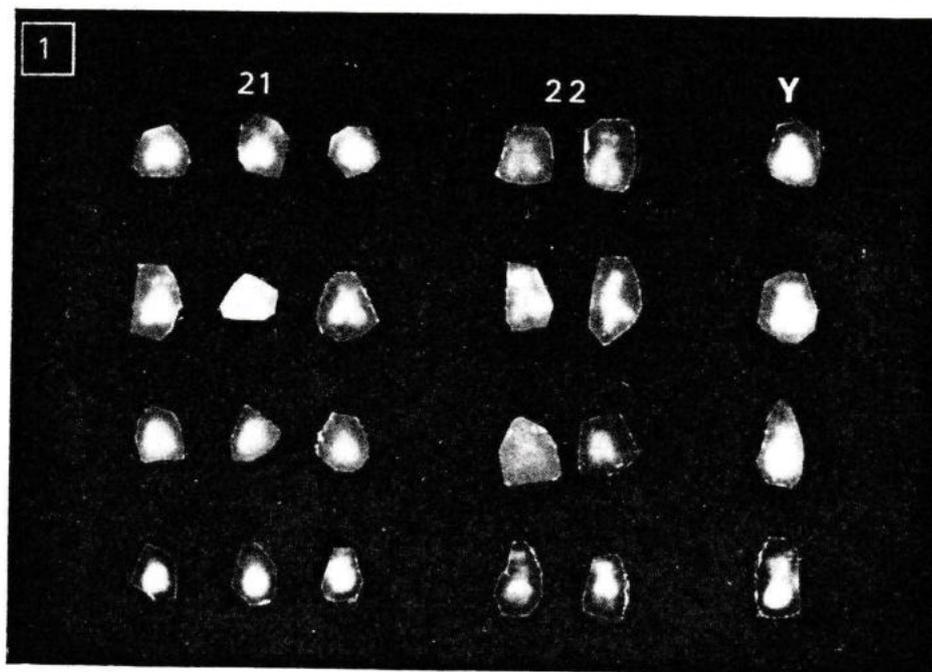


PLANCHE 3

Fig. 1. — Étude comparative de la fluorescence des chromosomes G.
Identification de cellules trisomiques 21.

Fig. 2. — Étude d'une cellule trisomique 21, après dénaturation dans le $2 \times SSC$.

Fig. 3. — Trisomie G identifiée comme trisomie 21
après dénaturation dans le $2 \times SSC$.

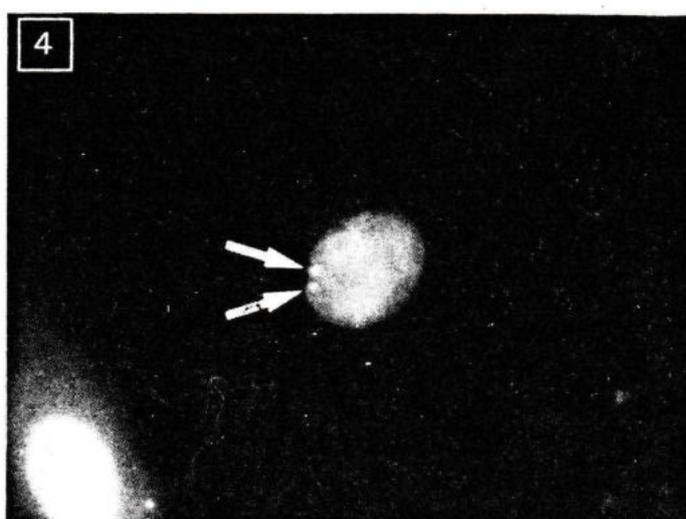
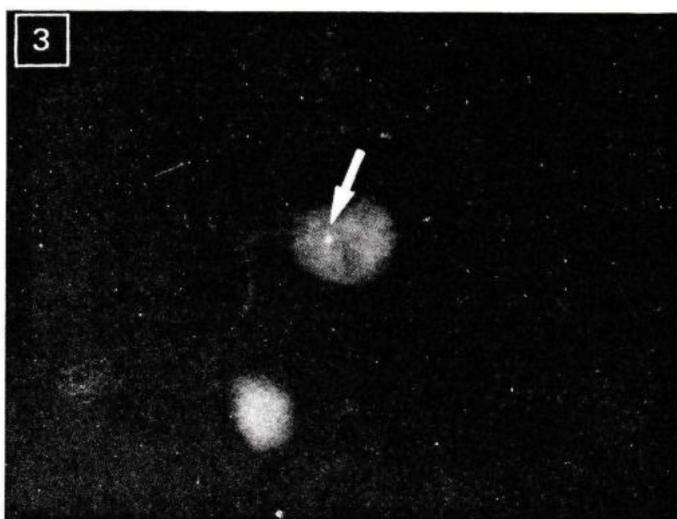
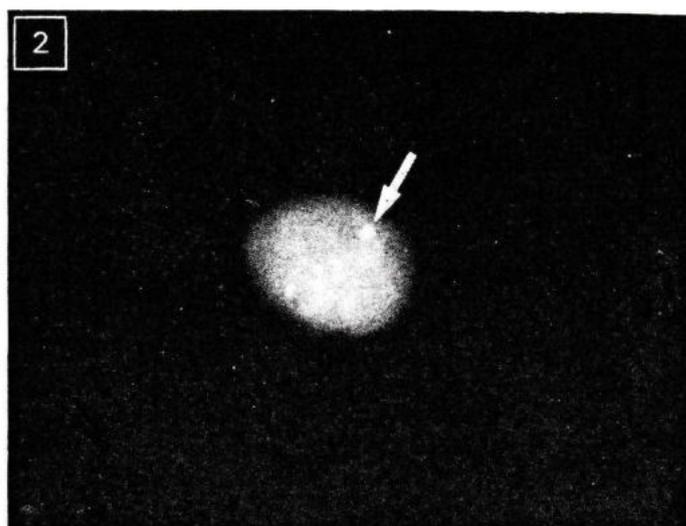
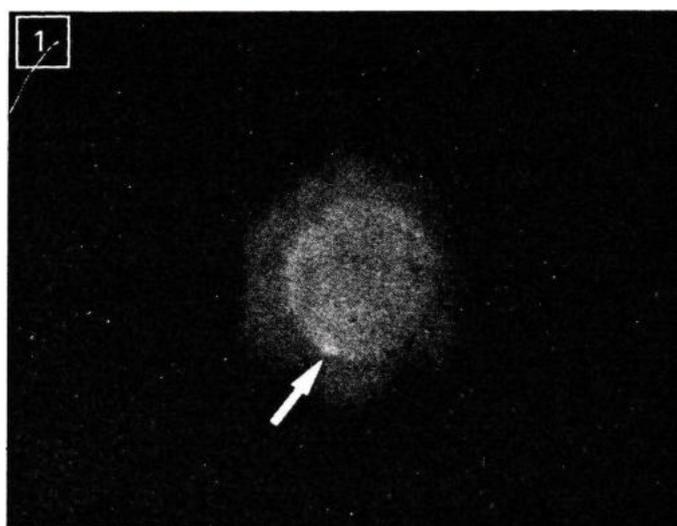


PLANCHE 4

Application des techniques de fluorescence à la recherche de la chromatine sexuelle Y dans des noyaux interphasiques :

Fig. 1. — Chromatine Y obtenue sur un étalement de sang.

Fig. 2. — Corpuscule Y dans une cellule endobuccale.

Fig. 3. — Détermination du sexe fœtal à partir de cellules amniotiques.

Fig. 4. — Présence de 2 corpuscules Y dans une cellule endobuccale.

qu'elles reflètent plus une différence chimique du DNA.

L'obtention de bandes G⁺ et G⁻ montre qu'il existe après dénaturation saline une affinité différentielle au colorant. Le mécanisme intime de formation des bandes reste obscur, bien que le traitement chimique des préparations plaide en faveur d'un processus mettant en évidence différents types de DNA. A partir d'expériences d'hybridation *in situ* chez la souris, PARDUE et

GALL (20) ont localisé un DNA particulier au niveau du centromère. Ce DNA satellite, constitué de séquences polynucléotidiques multiples (DNA répétitif) se réassocie rapidement après dénaturation. Appliquées à l'homme, ces techniques ont permis à ARRIGHI et HSU (1) de conclure à l'existence d'une hétérochromatine centromérique.

Selon SUMMER et coll. (26) l'incubation dans le 2 × SSC permettrait la différenciation d'un DNA non répétitif ; ce dernier

se réassociant plus lentement après dénaturation aurait une affinité moins grande au colorant.

En fait, il n'est pas exclu que les protéines jouent un rôle dans l'apparition des bandes.

Malgré le peu d'information quant à la nature exacte de ces bandes, du point de vue pratique, elles sont d'un grand intérêt étant donné les précisions qu'elles permettent d'apporter pour l'identification des chromosomes.

BIBLIOGRAPHIE

1. ARRIGHI F.-E. et HSU T.-C. — Localization of heterochromatin in Human chromosomes. *Cytogeretis*, 1971, **10**, 81-86.
2. BARLOW P. et VOSA C.-G. — The Y chromosome in Human spermatozoa. *Nature*, 1970, **226**, 961-962.
3. BOBROW M., MADAN K. et PEARSON F.-L. — Staining of some specific regions of Human chromosomes, particularly the secondary constriction of n° 9. *Nature, New Biology*, 1972, **238**, 122-124.
4. CASPERSSON T. — Analysis of chemical differentiations along metaphase chromosomes. *Exp. Cell Res.*, 1969, **58**, 451.
5. CASPERSSON R., GAHRTON G., LINDSTEN J. et ZECH L. — Identification of the philadelphia chromosome as a number 22 by quinacrine mustard fluorescence analysis. *Exp. Cell Res.*, 1970, **63**, 238-240.
6. CASPERSSON T., LINDSTEN J. et ZECH L. — Identification of the abnormal B group chromosome in « the cri du Chat » syndrome by QM fluorescence. *Exp. Cell Res.*, 1970, **61**, 475-476.
7. CASPERSSON T., ZECH L. et JOHANSSON C. — Analysis of the Human chromosome set by aid of DNA binding fluorescent agents. *Exp. Cell Res.*, 1970, **62**, 490-492.
8. CASPERSSON T., ZECH L., JOHANSSON C., LINDSTEN J. et HULTEN M. — Fluorescent staining of heteropycnotic chromosome regions in Human interphase nuclei. *Exp. Cell Res.*, 1970, **61**, 472-476.
9. CONEN P.-E., LEWIN P.-K. et VAKIL D.-V. — Rapid Y chromosome identification in Human blood smears. *C.M.A. Journal*, 1971, **104**, 925-926.
10. DRETS M.-E., SHAW M.-W. — Specific banding patterns of Human chromosomes. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 1971, **68**, 2073-2077.
11. DUTRILLAUX B., DE GROUCHY J., FINAZ C., LEJEUNE J. — Mise en évidence de la structure fine des chromosomes humains par digestion enzymatique (Pronase en particulier). *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 1971, **273**, 587.
12. DUTRILLAUX B., LEJEUNE J. — Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype Humain. *C.R. Acad. Sci. Paris*, t. **272**, p. 2638-2640, 1971.
13. DUTRILLAUX B., LEJEUNE J. — Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype Humain, 4^e Congrès international de Génétique Humaine, Paris, 6-11 sept. 1971.
14. EVANS H.-J., BUCKTON K.-E., SUMMER A.-T. — Cytological mapping of Human chromosomes: results obtained with quinacrine fluorescence and the acetic-saline-giemsa technique. *Chomosome (Berl.)*, 1971, **35**, p. 310-325.
15. FINAZ C., DE GROUCHY J. — Le caryotype Humain après traitement par l' α chymotrypsine. *Annales de génétique*, 1971, vol. **14**, n° 4, p. 309-311.
16. GEORGE K.-P. — Cytochemical differentiation along Human chromosomes. *Nature*, 1970, **226**, p. 80-81.
17. GERMAN J. — Autoradiographic studies of Human chromosomes. I. A review. In proceedings of the third international Congress of Human genetics. Chicago (The Johns Hopkins Press, Baltimore, Edt.), sept. 1966, p. 123-136.
18. DE GROUCHY J., ROUBIN M., PASSAGE E. — Micro-technique pour l'étude des chromosomes Humains à partir d'une culture de leucocytes sanguins. *Ann. Génét.*, 1964, **7**, 45.
19. O'RIORDAN M.-L., ROBINSON J.-A., BUCKTON K.-E., EVANS H.-J. — Distinguishing between the chromosomes involved in Down's syndrome (Trisomy 21) and chronic myeloid leukaemia (Ph¹) by fluorescence. *Nature*, 1971, **230**, n° 5290, 167-168.
20. PARDUE M.-L., GALL J.-G. — Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science*, 1970, **168**, 1356-1358.
21. PATIL S.-R., MERRICK S., LUBS H.-A. — Identification of each Human chromosome with a modified giemsa stain. *Science*, 1971, **173**, 821-822.
22. POLANI P.-E., MUTTON D.-E. — Y Fluorescence of Interphase nuclei, especially circulating lymphocytes. *British medical Journal*, 1971, **1**, 138-142.
23. RIDLER M.-A.-C. — Banding patterns of metaphase chromosomes in down's syndrome. *The lancet* it, 1971, 354-356.
24. SCHNEDL W. — Banding pattern of Human chromosomes. *Nature*, 1971 (Lond.), *New Biol.*, **233**, 93-94.
25. SHIRAISHI Y., YOSIDA T.-H. — Banding pattern analysis of Human chromosomes by use of urea treatment technique. *Chromosoma (Berl.)*, 1972, **37**, 75-83.
26. SUMMER A.-T., EVANS E.-J., BUCKLAND R.-A. — New technique for distinguishing between Human chromosomes. *Nature New Biology*, 1971, **232**, n° 27, p. 31-32.
27. TURPIN R., LEJEUNE J. — Les chromosomes Humains. Gauthier-Villars Édité, 1965, 535 p.
28. WANG H.-C., FEDOROFF S. — Banding in Human chromosomes treated with trypsin. *Nature of New Biology*, 1972, **235**, 52-54.
29. ZECH L. — Investigation of metaphase chromosomes with DNA binding fluorescence. *Exp. Cell Res.*, 1969, **58**, p. 463.