

**Technique d'isolement et de purification
de chromosomes métaphasiques de cellules KB,**

par MARC DEMINATTI, JEAN-LUC LAÏ, XAVIER DESBIENS
et NICOLE JACQUELOOT.

*Laboratoire de Génétique (Directeur M. Deminatti),
Faculté de Médecine, place de Verdun, 59045 Lille Cedex.*

(reçue le 23 mai 1975).

Summary. — Metaphase chromosomes were isolated from KB cells according to Salzman and Mendelsohn's method. Whole-mount electronic microscopic preparations of chromosomes *in situ*, after isolation and after purification showed that the morphological patterns of this material are preserved in spite of physical and chemical treatments (pH 3).

De nombreuses techniques d'isolement de matériel chromosomique ont été mises au point en vue d'analyses biochimiques.

Les premières ont été décrites par Mirsky et Ris (1) en 1947, qui ont extrait des « chromosomes interphasiques » provenant de noyaux de tissus de Vertébrés. Des chromosomes métaphasiques ont été isolés à partir de cellules de Hamster (2 à 9), de cellules Hela (3, 6, 10 à 13), de cellules tumorales de Souris (14, 15), de lymphocytes humains (16).

- (1) Mirsky A. E. & Ris H., *J. Gen. Physiol.*, 1947, 31, 1-6.
- (2) Somers C., Cole A. & Hsu T. C., *Exp. Cell Res.*, 1963, Suppt. 9, 220-234.
- (3) Maio J. J. & Schildkraut C. L., *J. Mol. Biol.*, 1967, 24, 29-39.
- (4) Coory P. M. & Cole A., *Radiations Res.*, 1968, 36, 528-543.
- (5) Mendelsohn J., Moore D. E. & Salzman N. P., *J. Mol. Biol.*, 1968, 32, 101-112.
- (6) Salzman N. P. & Mendelsohn J., *Meth. Cell Physiol.*, 1968, 3, 277-292.
- (7) Maio J. J. & Schildkraut C. L., *J. Mol. Biol.*, 1969, 40, 203-216.
- (8) Wray W. & Stubblefield E., *Exp. Cell Res.*, 1970, 59, 469-478.
- (9) Wray W., Stubblefield E. & Humphrey R., *Nature New Biology*, 1972, 238, 237-238.
- (10) Huberman J. A. & Attardi G., *J. Cell Biol.*, 1966, 31, 95-105.
- (11) Salzman N. P., Moore D. E. & Mendelsohn J., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1966, 56, 1447-1459.
- (12) Huberman J. A. & Attardi G., *J. Mol. Biol.*, 1967, 29, 487-505.
- (13) Burkholder G. D. & Mukherjee B. B., *Exp. Cell Res.*, 1970, 61, 413-422.
- (14) Chorazy M., Bendich A., Borenfreund E. & Hutchison D. J., *J. Cell Biol.*, 1963, 19, 59-69.
- (15) Cantor K. P. & Hearst J. E., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1966, 55, 642-649.
- (16) Schneider E. L. & Salzman N. P., *Science*, 1970, 167, 1141-1143.

Ces techniques d'isolement de chromosomes métaphasiques dérivent de la technique originale de Somers, Coles et Hsu (2) et ont été réalisées à différents pH : pH acide (2, 10, 11, 15, 16), à pH neutre (3, 8, 14) ou à pH basique (4, 9).

Le pH ainsi que la présence d'ions bivalents (Mg, Ca) influent sur la conservation et la structure des chromosomes obtenus (17).

Dans ce travail, nous rapportons les résultats d'isolement et de purification de chromosomes métaphasiques selon la technique de Salzman et Mendelsohn (6) que nous avons adaptée à des cellules KB. Les chromosomes ainsi obtenus présentent une morphologie comparable à celle des chromosomes *in situ* attestant la conservation de l'intégrité structurale de cet organe cellulaire par la technique d'isolement utilisée.

Technique d'isolement. — Nous utilisons des cultures de cellules KB en suspension (18) (souche KB 3 Green) (*). De la colchicine (colchicines Houdé) est ajoutée à raison de 0,1 microgramme par ml de culture cellulaire, 15 heures avant l'arrêt de la culture. Chaque litre de suspension cellulaire contient environ 2×10^8 cellules.

Ces cellules subissent plusieurs lavages dans le milieu de culture dépourvu de sérum. Les cellules lysées, les protéines solubles et autre matériel contaminant sont ainsi éliminés.

Les cellules sont placées dans le milieu hypotonique de Salzman et Mendelsohn (6).

Après centrifugation à 850 tours/mn pendant 10 mn, (centrifugeuse Jouan K 95), les cellules sont homogénéisées (appareil Dounce) dans le milieu à pH 2,1 de Salzman et Mendelsohn (6). A la fin de l'homogénéisation, on obtient un mélange de chromosomes, de noyaux interphasiques et de débris cytoplasmiques.

L'élimination des noyaux interphasiques peut s'effectuer en passant l'homogénéat sur des filtres métalliques de porosités variables allant de 2 à 10 microns (filtres Poral : Ugin Carbone), mais ces filtres retiennent en plus des noyaux, une partie des chromosomes, ce qui entraîne une diminution du rendement de la technique. Nous préférons la centrifugation de l'homogénéat (1000 tours/mn pendant 10 mn). Les chromosomes ainsi que des débris cellulaires restent dans le surnageant et

(17) Hearst J. E. & Botchan M., *Ann. Rev. Biochemistry*, 1970, 39, 151-182.

(18) Mc Limans W. F., Davis E. V., Glover F. L. & Rake G. W., *J. Immunol.*, 1957, 79, 428-433

(*) Nous remercions M. C. Lagrou de l'Unité de Virologie (Professeur J. Samaille) qui nous a fourni la souche cellulaire.

PLANCHE I.

FIG. 1. — Chromosomes métaphasiques de cellules KB après élimination des noyaux. ($\times 535$).

FIG. 2. — Chromosomes métaphasiques dans une cellule KB après le choc hypotonique. On observe la présence d'un réseau interchromosomique très dense ainsi que des « bandes » sur une des chromatides (flèches noires). Le centromère est constitué de fibres inter et intrachromatidiennes (flèches blanches). ($\times 13170$).

FIG. 3. — Chromosome *in situ* étiré montrant des fibres transversales entre les deux chromatides. ($\times 23940$).

FIG. 4. — Chromosome *in situ* étiré montrant des « bandes » identiques sur les chromatides sœurs. ($\times 34680$).

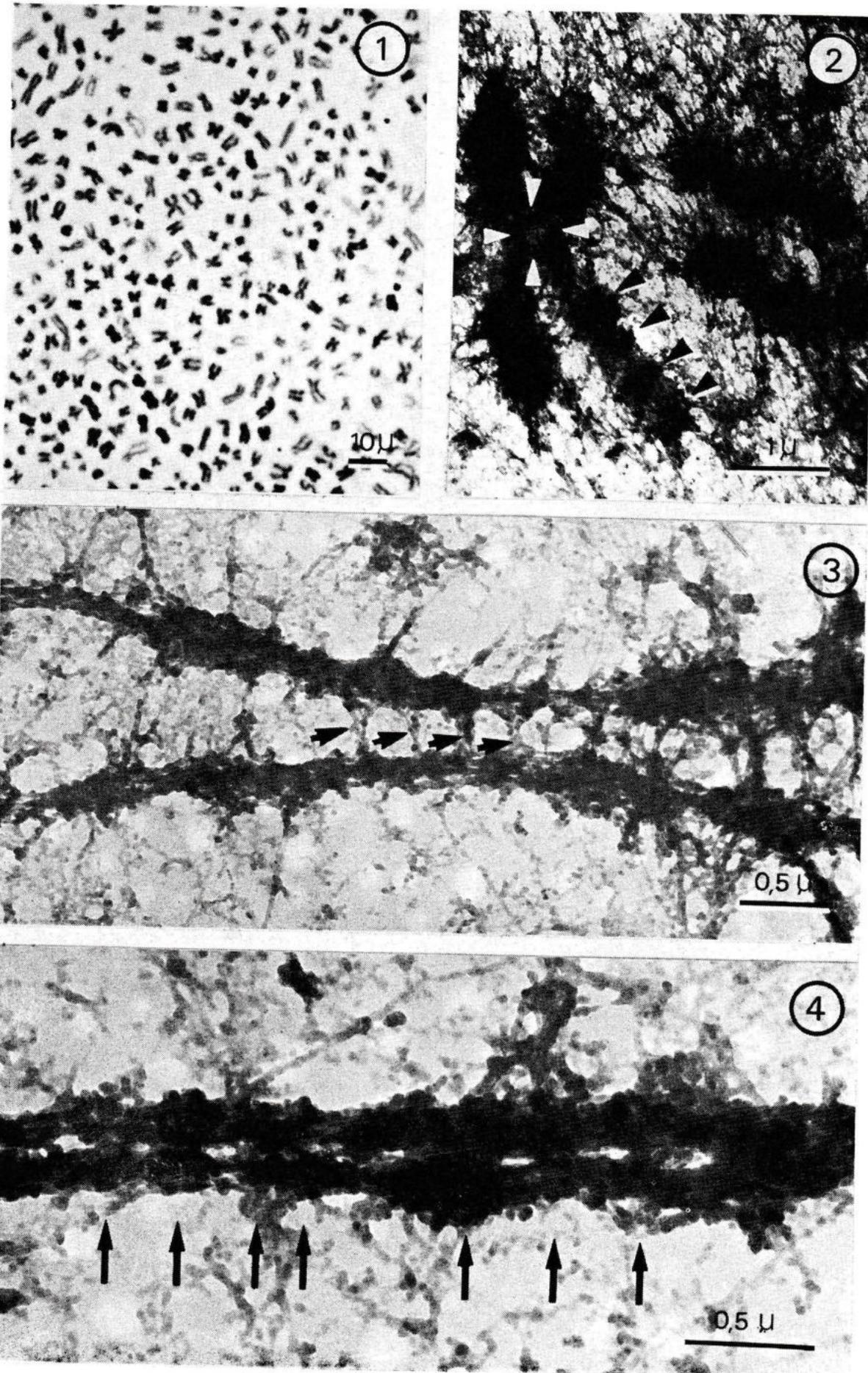


PLANCHE II.

FIG. 5. — Détails d'une cellule KB après le choc hypotonique : ch : chromosome ; flèche a : structure annulaire dans le réseau interchromosomique ; flèche b : structure globuleuse dans le réseau interchromosomique. ($\times 19900$).

FIG. 6. — Cellule KB après le choc hypotonique ; flèche a : réseau de fibres du type interchromosomique de 200 Å de diamètre ; flèche b : fibre spiralée de 420 Å de diamètre ; flèche c : fibre spiralée de 800 Å de diamètre. ($\times 17480$).

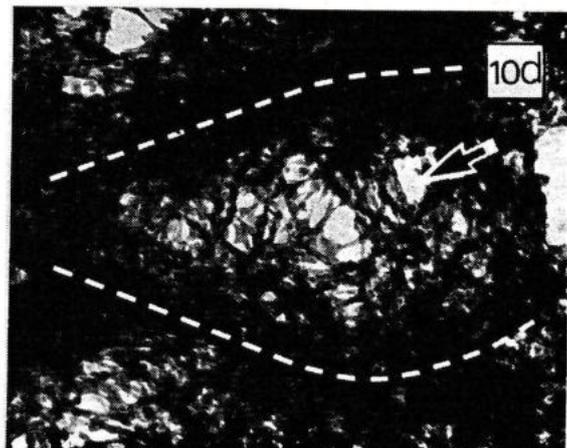
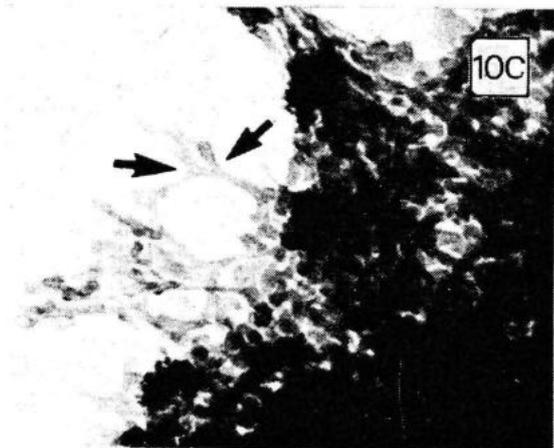
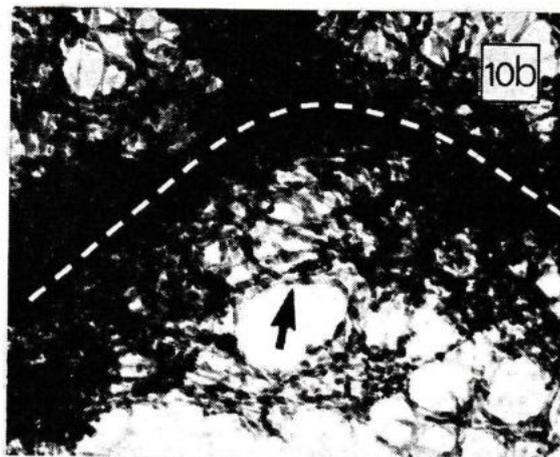
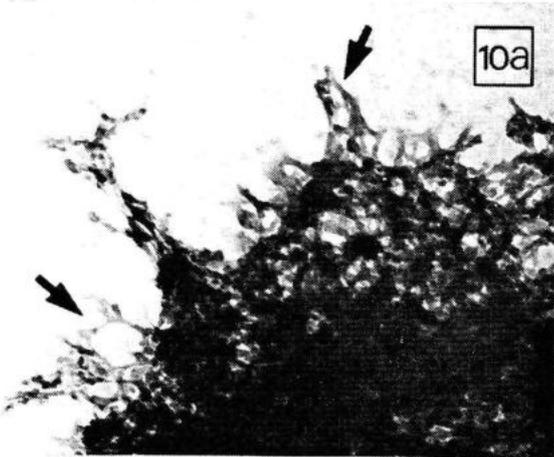
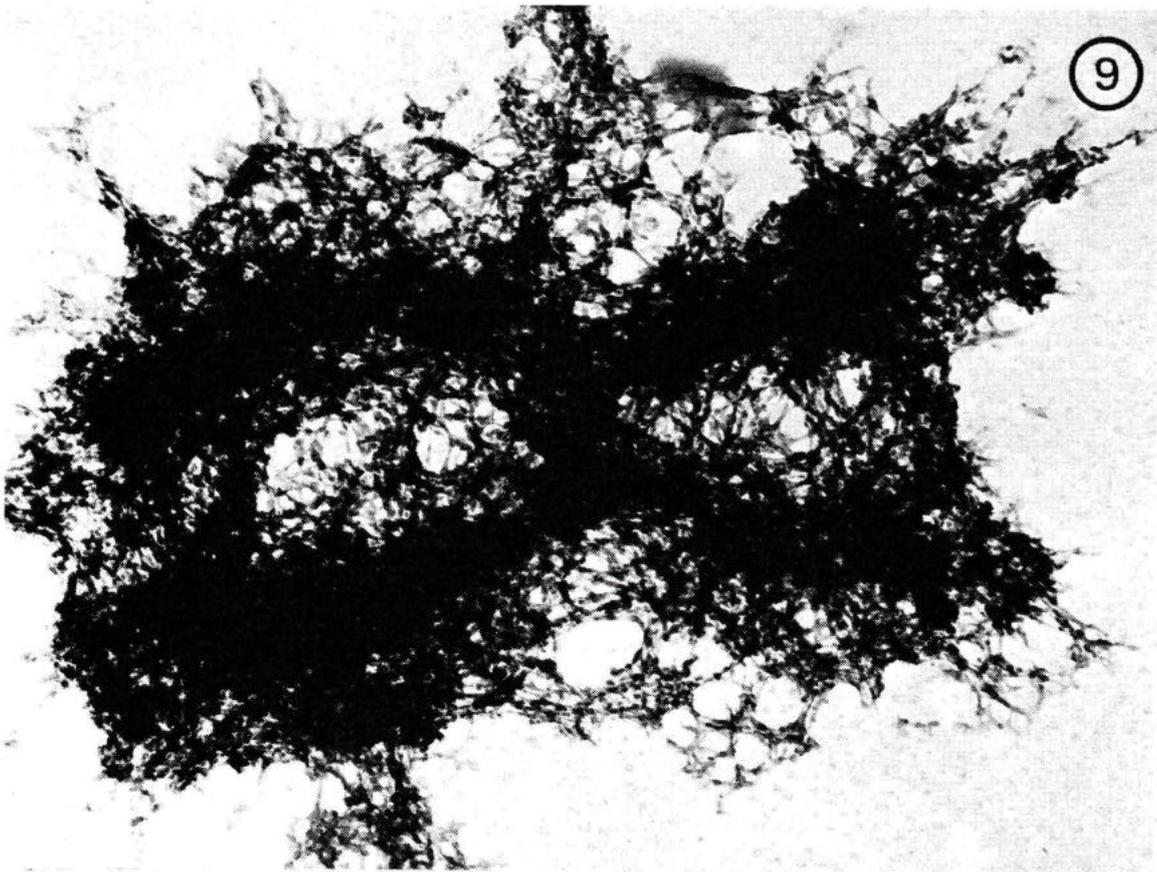
FIG. 7. — Chromosomes métaphasiques de cellule KB après l'homogénéisation. Le réseau interchromosomique est fragmenté, mais on note la persistance de ponts fibrillaires rectilignes entre les chromosomes. ($\times 13320$).

FIG. 8. — Chromosomes métaphasiques isolés et purifiés. Il reste des ponts fibrillaires rectilignes entre deux chromosomes voisins. ($\times 22680$).

PLANCHE III.

FIG. 9. — Chromosome métaphasique isolé et purifié : l'axe chromatidien est très opaque aux électrons par rapport aux zones périphérique et interchromatidienne. ($\times 30550$).

FIG. 10. — Détails de la périphérie du chromosome de la fig. 9. Fig. 10 a : certaines fibres forment des boucles pour retourner vers l'axe chromatidien. ($\times 37660$). Fig. 10 b : d'autres fibres sont parallèles à l'axe chromatidien. ($\times 38600$). Fig. 10 c : en certains endroits, ces fibres se ramifient. ($\times 72300$). Fig. 10 d : on distingue également des fibres interchromatidiennes perpendiculaires aux axes chromatidiens. ($\times 38600$).



sont récupérés par centrifugation à 2500 tours/mn pendant 1 heure 30 mn (centrifugeuse Jouan K 95). Le culot est lavé plusieurs fois dans une solution tampon à pH 3 (6).

La purification des chromosomes est assurée par une centrifugation à 50 000 *g* pendant une heure (Spinco rotor SW 27), à travers une solution de saccharose 2,2 M dans le tampon pH 3. Le culot de chromosomes purifiés subit un dernier lavage dans la solution tampon de pH 3 à 4°C afin d'éliminer l'excès de saccharose 2,2 M (2500 tours/mn pendant 1 heure 30 mn). Les chromosomes sont conservés à 4°C dans la même solution tampon de pH 3 (6).

Techniques d'étude morphologique et Résultats. — A chaque étape de l'isolement nous avons pratiqué des contrôles microscopiques.

1. MICROSCOPIE OPTIQUE. — Nos contrôles ont porté sur la comparaison entre l'aspect des chromosomes en contraste de phase avant et après fixation, et leur aspect après fixation et coloration au Giemsa R.

Après le choc hypotonique, les préparations montrent des chromosomes métaphasiques dispersés dans le cytoplasme.

Après homogénéisation des cellules, les chromosomes libérés dans le milieu subissent un gonflement. Sur des lames séchées à l'air, les chromatides ne sont plus boursoufflés comme précédemment. Après séchage et fixation (alcool méthylique-acide acétique 3/1), la coloration montre la conformité des structures chromosomiques avec celle des chromosomes de cellules entières avant l'homogénéisation. Par ailleurs, il faut noter la présence de fragments acentriques.

Après élimination des noyaux et conservation dans la solution tampon de pH 3 à 4°C, la morphologie des chromosomes n'est pas modifiée (même après un séjour prolongé d'un mois dans cette solution) (Pl. I, fig. 1).

Ces contrôles nous conduisent à admettre que la majorité des chromosomes métaphasiques reste intacte au cours de l'isolement.

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

La suspension est déposée sur des grilles recouvertes d'une membrane de formvar. Les grilles déshydratées dans des bains d'alcool éthylique de degré croissant puis dans un bain d'acétate d'amyle sont séchées à l'air avant d'être observées au microscope électronique (Zeiss EM 9) (**). Nous n'utilisons pas le dispositif d'Anderson (19) pour parfaire la déshydratation. Les observations et photographies ont été réalisées sans coloration préalable des grilles.

a. *Examen de cellules entières dans le milieu hypotonique.* — Les noyaux des cellules interphasiques ont l'aspect de masses arrondies et uniformément opaques aux électrons ; de ces noyaux partent des

(**) Nous remercions M^{me} F. Puvion de l'Institut de Recherche sur le Cancer de Lille (Professeur G. Biserte) pour son aide et ses conseils.

(19) Anderson T. F., *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, 1951, 13, II, 130-134

fibres formant un réseau à mailles lâches analogue au réseau interchromosomique que nous décrivons plus loin.

Dans les cellules métaphasiques, on retrouve les structures chromosomiques formées de deux chromatides, chacune étant constituée d'une zone axiale dense aux électrons et d'une zone périphérique formée d'un réseau fibrillaire de densité variable en continuité avec la partie interne (Pl. I, fig. 2). Les fibres chromosomiques périphériques ne montrent pas d'organisation précise. Leur diamètre est compris entre 180 et 230 Å. Mais il existe des portions plus minces et d'autres plus épaisses. Elles se chevauchent et il est difficile de définir une direction préférentielle pour ces fibres. Cependant, dans les régions interchromatidiennes, certaines fibres réunissent transversalement les deux chromatides d'un même bras chromosomique (Pl. I, fig. 3). De même, au niveau du centromère, transitent des fibres inter et intrachromatidiennes (Pl. I, fig. 2, flèches blanches). Les chromatides, dans certains cas, sont étirés et montrent alors des portions denses arrondies reliées entre elles par des ponts fibrillaires plus étroits (Pl. I, fig. 2, flèches noires). Quand l'étirement affecte les deux chromatides du chromosome, on note une similitude de la répartition de ces « bandes » rappelant celles observées en microscopie optique après action d'agents divers (bandes Q, C, R ou G) (Pl. I, fig. 4).

Qu'ils soient étirés ou contractés, les chromosomes sont noyés dans un système complexe de fibres en continuité avec le réseau périphérique de chaque chromatide. En certains endroits, ce réseau interchromosomique semble converger en structures globuleuses, de forte densité aux électrons (Pl. II, fig. 5, flèche b). Ailleurs, c'est sous forme de structure annulaire d'environ 1000 Å de diamètre extérieur que nous le retrouvons (Pl. II, fig. 5, flèche a).

Nous avons aussi rencontré de rares formations ayant l'aspect d'un réseau isolé de grosses fibres semblant constituées de sphérules plus ou moins fusionnées et dont le diamètre varie du simple au double selon la portion du réseau considérée (jusqu'à 800 Å) (Pl. II, fig. 6). Dans ces formations coexistent quelques fibres minces analogues à celles observées à la périphérie des chromosomes.

b. *Examen de chromosomes après élimination des noyaux.* — Les chromosomes et le réseau fibrillaire interchromatidien présentent les mêmes caractéristiques que dans les cellules entières. Toutefois, on ne rencontre que des chromosomes contractés, soit isolés, soit regroupés : dans ce cas, on note la présence de ponts fibrillaires interchromosomiques (Pl. II, fig. 7).

Le réseau fibrillaire interchromosomique observé dans les cellules entières a été fragmenté et apparaît dispersé (Pl. II, fig. 7). Nous avons retrouvé les grosses fibres signalées antérieurement.

c. *Examen de chromosomes purifiés.* — Dans ces préparations, les chromosomes sont isolés ou le plus souvent regroupés et présentent les mêmes caractéristiques que ceux décrits dans le paragraphe précédent : ils sont contractés et on retrouve une zone axiale très compacte, ainsi qu'une zone périphérique formée de fibres enchevêtrées (Pl. III, fig. 9).

Par contre, le réseau fibrillaire interchromosomique observé dans les préparations précédentes a disparu. On observe des fibres formant des faisceaux rectilignes entre les chromosomes regroupés (Pl. II, fig. 8). La disparition quasi totale du réseau interchromosomique permet d'examiner plus en détail la périphérie des chromosomes. Certaines fibres marginales (180 à 230 Å) forment des boucles pour revenir vers la zone axiale du bras chromosomique (Pl. III, fig. 10a), d'autres longent l'axe chromatidien (Pl. III, fig. 10b), d'autres enfin semblent se diviser en deux branches distinctes (Pl. III, fig. 10c). Entre les chromatides d'un même chromosome persistent les fibres interchromatidiennes (Pl. III, fig. 10d).

D'autre part, la purification n'élimine pas des préparations les grosses fibres que nous retrouvons, soit isolées, soit en continuité avec des chromosomes.

Conclusions. — Les images que nous avons obtenues dans nos préparations montrent des aspects déjà décrits par les auteurs qui ont employé l'étalement du matériel cellulaire sur cuve de Langmuir (20 à 32).

En effet, le chromosome dans les cellules entières apparaît formé d'un réseau de fibres très serrées dans la partie axiale de ses chromatides. Ce réseau se relâche en périphérie et semble connecté à une trame interchromosomique dont certains points s'organisent en structures annulaires que Comings et Okada (33), Lambert (31) assimilent à des pores nucléaires (Pl. II, fig. 5).

Quant aux fibres chromosomiques périphériques (180 à 230 Å), leurs portions minces pourraient correspondre à des zones d'étirement et leurs portions épaisses à des repliements. Mais il est possible que les variations de leur diamètre moyen correspondent à la présence ou à l'absence d'un arrangement spacial d'une ou de plusieurs sous-unités fibrillaires [Abuelo et Moore (26), Ris (34)]. La présence de grosses fibres déjà signalées et montrées par Bastia (35) serait en faveur d'une telle hypothèse : elle confirmerait la possibilité pour les molécules de nucléoprotéines de s'organiser en spires de plusieurs ordres [Bahr (28), Wolfe et Grim (24), Bastia (35)].

- (20) Gall J. G., *Science*, 1963, 139, 120-121.
- (21) Dupraw E. J., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1965, 53, 161-168.
- (22) Wolfe S. L., *J. Ultrastruct. Res.*, 1965, 12, 104-112.
- (23) Barnicot N. A., *J. Cell Biol.*, 1967, 32, 585-603.
- (24) Wolfe S. L. & Grim J. N., *J. Ultrastruct. Res.*, 1967, 19, 382-397.
- (25) Wolfe S. L. & Martin P. G., *Exp. Cell Res.*, 1968, 50, 140-150.
- (26) Abuelo J. G. & Moore D. E., *J. Cell Biol.*, 1969, 41, 73-90.
- (27) Dupraw E. J. & Bahr G. F., *Acta Cytol.*, 1969, 13, 188-205.
- (28) Bahr G. F., *Exp. Cell Res.*, 1970, 62, 39-49.
- (29) Lampert F. & Lampert P., *Humangenetik*, 1970, 11, 9-17.
- (30) Lampert F., *Nature*, 1971, 234, 187-188.
- (31) Lamter F., *Humangenetik*, 1971, 13, 285-295.
- (32) Mouriquand C., Gilly C. & Wolff C., *Ann. Génét.*, 1972, 15, 249-256.
- (33) Comings D. E. & Okada T. A., *Exp. Cell Res.*, 1970, 63, 62-68.
- (34) Ris H., *The molecular organization of chromosomes, Handbook of Molecular cytology* (Lima de Faria), 1969, 15, 221-250.
- (35) Bastia D. & Swaminathan M. S., *Exp. Cell Res.*, 1967, 48, 18-26.

De cette étude il ressort que les chromosomes résistent aux manipulations de l'isolement ainsi qu'aux tensions superficielles de la déshydratation classique. Mais il n'en est pas de même pour le réseau interchromosomique observé dans les cellules entières qui se fragmente et est éliminé pendant la purification des chromosomes. La désagrégation de ce réseau interchromosomique associée à la conservation de la structure du chromosome nous conduit à envisager une différence de nature entre ces deux constituants (31).

De l'étude comparative en microscopie électronique de chromosomes métaphasiques *in situ* et de chromosomes isolés, nous pouvons conclure que la structure des chromosomes métaphasiques n'est pas affectée par la méthode d'isolement utilisée.

Ce travail montre donc qu'il est possible de disposer de chromosomes métaphasiques en quantité suffisante, avec conservation de leur intégrité morphologique. Ces deux conditions permettent d'envisager d'autres recherches sur cet organite cellulaire qui correspond à un état particulier du matériel nucléaire.

Résumé. — Des chromosomes métaphasiques ont été isolés à partir de cellules KB selon la technique de Salzman et Mendelsohn. Une étude ultrastructurale des chromosomes *in situ*, après leur isolement et après leur purification ne montre pas d'altération morphologique de ces organites cellulaires.
