

ÉTUDE CYTOLOGIQUE COMPARÉE DES CHROMOSOMES MÉTAPHASIQUES *IN SITU* ET ISOLÉS A PARTIR DE CELLULES KB, APRÈS INCORPORATION DE 5-BROMODEOXY-URIDINE (5-BrdU)

M. DEMINATTI, J.-B. SAVARY, J.-L. LAÏ

Avec la collaboration technique de Mme N. LE COCQ-JACQUELOOT.

Laboratoire de Cytogénétique (Directeur : Professeur M. Deminatti), Faculté de Médecine, 1, place de Verdun, 59045 Lille Cedex (France).

INTRODUCTION

De nombreux travaux mettent en évidence l'incorporation de 5-BrdU dans les chaînes d'ADN chromosomique, et les perturbations ainsi occasionnées [5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16].

Dans ce travail, disposant d'une technique d'isolement et de purification de chromosomes métaphasiques [2], nous avons cherché à vérifier si, après incorporation de 5-BrdU, les manipulations d'isolement modifiaient ou non les caractéristiques morphologiques et cytologiques décrites au niveau des chromosomes métaphasiques *in situ*. Par ailleurs, nous avons étudié l'incidence du précurseur sur l'ultrastructure du chromosome de cellule KB.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1) Cultures cellulaires et incorporation de 5-BrdU.

La 5-BrdU est introduite dans le milieu de culture de cellules KB (souche KB 3 green) pendant 72 h à la dose de 10 µg/ml. De la colchicine (1,5 µg/ml) est ajoutée au milieu 5 h avant l'arrêt des cultures.

2) Préparations chromosomiques.

Les chromosomes métaphasiques *in situ* et isolés sont obtenus selon le protocole technique exposé antérieurement [2].

3) Techniques de coloration.

Les préparations de chromosomes métaphasiques *in situ* et isolés sont colorées soit par le Giemsa et observées en microscopie optique, soit par l'acridine-orange et observées en lumière UV selon la technique de Couturier et coll. [1]. Afin de visualiser les caractéristiques cytologiques induites par l'incorporation de 5-BrdU pendant 72 h les lames sont traitées selon la technique de Korenberg et Freedlender [10] puis colorées au Giemsa.

4) Etude ultrastructurale.

L'étude ultrastructurale de ce matériel chromosomique est réalisée conformément aux modalités techniques décrites antérieurement [3]. Les chromosomes sont observés sans coloration préalable (microscope Hitachi HU II E).

DEMINATTI M., SAVARY J.-B., LAÏ J.-L. (1976). — Etude cytologique comparée des chromosomes métaphasiques *in situ* et isolés à partir de cellules KB, après incorporation de 5-bromodeoxy-uridine (5-BrdU). *Ann. Génét.*, 19, n° 2, 91-94.

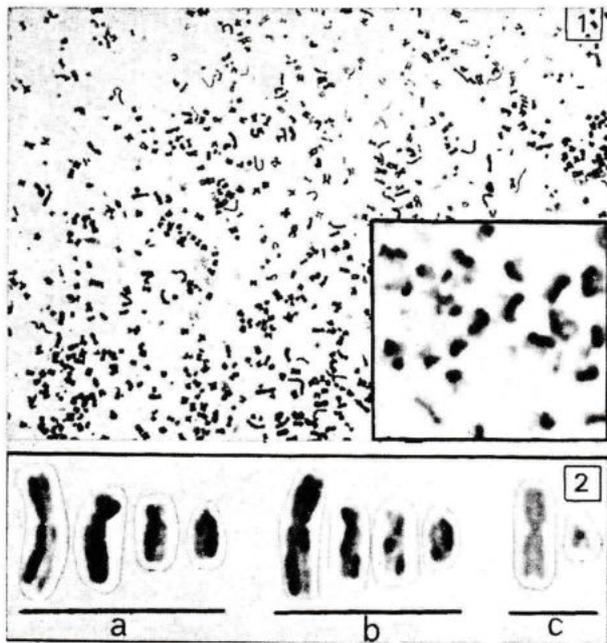


Fig. 1. — Chromosomes métaphasiques *isolés* de cellules KB ayant incorporé la 5 BrdU pendant 72 h. Coloration au Giemsa.

Fig. 2. — Principaux types de chromosomes observés après incorporation de 5-BrdU pendant 72 h et coloration au Giemsa :

- a) Mise en évidence de l'affinité tinctoriale différentielle entre les chromatides d'un même chromosome. La chromatide dont l'ADN contient de la BrdU apparaît pâle et plus longue que la chromatide dont l'ADN n'est pas substitué.
- b) Mise en évidence d'échanges de portions chromosomiques entre chromatides sœurs.
- c) Chromosomes qui ont une faible affinité pour le Giemsa. Leurs deux chromatides contiennent un ADN dans lequel la thymidine est remplacée par la BrdU.

RÉSULTATS

1) Morphologie des chromosomes après incorporation de BrdU.

Nos observations de chromosomes métaphasiques *in situ* ou *isolés* obtenus à partir de cellules KB ayant incorporé la 5-BrdU pendant 72 h, sont comparables à celles des autres auteurs. En effet, les périodes d'incorporation du précurseur, utilisées dans ce travail, mettent en évidence les affinités différentielles des chromatides d'un même chromosome après coloration par le Giemsa (fig. 1 et 2a), ou par l'acridine-orange (fig. 3 et 4).

Des échanges de portions chromosomiques entre chromatides sœurs sont mis en évidence (fig. 2b). D'autres chromosomes n'ont qu'une faible affinité aux colorants et apparaissent uniformément pâles (fig. 2c) ou peu fluorescents. Des différences de taille sont également observées au niveau des chromatides sœurs, la chromatide fortement colorée apparaissant plus courte.

2) Aspect des chromosomes ayant incorporé la 5-BrdU, puis traités pour l'observation des bandes G ou Q.

L'incorporation de 5-bromodeoxyuridine ne perturbe pas l'apparition des bandes G sur les chromosomes métaphasiques *in situ* ou *isolés* ayant incorporé la 5-BrdU (fig. 5 et 6). Il existe des chromosomes qui apparaissent plus pâles. D'autres présentent une chromatide plus sombre que l'autre. On retrouve néanmoins dans les deux cas, un marquage de type G sur les deux chromatides.

De même, après coloration par la moutarde de quinacrine, il existe une analogie de nombre et de répartition des bandes Q entre les chromosomes *in situ* ou *isolés* témoins, et les chromosomes ayant incorporé la 5-BrdU (fig. 7 et 8).

3) Etude ultrastructurale.

Nous avons décrit antérieurement [3] l'aspect en microscopie électronique des chromosomes métaphasiques *in situ*, *isolés* et *purifiés*. Cet aspect n'est pas modifié par l'incorporation de 5-BrdU pendant 72 h (fig. 9).

Si, dans certains cas, les chromatides sœurs sont symétriques, quelques chromosomes présentent un allongement de l'une d'entre elles, mais cette der-

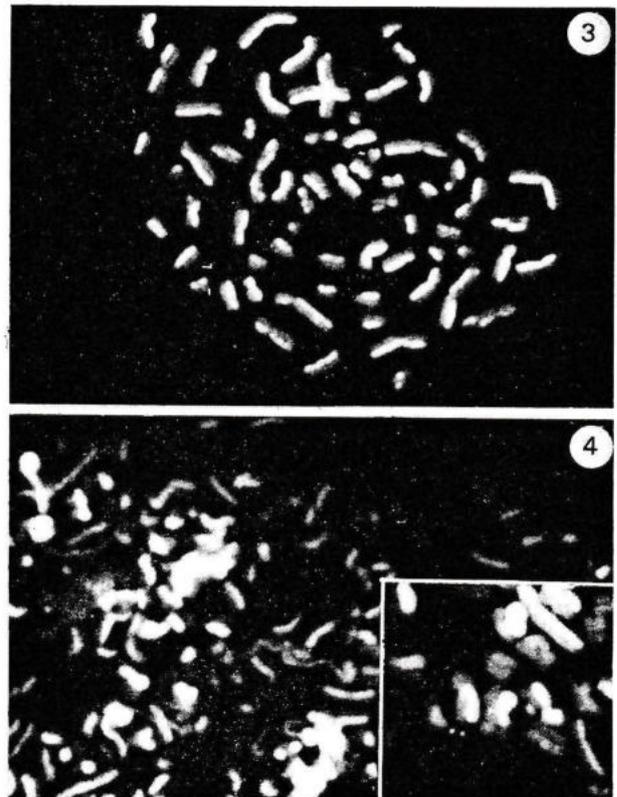


Fig. 3-4. — Les différents aspects observés après coloration au Giemsa sont retrouvés après coloration par l'acridine-orange.

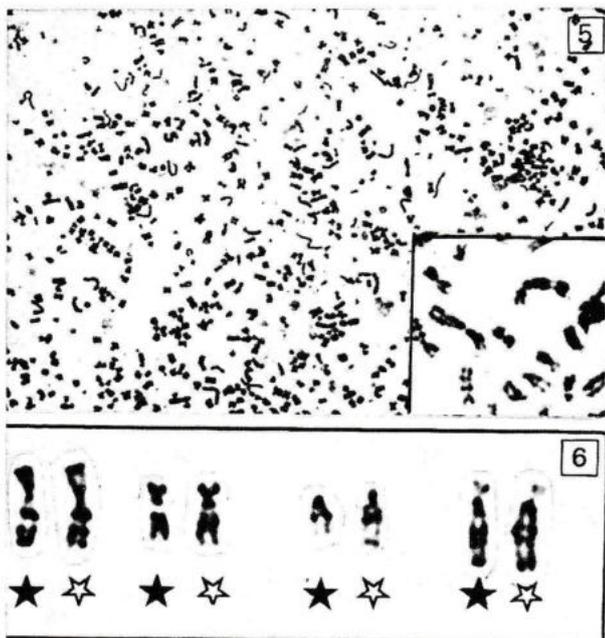


Fig. 5. — Chromosomes métaphasiques *isolés* de cellules KB après incorporation de 5-BrdU pendant 72 h puis traités pour l'observation des bandes « G ».

Fig. 6. — Comparaison des bandes « G » obtenues, avant et après incorporation de 5-BrdU. Le nombre et la répartition des bandes sont identiques sur les chromosomes témoins (★) et sur les chromosomes qui ont incorporé la BrdU (☆).

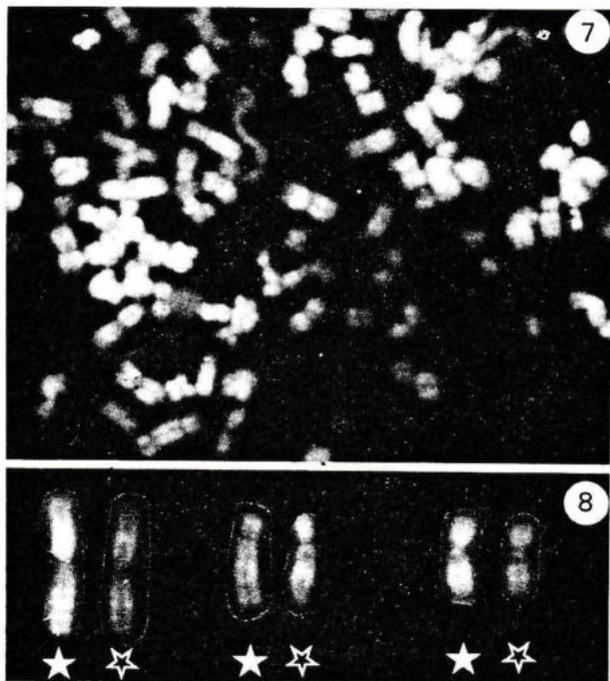


Fig. 7. — L'incorporation de 5-BrdU ne modifie pas l'apparition des bandes « Q » au niveau des chromosomes métaphasiques *isolés*.

Fig. 8. — Comparaison des bandes « Q » obtenues avant et après incorporation de 5-BrdU. Il existe une identité de nombre et de répartition des bandes « Q » entre les chromosomes témoins (★) et les chromosomes qui ont incorporé la BrdU (☆).

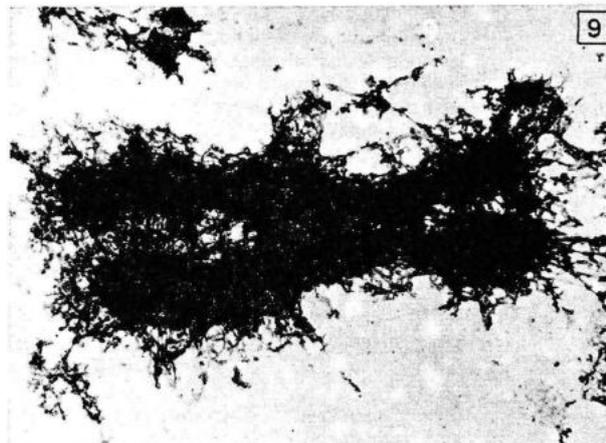


Fig. 9. — Après incorporation de BrdU, les caractéristiques ultrastructurales du chromosome métaphasique *in situ* et *isolé* sont retrouvées. Le chromosome métaphasique *in situ* est constitué de deux chromatides opaques aux électrons et réunies par un réseau interchromatidien formé de fibres perpendiculaires à l'axe du chromosome. Après incorporation de BrdU, quelques chromosomes *isolés* sont constitués de deux chromatides de taille différente, mais elles restent toutes deux aussi denses aux électrons.

nière reste aussi dense aux électrons que sa voisine (fig. 9). La comparaison des diamètres respectifs des fibres marginales de ces chromatides sœurs ne révèle pas de différence tangible. Aucune structure particulière ne laisse supposer l'existence de cassure et d'échanges entre chromatides.

DISCUSSION

Dans ce travail, les variations morphologiques et cytologiques induites par l'incorporation de 5-bromodeoxyuridine sont retrouvées au niveau de chromosomes métaphasiques *in situ* et *isolés*, obtenus à partir de cellules KB. En effet, il existe une affinité tinctoriale différente entre les chromatides d'un même chromosome, des variations de taille entre chromatides sœurs sont mises en évidence ainsi que des échanges de portions chromosomiques.

L'unité fibrillaire chromosomique, visible en microscopie électronique, est semblable avant et après incorporation de 5-BrdU bien que l'affinité tinctoriale du chromosome visible en microscopie optique soit considérablement perturbée. Geneix et coll. [7], après incorporation de 5-BrdU dans des cultures de lymphocytes 9 h avant la fixation, décrivent des fibres chromosomiques filamenteuses, phénomène provoqué par une altération probable des nucléoprotéines chromosomiques. Par ailleurs, ces auteurs signalent une redistribution de masse provoquée par la 5-BrdU et qui affecte la morphologie du chromosome. Sur nos préparations, aucune modification ne peut être imputée avec certitude à l'effet du précurseur. En conclusion, il apparaît que si la 5-BrdU entraîne des remaniements, non décelables par les techniques classiques de microscopie électronique, ces remaniements sont stables et se maintiennent au cours de nos manipulations d'isolement.

RÉSUMÉ. — La substitution de la thymidine par la 5-BrdU dans l'ADN chromosomique entraîne au niveau des chromosomes métaphasiques *in situ* et *isolés* à partir de cellules KB, les mêmes variations morphologiques et cytologiques : fluorescence bicolore et affinité pour le Giemsa différente entre les chromatides d'un même chromosome. Par contre, le précurseur ne semble pas perturber l'apparition des bandes G ou Q tant au niveau des chromosomes *in situ*, qu'au niveau des chromosomes *isolés*, et l'unité fibrillaire chromosomique, visible en microscopie électronique est semblable avant et après incorporation de 5-BrdU.

MOTS-CLÉS Medline : Bromodéoxy-Uridine. — Cytogénétique. — Chromosomes/ultrastructure.

CYTOLOGICAL COMPARATIVE STUDY OF *IN SITU* AND ISOLATED METAPHASE CHROMOSOMES OF KB CELLS, AFTER 5-BROMODEOXYURIDINE INCORPORATION (5-BrdU)

SUMMARY. — Substitution of thymidine by 5 BrdU induces the same morphological and cytological changes in *in situ* and *isolated* metaphase chromosomes of KB cells: a dichroic fluorescence and a difference in the affinity of each chromatid for Giemsa stain. However, the precursor does not seem to modify the appearance of G or Q bands in *in situ* and *isolated* chromosomes. The fibrillar unit which can be seen with electronic microscopy, shows no difference before and after 5-BrdU incorporation.

Medline KEY-WORDS : Bromodeoxyuridine. — Cytogenetics. — Chromosomes/ultrastructure.

RÉFÉRENCES

1. COUTURIER J., DUTRILLAUX B., LEJEUNE J. (1973). — Etudes des fluorescences spécifiques des bandes R et des bandes Q des chromosomes humains. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 276, 339-342.
2. DEMINATTI M., LAI J.L., DESBIENS X., JACQUELOOT N. (1975). — Techniques d'isolement et de purification de chromosomes métaphasiques de cellules KB. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 169, 4, 981.
3. DEMINATTI M., DESBIENS X., LAI J.L., JACQUELOOT N. (1975). — Le chromosome métaphasique: étude morphologique et biochimique. *Lille méd.*, 20, 5, 494-501.
4. DEMINATTI M., SAVARY J.B. (1974). — Techniques actuelles d'identification chromosomique. *Rev. Cytol. clin.*, 7, 1, 25-31.
5. DUTRILLAUX B., FOSSE A.M., PRIEUR M., LEJEUNE J. (1974). — Analyse des échanges de chromatides dans les cellules somatiques humaines. Traitement au BUDR (5 bromodeoxyuridine) et fluorescence bicolore par l'Acridine Orange. *Chromosoma (Berl.)*, 48, 327-340.
6. DUTRILLAUX B., LAURENT C., COUTURIER J., LEJEUNE J. (1973). — Coloration par l'acridine orange de chromosomes préalablement traités par le 5 bromodeoxyuridine (BUDR). *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 276, 3179-3181.
7. GENEIX A., FELLMANN N., JAFFRAY J.Y. (1975). — Chromosomes humains après incorporation de la 5 bromodeoxyuridine: observations en microscopie électronique. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 280, 1151-1153.
8. HSU T.C., SOMERS C.E. (1961). — Effect of 5 bromodeoxyuridine on mammalian chromosomes. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 47, 396-403.
9. IKUSHIMA T., WOLFF S. (1974). — Sister chromatid exchanges induced by light flashes to 5 bromodeoxyuridine and 5 iododeoxyuridine substituted chinese Hamster chromosomes. *Exp. Cell Res.*, 87, 15-19.
10. KORENBERG J.R., FREELENDER E.F. (1974). — Giemsa technique for the detection of sister chromatid exchanges. *Chromosoma (Berl.)*, 48, 355-360.
11. LATT S.A. (1973). — Microfluorometric detection of desoxyribonucleic acid replication in Human metaphase chromosomes. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 70, 3395-3399.
12. PALMER C.G. (1970). — 5 bromodeoxyuridine induced constrictions in human chromosomes. *Canad. J. Genet. Cytol.*, 12, 816-830.
13. PERRY P., WOLFF S. (1974). — New giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature (Lond.)*, 251, 156-158.
14. WOLFF S., PERRY P. (1974). — Differential Giemsa staining of sister chromatids and the study of sister chromatid exchanges without autoradiography. *Chromosoma (Berl.)*, 48, 341-353.
15. ZAKHAROV A.F., BARANOVSKAYA L.I., IBRAIMOV A.I., BENJSCHE V.A., DEMINTSEVA V.S., OBLAPENKO N.G. (1974). — Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes. II. 5 bromodeoxyuridine and 5 bromodeoxycytidine revealed differentiation in Human chromosomes. *Chromosoma (Berl.)*, 44, 343-359.
16. ZAKHAROV A.F., EGOLINA N.A. (1972). — Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes. I. BUDR revealed differentiation in chinese Hamster chromosomes. *Chromosoma (Berl.)*, 38, 341-365.

