

COMPÉTITION HISTONE H₁ - GIEMSA ET MARQUAGE CHROMOSOMIQUE

M. DEMINATTI, J.-B. SAVARY, F. STROZYK

Services de Génétique et d'Embryologie Humaine (Directeur : Pr Deminatti), Faculté de Médecine, 1, place de Verdun, 59045 Lille Cedex (France).

INTRODUCTION

Les colorants du groupe des thiazines, auquel appartient le Giemsa, permettent la coloration de la chromatine en se liant aux groupements PO₄ libres de l'ADN [3].

Les faits cytochimiques rapportés par Brown et coll. [1] ont montré que la fraction histonique H₁, déposée sur des chromosomes métaphisiques fixés, inhibait leur coloration par le Giemsa.

Dans ce travail, à partir de chromosomes métaphasiques *in situ* ou isolés de cellules KB, les résultats obtenus tendent à démontrer que l'histone H₁ sature *in vitro* les groupements PO₄ libres de l'ADN, rendant impossible la coloration des chromosomes par le Giemsa et le bleu de méthylène.

En ce qui concerne les techniques de « Banding » : bandes Q [2], bandes G [6, 8], bandes R [5] ou de coloration différentielle après incorporation de 5-BrdU [7], la persistance d'une fixation d'histone H₁ répartie régulièrement le long du chromosome, et aussi intense qu'au niveau des chromosomes témoins, nous conduit à admettre la présence de groupements acides libres quelles que soient les zones chromosomiques.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les chromosomes métaphasiques *in situ* ou isolés, obtenus à partir de cellules KB selon la technique décrite antérieurement [4], sont déposés sur lames et fixés dans le mélange méthanol-acide acétique 3:1.

Les solutions d'histones et les solutions témoins (tableau I) préparées à la concentration de 1 mg/ml dans un tampon pH 6,8 (KH₂PO₄M/15 - Na₂HPO₄M/15) sont déposées 15 mn à 20 °C avant la coloration, sur des préparations chromosomiques traitées ou non (tableau II). Après rinçage, toutes les lames sont placées dans une solution colorante (tableau II).

La fixation du matériel déposé est appréciée en colorant les lames 10 mn dans l'Amido-Schwarz (Amido-Schwarz 1 g - acide acétique 7 ml - éthanol

DEMINATTI M., SAVARY J.-B., STROZYK F., 1977. — Compétition histone H₁-Giemsa et marquage chromosomique. *Ann. Génét.*, 20, n° 3, 199-202.

TABLEAU I
NATURE DES SOLUTIONS DÉPOSÉES
SUR LES PRÉPARATIONS CHROMOSOMIQUES

	Provenance
<i>Solutions témoins</i>	
— tampon pH 6,8 (KH ₂ PO ₄ M/15-Na ₂ HPO ₄ M/15)	—
— lysine, arginine, sérine	P. Sautière(*)
— polyglycine, poly-D glutamique	Sigma
<i>Solutions histoniques</i>	
— histones totales (sulfate)	Sochibo
— histones totales (chlorhydrate), H ₁	P. Sautière(*)
— H ₁ , H ₂ B	Sigma
<i>Polyacides aminés, protéine basique</i>	
— poly-D lys, poly-L arg, protamine sulfate	Sigma

(*) P. Sautière, Institut de Recherches sur le Cancer
(Pr G. Biserte), 59000 Lille.

absolu 20 ml - eau qsp 100 ml), puis rincées dans
un mélange éthanol-acide acétique-eau (éthanol
20 ml - acide acétique 7 ml - eau qsp 100 ml).

RÉSULTATS

a) Mise en évidence de la fixation régulière de l'histone H₁
sur les chromosomes non traités : compétition H₁-Giemsa.

Les chromosomes métaphasiques témoins, *in situ*
ou *isolés* de cellules KB se colorent uniformément
au Giemsa. Lorsque les préparations sont colorées
à l'Amido-Schwarz, colorant des protéines, les
chromosomes présentent une teinte bleutée, pâle
et uniforme (fig. 1).

Lorsque les lames sont recouvertes d'histones
totales, de fractions histoniques (H₁, H₂B), de poly-
acides aminés basiques (poly-lysine, poly-arginine),
ou de protéines basiques (sulfate de protamine), les
chromosomes restent visibles en contraste de phase
et ne fixent plus le Giemsa. Par contre, le même

TABLEAU II
RÉSULTATS OBTENUS APRÈS DIFFÉRENTS TRAITEMENTS

Traitement des préparations	Giemsa		Bleu de méthylène		Amido-schwarz		Quinacrine moutarde	
	I	II	I	II	I	II	I	II
— <i>Témoins non traités</i>	+++	0 ₁	++	0 ₁	+	+++	Q+	Q+
— <i>Banding Q selon:</i>								
• CASPERSSON et coll. [3]							Q+	Q+
— <i>Banding G selon:</i>								
• SUMNER et coll. [15]	G+	0 ₁	G+	0 ₁	0 ₂	CU+++	Q+	Q+
• FINAZ et DE GROUCHY [11]	G+	0 ₁	G+	0 ₁	0 ₂	CU+++		
— <i>Banding R selon:</i>								
• DUTRILLAUX et LEJEUNE [9]	R+	0 ₁	R+	0 ₁	0 ₂	CU+++		
— <i>Banding C selon:</i>								
• ARRIGHI et HSU [1]	C+	0 ₁	C+	0 ₁	0 ₂	CU++	0	0
— <i>Incorporation de 5-BrdU pendant 72 h</i>	CD	0 ₁	CD	0 ₁	0 ₂	CU+++	Q+	Q+
— <i>DNase (Worthington)</i>	0	0	0	0	0	0	0	0

- I : coloration sans dépôt d'histones préalable
- II : coloration après dépôt d'histones
- G+ : bandes G ; R+ : bandes R ; C+ : bandes C ; Q+ : bandes Q
- CD : coloration différentielle (selon KORENBERG et FRELENDER [12])
- CU : coloration uniforme
- 0₁ : non coloré (morphologie normale en contraste de phase)
- 0₂ : non coloré (aspect gonflé et vide des chromosomes)

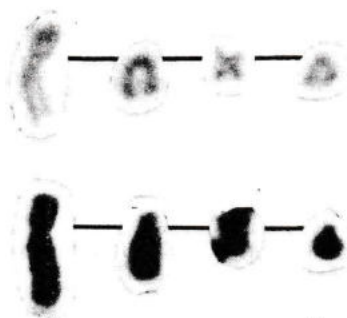


Fig. 1. — Montage de chromosomes métaphasiques de cellules KB.
En haut : coloration par l'Amido-Schwarz de chromosomes témoins.
En bas : coloration par l'Amido-Schwarz après dépôt d'histone H_1 .
Noter la plus intense colorabilité des chromosomes.

matériel coloré à l'Amido-Schwarz présente une teinte bleutée uniforme et nettement plus intense que sur les préparations témoins. Cette coloration intense et uniforme par l'Amido-Schwarz, rend compte de la fixation régulière du matériel protéique déposé sur les préparations (fig. 1). Des résultats similaires sont obtenus avec d'autres colorants spécifiques des protéines : Coomassie, Rouge ponceau.

L'inhibition de la coloration par les solutions histoniques est également observée lorsque les préparations sont colorées au bleu de méthylène, et d'une façon générale avec les colorants thiaziniques.

b) Persistance d'une fixation régulière d'histone après traitement des préparations par les techniques de banding.

Les méthodes de banding G ou R font apparaître sur les chromosomes une alternance de bandes colorées et non colorées, lorsque les préparations sont traitées au Giemsa. Par contre, aucun banding n'est observé avec l'Amido-Schwarz et les chromosomes apparaissent gonflés et vides.

Des lames traitées soit par le 2xSSC ou l' α -chymotrypsine pour l'obtention des bandes G, soit par un traitement thermique ménagé pour l'obtention des bandes R, ne se colorent plus au Giemsa si elles sont recouvertes d'histones H_1 avant la coloration. Par contre, les chromosomes traités par les métho-

des de Banding puis recouverts d'histone H_1 , fixent fortement l'Amido-Schwarz. Cette coloration intense à l'Amido-Schwarz, comparable à celles des lames témoins non traitées et recouvertes d'histones, rend compte de l'intégrité des sites de fixation de l'histone.

c) Fixation d'histones sur des chromosomes ayant incorporé la 5-BrdU.

Les traitements thermiques [7] de chromosomes métaphasiques ayant incorporé la 5-BrdU pendant 72 h, mettent en évidence après coloration au Giemsa, une coloration différentielle entre les 2 chromatides d'un même chromosome. Par contre, cette coloration différentielle n'est pas retrouvée avec l'Amido-Schwarz.

L'histone H_1 déposée sur les préparations chromosomiques traitées, empêche la fixation du Giemsa tandis qu'après coloration par l'Amido-Schwarz les 2 chromatides sont intensément et uniformément colorées. Ainsi, l'incorporation de 5-BrdU, suivi d'un traitement thermique, ne perturbe pas la fixation de l'histone H_1 sur les 2 chromatides d'un même chromosome.

COMMENTAIRES

Nos résultats sont en accord avec ceux de Brown et coll. [1]. En effet, des solutions d'histones, de poly-acides aminés basiques ou de protéines basiques, déposées sur des chromosomes métaphasiques *in situ* ou *isolés* de cellules KB, inhibent leur coloration au Giemsa.

Nos résultats mettent en évidence la persistance d'une fixation régulière et uniforme d'histones après traitement des préparations par les méthodes de Banding ou de coloration différentielle après incorporation de 5-BrdU, ce qui est en faveur de l'hypothèse que des groupements acides restent présents et libres quelles que soient les zones G+ ou G- du chromosome, après les différents traitements.

Enfin, le fait que le dépôt d'histones ne gêne pas la coloration par la quinacrine ou par l'acridine est dû à la différence de sites de fixation entre les histones et ces colorants.

RÉSUMÉ. — Le dépôt d'histones H_1 sur des chromosomes métaphasiques *in situ* ou *isolés* de cellules KB, montre qu'il existe une compétition H_1 -Giemsa. Cette compétition se rapporte aux mêmes sites de fixation. L'étude des différentes méthodes de marquage associée au dépôt d'histones révèle que l'histone H_1 se fixe uniformément le long du chromosome.

MOTS-CLÉS Medline : Coloration (technique de)/méthodes. — Giemsa. — Histones. — Chromosomes.

H_1 -GIEMSA HISTONE COMPETITION AND BANDING TECHNIQUES

SUMMARY. — The deposit of histone H_1 on metaphasic chromosomes *in situ* or isolated for KB cells shows that there is a H_1 -Giemsa competition at the same sites of fixation. Different banding techniques show that histone H_1 gets fixed uniformly along the chromosomes.

Medline KEY-WORDS: Stains and staining/methods. — Giemsa stains. — Histones. — Chromosomes.

RÉFÉRENCES

1. BROWN R.L., PATHAK S., HSU T.C., 1975. — The possible role of histones in the mechanism of chromosomal G banding. *Science*, 189, 1090-1091.
2. CASPERSSON T., ZECH L., JOHANSSON C., MODEST E.J., 1970. — Identification of human chromosomes by DNA-banding fluorescent agents. *Chromosoma (Berl.)*, 30, 215-22-7.
3. COMINGS D.E., AVELINO E., 1975. — Mechanisms of chromosome banding VII : Interaction of methylene blue with DNA and chromatin. *Chromosoma (Berl.)*, 51, 365-379.
4. DEMINATTI M., LAI J.L., DESBIENS X., JACQUELOOT N., 1975. — Technique d'isolement et de purification de chromosomes métaphasiques de cellules K.B. *C.R. Soc. Biol., (Paris)*, 169, n° 4, 981-986.
5. DUTRILLAUX B., LEJEUNE L., 1971. — Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 272, 2638-2640.
6. FINAZ C., DE GROUCHY J., 1971. — Le caryotype humain après traitement par l' α -chymotrypsine. *Ann. Génét.*, 14, 109-311.
7. KORENBERG J.R., FREELEND E.F., 1974. — Giemsa technique for the detection of sister chromatid exchanges. *Chromosoma (Berl.)*, 48, 355-360.
8. SUMNER A.T., EVANS H.J., BUCKLAND R.A., 1971. — New technique for distinguishing between human chromosomes. *Nature New Biol.*, 232, 31-32.

