

ÉTUDE DES PROTÉINES ACIDO-SOLUBLES DE CHROMOSOMES MÉTAPHASIQUES ISOLÉS DE CELLULES KB, AVANT ET APRÈS INCORPORATION DE 5-BROMODÉOXYURIDINE (5-BrdU)

J.-L. LAI et M. DEMINATTI

Laboratoire de Génétique (Directeur : Pr Deminatti), Faculté de Médecine, 1, place de Verdun, 59045 Lille Cedex (France).

INTRODUCTION

A partir de différentes techniques d'isolement publiées [2, 9, 10, 11, 15, 19, 23], nous avons mis au point un protocole expérimental nous permettant d'obtenir en grande quantité, un matériel chromosomique isolé et purifié à partir de cellules KB [5, 6].

La fraction protéique du chromosome métaphasique regroupe deux composantes : les protéines acido-solubles et les protéines non acido-solubles. Nous avons étudié dans ce travail les protéines acido-solubles chromosomiques à partir de matériel isolé à pH acide et à pH basique. En même temps, nous avons recherché l'existence de différences qualitatives entre protéines de chromosomes métaphasiques et protéines de noyaux interphasiques. Enfin, nous avons recherché si l'incorporation de 5-BrdU par notre matériel n'entraînait pas des modifications au niveau des protéines acido-solubles. Des résultats rapportés antérieurement après incorporation de 5-BrdU [7] indiquent qu'il n'existe pas de différence morphologique entre les chromosomes isolés et *in situ* de cellules KB.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les cellules KB (souche KB 3 Green) sont cultivées en suspension. Après addition de colchicine (0,1 µg/ml), on obtient 30 à 50 % de cellules en métaphase.

1) Isolement des chromosomes métaphasiques et des noyaux interphasiques.

Les cellules métaphasiques sont soumises à un traitement hypotonique (citrate de Na trisodique 0,5 %, MgCl₂ et CaCl₂ 10⁻³M) 20 mn à 37 °C.

Les chromosomes de cellules métaphasiques et les noyaux interphasiques sont isolés en milieu acide suivant le protocole décrit antérieurement [5, 6]. Une technique d'isolement à pH 9, 0 est également appliquée, dont les modalités sont identiques à la technique d'isolement en milieu acide sauf le milieu d'homogénéisation (Tris 0,02M-saccharose 0,1M pH9-CaCl₂ 5 × 10⁻³M-saponine 0,1 %).

2) Contrôles morphologiques.

Pour la microscopie optique, les cellules métaphasiques et les chromosomes isolés sont fixés 2 × 30 mn dans méthanol-acide acétique 3:1 et colorés 10 mn au Giemsa pH 6,8 (Giemsa R 4 ml, tampon PO₄ ml, H₂O qsp 100 ml).

Pour la microscopie électronique, 3 à 5 gouttes de matériel (CH pH3, CH pH9) sont déposées sur des grilles recouvertes de membrane de Formvar.

Ce travail a été réalisé grâce à l'aide financière de l'UER III de Médecine de Lille.

LAI J.L., DEMINATTI M. (1977). — Étude des protéines acido-solubles de chromosomes métaphasiques isolés de cellules KB, avant et après incorporation de 5-Bromodéoxyuridine (5-BrdU). *Ann. Génét.*, 20, n° 1, 25-29.

Les préparations sont déshydratées par passages dans des bains d'alcool de degré croissant. Elles sont séchées à l'air avant d'être observées au microscope électronique (Zeiss EM 9) sans coloration préalable des grilles.

3) Incorporation de 5 Bromodeoxyuridine (5-BrdU).

La 5-BrdU (Sochibo) est introduite dans le milieu de culture pendant 72 heures (concentration finale 10 µg/ml).

L'incorporation du précurseur par le chromosome métaphasique est vérifiée par coloration au Giemsa selon la technique de Korenberg et Freedlender [14], ou par fluorescence à l'acridine-orange selon la technique de Couturier et coll. [4].

4) Extraction des protéines acido-solubles.

Les culots de chromosomes (Jouan 2 500 tr/mn 60 mn) ou de noyaux purifiés (Jouan 800 tr/mn 5 mn), dont certains, après fixation au méthanol-acétique et séchés, sont traités 2 fois par HCl 0,25N et lyophilisés.

Les surnageants des milieux d'homogénéisation, après sédimentation des chromosomes (pH acide ou pH basique), ou les tampons servant de lavage des chromosomes après homogénéisation sont centrifugés à 5 500 tr/mn (Jouan K 95) pendant 20 mn, puis précipités par addition d'ATCA à 100 %, de manière à obtenir une concentration finale en ATCA de 20 %. Le précipité obtenu est centrifugé à 5 500 tr/mn pendant 20 mn. Le culot, lavé plusieurs fois à l'acétone ou à l'éther éthylique est ensuite partiellement dissout dans une solution d'urée 8M, HCl 0,01N. La partie soluble est ensuite étudiée par électrophorèse en gel de polyacrylamide.

5) Analyse électrophorétique des protéines acido-solubles.

Les protéines acido-solubles sont soumises à l'électrophorèse selon la technique de Panyim et Chalkley [17] : électrophorèse en gel de polyacrylamide à 17 %, urée 2,5M, en milieu acide acétique 0,9N. Les gels après coloration à l'amido-schwarz, sont enregistrés au microdensitomètre (Joyce-Loebl).

RÉSULTATS

1) Isolement et contrôles morphologiques.

En microscopie optique, le chromosome métaphasique isolé à pH acide, ou à pH basique présente la même morphologie et les mêmes propriétés tinctoriales que dans la cellule entière après un choc hypotonique.

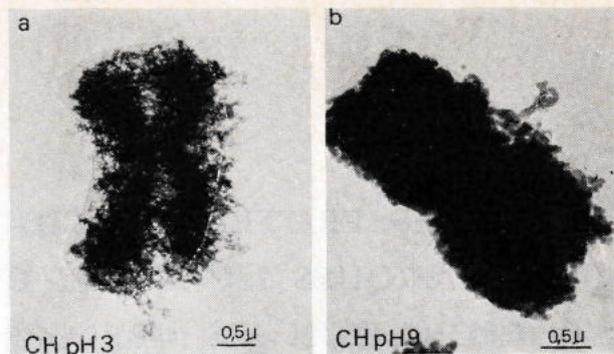


Fig. 1. — Etude au microscope électronique de
a) Chromosome métaphasique isolé à pH acide (CH pH3).
b) Chromosome métaphasique isolé à pH basique (CH pH9).
Grossissement : a' x 3800.
b' x 14 300.

Les chromosomes isolés à pH basique sont plus globuleux et plus contractés que ceux isolés à pH acide.

En microscopie électronique, ils sont souvent liés à un réseau dense de fibres appartenant au réseau fibrillaire interchromosomique observé lors de l'examen de cellules métaphasiques [5], (fig. 1). L'observation de ces chromosomes (fig. 1b), dont l'aspect morphologique rappelle celui du matériel isolé à pH acide (fig. 1a), est impossible car les axes chromatidiens sont denses et la périphérie du chromosome montre peu de fibres marginales. Le diamètre de leurs fibres (230 à 370 Å) est supérieur à celui de chromosomes isolés à pH acide (180 à 230 Å), [5]. Par ailleurs, rappelons que nous avons rapporté l'absence de modifications de l'unité fibrillaire chromosomique visible en microscopie électronique, avant et après incorporation de 5-BrdU [7].

2) Les protéines acido-solubles des chromosomes et des noyaux interphasiques.

La majorité des protéines acido-solubles des chromosomes (CH pH3 et CH pH9) ou des noyaux, extraites par HCl 0,25N, après fixation ou non, correspondent aux fractions histoniques connues, sous forme monomérique sauf pour l'histone H3. La figure 2a nous montre la migration électrophorétique des histones totales de thymus de veau témoin. Les figures 2b et 2c montrent respectivement les électrophorèses des protéines acido-solubles de noyaux et de chromosomes isolés à pH acide (CH pH3). Les enregistrements densitométriques correspondants présentent une grande similitude : dans les 2 cas, on note l'absence d'histones H1 et une réduction importante des histones H2B et H2A par rapport à l'histone H4. L'histone H3 apparaît surtout sous forme de dimère de mobilité électrophorétique plus faible que celle de l'histone H1. La forme dimère de H3 disparaît après traitement de la préparation par le β-mercaptoéthanol (fig. 2d et 2e).

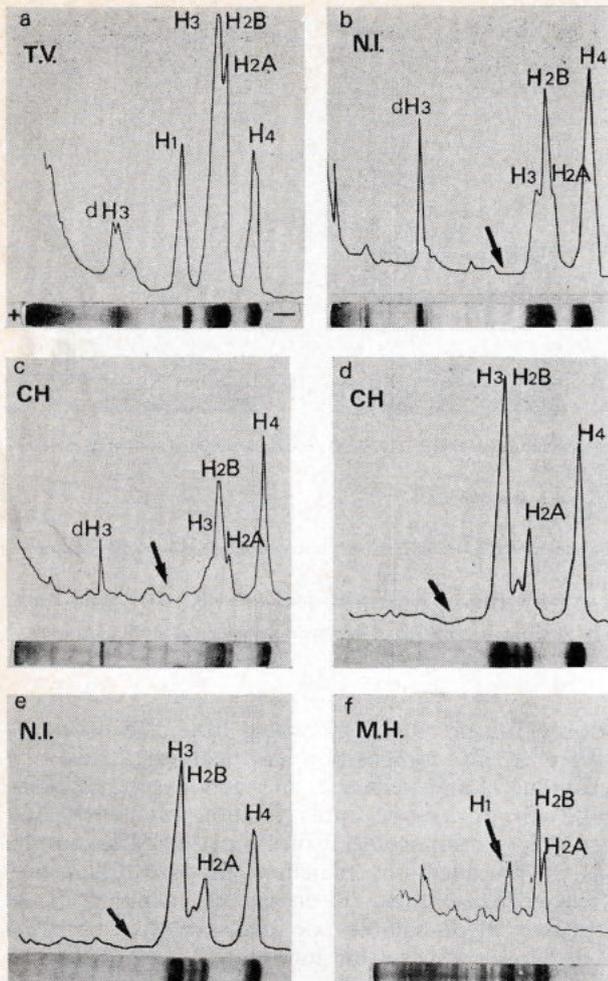


Fig. 2. — Analyse des protéines solubles dans HCl 0,25 N par « disc » électrophorèse en gels de polyacrylamide à 17p100 (dépôts 20 μ l)
a) Témoin histones totales de T.V. (*).
b) Protéines acido-solubles de noyaux interphasiques isolés à pH acide.
c) Protéines acido-solubles de chromosomes métaphasiques isolés à pH acide (CH pH3).
d) Protéines acido-solubles de chromosomes métaphasiques isolés à pH acide, après traitement au β -mercapto-éthanol.
e) Protéines acido-solubles de noyaux interphasiques isolés à pH acide après traitement au β -mercapto-éthanol.
f) Protéines du milieu d'homogénéisation (pH 2,1) précipitables par l'A.T.C.A. à 20 p 100 et solubles dans l'urée 8M, HCl 0,01N.
(*) Nomenclature comparative des histones/CIBA Symposium (21) H1, H2B, H2A, H3, H4 JOHNS (12) et (13) F1, F2b, F2a2, F3, F2a

L'extraction des protéines acido-solubles par l'acide sulfurique 0,4N donne sensiblement les mêmes résultats (fig. 4).

L'absence d'histone H1 et la diminution des histones H2B et H2A ne sont pas liées à une extraction imparfaite des protéines acido-solubles mais doivent être imputées à la technique d'isolement des chromosomes et des noyaux en milieu acide. En effet, dans le milieu d'homogénéisation à pH acide, nous avons identifié les histones H1, H2B et H2A ainsi que des protéines d'origine cytoplasmique et membranaire, et des protéines non histoniques (fig. 2f). Par contre, les

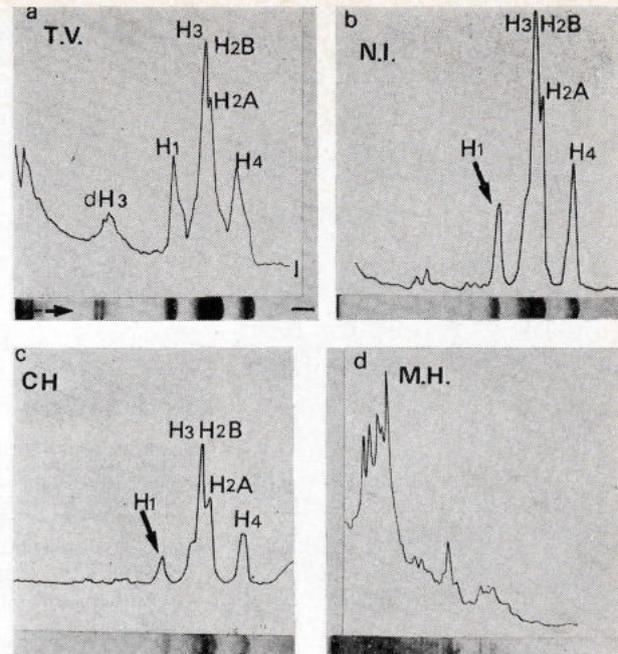


Fig. 3. — Analyse des protéines solubles dans HCl 0,25N, par « disc » électrophorèse en gels de polyacrylamide à 17 p. 100.
a) Témoin histones totales de thymus de veau.
b) Protéines acido-solubles de noyaux interphasiques isolés à pH9.
c) Protéines acido-solubles de chromosomes métaphasiques isolés à pH9 (CH pH9).
d) Protéines du milieu d'homogénéisation basique précipitables par l'A.T.C.A. à 20 p. 100 et solubles dans l'urée 8M, HCl 0,01N.

histones H3 et H4 ne sont pas retrouvées dans ce milieu d'homogénéisation. Nous n'avons mis en évidence aucune protéine dans le tampon de lavage acide des chromosomes. L'étude électrophorétique des protéines acido-solubles de chromosomes et noyaux isolés à pH basique (fig. 3b, 3c) montre la présence de toutes les histones H1, H2B, H2A, H3, H4, dans des proportions comparables à celles des histones de thymus de veau témoin (fig. 3a). On note aussi la diminution très importante du dimère H3. Le contrôle électrophorétique des protéines, extraites du milieu d'homogénéisation fait ressortir l'absence de toutes fractions histoniques (fig. 3d). Ce résultat montre une meilleure conservation des protéines acido-solubles du chromosome à pH basique.

Quel que soit le pH utilisé pour la technique d'isolement, il n'existe pas de différences qualitatives entre noyaux interphasiques et chromosomes métaphasiques au niveau des histones. Seules quelques différences sont observées, surtout quand l'extraction des protéines est réalisée avec H_2SO_4 0,4N (fig. 4), et sont situées dans la zone de migration comprise entre les formes dimère et monomère de l'histone H3.

Après incorporation de 5-BrdU, les enregistrements densitométriques des gels montrent que le précurseur ne modifie pas la composition en histones H3, H2B, H2A et H4 (fig. 5) des chromosomes ou des noyaux.

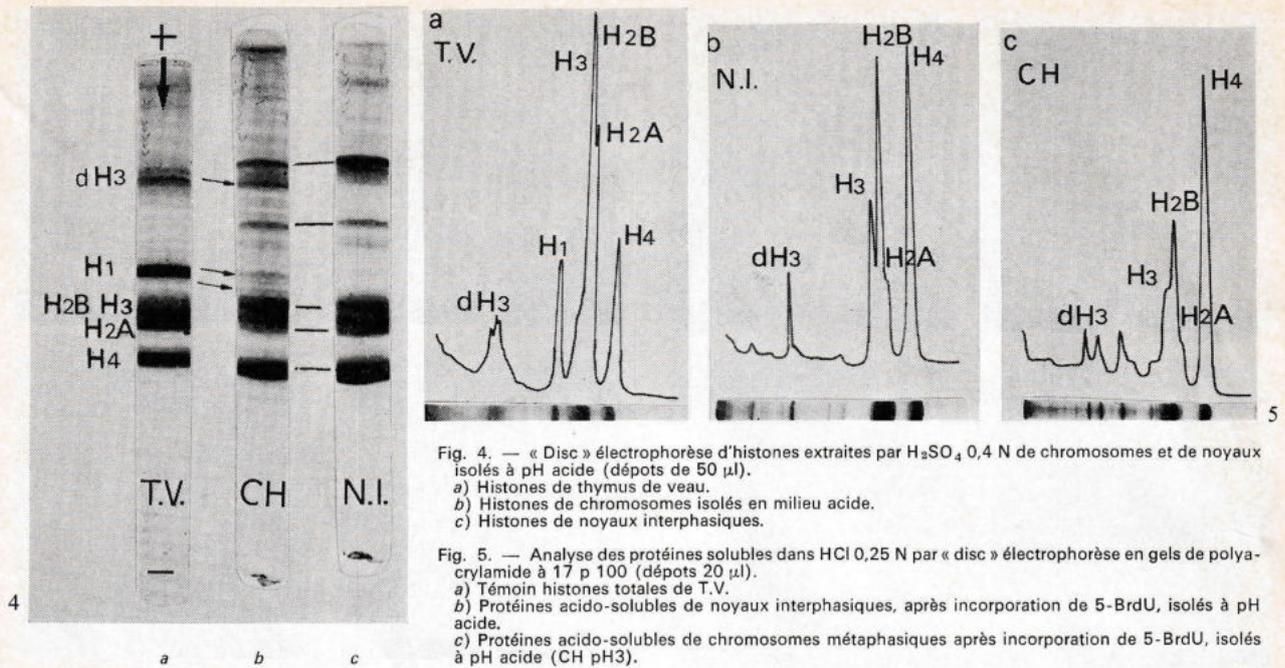


Fig. 4. — « Disc » électrophorèse d'histones extraites par H_2SO_4 0,4 N de chromosomes et de noyaux isolés à pH acide (dépôts de 50 μ l).
a) Histones de thymus de veau.
b) Histones de chromosomes isolés en milieu acide.
c) Histones de noyaux interphasiques.

Fig. 5. — Analyse des protéines solubles dans HCl 0,25 N par « disc » électrophorèse en gels de polyacrylamide à 17 p 100 (dépôts 20 μ l).
a) Témoin histones totales de T.V.
b) Protéines acido-solubles de noyaux interphasiques, après incorporation de 5-BrdU, isolés à pH acide.
c) Protéines acido-solubles de chromosomes métaphasiques après incorporation de 5-BrdU, isolés à pH acide (CH pH3).

DISCUSSION

Notre objectif a été de rechercher l'existence d'une relation entre la variation de colorabilité du chromosome métaphasique, après incorporation de 5-BrdU, et les histones.

L'étude des protéines acido-solubles de chromosomes isolés à pH acide, met en évidence la perte totale de l'histone H1, et partielle des histones H2B, H2A. Mais, cette perte en protéines acido-solubles, déjà signalée par différents auteurs travaillant soit sur des chromosomes métaphasiques [11, 18, 20], soit sur de la chromatine de noyaux interphasiques [3, 21, 22], ne modifie pas la structure globale du chromosome. Au contraire, c'est le chromosome isolé à pH acide qui garde la structure la plus comparable à celle du chromosome *in situ* [16]. Le chromosome isolé à pH basique, contenant toutes les fractions histoniques majeures H1, H2B, H2A, H3 et H4, est plus globuleux que le chromosome *in situ*. Ainsi, on peut admettre que la perte en protéines acido-solubles modifie la fibre chromosomique. En effet, la fibre du chromosome isolé à pH basique apparaît plus épaisse (230 à 370 Å) que celle des chromosomes isolés à pH acide (180 à 230 Å), sans que la structure globale du chromosome soit modifiée. La labilité particulière de l'histone H1 aux agents tels que les acides dilués ou les solutions salines peut s'expliquer par la position externe de cette histone dans le modèle structural de la chromatine proposé par Baldwin et coll. [1].

Par ailleurs, en aucun cas, la présence (à pH basique) ou l'absence (à pH acide) de l'histone H1 ne modifie les affinités tinctoriales (Giemsa ou

fluorochromes) du chromosome isolé. De même, la différence de composition en histones, suivant la technique d'isolement, est sans action sur la colorabilité. Enfin, l'étude après fixation (méthanol acétique) des chromosomes isolés à pH acide ne montre pas de modifications majeures au niveau des protéines acido-solubles. Il en est de même pour les protéines acido-solubles de chromosomes normaux et de chromosomes ayant incorporé de la 5-BrdU.

Ceci conduit à admettre, quant au rôle des histones dans le phénomène de coloration différentielle par le Giemsa ou les fluorochromes, après incorporation de 5-BrdU, entre les chromatides d'un même chromosome, soit leur non participation, soit une participation due à des remaniements des liaisons ADN-histones par suite d'une modification structurale de l'ADN [8].

ABRÉVIATIONS

CH pH3 : chromosomes isolés à pH acide.
CH pH9 : chromosomes isolés à pH basique.
NI : noyaux interphasiques.
TV : thymus de veau.
ATCA : acide trichloracétique.
MH : milieu d'homogénéisation.
5-BrdU : 5-Bromodeoxyuridine.

REMERCIEMENTS.

Nous remercions MM. J.-B. Savary, F. Strozyk, Madame Le Cocq-Jacqueloot pour leur excellente collaboration technique.

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

Nous remercions également M. J.-P. Kerkaert et P. Sautière de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille (Professeur G. Biserte) pour leur aide et leurs conseils.

RÉSUMÉ. — Des chromosomes métaphasiques ou des noyaux interphasiques sont isolés en milieu acide et en milieu basique. Les contrôles montrent l'intégrité morphologique du matériel. L'isolement à pH acide entraîne la perte totale de l'histone H1 et la perte partielle des histones H2B et H2A sans affecter la structure globale du chromosome. On remarque une diminution de l'épaisseur des fibres chromosomiques.

L'incorporation de 5-BrdU pendant 72 heures n'entraîne pas de modifications significatives des protéines acido-solubles extraites des chromosomes ou noyaux isolés ayant incorporé le précurseur.

MOTS-CLÉS Medline : Chromosomes/analyse. — Protéines/analyse. — Histones/analyse. — Bromodéoxyuridine.

STUDY OF ACID-SOLUBLE PROTEINS OF METAPHASE CHROMOSOMES ISOLATED FROM KB CELLS BEFORE AND AFTER 5-BrdU INCORPORATION

SUMMARY. — Metaphase chromosomes and interphase nuclei have been isolated by two different procedures, using either acidic or alkaline media. The morphological integrity of the isolated material has been monitored by electron microscopy. In the acidic procedure the thickness of the chromosome fibers is reduced but the chromosome gross structure is preserved. However, electrophoretic analysis indicates complete disappearance of histones H1 and partial loss of H2A and H2B. No significant modification of acid-soluble proteins isolated from chromosomes or nuclei was observed after 5-BrdU incorporation for 72 hours.

Medline KEY-WORDS : Chromosomes/analysis. — Proteins/analysis. — Histones/analysis. — Bromodeoxyuridine.

RÉFÉRENCES

1. BALDWIN J.P., BOSELEY P.G., BRADBURY E.M., IBEL K., 1975. — The subunit structure of the eukaryotic chromosome *Nature (Lond.)*, 253, 245-249.
2. CANTOR K.P., HEARST J.E., 1966. — Isolation and partial characterisation of metaphase chromosomes of Mouse ascite tumor. *Proc. N.A.S.*, 55, 642-649.
3. COMINGS D.E., TACK L.O., 1973. — Non histones proteins. *Exp. Cell Res.*, 82, 175-191.
4. 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.
5. DEMINATTI M., LAI J.L., DESBIENS X., JACQUELOOT N., 1975. — Technique d'isolement et de purification de chromosomes métaphasiques de cellules KB. *C.R. Soc. Biol.*, 169, 981-986.
6. DEMINATTI M., DESBIENS X., LAI J.L., JACQUELOOT N., 1975. — Le chromosome métaphasique : étude morphologique et biochimique. *Lille Méd.*, 20, 494-501.
7. DEMINATTI M., SAVARY J.B., LAI J.L., 1976. — Etude cytologique comparée des chromosomes métaphasiques in situ et isolés à partir de cellules KB, après incorporation de 5-Bromodéoxyuridine (5-BrdU). *Ann. Génét.*, 19, 91-94.
8. DUTRILLAUX B., AURIAS A., FOSSE A.M., 1976. — Différenciation des mécanismes induisant la segmentation et l'asymétrie des chromatides, après traitement par le 5-Bromodéoxyuridine. *Exp. Cell Res.*, 97, 313-321.
9. EBINA T., KAMO I., TAKAHASHI K., HOMMA M., ISHIDA N., 1970. — Incorporation of isolated HeLa S3 metaphase chromosomes into cultured mouse embryo cells. *Exp. Cell Res.*, 62, 384-388.
10. EBINA T., MIAO R., WATANABE Y., 1974. — Transfer of chromosomal material. Association of reutable sarcoma virus genome with the chromosomal fraction. *Exp. Cell Res.*, 88, 203-206.
11. HUBERMAN J.A., ATTARDI G., 1966. — Isolation of metaphase chromosomes from HeLa cells. *J. Cell Biol.*, 31, 95-105.
12. JOHNS E.W., BUTLER J.A., 1962. — Further fractionations of histones from calf thymus. *Biochem. J.*, 82, 15-18.
13. JOHNS E.W., 1964. — Studies on histones. Preparative methods for histone fractions from calf thymus. *Biochem. J.*, 92, 55-59.
14. KORENBERG J.R., FREELENDER E.F., 1974. — Giemsa technique for the detection of sister chromatid exchanges. *Chromosoma*, 48, 355-360.
15. MAIO J.J., SCHILDKRAUT C.L., 1967. — Isolated of metaphase chromosomes. I : General characteristics of nucleic acids and proteins. *J. Mol. Biol.*, 24, 29-39.
16. OCKEY C.H., 1973. — The chemistry of the eukaryote chromosome. In Nobel 23. Chromosome identification. Symposia. Academic Press, New York, 258-270.
17. PANYIM S., CHALKLEY R., 1969. — High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones. *Arch. Biochem. Biophys.* 130, 337-346.
18. SADGOPAL A., BONNER J., 1970. — Proteins of interphase and metaphase chromosomes compared. *Bioch. Biophys. Acta*, 207, 227-239.
19. SALZMAN N.P., MOORE D.E., MENDELSON J., 1966. — Isolation and characterization of human metaphase chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 56, 1449-1456.
20. SALZMAN N.P., MENDELSON J., 1968. — Isolation and fractionation of metaphase chromosomes. *Meth. Cell Physiol.*, 3, 277-292.
21. SKINNER L.G., OCKEY C.H., 1971. — Isolation, fractionation and biochemical analysis of the metaphase chromosomes of *Microtus agrestis*. *Chromosoma*, 35, 125-142.
22. SMART J.E., BONNER J., 1971. — Studies on the role of histones in the structure of the chromatin. *J. Mol. Biol.*, 58/3, 661-674.
23. WRAY W., STUBBELFIELD E., 1970. — A new method for the rapid isolation of chromosomes mitotic apparatus or nuclei from Mammalian fibroblasts at near neutral pH. *Exp. Cell Res.*, 59, 469-478.
24. Histone nomenclature, 1975. — Ciba Foundation Symp., 281-4 Amsterdam Ass. Sci. Pub.