

Nouveau système de marquage chromosomique : Les bandes T

B. Dutrillaux

Chaire de Génétique Fondamentale (Professeur J. Lejeune)
Institut de Progénèse, Paris

New System of Chromosome Banding: The T Bands

Abstract. Two new techniques of controlled thermic denaturation are described. They especially show a staining of some terminal regions of chromosomes (terminal bands or T bands). — The application of these techniques to translocations, hardly analysable by the other banding techniques, allow the precise location of juxta-telomeric break points.

Introduction

La dénaturation thermique ménagée (Dutrillaux et Lejeune, 1971) montre qu'il existe des bandes sur les chromosomes (bandes R selon la nomenclature de Paris), qui sont la réciproque de celles (bandes Q) révélées par la coloration à la moutarde de quinacrine (Caspersson *et al.*, 1970). Récemment, un marquage en bandes R était observé en fluorescence, après une coloration par l'acridine orange de préparations traitées ou non traitées par dénaturation (Lubs, 1973; Couturier *et al.*, 1973). L'une des particularités des bandes R est de colorer les extrémités distales des chromatides, mais dans tous les cas, après coloration par le Giemsa comme par l'acridine orange, les bandes distales et les bandes intercalaires ont la même intensité moyenne.

Cependant, la modification de certaines conditions expérimentales révèle une hétérogénéité des bandes R dont les unes perdent leur coloration alors que les autres, surtout situées aux extrémités distales la préservent, ou même la renforcent.

En raison de leur localisation terminale (ou télomérique) nous proposons de nommer ces structures les bandes T.

Matériel et méthodes

Les préparations sont obtenues après culture de cellules sanguines, selon la technique habituelle (Dutrillaux et Couturier, 1972; Turpin et Lejeune, 1965). Il semble préférable d'attendre quelques jours avant d'utiliser les lames pour les traitements ultérieurs.

Méthode No. 1

a) Traitement thermique. Un récipient contenant 94 ml d'eau distillée et 3 ml de tampon phosphate, de pH 6,7, est porté à la température de 87°. Quelques

minutes avant de plonger les lames, on ajoute 3 ml d'une solution commerciale de Giemsa. Les lames sont ensuite traitées pendant 5 à 30 mn.

b) Coloration par l'acridine orange. Les lames ainsi traitées sont ensuite décolorées et réhydratées par des bains d'alcool de titre dégressif, rincées à l'eau distillée, et recolorées pendant 20 mn dans une solution d'acridine orange, à la concentration de 5 mg pour 100 ml, tamponnée à pH 6,7 par du tampon phosphate (Couturier *et al.*, 1973). Elles sont ensuite rincées par le même tampon, recouvertes d'une lamelle, et observées en lumière ultra-violette.

Méthode No. 2

Les lames sont soumises pendant 20 mn à 60 mn à une dénaturation thermique ménagée, en présence de liquide de Earle, de P. B. S. ou de tampon phosphate. Seule différence, par rapport à la technique initiale (Dutrillaux et Lejeune, 1971; Dutrillaux et Couturier, 1972), on se place à un pH plus acide. A 87° on utilise un pH de 5,1.

On colore ensuite, soit par le mélange de Giemsa, soit comme précédemment, par l'acridine orange.

Résultats

Méthode No. 1

Après le traitement thermique en présence de Giemsa, l'observation montre des chromosomes d'apparence altérée. La coloration est insuffisante, et dans certaines cellules, les chromosomes, incolores, sont mis en évidence par la coloration du nucléoplasme environnant. Même après une nouvelle coloration par le Giemsa, on n'observe pas de bandes.

Colorés par l'acridine orange, ces mêmes chromosomes émettent une fluorescence particulière, qui varie en fonction de la durée du traitement thermique :

— pour une durée de moins de 15 mn, la fluorescence, nettement bicolore, est verte intense au niveau de nombreuses extrémités télomériques, le reste des chromatides étant d'un orange vif et diffus, résistant à l'irradiation ultra-violette. On remarque en outre des bandes vertes intercalaires sur les chromosomes 11, 19 et 22.

— pour un traitement de 15—20 mn, la coloration verte terminale demeure, mais la coloration orange est moins intense. Une irradiation u. v. prolongée la fait disparaître, laissant apparaître des bandes vertes intercalaires à l'emplacement des bandes R habituelles. Les bandes intercalaires des 11, 19 et 22, visibles d'emblée, restent toujours les plus intenses. Il est possible que l'intensité et l'apparition des autres bandes intercalaires correspondent à un ordre défini.

— pour un traitement de 30 mn et plus, la coloration orangée a presque totalement disparue, et des bandes R intercalaires apparaissent d'emblée.

La fig. 1 représente le caryotype d'une endomitose où un marquage R discret coexiste avec le marquage T, permettant ainsi l'identification précise de chaque élément.

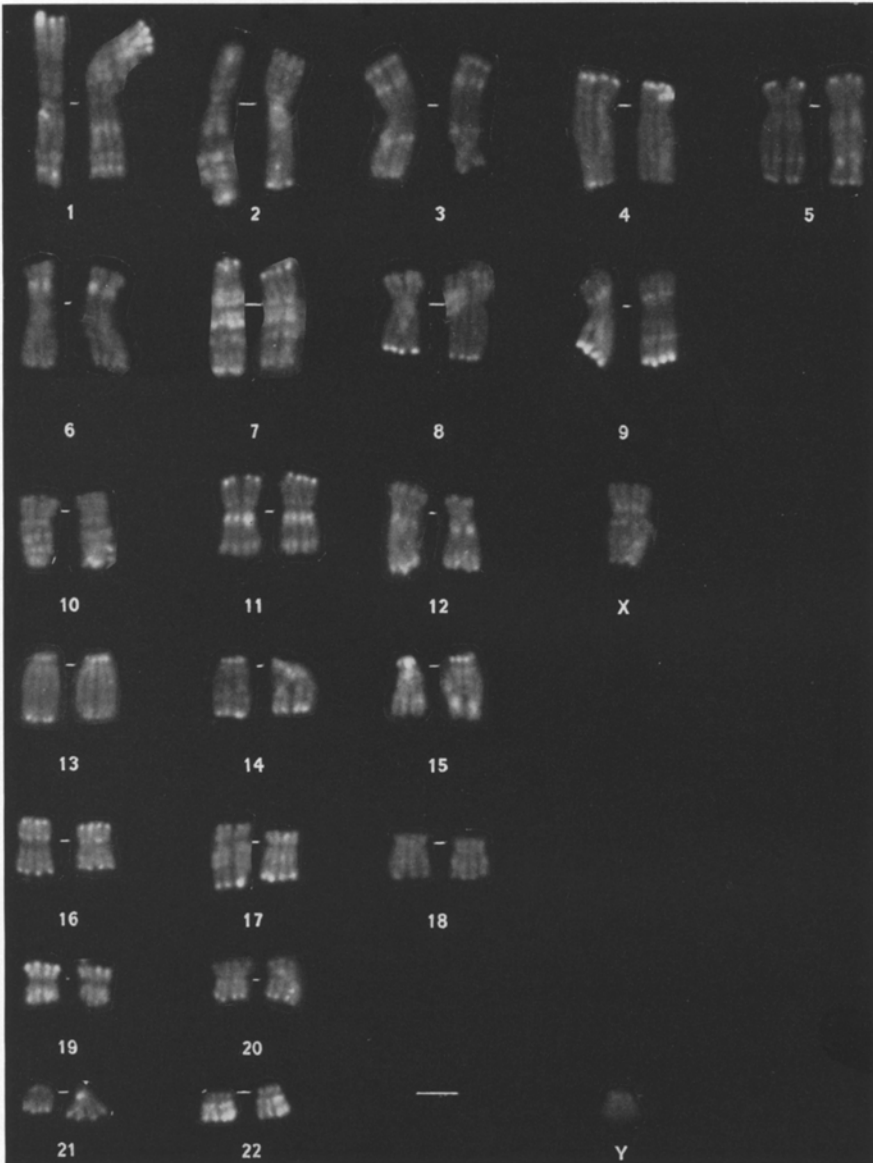


Fig. 1. Caryotype d'une endomitose. Les bandes T coexistent avec un léger marquage de type R (technique No. 1)

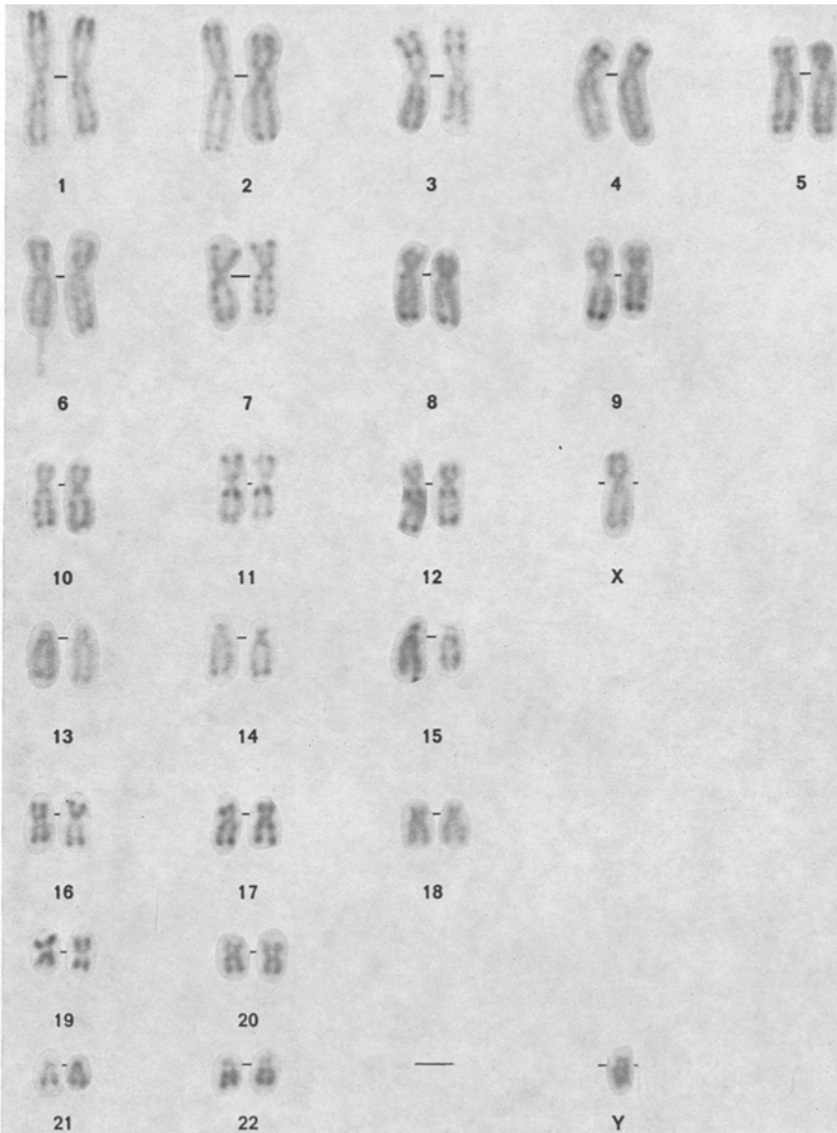


Fig. 2. Caryotype d'une mitose normale. Marquage en bandes T, après coloration au Giemsa (technique No. 2)

Tableau 1. Représentation de l'intensité de la fluorescence télomérique des différents éléments. 0 indique une fluorescence de la même intensité que celle du reste des chromatides, les intensités plus fortes sont de + à +++

Paire chromosomique	Bras court	Bras long	Paire chromosomique	Bras court	Bras long
1	+++	0	13	var ?	+
2	0	+	14	var ?	++
3	0	0	15	var ?	0
4	+++	0	16	++	++
5	+	+	17	0	+++
6	0	0	18	0	0
7	+++	0	19	+++	0
8	0	+++	20	0	++
9	0	+++	21	0	++
10	0	++	22	0	++
11	+++	0	X	0	0
12	0	+	Y	0	0

Dans le tableau 1 sont indiquées les intensités moyennes de fluorescence des régions terminales. Les bras courts des acrocentriques sont très fluorescents le plus souvent, mais semblent variables. En les excluant, sur les 43 régions terminales des 22 autosomes et des gonosomes, 20 ont une fluorescence plus intense que le reste des chromatides.

Méthode No. 2

A température et pH constant, on observe d'abord des bandes R pour une durée de traitement brève et pour une durée plus longue des bandes T. Les bandes T n'apparaissent qu'avec un traitement à pH acide, autour de 5,1, et sont une étape plus avancée de la dénaturation ménagée.

Cette seconde technique a l'avantage de donner des résultats comparables à la première, avec une simple coloration par le Giemsa. Cependant, le contraste entre les bandes T et les bandes R intercalaires qui restent est moins tranché (fig. 2).

Dans la mesure où l'on dispose d'une source de lumière ultraviolette, on lui préférera donc la première méthode pour les applications pratiques.

Discussion

Ce nouveau système de marquage, que nous proposons de nommer T, constitue, par sa localisation au moins, un composant du système R. En effet, dans ce dernier, presque toutes les chromatides se terminent par une bande colorée. Cependant, toutes les bandes R terminales

n'apparaissent pas dans le système T. D'autre part, les bandes T sont plus petites et plus strictement télomériques que les bandes R correspondantes.

L'origine du marquage T reste obscure. Il semble qu'il s'agisse des composants des bandes R les plus résistants à certaines conditions de dénaturation, mais leur nature chimique n'est actuellement pas connue. Il est intéressant de constater qu'avec la première des 2 méthodes utilisées, il n'y a pas de correspondance entre les colorations par le Giemsa et par l'acridine orange, alors qu'avec la 2^e méthode, on observe des bandes T avec ces 2 colorants.

Ce marquage indique que le support des bandes observées sur les chromosomes est vraisemblablement plus complexe que les seuls systèmes de bandes Q (ou G) et R pouvaient le laisser croire.

Par exemple, si l'on compare les bandes 11q13, 12q13, d'apparence très semblable en bandes R, leur hétérogénéité devient évidente en bandes T, ou seule la bande 11q13 persiste.

On peut donc envisager que des traitements appropriés pourraient permettre de différencier ainsi un très grand nombre de structures chromosomiques. A la limite, chaque bande Q (ou G) et chaque bande R est peut être de constitution unique.

Le marquage de nombreuses extrémités télomériques est lui même très intéressant car il devient évident que nombre de ces régions possèdent une structure qui les distingue des autres régions chromosomiques.

Applications

1. *Reconnaissance du chromosome 22.* Avec les systèmes de bandes Q, R et G, il est très difficile, voire impossible, de reconnaître formellement un segment de chromatide du 22 d'un autre segment de chromatide de marquage comparable. En système T, le chromosome 22, qui porte sur son bras long 2 bandes distinctes très fluorescentes, est presque aussi caractéristique que le bras long de l'Y en système Q, et ne pourrait être confondu avec aucun autre segment chromosomique de longueur comparable.

2. *Analyse des remaniements de structure.* La reconnaissance précise des régions télomériques est capitale dans l'analyse des remaniements structuraux. En effet, se pose toujours la question de l'existence du télomère et de la nécessité de 2 points de cassure au moins pour permettre le réarrangement.

Dans une analyse en dénaturation ménagée de 30 cas de translocations, nous avons remarqué que les points de cassure se situent souvent dans les régions télomériques (Lejeune *et al.*, 1972). Cependant, lorsque les points de cassure présumés se situent dans une bande intercalaire et une bande terminale de même intensité, il restait impossible d'affirmer qu'il

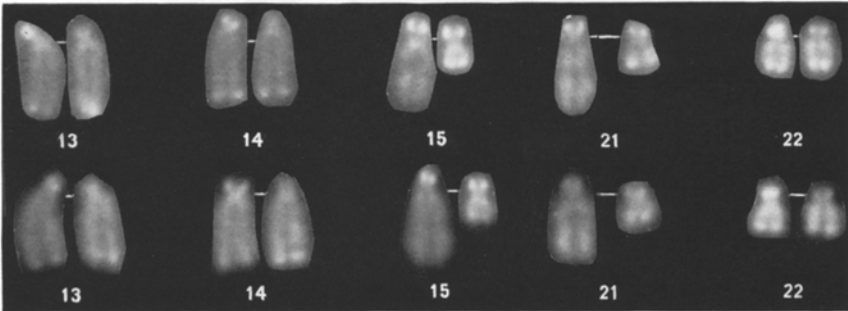


Fig. 3. Montages en bandes T d'une translocation $t(15; 21)$

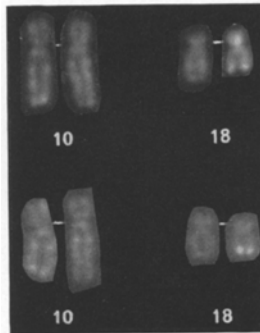


Fig. 4. Montages en bandes T d'une translocation $t(10; 18)$

y avait réellement eu une cassure dans la bande terminale et un échange du petit segment distal.

Appliquée à un exemple semblable, la méthode de bandes T a permis de trancher aisément: dans une translocation $t(15q; 21q)$ avec préservation apparente de la longueur des segments remaniés, la dénaturation ménagée et la fluorescence montrent qu'il s'agit d'une translocation $t(15q-; 21q+)$.

S'il s'agit réellement d'une translocation réciproque, il est impossible d'en faire la démonstration car les points de cassure se situeraient sur chaque chromosome, dans des bandes de même coloration ($15q_{15}$ et $21q_{22}$).

La méthode de bandes T appliquée ultérieurement montre alors que le chromosome $15q-$ porte à son extrémité une bande très fluorescente qui ne peut être que la bande T du 21 (fig. 3).

La réciprocité de la translocation devient donc certaine, et l'on peut localiser le point de cassure du 21, dans la partie proximale de la bande q 22.

L'étude d'une translocation t (10; 18) amène à une conclusion semblable: la cassure s'est effectuée dans la bande terminale du 10 qui a été échangée avec un segment plus long du 18 (fig. 4).

Il est donc fort intéressant de reprendre l'étude des remaniements chromosomiques par cette méthode de marquage qui permettra de cerner de plus près le comportement des télomères lors des remaniements.

Bibliographie

- Caspersson, T., Zech, L., Johansson, C.: Analysis of human metaphase chromosome set by aid of DNA binding fluorescent agents. *Exp. Cell Res.* **62**, 490—492 (1970).
- Couturier, J., Dutrillaux, B., Lejeune, J.: Etude de fluorescences spécifiques des bandes R et des bandes Q des chromosomes humains. *C. R. Acad. Sci. Paris* **276**, 339—342 (1973).
- Dutrillaux, B., Couturier, J.: Techniques d'analyse chromosomiques. Monographie annuelle Soc. Fr. Biol. Clin. **1972**, 5—12.
- Dutrillaux, B., Lejeune, J.: Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. *C. R. Acad. Sci. Paris* **272**, 2638—2640 (1971).
- Lejeune, J., Dutrillaux, B., Rethore, M. O.: Analysis of 30 cases of translocation by the controlled thermic denaturation. *Proc. Hoechst Symp. Heterochromatin* (sous presse, 1972).
- Lubs, H.: Comparative methodology and the mechanism of chromosomal banding. *Proc. Nobel Symp.* 23. Chromosome identification techniques and application in biology and medicine (sous presse, 1973).
- Turpin, R., Lejeune, J.: Les chromosomes humains. Paris: Edit. Gauthier Villars 1965.

Reçu le 23 Janvier 1973 / Accepté par H. Bauer
Bon à imprimer le 26 Janvier 1973

Dr. J. Dutrillaux
Chaire de Génétique
Institut de Progénèse (Professeur J. Lejeune)
Faculté de Médecine
15, rue de l'Ecole de Médecine
Paris 75006
France