

ETUDE DU CARYOTIPE BOVIN PAR UNE NOUVELLE METHODE CYTOGENETIQUE: LES BANDES C (1)

Study of cattle caryotype by a new cytogenetic method: the C bands

Estudio del cariotipo bovino por una nueva técnica citogenética:
las bandas C

C. P. POPESCU *
Jeannine BOSCHER **

On dispose actuellement de plusieurs techniques qui produisent des bandes spécifiques sur chaque paire chromosomique et facilitent leur individualisation. L'une d'elles colore d'une manière préférentielle un type particulier de chromatine, l'hétérochromatine constitutive (bandes C) situé généralement dans la région péracentromérique et contenant un ADN hautement répétitif. Le mécanisme de formation des bandes C n'est pas encore élucidé. On a avancé l'hypothèse d'une réassociation différentielle de l'ADN (ARRIGHI et HSU, 1971) ou d'une condensation différentielle de la chromatine (McKAY, 1973) mais on y attribue également un rôle important à l'interaction entre l'ADN et les protéines non-histones (COMINGS *et al.*, 1973). Malgré la méconnaissance du mode de formation des bandes C, cette méthode a contribué à l'individualisation des chromosomes de plusieurs espèces (ARRIGHI et HSU, 1971; HSU et ARRIGHI, 1971) et la mise en évidence d'un polymorphisme dans des populations humaines (CRAIG-HOLMES, 1971; LUBS et RUDDE, 1971; KIM, 1973) et animales (FODEJT, 1973).

En plus, la coloration spécifique de l'hétérochromatine constitutive, représente une nouvelle approche pour la connaissance de la nature exacte de certaines anomalies chromosomiques qui impliquent la région centrométrique, telles les translocations robertsoniennes.

Dans une publication précédente (POPESCU, 1973a) nous avons décrit les bandes C, par la méthode de ARRIGHI et HSU (1971), dans le caryotype normal des bovins et dans le caryotype porteur d'une translocation robertsonienne, fréquen-

* U. N. C. E. I. A. et Laboratoire de Génétique Factorielle, Centre National de Recherches Zootechniques (CNRZ), Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Domaine de Vilvert, 78350 Jouy-en-Josas, France.

** Collaboratrice technique.

(1) Ce travail a été partiellement financé par la D. G. R. S. T. (Contrat n° 72.7.0379).

ment rencontrée dans cette espèce. Nous avons entrepris par la suite une étude systématique sur un nombre important d'animaux en vue de déceler un éventuel polymorphisme de l'hétérochromatine constitutive. Pour obtenir les bandes C sur un grand nombre de préparations chromosomiques, nous avons légèrement modifié et adapté aux chromosomes bovins, la technique de SUMNER (1972). La description de cette technique et les résultats de son application sur des caryotypes normaux et porteurs de la fusion robertsonienne, constituent le sujet de cette note.

MATERIEL ET MÉTHODE

Cultures cellulaires.—Des cultures de sang total ont été pratiquées selon la méthode de GROUCHY et coll. (1964) sur de nombreux animaux normaux ou porteurs d'une translocation de type robertsonien, décrite premièrement en Suède (GUSTAVSSON et ROCKBORN, 1966; GUSTAVSSON, 1966, 1969) et retrouvée ensuite en France (POPESCU, 1971, 1973b).

Après le blocage à la colchicine et le choc hypotonique les préparations chromosomiques ont été faites par séchage à l'air, sans flamme.

Les bandes C.—Les lames ont été traitées selon la méthode de SUMNER (1972) légèrement modifiée. Ainsi le traitement à l'acide chlorhydrique a été supprimé et les lames plongées directement dans une solution saturée d'hydroxide de baryte chauffée à 50 °C pour 15 minutes. Après un rinçage rapide dans l'eau déminéralisée les lames sont incubées 1 h 45 à 60 °C dans une solution 2 × SSC (0,3 M chlorure de sodium et 0,3 M citrate trisodique) au pH 7, rincées à l'eau déminéralisée et colorées 10 mn au Giemsa.

Etude en fluorescence.—Une partie des lames traitées selon la technique décrite ont été colorées à l'acridine orange et étudiées en fluorescence, à l'aide d'un microscope Leitz-Ortholux. L'équipement pour la fluorescence était un illuminateur Ploem avec une lampe H 13 200, un filtre d'excitation BG-12, deux filtres interférentiels KP 490 et un filtre d'arrêt K 510. Les microphotographies ont été prises avec un Leitz-Orthomat sur un film Kodak Tri X en noir et blanc et Ansochrome 500 ASA en couleurs.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

La méthode de SUMNER avec les légères modifications apportées s'avère supérieure à l'ancienne méthode de ARRIGHI et HSU (1971) pour plusieurs raisons. Elle est beaucoup plus rapide, puisque la durée de la renaturation est ramenée de 16 heures à 1 h 45' et plus constante puisque la plupart des cellules traitées, l'hétérochromatine constitutive devient visible. De plus la structure des chromosomes est mieux conservée (Figure 1) et elle donne des résultats satisfaisants même sur des lames colorées auparavant à l'acridine orange ou quinacrine.

L'hétérochromatine constitutive est située sur tous les autosomes de *Bos taurus*, dans la région péricentromérique (HANSEN, 1973; POPESCU, 1973). En raison de leur disposition uniforme, les bandes C ne peuvent pas servir à l'identification des chromosomes de cette espèce. On constate toutefois, que sur certains chromosomes, l'hétérochromatine constitutive présente un aspect particulier (Figure 1).

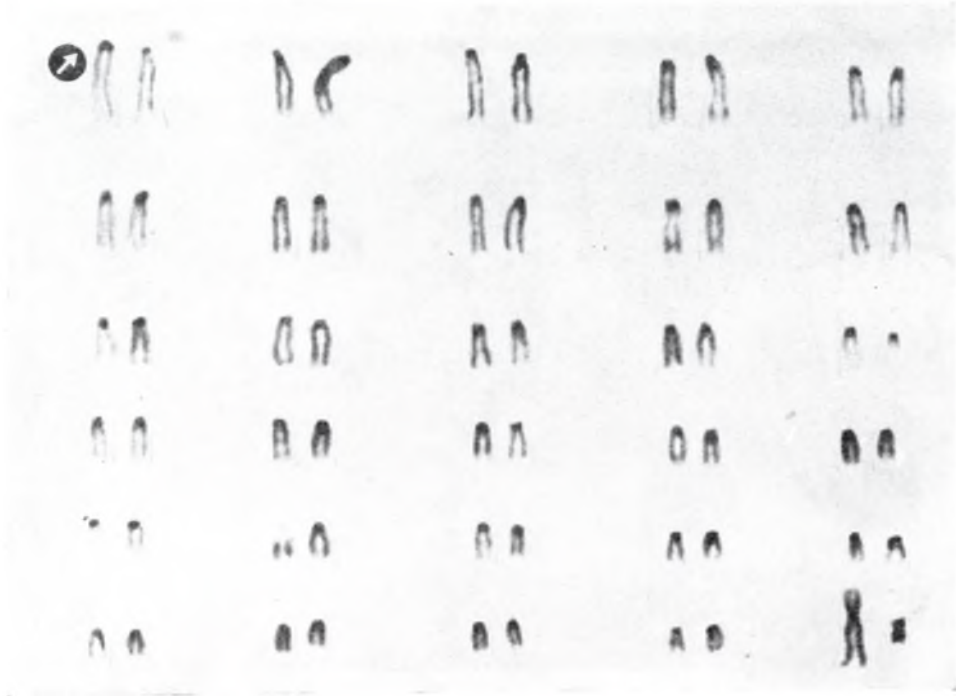


FIG. 1. Caryotype traité par la technique de SUMNER. A remarquer la différence de tailles des blocs H. C. sur la paire N. 1 (marquée par une flèche).

Chez l'homme, plusieurs auteurs ont décrit un polymorphisme de l'hétérochromatine constitutive (LUBS et RUDDLE, 1971; CRAIG-HOLMES *et al.*, 1971; KIM, 1973). Chez la souris on a également trouvé un polymorphisme dans des populations sauvages ou dans certaines lignées, conservé depuis de nombreuses générations (FORET, 1973). Chez *Bos taurus*, la mise en évidence d'un tel phénomène est très difficile à cause de l'uniformité des autosomes, tous acrocentriques, et de leur nombre relativement élevé. Toutefois, sur la seule paire autosomale identifiable par les techniques courantes dans le caryotype bovin, la première, on remarque chez certains individus, que les deux homologues ne contiennent pas la même quantité d'hétérochromatine constitutive (Figure 1). Le chromosome X montre, lui aussi, un aspect variable. Ainsi, il présente parfois dans les régions adjacentes au centromère une coloration intermédiaire entre le reste de la chromatine, assez claire, et les régions centromériques des autosomes, très foncées (POPESCU, 1973). Chez d'autres individus au contraire, l'X apparaît coloré d'une manière uniforme et semble complètement dépourvu d'hétérochromatine constitutive. Ces différences de colorations sont infimes et sans une détermination quantitative précise, il est difficile d'exclure la possibilité d'un artefact.

A l'origine de cette variabilité quantitative de l'hétérochromatine constitutive, il peut y avoir des *crossingovers* inégaux, dont la formation serait facilité par la

nature hautement répétitive de l'ADN qui la constitue (FOREJT, 1973). Du point de vue phénotypique, le polymorphisme de l'hétérochromatine constitutive devrait être neutre, mais il serait intéressant de l'étudier en tant que marqueur génétique.

Nous avons décrit le néo-chromosome formé par une fusion de type robertsonien, comme un monocentrique (POPESCU, 1973). En effet, il présente un seul bloc d'hétérochromatine constitutive situé sur le bras long, visible également par la coloration aux fluorochromes. Cette observation est confirmée sur d'autres animaux hétérozygotes pour cette anomalie (Figure 2) aussi bien en lumière normale qu'en fluorescence. COMINGS et OKADA (1970) ont été les premiers à montrer l'existence des chromosomes fusionnés dicentriques. Depuis, d'autres auteurs ont trouvé chez l'homme (NIEBUHR, 1972a, b; CHANDLEY *et al.*, 1973; HSU *et al.*, 1973) dans certains cas de translocations, des chromosomes dicentriques, aussi bien que des monocentriques. NIEBUHR (1972b) pense que les néo-chromosomes dicentriques seraient instables et de ce fait moins fréquents que les monocentriques. EVANS

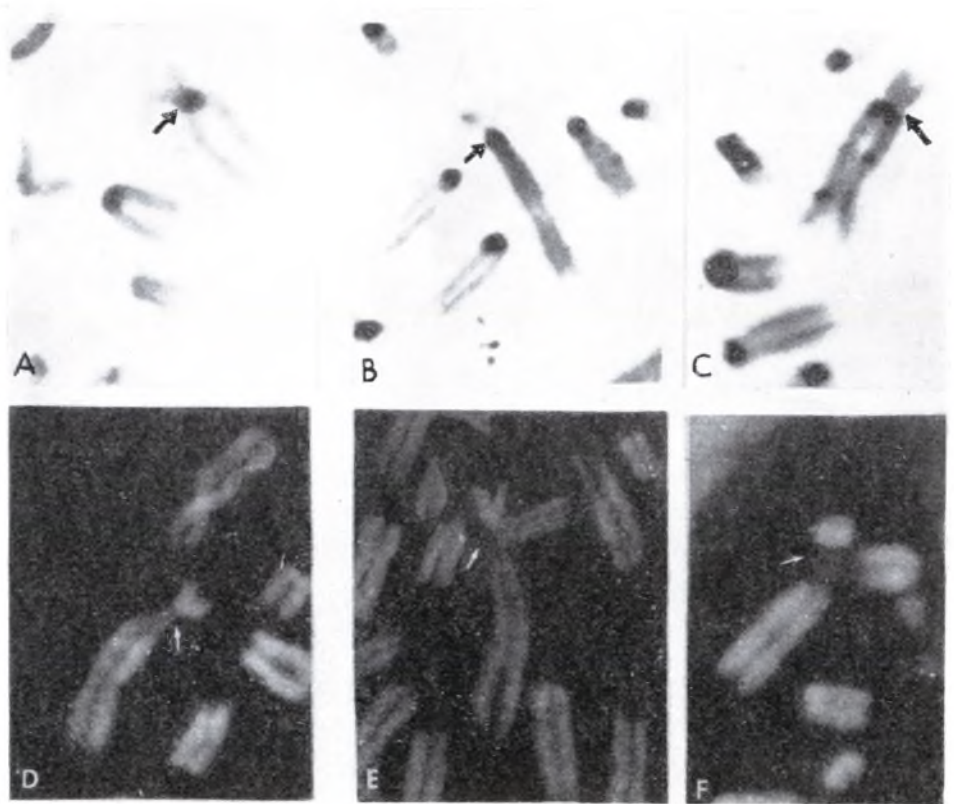


FIG. 2. a), b), c). Trois chromosomes fusionnés traités par la même technique. Le bloc d'H.C. marqué par une flèche. d), e), f). Trois chromosomes fusionnés colorés à la quinacrine moutarde. Les régions faiblement colorées, correspondent à l'H.C., marqués par un eflèche.

et al. (1973) affirment de leur côté que les dicentriques seraient présents dans les fusions récentes et deviendraient par la suite des monocentriques. Ils trouvent en effet un seul bloc hétérochromatique dans les chromosomes métacentriques du mouton et deux blocs sur un néo-chromosome de chèvre, considéré d'origine récente. Chez *Mus poschiavinus*, espèce également récente, tous les néochromosomes métacentriques contiennent deux blocs hétérochromatiques (FOREJT, 1973).

Chez les bovins, il serait intéressant de savoir si le chromosome fusionné se présente toujours comme un monocentrique et ceci pour deux raisons: d'une part pour établir une homologie éventuelle de l'anomalie décrite actuellement dans plus de 10 races différentes et d'autre part, pour établir son origine.

Parmi les nombreux types de translocation décrites comme fusions centriques en cytogénétique humaine et animale, une bonne part pourrait être en réalité des translocations réciproques (HSU *et al.*, 1973). La méthode de coloration de l'hétérochromatine constitutive (les bandes C) représente dans ce sens un moyen d'investigation précieux.

SUMMARY

The SUMNER's technique has been applied to demonstrate constitutive heterochromatine (C. H.) in cattle. A polymorphism of C. H. has been described in chromosome N.° 1. The both fluorescence and C bands pattern indicated that the chromosome originated by centric fusion is a monocentric. The nature of this translocation is discussed.

RESUMEN

El método de SUMNER, que pone en evidencia las bandas C, fue utilizado para el estudio de cromosomas bovinos. Utilizando esta técnica se pudo demostrar un polimorfismo 1. Utilizando esta misma técnica y la microscopia de fluorescencia, se confirmó que el neocromosoma formado después de la translocación robertsoniana es monocéntrico. Se discute además la naturaleza de esta translocación.

BIBLIOGRAPHIE

- ARRIGHI, F. E.; HSU, T. C.; SAUNDERS, P.; SAUNDERS, F. G. (1970): Localization of repetitive DNA in the chromosomes of *Microtus agrestis* by means of *in situ*-hybridization. *Chromosomes*, 32 (2), 224-236 (374/P).
- ARRIGHI, F. E.; HSU, T. C. (1971): Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics*, 10 (2), 81-86 (*Génétique*).
- COMINGS, D. E.; OKADA, T. A. (1970): Whole-mount electron microscopy of the centromere region of metacentric and telocentric mammalian chromosomes. *Cytogenetics*, 9 (6), 436-449 (*Génétique*).
- COMINGS, D. E.; AVELINO, E.; OKADA, T. A.; WYANDT, H. E. (1973): The mechanism of C— and G— banding chromosomes. *Exp. Cell. Res.*, 77 (1-2), 469-493 (275/P).
- CRAIG-HOLMES, P. Ann; SHAW, M. Margery (1971): Polymorphism of human constitutive hétérochromatine. *Science*, 174:702-704.
- EVANS, H. J.; BUCKLAND, R. A.; SUMNER, A. T. (1973): Chromosome homology and heterochromatine. *Science*, 174:702-704.
- FOREJT, J. (1973): Centromeric Heterochromatin Polymorphism in the House Mouse. Evidence from Inbred Strains and Natural Populations. *Chromosoma*, 43 (2), 187-202 (374/P).
- GROUCHY, J. de; ROUBIN, P.; PASSAGE, E. (1964): Microtechnique pour l'étude des chromosomes humains à partir d'une culture de leucocytes sanguins. *Ann. Génét.*, 7:45.

- GUSTAVSSON, I.; ROCKBORN, G. (1964): Chromosome abnormality in three cases of lymphatic leukaemia in cattle. *Nature* (Lond.), 203, 990.
- GUSTAVSSON, I. (1966): Chromosome abnormality in cattle. *Nature* (Lond.), 211, 865-866.
- GUSTAVSSON, I. (1969): Cytogenetics, distribution and phenotypic effects of a translocation in swedish cattle. *Hereditas*, 63 (1-2), 68-169 (96/P).
- HANSEN, K. M. (1973): Heterochromatin C bands in bovine chromosomes. *Hereditas*, 73 (1), 65-69 (96/P).
- HSU, T. C.; ARRIGHI, F. E. (1971): Distribution of constitutive heterochromatin in mammalian chromosomes. *Chromosoma*, 34 (3), 243-253 (374/P).
- HSU, L. Y. F.; KIM, H. J.; SUJANSKY, E.; KOUSSEFF, B.; HIRSCHHORN, K. (1973): Reciprocal translocation versus centric fusion between two No. 13 chromosomes. A case of 46, XX—13 + (13; 13) (p 12; q 13) and a case of 46, XY, —13, + t (13; 13) (p 12; p 12). *Cytogenet. Cell. Genet.*, 12 (4), 235-244.
- KIM, MY, A. (1973): Polymorphismus des konstitutiven Heterochromatins bei menschlichen A-1 Metaphasechromosomen. *Human Genetik*, 18:213-217.
- LUBS, H. A.; RUDDLE, F. H. (1971): Chromosome polymorphism in american negro and white populations, *Nature*, 233: 134-136.
- MCKAY, R. D. G. (1973): The mechanism of G and C banding in mammalian metaphase chromosomes. *Chromosoma*, 44 (1), 1-4 (374/P).
- NIEBUHR, E. (1972a): Unusual findings by fluorescence microscopy of r t (13 q 14). *Human Genetik*, 15:96-98.
- NIEBUHR, E. (1972b): Dicentric and monocentric robertsonian traslocation in man. *Human Genetik*, 16, 217-226.
- POPESCU, C. P. (1971): Deux cas nouveaux de fusion centrique chez les bovins. *Annls. Genet. Selection Anim.*, 3 (4), 521-526 (1080/P).
- POPESCU, C. P. (1973a): L'hétérochromatine constitutive dans le caryotype bovin normal et anormal. *Ann. Génét.*, 16:183-188.
- POPESCU, C. P. (1973b): Nouvelles observations sur une fusion centrique chez *Bos taurus* L. *Ann. Génét. Selection Anim.*, 5 (4), 435-440.
- SUMMER, A. T. (1972): A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin, *Exp. Cell. Res.*, 75 (1), 304-306 (275/P).