

Condensation des chromosomes associée à la mitose

Charles-Philippe
Leblond
Mohamed El-Alfy

Y a-t-il une relation directe entre la condensation des chromosomes et la synthèse de l'ADN ? Pour répondre à cette question, on a localisé l'ADN néosynthétisé et analysé la structure de la chromatine au cours de la mitose divisée en 11 stades. La synthèse de l'ADN a toujours lieu le long de nucléofilaments composés de rangées de nucléosomes larges de 11 nm, libres dans le nucléoplasme, compactés dans l'hétérochromatine ou attachés à sa surface. Au cours de la première étape de la condensation des chromosomes, les réplicons qui ont synthétisé leur ADN s'assemblent pour former d'abord des nucléofilaments compactés, puis des amas de chromatine et des protubérances. Au cours de la deuxième étape, qui dure moins de cinq minutes lors de la prophase, les amas et les protubérances s'agrègent et se transforment en chromomères. Au cours de la troisième étape, enfin, les chromomères s'approchent les uns des autres et se fondent pour donner naissance aux chromosomes mitotiques.

Dans la plupart des organes, les cellules ne se divisent que rarement ou pas du tout; ces cellules seront décrites sous l'épithète « stables ». En revanche, dans les organes hématopoïétiques et dans plusieurs épithéliums, les cellules se divisent à un rythme rapide. Ainsi, les cellules cylindriques qui tapissent les cryptes du duodénum de la souris entrent en division toutes les douze heures [1]. Les changements intervenant entre le début d'une mitose et celui de la suivante constituent le « cycle cellulaire »; ces cellules seront donc décrites sous l'épithète « cycliques ».

Les mécanismes biochimiques responsables du déroulement du cycle cellulaire sont de mieux en mieux

connus [2-4], mais les changements morphologiques qui y sont associés sont restés obscurs. On divise simplement le cycle en deux parties: la « mitose », au cours de laquelle on observe les images typiques de la division d'une cellule en deux cellules filles, et la « période intermitotique » ou « interphase » qui ne présente généralement pas d'image caractéristique. Cependant, en utilisant des coupes semifines de cryptes duodénaux colorées par des méthodes qui font ressortir l'ADN, en particulier la méthode de Feulgen spécifique de l'ADN [5], il est possible de distinguer des modifications structurales qui permettent de subdiviser l'interphase en sept stades; en y ajoutant les quatre stades de la mitose, nous avons divisé le cycle cellulaire en

ADRESSE

C.P. Leblond: *professeur*. M. El-Alfy: *professeur adjoint*. Département d'anatomie et de biologie cellulaire, Université McGill, 3640, rue de l'Université, Montréal, Québec, H3A 2B2 Canada.

RÉFÉRENCES

1. El-Alfy M, Leblond CP. Long duration of mitosis and consequences for the cell cycle concept, as seen in the isthmal cells of the mouse pyloric antrum. II. Duration of mitotic phases and cycle stages, and their relation to one another. *Cell Tissue Kinet* 1987; 20: 215-26.
2. Nasmyth K. Viewpoint: putting the cell cycle in order. *Science* 1996; 274: 1643-5.
3. King RW, Deshaies RJ, Peters JM, Kirschner MW. How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 1996; 274: 1652-8.
4. Ellidge SJ. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 1996; 274: 1664-71.
5. Feulgen R, Rossenbeck H. Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nukleinsäure vom Typus der Thymonukleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. *Z Physiol Chem* 1924; 135: 203-49.
6. El-Alfy M, Turner JP, Nadler NJ, Liu DF, Leblond CP. Subdivision of the mitotic cycle into eleven stages on the basis of the chromosome changes observed in mouse duodenal crypt cells stained by the DNA-specific Feulgen reaction. *Anat Rec* 1994; 238: 289-96.
7. Cogliati MR, Gauthier A. Mise en évidence de l'ADN et des polysaccharides à l'aide d'un nouveau réactif de type Schiff. *CR Acad Sci Paris* 1973; 276: 3041-4.
8. Koshland D, Strunnikov A. Mitotic chromosome condensation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996; 12: 305-35.

onze stades [6]. Récemment, l'un des stades (stade VI) a été subdivisé en deux sous-stades (*Tableau I*). En 1973, Cogliati et Gauthier ont modifié la méthode de Feulgen en y remplaçant la leucofuchisine par l'osmium-ammine [7]; l'osmium étant opaque aux électrons, cette méthode permet de localiser l'ADN en microscopie électronique. Nous avons utilisé la méthode ainsi modifiée pour l'examen de l'ADN du noyau dans deux types de cellules de souris: l'hépatocyte comme modèle des cellules stables et la cellule cylindrique des cryptes duodénales comme modèle des cellules cycliques. On admet généralement que chaque chromosome n'inclut qu'une seule molécule d'ADN, mais qu'elle est extrêmement longue. Tout au long de son trajet, cette molécule riche en résidus acides s'associe à une succession de petits groupes de huit protéines riches en résidus basiques, les histones; la molécule d'ADN s'enroule autour de chaque groupe pour former de petites structures d'un diamètre de 11 nm, les nucléosomes, qui se répètent le long de la molécule comme les perles le long du fil d'un collier. Elle apparaît donc sous la forme d'une file de nucléosomes que l'on décrit en microscopie électronique sous le nom de nucléofilament. La description de ces nucléofilaments après coloration à

l'osmium-ammine servira d'introduction à l'examen des noyaux des cellules stables et, par la suite, à l'étude détaillée des changements qui prennent place dans les noyaux des cellules cycliques. L'un des aspects caractéristiques du cycle cellulaire est la condensation des chromosomes. On a accompli de grands progrès dans l'étude des facteurs biochimiques impliqués dans la condensation [8], mais les changements morphologiques qui l'accompagnent sont mal connus. On admet généralement que la condensation commence à la prophase et atteint son point culminant à la métaphase. Cependant, Gurley *et al.* ont décrit l'apparition d'amas de chromatine au cours d'une période qu'ils nomment la préprophase [9]. Afin d'examiner en détail les changements morphologiques avant, pendant, après la prophase et leur relation avec la condensation, nous avons utilisé la réaction à l'osmium-ammine. Nous avons ainsi pu voir que la condensation commence dès le début de la phase S du cycle cellulaire, c'est-à-dire peu après le début de la synthèse de l'ADN, et se termine à la fin de la prométaphase [10]. Afin d'examiner s'il y a une relation directe entre la condensation des chromosomes et la synthèse de l'ADN, nous avons localisé cette synthèse à l'aide d'un précurseur de

Tableau I			
CORRESPONDANCE ENTRE LA NOMENCLATURE USUELLE, LES PHASES ET LES STADES DU CYCLE CELLULAIRE			
Nomenclature usuelle	Phases biochimiques [16]	Stades morphologiques [6]	Durée des stades (min) [10]
Prémitotiques			
Interphase	G1-S	I	40
Interphase	S	II	90
Interphase	S	III	228
Interphase	S-G2	IV	60
Mitotiques			
Prophase	M	V	6
Prométaphase	M	VIa	6
Métaphase	M	VIb	18
Anaphase	M	VII	9
Télophase	M	VIII	12
Postmitotiques			
Interphase	G1	IX	24
Interphase	G1	X	90
Interphase	G1	XI	96

l'ADN, la bromodésoxyuridine (BrdU), un analogue de la thymidine qui, comme elle, est incorporé dans les régions de la molécule d'ADN où se fait la synthèse. Ces sites de synthèse peuvent ainsi être caractérisés par rapport à ceux qui sont impliqués dans la condensation [11].

Condensation des chromosomes

Des souris albinos âgées de trois mois ont été anesthésiées au pentobarbital de sodium. Des échantillons de duodénum et de foie ont été prélevés puis fixés par le paraformaldéhyde à 4% et des coupes fines ont été colorées sur grille par l'osmium-ammine en utilisant la méthode modifiée par Liu *et al.* [12]. Les coupes ont été examinées à l'aide d'un microscope Philips EM 400.

D'autres souris ont reçu une injection intraveineuse de 200 µl de sérum salé contenant 5 mg de 5-bromo-2-désoxyuridine (BrdU) et ont été sacrifiées 10 minutes, 1 heure, 2 heures, 4 heures ou 6 heures plus tard; après la préparation de coupes fines comme indiqué plus haut, elles ont été colorées à l'osmium-ammine, exposées à un anticorps monoclonal dirigé contre le BrdU et, après lavage, mises au contact de l'anticorps murin dirigé contre les IgG murines combiné à des particules d'or colloïdal de 8 nm. La localisation des particules au microscope électronique révèle celle du BrdU incorporé dans les sites de synthèse d'ADN.

Dans toutes les cellules colorées par l'osmium-ammine, qu'elles soient stables ou cycliques, le matériel réactif apparaît au microscope électronique entièrement composé de portions de nucléofilaments. La plupart d'entre eux apparaissent sous la forme d'une file de petits cercles d'un diamètre de 11 nm opaques aux électrons mais dont le centre ne l'est pas (figure 1A). On rencontre, à l'occasion, des nucléofilaments quelque peu différents [10], mais tout l'ADN révélé par l'osmium-ammine est organisé en nucléofilaments.

• Cellules stables

Dans l'hépatocyte de la souris, les nucléofilaments sont organisés de trois façons différentes. (1) Ils sont dits « libres » lorsqu'ils sont indépen-

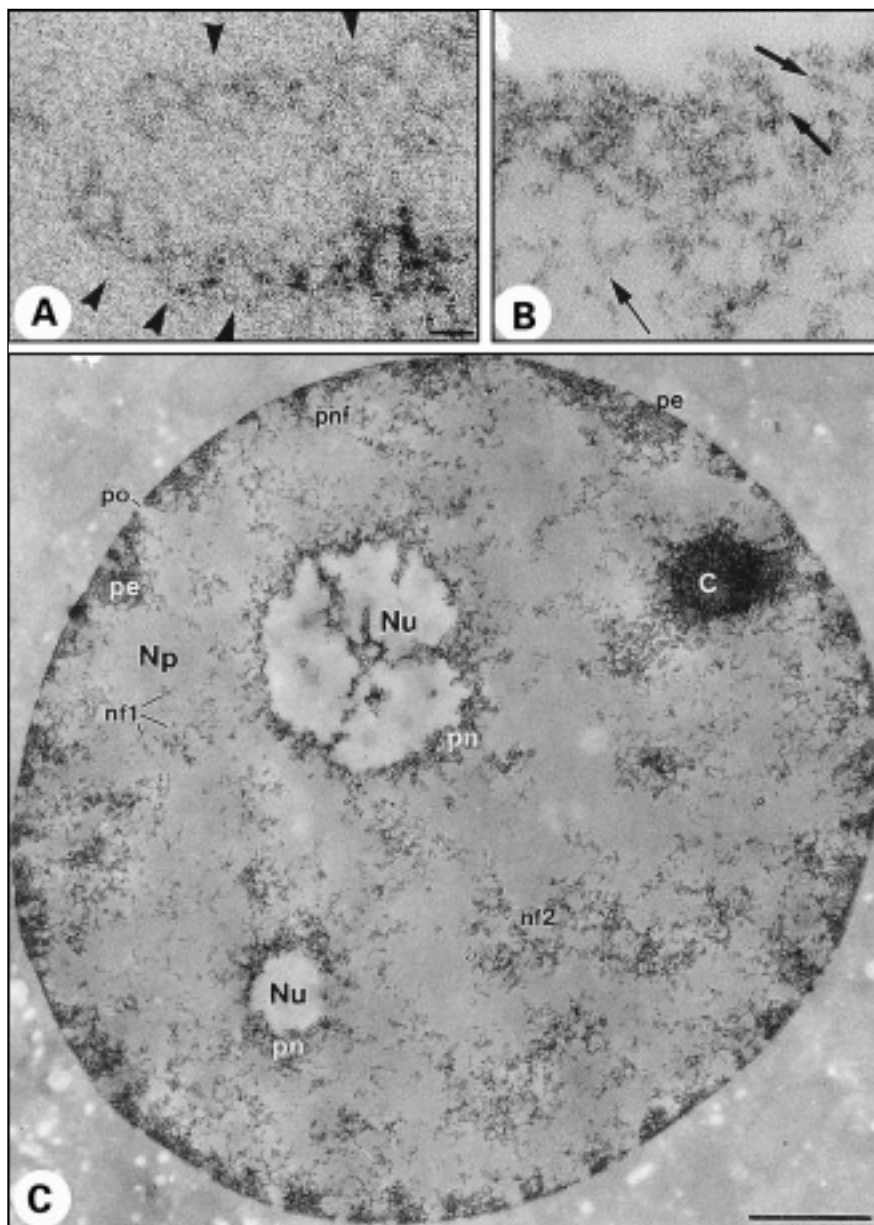


Figure 1. **Nucléofilaments observés à divers grossissements.** **A. Grossissement x 645 000.** Les deux nucléofilaments sont composés d'une série de cercles adjacents représentant l'ADN à la surface des nucléosomes (pointes de flèche) dont il est le seul élément coloré. Barre: 10 nm. **B. x 125 000.** Hépatocyte montrant les nucléofilaments à un plus faible grossissement. La partie claire en haut de la figure représente le nucléole non coloré. Au-dessous, l'hétérochromatine paranucléolaire dans laquelle les nucléofilaments sont compactés, un artefact permettant de les distinguer individuellement (flèches en haut et à droite). Dans le nucléoplasme, à la base de la figure, les nucléofilaments sont attachés à l'hétérochromatine (flèche en bas et à gauche). Barre: 100 nm. **C. x 17500.** Hépatocyte vu à un moyen grossissement. Le long de la surface du noyau se trouve l'hétérochromatine périphérique (pe) interrompue par les pores nucléaires (po); l'hétérochromatine paranucléolaire (pn) est autour et à l'intérieur des nucléoles clairs (Nu); il y a aussi un groupe d'hétérochromatine isolée (c). Le nucléoplasme présente de nombreux nucléofilaments libres (nf1, nf2) ou attachés (pnf), excepté dans quelques régions qui en sont dépourvues (Np). Barre: 1000 nm. Micrographies d'organes de souris après fixation au paraformaldéhyde et coloration à l'osmium-ammine sur coupes fines. (D'après [10] avec permission.)

dants les uns des autres ou qu'ils ne sont en contact qu'en quelque point précis. Ainsi, dans la *figure 1C*, les nucléofilaments libres sont disséminés à travers le nucléoplasme. (2) Ils sont dits « compactés » quand ils sont étroitement accolés les uns aux autres; ils forment ainsi des groupes de taille variable qui, dans les cellules stables, constituent l'hétérochromatine (*figures 1B, 1C*). (3) Ils sont dits « attachés » lorsque l'une de leurs extrémités est implantée dans de l'hétérochromatine, le reste étant libre. Les nucléofilaments compactés forment plusieurs types d'hétérochromatine: « périphérique » à la surface interne du noyau, « paranucléolaire » autour et à l'intérieur du nucléole, et « isolée » en l'absence de contact avec les deux autres. Les trois types se retrouvent dans la *figure 1C*.

• Cellules cycliques

Contrairement aux hépatocytes dont le noyau est semblable d'une cellule à l'autre, les cellules cycliques des cryptes duodénales ont des noyaux extrêmement différents, qui ont été classés en 11 types correspondant aux 11 stades du cycle cellulaire (*Tableau I*).

Au stade I, le noyau ressemble à celui des cellules stables. Ainsi, la *figure 2A* montre des nucléofilaments libres disséminés au travers du nucléoplasme, des nucléofilaments compactés formant les hétérochromatines périphérique et paranucléolaire et, à leur surface, des nucléofilaments attachés. Nous avons montré que la phase S du cycle cellulaire commence vers le milieu du stade I [6]; on en conclut que le noyau des cellules cycliques ressemble à celui des cellules stables juste avant et au début de la phase S.

Au cours des stades II-IV, nous observons l'image caractéristique de la phase S, c'est-à-dire la présence de multiples groupes de nucléofilaments compactés, nommés « amas » de chromatine ou simplement « amas ». Ces groupes sont épars dans le nucléoplasme; il existe à leur surface des nucléofilaments « attachés » comme à la surface de l'hétérochromatine. Au stade II (*figure 2B*), les amas sont nombreux, mais petits; on les définit par leur diamètre, inférieur à 114 nm. Au stade III (*figure 2C*) apparaissent un certain nombre d'amas de taille moyenne dont le diamètre varie entre 114 et

285 nm, alors que le nombre de petits amas est réduit. Au stade IV (*figure 3A*), des amas de grande taille, dont le diamètre excède 285 nm, font leur apparition parmi les amas moyens et petits. Pendant le passage du stade III au stade IV, le nombre de nucléofilaments libres diminue au fur et à mesure que les amas augmentent de taille, comme si les nucléofilaments libres étaient incorporés dans les amas. Une autre caractéristique de la phase S est nettement visible au stade III; c'est l'apparition de protubérances à la surface interne de l'hétérochromatine périphérique, des protubérances de plus petite taille se formant le long de l'hétérochromatine paranucléolaire. Elles sont composées de nucléofilaments compactés et leur surface porte des nucléofilaments attachés. Au cours des stades III et IV, ces protubérances s'accroissent peu à peu (*figures 2C, 3A*), tandis que l'hétérochromatine qui leur est associée s'amenuise et, généralement, disparaît. Au cours du stade IV, à la fin de la phase S, nous estimons qu'il y a en moyenne dans le noyau 821 amas et 350 protubérances, soit un total de 1 171 nouvelles entités composées de nucléofilaments compactés. Au fort grossissement, nous notons que l'organisation compacte des nucléofilaments dans ces entités est identique à celle que l'on observe dans les chromosomes mitotiques. Compton *et al.* (Strasbourg, France), à l'aide de méthodes différentes, ont aussi observé que la structure de la chromatine de l'interphase est la même que celle des chromosomes mitotiques [13]. Nous en concluons que la condensation des chromosomes mitotiques commence par la formation des amas et des protubérances, première étape de la condensation. Au stade V, correspondant à la prophase, un changement spectaculaire se produit. Les 1 171 amas et protubérances de toutes tailles disparaissent ainsi que les quelques nucléofilaments qui avaient persisté jusque-là. Ils sont remplacés par des structures sphéroïdales, d'un diamètre d'environ 600 nm (*figure 3B*), qui sont en moyenne 288 par noyau et qui sont composées de nucléofilaments compactés. Elles ont été décrites autrefois en microscopie optique et identifiées sous le nom de « chromomères » [14]. Entre ces chromomères, le nucléo-

RÉFÉRENCES

- Gurley LR, D'Anna JA, Barham SS, Deaven LL, Tobey RA. Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis in Chinese hamster cells. *Eur J Biochem* 1978; 84 : 1-15.
- El-Alfy M, Liu DF, Leblond CP. DNA changes observed in the formation of metaphase chromosomes, as observed in mouse duodenal crypt cells stained by osmium-amine. I. New structures arise during the S phase and condense at prophase into « chromomeres », which fuse at prometaphase into mitotic chromosomes. *Anat Rec* 1995; 242 : 443-8.
- Liu DF, El-Alfy M, Leblond CP. DNA changes involved in the formation of metaphase chromosomes, as observed in mouse duodenal crypt cells stained by osmium-amine. II : Tracing nascent DNA by bromodeoxyuridine into structures arising during the S phase. *Anat Rec* 1995; 242 : 449-61.
- Liu DF, El-Alfy M, Leblond CP. Visualization of DNA within mitochondria by osmium-amine of mouse duodenal crypt cells. *J Cell Sci* 1992; 101 : 785-93.
- Compton JL, Hancock R, Oudet P, Chambon P. Biochemical and electronmicroscopy evidence that the subunit structure of Chinese-hamster-ovary interphase chromatin is conserved in mitotic chromosomes. *Eur J Biochem* 1976; 70 : 555-68.
- Wilson EB. *The cell in development and heredity*, 3rd ed. New York: MacMillan, 1925.
- Hand R. Eucaryotic DNA : organization of the genome for replication. *Cell* 1978; 15 : 317-25.
- Alberts B, Dennis B, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular biology of the cell*, 2nd ed. New York: Garland Publishing, 1989.

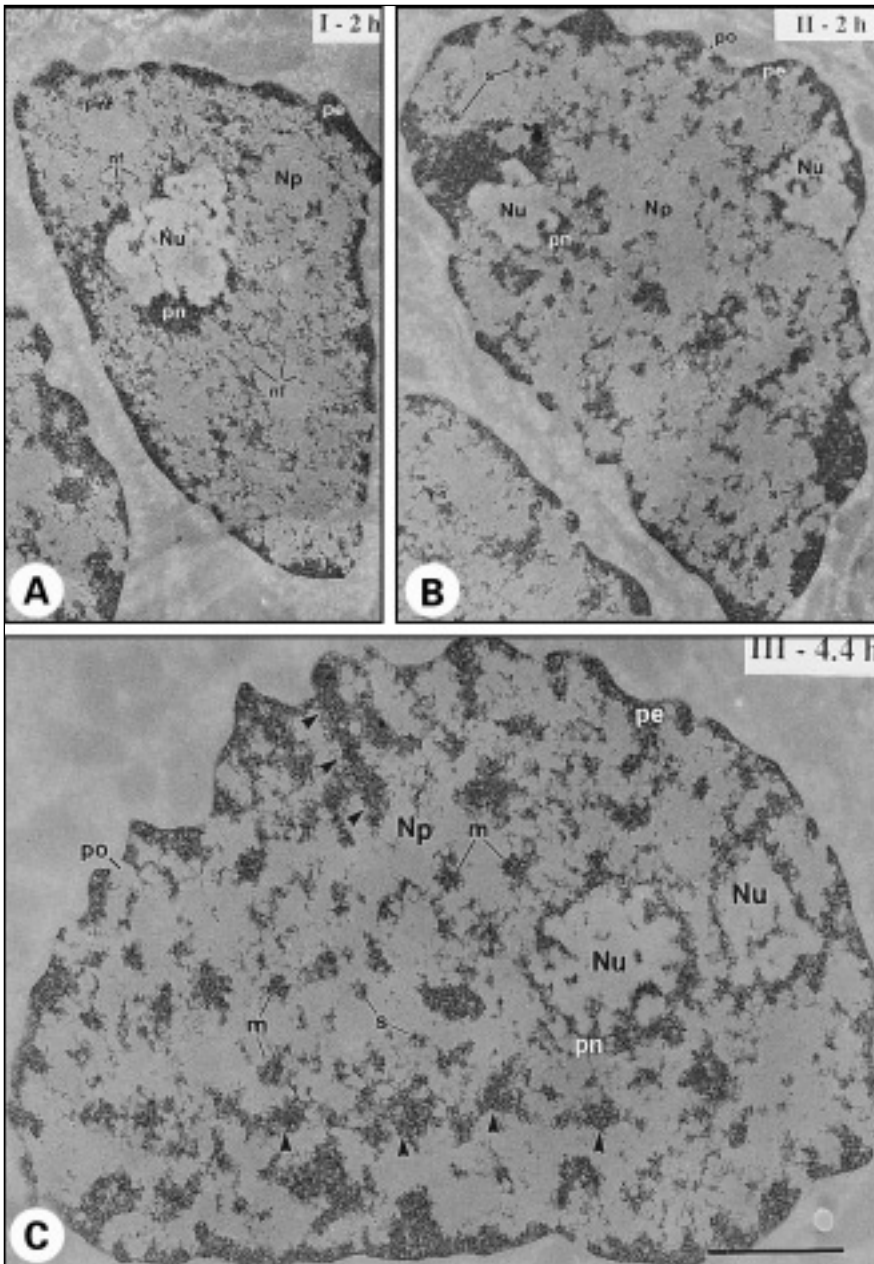


Figure 2. **Stades I, II, III de condensation des chromosomes mitotiques.** En haut de chaque figure, un nombre romain indique le stade et un nombre arabe la durée. **A. Noyau de ces cellules au stade I.** On observe une quantité de nucléofilaments libres (nf) distribués à travers le nucléoplasme, excepté dans des régions limitées (Np). Des nucléofilaments attachés (pnf) s'observent le long de l'hétérochromatine périphérique (pe) et de l'hétérochromatine paranucléolaire (pn). $\times 17500$. Barre: 1000nm pour les figures 4 à 12. **B. Stade II.** Le noyau est caractérisé par la présence d'amas dont la plupart sont de petite taille (s). Le nombre de nucléofilaments libres (nf) est moindre qu'au stade I. Les filaments attachés se distinguent le long de l'hétérochromatine et des amas. Quelques protubérances apparaissent à la surface de l'hétérochromatine périphérique (pe). $\times 17500$. **C. Stade III.** Les amas de taille moyenne (m) sont nombreux, mais on rencontre encore quelques petits amas (s). Les protubérances sont souvent de large taille à la surface interne de l'hétérochromatine périphérique (pe), comme celle indiquée par trois pointes de flèche au haut de la figure; à sa droite, il y a un amincissement de l'hétérochromatine. De petites protubérances sont présentes autour des nucléoles. Micrographies de cellules cylindriques des cryptes duodénales colorées à l'osmium-ammine. $\times 17500$. (D'après [10] avec permission.)

plasme apparaît vide. Cependant, leur surface présente des nucléofilaments attachés dont certains s'étendent jusqu'au chromomère voisin. En fait, ces connections entre les chromomères sont parfois très développées, pouvant ainsi les attacher les uns aux autres pour former des rangées plus ou moins régulières. En conclusion, 1171 amas et protubérances s'agglomèrent pour donner naissance à 288 chromomères: il y a donc condensation. En outre, les chromomères, comme les amas et les protubérances, sont composés de nucléofilaments compactés organisés

de la même manière que dans les chromosomes mitotiques. Nous considérons donc que la transformation des amas et des protubérances en chromomères est la seconde étape de la condensation de ces chromosomes. Le stade VI est subdivisé en deux sous-stades. Le premier ou stade VIa correspond à la prométaphase et, par conséquent, commence lorsque l'enveloppe nucléaire se désintègre. Dès le début, les rangées de chromomères sont mieux définies qu'au stade V. Puis, les chromomères de chaque rangée s'approchent les uns des autres, alors que les nucléofila-

ments qui les unissent deviennent de moins en moins visibles (figures 4A, B, C). En outre, les nucléofilaments attachés à leur surface disparaissent peu à peu. Finalement, les chromomères d'une rangée fusionnent avec leurs voisins pour donner naissance aux chromosomes mitotiques. La coalescence des chromomères et l'incorporation des nucléofilaments impliquent un certain degré de condensation. C'est donc la troisième et dernière étape de la condensation des chromosomes mitotiques. Au stade VIb, les chromosomes s'organisent en plaque équatoriale;

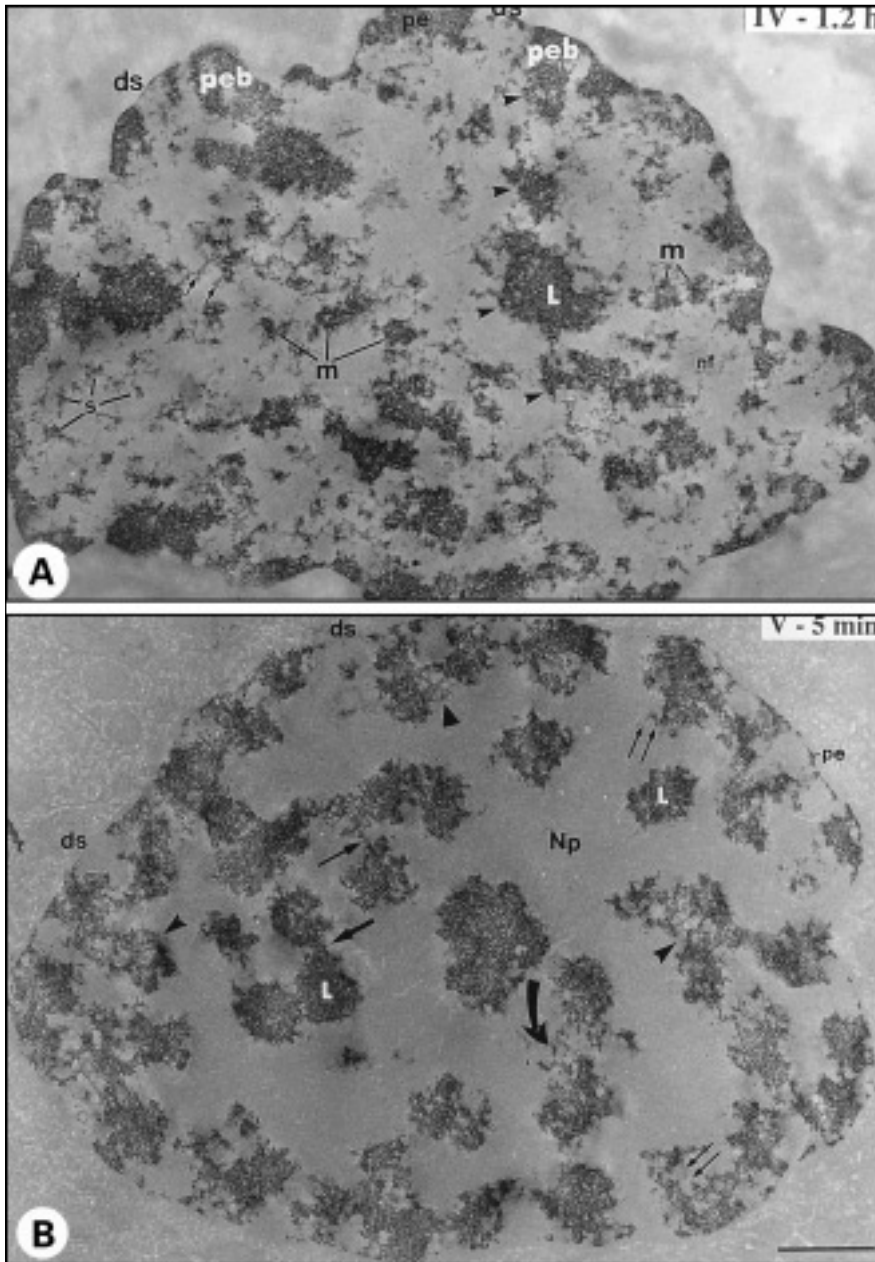


Figure 3. **Stades IV et V de condensation des chromosomes mitotiques.** **A. stade IV.** Des amas de grande taille (L) et de grosses protubérances (peb) s'observent parmi des protubérances et des amas de taille moyenne (m); il reste aussi quelques petits amas (s) et de rares nucléofilaments (nf). À la surface du noyau, on note des espaces dénudés entre les protubérances (ds). **B. stade V (prophase).** De larges structures sphéroïdales, les chromomères, se forment à partir des amas dans la région centrale et à partir des protubérances à la périphérie. Des nucléofilaments attachés peuvent être à leur surface (flèches en paire). À la surface du noyau, il ne reste qu'une quantité minimale d'hétérochromatine (pe). Les chromomères sont séparés les uns des autres par un nucléoplasme vide, mais la plupart d'entre eux sont reliés par des groupes de nucléofilaments formant des ponts plus ou moins épais (flèches), des réseaux (pointes de flèche) ou des liens irréguliers (flèche courbe). Il en résulte un alignement des chromomères en rangées plus ou moins distinctes. Micrographies de cellules cylindriques des cryptes duodénales colorées à l'osmium-ammine. $\times 17500$. (D'après [10] avec permission.)

nous observons alors les chromosomes mitotiques typiques (figure 5). Nous ne décrivons pas ici la suite de la mitose aux stades VII et VIII, ni la décondensation des chromosomes aux stades IX, X et XI.

Relation entre la condensation des chromosomes mitotiques et la synthèse de l'ADN

• Stade I

10 minutes après l'injection de BrdU, l'analyse des noyaux marqués révèle que les particules d'or se localisent sur des nucléofilaments libres ou très près d'eux (figure 6A). Cette observation implique que la synthèse d'ADN se fait le long de ces nucléofilaments. Il n'y a de particule d'or sur aucun des groupes d'hétérochromatine.

• Stade II

À 10 minutes, les particules d'or se retrouvent sur des nucléofilaments libres et surtout sur les nucléofilaments attachés aux petits amas, ces amas eux-mêmes n'en montrant pas. En revanche, à une heure, les particules d'or sont sur les petits amas (figure 6B). Cette localisation s'explique par l'incorporation dans les amas non seulement des nucléofilaments libres marqués aux stades I et II, mais aussi des nucléofilaments attachés marqués au stade II. Les nucléofilaments compactés dans les amas ont donc une double origine, les nucléofilaments libres et les nucléofilaments attachés à ces amas.

• Stade III

À 10 minutes, les particules d'or se trouvent généralement sur des nucléofilaments attachés, soit à des amas de taille moyenne, soit à de l'hétérochromatine. Elles ne sont ni sur les amas, ni sur l'hétérochromatine, ni sur les protubérances. En revanche, à une heure, les particules d'or se trouvent en deux endroits, sur des amas de taille moyenne et sur des protubérances. Il semble donc que, d'une part, les nucléofilaments marqués attachés aux amas soient incorporés dans ces amas et que, d'autre part, les nucléofilaments marqués attachés à l'hétérochromatine soient incorporés dans les protubérances.

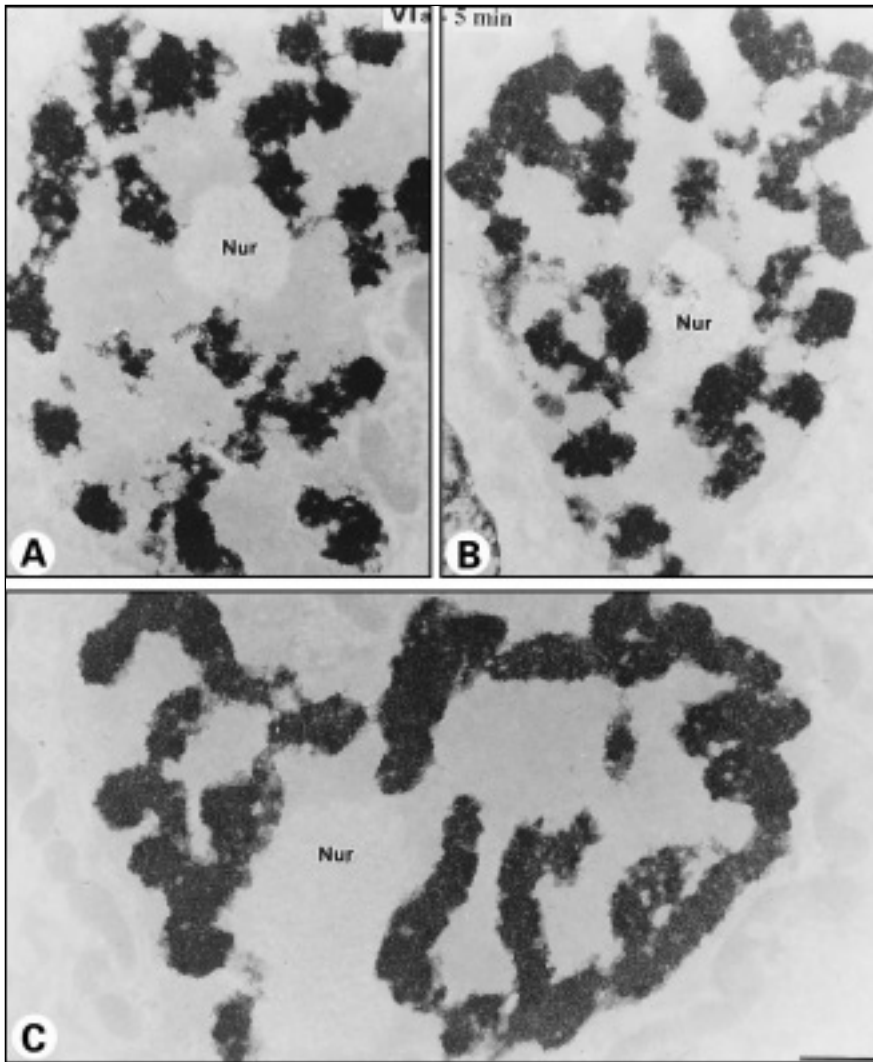


Figure 4. **Trois périodes dans l'évolution des chromomères pendant la prométaphase. Stade VIa (prométaphase).** A. Les chromomères sont distincts et montrent des nucléofilaments attachés à leur surface. B. Ils commencent à fusionner et leur surface devient lisse. C. Leur fusion se complète; ils perdent alors leur identité pour donner naissance aux chromosomes mitotiques. Il existe un reste de nucléole dégénéré (Nur) vers le centre de chacune des figures. $\times 17500$. Micrographies de cellules cylindriques des cryptes duodénales colorées à l'osmium-ammine. (D'après [10] avec permission.)

• Stade IV

A 10 minutes, les particules d'or apparaissent surtout sur des nucléofilaments attachés à de l'hétérochromatine (figure 6C). A une heure, elles se trouvent surtout sur des protubérances (figure 6D).

En conclusion des observations faites à l'aide du BrdU, les particules d'or sont associées, à 10 minutes, soit à des nucléofilaments libres, soit à des nucléofilaments attachés et, par conséquent, la synthèse de l'ADN ne se produit que le long de ces nucléofilaments. Elle ne se produit ni dans

les amas, ni dans les protubérances, ni dans l'hétérochromatine. Ainsi, les nucléofilaments compactés à l'intérieur de ces structures ne sont pas impliqués dans la synthèse de l'ADN. Cependant, au bout d'une heure, les particules d'or sont localisées sur les amas et sur les protubérances, mais pas sur l'hétérochromatine. Nous en concluons que les nucléofilaments libres ou attachés, qui sont le siège de la synthèse de l'ADN, s'associent généralement en moins d'une heure à des nucléofilaments semblables pour bâtir amas et protubérances.

Discussion

La coloration par l'osmium-ammine confirme que l'ADN des noyaux est sous la forme de nucléofilaments composés de files de nucléosomes. Tant dans l'hépatocyte, une cellule stable, que dans la cellule cylindrique du duodénum, une cellule cyclique, les nucléofilaments sont organisés de trois façons: ils sont libres, compactés ou attachés. Ainsi, dans le noyau de l'hépatocyte, ils sont libres dans le nucléoplasme, compactés dans l'hétérochromatine et attachés à la surface de celle-ci. Cette organisation se retrouve dans les cellules des cryptes duodénales, mais seulement au stade I, c'est-à-dire juste avant ou au début de la phase S. Au cours de cette phase, des groupes de filaments compactés, les amas et les protubérances, font leur apparition. L'ultrastructure de ces groupes est la même que celle des chromosomes mitotiques, la production de ces amas est donc considérée comme étant la première phase de la condensation de ces chromosomes.

• Première étape de la condensation

Les résultats obtenus 10 minutes après l'injection du BrdU montrent que la synthèse de l'ADN ne se fait que le long des nucléofilaments libres et attachés. Il est déjà connu que la synthèse de l'ADN a lieu sur des portions limitées de la molécule, les réplicons, constitués de 3,3 à 330 milliers de paires de bases [15]. Ainsi, d'après la longueur du nucléofilament marqué à l'or au centre de la figure 6C, nous estimons qu'il contient environ 7,7 milliers de paires de bases engagées dans la synthèse d'ADN, ce qui pourrait représenter un réplicon. Les réplicons dans lesquels se fait la synthèse, à un moment donné de la phase S, sont groupés dans une même région de la molécule d'ADN, mais sont généralement séparés les uns des autres.

L'ADN est synthétisé dans les nucléofilaments, libres ou attachés aux amas, au cours des 10 minutes qui suivent l'injection de BrdU, mais ce nouvel ADN apparaît à l'intérieur des amas une heure plus tard. Cela implique que les réplicons qui ont synthétisé leur ADN se sont joints les uns aux autres dans ces amas. En s'associant, les réplicons peuvent, soit créer un

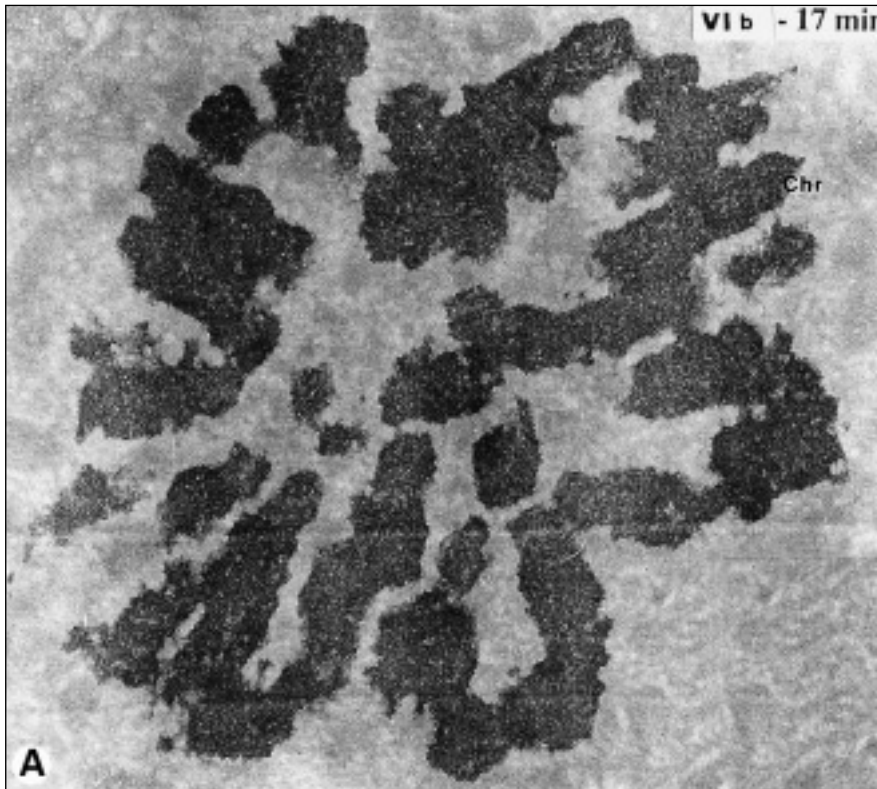


Figure 5. **Stade VIb (métaphase).** Les chromosomes mitotiques sont orientés de façon radiale pour former la plaque équatoriale qui caractérise ce stade. $\times 62\,500$. Micrographies de cellules cylindriques des cryptes duodénales colorées à l'osmium-ammine. (D'après [10] avec permission.)

nouvel amas, soit s'ajouter à un amas préexistant. Dans les deux cas, chacun de ces réplicons devient un nucléofilament compacté.

La synthèse d'ADN au niveau des nucléofilaments attachés à l'hétérochromatine est un cas complexe. En effet, tout l'ADN du noyau, y compris celui de l'hétérochromatine, doit être répliqué avant le début de la mitose. La synthèse ne se faisant pas à l'intérieur de l'hétérochromatine, mais seulement au niveau des nucléofilaments qui lui sont attachés, les nucléofilaments compactés de l'intérieur doivent sortir pour devenir des nucléofilaments attachés, le long desquels les réplicons peuvent faire la synthèse de leur ADN. Une fois la synthèse achevée, ces réplicons doivent aller rejoindre une protubérance dans laquelle ils retournent à l'état de nucléofilaments compactés. Ces déplacements paraissent fort complexes, mais ils semblent indispensables pour la synthèse de tout l'ADN du noyau. Notre interprétation d'ensemble se fonde sur la propriété adhésive bien

connue de l'ADN, qui, extrait des tissus, voit ses molécules s'agglomérer. Nous postulons que cette propriété permet le compactage des nucléofilaments qui forment les amas, les protubérances et l'hétérochromatine, mais qu'elle est inhibée au niveau des nucléofilaments libres et dans la portion libre des nucléofilaments attachés. Dans ces conditions, lorsque les réplicons de ces nucléofilaments ont synthétisé leur ADN, l'inhibition est levée et ils retrouvent leur propriété adhésive, ce qui leur permet de se compacter en amas et protubérances. En conclusion, la construction d'amas et de protubérances, dont la structure intime est semblable à celle des chromosomes mitotiques, constitue la première étape de la condensation de ces chromosomes.

• Deuxième étape de la condensation

L'opinion générale est que la condensation des chromosomes prend place à la prophase. La des-

cription de la prophase au microscope électronique (figure 3B) nous révèle qu'elle consiste en une agrégation des amas et des protubérances entraînant la formation des chromomères. Cette deuxième étape de la condensation est remarquable à plusieurs points de vue. Tout d'abord, l'importance des changements, chaque chromomère résultant en moyenne de la condensation de quatre amas ou protubérances; ensuite, la précision, la taille des chromomères étant limitée à environ 600 nm, soit la largeur des chromosomes mitotiques; puis, la rapidité des changements, qui ont lieu en moins de cinq minutes; enfin, l'alignement des chromomères en rangées plus ou moins distinctes qui représentent ce que l'on décrit généralement sous le nom de chromosomes prophasiques.

• Troisième et dernière étape de la condensation

Peu après la rupture de la membrane nucléaire, qui annonce l'entrée en prométaphase, la distance entre les chromomères de chaque rangée diminue jusqu'à ce qu'ils deviennent coalescents et indistincts, tandis que les nucléofilaments qui leur sont attachés disparaissent peu à peu. Cette condensation est moins spectaculaire que la seconde, mais elle est aussi rapide et dure environ cinq minutes.

Conclusion

Dans les hépatocytes, utilisés ici comme modèle des cellules statiques (cellules qui se divisent rarement ou pas du tout), l'ADN du noyau apparaît sous la forme de nucléofilaments qui sont, soit libres dans le nucléoplasme, soit compactés dans l'hétérochromatine, soit attachés à celle-ci. Dans les cellules cylindriques des cryptes duodénales, la même organisation se retrouve, mais seulement avant la phase S ou à son tout début. Par la suite, l'organisation du noyau change de façon spectaculaire. Pendant la fin de la phase S, l'ADN est synthétisé au niveau de certains réplicons, ceux des nucléofilaments libres et attachés. Peu après la synthèse de leur ADN, ces réplicons s'associent et deviennent des nucléofilaments compactés qui donnent naissance à de nouvelles structures, les amas et les

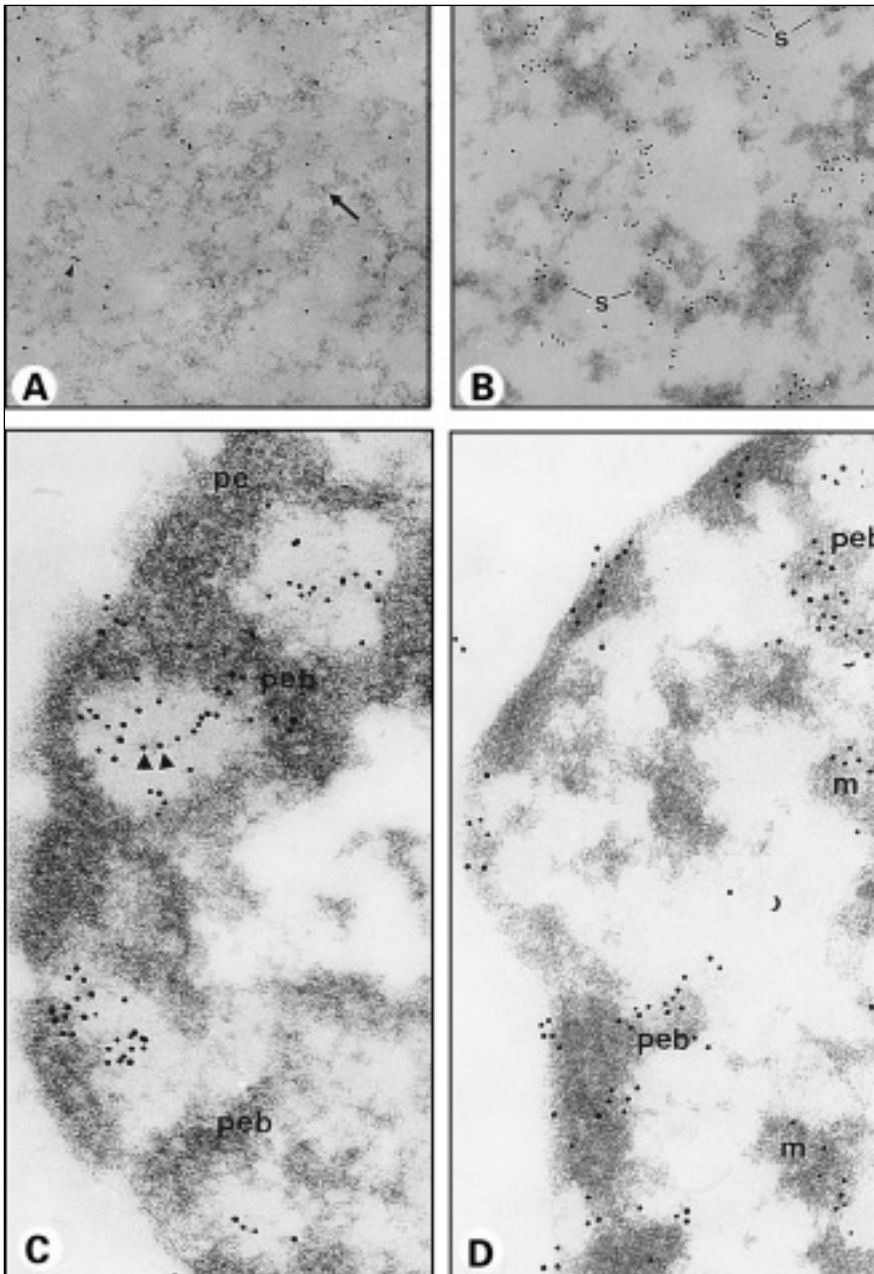


Figure 6. **Micrographies de cellules cycliques de la souris après injection de BrdU.** **A. Stade I, 10 minutes après injection de BrdU.** Les particules d'or indiquant la position du BrdU incorporé au cours de la synthèse de l'ADN sont localisées sur des nucléofilaments, certains sont à la limite de visibilité (pointes de flèche). $\times 62\,500$. **B. Stade II, une heure après injection de BrdU.** Les particules d'or sont surtout localisées sur des petits amas (s), qui sont formés par le rassemblement, d'une part, de portions de nucléofilaments libres dans lesquels s'est faite la synthèse d'ADN au stade I et, d'autre part, de portions de nucléofilaments libres et attachés où la synthèse de l'ADN s'est faite au début du stade II (le stade II dure 1,5 heure). $\times 62\,500$. **C. Stade IV, 10 minutes après injection de BrdU.** Des particules d'or sont localisées sur des nucléofilaments attachés à l'hétérochromatine périphérique (pe) ou aux protubérances (pro). A la pointe de flèche, la longueur du nucléofilament où l'ADN vient d'être synthétisé est telle qu'il pourrait constituer un réplicon. $\times 86\,000$. **D. Stade IV, une heure après injection de BrdU.** Les particules d'or prédominent sur les protubérances. Quelques particules sont présentes sur deux amas de taille moyenne (m). $\times 86\,000$. (D'après [11] avec permission.)

protubérances. La formation de ces structures est considérée comme étant la première étape de la condensation des chromosomes.

La seconde étape, qui coïncide avec la prophase et dure moins de cinq minutes se caractérise par l'agrégation de plus de 1 000 amas et protubérances pour former moins de 300 chromomères, qui s'alignent en rangées plus ou moins distinctes.

Au cours de la troisième étape, qui coïncide avec la prométaphase et dure environ cinq minutes, les chromomères de chaque rangée s'approchent les uns des autres et se fondent pour donner naissance aux chromosomes mitotiques ■

TIRÉS À PART

C.P. Leblond.

ROTARY INTERNATIONAL

ASSOCIATION POUR LE DÉVELOPPEMENT
DE LA RECHERCHE EN GÉRONTOLOGIE

- AdreG -



Ce prix s'adresse aux médecins, biologistes, psychologues..., ayant entrepris ou venant de terminer une recherche dans un domaine relevant de la gérontologie.

Pour postuler, il suffit d'envoyer un dossier comprenant une lettre de motivation, votre curriculum-vitae, ainsi qu'une copie de votre travail avant la fin mai 1997 en 3 exemplaires au :

Docteur de JAEGER
ASSOCIATION POUR LE DÉVELOPPEMENT
DE LA RECHERCHE EN GÉRONTOLOGIE
ROTARY CLUB DE MEUDON
37, avenue Galliéni - 92190 MEUDON

Un jury composé de scientifiques représentatifs étudiera les dossiers et attribuera le prix.

La remise des prix se fera fin 1997 en présence du Gouverneur du 1660^e district, des rotariens et de la presse médicale.

Pour tout renseignement, contacter :

Mme BARON ou le Docteur de JAEGER
Département de Gérontologie
Clinique Médicale du Château d'Herblay
50, rue de Paris, 95220 Herblay
Tél. : 01 34 50 50 14.

Summary

Chromosome condensation during mitosis

The DNA-specific osmium-ammine technique has been used to examine the distribution of DNA in a stable cell, the hepatocyte, and in a cyclic cell, the cylindrical cell of duodenal crypts, in the adult mouse. In both, the DNA is present in nucleofilaments composed of rows of 11 nm-wide nucleosomes. In hepatocytes at all times and in crypt cells just before and at the very beginning of the S phase, nucleofilaments are either «free» in the nucleoplasm, «compacted» in the heterochromatin or «attached» at the surface of the heterochromatin. During the long S phase of crypt cells, the DNA organization changes gradually, as two kinds of chromatin accumulations, referred to as «aggregates» and «bulges», appear and grow; they are composed of compacted nucleofilaments and have attached nucleofilaments at their surface. The use of bromodeoxyuridine for the detection of the sites of DNA synthesis has revealed that this synthesis takes place along free and attached but not along compacted nucleofilaments. Within an hour, the replicons of the free and attached nucleofilaments whose DNA has been synthesized associate to form aggregates and bulges. The elaboration of these structures constitutes the first step in the condensation of chromosomes. The second step of the condensation, in less than five minutes at prophase, consists in some confluence of over 1 000 aggregates and bulges giving rise to less than 300 chromomeres; these line up in a number of rows. At the third step of the condensation, which coincides with the prometaphase and lasts about five minutes, the chromomeres of each row move closer to one another and finally coalesce. Thus arise the mitotic chromosomes.