

ÉTUDE DES BANDES CHROMOSOMIQUES DU PORC ET DE TROIS DIFFÉRENTES SOUCHES DE REIN DE PORC EN CULTURE (PK 15, F et RP)

Geneviève ECHARD

*Laboratoire de Génétique cellulaire
Centre de Recherches de Toulouse, I. N. R. A.,
B. P. 12, 31320 Castanet Tolosan*

RÉSUMÉ

Depuis 1970, différentes techniques cytologiques ont montré l'existence d'une succession de bandes sombres et claires le long des chromosomes humains. Ces bandes sont caractéristiques d'un chromosome donné. Les techniques employées chez l'homme sont ici adaptées à des cultures de sang de porc et à trois différentes souches de rein de porc en culture (PK 15, F et RP); elles comportent un prétraitement suivi par une coloration classique au Giemsa. Les prétraitements utilisés ont été, soit une dénaturation ménagée à la chaleur, soit une « dénaturation » à la soude suivie d'une « renaturation », ou encore une dégradation enzymatique à la trypsine ou la pronase. Ces traitements ont permis d'obtenir le caryotype à bandes du porc puis d'étudier les modifications du caryotype et l'évolution de certains chromosomes des souches cellulaires cultivées; en effet les bandes chromosomiques de certains chromosomes marqueurs permettent d'expliquer leur origine.

INTRODUCTION

Un des problèmes difficile à résoudre en cytogénétique est de reconnaître sans ambiguïté un chromosome lorsqu'il s'agit de chromosomes très voisins tant au point de vue taille que position du centromère. Jusque ces dernières années, le moyen le plus précis dont on disposait, était l'étude d'un caryotype à l'aide de mesures biométriques des chromosomes. Depuis 1970, viennent s'y ajouter diverses techniques permettant de caractériser chaque paire de chromosomes par des bandes spécifiques. Bien que la nature exacte de ces bandes ne soit pas encore connue, l'étude de leur répartition et de leur importance relative, complétée par des mesures et des enregistrements au microdensitomètre, permet de reconnaître parfaitement chaque chromosome d'un caryotype (en particulier les chromosomes sexuels), de

compléter l'étude des anomalies chromosomiques et de faciliter la localisation de groupes de gènes sur un chromosome. Ce dernier problème étant l'un des objectifs du laboratoire, il a paru utile d'étudier, à l'aide des techniques de bandes, le caryotype des souches de rein de porc (*PK 15*, *F* et *RP*) maintenues en culture. Cette étude nécessitait une connaissance préalable des bandes chromosomiques chez le porc.

I. — MATÉRIEL ET TECHNIQUES

A. — Différentes souches et méthodes de culture

1. Culture de sang de porc.

Le caryotype normal du porc a été étudié à partir de cultures de leucocytes selon la technique classique de MOORHEAD *et al.*, 1960, adaptée au sang de porc par HAAG et NIZZA 1969. Quelques modifications ont cependant été apportées à cette technique. Les cultures sont effectuées soit en du milieu 199 soit en du milieu NCTC 109 auquel est ajouté 25 p. 100 de sérum de veau fœtal. Le milieu est complété en phytohématagglutinine Difco à la concentration de 0,05 ml de PHA P + 0,1 ml de PHA M pour 25 ml de milieu de culture. Le sang hépariné a été recueilli dans des conditions de stérilité suffisantes au moment de l'abattage de porcs. Après décantation pendant une à deux heures, la partie du surnageant la plus proche des hématies est prélevée et 10 gouttes de suspension de leucocytes sont mises en culture dans 25 ml de milieu. L'arrêt des cultures est effectué soit après 41-42 heures, soit après 68-70 heures à 38° (HAAG et NIZZA, 1969) après un blocage à la colchicine de deux à quatre heures à des concentrations de 0,2 à 0,4 µg/ml. Deux types de milieu hypotonique ont été utilisés, soit une solution de KCl à 0,7 p. 100 et dont la durée d'action est de 20 minutes, soit une solution hypotonique contenant 16 p. 100 de sérum de veau fœtal auquel est ajouté 250 000 UI de hyaluronidase. Le meilleur temps d'action de ce dernier milieu est de 35 à 40 minutes. Les cellules sont fixées à l'aide d'un Carnoy sans chloroforme et étalées sur lame selon la méthode classique de ROTHFELS et SIMINOVITCH (1958).

2. Culture des souches cellulaires *PK 15*, *F* et *RP*.

Les trois souches cellulaires de rein de porc étudiées ont des origines diverses, elles diffèrent par leur caryotype mais ont toutes été établies à partir de rein de truie. Deux de ces souches sont d'origine ancienne (*PK 15* et *F*), la troisième *RP* est beaucoup plus récente. La souche *PK 15* dérive de la souche *PK 2 a* établie en 1955 à BERKELEY en Californie par STICE. Des clones dérivés de cette souche ont été décrits par RUDDLE en 1961, l'un de ces clones fut appelé *PK 15*. L'évolution de certaines lignées qui en dérivent a été décrite par PIRTLE 1966-1969. Elle est maintenue en culture au laboratoire depuis 1968. La souche *F*, un peu plus récente, a été établie en 1962 par HAAG (communication personnelle), elle a subi des vicissitudes diverses, l'échantillon actuel provient du laboratoire de Virologie (I. N. R. A., Thiverval-Grignon) de même que la souche *PK 15*. La souche *RP* a été établie en 1969 par ce même laboratoire et son caryotype est suivi depuis 1970, deux lignées dérivent de cette souche, la lignée *RP 18* conservée congelée et la lignée *RP 51* maintenue en culture depuis l'origine. Les trois souches *PK 15*, *F* et *RP* diffèrent entre elles par sept ans d'âge.

Les besoins nutritionnels de ces souches sont différents. La souche *PK 15* pousse bien en milieu minimum de Eagle (MEM) complété en acides aminés non essentiels et auquel est ajouté 4 p. 100 de sérum de veau fœtal. La souche *F* et la lignée *RP 51* peuvent être maintenues dans ce milieu mais avec une croissance très ralentie et une mortalité importante. La lignée *RP 18* ne pousse pas en MEM même avec un apport maximum de sérum de veau fœtal (la mortalité est presque totale après 10 à 12 jours de culture). Les lignées *RP* et la souche *F* ont été cultivées en NCTC 109 contenant 4 p. 100 de sérum de veau fœtal.

Les cultures sont faites en tubes de Leighton, lorsque les cellules sont en phase de croissance exponentielle, on effectue un blocage à la colchicine ou à la colcémide à des concentrations variant de 0,2 à 0,4 µg/ml. Plusieurs types de choc hypotonique ont été effectués soit à l'aide d'une solution de citrate de soude 1 p. 100, soit de KCl 0,7 p. 100, soit un milieu hypotonique contenant 16 p. 100 de sérum de veau et de la hyaluronidase. La durée du choc hypotonique varie

selon la souche et le milieu utilisé, les temps d'action se situent entre 25 et 45 minutes à 37°. Les cellules sont fixées dans le tube par deux bains au minimum de Carnoy sans chloroforme pendant des temps variant de 2 heures à 24 heures.

B. — *Traitement et coloration des lames*

Les techniques mises au point au cours de ces deux dernières années en vue d'obtenir des chromosomes à bandes caractéristiques, se divisent actuellement en 5 catégories :

1. *Les techniques de fluorescence* (CASPERSSON *et al.*, 1970).

En utilisant les propriétés de la moutarde quinacrine (Quinacrine Mustard Dihydrochloride) qui, par alkylation se fixe au niveau de l'atome N 7 de la Guanine et s'intercale dans la double hélice, on obtient des bandes fluorescentes le long des chromosomes et la distribution de ces bandes est caractéristique de chaque paire d'homologues. Les régions les plus fluorescentes correspondraient à des zones où l'ADN chromosomique est riche en groupements GC. Les mêmes bandes sont aussi obtenues avec d'autres agents fluorescents. Le principal inconvénient de cette technique réside dans la courte durée de la fluorescence lors de l'éclaircissement : après 4 minutes son intensité peut avoir diminué de 50 p. 100. Pour cette raison les essais entrepris sur les différentes souches de porc ont été abandonnés au profit des techniques suivantes.

2. *Les techniques dites de « Dénaturation-renaturation ».*

Elles ont été énoncées par PARDUE et GALL (1970) et complétées par ARRIGHI et HSU (1971) dans le but d'étudier l'hétérochromatine chez l'Homme. Ces techniques consistent à provoquer une dénaturation de l'ADN par la soude, ou un autre agent dénaturant, et à produire ensuite une « renaturation » par un tampon SSC (saline citrate solution). Cette « renaturation » serait plus rapide dans les zones qui présentent des séquences hautement répétitives de DNA. La coloration au Giemsa après ce traitement indiquerait que les bandes chromosomiques très noires correspondent à des zones où l'ADN est hautement répétitif. Des modifications de la technique de base ont été apportées par les différents auteurs, en particulier par DRETS et SHAW (1971). Les meilleurs résultats sont obtenus en utilisant NaOH 0,07 M pendant des temps courts variant de 2 à 60 secondes, suivi par un passage dans un bain de SSC (2 SSC jusqu'à 12 SSC) pendant 12 à 24 heures entre 60 et 70°. Cette technique a été adaptée aux cultures de leucocytes et aux différentes lignées de rein de porc. Ses modalités sont les suivantes :

— Passage pendant 40 secondes dans un bain alcalin à température ambiante. (Composition de la solution alcaline : NaOH, 0,07 M ; NaCl 0,11 M pour un litre d'eau distillée. Solution à pH 12.)

— Rinçage dans l'eau distillée.

— Action d'un tampon citrate 2 SSC (0,3 M de NaCl, 0,03 M de citrate trisodique) à 69° pendant 1 h 1/2 à 2 heures.

— Rinçage dans l'eau distillée, puis dans le tampon phosphate pH 6,7 du Giemsa.

— Coloration pendant 5 minutes au Giemsa et différenciation dans l'eau distillée.

3. *Les techniques de dénaturation ménagée à la chaleur.*

En utilisant l'action d'un tampon à des températures de 60 à 90°, suivie d'une coloration au Giemsa, de nombreux auteurs ont obtenu des bandes chromosomiques caractéristiques. Le tampon peut être un tampon citrate SSC à concentration faible, 2 SSC (SUMNER, EVANS *et al.*, 1971 : technique ASG ; LOMHOLT et MORH, 1971, KATO et YOSIDA, 1972) ou 4 SSC (BHASIN et FOERSTER, 1972). La température du tampon varie de 60 à 70° et sa durée d'action est d'environ une heure. Le tampon peut être aussi un tampon phosphate (phosphate acide de potassium et phosphate de sodium à pH 6,7 DUTRILLAUX et LEJEUNE, 1971) utilisé à une température de 87° pendant 10 à 12 minutes. Cette température entraîne une dénaturation du DNA. Des bandes ont été obtenues chez le porc en utilisant un tampon 2 SSC à 60° pendant 1 heure, ou en utilisant le tampon phosphate pH 6,7 à 80° pendant 10 minutes. Dans les deux cas les lames sont refroidies dans l'eau distillée à température ambiante, puis rincées dans un tampon pH 6,7 avant d'être colorées cinq minutes au Giemsa.

4. *Les techniques utilisant une modification du pH.*

PATIL, MERRICK *et al.*, 1971, LABROUSSE et GUILLEMIN, 1972, obtiennent des bandes spécifiques en modifiant le pH du tampon phosphate utilisé pour diluer le Giemsa et mentionné

précédemment. Les meilleurs résultats sont obtenus à pH 9. Cette variation du pH provoque une dénaturation de l'ADN analogue à la dénaturation alcaline. Cette technique n'a pas été essayée chez le porc.

5. Les techniques faisant intervenir une digestion enzymatique.

Les enzymes employées sont la pronase (DUTRILLAUX, De GROUCHY *et al.*, 1971) l' α et β -chymotrypsine (FINAZ et De GROUCHY, 1971) la trypsine (WANG et FEDOROFF, 1972) la pancréatine (MULLER et ROSENKRANZ, 1972). Les lames sont plongées dans une solution enzymatique de concentration faible, à température ambiante ou à 37° pendant des temps variant de 2 à 15 minutes. L'application de cette technique aux cellules de porc est la suivante (seule la pronase et la trypsine ont été utilisées) :

— solution pronase : 50 μ g/ml de pronase dans une solution de NaCl 0,8 p. 100.

— solution trypsine : 0,025 p. 100 de trypsine dans une solution saline de Earle sans Ca^{++} ni Mg^{++} .

Les lames sont plongées dans ces solutions pendant 8 à 12 minutes, rincées à l'eau distillée, puis dans un tampon pH 6,7 et colorées 5 minutes au Giemsa. La pronase utilisée (Calbiochem) contient comme composé principal une protéase extraite d'un *Streptomyces*, elle n'a pas une grande spécificité et peut hydrolyser un grand nombre de liens peptidiques. La chymotrypsine et la trypsine ont des propriétés voisines. La trypsine produit une rupture après l'arginine ou la lysine (MALHER et CORDES, 1966).

II. — RÉSULTATS

Le nombre de chromosomes du porc normal (18 paires d'autosomes plus une paire de chromosomes sexuels) et leur répartition en groupes n'ont été nettement définis qu'à partir des travaux de RUDDLE (1961) qui utilisa comme premier critère de classification la position du centromère, détermina ainsi les groupes et fit les premières mesures biométriques précises (1964). Par la suite les différents auteurs ont adopté des classifications variables (GUIMENEZ-MARTIN *et al.*, 1962, Mac CONNELL *et al.*, 1963, STONE, 1963, HAAG et SANTUCCI, 1964, CORNEFERT JENSEN *et al.*, 1968). Une classification en accord strict avec le principe énoncé à la convention de Denver en 1960 et applicable à l'homme ou à la souris semble difficile chez le porc car elle oblige à placer côte à côte des chromosomes très éloignés quant à la position de leur centromère. La dernière étude en date du caryotype du porc faite par HAAG et NIZZA (1969) complétée par une étude biométrique (HAAG, LACOURLY *et al.*, 1969) donne une définition chiffrée de chaque paire d'homologues. Les chromosomes sont répartis en six groupes définis par la taille et la position du centromère des paires qu'ils contiennent, les groupes sont ensuite disposés selon la taille décroissante des chromosomes ne tenant compte que de la première paire du groupe. La classification adoptée diffère légèrement de celle de HAAG, elle comporte aussi six groupes (A, B, C, D, E, F) définis de la même façon (fig. 1), mais le groupe B est fusionné avec le groupe F de façon à ne former qu'un groupe de télacentriques, le groupe C devient alors le groupe B et le groupe D, le C. Les chromosomes X maintenant définis par leurs bandes peuvent être sortis du groupe C. Le groupe D est formé par la seule paire de chromosomes portant une constriction secondaire toujours nette. Cette répartition en groupes prend actuellement de moins en moins d'importance du fait que chaque paire est maintenant reconnaissable grâce à l'existence de ses bandes spécifiques.

A. — *Les bandes chromosomiques chez le porc et la lignée RP 18*

Cette lignée dérive de la souche RP, elle a été maintenue congelée de 1970 à 1971. Elle présente un nombre de chromosomes compris entre 37 et 38. Son caryotype est celui du porc.

1. *Groupe A, paire 1.* — Il s'agit de la paire la plus grande bien reconnaissable et submétacentrique. Elle présente des bandes d'égale épaisseur et uniformément réparties le long du chromosome, on peut en compter trois pour le bras court (1, 2, 3) et 6 ou 7 pour le bras long (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) plus la spiralisation de ce chromosome est grande, plus il est difficile de distinguer les bandes entre elles (fig. 1).

2. *Groupe B.* — Il comporte deux paires de chromosomes subtélocentriques.

La paire B₂, de taille plus grande, présente des bandes nettement reconnaissables : la première (1) est située près de la partie terminale du bras court, la deuxième (2) mince se trouve juste au-dessous du centromère, la troisième (3 et 4) est large et occupe la partie sub-distale du bras long, dans certains cas elle peut se résoudre en deux bandes presque contiguës.

La paire B₃ présente une bande importante (1) au milieu du bras court, puis au-dessous du centomère deux bandes étroites (2 et 3) pas toujours reconnaissables, puis ensuite trois bandes plus larges (4, 5 et 6) les bandes étant très rapprochées l'une de l'autre.

3. *Groupe C.* — Il s'agit de sept paires de chromosomes plus ou moins submétacentriques difficiles à classer, parmi eux se trouvent les chromosomes X. Pour ce groupe la répartition adoptée est celle de HAAG (1969) plaçant toutefois les X en dernier (paire 10).

La paire C₄, elle est la plus grande du groupe, ses bandes la rendent très reconnaissable : elle montre une bande large au milieu du bras court (1) puis juste au-dessous du centromère une bande toujours nette (2), enfin la partie distale du chromosome présente deux bandes très rapprochées (3 et 4) parfois confondues.

La paire C₅, ses bandes sont plus étroites que celles de la paire précédente, on peut y distinguer une bande au milieu des bras courts (1) puis trois bandes étroites également réparties le long des bras longs (2, 3 et 4).

La paire C₆, cette paire, légèrement submétacentrique, présente de façon plus ou moins variable une constriction secondaire au-dessus du centromère. Le bras court est occupé par une large bande sombre (1). Au niveau des bras longs, on peut distinguer deux bandes : une première relativement étroite, juste au-dessous du centromère, la deuxième, large, occupe tout le reste du bras (3).

La paire C₇, il s'agit de la paire la plus métacentrique du groupe. Le bras court montre deux bandes, la première subterminale est large et sombre (1) la deuxième est étroite, fine, plus claire (2), elle n'est décelable que sur les meilleures préparations. Le bras long présente une bande sombre large occupant le milieu du bras (3), parfois elle peut être séparée en deux sous-unités (3 et 4).

La paire C₈, elle est nettement submétacentrique, le bras court montre une bande nette (1). Juste au-dessous du centromère on observe une bande sombre (2)

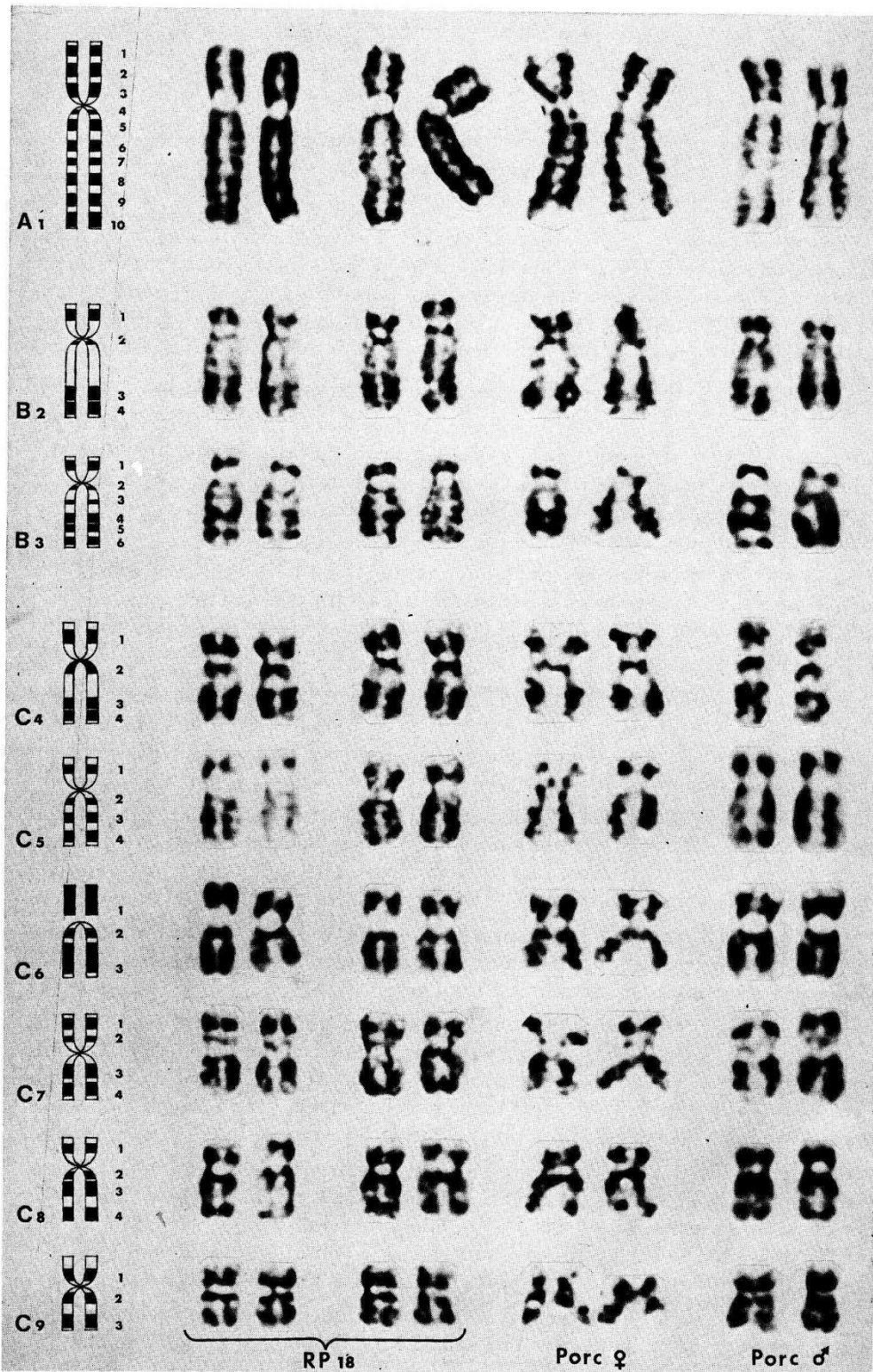
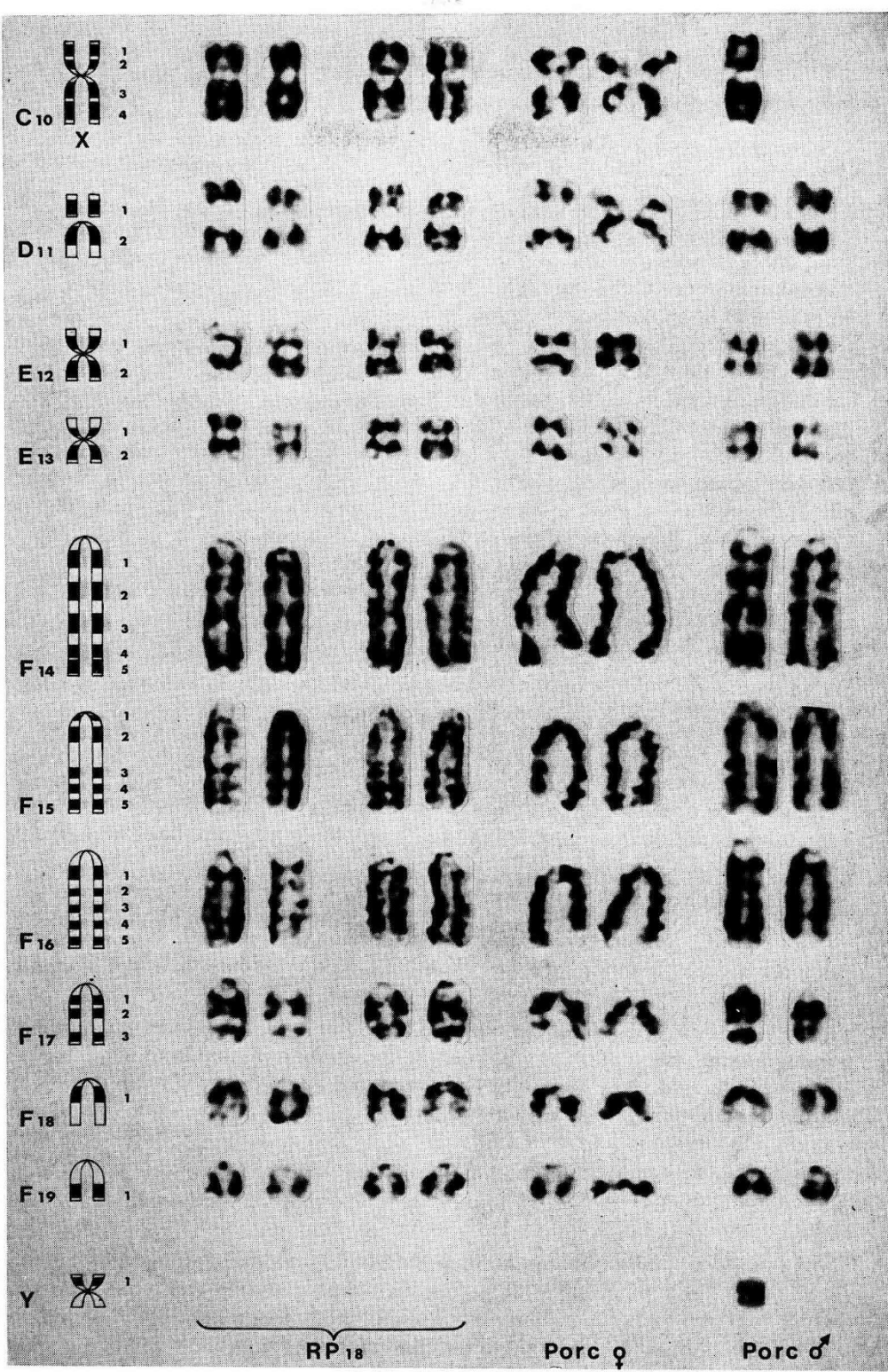


FIG. 1. — Le caryotype à bandes du porc



mée RP 18. Digestion enzymatique à la trypsine

suivie d'une seconde bande souvent moins nette (3), à la partie terminale du bras long se trouve une dernière bande (4).

La paire C_9 , est la plus petite paire du groupe, son centromère est submédian. Il existe trois bandes, deux sont situées de part et d'autre du centromère (1 et 2), la dernière se trouve à l'extrémité du bras long (3).

Les chromosomes X, paire C_{10} . L'identification des chromosomes X chez le porc s'est toujours montrée délicate. Les études autoradiographiques (marquage tardif d'un chromosome X CORNEFERT-JENSEN *et al.*, 1968) et les mesures biométriques récentes (HAAG et LACOURLY, 1969) ont permis de définir les chromosomes X comme une paire légèrement submetacentrique ne présentant pas de constriction secondaire et dont la longueur relative est la même que celle de la paire C_7 , mais son indice centromérique est plus faible. Ces deux paires sont difficiles à distinguer l'une de l'autre. L'existence de bandes différentes permet actuellement de les reconnaître. Le chromosome C_{10} , répondant à la définition précédemment donnée, présente quatre bandes larges, deux au niveau des bras courts (1 et 2) la première plus large que la deuxième, et deux au niveau des bras longs (3 et 4), elles sont de même épaisseur et occupent presque toute leur longueur. La principale différence entre ce chromosome et le C_7 réside dans la position des bandes des bras courts. Ces bandes correspondent à celles observées pour le chromosome X unique des métaphases mâles.

4. *Groupe D.* — Il comprend uniquement la paire D_{11} , toujours reconnaissable grâce à la présence d'une constriction secondaire. Chaque chromosome montre deux bandes (1 et 2) situées de part et d'autre du centromère.

5. *Groupe E.* — Il est constitué par deux paires de petits chromosomes pratiquement métacentriques (E_{12} et E_{13}), la paire E_{12} étant légèrement plus grande. Ces deux paires présentent une bande sombre de part et d'autre du centromère (1 et 2). Toutefois la bande du bras court de la paire E_{13} est plus mince que celle de la paire E_{12} .

6. *Groupe F.* — Il comporte six paires de chromosomes télocentriques répartis selon leur taille décroissante.

La paire F_{14} , la plus grande, montre quatre bandes sombres (1, 2, 3, 4) situées à peu près à égale distance l'une de l'autre. La bande la plus distale, plus large, semble parfois double (4 et 5).

La paire F_{15} , difficile à différencier de la paire F_{16} car la taille de ces chromosomes est très voisine, elle montre une disposition bien reconnaissable des quatre bandes étroites qui la caractérise, la bande 1 est peu éloignée du centromère, puis il existe une large bande claire entre la bande 2 et la bande 3. Les bandes 3, 4 et 5 sont situées à peu près à égale distance l'une de l'autre.

La paire F_{16} , montre cinq bandes (1, 2, 3, 4, 5) situées à égales distances, la première, plus épaisse que les suivantes se continue souvent entre les deux chromatides.

La paire F_{17} , plus petite que les précédentes, présente trois bandes sombres (1, 2, 3), les deux premières sont assez rapprochées l'une de l'autre, la troisième occupe la partie distale.

Les paires F_{18} et F_{19} diffèrent entre elles par la position de leur bande unique,

celle de la paire F_{18} est située près du centromère, celle de la paire 19 se trouve à la partie subterminale du chromosome.

7. *Le chromosome Y.* — Petit et pratiquement métacentrique, il présente une bande sombre unique attribuée au bras le plus court.

Cette répartition des bandes sombres est en accord avec les bandes fluorescentes décrites par GUSTAVSSON *et al.* (1972) chez le porc.

B. — *Évolution du caryotype des souches PK 15, RP 51 et F*

Les lignées cellulaires de porc ne conservent pas un caryotype diploïde. Comme dans la plupart des souches établies, elles deviennent hétéroploïdes après un nombre variable de générations (RUDDLE, 1961, HAAG et SANTUCCI, 1964). En dehors de l'apparition d'une faible proportion de cellules polyploïdes, le nombre des chromosomes tend à diminuer mais ne semble pas pouvoir descendre au-dessous d'une valeur limite. Il est en moyenne de 35 chromosomes pour la lignée RP 51 et la souche PK, de 34 pour la souche F. L'essentiel de l'évolution se fait par remaniement du matériel génétique et apparition d'anomalies chromosomiques. Le caryotype est d'autant plus éloigné de celui du porc que la souche est plus ancienne. L'étude du caryotype à bandes de ces souches permet d'expliquer l'origine de certains chromosomes, mais pour d'autres elle demeure encore incertaine.

1. *Le caryotype de la souche PK 15.*

Le clone PK 15 présente en 1961 un caryotype de porc normal (RUDDLE PK 1, 3), l'étude de deux lignées dérivées de ce clone (PK 15 ATCC et PK 15 NADL) faites par PIRTLE *et al.* entre 1966 et 1969 montre que le nombre global de chromosomes est de 38 ou 37, mais qu'il existe des anomalies chromosomiques se traduisant par la présence de marqueurs (1966). Ces marqueurs sont un grand métacentrique et un submetacentrique pour la lignée PK 15 NADL, et pour la lignée ATCC viennent s'y ajouter un submetacentrique plus petit et un subacrocentrique. Les caryotypes PK 15 faits au laboratoire en 1968 confirment que la lignée maintenue en culture dérive des PK 15 NADL. Les comptages effectués depuis cette date sur la souche non clonée montrent que le nombre de chromosomes a tendance à diminuer :

N. de chromosomes.....	38	37	36	35	34	33
Métaphases 1968 (%).....	8	53	13	26		
Métaphases 1972 (%).....			4	76	18	2

Actuellement le caryotype des PK 15 est le suivant (fig. 2).

Le groupe A. — Il est normal, les deux chromosomes A_1 présentent les mêmes bandes que chez le porc. Cependant depuis six mois, une forte proportion de cellules montrent un nouveau marqueur apparu dans la population. Il s'agit d'un chromosome subtélocentrique dont la taille et les bandes sont celles du A_1 . Lorsqu'il est présent, il manque toujours un chromosome de ce groupe. Il peut s'expliquer par une cassure des bras du A_1 manquant au-dessous du centromère puis une inversion péricentrique (fig. 3 b).

Le groupe B. — La paire B_2 est toujours présente et bien reconnaissable à ses bandes, par contre, il manque en permanence un chromosome B_3 .

Le groupe C. — Dans la plupart des métaphases 16 chromosomes peuvent correspondre à la définition de ce groupe. Les bandes de deux d'entre eux permettent de les interpréter facilement et d'en conclure qu'ils appartiennent en réalité au groupe F. Le premier est un chromosome métacentrique qui présente deux bandes semblables situées à égale distance du centromère, chaque demi-chromosome ressemble à un F_{18} . Il peut s'expliquer comme étant un isochromosome 18. Le deuxième est légèrement submetacentrique, les bras courts montrent une bande terminale sombre tandis que les bras longs présentent trois bandes, les deux premières rapprochées et la troisième distale (fig. 2, chromosome M_3). Il peut s'interpréter comme une fusion centrique entre un chromosome F_{17} et F_{19} . Parmi les quatorze chromosomes restant, la paire C_4 est toujours présente non modifiée (trois bandes larges bien reconnaissables). Il ne reste qu'un exemplaire des paires C_5 , C_6 , C_7 , C_9 et des chromosomes X (C_{10}). Dans la plupart des métaphases la paire C_8 est complète. Parmi les cinq chromosomes restant, deux sont difficiles à interpréter (fig. 2 chromosomes R), ils ont une longueur, une position du centromère et des bandes qui les rapprochent du C_7 et du C_{10} , mais sont plus nettement submetacentriques que les chromosomes X. Ils présentent deux larges bandes sombres (1 et 2), la première au niveau des bras courts, la deuxième occupe la plus grande partie des bras longs. Il se peut qu'il s'agisse d'un chromosome C_7 ou X remanié, le nouveau chromosome obtenu s'est alors dupliqué par endoreduplication. Une étude plus détaillée des bandes, doublées d'enregistrements au microdensitomètre et de mesure biométriques, permettra une interprétation plus complète de ces chromosomes remaniés.

Les trois derniers chromosomes submetacentriques montrent les bandes suivantes (fig. 2) :

— chromosome R_1 , une bande sombre, étroite, occupe la partie subterminale des bras courts (1), puis il existe une bande (2) au niveau des bras longs.

— chromosome R_2 , plus métacentrique que le précédent, il présente deux bandes, la première au niveau des bras courts (1), la deuxième est située au-dessous du centromère (2).

— chromosome R_3 , la position de son centromère et sa taille le rapprochent du chromosome B_3 ; mais ses bandes sont différentes : il existe une bande sombre au niveau des bras courts juste au-dessus du centromère (1), trois bandes occupent les bras longs (2, 3 et 4) la bande 2 étant juste au-dessous du centromère.

Ces trois chromosomes submetacentriques ont une position différente de leur centromère. Aucune mesure biométrique ni aucun enregistrement n'ont été faits. L'étude des bandes de ces chromosomes ne permet pas d'expliquer clairement leur origine, ils proviennent vraisemblablement de ramaniements des chromosomes manquants.

Le groupe D. — Il manque toujours un chromosome D_{11} , le chromosome restant présente les deux bandes observées chez le porc.

Le groupe E. — Le plus souvent normal, parfois il manque un E_{12} ou un E_{13} , plus rarement les deux.

Le groupe F. — Il n'existe entier dans ce groupe qu'un seul exemplaire de chaque paire, avec les bandes caractéristiques observées chez le porc. Le deuxième F_{14} présente cinq bandes sombres au lieu de quatre et leur répartition montre que la bande supplémentaire est située juste au-dessous du centromère (1'). Ce chromosome a donc subi une translocation entre le centromère et la bande 1. Il est difficile

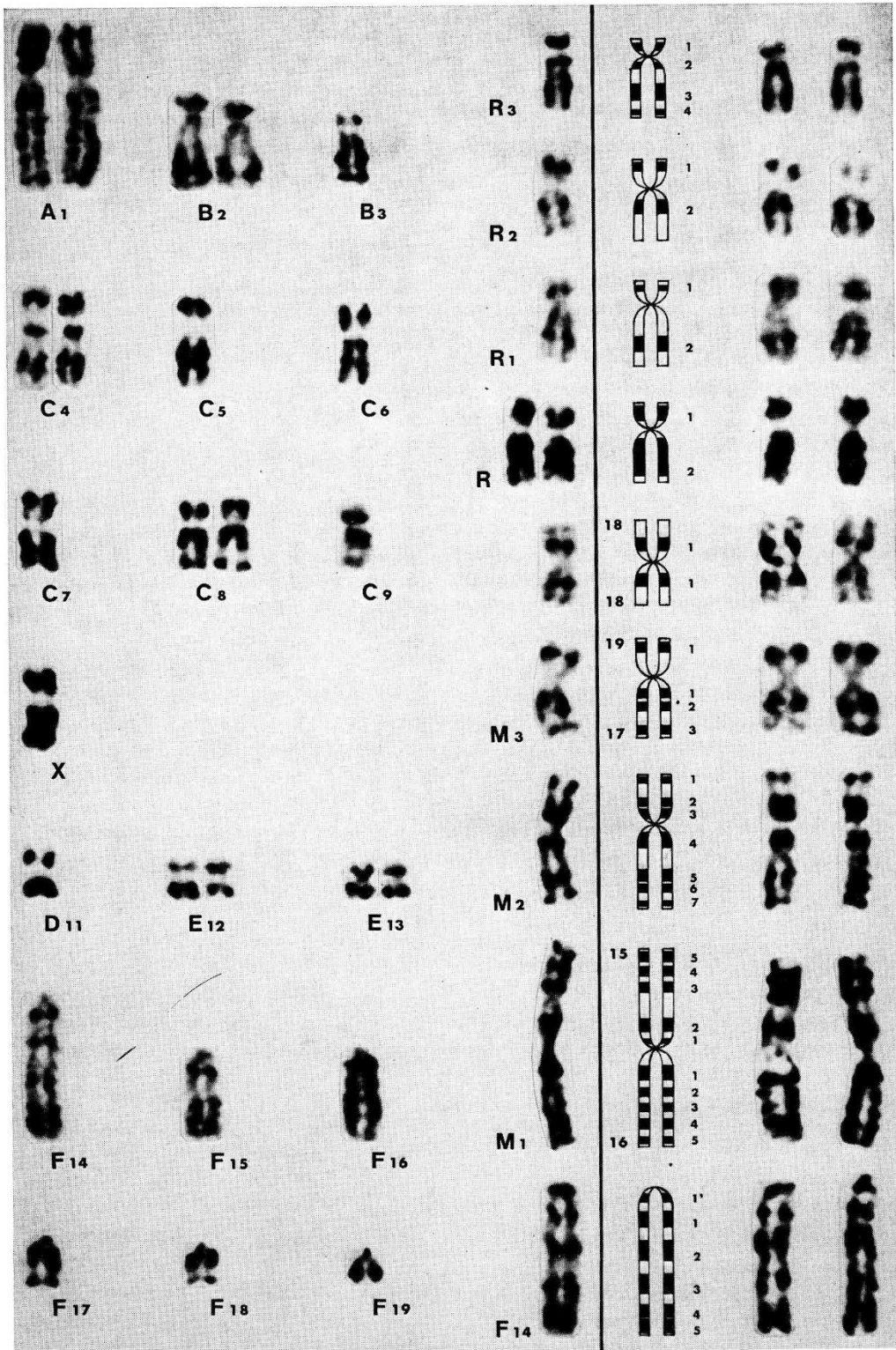


FIG. 2. — Le caryotype à bandes de la souche PK 15.
Dénaturation ménagée et dénaturation-renaturation
 A droite quelques exemplaires de chromosomes remaniés

de dire quel est le second chromosome impliqué dans cette translocation, car elle est ancienne dans la souche. Les caryotypes faits en 1968 montraient déjà une inégalité de taille entre les deux plus grands chromosomes télocentriques. Le deuxième F_{15} est fusionné avec le deuxième F_{16} (fusion centrique). Le chromosome métacentrique obtenu, de taille supérieure à celle des A_1 , constitue le marqueur M_1 de la souche. L'étude de ses bandes montre que deux de ses bras présentent la répartition des cinq bandes du F_{15} tandis que les deux autres celles des cinq bandes du F_{16} (fig. 2). Ce marqueur existe depuis longtemps chez les PK 15, il est déjà mentionné en 1966 par PIRTLE. Cette fusion centrique semble traduire une affinité entre les chromosomes 15 et 16 (un des clones autre que le PK 15 obtenu par RUDDLE (1961) la présentait, elle existe dans la lignée RP 51). Une autre fusion centrique s'est produite entre les deuxièmes F_{17} et F_{19} donnant un chromosome submétacentrique, puis il existe un isochromosome F_{18} . Ces deux chromosomes sont décrits dans le groupe C.

— Difficile à placer dans l'un de ces groupes, il reste à mentionner un chromosome marqueur submétacentrique M_2 (fig. 2). Sa longueur est proche du F_{14} et ses bandes sont les suivantes : trois sont situées au niveau des bras courts (1, 2 et 3), la première est distale, les deux autres, très rapprochées, sont près du centromère. Quatre bandes sont décelables au niveau des bras longs (4, 5, 6 et 7), la bande 4 est juste au-dessous du centromère, les bandes 5 et 6 sont très rapprochées et la bande 7 est distale. L'origine de ce chromosome est difficile à expliquer, il était déjà présent dans la souche en 1968, et est certainement le résultat d'un remaniement complexe. Une interprétation possible pourrait être la suivante : après trisomie du F_{14} , l'un des trois chromosomes obtenus subit une inversion péricentrique, il en résulte alors un chromosome submétacentrique répondant assez bien aux caractéristiques de ce marqueur. Une autre interprétation pourrait être aussi valable : la longueur et les bandes des bras longs sont assez proches d'un F_{15} tandis que la longueur et les bandes des bras courts sont semblables à celles des bras longs du C_8 . On peut alors imaginer une trisomie de ces deux chromosomes suivie par une translocation réciproque située près des centromères.

2. Le caryotype de la lignée RP 51.

Elle dérive de la souche RP et a été maintenue en culture depuis l'origine. Les premiers caryotypes faits en juin 1970 au 28^e passage, montrent qu'à cette époque, il est encore celui du porc. Les échantillons obtenus du *Laboratoire de Virologie* (Grignon) au début de 1971 sont constitués par une population hétérogène :

Nbre de chromosomes	38	37	36	35	33
Métaphases (%)	2	26	50	10	2

Les métaphases à 36 et 37 chromosomes avaient un caryotype proche de la normale, les métaphases à 35 et 33 portaient seules les marqueurs de cette lignée. La sélection ayant joué en faveur de ce dernier type cellulaire, le caryotype de cette lignée est actuellement le suivant (fig. 3 a).

- le groupe A est normal,
- le groupe B est modifié par la perte d'un B_8 ,
- le groupe C est souvent complet, il peut parfois manquer un C_5 ou un C_6 ou les deux. Les chromosomes X sont tous deux présents,

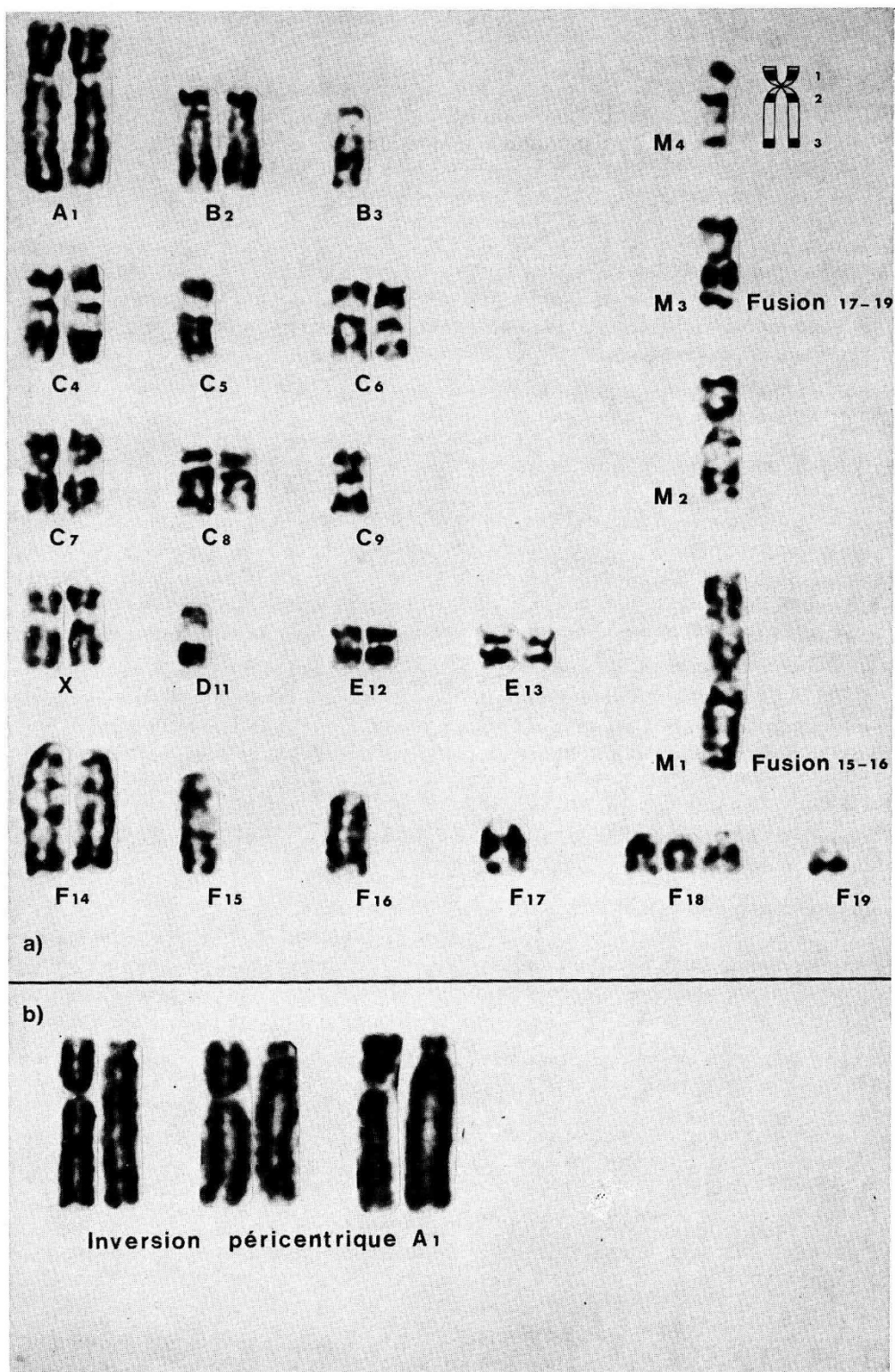


FIG. 3

a) Le caryotype à bandes de la lignée RP 51. Digestion enzymatique à la trypsine.

b) Quelques exemples de l'inversion péricentrique du chromosome A 1 de la souche PK 15.

- le groupe D ne comporte qu'un seul chromosome D_{11} ,
- le groupe E est souvent complet, mais il peut manquer un E_{12} ou un E_{13} .
- le groupe F. La paire F_{14} est toujours complète et montre ses quatre bandes caractéristiques ; il manque en apparence un chromosome 15 et un 16, il manque souvent un F_{17} et un F_{19} , la paire F_{18} est complète parfois trisomique.

Il existe en plus 4 chromosomes marqueurs.

— un chromosome métacentrique M_1 reconnaissable à sa taille supérieure à celle des A_1 . L'étude de ses bandes montre qu'il s'agit d'une fusion centrique entre les chromosomes F_{15} et F_{16} manquant. Ce marqueur est donc le même que le marqueur M_1 de la souche PK 15.

— un chromosome submetacentrique M_2 , ses bandes sont exactement les mêmes que celles du marqueur M_2 de la souche PK 15,

— un chromosome submetacentrique M_3 . Il présente les mêmes bandes que le chromosome M_3 des PK, il s'agit donc d'une fusion centrique entre un chromosome F_{17} et un F_{19} ,

— un chromosome subtélocentrique M_4 . Il n'a pas son équivalent chez les PK 15. Sa taille et la position de son centromère le rapproche du chromosome R_3 des PK, mais ses bandes sont différentes : il en existe trois, deux sont situées de part et d'autre du centromère (1 et 2), la troisième occupe la partie distale des bras longs (3). Son origine est difficile à reconstituer, il se peut qu'il provienne d'un remaniement du chromosome B_3 manquant.

Les principales différences entre la souche PK 15 et la souche RP 51 concernent d'une part le groupe C, qui est pratiquement normal chez le RP 51 et d'autre part le groupe F. Mais par ailleurs certaines analogies caryotypiques semblent troublantes (perte d'un B_3 , d'un D_{11} , présence des mêmes marqueurs M_1 , M_2 et M_3). Cette lignée semble suivre une évolution comparable à celle de la souche PK 15 à moins qu'il ne s'agisse d'un type cellulaire sélectionné au cours des générations successives dans une population mixte PK 15-RP 18.

3. Le caryotype de la souche F.

Le caryotype de cette souche n'a pas été suivi depuis son origine. Elle montre un pourcentage important de cellules polyploïdes et le nombre de chromosomes n'est plus celui du porc. Les derniers comptages effectués donnent les proportions suivantes pour les cellules diploïdes.

Nbre de chromosomes	33	34	35
Métaphases (%)	12	66	22

Le caryotype actuel est différent de celui des PK 15 ou RP 51 et comporte les caractéristiques suivantes (il s'agit du caryotype le plus fréquemment rencontré) (fig. 4).

- groupe A, il n'existe qu'un chromosome A_1 .
- groupe B, la paire B_2 est normale mais il n'existe qu'un exemplaire de la paire B_3 .
- groupe C, onze à douze chromosomes seulement peuvent correspondre à la définition de ce groupe. Les paires C_4 , C_6 , C_7 , C_9 et X sont normales et complètes, et il n'existe qu'un chromosome C_5 et un C_8 .

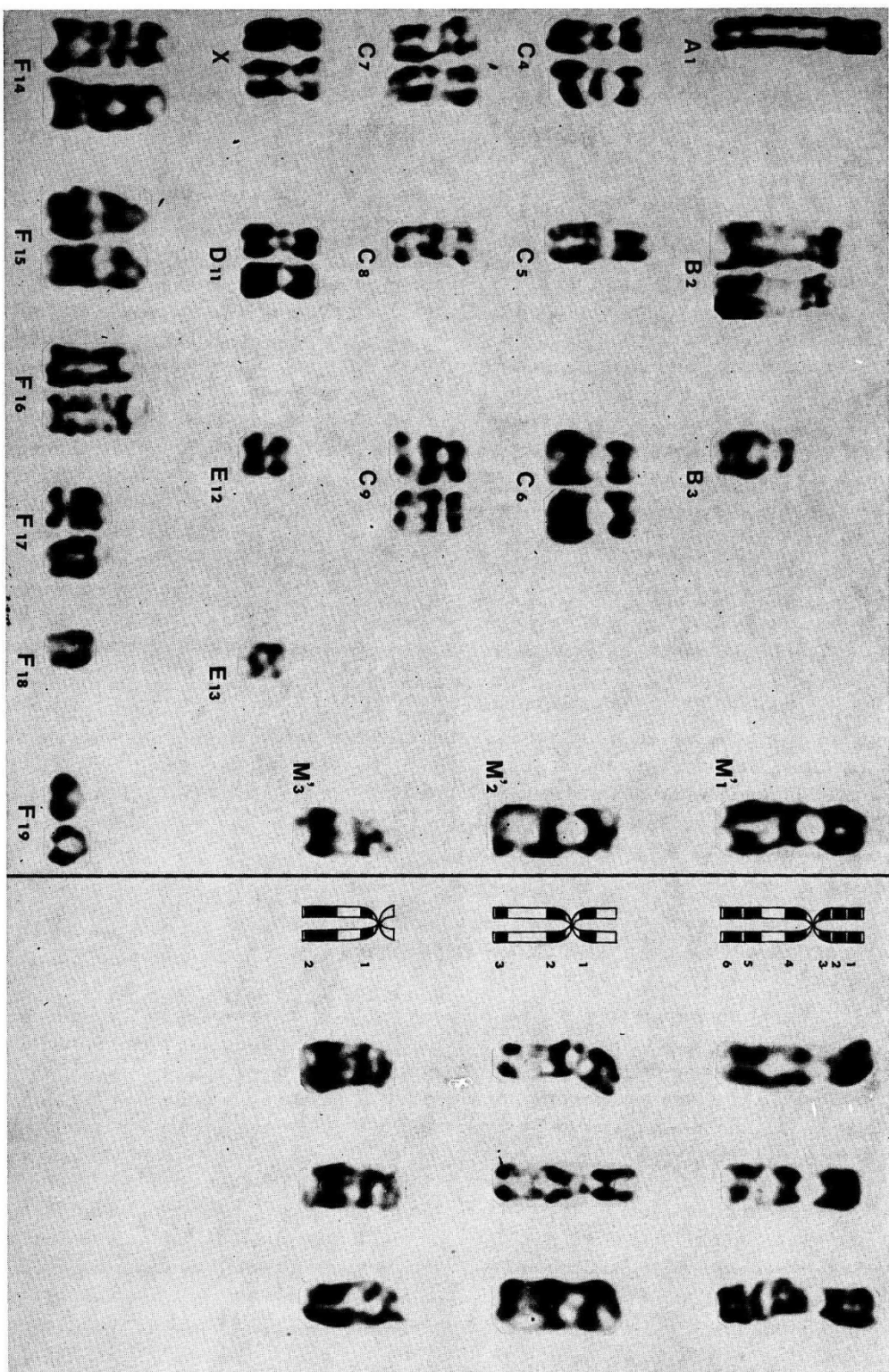


FIG. 4. — Le caryotype à bandes de la souche F. Dégradation enzymatique
 A droite quelques exemplaires des trois chromosomes marqueurs (M'1, M'2, M'3)

- groupe D, les deux chromosomes D_{11} sont présents.
- groupe E, il n'existe qu'un seul exemplaire des paires E_{12} et E_{13} .
- groupe F, les six paires sont présentes, normales, mais parfois il manque un F_{18} .

En dehors de ces chromosomes normaux, il existe trois marqueurs dont les bandes se répartissent comme suit :

— Chromosome M'_1 , il est légèrement plus court que le chromosome A_1 et son centromère est plus médian. Les bras courts ont la même longueur que celle du A_1 normal et dans les cas plus favorables on peut y distinguer les trois bandes (1, 2 et 3) décrites pour cette portion du chromosome. Les bras longs présentent des bandes différentes : une bande large (4) juste au-dessous du centromère, puis un espace clair suivi par deux bandes sombres distales et très rapprochées (5 et 6). Ce chromosome provient vraisemblablement de remaniements du chromosome A_1 perdu.

— Chromosome M'_2 , plus petit que le précédent, sa taille est approximativement celle d'un F_{14} , il est aussi submétacentrique et présente trois bandes, les bandes 1 et 2 sont situées de part et d'autre du centromère, la bande 3, se trouve dans la zone terminale des bras longs.

— Chromosome M'_3 , subtélocentrique. Il présente deux bandes au niveau des bras longs, la première (1) est située juste au-dessous du centromère, la deuxième large est subdistale (2).

Les remaniements ayant aboutis à la formation de ces trois marqueurs sont difficiles à préciser car la souche est ancienne. Les caryotypes faits entre 1968 et 1970 (37 chromosomes en moyenne) montrent que le groupe E est complet, qu'il existe une inégalité de taille entre les deux plus grands chromosomes submétacentriques, le marqueur M_1 est donc présent. Les paires B_2 et B_3 sont complètes mais l'un de ces quatre chromosomes est peut-être le marqueur M_3 . Le marqueur M_2 est aussi présent, légèrement plus grand que la paire C_4 , il a été placé à l'époque en tête du groupe C.

III. — DISCUSSION

L'étude du caryotype à bandes du porc et des différentes souches de rein de porc en culture montre que quelle que soit la technique utilisée (tampon phosphate ou SSC chaud, dénaturation-renaturation, dégradation enzymatique) la même alternance de bandes sombres et claires a été obtenue pour un chromosome donné et son homologue, par ailleurs les bandes sombres correspondent aux bandes fluorescentes décrites par GUSTAVSSON *et al.* en 1972 chez le porc.

Si on place à part les modalités techniques permettant de mettre en évidence l'hétérochromatine centromérique ou les zones hétérochromatiques (ARRIGHI et HSU, 1971, SUMNER, EVANS *et al.*, 1971; GAGNE, TANGUAY *et al.*, 1971) deux dispositions des bandes sont connues chez l'homme, elles sont complémentaires à quelques exceptions près (DUTRILLAUX, FINAZ *et al.*, 1972). La première disposition est appelée « en bandes », elle est la plus couramment rencontrée (bandes fluorescentes : CASPERSSON *et al.*, 1970-1971; MANOLOV *et al.*, 1971; AULA et SASKELA,

1972; bandes sombres obtenues après dénaturation-renaturation : DRETS et SHAW, 1971; SCHNEDL, 1971; bandes sombres obtenues après digestion enzymatique : DUTRILLAUX, De GROUCHY *et al.*, 1971; FINAZ et De GROUCHY, 1971; MULLER et ROSENKRANZ, 1972; SEABRIGHT, 1972; WANG et FEDOROFF, 1972; bandes sombres obtenues après coloration au Giemsa pH 9 : PATIL *et al.*, 1971). La deuxième disposition observée est appelée « en contre-type », en effet, les bandes sombres correspondent aux bandes non fluorescentes ou aux bandes claires obtenues avec les techniques précédentes, cette disposition est nettement observée par DUTRILLAUX et LEJEUNE, 1971 en utilisant un tampon phosphate à 87° (dénaturation ménagée). Elle n'a pas encore été rencontrée chez le porc.

La nature exacte du phénomène intervenant dans la formation des bandes n'est pas connu. Le nombre de bandes sombres ou fluorescentes d'un chromosome est peu élevé, cinq ou six en moyenne, une douzaine au maximum, parfois il n'en existe qu'une ou pas du tout. Par ailleurs en utilisant des techniques différentes on obtient les mêmes bandes pour un chromosome donné. Ces observations permettent de penser que les différentes zones ainsi déterminées le long d'un chromosome sont le reflet de l'organisation structurale des constituants du chromosome métaphasique (fibres DNA-protéines, RNA et fibres protéiques associées) et non une conséquence de la seule structure fine du DNA ou de sa seule dénaturation. L'organisation tri-dimensionnelle d'un chromosome métaphasique n'est pas connue, cependant des arrangements complexes se produisent au cours de la condensation des chromosomes en prophase (RIS et KUBAI, 1970). On peut supposer que ces arrangements ne sont pas les mêmes tout le long d'un chromosome donné et qu'ils ont leur importance dans la formation des bandes.

On connaît mal le mode de fixation du Giemsa aux chromosomes. Les solutions commerciales de ce colorant sont des éosinates d'azur et d'azur II. L'azur II est un mélange de deux colorants basiques : le chlorhydrate de bleu de méthylène et son dérivé sulfoné l'azur de méthylène; le mélange renferme toujours du violet de méthylène qui est un dérivé du bleu de méthylène. Selon le pH de la solution, le Giemsa colore les noyaux et les chromosomes en rose-violet ou en bleu. Si on n'effectue aucun traitement préalable, les chromosomes sont uniformément colorés, après traitement seules sont colorées certaines zones : les bandes sombres. Le chromosome a donc conservé au niveau des bandes son affinité pour le Giemsa, et la structure qu'il avait après la fixation. D'après DRETS et SAHW, 1971, le Giemsa agit probablement d'une façon très spécifique au niveau des chromosomes, les bandes ne sont pas visibles sur des lames traitées puis colorées à l'orcéine acétique. Par contre, les colorants analogues au Giemsa donnent nettement les mêmes bandes (colorant de Leishman, SEABRIGHT, 1972). Si après traitement préalable, on colore au bleu de méthylène seul (SUMNER, EVANS *et al.*, 1971) on obtient des bandes très pâles. Il semble donc que dans le cas du Giemsa, c'est le complexe éosinate d'azur qui est impliqué dans la mise en évidence des bandes. Une meilleure connaissance du mode de fixation du Giemsa aux chromosomes apporterait certainement des éclaircissements sur la nature des bandes obtenues.

En dehors du caryotype humain et à part une étude globale des bandes fluorescentes pour un certain nombre de mammifères (PEARSON, BOBROW *et al.*, 1971); le caryotype à bandes n'est actuellement bien connu que pour quelques espèces, ce sont pour la plupart des espèces largement utilisées en laboratoire et dont il existe

souvent des lignées permanentes en culture : *la souris* (FRANCKE et NESBITT, 1971 ; BUCKLAND *et al.*, 1971) *le rat* (WOLMAN *et al.*, 1971 ; SCHNEDL et SCHNEDL, 1972), *le hamster chinois* (KATO et YOSIDA, 1972), *le rat-kangourou* (GREWAL *et al.*, 1971). L'étude des bandes chromosomiques des espèces animales donne aux cytogénétiens le moyen de déterminer avec plus de certitude la nature des anomalies chromosomiques pathologiques. Cette étude est déjà largement engagée chez l'Homme. D'autres problèmes sont aussi abordés sous un nouvel aspect, par exemple celui de l'évolution interspécifique du caryotype par comparaison des bandes (De GROUCHY, TURLEAU *et al.*, 1972) ou celui de l'origine tétraploïdique de certaines espèces (COMINGS, 1972). Dans le cas de lignées permanentes en culture, les techniques de bandes permettent d'une part une étude de l'évolution normale ou provoquée du caryotype des clones hétéroplôides (MILLER *et al.*, 1971, lignées humaines, en particulier cellules Hela ; KATO et YOSIDA, 1972, clone D-6 de hamster chinois) d'autre part de situer certains groupes de linkage sur un chromosome précis (MILLER *et al.*, 1971 chez la souris) et par là même de faciliter la localisation de certains gènes.

L'étude du caryotype à bandes des trois souches cellulaires de rein de porc PK 15, F et RP montre que les anomalies intervenant au cours des générations successives sont les mêmes que celles décrites d'une manière générale dans le cas de lignées permanentes : pertes de chromosomes, translocations, fusions centriques, inversions péricentriques, trisomies, isochromosomes, délétions. L'évolution des deux souches les plus anciennes, PK 15 et F, a été très différente, mais dans les deux cas, il existe pour chaque paire chromosomique un exemplaire montrant les mêmes bandes que chez le porc, l'autre exemplaire homologue est soit présent, soit perdu, soit remanié et il entre alors dans la formation d'un nouveau chromosome. En effet dans le cas des PK 15 il existe 5, parfois 6 paires complètes normales et 13 ou 14 pour lesquelles il n'y a qu'un seul des homologues présent, non remanié. Pour la souche F, de sept ans plus récente, il reste encore 12 à 13 paires normales et 6 ou 7 avec un seul des homologues. Il se peut que l'évolution se poursuive dans ce sens jusqu'à ce qu'il n'existe plus une seule paire complète. On pourrait donc émettre l'hypothèse qu'après 17 ans et 10 ans de culture une moitié haploïde du génome est restée identique à ce qu'elle est chez le porc, l'autre moitié étant remaniée. Cette autre moitié comprend 16 chromosomes pour la souche PK au lieu de 19. La présence des fusions centriques $F_{15}-F_{16}$ et $F_{17}-F_{18}$ explique la perte de deux centromères, le troisième s'est alors trouvé perdu au cours des autres remaniements. Si on considère l'ensemble des chromosomes remaniés (10 à 11) leur taille et leur nombre laisse supposer que la quantité d'information génétique a peu varié, mais certaines portions du génome sont monosomiques, d'autres trisomiques, (présence d'un isochromosome 18). Dans le cas de la souche F la seconde moitié haploïde du génome comprend 15 chromosomes. Parmi ces derniers, il y a généralement 12 chromosomes normaux, il reste donc 3 chromosomes remaniés et 4 perdus. Il n'y a pas de fusion centrique comme dans le cas de la souche PK, les transformations ont été surtout des translocations et des pertes de chromosomes, la taille des trois chromosomes remaniés indique que, dans ce cas, la quantité globale d'information génétique a certainement diminué.

SUMMARY

BANDING PATTERN OF PIG CHROMOSOMES
AND OF THREE PIG KIDNEY CELL STRAINS (PK 15, F AND RP)

During the last two years, new cytological techniques have been performed in chromosome studies of human cells. It is possible to obtain a characteristic banding pattern for homologous chromosomes. Some of these techniques are adapted here to pig blood cultures and to three pig kidney cell strains (PK 15, F and RP). The PK, F and RP strains were established respectively in 1955, 1962 and 1969. The techniques used are : controlled heating, ASG technique, alkaline treatment and proteolytic digestion with trypsin or pronase. They have made it possible to find the banding pattern of the pig karyotype and to study the chromosomal rearrangements observed in the heteroploid cell strains. If the strain is old the rearrangements are more numerous but they are the same as the one usually described : centric fusions, translocations, pericentric inversions, deletions, isochromosomes. In the three strains, one of the two chromosomes of each pair has the banding characteristic of the pig. The other chromosome is either present, lost or modified. It may constitute part of a marker chromosome.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ARRIGHI F. E., HSU T. C., 1971. Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics*, **10**, 81-86.
- AULA P., SAKSELA E., 1972. Comparison of Areas of quinacrine mustard fluorescence and modified Giemsa staining in human metaphase chromosomes. *Expt. Cell. Res.*, **71**, 161-167.
- BHASIN M. K., FOERSTER W., 1972. A simple banding technique for identification of human chromosomes. *Humangenetiks*, **14**, 247-250.
- BUCKLAND R. A., EVANS J. J., SUMNER A. T., 1971. Identifying mouse chromosomes with ASG technique. *Expt. Cell. Res.*, **69**, 231-236.
- CASPERSSON T., FARBER S., FOLEY G. E., KUDYNOWSKI J., MODEST E. J., SIMONSSON E., WAGH U., ZECH L., 1968. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Expt. Cell. Res.*, **49**, 1, 219-222.
- CASPERSSON T., ZECH L., JOHANSSON C., MODEST E. J., 1970. Identification of human chromosomes by DNA banding fluorescent agents. *Chromosoma*, **30**, 215-227.
- CASPERSSON T., ZECH L., MODEST E. J., FOLEY G. E., WACH U., SIMONSSON E., 1969. Chemical differentiation with fluorescent alkylating agents in *Vicia faba* metaphases chromosomes. *Expt. Cell. Res.*, **58**, 128-140.
- COMINGS D. E., 1972. Evidence for ancient tetraploidy and conservation of linkage groups in mammalian chromosomes. *Nature*, **238**, 455-457.
- CORNEFERT-JENSEN F., HARE W. C. D., ABT D. A., 1968. Identification of the sex chromosomes of the domestic pig. *J. of heredity*, **59**, 251-255.
- DENVER STUDY GROUP, 1960. A proposed standard system of nomenclature of human mitotic chromosomes. *Lancet*, **1**, 1063-1065.
- DRETS M. E., SHAW W. M., 1971. Specific banding patterns of human chromosomes. *P. N. A. S.*, **68**, 2073-2077.
- DUTRILLAUX B., FINAZ C., GROUCHY J. de, LEJEUNE J., 1972. Comparaison of banding patterns of human chromosomes obtained with heating, fluorescence and proteolytic digestion. *Cytogenetics*, **11**, 113-116.
- DUTRILLAUX B., GROUCHY J. de, FINAZ C., LEJEUNE J., 1971. Mise en évidence de la structure fine des chromosomes humains par digestion enzymatique (pronase en particulier). *C. R. Acad. Sci. Paris*, **273**, 587-588.
- DUTRILLAUX B., LEJEUNE J., 1971. Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **272**, série D, 2638-2640.
- EVANS H. J., 1965. A simple microtechnique for obtaining human chromosome preparations with some comments on DNA replication in sex chromosomes of the goat, cow and pig. *Expt. Cell. Res.*, **38**, 511-516.

- FINAZ, GROUCHY J. de, 1971. Le caryotype humain après traitement par l'alphachymotrypsine. *Ann. Génét.*, **14**, 309-311.
- FRANCKE U., NESBITT M., 1971. Identification of the mouse chromosomes by quinacrine mustard staining. *Cytogenetics*, **10**, 356-366.
- GAGNE R., TANGUAY R., LABERGE C., 1971. Differential staining patterns of heterochromatin in man. *Nature New Biology*, **232**, n° 27, 29-30.
- GIMENEZ-MARTIN G., LOPEZ-SAEZ J. F., MONGE E. G., 1962. Somatic chromosomes of the pig. *J. of heredity*, **53**, 281-290.
- GREWAL M. S., DEV V. G., MILLER D. A., MILLER O. J., 1971. Quinacrine fluorescent patterns of the chromosomes in cell lines of the rat kangaroo. (*Potorous trydactylus apicalis*). *Expt. Cell. Res.*, **69**, 241-244.
- GROUCHY J. de, TURLEAU C., ROUBIN M., KLEIN M., 1972. Évolutions caryotypiques de l'homme et du chimpanzé. Étude comparative des topographies de bandes après dénaturation ménagée. *Ann. Génét.* **15**, 79-84.
- GUSTAVSSON I., HAGELTORN M., JOHANSSON G., ZECH L., 1972. Identification of the pig chromosomes by the quinacrine mustard fluorescence technique. *Expt. Cell. Res.*, **70**, 471-474.
- HAAG J., LACOURLY N., NIZZA P., 1969. Étude biométrique du caryotype du porc. *Rapport C. E. A.* R-3852, 21 p.
- HAAG J., NIZZA P., 1969. Le caryotype du porc normal. *Ann. Génét.*, **12**, 242-246.
- HAAG J., SANTUCCI J., 1964. Évolution quasi diploïde d'une souche cellulaire de rein de porc. *Ann. Genet.* **7**, 71-75.
- KATO H., YOSIDA T. H., 1972. Banding patterns of chinese Hamster chromosomes revealed by new techniques. *Chromosoma*, **36**, 272-280.
- LABROUSSE M., GUILLEMIN C., GALLIEN L., 1972. Mise en évidence, sur des chromosomes de l'amphibien *Pleurodeles Waltlii* M. de secteurs d'affinité différente pour le colorant Giemsa à pH 9. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **274**, série D, 1063-1065.
- LOMHOLT B., MORH J., 1971. Human karyotyping by heat-giemsa staining and comparison with fluorochrome techniques. *Nature New Biology*, **234**, 109-110.
- MAC CONNELL J., FECHHEIMER N. S., GILMORE L. O., 1963. Somatic chromosomes of the domestic pig. *J. Anim. Sci.*, **22**, 374-379.
- MALHER H. R., CORDES E. H., 1966. *Biological chemistry*. Harper international édition. Harper and Row Ltd New York, Evanston and London.
- MANOLOV G., MANOLOVA Y., LEVAN A., 1971. The fluorescence pattern of the human karyotype *Hereditas*, **69**, 273-286.
- MILLER O. J., MILLER D. A., ALLDERDICE P. W., DEV V. G., GREWAL M. S., 1971. Quinacrine fluorescent karyotypes of human diploid and heteroploid cell lines. *Cytogenetics*, **10**, 338-346.
- MILLER O. J., MILLER D. A., KOURI R. E., ALLDERDICE P. W., DEV V. G., GREWAL M. S., HUTTON J. J., 1971. Identification of the mouse karyotype by quinacrine fluorescence and tentative assignement of seven linkage groups. *P. N. A. S.*, **68**, 1530-1533.
- MOORHEAD P. S., NOWELL P. C., MELLMAN W. J., BATTIPS D. M., HUNGERFORD D. A., 1960. Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. *Expt. Cell. Res.*, **20**, 613-616.
- MULLER W., ROSENKRANZ W., 1972. Rapid banding technique for human and mammalian chromosomes. *Lancet*, **1**, 898.
- PARDUE M. L., GALL J. G., 1970. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science*, **168**, 1356-1358.
- PATIL S. R., MERRICK S., LUBS H. A., 1971. Identification of each human chromosome with a modified Giemsa stain. *Science*, **173**, 821-822.
- PEARSON P. L., BOBROW M., VOSA C. G., BARLOW P. W., 1971. Quinacrine fluorescence in mammalian chromosomes. *Nature*, **231**, 326-329.
- PIRTLE E. C., 1966. Chromosomal variations in a pig kidney cell line persistently infected with hog cholera virus. *Am. J. Vet. Res.*, **27**, 737-745.
- PIRTLE E. C., 1966. Variation in the modal chromosomes number of the two PK 15 porcine kidney cell lines. *Am. J. Vet. Res.*, **27**, 747-749.
- PIRTLE E. C., WOODS L. K., 1967. Dissimilarities in two PK 15 kidney cell lines. *Mammal. Chromosomes Newsletters*, **8**, 93-94.
- RIS H., KUBAI D. F., 1970. Chromosome structure. *Ann. Rev. of genetics*, **4**, 263-294.
- ROTHFELS K. H., SIMINOVITCH L., 1958. An air-drying technique for flattening chromosomes in mammalian cells grown *in vitro*. *Stain technology*, **33**, 73-77.
- RUDDLE F. H., 1961. Chromosome variation in cell populations derived from pig kidney. *Cancer research*, **21**, 885-894.
- RUDDLE F. H., 1964. Quantitation and automation of chromosomal data with special reference to the chromosomes of the *Hampshire* pig (*Sus scrofa*). In R. J. C. Harris; *cytogenetics of cells in culture*, 273-302. Academic Press. London and New York.
- SCHNEIDL W., 1971. Banding pattern of human chromosomes. *Nature New Biology*, **233**, 93-94.

- SCHNEDL W., SCHNEDL M., 1972. Banding pattern in rat chromosomes (*Rattus norvegicus*). *Cytogenetics*, **11**, 188-196.
- SEABRIGHT M., 1972. The use of proteolytic enzymes for the mapping of structural rearrangements in the chromosomes of man. *Chromosoma*, **36**, 204-210.
- STONE L. E., 1963. A chromosome analysis of the domestic pig (*Sus scrofa*) utilizing a peripheral blood culture technique. *Canad. J. Genet. Cytol.*, **5**, 38-42.
- SUMNER A. T., EVANS H. J., BUCKLAND R. A., 1971. New technique for distinguishing between human chromosomes. *Nature New Biology*, **232**, 31-32.
- WANG H. C., FEDOROFF S., 1972. Banding in human chromosomes treated with trypsin. *Nature New Biology*, **235**, 52-54.
- WOLMAN S. R., PHILLIPS T. F., BECKER F. F., 1971. Fluorescent banding patterns of rat chromosomes in normal cells and primary hepatocellular carcinomas. *Science*, **175**, 1267-1269.
- ZECH L., EVANS E. P., FORD E. C., GROPP A., 1972. Banding patterns in mitotic chromosomes of tobacco mouse. *Expt. Cell. res.*, **70**, 263-268.
-