
Dépôt Institutionnel de l'Université libre de Bruxelles /
Université libre de Bruxelles Institutional Repository
Thèse de doctorat/ PhD Thesis

Citation APA:

Koulischer, L. (1968). *Contribution à l'étude des chromosomes dans les leucémies humaines* (Unpublished doctoral dissertation). Université libre de Bruxelles, Faculté des sciences, Bruxelles.

Disponible à / Available at permalink : <https://dipot.ulb.ac.be/dspace/bitstream/2013/215195/5/35bc93a1-3e10-4b0f-a156-541cfaa98248.txt>

(English version below)

Cette thèse de doctorat a été numérisée par l'Université libre de Bruxelles. L'auteur qui s'opposerait à sa mise en ligne dans DI-fusion est invité à prendre contact avec l'Université (di-fusion@ulb.be).

Dans le cas où une version électronique native de la thèse existe, l'Université ne peut garantir que la présente version numérisée soit identique à la version électronique native, ni qu'elle soit la version officielle définitive de la thèse.

DI-fusion, le Dépôt Institutionnel de l'Université libre de Bruxelles, recueille la production scientifique de l'Université, mise à disposition en libre accès autant que possible. Les œuvres accessibles dans DI-fusion sont protégées par la législation belge relative aux droits d'auteur et aux droits voisins. Toute personne peut, sans avoir à demander l'autorisation de l'auteur ou de l'ayant-droit, à des fins d'usage privé ou à des fins d'illustration de l'enseignement ou de recherche scientifique, dans la mesure justifiée par le but non lucratif poursuivi, lire, télécharger ou reproduire sur papier ou sur tout autre support, les articles ou des fragments d'autres œuvres, disponibles dans DI-fusion, pour autant que :

- Le nom des auteurs, le titre et la référence bibliographique complète soient cités;
- L'identifiant unique attribué aux métadonnées dans DI-fusion (permalink) soit indiqué;
- Le contenu ne soit pas modifié.

L'œuvre ne peut être stockée dans une autre base de données dans le but d'y donner accès ; l'identifiant unique (permalink) indiqué ci-dessus doit toujours être utilisé pour donner accès à l'œuvre. Toute autre utilisation non mentionnée ci-dessus nécessite l'autorisation de l'auteur de l'œuvre ou de l'ayant droit.

----- English Version -----

This Ph.D. thesis has been digitized by Université libre de Bruxelles. The author who would disagree on its online availability in DI-fusion is invited to contact the University (di-fusion@ulb.be).

If a native electronic version of the thesis exists, the University can guarantee neither that the present digitized version is identical to the native electronic version, nor that it is the definitive official version of the thesis.

DI-fusion is the Institutional Repository of Université libre de Bruxelles; it collects the research output of the University, available on open access as much as possible. The works included in DI-fusion are protected by the Belgian legislation relating to authors' rights and neighbouring rights. Any user may, without prior permission from the authors or copyright owners, for private usage or for educational or scientific research purposes, to the extent justified by the non-profit activity, read, download or reproduce on paper or on any other media, the articles or fragments of other works, available in DI-fusion, provided:

- The authors, title and full bibliographic details are credited in any copy;
- The unique identifier (permalink) for the original metadata page in DI-fusion is indicated;
- The content is not changed in any way.

It is not permitted to store the work in another database in order to provide access to it; the unique identifier (permalink) indicated above must always be used to provide access to the work. Any other use not mentioned above requires the authors' or copyright owners' permission.

D 2388

UNIVERSITE LIBRE DE BRUXELLES

SERVICE D'ANTHROPOLOGIE ET DE GENETIQUE

(PROFESSEUR F. TWIESSELMANN)

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DES
CHROMOSOMES DANS
LES LEUCEMIES HUMAINES**

L. KOULISCHER

CIBLE

THESE PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION

DU GRADE D'AGREGE DE

L'ENSEIGNEMENT

SUPERIEUR

1968

THESES ANNEXES.

1. La stimulation des lymphocytes in vitro par la phytohémagglutinine est de type immunologique.
2. La génétique des maladies dites "familiales" ne pourra être abordée que si l'on dispose d'un système adéquat d'enregistrement de la population.
3. L'hétérochromatine est de l'acide désoxyribonucléique ne participant pas à la transmission des caractères héréditaires.

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES CHROMOSOMES DANS LES LEUCEMIES HUMAINES.

L. KOULISCHER.

REMERCIEMENTS.

Le présent travail n'aurait pu être mené à bien sans le concours généreux de ceux qui ont bien voulu me prêter leur assistance ou l'appui de leur autorité. Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur F. TWIESSELMANN, qui a mis à ma disposition le laboratoire de Cytogénétique de son Service et qui m'encourage depuis de longues années. Je remercie également les membres de son Service, et plus particulièrement Madame E. DEFRISE-GUSSENHOVEN, chargée de cours à l'U.L.B., qui m'a conseillé utilement du point de vue statistique, et Mademoiselle A. GENICOT qui a accompli avec compétence le travail technique. Je me fais un plaisir de souligner la parfaite entente qui a régné entre le Service de Cancérologie du Professeur H. TAGNON et moi-même. La presque totalité du matériel utilisé provient de ce Service; les Docteurs Y. KENIS et P. STRYCKMANS m'ont grandement facilité la tâche. Un certain nombre de cas proviennent des Services de Médecine Interne et de Pédiatrie de l'Hôpital Universitaire Saint-Pierre: j'en remercie les Professeurs P.A. BASTENIE et R. DUBOIS, leurs collaborateurs, les Docteurs Ch. CAUCHIE, R. MAURUS et P. PETIT, ainsi que les Docteurs M. DEMAERTELAERE et R. DENOLIN-REUBENS. Je remercie enfin les Professeurs A. DALCQ et P. DUSTIN, qui m'ont aidé et conseillé lors de la rédaction de ce travail et m'ont apporté le fruit de leur expérience.

Je remercie d'autre part l'Institut Arthur Gailly et son personnel, à Charleroi, qui ont effectué avec compétence l'impression de ce travail.

La présente recherche a été entreprise alors que je bénéficiais d'un mandat d'aspirant du Fonds National de la Recherche Scientifique; elle a été poursuivie alors que j'étais assistant à l'Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique (Directeur: Professeur A. CAPART).

PLAN DU TRAVAIL.

AVANT-PROPOS	p. I
CHAPITRE I.-TECHNIQUES D'ANALYSE DES CHROMOSOMES DES LEUCÉMIES HUMAINES.	p. 3
I. Analyse à partir du sang périphérique.	p. 3
1. Données théoriques.	
2. Applications aux leucémies.	
3. Description des techniques.	
II. Analyse à partir de la moelle osseuse	p. 6
1. Données théoriques.	
2. Méthode directe ou squash.	
3. Incubation à court terme.	
III. L'observation microscopique et les techniques de microphotographie. Le caryotype humain.	p. 8
1. Signification des numérations chromosomiques.	
2. Le caryotype. Importance des techniques de microphotographie.	
IV. Numérations "normales".	p. II
1. Cultures de lymphocytes.	
2. Moelle osseuse.	
CHAPITRE II. LES CHROMOSOMES DANS LA LEUCEMIE MYELOIDE CHRONIQUE.	p. 13
I. Introduction. Conceptions actuelles concernant le chromosome de Philadelphie ou Ph^I .	p. 13
1. Localisation du chromosome Ph^I .	
2. Identification du chromosome Ph^I .	
3. Apparition du chromosome Ph^I .	
4. Spécificité du chromosome Ph^I .	
5. Cytogénétique des crises blastiques.	

6.Cytogénétique et clinique.	
7.Cytogénétique et thérapeutique.	
II.Observations cytogénétiques dans la leucémie myé- loïde chronique.	p.21
I.Matériel clinique.	
2.Résultats.	
III. Discussion.	p.36
1.Technique et cytogénétique des leucémies myé- loïdes chroniques.	
2.Spécificité du chromosome Ph^I .Intérêt clinique et thérapeutique.	
3. Chromosome de Philadelphie et aneuploïdies.	
4. Cytogénétique de la crise blastique.	
5.Agents mutagènes et chromosomes dans la leucémie myéloïde chronique.	
6. Radiations et leucémie myéloïde chronique.Exposé d'une théorie "délétion chromosomique et muta- tion ponctuelle" englobant tous les cas de LMC connus.	
IV.Conclusions.	p.51
CHAPITRE III.-LES CHROMOSOMES DES LEUCEMIES LYMPHOIDES CHRONI- QUES.	p.53
I. Introduction.	p.53
1.Le chromosome de Christchurch.	
2.Phytohéماغglutinine et lymphocytes de sujets pré- sentrant une leucémie lymphoïde chronique.	
II.Observations cytogénétiques concernant les leucémies lymphoïdes chroniques.	p.54
III.Discussion.	p.55
1.Effet excito-mitotique de divers antigènes mis au contact de lymphocytes humains.	
2.Application théorique dans le cas de leucémies	

lymphoïdes chroniques.

IV. Conclusions.

p. 57

CHAPITRE IV.-LES CHROMOSOMES DES LEUCEMIES AIGUES.

p. 59

I. Introduction.

p. 59

1. Lignée souche et leucémies aiguës.
2. Lignées souches et altérations du caryotype.
Résultats d'ensemble.
3. Leucémies aiguës et caryotypes anormaux: rôle
de la différenciation tissulaire.
4. Mosaïcisme et leucémies.
5. Anomalies de la mitose et leucémies aiguës.

II. Observations cytogénétiques concernant les leucémies aiguës.

p. 68

I. Matériel.

- A. Chromosomes de patients atteints de leucémies aiguës.
- B. Etude des anomalies de la mitose.
- C. Etude de la stabilité des mosaïques constitutionnelles.

2. Résultats.

- A. Chromosomes des leucémies aiguës.
- B. Etude des anomalies de la mitose.
- C. Etude de la stabilité des mosaïques constitutionnelles.

III. Discussion.

p. 88

1. Technique et mise en évidence des aberrations chromosomiques des leucémies aiguës.
2. Absence de spécificité des aberrations chromosomiques des leucémies aiguës.

3. Mécanismes possibles impliqués dans la genèse des aberrations chromosomiques des leucémies aiguës.
4. Agents "leucémogènes" et leucémies aiguës chez l'Homme: apport de la cytogénétique.
5. La stabilité des mosaïques constitutionnelles. Comparaison avec les mosaïques leucémiques.
6. Signification des aberrations chromosomiques des leucémies aiguës.

IV. Conclusions.

p. 102

CHAPITRE V.-LES CHROMOSOMES DANS LES DESORDRES HEMATOLOGIQUES NON LEUCEMIQUES.

p. 104

I. Introduction.

p. 104

1. Les désordres myéloprolifératifs.
2. Polycythémie vraie ou maladie de Vaquez.
3. Anémies d'origines diverses.
4. Maladie de Waldenström et autres dysprotéïnémies.
5. Anomalie de Pelger-Huet.

II. Observations cytogénétiques concernant les désordres hématologiques non-leucémiques.

p. 111

1. Matériel.
2. Résultats.

III. Discussion.

p. 118

1. Maladie de Vaquez.
2. Désordres myéloprolifératifs autres que la maladie de Vaquez, et anémies de types divers.
3. Macroglobulinémie de Waldenström.
4. Anomalie de Pelger-Huet.

IV. Conclusions.

p. 121

CHAPITRE VI.-CONCLUSION GENERALE:SIGNIFICATION DES ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES DANS LES LEUCEMIES HUMAINES. p. 123

I.Le chromosome de Philadelphie. p. 123

- 1.Spécificité du chromosome de Philadelphie.
- 2.Chromosome Ph^I et carte des gènes,ou carte factorielle,chez l'Homme.
- 3.La leucémie myéloïde est-elle due à l'expression de gènes mutants récessifs?
- 4.Chromosome Ph^I et agents mutagènes.
- 5.Phase chronique et crise blastique de la LMC: deux "étapes" de la même maladie?
- 6.Chromosome Ph^I et différenciation tissulaire.
- 7.Conclusion.

II.Les chromosomes des leucémies aiguës et de la leucémie lymphoïde chronique. p. 128

- 1.Leucémies aiguës sans aberrations chromosomiques.
- 2.Leucémies avec aberrations chromosomiques chez des sujets à formule chromosomique constitutionnelle normale.
- 3.Leucémies chez les porteurs d'aberrations chromosomiques constitutionnelles.
- 4.Les déterminants prézygotiques des leucémies.

RESUME. p. 140a

BIBLIOGRAPHIE. p. 141

FIGURES ET LEGENDES DES FIGURES. p. 161

AVANT-PROPOS.

Dès le début de ce siècle, BOVERI avait soupçonné le rôle possible des anomalies chromosomiques dans l'installation et la propagation des processus cancéreux. En effet, un grand nombre d'anomalies mitotiques et chromosomiques pouvaient être mises en évidence au niveau des cellules néoplasiques malignes. Toutefois, dans le domaine particulier des leucémies, DAMESHEK et GUNZ notaient en 1958 que "les décomptes chromosomiques sont extrêmement difficiles sur matériel humain, même quand on emploie la coloration de FEULGEN, qui colore électivement l'acide désoxyribonucléique". Cette situation allait changer rapidement, grâce à l'introduction de techniques nouvelles conjuguant l'utilisation de cultures de tissus in vitro, de substances telles que la colchicine, qui bloque les mitoses en métaphase, du choc hypotonique qui disperse les chromosomes métaphasiques dans une cellule gonflée et du séchage à l'air libre ("air drying") qui ramène les chromosomes dans un même plan.

Trois découvertes particulièrement importantes ont montré tout l'intérêt des recherches cytogénétiques dans les leucémies humaines:

1. TJIO et LEVAN (1956) fixant définitivement à 46 le nombre normal de chromosomes chez l'Homme. Toutes les études cytogénétiques humaines ultérieures pourront enfin être comparées à un modèle normal précis, ce qui n'était pas le cas auparavant.

2. LEJEUNE et al. (1959) décrivent pour la première fois une aberration chromosomique liée à une maladie humaine: il s'agit du mongolisme ou syndrome de Down, caractérisé par un chromosome 21 surnuméraire. Des observations antérieures isolées (BERNARD et al., 1951; SCHUNK et LEHMAN, 1954; KRIVITT et GOOD, 1956; MERRIT et HARRIS, 1956), puis des séries plus importantes permettant une analyse statistique (KRIVITT et GOOD, 1957; STEWART et al., 1958) avaient permis d'établir la plus grande fréquence des leucémies aiguës chez les mongoliens.

La découverte de la trisomie 21 soulignait le lien existant entre une maladie par aberration chromosomique constitutionnelle et certaines formes de leucémies aiguës. Cette relation fut confirmée statistiquement sur un grand nombre de cas par HOLLAND et al. (1962). Ces auteurs ont noté que le risque de développer une leucémie aiguë était, par rapport à la population normale de même âge, 18 fois plus élevé chez les enfants mongoliens de 0 à 9 ans et 38 fois plus élevé de 10 à 19 ans.

3. NOWELL et HUNGERFORD (1960) observent dans la leucémie myéloïde chronique une anomalie qui se révèle spécifique. Il s'agit d'une délétion des bras longs d'un petit acrocentrique, sans doute un chromosome n° 21. A la suite de cette découverte, confirmée par BAIKIE et al. (1960), TOUGH et al. (1961) proposent comme hypothèse de travail de considérer qu'un ou plusieurs gènes intéressant la leucopoièse sont localisés au niveau du chromosome 21.

Dès ce moment, non seulement l'étude cytogénétique des leucémies humaines, mais aussi celle des affections hématologiques non-cancéreuses, fut entreprise de façon systématique. Les aberrations chromosomiques observées dans ces états pathologiques furent comparées à celles obtenues expérimentalement après action d'agents mutagènes connus. Il en est résulté un certain nombre de données difficiles à présenter de façon homogène. C'est pourquoi nous avons choisi de diviser notre travail en chapitres distincts. Le premier chapitre concerne la description des techniques employées. Les chapitres suivants sont consacrés successivement aux leucémies myéloïdes chroniques, aux leucémies lymphoïdes chroniques, aux leucémies aiguës et aux désordres myéloprolifératifs. Ils sont composés chacun d'une introduction, de l'exposé de nos résultats personnels, d'une discussion et d'une conclusion. Le dernier chapitre est consacré à une discussion générale concernant la signification théorique des aberrations chromosomiques dans les divers états pathologiques que nous avons étudiés.

CHAPITRE I

TECHNIQUES D'ANALYSES DES CHROMOSOMES DES LEUCEMIES HUMAINES.

Il est incontestable que les récents progrès de la cytogénétique humaine sont dus à la mise au point de techniques d'analyse simplifiées, précises et reproductibles. Ces techniques ont également permis d'améliorer nos connaissances concernant la biologie cellulaire, celle des lymphocytes en particulier. Elles méritent d'être exposées de façon détaillée.

I. Analyse à partir du sang périphérique.

Avant de décrire la technique de culture du sang périphérique, nous rappellerons les bases théoriques sur lesquelles cette technique repose.

1. Données théoriques.

L'utilisation du sang périphérique est simple. Le principe sur lequel est basé l'obtention de cellules en mitose repose sur les propriétés de la phytohéglutinine. Il s'agit d'une substance végétale découverte par LI et OSGOOD (1949), qui ont mis en évidence son action agglutinante vis-à-vis des hématies. Une substance agglutinante fut purifiée par RIGAS et OSGOOD (1955). HUNGERFORD (1959) démontra l'action excito-mitotique de la phytohéglutinine sur les cellules de la lignée blanche. On a pu montrer ultérieurement que ce sont les petits lymphocytes du sang circulant qui se divisent sous l'effet de la phytohéglutinine (PORTER et COOPER, 1962; ASTALDI et al., 1962; Mc KINNEY et al., 1962). Il se produit in vitro une réaction du type antigène/anticorps, la mucoprotéine jouant le rôle d'un antigène. Cette réaction est aspécifique; d'autres antigènes peuvent avoir le même effet. Une sécrétion de gammaglobulines a été mise en évidence (BACH et HIRSCHHORN, 1963); toutefois, les lymphocytes de sujets agammaglobulinémiques du type "suisse" (HIRSCHHORN et al., 1963) ou ceux de fœtus (LINDAHL-KIESSLING et BOOK, 1964) pourraient aussi se diviser sous l'effet de la phytohéglutinine. Celle-ci aurait comme propriété primaire

le "gonflement" et la division des lymphocytes; la sécrétion de gamma-globulines serait une propriété secondaire.

2. Applications aux leucémies.

L'utilisation de la phytohémagglutinine dans l'étude des chromosomes des leucémies doit se faire avec prudence. En effet, une population de lymphocytes normaux peut coexister avec une population de cellules leucémiques. Leur stimulation in vitro peut alors fausser complètement l'image cytogénétique de la maladie et mener à des conclusions erronées. Il arrive cependant que le sang périphérique soit le seul tissu accessible pour l'étude chromosomique: c'est pour-quoi la technique de stimulation à la phytohémagglutinine a été retenue. Elle est d'une utilité certaine si les résultats sont correctement interprétés. Son intérêt théorique est très important en ce qui concerne la genèse possible des leucémies lymphoïdes chroniques (ce point précis sera discuté ultérieurement).

3. Description de la technique.

Nous nous sommes inspirés de la méthode décrite par MOORHEAD et al. (1960). Environ 10 à 15 ml de sang veineux sont aspirés dans une seringue stérile et sont rejetés dans un tube également stérile contenant de l'héparine (Liquémine Roche ou Héparine pure Wellcome) à raison de 500 U.I. pour 15 ml. de sang. On laisse sédimenter les globules rouges; si après 1 ou 2 heures à température ambiante la sédimentation n'est pas satisfaisante, une centrifugation à basse vitesse est effectuée (400 tours/minute pendant 5 minutes). Le plasma surnageant contient en suspension les leucocytes. Les manipulations ultérieures sont les suivantes:

- a. Incubation in vitro: environ 1,5 à 2 ml de plasma sont injectés dans des flacons contenant 4 ml d'une solution saline tamponnée (milieu I99 obtenu prêt à l'emploi chez DIFCO); 0,1 ml de phytohémagglutinine "M" de DIFCO est ajouté dans chaque flacon (la

(la phytohémagglutinine est préparée suivant les indications du fournisseur: 50 mg de poudre contenus dans un flacon sont dilués dans 5 ml d'eau distillée). Les flacons sont placés dans un incubateur à 37° pendant 72 heures. Les cellules sont remises en suspension tous les jours par agitation manuelle. Trois heures avant l'arrêt de la culture, 1 microgramme de colcémide CIBA par ml de milieu est ajouté dans chaque flacon, de façon à bloquer les mitoses en métaphase.

- b). Choc hypotonique: le contenu de chaque flacon est vidé dans un tube à centrifuger conique. Les cellules sont centrifugées à 1200 tours/minute pendant 5 minutes. Il convient de souligner que toutes les centrifugations ultérieures seront effectuées de la même façon. Le surnageant est rejeté. Le culot est remis en suspension dans une solution de citrate de soude à 0,85 g/l et le tube est remplacé à 37° pendant 20 minutes. Ce milieu hypotonique est ensuite rejeté après centrifugation.
- c). Fixation: on ajoute goutte à goutte un fixateur composé de 3 parties de méthanol pour une partie d'acide acétique glacial. Le tube est constamment agité pour éviter que les cellules ne s'agglutinent en larges placards. Une centrifugation permet d'éliminer le fixateur, qui est remplacé par du fixateur frais. Les cellules sont alors laissées au repos pendant 30 minutes à la température ambiante. Ensuite, une nouvelle centrifugation rassemble les cellules au culot. Tout le fixateur est rejeté. Les cellules sont remises en suspension dans 0,2 ml de fixateur frais.
- d). Préparation des lames: une goutte de suspension cellulaire est aspirée dans une pipette Pasteur et rejetée sur une lame porte-objets propre et mouillée (sortant d'un récipient contenant de l'eau distillée). La lame est agitée vivement et chauffée prudemment au-dessus de la veilleuse d'un bec Bunsen, de façon à obtenir un séchage rapide qui favorise l'étalement et la dispersion des chromosomes dans les cellules en mitose. Les chromosomes sont alors colorés. Diverses solutions peuvent convenir. Nous employons l'orcéine acétique préparée de la façon suivante: 2,2 g

d'orcéine synthétique Merck sont placés dans 100 ml d'acide acétique glacial et portés à ébullition. Après filtration, la solution est diluée de moitié par de l'eau distillée. Les cellules sont mises au contact du colorant de 15 à 30 minutes. Les lames sont alors déshydratées et montées de la façon habituelle.

II. Analyse à partir de la moelle osseuse.

Comme pour la technique du sang périphérique, nous rappellerons les bases théoriques de l'analyse cytogénétique de la moelle osseuse.

I. Données théoriques.

L'examen des chromosomes des cellules de la moelle osseuse est celui qui rend le plus fidèlement compte de l'image cytogénétique in vivo (SANDBERG et al., 1961). En effet, le sang périphérique est un reflet, souvent imparfait, du processus pathologique médullaire. La présence de mitoses au niveau de la moelle osseuse permet d'abréger considérablement, et même de supprimer, tout séjour in vitro par conséquent toute sélection en faveur d'une lignée s'adaptant mieux à un environnement artificiel. Deux méthodes différentes sont habituellement employées.

2. Méthode "directe" ou squash.

La technique que nous avons utilisée est inspirée de celle de SANDBERG et al. (1961). Les cellules prélevées lors d'une ponction osseuse sont placées dans une solution isotonique glucosée-saline permettant le transport jusqu'au laboratoire. Une centrifugation à 1200 tours/minute pendant 5 minutes permet d'éliminer la solution isotonique. Les étapes ultérieures sont les mêmes que celles décrites pour le sang périphérique, sauf le temps d'incubation in vitro.

- a) Choc hypotonique: les cellules sont mises en suspension dans une solution de citrate de soude à 0,44 g/l pendant 15 minutes

à 37°. Ce milieu est éliminé après une centrifugation.

- b)- Fixation: le fixateur (méthanol 3 parties/acide acétique glacial 1 partie) est ajouté goutte à goutte, le tube étant secoué sans arrêt. Le fixateur est renouvelé après centrifugation, et les cellules sont laissées au repos pendant 30 minutes à la température ambiante. Le fixateur est ensuite totalement éliminé.
- c)- Préparation des lames: le culot cellulaire est mis en suspension dans 0,3 ml d'orcéine acétique. Une goutte de la suspension est placée sur une lame porte-objets très propre et recouverte d'une lamelle couvre-objets. Les cellules sont alors écrasées entre lame et lamelle par pression ferme du pouce ("squash"); la lamelle est protégée par plusieurs épaisseurs de papier filtre. Nous n'avons pas rendu ces préparations permanentes: elles doivent donc être observées immédiatement.

3. Incubation à court terme.

Nous avons utilisé cette méthode dans le but d'augmenter le nombre de mitoses convenant à l'analyse cytogénétique. Nous nous sommes inspiré de la technique de FORD et al. (1958)

- a)- Incubation in vitro: le prélèvement médullaire est placé dans un flacon contenant 4 ml d'un milieu composé de 85% de I99 et de 15% de sérum humain. Le flacon est incubé à 37° un temps variable (de 3 à 20 heures). Deux heures avant l'arrêt de l'incubation, de la colcémide CIBA est ajoutée au milieu. A la différence des cultures de lymphocytes, on n'a pas introduit de phytohémagglutinine dans les flacons.
- b)- Préparation des lames: la technique est identique à celle qui a été décrite pour le sang périphérique. Les lames sont permanentes.

Remarque: lorsque le sang périphérique est riche en cellules jeunes d'origine médullaire, il peut être traité comme la moelle osseuse. De toute façon, il ne faut pas ajouter de phytohémagglutinine dans ce cas (SPEED et LAWLER, 1964).

III. L'observation microscopique et les techniques de microphotographie.

Les résultats obtenus au moyen des techniques décrites ci-dessus sont inconstants. Comme le font remarquer FITZGERALD et al. (1964) "cela a été une expérience générale en cytogénétique des leucémies humaines, à savoir que des méthodes pourtant strictement standardisées ne permettent pas d'obtenir des résultats de façon constante ou prévisible". Cela tient surtout au matériel utilisé. Le rythme de croissance et de division des cellules leucémiques est loin d'être uniforme d'un cas à l'autre. Il peut en outre avoir été perturbé par divers agents thérapeutiques, qui sont souvent antimitotiques. D'autre part, la moelle peut être pauvre en cellules, ce qui réduit statistiquement le nombre de mitoses. Environ 30% de nos préparations n'ont pu être utilisées du point de vue cytogénétique, vu l'absence de divisions.

1. Signification des numérations chromosomiques.

Les chromosomes sont comptés soit à l'observation directe sous le microscope, soit sur microphotographies agrandies. Seules les mitoses dont les chromosomes sont bien dispersés sont retenues pour la numération. Il s'agit donc d'un "choix" destiné à placer l'observateur dans de bonnes conditions d'analyse. Une préparation peut être riche en mitoses ne "convenant" pas à la numération, les superpositions étant trop nombreuses par exemple. Le but des diverses techniques ne se limite pas à observer la présence de mitoses, mais plutôt à obtenir des étalements permettant l'analyse objective.

Les centrifugations répétées, le gonflement dû à l'action du milieu hypotonique et la fixation peuvent provoquer la rupture de la membrane. Un ou plusieurs chromosomes s'échappent dans le milieu et sont à la base de numérations anormales sans signification pathologique.

Pour éliminer cet inconvénient inhérent à la technique, il convient de compter les chromosomes d'un grand nombre de mitoses. Toutefois, c'est l'analyse du caryotype qui seule permettra d'affirmer la présence d'une ou plusieurs lignées anormales.

2. Le caryotype: importance de la technique de microphotographie.

Le caryotype est la mise en ordre des chromosomes d'une mitose suivant des règles précises codifiées lors de diverses réunions de spécialistes. La nomenclature actuelle est celle proposée lors du IIIe Congrès de Génétique Humaine tenu à Chicago en 1966. Le principe général repose sur la reconstitution de paires chromosomiques, qui ont une morphologie connue. Les altérations de nombre ou de forme seront immédiatement notées. Les caryotypes s'effectuent à partir d'agrandissements photographiques de mitoses.

Les microphotographies sont effectuées dans notre laboratoire en utilisant l'objectif à immersion d'un microscope Leitz Ortholux (grossissement: 90x) et un boîtier Leica de format 24x36 mm monté sur soufflet. Un oculaire 5 X est interposé entre l'objectif et l'appareil photographique. Le grossissement varie en fonction de la hauteur du soufflet. Celle que nous utilisons le plus souvent est de 24 cm. Le grossissement est alors d'environ 560 (objectif: 90 X; oculaire: 5 X; facteur dû au tube et indiqué par le constructeur: 1,25 X). L'émulsion photographique employée est le film Gevaert Scientia 39 C 56: il s'agit d'un film spécialement conçu pour la recherche, d'une sensibilité de I3 din environ, et sensible aux couleurs dont la longueur d'onde ne dépasse pas 5600 angströms. L'utilisation d'un filtre vert ou orange permet d'obtenir un négatif à fond noir, et par conséquent un positif à fond blanc sur lequel se détachent parfaitement les chromosomes. Les microphotographies sont agrandies environ 7 fois, sur papier format 18x24 cms blanc brillant et contrasté (de grade 3 ou 4, soit dur ou extra-dur). Le grossissement total final est d'environ 4000. Le classement des chromosomes s'effectue en découpant ceux-ci sur les agrandissements photographiques. Les différents bains utilisés sont ceux du commerce (Refinex; Metinol U et Acidofix).

Les paires de chromosomes sont classées d'après leur taille et la position de leur centromère. Il existe 22 paires d'autosomes, numérotées de 1 à 22, et une paire d'hétérosomes ou chromosomes sexuels; XX chez la femme, XY chez l'homme. Suivant leur taille, les chromosomes sont répartis en 7 groupes qui portent des signes alphabétiques: groupes A (chromosomes 1 à 3), B (4 et 5), C (6 à 12 et chromosomes X), D (13 à 15), E (16 à 18), F (19 et 20 et G (21, 22 et chromosome Y) (voir Fig. 1).

Il est parfois difficile de reconnaître formellement une paire à l'intérieur de certains groupes, notamment des groupes B, C, D. C'est pourquoi une même anomalie peut être décrite de deux façons différentes: par exemple, on remarquera une trisomie 13, qui sera pour d'autres une trisomie D.

Suivant la nomenclature de Chicago, le caryotype humain masculin normal est désigné de la façon suivante: 46, XY. Le caryotype féminin normal est dit 46, XX. Pour signaler la présence d'un chromosome surnuméraire, le signe + est employé après la lettre ou le numéro de ce chromosome. Par exemple, le caryotype d'une cellule féminine à 48 chromosomes avec un C et un G surnuméraires est décrit comme étant 48, XX, C+G+. Le signe - est utilisé pour souligner l'absence d'un chromosome. Par exemple, une cellule masculine à 44 chromosomes, ayant un B et un D manquants est décrite comme étant 44, XY, B-D-. Les bras courts d'un chromosome sont désignés par la lettre p, les bras longs par la lettre q. Une délétion est signalée par -; par exemple, la délétion des bras courts d'un chromosome 5, caractéristique de la maladie du cri de chat, est dite 5p. Un allongement chromosomique anormal est désigné par le symbole +; par exemple, l'accroissement de longueur des bras longs d'un chromosome C est désigné de la façon suivante: Cq+. Toute translocation est désignée par lettre t, suivie de la description de l'anomalie. Par exemple, une translocation se traduisant morphologiquement par la fixation des bras courts d'un chromosome B sur les bras longs d'un chromosome D est dite t (Bp-;Dq+). Cette nouvelle nomenclature a l'avantage "d'uniformiser la lecture des résultats" (Note éditoriale, Annales de Génétique, 1967) et d'en simplifier la présentation.

La confection des caryotypes et leur interprétation a été critiquée (PATAU, 1960; MATTHEY, 1963). La méthode des paires a été jugée peu satisfaisante. Il faut toutefois souligner combien cette technique est utile et sensible. La trisomie 21 représente un accroissement du génome de l'ordre de 1% environ; la délétion partielle des bras longs d'un chromosome 21, caractéristique de la leucémie myéloïde chronique, intéresse 40% de la substance totale d'un 21 (RUDKIN et al., 1964). Ces altérations réellement minimes du génome cellulaire sont mises en évidence avec une facilité déconcertante par l'étude des caryotypes. Il est probable qu'un certain nombre d'anomalies chromosomiques nous échappent encore, notamment dans les groupes où l'identification des paires est incertaine. Mais celles qui ont été mises en évidence ont démontré de façon très nette l'intérêt d'établir des "cartes chromosomiques" cellulaires.

IV. Numérations "normales".

Nos résultats concernant les sujets malades seront comparés à ceux de sujets sains obtenus dans notre laboratoire de la façon suivante:

1. Culture de lymphocytes: COURT-BROWN et al. (1960) ont observé, après avoir compté les chromosomes de 3.528 cellules de sujets normaux, 93,53% de mitoses à 46 chromosomes, 5,13% de cellules à 45 chromosomes ou moins, 1,34% de mitoses à 47 chromosomes ou plus. Nous avons noté les numérations faites sur 1.000 mitoses chez 26 sujets normaux. Les résultats sont les suivants:

45	46	47	total
35	947	18	1000
(3,5)	(94,7)	(1,8)	(100)

Les chiffres entre parenthèses indiquent les pourcentages: ils constituent nos témoins normaux.

2. Moelle osseuse: SANDBERG et al. (1961) après avoir compté 1649 mitoses de cellules de sujets normaux indiquent un pourcentage total de 12,2% de cellules aneuploïdes. Nous avons compté les chromosomes de 10 sujets dont le médullogramme s'est révélé normal; 353 mitoses ont été retenues par l'analyse. Les résultats sont les suivants:

45	46	47	total
II	326	16	
(3,1)	(92,3)	(4,6)	(100)

Ces chiffres sont différents de ceux de SANDBERG et al. et constituent notre série témoin normale, pour les analyses concernant la moelle osseuse.

CHAPITRE II

LES CHROMOSOMES DANS LA LEUCEMIE MYELOIDE CHRONIQUE.

I. INTRODUCTION: CONCEPTIONS ACTUELLES CONCERNANT LE CHROMOSOME DE PHILADELPHIE OU Ph^I .

En 1960, NOWELL et HUNGERFORD décrivirent un chromosome "minute" dans les cellules de 2 patients atteints de leucémie myéloïde chronique (LMC), sans pouvoir préciser son origine: il pouvait s'agir d'une délétion d'un petit acrocentrique, ou bien d'une translocation sur un autre chromosome. Ce petit chromosome fut observé à nouveau par BAIKIE et al. (1960) et NOWELL et HUNGERFORD (1960b). Le terme de "chromosome Philadelphie", ou Ph^I , fut proposé par BAIKIE et al. (1961), conformément à la nomenclature de DENVER relative aux "nouveaux" chromosomes humains. Ce système préconisait d'attribuer à tout chromosome marqueur le nom de la ville où il avait été décrit la première fois. Depuis, cette règle a été supprimée (conférence de CHICAGO, 1966), mais le chromosome Ph^I conserve sa dénomination (qui d'après la nouvelle nomenclature serait 21q-) "en raison de son intérêt historique".

De nombreuses recherches ont confirmé ces premiers résultats. La LMC se présente de ce fait comme étant le premier exemple de cancer humain associé à une aberration chromosomique spécifique. BERGER (1965) a relevé 257 cas de LMC avec étude cytogénétique: 233, soit près de 87%, présentaient le chromosome Ph^I . Compte tenu du fait que certaines observations étaient incomplètes (analyse du sang périphérique) on peut estimer, comme COURT-BROWN et TOUGH (1963), que 5% seulement des LMC ne montrent pas de Ph^I .

Avant d'exposer et de discuter nos résultats, nous résumerons les conceptions actuelles concernant le rôle du Ph^I dans l'installation et l'évolution de la LMC.

1. Localisation du chromosome Ph^{I} .

Le chromosome Ph^{I} ne se retrouve, chez les sujets atteints de LMC, qu'au niveau du système hématopoiétique. La peau ou l'aponévrose ne montrent pas d'anomalies chromosomiques chez ces malades (BAIKIE et al. (1959); FITZGERALD et al. (1963); WHANG et al. (1963) ont noté chez II patients que toutes les mitoses analysées au niveau de la moelle osseuse présentaient le Ph^{I} . Les frottis médullaires montraient de 25 à 60% de cellules érythroïdes, dont certaines en mitose: les auteurs ont conclu que toutes les cellules hématopoiétique sont porteuses du Ph^{I} . Des observations similaires ont été faites par TRUJILLO et OHNO (1963), TOUGH et al. (1963) et FITZGERALD et al. (1963). Elles ont été confirmées de façon directe par CLEIN et FLEMANS (1966), qui ont démontré histochimiquement la présence de granules de fer, prouvant donc qu'il s'agissait d'érythroblastes, au niveau de cellules avec chromosomes Ph^{I} . ENGEL (1965) et SPIERS et BAIKIE (1965) ont mis en évidence le Ph^{I} dans des cellules provenant de cultures de rates de patients atteints de LMC. Pour SPIERS et BAIKIE, ce serait la preuve que les lymphoblastes présentent également le Ph^{I} . Cette assertion est cependant discutable, une infiltration de la rate par des cellules leucémiques étant habituelle dans la LMC.

2. Identification du chromosome Ph^{I} .

Nous avons déjà signalé (p.II) que le chromosome Ph^{I} se présente comme un petit acrocentrique du groupe G ayant perdu environ 40% de sa substance par délétion des bras longs (RUDKIN et al., 1964). Certains arguments plaident en faveur d'une délétion d'un chromosome 2I. Par exemple, dans la trisomie 2I, caractérisée par un excès de gènes portés par cet autosome, la teneur en phosphatase alcaline des polynucléaires est augmentée (ALTER et al. 1962; TRUBOWITZ et al., 1962). Dans la LMC, caractérisée par une perte apparente de gènes portés par le chromosome 2I, la teneur en phosphatase alcaline des polynucléaires est diminuée (VALENTINE, 1951). Pour doser cette enzyme, la méthode la plus utilisée est celle de KAPLOW (1955). Les frottis sanguins sont fixés immédiatement après leur préparation dans un mélange

formol (10%) + méthanol (90%) pendant 30 secondes à 0°. Après un bref rinçage dans l'eau distillée, les cellules sont incubées à la température de la pièce pendant 10 minutes au contact d'un substrat qui est le phosphate de soude acide alphanaphtyl, le pH étant de 9,75. La présence de phosphatase alcaline est indiquée par un précipité brun-noir. Il s'agit d'une méthode dite semi-quantitative: les résultats en effet sont exprimés suivant un score établi par l'observateur, qui dispose d'une échelle allant de 0 à 4. Le 0 correspond à l'absence de précipité, le 4 à la présence d'un précipité noir recouvrant entièrement le polynucléaire. Cent polynucléaires sont examinés; un chiffre de 0 à 4 est attribué à chacun d'eux. Le score minimum sera de 0, le maximum de 400; chez les sujets normaux il varie de 50 à 80.

Il est cependant difficile de postuler une relation directe gène/enzyme. TEPLITZ et al. (1964) ont décrit un patient présentant simultanément une LMC avec Ph^I et une colite ulcéreuse infectée. Le taux de phosphatases alcalines leucocytaires était très élevé, comme toujours dans les états infectieux et ce malgré la délétion d'un chromosome 2I. Une thérapeutique adéquate ayant permis de juguler l'infection, le taux de phosphatases alcalines des leucocytes est descendu à la limite inférieure de la normale. Aussi TEPLITZ (1966) a-t-il proposé, en appliquant le concept d'opéron de Jacob et Monod, d'imaginer l'existence sur le chromosome 2I d'au moins 2 gènes régulateurs, R_I et R_2 , formant partie d'un complexe opéron/gène de structure intéressant la phosphatase alcaline leucocytaire. La production de l'enzyme serait dépendante de l'équilibre entre les régulateurs R_I et R_2 . Cet équilibre serait altéré lors de la formation d'un chromosome Ph^I , ou lors de la présence d'une trisomie 2I, avec pour conséquence respectivement un sous-dosage ou un surdosage enzymatique.

3.-Apparition du chromosome Ph^I .

L'étude de jumeaux monozygotes, dont l'un présente une LMC avec Ph^I tandis que l'autre est sain et ne montre pas de Ph^I (GOH et SWISHER, 1965; DOUGAN et al., 1966; JACOBS et al., 1966) permet d'affirmer que l'apparition du Ph^I est un caractère acquis, lié à la maladie, non transmis héréditairement. KEMP et al. (1961) ont noté la présence d'un Ph^I chez un malade atteint de polycythémie. Au moment de l'analyse cytogénétique, le tableau clinique n'était plus celui d'une polycythémie typique: le taux d'hémoglobine était de 17,9 g.

la leucocytose s'élevait à 16.500, les plaquettes étaient au nombre de 400.000; le malade avait reçu 15mC de ^{32}P . Par la suite, ce malade a développé une LMC et est décédé lors d'une crise blastique (KEMP et al., 1964). Cette observation pourrait signifier que le chromosome Ph^{I} apparaît avant toute symptomatologie clinique de LMC et qu'il est étroitement lié à la ou aux causes mêmes de la maladie.

4. Spécificité du chromosome Ph^{I} .

La spécificité du Ph^{I} doit être envisagée sous deux angles différents:

a) Leucémie myéloïde chronique sans Ph^{I} : un certain nombre de patients avec une LMC, mais sans Ph^{I} , ont été décrits. Nous ne considérerons que les sujets dont l'étude de la moelle osseuse a été effectuée. Il peut s'agir d'adultes: 4 cas sur 18 dans une série de SANDBERG et al. (1962); 3 cas de BLOCK et al. (1963), 2 cas sur 27 de TOUGH et al. (1963); 1 cas de SPEED et LAWLER (1964); 12 cas sur 28 de KRAUSSE et al. (1964); 13 cas sur 73 de TJIO et al. (1966). Il peut également s'agir d'enfants: 4 cas sur 9 enfants atteints de LMC (REISMAN et TRUJILLO, 1963), 3 cas de TJIO et al. (1966). L'aspect clinique de la maladie est différent chez ces malades sans Ph^{I} (TJIO et al., 1966): la durée de survie à partir du moment où le diagnostic a été établi est raccourcie (18 mois en moyenne au lieu de 45 pour les malades avec Ph^{I} , d'après ces auteurs), la réponse aux traitements habituels est mauvaise. On peut se demander s'il ne s'agit pas d'une "variante", mise en évidence par les études cytogénétiques. Quoi qu'il en soit, il convient de souligner qu'une certaine proportion de LMC n'ont pas de Ph^{I} : cette proportion varie de 2 à 44% suivant les séries. Pour l'ensemble des cas de LMC rapportés, la proportion serait d'environ 5% (LEJEUNE et BERGER, 1965).

b) Chromosome Ph^{I} sans leucémie myéloïde chronique: la spécificité du Ph^{I} vis-à-vis de la LMC semble très nette. Certains désordres myéloprolifératifs, dont l'image clinique se confond parfois transitoirement

avec la LMC, ou qui peuvent se transformer en LMC, comme les métaplasies myéloïdes et les myéloscléroses (GOH et SWISHER, 1964), ne montrent pas de Ph^I .

Cependant, chez quelques patients, on a mis en évidence un Ph^I sans LMC. Il s'agissait soit d'une thrombocytose importante allant jusqu'à 4.000.000 de plaquettes par mm^3 (TOUGH et al., 1963; HEATH et MOLONEY, 1965), soit des tableaux polycythémiques (KEMP et al., 1964; LEVIN et al., 1967). Dans deux cas avec polycythémie (KEMP et al., 1964); on a pu observer une transformation ultérieure en LMC. Pour les autres, qui ne représentent qu'une petite proportion de tous les cas avec Ph^I , il convient d'admettre que la présence du Ph^I ne s'accompagnait pas d'un tableau clinique de LMC.

Rappelons que les cas de LMC sans Ph^I ou les cas avec Ph^I sans LMC sont relativement peu nombreux et ne suffisent pas à contredire l'association étroite qui semble exister entre la délétion d'un chromosome G et la LMC. Leur signification possible sera discutée ultérieurement.

5. Cytogénétique des crises blastiques:

Si la phase chronique de la LMC se présente de façon homogène du point de vue cytogénétique, il n'en va pas de même des crises blastiques observées au cours de l'affection. On note cependant la persistance du Ph^I . En effet, sauf dans quelques cas (TOUGH et al., 1961; HUNGERFORD et NOWELL, 1962), le chromosome de Philadelphie est mis en évidence, ce qui démontre le lien direct existant entre les cellules atteintes lors de la phase chronique et lors de la crise blastique.

L'anomalie la plus fréquente au moment de la crise blastique semble être la duplication du Ph^I , avec formation par conséquent d'une lignée à 47 chromosomes (HAMMOUDA, 1963; HAMMOUDA et al., 1964, HEMPEL,

1964; KEMP et al., 1964; KIOSSOUGLOU et al., 1965; DOUGAN et WOODLIFF, 1965; ERKMAN et al., 1966; STICH et al., 1966; ENGEL et McKEE, 1966) ou même la triplication du Ph^I avec apparition de cellules à 48 chromosomes (de GROUCHY et al., 1965; SCHROEDER et BOCK, 1965). Il semble exister une "tendance" à la duplication sélective du Ph^I .

Des lignées cellulaires hyperdiploïdes ont été rapportées. Elles sont difficiles à systématiser: on n'a pas toujours précisé quels étaient les chromosomes surnuméraires. D'une façon générale, la tendance à l'hyperdiploïdie prédomine (LAWLER et GALTON, 1966), quoique des lignées hypodiploïdes puissent être rencontrées (SANDBERG et al., 1964). Il convient de souligner la rareté des remaniements chromosomiques complexes, tels que translocations, anneaux, etc. Les gains de chromosomes intéressent tous les groupes. A la suite de l'observation de LEJEUNE et al. (1963), concernant une "évolution clonale" chez une fille âgée de 2 ans, trisomique 21 et présentant une leucémie aiguë, on a tenté de reconstituer les formes de passage entre la lignée initiale à 46 chromosomes avec Ph^I et la ou les lignées présentes lors de la crise blastique (LEJEUNE et al., 1965; de GROUCHY et al., 1965). Des "modèles d'évolution clonale dans les leucémies myéloïdes chroniques en crise blastique" ont été proposés (de GROUCHY et al., 1966). Leur nombre montre combien l'image cytogénétique de la crise blastique peut varier. Il n'est pas possible actuellement de mettre en évidence des transformations "préférentielles" du caryotype de la crise blastique, sauf peut-être la duplication du Ph^I . Celle-ci toutefois est loin d'être présente dans tous les cas.

6.- Cytogénétique et clinique.

Il est incontestable que la découverte du Ph^{II} a imposé la cytogénétique comme l'un des éléments du diagnostic différentiel dans tous les cas de LMC, et ce malgré les exceptions connues, de LMC sans Ph^I et de Ph^I sans LMC. On a pensé que l'analyse des chromosomes serait également utile pour poser le diagnostic de crise blastique, celle-ci se

caractérisant par une aneuploïdie marquée. Ce point n'a pas été confirmé. La crise blastique peut montrer un caryotype identique à celui de la phase chronique de la maladie (HUNGERFORD et NOWELL, 1962, TJIO et al., 1966). D'autre part, une aneuploïdie peut exister en dehors de toute crise blastique. L'une d'entre-elles a paru suffisamment stable pour que l'on ait proposé d'en faire une entité particulière. Il s'agit d'une LMC à 45 chromosomes, avec un Ph^I mais un chromosome G absent (ATKINS et TAYLOR, 1962; TOUGH et al., 1963; SOEED et LAWLER, 1964; ENGEL et al., 1965; de GROUCHY et al., 1966). Pour de GROUCHY, qui souligne l'évolution très lente de cette forme de LMC, il pourrait s'agir de la perte d'un chromosome Y au niveau d'une cellule Ph^I positive. Toutefois, un cas identique du point de vue cytogénétique et clinique a été rapporté chez une femme (ENGEL, 1965), sous la dénomination, malgré la présence du Ph^I , de "leucémie aleucémique". Des cas d'évolution lente avec Ph^I et remaniements chromosomiques ont été rapportés par HOUSTON et al. (1964) et SANCHEZ-CASCOS et BARREIROS (1964). Dans le premier cas, une lignée à 46 chromosomes montrait un subtélocentrique surnuméraire de la taille d'un B, alors qu'un autre chromosome manquait; dans le second cas, outre le Ph^I on notait une translocation 5/12.

Suivant les cas publiés, le nombre de cellules médullaires avec Ph^I varie de 2 à 100% du nombre de mitoses observées. Il est très difficile de comprendre le sens de ces variations, parce qu'elles peuvent dépendre presque entièrement de la technique utilisée (lymphocytes normaux stimulés par la phytohémagglutinine, cellules normales mélangées aux cellules leucémiques, etc.). L'avis de TJIO et al. (1966) et de LAWLER (1967), qui se basent sur des séries importantes de malades, résume la situation actuelle. Pour ces auteurs, la proportion de cellules avec Ph^I ne dépend ni du traitement, ni de la durée de la maladie, et ne comporte aucune indication concernant l'évolution actuelle ou future de la LMC chez le patient examiné.

7.- Cytogénétique et traitement.

TOUGH et al. (1962) ont insisté sur la grande sensibilité des

cellules Ph^{I} aux rayons X. Après irradiation de la rate le nombre de cellules Ph^{I} positives diminue nettement. Lorsque le nombre de leucocytes est inférieur à 20.000, les cellules Ph^{I} disparaissent du sang périphérique, mais sont encore présentes dans la moelle osseuse (COURT-BROWN et TOUGH, 1963). On s'est fort attaché depuis ces travaux à suivre l'effet des différents traitements du point de vue cytogénétique, d'autant plus que la plupart des agents thérapeutiques utilisés ont une action mutagène connue vis-à-vis des chromosomes. Il convient cependant de placer le problème de l'action de la thérapeutique sur les chromosomes des cellules leucémiques dans son contexte clinique. Le premier effet obtenu, lorsque le traitement est efficace, est de supprimer les cellules caractéristiques de la crise blastique. On peut difficilement parler à ce moment d'une action spécifique sur les chromosomes. Lors de rémission, le caryotype est identique à celui de la phase chronique: 46 chromosomes dont le Ph^{I} (FREI et al., 1964; TJIO et al., 1966), quel qu'ait été le traitement: busulphan, 6 mercaptopurine, vincristine, démécolcine, etc. Les (ou la) lignées aneuploïdes peuvent servir de "témoin" de l'efficacité de l'agent thérapeutique et dans ces cas précis la régression de la lignée aneuploïde est parallèle à l'amélioration de l'état clinique (GOH et al., 1964). Certaines lignées peuvent disparaître avec certains médicaments ou au contraire se montrer résistantes. COURT-BROWN et TOUGH (1963) ont montré la régression et la disparition complète d'une lignée à 49 chromosomes, Ph^{I} positive et trisomique pour des chromosomes des groupes C,E et G sous l'effet de la 6-mercaptopurine, alors qu'apparaissait une lignée à 44 chromosomes, monosomique pour un chromosome E et un chromosome F, résistante à la 6-mercaptopurine et à la prednisone, mais sensible à la colcémide. On a pu espérer déterminer le traitement en fonction du caryotype. A l'heure actuelle, cet espoir n'est pas encore réalisé: auparavant, il conviendra de déterminer le rôle exact des aneuploïdies lors de la crise blastique. En effet, une lignée peut se montrer "résistante" à un agent thérapeutique déterminé parce qu'elle a une constitution chromosomique particulière ou bien parce qu'elle est leucémique, quel que soit son caryotype.

II. OBSERVATIONS CYTOGENETIQUES DANS LA LEUCEMIE MYELOIDE CHRONIQUE.

L'étude d'une série de sujets atteints de LMC nous donnera l'occasion de préciser la notion de spécificité du Ph^I et le rôle de ce chromosome dans la genèse des aneuploïdies souvent observées au cours de la maladie. Nous comparerons nos données cytogénétiques de la phase chronique à celles de la crise blastique. Enfin, nous proposerons un modèle théorique englobant à la fois les formes de LMC "classiques" avec Ph^I , les LMC sans ce chromosome et les maladies du système hématopoïétique avec Ph^I sans LMC.

1. MATERIEL CLINIQUE.

Nous avons étudié les chromosomes de 25 patients différents, âgés de 13 à 78 ans, chez qui le diagnostic de leucémie myéloïde chronique avait été posé. Les aspects cliniques concernant 21 cas ont été rapportés ailleurs (KENIS et KOULISCHER, 1967). Nous n'en reprendrons que certaines des données, utiles pour une meilleure compréhension des résultats cytogénétiques.

Chez 16 patients, une seule analyse des chromosomes a pu être faite. Chez les 9 autres, 2 ou plusieurs analyses ont pu être effectuées au cours de leur maladie. Au total, 38 analyses ont été menées à bien.

La moelle osseuse a été analysée dans 34 cas sur 38; la méthode du squash a été utilisée 16 fois, l'incubation à court terme 18 fois.

La culture des lymphocytes a été employée 4 fois. Les techniques ont été décrites au chapitre I

Nous avons distingué 3 groupes différents, en fonction de l'état clinique au moment de l'analyse:

- a) Les patients examinés uniquement lors de la phase chronique de leur maladie;
- b) Les patients examinés au cours d'une crise blastique seulement.

- c) Les malades chez qui une analyse des chromosomes a pu être effectuée lors de la phase chronique et lors d'une crise blastique.

A été considérée comme cellule "Ph^I positive" celle où le chromosome était nettement apparent. En cas de doute (chromosomes contractés, superposition, confusion avec un chromosome Y), la cellule a été considérée comme "Ph^I négative".

2. RESULTATS.

Les résultats ont été divisés en trois groupes différents:

A) Patients étudiés lors de la phase chronique (tableau I).

Avant l'analyse des caryotypes, nous envisagerons l'incidence des techniques utilisées sur les résultats obtenus.

a. Résultats globaux. Rôle des techniques utilisées.

Un total de 21 analyses a été effectué chez 17 patients différents. Pour 12 analyses, l'incubation de moelle osseuse a été utilisée, pour 7 c'est la technique du squash qui a été employée, et pour une seule la culture de sang périphérique a été choisie.

Quelle que soit la technique, le chromosome Ph^I était présent lors de toutes les analyses. La proportion de cellules "Ph^I positives" a varié de 12 à 100% avec l'incubation à court terme, de 39 à 90% avec le squash; dans le seul cas analysé au moyen de la culture de lymphocytes, cette proportion fut de 80%. Comme on peut le constater, avec les critères retenus un seul cas a montré 100% de cellules avec Ph^I: il s'agissait d'une incubation de moelle à court terme (cas n° 5). Aucun squash n'a montré une proportion semblable de mitoses Ph^I positives. Chez un malade (n° 10) 2 analyses ont été effectuées à un an d'intervalle, l'une par la méthode du squash, l'autre par l'incubation à court terme. La proportion de cellules avec Ph^I a été identique

TABLEAU I

n°	date ana-lyse	S	Age	Tech	Numérations chromosomiques						Total.	% cell. Ph ^I +
					44	45	46	47	48	49		
I	29-I-63	F	49	CS	voir texte							50
2	I8-2-63	F	4I	CS	I	I	9	4	2	-	II	80
3	2I-I2-64	F	66	IM	-	3	47	-	-	-	50	I2
4	2-8-64	M	63	SQ	-	2	2I	-	-	-	23	39
5	I6-9-64	M	48	IM	-	-	57	3	-	-	60	I00
6	8-I2-64	M	50	IM	-	-	I	I	2	46	50	78
7	25-I-63	M	83	SQ	-	2	37	I	-	-	40	45
8	4-7-65	F	3I	SQ	I	-	28	-	-	I	30	85
9	I5-2-64	M	44	IM	-	3	36	I	-	-	40	82
	I7-6-65			IM	I	-	46	-	-	-	47	90
	9-II-65			IM	I	2	54	2	I	-	60	78
	28-9-64			SQ	-	-	30	I	-	-	3I	90
I0	8-9-65	F	44	IM	-	3	3I	3	-	-	37	89
	8-8-63			SQ	-	-	34	2	-	-	36	52
II		M	39	SQ	-	-	29	2	-	-	3I	54
	4-3-65			IM	-	2	8	I	-	-	II	36
I2	20-4-66	F	62	IM	-	-	6	I	-	-	7	55
I3	26-4-66	M	47	SQ	-	3	I9	-	-	-	22	90
I4	7-7-66	M	54	IM	-	2	I8	I	2	-	23	90
I5	I4-4-66	M	5I	IM	I	5	26	-	-	-	3II	32
I6	8-8-66	F	37	IM	-	2	45	3	-	-	50	20
T O T A U X					5	30	582	22	5	47	69I	

Numérations chromosomiques effectuées chez des patients en phase chronique de leur maladie.

Abréviations: S: sexe; T: Technique; CS: culture du sang périphérique; SQ: squash; IM: incubation de moelle osseuse à court terme; F: féminin; M: masculin.

Ces résultats suggèrent une absence de sélection cellulaire ou une sélection dans le même sens, quelle que soit la technique utilisée.

Dix-huit analyses effectuées sur moelle osseuse ont montré un nombre modal de 46; pour 7 d'entre elles le squash a été utilisé, pour 11 l'incubation à court terme. La comparaison des numérations obtenues par les deux techniques (Tableau II) montre que le nombre de mitoses à 46 chromosomes dépasse chaque fois 90%. On note un excès de cellules hypoploïdes avec l'incubation à court terme, fait que l'on pourrait attribuer à la technique, qui requiert des centrifugations répétées. De toute façon, on ne constate pas, par l'incubation à court terme, de sélection en faveur de cellules normales. La moyenne de mitoses "convenant" à l'analyse cytogénétique a été de 30 pour le squash, de 37 pour l'incubation à court terme.

b. Etude des caryotypes.

L'analyse des cartes chromosomiques permet de distinguer 2 catégories de patients: ceux avec un nombre modal "normal" de 46 chromosomes, et ceux avec un nombre modal "anormal" ou difficile à déterminer.

Patients à nombre modal "normal": il s'agit du cas le plus fréquent, rencontré lors de 19 analyses sur 21. Tous les chromosomes ont une apparence normale sauf un petit acrocentrique qui présente une délétion importante des bras longs dans une certaine proportion de mitoses. L'état clinique actuel de ces patients est le même: ils sont tous en phase chronique d'une LMC. Leur histoire clinique passée est différente pour chacun d'entre eux (KENIS et KOULISCHER, 1967): la maladie peut évoluer depuis longtemps (plusieurs mois ou même plusieurs années), ou au contraire le diagnostic est récent et on ne peut encore parler "d'évolution". Il convient de remarquer que, quelle que soit l'histoire clinique, y compris le traitement, nous avons trouvé un caryotype identique dans tous les cas (fig. 2a). La proportion de cellules avec Ph^I varie de sujet

à sujet sans qu'il soit possible de la relier à l'évolution de la maladie. On peut cependant constater une certaine stabilité lors des analyses successives effectuées pour les cas n° 9, 10 et 11.

Patients à nombre modal différent de 46: 2 patients seulement sont à inclure dans cette catégorie, (n° 1 à 6) qui constitue donc une exception.

La patiente n° 1 avait reçu un traitement antileucémique sous forme de ^{32}P ; la dose totale fut de 129mC répartie sur 5 ans. L'analyse cytogénétique fut pratiquée sur les lymphocytes du sang circulant. La majorité des mitoses montraient des chromosomes présentant des anomalies semblables à celles obtenues après irradiation; fragments acentriques, chromosomes dicentriques, cassures chromatidiennes et chromosomiques (fig. 3c). Une numération précise n'a pas été possible. Cependant, la moitié des métaphases environ possédaient un chromosome Ph^{I} parfaitement reconnaissable (fig 3b/3c) souvent associé aux autres chromosomes du groupe G. Il est difficile d'affirmer que les lésions chromosomiques observées ont été provoquées par le traitement au phosphore radioactif. Les fibrocytes de la peau montraient des chromosomes normaux (fig. 3a).

Le malade n° 6 était dans un état clinique difficile à définir: il ne s'agissait pas d'une crise blastique typique; cependant le patient ne réagissait pas au traitement et est décédé 3 mois après l'analyse (KENIS et KOULISCHER, 1967). L'analyse cytogénétique a montré presque exclusivement des cellules à 49 chromosomes. On notait des surnuméraires dans les groupes C, E et F (fig. 2d). Le chromosome Ph^{I} était nettement identifiable dans 78 des 92% de mitoses à 49 chromosomes. Cette constatation appelle un bref commentaire. La présence du Ph^{I} dans les cellules à 49 chromosomes montre bien qu'il s'agit de cellules leucémiques dérivant d'une cellule ancestrale avec Ph^{I} . On aurait pu s'attendre à observer le Ph^{I} dans toutes les cellules à 49 chromosomes, les surnumé-

étant les mêmes, que le Ph^{I} soit présent ou absent. Les critères que nous avons employés ne nous ont pas permis de le faire. Dans certaines mitoses le degré de contraction des autres chromosomes du groupe G était tel qu'il était difficile d'encore affirmer la présence d'un Ph^{I} . Très vraisemblablement, pour toutes les autres analyses comme pour celle de ce cas, la proportion des cellules Ph^{I} positives observée ne correspond pas à la proportion réelle. C'est sans doute la raison pour laquelle il est si difficile d'établir une relation quelconque entre l'évolution clinique et le nombre de mitoses Ph^{I} positives.

B. Patients étudiés lors d'une crise blastique (Tableau III).

Avant d'étudier les caryotypes, nous envisagerons le rôle des techniques utilisées.

a) Résultats globaux. Rôle des techniques utilisées.

Un total de 9 analyses a été effectué chez 5 patients différents. Le squash a été utilisé 2 fois, l'incubation de moelle osseuse à court terme 6 fois et la culture de sang périphérique 1 fois.

Le chromosome Ph^{I} a été retrouvé dans tous les cas, la proportion de cellules Ph^{I} positives variant de 12 à 100%. Les analyses avec 100% de mitoses montrant le Ph^{I} ont été faites à partir d'une incubation de moelle. Les 2 squashes, chez le même sujet, ont montré respectivement 27 et 12% de cellules avec Ph^{I} . Nous n'avons pas constaté de sélection en faveur de cellules normales. Pour le cas n° 21, une première analyse sur moelle osseuse a montré une seule lignée à 46 chromosomes avec Ph^{I} . Une deuxième analyse 6 semaines plus tard a révélé deux lignées avec Ph^{I} , l'une à 46 chromosomes, l'autre à 44 chromosomes. Les conditions techniques ont été identiques lors des deux analyses. L'état clinique était inchangé, on peut penser que la lignée à 44 chromosomes n'est apparue qu'après la symptomatologie clinique caractéristique d'une crise blastique. Enfin, une troisième analyse fut entreprise sur les cellules du sang circulant 3 semaines plus tard. Les deux lignées ont été retrouvées dans les mêmes propor-

-tions, ce qui pourrait démontrer que ce sont des cellules de même origine qui ont été examinées au moyen de deux techniques différentes: le sang périphérique était devenu un fidèle reflet de la moelle osseuse.

b) Etude des caryotypes.

Comme pour les patients en phase chronique, nous pouvons distinguer 2 catégories de résultats: les sujets avec un nombre modal de 46 chromosomes et ceux avec plusieurs lignées cellulaires à constitution chromosomique différente.

Patients à nombre modal "normal": 3 analyses (cas n° 20 et 1ère analyse du cas n° 21) se sont révélées identiques à celles de la phase chronique de la maladie. Tant le médullogramme que l'évolution de la maladie ont confirmé le diagnostic clinique de crise blastique. Celle-ci ne s'accompagne donc pas nécessairement d'aneuploïdies différentes de celles de la phase chronique.

Patients avec lignées à nombre de chromosomes différent de 46: 5 analyses ont montré la présence de lignées aneuploïdes. Nous les commenterons ci-dessous.

Cas n° 18: la moelle osseuse semble habitée presque exclusivement par des cellules à 47 chromosomes. Celles-ci montrent deux chromosomes Ph^I (fig 2b), image cytogénétique assez fréquente dans la LMC en crise blastique.

Cas n° 22: Ce patient présente dans sa moelle osseuse 2 lignées cellulaires, l'une à 46 chromosomes, l'autre à 47 chromosomes. La première possède 1 chromosome Ph^I , la seconde en possède 2. La deuxième analyse a montré une proportion plus grande de cellules à 47 chromosomes avec 2Ph^I , en même temps que l'état clinique empirait. Deux semaines après cette 2ème analyse, le malade décédait.

TABLEAU II

Technique	Numérations chromosomiques						Nombre de cas	Nombre de mitoses
	44	45	46	47	48	49		
SQ	I	7	I98	6	-	I	7	2I3
IM	3	22	374	I4	I	-	II	4I4

Comparaison des numérations chromosomiques obtenues par 2 techniques différentes (SQ: squash; IM: incubation de moelle osseuse), chez des patients en phase chronique de LMC avec nombre modal normal.

TABLEAU III.

N°	Date analyse	S	Age	Techn.	Numérations chromosomiques							% cel. Ph ^I +	Divers
					44	45	46	47	48	49	Total		
I8	I5-2-65	F	I2	IM	-	I	3	30	I	-	35	85	2 Ph ^I
I9	I8-8-66	F	45	IM	I	2	3I	I5	I	-	50	94	46 Ph ^I 47 Ph ^I G+
20	I4-8-63	M	64	SQ	-	-	II	-	-	-	II	27	décès:
	30-9-63			SQ	-	I	23	-	-	-	24	I2	30-9-64
2I	I2-I-65	M	30	IM	-	2	26	2	-	-	30	80	décès
	24-2-65			IM	2I	-	I2	-	-	I	34	67	3I-3-65
	I6-3-65			6S	I4	I	8	I	-	-	24	70	
22	I-6-65	M	54	IM	-	I	25	I7	3	-	46	I00	2 Ph ^I
	7-7-65			IM	-	I	6	28	-	-	35	I00	décès: 20-7-65
T O T A U X					36	9	I45	93	5	I	289		

Numérations chromosomiques effectuées chez des patients atteints de LMC, lors de la crise blastique.

Abréviations: voir tableau I.

Cas n° 2I: lors d'une première analyse en crise blastique, ce patient n'a montré qu'une lignée à 46 chromosomes avec Ph^I dans 80% des mitoses examinées. Peu de temps après, en utilisant la même technique, nous avons pu mettre en évidence une lignée à 44 chromosomes, Ph^I positive, monosomique pour un chromosome du groupe C et un chromosome du groupe E. Des cellules à 46 chromosomes avec Ph^I étaient toujours présentes. Une analyse pratiquée peu de temps avant le décès sur du sang périphérique a montré la persistance de la lignée à 44 chromosomes.

Cas n° I9: deux lignées ont pu être observées chez cette patiente, l'une à 46 chromosomes Ph^I positive (62% des mitoses examinées), l'autre à 47 chromosomes, avec un Ph^I et un chromosome G surnuméraire (30% des mitoses examinées; fig. 2c). Il n'a pas été possible de répéter les analyses avant le décès.

En résumé, nous avons observé lors de la crise blastique les caryotypes suivants:

-46 chromosomes dont le Ph^I (image inchangée par rapport à la phase chronique de la maladie).

-l'apparition d'une lignée hyperploïde avec, dans deux cas, une duplication du Ph^I .

-l'apparition d'une lignée hypoploïde avec persistance du Ph^I .

C. Patients étudiés en phase chronique et en crise blastique (Tableau IV).

Une fois encore, avant d'étudier les caryotypes, nous envisagerons le rôle des techniques utilisées.

a) Résultats globaux. Rôle des techniques utilisées.

Huit analyses ont été effectuées chez 3 patients différents, d'abord lors de la phase chronique de leur maladie, ensuite lors d'une crise blastique. Le squash a été employé à 7 reprises, la culture du sang une fois. Pour la malade 23, on remarque que la 2ème analyse, en phase chronique comme la précédente et la suivante, a montré une augmentation importante

TABLEAU IV.

N°	Date analyse	Sexe	Age	Techn.	Numérations chromosomiques							%cell. Ph ⁺ +	Décès
					44	45	46	47	48	49	Tot.		
23	5-2-63	F	17	SQ	-	I	I6	3	-	-	20	50	3-6-64
	23-4-64			SQ	-	-	I6	I	-	-	I7	94	
	30-4-64			SQ	I	2	I6	2	-	-	2I	57	
	5-5-64			SQ	I	2	I5	I	-	-	I9	57	
24	20-9-63	M	36	SQ	-	I	I6	-	-	-	I7	64	18-2-64.
	17-2-64			CS	-	3	68	I	-	-	72	45	
25	14-8-63	M	29	SQ	I	4	33	-	-	-	38	39	5-3-64
	23-6-64			SQ	I	I	2I	I	-	-	24	54	

Numérations chromosomiques effectuées chez des patients lors de la phase chronique et lors d'une crise blastique de leur LMC (crise blastique:dernière analyse).

Abréviations: voir Tableau I.

des cellules avec Ph^{I} . La technique ayant été la même, on peut penser que des variations dans le nombre de cellules Ph^{I} positives peuvent survenir sans répercussion clinique apparente. La culture de sang du cas n° 24 mérité quelques commentaires. La prise de sang fut effectuée la veille du décès du malade. Le sang fut divisé en 3 lots, qui tous reçurent de la phytohémagglutinine. Le premier lot fut observé après 24 heures de séjour in vitro. En principe, aucune mitose de lymphocyte normal stimulé par la phytohémagglutinine n'aurait eu le temps de se produire (McKINNEY et al. 1962). Les autres lots furent fixés respectivement 48 et 72 heures de séjour in vitro. On constate (Tableau V) que si le nombre de

TABLEAU V.

Séjour <u>in vitro</u>	Numération chromosomiques			Cell. $\text{Ph}^{\text{I}+}$
	45	46	47	
24h.	-	30	-	46%
48h.	1	11	-	41%
72h.	2	27	2	45%

Numérations chromosomiques effectuées sur du sang d'un patient en crise blastique, lors de temps de séjour in vitro différents.

mitoses varie (il y en a très peu après 48 heures), la proportion de cellules Ph^{I} positives reste pratiquement constante, comme si l'on avait observé à chaque reprise des cellules de même origine.

b) Etude des caryotypes.

Le caryotype n'a pas changé, chez ces 3 patients, lors du passage de la phase chronique à la crise blastique, qui a précédé

de peu le décès. Pour ces cas, l'analyse cytogénétique n'a pas permis de faire une distinction entre les 2 phases de la maladie. Rappelons que la première analyse du cas n° 2I, également en crise blastique, était identique à celle de la phase chronique, de même que les deux analyses du cas n° 20.

D. Chromosome Ph^{I} et aneuploïdies cellulaires.

Nous avons voulu vérifier si le Ph^{I} était un facteur d'instabilité chromosomique au sein de la cellule. Si tel était le cas, plus la proportion de cellules Ph^{I} positives serait élevée pour une analyse donnée, plus grandes seraient les chances d'observer des aneuploïdies, le nombre de cellules "instables" étant plus grand.

Nous avons divisé nos résultats, indépendamment de l'état clinique du patient et de la technique utilisée, en 5 catégories, d'après le nombre de mitoses Ph^{I} positives observées. La 1ère catégorie groupe les analyses ayant montré de 0 à 20% de cellules Ph^{I} positives, la 2ème celles en ayant montré de 21 à 40%, la 3ème celles de 41 à 60%, la 4ème celles de 61 à 80% et la 5ème celles de 81 à 100%.

a) Résultats en fonction du nombre de cas:

Pour éviter une sélection éventuelle due à l'accumulation de numérations chromosomiques provenant d'un même sujet, nous n'avons considéré, en un premier temps, qu'une analyse par cas, la première s'il y en avait plusieurs (cas n° 2 à 25, soit 24 cas différents). Les numérations, groupées par catégories, sont reprises au Tableau VI. Il apparaît très nettement (fig. 4) que le nombre de cellules aneuploïdes, c'est-à-dire celles dont le nombre de chromosomes est différent de 46, augmente avec la proportion de cellules Ph^{I} positives observée. Lorsque cette proportion est égale ou inférieure à 60%, le nombre de cellules à 46 chromosomes est compris entre 86 et 92%. Au contraire, lorsque la proportion de cellules avec Ph^{I} dépasse 60%, le nombre de cellules à 46 chromosomes diminue considérablement (48,1% et 73,2%).

b) Résultats en fonction du nombre d'analyses.

Si nous considérons l'ensemble de nos analyses (37 analyses), de la même façon que ci-dessus (Tableau VII), l'allure générale des différentes courbes reste la même.

La présence du chromosome Ph^{I} semble bien liée à l'apparition de cellules aneuploïdes. Plus la proportion de cellules Ph^{I} positives sera grande, plus grandes seront les chances d'observer cet effet particulier du Ph^{I} . On peut remarquer que les aneuploïdies se font plutôt dans le sens de l'hyperploïdie, ce qui permet d'exclure en partie comme facteur responsable des motifs d'ordre purement technique, tels que rupture de membrane cellulaire lors du choc hypotonique ou de la centrifugation, qui provoquent le plus souvent des pertes de chromosomes, plutôt que des gains.

E. Crise blastique et aneuploïdies.

Après avoir étudié l'effet général du Ph^{I} au niveau cellulaire, il convenait de tenir compte à nouveau de l'état clinique des patients. En effet, le nombre de cellules Ph^{I} positives, de même que le nombre augmenté d'aneuploïdies, pouvaient correspondre à un stade déterminé de la maladie, par exemple à la crise blastique.

a) Résultats en fonction du nombre de cas.

Nous avons tout d'abord considéré les résultats d'une seule analyse par patient; 16 en phase chronique (Tableau I), 8 en crise blastique (Tableau II et Tableau III). Lorsqu'il y avait plusieurs analyses pour un même sujet, la première seulement a été utilisée. Il ressort (Tableau VIII) que le nombre de cellules diploïdes est plus bas lors de la crise blastique (fig. 5). Le test de χ^2 (avec ad.1) est hautement significatif ($p < 0,001$). On peut signaler également que la proportion de cellules à 46 chromosomes est moindre lors de la phase chronique que chez le normal (sans Ph^{I}). On peut rattacher cette observation à la liaison qui semble exister entre le Ph^{I} et l'apparition d'aneuploïdies; ou, plus simplement, au fait qu'un malade, considéré comme étant en phase chronique, avait une lignée à 49 chromosomes. Si ce malade avait été exclu de la série dans la-

TABLEAU VI.

Catégories	Nombre de cas	Numérations chromosomiques						Total
		44	45	46	47	48	49	
0-20%	2	-	5 (5)	92 (92)	3 (3)	1	-	100 (100)
21-40%	5	2 (1,8)	13 (11,3)	99 (86,0)	(1) (0,9)	-	-	(115) (100)
41-60%	4	-	3 (3,0)	97 (90,6)	7 (6,4)	-	-	107 (100)
61-80%	4	1 (0,9)	4 (3,7)	52 (48,1)	3 (2,9)	2 (1,8)	46 (42,6)	108 (100)
81-100%	9	2 (0,7)	12 (3,6)	247 (73,2)	68 (20,2)	7 (2,0)	1 (0,3)	337 (100)

Numérations chromosomiques effectuées dans 24 cas différents de LMC, classées par catégories en fonction du nombre de cellules Ph^I positives. Les chiffres entre parenthèses indiquent le % pour chaque catégorie.

TABLEAU VII.

Catégories	Nombre d'analyses	Numérations chromosomiques						Total
		44	45	46	47	48	49	
0-20 %	3	-	6 (1,8)	115 (92,7)	3 (2,5)	-	-	124 (100)
21-40 %	5	2 (1,8)	13 (11,3)	99 (86,0)	1 (0,9)	- -	- -	115 (100)
41-60 %	9	3 (1,2)	11 (4,0)	242 (89,6)	14 (5,2)	- -	- -	270 (100)
61-80 %	7	37 (16,3)	7 (3,1)	126 (55,8)	6 (2,6)	3 (1,4)	47 (20,8)	226 (100)
81-100 %	14	3 (0,8)	16 (3,3)	346 (71,5)	109 (22,5)	7 (1,4)	1 (0,5)	484 (100)

Numérations chromosomiques effectuées lors de 37 analyses de 24 cas différents de LMC, classées par catégories en fonction du nombre de cellules Ph^I positives. Les chiffres entre parenthèses indiquent le % pour chaque numération.

-quelle il se trouve (pour être placé parmi les patients en crise blastique dont il se rapproche tant pour la symptomatologie que par l'évolution de son affection), on n'aurait pas noté de différence entre les numérations effectuées chez le normal et chez les patients en phase chronique.

b) Résultats en fonction du nombre d'analyses.

Si nous examinons l'ensemble des numérations (37 analyses), nous voyons (Tableau IX) que les résultats sont fort semblables aux précédents. Tout au plus peut-on remarquer que le nombre de cellules à 46 chromosomes est un peu plus élevé dans cette série par rapport à la précédente (84,4% au lieu de 81,2%).

On peut donc affirmer que d'une façon générale, l'aneuploïdie est plus marquée lors de la crise blastique que lors de la phase chronique. La différence observée entre les numérations de la phase chronique (81,2% de cellules à 46 chromosomes, 5,7% de cellules hypoploïdes et 12,3% de cellules hyperploïdes) et celles de la crise blastique (61,7% de cellules à 46 chromosomes, 10,3% de cellules hypoploïdes et 28% de cellules hyperploïdes) est hautement significative (p 0,001).

TABLEAU VIII

stade	Nombre de cas	Numérations chromosomiques						Total
		44	45	46	47	48	49	
chroni-	16	4	27	436	18	5	47	537
		(0,7)	(5,0)	(81,2)	(3,3)	(1,0)	(8,8)	(100)
Crise	8	17	12	175	77	2	-	283
blast.		(6,0)	(4,3)	(61,7)	(27,1)	(0,9)		(100)

Comparaison entre les numérations effectuées chez 16 sujets en phase chronique et 8 sujets en crise blastique de LMC. Les chiffres entre parenthèses indiquent les pourcentages.

T A B L E A U IX

Stade	Nombre d'ana- lyses	Numérations chromosomiques						Total
		44	45	46	47	48	49	
chroni- que.	25	7 (0,8)	38 (4,7)	678 (84,4)	28 (3,4)	5 (0,6)	47 (5,8)	803 (100)
Crise blast.	12	38 (9,4)	15 (3,7)	249 (61,6)	96 (23,7)	5 (1,2)	1 (0,2)	404 (100)

Comparaison entre les numérations effectuées lors de 25 analyses en phase chronique et 12 analyses en crise blastique chez 24 sujets atteints de LMC. Les chiffres entre parenthèses indiquent les pourcentages.

F. Différenciation cytogénétique de 2 types de crise blastique.

Nous avons vu que la différence observée entre les numérations de la phase chronique et de la crise blastique est hautement significative. Il nous a semblé toutefois que l'on pouvait distinguer 2 types chromosomiques lors de la crise blastique. Le premier (cas n° 20, 1ère analyse du cas 21, cas 23 à 25) conserve une image identique à celle de la phase chronique: 46 chromosomes et le Ph^{I} . Le second montre l'apparition de lignées aneuploïdes (cas n° 18, 19, les 2 dernières analyses du cas 21 et le cas 22). Les résultats de ces numérations ont été comparés aux numérations de la phase chronique de la maladie (tableau X). Si l'on observe une différence très nette entre les 2 types cytogénétiques de crise blastique (fig. 5b), la différence entre les numérations de la phase chronique et celles de la crise blastique à 46 chromosomes est faible et sans signification statistique, ($0,70 > p > 0,50$). Ces résultats nous montrent que la cytogénétique seule n'est pas toujours suffisante pour différencier les 2 stades de la LMC.

T A B L E A U X.

Crise blast.	Nombre anal.	Numérations chromosomiques						Total
		44	45	46	47	48	49	
Lignées euploïde	6	2 (1,1)	9 (5,0)	164 (91,1)	5 (2,8)	-	-	180 (100)
Lignées aneupl.	6	36 (16,0)	6 (2,8)	85 (37,9)	91 (40,6)	5 (2,3)	1 (0,4)	224 (100)

Comparaison entre les numérations effectuées lors de la crise blastique à nombre modal de 46 et celles avec apparition de lignées aneuploïdes.

7. Cellules polyploïdes.

Les cellules polyploïdes sont fréquemment observées dans les échantillons de moelle osseuse provenant de sujets atteints de LMC. Cette polyploïdie s'étend de la tétraploïdie à la présence de plusieurs centaines de chromosomes. Lorsque les superpositions ne sont pas trop nombreuses, il est possible de distinguer autant de chromosomes Ph^I qu'il y a de multiples de 46. Ces cellules sont très vraisemblablement des mégacaryocytes, qui seraient donc également porteurs du Ph^I . Des observations semblables à celle-ci (BRECHER et TJIO, 1963; FREI et al.; 1964) plaident en faveur d'une origine commune des myéloblastes et des mégacaryocytes. Rappelons que des observations directes (CLEIN et FLEMANS, 1966), et non plus statistiques, montrent l'origine commune des érythroblastes et des myéloblastes. Les 3 lignées cellulaires principales de la moelle osseuse auraient donc une même cellule souche ancestrale.

III. DISCUSSION.

La découverte du Ph^I a été suivie de recherches qui ont fourni un certain nombre de précisions cytogénétiques concernant la LMC. Paradoxalement, l'abondance même des données tend à obscurcir un tableau qui semblait assez clair à l'origine: une mise au point s'avère nécessaire.

1° Technique et cytogénétique des leucémies myéloïdes chroniques.

Avant toute discussion concernant les résultats, il convient de se demander si les techniques utilisées ont été adéquates pour mettre en évidence le Ph^I dans tous les cas de LMC d'une part, au niveau de toutes les cellules porteuses de ce chromosome d'autre part. Nous envisagerons successivement ces deux problèmes.

a) Mise en évidence du Ph^I : rôle de la technique.

La découverte du Ph^I s'est faite à partir de cultures de sang périphérique stimulé par la phytohémagglutinine (PHA) suivant la méthode décrite par MOORHEAD et al. (1960): il s'agit des travaux initiaux de NOWELL et HUNGERFORD (1960) et de TOUGH et al. (1961-1962). La technique de MOORHEAD permettait en effet d'obtenir des mitoses particulièrement bien étalées convenant à l'analyse morphologique détaillée des chromosomes (BAIKIE, 1965). Des études sur moelle osseuse, faites à la même époque (SANDBERG et al., 1961) sur des sujets atteints de LMC n'avaient pas montré d'anomalie du caryotype. Il est donc naturel que la technique de culture de sang périphérique ait été à l'origine des travaux de cytogénétiques entrepris chez les malades atteints de LMC, et sans doute chez les leucémiques en général.

Parallèlement aux recherches chromosomiques, des études ayant pour but de préciser les mécanismes d'action de la phytohémagglutinine furent entreprises. Nous avons rappelé (page 3) qu'elles ont permis de montrer que ce sont les petits lymphocytes du sang circulant qui se divisent sous l'action de la PHA, suivant une

réaction de type immunologique. On s'est alors posé la question suivante: la culture de sang périphérique est-elle bien la meilleure méthode pour étudier les chromosomes des leucémies? On pouvait effectivement supposer que les lymphocytes normaux, présents dans le sang circulant pouvaient, en se divisant sous l'effet stimulant de la PHA, fausser l'image cytogénétique réelle de la maladie. Celle-ci, théoriquement, ne pouvait être donnée que par la moelle osseuse.

Effectivement, certains cas sans Ph^I par la technique de culture de sang périphérique se montraient positifs si l'on étudiait les chromosomes de la moelle osseuse (TOUGH et al., 1962; FITZGERALD et al., 1963). On préconisa donc, fort justement, l'étude des mitoses de la moelle osseuse. Cependant, comme les cellules immatures en circulation dans le sang, telles que myéloblastes, promyélocytes et myélocytes, se divisent sans stimulation par PHA (SANDBERG et al., 1964), on admit que l'incubation in vitro de sang périphérique sans addition de PHA pouvait être utilisée pour mettre en évidence le Ph^I (SPEED et LAWLER, 1964). Malgré un avis contradictoire (de GROUCHY et al., 1965) la situation pouvait se résumer de la façon suivante: toute technique pour mettre en évidence le Ph^I est utile, à la condition expresse d'éviter la stimulation des lymphocytes normaux par le PHA.

SANDBERG et al., (1962-1964) ont été plus catégoriques depuis: toute incubation in vitro, même brève, favoriserait la multiplication de cellules normales, plus susceptibles de s'adapter au nouvel environnement. Cette position peut étonner lorsqu'on se rappelle que les cellules néoplasiques survivent indéfiniment in vitro et peuvent être transplantées avec succès in vivo (montrant par là leurs facultés d'adaptation), ce qui n'est pas le cas des cellules euploïdes non cancéreuses. Quoi qu'il en soit, ces auteurs préconisent dans tous les cas l'examen direct: les étalements doivent être préparés dans les minutes qui suivent le prélèvement. Cet avis implique un fait intéressant; dans toute moelle leucémique, il existerait des cellules normales, peut-être suscep-

tible de recoloniser la moelle une fois que les cellules leucémiques auront été détruites (ou inhibées dans leur croissance) par un traitement adéquat.

Notre expérience personnelle, semblable en cela à celle de nombreux autres chercheurs, nous a montré que l'on n'obtient pas toujours des cellules convenant à l'analyse cytogénétique par la méthode directe. Le nombre de mitoses adéquates peut être augmenté par une incubation de quelques heures in vitro. Par cette technique, nous avons pu observer jusqu'à 100% de cellules à caryotype anormal, ce qui exclut toute notion de sélection en faveur des cellules normales. Nous n'avons donc pas hésité à l'employer, surtout lorsqu'un "squash" préalable sur le même matériel ne montrait pas un nombre suffisant d'étalements convenables. Par voie de conséquence, nous avons considéré comme valables les résultats obtenus dans d'autres laboratoires, quelle que soit la technique utilisée, pourvu qu'elle ne comporte pas d'addition du PHA.

Signalons pour terminer un raffinement technique introduit par ELVES et ISRAELS (1967), qui permet de ^{se} rapprocher encore plus de l'image cytogénétique in vivo. Ces auteurs injectent par voie intraveineuse 10 mg de vinculeucoblastine 2 heures avant la ponction de la moelle, de façon à bloquer les mitoses in situ. Cette technique n'est pas sans rappeler celle de BOTTURA et al., (1961), qui injectaient de la colchicine par voie intraveineuse avant la ponction de la moelle. Elle peut se justifier parce qu'elle est, d'après les auteurs, inoffensive, et permet d'augmenter considérablement le nombre de belles mitoses, en petit nombre lorsqu'une autre méthode est employée.

b) Signification de la proportion de mitoses Ph^I positives en fonction de la technique.

La signification du nombre de cellules Ph^I positives par rapport au nombre de cellules Ph^I négatives est difficile à apprécier. On n'a pu trouver de corrélation entre le nombre de cellules avec Ph^I et l'évolution de la maladie (TJIO et al., 1966; LAWLER, 1967). Aux problèmes techniques évo-

-qués ci-dessus, s'ajoutent les incertitudes concernant l'identification des chromosomes. Si ceux-ci sont fort contractés, si les superpositions sont nombreuses, la numération est possible, mais non le classement. Une mitose sera alors considérée par l'observateur objectif comme étant Ph^{I} négative, alors que le chromosome de Philadelphie pourrait être malgré tout présent. Nous avons illustré ce fait par notre cas n° 6 (p. 24). Nous nous rangeons donc parmi les nombreux chercheurs n'ayant pu trouver la signification du nombre de cellules Ph^{I} positives du point de vue clinique. La difficulté nous paraît très grande. En effet, même si on pouvait avoir une image médullaire "réelle", cette image ne serait valable que pour l'endroit ponctionné.

2. Spécificité du chromosome Ph^{I} . Intérêt clinique et thérapeutique.

La leucémie myéloïde chronique (y compris les crises blastiques) appartient au groupe des désordres myéloprolifératifs, qui comprend notamment les métaplasies myéloïdes, les polycythésies vraies et les myéloscléroses (DAMESCHEK et GUNZ, 1958). Ces différentes maladies peuvent se transformer en LMC (GOH et SWISHER, 1964). Il est évident que toute étude de la spécificité du Ph^{I} doit comporter une recherche cytogénétique concernant les désordres myéloprolifératifs. Nous y avons consacré une partie du présent travail (chapitre V); les résultats obtenus seront discutés ultérieurement dans le contexte général des leucémies. Du point de vue de la LMC, qui est celui que nous envisagerons ici, on peut déjà préciser que tant dans notre étude que dans celles parvenues à notre connaissance, aucun chromosome Ph^{I} n'a pu être mis en évidence sauf quelques rares exceptions. Ce sont ces exceptions, de même que tous les cas de LMC avec ou sans Ph^{I} , qui feront l'objet de la présente discussion. Celle-ci a pour but de répondre à la question suivante: l'existence de LMC sans Ph^{I} , ou de Ph^{I} sans LMC, met-elle en doute la notion même de la spécificité du Ph^{I} ?

Auparavant, nous voudrions insister sur le fait que nous n'avons aucune raison valable de mettre en doute les résultats négatifs (LMC sans Ph^{I}) obtenus par certains chercheurs. Ces chercheurs en effet ont employé des techniques adéquates (p. 37), ayant montré un Ph^{I} dans d'autres cas étudiés dans leurs laboratoires. De même, nous ne pouvons envisager, vu nos techniques actuelles, l'exis-

-tence de petites délétions non décelables du chromosome 21, permettant d'expliquer les LMC avec caryotype normal. Ces cas peuvent exister; en pratique, lorsqu'un caryotype est décrit comme "normal" dans une LMC, nous admettons ce diagnostic.

a.) Leucémies myéloïdes chroniques sans chromosome Ph^I .

Le nombre de LMC sans Ph^I est faible (voir page 16): il ne dépasserait pas 10% des cas étudiés. On y trouve la LMC de l'enfant. La leucémie myéloïde chronique est rare dans le jeune âge: 7 enfants sur 516 atteints de leucémie dans la série danoise de IVERSEN (1966), 9 enfants décrits par REISMAN et TRUJILLO (1963), représentant 3,75% des cas de leucémie dans leur série de 160 sujets âgés de moins de 10 ans. Que ce soit chez l'adulte ou chez l'enfant, l'évolution clinique de la LMC sans Ph^I est différente de celle avec Ph^I . La durée de survie est raccourcie (18 mois au lieu de 45 après l'établissement du diagnostic d'après les données de TJIO et al., 1966), le traitement habituel est peu efficace (TJIO et al., 1966). On a pu se demander, vu des différences, s'il ne s'agissait pas de 2 entités cliniques distinctes (KENIS et KOULISCHER, 1967), et s'il ne convenait pas de réserver le terme de "leucémie myéloïde chronique" aux seuls cas avec Ph^I . On peut objecter qu'avec ou sans Ph^I , le tableau hématologique est le même et est compatible avec le diagnostic de LMC, au moins à un moment déterminé. Aussi, convient-il de préciser que la spécificité du Ph^I n'est pas mise en doute en ce qui concerne l'évolution de leucémie myéloïde chronique, mais qu'un tableau hématologique identique à celui de la LMC pourrait ne pas être lié à la présence d'un chromosome de Philadelphie?

b.) Chromosome Ph^I sans leucémie myéloïde chronique. Distinction entre aberration chromosomique constitutionnelle et aberration acquise.

Nous avons rapporté les observations concernant la présence d'un Ph^I sans LMC (voir p. 17). Plusieurs hypothèses peuvent être

formulées à ce sujet. Il pourrait s'agir de désordres myéloprolifératifs qui se transformeront ultérieurement en LMC. Il faudrait convenir dans ce cas que la délétion d'un 2I précède de très longtemps (plusieurs années) l'installation clinique de la LMC. Il pourrait aussi s'agir de la délétion d'un chromosome 22 et non d'un chromosome 2I. Il pourrait enfin s'agir d'une aberration chromosomique constitutionnelle et non acquise. La signification de l'anomalie serait dans ce cas totalement différente. Elle serait observée presque exclusivement chez des enfants malformés, dont le développement embryonnaire se serait effectué sous le contrôle d'un génome perturbé. Un chromosome identique morphologiquement au Ph^{I} a été rapporté chez des polymalformés graves, soit en surnombre (PFEIFFER et al. 1962; DENT et al., 1963) soit dans des cellules à 46 chromosomes (LEJEUNE et al., 1964; DUBOIS et al., 1965; GOH, 1966). Aucun de ces enfants n'a vécu suffisamment longtemps que pour développer une leucémie myéloïde chronique. Le cas de LEJEUNE et al. montrait un taux de gamma-globulines abaissé, en plus d'un tableau morphologique décrit comme "anti-mongolisme", par opposition au mongolisme ou trisomie 2I. Nous pensons que les cas avec Ph^{I} sans LMC rapportés chez des adultes n'ont aucun lien avec les aberrations constitutionnelles; nous reprendrons les cas de délétion d'un G (2Iq-) lorsque nous aborderons le problème des leucémies chez les porteurs d'aberrations chromosomiques constitutionnelles.

c.) Résumé de la situation actuelle.

La grande majorité des cas de LMC présente le chromosome de Philadelphie. Le petit nombre de cas sans ce chromosome, ou avec ce chromosome, mais sans symptomatologie clinique de LMC, ne peuvent mettre en doute sa spécificité. Il convient cependant de retenir qu'une image identique à celle de la LMC peut se produire sans Ph^{I} . Inversement, la présence d'un Ph^{I} peut ne pas s'accompagner d'un tableau hématologique de LMC. Ceci nous amènera à discuter plus loin la possibilité suivante: la LMC dépendrait de 2 facteurs différents. L'un serait le Ph^{I} , l'autre un facteur inconnu, mais indispensable à l'évolution caractéristique de la maladie. Chacun de ces facteurs pourrait provoquer isolément un tableau

hématologique semblable à celui d'une LMC, mais il doivent être combinés pour que ce tableau, qui n'est en somme qu'un "instantané", s'insère dans celui d'une leucémie myéloïde chronique et non dans celui d'une autre affection, voisine, mais différente.

Du point de vue clinique, la mise en évidence d'une "leucémie myéloïde chronique" sans Ph^I rappellerait au clinicien que l'évolution et la réaction au traitement seront différentes de celles de la LMC "classique". L'observation d'un Ph^I sans LMC l'inciterait à suivre de près le malade de façon à déceler au plus tôt toute transformation en LMC.

3.- Chromosome Ph^I et aneuploïdies.

Nous avons montré, dans notre série de patients, que le nombre de cellules aneuploïdes varie parallèlement à la fréquence des mitoses Ph^I positives. Ce fait semble révélateur d'un "état d'instabilité chromosomique" lié à la présence du chromosome Ph^I , indépendamment du stade clinique de la maladie. Des cellules ou des lignées aneuploïdes pourront donc être observées tant en phase chronique (notre cas n° 6 par exemple) qu'en crise blastique. Quoique plus fréquemment rencontrées lors de la crise blastique, ces aneuploïdies ne permettront pas de préciser le stade de la maladie au moment de l'analyse cytogénétique.

Le chromosome de Philadelphie est-il directement responsable des aneuploïdies observées? Il est difficile de répondre à cette question de façon définitive. Le Ph^I est le témoin, visible au microscope optique, du nouvel état d'instabilité de la cellule leucémique. Il peut être le facteur primaire de la maladie; dans ce cas, les aneuploïdies seraient directement dépendantes de la délétion du 2I. Mais le Ph^I peut aussi être un facteur secondaire du processus leucémique: un chromosome 2I normal peut avoir été altéré par un facteur encore inconnu (un virus par exemple). Ce serait ce facteur, toujours présent dans la cellule, qui induirait l'apparition d'aneuploïdies nouvelles. Cependant, même si l'on accepte cette deuxième hypothèse, il convient de souligner que la spécificité apparente du Ph^I vis-à-vis de la LMC laisse penser que l'action de "facteur inconnu" est étroitement liée à la délétion d'un 2I. Celle-ci apparaît comme un élément indispensable aux processus ultérieurs. La présence d'une anomalie chromosomique provoque-t-elle l'apparition d'autres aberrations chromosomiques?

L'importance de ce phénomène a été soulignée lors de la méiose chez des sujets porteurs d'aberrations constitutionnelles. Cet effet pourrait-il être observé. Il est connu sous le nom "d'effet interchromosomique" à la mitose, au niveau des cellules porteuses d'aberrations chromosomiques acquises? Nos résultats semblent le suggérer.

Quelle que soit la position que l'on adopte, une relation étroite entre le Ph^I d'une part et les aneuploïdies, d'autre part, semble évidente, indépendamment du stade clinique de la maladie.

4. Cytogénétique de la crise blastique.

Comme l'analyse de nos résultats nous l'a montré, des sujets en crise blastique peuvent avoir un caryotype absolument inchangé par rapport à celui de la phase chronique. On n'a pas assez insisté sur ce point, à notre avis, et on a trop voulu lier l'aneuploïdie à la crise blastique. Bien entendu, nous reconnaissons que d'une façon générale on observe plus de cellules aneuploïdes, ou de lignées aneuploïdes, lors de la crise blastique, mais il ne s'agit pas d'une règle absolue. Des cas en phase chronique ont montré des aneuploïdies, outre le Ph^I (p. 24); nous en avons observé plusieurs. L'un d'entre eux n'a pas été inclus dans notre série parce que nous voulions suivre son évolution. Nous le rapportons brièvement à titre d'exemple. Il s'agit d'une malade dont le caryotype il y a 2 ans a montré, outre une symptomatologie clinique typique de LMC (CAUCHIE et DENOLIN, 1966), un chromosome Ph^I et une lignée à 47 chromosomes avec un G surnuméraire. L'état de cette patiente est absolument stationnaire depuis 2 ans; sa leucocytose varie entre 20.000 et 30.000, avec parfois de rares myélocytes, sans aucun traitement. Inversement, nous avons montré que 6 des analyses que nous avons effectuées chez des sujets en crise blastique indubitable (ayant entraîné le décès à très brève échéance), montraient un caryotype inchangé par rapport à la phase chronique, et un test de χ^2 entre les numérations de la phase chronique et celles de la crise blastique à 46 chromosomes n'a pas montré de différence significative.

Si l'on admet, d'après ce qui précède, qu'une aneuploïdie quelconque

autre que le Ph^I n'est ni indispensable ni spécifique d'une crise blastique de LMC, on pourra s'attendre à observer un grand nombre d'images cytogénétiques différentes lors de cette phase aiguë de la LMC. C'est effectivement ce que l'on constate. Les aneuploïdies se présentent donc plutôt comme un épiphénomène de la maladie, le Ph^I étant au contraire spécifique.

Les aneuploïdies de la crise blastique, même si elles ne sont qu'un épiphénomène, sont intéressantes à étudier. Si l'on admet l'origine unique de la LMC et de la crise blastique, on pourra tenter de relier entre eux les divers caryotypes observés chez un individu déterminé: ils dérivent tous d'une cellule primitive à 46 chromosomes avec Ph^I . C'est ce que LEJEUNE et al. (1963) ont appelé "évolution clonale". Celle-ci a été démontrée dans certains cas "privilégiés" de LMC (LEJEUNE et al., 1965; de GROUCHY et al., 1965 et 1966). Une notion nouvelle est issue de ces patientes études: celle de "duplication sélective des surnuméraires", et de duplication (ou non-disjonction) sélective des chromosomes marqueurs. C'est pourquoi l'on observerait plus souvent que toute autre aneuploïdie la duplication ou même la triplication (de GROUCHY et al., 1965; SCHROEDER et BOCK, 1965), du Ph^I .

5.- Agents mutagènes et chromosomes dans la leucémie myéloïde chronique.

Les "agents mutagènes" sont ceux qui peuvent induire des mutations à l'échelle du gène ou à celle du chromosome. "La démarcation entre mutations ponctuelles et chromosomique étant arbitraire, il ne paraît donc pas essentiellement justifié de distinguer avec E. FAVRET (1960) les substances en mutagènes et mutachromosomes (cette dernière dénomination étant réservée aux substances qui produisent des aberrations chromosomiques)" (MOUTSCHEN, 1964). Les agents mutagènes les plus connus peuvent être d'origine chimique, physique (radiations de divers types) ou biologiques (virus par exemple); de très nombreux travaux leur sont consacrés. Nous nous limiterons dans ce paragraphe à exposer quelques données seulement du vaste domaine de la mutagenèse, qui nous paraissent concerner tout particulièrement la cytogénétique des LMC.

D'une façon générale, les altérations chromosomiques des agents mutagènes telles qu'on peut les observer lors d'expérimentation in vitro ne ressemblent en rien aux aberrations chromosomiques des leucémies humaines. En effet, on note en culture de tissus l'apparition de cassures chromosomiques, la présence de fragments acentriques, de chromosomes di ou tricentriques, d'anneaux, d'images complexes dites tri- ou quadriradiées, etc. La cytogénétique des leucémies au contraire montre essentiellement des gains ou des pertes de chromosomes, et très rarement la présence de remaniements plus complexes (voir p. 17).

Lorsque l'on étudie in vitro le devenir de ces cellules altérées, on est frappé par leur faible pouvoir de multiplication. Dans une culture de cellules de Hamster infectée par de l'adénovirus, pratiquement toutes les cellules anormales ont disparu après 15 jours (STICH et al., 1964). Sans doute la répartition de matériel chromatique de la cellule mère atteinte aux cellules filles est perturbée au point que toute survie soit impossible. C'est le même effet que l'on recherche avec certains agents mutagènes employés thérapeutiquement.

a). Agents mutagènes d'origine chimique.

La plupart des substances utilisées en chimiothérapie des leucémies ont une action mutagène connue. Dans quelle mesure le traitement a-t-il modifié les chromosomes que nous observons à un moment donné de la maladie? Disons d'emblée que dans la grande majorité des cas le traitement n'a pas modifié les chromosomes. En effet, chez de nombreux patients atteints de LMC, ayant reçu des substances aussi variées que le busulfan, la 6-mercaptopurine, la 6-azauridine, la vincristine, la vinblastine, le caryotype a montré exclusivement des cellules à 46 chromosomes avec Ph^I , comme avant tout traitement. Ces patients étaient en rémission partielle ou totale, et leur maladie évoluait de plusieurs mois à de nombreuses années (TOUGH et al., 1963; REISMAN et TRUJILLO, 1963; FREI et al., 1964; KENIS et KOULISCHER, 1967). En fait, les cellules atteintes par la médication ont disparu. Peut-être qu'à leur niveau les chromosomes étaient atteints, mais nous n'avons pu l'observer.

Peut-on observer l'action de la chimiothérapie par rapport à des lignées cellulaires? Nous avons rapporté (p. 20) les résultats très intéressants de COURT-BROWN et TOUGH (1963), montrant la disparition d'une lignée à 49 chromosomes après un traitement à la 6-mercaptopurine, et l'apparition d'une autre à 44 chromosomes se comportant comme si elle était résistante à la 6-mercaptopurine mais sensible à la colcémide. GOH et al., (1965) ont noté avant tout traitement chez une patiente atteinte de LMC un Ph^I et un chromosome surnuméraire du groupe 6-12. Après un traitement au busulfan, les cellules porteuses de ce caryotype ont disparu. PEDERSEN (1964) note au contraire chez 2 patientes avec Ph^I et caryotype aneuploïde que le traitement n'a aucune action et que le nombre de cellules aneuploïdes augmente. Les deux premiers exemples rapportés ci-dessus montrent que le traitement peut modifier l'image cytogénétique observée à un moment donné de l'évolution de la maladie. Le troisième exemple montre que le traitement ne modifie pas toujours cette image. Le problème qui se pose est de préciser dans quelle mesure la nouvelle constitution chromosomique de la cellule l'a rendue "résistante" à un agent thérapeutique déterminé, avec les applications cliniques éventuelles.

On sait que l'évolution habituelle de la LMC comprend une ou plusieurs crises blastiques, de plus en plus difficilement contrôlées par le traitement. Nous avons vu que des patients en crise blastique terminale pouvaient avoir un caryotype à 46 chromosomes avec Ph^I , sans autre anomalie décelable. Dans ces cas précis, l'analyse des chromosomes ne permet pas de poser le diagnostic de crise blastique. L'apparition d'une crise blastique est inéluctable dès l'apparition du Ph^I puisqu'il s'agit de l'évolution habituelle de l'affection: il n'est pas nécessaire de postuler pour cette crise l'acquisition de formules chromosomiques nouvelles autres que le Ph^I .

L'état actuel de nos connaissances ne nous permet donc pas d'instaurer un traitement en fonction du caryotype, mais une application

cytogénétique intéressante subsiste: tout caryotype anormal reste toujours, quelle que soit sa signification, un témoin à l'échelle cellulaire de l'évolution de la maladie. La disparition d'une lignée anormale serait la preuve de l'efficacité du traitement vis-à-vis de cette lignée; la persistance de la lignée au contraire serait la preuve de l'inefficacité de l'agent thérapeutique utilisé, et peut-être une indication pour en essayer un autre.

b.-Les virus.

Des aberrations chromosomiques peuvent être induites par l'action de certains virus, qu'ils soient banaux ou oncogènes. Parmi les virus dont les effets cytogénétiques, sur des cellules euploïdes humaines ou animales, ont été étudiés in vivo ou in vitro, on peut citer le virus de l'herpès (HAMPAR et ELLISON, 1961), celui de la rougeole (NICHOLS et al., 1962), le virus SV40 (KOPROWSKI et al., 1962; MOORHEAD et SAKSELA, 1965; TODARO et al., 1966), le virus du sarcome de Rous (LEVAN, 1963), le virus de la rubéole (BOUE et al., 1964), celui de la fièvre jaune (HARNDEN et al., 1964), le virus de Sendai (AULA et SAKSELA, 1966). D'une façon générale, ces virus provoquent les effets suivants (NICHOLS et al., 1967): des cassures chromatidiennes ou chromosomiques, des pulvérisations chromosomiques, des anomalies du fuseau et la formation de syncytiums cellulaires. Les cellules atteintes ont un faible pouvoir de multiplication (STICH et al., 1964), sans doute à cause de l'altération importante du génome cellulaire et des erreurs de répartition mitotique qui en résultent.

Pour NICHOLS et al. (1967) les cassures chromosomiques joueraient le rôle le plus important en ce qui concerne l'oncogenèse pour deux motifs. En premier lieu, une délétion de faible amplitude est compatible avec la survie cellulaire. Dans ce chapitre consacré aux LMC, rappelons que NICHOLS (1963) a observé la délétion des bras longs d'un chromosome n° 21 au niveau d'une mitose provenant d'une cellule infectée par le virus de la rougeole. En second lieu, si l'on admet que les virus exercent un effet mutagène au niveau moléculaire, impossible à déceler par

nos techniques, les cassures jouent le rôle "d'indicateur de la présence de mutations ponctuelles".

Avec les faits dont nous disposons à l'heure actuelle, nous pouvons admettre qu'un certain nombre de virus, oncogènes ou banaux, sont capables de provoquer une délétion d'un chromosome 2I. Cette délétion est-elle suffisante pour permettre le développement d'une LMC? Les cas de LMC sans Ph^I (p.16) semblent montrer le contraire. De même, le fait que le virus de la rougeole ait provoqué in vitro la délétion des bras longs d'un chromosome 2I ne nous autorise pas à affirmer qu'il existe un lien entre la rougeole et la LMC. Pour tenter de mieux comprendre le rôle éventuel d'un virus dans l'installation d'une LMC, en tenant compte du caractère spécifique du Ph^I , il convient d'invoquer son double rôle d'agent mutagène au niveau du chromosome et au niveau de la molécule (NICHOLS, 1963). Ce double rôle permet d'établir un modèle théorique concernant la genèse de la LMC, qui sera exposé en détail dans le paragraphe suivant, consacré aux radiations ionisantes.

6.- Radiations et leucémie myéloïde. Exposé d'une théorie "délétion chromosomique et mutation ponctuelle" englobant tous les cas de LMC connus.

L'action des radiations est considérée dans un paragraphe séparé, parce qu'elle nous paraît de nature à faciliter la compréhension des mécanismes génétiques impliqués dans la LMC. Une relation semble exister entre la leucémie myéloïde chronique et les irradiations in vivo (emploi de substances radioactives, action des rayons X etc. (GUNZ et ATKINSON, 1964). L'une des premières séries de malades atteints de LMC et étudiés du point de vue cytogénétique concernait des sujets ayant reçu de fortes doses de RX pour spondylarthrite et ayant développé ultérieurement une LMC avec Ph^I (TOUGH et al., 1962). D'autre part, chez les survivants d'Hiroshima on constate que le nombre de cas de leucémie est plus élevé que celui d'une population témoin avec une nette prédominance des LMC (WATANABE et al., 1965).

Par quels mécanismes au niveau du génome cellulaire une irradiation pourrait-elle provoquer l'apparition d'une LMC?

L'action des rayons X in vitro est tellement caractéristique que toute substance ayant le même effet est dite radiomimétique. Cette action est double: elle peut intéresser à la fois les chromosomes et les gènes. Du point de vue chromosomique, les cassures multiples permettent de concevoir aisément une délétion d'un 2I. Il s'agirait là, comme pour les virus, d'un effet aspécifique, avec une survie préférentielle des cellules dont l'atteinte chromosomique est très localisée. Du point de vue génique, toute délétion signifie la perte d'une série de gènes, leurs allèles étant toujours présents sur l'autre chromosome de la paire, qui est intact. Chez un hétérozygote, la perte d'un allèle dominant pourrait permettre au mutant récessif de s'exprimer. Cette hypothèse a été évoquée à propos de délétions autosomiques constitutionnelles par ENGEL et al. (1966) et ELMORE et al. (1966), pour expliquer les différentes variantes observées chez des sujets malformés présentant une anomalie chromosomique du point de vue morphologique. NANCE et ENGEL (1967) ont en outre suggéré qu'il pourrait, à la suite d'une délétion, se produire une modification de l'expressivité d'un gène dominant; ils ont souligné l'intérêt des délétions pour constituer la carte des gènes chez l'Homme ("autosomal deletion mapping in man"). Nous proposons d'effectuer un raisonnement semblable pour la LMC. La délétion d'un 2I permettrait à certains gènes récessifs de s'exprimer; ces gènes seraient directement responsables de la transformation d'une cellule normale en cellule leucémique. Si nous pensons que l'action des rayons X est de nature à faciliter la compréhension de la genèse de la LMC, c'est bien parcequ'ils ont à la fois une action délétère sur les chromosomes et mutante sur les gènes.

L'hypothèse que nous proposons (délétion chromosomique et mutation ponctuelle) implique l'existence de porteurs hétérozygotes récessifs. De tels sujets ne développeront une LMC que si la délétion du 2I porteur du gène normal dominant survient. D'autre part, d'un mariage de 2 hétérozygotes pourront naître des enfants homozygotes récessifs, qui développeront une LMC sans Ph^I . Il est intéressant à cet égard de noter que la forme de LMC la plus fréquente chez l'enfant semble être précisément la LMC sans Ph^I (REISMAN et TRUJILLO, 1963), et que chez l'adulte la LMC sans Ph^I évolue plus rapidement que la LMC avec Ph^I (TJIO et al., 1966), comme si la présence de 2 gènes récessifs était plus

grave que la présence d'un seul. D'autre part, la délétion d'un 2I sans mutation du chromosome normal ne mènerait pas vers une LMC, ce qui expliquerait certains cas avec "Ph^I" sans LMC. Enfin, on peut imaginer que si la LMC dépend effectivement de 2 événements du point de vue génétique, elle soit inconnue chez les trisomiques 2I. En effet, si une délétion survient, il faudrait que la mutation se produise sur les 2 chromosomes restants; si une mutation survient, il faudrait, pour qu'il y ait une LMC, que la délétion atteigne les 2 chromosomes normaux: il s'agit là d'éventualités qui doivent se produire très rarement. Rappelons que le seul cas de LMC rapporté chez un mongol trisomique 2I a montré au niveau des cellules leucémiques une lignée à 46 chromosomes avec Ph^I (CAWEIN et al., 1965).

Soulignons cependant à nouveau que les LMC ne représentent qu'une très faible proportion des leucémies de l'enfant: 3,75% dans la série de 160 cas de REISMAN et TRUJILLO (1963), 1,2% dans la série de 570 cas de IVERSEN (1966). D'autre part, suivant les chiffres indiqués par KRIVITT et GOOD (1956), 5 enfants de 0 à 4 ans sur 100.000 présenteront une forme quelconque de leucémie. On peut en conclure, dans le cadre de notre hypothèse, que le ou les gènes récessifs mutants favorisent l'installation d'une LMC de même bien entendu que les porteurs hétérozygotes, sont très rares dans la population d'autant plus que les LMC sans Ph^I ne représentent qu'une fraction de l'ensemble des leucémies de l'enfant.

L'avantage de l'hypothèse proposée ci-dessus est qu'elle permet d'expliquer de façon positive tous les cas de LMC avec ou sans Ph^I et ceux avec Ph^I sans LMC. Elle n'exclut d'ailleurs pas une action virale lorsque les conditions essentielles, c'est-à-dire l'expression d'un gène récessif mutant (par délétion du chromosome sain ou par homozygotie) sont remplies. Elle suppose aussi l'existence de gènes associés à la lignée myéloblastique sur le chromosome 2I. Nous savons que les arguments d'ordre enzymologique sont peu convaincants (MELLMAN et al., 1964), tant que l'on se place d'un point de vue d'une relation directe gène/enzyme. Un système de régulation (TEPLITZ, 1966), et non plus de structure est, lui, parfaitement compatible avec l'hypothèse proposée.

IV. CONCLUSION.

Les points suivants nous paraissent pouvoir être dégagés à partir des informations que nous possédons en ce qui concerne la cytogénétique des leucémies myéloïdes chroniques:

- 1.- La LMC est le premier exemple de cancer humain associé à une aberration chromosomique spécifique. Dans une série personnelle, tous les patients ont montré un chromosome Ph^{I} caractéristique au niveau de leurs cellules leucémiques. Dans d'autres séries, certains cas de LMC sans Ph^{I} et de Ph^{I} sans LMC ont été rapportés. Ils ne dépassent pas 10% de l'ensemble des cas connus, et leur évolution clinique n'est pas toujours celle d'une LMC typique.
- 2.- Le Ph^{I} est un témoin visible au microscope optique de la métamorphose de la cellule normale en cellule cancéreuse. Nous avons montré que la présence du Ph^{I} est liée à une instabilité chromosomique: pour un cas déterminé, plus la proportion de cellules Ph^{I} sera élevée, plus grand sera le nombre de cellules s'écartant du nombre modal de 46 chromosomes.
- 3.- A l'exception du Ph^{I} , aucune anomalie chromosomique n'est caractéristique d'un stade déterminé de la maladie. Nous avons montré qu'une aneuploïdie peut exister en dehors de la crise blastique, et inversement que celle-ci peut se présenter avec un caryotype à 46 chromosomes dont le Ph^{I} , comme en phase chronique.
- 4.- Il n'est pas possible actuellement de démontrer qu'à un caryotype déterminé correspondent des propriétés particulières de la cellule. On ne peut instaurer un traitement en fonction du caryotype. Toutefois, la cytogénétique peut aider le clinicien à contrôler l'efficacité de son traitement (et bien entendu peut l'aider à poser le diagnostic de LMC, par la mise en évidence du Ph^{I}).

5.- La spécificité apparente du Ph^{I} laisse penser qu'un ou plusieurs gènes liés directement ou indirectement à la formation des cellules de la lignée myéloïde se trouvent sur le chromosome 2I. Une hypothèse concernant la genèse de la LMC, basée sur une action combinée "délétion chromosomique et mutation génique" est proposée. Elle permet de comprendre les cas de LMC avec ou sans Ph^{I} , les cas avec Ph^{I} sans LMC et la rareté des LMC chez les trisomiques 2I. D'après cette hypothèse, la fréquence des LMC augmenterait après exposition à des agents mutagènes actifs à la fois au niveau du chromosome et au niveau du gène, comme c'est le cas des rayons X, et des radiations ionisantes en général.

CHAPITRE III

LES CHROMOSOMES DES LEUCEMIES LYMPHOIDES CHRONIQUES.

I. INTRODUCTION.

A la suite d'une observation de GUNZ et al. (1962), l'étude des chromosomes des leucémies lymphoïdes chroniques (LLC) avait soulevé un intérêt aussi grand que celui des leucémies myéloïdes chroniques deux ans plus tôt. Les auteurs néozélandais avaient noté la présence, chez 2 frères atteints de LLC, d'un chromosome G anormal. Ce chromosome avait la forme d'un fer à cheval et paraissait en outre montrer une délétion des bras courts. Ayant été décrit à Christchurch, il fut désigné sous le terme de Ch^I , d'après la nomenclature de DENVER (1960).

Une nouvelle fois, une aberration d'un chromosome du groupe G semblait liée à une forme de leucémie humaine.

1.- Le chromosome de Christchurch.

Des études systématiques de la LLC furent entreprises. Toutes sans exception se montrèrent négatives (GUNTZ et al. 1962 chez d'autres patients que les premiers rapportés; DAVIDENKOVA et al., 1963; FITZGERALD et al., 1964; HENI et SIEBNER, 1964; BERNARD et al., 1964; BERGER, 1964; OPPENHEIM et al., 1965; BASERGA et CASTOLDI, 1965; FITZGERALD, 1965; FITZGERALD et al., 1966). Les études antérieures (BAIKIE et al., 1960; FORD et al., 1960; KINLOUGH et al., 1961) n'avaient pas montré d'anomalies non plus. D'autre part, l'anomalie dite Ch^I se retrouvait chez d'autres sujets sains de la famille rapportée initialement, ce qui range des enfants avec LLC et Ch^I dans la catégorie des "leucémies chez des porteurs d'aberrations chromosomiques constitutionnelles", que nous envisagerons dans un chapitre séparé. Notons que d'autres cas "familiaux" (familles dans lesquelles 2 ou plusieurs sujets parents au 1er degré ont présenté une LLC) n'ont pas montré d'aberrations chromosomiques (FITZGERALD et al., 1966). La cytogénétique n'a donc pas apporté, dans le cas de la LLC, une découverte semblable au Ph^I de la LMC.

2. Phytohémagglutinine et lymphocytes de sujets atteints de LLC.

On a pu observer que la phytohémagglutinine (PHA) a un effet excitomiotique faible, ou même nul, lorsqu'elle est mise au contact de lymphocytes de sujets atteints de LLC (SCHREK et RABINOWITZ, 1963; QUAGLI-NO, 1964; BERNARD et al., 1964; WINTER, 1964). Les rares mitoses observées dans certains cas de LLC mis en culture suivant la technique habituelle (voir chapitre I), pourraient être celles de lymphocytes normaux (BERNARD et al., 1964). Une des propriétés nouvelles du lymphocyte leucémique serait donc de mal répondre, ou de ne pas répondre, à la stimulation de la PHA (ASTALDI et al., 1963). Cette absence de réponse pourrait cependant être due à un facteur plasmatique.

Les lymphocytes étant des cellules immuno-compétentes, le système biologique "lymphocytes/PHA" a été utilisé pour aborder le problème des rapports pouvant exister entre certaines réactions de type immunologique et la LLC. Les conceptions actuelles, dans ce domaine, seront exposées dans la discussion.

II. RESULTATS.

Les lymphocytes de 16 sujets adultes atteints de LLC ont été étudiés par la technique de culture de sang périphérique. Six seulement ont montré des mitoses permettant l'analyse cytogénétique, ce qui confirme bien les observations ayant fait état de la rareté des divisions dans les cultures de lymphocytes de LLC. Un cas (n° 29) a montré de très nombreuses mitoses: le sang hépariné avait conservé 17 heures à 4° avant la mise en culture. Nous avons répété ce procédé à trois reprises pour d'autres cas, sans succès: il n'y eut pas de cellules en division.

Les numérations chromosomiques sont portées au tableau XI. Le nombre modal et les caryotypes des six cas furent normaux. En particulier, aucune anomalie ne fut relevée au niveau des chromosomes du groupe G.

TABLEAU XI.

N°	Date de l'analyse	Sexe	Numérations chromosomiques.				Total.
			45	46	47	48	
26	2 - 65	M	-	40	-	-	40
27	1 - 66	M	1	23	1	-	25
28	2 - 68	F	2	14	1	-	17
29	2 - 68	F	2	46	1	1	50
30	2 - 68	M	2	27	1	-	30
31	2 - 68	F	1	16	1	-	18

Numérations chromosomiques effectuées au niveau
des lymphocytes de 6 patients atteints de LLC.

III. DISCUSSION.

Confirmant les observations antérieures faites par d'autres chercheurs, nous n'avons pas observé d'anomalies chromosomiques dans les 6 cas de LLC que nous avons étudiés. Nous n'avons pas pu confirmer la destruction éventuelle d'un facteur plasmatique antimitotique par le séjour à 4° pendant 17 heures que nous avons cru observer chez le cas n° 29. Le petit nombre de cas ayant montré des cellules en division nous incite à aborder un problème général.

1. Effet excito-mitotique de divers antigènes mis au contact de lymphocytes humains.

On sait que les lymphocytes normaux sont stimulés par la phytohémagglutinine (PHA). Cette stimulation peut être mise en évidence morphologiquement ou par incorporation de précurseurs radioactifs tels que la thymidine tritiée. Nous avons vu également que cette stimulation a été comparée à une réaction immunologique malgré la transformation de lymphocytes foetaux et de lymphocytes de sujets agammaglobulinémiques. Précisons que pour ZACHARSKI

et al. (1967) "whether or not the stimulation effect of PHA is immunologic is debatable and may be a matter of semantics". En prenant pour modèle cette réaction de type immunologique, PEARMAIN et al. (1963) ont montré que si l'on remplaçait la PHA par de la tuberculine purifiée, on stimulait les lymphocytes de sujets sensibilisés au préalable à la tuberculine. Il ne s'agissait plus d'une stimulation aspécifique, mais bien d'une transformation spécifique intéressant un nombre plus restreint de lymphocytes. De la même façon, des extraits de peau d'un enfant présentant de l'eczéma stimulaient la croissance de ses propres lymphocytes in vitro; du pollen stimule les lymphocytes d'un sujet souffrant de rhume des foins (LYCETTE et PEARMAIN, 1963). Les lymphocytes d'un enfant sensible à la diphénylhydantoïne sont également transformés au contact de ce produit (HOLLAND et MAUER, 1964), ce qui laisse penser aux auteurs ayant décrit ce phénomène qu'il doit être possible de reconstituer in vitro toute l'histoire immunologique d'un sujet. On peut distinguer (HIRSCHHORN et HIRSCHHORN, 1965) les stimulants aspécifiques, comme la PHA, la streptolysine S, les exotoxines staphylococciques et les anticorps antileucocytaires, qui transforment de 60 à 95% des lymphocytes, et les stimulants spécifiques, qui en transforment seulement de 5 à 45%.

2.-Application théorique dans le cas de la LLC.

Ce qui nous intéresse, du point de vue des leucémies, c'est de constater qu'un grand nombre d'agents peuvent induire une croissance pratiquement incontrôlée, et en tous cas absolument inhabituelle, de lymphocytes, par un processus s'apparentant aux réactions immunologiques. Les réactions dites "leucémoïdes" à la suite d'une infection sévère de l'organisme en seraient un exemple. ASTALDI et al. (1966) ont observé la production d'anticorps anti-PHA chez des lapins ayant reçu cette mucoprotéine; ces anticorps inhibent la stimulation des lymphocytes. Dès lors, les auteurs se sont demandés si la LLC ne pouvait s'apparenter à une réaction de ce type. Une substance antigène donnée se fixerait dans un organisme par le système immunologique n'arriverait pas à neutraliser. Dès lors, elle stimulerait la croissance des lymphocytes, l'image pathologique finale étant la LLC.

En se basant sur l'hypothèse de TYLER (1960), DUSTIN (1966) envisage ce phénomène comme pouvant se produire à d'autres niveaux que le lymphocyte, l'antigène pouvant être notamment un virus. Notons à ce propos que morphologiquement, les cellules du lymphome de BURKITT ressemblent aux lymphocytes stimulés par la PHA (PULVERTAFT, 1964), alors que l'hypothèse la plus fréquente concernant la genèse du lymphome de BURKITT est celle faisant état d'un facteur viral, tant par son mode de dissémination (BURKITT, 1964) que par la mise en évidence de particules virales au niveau des cellules transformées (EPSTEIN et al., 1964).

Si une stimulation des lymphocytes par un antigène inconnu était à l'origine probable de la LLC, il n'est pas indispensable de supposer une altération chromosomique quelconque. Il s'agit plutôt d'un "réveil" de propriétés physiologiques des lymphocytes. Il n'est donc pas étonnant que l'ensemble des recherches cytogénétiques concernant la LLC se soit révélé normal. De même, le caryotype de cellules de lymphome de BURKITT peut être normal (JACOBS et al., 1963). On peut parfaitement concevoir une "leucémie" (lymphoïde chronique) sans altération chromosomique, visible ou non. Ce fait nous aidera à interpréter ultérieurement les cas de leucémies aiguës à caryotype normal. Précisons cependant que "caryotype normal" ne signifie pas dans notre esprit "cellule normale"; le lymphocyte de LLC par exemple n'est plus stimulé par la PHA. Il est possible toutefois de concevoir que les cellules leucémiques puissent exister avec un caryotype normal.

IV. CONCLUSION.

1. De nombreuses études cytogénétiques ont montré l'absence d'anomalies chromosomiques dans la leucémie lymphoïde chronique. Le chromosome Ch^I s'est révélé être une anomalie de type constitutionnel.

2. Par analogie avec les réactions de type immunologique, il est possible de concevoir la LLC comme une "hyper-réaction", de type cependant normal, à un ou plusieurs antigènes que l'organisme ne parviendrait plus à neutraliser.

- 3.- Si cette hypothèse se révélait exacte, il ne serait pas nécessaire de postuler un changement de caryotype comme nécessaire à l'implantation d'une LLC, contrairement à ce qui se passe pour les leucémies myéloïdes chroniques. L'ensemble des observations cytogénétiques effectuées à ce jour dans la LLC semble confirmer ce point de vue.

CHAPITRE IV.

LES CHROMOSOMES DES LEUCEMIES AIGUES.

I. INTRODUCTION?

Peu après la découverte du nombre diploïde normal par TJIXO et LEVAN (1956), des études concernant les chromosomes des leucémies aiguës chez l'Homme furent entreprises. Après la mise en évidence du Ph^I dans la leucémie myéloïde chronique, le but immédiat de ces recherches fut de trouver un "variant commun", équivalent du Ph^I , dans d'autres formes de leucémies humaines. Certains auteurs dont BERGER (1964), se demandaient si l'acquisition de chromosomes C surnuméraires ne pouvait être considérée comme un "variant commun" de la leucémie myéloïde aiguë. Des recherches ultérieures n'ont pas permis de confirmer ce point de vue. En effet, un C surnuméraire fut décrit dans un cas d'érythroleucémie (ADACHI et al., 1964), dans un cas dit de "leucémie prémyéloïde" (LEEKSA et al., 1965), chez un sujet présentant une "métaplasie myéloïde avec leucémie possible" (SANDBERG et al., 1964), chez 3 patients atteints respectivement d'anémie aplastique, d'anémie sidéroachrestique et de thrombocythémie (ROWLEY et al., 1966), et dans un certain nombre de mitoses de sujet polycythémiques (KAY et al., 1966). D'autre part, des malades atteints de leucémie myéloïde aiguë n'avaient pas de C surnuméraires dans leurs mitoses de cellules leucémiques. D'une façon générale, aucun "variant commun" n'a pu être mis en évidence dans une forme déterminée de leucémie aiguë chez l'Homme: la leucémie myéloïde chronique est encore un exemple unique.

Avant de présenter nos résultats, nous passerons en revue les données actuelles concernant les chromosomes des leucémies aiguës. Nous exposerons en outre un certain nombre de données fondamentales qui nous paraissent utiles, parce qu'elles permettent de mieux comprendre la signification des observations cytogénétiques effectuées dans les leucémies aiguës humaines.

1.- Lignée souche et leucémies aiguës.

Le concept de lignée souche (stemline), introduit par MAKINO et KANO (1951) a souvent été repris par les cytogénéticiens dans le domaine des leucémies aiguës (L.A.). Il est défini par BERGER (1964) de la façon sui-

-vante:" c'est l'expression du fait que, dans une population de cellules tumorales donnée, un seul type cellulaire (la lignée souche) est réellement responsable de la perpétuation de la tumeur, alors que les autres types sont considérés comme aberrants à ce point de vue et ne représentent que des fins d'évolution ou des "impasses" de la prolifération cellulaires". REISMAN et al., (1964) ont noté dans une série de 13 enfants atteints de L.A. de types divers la présence de lignées aneuploïdes. Celles-ci disparaissaient lors de rémission après traitement, pour réapparaître semblables à elles-mêmes lors de rechute. Il s'agit là, pour les auteurs, d'une démonstration très nette de l'existence d'une lignée souche "responsable de la perpétuation de la tumeur", suivant les termes de BERGER. L'un des buts de la cytogénétique est d'étudier si les lignées souches leucémiques se distinguent des cellules normales par une ou plusieurs anomalies du caryotype.

La cytogénétique devrait également permettre, lorsqu'une aneuploïdie a été constatée, de montrer comment le caryotype anormal a été acquis à partir du caryotype constitutionnel du patient leucémique: LEJEUNE et al., (1962), puis LEJEUNE (1965) ont pu établir les formes de passage entre une lignée primitive à 47 chromosomes et une lignée leucémique à 54 chromosomes chez une petite fille mongolienne. Il y eut une "évolution clonale" par acquisition et duplication de surnuméraires. Les cellules à 48, 49, 50, 51, 52 et 53 chromosomes montraient effectivement une altération progressive et surtout continue du caryotype. LEJEUNE (1965) a comparé la recherche de ces cellules à nombre intermédiaire de chromosomes aux démarches du paléontologiste à la recherche de chaînons manquants. La lignée souche représente la seule capable de proliférer, les autres représentant des "fins d'évolution ou des impasses de la prolifération cellulaire", pouvant être mises en évidence par la cytogénétique dans des "cas privilégiés" (LEJEUNE, 1965).

2.- Lignées souches et altération du caryotype. Résultats d'ensemble.

Pour certains chercheurs, la transformation d'une cellule sanguine

en cellules leucémique s'accompagnerait toujours d'un changement du caryotype. LEJEUNE (1965) a résumé cette conception de la façon suivante: "au cytogénéticien témoin des bouleversements génomiques affectant les cellules néoplasiques une sorte de sentiment s'impose: les aberrations chromosomiques ne sont probablement ni la cause ni la conséquence du cancer, elles sont le processus néoplasique même".

Il nous a semble utile de rassembler les données numériques concernant 299 cas de L.A. étudiés au point de vue cytogénétique (tableau XII) de façon à avoir une vue d'ensemble du problème. Les sujets ayant présenté des cellules à caryotype normal ont été appelés "eudiploïdes"; ceux avec lignée à 46 chromosomes mais à caryotype anormal ont été désignés comme "pseudodiploïdes". Les patients avec une ou plusieurs lignées à nombre de chromosomes inférieur à la normale ont été groupés comme étant "hypodiploïdes", ceux avec une ou plusieurs lignées cellulaires à nombre de chromosomes dépassant 46 ont été placés dans la catégorie des "hyperdiploïdes".

TABLEAU XII.

Nombre total	hypodiploïde	pseudodiploïde	Eudiploïde	hyperdiploïde.
299 (100)	32 (10,7)	21 (7,1)	166 (55,5)	80 (26,7)

Classement de 299 cas de leucémie aiguë d'après les numérations et les caryotypes effectués. Les chiffres entre parenthèses indiquent les pourcentages.

Pour constituer ce tableau les données des auteurs suivants ont été retenues: BAIKIE et al. (1959); BAYREUTHER (1960); NOWELL et al. (1960); FORD et al. (1958); BAIKIE et al. (1961); BOUTON et al. (1961); COOPER et al. (1961); HUNGERFORD et al. (1961); JOHNSTON (1961); KEMP et al. (1961); KINLOUGH et al. (1961); TOUGH et al. (1961); BOTTURA et al. (1961); de GROUCHY et al. (1962); HUNGERFORD et al. (1962); ROSS (1962); RUFFIE et al. (1962); CAMPBELL et al. (1962); BERGER (1963); BIEDLER (1963); BOTTURA et al. (1963); ELVES et al. (1963); VINCENT et al. (1963); WARKANY et al. (1963); WEINSTEIN et al. (1963); BAIKIE et al. (1963); FORD et CLARKE (1963); THOMPSON (1963); PEARSON et al. (1963); KIOSSOUGLOU et al. (1964); REISMAN et al. (1963); PERGORARO et al. (1963); OSAMURA et al. (1964); KOSSONO et al. (1964); LEWIS et al. (1964); ADACHI et al. (1964); FITZGERALD et al. (1964); BOYD et al. (1965); DOBZANSKA (1965); ILBERRY (1965); RICCI (1965); ATKINS et GAULIAN (1965); KIOSSOUGLOU et al. (1965); SANDBERG (1966): (l'auteur reprend dans cette publication tous ses résultats antérieurs obtenus en collaboration avec ISHIHARA, KIKUCHI, YAMADA, SOFUNI, TAKAGI, GROSSWHITE et HAUSCHKA, que nous n'avons pas mentionnés auparavant); PILERI et al. (1966). Ces données concernent tant des séries de malades que des patients isolés.

Il en résulte à l'analyse du tableau ci-dessus, que 166 cas sur 299 soit environ 55,5% du total, ont un nombre de chromosomes normal et un caryotype ne montrant aucune aberration décelable. La proportion de 55,5% correspond tout à fait aux chiffres proposés par SANDBERG (1966) et KIOSSOGLOU et al. (1965), d'après leurs résultats personnels portant sur environ 130 malades (repris dans le tableau XII). Il s'agit de 2 séries homogènes, en ce sens que les mitoses ont été examinées dans tous les cas par les mêmes observateurs et de la même façon. Il apparaît donc que la transformation d'une cellule normale en cellule leucémique ne doit pas nécessairement s'accompagner d'un changement du caryotype.

Lorsqu'il y a une aneuploïdie décelable par les techniques employées, la tendance à l'hyperploïdie semble plus fréquente. Les chromosomes en surnombre ne présentent pas habituellement d'altération morphologique importante: c'est pourquoi la non-disjonction répétée, ou la duplication sélective (LEJEUNE et al. 1966), est plus fréquemment évoquée comme cause des anomalies du caryotype des cellules leucémiques que des processus plus compliqués tels que les délétions, les translocations, les inversions, etc., qui donnent des images caractéristiques rarement observées dans les L.A.

SANDBERG et al. (1965) avaient cru pouvoir distinguer une tendance à l'hypoploïdie dans les leucémies myéloïdes aiguës et une tendance à l'hyperploïdie dans les leucémies lymphoïdes aiguës. Une observation ultérieure (SANDBERG et al., 1966) concernant des jumeaux ~~fratels~~ dizygotes n'a pas permis à ces chercheurs de confirmer le schéma qu'ils avaient proposé. En effet, chez ces jumeaux, une leucémie myéloïde aiguë est apparue au même âge (7 mois), avec les mêmes caractéristiques cliniques. On peut penser que ces jumeaux ont été soumis aux mêmes facteurs environnants depuis le moment de la fécondation, et que le ou les facteurs oncogènes ont été les mêmes. Pourtant l'un des deux frères a présenté une lignée cellulaire leucémique à 45 chromosomes, alors que l'autre montrait une lignée à 52 chromosomes. SANDBERG et al. en ont conclu que chaque individu réagit à l'agent oncogène suivant son génotype; et, développant cette idée, SANDBERG (1966) a proposé d'envisager les altérations du caryotype dans les L.A. comme un "épiphénomène" sans signification spéci-

-fication spécifique. Au moyen de notre série personnelle, nous tenterons de vérifier l'exactitude de cette opinion.

3.- Leucémies aiguës et caryotypes anormaux: rôle de la différenciation tissulaire.

Les études chromosomiques effectuées au niveau des cellules leucémiques montrent des résultats différents de ceux obtenus par l'étude des aberrations chromosomiques constitutionnelles effectuées chez des nouveau-nés malformés. Chez ces derniers, en effet, les aberrations sont presque toujours de faible amplitude: trisomie de petits autosomes, délétions très limitées, ou bien remaniements plus complexes tels que translocations ou chromosomes en anneau, impliquant cependant de petites altérations de la balance génique. Les aberrations des chromosomes sexuels peuvent être apparemment plus importantes (sujets à 2 ou 3 chromosomes X surnuméraires), mais on suppose (LYON, 1961) que ces X surnuméraires sont inactivés en grande partie sinon en totalité, ce qui expliquerait la tolérance de l'organisme à leur égard. Les cellules leucémiques au contraire peuvent montrer des altérations du caryotype extrêmement importantes et qui ne sont jamais observées chez les porteurs d'une aberration chromosomique constitutionnelle: gains de nombreux chromosomes, jusqu'à 20 et plus, ou pertes pouvant aller jusqu'à 6 chromosomes et plus. On peut légitimement se demander comment la cellule leucémique peut supporter une altération semblable de sa balance génique, alors que l'embryon la tolère si mal.

Pour tenter de mieux comprendre cette différence entre tissu embryonnaire et tissu adulte, des recherches complémentaires à la simple analyse morphologique s'imposent. Nous exposerons ci-dessous deux points particuliers ayant fait l'objet de travaux personnels.

4.- Mosaïcisme et leucémies.

Tout organisme composé de 2 ou plusieurs lignées cellulaires dont le génome n'est pas le même est désigné sous le terme de mosaïque. Le mosaïcisme peut être dû à un fonctionnement différent d'un même génome de cellule à cellule, ou bien à la présence de cellules dont le caryotype est différent: ce deuxième aspect du mosaïcisme intéressera plus spécialement le cytogénéticien.

Par définition, une mosaïque ne peut exister qu'au niveau d'organismes, embryonnaires ou adultes, composés d'au moins 2 cellules. C'est pour cela que l'on situe l'origine des mosaïques après la fécondation. Un mosaïcisme peut se former à tout moment après l'union du spermatozoïde et de l'ovule: il sera d'autant plus localisé que son apparition aura été tardive au cours du développement. La présence d'une lignée-souche leucémique répond à la définition de la mosaïque. Cette mosaïque sera très localisée, comme le laissait prévoir le moment tardif de son installation. Elle pourra se distinguer des cellules normales par un caryotype particulier, comme c'est le cas pour la leucémie myéloïde chronique. On pourra désigner ce mosaïcisme comme "acquis", par opposition au mosaïcisme "constitutionnel", qui apparaît lors de la période embryonnaire.

Une façon de mieux comprendre le rôle des aberrations chromosomiques dans l'évolution des L.A. serait de comparer le comportement d'une mosaïque constitutionnelle à celui d'une mosaïque leucémique acquise. Peu de recherches ont été effectuées de cette façon (BERGER, 1967), mais on peut dire, d'une façon générale, que les lignées aneuploïdes leucémiques, représentant le mosaïcisme acquis, envahissent progressivement tout l'organisme jusqu'à la mort du patient. Au contraire, les mosaïques constitutionnelles semblent très stables, les proportions de cellules à caryotype différent étant pratiquement les mêmes lors d'analyses faites à plusieurs mois ou plusieurs années d'intervalle, chez le même individu porteur de la mosaïque. Ceci laisse supposer que le facteur déterminant l'envahissement de l'organisme par une lignée cellulaire plutôt qu'une autre ne dépend pas de la constitution chromosomique de ces cellules, mais bien du fait que ces cellules sont devenues leucémiques. Nous présenterons plus loin nos recherches dans ce domaine encore peu exploré.

La stabilité des mosaïques constitutionnelles n'est cependant pas une règle absolue: dans de rares cas, l'aberration chromosomique peut être instable par elle-même (chromosome en anneau par exemple), et déterminer au sein du même organisme l'apparition de cellules à combinaisons chromosomiques variées. LEJEUNE et al. (1966) ont décrit un cas à formule 46, XX, 18r présentant des cellules à 45 chromosomes sans anneau, à 46

chromosomes avec 1 anneau et à 47 chromosomes avec 2 anneaux. GRIPENBERG (1966) a également noté une instabilité caryotypique dans des cellules d'un sujet porteur d'un chromosome 18 en anneau. Il nous a semblé que ce genre d'anomalie offre un bon "système" de comparaison avec les cellules leucémiques à caryotype instable, notamment en ce qui concerne l'évolution clonale. Aussi nous rapporterons des observations concernant des chromosomes en anneau, avec une étude détaillée des diverses combinaisons chromosomiques auxquelles elles ont donné lieu.

5.- Anomalies de la mitose et leucémies aiguës.

On sait depuis longtemps que les cellules cancéreuses présentent de nombreuses anomalies mitotiques, se traduisant notamment par des mitoses multipolaires qui peuvent être la cause d'une mauvaise répartition des chromosomes de la cellule mère aux cellules filles, avec apparition de lignées aneuploïdes. On peut également constater que la mitose précédant celle que l'on observe ne s'est pas déroulée normalement: la synthèse d'ADN a bien eu lieu, mais sans division cellulaire. Lors de la synthèse du cycle suivant, les chromosomes sont placés de façon spéciale, qui se traduit à la mitose par l'apparition de cellules tétraploïdes dont les chromosomes dédoublés sont côte à côte. On a appelé ces figures des endoréduPLICATIONS (LEVAN, 1939).

a)-Les endoréduPLICATIONS: les premières endoréduPLICATIONS ont été décrites chez les animaux, au niveau de cellules tumorales de souris (LEVAN, 1953). FRACCARO et al. (1960) ont observé des endoréduPLICATIONS dans une culture de fibrocytes d'une malade présentant un syndrome de TURNER avec formule sexuelle XO. BOTTURA et al. (1963) ont remarqué de nombreuses endoréduPLICATIONS chez un malade présentant une leucémie aiguë myéloblastique; à la suite de ces auteurs, de nombreux autres ont rapporté la présence d'endoréduPLICATIONS au niveau de cellules médullaires ou du sang périphérique de patients présentant une forme de leucémie aiguë, myéloblastique ou autre (REISMAN et al., 1963; HOUSTON et al., 1963; HAMPEL, 1964). Mais les endoréduPLICATIONS ne semblent pas spécifiques des leucémies aiguës. On peut les rencontrer chez le normal (VALDMANIS et MANN, 1964; FRACCARO et LINDSTEIN, 1964;

CHAUDURI, 1965; BISHUN et MORTON, 1965.), chez des porteurs d'aberrations chromosomiques constitutionnelles ou chez des malformés congénitaux sans aberration chromosomique décelable (VALDAMIS et MANN, 1964; GARDNER et al. 1964; CHAVARRIA et al., 1964), chez des cancéreux ayant subi une irradiation totale de l'organisme (FRIEDMAN et al., 1964), lors d'addition in vitro de thyroxine (BISHUN et al., 1964), de mercaptoéthanol (SCHWARZACHER et SCHNEDL, 1966), lors d'un traitement "anticancéreux" chez des malades non-leucémiques (NASJLETTI et al., 1965). Il semble s'agir (Lancet, éditorial, 1964) d'une anomalie mitotique aspécifique, pouvant se rencontrer dans un grand nombre de conditions et n'étant spécifique d'aucune d'entr'elles; elles paraissent toutefois plus fréquentes chez les leucémiques.

Nous avons comparé, dans le but de préciser la notion de spécificité, la fréquence des endoréduPLICATIONS observée dans notre laboratoire chez les leucémiques, et au niveau de cellules provenant de sujets ni leucémiques ni cancéreux, mais dont les cellules ont été cultivées suivant 2 techniques différentes, l'une (culture de lymphocytes) impliquant un séjour in vitro ne dépassant pas 4 jours, l'autre (culture de fibrocytes) impliquant un séjour in vitro beaucoup plus long (de 4 à 8 semaines).

- b)-"Disjonction" anaphasique et aneuploïdies: comme nous l'avons signalé, la disjonction mitotique est le facteur le plus habituellement mis en cause pour expliquer l'apparition d'aneuploïdies sans remaniements complexes, comme celles observées dans la plupart des leucémies aiguës. La "disjonction" de chromosomes à l'anaphase mérite d'être explorée pour mieux comprendre la "non-disjonction". Il s'agit d'un phénomène dynamique, d'un mouvement difficile à suivre au moyen des techniques habituelles qui fixent les cellules et par conséquent "arrêtent" tout mouvement. Dans un cas d'érythroleucémie chez un enfant de 6 ans, nous avons cependant pu reconstituer les diverses phases de l'ascension des chromosomes vers les pôles (KOULISCHER, 1966), ce qui nous a permis de proposer une explication que nous reprendrons ici et qui sera comparée à certaines observations effectuées depuis lors par d'autres chercheurs, qui semblent confirmer les nôtres. Par ces résultats, l'ascension des chromatides vers les pôles sera

rattachée à la période de synthèse S de l'ADN, qui s'est produite quelques heures plus tôt.

II.-OBSERVATIONS CYTOGENETIQUES CONCERNANT LES LEUCEMIES AIGUES.

Nous rapporterons ci-dessous nos observations concernant d'une part les chromosomes d'une série de 24 patients atteints de leucémie aiguë, d'autre part les résultats de recherches expérimentales effectuées dans le but d'étudier la spécificité et l'origine possible des aberrations chromosomiques observées chez ces patients.

1.-Matériel.

Le matériel sera exposé en fonction de l'objet de la recherche entreprise.

A. Chromosomes de patients atteints de leucémie aiguë.

Les chromosomes de cellules sanguines de 24 patients présentant une leucémie ont été examinés. Le diagnostic de L.A. fut posé d'après le médullogramme effectué à l'aide d'une partie du prélèvement destiné à l'analyse cytogénétique. L'état clinique au moment de l'analyse et l'évolution de la maladie chez ces patients feront l'objet de communications séparées, effectuées en collaboration avec les cliniciens nous ayant confié l'analyse des chromosomes de leurs malades. L'âge des patients varie de 1 à 73 ans; 7 d'entre eux avaient moins de 15 ans, 17 avaient 15 ans et plus. En général, les malades étudiés étaient en crise aiguë débutante et non-traitée. Ceux pour qui ce n'était pas le cas feront l'objet de brefs commentaires lors de l'exposé des résultats. Chez 2 sujets, l'examen des chromosomes a pu être répété au cours de la maladie, dans un cas à 2 mois d'intervalle dans l'autre à 8 mois. Chez un patient, une analyse simultanée des chromosomes de la moelle osseuse et du sang périphérique a été effectuée. Dans tous les autres cas, une seule analyse a été possible.

B. Etude des anomalies de la mitose.

Deux aspects ont été envisagés:

- a)- Disjonctions des chromatides: une tentative de reconstitution de l'ordre d'ascension des chromosomes vers les pôles à l'anaphase a été réalisée à partir de l'analyse détaillée de la

moelle osseuse d'un enfant de 6 ans présentant une érythroleucémie et traité par le méthothrexate. L'interprétation des images a été facilitée d'une part par l'examen de 1.000 mitoses provenant de 10 cultures de lymphocytes de sujets sains, fixées sans addition de colchicine préalable et sans traitement hypotonique, d'autre part par l'analyse autoradiographique de 150 mitoses de 5 sujets normaux.

- b)-EndoréduPLICATIONS: les endoréduPLICATIONS ont été repérées dans toutes les analyses de sujets leucémiques (moelle et sang), chez 116 sujets dont les fibrocytes ont été cultivés et chez 108 individus normaux chez qui une analyse de sang a été faite. On a pu de la sorte comparer la fréquence des endoréduPLICATIONS au niveau des cellules leucémiques et non-leucémiques et, pour ces dernières, préciser le rôle de la longueur du séjour in vitro (hors du contrôle de l'organisme).

C. Etude de la stabilité des mosaïques constitutionnelles.

Deux types de mosaïques ont été étudiés:

- a)-Mosaïques par non-disjonction: 3 patients ont fait l'objet de cette recherche qui nous permettra de comparer le comportement d'une mosaïque constitutionnelle à celui d'une mosaïque leucémique. L'un présentait une mosaïque 46,XY/47,XY I8+ (KULAKOWSKI et al., 1966); 5 analyses chromosomiques ont été effectuées en l'espace de 3 ans de façon à étudier le comportement et la compétition éventuelle des 2 lignées in vivo. Deux autres patients présentaient une mosaïque 46,XX/47,XX 2I+. Chez l'un, 2 numérations à partir de cultures de lymphocytes ont été effectuées à 1 an d'intervalle (PETIT, 1967), chez l'autre une culture de fibrocytes a été maintenue en vie 4 mois in vitro; 12 "passages" ont eu lieu, des numérations chromosomiques étant faites lors de chaque passage.
- b)-Mosaïques chez des porteurs d'un chromosome en anneau: l'instabilité de la garniture chromosomique due à une anomalie morphologique particulière d'un des autosomes a été étudiée chez 3 sujets porteurs d'un

chromosome en anneau. L'un présentait un chromosome I8 en anneau (I8r suivant la nomenclature de Chicago, PETIT et PONCELET, 1967); l'autre montrait un chromosome du groupe D en anneau (Dr) et le troisième un chromosome en anneau du groupe G (Gr). Au moins 50 mitoses provenant de cultures de lymphocytes ont été examinées dans chaque cas, dans le but de mettre en évidence les mitoses s'écartant du nombre modal qui était de 46, et de noter le rôle du chromosome en anneau dans l'apparition de ces aneuploïdies.

2. Résultats.

Les résultats seront exposés en 3 parties:

A. Chromosomes des leucémies aiguës.

Chez 19 patients différents, numérotés de 32 à 50 (Tableau XIII), 22 analyses cytogénétiques de moelle osseuse ont été pratiquées suivant les méthodes exposées au chapitre I. Le squash a été utilisé 1 fois (cas 32), l'incubation à court terme 21 fois. Cinq analyses à partir de sang périphérique (avec phytohémagglutinine) ont été effectuées chez 5 patients différents numérotés de 51 à 55 (Tableau XIV). Chez une patiente (n° 55), des numérations ont été faites après 48 et 72 heures de séjour in vitro; chez les autres, les chromosomes ont été examinés après 72 heures de culture.

Nous suivrons, pour l'exposé des résultats, le même schéma que celui qui a été adopté pour les leucémies myéloïdes chroniques.

TABLEAU XIII.

N°	Date analyse	Sexe	Age	Techn.	Numérations chromosomiques								Total
					43	44	45	46	47	48	49	50	
32	21-6-63	M	67	SQ	-	-	3	5	6	3	2	2	21
33	11-1-65	F	74	IM	I	-	-	29	-	-	-	-	30
	15-3-65	"	"	"	-	-	-	30	9	I	-	-	40
34	11-5-65	M	8	IM	-	-	I	49	-	-	-	-	50
35	22-4-65	M	4	IM	-	-	2	48	-	-	-	-	50
36	1-6-65	M	6	IM	I	I	I	46	-	-	-	-	49
37	14-6-65	M	10	IM	-	-	2	37	I	-	-	-	40
38	8-9-65	F	53	IM	-	-	-	8	-	-	-	-	8
39	15-9-65	M	15	IM	I	-	2	45	I	I	-	-	50
40	28-9-65	M	37	IM	-	-	-	-	2	22	2	I	27
41	10-1-66	F	53	IM	-	-	-	I	32	I	-	2	36
42	30-6-66	M	43	IM	-	-	-	2	2	I	I	34	40
43	15-9-66	F	3	IM	-	-	-	6	I	-	-	-	7
44	15-9-66	M	61	IM	-	I	3	41	4	-	-	-	49
45	23-9-66	F	43	IM	-	-	-	7	2	I	-	-	10
46	8-11-66	M	6	IM	-	-	-	9	-	-	-	-	9
47	20-2-67	M	52	IM	3	2	8	I	-	-	-	-	14
48	3-6-66	F	56	IM	-	I	14	33	2	-	-	-	50
	6-7-66	"	"	"	-	I	20	27	2	-	-	-	50
	9-1-67	"	"	"	-	I	9	39	I	-	-	-	50
49	20-2-67	M	68	IM	-	-	2	17	I	-	-	-	20
50	16-11-67	M	21	IM	tétraploïdie (voir texte)								
TOTAUX					6	7	67	480	66	30	5	39	700

Numérations effectuées sur des mitoses provenant de la moelle osseuse de patients présentant une forme de leucémie aiguë.

Abréviations: Techn.: technique utilisée

SQ:squash

I.M.:incubation de moelle osseuse à court terme.

a)- Résultats globaux. Rôle des techniques utilisées.

Nous avons déjà noté, lors de l'exposé de nos résultats concernant les leucémies myéloïdes chroniques, qu'un séjour bref de la moelle osseuse in vitro ne semblait pas favoriser la croissance des cellules à caryotype normal. Nous pouvons confirmer ce point de vue en ce qui concerne les cellules de sujets présentant une leucémie aiguë. En effet, les cas 40, 41 et 42 ont montré la présence d'une seule lignée, qui était aneuploïde; la proportion de cellules à 46 chromosomes était respectivement de 7,8%, 2,8% et 5%, chiffres qui ne correspondent pas à une sélection en leur faveur. Le cas n° 46 a montré exclusivement des mitoses à nombre de chromosomes tétraploïde. Deux cas ont montré la présence de 2 lignées cellulaires, l'une à 46 chromosomes avec caryotype normal, l'autre à 47 chromosomes (cas n° 33) ou 45 chromosomes (cas n° 49). Ce sont les 2 cas pour lesquels plusieurs analyses ont été effectuées, toujours par la même technique. En ce qui concerne le cas 33, une première analyse n'a pas permis d'observer de lignée aneuploïde; une 2ème analyse, faite 2 mois plus tard, a montré l'apparition d'une lignée à 47 chromosomes. La technique ayant été la même, nous pensons que lors de la première analyse les cellules à 47 chromosomes étaient en très petit nombre, soit elles n'existaient pas. En ce qui concerne le cas n° 49, la diminution progressive du nombre de cellules aneuploïdes correspondait à une amélioration de l'état général suite au traitement efficace plutôt qu'à une sélection in vitro en faveur des cellules à 46 chromosomes.

Il apparaît plus intéressant de comparer les résultats obtenus suivant que l'on ait utilisé les cellules de la moelle osseuse ou du sang périphérique. Par la première technique (Tableau XV), 68,5% des mitoses examinées avaient le nombre normal de 46 chromosomes, 11,5% étaient hypodiploïdes et 20% étaient hyperdiploïdes. Par la 2ème technique, 93,4% des mitoses étaient normales, 3,5% étaient hypodiploïdes et 3,1% hyperdiploïdes. Du point de vue statistique, une comparaison entre les numérations de la moelle normale et de la moelle

leucémique au moyen de test de χ^2 (avec 2d.l.) montre, comme on pouvait s'y attendre, que les différences observées sont hautement significatives ($p < 0,001$). Le même test effectué entre les numérations de sang normal et de sang de sujets leucémiques, n'est pas significatif. Ces résultats montrent bien que l'étude des chromosomes des leucémies doit se faire, pour en augmenter la signification, sur des cellules de la moelle osseuse.

b)- Etude des caryotypes obtenus à partir de cellules médullaires.

Chez les patients dont la moelle osseuse a pu être étudiée, certains montraient un caryotype normal et d'autre la présence d'aneuploïdies.

-Patients à caryotype normal: 12 analyses sur 22, soit 54,5%, ont montré la présence de cellules à 46 chromosomes dont le caryotype était normal. Nous avons pu cependant observer un certain nombre d'anomalies telles que cassures chromatidiennes ou chromosomiques, fragments acentriques et une fois un chromosome en anneau. Ces anomalies toutefois sont dites "aspécifiques" parce qu'elles peuvent se rencontrer chez des sujets normaux. Le cas n° 44 a retenu notre attention. Le nombre de cellules aneuploïdes est assez élevé (16%). Deux caryotypes de cellules à 47 chromosomes ont montré la présence d'un chromosome du groupe G surnuméraire; il ne nous est cependant pas possible, vu le petit nombre de ces mitoses anormales à 47 chromosomes, de décider s'il s'agit d'une lignée aneuploïde ou d'accidents dus à la technique. C'est pourquoi, nous l'avons inclus dans la série des patients à caryotype normal. Les mitoses à 45 chromosomes montraient chaque fois l'absence d'un chromosome différent, ce qui évoque plus l'artefact que la lignée hypoploïde. La première analyse du cas n°33 (leucémie à monocytes chez une femme de 74 ans non traitée au moment de l'examen cytogénétique) était entièrement normale. Deux mois plus tard, après un traitement peu

efficace à la Prednisolone, une lignée aneuploïde (commentée ci-dessous) est apparue.

-Patients à caryotype anormal: 10 analyses effectuées chez 8 patients différents ont montré la présence de lignées aneuploïdes. Il convient de préciser que nous avons admis la présence d'une lignée lorsque 3 caryotypes au moins de cellules à même nombre anormal de chromosomes étaient identiques. Ces analyses étaient les suivantes:

cas n° 32: leucémie aiguë à monocytes chez un homme de 67 ans, qui n'a jamais été traité auparavant. L'analyse cytogénétique fut effectuée par la technique du squash, et montra un grand nombre de mitoses avec nombre de chromosomes différents. Les cellules à 46 chromosomes avaient un caryotype normal. Trois caryotypes de cellules à 47 chromosomes ont montré un G surnuméraire; 2 autres caryotypes de cellules à 47 chromosomes ont montré un D surnuméraire; un caryotype d'une cellule à 45 chromosomes a montré l'absence d'un autosome du groupe A. D'après les critères que nous avons utilisés, il semble bien exister une lignée à 47 chromosomes 47,XY, G+ mais toutes les cellules à 47 chromosomes ne présentent pas ce caryotype.

cas n° 33: (2ème analyse): patiente de 74 ans, présentant une leucémie aiguë à monocytes depuis 6 mois et recevant un traitement à base de Prednisolone depuis 3 mois. La première analyse s'était révélée normale du point de vue cytogénétique. Lors de la 2ème analyse, on voit apparaître une lignée à 47 chromosomes avec un chromosome du groupe C surnuméraire.

cas n° 40: leucémie myéloblastique aiguë chez un homme de 37 ans; ce patient aurait été traité au ^{32}P pour une maladie de Vaquez mais nous n'avons pu obtenir plus de précisions concernant

son passé pathologique. Au moment de l'analyse cytogénétique, il ne recevait aucun traitement. La majorité des mitoses examinées montraient 2 chromosomes surnuméraires du groupe C. Tous les autres chromosomes avaient leur morphologie habituelle (notamment les chromosomes du groupe G). (fig. 6b).

cas n°41: leucémie aiguë de type lymphoblastique chez une femme de 53 ans ayant subi un traitement radiothérapique à la suite d'un cancer du sein. On note dans ses cellules la présence d'une lignée à 47 chromosomes, avec un chromosome E surnuméraires

cas n°42: leucémie aiguë lymphoblastique chez un homme de 43 ans. On note la présence prédominante d'une lignée à 50 chromosomes avec des surnuméraires dans les groupes B, E, F et G. Il convient de souligner que ces chromosomes en surnombre ont une morphologie identique aux chromosomes "normaux"; c'est d'ailleurs pourquoi nous les appelons "surnuméraires". (fig. 6c)

cas n°47: patient de 52 ans présentant une leucémie aiguë à cellules souches. Quatorze mitoses seulement ont pu être retenues pour l'analyse des chromosomes. Huit avaient 45 chromosomes; les caryotypes ont permis de montrer l'absence d'un chromosome du groupe C. Au niveau des cellules à 44 et 43 chromosomes, les caryotypes n'ont montré aucune anomalie constante nous permettant d'affirmer l'existence de lignées aneuploïdes: elles peuvent être la résultante d'artefacts dus à la technique.

cas n°49: leucémie aiguë à promyélocytes chez un patient de 56 ans, traité avant la première analyse par la Prednisolone. Ce traitement a été poursuivi par la suite. La première analyse a montré l'existence d'une lignée hypodiploïde à 45 chromosomes. Les caryotypes effectués ont permis de noter l'absence d'un chromosome du groupe E (fig. 6d). Les deux analyses suivantes ont montré la persistance

de cette lignée à 45 chromosomes. Le nombre de mitoses hypoploïdes cependant a diminué progressivement: 40% lors de la première analyse, 28% lors de la deuxième analyse, 18% lors de la troisième analyse. Parallèlement, l'état clinique du patient évoluait favorablement. Le décès est survenu 2 mois après la dernière analyse cytogénétique, sans que l'on puisse l'attribuer à une aggravation de son état leucémique (DRUEZ, 1967).

cas n° 50: leucémie aiguë lymphoblastique chez un patient de 21 ans non traité. Toutes les mitoses sont tétraploïdes. Le grand nombre de chromosomes est la cause de multiples superpositions. Nous n'avons pu dénombrer de façon exacte chaque mitose. Nous pouvons cependant affirmer que le nombre de chromosomes se situait chaque fois entre 85 et 95. Six mitoses "favorables" nous ont montré la présence de 92 chromosomes dans des cellules tétraploïdes. Chaque chromosome est présent 4 fois, comme l'ont montré les caryotypes. (fig. 7)

6. Etude des caryotypes obtenus à partir de cultures de sang périphérique.

Toutes les analyses effectuées (Tableau XIV) se sont révélées normales. Pour la malade n° 51, jeune femme de 34 ans présentant une leucémie à cellules souches non traitée, nous avons examiné les mitoses après 48 et 72 heures de séjour in vitro. Le nombre modal fut de 46 dans les 2 cas, et les caryotypes furent normaux. Mais le nombre de cellules aneuploïdes, ou présentant des anomalies du type radioinduit (cassures, fragments acentriques, etc.) est plus grand après 48 heures. On sait que les premières mitoses de sang périphérique stimulé in vitro par la phytohémagglutinine apparaissent après une incubation de 40 heures environ (MacKINNEY et al., 1962). On peut penser qu'après 48 heures nous avons observé les cellules effectuant leur première division, alors qu'après 72 heures nous avons observé des cellules effectuant une 2ème division in vitro. Il est possible que les cellules présentant une anomalie chromosomique n'ont pu mener leur première division à bien, et que seules les cellules "normales" ont pu effectuer une 2ème division et être observées.

d. Différenciation cytogénétique de 2 types de leucémie aiguë.

Comme pour la phase dite de "crise blastique" de la leucémie myéloïde chronique, nous avons distingué pour nos analyses de moelle osseuse de leucémie

aiguë, indépendamment de toute considération clinique, celles dont le nombre modal était normal et celles montrant une lignée aneuploïde. Les premières ont 92,9% de cellules à 46 chromosomes (373 mitoses provenant de 12 analyses effectuées chez des sujets différents), les secondes 42,2% de cellules à 46 chromosomes, 39% de cellules hyperdiploïdes et 18,8% de mitoses hypodiploïdes (numération de 337 mitoses provenant de 10 analyses effectuées chez 8 patients différents). Ces données sont portées au Tableau XVI. Si l'on compare les numérations de la moelle normale et celles de cellules médullaires provenant de sujets leucémiques mais dont la numération et les caryotypes étaient normaux par le test de χ^2 , on constate que les différences ne sont pas significatives ($p=0,180$; $0,70 > p > 0,50$). En d'autres termes, plus de la moitié de nos analyses de moelle osseuse de sujets leucémiques ne se distinguent pas de nos témoins normaux.

TABLEAU XIV

N°	Date analyse	Sexe	Age	Numérations chromosomiques.							Total
				44	45	46	47	48	49	50	
51	I5-10-63	F	65	I	3	44	2	-	-	-	50
52	I8- 9-64	M	26	-	-	36	2	I	I	-	40
53	7- 9-64	M	I	I	I	36	-	I	-	I	40
54	II- 5-65	M	8	-	I	49	-	-	-	-	50
55	I- 2-66	F	34	-	2	43	5	-	-	-	50
	"	"	"	-	I	48	I	-	-	-	50
TOTAUX				2	8	256	10	2	I	I	280

Numérations effectuées sur des mitoses provenant de cultures de sang périphérique stimulé par la phytohémagglutinine de malades atteints d'une forme de leucémie aiguë (la première numération du cas n° 55 a été faite après 48 heures de séjour in vitro, la seconde après 72 heures).

TABLEAU XV.

Origine des mitoses	Numérations chromosomiques.								Totaux
	43	44	45	46	47	48	49	50	
moelle oss.	6 (0,9)	7 (1,0)	67 (9,6)	480 (68,5)	66 (9,4)	30 (4,2)	5 (0,7)	39 (5,7)	700 (100)
sang périph.	- (0,7)	2 (2,8)	8 (93,4)	256 (1,4)	4 (0,8)	2 (0,4)	1 (0,4)	1 (0,4)	280 (100)

Comparaison entre les numérations effectuées à partir de la moelle osseuse et de sang périphérique. Les chiffres entre parenthèses indiquent les pourcentages.

TABLEAU XVI.

catégorie	Nombre d'ana-lyses	Numérations					Chromosomiques.			Total
		43	44	45	46	47	48	49	50	
Euploïde	12	3 (0,9)	2 (0,6)	13 (3,6)	342 (92,1)	10 (2,9)	2 (0,6)	-	-	373 (100)
Avec lignée aneuploïde	9	3 (0,9)	5 (1,5)	54 (16,4)	137 (42,2)	56 (17,2)	28 (8,8)	5 (1,2)	39 (11,8)	337 (100)

Comparaison entre les analyses ayant montré une numération normale (euploïde) et celles ayant mis en évidence la présence d'une lignée aneuploïde (aneuploïde). Les chiffres entre parenthèses indiquent les pourcentages.

B. Etude des anomalies de la mitose.

Nous envisagerons successivement la genèse possible des non-disjonctions puis l'apparition des endoréduplécations dans nos cultures.

- a) -Disjonction des chromosomes à l'anaphase: le cas n° 34 a présenté une série d'anomalies particulières au niveau des cellules de la moelle osseuse, incubée 10 heures in vitro suivant notre technique habituelle. Certaines mitoses montraient un allongement de la région centromérique de certains chromosomes. De plus, au lieu de se rejoindre en cet endroit, les chromatides au contraire étaient écartées l'une de l'autre, alors que les zones télomériques étaient toujours unies. Une analyse détaillée de 23 mitoses montrant cet aspect particulier "en losange" nous a permis de constater un synchronisme entre chromosomes homologues. Nous avons rapporté cette observation (KOULISCHER, 1966) et nous n'en rappellerons ici que les points principaux (fig. 8).

Une étude préliminaire sur des mitoses provenant de sujets normaux, dont les lymphocytes stimulés par la phytohémagglutinine n'avaient été traités ni par la colchicine ni en milieu hypotonique (de façon à conserver intacte la disposition des chromosomes au cours de la division cellulaire), nous avait permis de noter la présence d'images "en losange", fort semblables à celles que nous avons observées par la suite dans notre cas n° 34. Les chromatides de certains chromosomes, au lieu de se rejoindre au niveau du centromère, étaient séparés à cet endroit. Nous avons interprété ces images comme représentant le tout premier stade de l'anaphase: les chromatides, fixées par le centromère sur le fuseau, commencent leur ascension vers les pôles. Pour employer un terme souvent utilisé en cytogénétique, il s'agissait du début de la disjonction des chromatides mitotiques.

Si l'on transpose cette observation dans le cas de notre enfant leucémique, c'est-à-dire que si l'on suppose que les images

montrant des chromatides séparées au niveau du centromère représentent le début de l'anaphase, une remarque s'impose immédiatement: l'ascension vers les pôles se fait de façon asynchrone. La reconstitution des caryotypes permettrait dès lors d'étudier l'ordre d'ascension anaphasique des chromosomes. Cet "ordre" a été reconstitué de la façon suivante: nous avons observé que, si dans une mitose, 2 chromosomes seulement montraient une image en losange, il s'agissait toujours des 2 chromosomes de la paire n° 17. Si 4 chromosomes montraient cette image caractéristique, le caryotype permettait d'identifier, outre les chromosomes de la paire 17, ceux de la paire 5. Lorsque 6 chromosomes commençaient leur ascension vers les pôles, les paires 17 et 5 étaient toujours intéressées, ainsi qu'une nouvelle paire, la paire n° 2. Chaque image en losange supplémentaire était due à un chromosome qui venait s'ajouter à ceux qui l'avaient précédé, ce qui évoque une idée de continuité et d'ordre rigoureux. En outre, la synchronisation des mouvements des deux chromosomes d'une même paire était telle que pour la première fois nous avons pu classer les chromosomes en adoptant la numérotation de Denver par paires et non celle de Chicago par groupes (fig. 8)

L'analyse de 23 mitoses nous a permis de constater que les chromosomes de la paire n° 17 étaient ceux qui présentaient le plus souvent une "image en losange" au niveau de la zone centromérique, suivis successivement par ceux des paires 5, 2, 13, 6, 11, 8, 3, 10, 12, 19, 20, 22, 4, puis toutes les autres paires d'autosomes. Les chromosomes sexuels X et Y n'ont jamais montré d'image en losange. Cet asynchronisme dans l'ordre d'ascension des chromosomes vers les pôles nous en rappelle un autre: celui de la fin de synthèse d'ADN telle qu'on peut l'étudier par autoradiographies après incorporation de thymidine tritiée. Les paires montrant les premières des images de dissociation centromérique sont également celles qui terminent le plus tôt leur synthèse d'ADN.

La relation possible entre la synthèse d'ADN, la disjonction des chromatides et la genèse de certaines aneuploïdies observées dans les leucémies aiguës sera développée dans la discussion.

b. Endoréduplication.

Nous avons recherché la signification des endoréduPLICATIONS dans notre matériel de 3 façons différentes:

-nombre d'endoréduPLICATIONS par la méthode du choix: nous avons relevé la présence d'endoréduPLICATIONS lorsque nous faisons nos analyses de routine, c'est-à-dire lorsque nous repérons les "belles" mitoses pour en faire l'analyse chromosomique détaillée à l'aide de caryotypes. Nous voyons d'emblée que le nombre d'endoréduPLICATIONS est très faible pour les cultures de lymphocytes de sujets non leucémiques et pour les analyses de moelle osseuse de sujets leucémiques, alors qu'il est plus élevé pour les cultures de fibrocytes, qui séjournent plus longtemps in vitro - (Tableau XVII).

TABLEAU XVII.

Cellules	Nombre de cas	Nombre de cas avec end.	Nombre de mitoses	Nombre d'end.
Lymphocytes	1000	10	43.940	10
Fibrocytes	116	29	2.914	36
Cel. médull.	64	1	2.434	1

Nombre d'endoréduPLICATIONS rencontrées dans 3 types de cultures différents (par la méthode du choix).

Abréviations: end: endoréduPLICATIONS

Cel. médull.: cellules de moelle osseuse leucémique.

-Nombre d'endoréduPLICATIONS par une méthode systématique: nous avons recherché la fréquence des endoréduPLICATIONS en abandonnant la méthode du choix. Nous avons repris les lames des 10 cultures de sang périphérique nous ayant montré des endoréduPLICATIONS lors de l'analyse par la méthode du choix. Nous avons examiné en outre les lames provenant de 10 sujets dont le diagnostic clinique était le même que celui des cas avec endoréduPLICATIONS: 3 normaux, 2 trisomies 21, 1 syndrome de Klinefelter XXY, 2 délétions des bras courts d'un chromosome 5 et 2 sujets atteints de sclérose en plaques. Nous avons enfin examiné les lames de cultures de sang périphérique de 5 sujets présentant une forme de leucémie aiguë et de 5 sujets non-leucémiques dont les leucocytes avaient été au contact de la colcémide (1 microgramme par ml de milieu) toute la durée de la culture, soit 72 heures. Nous avons observé sans choisir les 1000 premières mitoses ou, s'il n'y avait pas 1000 mitoses sur la lame, toutes les mitoses présentes et nous avons noté le nombre d'endoréduPLICATIONS (Tableau XVIII). Nous n'avons trouvé de cette façon aucune endoréduPLICATION dans les cultures de sujets leucémiques ou dans celles de patients n'ayant pas montré d'endoréduPLICATIONS lors de l'analyse par la méthode du choix. Dans les cultures effectuées au contact de la colcémide 72 heures, un seul cas a montré 12 endoréduPLICATIONS pour mille mitoses comptées. Il s'agissait d'un enfant âgé de 10 jours, porteur d'une trisomie 21 présentant une malformation cardiaque et décédé 2 semaines plus tard; aucune culture sans colcémide n'a pu être effectuée chez ce patient. L'absence d'endoréduPLICATIONS dans les autres cultures de cette série ne permet cependant pas d'affirmer que la colcémide soit responsable directement des endoréduPLICATIONS observées chez ce trisomique 21.

Chez les patients ayant montré une endoréduPLICATION lors de l'analyse par la méthode du choix, d'autres endoréduPLICATIONS ont été mises en évidence. Ces résultats montrent: que la méthode du choix est suffisante pour repérer les endoréduPLICATIONS; que, dans notre série, et contrairement à d'autres, les leucémiques ne montrent

pas plus d'endoréduPLICATIONS que les sujets non leucémiques d'une série témoin et, enfin, qu'une série témoin identique par le diagnostic clinique à une série ayant permis d'observer des endoréduPLICATIONS ne montre pas ces images mitotiques particulières, ce qui suggère que les endoréduPLICATIONS ne semblent pas caractéristiques d'un syndrome déterminé.

TABLEAU XVIII.

Diagnostic	Nombre de cas	Nombre de mitoses	Nombre d'E
Cas "E+"	10	6593	20
Cas "témoins"	10	9330	0
Leucémies	5	3565	0

Nombres d'endoréduPLICATIONS dans des cultures de sang périphérique provenant de 10 cas avec une endo-réduPLICATION mise en évidence lors de l'analyse par la méthode du "choix", de 10 cas "témoins" dont le diagnostic clinique était le même que celui des cas avec endoréduPLICATIONS, mais où aucune de ces figures mitotiques particulières n'avait été mise en évidence lors de l'analyse par la méthode du choix, et de 5 cas leucémiques dont le sang périphérique a été mis en culture.

-nombre d'endoréduPLICATIONS en fonction de la durée du séjour in vitro: une différence nous est apparue à la lecture de nos résultats suivant la méthode du choix. Les cultures de fibrocytes en effet présentaient un nombre d'endoréduPLICATIONS trente fois plus élevé que les cultures de sang. On sait que les cultures de fibrocytes impliquent un séjour in vitro plus long que celui requis pour les cultures de sang périphérique et les incubations de moelle osseuse. Elles impliquent aussi un nombre de divisions cellulaires hors du contrôle de l'organisme, et par ce point précis se rapprochent des divisions des cellules leucémiques, qui semble s'effectuer également en dehors du contrôle habituel de l'organisme. Nous avons étudié le rôle de la durée du séjour in vitro de la façon suivante: nous avons choisi 20 cultures de fibrocytes provenant de 20 cas différents. Les cellules de tous ces cas ont été maintenues in vitro au moins 2 mois. Nous avons compté le nombre d'endoréduPLICATIONS pour les mêmes cultures après la première transplantation

TABLEAU XIX.

Séjour in vitro	N° mitoses	n° endoréduPLICATIONS.
Moins de 4 semaines	2114	10
Plus de 4 semaines	2197	13

Nombre d'endoréduPLICATIONS après un séjour in vitro de moins de 4 semaines et de plus de 4 semaines de fibrocytes provenant de 20 cas différents.

(moins de 4 semaines in vitro) et après la 4ème transplantation (plus de 4 semaines in vitro, et au moins 2 semaines de plus que la première analyse). Les résultats (Tableau XIX) ont été comparés entre eux au moyen du test de χ^2 ; avec Id.l., $p=0,180$ ce qui

n'est pas significatif ($0,70 > p > 0,50$). Nous ne pouvons pas attribuer de cause précise au nombre élevé d'endoréductions observé dans les cultures de fibrocytes mais nous pouvons préciser que si la durée du séjour in vitro est prolongée, le nombre d'endoréductions n'augmente pas de façon significative.

C. Etude de la stabilité des mosaïques constitutionnelles.

Nous avons étudié 2 types de mosaïcismes.

a)- Mosaïques par non disjonction chromosomique.

Trois sujets différents porteurs de mosaïques constitutionnelles par non disjonction ont été étudiés de la façon suivante:

-sujet 46,XY/47,XY I8+: 5 cultures de lymphocytes du sang périphérique ont été effectuées entre le I8-II-63 et le 3-3-66. Les résultats sont portés au tableau XX. La proportion de cellules trisomiques I8 a oscillé entre I8 et 26%, celui des cellules normales entre 65 et 80.

TABEAU XX.

Date de l'analyse	Numérations chromosomiques.				
	44	45	46	47	Total.
I8-II-63	-	-	40 (80)	10 (20)	50 (100)
24-I-64	-	-	15 (75)	5 (25)	20 (100)
I3-I0-64	1 (3)	2 (6)	25 (65)	10 (26)	38 (100)
2-4-65	-	1 (3)	55 (79)	13 (18)	69 (100)
3-3-66	1 (8)	4 (8)	33 (66)	13 (26)	50 (100)

Numérations chromosomiques effectuées à divers intervalles réguliers sur cultures de sang périphérique d'un sujet porteur d'une mosaïque constitutionnelle 46,XY/47,XY I8+. Les chiffres entre parenthèses indiquent les pourcentages.

-sujet 46,XX/47,XX 2I+: 2 cultures de lymphocytes à II moins d'intervalle ont montré des numérations chromosomiques presque identiques: lors de la première on a noté 80% de cellules normales et 20% de cellules trisomiques, lors de la seconde 77% de cellules normales et 23% de cellules trisomiques (PETIT, 1967).

-sujet 46,XX/47,XX 2I+: une culture de fibrocytes a été entreprise chez cette patiente et a été maintenue in vitro pendant 25 semaines. Douze passages ont eu lieu et des lames ont été préparées pour l'analyse cytogénétique après chaque passage. Les numérations effectuées sont portées au Tableau XXI. On remarque que progressivement les cellules trisomiques 2I ont disparu: une sélection en faveur des cellules normales à 46 chromosomes s'est effectuée. Après la 12ème transplantation, le fragment n'a plus présenté de croissance et la culture a été abandonnée. Dans ce cas, on constate une sélection en faveur des cellules normales. Celle-ci cependant n'est manifeste qu'après 8 semaines de séjour in vitro.

TABLEAU XXI.

Date de l'analyse	Numérations chromosomiques.						Total
	44	45	46	47	48	49	
3-II-63	I	I	I	25	5	6	33
5- I-64	-	2	10	22	-	-	34
19- 4-64	2	-	15	7	-	-	24
26- 4-64	-	3	34	18	-	-	55
2- 5-64	2	4	33	4	I	-	44
12- 5-64	-	-	12	-	-	-	12

Numérations chromosomiques effectuées dans des cultures de fibrocytes provenant du même fragment de tissu, chez un sujet 46,XX/47,XX 2I+.

b)- Mosaïques chez des sujets porteurs d'un chromosome en anneau.

Trois sujets porteurs de chromosomes en anneau ont été étudiés. Chez deux d'entr'eux cette anomalie s'est révélée très stable. L'un présentait un chromosome I8 en anneau (46,XX,I8r); 120 mitoses ont été analysées (PETIT et PONCELET, 1967): toutes montraient 46 chromosomes dont le I8r. L'autre sujet présentait un chromosome en anneau du groupe G (46,XY Gr); ici encore, une grande stabilité fut observée: 70 mitoses avaient 46 chromosomes dont le Gr. Un 3ème patient présentait un chromosome du groupe D en anneau (Dr). L'analyse de 100 mitoses a montré la présence de cellules à constitution chromosomique différente au sein de la même culture de sang périphérique. Ces variations cependant étaient assez limitées et concernaient exclusivement l'anneau: il était présent, absent, présent en double exemplaire², sous forme de chromosome "géant", traduisant de la sorte des erreurs de réplication et de répartition à l'anaphase (Tableau XXII).

TABLEAU XXII.

type cellulaire	46,XX Dr	46,XX	46,XX D"R"	45,XX Dr-	47,XX DrDr+	Total
n° mitoses	83	3	7	2	5	100

Divers caryotypes rencontrés chez un sujet porteur d'un chromosome D en anneau.

Abréviations: D"R": chromosome D en anneau "géant".

III. DISCUSSION.

L'étude des chromosomes mitotiques de cellules provenant de sujets leucémiques d'une part, la comparaison des anomalies leucémiques aux anomalies observées dans des systèmes cellulaires non leucémiques, d'autre part, ne nous ont pas permis de mettre en évidence une seule anomalie spécifique. Toutefois, sans être spécifiques, les images anormales des leucémies sont sûrement originales: c'est cette originalité que nous soulignerons au cours de notre discussion.

1.-Technique et mise en évidence des aberrations chromosomiques des leucémies:

L'importance des techniques utilisées pour étudier les chromosomes mitotiques des cellules leucémiques a été soulignée à l'occasion de l'exposé de nos résultats concernant les LMC. Comme pour les LMC, nous avons pu observer que l'incubation à court terme de moelle osseuse telle que nous l'avons pratiquée n'a pas eu d'influence sélective en faveur de cellules à caryotype normal. Certains cas ont montré presque exclusivement des cellules porteuses d'une aneuploïdie (cas n° 40, 41, 42, 48). Les variations numériques observées dans d'autres cas (n° 33 et 49) l'ont été par l'emploi des mêmes techniques d'une analyse à l'autre. Cette absence de sélection nous incite à penser que la présence exclusive dans certains cas de cellules à caryotype normal correspond à un fait réel: il existe des leucémies aiguës à caryotype normal, et inversement un caryotype anormal n'est pas une condition nécessaire à l'apparition d'une leucémie aiguë. Le cas n° 33 nous paraît intéressant à cet égard. Une première analyse, alors que la patiente présentait tous les signes d'une leucémie aiguë à monocytes a montré un caryotype normal. Six semaines plus tard l'état clinique s'est aggravé malgré un traitement à la Prednisolone et on note l'apparition d'une lignée aneuploïde. L'aneuploïde semble ici être apparue après l'installation de la leucémie aiguë; d'autre part le traitement n'a pas empêché la lignée à 47 chromosomes de proliférer.

Nos données globales concernant les analyses faites à partir de moelle osseuse correspondent à celles de SANDBERG (1966) et de KIOSSOGLOU et al. (1965): ces auteurs trouvent comme nous que 55% environ des cas de leucémies aiguës de leurs séries, étudiées par une méthode "directe", ne

montrent aucune anomalie chromosomique, décelable par les techniques habituelles. HUNGERFORD et NOWELL (1962) ne remarquent aucune différence du point de vue cytogénétique entre des préparations de moelle osseuse par la méthode "directe" ou après incubation de 24 heures in vitro. Chez un patient trisomique 21 atteint de leucémie myéloïde aiguë, VINCENT et al. (1963) observent dans des cultures de sang périphérique des cellules à 49 chromosomes; ces cellules sont plus nombreuses après 3 et 4 jours d'incubation. La sélection in vitro semble s'être faite ici en faveur des cellules aneuploïdes. Notons encore que l'évolution clonale décrite par LEJEUNE et al. (1962) concernait une culture de moelle osseuse de 4 jours (BERGER, 1964). Ces données démontrent tout l'intérêt des incubations à court terme, contrairement à l'opinion exprimée par SANBERG et al. (1962). La technique de culture de sang stimulé par la phytohéماغglutinine n'est ^{pas} satisfaisante: nous confirmons ici nos résultats obtenus lors de l'analyse des LMC.

2.-Absence de spécificité des aberrations chromosomiques des leucémies aiguës.

Nous avons constaté, comme d'autres chercheurs, la diversité des caryotypes dans les leucémies aiguës. Dans notre série, les aneuploïdies varient de cas à cas, même lorsque le diagnostic clinique est le même. Ces variations peuvent être très étendues, et aller pour les leucémies lymphoblastiques aiguës du caryotype normal à la tétraploïdie complète. Nous avons eu l'occasion d'étudier les chromosomes de 2 patients présentant une leucémie aiguë à promyélocytes. Chez l'un (n° 35), le caryotype était normal; chez l'autre on notait la présence d'une lignée à 45 chromosomes, haplo-21. Cette lignée a semblé régresser après traitement. Il est cependant malaisé d'établir une relation entre le traitement et les données cytogénétiques. En effet, cette patiente est décédée 2 mois après la dernière analyse qui montrait une nette diminution du nombre des mitoses aneuploïdes (DRUEZ, 1967). Une lignée haplo-21 a été observée par RUFFIE et al. (1962) dans 3 cas de leucémie myéloblastique aiguë. LEJEUNE (1965) se demandait s'il ne s'agissait pas là d'une "délétion totale" du 21, aux conséquences plus graves qu'une délétion partielle caractéristique de la LMC. Deux cas de leucémie à promyélocytes ont été rapportés par KIOSSOGLOU et al. (1965): l'un avait une lignée hypotétraploïde à 87 chromosomes

avec des surnuméraires dans tous les groupes, l'autre une lignée à 45 chromosomes haplo-C. Une observation concernant également une leucémie à promyélocytes, faite par PILERI et al. (1966), fait état de 2 lignées: l'une normale à 46 chromosomes, l'autre hypodiploïde à 44 chromosomes, haplo-I6 et haplo-20. L'absence d'un chromosome 2I telle que nous l'avons observé chez notre patiente atteinte de leucémie à promyélocytes ne se retrouve pas dans d'autres cas semblables, mais a été signalée dans quelques cas de leucémie aiguë myéloblastique: on ne peut donc pas parler d'aberration spécifique.

A la suite d'un grand nombre d'observations montrant cette absence de spécificité, SANDBERG avait conclu que l'aneuploïdie des leucémies aiguës correspondait plutôt à un épiphénomène, chaque sujet réagissant à l'agent oncogène en fonction de son génotype (voir page 50). Effectivement, l'aneuploïdie n'apparaît pas comme un élément essentiel dans l'acquisition des propriétés leucémiques de la cellule. A ce point de vue, les leucémies aiguës, quelle que soit leur forme, se distinguent de la leucémie myéloïde chronique, où la délétion du chromosome 2I semble étroitement liée à la transformation maligne.

Si elles ne sont pas spécifiques, les aberrations chromosomiques des L.A. sont d'un type particulier. Le plus souvent, elles se manifestent par le gain ou la perte de chromosomes. Ce n'est qu'exceptionnellement que l'on observe des remaniements plus complexes tels que cassures chromosomiques ou chromatidiennes, translocations, chromosomes en anneau, chromosomes dicentriques, images tri- ou quadriradiées, si souvent observées après l'action d'agents mutagènes chimiques, physiques (irradiations ionisantes) ou biologiques (virus). D'autre part, le nombre de chromosomes surnuméraires ou manquants peut être très élevé, ce qui implique des altérations très importantes de la balance génique. La cellule leucémique cependant semble non seulement bien tolérer ces altérations, mais encore en retirer un certain avantage. Nous examinerons comment les aneuploïdies peuvent survenir, ensuite comment la cellule peut les supporter.

3.- Mécanismes possibles impliqués dans la genèse des aberrations chromosomiques des L.A.

Du point de vue théorique, l'origine des aberrations chromosomiques des L.A. peut être multiple. Un certain nombre d'hypothèses ont été proposées: nous retiendrons surtout celles qui sont basées sur des observations cytogénétiques.

- a)- Sénescence et non-disjonction chromosomique: l'acquisition ou la perte de chromosomes dont la morphologie est "normale" peut s'expliquer le plus simplement par une "non-disjonction" mitotique. Deux chromosomes, au lieu de séparer à l'anaphase pour migrer chacun vers un pôle opposé, restent accolés et sont englobés dans la même cellule fille. C'est un mécanisme de ce type qui est le plus souvent invoqué pour expliquer l'apparition des trisomies humaines; s'il survient à une mitose après fécondation, il y aura apparition d'une mosaïque tissulaire constitutionnelle. L'association des chromosomes acrocentriques des groupes D et G à la mitose (FERGUSON-SMITH et HANDMAKER, 1961) et la participation de ces chromosomes à l'élaboration des nucléoles à l'interphase avaient suggéré à OHNO (1961) que la fonction d'organisateur nucléolaire pourrait être responsable des non-disjonctions et des translocations intéressant les chromosomes acrocentriques. Ceux-ci en effet seraient étroitement associés pendant la période interphasique, ce qui favoriserait les accidents tels que translocations et non-disjonctions.

Quel que soit le rôle de la fonction interphasique des chromosomes acrocentriques, il convient de souligner l'importance de l'âge dans les processus de non-disjonction conduisant à la naissance d'enfants trisomiques G. Plus une mère est âgée, plus grand est le risque pour elle de mettre au monde un enfant trisomique 21 (PENROSE et SMITH, 1966). Dans la population générale, on a noté (JACOBS et al. 1963), au niveau de cultures de lymphocytes (et donc des mitoses), un nombre d'aneuploïdies plus élevé chez les sujets âgés. L'analyse des caryotypes a montré la perte "préférentielle" d'un chromosome X chez

les femmes et d'un chromosome Y chez les hommes. Ces observations peuvent être rapprochées de celles de HAYFLICK et MOORHEAD (1961) concernant les cultures diploïdes in vitro. Après quelques mois, ces cultures entrent dans une phase dite de sénescence ou dégénérative, au cours de laquelle les cellules perdent leur aptitude à se multiplier en même temps qu'apparaissent un nombre élevé de cellules aneuploïdes (SAKSELA et MOORHEAD, 1963). Ces "cell-strains" sont à distinguer des "cell-lines": les premières conservent in vitro toutes les propriétés des cellules dont elles dérivent, elles conservent leur caryotype d'origine et elles ont un pouvoir de multiplication limité. Les secondes au contraire ont un pouvoir de multiplication qui semble illimité, ne conservent pas leur caryotype d'origine, et injectées à un hôte proliférant et souvent métastasient, ce qui n'est pas le cas des "cell-strains" (HAYFLICK, 1965). Ces propriétés les rapprochent des cellules cancéreuses. La sénescence favorise-t-elle le passage de "cell-strain" à "cell-line"? Et les cellules leucémiques sont-elles des cellules "vieillies" précocement? On ne peut encore l'affirmer. On a cependant pu constater que la transformation des cellules après contamination virale par le virus SV40 est beaucoup plus rapide au niveau de "cell-strains" sénescents qu'à celui de "cell-strains" jeunes (JENSEN et al., 1963; TODARO et al., 1963; WOLMAN, 1964; MOORHEAD et SAKSELA, 1965).

- b)-Fin de synthèse d'ADN et non-disjonction chromosomique: on sait que la synthèse d'ADN par les chromosomes est asynchrone: les chromosomes ne terminent pas tous leur synthèse d'ADN en même temps (SCHMID, 1963; MOORHEAD et DEFENDI, 1963; KIKUCHI et SANDBERG, 1964). Nous avons montré dans un cas que l'ascension des chromosomes vers les pôles paraissait également asynchrone, et cet asynchronisme pouvait être facilement relié à celui de la fin de synthèse: les chromosomes "tardifs" semblent être les derniers à migrer vers les pôles.

Etudiant la mitose au niveau de cultures à long terme provenant de cellules leucémiques, ZURHAUSEN (1967) a noté que certains chromosomes déspiralés ne migraient pas vers les pôles à l'anaphase, mais au contraire restaient à l'équateur de la cellule. Une étude autoradiographique

après incorporation de thymidine tritiée a montré que ces chromosomes synthétisaient de l'ADN longtemps après les autres, qui étaient normalement spiralés. Ces observations semblent confirmer notre hypothèse qui avait été formulée de la façon suivante (KOULISCHER, 1966): "plus tard un chromosome termine sa période de synthèse, plus tard il migre vers les pôles à l'anaphase, ce qui suggère une corrélation entre la synthèse d'ADN, les processus mitotiques et les aneuploïdies". Les facteurs oncogènes pourraient interférer avec la synthèse d'ADN, altérer en plus le cycle normal de spiralisation des chromosomes (KOULISCHER, 1963), et provoquer de la sorte un retard de migration vers les pôles à l'anaphase. Les chromosomes polaires seraient dus à un phénomène équivalent, mais survenant à la prophase et empêchant la formation d'une plaque équatoriale. A la télophase, ces chromosomes "tardifs" seraient soit inclus dans la même cellule, soit perdus, avec formation de cellules aneuploïdes, hyperdiploïdes dans le premier cas, hypodiploïdes dans le second. Cette hypothèse permet de montrer de façon très nette que l'origine du phénomène que l'on observe à un moment donné (absence de migration vers les pôles ou mitose aneuploïde, peut être très éloignée dans le temps; elle souligne également l'interdépendance de diverses phases de la vie du noyau. Toute atteinte pathologique d'une de ces phases peut se traduire ultérieurement par l'apparition d'une cellule aneuploïde.

- c) -EndoréduPLICATIONS et aneuploïdies: une non disjonction chromosomique au niveau d'une cellule à 46 chromosomes suppose la formation d'une cellule à 47 chromosomes (type "hyper") et d'une cellule à 45 chromosomes (type "hypo"). Dans un cas d'évolution clonale, LEJEUNE et al. (1962) ont été frappés par l'absence de cellules de type "hypo": l'évolution semblait se faire par l'acquisition de surnuméraires. La présence d'endoréduPLICATIONS dans des cultures de cellules leucémiques (voir page 67) a suggéré à ces auteurs un mécanisme particulier d'acquisition de surnuméraires: l'endoréduPLICATION sélective d'un seul chromosome. Certaines observations ont fait état d'endoréduPLICATIONS limitées à un ou deux chromosomes, chez des leucémiques (WAHRMAN et al., 1962), chez des cancéreux non-leucémiques (FRIEDMAN et al., 1964), et au niveau de cellules provenant de sujets normaux (LEJEUNE et al., 1966; de GROUCHY et al., 1967). La fréquence de ces

anomalies serait pour les tissus normaux de 1/5000 à 10.000 mitoses. Nous n'avons jamais observé d'images semblables. Nous en avons peut-être observé les conséquences, dans les cellules à deux anneaux de notre cas 46,XX Dr.

L'endoréduplication sélective est un moyen possible pour la cellule d'acquérir des surnuméraires. Nous avons cependant montré que les endoréduPLICATIONS de tout le génome ne sont pas spécifiques des leucémies, et nous n'avons pas observé, dans des cultures in vitro à long terme, d'effet dû au temps. Les aneuploïdies par endoréduplication sélective ne paraissent donc pas liés directement aux facteurs oncogènes ou à la sénescence cellulaire.

d)-"Agents cancérigènes" et aberrations chromosomiques des L.A.: il est difficile, pour plusieurs motifs, de comparer les aneuploïdies observées dans les L.A. à celles induites expérimentalement par les agents dits cancérigènes. Comme il s'agit d'un problème assez vaste, nous le considérerons dans un paragraphe séparé.

4.- Agents "leucémogènes" et L.A. chez l'Homme: apport de la cytogénétique.

Sont réputés leucémogènes chez l'Homme des agents d'ordre chimique, comme le benzène (CONKRITE, 1961; VIGLIANI et SEITA, 1964; FORNI et MOREO, 1967), ou physique, comme les radiations ionisantes (CONKRITE, 1961). A première vue, l'action de ces agents sur les chromosomes de cellules cultivées in vitro est caractérisée par l'apparition de mitoses avec de nombreuses cassures chromosomiques ou chromatidiennes, de fragments acentriques, de chromosomes dicentriques ou en anneau, ou de réarrangements plus complexes avec formation d'images tri-ou quadriradiées, de translocations avec apparition de chromosomes "marqueurs" ne ressemblant pas aux chromosomes normaux, et de tétraploïdies ou d'endoréduPLICATIONS. Les réarrangements complexes sont surtout observés après irradiation ou action de radiomimétiques, les cassures et fragments acentriques après infection virale (NICHOLS et HENEEN, 1965). Pour mieux pouvoir comparer les observations entre elles, BUCKTON et al. (1962) ont proposé une nomenclature simple: ils distinguent les aneuploïdies stables des aneuploïdies instables. Les premières peuvent se transmettre aux cellules filles et n'affectent

pas gravement la vie de la cellule, les secondes au contraire ne se transmettent pas, par suite d'une répartition profondément anormale des chromosomes atteints lors de l'anaphase (nombreux fragments acentriques ne pouvant se fixer au fuseau).

BUCKTON et al. (1962) ont noté, après irradiation de la colonne aux RX chez des patients atteints de spondylarthrite ankylosante, au niveau de cultures de sang périphérique stimulé par la PHA, une augmentation rapide des aneuploïdies instables. Un pic est atteint après 2 à 3 semaines, puis ces anomalies disparaissent rapidement. La proportion de cellules avec anomalies stables au contraire reste constante, et peuvent se retrouver jusqu'à 20 ans après l'irradiation, chez des sujets qui n'ont pas développé de leucémie. La même observation peut être faite après exposition au benzène (TOUGH et COURT BROWN, 1965): les aneuploïdies du type stable persistent longtemps après la disparition des aneuploïdies de type instable. Sans utiliser la même nomenclature, STICH et al. (1964) notent après infection de cellules de Hamster in vitro par l'adénovirus de type I2 l'apparition de cellules avec de nombreuses anomalies du type instable: 15 jours plus tard, elles ont disparu et n'ont survécu que des cellules à caryotype normal. MOORHEAD et SAKSELA (1965) ont infecté in vitro des cellules diploïdes humaines par le virus oncogène SV40: dans leurs expériences également, les anomalies de type instable (cassures, fragments acentriques) apparaissent de 4 à 6 semaines après l'infection et disparaissent ultérieurement pour faire place aux aneuploïdies de type stable (chromosomes dicentriques, chromosomes surnuméraires et tétraploïdies). Il semble bien, d'après ce qui précède, que si les agents dits leucémogènes jouent effectivement un rôle dans l'installation des leucémies chez l'Homme, ce ne soit pas par leur effet cytogénétique immédiat, spectaculaire certes, mais de peu de durée. Quant aux effets stables, ils ne sont pas oncogènes par eux-mêmes: on connaît un certain nombre d'observations effectuées chez des radiologues et des techniciens en radiologie, qui montrent des remaniements chromosomiques importants au niveau des lymphocytes du sang périphérique, sans leucémie (CONEN et al., 1966; KOULISCHER, 1967; NORMAN et al., 1964)

Des anomalies chromosomiques semblables aux anomalies instables de BUCKTON et al. ont été décrites par COX et al. (1965) et par LUBS et al. (1966) au niveau de tumeurs gliales chez l'enfant: ces auteurs observent des chromosomes "minute" multiples; les images suggèrent la présence de nombreux fragments. Des cassures chromatidiennes et chromosomiques peuvent être observées après infection cellulaire in vitro au moyen des virus de la rougeole (NICHOLS et al., 1962), de la rubéole (BOUE et al., 1964), chez des patients vaccinés contre la fièvre jaune (HARNDEN, 1964), au niveau de lymphocytes normaux mis au contact de plasma de sujets atteints d'hépatite infectieuse (EL-ALFI et al., 1965), mais aussi après traitement in vitro (NICHOLS et HENEEN, 1965) ou in vivo par un analogue des déoxyribosides, l'arabinosylcytosine (BELL et al., 1966), chez des sujets déficients en acide folique ou vitamine B12 (RYAN et al., 1965; MENZIES et al., 1966; SANDBERG, 1966), au niveau de cultures de cellules de Hamster infectées par le virus de l'herpès (HAMPAR et ELLISON, 1961), dans des leucocytes d'enfants atteints de varicelle (AULA, 1963), après n'importe quel type d'irradiation in vivo ou in vitro, chez des patients cancéreux traités. Pour GRIPENBERG (1965), l'augmentation des cassures, la présence de fragments acentriques sont les témoins d'une réaction aspécifique des chromosomes contre une agression. Leur association avec une forme de leucémie (MAKINO et AWA, 1965) ne révélerait pas un phénomène particulier à cette forme de cancer.

L'existence de ces réactions aspécifiques des chromosomes soulignent la difficulté qu'il y a de trouver une cause aux aberrations observées dans les leucémies. L'action transformante des virus telle qu'on la suppose dans cancers induits par un virus oncogène, que ce soit son incorporation au génome cellulaire ou son action sur des gènes régulateurs de la division cellulaire sans incorporation réelle au génome, ne ressemble en rien à ce que les cytogénéticiens observent. NICHOLS (1963) signale que, s'il s'est intéressé au virus de la rougeole, c'est parce qu'il a eu "l'impression" qu'après une épidémie rougeoleuse particulièrement sévère à Philadelphie en 1956, le nombre de leucémies aiguës a augmenté. Cet auteur a du reste observé dans une culture de leucocytes infectés par le virus de la rougeole,

une délétion des bras courts d'un chromosome G, qui devenait de la sorte identique à un chromosome Ph^I. Mais est-ce suffisant pour démontrer qu'il existe un lien entre la leucémie myéloïde chronique et la rougeole? Nous ne le pensons pas. Le lien entre les observations cytogénétiques et les causes des anomalies observées est encore à rechercher. L'effet "premier" de tous les agents dits leucémogènes est plutôt de détruire que de transformer la cellule, et c'est cet effet que nous observons, parfois au moyen de certains artifices: par exemple, la stimulation des lymphocytes par la PHA nous permet d'observer leur première division depuis le moment où ils ont été atteints. Si celle-ci s'était produite spontanément plus tôt, ces lymphocytes n'auraient vraisemblablement pas survécu et nous n'aurions pu les observer. Les expériences de NICHOLS et HENEEN (1965) concernant la transformation des cellules par le SV40, de même que les observations de NICHOLS (1963) et de AULA et SAKSELA (1966) concernant la pulvérisation des chromosomes de 10 à 60 minutes après l'infection virale, montrent qu'il est également difficile d'établir un lien direct entre l'action de l'agent mutagène et la synthèse de l'ADN cellulaire. Un vaste domaine de recherches est encore à défricher, et la cytogénétique, sans indiquer les mécanismes intimes, peut certainement aider valablement les travaux futurs.

5.-La stabilité des mosaïques constitutionnelles. Comparaison avec les mosaïques leucémiques.

Un sujet leucémique possède au moins deux populations cellulaires dans son organisme: la population normale et la population leucémique. Cette dernière peut parfois se distinguer de la normale par un caryotype aberrant. Il se crée alors une situation qui n'est pas sans présenter quelque analogie avec les mosaïques constitutionnelles. Cette analogie toutefois semble d'ordre morphologique: contrairement aux cellules leucémiques avec aneuploïdie, les lignées aneuploïdes des mosaïques constitutionnelles soit sont très stables, soit ont une tendance à disparaître spontanément.

- a)- Stabilité des mosaïques constitutionnelles: l'existence démontrée d'adultes porteurs de mosaïques constitutionnelles montre que plusieurs dizaines d'années après la formation de la mosaïque des cellules à ca-

ryotype différent continuent d'exister. Des numérations à intervalles réguliers d'un même tissu au moyen de la même technique permettent de suivre de façon plus précise cette stabilité. FERRIER (1966) rapporte des numérations effectuées à 5 ans d'intervalle sur des lymphocytes d'un enfant porteur d'une mosaïque XO/XY: la proportion de cellules avec l'une ou l'autre formule sexuelle est sensiblement la même lors des 2 analyses. Nous avons rapporté dans le présent travail les numérations effectuées chez un enfant porteur d'une mosaïque 46,XY/47,XY I8+: en 3 ans, nous n'avons constaté aucune altération de la proportion des cellules normales par rapport aux cellules aneuploïdes. Chez un autre enfant, 46 XX/47 XX 2I+, la proportion de cellules trisomiques 2I est restée la même à 1 an d'intervalle. L'aneuploïdie ne semble pas conférer à ces cellules un avantage ou un désavantage quelconque sur les cellules euploïdes.

- b)-Instabilité des mosaïques constitutionnelles: tendance à la disparition des lignées aneuploïdes: lorsqu'une instabilité est constatée chez un porteur d'une mosaïque constitutionnelle, on observe toujours la disparition progressive de la lignée aneuploïde in vivo. Celle-ci semble s'effectuer de la même manière que celle qui s'est produite in vitro avec les cellules d'une petite fille à mosaïque 46,XX/47,XX 2I+, que nous avons rapporté plus haut. L'aneuploïdie, loin d'avantager la cellule, paraît au contraire la défavoriser. BOOK et al. (1963) rapportent la diminution du nombre de cellules triploïdes dans des cultures de fibrocytes effectuées à 3 ans d'intervalle chez un sujet diploïde/triploïde: de 84% à l'âge d'un an, elles ne sont plus que de 10% à l'âge de 4 ans. Lorsque la mosaïque comporte dans l'une de ses lignées un chromosome en anneau, celle-ci tend également à disparaître avec le temps (ATKINS et al., 1966; GRIPENBERG, 1966). La présence d'un anneau peut toutefois créer une mosaïque, à cause sans doute de son instabilité. LEJEUNE et al. (1966) notent 3 lignées différentes chez un enfant porteur d'un chromosome I8 en anneau: une lignée à 45 chromosomes sans anneau, une lignée à 46 chromosomes avec anneau, et une

lignée à 47 chromosomes avec 2 anneaux. Nous avons constaté que la présence d'un anneau peut soit s'accompagner d'une grande stabilité, soit au contraire favoriser l'apparition d'aneuploïdies mais qui sont toutes des "variations autour d'un anneau": pas d'anneau dans des cellules à 45 chromosomes, 2 anneaux dans des cellules à 47 chromosomes, un anneau "géant", 2 anneaux "géants", mais jamais d'aneuploïdies intéressant d'autres chromosomes que celui en anneau.

c) -Comparaison avec les cellules leucémiques: l'état d'instabilité du caryotype des cellules leucémiques et leur aptitude à se multiplier de façon incontrôlée ne peut être comparée à la stabilité ou à la disparition des cellules aneuploïdes des mosaïques constitutionnelles, même quand le caryotype est apparemment identique. La patiente n° 4I de notre série montrait dans presque toutes ses cellules une lignée trisomique I8, semblable morphologiquement à la lignée trisomique I8 de notre mosaïque constitutionnelle suivie pendant 3 ans. Mais dans ce cas, la lignée aneuploïde semblait avoir envahi toute la moelle osseuse, et la patiente est décédée 2 mois après l'analyse de ses chromosomes. Dans la mosaïque constitutionnelle au contraire, la lignée aneuploïde semblait en parfait équilibre avec la lignée normale. On est tenté de penser que les propriétés leucémiques des cellules dans le premier cas ne dépendent pas directement de la présence d'un chromosome I8 surnuméraire.

6.- Signification des aberrations chromosomiques des L.A.

Les cas rapportés par d'autres chercheurs et nos observations personnelles montrent que les aberrations chromosomiques ne sont pas nécessaires à la transformation leucémique des cellules du système hématopoïétique. De plus, lorsqu'une aberration chromosomique est présente, elle ne semble pas spécifique d'une forme de L.A. déterminée. Tout semble indiquer, comme l'a souligné SANDBERG (1966) que les aneuploïdies des L.A. sont un épiphénomène de la maladie. L'apparition des aneuploïdies pourrait traduire une adaptation des cellules à leur nouvel état, la quantité de gènes actifs intéressés étant faible, puisqu'il s'agit d'un tissu différencié. La cytogénétique dans ce cas a eu pour mérite de mettre en évidence la différence existant entre les LMC, à aberration chromosomique spécifique, et les L.A. sans anomalie spécifique.

Le grand nombre de caryotypes différents observés dans les L.A. peut être expliqué de la façon suivante: on sait que les chromosomes, par l'ADN qu'ils contiennent, peuvent être considérés comme les dépositaires du message héréditaire. Lors du développement embryonnaire, la totalité de ce message sera nécessaire pour élaborer un organisme harmonieux. La plus petite anomalie du génome pourra avoir des répercussions importantes au niveau des tissus dont l'information génétique sera altérée. Au delà d'une certaine limite, vite franchie, les malformations seont telles qu'elles entraîneront la mort du foetus et l'expulsion avant terme. Dans les tissus différenciés, au contraire, une toute petite partie du génome, environ 2%, sera active (IZAWA et al., 1963): ce sera celle dont l'information est requise pour un fonctionnement normal de la cellule. Si tous ces gènes actifs étaient groupés sur le même chromosome, celui-ci aurait les dimensions d'un chromosome 18 de la nomenclature de DENVER (1960). On ne connaît pas encore le mode de répartition des gènes actifs sur les chromosomes: il est certain cependant qu'ils ne se trouvent pas tous sur le même chromosome mais sont répartis sur un nombre plus ou moins grand d'autosomes différents. Par conséquent, il est fort probable qu'une aberration chromosomique ne représente pas, au niveau d'un tissu déterminé, un déséquilibre génique fonctionnel aussi important que pourrait le laisser supposer l'anomalie morphologique du caryotype. Si l'on admet cette hypothèse, on peut admettre également les conséquences suivantes:

- d'une part, des anomalies morphologiques très importantes du caryotype, comme celles observées au niveau des cellules leucémiques, peuvent être bien tolérées par la cellule parcequ'elles ne représentent pas une altération grave du génome actif;
- d'autre part, des gènes à même fonction régulatrice peuvent se retrouver sur des chromosomes différents. Des aberrations chromosomiques à morphologie différente pourraient avoir la même signification, ce qui expliquerait que pour une même forme de leucémie plusieurs types d'aberrations puissent se rencontrer.

Les hypothèses exposées ci-dessus nous paraissent utiles dans la mesure où elles soulignent l'extrême prudence qui s'impose dans l'interprétation des faits observés. Par exemple, on peut espérer que le nombre de combina-

-sons génétiques très grand, observé au niveau des cellules leucémiques, nous permettra de fixer plus facilement la "carte des gènes" chez l'Homme, ce qui est le but final de la cytogénétique humaine (LEJEUNE, 1965). Mais on doit envisager l'inverse également: les aberrations chromosomiques ont été possibles parce qu'elles ne jouent aucun rôle dans la vie de la cellule; elles ne sont donc d'aucune utilité pour dresser la carte factorielle de l'Homme.

Ce qui apparaît comme un fait important pour la cellule leucémique, c'est la propriété de pouvoir se multiplier à un rythme qui semble échapper aux mécanismes régulateurs habituels. De nombreuses hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ce fait, n'impliquant pas une altération du caryotype. Une mutation somatique punctiforme, l'incorporation au génome cellulaire d'un génome ou d'une partie de génome viral, un changement de la régulation par les histones de l'activité de l'ADN peuvent être responsables sans modification visible des chromosomes. Des changements extranucléaires pourraient aussi intervenir dans l'acquisition de propriétés nouvelles. On peut rappeler à ce propos (GURDON, 1967) les expériences de transplantations de noyaux embryonnaires introduites par BRIGGS et KING (1959). Lors du développement embryonnaire de l'oeuf la durée de la période de synthèse S des noyaux varie: elle est de 2 heures environ après la fécondation, de 20 minutes au stade morula, pour s'allonger ultérieurement et atteindre 24 heures environ. Un noyau dont la période de synthèse est de 6 heures, comme celui d'une gastrula, implanté dans un ovule vierge énucléé, se verra imposer un rythme de synthèse propre aux noyaux des stades précédents.

L'information contenue dans ce cytoplasme, sous forme de ARN messager produit par les chromosomes maternels, est suffisante pour provoquer ce changement très important. Si l'on généralise cette notion, on peut imaginer que de l'ARN messager qui ne soit pas produit par le noyau cellulaire puisse imposer au noyau un rythme de synthèse anormal, qui pourrait à son tour déterminer une croissance de type leucémique, sans aucun changement du caryotype. Des réactions de type immunologique, comme celles évoquées pour les leucémies lymphoïdes chroniques, pourraient également être la cause d'une croissance anormale sans altération visible du caryotype.

La cytogénétique des leucémies aiguës est cependant intéressante, après que l'on ait situé exactement son rôle. Lorsqu'une aneuploïdie existe,

elle est un des témoins facilement repérables de la transformation leucémique. La persistance ou la disparition d'une lignée aberrante pourra être suivie chez un patient donné: on aura des indications concernant l'efficacité du traitement entrepris, et des corrélations utiles pourront être établies entre l'imagerie cytogénétique et l'évolution clinique de la maladie. Les cas "privilégiés", pour employer l'expression de LEJEUNE, permettront de reconstituer l'évolution clonale du caryotype et d'étudier certains mécanismes de la production des aneuploïdies. Enfin, il n'est pas impossible que, par un raffinement des techniques, l'on parvienne à mettre en évidence des variants communs non-décelés à l'heure actuelle.

IV. CONCLUSION.

De l'ensemble de nos résultats, les points suivants nous paraissent pouvoir être dégagés:

1. Une altération du caryotype n'est pas une condition nécessaire à la transformation leucémique d'une cellule du système hématopoïétique. Plus de la moitié des cas de leucémies aiguës étudiés, tant dans notre série que dans d'autres, ont un caryotype normal au niveau des cellules médullaires.
2. Il n'y a pas, à ce jour, d'aberration chromosomique spécifique d'une forme de L.A. Le caryotype varie de sujet à sujet pour une même forme clinique de leucémie.
3. Les aberrations chromosomiques des L.A. apparaissent comme un épiphénomène. Le fait qu'elles surviennent au niveau de tissus différenciés permet de supposer que l'altération génique active n'est pas aussi importante que ne le laisserait supposer l'analyse morphologique.
4. L'origine des aneuploïdies observées est difficile à déterminer. Nous avons proposé un mécanisme possible: l'ascension retardée vers un des pôles à l'anaphase pourrait faire inclure un chromosome avec son homologue dans une même cellule fille. L'ascension vers les pôles semble asynchrone et cet asynchronisme paraît lié à l'asynchronisme de la fin de synthèse d'ADN par les chromogomes. Les aneuploïdies intéressant plus particulièrement ces chromosomes "tardifs" seraient fréquemment observées (trisomies ou monosomies C et G). Les endoreduplications ne sont pas spécifiques des L.A., et

le nombre d'endoréduPLICATIONS n'augmente pas avec la durée du séjour in vitro hors du contrôle de l'organisme. Nous n'avons pas observé d'endoréduPLICATIONS sélectives d'un seul chromosome.

5. Les mosaïques constitutionnelles sont soit très stables, soit présentent une tendance à l'élimination de la lignée aneuploïde. Elles sont à ce point de vue à l'opposé des mosaïques leucémiques. On peut en conclure que ce qui détermine la prolifération anarchique des cellules leucémiques n'est pas étroitement dépendant de l'aneuploïdie. Nous avons pu le démontrer de la façon suivante: chez deux sujets, une lignée aneuploïde trisomique 18 a été mise en évidence. Chez l'un, leucémique, cette lignée avait envahi la moelle osseuse; chez l'autre, il s'agissait d'une lignée constitutionnelle sans aucune tendance à l'envahissement.
6. Il n'est pas impossible qu'avec un raffinement de nos techniques une aberration spécifique d'une forme de L.A. puisse être mise en évidence. Actuellement, il convient d'admettre que la transformation d'une cellule normale en cellule leucémique puisse se faire avec un caryotype normal. Les L.A. sont donc différentes à ce point de vue des LMC, et la cytogénétique est un moyen de le démontrer.

CHAPITRE V.

LES CHROMOSOMES DANS LES DESORDRES HEMATOLOGIQUES NON-LEUCEMIQUES.

I. INTRODUCTION:

Dans le cadre d'une étude concernant les leucémies, l'analyse des chromosomes de cellules médullaires de patients atteints d'affections hématologiques non-leucémiques se révèle importante. En effet, il est bien connu que certaines de ces maladies peuvent se transformer en leucémie (myélosclérose, maladie de Vaquez, etc.). Il a paru intéressant dans ces cas de rechercher une corrélation éventuelle entre l'apparition d'aneuploïdies et la transformation en leucémie.

1.-Désordre myéloprolifératifs.

On a l'habitude de grouper sous ce terme (DAMESHEK et GUNZ, 1958) les métaplasies myéloïdes, la polycythémie ou maladie de Vaquez (que nous considérerons plus en détail au paragraphe suivant), la myélosclérose et certaines thrombocytoses. Les chromosomes des désordres myéloprolifératifs ont été étudiés principalement pour démontrer l'absence du chromosome Ph^I et par là exclure le diagnostic de leucémie myéloïde chronique. NOWELL et HUNGERFORD (1962) ont observé les chromosomes de 13 malades présentant un syndrome myéloprolifératif ou d'autres "désordres myéloïdes atypiques". Dans 9 cas, ils n'ont pas décelé d'anomalies; les aberrations visibles dans les 4 autres cas étaient difficiles à interpréter à cause de traitements préalables au ^{32}P . Aucun des 13 cas ne montrait de chromosome Ph^I . Chez 16 malades atteints de prolifération importante de la lignée myéloïde avec le diagnostic clinique de myélofibrose, métaplasie myéloïde, polycythémie ou LMC "atypique", SANDBERG et al. (1962) n'observent pas de chromosome Ph^I . De même, dans une série de patients présentant une métaplasie myéloïde, avec une image sanguine et médullaire proche de la LMC, GOH et SWISHER (1964) n'ont trouvé aucune anomalie chromosomique. Ces résultats étayaient encore, s'il en était besoin, la notion de spécificité de chromosome de Philadelphie vis-à-vis de la LMC et démontrent l'intérêt des études cytogénétiques du point de vue du diagnostic différentiel (ELVES et ISRAELS, 1967).

Quelques rares cas de désordres myéloprolifératifs avec aberrations chromosomiques ont été rapportés. Chez un sujet présentant un "désordre myéloprolifératif inhabituel" (unusual myeloproliferative disorder) avec une thrombocytose élevée, HEATH et MOLONEY (1965) ont mis en évidence un Ph^I ; ces auteurs rappellent que TOUGH et al. (1963) et KEMP et al. (1964) ont fait des observations analogues. KEMP et al. (1964) ont du reste observé une transformation en LMC de la maladie myéloproliférative de leur patient. Par analogie, on peut se demander si, dans ces cas de désordres myéloprolifératifs, l'apparition du Ph^I n'est pas le signe précurseur d'une transformation en LMC. Chez une patiente de 69 ans avec une métaplasie myéloïde et une "leucémie possible" (diagnostic de leucémie effectué lors de l'autopsie mais non lors du vivant de la patiente) SANDBERG et al. (1964) notent un chromosome surnuméraire du groupe C; chez 19 autres sujets présentant un désordre myéloprolifératif, les mêmes auteurs ne constatent aucune anomalie chromosomique.

En résumé, les chromosomes des désordres myéloprolifératifs sont normaux sauf quelques rares exceptions.

2)-Polycythémie vraie ou maladie de Vaquez.

Les études cytogénétiques entreprises chez des patients présentant une polycythémie vraie ou maladie de Vaquez se sont montrées en général normales. KEMP et al. (1961), BRAUNSTEINER et al. (1964), McDIARMID (1965), n'ont observé aucune anomalie sauf si la maladie du sujet examiné s'était transformée en leucémie aiguë. KAY et al. (1966) ont étudié les chromosomes de 43 patients atteints de polycythémie: la proportion de cellules porteuses d'anomalies chromosomiques aspécifiques, telles que cassures, fragments acentriques et chromosomes dicentriques, est plus grande dans cette série que chez des sujets normaux. En outre, 6 des 43 patients montraient un chromosome F plus petit que les autres du même groupe; toutefois, on ne peut pas considérer cette anomalie, d'après les auteurs, comme étant spécifique de la polycythémie vraie. Chez 10 patients différents, nous n'avons trouvé aucune anomalie, sauf chez ceux dont la maladie s'était transformée soit en LMC, soit en L.A. (KOULISCHER et al., 1967). LEVIN et al. (1967) observent, chez 2 frères tous deux polycythémiques, un chromosome semblable au Ph^I , sans LMC au moment de l'analyse.

D'une façon générale, pour l'ensemble des polycythémiques, l'apparition d'une lignée aberrante semble toujours annoncer la transformation en leucémie aiguë; si cette lignée aberrante comporte un Ph^I , il pourrait s'agir du premier signe d'une transformation en LMC, précédant la symptomatologie clinique de plusieurs mois ou même de plusieurs années. La présence d'aberrations chromosomiques aspécifiques, du type "instable", dans un certain nombre de mitoses, et celle d'un "petit chromosome F", n'ont pas pour le moment de signification spécifique, et pourraient être dues au traitement par le ^{32}P .

3.- Anémies d'origines diverses.

Certaines anémies peuvent être un symptôme associé à une transformation maligne de la moelle osseuse: c'est pourquoi les chromosomes de ces états ont été étudiés. ROWLEY et al. (1966) qualifient "d'état préleucémique" trois formes différentes d'anémie: l'anémie aplastique, l'anémie sidéroachrestique et l'anémie avec thrombocythémie "idiopathique". Chez 3 patients présentant chacun l'un de ces 3 désordres, les auteurs ont noté la présence de 2 chromosomes C surnuméraires; il n'y avait pas de leucémie du point de vue clinique, et l'état de ces malades n'avait pas évolué depuis 2 ans. LEEKSMA et al. (1965) ont isolé un état dit de "leucémie prémyéloïde": outre l'anémie de type sidéroblastique ou réfractaire (acquise), ils notent une augmentation des cellules plasmiques dans la moelle osseuse, une hypogammaglobulinémie et la présence de paraprotéines dans le sérum et dans les urines. Les sujets présentant cette entité morbide, le plus souvent âgés, peuvent présenter des lignées cellulaires anormales à 47 chromosomes avec un C surnuméraire pouvant évoquer du point de vue cytogénétique, mais non du point de vue clinique, la transformation en leucémie aiguë. SANDBERG et al. (1964) notent la même anomalie chromosomique chez 5 sujets âgés dont la symptomatologie est proche de celle décrite par LEEKSMA. Dans les anémies toxiques induites par le benzène (VIGLIANI et SAITA, 1964; FORNI et MOREO, 1967) des aneuploïdies ont été décrites simultanément à l'apparition clinique d'une leucémie aiguë. Rappelons que des aberrations chromosomiques "instables" ont été décrites chez des sujets ayant manipulé du benzène (COURT BROWN et al., 1965), mais ne présentant pas d'anémie.

D'autres formes d'anémie, qui ne sont pas décrites comme préleucémiques ont été étudiées du point de vue cytogénétique, avec la découverte fortuite d'aberrations chromosomiques. ASTALDI et al. (1962) rapportent un cas de thalassémie et un cas d'anémie pernicieuse avec aneuploïdies aspécifiques. Chez des malades déficients en acide folique ou vitamine B₁₂, HEATH (1966) note dans plusieurs mitoses des anomalies de structure des chromosomes, telles que cassures ou "étalement de la région centromérique" (centromere spreading) identique à celui que nous avons observé dans le cas n° 37 de notre série de patients atteints de L.A.: dans 14 cas, 0,7 à 8,3% des mitoses examinées présentaient cette image particulière. Dans son travail, HEATH signale que NOWELL avait également remarqué cet étalement centromérique dans un cas d'anémie pernicieuse. Comme nous l'avons déjà mentionné, SANDBERG (1966) a fait la même observation chez un malade atteint de leucémie myéloblastique aiguë après traitement à l'arabinosyl-cytosine.

Le lien qui pourrait exister entre une forme d'anémie et sa transformation en leucémie peut se justifier du point de vue cytogénétique de la façon suivante: l'étude des LMC a montré que le Ph^I existait au niveau des cellules souches des lignées blanches, rouge, ~~rouge~~ et plaquettaire, suggérant par là une origine commune à ces trois types de cellules sanguines. On peut donc penser que certaines formes d'anémie, se traduisant cliniquement par l'atteinte de la lignée rouge, représentent un désordre plus profond intéressant les cellules "ancestrales" aux 3 lignées et pouvant se manifester ultérieurement par une leucémie caractéristique de la lignée blanche.

4.- Maladie de Waldenström et autres dysprotéïnémies.

Les lymphocytes d'un certain nombre de patients présentant la maladie de Waldenström ont montré, dans un nombre variable de mitoses (de 2 à 50%) un grand chromosome surnuméraire de la taille de ceux du groupe A, souvent désigné comme chromosome W (BOTTURA et al., 1961; GERMAN et al., 1961; BENIRSCHKE et al., 1962; PFEIFFER et al., 1963; HENI et SIEBNER, 1963; FERGUSON et MACKAY, 1963; de GROUCHY et al., 1965). On a cru que les lymphocytes porteurs du chromosome anormal pourraient être responsables de la sécrétion de la macroglobuline. Mais on a pu montrer un chromosome semblable chez des sujets présentant une forme de gammopathie différente de celle de la maladie

de Waldenström, sans macroglobuline (HOUSTON et al., 1967), ou chez des sujets sains appartenant à une famille comprenant des individus avec une macroglobulinémie (BROWN et al., 1967), chez un patient atteint de malformations bénignes des extrémités (HAUSMAN-HAGEMEIER et al., 1966), chez une personne de 86 ans asymptomatique (SCHMID et HATFIELD, 1962), chez la mère d'un enfant trisomique 21 dont les gamma-globulines étaient légèrement élevées (ELVES et ISRAELS, 1963). D'autre part, SPENGLER et al. (1966) ont observé chez une patiente avec macroglobuline un autosome surnuméraire de la taille de ceux du groupe F tandis que sa soeur jumelle monozygote avait un caryotype normal et n'était pas malade. La signification du chromosome surnuméraire dans la maladie de Waldenström n'apparaît pas encore clairement. Toutefois, sans pouvoir encore établir une corrélation entre la sécrétion de protéine normale et l'aneuploïdie, la présence d'un chromosome surnuméraire serait à rapprocher de la tendance fréquente des macroglobulinémies à se transformer en désordre malin du type lymphome: une fois de plus aneuploïdie et malignité seraient associés.

Dans un cas de myélomatose, LEWIS et al. (1963) notent la présence côte à côte d'une lignée normale à 46 chromosomes et d'une lignée pathologique à 53 chromosomes avec des surnuméraires dans les groupes A,B,D,F et G.

5.- Anomalie de Pelger-Huet.

Cette anomalie des polynucléaires, transmise par voie héréditaire, n'a jamais été considérée comme étant un état préleucémique. Des études cytogénétiques ont néanmoins été entreprises, à la suite de considérations d'ordre théorique. Suivant l'hypothèse de travail de TOUGH et al. (1961), un ou plusieurs gènes intéressant la leucopoïèse pourraient se trouver sur le chromosome 21. Dès lors, il paraissait légitime d'étudier les chromosomes de sujets présentant une anomalie congénitale des polynucléaires, et plus particulièrement d'observer les chromosomes de la paire 21. SIEBNER et al. (1963) ont observé chez un frère et une soeur présentant l'anomalie de PELGER-HUET une lignée normale à 46 chromosomes au niveau de la moelle osseuse et des lymphocytes, et une lignée à 47 chromosomes avec un G surnuméraire. Ces données n'ont pas été confirmées.

II.- OBSERVATIONS CYTOGENETIQUES CONCERNANT LES DESORDRES HEMATOLOGIQUES NON-LEUCEMIQUES.

Nous avons étudié une série de 40 patients présentant des désordres hématologiques divers, dans le but d'étudier la spécificité du Ph^{I} et la corrélation éventuelle entre l'apparition d'une lignée aneuploïde et la transformation de la maladie en leucémie.

1.- MATERIEL.

Les patients étudiés présentaient l'un des symptômes, ou plusieurs des symptômes, suivants: cellules jeunes de la lignée blanche dans le sang circulant (promyélocytes et myélocytes), augmentation inexpliquée de la leucocytose avec une image médullaire normale, thrombocytose importante, anémie grave d'origine inconnue, ou bien leucopénie ou même aplasie médullaire.

Les données cliniques détaillées concernant les patients atteints de maladie de Vaquez ont été précisées ailleurs (KOULISCHER et al., 1967).

Nous ne citerons ici que 2 observations qui nous paraissent particulièrement caractéristiques. La première concerne une petite fille de 2 ans (Dr. HARIGA), présentant, le 29-6-65, sur un tableau de pyélonéphrite grave avec complications nerveuses, 19.900 globules blancs dans le sang périphérique, dont 67% de neutrophiles, 12% de métamyélocytes, 5% de myélocytes, 4% de promyélocytes et 3% de myéloblastes. Le 1-7-65, la moelle osseuse contient 4;5% de myéloblastes, 31,5% de promyélocytes et 20% de myélocytes. L'étude des chromosomes est entreprise à ce moment, dans le but d'éliminer le diagnostic de LMC; on notait l'absence de réaction ganglionnaire généralisée et la rate n'était pas augmentée de volume. Les chromosomes furent normaux (cas 72, Tableau XXIV). L'absence de chromosome Ph^{I} faisait exclure le diagnostic de LMC. Dès le 8-7-65, la formule sanguine tend à revenir à la normale, orientant le diagnostic vers celui de réaction myéloïde sur pyélonéphrite. La deuxième observation concerne un malade de 75 ans (Dr. CAUCHIE), présentant une forte splénomégalie, des formes jeunes de la série rouge et de la série blanche dans le sang circulant, une hyperplaquettose, une anémie normochrome. Le taux des phosphatases alcalines des leucocytes est normal. Les chromosomes sont normaux. L'évolution ultérieure de l'état clinique se fait vers la

guérison, après un traitement au fer et à la testostérone.

Beaucoup d'observations cliniques sont semblables à celles-ci et l'analyse cytogénétique a été entreprise surtout pour éliminer de façon formelle le diagnostic de LMC.

Six analyses ont été faites à partir de sang périphérique de sujets atteints de macroglobulinémie de Waldenström; une de ces analyses toutefois concernait un sujet asymptomatique, fils d'une macroglobulinémique, présentant lui-même dans le sang une macroglobuline.

Enfin, 2 analyses concernent 2 sujets non-apparentés porteurs de l'anomalie de Pelger-Huet.

2.- RESULTATS.

Les résultats ont été répartis en 4 tableaux: maladies de Vaquez, désordres hématologiques autres que la maladie de Vaquez (le diagnostic clinique est indiqué pour chaque cas), maladie de Waldenström et anomalie de Pelger-Huet.

a)-Maladie de Vaquez.

Dix patients différents ont pu être étudiés du point de vue cytogénétique à 12 reprises. Les numérations chromosomiques sont indiquées au tableau XXIII. Elles seront brièvement commentées, ayant déjà fait l'objet d'une communication (KOULISCHER et al., 1967). Les renseignements cliniques concernant les autres malades nous ont été communiqués personnellement (nous remercions ici les Docteurs CAUCHIE, DRUEZ, HARIGA, KENIS, LUSTMAN et MAURUS pour leur amabilité).

TABLEAU XXIII.

n°	Date	Tech.	Numérations chromosomiques							Remarques.	
			43	44	45	46	47	48	49		Total
6	2-65	SQ	-	-	3	24	-	-	-	27	
7	3-65	SQ	-	-	-	I4	I	I	-	16	
8	3-65	IM	-	-	-	5	I	-	-	6	
	8-65	IM	-	-	-	33	3	-	-	36	
9	3-65	IM	-	-	-	9	-	-	-	9	
0	12-65	IM	-	I	2	46	I	-	-	50	
I	4-66	IM	-	-	2	31	I	-	-	34	
2	6-66	IM	-	-	-	59	I	-	-	60	Cassures chromatidiennes. Ph ^I ?
	4-67	IM	-	-	I	48	I	-	-	50	Disparition des anomalies.
3	8-65	IM	-	I	7	40	2	-	-	50	LMC Ph ^I + au moment de l'analyse.
4	3-65	IM	2	I2	I	7	2	-	-	24	L.A. lors de l'analyse.
5	8-65	IM	-	-	-	I8	I	-	I	20	

Numérations chromosomiques effectuées chez des patients présentant une maladie de Vaquez.

Sept patients n'ont montré aucune anomalie du caryotype. Trois autres ont montré les aberrations suivantes:

-cas n° 62: lors d'une première analyse, cette patiente de 75 ans, non-traitée et dont le diagnostic venait d'être posé, a montré au niveau de 15% de ses mitoses des cassures chromatidiennes. En outre, dans quelques mitoses un chromosome identique au Ph^I était observé. Une analyse 10 mois plus tard a montré la disparition de ces anomalies; la patiente avait été traitée au ³²P. Celui-ci aurait donc favorisé la disparition des cellules anormales. En outre, le chromosome semblable au Ph^I n'a plus été retrouvé.

-cas n° 63: ce patient, suivi depuis 5 ans pour maladie de Vaquez, a vu son affection se transformer en LMC. Au moment de l'analyse, celle-ci était caractéristique. Confirmant le diagnostic clinique, l'analyse des chromosomes permettait de mettre en évidence au niveau de 72% des mitoses examinées un chromosome Ph^I . Les 7 mitoses à 45 chromosomes n'ont pas montré d'anomalie constante du caryotype: on ne peut donc parler de lignée à leur propos.

-cas n° 64: les numérations ont mis en évidence 2 nombres modaux. Les cellules à 46 chromosomes avaient un caryotype normal. Dans celles à 44 chromosomes, on remarquait l'absence d'un chromosome du groupe A et d'un autre du groupe C: il s'agissait donc d'une lignée hypodiploïde. Au moment de l'analyse, la maladie de Vaquez, qui évoluait depuis 8 ans, s'était transformée en leucémie aiguë.

b) -Désordres myéloprolifératifs autres que la maladie de Vaquez, et états anémiques.

L'analyse des mitoses de la moelle osseuse de 23 patients, atteints de désordres myéloprolifératifs ou d'altérations de la formule sanguine intéressant le nombre de globules blancs ou rouges, a été effectuée. Les numérations, ainsi que le diagnostic clinique ayant motivé l'analyse cytogénétique, se trouvent au tableau XXIV. L'ensemble des résultats est normal: 88,9% des mitoses ont 46 chromosomes, 5,6% sont hyperdiploïdes et 5,5% sont hypodiploïdes. Les cas ayant montré le plus grand nombre de mitoses s'écartant du nombre modal normal (mais sans signification statistique) sont ceux dont le diagnostic clinique était de réaction leucémoïde ou de "leucocytose inexpliquée". Aucun de ces malades n'a développé de leucémie depuis le moment de l'analyse; le recul actuel est de 10 à 40 mois suivant les cas.

Les numérations de certains patients seront commentées brièvement:

-cas n° 67: métaplasie myéloïde. Six mitoses sur 21 ayant été analysées ont montré 47 chromosomes. Les caryotypes ont mis en évidence

2 fois la présence d'un chromosome C surnuméraire, 2 fois celle d'un D surnuméraire et la mitose à 48 chromosomes montrait 2 chromosomes du groupe D surnuméraires. Cette "instabilité" apparente ne correspondait pas, du point de vue clinique, à une transformation maligne de la maladie. D'autre part, les critères que nous avons utilisés ne nous permettent pas d'affirmer la présence d'une lignée anormale.

-cas n° 73: réaction leucémoïde. Cinq mitoses sur 60 ont 45 chromosomes. Les caryotypes ne permettent toutefois pas de mettre en évidence une lignée particulière, le chromosome manquant variant de mitose à mitose.

-cas n° 78: leucocytose inexpiquée. Quatre mitoses sur 50 ont 45 chromosomes. Comme pour le cas n° 73, l'analyse des caryotypes ne permet pas de mettre en évidence une aberration constante.

-cas n° 87: aplasie médullaire et anémie rebelle à tout traitement. Les agents thérapeutiques utilisés ont été nombreux et pourraient être responsables des anomalies constatées, qui sont essentiellement des cassures chromatidiennes, des chromosomes surnuméraires dans les groupes D ou G, et dans une mitose, un chromosome E en anneau.

TABLEAU XXIV.

n°	Numérations chromosomiques							Diagnostic clinique.
	44	45	46	47	48	49	Total	
66	-	I	27	2	-	-	30	Métablasie myéloïde agnogénique.
67	-	-	14	6	I	-	21	Métablasie myéloïde.
68	I	-	39	I	-	-	41	Métablasie myéloïde (rate +++).
69	-	-	47	2	I	-	50	Syndrôme myéloprolifératif (myélosclérose).
70	-	-	19	2	-	I	22	Syndrôme myéloprolifératif.
71	I	I	43	-	-	-	45	Myélofibrose.
72	I	-	25	-	I	-	27	Réaction myéloïde sur pyélonéphrite.
73	2	5	50	I	-	I	59	Réaction "leucémoïde".
74	-	-	24	2	I	-	27	Réaction "leucémoïde".
75	-	-	12	-	-	-	12	Leucocytose inexpliquée (12.000 blancs)
76	I	5	26	-	-	-	32	Leucocytose inexpliquée (15.000 blancs)
77	I	2	25	2	-	-	30	Leucocytose inexpliquée.
78	I	-	45	4	-	-	50	Leucocytose inexpliquée.
79	I	3	32	I	-	-	37	Eosinophilie.
80	-	I	18	I	-	-	20	Thrombocytose.
81	I	2	34	I	I	-	39	Polyglobulie ($6,10^6$ rouges) sans Vaquez.
82	-	-	38	2	-	-	40	Anémie cryptogénique.
83	I	-	21	-	I	-	23	Anémie. Moelle riche en cellules souches.
84	-	I	26	I	I	-	29	Anémie.
85	-	2	26	-	-	-	29	Anémie aplastique d'origine inconnue.
86	-	-	18	-	-	-	18	Anémie grave.
87	3	I	42	4	-	-	50	Aplasie médullaire.
88	-	3	44	2	-	I	50	Leucopénie.

Numérations chromosomiques effectuées chez des patients atteints de désordres myéloprolifératifs autres que la maladie de Vaquez et d'anémies de types divers.

c)- Macroglobulinémie de Waldenström.

Les chromosomes de 6 patients présentant une macroglobuline dans leur sang périphérique ont été étudiés. Cinq de ces patients (cas n° 89 à 93 du tableau XXV) montraient la symptomatologie clinique caractéristique de la macroglobulinémie de Waldenström. Le 6ème, quoique présentant une macroglobulinémie, était en bonne santé au moment de l'analyse. Il est le fils de la patiente n° 93, et la protéine anormale a été décelée lors d'un examen systématique de la famille (LUSTMAN et al., 1968).

Chez un malade (n° 89) le sang et la moelle osseuse ont été analysés chez les autres seul le sang périphérique a été utilisé. Les numérations sont portées au tableau XXV. Deux patient (n° 92 et 93) ont montré un grand autosom

TABEAU XXV.

n°	Techn.	Numérations chromosomiques						Remarques.
		44	45	46	47	48	Total	
89	IM	I	2	57	-	-	60	
	SG	-	I	9	-	-	10	
90	SG	-	-	40	-	-	40	
91	SG	-	I	47	2	-	50	
92	SG	-	-	54	6	-	60	Grand autosome surnuméraire dans les cellules à 47 chromosomes.
93	SG	-	I	31	4	-	37	"
94	SG	I	47	2	-	-	50	Translocation du type D/D.

Numérations effectuées chez des patients présentant une macroglobuline dans le sang périphérique.

Abbréviations: IM: incubation de moelle osseuse.

SG: culture de sang périphérique.

surnuméraire dans les mitoses à 47 chromosomes, de la taille d'un chromosome du groupe A, l'un dans 10% des mitoses examinées (cas n° 92, PETIT et al., 1967), l'autre dans 10% également (fig. 9a). Le caryotype des patients n° 89

à 91 était normal. Les mitoses du patient n° 94 ont montré un nombre modal de 45 chromosomes (fig. 9b); on notait l'absence de 2 chromosomes du groupe D, et la présence d'un chromosome du groupe C surnuméraire: celui-ci a été considéré comme le résultat d'une translocation entre les 2 chromosomes D manquants. Nous n'avons pas examiné les chromosomes provenant de cellules d'un autre tissu. Néanmoins, nous pensons qu'il s'agit d'une aberration chromosomique constitutionnelle. Le patient est père de 2 petites filles normales, ce qui semble indiquer que la translocation ne concerne pas les 2 homologues d'une même paire.

d)- Anomalie de Pelger-Huet.

Les deux patients étudiés n'ont montré aucune anomalie du caryotype au niveau des lymphocytes du sang périphérique (Tableau XXVI).

TABLEAU XXVI.

n°	Numérations chromosomiques.				
	45	46	47	48	Total.
95	2	37	-	I	40
96	I	2I	-	-	22

Numérations effectuées sur les lymphocytes de
2 sujets présentant l'anomalie de Pelger-Huet.

III.-DISCUSSION.

Aucune anomalie spécifique n'a pu être mise en évidence dans le groupe varié de désordres du système hématopoïétique que nous avons étudié. Nos résultats semblent indiquer que les aneuploïdies sont exceptionnelles en dehors des leucémies. Les remarques suivantes peuvent être faites:

1. Maladie de Vaquez:

Dans l'ensemble les résultats sont normaux. Nous n'avons pas observé d'anomalie des chromosomes du groupe F, comme KAY et al. (1966). Lorsque

nous avons constaté la présence d'une lignée aneuploïde, dans 2 cas la transformation leucémique était évidente: l'un était une LMC caractéristique, l'autre une leucémie aiguë de type myéloblastique. Dans un 3ème cas, nous avons observé, outre des anomalies du type "instable", la présence d'un chromosome identique au Ph^I , en l'absence de toute symptomatologie de LMC. La maladie n'a pas évolué vers la LMC, et les anomalies n'ont plus été retrouvées lors d'une analyse 10 mois plus tard. Il pouvait s'agir d'un des rares cas de polycythémie avec Ph^I sans LMC (LEVIN et al., 1967). On peut supposer soit que la délétion n'intéresse pas un chromosome 21 soit, suivant notre hypothèse, que le gène récessif responsable de la LMC ne se trouvait pas sur le chromosome intact. Il est curieux de constater la disparition des mitoses anormales après un traitement au phosphore radioactif: ce traitement a la réputation d'exercer une action délétère sur les chromosomes. Il semble qu'il ait eu plutôt pour effet dans ce cas-ci d'éliminer les cellules aneuploïdes.

2.- Désordres myéloprolifératifs autres que la maladie de Vaquez et anémies de types divers.

Aucune anomalie spécifique n'a pu être relevée dans ce groupe.

L'absence de chromosomes Ph^I a toujours confirmé l'absence de transformation en LMC. Quelques rares cas de métaplasie myéloïde avec Ph^I (FORRESTER et LOURO, 1966; NICOARA et al., 1967), ont été rapportés. En fonction de la cytogénétique et en tenant compte de ces cas, NICOARA et al. (1967) ont proposé la classification suivante des désordres myéloprolifératif

a)-LMC: Ph^I positive: forme typique

Ph^I négative: formes atypiques.

b)-Métaplasie myéloïde et myélosclérose: sans Ph^I : formes primitives
formes secondaires
avec Ph^I : forme secondaire à partir d'une LMC ou transition vers une LMC.

c)-Polycythémie: sans Ph^I : avec caryotype normal: forme typique
avec anomalies chromosomiques: formes atypiques
et altérations dues au traitement (RX , ^{32}P , etc)
avec Ph^I : forme de transition vers la LMC.

- d)-Thrombocytose essentielle: sans Ph^I : forme typique
avec Ph^I : forme de transition vers la
LMC.

La LMC pouvant elle-même évoluer vers un autre désordre myélo-prolifératif (GOH et al., 1964), les cas avec Ph^I à un certain moment, puis ne montrant plus ce chromosome, pourraient se ranger dans la catégorie (très rare) des LMC transformées.

La tentative de NICOARA est peut-être criticable, mais elle montre comment appliquer à la clinique les données cytogénétiques récentes.

Nous avons observé un petit nombre de mitoses avec anomalies chromosomiques dans notre série. Jamais cependant nous n'avons mis en évidence de lignée pathologique. Ces mitoses aberrantes ne semblent pas avoir une grosse importance dans l'évolution de la maladie.

3.-Macroglobulinémie de Waldenström.

Deux patients sur les 5 présentant cette affection ont montré un grand chromosome surnuméraire ressemblant au chromosome W décrit par certains chercheurs. La présence de ce surnuméraire n'est pas présente dans tous les cas (TANZER et al., 1967; BROUSTET et al., 1967); de plus la spécificité de cette anomalie n'apparaît pas clairement, comme nous l'avons remarqué plus haut. Aussi, c'est à un autre point de vue que nos résultats nous paraissent intéressants.

Nous avons rappelé qu'ELVES et ISRAELS (1963) avaient mis en évidence un grand surnuméraire chez la mère d'un trisomique 21. Cette femme présentait un taux de gamma-globulines légèrement élevé. Il nous semble que notre observation concernant une mère avec macroglobuline et surnuméraire et son fils porteur d'une translocation constitutionnelle, se rapproche de celle des auteurs anglais. Pour FIALKOW (1964, 1967) il pourrait exister une

corrélation entre le taux d'anticorps antithyroïdiens et la fréquence des non-disjonctions méiotiques chez l'Homme. Pourrait-on étendre cette notion à d'autres altérations de l'équilibre protéique sanguin? Par exemple, la présence d'une macroglobuline dans le sang altère-t-elle les mécanismes normaux de la méiose? Malheureusement, dans notre série, aucun des autres patients étudiés n'a eu d'enfants. Des observations plus nombreuses seront nécessaires pour étudier cette hypothèse, d'autant plus que dans notre cas la naissance de l'enfant porteur d'une aberration chromosomique a eu lieu trente ans auparavant, alors que la mère était en bonne santé et que la nature de ses globulines sanguines nous était inconnue.

4.-Anomalie de Pelger-Huet.

Nous^{n'}avons pu confirmer les données de SIEBNER et al. (1963): les 2 cas que nous avons eu l'occasion d'étudier étaient en effet normaux du point de vue cytogénétique. Une fois de plus, il s'avère difficile de démontrer une relation directe entre le chromosome 2I et la leucop^oxièse.

V. CONCLUSION.

L'étude des chromosomes de 41 cas de désordres hématologiques divers non-leucémiques nous permet de formuler les conclusions suivantes:

- 1.- Des cellules aberrantes peuvent exister en petit nombre dans la moelle osseuse de sujets présentant des désordres hématologiques non-leucémiques (désordres myéloprolifératifs, altérations du nombre de globules rouges ou blancs dans le sang circulant). Elles ne paraissent pas, après un recul de 10 à 40 mois, jouer un rôle quelconque dans l'évolution de la maladie ou dans une transformation en leucémie
- 2.- Des lignées aberrantes ont indiqué, dans notre série et notamment dans le groupe de maladies de Vaquez, une transformation leucémique de l'affection. Dans un cas de transformation en LMC, le Ph^I a été mis en évidence. Un cas cependant a montré un chromosome Ph^I; lors d'une analyse ultérieure, ce chromosome avait disparu: ce serait un cas exceptionnel (le 3ème publié à l'heure actuelle) de maladie de Vaquez avec Ph^I ne se transformant pas ultérieurement en LMC.

- 3.- Sauf notre cas "exceptionnel", le Ph^{I} n'a pas été mis en évidence dans les désordres myéloprolifératifs dont la symptomatologie clinique peut être proche de la LMC. La notion de spécificité du Ph^{I} vis-à-vis de la LMC semble donc réelle, et l'intérêt des recherches cytogénétiques en clinique évident.
- 4.- D'après la théorie de FIALKOW, une corrélation pourrait exister entre un déséquilibre protéique sanguin intéressant les gamma-globulines et la genèse de certaines aberrations chromosomiques constitutionnelles par perturbation de la méiose. D'après nos données, il serait intéressant de vérifier si cette théorie, qui concerne les auto-anticorps, ne pourrait pas être étendue aux altérations du taux des globulines en général.
- 5.- L'aberration chromosomique de la maladie de Waldenström (présence d'un grand autosome surnuméraire) n'est pas suffisamment spécifique pour permettre de poser un diagnostic en utilisant l'analyse cytogénétique.

CHAPITRE VI.

CONCLUSION: SIGNIFICATION DES ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES DES LEUCEMIES HUMAINES.

=====

L'hypothèse suivant laquelle un ou plusieurs facteurs d'ordre génétique pourraient jouer un rôle dans la genèse des cancers, que ce soit par transmission héréditaire d'un ou plusieurs gènes mutants ou par altération du génome de cellule cancéreuse, est déjà ancienne (KOLLER, 1967). La mise en évidence du chromosome Ph^I dans la leucémie myéloïde chronique apportait un argument important en faveur de la théorie de BOVERI. Depuis 1960, de nombreuses recherches ont été consacrées aux chromosomes des leucémies, des désordres hématologiques et des cancers en général. Nous tenterons de dégager la signification de huit années de travaux concernant les chromosomes des leucémies humaines.

I. Le chromosome de Philadelphie.

Il nous paraît logique de commencer ce "bilan" de la cytogénétique des leucémies humaines par la découverte la plus significative: le chromosome Ph^I .

1. Spécificité du Ph^I .

Nous avons montré précédemment que l'on peut considérer la présence du Ph^I comme spécifique de la LMC. Jusqu'à présent, aucun autre désordre hématologique, malin ou non, n'a montré de chromosome marqueur semblable. Certains marqueurs ont pourtant été décrits: un grand autosome surnuméraire, le chromosome "W" (BENIRSCHKE et al., 1962), dans une certaine proportion de mitoses provenant de lymphocytes de patients atteints de macroglobulinémie de Waldenström (BOTTURA et al., 1961); un chromosome G, le chromosome Ch^I (pour Gristchurch, Nouvelle-Zélande), avec une délétion des bras courts dans la leucémie lymphoïde chronique (GUNZ et al., 1962); un chromosome 18, le chromosome M^I (Melbourne), avec délétion des bras courts dans la maladie de Hodgkin (BAIKIE et al., 1964); un chromosome F avec délétion dans certains cas de maladie de Vaquez (KAY et al., 1966). La spécificité de ces chromosomes marqueurs n'a jamais été confirmée et l'on peut dire que le "cas" du Ph^I est encore unique. Comme on l'a souligné

plusieurs fois, une délétion de l'importance de celle du Ph^{I} pourrait exister, mais passer inaperçue, au niveau d'un autre chromosome. On ne peut donc exclure la présence de marqueurs dans d'autres affections hématologiques que la LMC. Une des premières conclusions qui s'impose est qu'il convient d'améliorer les techniques actuelles d'analyse des chromosomes pour progresser dans la voie ouverte par la mise en évidence du Ph^{I} .

2. Chromosome Ph^{I} et carte de gènes, ou carte factorielle, chez l'Homme.

Le but recherché en génétique humaine est certes d'établir la carte des gènes. La cytogénétique se présente, par analogie avec les travaux effectués chez d'autres espèces, comme un moyen possible d'y arriver. Plus particulièrement, les leucémies, par la diversité de caryotypes qu'elles permettent d'observer, sont intéressantes puisqu'elles offrent un nombre plus grand de combinaisons génétiques que n'importe quel autre état pathologique (LEJEUNE, 1965).

Nous avons rappelé l'hypothèse de travail de TOUGH et al. (1961) attribuant la localisation d'un ou plusieurs gènes intéressant la leucopie au niveau du chromosome 2I. La biochimie a été utilisée pour étudier cette hypothèse. On sait (VALENTINE, 1951) que la teneur en phosphatases alcaline des leucocytes est très abaissée dans la LMC. Chez les trisomiques 2I, par la technique semi-quantitative de KAPLOW (1957), on a montré que la teneur en phosphatases alcalines était augmentée dans les proportions de 3/2 par rapport à la normale (ALTER et al., 1962; TRUBOWITZ et al., 1962). Il était dès lors tentant de supposer une relation directe gène-enzyme (voir page 15). MELLMAN et al. (1964) ont noté chez les trisomiques 2I, outre l'élévation du taux de phosphatases alcalines au niveau des polynucléaires, une augmentation du taux de glucose-6-phosphate-déhydrogénase, dont le gène se trouve sur le chromosome X: ces auteurs en ont conclu que les techniques utilisées ne permettaient pas d'affirmer cette relation gène-enzyme. De même, BRANDT et al. (1963) trouvent une augmenta-

-tion du taux de galactose-1-phosphate-uridyl-transférase chez les trisomiques 21, confirmée par MELLMAN et al. (1964); mais WANG et DESFORGES (1967) ne trouvent pas de différence pour cette enzyme entre des sujets porteurs d'un Ph^I et des sujets témoins normaux, ce qui rend toute localisation génétique aléatoire. Dans l'état actuel de nos connaissances, il paraît difficile de localiser des gènes au niveau des autosomes. On comprend néanmoins que pareille entreprise soit tentée par ceux qui possèdent les techniques adéquates; la cytogénétique apparaît alors comme un complément à d'autres techniques visant toutes à connaître un jour la carte des gènes chez l'Homme.

Du point de vue théorique, il convient d'utiliser pour dresser la carte factorielle toutes les délétions connues (y compris bien entendu le Ph^I). Il est évident toutefois qu'il convient encore toujours d'envisager que le Ph^I ne soit pas la résultante d'une délétion, mais bien d'une translocation, comme l'avaient supposé dès la première publication NOWEEL et HUNGERFORD (1960). Dans ce cas, une altération enzymatique pourrait aussi être le fruit d'un effet de position des gènes, et non d'une perte pure et simple, ce qui modifierait certaines interprétations déjà proposées.

3. La LMC est-elle due à l'expression de gènes mutants récessifs?

ELMORE et al. (1966) ont décrit, chez un enfant, un syndrome polymalformatif associé à une délétion des bras courts d'un chromosome 22. La même anomalie chromosomique se retrouvait chez le père et deux des trois frères et soeurs du patient; ces derniers sujets étaient tous normaux. Les auteurs ont alors proposé, comme explication des malformations chez le propositus, une hémizygotie pour un ou plusieurs gènes anormaux, récessifs, mais pouvant s'exprimer suite à la délétion du segment porteur des allèles normaux. Nous nous sommes inspirés de cet exemple pour proposer notre explication "délétion chromosomique/mutation ponctuelle" comme cause de la LMC (pages 39-41). Nous avons vu les conséquences théoriques entraînées par cette hypothèse: l'existence de sujets porteurs de gènes récessifs déterminant la LMC. RANDALL et al. (1965) ont décrit un syndrome familial,

héréditaire, transmis suivant un mode mendélien récessif, s'accompagnant d'un tableau identique à celui de la LMC, apparaissant très tôt au cours de la vie (dans les 2 premières années). Ultérieurement, l'évolution se fait de 2 façons différentes: il y a soit une transformation vers un tableau de leucémie aiguë et un décès rapide (3 cas sur 9 décrits), soit une stabilité ou même un amendement de la symptomatologie clinique. Le recul est de 10 à 12 ans. Les auteurs ont proposé le terme de "maladie myéloproliférative familiale" pour désigner ce nouvel état. Ils précisent qu'il s'agit "d'un nouveau syndrome ressemblant très fort (closely simulating) la leucémie myéloïde de l'enfance". La phosphatase alcaline des polynucléaires est abaissée tant chez les malades que chez les parents indemnes.

Il est évident que si la LMC peut être considérée comme l'expression de gènes mutants, on est en droit de supposer des allèles normaux localisés au même endroit. Des gènes intéressant la leucop^oxièse se trouveraient donc bien sur la partie distale des bras longs du chromosome 21. On peut conclure que l'étude chromosomique de la LMC se présente en tous cas comme un modèle permettant de montrer par quels raisonnements théoriques et par quel ensemble d'informations l'on peut utiliser un chromosome marqueur pour établir la carte des gènes chez l'Homme. Si le même modèle est utilisé dans le cas d'une mutation dominante déterminant l'apparition d'une leucémie, aucune modification primaire du caryotype ne sera observée.

4. Chromosome de Philadelphie et agents mutagènes.

L'expérimentation in vivo et in vitro a permis d'observer l'apparition de cassures chromosomiques à la suite de l'action de nombreux agents chimiques, physiques ou biologiques (virus). L'hypothèse la plus simple concernant la formation du Ph^I est celle d'une délétion provoquée par une cassure chromosomique au niveau des bras longs d'un 21. Dans quelle mesure peut-on faire un rapprochement entre les faits expérimentaux et la présence d'un Ph^I au niveau des cellules de la moelle osseuse de sujets atteints de leucémie myéloïde chronique? Pour répondre à cette question nous nous référerons surtout aux travaux de NICHOLS et de ses collaborateurs, qui étudient ce problème depuis 1961.

Dans une tentative d'unifier l'hypothèse de BOVERI, suivant laquelle les aberrations chromosomiques seraient directement responsables de la cancérisation d'une cellule, et la théorie proposant comme cause du cancer l'incorporation au génome cellulaire du génome d'un virus oncogène, NICHOLS et al. (1967) accordent plus d'importance aux cassures chromosomiques qu'aux autres manifestations cytogénétiques des agents mutagènes. Ces auteurs reconnaissent que les cassures sont le plus souvent mortelles pour la cellule. Cela se comprend aisément: lors de la division cellulaire, la répartition des fragments acentriques ne s'effectue pas correctement, les cellules filles ont un génome déséquilibré et ne peuvent survivre. Seules des cassures de très faible amplitude, comme celle présentée par le Ph^I , permettraient une survie de la cellule. Pour NICHOLS, l'intérêt des cassures serait le suivant: elles peuvent servir d'indicateur de l'action de l'agent mutagène, au niveau moléculaire. Autrement dit, quand on constate la présence de cassures, la probabilité de mutations ponctuelles au niveau des cellules apparemment intactes est grande. Et ces mutations peuvent être tolérées par la cellule, tout en la rendant apte à se transformer en cellule cancéreuse. La leucémie myéloïde chronique serait donc un cas exceptionnel de survie de la cellule à une cassure chromosomique bien tolérée.

Nous pensons que le point de vue défendu par NICHOLS soutient parfaitement notre hypothèse de "délétion chromosomique et mutation ponctuelle" que nous avons déjà exposée. Nous n'en aurons la preuve que lorsqu'il sera possible d'étudier le patrimoine héréditaire humain à l'échelle du gène.

5. Phase chronique et crise blastique de la LMC: deux "étapes" différentes de la même maladie.

En général, la phase chronique d'une LMC se caractérise par un caryotype composé de 46 chromosomes; 45 sont normaux, un seul est altéré: un n° 21, dit chromosome Ph^I . Après une durée plus ou moins longue de la phase chronique, une "crise blastique" peut apparaître. Le caryotype de la crise blastique peut être inchangé par rapport à la phase chronique.

Mais très souvent on constate des aberrations chromosomiques graves, dues à un gain, ou une perte, de chromosomes. La persistance du Ph^{I} permet toutefois d'établir une "filiation": les cellules aneuploïdes de la crise blastique sont issues des cellules 46, Ph^{I} de la phase chronique. La crise blastique coïncide toujours avec une exacerbation de la symptomatologie clinique et peut emporter le malade.

On s'est demandé (TOUGH et al., 1961; BAIKIE, 1965) s'il n'y avait pas deux étapes dans la maladie, objectivables par la cytogénétique. La première correspondrait à l'apparition du Ph^{I} . La cellule devient leucémique et acquiert un état d'instabilité chromosomique, mais sa croissance est encore plus ou moins sous contrôle de l'organisme. La deuxième étape correspondrait à l'apparition de lignées aneuploïdes. La cellule deviendrait "franchement concréuse", et l'évolution clinique serait alors très rapide. Ces opinions sont fort schématiques. Elles ne tiennent pas compte du fait que l'on a décrit des caryotypes inchangés au cours de la crise blastique. D'autre part, nous avons montré que la présence du Ph^{I} est liée à l'instabilité chromosomique indépendamment du stade évolutif de la maladie, ce qui tend à montrer qu'il n'y a pas plusieurs étapes. Nous avons néanmoins exposé les vues de ces auteurs parce qu'elles constituent une approche au problème du début de la concréisation cellulaire. Que se passe-t-il au moment précis où une cellule cesse d'être normale pour devenir concréuse? Peut-on mettre en évidence un état "précancéreux"? Il ne semble pas que la cytogénétique puisse aider à résoudre ce problème dans le cas de la LMC. Au contraire, elle permet de montrer un état de continuité entre la phase chronique et la crise blastique.

6.- Chromosome de Philadelphie et différenciation tissulaire.

Le chromosome Ph^{I} a été mis en évidence, nous l'avons vu, au niveau des érythroblastes et des mégacaryocytes. Ceci suppose une cellule souche ancestrale commune aux trois lignées hématopoïétiques de la moelle osseuse. Du point de vue génétique, il en découle 2 possibilités intéressantes à examiner:

- a)-Suite à la différenciation tissulaire, le fonctionnement du chromosome 21 n'est pas le même au niveau des myéloblastes, des érythroblastes et des mégacaryocytes. La délétion ne concerne par conséquent que des gènes intervenant dans la leucop⁰xièse. On pourra dès lors supposer que les globules rouges et les plaquettes seront normaux dans la LMC
- b)-Certains gènes intéressant le métabolisme des érythroblastes ou des mégacaryocytes se trouvent au niveau de la partie manquante du chromosome 21. Les globules rouges et les plaquettes montreraient certaines anomalies. On pourrait peut-être expliquer de la sorte les anémies ou les thrombocytoses passagères souvent observées lors des premiers stades de la LMC. Il s'agirait alors vraisemblablement de gènes de fonction, réglant la multiplication cellulaire, mais non leur structure intime.

Il nous paraît difficile de choisir actuellement entre ces deux hypothèses, qui ont en commun d'utiliser une délétion chromosomique pour tenter de dresser la carte des gènes chez l'Homme.

7.- CONCLUSION.

Nous avons montré, au cours de cette discussion de synthèse, que la découverte du Ph^I a de nombreuses applications théoriques ou pratiques relevant de diverses spécialités. La spécificité de ce chromosome permet un certain nombre d'applications cliniques utiles au médecin. Mais l'existence du Ph^I permet surtout de poser une série d'hypothèses qui sont autant de voies de recherche possible. La tâche du cytogénéticien apparaît liée à celle de chercheurs d'autres disciplines avec lesquels il convient de collaborer de façon suivie.

II.- Les chromosomes des leucémies aiguës et de la leucémie lymphoïde chronique.

Nous ne disposons pas, pour les leucémies aiguës (L.A.) ou la leucémie lymphoïde chronique (LLC), d'un variant commun semblable à celui de la LMC. Nous savons, au contraire, que l'image chromosomique des L.A. est variable de cas à cas; SANDBERG (1966) en a conclu que les aberrations chromosomiques constatées dans les L.A. représentent un épiphénomène de la maladie, chaque individu réagis-

-sant à l'agent oncogène suivant son propre génome. Nous nous proposons de rechercher la signification possible des aberrations chromosomiques des L.A. en nous basant sur les possibilités que nous avons mises en évidence: les L.A. sans aberration chromosomique décelable (et nous incluerons dans ce paragraphe les LLC), les L.A. avec aberrations chromosomiques chez des sujets à caryotype constitutionnel normal et les L.A. chez les porteurs d'aberrations chromosomiques congénitales.

1.-Leucémie sans aberrations chromosomiques.

Nous avons vu (page 61) et nos résultats nous l'ont confirmé, que plus de la moitié des cas de leucémies autres que la LMC ne présentent pas d'anomalies chromosomiques. Il est utile de rappeler à ce propos que nos techniques sont encore imparfaites. Une anomalie caryotypique de faible amplitude peut facilement passer inaperçue si elle concerne certains chromosomes, notamment ceux du groupe C, qui sont difficiles à apparier et à identifier. Par conséquent, un caryotype décrit comme "normal" peut ne pas l'être. Cependant, dans la présente discussion, nous considérerons, puisque nous ne disposons pas de moyens pour démontrer le contraire, que toute cellule à caryotype apparemment euploïde est effectivement normale du point de vue chromosomique. Deux possibilités sont alors à envisager: ou bien le génome est intact et la transformation leucémique n'intéresse pas l'ADN cellulaire, ou bien la cellule présente une altération de son génome, soit par mutation ponctuelle, soit par incorporation du génome, ou d'une partie de génome viral, et cette altération est à la base de sa transformation, sans pour autant modifier le caryotype.

a)-Leucémies avec génome cellulaire intact: l'on accepte que la prolifération apparemment incontrôlée soit l'une des caractéristiques essentielles de la cellule leucémique, on peut admettre, d'un point de vue théorique, que cette prolifération puisse se produire sans aucune modification du génome. Un modèle de cette conception peut être fourni, nous l'avons vu, par le système biologique phytohéماغگلutinine (PHA)/lymphocytes in vitro. La PHA provoque, ou induit, la division des lym-

-phocytes (NOWELL, 1960) en faisant appel exclusivement aux propriétés physiologiques de ces cellules immuno-compétentes. Toute substance agissant comme la PHA peut être à la base d'une multiplication importante des lymphocytes (ou d'autres cellules hématopoiétiques). Des recherches s'imposent dans cette voie, d'une part pour reconnaître des substances "excito-mitotiques", d'autre part pour étudier leur rôle dans la leucémogenèse, ce terme englobant toutes les formes de leucémie et pas seulement les leucémies lymphoïdes chroniques. Il est possible que les cellules stimulées de la sorte perdent certains de leurs caractères "normaux". Il a été montré (BERNARD et al., 1964; WINTER et al., 1964; ASTALDI et al., 1965) que les lymphocytes de leucémie lymphoïde chronique (LLC) ne sont pas stimulés, ou moins bien stimulés par la PHA que les lymphocytes normaux. Mais il s'agit là d'une propriété aspécifique; les lymphocytes de patients atteints d'autres affections que la LLC ne répondent pas au stimulus de PHA: ceux de sclérose en plaques en phase évolutive (KOULISCHER et al., 1966, 1967) d'ataxie-télangectasie (OPPENHEIM et al., 1966; LEVIN et al., 1966), lors de la période post-opératoire. Ceci ne diminue pas, pensons-nous, l'intérêt du système lymphocytes/PHA en tant que modèle de croissance cellulaire anormale sans altération du génome.

Un autre modèle d'acquisition par la cellule de propriétés nouvelles sans modification du génome nous est donné par ce que nous savons du système de régulation génique par les histones. On sait que toutes les cellules de l'organisme, descendantes d'une même cellule initiale (l'ovule fécondé par un spermatozoïde) sont porteuses du même équipement génique. Celui-ci, par suite de la différenciation tissulaire, s'exprime différemment de tissu à tissu. Une grande partie du génome tissulaire est inactive, sans doute par les histones au niveau de l'ADN (ALLFREY et al., 1963). Une altération dans la régulation par les histones peut permettre à la cellule d'acquérir des propriétés nouvelles sans altération du génome. Pour illustrer ce modèle, on peut prendre comme exemple le cancer du poumon à petites cellules en grains d'avoine. On a constaté (LIPSETT, 1965; BOVER et GORDON, 1965) au niveau de ces cellules cancéreuses une sécrétion réservée normalement aux glandes endocrines. On peut expliquer cette sé-

-création anormale par une dérégulation de gènes normalement inactivés, sans avoir besoin d'invoquer une altération quelconque de l'équipement génique de la cellule. Une dérégulation du même type, concernant par exemple les mécanismes régulateurs de la multiplication ou un système enzymatique de "protection" contre une infection virale, pourrait transformer une cellule normale en cellule ayant toutes les caractéristiques de la cellule cancéreuse, sans altération aucune de l'ADN cellulaire. Bien entendu, il s'agit ici d'une hypothèse, qui montre combien une connaissance des mécanismes génétiques de la cellule à l'échelle moléculaire sont indispensables à la meilleure compréhension de la transformation de la cellule normale en cellule cancéreuse.

b.-Leucémies avec mutations géniques sans altération du caryotype: comme le souligne LEVAN (1967), une cellule peut avoir toutes les caractéristiques de la malignité sans changement apparent du caryotype ("cells can be fully malignant without any discernible changes in stemline karyotypes"). Des changements, ou mutations, à l'échelle moléculaire ont néanmoins pu se produire. Comme on ne peut les objectiver, on ne peut qu'émettre des hypothèses concernant la nature de ces mutations. L'hypothèse la plus simple est celle qui envisage une mutation directement responsable de la malignité, parce qu'elle intéresse par exemple les mécanismes régulateurs de la croissance. Mais on peut postuler l'existence d'un grand nombre de mutations n'ayant qu'une cause indirecte avec la transformation cancéreuse. Un exemple est fourni par la "théorie immunologique" du cancer, très clairement exposée récemment par FIALKOW (1967). Par une mutation ponctuelle, la cellule peut devenir immunocompétente et réagir à la stimulation d'un antigène déterminé. Ou encore, une mutation peut rendre une cellule inapte à neutraliser un antigène déterminé; celui-ci induirait une multiplication ayant toutes les caractéristiques de la prolifération cancéreuse. Le point de départ de cette transformation n'intéresse pourtant pas directement l'oncogène^{5e}. Un autre exemple peut être donné par l'étude de maladies transmises suivant un mode mendélien classique, et s'accompagnant souvent de processus tumoraux. LYNCH (1965) en énumère quelques unes: maladie de von

Recklinghausen et transformations sarcomateuses, exostoses multiples et chondrosarcomes, polypose colique et leur transformation cancéreuse, sclérose tubéreuse de Bourneville et gliomes, syndrome de Bloom et leucémie, anémie aplastique de Fanconi et leucémie ou tumeurs solides, agammaglobulinémie du type Bruton et leucémie aiguë lymphatique, ataxie-télangectasie et cancers lymphoréticulaires, syndrome de Chediak-Higashi et lymphomes malins, syndrome de Sjögren et lymphomes malins. Une mutation génique à la base d'un tableau clinique déterminé semble associée à une fréquence élevée de cancers chez les sujets porteurs. Un troisième exemple peut être fourni par une mutation induisant des aberrations chromosomiques, qui à leur tour peuvent favoriser l'implantation ou la transformation cancéreuse, comme le gène "sticky" du maiz ou "sd" (segregation distorter) de la Drosophile. Enfin, par nos techniques cytogénétiques il serait impossible de mettre en évidence l'incorporation partielle ou totale d'un génome viral dans le génome cellulaire.

L'absence d'aberrations chromosomiques n'implique pas pour autant que le génome cellulaire ait conservé son intégrité. La tâche du cytogénéticien est malheureusement très limitée dans les cas de cancers avec caryotype normal. Il n'est pas impossible cependant qu'ultérieurement, avec l'accumulation des observations, les leucémies aiguës à caryotype normal puissent avoir une autre signification (clinique ou étiologique) que celles avec caryotype aneuploïde.

2.- Leucémies avec aberrations chromosomiques chez des sujets à formule chromosomique constitutionnelle normale:

L'altération du caryotype des cellules leucémiques chez des sujets présentant des chromosomes normaux dans leurs autres tissus est la démonstration que le génotype cellulaire n'est pas quelque chose de stable, d'immuable qui ne changera plus après la fécondation. Au contraire, sous l'influence de certains facteurs, il peut varier de façon considérable. Deux alternatives sont à envisager dans ce cas: ou bien l'aberration chromosomique est le facteur primaire, déclenchant la leucémie, ou bien c'est un phénomène secondaire, une réaction de la cellule à l'agent oncogène.

a) -Aberration chromosomique, facteur primaire?: en principe, toute aberration chromosomique s'accompagne d'une altération de la balance génique de la cellule. Ce déséquilibre peut avoir trois conséquences: soit il désavantage la cellule, qui est éliminée, soit il n'a aucune action sur la vitalité de la cellule, soit il donne un avantage à la cellule, ce qui se traduira ultérieurement par un envahissement progressif du tissu dont elle fait partie. Ce dernier aspect pourrait expliquer, théoriquement, qu'une aberration chromosomique soit responsable de la transformation maligne d'une cellule normale. Un exemple en a été donné par le chromosome de Philadelphie dans la LMC. Par analogie, si une forme donnée de leucémie (autre que la LMC) était déterminée par une aberration chromosomique, cette aberration chromosomique devrait être spécifique de cette forme de leucémie. Or, nous avons vu qu'il n'est pas possible à l'heure actuelle de démontrer qu'il existe une forme de leucémie autre que la LMC à présenter une anomalie chromosomique spécifique. Il est compréhensible, dès lors, que l'on hésite à attribuer à une aberration chromosomique quelconque une fonction primaire dans l'installation d'une leucémie.

En fait, le problème est complexe. La cellule peut réagir à un excès de matériel génétique dû à une hyperdiploïdie, et se "protéger" en inactivant les chromosomes surnuméraires par transformation de l'euchromatine en hétérochromatine. Ce phénomène a tout d'abord été montré chez les plantes et évoqué dès 1939: "comme il est bien connu, il est assez probable que l'hétérochromatine est génétiquement inactive. De sorte que nous pourrions dire qu'il existe des plantes-dont les narcisses- ayant la faculté de contrôler leur quantité de chromatine active. Ces plantes seraient donc défendues des déséquilibres géniques que la polysomie peut provoquer" (FERNANDEZ, 1939). Cette hypothèse n'est pas sans rappeler la théorie de LYON (1961) concernant l'inactivation des chromosomes X surnuméraires chez les mammifères. Il est très probable qu'une aberration chromosomique n'a pas la signification dramatique que ses dimensions pourraient laisser supposer. Peu de gènes portés par un chromosome (ou plusieurs chromo-

somes) surnuméraire seraient actifs. Notre hypothèse personnelle est alors la suivante: toute aberration chromosomique peut n'avoir comme effet réel qu'un effet identique à celui d'une mutation ponctuelle. Elle aurait donc la même signification qu'une altération génique, tout en étant visible au microscope optique. Dès lors, tout raisonnement concernant leur rôle 'oncogène serait identique à celui tenu plus haut pour les mutations ponctuelles.

L'étude systématique du caryotype d'un grand nombre de sujets pourrait aider à éclaircir ce problème. Les patients chez qui une aberration chromosomique serait décelée au niveau de la moelle osseuse uniquement seraient suivis du point de vue clinique, et l'apparition d'une leucémie notée. Peu de cas semblables ont été décrits. Nous avons mentionné (p.107 et 109) une série d'états (désordres myéloprolifératifs et anémies de types divers) avec aberrations chromosomiques ne s'étant pas transformés en leucémie chronique ou aiguë. A l'opposé, outre le cas de KEMP et al. (1964) avec chromosome Ph^I précédant l'apparition clinique de la LMC, HONDA et al. (1964) ont rapporté un exemple d'aberration chromosomique au niveau de la moelle osseuse 25 mois avant l'installation clinique d'une leucémie aiguë chez une enfant de 26 mois, et DEMAYO et al. (1967) ont noté chez un trisomique 21 des aneuploïdies de la moelle osseuse 3 mois avant la symptomatologie caractéristique de leucémie aiguë. Cependant, vu le petit nombre de cas rapportés, rien ne permet d'affirmer qu'à une aneuploïdie correspond la transformation ultérieure de la cellule en cellule leucémique.

- b)-Aberrations chromosomiques, facteur secondaire: les aberrations chromosomiques des cellules leucémiques autres que la LMC pourraient représenter une réaction secondaire du noyau, une "adaptation" à leur nouvel état. Chaque individu réagirait à l'agent oncogène en fonction de son génotype (SANDBERG, 1966), les cellules atteintes "recherchant" la meilleure combinaison génétique leur permettant de survivre. Une analogie avec l'évolution des espèces a été proposée (LEJEUNE, 1965; LEVAN, 1967). Il y aurait, à partir du génotype constitutionnel une évolution, avec des cellules ancestrales, des rameaux abortifs et d'autres représentant un succès du point de vue compétitif. Pour LEVAN, si cette microévolution est rapide,

alors qu'à l'échelle de l'individu l'évolution se compte en milliers, si pas en dizaine de milliers, d'années, c'est parce que les cellules somatiques ne connaissent pas l'obstacle de la méiose, avec appariement des segments homologues.

LEJEUNE (1965) a proposé des "lois d'évolution clonale" s'appliquant au caryotype des cellules leucémiques. On peut les résumer de la façon suivante: tout d'abord, l'auteur postule l'existence d'une évolution clonale progressive "entre la lignée néoplasique à caryotype entièrement remanié et la cellule normale". Une des tâches du cytogénéticien est de reconstituer cette évolution, par des démarches "qui ne sont guère différentes de la pratique des paléontologistes". LEJEUNE note ensuite la tendance à la duplication des surnuméraires, normaux ou anormaux. Cette duplication peut se faire par non-disjonctions successives. Dans cette optique, le patient que nous avons eu l'occasion d'étudier (p. 80 et sq.; voir également KOULISCHER, 1966) est intéressant parce qu'il montre que l'ascension anaphasique est asynchrone et qu'une non-disjonction peut atteindre en premier lieu les derniers chromosomes à migrer vers les pôles. La duplication des surnuméraires peut se produire à la suite d'une endoreduplication d'un seul, ou de quelques, chromosomes, comme nous l'avons mentionné. Cette hypothèse a justifié une recherche de notre part, qui ne nous a pas permis de montrer que les endoreduplications étaient plus fréquentes au niveau des cellules leucémiques qu'au niveau des cellules normales. LEJEUNE signale ensuite l'hypothèse des "variants communs": comme pour la LMC, il y aurait des anomalies spécifiques pour certaines formes de leucémies ou de cancers; il conviendrait d'étudier leurs mécanismes d'apparition. Par exemple, y aurait-il un point fragile au niveau de certains chromosomes, favorisant les délétions ou les remaniements? Enfin, LEJEUNE propose l'hypothèse des "combinaisons interdites". Ce sont celles qui provoqueraient des changements tels que la survie de la cellule ne serait plus possible, soit à cause de besoins métaboliques nouveaux impossibles à satisfaire, soit encore parce que la cellule mutante serait "reconnue", et éliminée, par les réactions immunitaires de l'organisme.

D'une façon générale, et quelles que soient les "lois" d'évolution clonale (pour employer le terme de LEJEUNE), l'hyperploïdie, et surtout la

polyploïdie (LEVAN, 1967) permettraient une meilleure adaptation de la cellule à son environnement. Il convient de souligner qu'il s'agit ici de polyploïdie en tant que phénomène d'adaptation au processus néoplasique. La polyploïdie physiologique, comme celle des mégacaryocytes, ne mène pas vers une prolifération leucémique de ces éléments médullaire. LEJEUNE (1965) se demande si l'hybridation somatique telle qu'elle a été décrite par BARSKI et al. (1960) et SORIEUL et EPHRUSSI (1961) n'est pas un des processus capables d'accélérer l'adaptation de la cellule à son nouvel état.

En conclusion, le génome cellulaire est loin d'être figé; il peut évoluer sous l'effet de nombreux stimuli, dont certains sont des agents oncogènes. L'exposé ci-dessus indique que la voie qui s'offre au cytogénéticien est de tenter de découvrir les causes qui régissent l'apparition des aneuploïdies des cellules leucémiques, et de tenter de les systématiser. Les perturbations peuvent se situer à de nombreux moments de la vie cellulaire. L'accumulation des données permettra de contribuer à résoudre ce problème. D'autre part, comme nous l'avons souligné, nous pensons, d'un point de vue fondamental, que l'effet des aberrations chromosomiques n'est pas tellement différent de celui des mutations punctiformes. En effet, si l'on tient compte de l'inactivation de l'ADN par suite de la différenciation tissulaire, peu de gènes seraient actifs au niveau des chromosomes surnuméraires. Nous aurions dès lors, par le truchement des leucémies, un moyen aisé de repérer ces mutations et d'étudier leurs conséquences, ce qui n'est pas le cas pour les mutations punctiformes.

3.- Leucémies chez les porteurs d'aberrations chromosomiques constitutionnelles.

Le problème des leucémies chez les porteurs d'aberrations chromosomiques constitutionnelles nous permettra de situer les leucémies humaines dans le contexte général des maladies par aberration chromosomique et de conclure notre travail.

a)-Trisomie 21 et leucémies aiguës.

La notion d'une association entre le mongolisme et les leucémie aiguës est devenue classique déjà avant la découverte de la trisomie 21.

KRIVITT et GOOD (1956) avaient calculé la fréquence théorique de l'association mongolisme/ leucémie. Ils se basaient sur un taux de naissances d'enfants mongoliens de 1/500 (chiffre exagéré pour rendre la démonstration plus évidente) et un nombre de décès entre 0 et 4 ans par leucémie de 5/100.000. D'après ces chiffres, l'association mongolisme/ leucémie aurait dû s'observer chez 1 enfant sur 10.000.000 âgés de 0 à 4 ans. Or en l'espace d'un an, ces auteurs avaient examiné 4 enfants mongoliens atteints de leucémie aiguë; d'après les chiffres théoriques, un tel événement aurait dû survenir une fois tous les 25 ans dans leur service (Minnesota, U.S.A.). Dans le but d'avoir des chiffres d'une valeur statistique indiscutable, KRIVITT et GOOD (1957) envoyèrent un questionnaire à 300 institutions pour arriérés mentaux; les réponses plaidaient en faveur d'une association entre les 2 affections. D'autres chercheurs confirmèrent ces données (MERRIT et HARRIS, 1956; STEWART et al., 1958; DOLL et al., 1962). Il est admis depuis que la fréquence des leucémies chez les trisomiques 21 est environ 20 fois plus élevée que dans la population de même âge.

Les trisomiques 21 ne présentent pas une forme spécifique de leucémie aiguë. Celle-ci peut être myéloblastique, mais aussi lymphoblastique ou à cellules souches (PENROSE et SMITH, 1966). En fait, la trisomie 21 semble plutôt perturber la régulation de la leucopoïèse que déterminer de façon directe la transformation leucémique des cellules. Confirmant cette opinion, certains auteurs ont décrit chez le nouveau-né mongolien des états cliniques proches de la leucémie, s'amenant spontanément (ROSS et al., 1963: "ineffective regulation of granulopoiesis masquerading as congenital leukemia"; ENGEL et al., 1965: "transient congenital leukemia"; GERMAIN et al., 1967). On sait d'autre part (TURPIN et BERNYER, 1947) que la lobulation des polynucléaires des trisomiques 21 est anormale. Ces faits plaident en faveur de la présence de gènes intervenant dans la leucopoï^oïèse, qui seraient situés sur le chromosome 21, mais il s'agirait plutôt de gènes de régulation que de gènes de structure.

L'image cytogénétique des leucémies aiguës des trisomiques 21 est variable. Le caryotype des cellules atteintes peut être inchangé et ne montrer aucune autre anomalie que le chromosome 21 surnuméraire, ou bien il peut être altéré: on noterait dans ce cas souvent le gain d'un chromosome C ou d'un chromosome G (CONEN et ERKMAN, 1966). A ce point de vue, la situation n'est guère différente de celle qui existe chez les leucémiques à formule chromosomique constitutionnelle normale (nous avons vu que la moitié d'entre eux environ ne montre aucune anomalie au niveau des cellules leucémiques). Rappelons que c'est chez un trisomique 21 leucémique que LEJEUNE et al. (1962) ont le plus clairement observé "l'évolution clonale".

b)- Leucémies chez les porteurs d'aberrations chromosomiques constitutionnelles autres que la trisomie 21.

Des leucémies aiguës ont été décrites chez ces sujets, mais en petit nombre. SCHADE et al. (1962) ont observé une leucémie aiguë chez un trisomique D, ENGEL et al. (1967) une LMC avec Ph^I chez une femme porteuse d'une translocation D/D, et quelques leucémies ont été rapportées chez des patients avec aberration chromosomique constitutionnelle sexuelle (LEWIS et al., 1963; TOUGH et al., 1963). Deux faits viennent compliquer l'interprétation de ces résultats. Tout d'abord, les sujets porteurs d'une aberration chromosomique sexuelle ne sont pas rares. D'après les données de MACLEAN et al. (1964) portant sur 20.000 nouveaux-nés écossais, la fréquence des porteurs d'anomalies chromosomiques sexuelles serait environ de 2 pour mille. Dans ces conditions, il est encore trop tôt pour déceler un lien entre aberration sexuelle et leucémie: les cas rapportés peuvent être une simple coïncidence. La même explication peut être donnée pour les porteurs d'autres aberrations chromosomiques constitutionnelles; sauf la trisomie 21, elles sont mal tolérées et rapidement fatales pour l'individu porteur. Celui-ci ne survit peut-être pas assez longtemps que pour développer une leucémie. Des anomalies des polynucléaires ont été décrites chez les trisomiques D (HUENS et al., 1964) sous forme de projections nucléaires. Si l'on raisonne par analogie, les trisomiques 21 présentent également des anomalies de la lobulation des polynucléaires; mais leur durée de survie est grande, alors que celle des trisomiques D n'est

que de quelques jours (KEJEUNE, 1965), et ils ont le temps de développer une leucémie.

Nous avons étudié ce problème en suivant au cours du temps plusieurs enfants porteurs d'aberrations chromosomiques constitutionnelles, et notamment de mosaïques. Nous avons montré (p. 98) la grande stabilité de ces mosaïques. La présence, au niveau de la moëlle osseuse, de cellules de constitution chromosomique différente, ne suscite aucune compétition, alors que si l'aberration est due à un processus leucémique, les cellules aneuploïdes envahissent rapidement l'organisme. Aussi, nous proposons l'hypothèse suivante: HALL (1965) s'est attaché à montrer que des malformations communes se retrouvent chez tous les enfants porteurs d'aberrations chromosomiques intéressant les autosomes: retard statuto-pondéral, retard mental, micrognathie, malformation de l'oreille externe, malformations cardiaques, etc. Nous nous demandons si des anomalies de la leucop^oxièse ne rentreraient pas dans le cadre de ces anomalies aspécifiques, favorisant la transformation leucémique des cellules hématopoiétiques. Ceyte aspécificité pourrait expliquer pourquoi, chez les trisomiques 21, les leucémies peuvent se présenter sous plusieurs formes différentes. Une fois de plus, c'est l'accumulation patiente des données qui permettra d'éclaircir ce problème, et notamment la recherche systématique de toute réaction pathologique des leucocytes chez les porteurs d'aberrations chromosomiques constitutionnelles.

4.- Les déterminants prézygotiques des leucémies.

BORGES et al. (1967) ont proposé le terme de "déterminant prézygotique" pour désigner l'élément causal des leucémies survenant chez des porteurs d'aberrations chromosomiques constitutionnelles, quelle que soit leur nature. Ce terme se justifie parce que l'anomalie chromosomique est due dans ces cas à une erreur de répartition méiotique chez l'un des deux parents, donc avant la formation du zygote. Cette notion de "déterminant prézygotique" se retrouve au sein de certaines familles chez lesquelles un ou plusieurs membres sont porteurs d'une aberration chromosomique constitutionnelle alors que d'autres sont atteints de leucémie. Dans une famille dont les parents sont normaux, un de leurs quatre

enfants décède après avoir présenté une leucémie lymphoblastique aiguë, un autre une leucémie myéloblastique aiguë, le 3ème à la suite d'une broncho-pneumonie et le 4ème est une mosaïque de constitution XY/XXY (BAIKIE et al. 1961). Dans une autre famille, la mère est porteuse d'une translocation de type 15/21: elle a eu 4 enfants, dont un mongolien à 46 chromosomes et un autre décédé à la suite d'une leucémie aiguë (BUCKTON et al., 1961). Nous avons rapporté l'observation de GUNZ et al. (1962), concernant une accumulation de cas de leucémie lymphoïde chronique dans 2 familles présentant un chromosome G anormal auquel avait été donné le nom de chromosome Ch^I. HUNGERFORD et NOWELL (1961) ont rapporté l'existence d'une famille dont le père était atteint de leucémie lymphoïde chronique, le fils présentait une formule sexuelle XXXXY alors qu'une tante et une cousine étaient trisomiques 21. On connaît encore une famille dont un sujet est mongolien et est atteint de leucémie lymphoblastique aiguë, alors que sa tante est trisomique 21 (THOMPSON et al. 1963) et une remarquable famille où une mère est une mosaïque normale/trisomie 21, son fils un trisomique 21 standard, alors que son père et deux oncles paternels ont développé une leucémie myéloïde chronique (VERREESEN et al., 1964).

La cytogénétique se présente dans tous ces cas comme un moyen de recherche à employer dans l'étude des facteurs héréditaires dans les leucémies humaines. Certains de ces facteurs cependant doivent être examinés avec prudence. Il est évident que dans les familles où se transmet une translocation intéressant un chromosome 21, où les naissances de trisomiques 21 sont fréquentes, la probabilité d'observer des sujets développant une leucémie aiguë est plus grande que dans une population témoin à caryotype normal. D'autre part, si la fréquence des naissances de trisomiques 21 augmente avec l'âge de la mère (PENROSE et SMITH, 1966), la fréquence des leucémies chez les enfants augmentera avec l'âge de la mère. Quoi qu'il en soit, envisagées sous cet angle, il est possible de replacer les leucémies dans le cadre des maladies humaines par aberrations chromosomiques. La prédisposition à certaines formes de leucémie pourrait être présente déjà dans les gamètes des parents, avant la fécondation.

Il ressort de ce qui précède que l'étude des chromosomes des leucémies ne peut se limiter aux cellules leucémiques. Nous avons vu, à la fin de notre exposé, que nous rejoignons en un certain point les maladies par aberrations chromosomiques constitutionnelles, et quelques maladies transmises héréditairement suivant un mode mendélien. Existe-t-il un, ou plusieurs facteurs communs à la tératogenèse et à l'oncogenèse? Nous avons eu l'occasion (PETIT et al., 1968) d'étudier une leucémie aiguë chez un trisomique 21. Les cellules leucémiques montraient un chromosome 5p- identique à celui de la maladie du cri du chat (LEJEUNE et al., 1963). Est-ce suffisant pour conclure que le même agent (viral?) participe à la transformation d'une cellule normale en cellule leucémique, et à la formation d'une anomalie chromosomique responsable d'un syndrome polymalformatif? La réponse à cette question, comme à bien d'autres que nous avons posées, ne pourra se faire qu'en poursuivant les recherches entreprises pour accumuler les données.

RESUME.

Les chromosomes de la moelle osseuse ou des lymphocytes de sujets présentant des affections hématologiques leucémiques et non-leucémiques ont été étudiés, soit par une méthode directe, soit après un séjour de quelques heures in vitro. Les faits observés ont été rassemblés en 4 groupes distincts.

I. LEUCEMIE MYELOIDE CHRONIQUE:

Le chromosome de Philadelphie (Ph^I), spécifique de la leucémie myéloïde chronique (LMC), a été mis en évidence lors de 38 analyses effectuées chez 25 patients atteints de LMC. Dans la présente série, aucun cas de LMC sans Ph^I n'a été observé. La proportion de mitoses avec Ph^I a varié suivant les analyses de 12 à 100%. Plus la proportion de mitoses avec Ph^I était élevée, plus le nombre de cellules s'écartant du nombre normal de 46 était grand: la présence du chromosome Ph^I semble donc liée à un facteur d'instabilité chromosomique cellulaire.

Lors de la phase chronique de la maladie, le nombre modal observé était de 46 et le caryotype était normal, exception faite de la présence du Ph^I . La moitié des cas étudiés lors d'une crise blastique ont montré un caryotype inchangé par rapport à la phase chronique: la crise blastique ne s'accompagne pas nécessairement d'un changement décelable du caryotype. La présence de lignées cellulaires aneuploïdes a été mise en évidence dans certains cas de crise blastique; les caryotypes variaient de patient à patient. La présence du Ph^I permettait néanmoins de rattacher le caryotype de la phase chronique à ceux, altérés, des crises blastiques.

Du point de vue génétique, la LMC peut être envisagée comme étant la résultante de l'expression de gènes récessifs mutants sur un chromosome 21. Ceux-ci s'expriment suite à la perte des allèles dominants normaux par la délétion du chromosome homologue, qui devient "chromosome Ph^I ". Cette hypothèse est compatible avec les cas rapportés de LMC sans Ph^I et de Ph^I sans LMC.

2. LEUCEMIE LYMPHOIDE CHRONIQUE.

L'obtention de mitoses de lymphocytes provenant de sujets atteints de leu

-cémie lymphoïde chronique (LLC) après stimulation par la phytohéماغglutinine (PHA) n'est pas aisée. Le sang de 16 patients a été mis en culture: 6 seulement ont montré des mitoses convenant à l'analyse cytogénétique. Les caryotypes dans ces 6 cas se sont révélés normaux.

Une aberration chromosomique n'est pas indispensable pour expliquer l'apparition d'une LLC. En effet, par analogie avec la stimulation par la PHA, on peut supposer le "réveil" des propriétés mitotiques des lymphocytes par un agent, encore inconnu et faisant intervenir les propriétés immunologiques des lymphocytes. Il s'en suivrait un tableau clinique de leucémie lymphoïde chronique.

3. LEUCEMIES AIGUES.

Les chromosomes de 25 patients atteints de leucémie aiguë (L.A.) ont été étudiés. La moelle osseuse a été examinée chez 20 patients, le sang périphérique chez 5 autres patients. Toutes les analyses faites à partir du sang périphérique, de même que 12 analyses sur 22 (soit 54,5%) effectuées sur moelle osseuse, ont montré des caryotypes apparemment normaux. L'altération du caryotype n'est donc pas une condition essentielle à l'apparition d'une L.A. Dix analyses de moelle osseuse ont montré la présence de lignées aneuploïdes, variant de 44 à 92 chromosomes. L'absence d'anomalies spécifiques a été notée.

Des recherches complémentaires ont été entreprises pour tenter de préciser l'origine possible des aberrations chromosomiques des L.A., en tenant compte d'une part que les anomalies les plus fréquemment observées sont des anomalies de nombre plutôt que de structure, d'autre part que tout sujet leucémique porteur d'une lignée aneuploïde médullaire peut être considéré comme une "mosaïque" tissulaire.

a)- Erreur de répartition chromosomique à la mitose: un cas de L.A. a permis d'étudier l'ascension anaphasique des chromosomes. Celle-ci semble asynchrone: les paires terminant le plus tôt leur période de synthèse d'ADN au cours de la période "S" (comme on a pu l'étudier au moyen de l'incorporation

à la thymidine tritiée) sont les premières à commencer la migration vers les pôles. Les chromosomes "tardifs" (les chromosomes sexuels X et Y et les autosomes 15, 16, 18 et 21) auraient de ce fait plus de risques d'être mal répartis: les aneuploïdies devraient les concerner le plus souvent.

b)-Endoréduplication d'une partie ou de la totalité du génome: les endoréduPLICATIONS sont nettement plus fréquentes au niveau des cultures de tissus à long terme impliquant un grand nombre de générations cellulaires (fibrocytes sujets non-cancéreux), que dans les cultures à court terme (lymphocytes) ou dans les incubations de moelle osseuse leucémique. On pourrait y voir un effet de "vieillissement", à rapprocher des aneuploïdies plus fréquentes chez le sujet âgé comme au niveau des tissus cancéreux. Cependant, le nombre d'endoréduPLICATIONS au niveau des fibrocytes n'augmente pas avec la durée du séjour in vitro: le "vieillissement" seul ne paraît pas suffisant pour expliquer l'apparition d'endoréduPLICATIONS. Les endoréduPLICATIONS signalées chez de nombreux leucémiques au niveau des cellules du tissu hématopoïétique sont vraisemblablement d'une autre origine.

c)-Comparaison des mosaïques tissulaires constitutionnelles et acquises: des numérations chromosomiques à intervalles réguliers ont été effectuées chez des sujets porteurs de mosaïques constitutionnelles composées de 2 lignées cellulaires, l'une normale, l'autre aneuploïde. Lors de chaque analyse, on a constaté la stabilité des 2 populations cellulaires, alors que chez les leucémiques les lignées aneuploïdes envahissent rapidement l'organisme. On peut en conclure que l'aberration chromosomique ne paraît pas suffisante à elle seule pour expliquer cet envahissement par les cellules leucémiques (d'autant plus qu'il peut se produire en l'absence de toute anomalie visible du caryotype). Une exception a été observée dans le cas particulier d'un chromosome en anneau: il convient cependant de souligner que les aneuploïdies ne concernaient que l'anneau.

D'une façon générale, les cellules leucémiques tolèrent les aneuploïdies bien mieux que les cellules embryonnaires: c'est parcequ'il s'agit de cellules différenciées dont une petite partie du génome est active. Les aberrations chromosomiques, de ce fait, n'ont pas de répercussions génétiques aussi importantes.

que la morphologie pourrait laisser prévoir. D'autre part, si l'on admet que les gènes de régulation sont en nombre élevé, on peut penser que certains gènes ayant le même effet régulateur se retrouvent sur des chromosomes différents. Des aneuploïdies différentes pourraient avoir le même effet, ce qui expliquerait la variété des images observées dans les leucémies.

4. AFFECTIONS HEMATOLOGIQUES NON-LEUCEMIQUES.

Dans les désordres myéloprolifératifs, aucune anomalie chromosomique n'a été observée, sauf chez 2 patients atteints de maladie de Vaquez transformée en leucémie. Un de ces 2 patients montrait un chromosome Ph^I , ce qui démontre que la maladie de Vaquez peut se transformer en LMC avec Ph^I . Dans les autres cas, l'absence de Ph^I a été utilisée comme élément du diagnostic différentiel.

Aucune anomalie n'a été relevée chez des patients présentant une anémie.

Deux patients sur 6 atteints de macroglobulinémie de Waldenström ont montré dans une certaine proportion de leurs lymphocytes la présence de cellules à 47 chromosomes avec un grand autosome du groupe A en surnombre. Le fils d'une patiente avec un A surnuméraire, présentant une macroglobuline dans son sang sans atteinte clinique, était porteur d'une aberration chromosomique constitutionnelle (translocation du type D/D).

5. CONCLUSION GENERALE.

La LMC semble être, à l'heure actuelle, la seule forme de leucémie humaine à présenter une aberration chromosomique spécifique. On connaît la tendance des trisomiques 21 à développer une forme de L.A.: certains gènes (de régulation et/ou de structure) intervenant dans la leucopiose pourraient se trouver sur un chromosome 21. Il semble en tous cas exister un lien entre une maladie par aberration chromosomique constitutionnelle et les leucémies. L'existence de familles dont certains sujets sont porteurs d'une aberration constitutionnelle et d'autres sont atteints d'une forme de leucémie permet de supposer, dans certains cas, l'existence de facteurs communs à l'oncogenèse et à la tératogenèse. Des recherches futures devraient permettre de préciser l'exactitude de cette hypothèse.

REFERENCES.

- ADACHI M., ITO C., KAWANISHI M., YAMAMOTO T., KATSUNUMA M., OSAMURA S.-Chromosome abnormalities observed in two cases of erythroleukemia. *Acta Hemat. Jap.* 27, 264, 1964 (*in* Carcinogenesis Abstracts, 3, 208, 1965).
- ALLFREY V.G., LITTAU V.C., MIRSKY A.E.-On the role of histones in regulating ribonucleic acid synthesis in the cell nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 49, 415-421, 1963.
- ALTER A.A., LEE S.L., POURFAR M., DOBKIN G.-Leukocyte alkaline phosphatase in mongolism: a possible chromosome marker. *J. Clin. Investig.*, 41, 1341, 1962.
- ASTALDI G., STROSSELLI E., SAULI S.-Le cellule emiche nella ricerca citogenetica. *Haematologica*, 47 (suppl.), 1-56, 1962.
- ASTALDI G., MASSIMO L., AIRO R., MORI P.G.-Phytohemagglutinin and lymphocytes from acute lymphocytic leukemia. *Lancet*, i, 1265, 1966.
- ATKIN N.B., TAYLOR M.C.-45 chromosomes in chronic myeloid leukemia. *Cytogenetics*, 1, 97-103, 1962.
- ATKINS L., GAULIAN M.-Multiple clones with increase in number of chromosomes in the G-group in a case of myelomonocytic leukemia. *Cytogenetics*, 4, 321-328, 1965.
- ATKINS L., SCEERY R.T., KEENAN M.E.-An unstable ring chromosome in a female infant with hypotonia, seizures and retarded development. *J. Med. Genet.*, 3, 134-138, 1966.
- AULA P.-Chromosome breaks in leukocytes of chickenpox patients. Preliminary communication. *Hereditas*, 55, 362-367, 1966.
- BACH F., HIRSCHHORN K.-Gamma-globulin production by human lymphocytes *in vitro*. *Exper. Cell Res.*, 31, 100, 1963.
- AULA P., SAKSELA E.-Early morphology of the chromosome damage induced by Sendai virus. *Hereditas*, 55, 362-367, 1966.
- BAIKIE A.G.-Chromosomes and leukemia. *Acta Haemat.*, 36, 157-173, 1966.
- BAIKIE A.G., COURT BROWN W.M., JACOBS P.A., MILNE J.S.-Chromosome studies in human leukemia. *Lancet*, ii, 425-428, 1959.
- BAIKIE A.G., COURT BROWN W.M., BUCKTON K.E., HARNDEN D.C., JACOBS P.A., TOUGH I.M. A possible specific chromosome abnormality in human chronic myeloid leukemia. *Nature*, 188, 1165-1166, 1960.
- BAIKIE A.G., JACOBS P.A., McBRIDE J.A., TOUGH, I.M.-Cytogenetics studies in acute leukemia. *Brit. Med. J.*, i, 1564-1571, 1961a.

- BAIKIE A.G.,BUCKTON K.E.,COURT BROWN W.M.,HARNDEN D.G.-Two cases of leukemia and a case of sex chromosome abnormality in the same sibship.Lancet,ii, 1003-1004,1961b.
- BARSKI G.,SORIEUL S.,CORNEFERT F.-Production dans des cultures in vitro de deux souches cellulaires en association,de cultures de caractère hybride. C.R. Acad. Sc.,251,1825-1827,1960.
- BASERGA A.,CASTOLDI G.L.-Chromosomes in chronic lymphatic leukemia.Lancet, ii,1299-1300,1965.
- BAYREUTHER K.-Chromosomes in primary neoplastic growth.Nature,186,6-9,1960.
- BELL W.R.,WHANG J.J.,CARBONE P.P.,BRECHER G.,BLOCK J.B.-Cytogenetic and morphologic abnormalities in human bone marrow cells during cytosine arabinoside therapy.Blood,27,771-781,1966.
- BENIRSCHKE K.,BROWNHILL L.,EBAUCH F.G.-Chromosomal abnormalities in Waldenström's macroglobulinemia.Lancet,i,594-595,1962.
- BERGER R.-Contribution à l'étude cytogénétique des leucémies humaines.Thèse de Médecine,Paris,1964.
- BERGER R.-Chromosomes et leucémies humaines.La notion d'évolution clonale. Ann. Gén.,8,70-82,1965.
- BERGER R.-Note éditoriale. Ann. Gén.,10,102-103,1967.
- BERNHARD W.G.,GORE I.,KILBY R.A.-Congenital leukemia.Blood,6,990,1951.
- BERNARD C.,GERALDES A.,BOIRON M.-Action de la phytohémagglutinine in vitro sur les lymphocytes de leucémies lymphoïdes chroniques.Nouv. Rev. Franç. Hémat.,4,69,1964.
- BIEDLER J.L.,MURPHY M.L.-A case of acute lymphoblastic leukemia associated with mongolism.Mammal. Chr. News1.,2,23-24,1963.
- BISHUN N.P.,MORTON W.R.M.,RASHAD M.N.-Chromosome endoreduplication.Lancet,i, 1452,1964.
- BLOCK J.B.,CARBONE P.P.,OPPENHEIM J.J.,FREI E.,III.-The effect of treatment in patients with chronic myelogenous leukemia:biochemical studies. Ann. Int. Med.,59,629,1963.
- BOOK J.A.,ATKINS L.,SAMTESSON B.-Some new data on autosomal aberrations in man.Path. Biol.,11,1159-1162,1963.
- BORGES W.H.,NICKLAS J.W.,HAMM C.W.-Prezygotic determinants in acute leukemia.J. Ped.,70,180-184,1967.

- BOTTURA C., FERRARRI I., VEIGA A.A.-Chromosome abnormalities in Waldenström's macroglobulinemia. *Lancet*, *1*, 1170, 1961.
- BOTTURA C., FERRARRI I.-Male pseudo-hermaphroditism with XO chromosomal constitution on bone marrow cells. *Brit. Med. J.*, *1*, 1100-1101, 1962.
- BOTTURA C., FERRARRI I.-Endoreduplication in acute leukemia. *Blood*, 21, 207-212, 1963.
- BOUE J.G., BOUE A., MOORHEAD P.S., PLOTKIN S.A.-Altérations chromosomiques induites par le virus de la rubéole dans les cellules embryonnaires diploïdes humaines cultivées in vitro. *C.R. Acad. Sc.*, 259, 687-690, 1964.
- BOUTON M.J., PHILLIPS H.J., SMITHELLS R.W., WALKER S.-Congenital leukemia with parental consanguinity. *Brit. Med. J.*, *11*, 866-869, 1961.
- BOVERI T.-Zur Frage des Entstehung maligner Tumoren. I vol., Jena, Fischer, 1914 (in TURPIN R. et LEJEUNE J.: Les chromosomes humains, Gauthier-Villars, 1965).
- BOYD E., PINKERTON A.H., HUTCHINSON H.E.-Chromosomes in aleukemic leukemia. *Lancet*, *11*, 444, 1965.
- BRANDT N.J., FRØLAND A., MIKELSEN A., TOLSTRUP N.-Galactosemia locus and the Down's syndrome chromosome. *Lancet*, *11*, 700-703, 1965.
- BRAUNSTEINER H., ROTHENBUCHNER G., SCHRODER B.-Chromosomes Untersuchungen bei Morbus Waldenström. *Wien. Klin. Wschr.*, 76, 502-503, 1964.
- BRECHER G., TJIO J.H.-Le problème des cellules souches. Intérêt de l'étude des chromosomes marqueurs. *Nouv. Rev. Franç. Hémat.*, 3, 641-646, 1963.
- BRIGGS R., KING T.J.-Nucleocytoplasmic interactions in eggs and embryos. *The Cell*, vol. I (ed. : BRACHET J. and MIRSKY A.E.). Academic Press, New York, 1959.
- BROUSTET A., STAEFFEN J., MOULINIER J., HARTMANN L., MORETTI G.-Anomalies chromosomiques dans 18 cas de macroglobulinémie de Waldenström. *La Presse Médicale*, 74, 2286, 1966.
- BROWN A.K., ELVES M.W., GUNSON H.H., PELL-ILDERTON R.-Waldenström's macroglobulinemia. A family study. *Acta Haemat.*, 38, 184-192, 1967.
- BUCKTON K.E., HARNDEN D.G., BAIKIE A.G., WOODS G.E.-Mongolism and leukemia in the same sibship. *Lancet*, *1*, 171, 1961.
- BUCKTON K.E., JACOBS P.A., COURT BROWN W.M., DOLL R.-A study of the chromosome damage persisting after X-ray therapy for ankylosing spondylitis. *Lancet*, *11*, 676-682, 1962.
- CAMPBELL J.A.B., McCAFFEE A.L., WADE W.G.-Familial neonatal leukemia. *Arch. Dis; Child.*, 37, 93-98, 1962.

- CAUCHIE J.,DENOLIN-REUBEN S.-Communication personnelle (1966).
- CAWEIN M.,LAPPAT E.J.,RACKLEY J.W.-Down's syndrome and chronic myelogenous leukemia.Arch. Intern. Med.,116,505-508,1965.
- CHAUDHURI A.-Chromosome endoreduplication in normal controls.Lancet,i,1118,1965.
- CHAVARRIA C.,MARQUEZ-MONTER H.,BENITEZ-GURROLA S.-Chromosomal endoreduplication in coarctation of the aorta.Lancet,ii,419,1964.
- CHICAGO,Conférence de.-Nomenclature des chromosomes humains.Ann. Gén.,10,153,1967.
- CLEIN G.P.,FLEMANS R.J.-Involvement of the erythroid series in blastic crisis of chronic myeloid leukemia.Brit. J. Haemat.,12,754-758,1966.
- CONEN P.E.,ERKMAN B.,LASKI B.-Chromosome studies on a radiographer and her family.Arch. Intern. Med.,117,125-132,1966.
- CONEN P.E.,ERKMAN B.-Combined mongolism and leukemia.Amer. J. Dis. Child.,112,429-443,1966.
- CONKRITE E.P.-Evidence for radiation and chemicals as leukemogenic agents.Arch. Environm. Hlth,3,297-303,1961.
- COURT BROWN W.M.,JACOBS P.A.,DOLL R.-Interpretation of chromosome counts made on bone marrow cells.Lancet,i,160-163,1960.
- COURT BROWN W.M.,TOUGH I.M.-Cytogenetic studies in chronic myeloid leukemia.Advances in Cancer Research,7,351-381,1963.
- COX D.,YUNCKEN C.,SPRIGGS A.-Minute chromatin bodies in malignant tumors of childhood.Lancet,ii,55-58,1965.
- DAMESHEK W.,GUNZ F.-Leukemia.Grune and Stratton,NewYork and London,420 pp.,1958.
- DAVIDENKOVA E.F.,KOSLOVA N.N.-Chromosomal anomalies in acute and chronic leukemias.Vop. Onkol.,10,3-7,1964.
- DEMAYO A.P.,KIOSSOGLOU K.A.,ERLANDSON M.E.,NOTTERMAN R.F.,GERMAN J.-A marrow chromosomal abnormality preceeding clinical leukemia in Down's syndrome.Blood,29,233-241,1967.
- DENVER,Conférence de.-A proposed standard system of nomenclature of human mitotic chromosomes.Acta Genet. Stat. Med.,10,322-328,1960.
- DOBRZANSKA A.-Etudes chromosomiques dans les leucémies chez les enfants.XXe Congrès de l'Ass. Péd. Langue Franç.,vol. 4,p. 315,1965.

DOLL R., HOLLAND W.W., CARTER C.O.-The mortality from leukemia and other cancers among patients with Down's syndrome (mongols) and their parents. *Brit. J. Cancer*, 16, 177-186, 1962.

DOUGAN L., WOODLIFF H.J.-Presence of two Ph^I chromosomes in cells from a patient with chronic granulocytic leukemia. *Nature*, 205, 405-406, 1965.

DOUGAN L., SCOTT I.D., WOODLIFF H.J.-A pair of twins, one of whom has chronic granulocytic leukemia. *J. Med. Genet.*, 3, 217-219, 1966.

DRUEZ J.-Communication personnelle, 1967.

DUSTIN P.-Leçons d'anatomie pathologique générale. I vol., 660 pp., Presses Académiques Européennes, Bruxelles, 1966.

EL-ALFI O.S., SMITH P.M., DIESELS J.J.-Chromosomal breaks induced by an agent in the plasma of infectious hepatitis patients. *Hereditas*, 52, 285-295, 1965.

ELMORE S.M., NANCE W.E., MCGEE B.J., ENGEL-DEMONTMOLLIN M., ENGEL E.-Pycnodysostosis, with a familial chromosome anomaly. *Amer. J. Med.*, 40, 273-282, 1966.

ELVES M.W., ISRAELS M.C.G.-Chromosomes and serum proteins: a linked abnormality. *Brit. Med. J.*, 1, 1024-1026, 1963.

ELVES M.W., BUTTOO S.A., ISRAELS M.C.M.G., WILKINSON J.F.-Chromosome changes caused by 6-azauridine during treatment of acute myeloblastic leukemia. *Brit. Med. J.*, 1, 156-159, 1953.

ELVES M.W., ISRAELS M.C.G.-Cytogenetic studies in unusual forms of chronic myeloid leukemia. *Acta Haemat.*, 38, 129-141, 1967.

ENGEL E.-Chromosomes in aleukemic leukemia. *Lancet*, ii, 1242, 1965.

ENGEL E., HAMMOND D.D., EITZMAN D.V., PEASON H., KRIVITT W.-Transient congenital leukemia in 7 infants with mongolism. *J. Pediat.*, 65, 303-305, 1964.

ENGEL E., JENKINS D.E., TIPTON R.E., MCGEE B.J., ENGEL M.- Ph^I positive chronic myelogenous leukemia with absence of another G chromosome, in a male. *New Engl. J. Med.*, 273, 738-742, 1965.

ENGEL E., MCGEE R.J., HARTMANN R.C., ENGEL-DEMONTMOLLIN M.-Two leukemic peripheral blood stemlines during acute transformation of chronic myelogenous leukemia in a D/D translocation carrier. *Cytogenetics*, 4, 157-170, 1965.

ENGEL E., MCGEE B.J.-Double Ph^I chromosome in leukemia. *Lancet*, ii, 337, 1966.

ERKMAN B., CROOKSTON J., CONEN P.E.-Double Ph^I chromosomes in leukemia. *Lancet*, 1, 368-369, 1966.

FAVRET E.-Spontaneous and induced mutations of barley for the reaction to mildew. *Hereditas*, 46, 20-28, 1960.

FERGUSON SMITH M.A., HANDMAKER S.D.-Observations on the satellited human chromosomes. *Lancet*, 1, 638-640, 1961.

FERGUSON SMITH M.A., MCKAY I.R.-Macroglobulinemia with chromosome anomaly. *Aust. Ann. Med.*, 12, 197-201, 1963.

FERNANDEZ A.-Sur le comportement d'un chromosome surnuméraire pendant la mitose. *Scientia Genetica*, 1, 23-39, 1939.

FERRIER P.E.-Stability of sex-chromosome mosaicism in man. *Am. J. Hum. Genet.*, 18, 614-615, 1966.

FIALKOW P.J.-Autoimmunity: a predisposing factor to chromosomal aberrations? *Lancet*, 1, 474, 1964.

FIALKOW P.J.-"Immunologic" oncogenesis. *Blood*, 30, 388-394, 1967.

FITZGERALD P.H., ADAMS A., GUNZ F.W.-Chronic granulocytic leukemia and the Philadelphia chromosome. *Blood*, 21, 183-196, 1963.

FITZGERALD P.H., GUNZ F.W.-Chromosomal abnormality and the chronic lymphocytic leukemia. *Lancet*, 11, 150, 1964.

FITZGERALD P.H., ADAMS A., GUNZ F.W.-Chromosome studies in familial leukemia. *J. Med. Genet.*, 3, 96-100, 1966.

FITZGERALD P.H., ADAMS A., GUNZ F.W.-Chromosome studies in adult acute leukemia. *J. Nat. Cancer Inst.*, 32, 395-417, 1964.

FITZGERALD P.H., CROSSEN P.E., ADAMS A.C., SHARMAN C.V., GUNZ F.W.-Chromosome studies in familial leukemia. *J. Med. Genet.*, 3, 96-100, 1966.

FITZGERALD P.H.-Abnormal length of the small acrocentric chromosomes in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res.*, 25, 1904-1909, 1965.

FORD C.E., JACOBS P.A., LAJTHA L.G.-Human somatic chromosomes. *Nature*, 181, 1565-1568, 1958.

FORD C.E., MOLE R.H.-Chromosome studies in human leukemia. *Lancet*, 11, 732, 1959.

FORD C.E., CLARKE M.-Cytogenetic evidence of clonal proliferation in primary reticular neoplasms. In: *Canad. Cancer Conf.*, 5 129-146, 1963 (Academic Press).

- FORNI A., MOREO L.-Cytogenetic studies in a case of benzene leukemia. *Europ. J. Cancer*, 3, 251-255, 1967.
- FRACCARO M., KAIJSER K., LINDSTEN J.-Somatic chromosome complement in continuously cultured cells of two individuals with gonadal dysgenesis. *Ann. Hum. Gen.*, 24, 45-61, 1960.
- FRACCARO M., LINDSTEN J.-Endoreduplication of chromosomes. *Lancet*, ii, 822, 1964.
- FREI E., TJIO J.H., WHANG J., CARBONE P.P.-Studies of the Philadelphia chromosome in patients with chronic myelogenous leukemia. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 113, 1073-1080, 1964.
- FRIEDMAN B.I., SAENGER E.L., KREINDLER N.S.-Endoreduplication in leukocyte chromosomes. Preliminary report of its relation to cancer and whole body irradiation. *Lancet*, ii, 494-495, 1964.
- GERMAN J.L., BIRO C.E., BEARN A.G.-Chromosomal abnormalities in Waldenström's macroglobulinemia. *Lancet*, ii, 48, 1961.
- GOH K.O., SWISHER S.N.-Specificity of the Philadelphia chromosome. Cytogenetic studies in cases of chronic myelocytic leukemia and myeloid metaplasia. *Ann. Intern. Med.*, 61, 609-624, 1964.
- GOH K.O., SWISHER S.N., TROUP S.P.-Submetacentric chromosome in chronic myelocytic leukemia. *Arch. Intern. Med.*, 114, 439-443, 1964.
- GOH K.O., SWISHER S.N., ROSENBERG C.A.-Cytogenetic studies in eosinophilic leukemia. The relationship of eosinophilic leukemia and chronic myelocytic leukemia. *Ann. Int. Med.*, 62, 80-86, 1965.
- GRIPENBERG U.-Chromosome studies in some virus infections. *Hereditas*, 54, 1-18, 1965.
- GRIPENBERG U.-The cytological behaviour of a human ring chromosome. *Chromosoma*, 20, 284-289, 1967.
- GROUCHY J. de, LAMY M.-Délétion partielle d'un chromosome moyen dans une leucémie aigüe lymphoblastique. *Rev. Franç. Et. Clin. Biol.*, 7, 639, 1962.
- GROUCHY J. de, DE NAVA C., BILSKI-PASQUIER G.-Duplication d'un Ph^I et suggestion d'une évolution clonale dans une leucémie myéloïde chronique en transformation aigüe. *Nouv. Rev. Franç. Hémat.*, 5, 69-78, 1965.
- GROUCHY J. de, DE NAVA C., CANTU J., BILSKI-PASQUIER G., BOUSSER J.-Models for clonal evolution: a study of chronic myelogenous leukemia. *Amer. J. Human Genet.*, 18, 485-503, 1966.
- GROUCHY J. de, DE NAVA C., BILSKI-PASQUIER G., ZITTOUN R., BERNADOU A.-Endoreduplication sélective d'un chromosome surnuméraire dans un cas de myélome multiple (maladie de Kahler). *Ann. Génét.*, 10, 43-45, 1967.

- GUNZ F.W., FITZGERALD P.H., ADAMS A.-An abnormal chromosome in chronic lymphocytic leukemia. *Brit. Med. J.*, ii, 1097-1099, 1962.
- GURDON J.-Second Course on Advances in Embryology (N.A.T.O., Palermo, 1967).
- HALL B.-Delayed ontogenesis in human trisomy syndromes. *Hereditas*, 52, 334-344, 1965.
- HAMMOUDA F.-Chromosome abnormality in acute leukemia. *Lancet*, ii, 410-411, 1963.
- HAMMOUDA F., QUAGLINO D., HAYHOE F.G.J.-Blastic crisis in chronic granumocytic leukemia: cytochemical, cytogenetic and autoradiographic studies in four cases. *Brit. Med. J.*, i, 1275-1281, 1964.
- HAMPAR B., ELLISON J.-Chromosomal aberration induced by an animal virus. *Nature*, 192, 145-149, 1961.
- HAMPEL K.E.-Diplo Ph^I chromosome in myeloid leukemia. *Klin. Wschr.*, 42, 522-524, 1964.
- HARNDEN D.G.-Cytogenetic studies on patients with virus infections and subjects vaccinated against yellow fever. *Am. J. Hum. Genet.*, 16, 204-213, 1964.
- HAUSMAN-HAGEMAIJER A., FRADERIC J., DODINVAL P.-Un cas de mosaïcisme avec grand chromosome surnuméraire. *Humangenetik*, 2, 52-62, 1966.
- HAYFLICK L., MOORHEAD P.S.-Human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.*, 25, 585-621, 1961.
- HAYFLICK L.-Cell culture and the aging phenomenon. In: *Topics in the biology of ageing*. Ed. by P.L. Krohn, p. 83-100, 1965 (Interscience Publ., N.Y., London).
- HEATH C.W.-Cytogenetic observations in vitamin B12 and folate deficiency. *Blood*, 27, 800-815, 1966.
- HEATH C.W., MOLONEY W.C.-The Philadelphia chromosome in an unusual case of myeloproliferative disease. *Blood*, 26, 471-478, 1965.
- HENI F., SIEBNER H.-Chromosomen Veränderungen bei der Makroglobulinämie Waldenström. *Dtsch. Med. Wschr.*, 88, 1781, 1963.
- HIRSCHHORN K., BACH F., KOLODNY R.C., FIRSHEIN I.L., HASHEM N.-Immune response and mitoses of human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Science*, 142, 1185-1187, 1963.
- HIRSCHHORN K., HIRSCHHORN R.-Role of lysosomes in the lymphocyte response. *Lancet*, i, 1046-1047, 1965.

- HOLLAND W.W., DOLL R., CARTER C.O.-The mortality from leukemia and other cancers among patients with Down's syndrome (mongols) and among their parents. *Brit. J. Cancer*, 11, 177-186, 1962.
- HOLLAND P., MAUER A.M.-Drug induced in vitro stimulation of peripheral lymphocytes. *Lancet*, i, 1368-1369, 1964.
- HONDA F., PUNNETT H., CHERNEY E., MILLER G., THIEDE H.A.-Serial cytogenetic and hematologic studies on a mongol with trisomy 21 and acute congenital leukemia. *J. Pediat.*, 65, 880, 1964.
- HOUSTON E.W., LEVIN W.C., RITZMAN S.E.-Endoreduplication in untreated early leukemia. *Lancet*, ii, 496-497, 1964.
- HOUSTON E.W., RITZMAN S.E., LEVIN W.C.-Untreated chronic myelocytic leukemia associated with an unusual chromosome pattern. *Ann. Int. Med.*, 61, 696-702, 1964.
- HOUSTON E.W., RITZMAN S.E., LEVIN W.C.-Chromosomal aberrations common to three types of monoclonal gammopathies. *Blood*, 20, 214-232, 1967.
- HUENS E.R., PHILIPS M., WHITE W.F.-Nuclear abnormalities of the neutrophils in D₁ (13-15) trisomy syndrome. *Lancet*, i, 589-590, 1964.
- HUNGERFORD D.A., DONNELLY A.J., NOWELL P.C., BECK S.-The chromosome constitution of a human phenotypic intersex. *Am. J. Hum. Genet.*, 11, 215-236, 1959.
- HUNGERFORD D.A., NOWELL P.C.-Chromosome studies in human leukemia. I. Acute leukemia in children. *J. Nat. Cancer Inst.*, 27, 983-1013, 1961.
- HUNGERFORD D.A., NOWELL P.C.-Chromosome studies in human leukemia. III. Acute granulocytic leukemia. *J. Nat. Cancer Inst.*, 29, 545-565, 1962.
- ILBERY P.L.T., AHMED A.-An extra small acocentric chromosome in a case of acute monocytic leukemia. *Med. J. Aust.*, 52, 330-352, 1965.
- IVERSEN T.-Leukemia in infancy and childhood. A material of 570 Danish cases. *Acta Paed. Scand.*, suppl. 167, 219 pp., 1966.
- IZAWA M., ALLFREY V.G., MIRSKY A.E.-Composition of the nucleus and chromosomes in the lampbrush stage of the newt oocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 50, 811-817, 1963.
- JACOBS P.A., BRUNTON M., COURT BROWN W.M., DOLL R., GOLDSTEIN H.-Change of human chromosome count distributions with age: evidence for a sex difference. *Nature*, 197, 1080, 1963.
- JACOBS P.A., TOUGH I.M., WRIGHT O.H.-Cytogenetic studies in Burkitt's lymphoma. *Lancet*, ii, 1144-1146, 1963.

JACOBS E.M., LUCE J.K., CAILLEAU R.-Chromosome abnormalities in human cancer. Report of a patient with chronic granulocytic leukemia and his non-leukemic monozygotic twin. *Cancer*, 19, 869-876, 1966.

JOHNSTON A.W.-Chromosomes in a child with mongolism and acute leukemia. *New Engl. J. Med.*, 265, 591-594, 1961.

KAPLOW L.S.-A histochemical procedure for localizing and evaluating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow. *Blood*, 10, 1023, 1955.

KAY H.E.M., LAWLER S.D., MILLAERD R.E.-The chromosomes in polycythemia vera. 8th Congress Europ. Soc. Haemat., Vienna 1961, p. 91 (Ed.: Karger, Basel). *Brit. J. Hemat.*, 12, 507-528, 1966.

KEMP N.H., STAFFORD J.L., TANNER R.K.-Cytogenetic studies of polycythemia vera. 8th Congress Europ. Soc. Haemat., Vienna 1961, p. 92 (Ed.: Karger, Basel).

KEMP N.H., STAFFORD J.L., TANNER R.K.-Chromosome studies during early and terminal chronic myeloid leukemia. *Brit. J. Med.*, 1, 1010-1014, 1964.

KENIS Y., KOULISCHER L.-Etude clinique et cytogénétique de 21 patients atteints de leucémie myéloïde chronique. *Europ. J. Cancer*, 1, 83-93, 1967.

KIKUCHI Y., SANDBERG A.A.-Chronology and pattern of human chromosome replication. I. Blood leukocytes of normal subjects. *J. Nat. Cancer Inst.*, 32, 1109-1143, 1964.

KINLOUGH M.A., ROBSON H.N.-Study of chromosomes in human leukemia by a direct method. *Brit. Med. J.*, 11, 1052-1055, 1961.

KIOSSOGLOU K.A., MITUS W.J., DAMESHEK W.-Chromosomal aberrations in acute leukemia. *Blood*, 26, 610-614, 1965.

KIOSSOGLOU K.A., ROSENBAUM E., MITUS W.J., DAMESHEK W.-Multiple chromosome aberrations in Down's syndrome associated with twinning and acute leukemia. *Lancet*, 11, 944-945, 1963.

KOLLER P.C.-The possible role of genetic factors in carcinogenesis. *Europ. J. Cancer*, 3, 279-287, 1967.

KOPROWSKI H., PONTEN J.A., JENSEN F., RAVDIN R.G., MOORHEAD P.S., SAKSELA E.-Transformation of cultures of human tissue infected with simian virus S.V. 40. *J. Cell. Comp. Phys.*, 59, 281-292, 1962.

KOSSONO N., KAMATA S.-A study of chromosomes in haematologic disorders. *Acta Hemat. Jap.*, 27, 263, 1964.

KOULISCHER L.-Le cycle de spiratisation des chromosomes mitotiques humains. *Arch. Biol.*, 74, 391-413, 1963.

- KOULISCHER L.-Mitotic chromatid separation in a case of acute leukemia. *Europ. J. Cancer*, 2, 347-352, 1966.
- KOULISCHER L.-Remaniements chromosomiques chez une technicienne en radiologie (observation non publiée).
- KOULISCHER L., STENUIT J., KETELAER P.-La croissance "in vitro" de leucocytes de malades atteints de sclérose en plaques. *Acta Neur. Psych. Belg.*, 66, 274-288, 1966.
- KOULISCHER L., FRUHLING J., HENRY J.-Observations cytogénétiques dans la maladie de Vaquez. *Europ. J. Cancer*, 3, 193-201, 1967.
- KRIVITT W., GOOD R.A.-The simultaneous occurrence of leukemia and mongolism. *Am. J. Dis. Child.*, 91, 218-222, 1956.
- KRIVITT W., GOOD R.A.-Simultaneous occurrence of mongolism and leukemia. *Am. J. Dis. Child.*, 94, 289-294, 1957.
- KULAKOWSKI S., KOULISCHER L., MERCKEN J.-Etude clinique et cytogénétique d'un cas de mosaïcisme formé d'une lignée normale et d'une lignée trisomique pour un chromosome du groupe 16-18. *Arch. Franç. Péd.*, 23, 47-56, 1966.
- LANCET, note éditoriale.-Endoreduplication, polyploidy and leukemia. *Lancet*, ii, 511-513, 1964.
- LAWLER S.D.-Chromosomes et transformation aigüe des leucémies myéloïdes chroniques. *Nouv. Rev. Franç. Hémat.*, 7, 529-535, 1967.
- LAWLER S.D., GALTON D.A.G.-Chromosome changes in the terminal stages of chronic granulocytic leukemia. *Acta Med. Scand.*, suppl. 445, 312-318, 1966.
- LEEKSMAN C.H.W., FRIDEN-KILL L., BROMMER E.J.P., NEUBERG C.W., KERKHOF H.-Chromosomes in premyeloid leukemia. *Lancet*, ii, 1299, 1965.
- LEIKIN S.L., BAZELON M., PARK K.H.-In vitro lymphocyte transformation in ataxia telangiectasia. *J. Ped.*, 68, 477, 1966.
- LEJEUNE J., 1965.-In: R. Turpin et J. Lejeune: Les chromosomes humains. Gauthiers-Villars éd., 535 pp., 1965.
- LEJEUNE J., GAUTHIER M., TURPIN R.-Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *C.R. Acad. Sci.*, 248, 1721-1722, 1959.
- LEJEUNE J., BERGER R., HAINES M., LAFOURCADE J., VIALATTE J., SATGE P., TURPIN R. Constitution d'un clone à 54 chromosomes au cours d'une leucoblastose chez une enfant mongolienne. *C.R. Acad. Sci.*, 256, 1195-1197, 1963.

- LEJEUNE J., BERGER R., CAULLE B., TURPIN R.-Evolution chromosomique d'une leucémie myéloïde chronique. *Ann. Génét.*, 8, 44-49, 1965.
- LEJEUNE J., RETHORE M.O., BERGER R., BAHEUX G., CHABRAN J.-Sur un cas de chromosome 18 en anneau. *Ann. Génét.*, 9, 173-175, 1966.
- LEJEUNE J., BERGER R., RETHORE M.O.-Sur l'endoréduplication sélective de certains segments du génome. *C.R. Acad. Sci.*, 263, 1880-1882, 1966.
- LEVAN A., HAUSCHKA T.S.-Endomitotic reduplication mechanism in ascites tumors of the mouse. *J. Nat. Cancer Inst.*, 14, 1-43, 1953.
- LEVAN A.-Some current problems of cancer cytogenetics. *Hereditas*, 57, 343-355, 1967.
- LEVIN W.C., HOUSTON E.W., RITZMAN S.E.-Polycythemia vera with Ph^I chromosome in two brothers. *Blood*, 30, 503-512, 1967.
- LEWIS F.J.W., FRASER I.C., McTAGGART M.-An abnormal chromosomal pattern in myelomatosis. *Lancet*, ii, 1013-1015, 1963.
- LEWIS F.J.W., POULDING R.H., EASTHAM R.D.-Acute leukemia in an XO/XXX mosaic. *Lancet*, ii, 306, 1963.
- LEWIS F.J.W., McTAGGART M., ANDREWS M.I.J.-Chromosome studies in acute leukemia. *J. Clin. Path. (abstract)*, 17, 475-476, 1964.
- LI J.G., OSGOOD E.E.-A method for the rapid separation of leukocytes and nucleated erythrocytes from blood and marrow with a phytohemagglutinin from red beans (*Phaseolus vulgaris*). *Blood*, 4, 670-674, 1949.
- LINDALL-KIESSLING K., BOOK J.A.-Effects of phytohemagglutinin on leukocytes. *Lancet*, ii, 591, 1964.
- LIPSETT M.B.-Humoral syndromes associated with cancer. *Cancer Res.*, 25, 1068-1073, 1965.
- LUBBS H.A., SALMON J.H., FLANIGAN S.-Studies of a glial tumor with multiple minute chromosomes. *Cancer*, 19, 591-600, 1966.
- LUSTMAN F., STOFFELS-DE SAINT GEORGES A., ARDICHVILI D., KOULISCHER L., DEMOL H.-La macroglobulinémie de Waldenström. *Acta Clin. Belg.*, 23, 67-96, 1968.
- LYCETTE R.R., PEARMAIN G.E.-Further observations on antigen-induced mitosis. *Lancet*, ii, 386, 1963.
- LYNCH H.T.-Hereditary factors in carcinoma. I vol., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1967.

- LYON M.F.-Gene action in the X-chromosome of the mouse. *Nature*, 190, 272-273, 1961.
- McDIARMID W.D.-Chromosomal changes following treatment of polycythaemia with radioactive phosphorus? *Quart. J. Med.*, 34, 133, 1965.
- McKINNEY A.A., STOHLMAN F., BRECHER G.-The kinetics of cell proliferation in cultures of human peripheral blood. *Blood*, 19, 349-358, 1962.
- McLEAN N., HARNDEN D.G., COURT BROWN W.M., BOND J., MANTLE D.J. -Sex chromosome abnormalities in newborn babies. *Lancet*, i, 286-290, 1964.
- MAKINO S., KANO K.-Cytological studies on cancer. II. Daily observations on the mitotic frequency and the variation of the chromosome number in tumor cells of the Yoshida sarcoma through a transplant generation. *J. Fac. Sci. (Hokkaido)*, 10, 225-242, 1951.
- MAKINO S., AWA A.A.-Chromosome breakage in four chronic myeloid leukemia patients. *Hereditas*, 52, 253-264, 1965.
- MATTHEY R.-Etudes sur les chromosomes d'*Ellobius lutescens* (Mammalia-Muridae-Microtinae). *Cytogenetics*, 1, 180-195, 1962.
- MELLMAN W.J., OSKI F.A., TEDESCO T.A., MACIERA-COELHO A., HARRIS H.-Leucocyte enzymes in Down's syndrome. *Lancet*, ii, 674-675, 1964.
- MENZIES R.C., CROSSEN P.E., FITZGERALD P.H., GUNZ F.W.-Cytogenetic and cytochemical studies on marrow cells in B₁₂ and folate deficiency. *Blood*, 28, 581-594, 1966.
- MERRIT D.H., HARRIS J.S.-Mongolism and acute leukemia. *Amer. J. Dis. Child.*, 92, 41-44, 1956.
- MILLER O.J., BREG W.R., SCHMICKEL R.D., TRETTER W.A.-A family with an XXXXY male, a leukemic male, and two 21-trisomic mongoloid females. *Lancet*, ii, 78-79, 1961.
- MOORHEAD P.S.-Approaches to the genetic analysis of mammalian cells. Chromosome morphology as a genetic marker. *Univ. Mich. Med. Bull.*, 28, 294-312, 1962.
- MOORHEAD P.S., NOWELL P.S., MELLMAN W.J., BATTIPS D.M., HUNGERFORD D.E.-Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.*, 20, 612-617, 1960.
- MOORHEAD P.S., DEFENDI V.-Asynchrony of DNA synthesis in chromosomes of human diploid cells. *J. Cell. Biol.*, 16, 202-209, 1963.

- MOORHEAD P.S., SAKSELA E.-The sequence of chromosome aberrations during SV40 transformation of a human diploid cell strain. *Hereditas*, 52, 271-284, 1965.
- MOUTSCHEN J.-Les effets cytogénétiques des composés alkane sulfonates d'alkyl. Thèse, Université de Liège, Faculté des Sciences, I vol., 1964.
- NANCE W.E., ENGEL E.-Autosomal deletion mapping in man. *Science*, 155, 692-694, 1967.
- NASJLETI L.E., WALDEN J.M., SPENCER H.H.-Polyploidy and endoreduplication in non-leukemic patients. *New Engl. J. Med.*, 272, 250-251, 1965.
- NICHOLS W.W.-Relationships of viruses, chromosomes and carcinogenesis. *Hereditas*, 50, 53-80, 1963.
- NICHOLS W.W., LEVAN A., HALL B., OSTERGREEN C.-Measles associated chromosome breakage. Preliminary communication. *Hereditas*, 48, 367-370, 1962.
- NICHOLS W.W., HENEEN W.K.-Chromosomal effects of arabinosylcytosine in a human diploid cell strain. *Hereditas*, 52, 402-410, 1965.
- NICHOLS W.W., LEVAN A., HENEEN W.K.-Studies on the role of viruses in somatic mutations. *Hereditas*, 57, 365-368, 1967.
- NICOARA S., BUTOIANU E., BROSTEANU R.-Specificity of the Ph^I chromosome. *Lancet*, ii, 1312-1313, 1967.
- NORMAN A., SASAKI M., OTTOMAN R.E., VEOMETT R.C.-Chromosome aberrations in radiation workers. *Radiat. Res.*, 23, 282-289, 1964.
- NOTE EDITORIALE.-*Ann. Génét.*, 10, 153, 1967.
- NOWELL P.C.-Phytohaemagglutinin: an initiator of mitoses in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res.*, 20, 462-466, 1960.
- NOWELL P.C.-Inhibition of human leukocyte mitoses by prednisolone in vitro. *Cancer Res.*, 21, 1518-1521, 1961.
- NOWELL P.C., HUNGERFORD D.A.-A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*, 132, 1497, 1960a.
- NOWELL P.C., HUNGERFORD D.A.-Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J. Nat. Cancer Inst.*, 25, 85-109, 1960b.
- NOWELL P.C., HUNGERFORD D.A.-Chromosome studies in human leukemia. IV. Myeloproliferative syndrome and other atypical myeloid disorders. *J. Nat. Cancer Inst.*, 29, 911-931, 1962.

OHNO S.-Properties of the X-chromosome.Lancet,ii,723-724,1961.

OPPENHEIM J.J.,WHANG J.,FREI E. III.-Immunologic and cytogenetic studies of chronic lymphocytic leukemia cells.Blood,26,I2I-I32,1965.

OPPENHEIM J.J.,BARLOW M.,WALDMANN T.A.,BLOCK J.B.-Imapired in vitro lymphocyte transformation in patients with ataxia-telengectasia.Brit. Med. J.,ii,330-333,1966.

OSAMURA S.,KAWANISHI M.,DADCHI M.-Chromosome abnormality in a patient with erythroleukemia.Med. Biol. (Tokyo),69,I09-II2,1964.

PATAU K.-The identification of individual chromosomes,especially in man. Am. J. Hum. Gen.,12,250-276,1960.

PEARMAN G.E.,LYCETTE R.R.,FTZGERALD P.H.-Tuberculin induced mitosis in peripheral blood cultures.Lancet,i,637-638,1963.

PEARSON H.A.,GRELO F.W.,CONE T.E. Jr.-Leukemia in identical twins.New Engl. J. Med.,268,II5I-II56,1963.

PEDERSEN B.-Two cases of chronic myeloid leukemia with presumably identical 47-chromosome cell-lines in the blood.Acta Path. Microbiol. Scand.,61,497-502,1964.

PENROSE L.S.,SMITH G.F.-Down's anomaly.I vol.,2I8 pp.Ed.:J. and A. Churchill.

PERGORARO L.,PILERI A.,GAVOSTO F.-Chromosome abnormalities in a case of acute leukemia with bone marrow aplasia.Haemat. (Pavia),48,7I3-7I9,1963.

PETIT P.-Mosaïcisme normal/trisomie 2I chez une petite fille.Communication personnelle,1967.

PETIT P.,PONCELET R.-Un nouveau cas de chromosome I8 en anneau (I8r). Ann. Génét.,10,I34-I37,1967.

PETIT P.,CAUCHIE J.,VRYENS P.,KUOLISCHER L.-Etude cytogénétique d'un patient présentatnt une macroglobulinémie de Waldenström.Acta Clin. Belg. (sous presse).

PETIT P.,MAURUS R.,RICHARD J.,KOULISCHER L.-Chromosome 5p- chez un trisomique 2I présentant une leucémie aiguë. Ann. Génét.,11,I25-I28,1968.

PFEIFFER R.A.,KOSENOW W.,BAUMER A.-Chromosomen Untersuchungen an Blutzellen eines Patienten mit Makroglobulinemie Waldenström.Klin. Wschr.,40,342-344,1962.

- PILERI A., PERGORARO L., GAVOSTO F.-Cytogenetical and proliferative characteristics of acute promyelocytic leukemia cells. *J. Europ. Cancer*, 2, 189-192, 1966.
- PORTER K.A., COOPER E.H.-Recognition of transformed small lymphocytes by combined chromosomal and isotopic labels. *Lancet*, ii, 317-319, 1962.
- PULVERTAFT R.J.F.-Phytohaemagglutinin in relation to Burkitt's tumor. *Lancet*, ii, 552-554, 1964.
- RANDALL D.C., REIQUAM C.W., GITHENS J.H., ROBINSON A.-Familial myeloproliferative disorder. A new syndrome closely ~~related~~ simulating myelogenous leukemia in childhood. *Amer. J. Dis. Child.*, 110, 479-500, 1965.
- REISMAN L.E., ZUELZER W.W., MITANI M.-Endoreduplication in a patient with acute monocytic leukemia. *Lancet*, ii, 1038-1039, 1963.
- REISMAN L.E., TRUJILLO J.M.-Chronic granulocytic leukemia of childhood. *J. Pediat.*, 62, 710-723, 1963.
- REISMAN L.E., TRUJILLO J.M., THOMPSON R.I.-Further observations on the role of aneuploidy in acute leukemia. *Cancer Res.*, 24, 1448-1455, 1964.
- RICCI N.-Chromosomal anomaly in a case of erythroleukemic syndrome. *Progr. Med. (Napoli)*, 21, 309-317, 1965.
- RIGAS D.A., OSGOOD E.E.-Purification and properties of the phytohemagglutinin. *J. Biol. Chem.*, 212, 607, 1955.
- ROSS J.D., ATKINS L.-Chromosomal anomaly in a mongol with leukemia. *Lancet* ii, 612-613, 1963.
- ROSS J.D., MOLONEY W.C., DESFORGES J.F.-Ineffective regulation of granulopoiesis masquerading as congenital leukemia in a mongoloid child. *J. Ped.*, 63, 1-10, 1963.
- ROWLEY J.D., BLAISDELL R.K., JACOBSON L.O.-Chromosome studies in preleukemia. I. Aneuploidy of group C chromosomes in 3 patients. *Blood*, 27, 782-799, 1966.
- RUDKIN C.T., HUNGERFORD D.A., NOWELL P.C.-DNA contents of chromosome Ph^I and chromosome 21 in human chronic granulocytic leukemia. *Science*, 144, 1229-1231, 1964.
- RUFFIE J., LEJEUNE J.-Deux cas de leucose aiguë myéloblastique avec cellules sanguines normales et cellules haplo (21 ou 22). *Rev. Franç. Et. Clin. Biol.*, 7, 644-647, 1962.

RYAN T.J., BODDINGTON M.M., SPRIGGS A.I.-Chromosomal abnormalities produced by folic acid antagonism. Brit. J. Derm., 77, 541-545, 1965.

SANCHEZ-CASCOS A., BARREIRO E.-Ph^I chromosome and 5-12 translocation in a case of chronic myeloid leukemia. Blood, 24, 716-725, 1964.

SANDBERG A.A.-The chromosomes and causation of human cancer and leukemia. Cancer Res., 26, 2064-2081, 1966.

SANDBERG A.A., ISHIHARA T., MIWA T., HAUSCHKA T.S.-The in vivo constitution of marrow from 34 human leukemias and 60 non-leukemic controls. Cancer Res., 21, 678-689, 1961.

SANDBERG A.A., TAKAOKI I., CROSSWHITE L.H., HAUSCHKA T.S.-Comparison of chromosome constitution in chronic myelocytic leukemia and other myeloproliferative disorders. Blood, 20, 393-423, 1962.

SANDBERG A.A., KIKUCHI Y., CROSSWHITE L.H.-Mitotic ability of leukemic leukocytes in chronic myelocytic leukemia. Cancer Res., 24, 1468-1473, 1964a.

SANDBERG A.A., ISHIHARA T., CROSSWHITE L.H.-Group C trisomy in myeloid metaplasia with possible leukemia. Blood, 24, 716-725, 1964b.

SANDBERG A.A., CORTNER J., TAKAGI N., MOGHADAN M.A., CROSSWHITE L.H.-Differences in chromosome constitution of twins with acute leukemia. New Engl. J. Med., 275, 809-812, 1966.

SCHADE H., SCHOELLER L., SCHULTZE K.W.-D-trisomic (Patau-syndrome) mit kongenitaler myeloischer Leukämie. Med. Welt, , 2690-2692, 1962.

^H
SCHMID W.-DNA replication pattern of human chromosomes. Cytogenetics, 2, 175-193, 1963.

SCHMID W., HATFIELD D.-Normal karyotype/translocation mosaic. Cytogenetics, 1, 210-216, 1962.

SCHROEDER T.M., BOCK H.E.-Trisomie des Ph^I-Chromosoms in Myeloblasten während der terminaler Phase einer chronisch myeloischen Leukämie. Humangenetik, 1, 681-685, 1965.

SCHUNK G.J., LEHMAN W.L.-Mongolism and congenital leukemia. J. AM. Med. Ass., 155, 250, 1954.

^H
SCHWARZACHER H.G., SCHNEDL W.-Position of labelled chromatids in diplochromosomes of endoreduplicated cells after uptake of tritiated thymidine. Nature, 209, 107-108, 1966.

SIEBNER H., KLAUS D., HENI F.-Ein extra-Chromosomen bei der Pelger Huetschen Kernanomalie. *Med. Welt*, 16, 877-883, 1963.

SORIEUL S., EPHRUSSI B.-Karyological demonstration of hybridization of mammalian cells in vitro. *Nature*, 190, 653-654, 1961.

SPEED D., LAWLER S.-Chronic granulocytic leukemia: the chromosome and the disease. *Lancet*, i, 403-408, 1964.

SPENGLER G.A., SIEBNER H., RIVA G.-Chromosomal abnormalities in macroglobulinemia Waldenström: discordant findings in uniovular twins. *Acta Med. Scand.*, suppl. 445, 132-139, 1966.

SPIERS A.S.D., BAIKIE A.G.-Chronic granulocytic leukemia: demonstration of the Philadelphia chromosome in cultures of spleen cells. *Nature*, 208, 497, 1965.

STEWART A.M., WEBB J., HEWITT D.-A survey of childhood malignancies. *Brit. Med. J.*, ii, 1495-1508, 1958.

STICH H.F., VANHOOSIER G.L., TRENTIN J.J.-Viruses and mammalian chromosomes. Chromosome aberrations by adenovirus type 12'. *Exp. Cell Res.*, 34, 400-403, 1964.

STICH W., BACK F., DORMER P., TSIRIMBAS A.-Doppel Philadelphia Chromosom und Isochromosom 17 in der terminalen Phase der chronischen myeloischen Leukämie. *Klin. Wschr.*, 44, 334-337, 1966.

TANZER J.-Les examens chromosomiques dans les hémopathies malignes. *Revue du Praticien*, 17, 1373-1385, 1967.

TEPLITZ R.L., ROSEN R.B., TEPLITZ M.R.-Granulocytic leukemia, Philadelphia chromosome and leukocyte alkaline phosphatase. *Lancet*, ii, 418-419, 1964.

TEPLITZ R.L.-Regulation of alkaline leukocyte phosphatase and the Philadelphia chromosome. *Nature*, 209, 821-822, 1966.

TJIO J.H., LEVAN A.-The chromosome number of Man. *Hereditas*, 42, 1-6, 1956.

TJIO J.H., CARBONE P.P., WHANG J., FREI E. III.-The Philadelphia chromosome and chronic myelogenous leukemia. *J. Natl. Cancer Inst.*, 36, 567-584, 1966.

TODARO G.J., GREEN H., SWIFT M.-Susceptibility of human diploid fibroblast strains to transformation by SV40 virus. *Science*, 153, 1252-1254, 1966.

TOUGH I.M., COURT BROWN W.M., BAIKIE A.G., BUCKTON K.E., HARNDEN D.C., JACOBS P.A., KING M.J., McBRIDE J.A.-Cytogenetic studies in chronic myeloid leukemia and acute leukemia associated with mongolism. *Lancet*, i, 411-417, 1961.

TOUGH I.M., COURT BROWN W.M., BAIKIE A.G., BUCKTON K.E., HARNDEN D.G., JACOBS P.A., WILLIAMS J.A.-Chronic myeloid leukemia. Cytogenetic studies before and after splenic irradiation. *Lancet*, ii, 115-120, 1962.

TOUGH I.M., JACOBS P.A., COURT BROWN W.M., BAIKIE A.G., WILLIAMSON E.R.D.-Cytogenetic studies on bone marrow in chronic myeloid leukemia. *Lancet*, i, 844-846, 1963.

TOUGH I.M., COURT BROWN W.M.-Chromosome aberrations and exposure to ambient benzene. *Lancet*, i, 684-686, 1965.

TRUJILLO J.M., OHNO S.-Chromosomal alteration of erythropoietic cells in chronic myeloid leukemia. *Ac a Haemat.*, 29, 311-316, 1963.

TRUBOWITZ S., KIRMAN D., MASEK B.-The leukocyte alkaline phosphatase in mongolism. *Lancet*, ii, 486-487, 1962.

TURPIN R., BERNYER G.-De l'influence de l'hérédité sur la formule d'Arneth (cas particulier du mongolisme). *Revue d'Hémat.*, 2, 189, 1947?

TYLER A.-Clues to the etiology, pathology and therapy of cancer provided by analogies with transplantation disease. *J. Nat. Cancer Inst.*, 25, 1197-1229, 1960.

VALDMANNIS A., MANN J.D.-Chromosome endoreduplication. *Lancet*, i, 1452-1453, 1964.

VALENTINE W.N., BECK W.S.-Leukocytes phosphatase activity in health, leukocytosis and myelocytic leukemia. *J. Lab. Clin. Med.*, 38, 39-55, 1951.

VERREESSEN H., VANDENBERGHE H., CREEMERS J.-Mosaic trisomy in phenotypically normal mother of mongol. *Lancet*, i, 526-527, 1964.

VIGLIANI E.C., SEITA G.-Benzene and leukemia. *New Engl. J. Med.*, 271, 872-876, 1964.

- VINCENT P.C., SINHA S., NEATE R., DENDULG G., TURNER B.-Chromosome abnormalities in a mongol with acute leukemia. *Lancet*, i, 1328-1329, 1963.
- WAHRMAN J., SCHAAP T., ROBINSON E.-Manifold chromosome abnormalities in leukemia. *Lancet*, i, 1098-1100, 1962.
- WHANG M., DESFORGES J.F.-The Philadelphia chromosome and galactose-1-phosphate uridyl transferase. *Blood*, 29, 790-799, 1967.
- WARKANY J., SCHBERT W.K., THOMPSON J.N.-Chromosome analysis in mongolism (Langdon-Down syndrome), associated with leukemia. *New Engl. J. Med.*, 268, 1-4, 1963.
- WATANABE S., TAKIZAMA S., YOKORO K., HIROSE F.-Incidence of leukemia in Hiroshima during the years 1946 to 1962. *Israel J. Med. Sci.*, 1, 787, 1965.
- WEINSTEIN A.W., WEINSTEIN D.E.-A chromosomal abnormality in acute leukemia. *New Engl. J. Med.*, 268, 253-255, 1963.
- WHANG J., FREI E. III., TJIO J.H., CARBONE P.P., BRECHER G.-The distribution of the Philadelphia chromosome in patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 22, 664-673, 1963.
- WINTER G.C.B., OSMOND D.G., YOFFEY J.M., MAHY D.J.-Leukocyte cultures with phytohemagglutinin in chronic lymphatic leukemia. *Lancet*, ii, 563-565, 1965.
- ZACHARSKI L.R., HILL R.W., McDONANDO J.E.-The lymphocyte. *Maya Clinics Proc.*, 42, 431-451, 1967.
- ZURHAUSEN H.-Chromosomal changes of similar nature in seven established cell lines derived from the peripheral blood of patients with leukemia. *J. Natl. Cancer Inst.*, 38, 683-696, 1967.

LEGENDE DES FIGURES.

Fig. 1.:caryotype humain normal.(a):caryotype masculin dont les chromosomes sont classés suivant la classification de Denver par paires. La formule sexuelle est XY.

(b):caryotype féminin normal,dont les chromosomes sont classés par groupes,de A à G.Les chromosomes sexuels sont de la dimension des autosomes du groupe C.

Fig. 2: Caryotypes de leucémie myéloïde chronique (phase chronique et crises blastiques). (a):Patient en phase chronique.Le chromosome Ph^I est désigné par une flèche:il s'agit d'un chromosome G ayant perdu la plus grande partie de ses bras longs.

(b)Crise blastique chez un patient avec une lignée à 47 chromosomes:on note la présence de 2 Ph^I .

(c):Patiente en crise blastique avec une lignée à 47 chromosomes,comportant un Ph^I et un G surnuméraires.

(d):Lignée à 49 chromosomes chez un patient montrant,outre le Ph^I ,un C,un E et un F surnuméraires.

Fig. 3: (a) :caryotype d'un fibrocyte de la peau d'une patiente atteinte de LMC.On note l'absence du Ph^I ,qui ne se retrouve qu'au niveau des cellules leucémiques.

(b) :Caryotype d'une cellule leucémique de la même patiente:on remarque le Ph^I .

(c) :caryotype d'une autre cellule de la même patiente,après traitement au ^{32}P .On remarque un chromosome dicentrique du groupe A, un chromosome B présentant une cassure,et un fragment acentrique, ainsi que l'absence d'un chromosome du groupe G.

(d) :chromosome 21q- semblable au Ph^I chez un enfant ploymalformé ne présentant pas de LMC.

Fig. 4: graphique montrant que, lorsqu'on groupe les cellules d'un cas déterminé en ne tenant compte que de la proportion de mitoses avec le chromosome de Philadelphie, plus cette proportion est élevée, plus grand est le nombre de cellules aneuploïdes. Ce phénomène est surtout évident lorsque la proportion de mitoses avec Ph^I dépasse 60%.

Fig. 5: graphique montrant la nette différence existant entre les numérations chromosomiques effectuées lors de la phase chronique de la LMC et lors des crises blastiques. Les cellules aneuploïdes sont beaucoup plus nombreuses lors des crises blastiques.

Fig. 6: caryotypes provenant de cellules médullaires de patients présentant diverses formes de leucémie aiguë.

(a): lignée à 48 chromosomes avec 2 G surnuméraires chez une femme.

(b): lignée à 48 chromosomes avec 2 C surnuméraires chez un homme.

(c): lignée à 49 chromosomes avec un B, un E et un F surnuméraires ne se distinguant en rien des chromosomes normaux des groupes correspondants.

(d): lignée hypodiploïde à 45 chromosomes avec un E manquant.

Fig. 7: mitose tétraploïde chez un patient de 21 ans non traité atteint de leucémie aiguë lymphoblastique.

Fig. 8: mitose d'un cas de leucémie aiguë, montrant un étalement centromérique des chromosomes et une séparation des chromatides à ce niveau. Ces images sont identiques pour les 2 chromosomes d'une même paire, ce qui permet de classer les chromosomes suivant la numérotation de Denver et non pas par groupes.

Fig. 9: (a): mitose d'une patiente présentant une maladie de Waldenström. On note la présence d'un grand autosome surnuméraire au niveau du groupe A.

(b): mitose du fils de la malade précédente: 45 chromosomes et une translocation D/D.



④ 46,XY

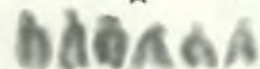


⑤ 46,XX

Fig. 1



A

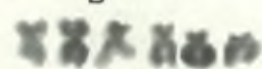


D

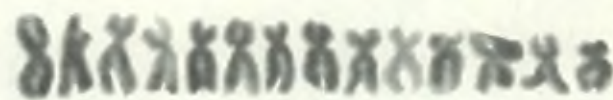
④ 46,XY,Ph¹.



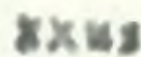
B



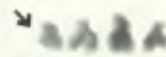
E



C



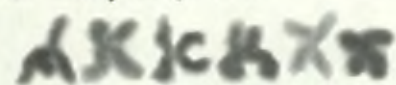
F



G



Y X

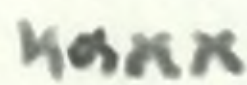


A



D

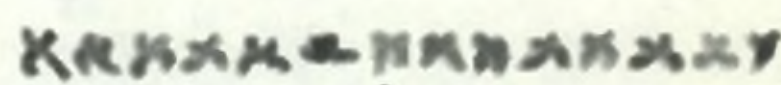
⑤ 47,XY,2 Ph¹.



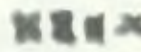
B



E



C



F



G



Y X



A

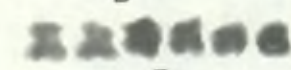


D

⑥ 47,X X,Ph¹,G+.



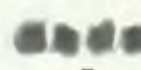
B



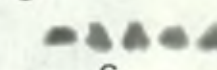
E



C



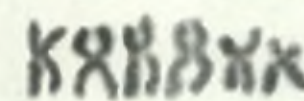
F



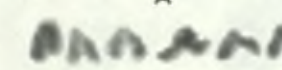
G



XX

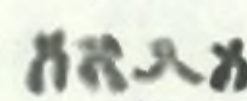


A

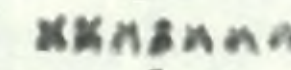


D

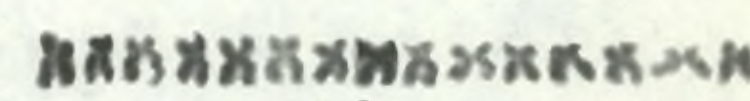
⑦ 49,XY,Ph¹,C+,E+,F+.



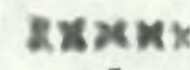
B



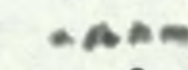
E



C



F



G

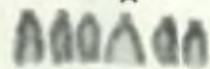


Y X

Fig. 2

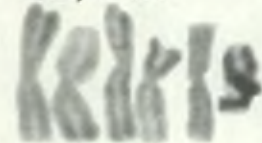


A

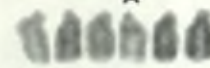


D

46, X X.



A

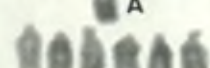


D

46, X X, Ph¹ +

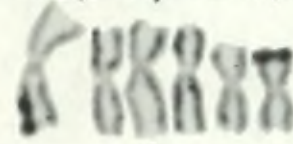


A



D

45, XX, Ph¹ +, G -, A DIC., B CASS., FRAG.

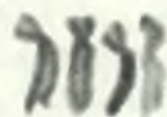


A

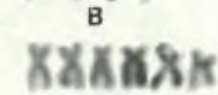


D

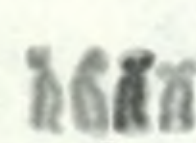
46, XY, Gq -



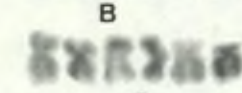
B



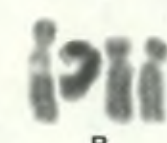
E



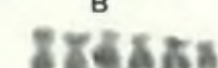
B



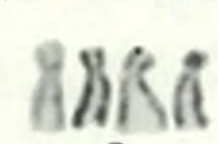
E



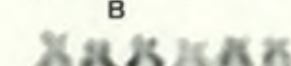
B



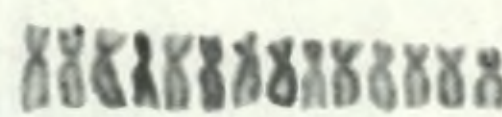
E



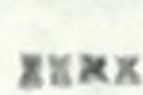
B



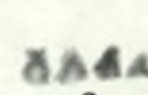
E



C



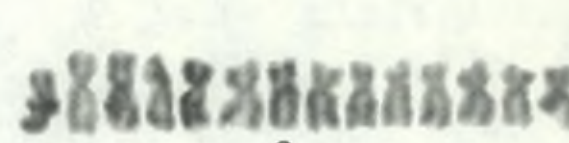
F



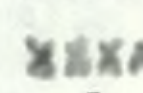
G



X X



C



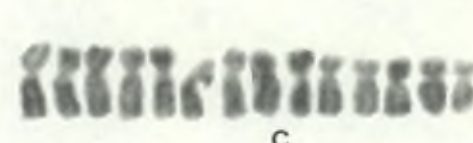
F



G



X X



C



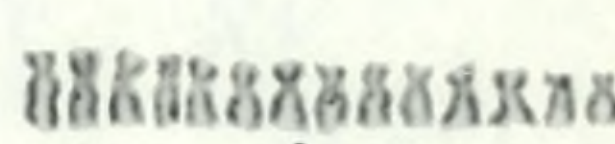
F



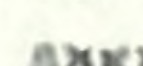
G



X X



C



F



G



Y X

Fig. 3

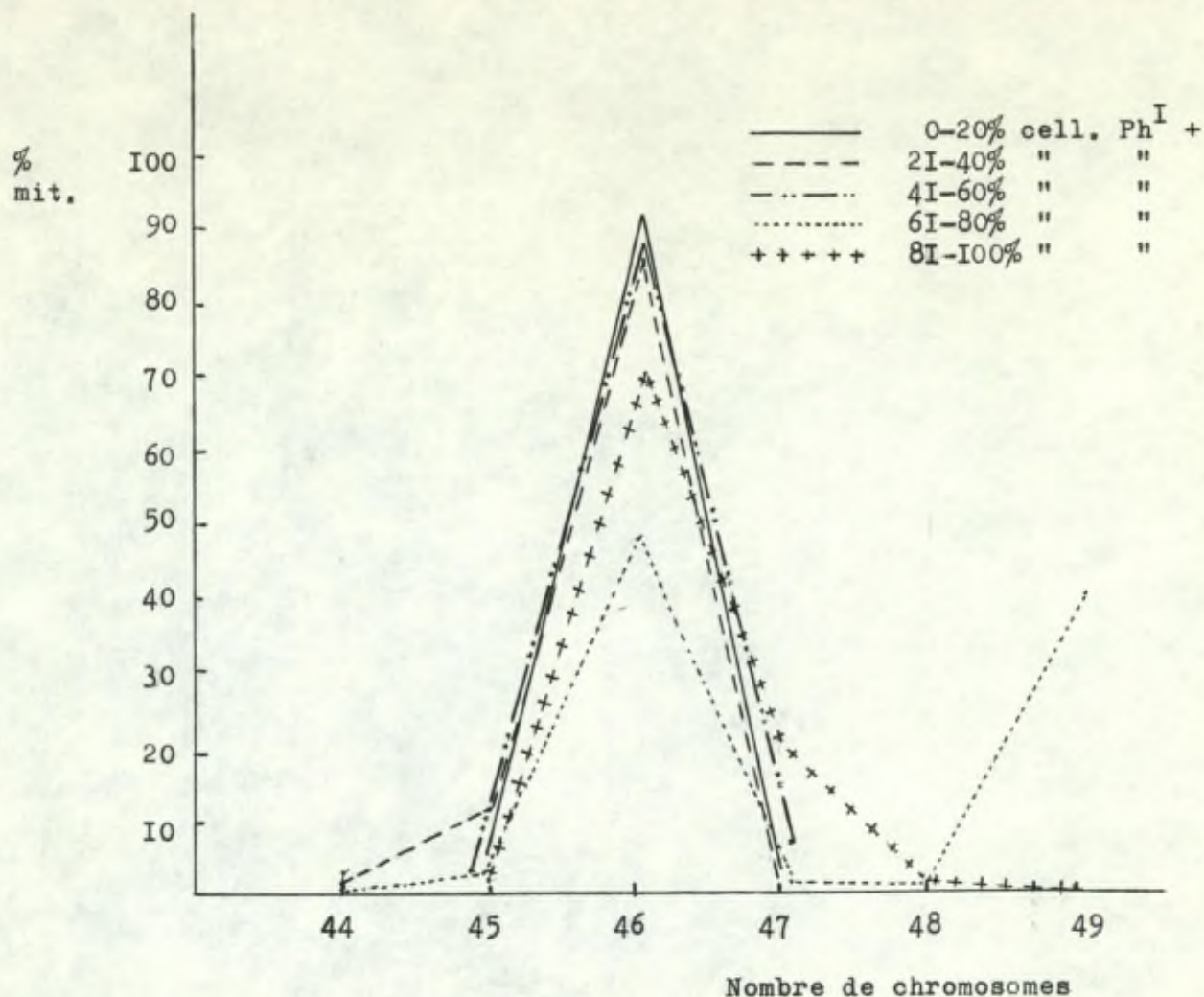


Fig. 4

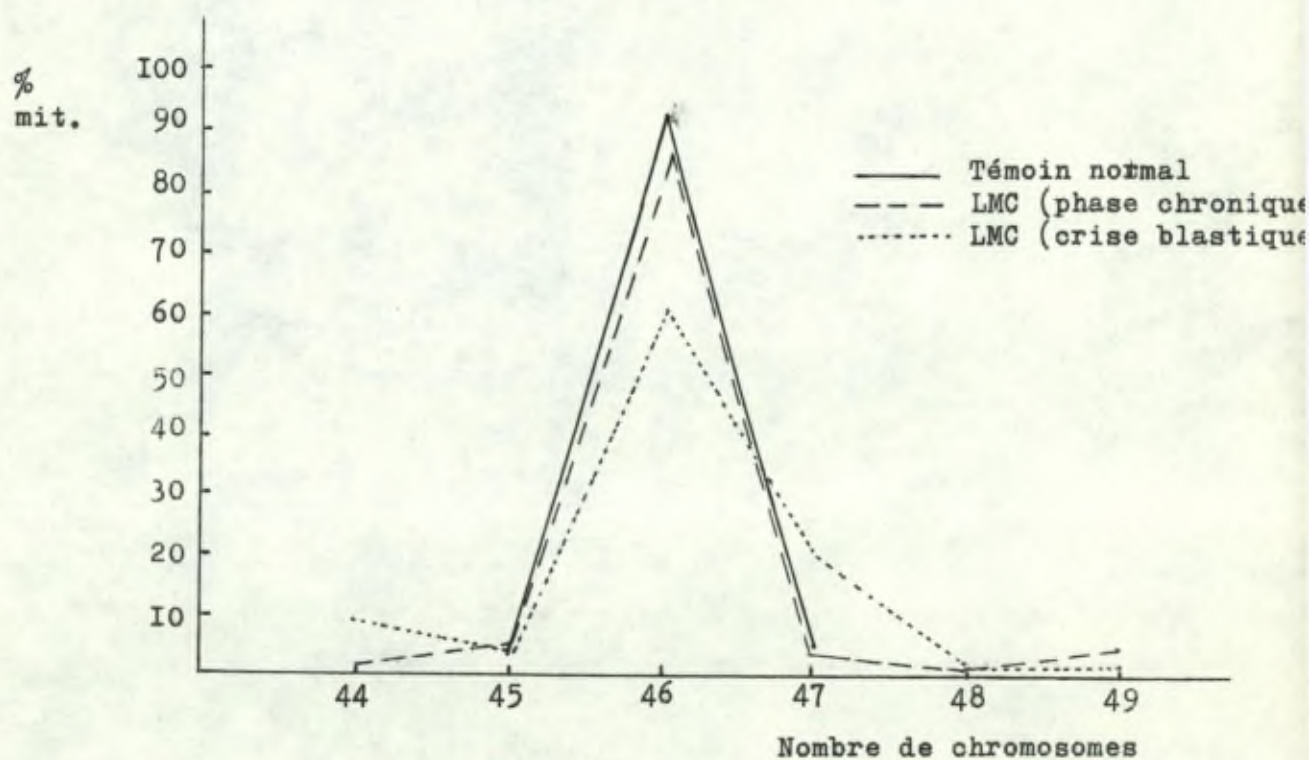
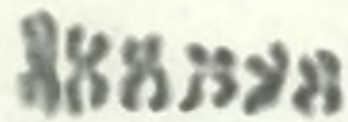


Fig. 5



A

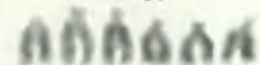


D

Ⓐ 48,XX,2G+

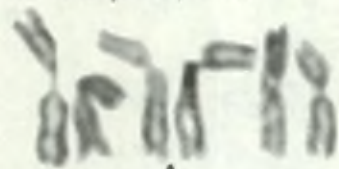


A

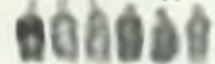


D

Ⓑ 48,XY,2C+

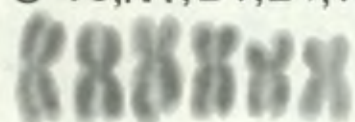


A

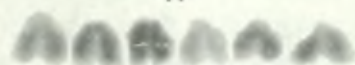


D

Ⓒ 49,XY,B+,E+,F+

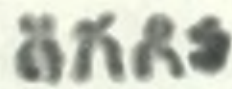


A

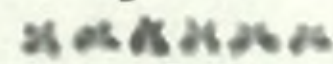


D

Ⓓ 45,XY,E-



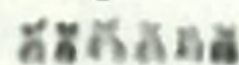
B



E



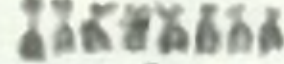
B



E



B



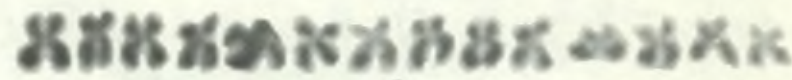
E



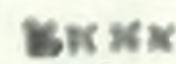
B



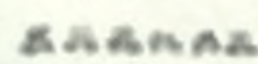
E



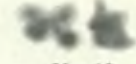
C



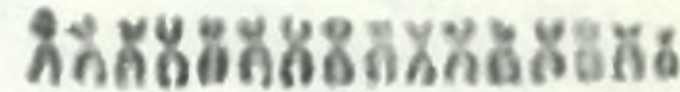
F



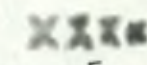
G



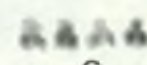
X X



C



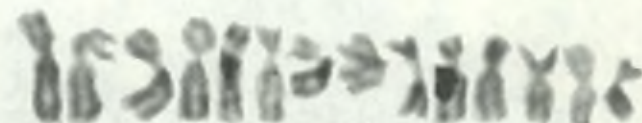
F



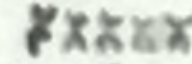
G



Y X



C



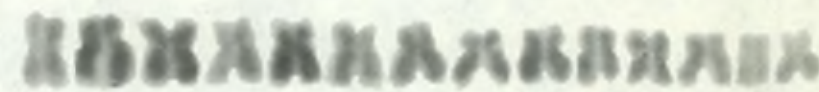
F



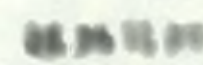
G



Y X



C



F



G



Y X

Fig. 6



A



B



C



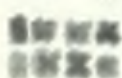
YX



D



E



F



G

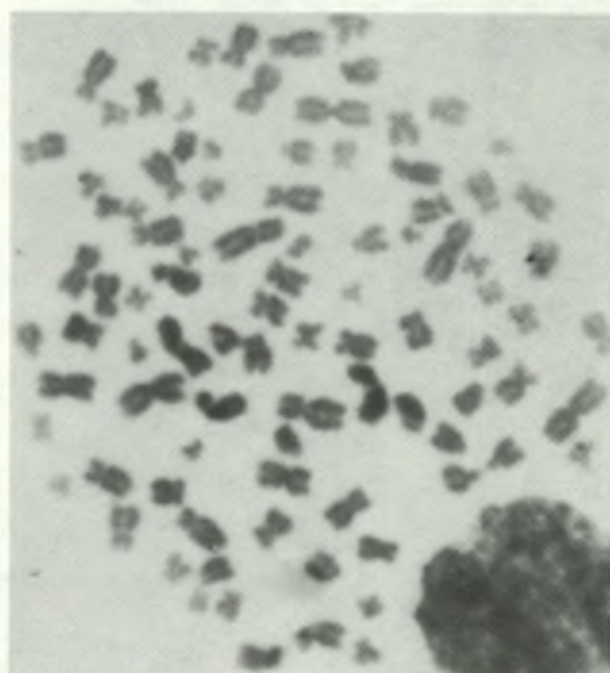


Fig. 2

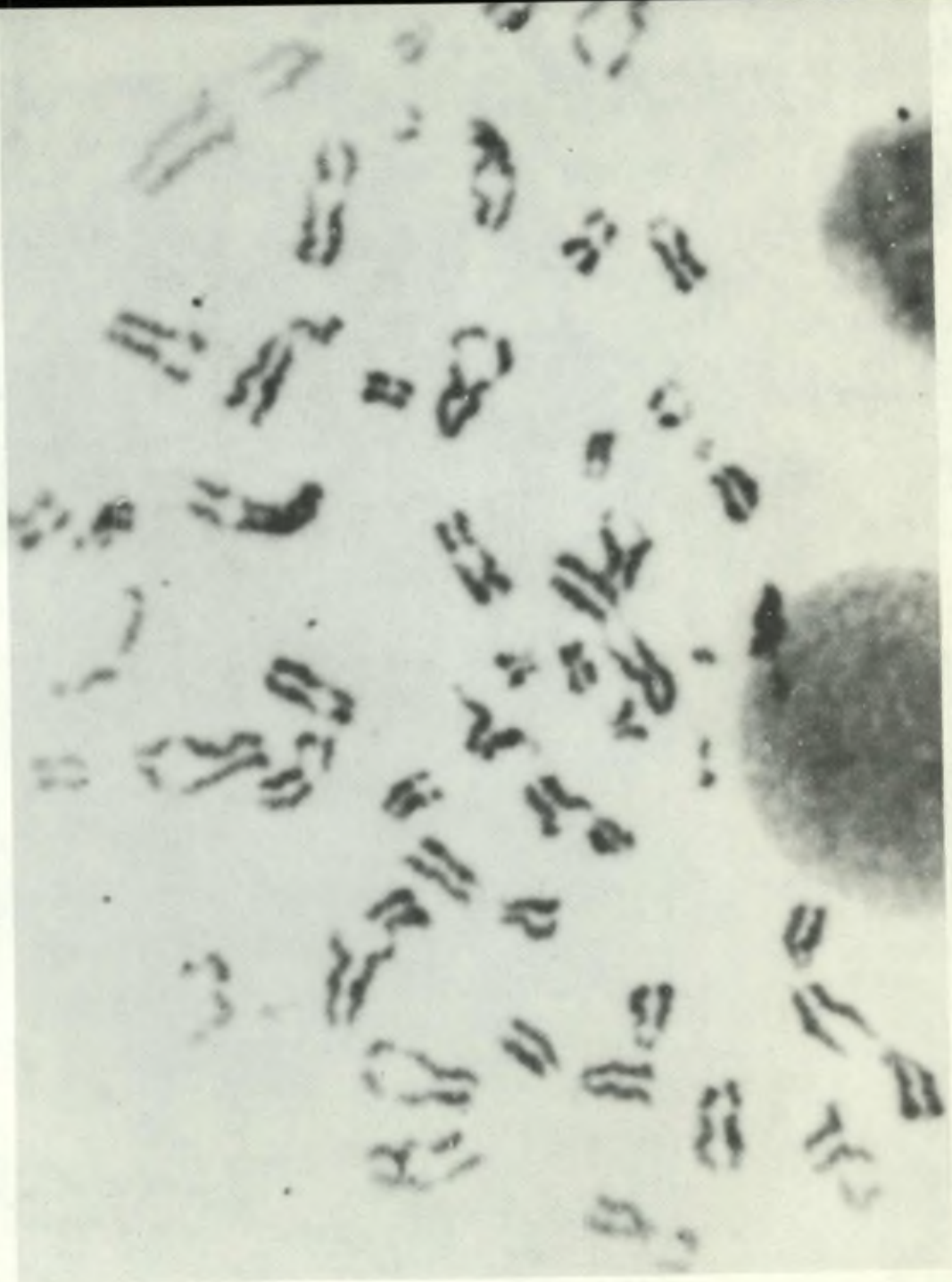
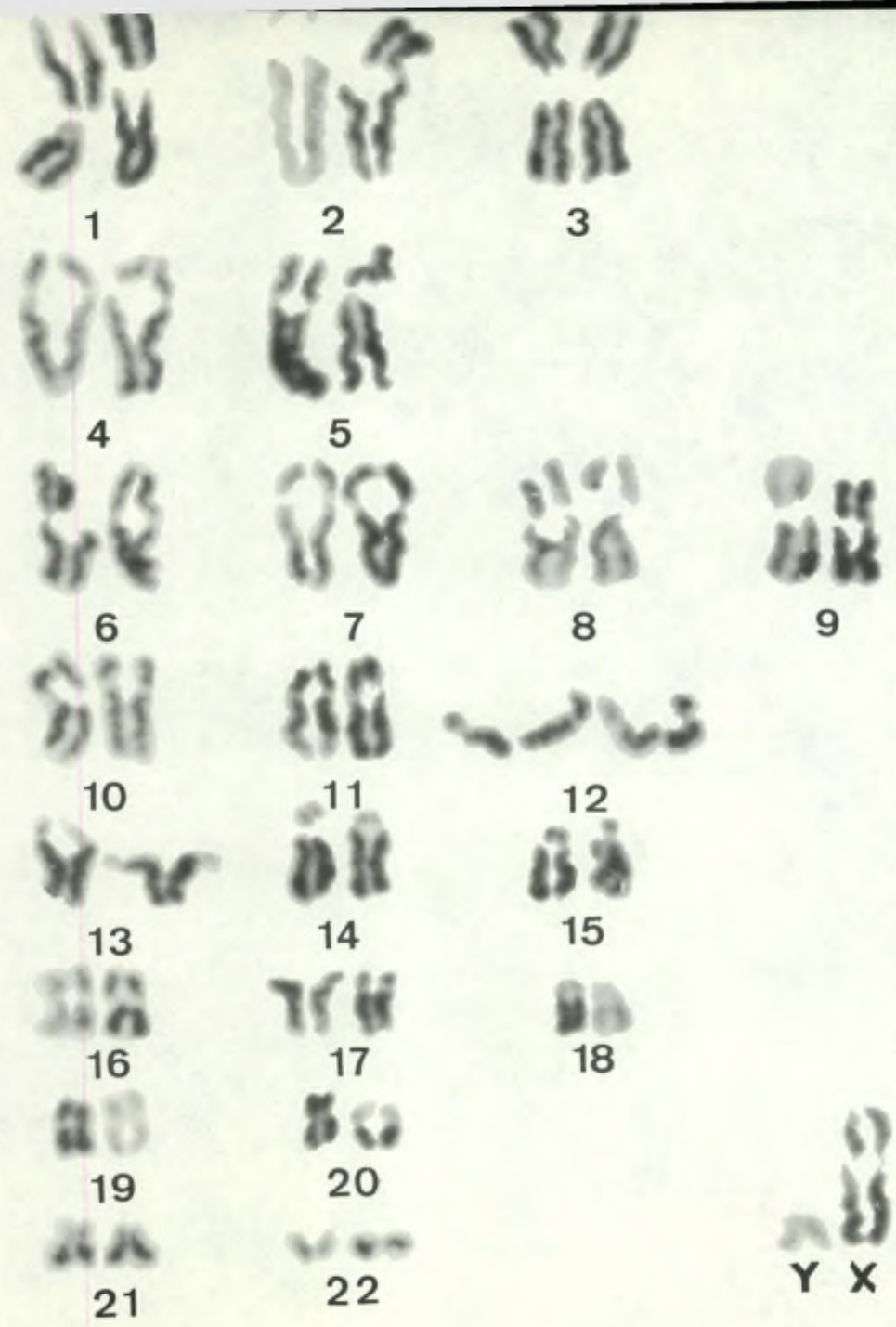
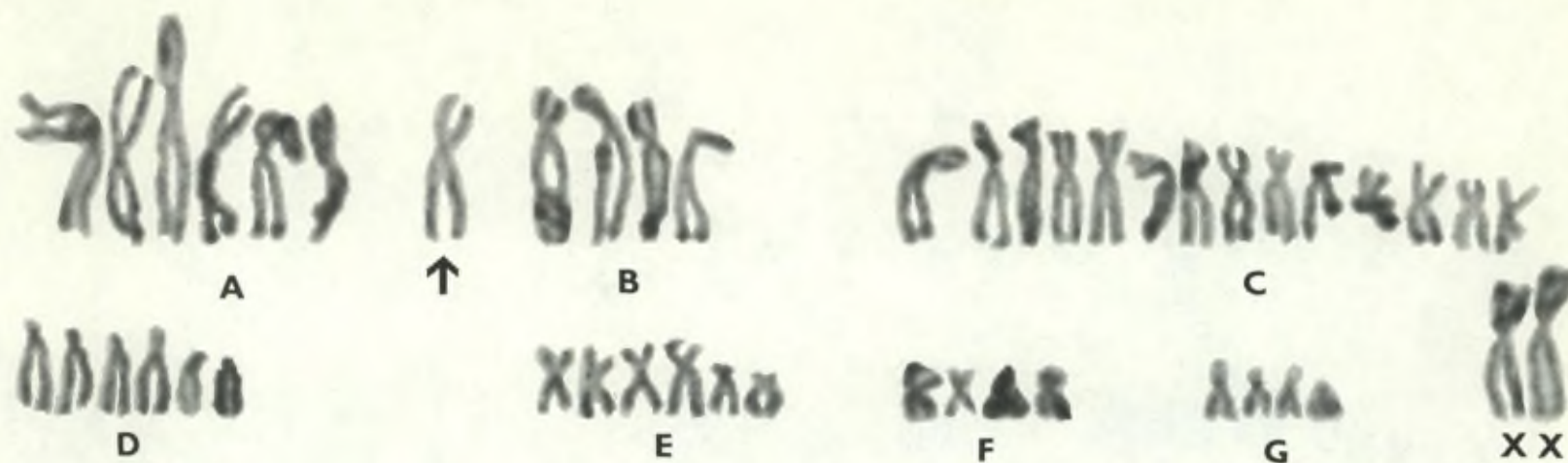


Fig.8



Ⓐ 47,XX,A+



Ⓑ 45,XY,t(D-D)

Fig. 9

