

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Étude cytogénétique de trois myélomes (SPN, SPM, SPB) et d'un hybridome (4A8) de souris

Fries, François-Xavier

Award date:
1987

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

1987



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTÉ DES SCIENCES

ETUDE CYTOGENETIQUE DE TROIS
MYELOMES (SP_2^N , SP_2^M , SP_2^B) ET D'UN
HYBRIDOME (4A8) DE SOURIS .

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques
par

FRANCOIS-XAVIER
FRIES

US 3081326

194785

ETUDE CYTOGENETIQUE DE TROIS MYELOMES (SP_2N , SP_2M , SP_2B) ET D'UN
HYBRIDOME (4A8) DE SOURIS.

Résumé.

Le présent travail est une contribution à l'étude des chromosomes de trois lignées de myélomes de souris: SP_2B , SP_2M , SP_2N , ainsi que d'un hybridome de la même espèce: 4A8. Nos observations sont les suivantes:

- a. en ce qui concerne les nombres chromosomiques, nous n'avons pas observé un nombre modal unique pour chaque lignée mais bien une dispersion autour d'une valeur centrale. Les myélomes ont montré que 90% des cellules avaient de 58 à 74 chromosomes (les deux nombres extrêmes pouvant varier suivant les lignées). L'hybridome a montré une double distribution, de 68 à 85 chromosomes pour 50% des mitoses et de 97 à 107 chromosomes pour 40% des mitoses. Cette dispersion des nombres chromosomiques autour d'une valeur centrale peut vraisemblablement être attribuée au fait que les "myélomes" de départ étaient déjà de nature "hybride".
- b. diverses anomalies chromosomiques ont pu être identifiées. Les plus fréquentes sont des chromosomes métacentriques et des "double-minutes". La mise en évidence de bandes (banding) a toutefois permis d'observer l'existence de remaniements plus complexes de type inversions, translocations ou duplications segmentaires.
- c. comparés au caryotype normal de la souris, un chromosome "marqueur" est présent dans les lignées SP_2B et SP_2N . Il s'agit d'une fusion centromérique entre un chromosome 3 et 5 (Rb 3;5). Au niveau de la lignée SP_2M , une fusion entre deux chromosomes 4 a été identifiée; elle ne se retrouve pas dans les autres lignées. Enfin, un chromosome marqueur identique dans les lignées SP_2M et SP_2B a été noté; le banding est le même mais les remaniements sont tels qu'une identification précise est difficile. Toutefois, un chromosome 12 et un chromosome 15 semblent impliqués! L'utilisation des bandes nous a également permis de montrer que des éléments d'apparence normale à la coloration de routine sont en fait considérablement remaniés, au point que très peu de chromosomes normaux persistent dans les lignées étudiées.
- d. nous avons également observé que le nombre de chromosomes métacentriques et de double-minutes n'est pas constant d'une lignée à l'autre et même d'une cellule à l'autre. Un nombre minimum de ces marqueurs semble cependant indispensable à la propagation cellulaire in vitro.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Septembre 1987

Laboratoire de Cytogénétique

Promoteur : Dr. L.KOULISCHER

FRIES FRANCOIS-XAVIER

REMERCIEMENTS

Il n'est pas possible de mentionner ici toutes les personnes et amis qui m'ont aidé ou encouragé en cours d'année , même indirectement, mais je les remercie.

Plus particulièrement, je veux adresser ici tous mes remerciements :

Au Docteur L.Koulischer, mon promoteur de mémoire, qui a pu m'introduire et m'initier à la cytogénétique des mammifères.

Je le remercie pour son aide, sa grande disponibilité et pour avoir su mettre à ma disposition le laboratoire de morphologie pathologique à Loverval ainsi que de m'avoir prêté son propre matériel. Je tiens d'ailleurs à remercier chacune de ses techniciennes pour les nombreux films et photographies qu'elles ont bien voulu développer ou imprimer.

Un grand merci particulièrement à Roland Hübner du laboratoire de cytogénétique pour son aide, sa compréhension et son expérience dont j'ai pu tirer profit dans l'étude des chromosomes de souris.

Tous mes remerciements aussi au département d'immunologie et plus spécialement à monsieur C.Didembourg pour m'avoir fourni, tout au long de l'année, le matériel d'étude nécessaire.

Je remercie enfin madame A.Van Vyve-Genette , du laboratoire de biologie quantitative de m'avoir aidé dans l'utilisation de logiciels de statistiques. Merci aussi aux services de la bibliothèque universitaire Morethus Plantin pour l'aide qu'ils ont su me procurer.

TABLE DES MATIERES

RESUME.

REMERCIEMENTS.

CHAP.I. LES CHROMOSOMES DE MAMMIFERES

- A. Chromosomes de mammifères et cultures in vitro. p.6
- B. Cellules normales : durée de vie limitée. p.7
- C. Immortalité : changement du caryotype. p.8
- D. Immortalité in vitro et cancer in vivo : analogies. p.10
- E. Chromosomes et gènes. p.12
 - 1.- L'amplification génique
 - 2.- Les effets de position

CHAP.II. ETUDE DES CHROMOSOMES D'HYBRIDOMES DE SOURIS

- A. Définitions. p.17
- B. Les chromosomes des myélomes chez la souris. p.18
- C. Hybridations somatiques : hybridomes. p.19
 - 1.- L'hybridation : premières tentatives.
 - a. Hybridation de cellules diploïdes normales.
 - b. Les premiers systèmes sélectifs pour l'isolation d'hybrides somatiques.
 - 2.- Les hybridomes.
- D. Secrétions in vitro et caryotype. p.23
- E. Buts du présent travail. p.25

CHAP.III. HYBRIDOMES UTILISES ET TECHNIQUES D'ETUDE

- A. Les hybridomes et myélomes. p.27-29
 - 1.- Origine des "myélomes" utilisés dans ce travail.
 - 2.- Origine des hybridomes.
- B. Techniques cytogénétiques. p.30-40
 - 1.- Obtention des chromosomes.
 - 2.- Coloration de banding.
 - 3.- Techniques microphotographiques.
- C. Adaptation des techniques aux hybridomes et myélomes de souris. p.41-47
 - 1.- Préparation des chromosomes.
 - 2.- Coloration des chromosomes.

CHAP.IV. RESULTATS

- 1.- Caryotype de souris normale. p.49
- 2.- Détermination des nombres modaux. p.50-56
- 3.- Etude des chromosomes. p.57-72
 - A. Sans banding.
 - a) Chromosomes marqueurs.
 - b) Les nombres chromosomiques observés.
 - c) Doubles minutes.
 - B. Avec banding.
 - a) Aspect en bandes G.
 - b) Etude des bandes C.
 - c) Mise en évidence des régions NORs.
 - d) Autres anomalies.

CHAP.V. DISCUSSION

- 1.- Dispersion du nombre modal. p.75-81
 - a. Culture in vitro et variation du nombre modal.
 - b. Myélomes, hybridomes et variations numériques.
- 2.- Les chromosomes marqueurs dans les myélomes et hybridomes de souris. p.82-88
 - a. Les divers chromosomes métacentriques observés dans les cellules murines.
 - b. Remaniements chromosomiques et propriétés cellulaires nouvelles.
 - c. Remaniements du chromosome 15 de la souris et oncogène c-myc.
- 3.- Les doubles minutes ; leur signification possible. p.89-91
- 4.- Les remaniements autres que les fusions robertsoniennes. p.91-92
- 5.- Mécanismes possibles de l'amplification génique. p.93-96
 - a. Utilisation de cellules lysées.
 - b. Crossing-over somatique inégal.
 - c. Réplication anormale de l'ADN en cours de division.
- 6.- Amplification et cytogénétique. p.96-97
- 7.- Amplification génique, cancer et immortalité cellulaire. p.98-99

CONCLUSIONS

p.101-102

BIBLIOGRAPHIE

p.104-120

CHAPITRE I

CHAP. I. LES CHROMOSOMES DE MAMMIFERES

A. CHROMOSOMES DE MAMMIFERES ET CULTURES IN VITRO

Les chromosomes de mammifères ne peuvent s'étudier que lors des divisions cellulaires. En effet, ils ne sont visibles que pendant le cycle de division de la cellule et plus précisément au stade métaphasique. C'est pourquoi il est nécessaire, pour les étudier, d'utiliser des cultures in vitro, moyen le plus commode pour disposer de cellules se multipliant activement.

Le stade le plus favorable à l'observation étant la métaphase, on peut en augmenter le nombre en détruisant le fuseau avec de la colchicine. Il suffit ensuite de disperser les chromosomes au sein de la cellule pour pouvoir les étudier.

Les cultures in vitro permettent aux cellules de se trouver dans un milieu favorable à leur multiplication. Le milieu est cependant tout aussi favorable aux micro-organismes. La stérilité des milieux est donc essentielle. De plus, on sait agir sur leur composition. Par exemple, on peut ajouter des antibiotiques, des vitamines, des produits tampons maintenant un pH proche du pH physiologique du sérum, ...etc.

Par ailleurs, les cultures permettent de maintenir plus ou moins longtemps, selon leur nature, les cellules, de les étudier à longue échéance, et de pouvoir disposer d'une quantité de matériel importante parfois nécessaire.

B. CELLULES NORMALES : DUREE DE VIE LIMITEE

La plupart des cellules normales de vertébrés meurent après un certain nombre de divisions en culture. Par exemple, chez les mammifères, les cellules se divisent plus ou moins 50 fois avant de mourir (HAYFLICK et MOORHEAD

1961, sur des lignées cellulaires diploïdes humaines cultivées in vitro).

On croit que cette durée de vie limitée reflèterait la durée de vie normale de l'animal dont les cellules dérivent (ALBERTS et al., 1983).

Cependant, occasionnellement, des cellules immortelles apparaissent en culture. Ces cellules peuvent se multiplier indéfiniment et forment des lignées cellulaires. Suivant leur nature, leur développement est meilleur lorsqu'elles sont attachées à une surface solide et leur croissance cesse lorsqu'elles ont formé une couche continue sur la surface de la boîte de culture ("monolayer cell culture"). D'autres cellules, comme les cellules plasmatiques de souris SP₂ par exemple, sont capables de croître en suspension.

Les cellules cancéreuses forment aussi des lignées immortelles, aussi bien in vitro qu'in vivo. De plus, les cellules cancéreuses prolifèrent souvent à une vitesse beaucoup plus élevée que les cellules normales. De telles propriétés peuvent d'ailleurs être induites expérimentalement dans des cellules normales par "transformation" avec un virus ou un agent chimique servant d'inducteur tumoral.

Ces lignées cellulaires transformées provoqueront une tumeur si elles sont injectées à l'animal.

En résumé, les lignées cellulaires, transformées ou non, sont très utiles en tant que source d'un grand nombre de cellules d'un type uniforme, surtout depuis qu'on peut les stocker à -70°C pour une période indéfinie ; après décongélation, les cellules produites sont tout à fait viables.

C. IMMORTALITE : CHANGEMENT DU CARYOTYPE

Le caryotype des cellules somatiques de mammifères est en fait très stable. Dans des conditions normales, depuis la première division après la fécondation

ETUDE CYTOGENETIQUE DE TROIS MYELOMES (SP₂N, SP₂M, SP₂B) ET D'UN
HYBRIDOME (4A8) DE SOURIS.

Résumé.

Le présent travail est une contribution à l'étude des chromosomes de trois lignées de myélomes de souris: SP₂B, SP₂M, SP₂N ainsi que d'un hybridome de la même espèce: 4A8. Nos observations sont les suivantes:

- a. en ce qui concerne les nombres chromosomiques, nous n'avons pas observé un nombre modal unique pour chaque lignée mais bien une dispersion autour d'une valeur centrale. Les myélomes ont montré que 90% des cellules avaient de 58 à 74 chromosomes (les deux nombres extrêmes pouvant varier suivant les lignées). L'hybridome a montré une double distribution, de 68 à 85 chromosomes pour 50% des mitoses et de 97 à 107 chromosomes pour 40% des mitoses. Cette dispersion des nombres chromosomiques autour d'une valeur centrale peut vraisemblablement être attribuée au fait que les "myélomes" de départ étaient déjà de nature "hybride".
- b. diverses anomalies chromosomiques ont pu être identifiées. Les plus fréquentes sont des chromosomes métacentriques et des "double-minutes". La mise en évidence de bandes (banding) a toutefois permis d'observer l'existence de remaniements plus complexes de type inversions, translocations ou duplications segmentaires.
- c. comparés au caryotype normal de la souris, un chromosome "marqueur" est présent dans les lignées SP₂B et SP₂N. Il s'agit d'une fusion centromérique entre un chromosome 3 et 5 (Rb 3;5). Au niveau de la lignée SP₂M, une fusion entre deux chromosomes 4 a été identifiée; elle ne se retrouve pas dans les autres lignées. Enfin, un chromosome marqueur identique dans les lignées SP₂M et SP₂B a été noté; le banding est le même mais les remaniements sont tels qu'une identification précise est difficile. Toutefois, un chromosome 12 et un chromosome 15 semblent impliqués! L'utilisation des bandes nous a également permis de montrer que des éléments d'apparence normale à la coloration de routine sont en fait considérablement remaniés, au point que très peu de chromosomes normaux persistent dans les lignées étudiées.
- d. nous avons également observé que le nombre de chromosomes métacentriques et de double-minutes n'est pas constant d'une lignée à l'autre et même d'une cellule à l'autre. Un nombre minimum de ces marqueurs semble cependant indispensable à la propagation cellulaire in vitro.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Septembre 1987

Laboratoire de Cytogénétique

Promoteur : Dr. L.KOULISCHER

FRIES FRANCOIS-XAVIER

jusqu'à la mort de l'individu, les cellules somatiques présentent un même caryotype. C'est très important et même essentiel en cytogénétique : toute cellule somatique peut être utilisée pour des études caryotypiques spécifiques.

Cette grande stabilité chromosomique a été rapportée dans de nombreuses études dont celle effectuée par HAYFLICK en 1965 sur des lignées cellulaires diploïdes humaines, cultivées in vitro.

Néanmoins, dans certaines circonstances, la stabilité du caryotype des cellules somatiques de mammifères n'est plus observée. C'est le cas des cellules tumorales (tumeurs spontanées ou induites) ou des lignées cellulaires immortelles cultivées in vitro provenant de cellules normales ou non.

On admet généralement que les changements survenus dans le caryotype correspondent à l'adaptation du génome à son nouvel environnement. Si la cellule et son génome ne sont pas adaptés, elle disparaît. Inversément, si la cellule survit et s'adapte, cela peut donner lieu à une lignée cellulaire "immortelle" (au contraire des souches cellulaires à durée de vie finie).

D'une façon générale, l'immortalité cellulaire s'accompagne le plus souvent d'un changement du caryotype avec anomalies chromosomiques. Il suffit pour s'en rendre compte de prendre l'exemple bien connu de la trisomie d'un chromosome particulier qui a été décrite en tant qu'anomalie caryotypique survenant dans de nombreux néoplasmes d'animaux et plus particulièrement de souris (COWELL, 1979; DOFUKU et al., 1979; SPIRA, 1979; SASAKI, 1982).

Ces observations étayèrent l'hypothèse qu'un phénotype cellulaire malin résulterait d'un déséquilibre génétique.

Bien que le génome cellulaire soit généralement stable, on sait que cette stabilité n'est pas constante. Divers réarrangements chromosomiques ou anomalies peuvent survenir spontanément.

On peut distinguer les anomalies stables telles les variations de nombre de chromosome d'une même paire ,

les translocations, délétions, inversions et les anomalies instables ne pouvant la plupart du temps être transmises aux cellules filles de manière symétrique (ces cellules présentent alors un caryotype différent de celui de la cellule dont elles sont issues) telles les cassures chromosomiques, les chromosomes en anneau, les dicentriques, ...etc.

La souris ayant un caryotype peu favorable à l'analyse (même aspect et même taille des chromosomes), toute la gamme des changements possibles pouvant être rencontrée dans les cellules de myélomes et d'hybridomes étudiées peut rendre fort complexe la détermination de l'origine des fragments impliqués.

Les remaniements chromosomiques observés en cancérologie impliqueraient les oncogènes. On sait en effet aujourd'hui que de l'ADN d'une cellule cancéreuse transféré dans une cellule normale peut transformer cette dernière. Le mécanisme en a été compris en étudiant les rétrovirus, c'est-à-dire les virus à RNA. Ceux-ci sont en fait capables de provoquer à l'échelle de la cellule un cancer. Ils possèdent non seulement des gènes nécessaires dans la régulation de leur multiplication mais aussi des gènes déclenchant le cancer et issus de copies de gènes normaux présents dans les cellules, les oncogènes. L'hôte possède un ou des oncogènes à l'état normal pouvant être activés.

On connaît l'existence d'environ 50 oncogènes chez l'homme et les retrouve dans pratiquement toutes les espèces. Il s'agirait donc de séquences conservées à travers l'évolution et, par conséquent, d'une importance particulière, peut-être en rapport avec la multiplication et la différenciation cellulaire.

Les études récentes font un rapprochement entre ces oncogènes et les anomalies chromosomiques associées aux cellules cancéreuses et donc à l'immortalité cellulaire. Des travaux effectués sur différentes tumeurs animales et humaines suggèrent de plus un rôle de l'oncogène c-myc (oncogène cellulaire) dans les tumeurs lymphocytaires en général.

A côté d'un rôle dans l'amplification (ALITALO, 1983 ; 1985 ; SCHWAB, 1983) l'oncogène c-myc serait impliqué dans des réarrangements de plusieurs types de tumeurs dérivées de cellules B et de cellules T : chez la souris, le réarrangement du locus c-myc se ferait par des translocations chromosomiques à partir d'un chromosome 15 sur lequel il se trouve originellement (KLEIN, 1981; 1983). Les points de cassure de ces translocations affectent d'ailleurs souvent les loci des chaînes lourdes et légères (λ, κ) d'immunoglobulines des tumeurs de cellules B, comme le lymphome de Burkitt chez l'homme, les plasmacytomes de souris et les immunocytomes de rat.

C'est à partir de ces observations que G.KLEIN en 1981 proposa que la région du gène codant pour l'immunoglobuline pourrait fournir un proto-oncogène cellulaire, transloqué à proximité de promoteurs actifs dans les cellules B et donc l'activant.

Plusieurs études ont confirmé par la suite que l'expression du gène c-myc transloqué était dérégulée : il perd sa capacité de répondre aux signaux de régulation normale lors de la différenciation des cellules B (revu par CROCE et NOWELL, 1985; et CORY , 1986).

Comment se ferait la dérégulation du gène c-myc au cours des translocations n'est toujours pas élucidé , bien que diverses hypothèses aient été suggérées : par exemple, il pourrait y avoir perte d'inhibition en feedback de l'expression de l'oncogène (SIEBENLIST et al., 1984) une transcription altérée, une instabilité du RNA provenant du gène c-myc réarrangé (CORY , 1986), etc...

D. IMMORTALITE IN VITRO ET CANCER IN VIVO : ANALOGIES

L'immortalité cellulaire semble étroitement liée à un changement du caryotype. D'autre part, les cellules cancéreuses in vivo semblent se développer d'une façon qui leur est tout à fait propre et échappent à la régulation de l'organisme au sein duquel elles se trouvent.

Les anomalies chromosomiques à leur niveau étant semblables à celles rencontrées dans les cellules immortelles cultivées in vitro, ceci suggère que les remaniements chromosomiques sont associés à la survie indéfinie des cellules.

En fait, il s'agit d'une idée déjà ancienne. BOVERI au début du siècle, proposa le premier ce concept. Depuis, de nombreuses études ont été faites sur la constitution chromosomique de tumeurs humaines et animales, essayant de montrer que le développement de la malignité pourrait être associé avec un déséquilibre de chromosomes. Les études avant 1950 étaient de portée limitée, vu les difficultés techniques rencontrées.

Durant ces trente dernières années cependant de nombreuses données se sont accumulées, montrant que la majorité des tumeurs avaient des anomalies chromosomiques et qu'elles étaient pratiquement toutes dérivées d'une seule cellule présentant occasionnellement des changements progressifs, par rapport au caryotype de la lignée souche.

Les chromosomes étant porteurs de l'information génétique et la transformation de cellule normale en cellule cancéreuse étant transmissible aux descendants de la lignée souche originelle, il était a priori raisonnable de prétendre que le DNA cellulaire était impliqué d'une quelconque manière dans le changement.

Comme nous le verrons plus loin, de nombreuses informations sont maintenant disponibles quant à l'apparition spécifique de changements chromosomiques dans les tumeurs animales.

L'interprétation n'est cependant pas toujours facile : elle dépend des espèces ou lignées animales étudiées, mais aussi des systèmes expérimentaux utilisés.

Par exemple, certains changements chromosomiques spécifiques dans des tumeurs de souris (tels la trisomie 15 des lymphomes de cellules T et les translocations impliquant le chromosome 15 des plasmacytomes ou myélomes) furent d'abord considérés comme dépendants du type de cellule d'origine, tandis que la trisomie 2, trouvée dans différents types de tumeurs chez les rats, était considérée comme spécifique du type d'agent inducteur utilisé.

Toutefois, on sait maintenant que la trisomie 15 fut observée également dans des lymphomes de cellule B, et la trisomie 2 s'avera être induite par plus d'une sorte de carcinogène.

E. CHROMOSOMES ET GENES

L'étude des chromosomes qui, heureusement pour nous, sont visibles au microscope, permet en fait d'étudier ce qui se passe au niveau des gènes portés par ces chromosomes.

En réalité, ce ne sont donc pas les chromosomes qui sont importants dans le cancer mais bien les gènes ; les remaniements chromosomiques observés sont l'aspect visible au microscope optique des remaniements géniques!

C'est pourquoi il est important de définir ici tout ce qui est lié à l'aspect génique : l'amplification génique, les effets de position et toutes les anomalies que l'on peut rencontrer qui nous sont rendus apparents au moyen des translocations, des inversions et délétions chromosomiques, des double-minutes, ...etc.

Ce sont tous ces changements qui, en définitive font que la cellule se libère de son contrôle habituel et ne se conduit plus comme une cellule normale.

1.- L'AMPLIFICATION GENIQUE

Les cellules cancéreuses ont fourni l'occasion d'étudier toute une série d'anomalies chromosomiques numériques ou de structure dans les cellules de mammifères dont les cellules de souris.

Ces aberrations comprennent des translocations (c'est-à-dire fixation d'un chromosome ou d'une partie de chromosome sur

FIGURE 1 : Aspect des doubles minutes.

- a. dans une lignée cellulaire tumorale de souris.
- b. dans une lignée cellulaire transformée in vitro.

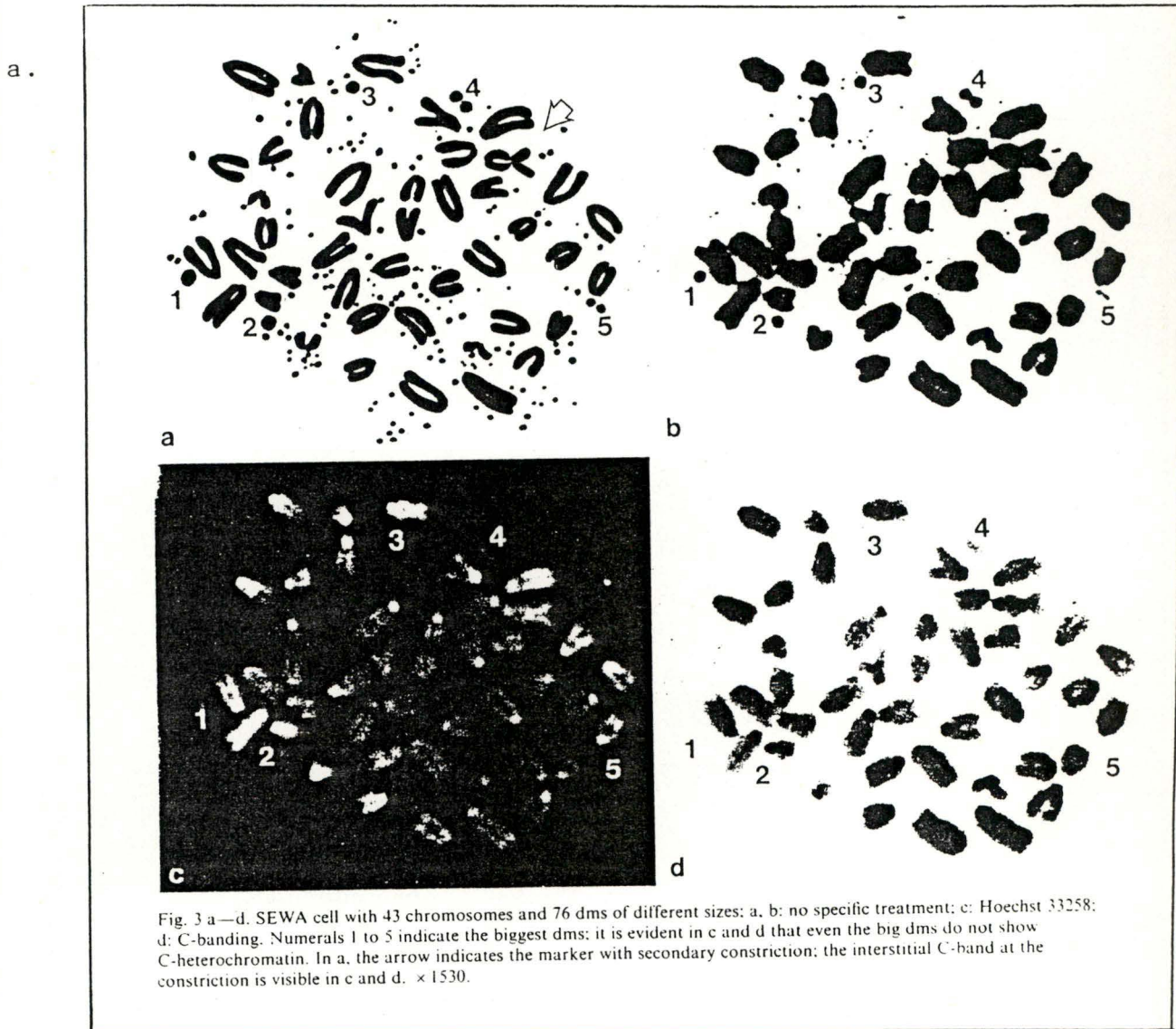


Fig. 3 a—d. SEWA cell with 43 chromosomes and 76 dms of different sizes: a, b: no specific treatment; c: Hoechst 33258; d: C-banding. Numerals 1 to 5 indicate the biggest dms; it is evident in c and d that even the big dms do not show C-heterochromatin. In a, the arrow indicates the marker with secondary constriction; the interstitial C-band at the constriction is visible in c and d. $\times 1530$.

* Photocopie tirée de Levan et al.(1976)

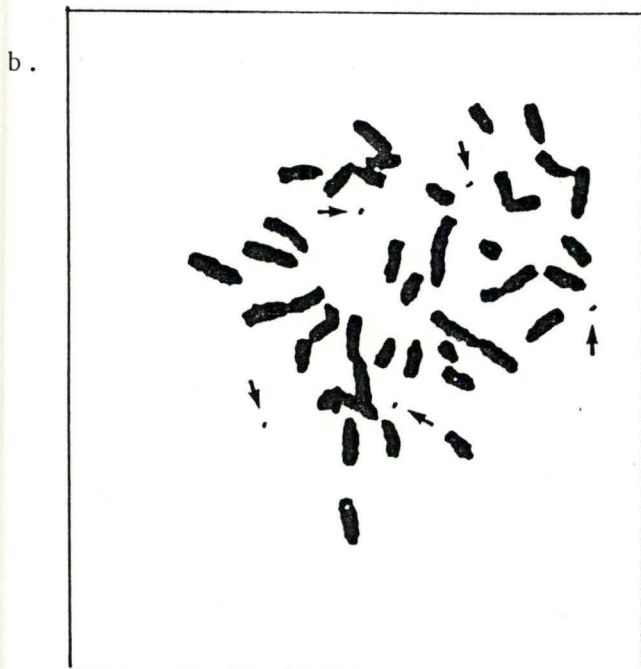
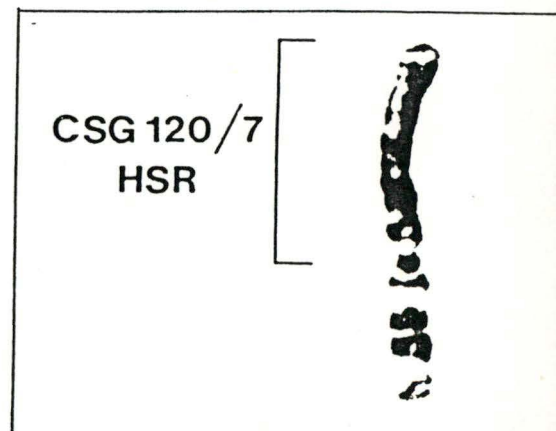


FIGURE 2 : Aspect d'une rég à coloration homogène dans une lignée cellulaire tumorale de souris.



** Photocopie tirée de Cowell (1982a)

Photocopie tirée de Wigley & Cowell (1984)

un autre chromosome), des inversions (cassure chromosomique suivie d'une rotation à 180°), des délétions (pertes de fragments chromosomiques), ...etc.

Récemment, on a pu rajouter à cette liste deux types tout à fait particuliers de réarrangements : les double-minutes et les régions à coloration homogène. Des données récentes montrent que ces deux anomalies représentent en fait les formes cytologiques (ou cytogénétiques) de l'amplification de gènes (BIEDLER et SPENGLER, 1976 LEVAN et al., 1976; 1980).

Les "double-minutes" apparaissent comme de petites structures chromatiniennes habituellement sphériques et souvent par paires. Ils montrent une hétérogénéité numérique et de structure dans leur distribution entre cellules. Ils ont habituellement une taille approximative de $0,3 - 0,5 \mu\text{m}$ de diamètre (LEVAN et al., 1978; BARKER et al., 1979) mais peuvent varier depuis les limites de résolution optique jusqu'à la dimension de petits chromosomes (v.fig.1).

Les "régions à coloration homogène" (HSR) portées par certains chromosomes ne montrent pas d'images de banding (mise en évidence de "bandes" sur les chromosomes habituelles et uniformes (v.fig.2).

Dans certains cas bien étudiés, on a montré que ces HSRs représentaient les sites d'amplification de gènes spécifiques (NUNBERG et al., 1978; MILLER et al., 1979; WAHL et al., 1982 Par analogie, toutes les autres régions à coloration homogène pourraient représenter l'amplification génique, même si on n'a pas pu démontrer chaque fois une surproduction de produits de gènes spécifiques (COWELL, 1982b).

On sait actuellement que les double-minutes et les régions à coloration homogène partagent la même propriété : ils représentent une amplification génique, et se retrouvent presque exclusivement dans les cellules cancéreuses.

Lorsqu'ils sont présents dans la même population cellulaire, ils sont mutuellement exclusifs au sein d'une même cellule (BALABAN-MALENBAUM et al., 1977; COWELL, 1980; GEORGE et al. 1980) sauf cas exceptionnels (GEORGE et al., 1982).

Les premières études des double-minutes (DMs) et des HSRs de lignées cellulaires résistantes au méthotrexate chez la souris, ont permis de proposer qu'elles contenaient des gènes amplifiés de la déhydrofolatereductase (BIEDLER et al., 1976). Depuis lors, il a été clairement démontré que dans les systèmes de résistance au méthotrexate par exemple, ces anomalies représentent bien des formes variées d'amplification de gènes.

Il reste cependant encore à éclaircir comment ces deux types d'aberrations apparaissent et comment elles sont structurellement liées. On pense actuellement à une réplication multiple du gène et à la provenance directe des DMs à partir des régions à coloration homogène (HSRs) elles-mêmes (BALABAN-MALENBAUM et al., 1977; COWELL, 1980^a;1981; WIGLEY et al., 1984).

2.- LES EFFETS DE POSITION

L'"effet de position" recouvre la notion que les gènes situés sur les chromosomes s'expriment en fonction de leur position et en fonction de la position relative des autres gènes.

Lors de réarrangements chromosomiques, certains gènes pourront ne plus s'exprimer ou au contraire être activés, parcequ'ils ne sont plus dans le même ordre sur le chromosome

Il est évident que cet effet de position ne se voit pas directement mais indirectement, suite à divers types de remaniements tels que translocations, inversions, ...etc., au niveau des chromosomes.

La souris ayant par ailleurs (comme nous l'avons signalé) un caryotype difficilement "analysable" (même aspect des chromosomes, même taille), toute la gamme des changements possibles peut rendre fort complexe la détermination de l'origine des fragments impliqués dans des réarrangements et donc l'identification des chromosomes.

Il semble enfin que ces effets de position sont d'une grande importance (en occurrence et fréquence) dans l'étude du caryotype des myélomes et hybridomes de souris, vu l'ensemble et le type de résultats obtenus (v.résultats).

CHAPITRE II

CHAP.II. ETUDE DES CHROMOSOMES D'HYBRIDOMES DE SOURIS

A. DEFINITIONS

Quelques notions importantes sont définies ci-dessous.

* MYELOME : Un plasmacytome ou myélome est une cellule tumorale plasmatique de type B du système immunitaire qui peut ou non produire différents types d'immunoglobulines (protéines de myélome).

* HYBRIDOME : C'est une cellule provenant de la fusion d'un lymphocyte B, producteur d'anticorps d'une souris immunisée, avec un myélome. L'hybridome possède ainsi la capacité de fabriquer un anticorps particulier et de se multiplier indéfiniment.

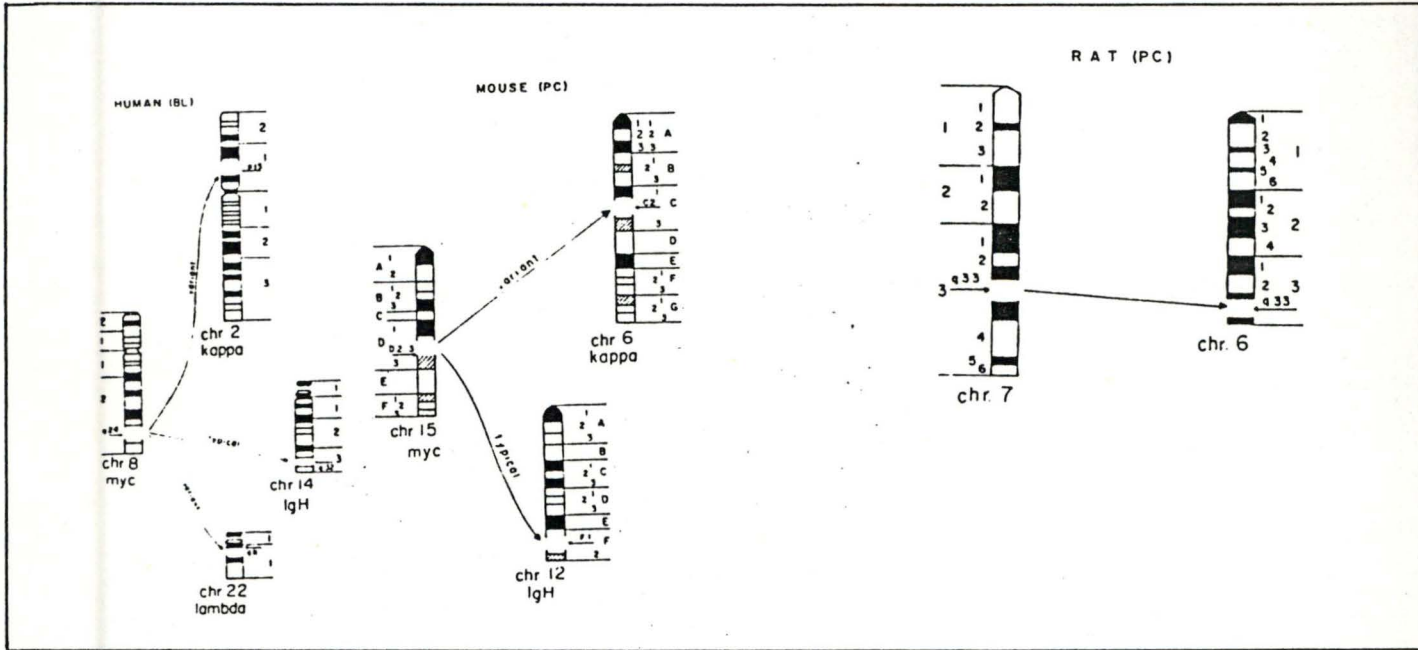
* BANDES CHROMOSOMIQUES :

Ce sont les régions chromosomiques mises en évidence par des techniques de "banding" spécifiques et diverses qui permettent de regrouper les chromosomes présentant un même type de bandes.

Elles permettent d'observer plus de 400 détails (pour certains, presque 2000) au niveau du caryotype.

Chaque bande peut ainsi être identifiée suivant une nomenclature standard pour chaque espèce.

FIGURE 3 : Exemple de translocations entre le chromosome 15 et les chromosomes 6 et 12 dans un plasmacytome de souris comparé à celles survenant chez l'homme (lymphome de Burkitt) ou chez le rat (plasmacytome).



* Photocopie tirée de l'article de SHEPARD et al. (1978).

B. LES CHROMOSOMES DES MYELOMES CHEZ LA SOURIS

Du point de vue caryotypique, différentes études ont été faites (SHEPARD et al., 1974a,b; 1976; 1978; 1979; SOROKINA, 1986). Mais on s'est surtout penché sur la présence éventuelle de marqueurs chromosomiques précis pouvant caractériser les myélomes.

Ce sont SHEPARD et ses collaborateurs (1974; 1978) qui décrivent, les premiers, deux marqueurs dérivés des chromosomes 12 et 15 (ou 18) dans trois plasmacytomes de souris presque tétraploïdes (leur caractéristique commune était la présence d'un chromosome 12 allongé et d'un chromosome 15 raccourci). YOSHIDA et MORIWAKI (1975) trouvèrent des marqueurs similaires dans un plasmacytome diploïde. Ceux-ci furent identifiés comme provenant d'une translocation entre un chromosome 12 et un chromosome 15 (T 12;15) avec des points de cassure précis (situés entre les bandes 12F2 et 15E).

Plus tard, d'autres études (YOSHIDA et al., 1978) révélèrent que, chez la souris, dans plusieurs plasmacytomes indépendants, un chromosome 15 était impliqué dans une translocation avec un chromosome 10 ou 12.

Plusieurs faits suggèrent ainsi aujourd'hui que le phénomène de cassure d'un chromosome 15 serait essentiel dans la pathogenèse des plasmacytomes (SHEPARD et al., 1978; OHNO et al., 1979) chez la souris.

Un intérêt tout particulier fut, par ailleurs, porté sur l'implication des chromosomes 6 et 12 dans la formation d'un marqueur caractéristique des myélomes. En effet, on a pu localiser sur le chromosome 6 de la souris le locus de la chaîne légère d'immunoglobuline (chaîne lambda) et celui de la chaîne lourde sur le chromosome 12.

A l'heure actuelle, on pense que des translocations "non-aléatoires", impliquant le chromosome 15 avec un chromosome 12 ou un 6, seraient ainsi caractéristiques des plasmacytomes de souris (v. fig. 3).

C. HYBRIDATIONS SOMATIQUES : HYBRIDOMES

1.- L'HYBRIDATION : PREMIERES TENTATIVES

Pendant plusieurs années, BARSKI (1962) étudia des lignées hétéroploïdes de cellules de souris in vitro. Deux de ces lignées, dérivées de la même culture initiale, devinrent avec les années fort différentes par leur degré de néoplasticité. Ayant observé des différences morphologiques et caryotypiques entre les deux lignées, il essaya de mettre en évidence une transformation (du type de celle qu'on trouve chez pneumococcus) en cultivant les deux types de cellules ensemble.

Après trois mois de culture mixte, apparut un nouveau type cellulaire, caractérisé par un nombre de chromosomes presque égal à la somme des nombres modaux (nombre de chromosomes présenté par le plus grand nombre de cellules) des deux types de cellules! C'était de toute évidence des cellules "hybrides". Elles contenaient dans un seul noyau les génomes combinés des deux parents. (il faut noter que la nature hybride de ce nouveau type cellulaire a pu être identifiée grâce à la présence de chromosomes marqueurs dans les deux lignées parentales).

Les premières publications de BARSKI furent reçues avec grand scepticisme ; les métaphases hybrides assez rares et observées parmi les métaphases des cellules parentales furent considérées comme des artéfacts résultant de la superposition dans les préparations caryotypiques des métaphases des deux parents.

C'est en 1960 que B.EPHRUSSI, convaincu de l'importance potentielle d'une telle expérience, reproduisit avec des lignées cellulaires semblables et endéans quelques mois les mêmes résultats.

Par la suite, de nombreuses études confirmèrent ces résultats et prouvèrent que les deux génomes parentaux étaient actifs dans ces hybrides somatiques provenant de lignées permanentes.

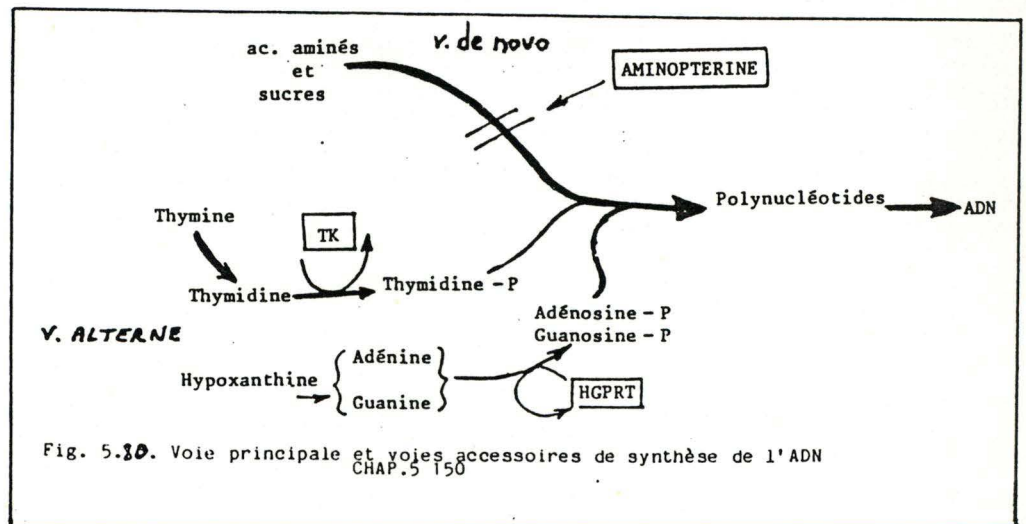
a. HYBRIDATION DE CELLULES DIPLOIDES NORMALES

Toutes les expériences d'hybridation entre cellules ou lignées cellulaires permanentes ne furent pas effectuées avec succès. Les différents échecs furent sans doute dûs à la rareté des hybrides entre certains types cellulaires ou au manque d'avantage sélectif de certains hybrides sur les cellules parentales.

Plusieurs hybrides nouveaux furent isolés par la suite et plus particulièrement une nouvelle sorte d'hybride d'une grande importance : on obtint les premiers hybrides entre cellules de souris de lignée cellulaire permanente et des cellules diploides d'une souris nouveau-né portant une translocation de petits chromosomes. Le nombre chromosomique total était, à un chromosome près, celui auquel on pouvait s'attendre ; c'est-à-dire à la somme des nombres chromosomiques des deux parents.

Ces hybrides étaient d'une importance particulière parcequ'ils montraient pour la première fois que des cellules diploides pouvaient aussi s'hybrider lorsque leurs partenaires étaient des cellules d'une lignée permanente, néoplasique.

FIGURE 4 :



* schéma tiré de Depelchin (1985).

b. LES PREMIERS SYSTEMES SELECTIFS POUR L'ISOLATION
D'HYBRIDES SOMATIQUES

En 1964, J.LITTLEFIELD démontra qu'en utilisant deux lignées cellulaires portant des marqueurs sélectifs différents, on pouvait établir (comme en génétique microbienne) un système sélectif dans lequel les hybrides survivraient, pas les cellules parentales.

Il utilisa pour cela deux lignées dérivées d'une lignée de souris hétéropleïde connue sous le nom de lignée L : une était résistante à la 8-azaguanine, l'autre à la 5-bromodeoxyuridine (Budr) .

Ces deux types de résistance sont à rattacher, respectivement au manque de l'enzyme hypoxanthine-guanine phosphorybosyl transferase (HGPRT) et de la thymidine kinase (TK) qui sont nécessaires à la phosphorylation et donc à l'incorporation d'analogues de base du DNA.

Le système de sélection des hybrides est basé sur le fait que les cellules de mammifères ont accès à deux chemins différents pour synthétiser les nucléotides. La voie DE NOVO où les nucléotides sont synthétisés à partir des sucres et des acides aminés, et la voie ALTERNE, qui utilise des nucléosides préformés, l'hypoxanthine et la thymidine (v.fig.4).

La voie primaire peut être bloquée par l'aminoptérine. L'utilisation de la voie alterne est fonction de la présence simultanée de la TK et de l'HGPRT. Ainsi, les cellules parentales résistantes (déficientes en enzyme) sont incapables de croître dans un milieu contenant de l'hypoxanthine, de l'aminoptérine et de la thymidine : un milieu HAT. Au contraire, les hybrides possédant les gènes des deux parents et donc pouvant produire de la TK et de l'HGPRT, se développent dans ce milieu.

Très tôt ce système de Littlefield fut utilisé comme modèle dans beaucoup d'expérimentations de ce type. Des marqueurs similaires, résistants à certaines drogues, furent introduits dans plusieurs autres lignées cellulaires permanentes et des hybrides furent obtenus par

FIGURE 4 bis : Schéma de production d'hybridomes.

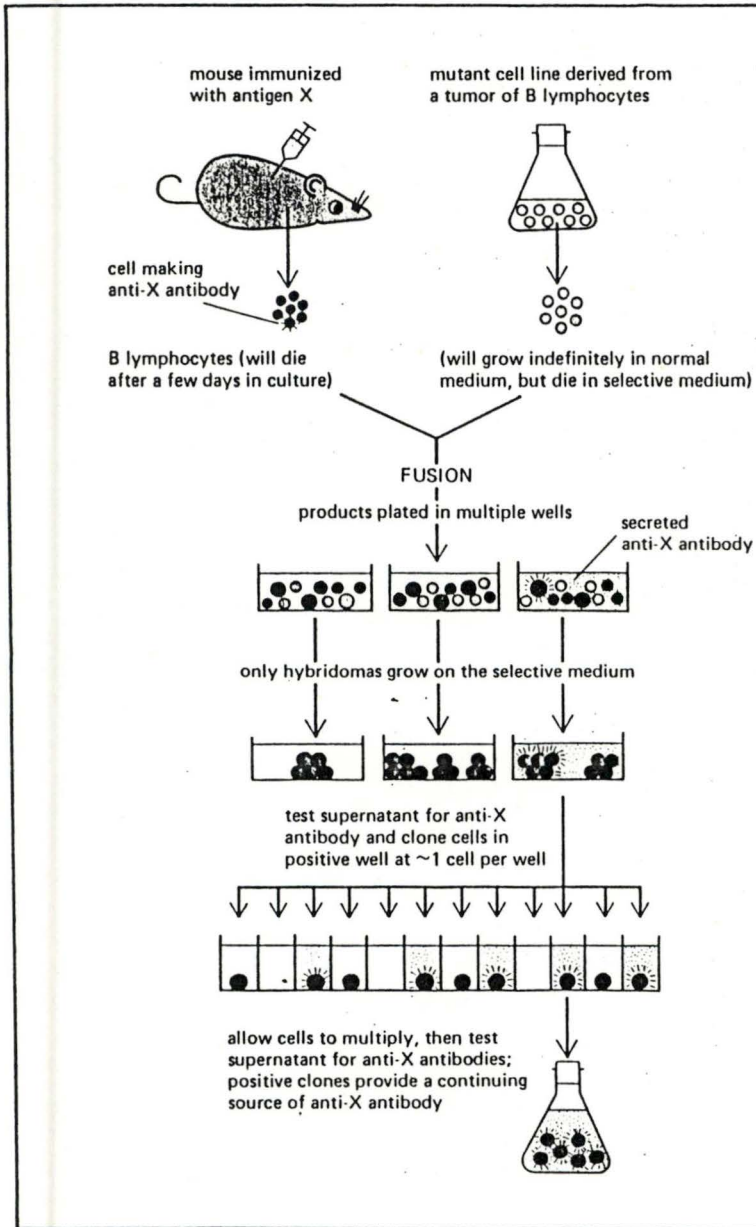


Figure 4-45 Schematic diagram showing how hybrid cells, or hybridomas, that secrete homogeneous monoclonal antibodies against a particular antigen (X) are prepared. The selective growth medium used contains an inhibitor (aminopterin) that blocks the normal biosynthetic pathways by which nucleotides are made. The cells must therefore use a bypass pathway in order to synthesize their nucleic acids, and this pathway is defective in the mutant cell line to which the normal B lymphocytes are fused. Because neither cell type used for the initial fusion can grow on its own, only the cell hybrids survive.

* Photocopie tirée de Alberts et al.(1983).

des procédures analogues.

Non moins important fut l'établissement par la suite d'un système semi-sélectif. En utilisant le même milieu sélectif, HAT, DAVIDSON et EPHRUSSI (1965) montrèrent qu'on pouvait obtenir des hybrides entre des cellules hétéroploïdes portant un marqueur sélectif et des cellules diploïdes sans marqueurs. Les cellules hétéroploïdes sont tuées par le milieu sélectif tandis que les hybrides possèdent les enzymes nécessaires à leur croissance. Ceux-ci sont facilement différenciés des cellules diploïdes parentales par leur vitesse de croissance différente.

Des expériences du même type ont montré plus tard que le taux effectif d'obtention d'hybrides était très élevé si on utilisait des proportions très différentes de cellules parentales (par exemple 10^6 cellules de lignée avec marqueur pour seulement 10^2 ou 10^3 cellules diploïdes). Le taux est de : une cellule diploïde sur 100 forme un hybride.

Si on augmente la proportion de cellules diploïdes, ce taux diminue (cet effet inexplicable est aussi observé dans d'autres croisements spontanés et dans des hybridations induites par virus).

2.- LES HYBRIDOMES

C'est en 1975 que KÖHLER et MILSTEIN eurent l'idée de fusionner des cellules de myélomes de souris et des lymphocytes b de rate de souris immunisée avec un antigène déterminé. Ils obtinrent ainsi les premiers HYBRIDOMES. (v.technique)

Ceux-ci possèdent à la fois le caractère immortel du myélome et la propriété de produire des anticorps spécifiques du lymphocyte (v.fig.4 bis).

D. SECRETIONS IN VITRO ET CARYOTYPE

Lorsqu'on injecte une molécule antigénique à un animal, il répond en synthétisant toute une série d'anticorps spécialisés, et présentant souvent une grande hétérogénéité dans une même famille. Il est très difficile de séparer ces différents anticorps.

On sait que chaque anticorps est fabriqué par un clone de lymphocytes unique. Il suffira donc d'isoler ce clone producteur d'anticorps et de le mettre en culture pour avoir une sécrétion permanente de protéines de même classe et de même affinité, dirigé contre l'antigène, c'est-à-dire un anticorps monoclonal.

Mais une culture continue de lymphocytes normaux est impossible car ils ne se multiplient que pendant quelques générations in vitro. Ne peuvent se multiplier in vitro indéfiniment que des cellules transformées!

Or dans certaines tumeurs malignes du système immunitaire comme les myélomes, un clone prolifère rapidement tout en produisant de grandes quantités d'immunoglobulines monoclonales. Ces cellules peuvent être cultivées indéfiniment et sécrètent in vitro la même immunoglobuline monoclonale. On ne peut malheureusement pas souvent découvrir contre quel antigène celle-ci est dirigée. On ne sait pas non plus faire produire à un myélome un anticorps dirigé contre un antigène donné (MILSTEIN, 1985).

Dans les hybridomes, comme nous l'avons vu plus haut, l'information des deux cellules fusionnées peut s'exprimer en même temps. Ils pourront donc synthétiser deux chaînes lourdes (H) et deux chaînes légères (L) de la protéine, conduisant à la formation de plusieurs immunoglobulines de spécificités différentes selon les combinaisons possibles d'association entre chaînes lourdes et chaînes légères (H_2L_2).

Si on veut éviter cette "diversité", on choisit des cellules myélomateuses mutantes, n'exprimant aucune chaîne d'immunoglobuline en plus de leur déficience en HGPRT et/ou en TK (cfr production d'anticorps monoclonal). Le type d'immunoglobuline secrété sera donc uniquement du lymphocyte avec lequel le myélome a été fusionné.

Les hybridomes sélectionnés d'après leur spécificité de production d'un anticorps particulier, pourront alors servir à une production abondante de celui-ci par deux méthodes : soit par inoculation à une souris histocompatible avec les cellules fusionnées, soit par croissance en milieu de culture (v.hybridomes utilisés et techniques de culture).

Il est évident par ailleurs que toutes les protéines qui se trouvent dans le milieu de culture et qui ont été secrétées par les cellules de myélomes et d'hybridomes, ont été en fait codées par des gènes se trouvant sur les chromosomes.

On sait aussi que pour chaque type de chaîne d'immunoglobuline (les chaînes légères k, les chaînes légères λ et les chaînes lourdes), il existe des "pools" de gènes séparés sur des chromosomes différents, à partir desquels une seule chaîne polypeptidique est éventuellement synthétisée (le DNA doit en effet être réarrangé pendant le développement d'une cellule B productrice d'immunoglobuline afin de constituer une "immunoglobuline entière").

Les gènes codant pour les protéines se trouvant sur les chromosomes, une relation directe peut être faite entre le caryotype observé des cellules de souris et les secrétions que l'on peut trouver dans le milieu de culture!

IL DEVIENT AINSI TRES INTERESSANT DE CARACTERISER CYTOGENETIQUEMENT LES CELLULES DE MYELOMES ET D'HYBRIDOMES AFIN D'ETABLIR EVENTUELLEMENT DES CORRELATIONS GENOTYPIQUES ET PHENOTYPIQUES.

E. BUTS DU PRESENT TRAVAIL

Nous avons entrepris le présent travail pour étudier les points suivants :

1. caractériser du point de vue cytogénétique des hybridomes couramment utilisés du point de vue expérimental :
 - étude numérique et morphologique des chromosomes pour chaque lignée .
 - mise en évidence de marqueurs chromosomiques éventuels.
 - caractérisation des chromosomes au moyen des techniques récentes de banding.
2. Identifier des changements caryotypiques survenus au niveau de chaque lignée.
3. Adapter des techniques de banding aux chromosomes des myélomes et hybridomes de souris, et situer l'étude de ces chromosomes de myélomes et d'hybridomes de souris dans le cadre de la cytogénétique actuelle du cancer.
4. Essayer d'établir les corrélations existant entre les chromosomes et les protéines secrétées afin de pouvoir ultérieurement localiser certains gènes.

CHAPITRE III

CHAP.III. HYBRIDOMES UTILISES ET TECHNIQUES D'ETUDE

A. LES HYBRIDOMES ET MYELOMES

1.-Origine des "myélomes" utilisés dans ce travail

La lignée cellulaire utilisée pour l'hybridation, SP₂/0, est une lignée bien connue des spécialistes dont l'origine est connue. Selon SHULMAN et al.(1978), la lignée SP₂/0-Ag 14 a été isolée à partir d'un reclonage d'une lignée SP₂/HL-Ag, elle-même dérivée en plusieurs étapes de la souche SP₂/HLGK. Cette dernière provient d'une hybridation entre une cellule de rate de souris BALB/c et le myélome X63-Ag8.

On sait que la souche SP₂/0-Ag14 est résistante à la 8-azaguanine, qu'elle meurt en milieu HAT (Hypoxanthine Aminoptérine Thymidine) et qu'elle ne synthétise pas de chaînes d'immunoglobuline. Elle aurait plus ou moins 73 chromosomes par rapport au myélome X63-Ag8 qui en posséderait environ 65 (SHULMAN et al.,1978).

Les "myélomes" étudiés ici (SP₂ de Bruxelles, SP₂ de Malroie et SP₂ de Namur) sont en fait déjà des hybridomes, ce qui n'est pas fait pour simplifier notre étude et qui pourrait expliquer la grande variabilité observée dans leur caryotype. Il s'agit d'une difficulté que nous n'avions pas prévue.

Vu les fréquents reclonages effectués, afin de "stabiliser" la lignée pour la production d'anticorps monoclonaux, l'interprétation des variations chromosomiques est plus délicate.

Dès lors, nous avons procédé comme suit : nous avons étudié pour la première fois le caryotype des lignées

qui nous étaient fournies.

Cette première étude nous a servi de point de départ (et pourra servir pour d'autres) ; à intervalles réguliers, de nouvelles études cytogénétiques ont été effectuées (et sont à prévoir dans le cadre d'un autre travail éventuel) pour estimer la stabilité du caryotype et la constance des "marqueurs" mis en évidence. En effet, il fallait s'assurer qu'il n'y avait pas de modifications (ou, au contraire, qu'il y en avait) en cours d'étude.

2.-Origine des hybridomes.

Le protocole expérimental utilisé est résumé ci-dessous (données aimablement fournies par le département d'immunologie) :

a. Production de cellules immunitaires

Dans le cas présent, on a utilisé des souris immunisées par des membranes plasmiques de rats chez lesquels un rappel a été effectué tous les 15 jours.

La rate est extraite stérilement et ensuite broyée avec un homogénéisateur dans du chlorure d'ammonium. On effectue une centrifugation et plusieurs lavages dans du milieu de culture RPMI 1640 sans sérum.

b. Cellules de myélomes

Le myélome utilisé est de la souche SP_{2/0}-Ag14 décrite ci-dessus et qui est lui-même déjà un hybridome monoclonal. Il répond ici aux conditions de compatibilité (homofusion souris-souris).

c. Fusion

On met les cellules de rate et de myélome dans un rapport proche de 6/1 respectivement, avec l'agent de fusion polyéthylèneglycol dans du milieu de culture RPMI 1640.

Il suffit par la suite de resuspendre les cellules fusionnées en milieu HAT et de les mettre en culture (plaque avec puits; la dénomination de l'hybride 4A8 venant d'ailleurs de la position de celui-ci dans cette plaque. Par exemple 4^e rangée, 8^e colonne).

Les clones intéressants sont conservés et préservés par congélation. La production importante d'anticorps se fera soit en culture, soit en réinjectant à l'animal ces cellules, provoquant une ascite.

Note : Le milieu de culture utilisé est le RPMI 1640; il est constitué de :

- HEPES (tampon)		4,7 gr/l
- Foetal calf serum		10 %
- Na H CO ₃		0,85 gr/l
- Pénicilline	10 unités/ml	10 ml/l
Streptomycine		
- Glutamine	200 mM	10 ml/l
- Sodium pyruvate	100 mM	10 ml/l
- RPMI minimum en poudre		
- pH	7,4	

B. TECHNIQUES CYTOGENETIQUES

Chez les mammifères, les chromosomes somatiques ne sont visibles que lors d'une division cellulaire (chez la drosophile, par exemple, on peut les observer en intercinèse). C'est au stade métaphasique de la division que l'observation est la plus aisée. L'obtention d'une source de cellules encore capables de se diviser est donc d'une importance fondamentale pour préparer les chromosomes mitotiques.

Nous avons pu bénéficier de la nature prolifique des myélomes et hybridomes de souris. De plus, la quantité de matériel d'étude qui nous était nécessaire, nous a été fournie tout au long du travail par le département d'immunologie. Cela nous a permis de traiter immédiatement les cultures de cellules sans devoir en assurer le maintien et de gagner beaucoup de temps.

1.- OBTENTION DES CHROMOSOMES

La mise en évidence des chromosomes mitotiques se fait par une technique bien connue : colchicine, solution hypotonique et fixation. Le principe est le suivant : la colchicine ajoutée au milieu bloque les métaphases par destruction du fuseau. La solution hypotonique permet de disperser les chromosomes au sein de la cellule. La fixation préserve les cellules dans cet état gonflé et l'étalement par séchage à l'air (air-drying) ramène tous les chromosomes dans un même plan. On peut, dès lors, effectuer une numération aisée au microscope optique.

Nous allons maintenant détailler ces diverses étapes.

a. Arrêt des cultures

Environ 2h30 avant la fin de la culture est ajoutée de la colchicine qui est en concentration finale de 1 g/ml , c'est-à-dire 0,1 ml de la solution stock par ml de culture.

Ces temps et concentration permettent d'éviter une condensation trop forte des chromosomes et mènent souvent à une bonne séparation des chromosomes métaphasiques.

b. Solution hypotonique

Une centrifugation préalable est nécessaire pour éliminer le milieu de culture. Elle se fait à 1200 RPM pendant 5-10 min.

La dispersion des chromosomes est réalisée grâce à l'utilisation d'une solution hypotonique de KCl. La solution stock étant à 6 % de KCl, on effectue une dilution 10, ce qui mène à une concentration finale égale à 0,6 %. La durée du choc hypotonique est de 7 min.

On centrifuge alors à 600 RPM pour éliminer le milieu hypotonique, ce qui évite une agression trop intense des cellules fragilisées par la solution hypotonique qui provoquerait une perte de chromosomes par rupture des cellules, ainsi que pour permettre une meilleure fixation.

c. Fixation

Un mélange de méthanol (contenant 1/5 d'isopropanol) et d'acide acétique glacial respectivement en proportion 3/1 est ensuite ajouté de manière

"anhydre" , par ml, au culot de centrifugation.

On laisse, après légère remise en suspension des cellules, le tout au frigo à 4° pendant une vingtaine de minutes.

On répète cette dernière étape 2 fois avec une centrifugation intermédiaire pour retenir les cellules, le surnageant étant jeté. On peut ainsi stocker les cellules au frigo pendant quelques temps.

d. Etalement sur lame

A l'aide d'une pipette Pasteur, on remet en suspension les cellules. Ensuite, on laisse tomber des gouttes sur des lames propres, mouillées, à 4°, et tenues légèrement inclinées.

On effectue un "air-drying" avec étalement énergique pour une bonne dispersion des cellules : on passe alors brièvement la lame au dessus d'une flamme pour sécher rapidement.

2.- COLORATION DE BANDING

Aucun des 40 chromosomes de souris ne peut être identifié après une coloration conventionnelle au Giemsa. Ils sont tous télocentriques et ne varient pas beaucoup en taille. Deux exceptions sont les chromosomes 19 et les chromosomes Y qui peuvent être identifiés avec certitude sans l'utilisation des techniques de banding (revu par MILLER et MILLER, 1975).

a. La mise en évidence des bandes : généralités.

On distingue plusieurs types de bandes.

1) Bandes_Q

Elles consistent en la mise en évidence de bandes fluorescentes après coloration à

la moutarde de quinacrine. Cette coloration ne demande pas de prétraitement spécial, mais une observation en fluorescence ; cette dernière pâlit rapidement, ce qui nécessite un examen rapide.

2) Bandes G

Un prétraitement des chromosomes fixés est nécessaire pour modifier les protéines associées au DNA. On dénature soit par la chaleur (60°) dans une solution salée, soit en traitant les chromosomes avec une enzyme protéolytique comme la trypsine.

La coloration utilisée est celle du Giemsa. Les chromosomes ainsi préparés montrent une succession de bandes claires et foncées.

La topographie des bandes G est constante pour chaque paire et se rapproche de celle des bandes Q. Cependant, les régions adjacentes au centromère qui contiennent l'hétérochromatine constitutive sont bien colorées par le Giemsa mais pas par la quinacrine.

3) Bandes R

Elles sont obtenues par dénaturation à la chaleur (87°). Elles représentent l'inverse des bandes G.

Cette technique a les mêmes applications que les bandes G, un intérêt supplémentaire réside cependant dans la mise en évidence plus marquée des régions télomériques (parties terminales des chromosomes).

4) Bandes C

Elles permettent de révéler l'hétérochromatine constitutive des chromosomes. On les retrouvera donc au niveau des centromères qui apparaissent fortement colorés tandis que les chromatides sont uniformément pâles.

L'essentiel consiste en un prétraitement alcalin.

Ce type de banding est utilisé pour localiser les centromères et, éventuellement, d'autres zones à hétérochromatine sur les chromosomes.

5) Bandes N

Ce système de bandes permet de mettre en évidence les régions porteuses des organisateurs nucléolaires (NOR) qui, autrement, ne peuvent l'être que par hybridation in situ.

Deux types de méthodes sont utilisées : les méthodes de dénaturation (bandes N) et les méthodes de précipitation argentique (Ag-NOR).

b. Description des techniques de banding utilisées.

Nous détaillerons ci-dessous les techniques que nous avons utilisées plus particulièrement pour le présent travail.

1) Technique "réversible" de mise en évidence des bandes G.

Les méthodes habituelles de coloration des bandes G couramment utilisées ont une action irréversible sur quelques constituants chromosomiques et cela d'une manière plus ou moins prononcée. Ceci rend le plus souvent impossible la répétition de la coloration sur une même lame.

C'est pourquoi, afin d'éviter une multiplication excessive de montages et préparations chromosomiques, il est apparu nécessaire d'utiliser une procédure de coloration complètement réversible, mise au point aux Facultés N-D de la Paix par le père LICHTENBERGER (1983).

On procède de la façon suivante :

- une solution de dilution (tampon "SN") comprenant

H ₂ O distillée	100 ml
Citrate de Potassium	2 gr
Urethane	1 gr
Chlorure de Sodium	0,25 gr
Eosine Y à 1%	0,8 ml

- la coloration des lames se fait par addition de Giemsa à cette solution.
- le mélange se fait dans des proportions 1/3-6, respectivement, de Giemsa et de tampon SN. Il doit être réalisé juste avant usage.
- le temps de coloration est de 2min.30sec.
- il faut ensuite rincer abondamment à l'eau courante
- il faut attendre que la lame soit sèche pour pouvoir l'examiner au microscope après montage au DPX ou non.
- il est possible de recolorer une lame après "nettoyage" à l'alcool et à l'eau. Pour recolorer une lame montée, il faut cependant effectuer un nettoyage préliminaire au toluol (qui permet d'enlever le milieu de montage) et d'effectuer exactement la même procédure.

2) Technique de mise en évidence des bandes C.

La technique utilisée est une légère modification de celle de SUMNER (1972).

On procède de la façon suivante :

- traitement pendant 15 min. à une solution saturée en hydroxyde de baryum à 50°C.
- rinçage à l'eau distillée.

- les lames sont alors plongées dans une solution de SSC X2 (NaCl 0,3 M ; Citrate trisodique 0,03 M) à 60°C pendant une heure.
- rinçage à l'eau distillée.
- coloration au Giemsa pendant 5 min.
- rinçage à l'eau courante et séchage.

note : Un traitement insuffisant à l'hydroxyde de baryum entraîne une coloration trop prononcée des chromatides et donc, un mauvais contraste des bandes (C). Il faut alors le prolonger de 30 sec. Par contre, un traitement trop long provoque un non marquage des chromosomes qui apparaissent très pâles.

3) Les techniques de mise en évidence des bandes N.

Deux types de méthodes permettent de colorer les régions porteuses des organisateurs nucléolaires : par dénaturation (bandes N à proprement parlé) ou par précipitation argentique (coloration Ag-NOR).

* La technique initiale de bandes N faisant intervenir un traitement à l'acide trichloracétique et à l'HCl, à chaud, a été modifiée (FUNAKI et al., 1975) :

- incubation à 96°C dans une solution de Na H₂PO₄ M à pH 4,2 (ajusté avec du NaOH 1N) pendant 15 min.
- rinçage à l'eau distillée et coloration pendant 20 min. dans une solution de Giemsa à 4% dans du tampon phosphate 1/15 M à pH 7.
- rinçage à l'eau courante et "air-drying".

* Une technique directe de coloration par le nitrate d'argent (BLOOM et GOODPASTURE, 1976) permet de visualiser certains NORs rapidement :

- recouvrir les lames avec une solution de nitrate d'argent à 50% dans de l'eau distillée.
- couvrir par une lamelle.
- mettre en chambre humide pour éviter la dessiccation de la préparation, pendant 4 heures à 50°C.
- rinçage à l'H₂O dist. et séchage à l'air.
- coloration éventuelle au Giemsa 2%, 15 sec. si le contraste des chromosomes est trop faible.

rem. : Il est cependant difficile d'interpréter les lames vu certaines précipitations non-spécifiques; de plus, cette technique ne révèle pas tous les NORs.
Il semble donc préférable d'utiliser la méthode à développeur colloïdal de HOWELL et BLACK (1980) pour éviter ces problèmes.

- 4) Il est possible de faire ces différentes colorations l'une après l'autre en suivant cependant un certain ordre. Par exemple, effectuer des bandes G puis des bandes C , ou des bandes N puis des G. Cela permet d'accumuler des informations différentes à partir d'une même métaphase.

3.- TECHNIQUES MICROPHOTOGRAPHIQUES

L'étude du caryotype se fait par examen au microscope optique des lames préparées précédemment.

Il faut repérer les mitoses sur la lame d'abord à faible grossissement, ensuite à des grossissements supérieurs si elles répondent aux critères que l'on s'est fixé au départ : bon étalement, coloration suffisante, chromosomes dont les chromatides sont restées accolées,...etc. Une fois trouvée, la métaphase convenant à l'analyse est observée à l'immersion pour arriver à un grossissement de 1250 fois.

Il faut s'astreindre à examiner ainsi chaque lame pour repérer les meilleures métaphases qui seront photographiées par la suite.

Bien que la détermination du nombre modal (nombre de chromosomes le plus souvent rencontré par métaphase) et, plus rarement, l'identification des chromosomes puissent se faire directement, on travaille plutôt sur microphotographies

En effet, dans le cas de la souris et, plus spécialement, des myélomes et hybridomes, la détermination du nombre modal n'est pas chose facile : tous les chromosomes de souris sont télocentriques (ils ont leur centromère en position terminale), de tailles presque identiques mais surtout pour les myélomes et hybridomes, ils sont bien plus nombreux que le nombre modal établi de la souris : 50 à 110 chromosomes par rapport aux 40 habituels.

Pour des métaphases ayant plus de 100 chromosomes dans les hybridomes, il devient d'autant plus difficile d'en trouver de bien étalées ! L'observation est donc longue avant d'en trouver une où tous les chromosomes sont séparés.

Heureusement, la détermination du nombre modal peut quand même se faire si quelques chromosomes seulement se touchent ou se superposent. Par contre, l'identification précise des chromosomes (par la technique des bandes) ne peut se faire convenablement sur de telles préparations !

Les microphotographies permettent une numération des chromosomes, leur classement éventuel selon la taille, après découpage.

Lorsque de belles bandes apparaissent sur les chromosomes, il devient possible de les regrouper de manière univoque.

Ces microphotographies permettent, en outre, d'obtenir un contraste optimal parmi les différentes bandes par l'utilisation d'un certain type de papier, d'un certain temps d'exposition, ...etc.

Les mitoses choisies pour cette étude ont été photographiées en utilisant un film AGFA ortho 25 à haut pouvoir de résolution. L'utilisation d'un filtre vert donne un fond très clair sur les positifs et augmente la netteté des bords des chromosomes. Les photographies ont été agrandies environ 4 fois, donnant un agrandissement final de plus de 4000 fois.

Le classement des chromosomes en fonction d'un critère choisi (longueur, indice centromérique, ...etc.) permet d'effectuer le caryotype.

Ce classement plus précis est basé sur le fait qu'au niveau de toute cellule diploïde, les chromosomes sont par paires : un élément d'origine paternel, l'autre d'origine maternelle.

On peut donc reconstituer des paires qui ont parfois des détails caractéristiques, sauf chez la souris où ils sont tous télocentriques si on n'utilise pas la technique de bandes.

Cependant, un détail particulier peut parfois, à lui seul, permettre de reconnaître un chromosome : c'est un chromosome marqueur.

Par exemple, chez la souris, l'apparition d'un chromosome métacentrique (c'est-à-dire à centromère médian) peut être considéré comme un chromosome marqueur s'il est unique. S'il y en a plusieurs, identiques en taille et en position du centromère, il faut nécessairement recourir aux techniques de banding pour en avoir une identification correcte.

FIGURE 5 :

Métaphase présentant des chromosomes trop condensés.

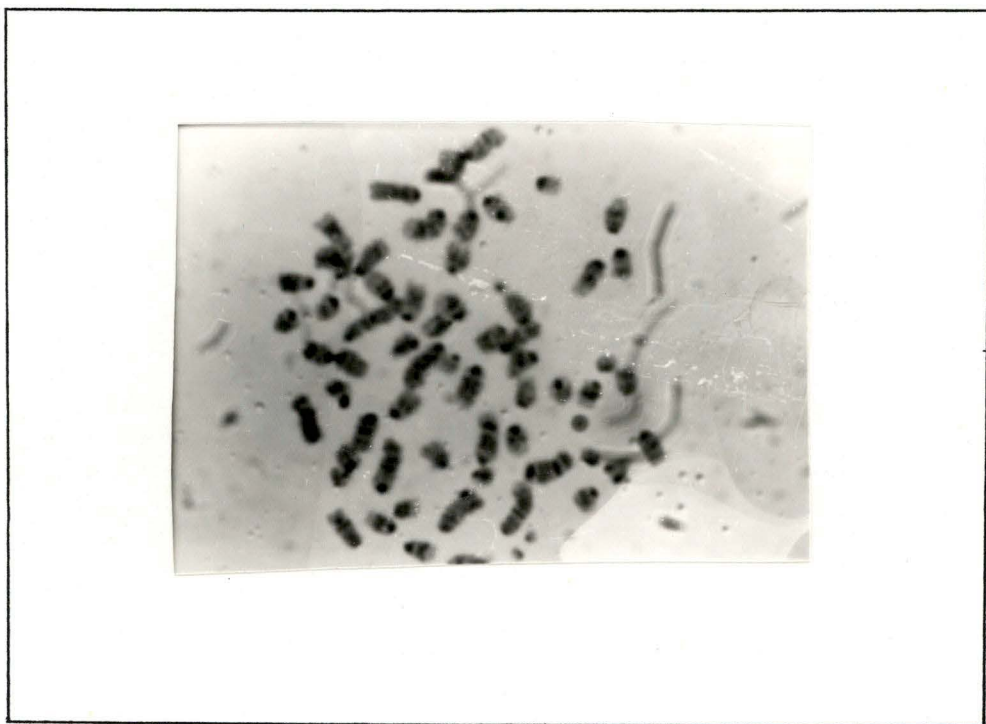


FIGURE 6 :

Exemple de métaphase présentant des chromosomes aux chromatides décollés.



C. ADAPTATION DES TECHNIQUES AUX HYBRIDOMES
ET MYELOMES DE SOURIS.

Les techniques d'obtention des chromosomes et des systèmes de banding étant difficiles, de nombreuses mises au point ont été nécessaires avant l'obtention d'images satisfaisantes. Les modifications majeures effectuées sont ainsi détaillées ci-dessous.

1.- PREPARATION DES CHROMOSOMES

Après examen au microscope de plusieurs lames préparées avec la méthode habituelle (v.p. 34), nous avons observé que, de manière générale, les chromosomes étaient trop condensés (v. fig. 5).

Les métaphases avaient des chromosomes mal séparés et aux chromatides souvent (pas toujours) décollées (v.f.6). Le nombre de métaphases présentes sur les lames était relativement grand, avec une variation non nette entre types de lignées myéломateuses.

Il nous est donc apparu nécessaire de changer, dans un premier temps, la durée d'exposition à la colchicine et/ou sa concentration finale dans la culture afin de diminuer la condensation des chromosomes.

a) Modifications concernant la colchicine.

Le temps fut gardé à 2H30 dans des échantillons contrôles, les autres étant soumis à des temps d'exposition de 2H00, 1H30, 1H00, 30 min. et les derniers sans colchicine du tout.

Si on n'ajoute pas de colchicine, il apparaît quand même des métaphases avec chromosomes relativement allongés, mais en petit nombre.

Une première conclusion pouvait être dégagée de nombreux examens au microscope : la colchicine permettait d'obtenir plus de métaphases (comme prévu par ses propriétés bien connues) et une durée d'action de 30 min. semblait favoriser l'allongement suffisant des chromosomes.

La concentration en colchicine semble avoir un effet plus difficilement mis en évidence. En effet, seules des concentrations nettement différentes ont montré des modifications apparentes au niveau des chromosomes ; par exemple, une trop faible concentration empêche une action de la colchicine au niveau de beaucoup de métaphases.

Une solution optimale, combinant le temps d'exposition et la concentration de la colchicine les plus favorables, a pu ainsi être mise au point.

b) Modifications concernant la solution hypotonique.

Le problème majeur rencontré est l'étalement des chromosomes, dû à leur nombre élevé. Il faut donc agir sur les facteurs le favorisant : la solution hypotonique et la méthode d'étalement elle-même (v. point c))

- Nous avons ainsi essayé d'allonger le temps d'exposition à la solution hypotonique et/ou sa concentration : colchicine pendant 30 min. , solution hypotonique pendant 5, 15 et 30 min.

Les résultats ont montré que la durée d'exposition à la solution hypotonique ne semble pas avoir d'influence après une durée d'action minimale de 10 min. ; cela pour la concentration habituelle de cette solution.

- En variant par la suite la concentration de la solution qui fut portée à 0,3 %, 0,45 % et 0,9 % de KCl, nous n'avons pu constater d'amélioration dans les étalements ; pour une concentration de 0,03 %, peu de métaphases furent trouvées (à cause sans doute de l'éclatement des cellules dans un milieu trop peu concentré).

Suite à ces divers changements, nous avons pu constater que l'obtention de bons résultats était dépendante d'un temps d'exposition de 10 min. et d'une concentration de la solution de KCl à 0,06 %.

c) Modifications concernant la fixation des cellules.

Essayant d'améliorer les étalements, nous avons modifié la technique de base de fixation

- soit en effectuant un troisième passage au fixateur, estimant qu'il y aurait une meilleure dissolution des protéines (RONNE et al., 1979) ,
- soit en fixant pendant une nuit à 4°C ,
- soit en fixant directement les cellules dans du méthanol pur selon la nouvelle technique de Korthof (1986).

Cette technique vise à préserver les cellules en un état rétréci et évite des pertes lors de l'addition de fixateur à acide acétique. L'étalement est alors effectué directement sur la lame (non plus dans des tubes coniques). Selon le mélange alcool/acide acétique en proportions diverses, un contrôle peut être alors obtenu.

Cette méthode permet aussi de stocker les préparations pendant plusieurs jours en changeant le fixateur de temps en temps.

Les séquences à suivre sont les suivantes on laisse couler deux, trois gouttes de cellules fixées au méthanol pur sur la lame qui a été nettoyée au préalable à l'acide et à l'alcool.

Immédiatement après, on superpose des gouttes d'un mélange ac. acétique/méthanol de concentration définie à l'avance. En essayant des concentrations différentes de ce mélange, on arrive à des étalements plus ou moins bons.

Les chromatides sont malheureusement souvent décollées (ceci pouvant être dû à une action trop forte de l'acide acétique) et "attaquées" : les bords des chromosomes ou même tout le chromosome sont peu nets.

- soit en fixant normalement mais sans isopropanol (qui pourrait freiner un "scattering" des chromosomes).

- soit en fixant selon la manière "classique" avec resuspension dans 0,1 ml de solution hypotonique et pas de façon "anhydre".

d) Modifications concernant l'étalement.

Il nous est apparu utile d'essayer d'apporter des modifications à la méthode habituelle ou même d'autres techniques d'étalements.

- "air-drying" : nos étalements habituels n'étant pas satisfaisants, nous avons tout d'abord pensé à augmenter la hauteur à partir de laquelle on laisse tomber les gouttes sur les lames ; le reste consistant en un "air-drying" ordinaire (ROTHFELS et al., 1958

- par la suite, nous avons essayé d'augmenter les dilutions des suspensions cellulaires afin de permettre à chacune de s'étaler sans être superposées ou freinées par d'autres.

Jusqu'ici, seules les méthodes dites "classiques" avaient fait l'objet de modifications. Deux techniques moins utilisées ou plus récentes ont cependant été employées ; elles sont décrites ci-après.

- "Blaze-drying" : Lorsque des étalements adéquats ne peuvent être obtenus, un séchage, en faisant brûler la solution fixatrice (=blaze-drying), peut être parfois utile. Les préparations effectuées ne se colorent cependant pas aussi vite que lors du séchage à l'air et il y a souvent de mauvaises bandes sur les chromosomes.

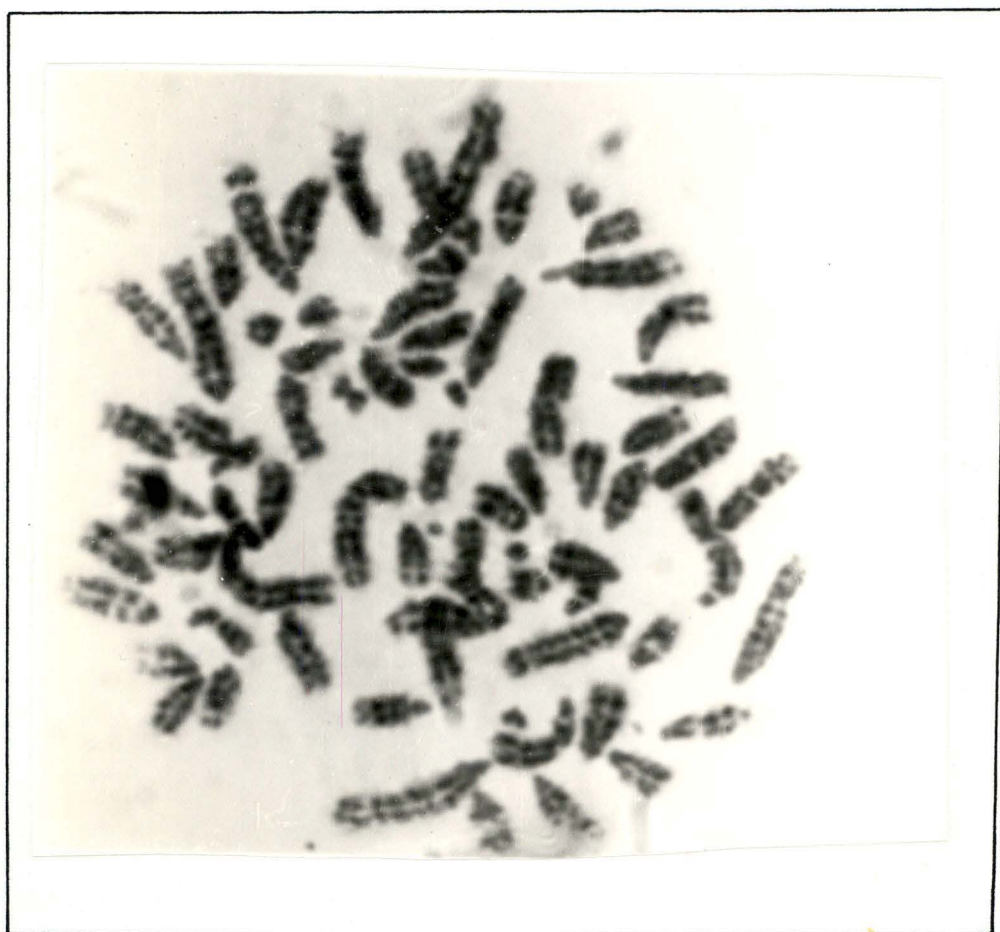
- Technique de Korthof :

L'autre technique utilisée est celle de KORTHOF (1986). Bien que précédemment décrite pour son action sur la fixation, y intervient aussi l'étalement qui se fait directement sur la lame.

Ce dernier est réalisé par l'addition d'un mélange d'alcool et d'acide acétique en proportions diverses sur les cellules préalablement disposées sur la lame, ce qui permet aux chromosomes d'être "éparpillés".

FIGURE 7 :

Exemple de microphotographie tirée à partir d'une lame répondant suffisamment aux critères demandés.



2.- COLORATION DES CHROMOSOMES

La coloration habituelle au Giemsa a été gardée avec cependant utilisation d'un tampon "SN" du laboratoire (v.p.35). Il a juste fallu modifier les proportions utilisées de cette solution et du Giemsa pour arriver, après plusieurs essais, à une coloration suffisante des lames.

En effet, un temps d'application trop long provoque une sur-coloration et une quantité trop grande de tampon SN entraîne une décoloration des chromosomes. Le mélange de ce colorant mixte (présence d'éosine dans le tampon SN) est de plus indispensable pour une coloration homogène de la préparation.

L'aspect attendu des chromosomes après coloration est lui-même dépendant de plusieurs facteurs : il faut une netteté, une résolution et un contraste suffisant sur les lames dont on tirera des microphotographies (celles-ci devront répondre aux mêmes critères), (v.fig.7). C'est pourquoi, un bon microscope et une bonne manipulation de celui-ci ainsi que l'utilisation d'un bon matériel photographique, sont indispensables.

L'étude du caryotype de myélomes et d'hybridomes de souris s'est réalisée du point de vue "banding" essentiellement par utilisation et mise en évidence des bandes G pour l'identification globale des chromosomes présents ; mais des essais de bandes C et bandes N furent aussi effectués pour mieux caractériser certaines particularités.

Le choix de ces techniques s'explique par le fait que :

- les "bandes G" donnent plus de contraste que les bandes Q, car les souris possèdent des centromères tous terminaux ;

Les bandes R sont d'un certain intérêt pour délimiter la taille des chromosomes et localiser les points de cassure des réarrangements mais ne sont pratiquement pas utilisées chez la souris.

La méthode suivie pour les bandes G est de plus, comme précédemment signalé, réversible, ce qui présente un avantage important dans l'adaptation d'une technique à l'étude des myélomes et hybridomes.

- les "bandes C" ont été utilisées pour détecter d'éventuelles translocations ou apparitions de matériel hétérochromatique ainsi que pour caractériser les petits chromosomes et les "doubles minutes" car, chez la souris, il n'y a habituellement que les centromères qui sont marqués.

- les "bandes N" ont été utilisées pour identifier éventuellement les chromosomes porteurs des NORs, chez la souris les paires 12, 15, 16, 17, et 18 (EVANS, 1981), en position centromérique.

Chez des souris sauvages, des NORs terminaux ont été détectés en position terminale de la paire 4 (WINKING et al., 1980).

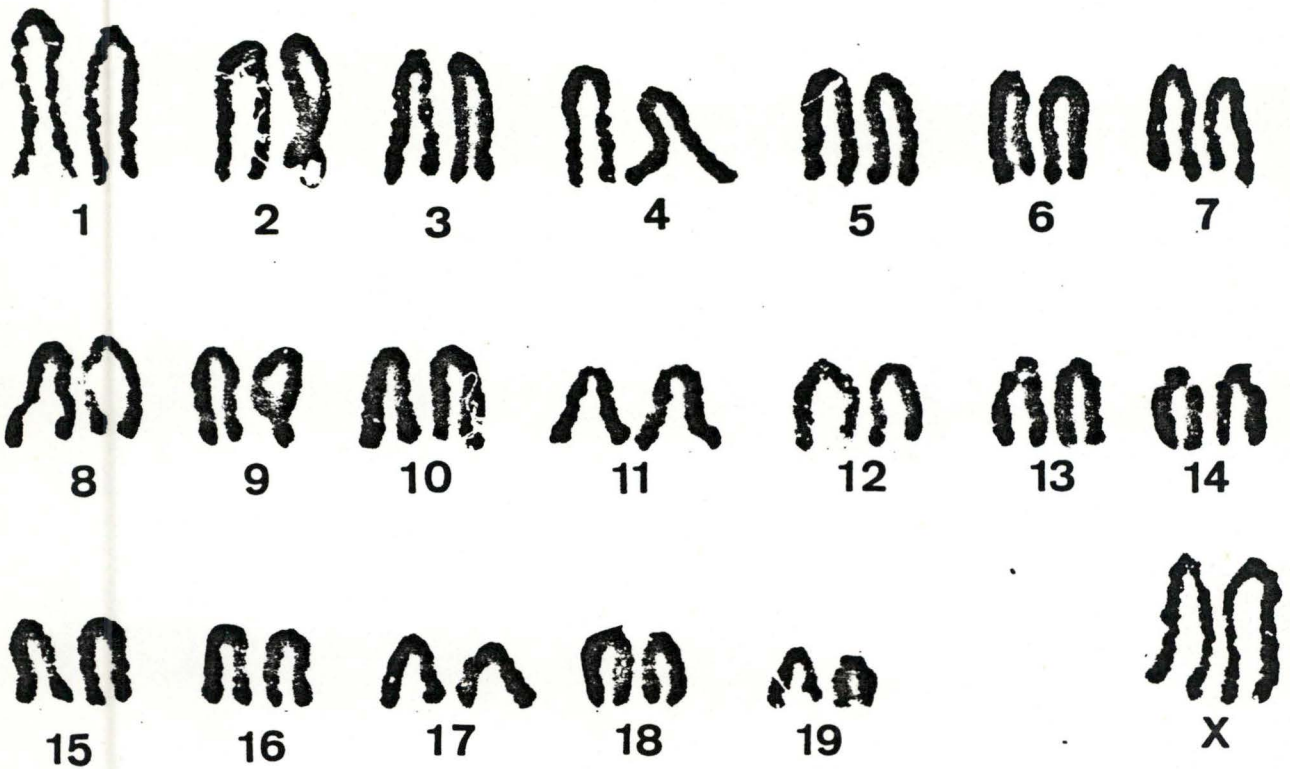
Une coloration à l'argent détermine les endroits potentiellement actifs pour la transcription (DIMOVA et al., 1982) et, avec la technique rapide, "propre" et complète de HOWELL et BLACK (1980), des éventuelles variations dans l'emplacement des organisateurs nucléolaires semblent d'investigation utile, surtout pour ceux qui pourraient se trouver sur les chromosomes réarrangés.

Enfin, les techniques de dénaturation effectuées selon la méthode de FUNAKI et al. (1975), n'ont pas donné un contrôle suffisant de spécificité qui, d'ailleurs, pose encore des problèmes lors de la précipitation à l'argent (colorations des centromères ressemblant aux bandes C, aux colorations des kinétochores, ...etc.).

CHAPITRE IV

FIGURE 1 :

A.



B.

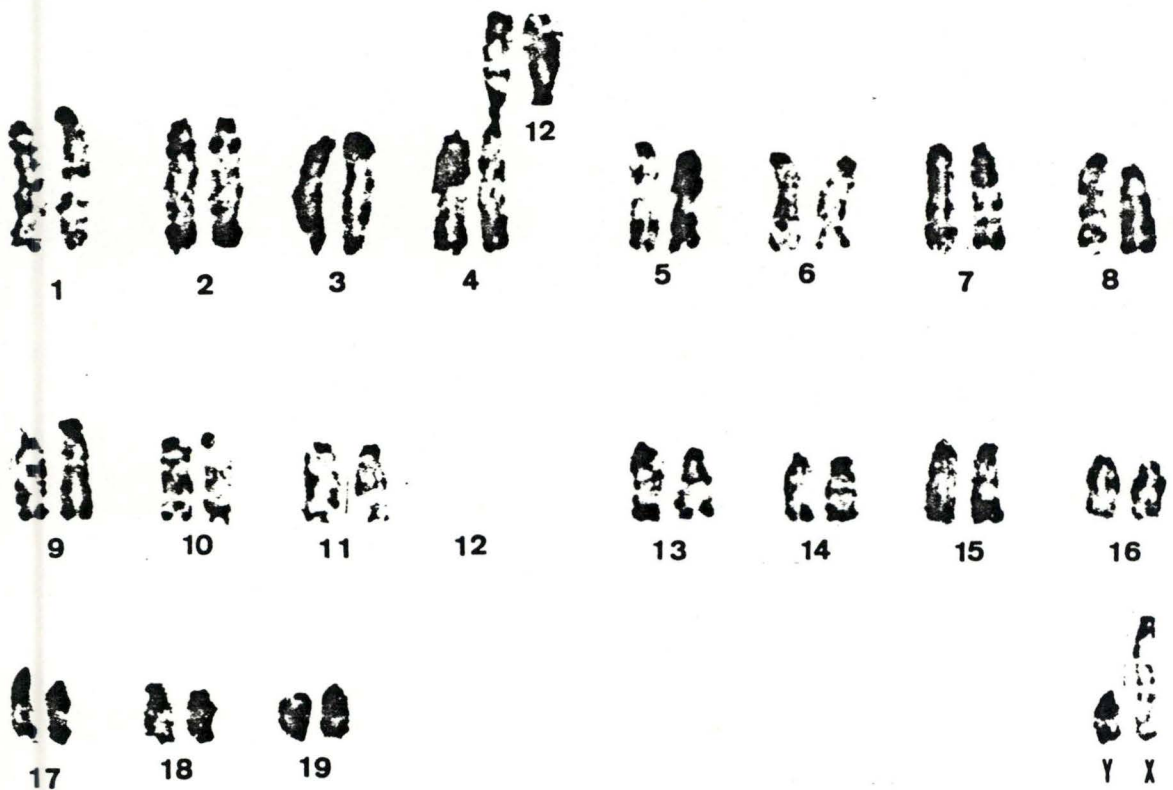


Fig. A : Caryotype d'une cellule de souris femelle normale avec les chromosomes classés par taille.

Fig. B : Caryotype de référence en bandes G d'une cellule de souris mâle normale et présentant ici une fusion 4;12

CHAP. IV. RESULTATS

1.- CARYOTYPE DE SOURIS NORMALE

Afin de pouvoir préciser le "contexte" chromosomique auquel on devait s'attendre dans l'étude des myélomes et hybridomes de souris, il paraît utile et nécessaire de montrer ici le caryotype d'une souris normale (v.fig.1), qui pourra être comparé à celui de cellules cancéreuses de souris.

On pourra notamment constater que les 60-70 chromosomes de celles-ci ne proviennent pas d'une triploidisation ou tétraploidisation éventuelle de chromosomes normaux !

En effet, les bandes chromosomiques montrent qu'il est la plupart du temps impossible de retrouver un même type de banding que celui présenté par le caryotype de la souris normale, chez les myélomes et hybridomes.

Il faut donc pouvoir comparer les résultats obtenus grâce aux bandes à la référence d'un caryotype de souris normale (v.discussion).

Les chromosomes de souris sont tous télocentriques et ne varient presque pas de taille. Le nombre diploïde de la souris de laboratoire est habituellement 40. Mais même avec les premières études de banding, une certaine variabilité empêchait une détermination rapide et facile.

Pour s'apercevoir combien les différents systèmes de banding prêtaient à confusions, il faut rappeler que même des spécialistes ont initialement mal identifié certains chromosomes (comme l'indiquent MILLER et MILLER en 1975) chez la souris normale !

Pour l'étude cytogénétique des cellules cancéreuses de souris, il faut un système d'identification univoque, surtout si on veut déterminer l'origine de réarrangements chromosomiques observés ; sans les bandes, seuls les chromosomes 19 et Y peuvent être reconnus.

2.- DETERMINATION DES NOMBRES MODAUX

On appelle nombre modal le(s) nombre(s) de chromosomes présentés par le plus grand nombre de cellules.

Lors des premières analyses du caryotype des myélomes et, plus particulièrement, des nombres modaux propres à chaque lignée, nous nous attendions à des résultats relativement constants et à une détermination aisée du nombre de chromosomes présents dans chaque métaphase. C'était sans compter sur la grande variabilité qu'allait présenter l'étude des myélomes et hybridomes de souris.

En effet, les premiers résultats ont montré une numération très dispersée des chromosomes : il n'y avait pratiquement jamais dix métaphases successivement étudiées ayant le même nombre. De plus, entre chaque type de myélome et l'hybridome, ce nombre paraissait aussi être assez différent.

Ces premières données indiquèrent alors la voie d'étude à suivre nécessairement : la détermination exacte de la distribution des chromosomes présents dans les cellules de chaque lignée.

Pour avoir une détermination relativement fiable, nous nous sommes basés sur l'analyse de cinquante métaphases pour chacun des trois myélomes et l'hybridome.

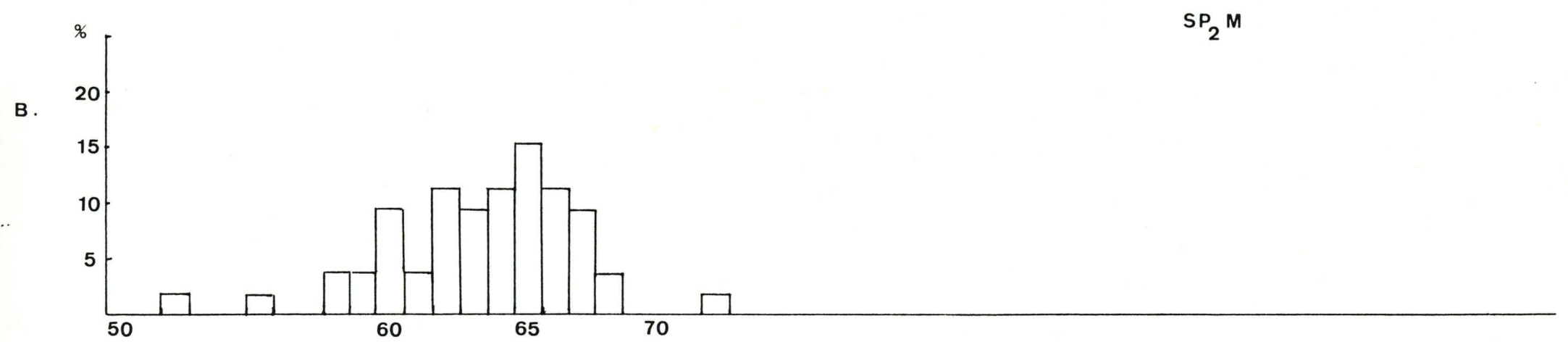
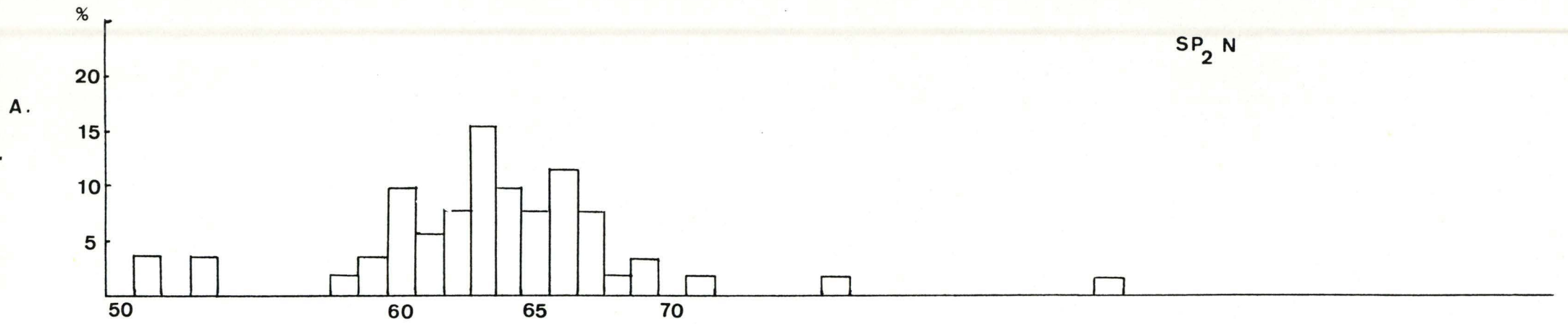


FIG. 2 : DISTRIBUTION DES CHROMOSOMES DES MYELOMES SP₂ N (FIG.A) ET SP₂ M (FIG.B) SUR 50 METAPHASES

ABS.: NOMBRE DE CHROMOSOMES
 ORD.: POURCENTAGE DE CELLULES MONTRANT LE NOMBRE

Le relevé s'est fait de la façon suivante:

- choix de lames permettant, par leur "qualité" d'étalement, la numération des chromosomes.
- recherche de métaphases adéquates avec prise d'un repère pour pouvoir les retrouver par la suite.
- prise des microphotographies.
- comptage des chromosomes sur chaque microphotographie, plusieurs fois pour éviter une erreur de comptage vu le nombre élevé de chromosomes.

Nos résultats sont relevés dans les deux graphiques ci-joints (Fig.2 et 3). Ils ont été établis en mettant en abscisse le nombre de chromosomes et en ordonnée, le pourcentage de métaphases présentant le nombre de chromosomes indiqué (% à partir donc de 50 métaphases).

En examinant la figure 2a, on peut voir que les nombres chromosomiques sont assez bien dispersés au niveau du myélome SP₂N, avec un petit pic de 63 chromosomes, concernant environ 15 % des métaphases. Toutefois, la distribution s'étale de 51 à 86 chromosomes ; on peut cependant considérer que 90 % des cellules ont entre 58 et 69 chromosomes.

La figure 2b montre que le myélome SP₂M présente également une très large dispersion avec un petit pic à 65 chromosomes, nombre observé dans environ 15 % des métaphases.

La distribution s'étale de 52 à 81 chromosomes ; on peut cependant considérer que 95 % des cellules ont entre 58 et 68 chromosomes.

La figure 3a permet de préciser que le myélome SP₂B présente un nombre modal de 67 chromosomes compté au niveau de 25 % des métaphases.

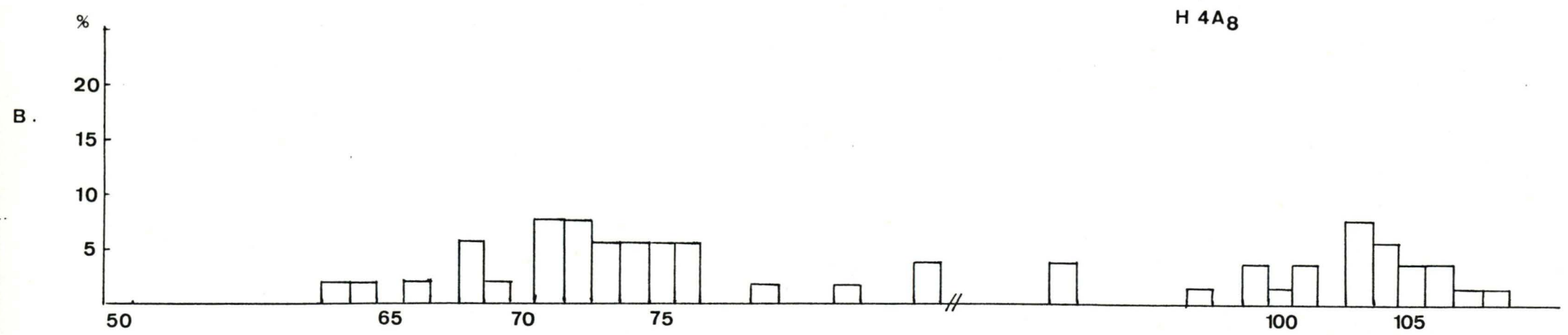
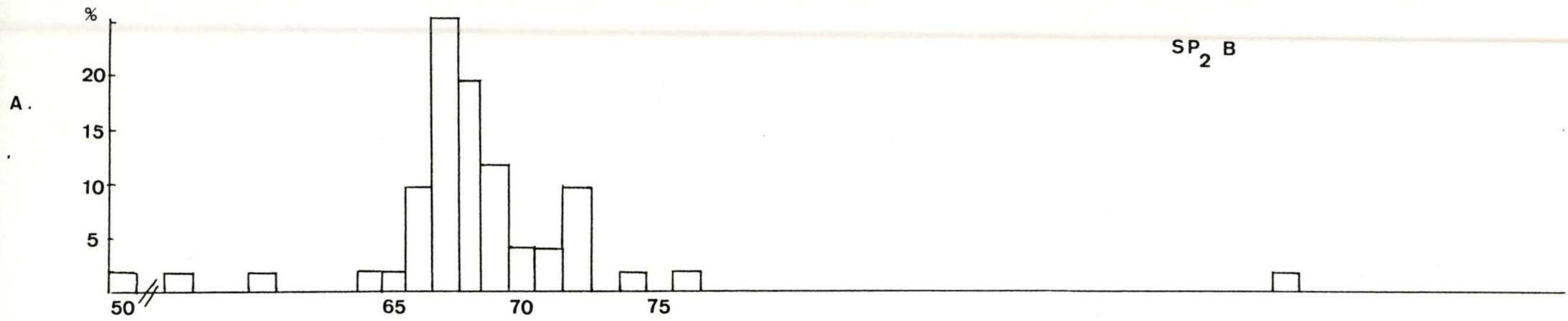


FIG. 3 : DISTRIBUTION DES CHROMOSOMES DU MYELOME SP₂B (FIG.A) ET DE L'HYBRIDOME 4A8 (FIG.B) 50 METAPHASES
 ABS.: NOMBRE DE CHROMOSOMES
 ORD.: POURCENTAGE DE CELLULES MONTRANT LE NOMBRE DE CHROMOSOMES INDIQUE

La distribution s'étale de 50 à 89 chromosomes (avec une seule métaphase à 100 chromosomes!) ; on peut cependant considérer que 90 % des cellules ont entre 64 et 72 chromosomes.

La figure 3b montre qu'il est difficile d'attribuer un nombre modal à l'hybridome 4A8. La distribution s'étale de 63 à 108 chromosomes avec cependant une double répartition : se distinguent nettement une partie des chromosomes basée sur le nombre médian 71-72 et l'autre sur 103 chromosomes.

Ces résultats ayant montré une assez grande variation dans la détermination des nombres de chromosomes, nous avons alors effectué une détermination sur 50 métaphases supplémentaires pour chaque lignée.

Au total, nous avons compté 100 métaphases par lignée, ce qui représente environ 30.000 chromosomes qui ont été séparés suivant leur taille (chromosomes "normaux" double minutes, ...etc.). Les résultats se trouvent reportés à la fig.4 .

La figure 4a montre que la lignée SP₂N a toujours une dispersion de 50 à 86 chromosomes ; comparée à la figure 2a, on peut cependant observer que le nombre de cellules à 63, 65, 66 et 67 chromosomes est à peu près identique.

Le pic à 63 chromosomes a disparu et, s'il est difficile de parler encore de pic, on voit néanmoins que le plus grand nombre de cellules à même numération se situe à 67. Environ 50 % des mitoses ont entre 63 et 67 chromosomes.

La figure 4b permet de préciser, comparée à la fig.2b, que la dispersion des nombres chromosomiques s'effectue autour d'un pic de 60, et non plus de 65 ; 60 % des mitoses ont entre 60 et 65 chromosomes

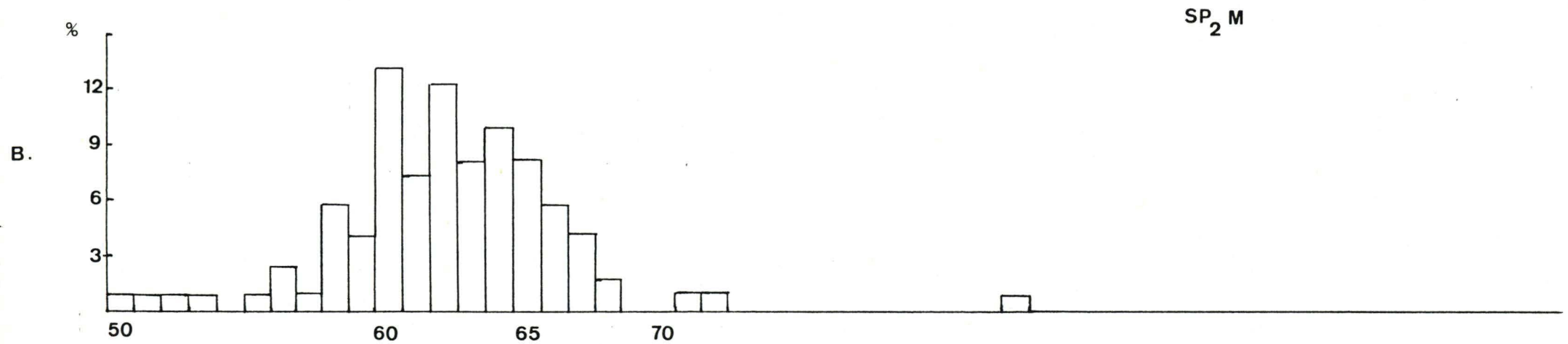
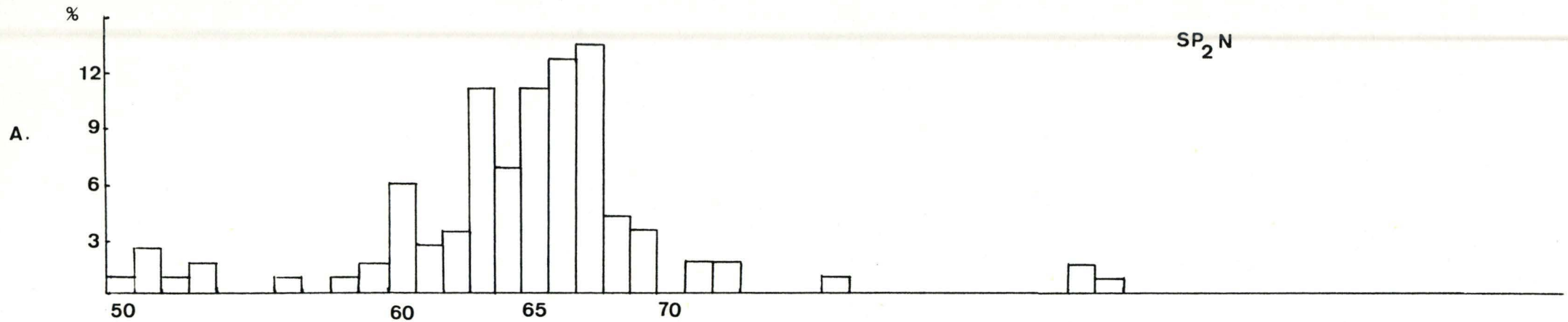
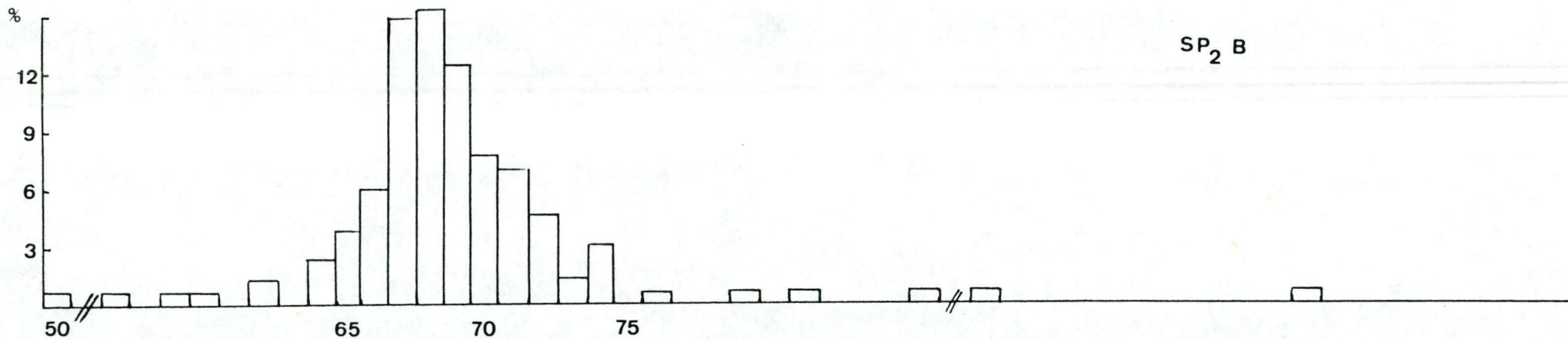


FIG. 4 : DISTRIBUTION DES CHROMOSOMES DES MYELOMES SP₂N (FIG.A) ET SP₂M (FIG.B) SUR CENT METAPHASES

ABS.: NOMBRE DE CHROMOSOMES

ORP. POURCENTAGE DE CELLULES MONTRANT LE NOMBRE

A.



B.

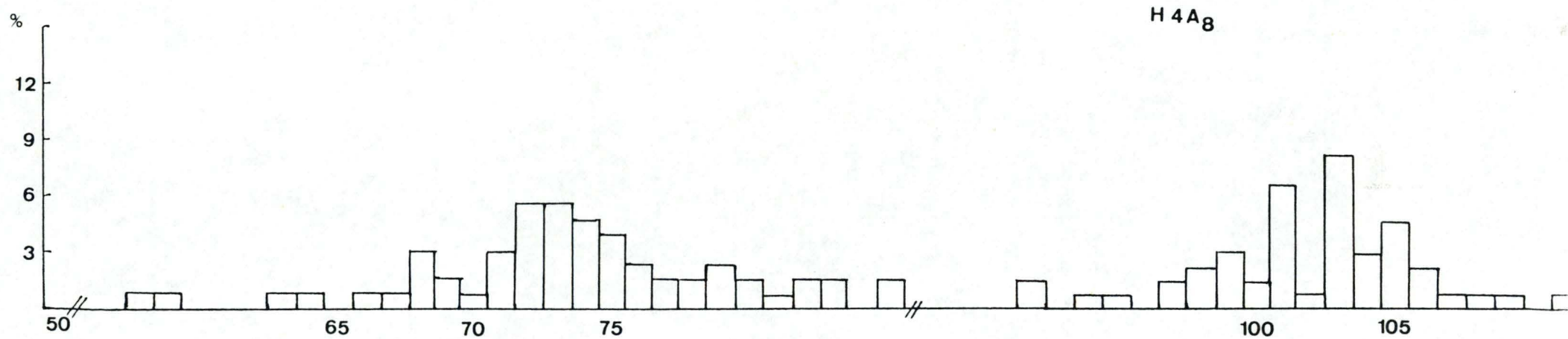


FIG. 5 : DISTRIBUTION DES CHROMOSOMES DU MYELOME SP₂B (FIG.A) ET DE L'HYBRIDOME 4A8 (FIG.B) SUR CENT METAPHASES
ABS.: NOMBRE DE CHROMOSOMES
ORD.: POURCENTAGE DE CELLULES MONTRANT LE NOMBRE DE CHROMOSOMES INDIQUÉ

La figure 5a peut être comparée à la fig.3a : la numération de 100 mitoses montre que les mitoses à 67 et 68 chromosomes sont en nombre presque égal (le pic à 67 a disparu) ; 45 % des mitoses ont entre 67 et 69 chromosomes .

Enfin, la figure 5b confirme et précise la dispersion déjà notée sur la fig.3b.

La figure 6 précise les nombres à partir desquels ont été construits les histogrammes des figures précédentes.

Incontestablement, l'étude effectuée sur 100 métaphases montre donc des changements par rapport à celle portant sur 50 métaphases. Elle est sans aucun doute plus précise.

Une détermination sur un nombre encore plus important de mitoses pourrait être entreprise mais ne ferait probablement qu'améliorer l'allure de la distribution du nombre de chromosomes.

On peut du reste noter ici (et cela fera l'objet d'une partie de notre discussion) qu'aucune étude, à notre connaissance, n'a été effectuée sur la distribution des chromosomes de ces lignées avec un échantillonnage de 100 mitoses ; en effet, comme nous le verrons, la plupart des études faites sur le même matériel se limitent souvent à 50 métaphases ou même moins.

On peut également rappeler que l'étude de cultures de myélomes et hybridomes présentée ici concerne des étalements réalisés à partir d'une seule et même culture pour chacun des myélomes et l'hybridome. Les distributions obtenues sont donc celles de cultures cellulaires à un moment déterminé, de clones cellulaires à une étape de reclonage déterminée.

Un tableau regroupant les différentes données pour chaque myélome permet de comparer les différentes lignées :

TABLEAU 1

Lignée	N ^{br} chromosomes	N ^{br} modal	N ^{br} présentés par 90% des cell.	N ^{br} présentés par 50%-60%
SP ₂ N	50-86	67	58-69	63-67
SP ₂ M	50-83	60	56-68	60-65
SP ₂ B	50-89	68	62-74	67-69
H4A8	58-111	72-73 et 103		

3.- ETUDE DES CHROMOSOMES

Nous présenterons successivement nos résultats sans et avec banding.

En effet, il faut noter l'avantage d'avoir des chromosomes avec et sans bandes. Par exemple, l'utilisation de la coloration de routine est intéressante pour la mise en évidence des doubles minutes : quel que soit le type de coloration, les difficultés à déterminer le nombre de doubles minutes et celui des chromosomes métacentriques (et marqueurs en général) sont les mêmes.

On peut même se demander si la coloration de routine n'est pas meilleure pour ces doubles minutes qui, traités par différents agents lors de l'utilisation des techniques de bandes, pourraient passer inaperçus !

A. SANS BANDING

a) Chromosomes marqueurs (méta- et sub-métacentriques).

Un relevé du nombre de chromosomes marqueurs (essentiellement les méta- ou submétacentriques) a été effectué dans chaque métaphase des différentes lignées.

D'une lignée à l'autre, le nombre de chromosomes métacentriques varie de 0 à 8 /cellule.

Une étude statistique a alors été réalisée sur la comparaison des "moyennes" obtenues de chromosomes marqueurs entre lignées.

Elle montre que la lignée SP₂N posséderait plus de chromosomes marqueurs métacentriques que les autres souches (v.aussi discussion) et même plus que l'hybridome 4A8 !

Cette "étude des moyennes" reste cependant indicative, l'identification précise de tels marqueurs n'ayant pas toujours pu être effectuée ; de même leur numération après plusieurs étapes de reclonage est à faire. Néanmoins, elle présente un intérêt certain. Les résultats sont repris dans le tableau suivant :

ESTIMATES OF MEANS

		B	M	N	H
		1	2	3	4
Nbrchr	2	69.1100	62.0300	64.2600	86.6700
Nbrdm	3	2.1100	1.5400	1.9800	2.6100
Nbrmar	4	3.0600	2.700	5.3700	3.2400

Abréviations : Nbrchr= nombre de chromosomes en moyenne.
 Nbrdm= nombre de doubles minutes.
 Nbrmar= nombre de chromosomes marqueurs.
 B, M, N, H : différentes souches étudiées.

On constate que le nombre moyen de marqueur (nbrmar) est assez différent entre lignées (SP₂B, SP₂M, SP₂N, et H4A8).

Des analyses de la variance et covariance à une dimension ont été réalisées, avec l'aide du département de biologie quantitative, suivant les méthodes habituelles (exposées dans le cours de licence de biologie quantitative).

On peut en conclure qu'il existe une différence hautement significative quant au nombre de chromosomes marqueurs différent pour chaque lignée : la souche SP₂N ayant nettement plus de chromosomes marqueurs que les autres. Par contre, il n'existe pas de différence apparente entre les souches SP₂M et SP₂B de ce point de vue.

b) Les nombres chromosomiques observés.

D'après le tableau ci-dessus et l'analyse des comparaisons entre lignées, une nette différence peut être montrée entre la souche SP₂B et les autres, mis à part l'hybridome qui ne peut être comparé aux autres à cause de sa "double distribution" de chromosomes : on peut dire que la souche SP₂B a plus de chromosomes que les deux autres et que la souche SP₂N a elle-même plus de chromosomes que la souche SP₂M.

c) Doubles minutes.

La détermination du nombre de doubles minutes présent dans chaque cellule et entre lignées a pu être réalisée directement sur microphotographies.

Il convient cependant de souligner la difficulté d'une telle numération. D'une part, ces éléments sont très petits et peuvent ne pas avoir été repérés, d'autre part la transmission de cellule mère à cellule fille n'est pas aussi rigoureuse qu'avec les autres chromosomes. D'où la grande variation allant de l'absence jusqu'à 8 doubles minutes par cellule.

Les résultats obtenus sont repris en moyenne dans le tableau précédent (nbrdm).

Une étude statistique effectuée sur la comparaison des moyennes obtenues permet de suggérer que la souche SP₂M possède moins de doubles minutes que les souches SP₂B, SP₂N, ainsi que l'hybridome 4A8, en tout cas à l'étape de reclonage que nous avons étudiée et qui pourra servir de base à des études similaires ultérieures.

Par contre, aucune différence ne peut être significativement mise en évidence entre les souches SP₂B et SP₂N ou l'hybridome 4A8.

L'aspect morphologique des doubles minutes (qui représenteraient la visualisation de l'amplification de gènes) s'est révélé être variable dans les cellules des différentes lignées.

De manière générale, ils ont une taille inconstante : petits points d'un micron environ (donc à la limite du pouvoir de résolution) jusqu'aux dimensions de petits chromosomes (v. aussi la fig.1 du chap.I).

Ils varient aussi en position : soit isolés, soit le plus souvent par paires. Enfin, leur fréquence dans les cellules change fortement et il n'y a apparemment pas plus ou moins de doubles minutes dans une cellule possédant plus ou moins de chromosomes !

Un aperçu de ce que sont ces doubles minutes sur microphotographie est donné dans le caryotype des myélomes SP₂M et SP₂N présenté dans le paragraphe suivant (v. les traits présents sur la figure 9 et la flèche de la figure).

B. AVEC BANDING

a) Aspect en bandes G.

Après plusieurs essais d'amélioration des techniques de préparations chromosomiques et de coloration ainsi que de nombreuses observations au microscope le banding désiré a été obtenu de façon très claire pour les souches SP₂B et SP₂M.

Le classement des chromosomes, par paires, est représenté pour la souche SP₂B (fig.7).

Les chromosomes marqueurs présents dans ces cellules ont été étudiés dans chaque souche.

La comparaison des différents marqueurs trouvés dans les lignées SP₂B et SP₂M nous a alors permis de montrer la présence d'un CHROMOSOME MARQUEUR COMMUN à ces deux lignées ! (fig.8a).

Selon plusieurs références standard en bandes G (COWELL, 1984 NESBITT et FRANCKE, 1973; COMMITTEE ON STANDARDISED GENETIC NOMENCLATURE FOR MICE, 1972; HÜBNER, 1984) nous avons pu

Fig. 7 :

CARYOTYPE

DU

MYELOME

SP₂B



1



2



3



4



5



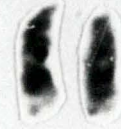
6



7



8



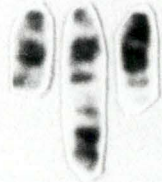
9



10



11



12



13



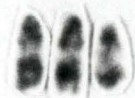
14



15



16



17



18



19



X



2N = 62 ?

identifier ce chromosome comme provenant de la fusion d'un chromosome 3 avec un chromosome 5.

Un autre chromosome marqueur de la lignée SP₂M a pu être identifié comme une fusion de deux chromosomes 4 (fig.8b).

Par la suite un AUTRE CHROMOSOME MARQUEUR COMMUN a pu être décelé entre les lignées SP₂M et SP₂B (fig.8c). La complexité des remaniements n'a pas permis de l'identifier aussi précisément que les autres marqueurs. Cependant, il a été retrouvé dans une lignée apparentée (de plasmacytome de souris MOPC 21) dont le caryotype a été étudié par SHEPARD et al. en 1974. Il faut remarquer que ce même marqueur n'a pas pu être identifié par ces auteurs, malgré l'excellente qualité du banding alors obtenu !

Enfin, tous les autres marqueurs de certaines lignées (mais non plus communs aux différentes lignées) bien que présentant un bon banding n'ont pas pu être identifiés de manière sûre.

La raison essentielle étant le nombre de réarrangements tout à fait remarquables que présentaient ces chromosomes (certaines parties de chromosomes sont quand même reconnaissables !).

Il nous paraît dès lors intéressant d'aborder le problème autrement : y a-t-il des chromosomes non remaniés reconnaissables ? (comparaison avec le caryotype normal de la souris).

Nous pouvons reconnaître au niveau du myélome SP₂B certainement des chromosomes 6, 12, 15 et X normaux ; il n'est pas exclu cependant que d'autres chromosomes normaux soient présents.

En ce qui concerne la lignée SP₂M, la présence de chromosomes 6 semble certaine (fig.9),

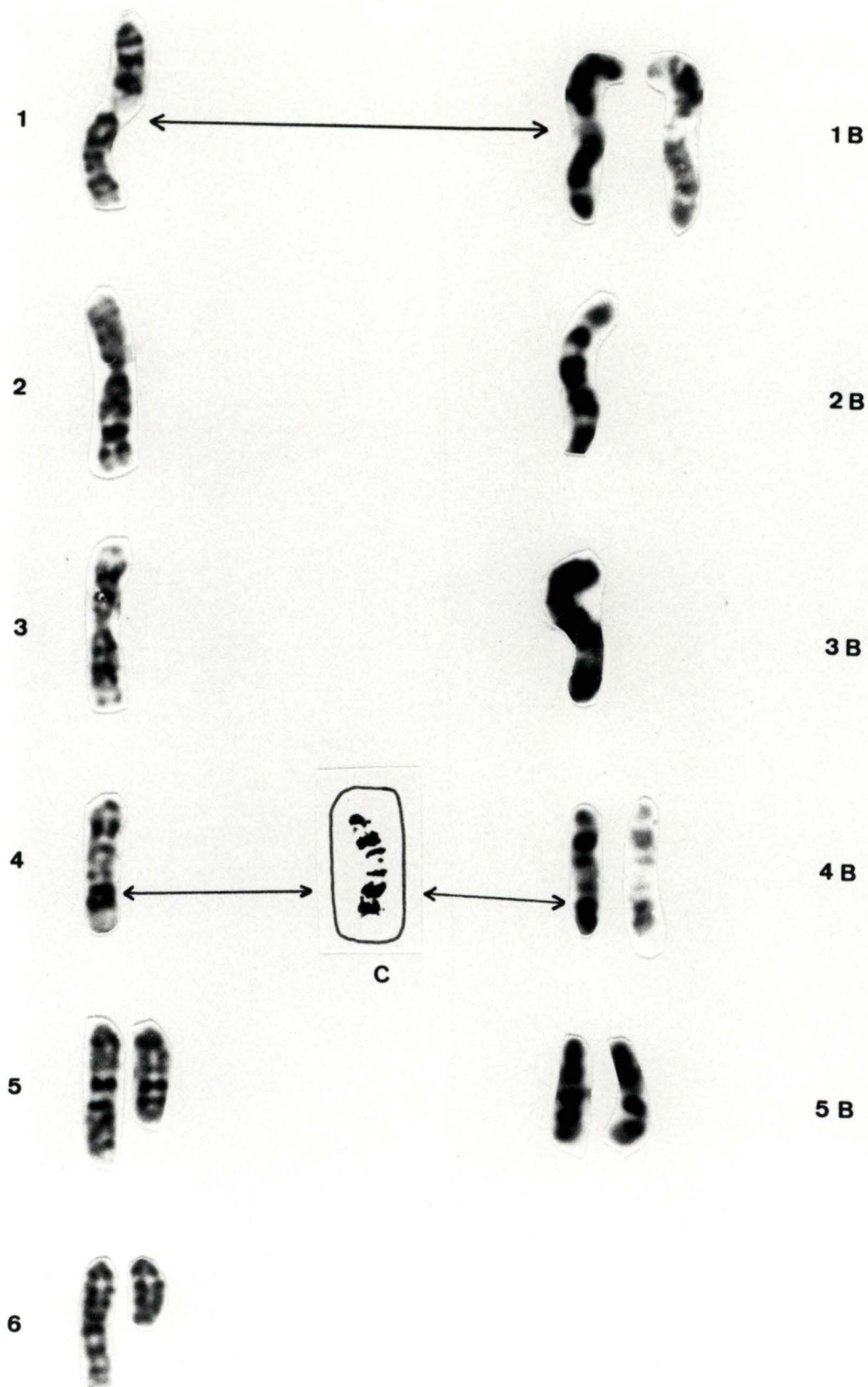


FIGURE 8 : Fig.8a : 1-1B; Marqueur commun des lignées SP_2B et SP_2M , constitué d'un chromosome 3 et d'un 5.

Fig.8b : 3; Marqueur de la lignée SP_2M (fusion de deux chromosomes 4).

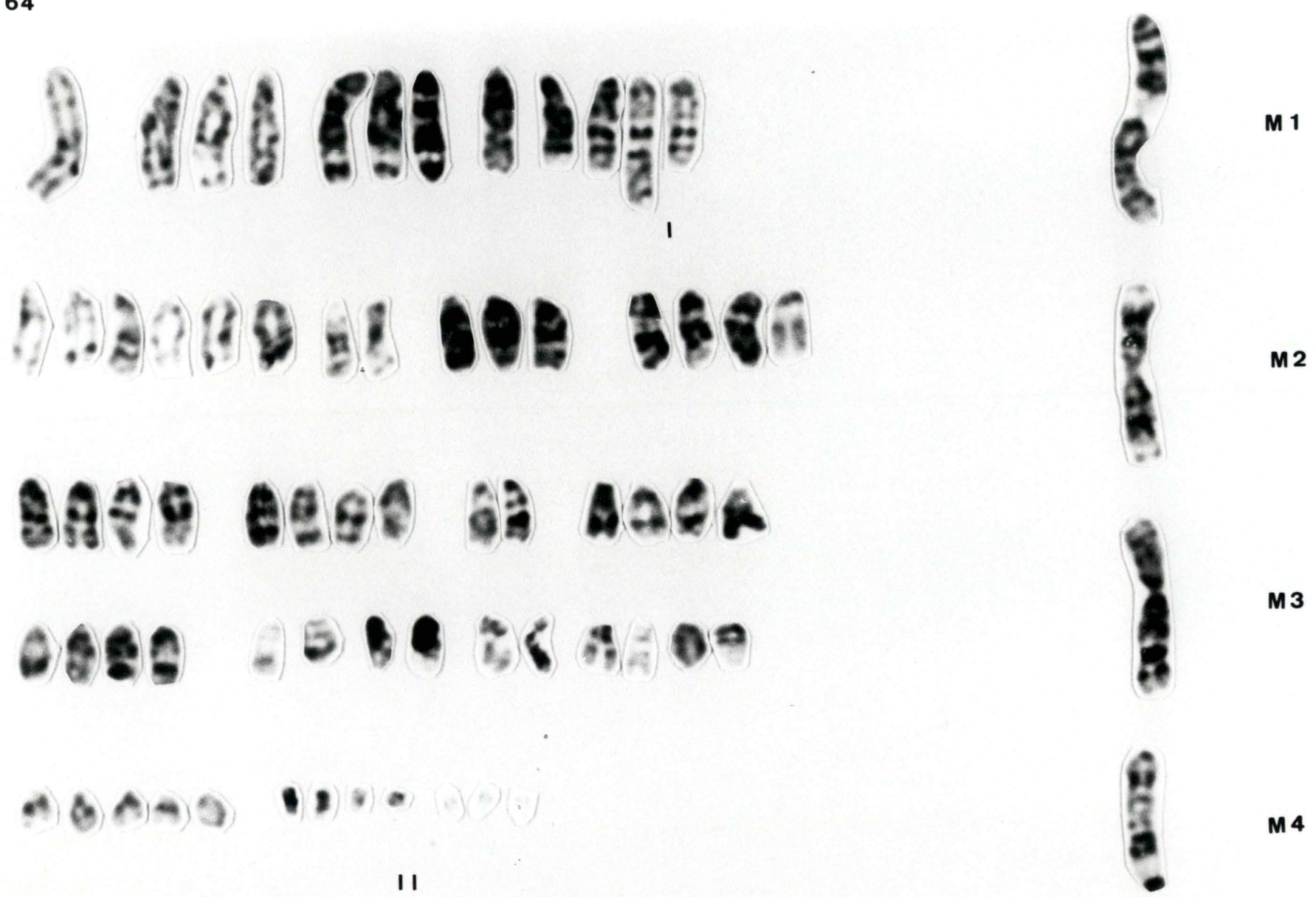
Fig.8c : 4-4B; Marqueur commun des lignées SP_2M et SP_2B .

1 à 6 : Marqueurs de la lignée SP_2M .

1B à 5B : Marqueurs de la lignée SP_2B .

C : Marqueur d'une autre lignée apparentée (SHEPARD et al., 1974a).

2N = 64



l'un des deux étant cependant plus long (amplification génique sous forme de région à coloration homogène?).

En fait, l'étude des bandes G fait apparaître la grande différence qui existe entre les chromosomes normaux et ceux des lignées étudiées alors que la coloration de routine laisse penser qu'il n'y a pas de remaniements sensibles (v. les caryotypes des lignées SP₂N et H4A8 , donnés aux figures 13 et 14 en fin de chapitre).

b) Etude des bandes C.

Un exemple de métaphase de la lignée $SP_2\beta$ traitée pour faire apparaître l'hétérochromatine constitutive est donné ci-dessous ; la qualité de la photo permet de déceler la présence de nombreux centromères (taches noires sur les chromosomes). Les taches noires isolées, de même taille que les centromères pourraient refléter la présence de "mini-chromosomes".

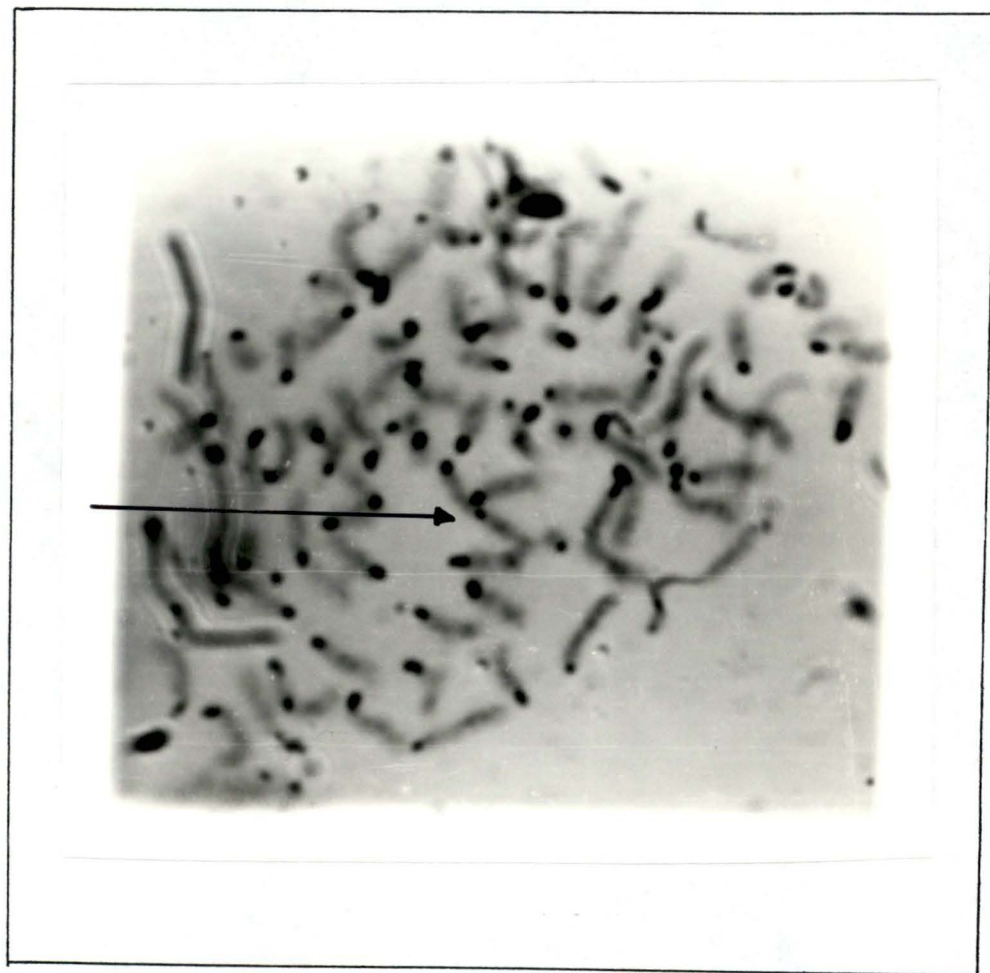
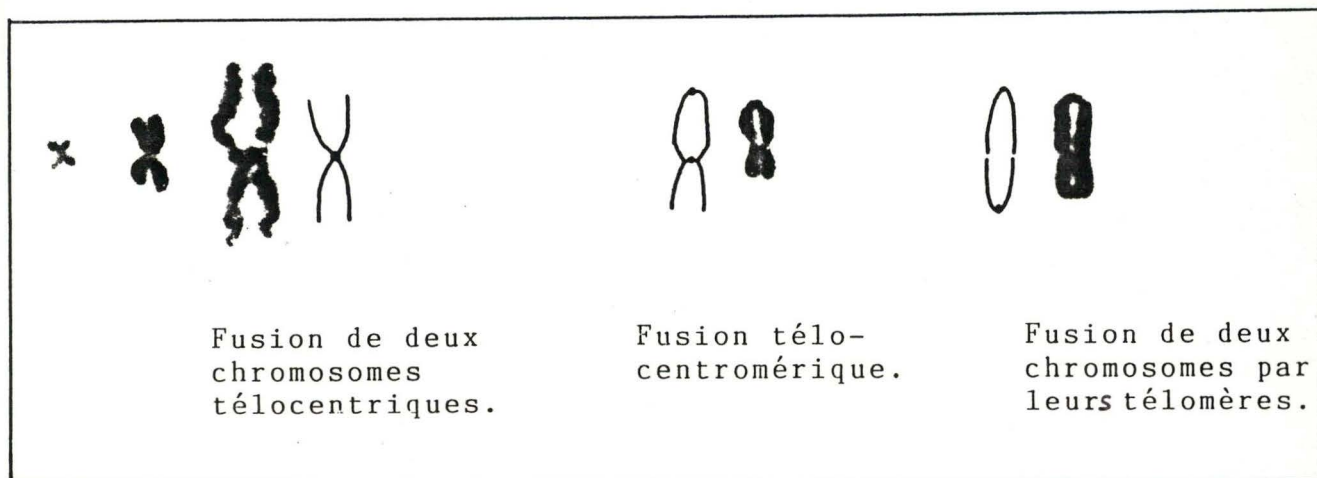


FIGURE 10 : Métaphase d'une cellule de la lignée $SP_2 M$ faisant apparaître les régions centromériques des chromosomes sous forme de taches noires .

D'autres observations ont montré nettement que certains chromosomes au moins étaient impliqués dans des fusions.

Le type d'arrangements chromosomiques observé peut être figuré comme ceci :

FIGURE 11 :



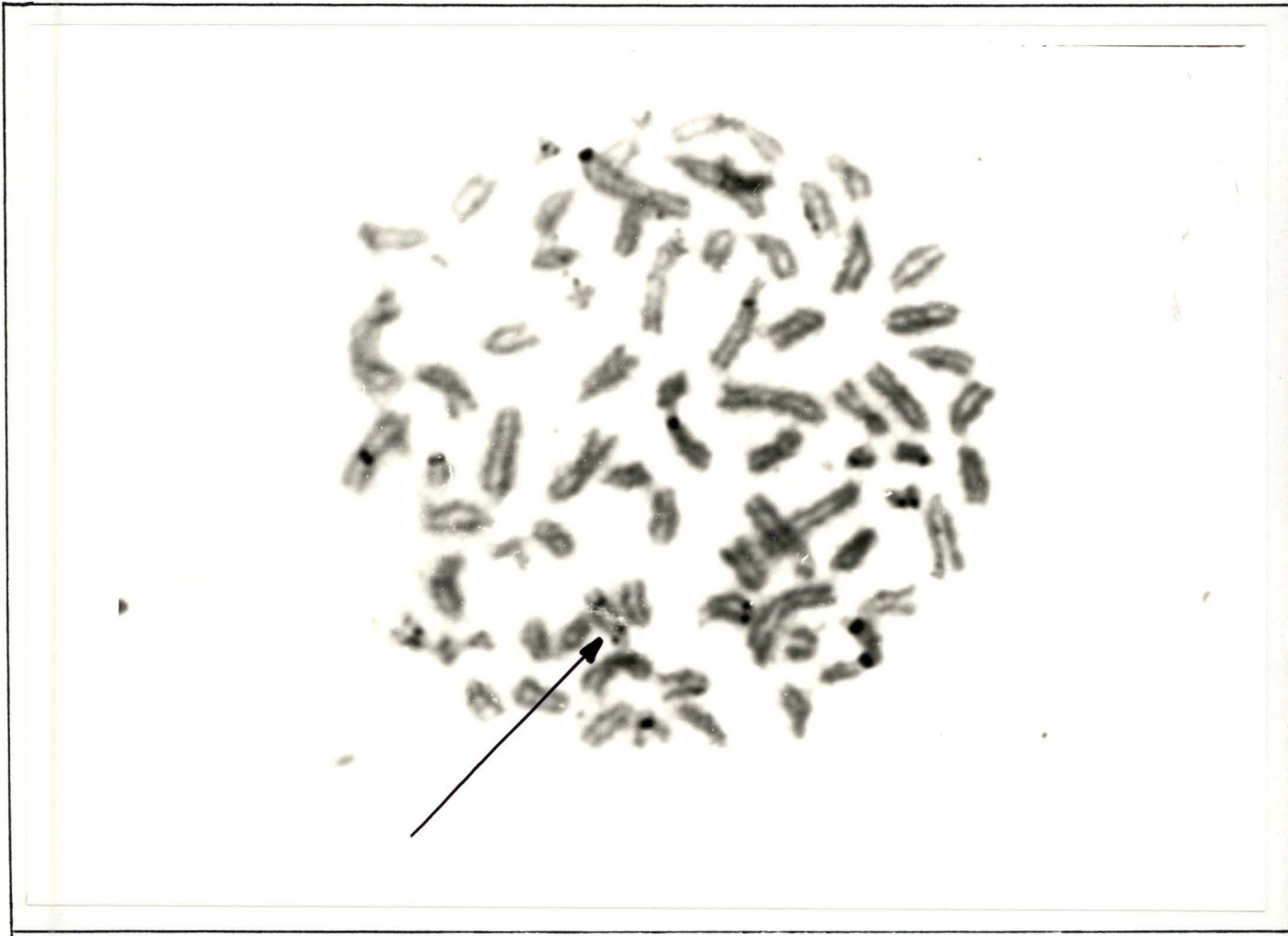
La figure 10 montre ainsi une fusion télo-centromérique de deux chromosomes (v. flèche).

Il s'agit en réalité d'un marqueur de la souche SP_2^B ; il faut donc tenir compte de ce type de fusion dans la détermination possible des chromosomes marqueurs de cette lignée ! Le chromosome marqueur non identifié dans les caryotypes des souches SP_2^B et SP_2^M pourrait être ce marqueur-ci.

Cette technique de bande C permet en plus de prouver que les "petites taches" représentant les doubles minutes ne sont pas des chromosomes (minichromosomes) puisqu'ils apparaissent négatifs par cette méthode, révélant l'absence de centromère. Ceci explique également leur variation en nombre de métaphase à métaphase, la transmission se faisant plus ou moins au hasard.

FIGURE 12 :

Mise en évidence des régions porteuses
des organisateurs nucléolaires sur
une métaphase d'une cellule de lignée SP₂



c) Mise en évidence des régions NORs.

La coloration à l'argent d'HOWELL et BLACK (1980) détermine la présence de régions porteuses des organisateurs nucléolaires sur les chromosomes n° 12, 15, 16, 17 et 18.

Un exemple de métaphase obtenue par cette méthode est donné figure 12. Il s'agit d'une cellule de lignée SP₂N .

En observant la fig.12, on constate la présence d'un chromosome "marqueur" constitué de deux chromosomes possédant une région organisatrice du nucléole (v.flèche).

Ce genre d'observation en corrélation avec les résultats obtenus à partir des bandes G pourrait donc permettre ou aider à l'identification de certains chromosomes remaniés.

On peut constater du reste qu'il y a d'autres chromosomes de ce type qui sont impliqués dans un réarrangement; ce sont donc autant de chromosomes marqueurs de la souche SP₂N qui sont constitués d'un ou deux chromosomes, ou de régions de chromosomes "prenant" comme déjà mentionné ce type de coloration ! Sept autres chromosomes semblent normaux.

d) Autres anomalies.

Un certain nombre d'autres anomalies, moins systématisées que celles qui viennent d'être décrites, ont été observées. Elles peuvent se trouver au niveau de toutes les cellules ou de cellules isolées.

Il s'agit de délétions, duplications, chromosomes dicentriques, cassures chromatidiennes, ...etc. Par exemple, au numéro 5 de la figure 8, le marqueur de la lignée SP₂M pourrait être un chromosome 6. Comparé au chromosome qui lui est juxtaposé et qui lui-même est sans doute un chromosome 6, on s'aperçoit qu'il est nettement différent !

De même, (v. caryotype du SP₂B, fig. 7) les chromosomes de la souche SP₂B classés comme étant des chromosomes 2 sont différents, surtout le troisième.

Enfin, une dernière aberration chromosomique fut trouvée dans les différentes souches de myélomes et dans l'hybridome, sauf pour la lignée SP₂M. Elle se présentait sous forme d'un tout petit chromosome (sans doute métacentrique) mais dans de rares cellules. Cette structure chromosomique pourrait être considérée comme une anomalie typique de ces trois lignées mais pas de la lignée SP₂M (et donc pas représentative de la souche de myélome SP_{2/0} de souris).

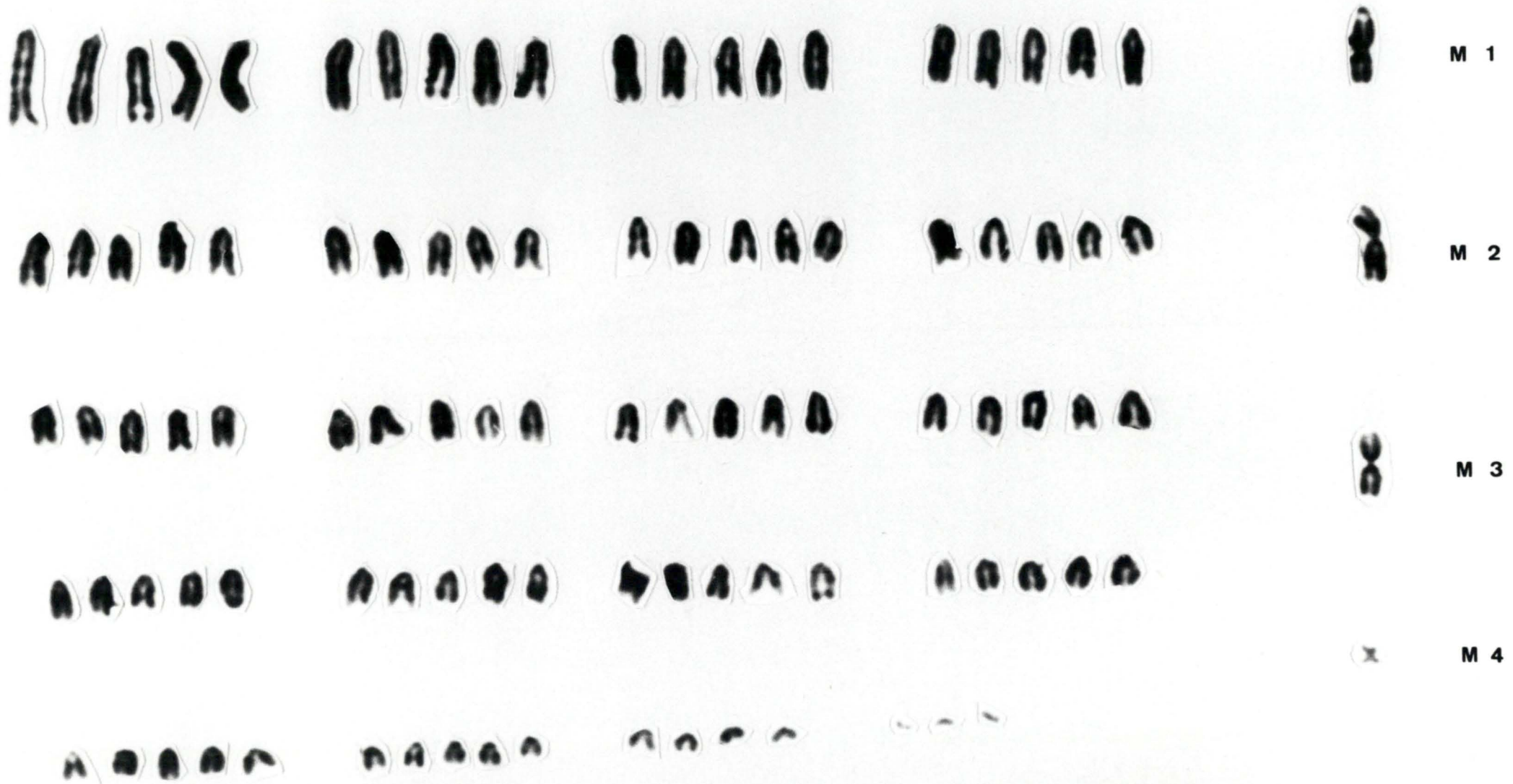
FIG. 13:

CARYOTYPE

DE

L' HYBRIDOME

4A8



2N = 98

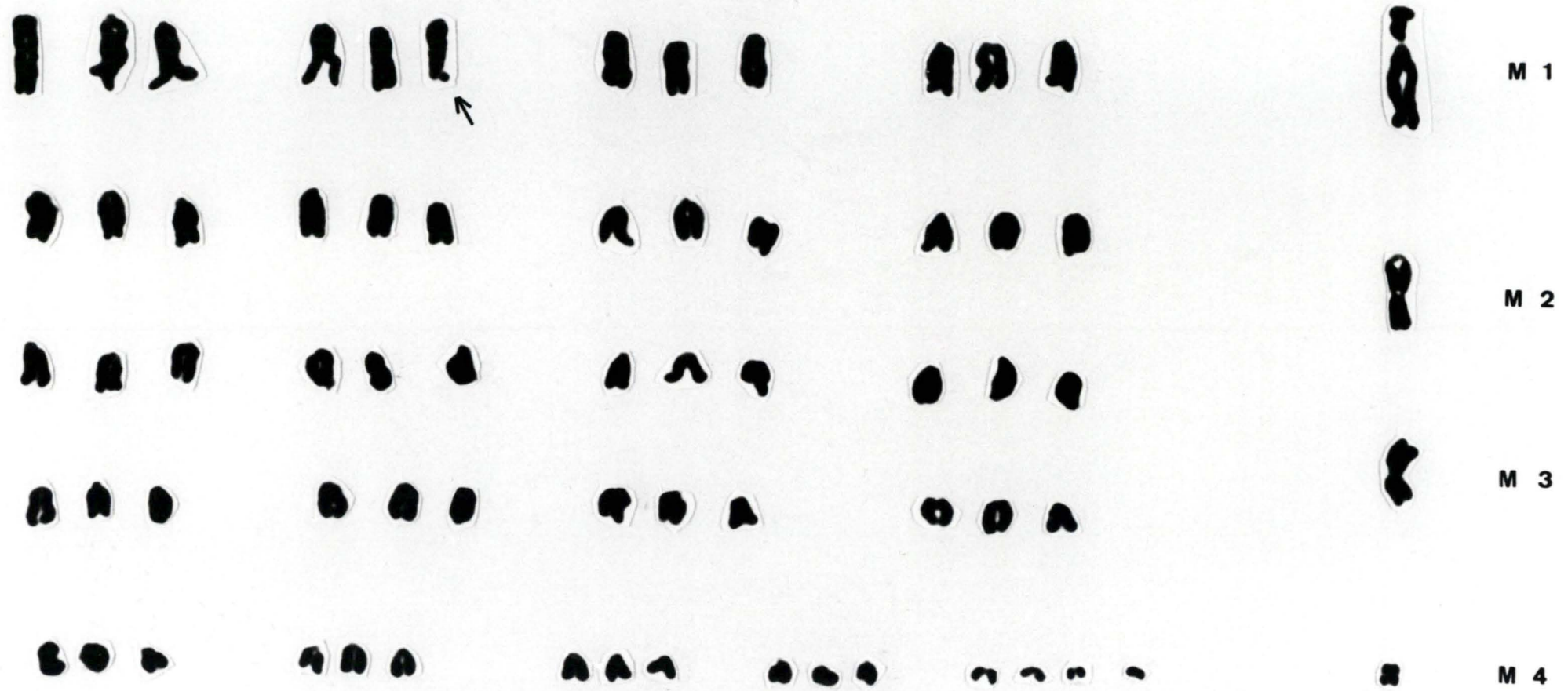
Fig. 14 :

CARYOTYPE

DU

MYELOME

SP₂N



2N = 66

CHAPITRE V

Nous voudrions souligner que, dans un souci de clarté, nous explicitons dans notre discussion certains points de l'introduction. Cela nous permettra de commenter nos résultats par rapport aux connaissances actuelles sur le sujet.

CHAP.V. DISCUSSION

Notre discussion concernera les points principaux que nous avons mis en évidence dans l'exposé de nos résultats.

1.- DISPERSION DU NOMBRE MODAL.

Le premier point qu'il convient de discuter est le fait remarquable d'une absence de nombre modal unique. De très nombreuses tumeurs, la plupart des leucémies humaines (qui sont les cancers les mieux étudiés du point de vue cytogénétique) et de très nombreuses lignées cellulaires cultivées in vitro ont un nombre de chromosomes unique et un caryotype unique. Des changements peuvent survenir mais en définitive, c'est une nouvelle lignée à nombre modal unique qui supprime la précédente. Pendant une courte période, on peut avoir "l'impression" d'une certaine variabilité mais il s'agit d'un état passager.

Parallèlement à ce type de tumeurs, il y a des lignées ne présentant pas un nombre modal unique mais , au contraire, une dispersion comme celle que nous avons trouvée. Les hypothèses avancées pour expliquer cette dispersion sont variées et traduisent bien la difficulté d'interprétation d'un tel phénomène.

a. Culture in vitro et variation du nombre modal.

Les causes d'une telle variation peuvent être attribuées entre autres au fait que les conditions in vitro sont beaucoup plus variables que celles à l'intérieur de l'organisme et comme telles, ces variations favoriseraient un certain polymorphisme.

Même si on prend une mesure stricte de variation comme le nombre de chromosomes, les lignées devront être définies en terme de distribution : on se réfère au nombre modal. De plus, si dans une même classe modale deux cellules ont le même nombre de chromosomes, cela ne signifie pas nécessairement un même nombre de chromosomes identiques.

Mises à part les translocations et les inversions, les autres causes de variation dans le caryotype des cellules sont les erreurs en cours de mitose.

Un exemple d'erreur est la tétraploïdisation qui est fréquente dans les cellules de souris in vitro (p.ex. MORIWAKI et al., 1978; BERENSON et al., 1981; KODAMA et al., 1981; CHEN, 1987) ; une autre variation, plus limitée, est provoquée par les non-disjonctions ou pertes chromosomiques.

Plusieurs autres causes de polymorphisme ont été avancées. Un modèle de sélection cyclique a ainsi été proposé par HSU et KELLOG (1960) selon lesquels différentes cellules peuvent avoir des avantages sélectifs cycliques à différents moments. On peut aussi imaginer des modèles plus compliqués d'interactions entre sous-populations par lesquelles une population polymorphique mixte pourrait être mieux adaptée que les types individuels dont elle est composée.

L'ennui, avec de tels modèles, est qu'il n'y a pas de diminution de variabilité dans les clones : les cellules filles d'une seule cellule parentale ne sont pas génétiquement uniformes.

Ces différentes raisons comptent seulement peut-être pour une petite part dans l'énorme degré de variabilité qui est continue, s'autoperpétue et est si vaste qu'on peut se trouver en présence d'une coexistence de milliers de caryotypes différents. HUGHES en 1968, examina ainsi cent métaphases prises au hasard, de mêmes lignées cellulaires établies, et trouva tous des caryotypes différents !. Cela est peut-être un cas extrême mais on observe fréquemment que des cellules de populations établies ont différents nombres de chromosomes habituellement centrés autour d'un mode.

HUGHES a alors proposé l'existence non seulement d'une vie propre des cellules mais aussi d'une coopération entre cellules qui expliquerait la diversité des caryotypes.

De plus, un phénomène qui peut éclairer l'origine de ce polymorphisme cytogénétique, est le fait que ces populations de cellules tendent à maintenir certains nombres chromosomiques spécifiques.

Lorsque des cellules deviennent "établies" chez la souris, elles sont souvent passées par une phase tétraploïde à partir de laquelle une population pseudodiploïde ou hypotétraploïde a émergé (Une sorte de cycle parasexuel a été décrit pour des fibroblastes humains où a lieu une tétraploïdisation suivie par une restitution de la constitution diploïde (MACGREGOR et al., 1978)).

Dans beaucoup de lignées cellulaires, le clonage peut générer différentes populations avec des modes variés; cependant les modes des sous-populations retournent souvent, après une période plus ou moins longue, au mode original.

Dans plusieurs cas, le nombre diploïde total est en fait obtenu avec des petits "fragments chromosomiques" qui contiennent du matériel autre que le centromère. Il semblerait aussi qu'il y ait restriction sur le nombre de centromères pouvant être présents dans une cellule, indépendamment du contenu génétique

des chromosomes. il pourrait y avoir une sorte de sélection agissant sur le nombre de ces centromères.

On ignore encore comment cette sélection ou restriction peut avoir lieu. Un nombre constant de fibres du fuseau et/ou un nombre préférentiel de sites d'attachement des fibres au centriole, sont des suggestions qui ont été faites mais qui sont émises à partir de fondements purement théoriques (TERZI, 1974).

Quelque soit leur origine, les conséquences de ces restrictions sur le polymorphisme sont évidentes. Si l'aptitude d'une cellule n'est pas déterminée uniquement par le contenu de sa balance génique avec une croissance plus rapide possible mais que le nombre de centromères doit aussi être pris en compte, alors il y a plusieurs solutions optimales possibles pour différentes cellules : d'où il en résulte un polymorphisme.

En conséquence, beaucoup de lignées cellulaires établies apparaissent comme composées de cellules avec des nombres chromosomiques distribués autour d'un mode. Les chromosomes individuels peuvent présenter une grande variabilité dans leur nombre de copies ; des cellules auront chacune un set de chromosomes de base, haploïde, plus quelques chromosomes en nombre de copies différent dans les diverses cellules. Les réarrangements chromosomiques comme les translocations et les inversions doivent aussi être pris en considération.

Un changement dans le nombre de chromosomes (équivalent d'une mutation somatique) pourrait marquer le début de l'établissement d'une population cellulaire tumorale ; mais au départ du processus et dans les tentatives de corriger le nombre de chromosomes, différents types de cellules sont générées et un polymorphisme cytogénétique peut être maintenu dans une telle population. Sur cette base, la variation chromosomique est potentiellement tumorigénique parce qu'elle crée au niveau de la population cellulaire, une source de

variabilité et d'"auto-perpétuation".

Le fait qu'une cellule possède un caryotype anormal ne produira aucun effet si cette cellule est incapable de se diviser et de commencer une évolution indépendante. Cependant, si la cellule est stimulée à se diviser (par des agents chimiques ou même des stimuli mécaniques), cela peut mener, en combinaison avec la grande variabilité créée dans le processus de variation chromosomique, à une tumeur (TERZI , 1974).

Comme la tumorigénicité, c'est-à-dire la capacité des cellules de croître lorsqu'elles sont réimplantées dans un animal, peut avoir lieu spontanément dans les lignées cellulaires (un signe de celle-ci est la présence d'un caryotype anormal dans la population), la réversion de la tumorigénicité pourrait aussi avoir lieu spontanément , par un mécanisme qui devrait être proche de celui observé par variation chromosomique.

En conclusion, nous pouvons penser que les cellules tumorales et les lignées établies suivent les mêmes voies que les populations cellulaires polymorphiques. Les hybridomes et donc le type de cancer qui y est lié chez la souris, ne peuvent être décrits qu'en terme de population de cellules.

Table IV: Comparison of chromosome numbers and ploidy distributions¹ in tumors, cell lines, and tumors from inoculation of cell line (from banded karyotypes).

Number of chromosomes per cell	MOPC-21 tumor	DMS-402 cell line	SLU-5 L-2, oncogenic					SLU-5 L-2, less oncogenic cell line	SLU-5 L-1, non-oncogenic								
			Cell line	Tumor No.			Irradiated		Cell line	Tumor No.							
				Normal	16	18				20	12	10	Irradiated	3	6	18	2
61		1	1		1					1							
62					1		1										
63																	
64			1	1			1										
65	1		1	2													1
66	1	1	1	1	1		1										1
67	1	1	1	1	1												
68		3	2	1	1		1	1					1			1	1
69	1	2		3	1	2						1	1	1			
70		1	4	3	3		4					2	1				1
71	1	2	3	6	2		2					1		2			1
72	4		18	1	1	4				2		3		2	2		1
73	9	8	14	2	1	1	5	3		2		9	2	2	3		1
74	8	15	15	1		2	3			1		9	5	10	2		
75	9	2	2				3			8		13	2	5	3		2
76	2		4				2			2		6					
77	1	1	1							2							1
78										1							
79			1														

Photocopie tirée de l'article de SHEPARD et ses collaborateurs (1974b) montrant des exemples de lignées cellulaires présentant une variation dans le nombre de chromosomes.

b. Myélomes, hybridomes et variations numériques.

D'après les résultats obtenus, nous pouvons constater qu'il n'y a pas de nombre modal fixe dans le cas des myélomes et hybridomes de souris.

Nous sommes ici en présence d'une distribution du nombre modal, ce qui peut être mis en relation avec la nature hybride du matériel utilisé.

En effet, il n'est pas étonnant d'observer une distribution du nombre de chromosomes puisque les myélomes proviennent déjà d'hybrides et que l'hybridome lui provient en plus d'une fusion de ce type de myélome avec un lymphocyte d'une souris normale !

Cependant, on peut considérer que 90 % des cellules étudiées possèdent de 58 à 74 chromosomes en ce qui concerne la souche de myélome SP_{2/0} en général.

Pour l'hybridome, il y a une double distribution : de 68 à 85 chromosomes pour 50 % des cellules et de 97 à 107 chromosomes pour 40 % des cellules.

Des exemples d'une telle variation dans le nombre de chromosomes sont donnés dans la littérature. Les uns concernent des cellules tumorales diverses de souris, cultivées in vitro, les autres des cellules de myélomes. Il paraît utile ici de citer deux exemples précis observés dans une lignée apparentée de myélome MOPC 21, par SHEPARD et al., en 1974^b, et portés au tableau IV.

On s'aperçoit ainsi que la distribution obtenue est du même genre que celle que nous avons décrite pour les myélomes SP_{2B}, SP_{2M} et SP_{2N} et qu'il y a aussi néanmoins des nombres de chromosomes préférentiels.

FIGURE 15 :

Exemple de distribution du nombre de chromosomes présentée par des cellules d'hybridomes de souris.

ABS.: nombre de chromosomes.

ord.: pourcentage de cellules ayant le nombre de chromosomes indiqué en abscisse.

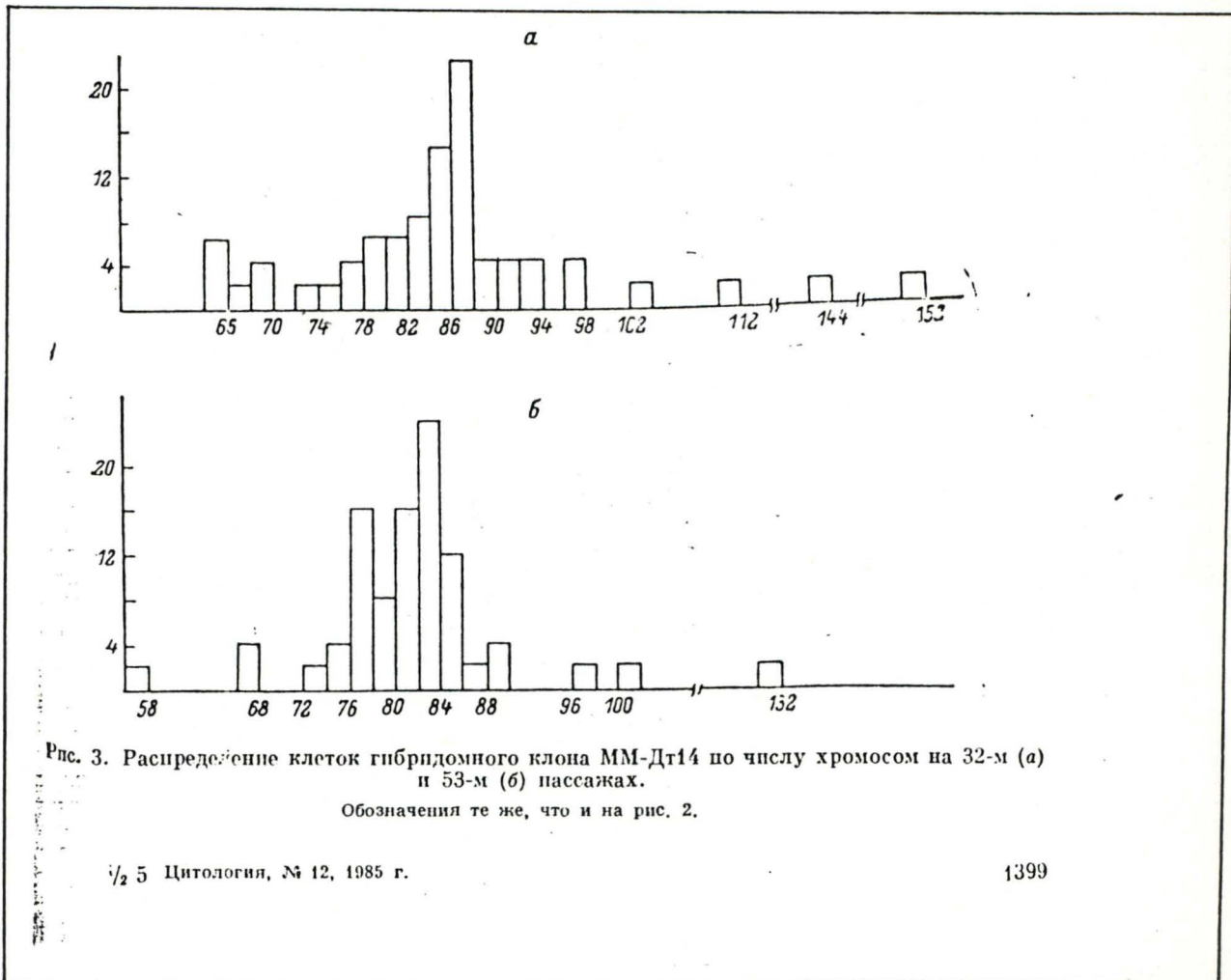


Рис. 3. Распределение клеток гибридного клона ММ-Дг14 по числу хромосом на 32-м (а) и 53-м (б) пассажах.

Обозначения те же, что и на рис. 2.

Un autre exemple de distribution du nombre de chromosomes est donné par VOLGAREVA (1985;v.fig. 15) : il s'agit de la dispersion présentée par les cellules d'hybridomes étudiées à un nombre de "passages" différent. On constate ainsi que cette lignée n'est pas encore "stabilisée génotypiquement comme cela peut être le cas des lignées ici étudiées.

Si nous revenons à nos résultats, nous voyons que la comparaison des distributions du nombre de chromosomes des différentes lignées de myélomes, permet de constater que la souche SP₂M a un "déficit" global en chromosomes, par rapport aux autres souches (selon les tests statistiques effectués). On peut imaginer que ce genre de perte peut supprimer certains gènes sans doute moins importants, mais pas ceux responsables de la croissance tumorale infinie par exemple.

Au contraire, la souche SP₂B possède le nombre de chromosomes globalement le plus élevé. Son bon maintien en culture pourrait ainsi être attribué à la présence du nombre nécessaire de chromosomes impliqués dans la survie de la cellule (survie infinie), plus quelques autres, lui procurant peut-être différentes propriétés supplémentaires(dont on ignore la nature).

2.- LES CHROMOSOMES MARQUEURS DANS LES MYELOMES ET HYBRIDOMES DE SOURIS.

Avant de discuter nos résultats, il convient de rappeler l'importance de la fusion des chromosomes télocentriques dans l'évolution (encore appelées fusions robertsoniennes).

En effet, on sait aujourd'hui qu'ils représentent un mécanisme possible d'apparition d'espèces et un processus par lequel se fixent les espèces récentes.

Le nombre de chromosomes chez la souris normale est habituellement de 40 télocentriques et varie en fait selon la proportion de chromosomes métacentriques provenant de fusions centromériques robertsoniennes chez les souris sauvages par exemple.

C'est ainsi qu'on a trouvé des souris à $2n=38$, 36 , et jusqu'à $2n=22$ chromosomes avec la présence parmi ceux-ci de , respectivement, 2, 4, et jusqu'à 18 chromosomes fusionnés (GROPP, 1969; HÜBNER, 1984).

Le fait de trouver spontanément dans la nature des chromosomes métacentriques semble aussi indiquer qu'il n'y a pas forcément un rapport entre leur présence dans des cellules tumorales et l'immortalité de celles-ci, ni de rapport avec le cancer !

a. Les divers chromosomes métacentriques observés dans les cellules murines.

La détermination du nombre de chromosomes métacentriques dans chaque lignée de myélomes et dans l'hybridome a permis de constater qu'il y en avait plus dans la souche SP_2^N que dans les autres.

C'est ce qui détermine, entre autre, la différence qui existe entre ces souches.

L'identification des chromosomes marqueurs des myélomes de souris a révélé la présence d'un métacentrique, constitué des chromosomes 3 et 5. Nous l'avons retrouvé dans deux lignées différentes (SP_2B et SP_2M) au moins.

Bien que la souche SP_2N possède des métacentriques, rien ne permet d'affirmer la présence de ce même marqueur dans cette souche.

Un autre marqueur (de la souche SP_2M) a aussi été identifié : il s'agit d'une fusion entre deux chromosomes 4. Il n'a pas été retrouvé dans d'autres lignées.

Enfin, un deuxième chromosome marqueur commun aux lignées SP_2M et SP_2B existe. Il provient vraisemblablement de remaniements complexes intéressant les chromosomes 12 et 15.

Dans la littérature, il n'y a à notre connaissance aucune étude qui ait montré un chromosome marqueur de myélome constitué de la fusion des chromosomes 3 et 5. Cela suggère que les souches SP_2B et SP_2M utilisées possèdent ce marqueur et sont tout à fait uniques et particulières.

De plus, le marqueur commun ayant des caractéristiques du 12 et du 15 semble identique à celui décrit par SHEPARD et al. (1974a) dans une lignée cellulaire voisine (myélome MOPC 21), (v. fig. 8 du chap. IV). Il s'agirait peut-être d'un marqueur des myélomes de souris bien qu'aucune autre évidence citée dans les divers travaux effectués jusqu'ici ne puissent venir appuyer cette hypothèse.

Toutefois, il a été établi qu'un autre type de fusion constituait un chromosome marqueur des plasmacytomes de souris (ou myélomes) : il s'agit d'une translocation entre un chromosome 12 et une partie de chromosome 15 (YOSHIDA et MORIWAKI, 1975; SHEPARD et al., 1978;

WIENER et al., 1980; SOROKINA et al., 1986).

On s'intéressa aussi tout particulièrement à d'autres fusions chromosomiques présentes dans les plasmacytomes de souris. Par exemple, les translocations impliquant les chromosomes 12 et 6.

En effet, il a été déterminé que les gènes codant pour la chaîne lourde d'immunoglobuline et pour la chaîne légère lamda se situaient respectivement sur ces chromosomes 12 et 6 chez la souris (on peut comparer cela au fait que chez les plasmacytomes et lymphomes de cellules B chez l'homme, des translocations impliquant le chromosome 14 ont été décrites ; or, les gènes codant pour la chaîne lourde d'immunoglobuline chez l'être humain sont justement assignés à ce chromosome).

Comme des translocations impliquant les chromosomes 12 et 15 chez la souris furent aussi mises en évidence dans des tumeurs produisant des immunoglobulines de type A (chaîne kappa) et que parmi elles, certaines présentaient à la fois la translocation t(12;15) et la t(6;15) l'hypothèse suivante fut émise :

la genèse d'une translocation entre un chromosome 12 et un chromosome 15 doit être une étape essentielle dans la genèse des plasmacytomes de souris ; ces translocations devaient survenir à une étape première de ces lignées, probablement durant la différenciation des cellules plasmatiques normales (plusieurs discussions traitant le sujet sont proposées par OHNO et al., 1979 et par WIENER et al., 1984 b et c).

Une telle translocation t(12;15) n'a pu être identifiée en tant que telle ici mais rien ne permet de conclure à son absence dans les lignées que nous avons étudiées.

Au contraire, une étude très récente sur la souche de myélome SP_{2/0}-Ag14 mentionnée dans la littérature (SOROKINA, *et al.* 1986) a décrit l'existence de ce marqueur dans la souche SP_{2/0}. Il faut cependant remarquer que c'est la seule étude effectuée sur cette souche de myélome et qu'elle n'apporte aucune évidence photographique, ni d'identification de ce marqueur !!

b. Remaniements chromosomiques et propriétés cellulaires nouvelles.

Dans plusieurs lignées cellulaires de myélomes de souris cultivées in vitro (SHEPARD et al., 1974; 1978; 1979), on a observé une perte spontanée de tumorigénicité associée à des changements caryotypiques accélérés et/ou une élévation apparente de l'immunogénicité.

On ignore encore si de tels changements sont reliés par un lien de cause à effet à une tumorigénicité altérée ; on a pourtant suggéré que certains changements caryotypiques reproductibles avaient lieu dans quelques lignées cellulaires cultivées (SHEPARD et al., 1979).

On a montré aussi que la perte d'oncogénicité ne requierait pas la perte de marqueurs des plasmacytomes impliquant un chromosome 15 ni de copies supplémentaires de chromosomes normaux spécifiques (SHEPARD et al., 1976).

Enfin, la perte d'un chromosome X ou la perte d'un Y dans le cas de mâles semble être un phénomène courant mais non spécifique des plasmacytomes étudiés jusqu'à présent (SASAKI, 1982).

Une partie des modifications caryotypiques pouvant survenir dans les myélomes de souris a été retrouvée dans les lignées étudiées ici.

Cependant, contrairement aux résultats décrits par SOROKINA (1986) dans son étude de la souche SP_{2/0}, nous avons décelé la présence de chromosomes 6, 12 et X dont un exemplaire au moins était apparemment normal. Tous les autres chromosomes étaient remaniés et inidentifiables!

En ce qui concerne les chromosomes impliqués de manière générale dans des translocations,

inversions, délétions,...etc. et, de façon plus particulière, les chromosomes fusionnés 3 et 5, 4 et 4 rencontrés dans le présent travail, il faut compter sur les "effets de position" possibles.

En effet, on sait depuis longtemps qu'un fragment de chromosome et les gènes qui s'y trouvent, peuvent avoir une expression génique tout à fait modifiée ou altérée suite à un changement de position ! C'est ainsi qu'une partie de chromosome possédant les gènes nécessaires à la production d'immunoglobulines par exemple, une fois transloquée sur un autre chromosome, peut voir celle-ci altérée ou complètement supprimée.

Ces effets de positions constituent dès lors des changements majeurs (pas nécessairement caractéristiques des cellules tumorales) dans les caryotypes et ne sont pas à négliger dans le cas des myélomes et hybridomes de souris.

c. Remaniements du chromosome 15 de la souris et oncogène c-myc.

D'une façon beaucoup plus générale, vu la grande hétérogénéité des remaniements chromosomiques observés tant dans les lignées cultivées in vitro que dans les lignées cancéreuses, on peut se demander s'il existe vraiment un lien entre ces altérations du caryotype et les propriétés cellulaires observées.

De plus, il existe des exemples de cancer sans anomalie visible du caryotype : c'est le cas de certaines leucémies spontanées (KODAMA et al., 1978) ou

induites par radiations, virus ou autre (KLEIN et al., 1980).

En ce qui concerne plus particulièrement l'absence apparente d'anomalies, il convient de rappeler ici les travaux de YUNIS et al. (1981).

En étudiant des chromosomes prométaphasiques, donc très longs, et en appliquant des méthodes de banding très particulières, ces auteurs ont réussi à mettre en évidence des anomalies minimales mais visibles en microscope optique, des chromosomes de leucémies lymphocytaires aiguës humaines.

Chez la souris, de telles études sont entreprises. Cela sera sans aucun doute une technique très utile et nécessaire pour l'étude des myélomes et hybridomes mais elle reste encore à mettre au point (comme plusieurs autres techniques qui ont été utilisées avec de bons résultats et depuis "longtemps" chez l'homme mais beaucoup moins chez la souris qui possède un caryotype plus difficile).

Suite à toute une série de travaux et plus particulièrement ceux se rapportant aux plasmacytomes (ADAMS et al., 1982; CALAME et al., 1982; CHU CHEN et al., 1986), on a suggéré que la partie distale d'un chromosome 15 (partie qui est souvent impliquée dans une translocation) contiendrait des gènes contrôlant la différenciation et/ou la croissance du système lymphoréticulaire de la souris (SPIRA et al., 1979).

Plusieurs observations contribuent à renforcer l'hypothèse du rôle possible du chromosome 15 dans l'expression de la malignité chez la souris. Par exemple, il fut montré que la différence la plus nette entre deux lignées cellulaires particulières (ALLDERDICE et al. 1973), l'une étant beaucoup plus tumorigène que l'autre, était une augmentation du nombre de copies du chromosome 15 par cellule (de 4 à 6 copies) chez cette dernière, sans que l'on puisse dire si les propriétés tumorigènes étaient associées au nombre de copies du chromosome 15 ou à une cassure spécifique de celui-ci.

Ces dernières années, on a cependant pu suggérer que les plasmacytomes de souris seraient générés par l'activation d'un oncogène cellulaire (c-myc) situé dans la région distale du chromosome 15 suite à une transposition sur une région génique fonctionnellement active dans la production d'immunoglobuline sur le chromosome 12 (CORY, 1986; LEWIN, 1985).

Dans le présent travail, trois chromosomes 15 ont pu être identifiés dans la lignée SP₂B (v.caryotype) et peut-être un quatrième (ou une partie de celui-ci?) impliqué dans la fusion du chromosome marqueur déjà décrit précédemment.

Rien ne permet d'affirmer qu'il a subi une translocation sur un chromosome 12 mais, d'après les exemples cités dans la littérature, on peut penser qu'une telle translocation peut avoir lieu ici aussi (peut-être est-ce le chromosome marqueur non identifié ?).

3.- LES DOUBLES MINUTES ; LEUR SIGNIFICATION POSSIBLE.

Il est intéressant d'étudier les doubles minutes et d'aborder ici le problème de leur répartition, leur fréquence, etc. puisque l'on sait actuellement qu'ils correspondent à l'amplification de gènes au niveau de certaines cellules (v.chap.I).

Nous avons trouvé dans notre étude de myélomes et d'hybridome de souris de telles structures, dans chaque lignée. Ils sont apparus sous formes diverses (isolés, par paires, petits, plus grands, etc.) et présentaient une grande hétérogénéité dans leur répartition entre lignées et même entre cellules d'une même lignée.

Ce dernier point confirme l'hypothèse de leur ségrégation qui se ferait au hasard au cours de la division cellulaire, puisque les doubles minutes ne possèdent pas de centromère leur permettant de se distribuer uniformément entre cellules filles lors de la mitose.

La numération précise des doubles minutes est sans aucun doute importante. Leur véritable incidence doit cependant être encore plus élevée que ce qui a été rapporté précédemment. En effet, on ne prêtait pas suffisamment attention à ces "petites taches" présentes sur les préparations. De plus, les techniques de routine ne permettent pas toujours de révéler ces structures. On peut toutefois citer quelques études mentionnant la présence de doubles minutes, dans des lignées cellulaires pouvant contenir seulement un ou deux doubles minutes par cellule, ou bien uniquement dans une petite proportion de cellules (COWELL, 1982a; LEVAN et al., 1976).

Cette hétérogénéité numérique des doubles minutes trouvée aussi dans le présent travail, pourrait provenir, comme proposé par plusieurs auteurs (KAUFMAN et al.,

1979; COWELL, 1982; QUINN et al., 1979), d'une non-disjonction mitotique (c'est-à-dire une ségrégation mitotique anormale) et non pas d'une réplication anormale du DNA de ces doubles minutes. En effet, une réplication disproportionnée du DNA des doubles minutes pendant la phase de synthèse ainsi qu'une réplication de celui-ci en dehors de la phase de synthèse n'ont été observés dans aucune étude ; des doubles minutes observés en période G_1 (de repos) du cycle cellulaire montrent une coloration différentielle indiquant une non-disjonction; les doubles minutes manquent de centromère; enfin, des cellules en anaphase ont montré une évidence directe de non-disjonction des doubles minutes (LEVAN et al., 1976; 1978).

La présence d'au moins un exemplaire de doubles minutes par cellule dans les lignées d'hybridomes et myélomes de souris semble indiquer qu'ils représentent une structure importante pour les cellules.

Il paraît dès lors intéressant d'établir un lien entre leur présence et leur fréquence dans les métaphases étudiées, en fonction de l'environnement.

La présence de doubles minutes dans des hybridomes de souris a été notée par VOLGAREVA en 1985. L'étude concernait des hybridomes de cellules B de souris; le myélome utilisé était dérivé de la souche X63-Ag8 dont proviennent les lignées que nous avons nous-mêmes caractérisées (SP_2B , SP_2M , SP_2N et l'hybridome 4A8). Tous les hybridomes étudiés par Volgareva se distinguaient les uns des autres par leur nombre varié de métaphases possédant des doubles minutes en quantité diverses.

C'est grâce à des techniques cytogénétiques de coloration qu'on a pu démontrer le contenu en DNA des doubles minutes ainsi que par identification de sites de cassure spécifiques dans leur DNA (BARKER et al., 1979; GEORGE et al., 1981).

Globalement, les doubles minutes se colorent faiblement avec le colorant HOECHST 33258 qui est spécifique des bases adénine et thymine. En bandes G, ils apparaissent plus ou moins gris et par technique de c-banding, ils se révèlent négativement, ce qui indique un manque de centromère fonctionnel.

Ces différentes propriétés ont d'ailleurs permis de distinguer les doubles minutes de contaminants éventuels. En effet, les mycoplasmes, au contraire des DMs, apparaissent "brillants" en bande G ou par coloration au Hoechst 33258. D'autre part, des petits chromosomes possèdent des bandes C positives, ce qui permet de les distinguer facilement.

4.- LES REMANIEMENTS AUTRES QUE LES FUSIONS ROBERTSONIENNES.

Nos observations des caryotypes présentés ici pour les souches de myélomes (ou hybridomes) nous ont permis de constater que, malgré un banding très satisfaisant, on ne reconnaît pas tous les chromosomes normaux de souris ! Il s'est donc passé quelque chose, le plus vraisemblablement en rapport avec la survie de la cellule et son immortalité. Les remaniements seraient donc importants au niveau du gène, peut-être en rapport avec l'amplification.

Ce qui est curieux dans la nature des séquences amplifiées, ce sont leur longueur différente, leur variabilité de réarrangements chromosomiques et leurs propriétés changeantes lorsqu'on les étudie sur de longues périodes, dans des lignées cellulaires variées (COWELL, 1982).

Dans certains cas, l'amplification rencontrée sous forme de "région à coloration homogène" (HSRs; v. chap. I) apparaît sur le locus, ou tout près du gène non amplifié (NUNBERG et al., 1978; BIEDLER et al., 1980; WAHL et al., 1982).

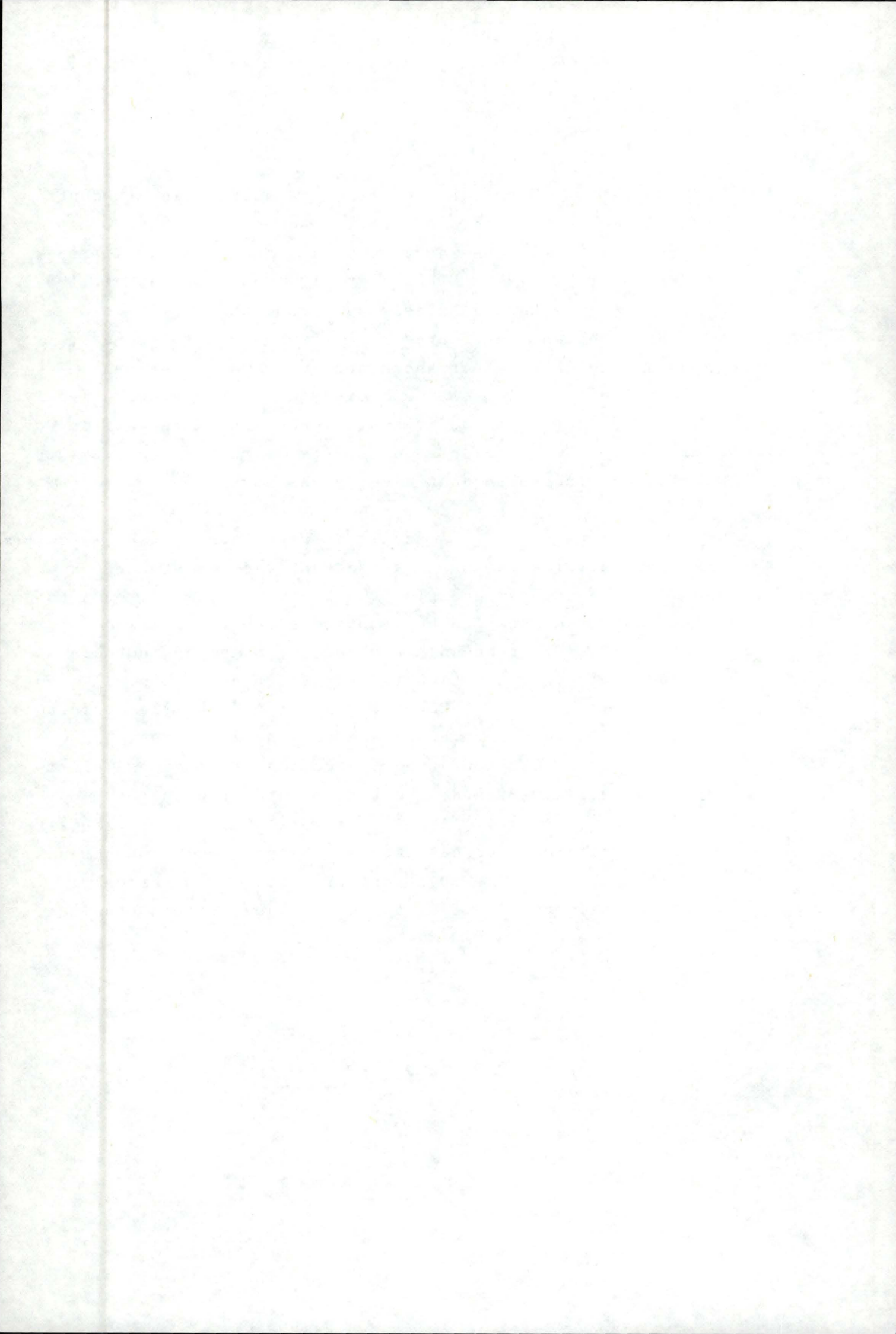
Dans d'autres cas, les gènes amplifiés et les HSRs peuvent se trouver sur différents chromosomes ; sans doute par des réarrangements, des translocations, lorsque les cellules sont soumises à des pressions sélectives.

Nous pouvons ainsi nous attendre dans le cas des myélomes et hybridomes de souris à trouver des segments quelconques correspondant à des gènes amplifiés.

A partir de plusieurs travaux effectués sur des cellules de souris présentant une résistance au méthotrexate par exemple (BOSTOCK et al., 1981), on a pu aussi conclure que l'unité de DNA qui était amplifiée consistait en fait en une séquence chromosomique normale et que celle-ci pouvait varier fortement en taille.

Cette variabilité de taille correspond bien avec la longueur variée des régions à coloration homogène, en fonction du nombre de copies de gènes, ainsi qu'à la taille variée des doubles minutes rencontrés.

A cela s'ajoute encore la variabilité dans l'emplacement de ces séquences amplifiées comme déjà mentionnée, ce qui ne nous permettait en aucun cas de prévoir le comportement cytogénétique des lignées étudiées.



5.- MECANISMES POSSIBLES DE L'AMPLIFICATION GENIQUE.

Nous avons souvent évoqué le mécanisme d'amplification génique. Il nous paraît important d'y revenir et d'y consacrer spécifiquement une partie de la discussion.

Les mécanismes d'amplification et la structure du DNA amplifié ont été étudiés essentiellement par expérimentation sur des cellules en culture présentant une sélection pour une résistance à certaines drogues (SCHIMKE, 1984).

Bien que tous les problèmes n'aient encore été complètement résolus et qu'ils peuvent varier selon les cas, trois mécanismes généraux sont proposés pour expliquer la genèse de l'amplification dans les cellules somatiques (SCHIMKE et al., 1981) :

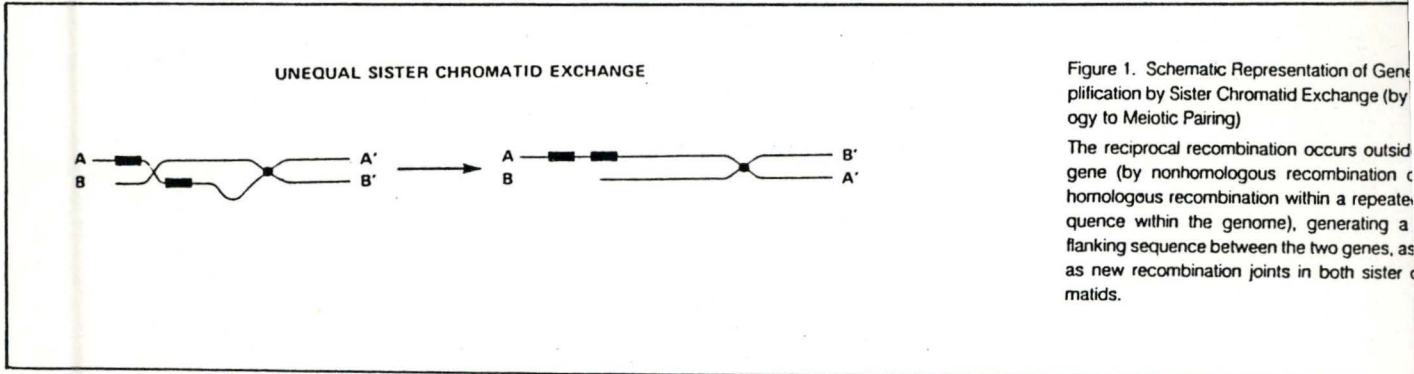
- utilisation du DNA de cellules lysées par réplication et intégration de manière analogue aux techniques de transfection de DNA.
- crossing-over somatique (c'est-à-dire échanges entre chromatides) inégal soit par "branchement" entre différents segments durant la réplication, soit par échange entre chromatides soeurs.
- réplication disproportionnée par laquelle une partie du génome serait dupliquée plus d'une fois dans un seul cycle cellulaire.

Chacun de ces mécanismes sera envisagé ci-dessous.

a. Utilisation de cellules lysées.

La première possibilité évoquée est que les doubles minutes proviennent d'une phagocytose de DNA de cellules lysées. Si ce DNA contient un site d'initiation

FIGURE 16 :



* Photocopie tirée de STARK et WAHL (1984).

de réplication, il pourrait effectivement exister sous cette forme extrachromosomique et serait aussi potentiellement capable de s'intégrer dans les chromosomes et de former alors une région à coloration homogène.

Toutefois, ce matériel "ingéré" ne semble pas se fixer à des sites particuliers du génome. On ne peut donc pas expliquer de cette façon la localisation en tandem de gènes répétés sur un seul chromosome à l'endroit du gène normal impliqué.

b. Crossing-over somatique inégal.

Un autre mécanisme possible propose que l'événement initial dans le processus d'amplification serait une duplication du gène.

Le début de l'amplification impliquerait la formation d'un petit nombre de copies de gène. Après quoi, l'amplification continuerait grâce à des crossing-over inégaux entre chromatides soeurs (SCE), (v.fig.16).

Ce phénomène est observé notamment lorsqu'on additionne le milieu avec une concentration élevée d'un composé chimique. Celui-ci agirait par sélection en faveur des quelques cellules chez lesquelles un tel échange inégal a eu lieu.

Par ce système, la localisation chromosomique des séquences de DNA amplifiées serait le site "endogène" et c'est seulement lorsque la région amplifiée sera assez grande qu'elle sera reconnaissable sous forme de région à coloration homogène (HSR). Enfin, si on considère (comme proposé précédemment) que les doubles minutes forment les HSR par intégration dans les chromosomes, on pourrait attribuer un rôle aux SCE dans l'élongation de celles-ci.

Mais, tandis que le crossing-over inégal pourrait expliquer l'apparition de HSR dans des systèmes de sélection par étapes, il ne peut expliquer l'amplification qui a lieu en une étape. Il existe en effet des exemples

FIGURE 17:

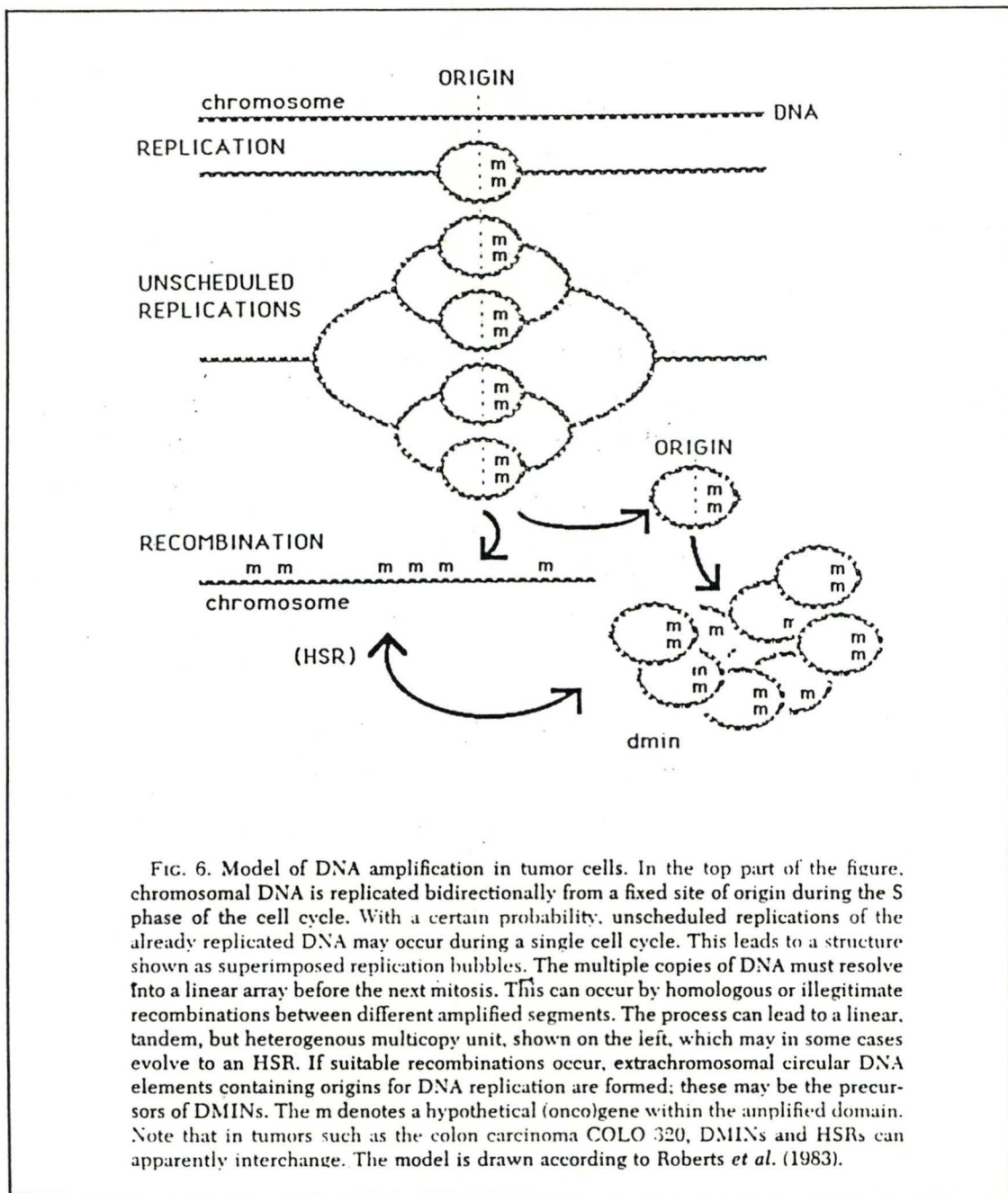


FIG. 6. Model of DNA amplification in tumor cells. In the top part of the figure, chromosomal DNA is replicated bidirectionally from a fixed site of origin during the S phase of the cell cycle. With a certain probability, unscheduled replications of the already replicated DNA may occur during a single cell cycle. This leads to a structure shown as superimposed replication bubbles. The multiple copies of DNA must resolve into a linear array before the next mitosis. This can occur by homologous or illegitimate recombinations between different amplified segments. The process can lead to a linear, tandem, but heterogenous multicopy unit, shown on the left, which may in some cases evolve to an HSR. If suitable recombinations occur, extrachromosomal circular DNA elements containing origins for DNA replication are formed; these may be the precursors of DMINs. The m denotes a hypothetical (onco)gene within the amplified domain. Note that in tumors such as the colon carcinoma COLO 320, DMINs and HSRs can apparently interchange. The model is drawn according to Roberts *et al.* (1983).

montrant que l'amplification génique peut avoir lieu sans division cellulaire préalable (COWELL, 1982). Or la génération d'HSR par crossing-over inégal est tributaire, elle, de nombreuses divisions cellulaires entre chaque étape de sélection.

c. Réplication anormale de l'ADN en cours de division.

La troisième hypothèse est basée sur "la réplication saltatoire", qui est par ailleurs le mécanisme proposé pour expliquer l'excision du virus SV 40 d'un chromosome hôte.

Cette théorie suppose que la réplication peut commencer, au même endroit, plusieurs fois pendant un cycle mais s'arrête avant de rejoindre la fourche de réplication provenant de l'origine adjacente.

Selon certaines études (ROBERTS et al., 1983; STARK et al., 1984; ALITALO et al., 1986), les cycles multiples de réplication de DNA au même locus pendant un cycle cellulaire montreraient une structure en "boucles de réplication" superposées (v. fig. 17).

Les copies amplifiées de DNA devant cependant se retrouver sous forme d'enchaînement linéaire avant la mitose suivante, cela se ferait par des recombinaisons homologues ou non entre certaines séquences répétées à l'intérieur d'une région amplifiée (ROBERTS et al., 1983).

Comme déjà signalé, une partie des recombinaisons mènerait à la formation de boucles extra-chromosomiques qui possèderaient un site d'initiation de réplication ; ce pourraient être d'ailleurs les précurseurs des doubles minutes (PELLIGRINI et al., 1984). Mais ce processus pourrait aussi mener à une unité de copies multiples, linéaire et hétérogène qui, dans certains cas, évoluerait en une région à coloration homogène.

Plusieurs études ont suggéré que, suite à une brève inhibition de la réplication du DNA par certaines drogues, la réplication pourrait se "réinitialiser" au même endroit (WOODCOCK et al., 1979). Puisque le méthotrexate, par exemple, prive les cellules de thymidine, il est possible que cette drogue ou d'autres agents anticancéreux qui inhibent la réplication, facilitent l'amplification en stimulant une "réplication saltatoire".

6.- AMPLIFICATION ET CYTOGENETIQUE.

L'intérêt de la cytogénétique est de pouvoir mettre en évidence en microscopie optique des événements intéressant un gène c'est-à-dire correspondant à une échelle moléculaire.

L'amplification génique permettrait de visualiser ces mécanismes, sans avoir recours soit aux techniques de biologie moléculaire soit au microscope électronique. En somme, des moyens relativement simples permettent d'aborder l'étude de phénomènes relativement compliqués.

Grâce à la cytogénétique, on peut en effet déceler la présence de petites structures chromosomiques comme les doubles minutes, en étudier la répartition dans les cellules et en tirer des informations sur leur mécanisme d'apparition, de répartition entre cellules, leur importance pour la survie et l'acquisition de propriétés nouvelles.

Il faut cependant souligner que peu de travaux sur ce sujet existent et que ces processus d'amplification (et les structures qui y sont associées) restent encore peu connus.

Dans un souci d'objectivité, nous voudrions rappeler quelques points non encore élucidés :

- quand est-ce que des séquences particulières de DNA sont-elles répliquées et quels gènes pourraient être plus facilement amplifiés ?
- qu'est-ce qui détermine le moment de réplication d'une séquence de DNA dans le cycle cellulaire ? Jusqu'à présent, on ignore encore le temps de réplication de divers gènes qui ont été amplifiés sous conditions sélectives par exemple. Wahl et ses collaborateurs (1984) ont déterminé que la propension à l'amplification de gènes transfectés est dépendante de leur site d'intégration chromosomique ; il y aurait ainsi une différence dans la probabilité d'amplification (quelque soit le mécanisme impliqué).
- quelles sont les origines impliquées lors de la reduplication du DNA ? Il apparaîtrait que ces origines de réplication pourraient ne pas être à des sites fixes dans toutes les conditions de croissance (SCHIMKE, 1984).

Comme nos résultats le montrent, dans les myélomes et hybridomes de souris, il semble qu'il ne soit pas possible de prévoir le niveau et le moment d'apparition d'une amplification, ni de prévoir dans quelle lignée elle surgira (en fonction d'une constitution chromosomique particulière par exemple).

Par ailleurs, il nous est très difficile de choisir les types de mécanisme d'amplification qui se sont produits dans nos lignées mais nous avons néanmoins pu mettre en évidence qu'ils se sont produits !

Enfin, l'amplification des gènes ne doit pas faire oublier tous les autres mécanismes ayant provoqué les nombreux réarrangements chromosomiques observés. Il faut en effet compter sur les translocations, les délétions, les inversions chromosomiques et tous les remaniements avec "effet de position". Et ce sont sans aucun doute ces derniers qui prédominent, bouleversant l'expression de certains gènes en les activant ou non.

7.- AMPLIFICATION GENIQUE, CANCER ET IMMORTALITE CELLULAIRE.

Plusieurs faits suggèrent que l'amplification de gènes peut être en relation avec l'origine et/ou la progression du cancer (PALL, 1981; VARSHAVSKY, 1981; SCHIMKE, 1982). Des aberrations chromosomiques comprenant les doubles minutes et les régions à coloration homogène ont été trouvées dans de nombreuses cellules et lignées cellulaires tumorales (v. LEVAN et al., 1977; MILLER et MILLER, 1983) et, dans certains cas, on a pu démontrer que les lignées cellulaires contenaient des oncogènes amplifiés comme le c-myc, c-k-ras, etc... (SCHWAB et al., 1983; KOHL et al., 1983).

Il faut cependant encore établir si ces aberrations (et les gènes amplifiés) sont liées au processus oncogénique ou s'ils sont le résultat de l'établissement de lignées cellulaires continues dérivées de telles tumeurs.

D'autres études ont montré que divers réarrangements de DNA sont associés au cancer, comme les translocations chromosomiques provoquant une expression accrue des gènes c-myc (KLEIN, 1983), ou comme la surexpression d'oncogènes cellulaires par juxtaposition à un promoteur rétrovirus (HAYWARD et al., 1981).

De telles données suggèrent que l'amplification génique peut être une forme fréquente d'instabilité génomique et être à la base de diverses formes de réarrangements chromosomiques. Ceux-ci, à leur tour, peuvent mener à une surproduction de protéines nécessaire pour surmonter les contraintes de croissance normale, et lors de croissance tumorale, à une hétérogénéité dans la population cellulaire et une progression dite maligne.

L'induction rapide de l'amplification qui a souvent lieu par intermédiaires extrachromosomiques, pourrait aussi fournir à la cellule cancéreuse le matériel génétique nécessaire à son maintien sous certaines pressions sélectives.

Il nous paraît enfin utile de souligner les progrès réalisés grâce aux techniques de banding.

Lorsqu'on observe les chromosomes de myélomes et d'hybridomes de souris, ils peuvent apparaître (et ils ont été du reste décrits) à première vue tout à fait normaux (v. caryotype du myélome SP₂N et de l'hybridome H4A8). Mais en réalité, après mise en évidence des bandes, nous avons pu montrer qu'il ne s'agissait plus du tout de chromosomes normaux de souris mais bien de chromosomes profondément remaniés, au point qu'il devient même impossible de reconnaître des chromosomes normaux.

Cette "non identification" de certains chromosomes nous permet aussi d'apporter une contribution à une meilleure compréhension de la survie des hybridomes : des chromosomes normaux ne permettraient pas du tout d'avoir des hybridomes !

De plus, au contraire de certaines cellules tumorales (chez l'homme par exemple) dans lesquelles l'apport de chromosomes normaux (par introduction directe dans la cellule ou par hybridation avec des cellules normales) peut rétablir la "normalité", les myélomes et hybridomes montrent bien à quel point ces cellules sont réarrangées, anormales, et que cela ne s'explique pas simplement par des pertes ou gains de chromosomes.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

a.) L'étude des myélomes et hybridomes de souris que nous avons effectuée , a été compliquée par le fait que les lignées utilisées ont été constituées d'hybridomes et d'hybridomes fusionnés avec des lymphocytes. Cela peut expliquer une partie de la variabilité et des résultats observés.

b.) Nous avons étudié divers systèmes de bandes (bandes G et C) et mis en évidence certaines régions chromosomiques particulières (régions des organisateurs nucléolaires) dans les lignées de myélomes SP₂M, SP₂B, SP₂N et l'hybridome 4A8.

Nous avons observé une dispersion du nombre de chromosomes au sein de chaque lignée. Cette distribution du nombre modal peut s'expliquer par le fait que nous sommes partis d'un matériel qui lui-même présentait déjà une grande variation chromosomique et par sa nature hybride.

Les myélomes et hybridomes de souris sont donc à classer dans le groupe de cellules tumorales à dispersion chromosomique.

c.) Apparemment, les anomalies observées ne sont pas dues au hasard en ce sens que nous n'avons pas vu de chromosomes en anneau, de chromosomes dicentriques, etc... (qu'on retrouve dans des cas de leucémies, lors de radiations, etc.).

d.) Nous avons pu identifier certains chromosomes et déterminer pour la première fois l'existence d'une translocation entre un chromosome 3 et un chromosome 5 qui est donc importante dans ces cellules. Bien que certains auteurs aient montré l'existence d'une translocation (12;15) dans des plasmacytomes de souris, ou même dans ce type de souche cellulaire, nous pouvons dire que cette lignée est originale.

Un autre chromosome marqueur a aussi été trouvé mais n'a pu être identifié de manière univoque. Il n'est pas exclu qu'il soit constitué d'un chromosome 12 et d'un 15, en tout ou en partie.

La plupart des autres chromosomes n'ont pu être identifiés en tant que normaux ! On peut donc penser qu'ils ont subi des remaniements intrachromosomiques.

e.) Dans ces conditions, une corrélation génotype/phénotype devient aléatoire. Il faudrait en effet pouvoir étudier pour chaque culture quel était exactement le génotype des cellules (avec la variabilité qu'il comporte). Il ne serait ainsi pas étonnant de voir apparaître et disparaître des protéines secrétées dans le milieu.

Le présent travail permettrait alors d'expliquer pourquoi on observerait cette variabilité et pourquoi certaines lignées d'ailleurs produiraient un type de protéines tandis que d'autres lignées apparemment les mêmes n'en produiraient pas ou moins.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Est reprise ici, par ordre alphabétique, la liste des références citées dans le présent travail. Nous mentionnons aussi certains travaux importants qui nous ont aidé dans la réalisation de ce mémoire.

ADAMS, J.M.; GERONDAKIS, S.; WEBB, E.; MITCHELL, J.; BERNARD, O.; CORY, S. (1982)

"Transcriptionally active DNA region that rearranges frequently in murine lymphoid tumors"
PROC.NATL.ACAD.SCI.USA 79, 6994-6998

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. (1983)

"Molecular biology of the cell"
GARLAND PUBLISHING, INC. - New York, London
pp. 183

ALITALO, K.; SCHWAB, M.; LIN, C.C.; VARMUS, H.E.; BISHOP, J.M., (1983)

"Homogeneously staining chromosomal regions contains amplified copies of an abundantly expressed cellular oncogene (c-myc) in malignant neuroendocrine cells from a human colon carcinoma"
PROC.NATL.ACAD.SCI.USA 80, 1707-1711

ALITALO, K. (1985)

"Amplification of cellular oncogenes in cancer cells"
T.I.B.S. , pp. 194-197

ALITALO, K.; SCHWAB, M. (1986)

"Oncogene amplification in tumor cells"
ADVANCES IN CANCER RESEARCH 47 , 235-281

ALLDERDICE, P.W.; MILLER, O.J.; MILLER, D.A.; WARBURTON, D.; PEARSON, P.L.; KLEIN, G.; HARRIS, H. (1973)

"Types of cytogenetic damage detected in the mouse lymphoma assay by banded karyotype analysis"
J.CELL SCI. 12 , 263-274

- BALABAN-MALENBAUM, G.; GILBERT, F.W. (1977)
 "Double minute chromosomes and the homogeneously staining regions in chromosomes of a human neuroblastoma cells"
 SCIENCE 198, 739-741
- BARKER, P.E.; HSU, T.C. (1978)
 "Are double minutes chromosomes"
 EXP.CELL RES. 113, 457-458
- BARKER, P.E.; HSU, T.C. (1979)
 "Double minutes in human carcinoma cell lines, with special reference to breast tumors"
 J.NATL.CANCER INST. 62, 257-262
- BARKER, P.E.; DRWINGA, H.L.; HITTELMAN, W.N.; MADDOX, A.M. (1980)
 "Double minutes replicate once during S phase of the cell cycle"
 EXP.CELL RES. 113, 353-360
- BARKER, P.E. (1982)
 "Double minutes in human tumor cells"
 CANCER GENET.CYTOGENET. 5, 81-94
- BARSKI, G.; CORNEFERT, F. (1962)
 "Characteristics of "Hybrid"-type clonal cell lines obtained from mixed culture in vitro"
 J.NATL.CANCER INST. 28, 801-821
- BERENSON, R.J.; FRANCKE, U.; DOLNICK, B.J.; BERTINO, J.R. (1981)
 "Karyotypic analysis of methotrexate-resistant and sensitive mouse L5178Y cells"
 CYTOGENET.CELL GENET. 29, 143-152
- BIEDLER, J.L.; SPENGLER, B.A. (1976)
 "Metaphase chromosome anomaly: association with drug resistance and cell-specific products"
 SCIENCE 191, 185-187
- BIEDLER, J.L.; MELERA, P.W.; SPENGLER, B.A. (1980)
 "Specifically altered metaphase chromosomes in antifolate-resistant chinese hamster cells that overproduce dihydrofolate reductase"
 CANCER GENET.CYTOGENET. 2, 47-60
- BLOOM, S.E.; GOODPASTURE, C. (1976)
 "An improved technique for silver staining of nucleolar organizer regions in human chromosomes."
 HUM.GENET. 34, 199
- BOSMAN, F.T.; SCHABERG, A. (1973)
 "A new G-banding modification for metaphase chromosomes"
 NATURE NEW BIOLOGY 241, 216-217

- BOSTOCK, C.J.; TYLER-SMITH, C. (1981)
 "Gene amplification in methotrexate resistant mouse cells"
 J.MOL.BIOL. 153 , 219-236
- BREGULA, U.; KLEIN, G.; HARRIS, H. (1971)
 "The analysis of malignancy by cell fusion II: Hybrids between ehrlich cells and normal diploid cells"
 J.CELL SCI. 8 , 673-680
- CALAME, K.; KIM, S.; LALLEY, P.; HILL, R.; DAVIS, M.; HOOD, L. (1982)
 "Molecular cloning of translocations involving chromosome 15 and the immunoglobulin c gene from chromosome 12 in murine plasmacytomas"
 PROC.NATL.ACAD.SCI.USA 79 , 6994-6998
- CHEN, T.R. (1987)
 "Cytogenetics of somatic cell hybrids II. Modal karyotypes and mosaicism in mouse mutant cell lines: LM(tk⁻), A9, and RAG"
 CANCER GENET.CYTOGENET. 24 , 95-107
- CHU CHEN, K.; BEVAN, P.C.; MATTHEWS, J.G. (1986)
 "Analysis of G banded karyotypes in myeloma cells"
 J.CLIN.PATHOL. 39 , 260-266
- COHEN, J.B.; UNGER, T.; RECHAVI, G.; CANAANI, E.; GIVOL, D. (1983)
 "Rearrangement of the oncogene c-mos in mouse myeloma NSI and hybridomas"
 NATURE 306 , 795-796
- COMMITTEE ON STANDARDISED GENETIC NOMENCLATURE FOR MICE (1972)
 "Standard karyotype of the mouse, *Mus musculus*."
 J.HERED. 63 , 69-72
- CORY, S. (1986)
 "Activation of a cellular oncogenes in hemopoietic cells by chromosome translocation"
 ADV.CANCER RES. 47 , 189-234
- COWELL, J.K. (1979)
 "Chromosome changes associated with epithelial cell transformation with special reference to in vitro systems"
 ed. L.M.FRANKS, C.B.WIGLEY pp.259-286 LONDON: ACADEMIC

- COWELL, J.K. (1980a)
 "A new chromosome region possibly derived from double minutes in an in vitro transformed epithelial cell line"
 CYTOGENET.CELL GENET. 27 , 2-7
- COWELL, J.K. (1980b)
 "Consistent chromosome changes associated with mouse bladder epithelial cell lines transformed in vitro"
 J.NATL.CANCER INST. 65 , 955-961
- COWELL, J.K. (1981)
 "Evolution of a normal karyotype in a mouse bladder epithelial cell line transformed in vitro"
 CANCER GENET.CYTOGENET. 3 , 359-361
- COWELL, J.K. (1982a)
 "Appearance of double minute chromosomes in somatic cell hybridisation experiments involving the HAT selection system"
 CELL BIOLOGY INTERNATIONAL REPORTS 6(4), 393-399
- COWELL, J.K. (1982b)
 "Double minutes and homogeneously staining regions:gene amplification in mammalian cells"
 ANN.REV.GENET. 16 , 21-59
- COWELL, J.K. (1983)
 "Occurrence and evolution of homogeneously staining regions may be due to breakage-fusion-bridge cycles following telomere loss"
 CHROMOSOMA 88 , 216-221
- COWELL, J.K. (1984)
 "A photographic representation of the variability in the G-banded structure of the chromosomes in the mouse karyotype"
 CHROMOSOMA 89 , 294-320
- CREWS, S.; BARTTH,R.; HOOD,L.; PREHN,J.; CALAME,K. (1982)
 "Mouse c-myc oncogene is located on chromosome 15 and translocated to chromosome 12 in plasmacytomas"
 SCIENCE 218 , 1319-1321
- CROCE,C.M.; NOWELL,P.C. (1985)
 "Molecular basis of human B-cell neoplasia"
 BLOOD 65 , 1-7
- DEPELCHIN, A. (1985)
 "Immunologie fondamentale"
 FNDP Notes de cours NAMUR. Chap.5 ,p.150

- DAVIDSON, R.L.; EPHRUSSI, B. (1965)
 "A selective system for the isolation of hybrids between L cells and normal cells"
 NATURE 205 , 1170
- DIETRICH, A.J.J. (1986)
 "The influence of fixation on the morphology of mitotic chromosomes"
 CANCER J.GENET.CYTOL. 28, 536-539
- DIMOVA, R.N.; MARKOV, D.V.; GAJDARDJIEVA, K.C.; DABEVA, M.D.; HADJIOLOV, A.A. (1982)
 "Electron microscopic localization of silver staining NOR-proteins in rat liver nucleoli upon d-galactosamine block of transcription"
 EUR.J.CELL BIOL. 28 , 272-277
- DOFUKU, R.; UTAKOJI, T.; MATSUZAWA, A. (1979)
 "Trisomy of chromosome #13 in spontaneous mammary tumors of GR, C3H, and noninbred Swiss mice"
 J.NATL.CANCER INST. 63, 651-654
- EPHRUSSI, B. (1972)
 "Hybridization of somatic cells"
 PRINCETON UNIVERSITY PRESS (PRINCETON NEW JERS
- EVANS, E.P. (1981)
 "Karyotype of the house mouse"
 SYMP.ZOOL.SOC.LOND. 47 , 127-139
- EVANS, E.P.; BURTENSHAW, M.D.; BROWN, B.B.; HENNION, R.; HARRIS, H. (1982)
 "The analysis of malignancy by cell fusion"
 J.CELL.SCI. 56, 113-130
- FUNAKI, N.; MATSUI, S.; SASAKI, M. (1975)
 "Location of nucleolar organizers in animal and plant chromosomes by means of an improved N-banding technique."
 CHROMOSOMA 49 , 357
- GEORGE, D.L.; POWERS, V.E. (1981)
 "Cloning of DNA from double minutes of Y1 mouse adrenocortical tumor cells: evidence for gene amplification"
 CELL 24, 117-123
- GEORGE, D.L.; POWERS, V.E. (1982)
 "Amplified DNA sequences in Y1 mouse adrenal tumor cells: association with double minutes and localization to a homogeneously staining chromosomal region"
 PROC.NATL.ACAD.SCI.USA 79, 1597-1601

- GROPP, A. (1969)
 "Comparative presentation of a further case of robertsonian changes in the genus *Mus*"
 in: "Comparative Mammalian Cytogenetics"
 (Benirschke, K. éd.) pp. 260-266
 Springer Verlag - Berlin, Heidelberg, New York
- HABER, D.A.; SCHIMKE, R.T. (1981)
 "Unstable amplification of an altered dihydrofolate reductase gene associated with double-minute chromosomes"
 CELL 26 , 355-362
- HARRIS, L.J.; D'EUSTACHIO, P.; RUDDLE, F.H.; MARCU, K.B. (1982)
 "DNA sequence associated with chromosome translocations in mouse plasmacytomas"
 PROC.NATL.ACAD.SCI.USA 79, 6622-6626
- HASHMI, S.; ALLERDICE, P.W.; KLEIN, G.; MILLER, O.J. (1974)
 "Chromosomal heterogeneity in the RAG and MSWBS mouse tumor cell lines"
 CANCER RES. 34, 79-88
- HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P.S. (1961)
 "The serial cultivation of human diploid cell strains"
 EXP.CELL RES. 25 , 585-621
- HAYFLICK, L. (1965)
 "The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains"
 EXP.CELL RES. 37 , 614-625
- HAYWARD, W.S.; NEEL, B.G.; ASTRIN, S.M. (1981)
 "Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukemia"
 NATURE 290, 475-480
- HENGARTNER, H.; MEO, T.; MÜLLER, E. (1978)
 "Assignment of genes for immunoglobulin K and heavy chains to chromosomes 6 and 12 in mouse"
 PROC.NATL.ACAD.SCI.USA 75, 4494-4498
- HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. (1980)
 "Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer - A 1-step method"
 EXPERIENTIA 36 , 1014-1015
- HSU, T.C.; KELLOGG, D.S. (1960)
 "Mammalian chromosomes in vitro XII experimental evolution of cell populations"
 J.NATL.Cancer Inst. 24 , 1067-1073

- HÜBNER, R. (1984)
 "Etude du caryotype de souris sauvages de nos régions"
 FUNDP Mémoire de licence - Cytogénétique.
- HUGHES, D.T. (1968)
 "Cytogenetical polymorphism and evolution in mammalian somatic cell populations in vivo and in vitro"
 NATURE 217 , 518-523
- HUNGERFORD, D.A. (1969)
 "Leukocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCL STAIN TECHNOLOGY 40, 333-338
- KAUFMAN, R.J.; BROWN, P.C.; SCIMKE, R.T. (1979)
 "Amplified dihydrofolate reductase genes in unstably methotrexate-resistant cells are associated with double minute chromosomes"
 PROC.NATL.ACAD.SCI.USA 76, 5669-5673
- KLEBE, R.J.; CHEN, T.R.; RUDDLE, F.H. (1970)
 "Controlled production of proliferating somatic cell hybrids"
 THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY 45, 74-82
- KLEIN, G.; OHNO, S.; ROSENBER, N.; WIENER, F. (1980)
 "Cytogenetic studies on abelson-virus induced mouse leukemias"
 INT.J.CANCER 25 , 805-811
- KLEIN, G. (1981)
 "The role of gene dosage and genetic transpositions in carcinogenesis"
 NATURE 294, 313-318
- KLEIN, G. (1983)
 "Specific chromosomal translocations and the genesis of B-cell derived tumors in mice and man"
 CELL 32 , 311-315
- KODAMA, Y.; YOSHIDA, M.C.; (1978)
 "Note on banded karyotypes in spontaneous leukemias of AKR mouse"
 PROC.JPN.ACAD. 54 , 222-227
- KODAMA, Y.; TAKAGI, N.; YOSHIDA, M.C.; SASAKI, M. (1981)
 "Karyotypic changes in serial transfers of leukemic cells of AKR mouse"
 CANCER GENET.CYTOGENET. 3, 237-242
- KOHL, N.E.; KANDA, N.; SCHRECK, R.R.; BRUNS, G.; LATT, S.A.; GILBERT, F. (1983)
 "Transposition and amplification of oncogene related sequences in human neuroblastomas"
 CELL 35 , 359-367

- KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. (1975)
 "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity"
 NATURE 256 , 495-497
- KÖPF, I.; STRIO, K.G.; HENEEN, W.K.; MAGNUSSON, B.; BRANEHÖG, I. (1986)
 "Modification and evaluation of direct and high-resolution bone-marrow chromosome preparation techniques"
 HEREDITAS 104 , 245-252
- KOPNIN, B.P. (1981)
 "Specific karyotypic alterations in colchicine-resistant cells"
 CYTOGENET. CELL GENET. 30 , 11-14
- KORTHOF, G. (1986)
 "An improved fixation method for chromosome preparation of chinese hamster, chinese hamster-human hybrid, and mouse cell lines"
 CYTOGENET. CELL GENET. 41 , 181-184
- KOULISCHER, L. (1967)
 "Mammalian cytogenetics III. Description of a whole blood culture technique with autologous plasma"
 ACTA ZOOLOGICA ET PATHOLOGICA ANTVERPIENSIA 44 , 119-123
- KOULISCHER, L. (1973)
 "Common patterns of chromosome evolution in mammalian cell cultures or malignant tumors and mammalian speciation"
 in: "Cytotaxonomy and vertebrate evolution"
 pp. 129-164 ; CHIARELLI, A.B.; CAPANNA, E. (1973)
 éds. Academic Press London
- KOULISCHER, L. (1987)
 "Cytogénétique"
 FUNDP Notes de cours - Namur
- KOULISCHER, L. (1986)
 "GENETIQUE 1.; 2.; 3."
 FUNDP NOTES DE COURS
- KRIZMAN, D.B.; PATHAK, S.; CAILLEAU, R. (1985)
 "Double minutes in the HELA cell line"
 CANCER GENET. CYTOGENET. 18 , 43-47
- LEVAN, G.; MANDAHL, N.; BREGULA, U.; KLEIN, G.; LEVAN, A. (1976)
 "Double minute chromosomes are not centromeric regions of the host chromosomes"
 HEREDITAS 83 , 83-90
- LEVAN, G.; MANDAHL, N.; BENGTSOON, B.O.; LEVAN, A. (1977)
 "Experimental elimination and recovery of double minute chromosomes in malignant cell populations"
 HEREDITAS 86 , 75-90

- LEVAN, A.; LEVAN, G.; MITELMAN, F. (1977b)
 "Chromosomes and cancer"
 HEREDITAS 86 , 15-30
- LEVAN, A.; LEVAN, G. (1978)
 "Have double minutes functioning centromeres?"
 HEREDITAS 88 , 81-92
- LEVAN, A.; LEVAN, G.; MANDAHL, N. (1978b)
 "A new chromosome type replacing the double
 minutes in a mouse tumor"
 CYTOGENET. CELL GENET. 20 , 12-23
- LEVAN, A.; LEVAN, G. (1980)
 "Large double minutes with ring-shape and
 rod-shape"
 HEREDITAS 92 , 259-265
- LICHTENBERGER, M. J. (1983)
 "Quick and reversible staining methods for
 G- and Q-bands of chromosomes"
 STAIN TECHNOLOGY 58(4), 185-188
- LITTLEFIELD, J. (1964)
 "Selection of hybrids from mating of
 fibroblasts in vitro and their presumed
 recombinants"
 SCIENCE 145 , 709-710
- LEWIN, B. (1985)
 "Genes"
 WILEY INT. EDITION 6 New York , Chap. 37, pp. 646-
 667
- MACGREGOR, H.; VARLEY, J. (1978)
 "Working with animal chromosomes"
 A WILEY INTERSCIENCE PUBLICATION, pp. 11-42
 J. WILEY and SONS. LONDON NEW YORK.
- MACKAY, R. D. G. (1973)
 "The mechanism of G and C banding in
 mammalian metaphase chromosomes"
 CHROMOSOMA 44 , 1-14
- MAMAEVA, S. E.; TSVILENEVA, N. N. (1985)
 "A study of chromosome content of friend virus
 induced mouse erythroleukemia cells (clone M2
 via karyotype reconstruction"
 CANCER GENET. CYTOGENET. 16, 199-205
- MELCHERS, F.; POTTER, M.; WARNER, N. L. (1978)
 "Lymphocyte hybridomas"
 CURRENT TOPICS IN MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY
81 , R9-R23

- MILLER, O.J.; MILLER, D.A. (1975)
 "Cytogenetics of the mouse"
 ANN.REV.GEN. 9 , 285-303
- MILLER, D.A.; TANTRAVAH, R.; NEWMAN, B.; DEV, V.G.; MILLER, O.J.
 (1979)
 "Karyotype of Friend virus induced
 mouse erythroleukemia cells"
 CANCER GENET.CYTOGENET. 1 , 103-113
- MILLER, D.A.; MILLER, O.J. (1981)
 "Cytogenetics"
 THE MOUSE IN BIOMEDICAL RESEARCH 1 , 241-261
- MILLER, D.A.; MILLER, O.J. (1983)
 "Chromosomes and cancer in the mouse: studies
 in tumors, established cell lines, and cell
 hybrids"
 ADVANCES IN CANCER RESEARCH 39 , 153-182
- MILSTEIN, C. (1985)
 "Les anticorps monoclonaux"
 in: "Des gènes aux protéines", pp.134-143
 BIBLIOTHEQUE POUR LA SCIENCE, éd.POUR LA SCIENCE
 PARIS
- MORIWAKI, K.; IMAI, H.T. (1978)
 "Mechanism of ploidy shift from diploidy
 to tetraploidy in MSPC-1 mouse myeloma"
 EXP.CELL RES. 111, 483-490
- MORIWAKI, K.; IMAI, H.T.; YOSIDA, T.H. (1969)
 "Polyploidization and protein synthesis
 in mammalian tumor cells"
 JAP.J.GENETICS 44 , 71-83
- NESBITT, M.N.; FRANCKE, U. (1973)
 "a system of nomenclature for band patterns
 of mouse chromosomes"
 CHROMOSOMA 41, 145-158
- NIELSEN, K. (1976)
 "Chromosomal evolution in the Ehrlich-Lettré
 complex of hyperdiploid mouse ascites
 tumors: results from seven laboratory
 strains"
 HEREDITAS 84 , 77-108
- NIELSEN, K.; GRANZOW, C. (1983)
 "Chromosome band patterns of near tetraploid
 Ehrlich-Lettré mouse ascites cells (ELT Bonn)
 in vivo and in vitro"
 HEREDITAS 98, 95-103

- NUNBERG, J.H.; KAUFMAN, R.J.; SCHIMKE, R.T.; URLAUB, G.; CHASIN, L.A. (1978)
 "Amplified dihydrofolate reductase genes are localised to a homogeneously staining region of a single chromosome in a methotrexate resistant chinese hamster ovary cell line"
 PROC.NATL.ACAD.SCI.USA 75 , 5553-5556
- NOWAK, J.S. (1985)
 "Loss of antibody production accompanied by chromosome loss in a cloned hybrid line secreting antibodies to sheep red blood cells"
 EXPERIENCIA 41 , 88-89
- OHNO, S.; BABONITS, M.; WIENER, F.; SPIRA, J.; KLEIN, G.; POTTER, M. (1979)
 "Nonrandom chromosome changes involving the Ig gene-carrying chromosomes 12 and 6 in pristane-induced mouse plasmacytomas"
 CELL 18 , 1001-1007
- PALL, M.L. (1981)
 "Gene-amplification model of carcinogenesis"
 PROC.NATL.ACAD.SCI.USA 78 , 2465-2468
- PELLIGRINI, S.; DAILEY, L.; BASILICO, C. (1984)
 "Amplification and excision of integrated polyoma DNA-sequences require a functional origin of replication"
 CELL 36 , 943-949
- PETTENGILL, O.S.; SORENSON, G.D. (1972)
 "Growth characteristics of long-term cultures of mouse myeloma cells"
 EXP.CELL RES. 70 , 65-72
- PETTENGILL, O.S.; SORENSON, G.D. (1967)
 "Murine myeloma cells in suspension culture"
 EXP.CELL RES. 47 , 608-613
- POTTER, M. (1986)
 "MYELOMA PROTEINS"
 EXPERENTIA 42(9) , 967-970
- QUINN, L.A.; MOORE, G.E.; MORGAN, R.T.; WOODS, L.K. (1979)
 "Cell line from human colon carcinoma with unusual cell products, double minutes, and homogeneously staining regions"
 CANCER RES. 39 , 4914-4924
- RATTNER, J.B.; LIN, C.C. (1985)
 "Centromere organization in chromosomes of the mouse"
 CHROMOSOMA 92 , 325-329
- RECHAVI, G.; GIVOL, D.; CANAANI, E. (1982)
 "Activation of a cellular oncogene by DNA rearrangement: possible involvement of an IS-like element"
 NATURE 300 , 607-611

- ROBERTS, J.M.; BUCK, L.B.; AXEL, R. (1983)
 "A structure for amplified DNA"
 CELL 33 , 53-63
- RONNE, M.; ANDERSEN, O.; ERLANDSEN, M. (1979)
 "Effect of colcemid exposure and methanol
 acetic acid fixation on human metaphase
 chromosome structure"
 HEREDITAS 90 , 195-201
- RONNE, M.; BOYE, H.A.; SANDERMANN, J. (1977)
 "A mounting medium for banded chromosomes"
 HEREDITAS 86 , 155-158
- ROTHFELS, K.H.; SIMINOVITCH, L. (1958)
 "An air-drying technique for flattening
 chromosomes in mammalian cell grown in
 vitro"
 STAIN TECHNOLOGY 33 , 73-77
- ROWLAND, P.; CHIANG, J.; JARGIELLO-JARRETT, P.; HOFFEE, P.A.
 (1986)
 "Chromosome anomalies associated with
 amplification of the adenosine gene (ADA)
 in rat hepatoma cells"
 CYTOGENET.CELL GENET. 41 , 136-144
- RUSSELL, M.H.; ENGEL, E.; VAUGHN, W.K.; MC GEE, B.J. (1977)
 "Karyotypic analysis of parental and hybrid
 intraspecific mouse cells, A9/B82, by giemsa
 and centromeric banding"
 J.CELL SCI. 25 , 59-71
- SAINEROVA, H.; SVOBODA, J. (1981)
 "Stability of c-banded and c-bandless
 microchromosomes in clonal sublines of
 the RVP3 mouse tumor grown serially in vivo"
 CANCER GENET.CYTOGENET. 3 , 237-242
- SASAKI, M. (1982)
 "Current status of cytogenetics studies in
 animal tumors with special reference to
 nonrandom chromosome changes"
 CANCER GENET.CYTOGENET. 5 , 153-172
- SCHIMKE, R.T.; KAUFMAN, R.J.; ALT, F.W.; KELLEMS, R.F. (1978)
 "Gene amplification and drug resistance
 in cultured murine cells"
 SCIENCE 202 , 1051-1055
- SCHIMKE, R.T.; BROWN, P.C.; KAUFMAN, R.J.; MCGROGAN, M.; SLATE, D.L.
 (1981)
 "Chromosomal and extrachromosomal
 localization of amplified dihydrofolate
 reductase genes in cultured mammalian
 cells"
 COLD SPRING HARBOR SYMP. QUANT. BIOL. 45 ,
 785-796

- SCHIMKE, R.T. (1982)
 "Gene amplification"
 NEW YORK : COLD SPRING HARBOR LAB. ,
 pp. 317-333
- SCHIMKE, R.T. (1984)
 "Gene amplification in cultured animal cells"
 CELL 37 , 705-713
- SCHRÖDER, J.; SUDMALAINEN, H.; KNAPP, M.R.; GRONOWICZ, E.;
 STROBER, S. (1979)
 "Karyotypic differentiation in a spontaneous
 mouse B-cell leukemia"
 CANCER GENET. CYTOGENET. 1 , 57-62
- SCHRÖDER, J.; AUTIO, K.; JARVIS, J.M.; MILSTEIN, C. (1980)
 "Chromosome segregation and expression
 of rat immunoglobulins in rat/mouse
 hybrid myelomas"
 IMMUNOGENETICS 10 , 125-131
- SCHWAB, M.; ALITALO, K.; VARMUS, H.E.; BISHOP, J.M.; GEORGE, D.
 (1983)
 "A cellular oncogene (c-k-ras) is amplified
 overexpressed, and located within karyotypic
 abnormalities in mouse adrenocortical
 tumor cells"
 NATURE 303 , 497-501
- SCHWAB, M.; RAMSAY, G.; ALITALO, K.; VARMUS, H.E.; BISHOP, J.M.;
 MARTINSSON, T.; LEVAN, G.; LEVAN, A. (1985)
 "Amplification and enhanced expression of
 the c-myc oncogene in mouse SEWA tumor cells"
 NATURE 315 , 345-347
- SHABTAI, F.; HALBRECHT, I. (1981)
 "Interpretation of a marker chromosome 17p
 in multiple myeloma"
 HEREDITAS 95 , 11-14
- SHEPARD, J.S.; WURSTER-HILL, D.H.; PETTENGILL, O.S.;
 SORENSON, G.D. (1974a)
 "Giemsa-banded chromosomes of mouse myeloma
 in relationship to oncogenicity"
 CYTOGENET. CELL GENET. 13 , 279-309
- SHEPARD, J.S.; PETTENGILL, O.S.; WURSTER-HILL, D.H.;
 SORENSON, G.D. (1974b)
 "Alterations of karyotype and oncogenicity
 in mouse myeloma MOPC-315 and 5-bromodeoxy-
 uridine-resistant cell lines"
 CANCER RES. 34 , 2852-2858
- SHEPARD, J.S.; PETTENGILL, O.S.; WURSTER-HILL, D.H.;
 SORENSON, G.D. (1976)
 "Karyotype, marker formation, and oncoge-
 nicity in mouse plasmacytomas"
 J. NATL. CANCER INST. 56 1003-1011

- SHEPARD, J.S.; PETTENGILL, O.S.; WURSTER-HILL, D.H.; SORENSON, G.D. (1978)
 "A specific chromosome breakpoint associated with mouse plasmacytomas"
 J.NATL.CANCER INST. 61 , 255-257
- SHEPARD, J.S.; PETTENGILL, O.S.; WURSTER-HILL, D.H.; SORENSON, G.D. (1979)
 "Karyotypic evolution associated with loss of tumorigenicity"
 J.NATL.CANCER INST. 62 , 547-554
- SHULMAN, M.; WILDE, C.D.; KÖHLER, G. (1978)
 "A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies"
 NATURE 276 , 269-270
- SIEBENLIST, U.; HENNIGHAUSEN, L.; BATTEY, J.; LEDER, P. (1984)
 "Chromatin structure and protein-binding in the putative regulatory region of the c-myc gene in Burkitt-lymphoma"
 CELL 37 , 381-391
- SOMSSICH, I.; HAMEISTER, H.; WINKING, H. (1981)
 "The pattern of early replicating bands in the chromosomes of the mouse"
 CYTOGENET.CELL GENET. 30 , 222-231
- SOMSSICH, I.; SPIRA, J.; HAMEISTER, H.; KLEIN, G. (1984)
 "Correlation between tumorigenicity and banding pattern of chromosome 15 in murine T-cell leukemia cells and hybrids of normal and malignant cells"
 CHROMOSOMA 91 , 39-45
- SORENSON, G.D.; PETTENGILL M.D. ; PETTENGILL, O.S. (1972)
 "Morphologic and functional characteristics of long-term cultures of murine myeloma cells"
 AMERICAN J. PATHOLOGY 67 , 241-264
- SOROKINA, E.A.; KOZHUKHAROVA, I.V.; GRINCHUCK, T.M. (1986)
 "Karyotypical characteristics analysis of mouse myeloma cell line SP₂/O-Ag14"
 TSITOLOGIYA 28(6), 623-626
- SPIRA, J.; WIENER, F.; OHNO, S.; KLEIN, G. (1979)
 "Is trisomy cause or consequence of murine T cell leukemia development? Studies on robertsonian translocation mice"
 PROC.NATL.ACAD.SCI.USA 76 , 6619-6621
- SPIRA, J.; WIENER, F.; KLEIN, G. (1983)
 "Robertsonian translocation studies on the significance of trisomy 15 in murine T cell leukemia"
 CANCER GENET.CYTOGENET. 9 , 45-50

- STARK, G.R.; WAHL, G.M. (1984)
 "Gene amplification"
 ANN.REV.BIOCH. 53 , 447-491
- SUMNER, A.T. (1972)
 "A simple technique for demonstrating
 centromeric heterochromatin"
 EXP.CELL RES. 75 , 304-306
- TANAKA, K.K.; HIGASHIDA, H.; FUKAMI, H.; TANAKA, T. (1982)
 "Double minutes in mouse neuroblastoma
 cells and their hybrids"
 CANCER GENET.CYTOGENET. 5 , 51-62
- TAUB, R.; KIRSCH, I.; MORTON, C.; LENOIR, G.; SWAN, O.; TRONICK,
 AARONSON, S.; LEDER, P. (1982)
 "Translocation of the c-myc gene into the
 immunoglobulin heavy chain locus in human
 Burkitt lymphoma and murine plasmacytomas
 cells"
 PROC.NATL.ACAD.SCI.USA 79 , 7837-7841
- TERZI, M. (1974)
 "Genetics and the animal cell"
 A WILEY-INTERSCIENCE PUBLICATION
 J.WILEY and SONS. LONDON-NEW YORK
- TIEPOLO, L.; ZUFFARDI, O. (1973)
 "Identification of normal and abnormal
 chromosomes in tumor cells"
 CYTOGENET.CELL GENET. 12 , 8-16
- TRAUT, W.; WINKING, H.; ADOLPH, S. (1984)
 "An extra segment in chromosome 1 of wild
 Mus musculus: a c-band positive homogeneous
 staining region"
 CYTOGENET.CELL GENET. 38 , 290-297
- VARSHAVSKY, A. (1981)
 "On the possibility of metabolic control
 of replicon "misfiring". Relationship
 to emergence of malignant phenotypes in
 mammalian cell lineages"
 PROC.NATL.ACAD.SCI.USA 78 , 3673-3677
- VOLGAREVA, G.M. (1985)
 "Karyological investigation of murine
 B-cell hybridomas"
 TSITOLOGIYA 27 , 1394-1403
- VOLGAREVA, G.M. (1986)
 "Chromosomal markers of mouse hybridomas"
 ZH MIKROBE 2 , 69-73

- WAHL, G.M.; VITTO, L.; PADGETT, R.A.; STARK, G.R. (1982) 119.
"Localisation of single copy and amplified
CAD genes in Syrian hamster chromosomes
using a highly sensitive method for in
situ hybridization"
MOL. CELL BIOL. 2 , 308-319
- WAHL, G.M.; DESAINTU, B.R.; DEROSE, M.L. (1984)
"Effect of chromosomal position on
amplification of transfected genes
in animal cells"
NATURE 307 , 516-520
- WIENER, F.; FENYÖ, E.M.; KLEIN, G. (1972)
"Fusion of tumour cells with host cells"
NATURE NEW BIOLOGY 238 , 155-159
- WIENER, F.; OHNO, S.; SPIRA, J.; HARAN-GHERA, N.; KLEIN, G. (1978)
"Cytogenetic mapping of the trisomic
segment of chromosome 15 in murine t-cell
leukemia"
NATURE 275 , 658-660
- WIENER, F.; BABONITS, M.; SPIRA, J.; KLEIN, G.; POTTER, M. (1980)
"Cytogenetic studies on IgA/lambda-producing
murine plasmacytomas: regular occurrence
of a T(12;15) translocation"
SOMATIC CELL GENETICS 6 , 731-738
- WIENER, F. (1984a)
"Chromosomal aberrations in murine
plasmacytomas"
CURRENT TOPICS IN MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOG'
113 , 178-182
- WIENER, F.; OHNO, S.; BABONITS, M.; SÜMEGI, J.; WIRSCHUBSKY, Z.;
KLEIN, G.; MUSHINSKI, J.P.; POTTER, M. (1984b)
"Hemizygous interstitial deletion of
chromosome 15 (band D) in three transloca-
tion-negative murine plasmacytomas"
PROC.NATL.ACAD.SCI.USA 81 , 1159-1163
- WIENER, F.; BABONITS, M.; BREGULA, U.; KLEIN, G.; LEONARD, A.;
WAX, J.S.; POTTER, M. (1984c)
"High resolution banding analysis of the
involvement of strain balb/c and akr-
derived chromosomes n°15 in plasmacytoma
specific translocations"
J.EXP.MED. 159 , 276-291
- WIGLEY, C.B.; COWELL, J.K. (1984)
"Presence of two cytogenetic forms of
amplified DNA: evidence for a role in
tumor growth in an intraspecific mouse
hybrid cell line"
J.NATL.CANCER INST. 73 , 219-226
- WINKING, H.; NIELSEN, K.; GROPP, A. (1980)
"Variable positions of NORs in mus
musculus"
CYTOGENET.CELL GENET. 26 , 158-164

- WIRSCHUBSKY, Z.; INGVARSSON, S.; CARSTENSSEN, A.; WIENER, F.;
KLEIN, G.; SÜMEGI, J. (1985)
"Gene localization on sorted chromosomes:
definitive evidence on the relative
positioning of genes participating in
the mouse plasmacytoma-associated typical
translocation"
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 82 , 6975-6979
- WOODCOCK, D.M.; COOPER, I.A. (1979)
"Aberrant double replication of
segments of chromosomal DNA following
DNA synthesis inhibition of cytosine
arabioside"
EXP. CELL RES. 123 , 157-166
- WURSTER, D.H. (1972)
"Mouse chromosomes identified by trypsin-
Giemsa (T-G) banding"
CYTOGEN. CELL GENET. 11 , 379-387
- YIELDING, K.L. (1967)
"Chromosome redundancy and gene expression:
explanation for trisomy abnormalities"
NATURE 214 , 613-614
- YUNIS, J.J.; BLOOMFIE, C.D.; ENSRUD, K. (1981)
"All patients with acute nonlymphocytic
leukemia may have a chromosomal defect"
N. ENG. J. MED. 305 , 135-139
- YOSHIDA, M.C.; MORIWAKI, K.; MIGITA, S. (1978)
"Specificity of the deletion of chromosome
15 in mouse plasmacytoma: brief communi-
cation"
J. NATL. CANCER INST. 60 , 235-238
- YOSHIDA, M.C.; MORIWAKI, K. (1975)
"Specific marker chromosomes involving a
translocation (12;15) in a mouse myeloma"
PROC. JAP. ACAD. 51 , 588-592
-