

## EFFETS DE LA MITOMYCINE C ET DU MELPHALAN SUR LES PROTÉINES NUCLÉAIRES TOTALES ET LES ACIDES DÉSOXYRIBONUCLÉIQUES CHEZ DES FIBROBLASTES DE RAT CULTIVÉS *IN VITRO*

R. BASSLEER

Institut d'Histologie et Centre anticancéreux, Université de Liège, 20, rue de Pitteurs,  
Liège, Belgique

(Received 1 June 1966; accepted 16 February 1967)

**Abstract**—The effects of Mitomycin C and the aromatic nitrogen mustard Melphalan on total nuclear proteins, nucleolar dry mass and DNA in rat fibroblasts cultivated *in vitro* have been studied by means of microinterferometry and cytophotometry after Feulgen reaction. With these techniques, the quantity of the three nuclear components can be measured in individual cells and successively in the same cells. Previously, Mitomycin C and Melphalan had been shown to inhibit cell multiplication and to cause important cytological alterations during interphase and mitosis.

As far as total nuclear proteins, nucleolar dry mass and DNA are concerned, the effects of Mitomycin C (0.4 mg/l, during 4 days) and of Melphalan (100 mg/l during 3 days) are quite similar. Indeed, in the presence of one or another of these antimitotic agents, premitotic syntheses of nuclear proteins, nucleolar material and DNA take place; however, DNA synthesis seems to be somewhat inhibited by Mitomycin C. In both cases only a few cells divide. In these fibroblasts, the amount of total nuclear proteins and the nucleolar dry mass increase up to twice the normal pre-division value, while the DNA content is at the premitotic level. Probably due to inhibition of DNA synthesis, the majority of the Mitomycin C treated cells remain in this state. In the case of Melphalan, the DNA content continues to increase and the cells become octoploid and even sometimes hexadecaploid as far as DNA and nuclear proteins are concerned.

The size of the fibroblasts treated by Mitomycin C or by Melphalan increases progressively and the cells slowly degenerate.

LA MICRO-INTERFÉROMÉTRIE et la cytophotométrie après réaction de Feulgen sont des techniques cytochimiques grâce auxquelles il est possible d'aborder quantitativement le problème du mécanisme d'action des substances antimitotiques. Ces deux méthodes permettent en effet de déterminer successivement dans *les mêmes cellules*, les teneurs en protéines nucléaires totales et les teneurs en acides désoxyribonucléiques (ADN). Le comportement respectif de ces macromolécules nucléaires peut être ainsi analysé, notamment dans des cellules cultivées *in vitro* et traitées par divers agents cytotoxiques. Les effets des rayons X ont été étudiés à ce point de vue par Killander *et al.*; <sup>1</sup> de notre côté, nous avons utilisé précédemment ces techniques pour analyser les synthèses de protéines nucléaires et d'ADN dans des fibroblastes de rat croissant *in vitro* en présence de Myleran. <sup>2, 3</sup> Dans le présent travail, nous avons porté notre attention sur le comportement des protéines nucléaires et des ADN dans des fibroblastes de rat soumis à l'action de la Mitomycine C ou du Melphalan, deux substances à propriétés antimitotiques dont nous avions auparavant étudié les effets sur la croissance et les

synthèses d'ADN dans des cultures *in vitro* de fibroblastes de poulet.<sup>4-7</sup> Les résultats actuels indiquent essentiellement que ces deux antimitotiques empêchent la plupart des cellules de se diviser et provoquent un important accroissement du poids sec des nucléoles, de la teneur en protéines nucléaires et éventuellement de la teneur en ADN. Le résumé de ces observations a été publié dans deux notes préliminaires.<sup>8, 9</sup>

#### MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Des fibroblastes de cœur d'embryons de rat ont été prélevés puis directement mis en culture *in vitro* selon une modification personnelle de la technique sur double lamelle et lame de Maximow. Des explants de petite taille sont placés sur lamelle dans un milieu liquide contenant du TC Medium NCTC 109 Difco, du sérum de veau et du liquide de Tyrode-glycosol. Tous les deux ou trois jours, les cultures sont aérées et le milieu nutritif remplacé sans repiquage des explants. Dans ces conditions, la multiplication cellulaire est très active et les cellules s'étalent fortement sur le verre. La Mitomycine C ou le Melphalan ont été ajoutés dès l'explantation au milieu de culture, aux concentrations finales respectives de 0,4 mg/l. et de 100 mg/l, concentrations n'empêchant pas une certaine croissance mais provoquant de nettes lésions cytologiques. Après 4 jours pour la Mitomycine C et 3 jours pour le Melphalan, les cultures ont été fixées par la technique de la congélation-substitution au méthanol absolu. Après cette fixation, la perte de matières sèches est relativement faible et l'aspect des cellules est très comparable à celui des cellules vivantes.

Des dosages interférentiels du poids sec nucléaire total—nucléoles non compris—ont été exécutés dans les cellules fixées, considérées individuellement, à l'aide du microscope à interférences de Smith-Baker et de son oculaire spécial 'half-shade'; pour chaque noyau, 3 à 5 mesures de retard optique ont été effectuées. Ensuite, les cellules ainsi étudiées ayant été repérées, la réaction de Feulgen classique a été réalisée; des dosages cytophotométriques d'acides désoxyribonucléiques (ADN) ont ensuite été effectués à l'aide du microdensitomètre intégrateur de Barr and Stroud, muni d'un système 'scanning' selon Deeley (4 à 5 mesures ont été réalisées pour chaque noyau étudié). La teneur en ADN des noyaux qui avaient été préalablement étudiés par microscopie à interférences a été ainsi déterminée. La teneur en protéines nucléaires totales a été calculée en admettant que celle-ci correspond au résultat de la soustraction: poids sec total du noyau moins la teneur en ADN correspondante<sup>10</sup> (et Richards et Davies, communication personnelle). Les résultats des dosages cytophotométriques ont donc dû être préalablement transformés en valeurs absolues; la valeur diploïde moyenne pour le rat, trouvée par méthode biochimique et utilisée ici, est de  $5,7 \times 10^{-12}$  g.<sup>11</sup> Enfin, le poids sec total du matériel correspondant à l'aire de projection des nucléoles a été déterminé aussi par microscopie à interférences et par la même technique que celle utilisée pour calculer le poids sec total du noyau; lorsque le noyau contenait plusieurs nucléoles, ce qui est fréquent dans notre matériel, les poids secs des différents nucléoles ont été additionnés donnant ainsi, pour le matériel nucléolaire, une valeur totale par noyau.

Soulignons que tous nos dosages ont été réalisés dans des cellules rencontrées au hasard; dans le cas où, au contraire, certaines cellules ont été préalablement choisies, nous l'avons indiqué dans le texte. Soulignons aussi que nous considérons tout accroissement de la teneur en protéines du noyau comme le résultat de synthèses

mais sans préjuger du lieu où elles se produisent (noyau et (ou) cytoplasme). En d'autres termes, nous ne faisons pas la distinction entre synthèses et accumulation.

## RÉSULTATS

### *4. Effets de la Mitomycine C*

La Mitomycine C, substance à propriétés antibiotiques et antitumorales<sup>12-15</sup> inhibe l'activité mitotique, perturbe la division cellulaire<sup>4, 5, 16</sup> et altère le noyau en interphase<sup>4, 5, 17</sup>. Dans un travail précédent<sup>4, 5</sup>, nous avons aussi montré que dans des fibroblastes de poulet traités par cet agent antimitotique, les synthèses d'ADN sont ralenties et que beaucoup de ces cellules restent bloquées en préprophase. Etant donné l'utilisation de la Mitomycine C en clinique humaine, nous l'avons fait agir, dans le présent travail, sur des cellules de Mammifère. Il est à remarquer que les concentrations de Mitomycine C actives *in vitro* sont pratiquement les mêmes pour les fibroblastes de rat que pour les fibroblastes de poulet. Cette observation est valable aussi pour d'autres substances antimitotiques telles que le Myleran, le Melphalan ou le sulfate de Béryllium.

Dans les cultures témoins (partie supérieure de la Fig. 1 ci-contre), la plupart des cellules sont en début d'interphase, c'est-à-dire contiennent des quantités de protéines nucléaires et d'ADN correspondant aux valeurs 'post-télophasiques' ou encore sont 'diploïdes' du point de vue de ces macromolécules. Les cellules en train de réaliser des synthèses prémitotiques sont rares; quelques-unes ont doublé leurs teneurs en ADN et en protéines nucléaires: elles sont arrivées en préprophase.<sup>18</sup> On notera que la dispersion des points autour de la valeur diploïde moyenne est moins grande dans le cas des teneurs en ADN que dans celui des protéines; ceci est dû en partie au fait que les dosages cytophotométriques sont plus précis (erreur de 2 à 5 pour cent environ) que les dosages interférentiels (erreur de 5 à 10 pour cent environ). La variation biologique pourrait aussi être plus importante dans le cas des protéines nucléaires que dans celui des ADN. Dans ces cultures témoins, l'activité mitotique est faible (index mitotique 3 pour mille) car elles ont été fixées deux jours après le renouvellement de leur milieu nutritif, c'est-à-dire en fin de croissance. Nous y avons observé en outre, une cellule quasi octoploïde quant aux ADN mais apparemment encore tétraploïde du point de vue des protéines nucléaires (voir le point situé à l'extrême droite du diagramme témoin dans le Fig. 1). On ne peut affirmer que ce fibroblaste exceptionnel se divisera mais il est le siège de synthèses d'ADN dont la quantité dépasse nettement la valeur préphasique.

Dans les cultures traitées, la zone de croissance est moins large que chez les témoins mais on y observe cependant des mitoses. L'index mitotique y est de 6 pour mille; cette apparente augmentation de la fréquence des divisions par rapport aux témoins est due au blocage de la mitose en métaphase comme nous l'avons aussi montré antérieurement pour des cellules de poulet<sup>4, 5</sup>. Fréquemment, de petits noyaux accessoires se forment en post-télophase, à partir de chromosomes aberrants. Parmi les cellules en interphase, beaucoup peuvent être qualifiées de géantes ainsi que leur noyau. Souvent aussi, le noyau 'bourgeonne' et émet des micronoyaux dans le cytoplasme; ce phénomène peut se produire à tous les stades de l'interphase. D'autres fibroblastes sont en pycnose et des débris nucléaires positifs après la réaction de Feulgen s'observent dans le cytoplasme des macrophages; il s'agit de matériel phagocyté. Ces modifications morphologiques des cellules traitées s'accompagnent de

sévères perturbations dans les synthèses des protéines nucléaires et des ADN, ainsi que l'indique le diagramme inférieur de la Fig. 1 ci-contre. En effet, la plupart des cellules traitées ont une teneur élevée en protéines nucléaires et en ADN; peu nombreuses sont celles qui sont diploïdes à la fois quant aux protéines et aux ADN. Une de ces cellules diploïdes ne contient que 4 picogrammes d'ADN; le reste de la quantité diploïde

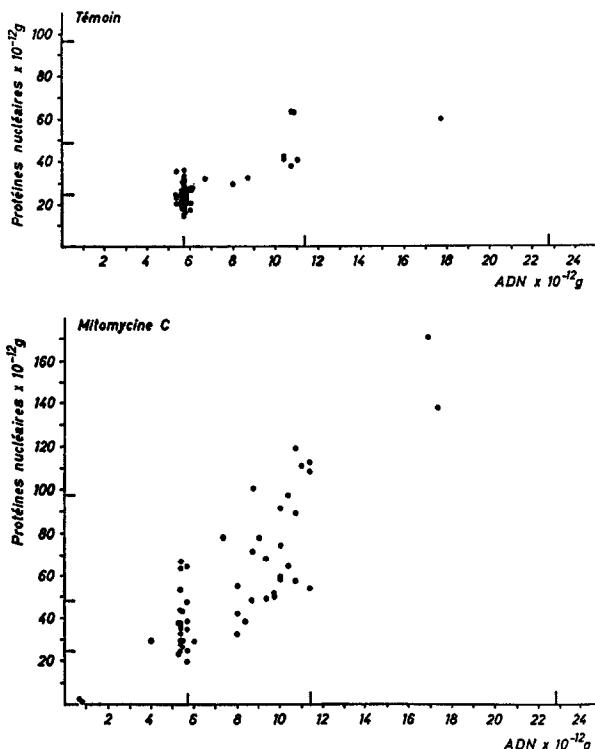


FIG. 1. Relation entre les teneurs en protéines totales et en acides désoxyribonucléiques dans le noyau de fibroblastes de rat traités par la Mitomycine C et dans les témoins correspondants.

Chacun des points correspond à un noyau dont les teneurs en protéines totales et en ADN ont été déterminées respectivement par microscopie interférentielle et cytophotométrie après réaction de Feulgen, dans des cellules considérées individuellement. En abscisses, teneurs en ADN exprimées en valeurs absolues ( $10^{-12}$  g); en ordonnées, teneurs en protéines nucléaires totales exprimées en  $10^{-12}$  g. Les petits traits perpendiculaires aux axes des abscisses ou des ordonnées indiquent les valeurs moyennes pour les noyaux diploïdes, tétraploïdes ou octoploïdes en ce qui concerne respectivement les ADN et les protéines nucléaires totales. Ces cultures ont été fixées 4 jours après l'explantation; les cellules ont été traitées par de la Mitomycine C à la concentration finale de 0,4 mg/1., dès la mise en culture. 51 noyaux de cellules témoins et 49 noyaux de cellules traitées par Mitomycine C ont été étudiés. Il existe des différences hautement significatives entre ces cultures, tant au point de vue des protéines ( $\chi^2 = 35,35$ ;  $P < 0,001$ ) que des ADN ( $\chi^2 = 12,41$ ;  $P < 0,001$ ).

d'ADN se trouve dans un petit noyau accessoire situé dans le même cytoplasme; les deux points situés près de l'origine des axes des ordonnées et des abscisses correspondent à de tels micronoyaux à teneur basse en ADN et en protéines. Dans quelques cellules, la teneur en protéines du noyau a doublé alors que ces noyaux sont restés diploïdes quant aux ADN; cette forte dissociation dans le temps entre ces synthèses

pourrait s'expliquer ici par un certain degré d'inhibition s'exerçant sur les synthèses d'ADN mais non sur les synthèses de protéines nucléaires. Une dissociation de même nature peut s'observer aussi dans des cultures non traitées et en croissance active, comme nous l'avions montré antérieurement;<sup>18</sup> ici, dans les cultures témoins, enfin de croissance, une telle dissociation n'apparaît pas. Nous pensons que ce phénomène est fortement accentué dans les cultures traitées par la Mitomycine C en raison de l'inhibition sélective des synthèses d'ADN que peut provoquer cet antimitotique ainsi que d'autres auteurs l'ont signalé pour d'autres matériels: Shiba *et al.*<sup>20</sup> et Sekiguchi et Takagi<sup>21</sup> pour *Escherichia coli* et Kuroda et Furuyama<sup>22</sup> pour les cellules HeLa. Dans les cultures traitées, les synthèses d'ADN ne sont cependant pas inhibées complètement car les fibroblastes peuvent devenir tétraploïdes quant aux ADN. Certaines de ces cellules à 4 ADN sont de teneur prémitotique en ce qui concerne les protéines nucléaires et quelques-unes peuvent entrer en mitose. D'autres fibroblastes sont aussi tétraploïdes quant aux ADN (4 ADN), ou presque, mais leur teneur en protéines nucléaires a nettement dépassé le niveau prémitotique; ils sont devenus octoploïdes du point de vue des protéines nucléaires (8 p) et leur taille s'est accrue fortement. On peut constater ici de nouveau que des synthèses (ou une accumulation) de protéines nucléaires peuvent avoir lieu en avance sur les synthèses d'ADN. Il est vraisemblable que certains noyaux arrivent au stade 8 p/4 ADN sans avoir atteint la préprophase (4 p/4 ADN), les synthèses de protéines devançant celles des ADN ralenties par la Mitomycine C; dans ce cas, la mitose n'a pu se déclencher. De rares cellules octoploïdes quant aux protéines et aux ADN peuvent aussi se rencontrer, mais il en existe parfois aussi l'une ou l'autre chez les témoins. Il est probable que, les synthèses d'ADN étant inhibées dans une certaine mesure, la plupart des noyaux octoploïdes quant aux protéines restent à ce stade, ne deviennent pas des octoploïdes vrais à 8 ADN mais dégénèrent progressivement. Remarquons aussi que les noyaux ne deviennent pas octoploïdes quant aux protéines alors que la teneur en ADN est encore diploïde. Le même comportement du noyau s'observe aussi lors de l'action du Myleran sur le même type de cellules.<sup>2, 3</sup>

Nous avons montré antérieurement que le poids sec total des nucléoles par noyau double au cours de la préparation normale à la mitose (préparation nucléolaire à la mitose,<sup>23</sup>) ; il passe ainsi, chez le fibroblaste de rat, de 5 à 10 picogrammes environ. De plus, dans les noyaux octoploïdes quant aux protéines, le poids sec nucléolaire total par noyau est voisin de 20 picogrammes, (<sup>3</sup> et Fig. 2 ci-contre); inversement, dans les noyaux accessoires ou micronoyaux, le poids sec des nucléoles est réduit et quasi proportionnel à la teneur en protéines de ces micronoyaux. L'accroissement du poids sec total des nucléoles paraît donc se réaliser approximativement en même temps que les synthèses de protéines dans le reste du noyau; entre ces deux variables nucléaires, on observe une corrélation positive, statistiquement significative.\*

Dans les cellules traitées par la Mitomycine C, le comportement des nucléoles paraît normal ainsi que l'indique la Fig. 3 ci-après: en effet, le poids sec des nucléoles est pratiquement le même que chez les fibroblastes non traités (5 picogrammes environ en début d'interphase) puis il tend à doubler puis à quadrupler respectivement dans les noyaux tétraploïdes ou octoploïdes quant aux protéines. Dans les micronoyaux, le poids sec des nucléoles est fortement réduit; parfois même, aucune trace de matériel nucléolaire n'y est visible.

\* Cette analyse mathématique a été réalisée en collaboration avec G. Lennes.

Dans nos conditions d'expérience, malgré la présence de Mitomycine C dans le milieu de culture, les synthèses prémitotiques de protéines nucléaires et de matériel nucléolaire se réalisent donc, bien que les synthèses d'ADN paraissent subir une certaine inhibition. Dans la plupart des cellules, toutefois, l'entrée en mitose est inhibée. Dans ces fibroblastes traités, la teneur en protéines totales du noyau et le poids

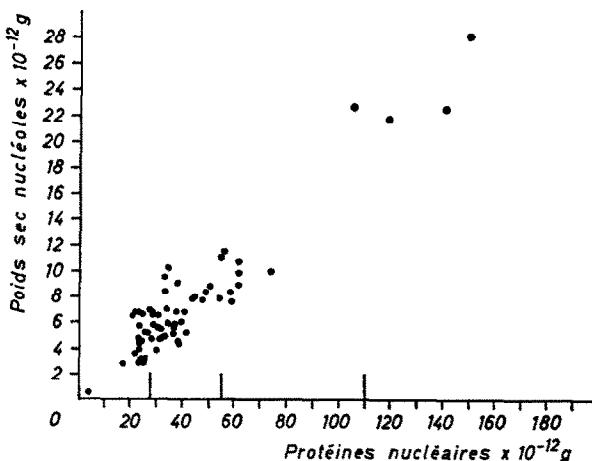


FIG. 2. Relation entre la teneur en protéines totales et le poids sec total du matériel nucléolaire dans le noyau de fibroblastes de rat normaux.

Chacun des points correspond à un noyau dont la teneur en protéines totales (nucléoles non compris) et le poids sec total des nucléoles ont été déterminés par microscopie interférentielle. Lorsque le noyau contenait plusieurs nucléoles, c'est la somme des poids secs de chacun d'eux qui est donnée ici. En abscisses, la teneur en protéines totales du noyau; en ordonnées, le poids sec total des nucléoles; les petits traits perpendiculaires à l'axe des abscisses indiquent les valeurs moyennes pour chacune des 3 classes de noyaux: diploïdes, tétraploïdes ou encore octoploïdes en ce qui concerne les protéines totales. A 63 valeurs correspondant à des cellules rencontrées au hasard, 3 valeurs octoploïdes du point de vue des protéines nucléaires ont été ajoutées; elles ont été choisies dans différentes cultures de fibroblastes de rat normaux afin d'étudier les relations entre le quantité de matériel nucléolaire et la teneur en protéines nucléaires totales dans de tels noyaux géants. Dans ce diagramme, le nombre de points situés en haut et à droite ne représente donc pas la fréquence avec laquelle se rencontrent ces noyaux de grande taille dans les cultures témoins. La valeur située près de l'origine des axes des abscisses et des ordonnées a été observée dans un petit noyau accessoire ou micronoyau. L'analyse statistique a montré l'existence d'une corrélation positive et significative au seuil de  $P < 0,001$  entre ces deux variables nucléaires ( $r = 0,933$ ).

sec total des nucléoles continuent de s'accroître fortement alors que, le plus souvent, la teneur en ADN ne dépasse pas le niveau prémitotique. Ces cellules augmentent considérablement de taille mais sont vouées à la dégénérescence.

#### B. Effets du Melphalan

Le Melphalan (*p*-di-(2 chloroéthyl)amino-L-phénylalanine)<sup>25</sup> est une substance douée de propriétés antitumorales et alkylantes. Nous avons montré récemment<sup>6, 7</sup> qu'il provoque dans des cultures de fibroblastes de poulet, une inhibition de la croissance et de l'activité mitotique, des anomalies de la division et le blocage de nombreuses cellules en préprophase.

Dans le présent travail, effectué, rappelons-le, sur des fibroblastes de rat, l'effet inhibiteur sur la croissance s'est manifesté nettement car l'index mitotique n'est que de 1 pour mille après un contact de 72 h avec le produit, à la concentration finale de 100 mg/l.; cet index est de 19 pour mille dans les cultures témoins, fixées en pleine

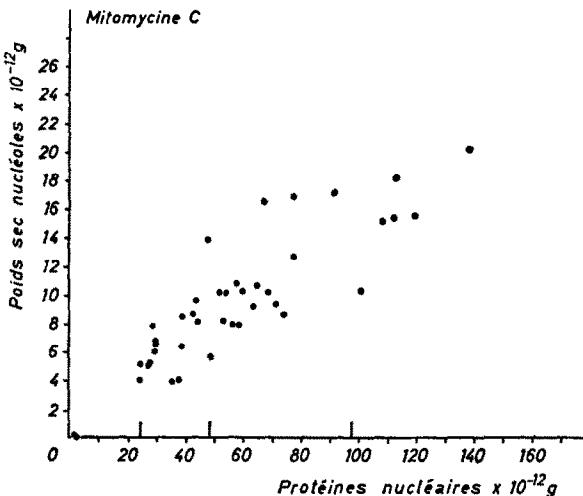


FIG. 3. Relation entre la teneur en protéines totales (nucléoles non compris) et le poids sec total du matériel nucléolaire dans le noyau de fibroblastes de rat traités par la Mitomycine C.

Ce diagramme a été construit de la même manière que celui de la Fig. 2. Il est à noter toutefois qu'ici, les 42 valeurs ont toutes été rencontrées au hasard. Les deux valeurs situées à gauche, contre l'axe des abscisses, ont été observées dans deux petits noyaux accessoires. Les cellules ont été traitées dès l'explantation par de la Mitomycine C à la concentration finale de 0,4 mg/l., pendant 4 jours.

La corrélation entre les deux variables est significative ( $r = 0,876$ ;  $P < 0,001$ ).

croissance. De très nombreuses cellules traitées contiennent plusieurs petits noyaux accessoires, dans d'autres, le noyau est en pycnose. Les macrophages phagocytent les cristaux de Melphalan qui ne se sont pas dissous.

Comme l'indique la Fig. 4 ci-contre, dans les cultures témoins, les cellules en début d'interphase, c'est-à-dire à teneur en protéines nucléaires voisine de 25 picogrammes et à teneur en ADN diploïde (5,7 picogrammes) sont relativement nombreuses. D'autres cellules sont en train de réaliser leurs synthèses prémitotiques; on remarquera que de telles cellules sont plus nombreuses ici que dans les cultures témoins de l'expérience 'Mitomycine C'. Ces dernières étaient en effet en fin de croissance contrairement à celles de l'expérience 'Melphalan', fixées en période de croissance active. Certaines cellules enfin, (Fig. 4) sont arrivées en préprophase où teneurs en protéines et en ADN ont doublé toutes deux. Dans les cultures traitées, il n'existe que de rares cellules en début d'interphase. La plupart des fibroblastes sont tétraploïdes quant aux ADN, ou presque, et plusieurs sont en préprophase (4 p/4 ADN); cependant, on constate une forte diminution du nombre des mitoses dans ces cultures. Dans beaucoup de noyaux, la quantité de protéines nucléaires totales a fortement augmenté et est même parfois devenue octoploïde (100 picogrammes environ), bien que la quantité d'ADN ne dépasse pas le niveau prémitotique (4 ADN). Quelques-unes de ces cellules géantes deviennent ensuite des octoploïdes vraies, c'est-à-dire à teneurs en protéines et en ADN

octoploïdes; rarement, le noyau semble même pouvoir atteindre le niveau 16-ploïde (voir le point situé dans le coin supérieur droit du diagramme inférieur de la Fig. 4). Ces noyaux à teneur prémitotique ou devenant polyploïdes subissent très souvent le phénomène du bourgeonnement à la suite duquel de petits noyaux accessoires

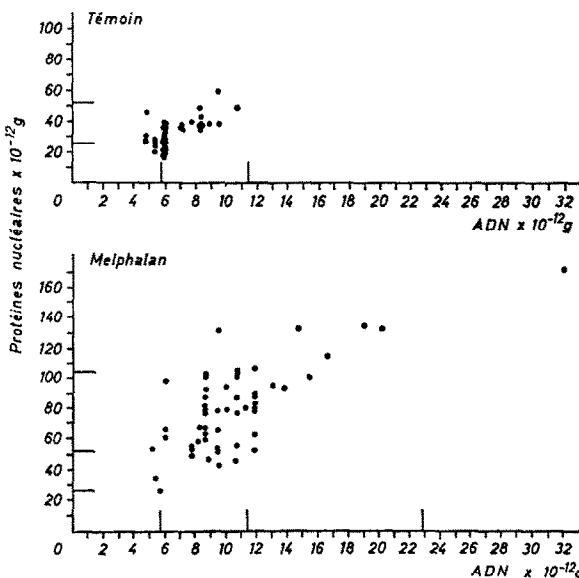


FIG. 4. Relation entre les teneurs en protéines totales et en acides désoxyribonucléiques dans le noyau de fibroblastes de rat traités par le Melphalan et dans les témoins correspondants.

Ce diagramme a été établi de la même façon que celui de la Fig. 1; ici 47 noyaux de cellules témoins et 53 noyaux de cellules traitées par le Melphalan ont été étudiés. Il existe des différences hautement significatives en ce qui concerne les protéines ( $\chi^2 = 42,40$ ;  $P < 0,001$ ) et les ADN ( $\chi^2 = 40,22$ ;  $P < 0,001$ ), lorsque l'on compare les cultures traitées aux témoins.

sont libérés dans le cytoplasme, comme c'est aussi le cas avec la Mitomycine C. Nous pensons qu'il s'agit d'une dégénérescence cellulaire progressive au cours de laquelle la teneur en ADN de la cellule paraît diminuer. Un fibroblaste fixé au cours de ce processus dégénératif est représenté dans le diagramme de la Fig. 4: il est octoploïde quant aux protéines nucléaires mais seulement diploïde quant aux ADN. Notons que dans ces cultures, certaines des cellules contenant plusieurs noyaux accessoires peuvent aussi résulter de mitoses anormales avec chromosomes aberrants.<sup>6, 7</sup>

Au cours de l'important accroissement de la teneur en protéines totales du noyau provoqué par le Melphalan, le poids sec total des nucléoles par noyau augmente lui aussi nettement. Comme l'indique la Fig. 5 ci-contre, les noyaux octoploïdes quant aux protéines (100 picogrammes environ) contiennent en moyenne 4 fois plus de matière sèche nucléolaire (20 picogrammes environ) que les noyaux diploïdes en ce qui concerne les protéines (5 picogrammes, voir ci-dessus). Ajoutons que dans ces noyaux géants, la taille des nucléoles s'est aussi fortement accrue. La relation qui, selon nous, lie les synthèses de protéines nucléaires et les synthèses nucléolaires apparaît particulièrement bien dans ces cellules traitées par le Melphalan.

Malgré la présence de Melphalan dans le milieu de culture, les synthèses d'ADN, de protéines nucléaires et de matériel nucléolaire se poursuivent, amenant certaines cellules en préprophase; cependant, peu de fibroblastes entrent en mitose. Au cours du traitement, les teneurs en protéines nucléaires et le poids sec nucléolaire s'accroissent fortement bien que la teneur en ADN ne dépasse pas le niveau prémitotique; dans la

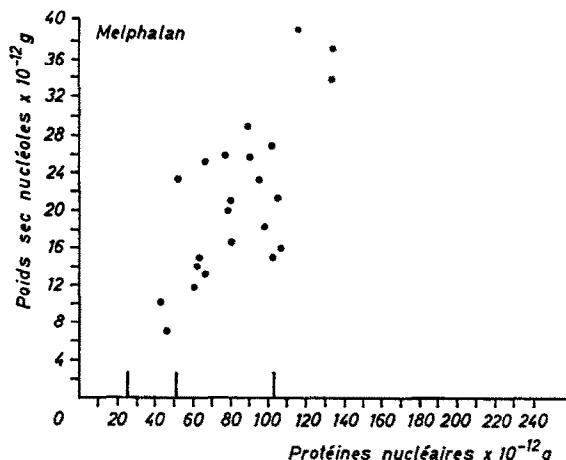


FIG. 5. Relation entre la teneur en protéines totales (nucléoles non compris) et le poids sec total du matériel nucléolaire dans le noyau de fibroblastes de rat traités par le Melphalan.

Les mêmes remarques que pour le Fig 2 sont à faire concernant la construction de ce diagramme. Soulignons toutefois que les 23 valeurs présentées ici correspondent à des cellules rencontrées au hasard. La corrélation entre les deux variables est significative ( $r = 0,717$ ;  $P < 0,001$ ).

suite, certains noyaux deviennent octoploïdes et parfois même 16-ploïdes à la fois quant aux ADN et aux protéines. Cette 'polyploidisation' du noyau associée à du gigantisme cellulaire paraît donc se produire, d'une manière générale, en présence des substances antimitotiques capables d'inhiber l'entrée en mitose; nous l'avons en effet observée aussi dans le cas de la Mitomycine C (voir ci-dessus) et du Myleran.<sup>2, 3</sup>

#### DISCUSSION

Les deux substances à propriétés antimitotiques étudiées dans le présent travail, la Mitomycine C et le Melphalan, provoquent toutes deux une forte diminution de l'activité mitotique dans des cultures *in vitro* de fibroblastes de rat. Cet effet est dû non pas à une inhibition des synthèses de protéines nucléaires et d'ADN mais à un blocage de l'entrée en mitose. Les noyaux réalisent des synthèses prémitotiques de protéines et d'ADN et deviennent tétraploïdes à ce point de vue (4 p/4 ADN); bien que le rapport protéines/ADN y soit alors normal et compatible avec l'entrée en mitose,<sup>25</sup> la plupart de ces cellules sont cependant incapables de se diviser. Il existe donc dans ces fibroblastes traités, une perturbation dans les mécanismes complexes et encore mal connus qui font passer la cellule de la préprophase à la mitose. Il semble, d'après nos résultats, que cette altération soit d'ordre qualitatif et non quantitatif. Sous l'effet du traitement, la teneur en protéines du noyau continue de s'accroître jusqu'à atteindre un niveau double de la valeur prémitotique alors que la teneur en ADN ne dépasse pas ce niveau (8p/4ADN); ils deviennent ainsi géants mais incapables de donner lieu à une mitose octoploïde. Soulignons que nos techniques ne nous

permettent pas de dire si les protéines dont la quantité augmente ainsi dans le noyau sont synthétisées dans ce dernier ou proviennent du cytoplasme ou encore prennent leur origine dans les deux à la fois. Une telle dissociation dans le déroulement des synthèses nucléaires de protéines et d'ADN existe également dans des fibroblastes de même nature mais traités par du Myleran.<sup>2,3</sup> Un phénomène semblable a aussi été décrit par Killander *et al.*<sup>1</sup> pour des cellules d'Ehrlich ayant subi un traitement par rayons X: les cellules ayant synthétisé des ADN jusqu'au niveau prémitotique ne peuvent cependant entrer en mitose mais continuent d'accumuler des protéines dans leur noyau. L'ypérite (moutarde) à l'azote,<sup>26-28</sup> provoque aussi une forte inhibition de l'activité mitotique et du gigantisme cellulaire dans des cultures de fibroblastes de Mammifère: il y a blocage au stade prémitotique en ce qui concerne les synthèses d'ADN mais la teneur en protéines *cellulaires* totales et en acides ribonucléiques s'accroît et dépasse largement le niveau prémitotique. La cellule, bien que incapable de se diviser, est donc le siège d'actives synthèses.

Dans nos conditions expérimentales et plus spécialement dans le cas du Melphalan, certaines cellules deviennent, à la longue, octoploïdes vraies, c'est-à-dire à la fois quant aux ADN et aux protéines nucléaires. Toutefois, ces cellules géantes ne donnent généralement pas lieu à des mitoses octoploïdes bien que le rapport protéines/ADN dans le noyau (8p/8ADN) soit compatible avec une telle éventualité. Ces fibroblastes paraissent donc de nouveau bloqués en préprophase et certains d'entre eux, rares il est vrai, continuent de synthétiser des protéines nucléaires et des ADN et peuvent devenir ainsi 16-ploïdes. Cette 'polyploidisation' du noyau se produit sous l'effet du Melphalan mais ne s'observe que dans une beaucoup plus faible mesure dans les cultures traitées par la Mitomycine C. Dans ce dernier cas, la plupart des cellules restent au stade 8p/4ADN probablement parce que l'antimitotique inhibe ou ralentit fortement les synthèses d'ADN. Comme nous l'avons signalé plus haut, différents auteurs<sup>20-22</sup> ont en effet montré pour d'autres matériels, que la Mitomycine C exerce un effet inhibiteur spécifique sur les synthèses d'ADN.

Il faut souligner ici que pour des cellules étudiées, comme ici, après plusieurs jours de contact avec l'antimitotique, il est difficile de déterminer depuis combien de temps a lieu un éventuel blocage en préprophase ou par exemple, une inhibition sélective des synthèses d'ADN. Les raisons en sont les suivantes: d'une part, les effets de la substance cytotoxique s'accentuent avec la durée de contact et d'autre part, alors que certaines cellules parviennent à se diviser, beaucoup d'autres disparaissent au fur et à mesure, par dégénérescence. Il est à noter que, habituellement, les noyaux ne deviennent pas octoploïdes quant aux protéines alors que leur teneur en ADN est encore diploïde et ils ne paraissent pas devenir 16-ploïdes quant aux protéines alors qu'ils sont encore tétraploïdes quant aux ADN. Le même phénomène s'observe pour la Mitomycine C mais, nous l'avons vu, jusqu'à un degré moindre de 'polyploidisation'. Il est vraisemblable que la teneur en ARN du noyau de ces cellules géantes augmente elle aussi mais nos techniques ne nous permettent pas de préciser dans quelle mesure. Nous avons récemment tiré des conclusions identiques d'une étude concernant les effets du Myleran sur le même type de cellules.<sup>2,3</sup> Il est à remarquer ici que le Myleran et le Melphalan font partie du groupe des agents alkylants et que l'on tend actuellement à expliquer les effets biologiques de la Mitomycine C en lui attribuant des propriétés analogues.<sup>29-31</sup> Un mécanisme d'action commun ou du moins semblable peut donc caractériser ces trois substances cytotoxiques.

D'après nos observations, dans les cellules traitées par le Melphalan ou la Mitomycine C, les synthèses d'ADN qui se déroulent au cours de la 'polyploïdisation' du noyau, se déclenchent *après* les synthèses de protéines nucléaires; en d'autres termes, le noyau devient souvent d'abord octoploïde quant aux protéines avant de devenir octoploïde quant aux ADN; le contraire paraît très rare. Nous ne pouvons dire si ce phénomène se produit ainsi au cours de toute polyploïdisation cellulaire ou si au contraire il est lié ici, par exemple à l'alkylation des ADN.

En ce qui concerne les synthèses de protéines nucléaires et d'ADN au cours de la préparation à la mitose dans des cellules normales, nous avons étudié nos résultats portant sur un grand nombre de cultures, par différentes méthodes. En posant comme hypothèse<sup>19</sup> que les synthèses de protéines nucléaires seraient continues lors de la préparation à la mitose, nous avons calculé que la durée des synthèses d'ADN serait d'environ 5 h dans ce matériel, ce qui est généralement admis. Rappelons que les synthèses de protéines *cellulaires* totales et d'acides ribonucléiques<sup>27, 32</sup> seraient elles aussi continues, contrairement aux synthèses d'ADN qui sont précédées, on le sait, par une période de 'repos' (G1). Rappelons d'autre part, qu'une association étroite entre les synthèses d'ADN et les synthèses de matériel nucléaire absorbant les rayons ultraviolets (ADN+ARN) a été aussi signalée.<sup>33</sup> Une analyse mathématique plus récente de nos résultats relatifs à des cultures de fibroblastes de rat non traitées (observations non encore publiées) a montré que dans notre matériel, les synthèses de protéines nucléaires et d'ADN ne paraissent pas se dérouler nécessairement selon les mêmes courbes, au cours de la préparation à la mitose.\* Le calcul des courbes de synthèses moyennes selon Walker<sup>35</sup> a été aussi effectué bien que les conditions requises ne soient pas entièrement réalisées dans notre matériel (croissance logarithmique, notamment). Les courbes obtenues montrent, même si l'on tient compte de 20 ou 30 pour cent de cellules non participantes, que les synthèses de protéines nucléaires débutent avant celles des ADN et sont quasi continues au cours de l'interphase, contrairement aux synthèses d'ADN qui ne commencent qu'après un certain délai. Nous n'acceptons cependant pas ces courbes sans formuler certaines réserves car, étant moyennes, elles peuvent masquer le comportement éventuellement particulier de certaines cellules et d'autre part, surtout en ce qui concerne les protéines, la précision plus ou moins grande des mesures ainsi que l'existence de larges variations individuelles peut influencer l'allure de telles courbes. Toutefois, ces différentes méthodes d'analyse de nos résultats se heurtent à diverses difficultés. En effet, les modèles mathématiques utilisés exigent que les données expérimentales répondent à un certain nombre de conditions qui ne sont pas toujours remplies; de plus, les mesures biologiques elles-mêmes peuvent être influencées par plusieurs types d'erreurs, parmi lesquelles figurent notamment les limites de précision des mesures et des variations individuelles plus larges dans le cas des protéines que dans celui des ADN. C'est pourquoi nous ne pouvons, sur la base de nos résultats actuels, définir avec certitude et précision, le rythme exact de ces synthèses prémitotiques dans notre matériel. Nous admettons toutefois actuellement que les courbes de synthèses de protéines ou d'ADN n'y sont pas nécessairement identiques.

Dans le cas particulier des cellules traitées par la Mitomycine C, la dissociation

\* Cette analyse a été effectuée en appliquant le test de linéarité habituel (F de Snedecor) et le test de Wald-Bartlett.<sup>34</sup> Ce dernier tient compte du fait que les deux variables nucléaires sont sujettes à une erreur de mesure. Les résultats obtenus par chacune de ces méthodes concordent parfaitement.

entre les synthèses d'ADN et de protéines est très accentuée en raison, pensons-nous, de l'inhibition spécifique que peut exercer la Mitomycine C sur les synthèses d'ADN. Récemment,<sup>36</sup> nous avons étudié un autre exemple de dissociation entre synthèses de protéines nucléaires et d'ADN: lorsque des fibroblastes de rat sont cultivés en présence de sulfate de Béryllium, la teneur en protéines du noyau peut doubler et même souvent quadrupler en l'absence de toute synthèse d'ADN. Ces cellules à noyau géant et à teneur octoploïde en protéines restent diploïdes quant aux ADN.

Dans les cellules traitées par le Melphalan ou la Mitomycine C et dont les teneurs en protéines nucléaires et en ADN s'accroissent, nous avons constaté que le nombre et la taille des nucléoles augmentent. Le poids sec nucléolaire total par noyau s'élève lui aussi et quasi proportionnellement à la teneur en protéines du reste du noyau. Il est frappant de constater que le poids sec total des nucléoles est quasi doublé dans les noyaux tétraploïdes quant aux protéines et à peu près quadruplé dans les noyaux octoploïdes. Il semble donc exister une relation entre les synthèses des protéines nucléaires et les synthèses nucléolaires. Cette relation existe aussi dans la cellule normale où, nous l'avons montré antérieurement, le poids sec total des nucléoles double lors de la préparation à la mitose (préparation nucléolaire à la mitose<sup>23</sup>); notons de plus que dans les rares cellules octoploïdes que nous rencontrons parfois dans nos cultures normales de fibroblastes de Mammifères, le poids sec nucléolaire total par noyau est quatre fois plus élevé que celui correspondant aux cellules diploïdes, c'est-à-dire en début d'interphase. En ce qui concerne le comportement des nucléoles au cours de l'action d'autres agents antimitotiques, nous avons aussi constaté un accroissement du poids sec des nucléoles dans des fibroblastes de rat traités par du Myleran et dont le noyau subit une 'polyploidisation' comparable à celle que provoque le Melphalan;<sup>2, 3</sup> du point de vue des nucléoles, les effets de ces deux substances sont pratiquement les mêmes. Killander *et al.*<sup>37</sup> de leur côté, ont observé un accroissement d'environ 100 pour cent du volume des nucléoles dans des cellules d'Ehrlich irradiées et bloquées en préprophase. Caspersson *et al.*<sup>27</sup> ont montré que l'ypérite à l'azote bloque les fibroblastes de souris en préprophase et provoque, au niveau du système nucléolaire, une augmentation de la taille et de la teneur en protéines et en ARN.

Si nous voulons schématiser les résultats de nos observations concernant les effets *in vitro* de la Mitomycine C ou du Melphalan sur les fibroblastes du rat, nous retiendrons essentiellement que ces deux substances inhibent l'entrée en mitose et provoquent, jusqu'à un degré plus ou moins élevé, un accroissement de la teneur en ADN, en protéines nucléaires et en matériel nucléolaire dans ces cellules vouées à la dégénérescence et dont la taille augmente fortement.

En ce qui concerne le mode d'action de la Mitomycine C, différentes hypothèses ont été proposées; nous ne les reprendrons pas ici en détail. Nous retiendrons cependant que Schwartz et Sodergren<sup>29</sup> pensent que la Mitomycine C agit par alkylation. Iyer et Szybalski<sup>30</sup> suggèrent que l'action primaire de cette substance est le 'cross-linking' au niveau des molécules d'ADN. Une opinion analogue a été émise par Matsumoto et Lark.<sup>31</sup> Quant au Melphalan, il s'agit rappelons-le, d'un agent alkylant dont le groupe actif est porté par un acide aminé. Cet ensemble de données permet peut-être de mieux comprendre pourquoi les deux substances cytotoxiques étudiées dans le présent travail provoquent des altérations assez comparables au niveau des fibroblastes, tant au point de vue cytologique que cytochimique. Pour plusieurs auteurs, les agents alkylants exercent leur activité antitumorale par inhibition des

biosynthèses des protéines et en particulier des protéines nucléaires.<sup>38-40</sup> Dans nos conditions expérimentales, étant donné la longue durée de chacun de ces traitements, le fait que dans la plupart de ces cellules, la teneur en protéines ne dépasse pas le niveau octoploïde suggère que ces synthèses pourraient être ralenties comme celles des ADN, mais peut-être dans une moindre mesure. Cependant, nous devons tenir compte aussi de la disparition par dégénérescence de bon nombre de cellules polyploïdes. Mais dans notre matériel, comme de rares mitoses persistent, il n'est pas possible de fixer avec certitude le moment où, par exemple, aurait débuté un arrêt de synthèses ou un blocage au niveau prémitotique. Nous avons d'autre part rappelé plus haut les travaux de plusieurs auteurs<sup>26-28</sup> selon lesquels les synthèses de protéines continuent dans des cellules traitées par de l'ypérite à l'azote et bloquées de ce fait, en préprophase. On sait de plus qu'une certaine spécificité d'action caractérise les acides aminés portant un groupe alkylant, ceux-ci pouvant inhiber la croissance de cellules tumorales mais non de cellules normales.<sup>40</sup>

#### RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Les effets de deux substances à activité antimitotique, la Mitomycine C et le Melphalan, sur les synthèses de protéines nucléaires et de matériel nucléolaire d'une part et d'ADN d'autre part, dans des fibroblastes de rat cultivés *in vitro* ont été étudiés respectivement par micro-interférométrie et cytophotométrie après réaction de Feulgen. Grâce à ces deux techniques cytochimiques, la teneur en protéines totales, le poids sec des nucléoles et la teneur en ADN peuvent être déterminés successivement dans les mêmes noyaux considérés individuellement.

La Mitomycine C ainsi que le Melphalan inhibent la multiplication des cellules et provoquent d'importantes anomalies morphologiques au cours de l'interphase et de la mitose. Nous avons étudié ces dernières dans des travaux précédents. En ce qui concerne le comportement des ADN, des protéines nucléaires et des nucléoles dans des cellules cultivées en présence de l'un ou l'autre de ces agents cytoxiques, nos résultats indiquent que ceux-ci ont des effets assez semblables. En effet, malgré la présence de Mitomycine C ou de Melphalan dans le milieu de culture, les synthèses prémitotiques de protéines nucléaires, d'ADN et de matériel nucléolaire ont lieu; toutefois, une certaine inhibition des synthèses d'ADN paraît bien exister dans les fibroblastes traités par la Mitomycine C. La plupart des cellules traitées par la Mitomycine C ou le Melphalan ne réussissent pas à se diviser. Dans ces fibroblastes, la teneur en protéines totales du noyau et le poids sec total des nucléoles continuent de s'accroître et arrivent à un niveau double de celui de la préprophase alors que la teneur en ADN ne dépasse pas le niveau prémitotique. Vraisemblablement en raison de l'inhibition des synthèses d'ADN qu'exerce la Mitomycine C, la majorité des cellules traitées par cette substance restent à ce stade. Dans le cas du Melphalan, la teneur en ADN peut ensuite augmenter: les cellules deviennent alors octoploïdes et parfois même 16-ploïdes à la fois quant aux protéines nucléaires totales et aux ADN.

Sous l'effet de la Mitomycine C ou du Melphalan, la taille des fibroblastes augmente fortement et ceux-ci dégénèrent progressivement.

#### BIBLIOGRAPHIE

1. D. KILLANDER, C. RIBBING, N. R. RINGERTZ and B. M. RICHARDS, *Expl. Cell. Res.* **27**, 63 (1962).
2. R. BASSLEER, *C.r. Séanc. Soc. Biol.* **159**, 237 (1965).

3. R. BASSLEER, *Chemotherapia*, **10**, 103 (1965).
4. H. OLEDSZKA-SLOTWINSKA, R. BASSLEER and S. CHÈVREMONT-COMHAIRE, *C.r. Séanc. Soc. Biol.* **156**, 1714 (1962).
5. H. OLEDSZKA-SLOTWINSKA, R. BASSLEER and S. CHÈVREMONT-COMHAIRE, *Chemotherapia*, **8**, 210 (1964).
6. J. GUIMARD et R. BASSLEER, *C.r. Séanc. Soc. Biol.* **157**, 2337 (1963).
7. J. GUIMARD et R. BASSLEER, *Chemotherapia* **9**, 25 (1964).
8. R. BASSLEER, *C.r. Séanc. Soc. Biol.* **159**, 772 (1965).
9. R. BASSLEER, *C.r. Séanc. Soc. Biol.* **159**, 1242 (1965).
10. P. M. B. WALKER and B. M. RICHARDS, in *The Cell* (Eds. pr J. BRACHET and A. E. MIRSKY) Acad. Press, New York, vol. 1, p. 91 (1961).
11. C. VENDRELY, *Bull. biol. Fr. Belg.* **86**, 1 (1952).
12. H. KANAMORI, T. SHIMA, C. MORITA and T. HATA, *J. Antibiot.* **10**, 120, (1957).
13. K. SUGIWARA, *Cancer Res.* **19**, 438 (1959).
14. T. SHIMA, H. KANAMORI, T. HOSHI, C. MORITA and T. HATA, *Chemotherapy*, **4**, 304 (1956).
15. Y. SHIRABA, K. SAKAI and T. TERANAKA, *Antibiot. Ann.* p. 533 (1958-1959).
16. R. TRUHAUT et G. DEYSSON, *C.r. Séanc. Soc. Biol.* **154**, 718 (1960).
17. A. J. SHATKIN, E. REICH, R. M. FRANKLIN and E. L. TATUM, *Biochim. biophys. Acta* **55**, 277 (1962).
18. R. BASSLEER, *C.r. hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris* **259**, 2683 (1964).
19. R. BASSLEER et G. LENNES, *Path. Biol., Paris* **14**, 180 (1966).
20. S. SHIBA, A. TERAWAKI, T. TAGUCHI and J. KAWAMATA, *Nature, Lond.* **183**, 1056 (1959).
21. M. SEKIGUCHI and Y. TAKAGI, *Biochim. biophys. Acta* **41**, 434 (1960).
22. J. KURODA and J. FURUYAMA, *Cancer Res.* **23**, 682 (1963).
23. R. BASSLEER, *C.r. Séanc. Soc. Biol.* **158**, 2201 (1964).
24. F. BERGEL et J. A. STOCK, *J. chem. Soc.* **2**, 2409 (1954).
25. R. BASSLEER, *C.r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris* **260**, 1777 (1965).
26. H. B. BREWER, J. P. COMSTOK and L. ARONOW, *Biochem. Pharmac.* **8**, 281 (1961).
27. T. CASPERSSON, S. FARBER, G. E. FOLEY and D. KILLANDER, *Expl. Cell Res.* **32**, 529 (1963).
28. A. G. LEVIS and A. DE NADAI, *Expl. Cell Res.* **33**, 207 (1964).
29. H. E. SCHWARTZ and J. E. SODERGREN, *Science* **142**, 1181 (1963).
30. V. N. IYER and W. SZYBALSKI, *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* **50**, 355 (1963).
31. I. MATSUMOTO and K. G. LARK, *Expl. Cell Res.* **32**, 192 (1963).
32. D. KILLANDER and A. ZETTERBERG, *Expl. Cell. Res.* **38**, 272 (1965).
33. P. M. B. WALKER and H. B. YATES, *Proc. R. Soc. B.* **140**, 274 (1952).
34. M. S. BARTLETT, *Biometrics* **5**, 207 (1949).
35. P. M. B. WALKER, *J. exp. Biol.* **31**, 8 (1954).
36. R. BASSLEER, *C.r. Séanc. Soc. Biol.* **159**, 1620 (1965).
37. D. KILLANDER, B. M. RICHARDS and N. R. RINGERTZ, *Expl. Cell. Res.* **27**, 321 (1962).
38. H. BUSCH, D. C. FIRSZT, A. LIPSEY, E. KOHEN and S. AMER, *Biochem. Pharmac.* **7**, 123 (1961).
39. G. R. HONIG, J. R. DAVIS, and H. BUSCH, *Biochem. Pharmac.* **6**, 223 (1961).
40. W. L. NYHAN and E. L. HOEHN-SARIC, *Biochem. Pharmac.* **12**, 457 (1963).