

CONTRIBUTION CYTOCHIMIQUE ET HISTO AUTORADIOGRAPHIQUE À L'ÉTUDE DU MÉTABOLISME ET DE LA SYNTHÈSE DES ACIDES DÉSOXYRIBONUCLÉIQUES DANS DES CELLULES ANIMALES CULTIVÉES *IN VITRO*—I

ÉTUDES CYTOPHOTOMÉTRIQUE ET HISTO AUTORADIOGRAPHIQUE DES ADN DANS DES FIBROBLASTES TRAITÉS PAR LE MYLERAN

M. CHÈVREMONT, E. BAECKELAND et J. FREDERIC

Institut d'Histologie, Université de Liège, Liège, Belgique

Abstract—We have studied the behaviour of normal animal cells cultivated *in vitro* in the presence of Myleran for variable periods ranging from a few hours to 18 days. The cytological modifications produced by this substance have already been described previously. The present report deals essentially with the study of DNA which we have carried out by means of quantitative cytophotometry of individual cells after Feulgen reaction as well as by histoautoradiography after the incorporation of tritiated thymidine.

The Myleran profoundly modifies the metabolism of DNA. It provokes an increase of positive Feulgen material in the interkinetic nuclei. This effect becomes more and more marked with time: nuclei with tetraploid value are more frequent, octoploid and even hexadecaploid nuclei appear and become progressively more numerous. Nevertheless, it does not appear that the number of genomes increases, in spite of the possibility of eventual fragmentation,

The frequency of mitosis is very low. Under the influence of Myleran there is thus a dissociation between the frequency of tetraploid values of DNA and that of the mitoses. In cultures having been treated for a sufficient time, the cytophotometric estimations of mitotic figures (two wavelength method) show that a certain proportion of mitoses: prophases, metaphases, etc., reach octoploid DNA values, contrary to what happens in the controls. Fibroblasts having this peculiarity are thus capable of undergoing mitosis and to complete it.

The histoautoradiographies clearly show that tritiated thymidine is incorporated by the nuclei even if the mitotic activity has been reduced. The level of this incorporation is related to the increase of frequency of nuclei with high DNA content. The cells therefore remain able to synthesize DNA even after long action of Myleran.

A hypothesis is proposed to explain the observed facts. According to this, the cell after each mitosis, synthesizes a fresh quantity of deoxyribonucleic acids to compensate for those which have been affected by the Myleran. It will then undertake the preprophase synthesis in readiness for the subsequent mitosis by doubling the quantity of DNA then present in the nucleus. In this way the amount of DNA in the nuclei will increase in time.

In addition, under certain aspects, our experiments suggest that the synthesis of

DNA does not take place following classical concepts (i.e. from a "model", by duplication of existing material) but following a different process, from a "plan".

DÉCOUVERT par HADDOW et TIMMIS (1951, 1953), le Myleran ou 1:4-diméthylsulfonxybutane est un agent alkylant qui, on le sait, est considéré comme un poison de la mitose et est utilisé à ce titre en vue d'un traitement chimiothérapique de leucémies myéloïdes chroniques. Les propriétés biochimiques et physico-chimiques ainsi que le mode d'action des agents alkylants biologiquement actifs ont été discutés dans plusieurs revues (ROSS, 1953; ALEXANDER, 1954; 1958; BACQ et ALEXANDER, 1955; GALTON, 1956; BIESELE, 1958; etc.). Toutefois, le mécanisme biochimique de leur action biologique n'est pas connu avec certitude. De même, les effets du Myleran sur le métabolisme des acides désoxyribonucléiques (ADN) dans la cellule vivante ont été peu envisagés.

Dans une série de recherches récentes, nous avons étudié à la fois par les techniques cytologiques, cytochimiques et histoautoradiographiques, le comportement de cellules animales normales mises en présence de Myleran. Nous avons cultivé, en goutte pendante et suivant nos techniques habituelles, des fibroblastes et myoblastes, qui ont été soumis à l'action du Myleran pendant des temps variables (quelques heures à 18 jours). Cette substance a été utilisée selon plusieurs modalités et, le plus souvent, ajoutée au milieu de culture à des concentrations finales de 1×10^{-3} M à 1×10^{-4} M.

Nos observations cytologiques, portant sur des cellules d'embryons de poulet, de souris ou d'embryons humains, ont été exposées ailleurs (FREDERIC *et al.*, 1959; CHÈVREMONT *et al.*, 1959; dans ce dernier article, se trouve notamment une bibliographie détaillée); nous n'y reviendrons pas ici. Rappelons seulement que la croissance des cultures est peu affectée par le Myleran, même à forte dose, pendant les deux ou trois premiers jours, mais cette croissance et l'activité mitotique sont ensuite fortement inhibées, même avec des doses faibles lorsqu'on fait agir celles-ci pendant des temps longs. Nous avons observé également que c'est au moment de la mitose que la cellule apparaît atteinte par le Myleran; les lésions "se manifestent" à la prométaphase et à la métaphase, mais il est possible que la chromatine ait déjà été lésée antérieurement, pendant la synthèse préprophasique d'ADN et même dans l'intervalle suivant cette synthèse. D'importantes anomalies chromosomiques peuvent alors s'observer. Quand la cellule-fille retourne à l'état interphasique, elle peut présenter des lésions diverses; dans ces conditions, des anomalies s'observent chez des cellules intercinétiques.

MODIFICATIONS QUANTITATIVES DES ADN DANS LES CELLULES CONSIDÉRÉES INDIVIDUELLEMENT

Par les techniques cytophotométriques, nous avons mesuré quantitativement les ADN, tels qu'ils sont mis en évidence par la réaction cytochimique de Feulgen. Ces mesures ont porté sur des noyaux interphasiques et sur des figures mitotiques (fibroblastes d'embryons de poulet). Nos observations montrent que le métabolisme des ADN est profondément modifié sous l'effet du Myleran. Elles ont déjà été décrites ailleurs (BAECKELAND *et al.*, 1959; CHÈVREMONT *et al.*, 1959); mais nous en rappellerons ici les points essentiels.

Noyaux interphasiques

Nous avons dosé les ADN dans des cultures de trois types: n'ayant subi aucun repiquage, "entretenues" ou transplantées plusieurs fois.

Cultures n'ayant subi aucun repiquage (voir histogrammes I et II). Nous avons porté surtout notre attention sur des cultures âgées de 70 hr et mises en présence de Myleran à la concentration finale de 1×10^{-3} M depuis l'explantation. Dans ces conditions, la largeur de la zone d'émigration est inférieure d'un tiers à celle des témoins correspondants. L'index mitotique est pratiquement le même dans les deux cas; il est d'ailleurs bas. Les cultures témoins sont en fin de croissance et si on y trouve encore quelques mitoses (5‰), ce sont les dernières qui s'y produisent; il n'y a pratiquement plus de noyaux qui ont réalisé ou réalisent une synthèse d'ADN préparatoire à la mitose (synthèse préprophasique). Dans les cultures traitées, par contre, près du tiers des noyaux d'aspect intercinétique possèdent une valeur dite tétraploïde en ADN. Quant à la moyenne "diploïde", elle est sensiblement la même dans les cellules traitées ou non (respectivement 5,1 et 5,0 unités arbitraires).

Cultures "entretenues" (voir histogrammes III et IV). Quand les cultures ont été "entretenues", sans être repiquées, le pourcentage des valeurs "tétraploïdes" d'ADN devient nettement plus élevé dans les cultures traitées. Par exemple, après 7 jours en présence de Myleran $0,2 \times 10^{-3}$ M, il atteint 66% alors qu'il est de 16% dans les témoins correspondants; l'index mitotique est alors respectivement de 1 et de 5‰; la valeur diploïde moyenne n'est pas modifiée (5,0 et 4,9 unités arbitraires).

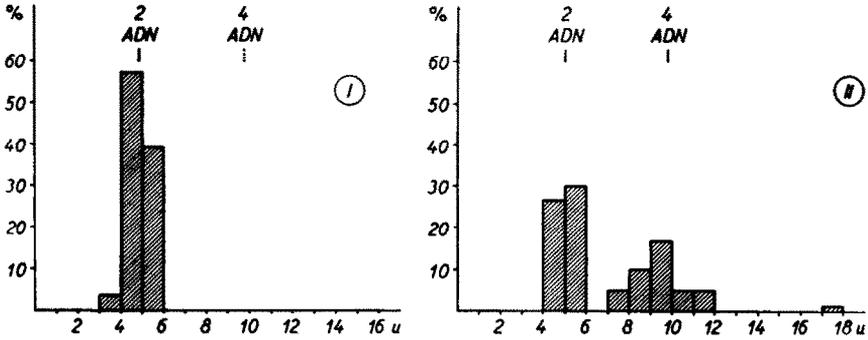
D'autres observations semblables démontrent que les effets de cet agent alkylant sont d'autant plus intenses que le temps d'action est plus long et la concentration plus élevée.

Cultures transplantées plusieurs fois (voir histogrammes V à VII). Des dosages cytophotométriques ont aussi été faits sur des cultures appartenant à des souches et âgées de 10 à 18 jours (concentrations de Myleran $0,2 \times 10^{-3}$ M et $0,1 \times 10^{-3}$ M). Dans l'ensemble, ces recherches montrent que de nombreux noyaux interphasiques de cellules traitées sont devenus nettement plus riches en ADN; en effet, les valeurs "tétraploïdes" deviennent beaucoup plus fréquentes (jusqu'à 60%) et on trouve en outre de nombreuses valeurs "octoploïdes" (par exemple 25-30%). Dans un cas, nous avons même observé des teneurs atteignant huit fois la valeur "diploïde" habituelle du noyau en repos intercinétique (valeur "hexadécaploïde"); cette valeur est tout à fait inhabituelle pour ce matériel cellulaire.

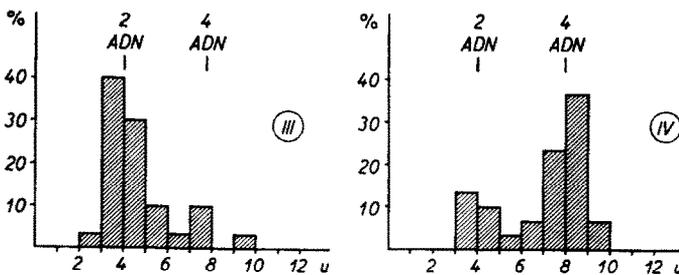
Fait à souligner, la plupart des teneurs en ADN se répartissent en groupes principaux, dont les valeurs moyennes sont approximativement comme 2, 4 et 8 ou même 16. Entre ces groupes, il y a peu de valeurs intermédiaires, ou même aucune. Ici encore, les effets sont d'autant plus marqués que les cellules sont soumises à l'action du Myleran depuis des temps plus longs.

Les résultats qui viennent d'être rappelés ont été obtenus sur des noyaux rencontrés au hasard dans les cultures (*loc. cit.*). Mais, sous l'influence du Myleran, des noyaux acquièrent une taille nettement supérieure à la normale et si on dose les ADN dans ces noyaux de grande taille, on constate qu'ils ont le plus souvent une teneur élevée: "octoploïde".

Dosages cytophotométriques d'ADN dans des noyaux
 En abscisses, les quantités d'ADN exprimées en unités arbitraires; en ordonnées



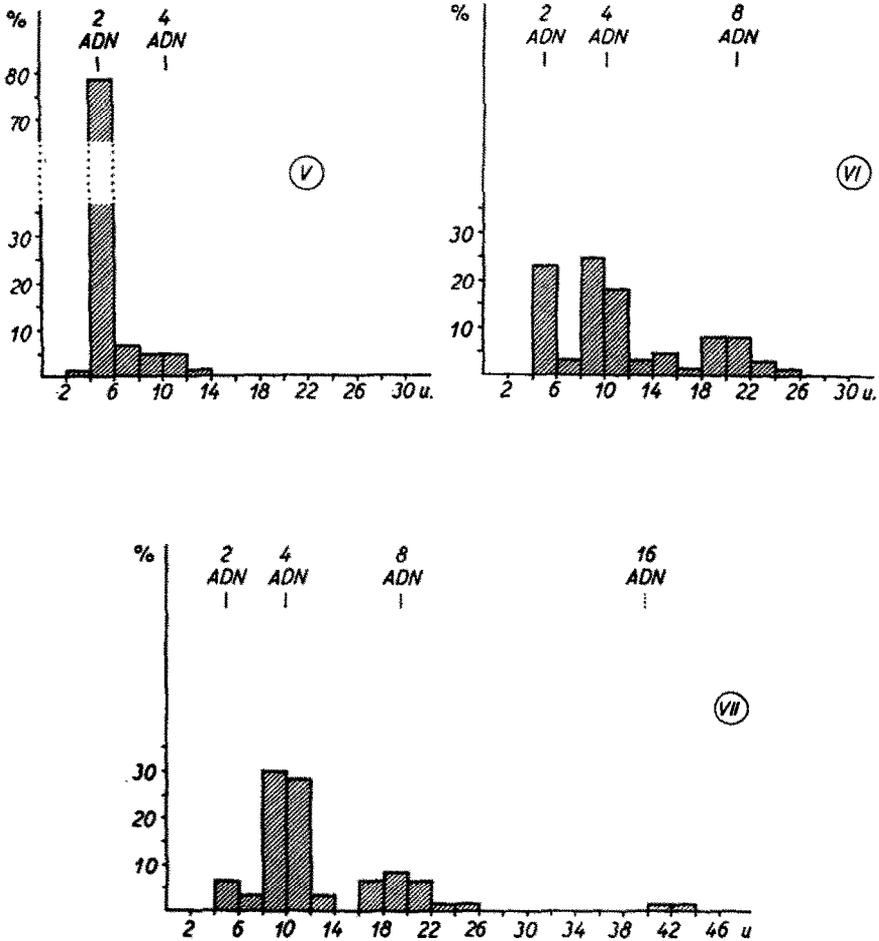
HISTOGRAMMES I et II. Effets du Myleran 1×10^{-3} M dans des cultures âgées de 70 heures et en présence de cette substance depuis le début. A droite (II), cultures traitées; à gauche (I), témoins correspondants.



HISTOGRAMMES III et IV. Effets du Myleran $0,2 \times 10^{-3}$ M agissant pendant 7 jours. Cultures "entretenues". A gauche, culture témoin; à droite, culture traitée depuis l'explantation.

interphasiques de fibroblastes traités par du Myleran.

équence (%) des différentes classes de valeurs (in *Bull. Acad. Méd. Belg.*, 1959).



HISTOGRAMMES V à VII. Effet du Myleran dans des souches de fibroblastes. En haut et à gauche (V), culture témoin qui a subi la réaction de Feulgen en même temps que les cultures utilisées pour les histogrammes VI et VII mais qui n'a subi aucun repiquage et est âgée de 47 hr seulement. En haut et à droite (VI), culture repiquée quatre fois en présence de Myleran $0,1 \times 10^{-8}$ M et âgée au total de 12 jours (fixée 2 jours après le dernier passage). En bas (VII), cultures transplantées quatre fois avec du Myleran $0,2 \times 10^{-8}$ M et âgées aussi de 12 jours (fixation 48 hr après le dernier passage).

D'un autre côté, nous avons procédé sur des figures mitotiques à des dosages cytophotométriques, par la méthode à deux longueurs d'onde. Nous avons ainsi constaté qu'une certaine proportion de mitoses dans des cultures traitées durant un temps suffisant, atteignent des valeurs "octoploïdes" en ADN, qu'il s'agisse de prophases, de métaphases, etc., contrairement à ce qui se passe chez les témoins. Des fibroblastes ayant cette particularité sont donc capables d'entrer en mitose et de l'achever. Vraisemblablement, il n'y a pas d'accroissement réel du nombre de génomes (chromosomes) dans ce cas, si on ne tient pas compte d'une fragmentation éventuelle (*loc. cit.*).

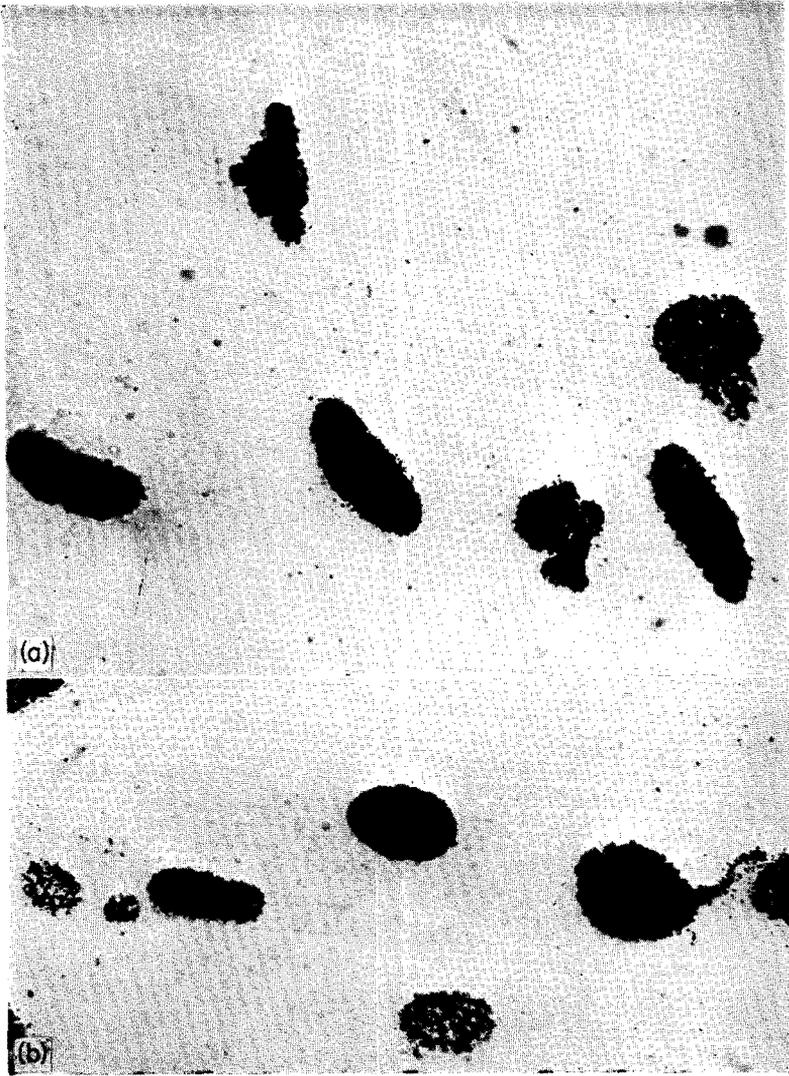
Nous venons donc de voir que le Myleran provoque d'importantes modifications quantitatives des ADN dans le noyau. Il nous a paru intéressant de vérifier en outre le pouvoir de synthétiser des ADN que possèdent encore les cellules après une action prolongée de cette substance.

ÉTUDE HISTO AUTORADIOGRAPHIQUE APRÈS INCORPORATION DE THYMIDINE TRITIÉE

C'est pourquoi deux d'entre nous ont étudié le métabolisme des ADN sous l'influence du Myleran chez le même matériel mais par les techniques histoautoradiographiques (CHÈVREMONT et BAECKELAND, 1959). Dans ce but, de la thymidine tritiée, précurseur quasi spécifique des ADN, a été ajoutée au milieu nutritif des cultures, à des *moments* différents et pendant des *durées* variables ($^3\text{H-TDN}$ de marque Schwarz, U.S.A.; concentration finale $0,8 \times 10^{-5}$ M; radioactivité de 0,028 mc/ml). Comme on le sait, la présence, en un endroit, de thymidine tritiée est révélée par l'existence de grains d'argent "développés" dans l'émulsion photographique en regard de cet endroit. L'incorporation de thymidine, elle-même, signifie que de nouveaux ADN ont été formés. Si des synthèses d'ADN se produisent à plusieurs reprises dans une cellule et sa descendance en présence de thymidine marquée, celle-ci peut s'accumuler dans le noyau (effet cumulatif). Si au contraire cet isotope radioactif n'a été présent que pendant une période courte (correspondant par exemple à la préparation complète à une première mitose et au déroulement de celle-ci) et si la descendance de cette cellule entre plusieurs fois en mitose, les noyaux de ces descendants seront beaucoup moins marqués, à la suite de la "dilution" des ADN marqués par de nouveaux ADN non radioactifs (voir aussi les notes au bas des pp. 72, 74 des comptes rendus de ce Colloque).

Voici, essentiellement, les résultats que nous a fournis l'histoautoradiographie, dans ces conditions. Pendant toute la durée de ces expériences, qui atternt parfois 13 jours, il y a du Myleran dans le milieu nutritif des cultures (à la concentration de $0,28 \times 10^{-3}$ M).

La *première série* d'expériences comporte des cultures qui sont en contact à la fois avec de la thymidine tritiée et du Myleran depuis l'explantation et pendant toute la durée de l'expérience. Tous les 2 ou 3 jours, c'est-à-dire avant chacune des transplantations successives, des cultures sont retirées du lot et préparées pour histoautoradiographie. Après les 48 premières heures (0 repiquage), les fibroblastes constituant la zone de croissance et d'émigration sont comparables dans les cultures



FIGS. 1a et 1b. Histoautoradiographies de cultures âgées de 5 jours, traitées par du Myleran en présence de thymidine tritiée depuis le début. Les noyaux sont nettement marqués; la disposition des grains d'argent traduit aussi, en les "silhouettant", les anomalies de forme de certains d'entre eux. *Background* faible, comme d'ailleurs dans les figures suivantes. Remarquer, dans la partie gauche de la Fig. 2, deux petits noyaux accessoires, à côté du noyau principal; ils se trouvent tous trois dans une même cellule, dont les contours ne sont pas distincts ici. A droite de la même figure, autre anomalie nucléaire. ($\times 700$).



FIG. 1c. Histoautoradiographie de cultures en présence du Myleran depuis le début de l'expérience, puis mises en outre en présence de thymidine tritiée pendant les six derniers jours. Durée totale de l'expérience: 11 jours. Remarquer notamment les différences dans la taille des noyaux. ($\times 313$).

FIGS. 1d et 1e. Histoautoradiographie de deux fibroblastes dans une culture traitée par du Myleran et en présence de thymidine ^{-3}H dès le début de l'expérience, ceci pendant 5 jours, puis par du Myleran seul pendant 6 jours, jusqu'à la fixation (au total 11 jours). Noter le marquage assez faible des noyaux; ici, l'ADN marqué qui a été synthétisé au début a été "dilué" par des ADN non marqués, synthétisés par la suite. La coloration histologique fait mieux ressortir la forme des cellules que dans les figures précédentes. ($\times 700$).

traitées aux témoins non traités par cette substance, aussi bien au point de vue de l'intensité du "marquage" par cellule qu'à celui du pourcentage de noyaux marqués. Ce dernier varie, en effet, de 76 à 98% chez les premières et de 80 à 99% chez les secondes. Quarante-huit heures après le premier repiquage, c'est-à-dire au total après 4 ou 5 jours, de la radioactivité se décèle au niveau de tous les noyaux (Fig. 1a). Comme la densité des grains d'argent développés dans le *stripping film* au niveau des noyaux devient de plus en plus forte, il semble que la substance radioactive se soit accumulée chez ces derniers. Plusieurs jours après, cet aspect se retrouve intensifié, mais l'exposition des cellules à une quantité relativement grande de substance radioactive et pendant des temps assez longs peut appeler certaines réserves (action nocive éventuelle sur la cellule); aussi, nous ne tiendrons guère compte ici de ces derniers résultats bien qu'ils concordent avec les autres.

Nous avons signalé plus haut que sous l'effet du Myleran, certains noyaux se caractérisent par une grande taille ou montrent des anomalies de forme; même alors, ils ne se distinguent pas des noyaux morphologiquement normaux par une intensité différente de leur radioactivité. Quant aux noyaux accessoires, ils sont également marqués (Fig. 1b).

Dans la *deuxième série* d'expériences, la thymidine -³H a seulement été ajoutée après un certain temps: dans un groupe de cultures, elle l'a été 5 jours après l'explantation et a été renouvelée jusqu'au moment du prélèvement (11 jours). Dans un second groupe, elle a été ajoutée après 11 jours et est restée seulement deux jours en contact avec les cultures, c'est-à-dire que le prélèvement a eu lieu à la fin du treizième jour. Une nette incorporation de thymidine est décelable dans les deux cas. Dans le premier, tous les noyaux présentent une radioactivité intense (Fig. 1c). Dans le second, le pourcentage de noyaux marqués—en 48 hr—s'élève en moyenne à 83%, mais l'incorporation de thymidine tritiée, appréciée par le nombre de grains d'argent révélés en regard du noyau, est très variable d'une cellule à l'autre. Bien que ces cellules aient été soumises pendant un temps déjà long à l'influence du Myleran, la plupart d'entre elles restent donc capables de synthétiser des ADN.

Enfin, dans la *troisième série*, les fibroblastes ont d'abord été cultivés pendant 2 ou 5 jours avec du Myleran et de la thymidine puis en l'absence de cette dernière jusqu'au onzième jour. Tous les noyaux se révèlent alors marqués, mais de façon peu intense (Fig. 1d et 1e). Il semble donc que les ADN pour la synthèse desquels les cellules ont utilisé de la thymidine tritiée aient été "dilués" par des ADN non marqués, en d'autres termes que des ADN nouveaux ont été synthétisés par la suite. Nos résultats apportent une preuve indirecte de l'existence de cette synthèse.

Ces diverses recherches histoautoradiographiques montrent donc qu'une nette incorporation de thymidine tritiée se produit dans les fibroblastes soumis à l'action plus ou moins prolongée du Myleran, même quand leur activité mitotique est réduite. L'intensité de cette incorporation est notamment en rapport avec l'augmentation fréquente de la teneur individuelle en ADN observée après réaction de Feulgen chez un pourcentage élevé de noyaux. Ces observations sont en accord avec les interprétations que nous avons proposées précédemment et elles les renforcent (CHÈVREMONT *et al.*, 1959).

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

L'ensemble de nos expériences nous autorise à proposer quelques hypothèses permettant d'expliquer les faits observés et concernant le métabolisme des ADN en présence du Myleran ainsi que la synthèse d'ADN en général.

Tout se passe comme si les ADN subissaient, pour une cellule donnée, l'évolution suivante. Lors d'une première mitose en présence du Myleran, les désoxyribonucléoprotéines sont atteintes. Chacune des cellules-filles résultant de cette mitose possède à ce moment une quantité diploïde d'ADN; ceux-ci étant altérés, la cellule en synthétiserait à nouveau une quantité équivalente, mais normale. A ce stade, la cellule possède donc dans son noyau une quantité de désoxyribonucléoprotéines correspondant à quatre ADN, et son cytoplasme, de même que son noyau, tendent à augmenter de volume; son chondriome, notamment, tend lui aussi à s'accroître. Quand cette cellule, devenue ainsi tétraploïde, effectue sa synthèse préprophasique d'ADN préparatoire à une deuxième mitose, elle synthétiserait quatre nouveaux ADN, devenant ainsi octoploïde. Il ne nous est toutefois pas possible d'affirmer que de ces quatre nouveaux ADN tous sont qualitativement normaux ou seulement deux d'entre eux. Bien que cela ne soit pas démontré, nous serions plutôt enclins à admettre la première de ces possibilités.

Lors de cette deuxième mitose, les huit ADN seraient tous modifiés dès les premières phases; cette division une fois achevée, on aurait ainsi deux cellules-filles possédant chacune quatre ADN altérés. Pendant l'intercinèse subséquente, chacune d'elles synthétiserait à son tour quatre nouveaux ADN suivant le même processus que celui suggéré ci-dessus et deviendrait octoploïde avant même de commencer une éventuelle synthèse préprophasique ultérieure. Si celle-ci se produisait, en préparation à une troisième mitose, la quantité d'ADN deviendrait alors hexadécaploïde; des valeurs de cet ordre ont été effectivement trouvées dans nos dosages.

Sous certains aspects, nos expériences suggèrent donc que la synthèse des ADN ne se ferait pas selon la conception classique, c'est-à-dire d'après "modèle" par duplication de matériel existant, mais selon un autre processus, comme d'"après un plan". Dans ce dernier processus, interviendrait peut-être le chondriome.

RESUMÉ

Nous avons étudié le comportement de cellules animales normales cultivées *in vitro* en présence du Myleran pendant des temps variables (de quelques heures à 18 jours). Les altérations cytologiques et l'inhibition de la croissance provoquées par cette substance ayant déjà été exposées précédemment, le présent rapport concerne essentiellement l'étude quantitative des ADN, que nous avons abordée par cytophotométrie de cellules individuelles après réaction de Feulgen ainsi que par histoautoradiographie après incorporation de thymidine tritiée.

Le Myleran modifie profondément le métabolisme des ADN; il provoque une augmentation de la quantité de matériel Feulgen positif dans les noyaux intercinétiques. Cet effet devient de plus en plus marqué avec le temps: augmentation de la fréquence des noyaux à valeur "tétraploïde", apparition de noyaux à valeur octoploïde (voire même hexadécaploïde), accroissement progressif de leur nombre, etc. Il ne semble cependant pas qu'il y ait augmentation du nombre de génomes,

si on ne tient pas compte d'une fragmentation éventuelle. La fréquence des mitoses est très faible; il y a donc, sous l'effet du Myleran, une dissociation entre la fréquence des valeurs tétraploïdes d'ADN et celle des mitoses. Des dosages cytophotométriques (méthode à deux longueurs d'onde) de figures mitotiques montrent qu'une certaine proportion de mitoses dans des cultures traitées pendant un temps suffisant atteignent des valeurs octoploïdes d'ADN, qu'il s'agisse de prophases, métaphases, etc., contrairement à ce qui se passe chez les témoins. Des fibroblastes ayant cette particularité sont donc capables d'entrer en mitose et de l'achever.

Les histoautoradiographies mettent en évidence qu'une nette incorporation de thymidine tritiée se produit dans les noyaux, même quand l'activité mitotique est réduite. L'intensité de cette incorporation est notamment en rapport avec l'augmentation de fréquence de la teneur individuelle en ADN chez un pourcentage élevé de noyaux. Les cellules possèdent donc encore le pouvoir de synthétiser des ADN, même après une action prolongée du Myleran.

Une hypothèse est proposée, qui permet d'expliquer les faits observés. Selon cette hypothèse, la cellule synthétiserait après chaque mitose une quantité nouvelle d'acides désoxyribonucléiques en *compensation* de ceux qui auraient été altérés par le Myleran; elle réaliserait ensuite sa synthèse préprophasique préparatoire à la mitose suivante, en doublant la quantité d'ADN présente alors dans le noyau. Ainsi, les ADN augmenteraient dans les noyaux au cours du temps.

Sous certains aspects, en outre, nos expériences suggèrent que la synthèse des ADN ne se ferait pas selon la conception classique, c'est-à-dire d'après "modèle" par duplication de matériel existant, mais selon un autre processus, comme d'"après un plan".

BIBLIOGRAPHIE

- ALEXANDER P. (1954) *Advanc. Cancer Res.* **2**, 2.
ALEXANDER P. (1958) *Biochem. Pharmacol.* **1**, 25.
BACQ Z. M. et ALEXANDER P. (1955) *Principes de Radiobiologie*. Sciences et Lettres, Liège.
BAECKELAND E., CHÈVREMONT M. et FREDERIC J. (1959) *C.R. Acad. Sci., Paris* **248**, 1413.
BIESELE J. J. (1958) *Mitotic Poisons and the Cancer Problem*. Elsevier, Amsterdam et New York.
CHÈVREMONT M. et BAECKELAND E. (1959) *C.R. Acad. Sci., Paris* **249**, 1810.
CHÈVREMONT M., FREDERIC J. et BAECKELAND E. (1959) *Bull. Acad. Méd. Belg.* **24**, 141.
FREDERIC J., CHÈVREMONT M. et BAECKELAND E. (1959) *C.R. Acad. Sci., Paris* **248**, 1216.
GALTON D. A. G. (1956) *Advanc. Cancer Res.* **4**, 73.
HADDOW A. et TIMMIS G. M. (1951) *Acta Unio Internat. Contra Cancrum* **7**, 469.
HADDOW A. et TIMMIS G. M. (1953) *Lancet* **264**, 207.
ROSS W. C. J. (1953) *Advanc. Cancer Res.* **1**, 397.

DISCUSSION

J. HUPPERT: Les cellules "anormales" peuvent-elles être cultivées ultérieurement si on enlève le Myleran ?

M. CHÈVREMONT: Nous avons fait des expériences à ce sujet. Des cultures ont été cultivées pendant 12 jours en présence de Myleran, puis repiquées en milieu dépourvu de cette substance. La croissance, qui était devenue faible, reprend nettement dans la plupart des cas; ainsi, les effets du Myleran paraissent bien être réversibles, tout au moins en ce qui concerne la croissance. Il s'agit là d'expériences préliminaires et des recherches plus approfondies sont en cours.

A. LOVELESS: Est-ce que l'aspect des chromosomes d'une cellule montrant une teneur en ADN très élevée est, du point de vue largeur, entièrement normal ?

M. CHÈVREMONT: Comme nous l'avons décrit en détail ailleurs (voir *Bull. Acad. Méd. Belg.*, 1959), les chromosomes ont fréquemment un aspect anormal dans des mitoses de fibroblastes traités par le Myleran, consistant notamment en irrégularités de diamètre sur leur longueur; il est assez difficile, dans ces conditions, d'évaluer le "diamètre moyen". Il ne semble cependant pas que ces chromosomes soient épaissis de manière notable. Nous envisageons de reprendre cette question sur un autre matériel plus favorable à ce point de vue.