

SUR LES PROPRIÉTÉS ANTIMITOTIQUES DES ANTIFOLIQUES. RECHERCHES À L'AIDE DU TEST ALLIUM

RENÉ TRUHAUT et GUY DEYSSON

Unité de Chimiothérapie expérimentale de l'Institut Gustave Roussy,
Villejuif, et Faculté de Pharmacie, Paris, France

(Received 18 January 1964; accepted 24 March 1964)

Abstract—The cytotoxicity of four folic acid antagonists to *Allium* shows that aminopterin may be classified among the most powerful mitotic inhibitors. The effect is mainly a preprophasic one and does not occur immediately. Some chromosome poisoning is observed on resumption of mitotic activity after mitostasis or at concentration which do not lower the mitotic index. In none of the many different experimental conditions used has metaphase blocking been observed. Since the mitotic poisoning observed can be antagonized by folinic acid and, to a lesser extent, by folic acid, it would appear to result from a lack of folinic acid in the cell.

ON SAIT que l'acide folique est une vitamine du groupe B qui joue un rôle important dans le métabolisme; en effet, sous l'influence de réductases et d'acide adénosine tri-phosphorique, il se transforme en acide folinique (acide formyl-5 tétrahydro-5,6,7,8 folique) qui intervient comme agent de méthylation dans la biosynthèse des purines et dans le métabolisme de plusieurs acides aminés.¹ Cette transformation peut être inhibée par divers analogues structuraux de l'acide folique dont l'aminoptérine est le type^{2, 3} et qui ont une affinité supérieure à celle de l'acide folique pour les réductases intervenant dans sa transformation en acide folinique.⁴ On comprend ainsi que ces divers antifoliques soient capables d'inhiber la prolifération cellulaire et qu'ils puissent être utilisés avec quelque profit dans la chimiothérapie de certaines affections cancéreuses.⁵

D'après Jacobson⁶, l'acide folinique serait nécessaire à un double titre au déroulement de la mitose normale: d'une part, il serait indispensable au passage de la métaphase à l'anaphase, c'est-à-dire à la séparation complète des chromosomes-fils; d'autre part, il intervient, à titre de coenzyme, dans une série de synthèses qui prennent place après l'achèvement de la mitose et qui permettront ultérieurement le déroulement d'un nouveau cycle mitotique. Etudiant l'effet produit par divers antifoliques sur des cellules animales cultivées *in vitro*, Jacobson observe très rapidement un blocage des mitoses en métaphase, les chromosomes n'arrivant pas à se scinder et formant un amas compact; cet effet antimitotique peut être empêché par addition d'acide folinique; par contre, l'acide folique est inefficace. Les études de Jacobson ont été faites sur des fibroblastes d'embryon de poulet et sur des cellules leucémiques. Hughes⁷ a également obtenu un blocage des mitoses en métaphase dans des cultures d'embryon de poulet traitées par l'aminoptérine: pour l'a-méthoptérine, des concentrations 10 fois

supérieures n'exercent qu'un effet partiel; Benitez *et al.*⁸ ont observé un effet mitoclasique assez fugace dans les cultures de fibroblastes de rat. Biesele⁹ a signalé ce blocage métaphasique dans les cultures de peau embryonnaire de Souris et de sarcome 180, mais avec des concentrations plus élevées. Cependant, Gelfant¹⁰ ne retrouve pas d'effet mitoclasique sur l'épiderme de l'oreille de Souris *in vitro*: pour lui, l'aminoptérine empêche uniquement l'entrée des cellules en mitose. Un tel effet inhibiteur sur l'entrée en prophase avait d'ailleurs été déjà décrit.^{9, 11, 12} Enfin, s'il ne semble pas qu'on ait signalé des altérations chromosomiques dans les cellules cultivées *in vitro* soumises à l'action des antifoliques, il n'en est pas de même chez l'animal où une action 'radiomimétique' a été observée au niveau de certains tissus après injection d'aminoptérine, d'a-méthoptérine et d'amino-an-fol.¹³⁻¹⁵

C'est surtout dans le cas de l'a-méthoptérine que le mécanisme biochimique de l'action exercée sur les cellules animales a fait l'objet de vérifications: l'effet inhibiteur peut être empêché par addition d'acide folinique (Sartorelli *et al.*,¹⁶ sur la tumeur ascitique d'Ehrlich), de thymidine (Loh,¹⁷ sur les cellules He La), d'un mélange de thymidine, hypoxanthine et glycolle (Hakala,¹⁸ sur les cellules de sarcome 180); finalement, le blocage de la mitose doit être rapporté à une inhibition de la synthèse de l'ADN, tandis que la synthèse d'ARN et de protéines continue; d'ailleurs, on constate que l'a-méthoptérine inhibe la synthèse des virus à ADN et pas celle des virus à ARN.¹⁷

Sur la division des cellules végétales, l'action exercée par les antifoliques a été assez peu étudiée. Himes et Leuchtenberger¹⁹ indiquent, dans un bref résumé, (le mémoire correspondant n'a pas, à notre connaissance, été publié) que l'aminoptérine bloque les mitoses au stade prophasique dans les méristèmes radiculaires d'*Allium Cepa* L. Au contraire, les stades ultérieurs s'observent encore lorsque les racines sont traitées par l'a-méthoptérine, la téroptérine ou l'amino-an-fol et l'un quelconque de ces 3 composés empêche l'aminoptérine d'exercer son effet caractéristique. Levine et Rice²⁰ décrivent un effet inhibiteur sur la croissance des racines d'Oignon. Jakowska *et al.*²¹ concluent d'une étude plus détaillée sur le même matériel que l'aminoptérine n'exerce qu'une action mitodépressive banale et ne produit pas d'anomalies mitotiques; cette action ne serait pas empêchée par addition d'acide folique mais les auteurs ne donnent aucun détail sur cette partie de leurs recherches. Schopfer et Grob²² constatent également que l'addition d'acide folique ne rend pas réversible l'inhibition de croissance des racines de pois produite sous l'influence de l'ac. diamino-diméthyl-ptéroylglutamique, mais n'ont pas fait d'observations cytologiques. Quenette²³ étudie à son tour l'action de l'aminoptérine, sur les méristèmes radiculaires d'Oignon, de lin et d'orge; il fixe entre 10^{-8} et 10^{-9} le seuil d'activité de ce composé et montre que des concentrations supérieures provoquent, toujours assez lentement, la disparition des mitoses; divers essais au cours desquels l'action de l'aminoptérine a été interrompue et les racines replacées sur milieu témoin, n'ont pas permis d'obtenir une reprise de l'activité mitotique.

En somme, les données bibliographiques font apparaître des résultats contradictoires qui ne permettent pas de connaître avec certitude le mécanisme de l'action antimitotique des antifoliques ni, par conséquent, le rôle que peut jouer l'acide folinique dans le déroulement de la mitose normale.

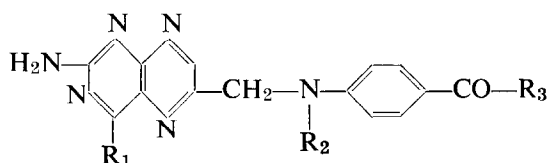
Il nous a donc paru intéressant de reprendre l'étude de ces composés en utilisant le test *Allium* suivant la technique qui nous est habituelle et en faisant varier beaucoup

plus largement que les auteurs cités précédemment les concentrations mises en oeuvre et la durée des expériences.

RÉSULTATS EXPERIMENTAUX

Rappelons brièvement que nous utilisons, pour chaque expérience, les divers bulbes d'Ail (*Allium sativum* L.) provenant d'une même 'tête' et qui sont mis à 'germer' en même temps sur du liquide de Knop dilué au demi. L'expérience commence dès que les racines ont 2 à 3 cm. Un lot, cultivé sur liquide de Knop au demi, constitue le témoin, tandis que les autres sont placés sur les solutions à étudier; chaque prélèvement est effectué simultanément sur le lot témoin et sur les lots en expérience et on a soin de choisir, dans chaque cas, des racines dont la longueur correspond à la longueur moyenne du lot. Pour l'examen cytologique, les extrémités radiculaires sont colorées à l'orcéine acétique et dissociées sur lames.

La formule des composés que nous avons étudiés est indiquée dans le tableau suivant, par comparaison avec celle de l'acide folique.



| | R ₁ | R ₂ | R ₃ | P.M. |
|---------------|-----------------|-----------------|---------------------|-------|
| Acide folique | OH | H | acide glutamique | 441,4 |
| aminoptérine | NH ₂ | H | acide glutamique | 440,4 |
| améthoptérine | NH ₂ | CH ₃ | acide glutamique | 454,4 |
| amino-an-fol | NH ₂ | H | acide aspartique | 427,4 |
| téroptérine | OH | H | acide triglutamique | 654,6 |

Etude des caracteristiques de cytotoxicité de l'aminoptérine (acide amino-desoxy-4 pteroyl-glutamique)

Nous avons étudié l'influence de nombreuses concentrations comprises entre $6,6 \cdot 10^{-7}$ M (0,025/100) et 10^{-14} M, mais nous n'avons observé aucune activité pour la concentration de $1,25 \cdot 10^{-10}$ M (0,0055 mg/100 g) et les concentrations inférieures.

D'une manière générale, lors d'un traitement continu par une des concentrations actives, on observe que les index mitotiques restent d'abord normaux puis qu'ils diminuent progressivement sans apparition d'images pathologiques; la disparition des mitoses est suivie plus ou moins rapidement par la mort.

Après 1 hr et 3 hr de traitement, les index mitotiques restent sensiblement normaux avec toutes les concentrations étudiées. Ultérieurement, la concentration de $1,25 \cdot 10^{-10}$ M continue à n'exercer aucune influence; après 7 jours d'expérience, les racines du lot traité ont sensiblement la même longueur que celles du lot témoin; l'index mitotique est de 107,5/1000 dans un méristème et de 106,3 dans un autre, contre 110,9 dans une racine témoin et 106,7 dans une autre; les proportions des différents stades de la mitose ne sont pas modifiées.

Après 24 hr de traitement, les mitoses deviennent très rares avec les concentrations comprises entre $2,5 \cdot 10^{-10}$ M et $2,25 \cdot 10^{-8}$ M; ainsi, pour $2,24 \cdot 10^{-9}$ M, on a dénombré 66 mitoses en tout dans un méristème (41 prophases, 6 métaphases, 3 anaphases et 16 télophases), et 43 dans un autre. Pour la concentration de $2,25 \cdot 10^{-8}$ M et les concentrations supérieures, on ne rencontre plus aucune mitose. Enfin, la mort survient plus ou moins rapidement, avec altération de la structure des noyaux au repos (en 48 hr pour $6,6 \cdot 10^{-7}$ M; en 3 jours pour $2,25 \cdot 10^{-8}$ M, en 4 jours pour $2,25 \cdot 10^{-9}$ M, en 6 jours pour $2,50 \cdot 10^{-10}$ M).

Dans une seconde série d'expériences, le traitement par l'aminoptérine a été limité à une durée de 1 hr, puis les bulbes d'*Allium* ont été reportés sur liquide de Knop dilué au demi et on a observé le comportement des cellules méristématique-radiculaires au cours des jours suivants. Avec la concentration de $5 \cdot 10^{-9}$ M et les concentrations supérieures, ce court traitement est suffisant pour provoquer la disparition de toute activité mitotique dans les heures qui suivent; cette disparition est irréversible et les cellules méristématiques finissent par mourir. La concentration de $2,5 \cdot 10^{-9}$ M n'exerce aucune influence sur l'index mitotique, mais provoque l'apparition de très rares cas de fragmentation chromosomique ou de ponts d'agglutination entre le 2ème et le 5ème jour. Enfin, un traitement d'une heure avec la concentration de 10^{-9} M et les concentrations inférieures, n'est suivi d'aucun effet décelable.

Dans une 3ème série d'expériences, nous avons cherché à déterminer, sous l'influence de l'aminoptérine dans des conditions convenables, un effet mitostatique total suivi d'une reprise d'activité. Nous avons tout d'abord constaté, au cours de nombreuses expériences, qu'il est généralement impossible d'obtenir une telle reprise des mitoses. Cependant, avec la concentration de $2,5 \cdot 10^{-10}$ M, nous sommes parvenus à des résultats satisfaisants, en interrompant le traitement après 24 hr; les mitoses sont alors très rares; elles le sont encore le lendemain (175 en tout dans un méristème, 142 dans un autre), puis leur fréquence s'accroît et l'index mitotique retrouve une valeur normale après 3 jours de retour; on observe alors de très rares mitoses présentant des fragmentations chromosomiques qui donneront naissance à des cellules pourvues de micronoyaux.

Quenette, dans le mémoire cité plus haut, signale que très souvent, après traitement des méristèmes d'Oignon par l'aminoptérine pendant un temps relativement court, les mitoses observées se trouvent assez haut dans ce méristème et il pense que les cellules les plus jeunes seraient les plus sensibles à l'action de l'antimitotique. Ce mode de disparition des mitoses paraît très curieux; en effet, il résulte des recherches de Mme. Benbadis²⁴ que la disparition des mitoses dans les racines d'Ail en fin de croissance s'effectue progressivement de haut en bas; lorsque cette disparition est provoquée prématurément sous l'influence de la triéthylène-méla mine, les dernières mitoses sont, au contraire, réparties uniformément dans toute l'étendue du méristème et ne présentent pas de localisation particulière²⁵; il nous a donc paru intéressant de rechercher si le mode de disparition des mitoses sous l'influence de l'aminoptérine répond à un schéma différent. Dans ce but, nous avons effectué plusieurs séries d'expériences, traitant les racines par l'aminoptérine à $5 \cdot 10^{-9}$ M pendant une heure et faisant des prélèvements 6 hr, 24 hr et 3 jours après report sur liquide de Knop dilué au demi. Nous avons également traité d'autres bulbes par une solution à $2,5 \cdot 10^{-10}$ M pendant 24 hr, prélevant des méristèmes à la fin du traitement et 48 hr après report des racines sur liquide de Knop dilué au demi. Les racines ont été incluses en paraffine, coupées

longitudinalement et colorées par la technique de Feulgen; on a fait, sur un certain nombre de coupes axiales, un relevé des mitoses à l'aide d'un microscope à projection de Leitz (Xb II). Sans rapporter ici le détail de nos observations, nous indiquerons seulement que, chaque fois que les mitoses étaient peu nombreuses, elles étaient réparties uniformément dans les 2 premiers millimètres et que, par conséquent, leur disparition s'effectuait de la même manière que sous l'influence de la triéthylène-méla mine. La Fig. 1 constitue un exemple des résultats que nous avons obtenus.

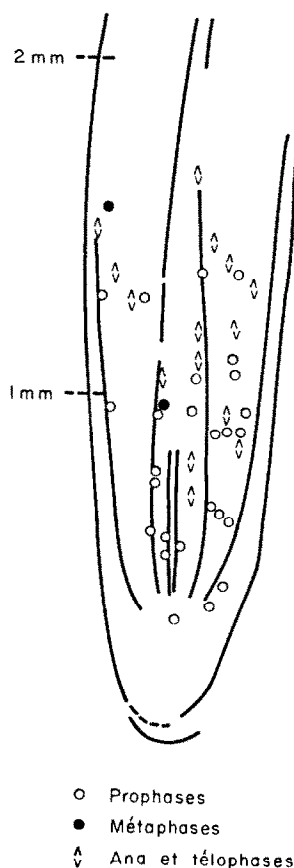


FIG. 1. Répartition des mitoses dans une coupe longitudinale axiale de méristème racinaire d'*Allium sativum* ayant été traité 1 hr par l'aminoptérine à $5 \cdot 10^{-9}$ M puis replacé pendant 24 hr sur liquide de Knop dilué au demi. Les mitoses sont peu nombreuses, mais ont la même répartition que dans les méristèmes normaux de racines du même âge.

En conclusion, sur les méristèmes racinaires d'*Allium*, l'activité antimitotique de l'aminoptérine présente les caractéristiques suivantes. Une assez large gamme de concentrations provoque une cessation générale de l'entrée des cellules en mitose: les cellules qui avaient commencé à se diviser achèvent cette division d'une manière normale; nous n'avons, en particulier, jamais observé d'effet mitoclasique. Lorsque les méristèmes ne renferment plus aucune mitose, il est généralement impossible d'obtenir une reprise d'activité par interruption du traitement, sauf avec la concentration de $2,5 \cdot 10^{-10}$ M. D'autre part, même avec les concentrations les plus fortes que

nous avons mises en oeuvre, la mort ne survient jamais avant un délai de 48 hr; elle ne résulte donc pas d'une action toxique directe du produit mais des conditions défavorables créées progressivement par suite de modifications du métabolisme. Enfin, l'aminoptérine peut exercer un effet chromatoclasique; celui-ci, toujours très discret, se manifeste lorsqu'une reprise d'activité suit l'effet mitostatique ou avec la plus forte concentration ne diminuant pas l'index mitotique.

Recherche d'un antagonisme entre l'aminoptérine, d'une part, et l'acide folinique d'autre part

Afin de rechercher si les caractéristiques de l'activité antimitotique de l'aminoptérine traduisent réellement une carence en acide folinique des cellules méristématiques, nous avons effectué des essais selon le protocole suivant: des bulbes d'*Allium* sont traités pendant une heure par une solution d'aminoptérine à $5 \cdot 10^{-9}$ M puis, tandis que certains sont reportés sur liquide de Knop dilué au demi, d'autres sont placés sur une solution d'acide folique ou d'acide folinique.

Dans les racines traitées par l'aminoptérine puis reportées sur liquide de Knop au demi, les mitoses ont pratiquement disparu 3 hr plus tard; après 24 hr et 48 hr, les méristèmes ne renferment aucune mitose et les noyaux deviennent légèrement condensés; enfin, 3 jours après le traitement, les racines, qui n'ont présenté aucun allongement, deviennent flaccides.

Lorsque, après avoir subi le même traitement par l'aminoptérine, les racines sont reportées sur une solution d'acide folique à $5 \cdot 10^{-8}$ M, on constate que les mitoses, rares au bout de 3 hr, redeviennent assez nombreuses après 24 et 48 hr; elles se raréfient le 3ème jour et disparaissent le 4ème mais, 5 jours après le traitement, les racines ne sont pas encore mortes bien qu'elles n'aient pas présenté d'allongement apparent. Si la concentration de la solution d'acide folique était seulement de $5 \cdot 10^{-9}$ M, on constate que, 3 hr après l'action de l'aminoptérine, les méristèmes ne présentent plus que de rares mitoses: elles ont totalement disparu 24 hr plus tard et les racines sont mortes le 3ème jour.

L'influence de l'acide folinique à la concentration de $5 \cdot 10^{-8}$ M montre une efficacité supérieure à celle de l'acide folique à la même concentration; la fréquence des mitoses n'est que légèrement diminuée au bout de 3 hr et l'activité mitotique est normale dans les méristèmes prélevés 24 hr, 48 hr, 3, 4 et 5 jours après le traitement par l'aminoptérine;* l'allongement des racines, nul les 2 premiers jours, reprend faiblement le 3ème et redevient identique à celui du lot témoin le 5ème jour.

Ces expériences nous autorisent donc à rapporter à une carence en acide folinique l'action antimitotique observée sous l'influence de l'aminoptérine: l'apport d'acide folique exogène permet de prolonger l'activité mitotique mais n'empêche pas l'arrêt de la croissance; l'apport d'acide folinique permet le maintien d'une activité mitotique normale et la reprise de la croissance après un arrêt temporaire.

Etude des caractéristiques de cytotoxicité de l'A-methoptérine (acide aminodesoxy-4-méthyl-10-pteroylglutamique ou methotrexate)

Ce dérivé, très proche de l'aminoptérine par sa constitution, a été étudié à des concentrations variées, allant de 10^{-7} M (4,54 mg/100 g) à $2,5 \cdot 10^{-11}$ M; la concentration de $1,25 \cdot 10^{-10}$ (0,0056 mg/100 g) et les concentrations inférieures se sont montrées totalement dépourvues d'activité.

* Signalons, cependant, l'existence d'un certain nombre de fragmentations chromosomiques à partir du 3ème jour.

La première concentration active en traitement continu est celle de $2,5 \cdot 10^{-10}$ M; on observe que les mitoses sont nettement moins fréquentes après 24 hr et qu'elles ont pratiquement toutes disparu après 48 hr. Cependant, cette cessation de l'activité mitotique n'est que transitoire et, bien que le traitement soit poursuivi, les mitoses reparaissent le 3ème jour et sont assez nombreuses le 5ème et le 7ème; d'ailleurs, parallèlement, la croissance des racines, qui avait pratiquement cessé après le 2ème jour, reprend le 5ème jour. Signalons que la reprise de l'activité mitotique s'accompagne de l'apparition de quelques cas de fragmentations et de rares ponts chromosomiques.

La concentration de $5 \cdot 10^{-10}$ M et les concentrations supérieures provoquent la disparition totale et définitive des mitoses; celle-ci est suivie de la mort des cellules le 3ème jour à partir de 10^{-9} M.

Comme pour l'aminoptérine, nous avons effectué une seconde série d'expériences dans lesquelles le traitement a été limité à une durée de 1 hr; lorsque ce traitement est réalisé avec la concentration de 10^{-8} M, les mitoses deviennent rares quelques heures plus tard; toute activité mitotique a cessé en 24 hr et les cellules radiculaires ne tardent pas à mourir. Avec les concentrations de $5 \cdot 10^{-9}$ M et de 10^{-9} M, la fréquence des mitoses diminue fortement le 1er jour puis on observe, suivant les racines, soit une remontée de l'index mitotique, soit une disparition totale des mitoses suivie de mort. La concentration de $5 \cdot 10^{-10}$ M diminue fortement l'index mitotique (quelques heures après le traitement, les méta et anaphases sont, en particulier, très rares) mais cette diminution n'est que transitoire et la reprise d'activité mitotique s'observe dans tous les méristèmes. Enfin, la concentration de $2,5 \cdot 10^{-10}$ M n'exerce, dans ces conditions, aucune influence, même transitoire.

En conclusion, les caractéristiques de l'activité antimitotique de l'a-méthoptérine sont de même nature que celles de l'aminoptérine; il s'agit d'une action inhibitrice sur l'entrée en mitose et on n'observe aucun effet mitoclasique. La plus forte concentration inactive est la même pour les 2 composés, mais l'action mitostatique est ici un peu plus facilement réversible et les cellules présentent même un phénomène d'accoutumance vis-à-vis des concentrations faiblement actives. Enfin, un effet chromatoclasique discret a pu être mis en évidence dans certaines conditions.

Etude des caractéristiques de cytotoxicité de l'amino-an-fol (acide aminodésoxy-4 ptéroylaspartique)

La solution saturée d'amino-an-fol dans le liquide de Knop dilué au demi a une concentration très voisine de 10^{-8} M (0,427 mg/100 g); nous avons étudié l'effet de cette concentration et celui de concentrations plus faibles, allant jusqu'à $5 \cdot 10^{-11}$ M. La concentration de $5 \cdot 10^{-10}$ M (0,021 mg/100 g) et les concentrations inférieures se sont révélées dépourvues de toute activité.

En traitement continu, la première concentration active est celle de 10^{-9} M. Elle exerce un léger effet mitodépresseur les 2 premiers jours (après 48 hr, l'index mitotique était de 82,1/1000 dans un méristème et de 80,2 dans un autre contre 110,6 et 106,3 chez les témoins correspondants), mais celui-ci disparaît les jours suivants et, en fin d'expérience, la longueur moyenne des racines est pratiquement identique à celle du lot témoin (59 mm au lieu de 63); on note, dans les divers prélèvements effectués, quelques rares cas de fragmentations chromosomiques.

L'effet est de même nature, mais un peu plus accentué, avec la concentration de $5 \cdot 10^{-9}$ M. Les mitoses sont peu nombreuses après 24 hr (336 en tout dans un méristème, 267 dans un autre) et après 48 hr (259 en tout dans un méristème et 173 dans un autre), puis l'activité mitotique redevient normale, même si les solutions sont renouvelées quotidiennement. Les fragmentations chromosomiques sont plus fréquentes qu'avec la solution précédente et, à partir du 3ème jour, les micronoyaux sont assez nombreux.

Enfin, les concentrations supérieures ($7,5 \cdot 10^{-9}$ M et solution saturée) provoquent la disparition totale et définitive des mitoses en 2 à 3 jours; celle-ci est suivie de la mort des cellules le 6ème jour dans le cas de la solution saturée.

Au cours d'une seconde série d'expériences, dans laquelle l'action de l' amino-an-fol a été limitée à 1 hr et les cellules reportées sur liquide de Knop dilué au demi, la concentration de 10^{-9} M et les concentrations supérieures ont exercé un effet mitodépresseur net, mais, 24 hr plus tard, l'activité mitotique avait retrouvé une valeur normale.

En conclusion, l' amino-an-fol est moins toxique que les 2 composés précédents. Son action mitodépresseuse, un peu moins prononcée puisque la première concentration efficace est celle de 10^{-9} M, est toujours réversible lorsque le traitement n'est pas poursuivi. On observe souvent également une accoutumance des cellules et la régression de l'effet mitodépresseur en traitement continu. Enfin, l' amino-an-fol exerce parfois un effet chromatoclasique modéré, mais jamais d'action mitoclasique. L'effet global est donc du même type que celui de l'a-méthoptérine mais plus faible.

Etude des caractéristiques de cytotoxicité de la téroptérine (acide pteroyl-triglutamique)

L'action de la téroptérine a été étudiée pour les concentrations comprises entre 10^{-6} M (65,4 mg/100 ml) et 10^{-10} M. La concentration de $5 \cdot 10^{-8}$ M (2,20 mg/100) et les concentrations inférieures se sont révélées totalement inactives.

Les concentrations supérieures exercent un effet mitodépresseur temporaire qui disparaît bientôt, même si le traitement est continué. Enfin, quelques fragmentations chromosomiques ont été observées, à partir du 4ème jour, avec la concentration de 10^{-6} M.

Dans le cas des expériences dans lesquelles la durée du traitement est limitée à 1 hr, on peut également observer un effet mitodépresseur parfois important (3 hr après la fin du traitement, avec la concentration de $5 \cdot 10^{-7}$ M, il ne restait que 280 mitoses dans un méristème et 268 dans un autre), mais, 24 hr plus tard, l'index mitotique est déjà revenu à des valeurs normales.

En conclusion, les propriétés antimitotiques de la téroptérine sont beaucoup plus faibles que celles des dérivés précédents, mais elles sont de même nature et, en particulier, la téroptérine n'exerce jamais non plus d'effet mitoclasique.

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS

Les 4 antagonistes de l'acide folique étudiés sur le test *Allium* présentent une activité antimitotique de même type dont les caractéristiques sont indiquées dans le Tableau 1.

Le composé le plus actif est l'aminoptérine; l'activité de l'a-méthoptérine est à peine plus faible, mais un phénomène d'accoutumance se manifeste; au contraire, l'amino-an-fol et surtout la téroptérine sont beaucoup moins efficaces. Ces résultats présentent une concordance satisfaisante avec ceux de Eagle et Foley²⁶ qui, sur des cellules He la cultivées *in vitro*, ont déterminé les doses inhibitrices 50 (ID 50) suivantes (en mmol.): aminoptérine $4,5 \cdot 10^{-6}$, a-méthoptérine $1,9 \cdot 10^{-5}$, amino-an-fol $2,2 \cdot 10^{-4}$. D'autre

TABLEAU 1.

| | Aminoptérine | A-méthoptérine | Amino-an-fol | Téroptérine |
|-------------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|-------------|
| Seuil d'action mitodépressive | $2,5 \cdot 10^{-10}$ M | $2,5 \cdot 10^{-10}$ M | 10^{-9} M | 10^{-7} M |
| Accoutumance | 0 | + | + | + |
| Action chromatoclasique | + | + | + | + |
| Action mitoclasique | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Seuil d'action mitostatique | $2,5 \cdot 10^{-10}$ M | $5 \cdot 10^{-10}$ M | $7,5 \cdot 10^{-9}$ M | 0 |
| | 24 hr | 3 jours | 3 jours | |
| Seuil d'action léthale | $2,5 \cdot 10^{-10}$ M | 10^{-9} M | 10^{-8} M | 0 |
| | 6 jours | 3 jours | 6 jours | |

part, l'ordre de grandeur des concentrations trouvées actives pour l'aminoptérine concorde, compte tenu des différences dans le mode d'expression, avec les résultats de Jakowska *et al.* et avec ceux de Quenette.

Le fait que l'activité antimitotique de l'aminoptérine sur le test *Allium* peut être retardée par l'acide folique et inhibée par l'acide folinique autorise à considérer les troubles observés comme résultant d'une carence en acide folinique.

Ces troubles consistent essentiellement en une inhibition de l'entrée des cellules en mitose et cet effet ne se manifeste qu'après un certain temps de latence mais d'une manière brutale. Il ne s'agit donc pas d'un effet toxique direct sur l'entrée en prophase mais l'incapacité des cellules à se multiplier paraît être la conséquence de l'inhibition de certaines synthèses dépendant de l'acide folinique (sans doute celle des bases puriques).

Rappelons qu'à la suite d'un traitement d'une heure, les concentrations minimales efficaces pour abaisser temporairement ou faire cesser l'activité mitotique sont les suivantes:

aminoptérine: $5 \cdot 10^{-9}$ M—disparition des mitoses
 a-méthoptérine: $5 \cdot 10^{-9}$ M—disparition des mitoses
 a-méthoptérine: $5 \cdot 10^{-10}$ M—mitodépression temporaire
 amino-an-fol: 10^{-9} M—mitodépression temporaire
 téroptérine: 10^{-7} M—mitodépression temporaire

Ayant étudié l'action d'un grand nombre de composés antimitotiques dans les mêmes conditions,²⁷ nous constatons que l'aminoptérine figure parmi les composés actifs aux plus faibles concentrations comme le montre le tableau suivant dans lequel nous avons classé les composés les plus actifs en fonction de leur effet mitodépresseur:

| | Concentration maximale inactive sur l'index mitotique pendant au moins 7 jours |
|---|---|
| Fluoro ₅ désoxy ₅ uridine | 10^{-10} M |
| Aminoptérine | $1,25 \cdot 10^{-10}$ M |
| Mitomycine C | $1,8 \cdot 10^{-10}$ M |
| Acide fluoro ₅ orotique | $5 \cdot 10^{-10}$ M |
| Diazo-oxo-norleucine | 10^{-9} M |
| Ethylène-imino-quinone (E 39) | $1,5 \cdot 10^{-9}$ M |
| Carzinophiline | $2,5 \cdot 10^{-9}$ M |
| Ethylène-imino-quinone (A 139) | $3 \cdot 10^{-9}$ M |

Ces différents résultats nous incitent à penser que l'action antimitotique de l'aminoptérine n'est pas une action 'non spécifique' comme le disent Jakowska *et al.*, mais qu'elle est, au contraire, produite à la suite d'une inhibition métabolique très spécifique.

Il nous paraît également important de signaler que, malgré la variété des conditions expérimentales réalisées, dans notre travail, nous n'avons jamais observé de blocage de mitoses en métaphase. Ces résultats indiquent que les conclusions de Jacobson, selon lesquelles l'acide folinique interviendrait pour permettre l'achèvement de la métaphase, c'est-à-dire la séparation complète des chromosomes-fils, ne peuvent être considérées comme ayant une portée générale.

Enfin, les différents antagonistes de l'acide folique étudiés ici se sont tous montrés capables, dans des conditions convenables, d'exercer une action chromatoclasique, c'est-à-dire de produire des fragmentations chromosomiques. Ces résultats sont à rapprocher de ceux de P. Dustin qui observe chez l'animal un 'effet radiomimétique partiel' à la suite de l'administration d'antagonistes de l'acide folique. Ils n'ont rien de surprenant puisque nous savons que ces composés agissent finalement comme inhibiteurs de la synthèse de l'ADN; lorsque cette inhibition n'est pas totale, on comprend facilement que des anomalies de structure de l'ADN puissent se produire et que des fragmentations chromosomiques puissent en résulter.

RESUME

L'étude des caractéristiques de cytotoxicité de 4 antagonistes de l'acide folique sur le test *Allium* permet de conclure que l'aminoptérine se classe parmi les antimitotiques les plus actifs. L'effet obtenu consiste essentiellement en une inhibition de l'entrée en mitose; quelques altérations chromosomiques peuvent être observées lorsqu'une reprise d'activité suit l'effet mitostatique ou avec la plus forte concentration ne diminuant pas l'index mitotique. Bien que les conditions expérimentales réalisées aient été très variées, il n'a jamais été observé de blocage des mitoses en métaphase.

Le fait que l'activité antimitotique étudiée dans ce travail peut être retardée par l'acide folique et inhibée par l'acide folinique autorise à considérer les troubles observés comme résultant d'une carence en acide folinique.

Les résultats obtenus sont discutés comparativement aux données contradictoires de la bibliographie.

REFERENCES

1. M. DE CLERCQ, *Biol. med.* **51**, 469 (1962).
2. M. DE CLERCQ, *Biol. med.* **45**, 561-590 (1956).

3. L. DELMONTE et T. JUKES, *Pharmacol. Rev.* **14**, 91–135 (1962).
4. A. M. PERAULT et B. PULLMAN, *Biochim. biophys. Acta*, **52**, 266–280 (1961).
5. R. TRUHAUT, *Presse med.* **63**, 880–883 (1955).
6. W. JACOBSON, *Pathol. et Biol.* **9**, 481–484 (1961).
7. A. HUGHES, *Quart. J. micr. Sci.* **91**, 251–278 (1950).
8. M. BENITEZ, M. MURRAY, E. CHARGAFF, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **58**, 1288–1302 (1945).
9. J. BIESELE, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **58**, 1129–1146 (1954).
10. S. GELFANT, *Exp. cell Res.* **15**, 451–453 (1958).
11. M. ALBRECHT et I. BOLL, *Z. Krebsforsch.* **57**, 496 (1951).
12. J. KIELER et E. KIELER, *Cancer Res.* **14**, 428 (1954).
13. P. DUSTIN, *C.R. Soc. Biol.* **143**, 1609–1610 (1949).
14. P. DUSTIN, *Rev. Hematol.* **5**, 603–617 (1950).
15. J. THIERSCH, *Cancer*, **2**, 877 (1949).
16. A. SARTORELLI, H. UPCHURCH et B. BOOTH, *Cancer Res.* **22**, 102–106 (1962).
17. P. LOH, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **105**, 296–300 (1960).
18. M. HAKALA, *Science*, **126**, 255 (1957).
19. M. HIMES et C. LEUCHTENBERGER, *Genetics*, **35**, 114 (1950).
20. M. LEVINE et S. RICE, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **74**, 310–313 (1950).
21. S. JAKOWSKA, R. NIGRELLI et E. GOLDSMITH, *Caryologia*, **3**, 1–10 (1950–51).
22. W. SCHOPFER et E. GROB, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **36**, 1195–1205 (1954).
23. R. QUENETTE, *Rev. Cytol. et Biol. veget.* **19**, 199–218 (1958).
24. M.-C. BENBADIS, *Rev. gén. Bot.* **67**, 550–571 (1960).
25. M.-C. BENBADIS, *Rev. gén. Bot.* **69**, 389–398 (1962).
26. H. EAGLE et G. FOLEY, *Amer. J. Méd.* **21**, 739–749 (1956).
27. G. DEYSSON et R. TRUHAUT, Colloque internat. C.N.R.S., No. 88, Montpellier, 17–21 Mai 1959.