Zeitschrift: Mémoires de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles

Herausgeber: Société Vaudoise des Sciences Naturelles

Band: 10 (1950-1952)

Heft: 4

Artikel: Le rôle de la culture des tissus in vitro dans l'étude des poisons de la mitose

Autor: Bucher, Otto

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-256790

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 15.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Mémoires de la Société vaudoise des Sciences naturelles
N° 65 1951 Vol. 10, N° 4

Le rôle de la culture des tissus in vitro dans l'étude des poisons de la mitose

PAR

Otto BUCHER

On entend par *transplantation* le déplacement d'un morceau de tissu ou d'organe qui est séparé de ses rapports naturels et placé à un autre endroit du corps du même individu ou d'un autre. De telles recherches sont poursuivies depuis longtemps déjà en biologie expérimentale et ont acquis peu à peu une grande importance pratique en chirurgie. Au concept de transplantation, WILHELM ROUX, dès 1905, a opposé celui d'*explantation*. Alors que le transplant est greffé dans un nouvel entourage lui-même *vivant*, l'explant est placé dans un milieu de culture *mort* naturel ou éventuellement artificiel et dont la composition peut être modifiée à volonté. On peut explanter soit des parties d'embryon, soit des organes entiers, soit seulement un fragment tissulaire. Ce n'est que dans ce dernier cas que l'on parle de culture de tissu.

Si nous voulons caractériser en quelques mots la culture des tissus, nous pouvons dire que c'est une méthode de la cytologie expérimentale qui a été créée en 1907 par R. G. HARRISON, puis développée avant tout par A. CARREL. Pour cultiver des tissus, on prélève sur un organisme, dans des conditions aseptiques, de petits fragments de tissus vivants de la grosseur d'une tête d'épingle et on les transporte dans un milieu de culture mort. Dans des conditions appropriées, le tissu peut non seulement être maintenu vivant, mais encore, dans bien des cas, être cultivé pendant de nombreuses années. Les cellules croissant in vitro peuvent être *photographiées* ou *cinématographiées*. Sur les cultures de tissu, que l'on peut considérer comme des *animaux de laboratoire de dimension microscopique*, il est possible d'étudier les problèmes expérimentaux les plus variés et il

n'est plus nécessaire aujourd'hui d'insister sur l'importance de la cuture in vitro dans le domaine du cancer.

En ce qui concerne *la technique de la culture des tissus,* je n'en mentionnerai que le principe (pour détails, voir : G. CAMERON, 1950; C. P. PARKER, 1950; T. S. P. STRANGEWAYS, 1924). Le *milieu de culture* se compose en général des deux constituants suivants : le plasma sanguin et l'extrait tissulaire. Le *plasma,* coagulé après ensemencement de la culture, fournit, en plus de certaines substances nutritives, une fine charpente

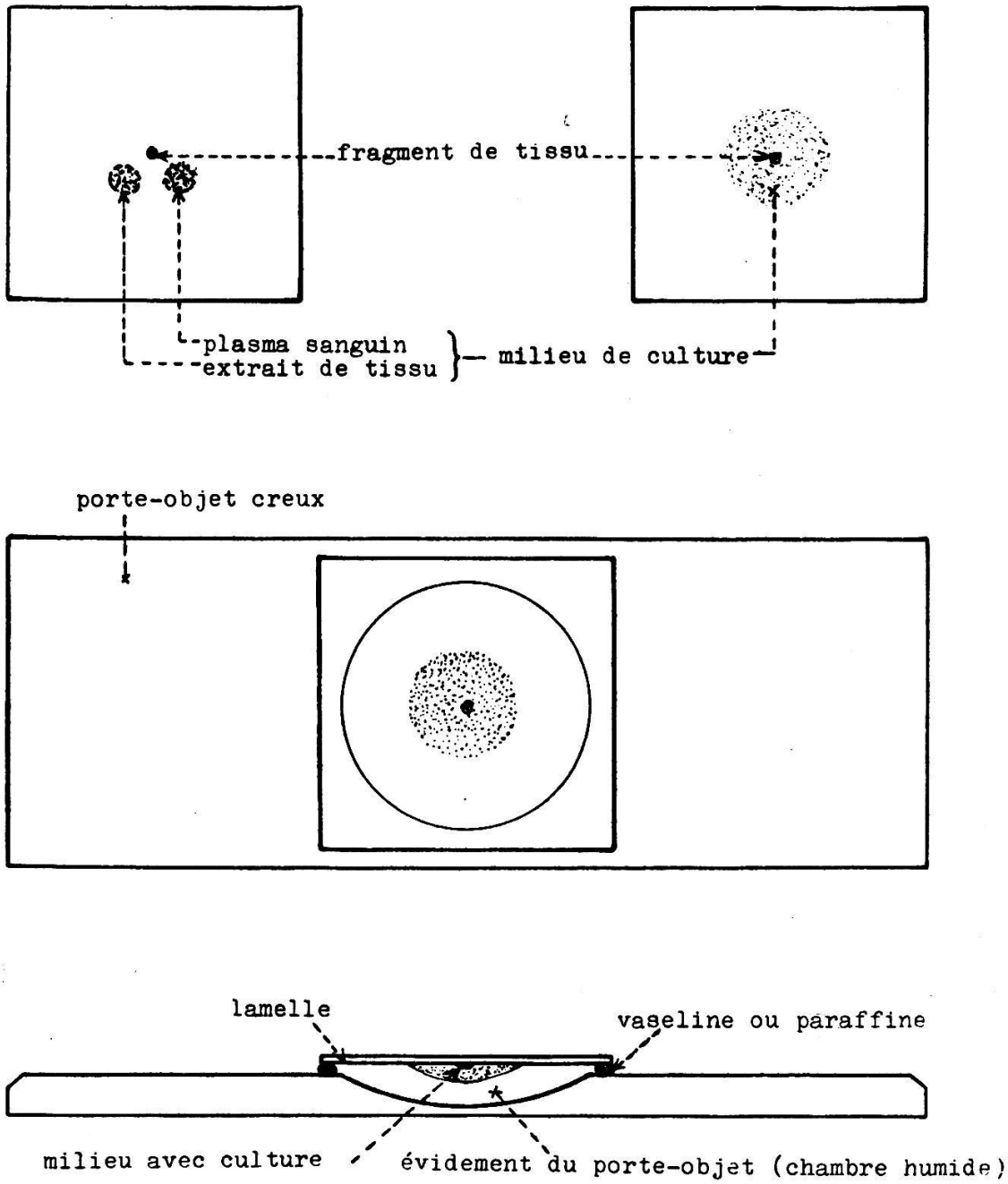

FIG. 1. — Mise en train d'une culture sur lamelle.

spongieuse de fibrine sur laquelle les cellules peuvent croître. Dès que le milieu est liquéfié par la fibrinolyse — c'est une des difficultés de la culture des tumeurs —, les cellules perdent leur support; elles s'arrondissent et en général ne prolifèrent plus. Comme certaines substances stimulatrices de la croissance manquent dans le plasma sanguin, on ajoute au milieu un *extrait de tissu,* lequel — en raison de sa teneur en thrombokinase — provoque de plus la coagulation du plasma. Il va de soi que la culture des tissus doit se faire dans des *conditions aseptiques,* car la culture in vitro ne bénéficie pas des systèmes de défense de l'organisme entier et ne peut par conséquent se protéger contre une infection. Pour cette raison, il importe de stériliser soigneusement tous les instruments, la verrerie, les solutions nécessaires; les composants du milieu et le tissu doivent être prélevés aseptiquement sur l'organisme de l'animal.

Il existe *trois méthodes essentielles de culture* : la culture sur lamelles, la culture en verre de montre et la culture en flacons, méthodes dont je ne citerai ici que les grandes lignes. Dans toutes ces méthodes — si l'on travaille avec des tissus d'animaux à sang chaud — les cultures doivent être tenues dans une étuve à la température du corps. Dans la *culture sur lamelles,* tissu et milieu sont suspendus sous la forme d'une goutte à la face inférieure d'une lamelle de verre fixée elle-même au-dessus de l'évidement d'un porte-objet creux. La mise en train de la culture sur lamelle se fait de la manière suivante (fig. 1) : on dépose une goutte de plasma et une goutte d'extrait — tous deux à la dilution appropriée — sur une lamelle de verre stérile. Un fragment de tissu d'environ ½-1 mm de diamètre y est placé, puis les deux gouttes sont mélangées et en même temps étalées. Lorsque le milieu est coagulé, on retourne la lamelle sur une lame creuse et les bords du couvre-objet sont scellés avec de la vaseline ou de la paraffine chauffée.

Dans la *culture sur verre de montre,* on dépose le milieu dans un verre de montre lequel est enfermé dans une boîte de Petri, dont le fond est recouvert d'ouate imbibée d'eau distillée; on réalise ainsi une chambre humide. Pour la *culture en flacons,* on utilise des flacons plats construits spécialement et qui possèdent une ou deux tubulures latérales (fig. 2). Le milieu de culture y est constitué par deux éléments. Un milieu solide étalé sur le fond contenant la culture est recouvert d'une phase liquide. Une variante particulière de la culture en flacons est la culture dite en « *rollertubes* ». Le milieu, qui est aussi formé d'une partie solide et d'une partie liquide, se trouve placé avec le tissu dans une éprouvette; cette éprouvette, éven-

tuellement un peu modifiée, se monte dans un appareil spécial, à rotation lente (par exemple de 6 à 8 tours par heure). Le but de ce dispositif est d'amener régulièrement au contact du tissu l'oxygène et la phase liquide contenant les substances nutritives.

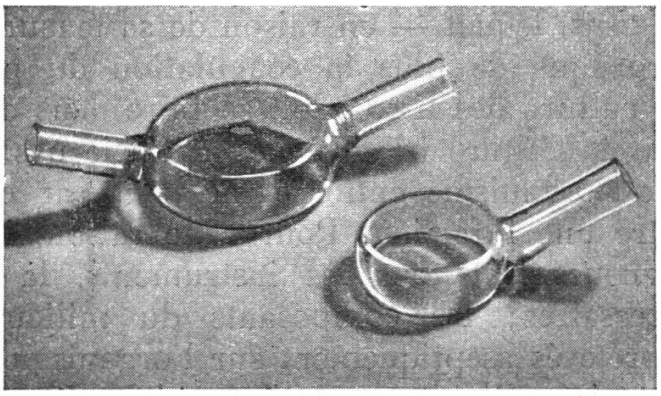

FIG. 2 — Deux types de flacons de culture.
(Tiré de O. BUCHER, *Revue Ciba* [1], N° *20*, 1942).

Comme d'une part les substances nutritives présentes dans le milieu s'épuisent peu à peu et que, d'autre part, les produits métaboliques s'accumulent progressivement — ce qui à la longue pourrait endommager les tissus —, les cultures doivent être *repiquées* dans un milieu neuf à intervalles déterminés. Dans les cultures sur lamelles, cette opération se fait tous les 2 à 3 jours, dans les cultures sur verre de montre, tous les 2 à 6 jours. Dans les cultures en flacons et en « *rollertubes* », où la phase liquide peut être changée aussi souvent que cela est nécessaire, le repiquage ne s'impose que toutes les 2 à 4 semaines.

Suivant la technique employée, suivant aussi l'origine et le degré de différenciation du tissu explanté, on peut obtenir deux résultats fondamentalement différents (H. B. FELL, 1935; G. LEVI, 1946; O. BUCHER, 1950 c). *Dans un premier cas*, l'explant se comporte plus ou moins comme s'il était resté dans l'organisme, autrement dit, on observe la *différenciation spécifique* que son origine permettait de prévoir : par exemple, dans la peau embryonnaire explantée apparaissent des glandes et des poils; les épithéliums des glandes endocrines forment in vitro des structures organo-typiques (par exemple des follicules lorsque de l'épithélium thyroïdien a été utilisé) et dans certains

[1] Nous remercions la Ciba S. A. d'avoir bien voulu mettre à notre disposition les clichés des figures 2 et 3.

cas favorables ils sont même capables de fabriquer l'hormone; les ostéoblastes forment de l'os. Nous avons étudié la guérison de fractures expérimentales d'os en culture (cf. O. BUCHER, 1950 b et 1951) et influencé pharmacologiquement les processus de régénération (cf. BUCHER et WEIL, 1951; J.-TH. WEIL, 1951). Pour de telles recherches les méthodes en verre de montre ou en flacons sont particulièrement indiquées.

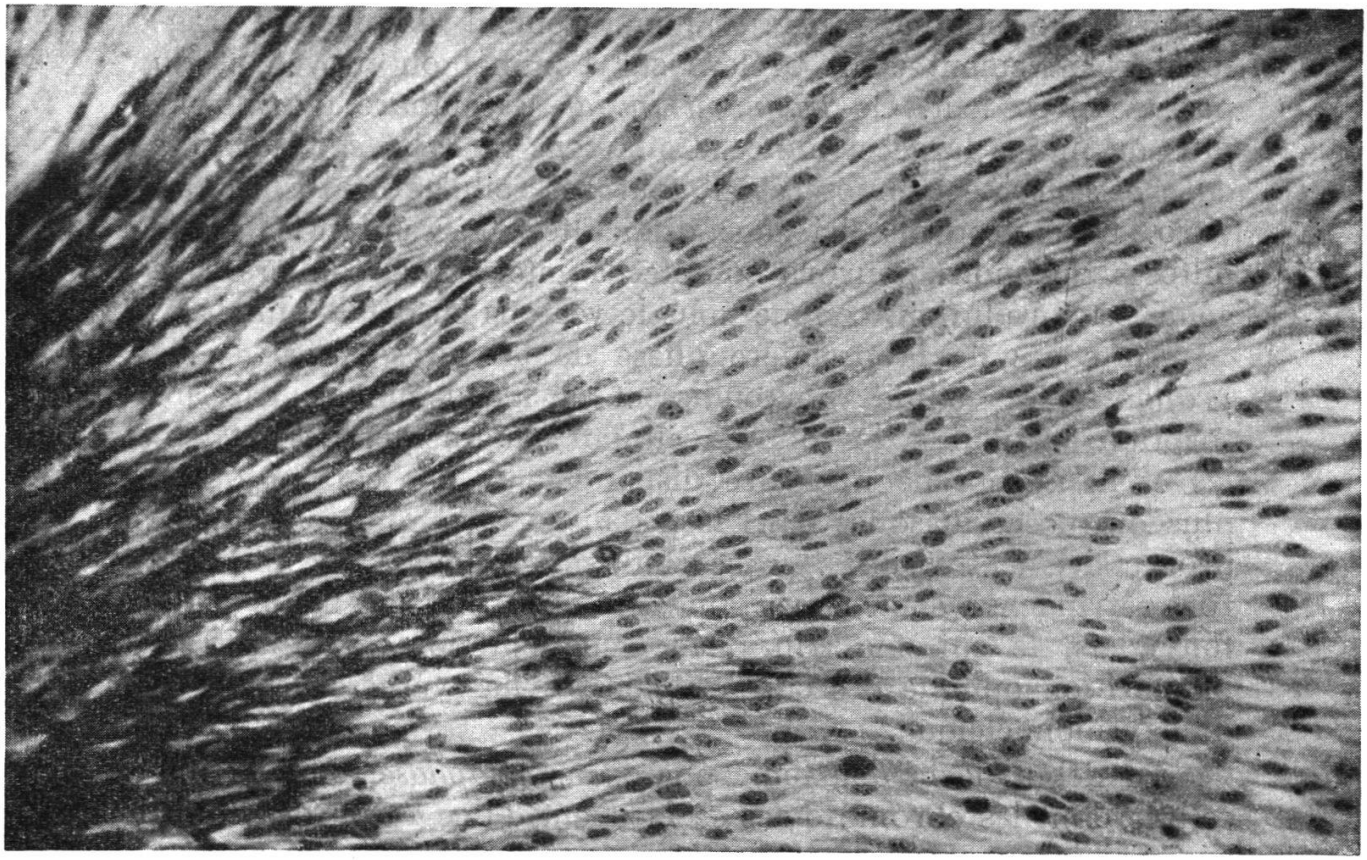

FIG. 3. — Partie d'une culture sur lamelle — fibrocytes de lapin — à un grossissement moyen. Le fragment initial (à gauche en bas) est entouré d'une large auréole de croissance (à droite).

(Tiré de O. BUCHER, *Revue Ciba*, N° *20*, 1942).

Dans un second cas, il ne se forme pas de structures organotypiques; au contraire les différenciations histologiques acquises avant l'explantation disparaissent souvent tout à fait. Dans ces cultures, la *division cellulaire et la croissance* sont au premier plan. Ce sont ces processus qui vont dès maintenant retenir plus spécialement notre attention. Dans les cultures sur lamelles, qui se prêtent avantageusement à de telles recherches, nous pouvons suivre directement les mitoses dans les cellules vivantes; au moyen d'un appareil microcinématographique approprié, on pourra

enregistrer le phénomène au ralenti et plus tard apprécier les films en projection accélérée, du double point de vue de la qualité et de la quantité (W. von Moellendorf, 1937). Nous avons cependant à prendre garde que les cultures ne se refroidissent pas et de plus il est nécessaire que le tissu ne soit pas altéré au cours de la prise de vue par une intensité lumineuse trop forte.

Si l'on examine une bonne culture deux jours après l'explantation ou le repiquage (fig. 3), on reconnaît aisément le fragment relativement épais prélevé sur l'animal ou provenant du passage précédent. Ce *fragment initial* est entouré d'une zone plus ou moins large et mince. Cette *zone marginale ou auréole de croissance* se compose avant tout des cellules néoformées in vitro. Nous trouvons ici sans difficulté un grand nombre de mitoses que nous pouvons compter à intervalles réguliers sans gêner leur évolution, comme nous le verrons en détail plus loin.

Au cours de la première phase de la *mitose* (fig. 4), la *prophase,* les cellules s'arrondissent et fréquemment, par absorption de liquide, le volume cellulaire augmente. Les nucléoles et la membrane nucléaire disparaissent. Les chromosomes, plus ou moins masqués dans le noyau métabolique, deviennent progressivement visibles. A ce stade les chromosomes, bientôt fort réfringents, sont encore longs, minces, et forment un peloton épais, le spirème. Un phénomène chimique corrélatif de l'apparition optique des chromosomes est la synthèse de l'acide desoxyribonucléique.

Au début de la deuxième phase, la *métaphase,* on voit une cellule dont les chromosomes se meuvent d'une façon désordonnée visible sur les films accélérés (*pré-métaphase*). Dans une deuxième période de la métaphase apparaissent les fibres du fuseau qui résulte en quelque sorte d'une coagulation intracellulaire. On peut observer ce fuseau au microscope à contraste de phase ou en lumière polarisée. Sous son influence, les chromosomes, auxquels les fibres fusoriales se fixent, s'ordonnent en une *plaque équatoriale.* Si la plaque persiste quelque temps, on constate alors sur les films des mouvements coordonnés des chromosomes qui ont subi entre temps une division longitudinale. La troisième phase, l'*anaphase,* se déroule relativement vite. Elle est caractérisée par la séparation du matériel chromosomique : en général immédiatement après leur disposition en plaque équatoriale, les deux moitiés des chromosomes se dirigent vers les pôles de la cellule. Ce phénomène est conditionné par la contraction des fibres du fuseau, qui perdent — de ce fait — leur biréfringence. Si la formation fusoriale est

troublée (par exemple sous l'action de la colchicine) alors la migration polaire ne se fait pas. Les deux groupes de chromosomes atteignent le plus souvent la fin de leur migration peu de temps avant l'étranglement du cytoplasme, premier acte de la *télophase*. Le corps cellulaire qui s'est progressivement étiré dans l'axe des pôles s'étrangle maintenant au niveau du plan équatorial; finalement il ne reste plus qu'un pont cytoplasmique très mince entre les deux cellules-filles. Le film met en évidence à ce moment de très forts mouvements de la surface cellulaire, mouvements consécutifs aux modifications d'imbibition du cytoplasme. Au cours de la deuxième période de la télophase, les chromosomes redeviennent plus longs et plus minces; dans chaque cellule-fille se reforme un spirème semblable à celui de la prophase. Anaphase et cytodiérèse sont

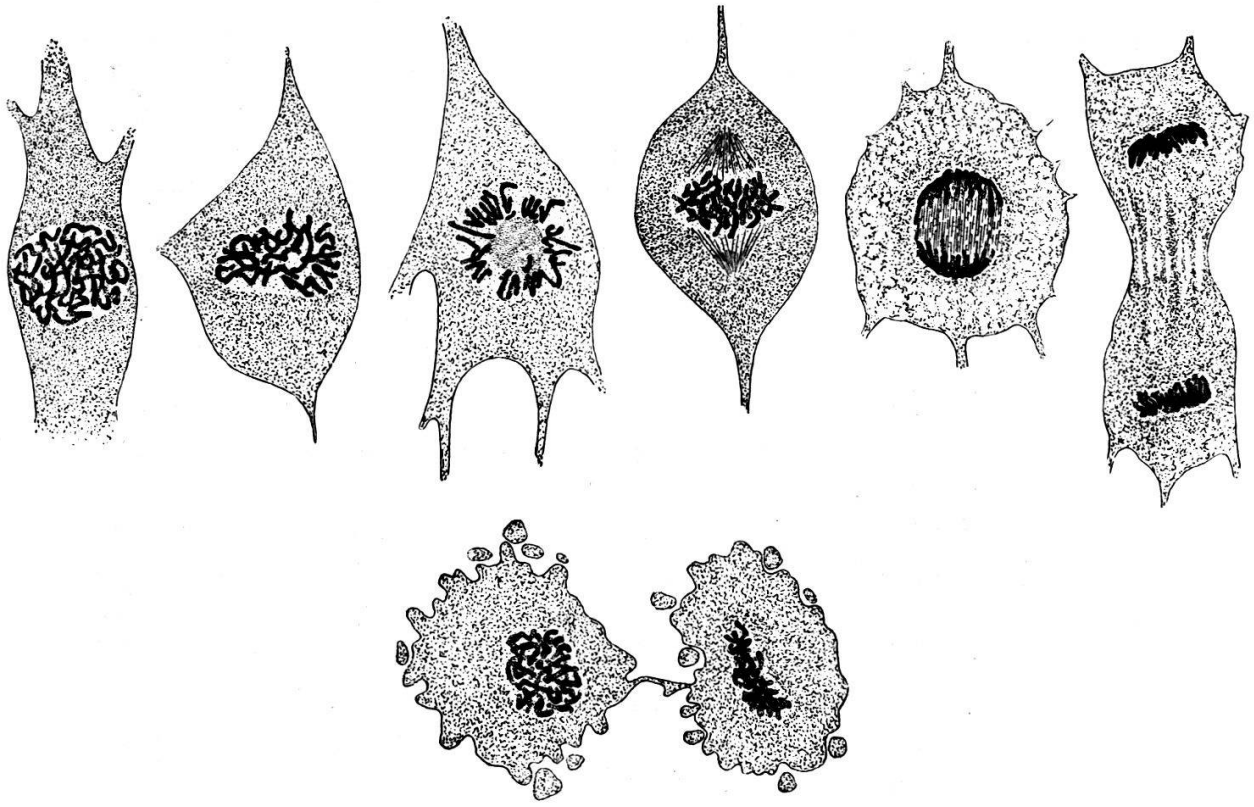

FIG. 4. — Différentes phases mitotiques de fibrocytes cultivés in vitro. Coloration à l'hématoxyline ferrique. Grossissement 1000 fois.

a) prophase. *b*) premier stade de la métaphase. *c*) deuxième stade de la métaphase (plaque équatoriale), vue de face. *d*) deuxième stade de la métaphase (plaque équatoriale), vue de profil. *e*) anaphase. *f*) premier stade de la télophase. *g*) deuxième stade de la télophase. (Tiré de O. BUCHER, Histologie, Berne [1], 1948).

[1] Nous remercions la maison d'Edition Hans Huber, à Berne, d'avoir bien voulu mettre à notre disposition le cliché de la figure 4.

deux manifestations associées l'une à l'autre. Si la télophase ne s'achève pas, il en résulte une cellule à deux noyaux.

Dans la dernière phase de la division cellulaire, appelée *phase de reconstruction,* le noyau reprend sa forme métabolique (« noyau au repos ») : la colorabilité et la réfringence des chromosomes diminuent; les nucléoles réapparaissent, de même que la membrane nucléaire. Les cellules des cultures qui se sont arrondies dans la prophase s'étalent de nouveau. La surface cellulaire se trouve ainsi agrandie et les échanges métaboliques favorisés. *La division cellulaire complète* des fibrocytes cultivés in vitro *dure* environ 40 à 50 minutes en moyenne, comme nous avons pu le calculer à partir de nos films. L'anaphase commence en général très peu après le milieu de la durée totale d'une mitose normale.

L'activité mitotique peut être *influencée expérimentalement* par toutes sortes de facteurs. Ceux-ci ne peuvent être étudiés nulle part aussi bien que dans la culture de tissu car elle permet de suivre leur action directement sur la cellule vivante, alors qu'avec des animaux d'expérience, en général, on peut travailler seulement sur des préparations histologiques fixées.

Quelques exemples montreront comment nous procédons à *l'analyse de l'action d'une substance antimitotique* dans notre laboratoire. Les substances en question sont introduites à la concentration désirée soit dans le milieu de culture, soit aussi — en particulier pour les expériences de courte durée — dans le creux du porte-objet sur lequel nous montons la lamelle portant la culture.

On obtient une première idée de l'action d'un poison de la mitose en dénombrant à des intervalles déterminés — par exemple toutes les deux heures — les mitoses dans la zone marginale. Pour éviter un refroidissement des cultures, nous utilisons toujours un microscope à platine chauffante. Tous les chiffres obtenus sont calculés en % du nombre des mitoses comptées au début de l'expérience. Ensuite les résultats sont comparés à ceux obtenus de la même manière dans des cultures témoins. La représentation graphique (fig. 5) dans laquelle nous portons en ordonnée le pourcentage des mitoses et en abscisse le temps, nous donne des courbes que l'on peut appeler *courbes de fréquence mitotique.* Je peux démontrer ceci au moyen d'essais dans lesquels nous avons utilisé la colchicine et la trypaflavine (O. Bucher, 1939, 1947 a). D'emblée nous voyons que les nombres de mitoses dans nos différentes séries d'expériences de contrôle comportent également une certaine dispersion. Nous ne pouvons pas ignorer ces différences individuelles

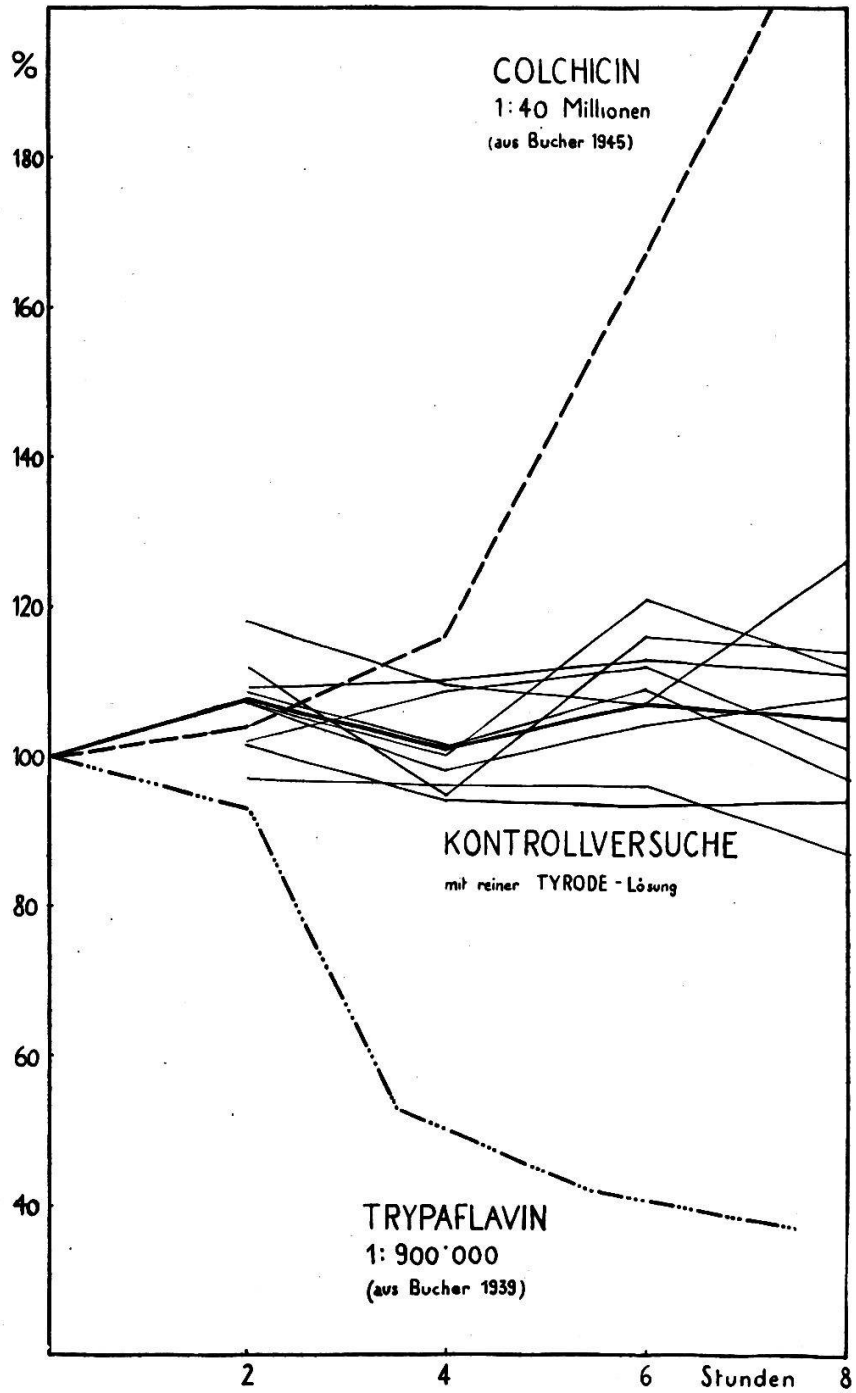

FIG. 5. — Courbes de fréquence mitotique, obtenues en dénombrant, à des intervalles de deux heures environ, les mitoses dans l'auréole de croissance. Ces chiffres, calculés en % du nombre des mitoses comptées au début de l'expérience, sont portés en ordonnée et le temps en abscisse.

Notez que le pourcentage des mitoses dans les cultures témoins présente une certaine dispersion due à la vitalité individuelle des différentes séries de cultures. Cependant la courbe ascendante obtenue à partir des cultures traitées à la colchicine (1 : 40.000.000) et la courbe descendante des essais à la trypaflavine (1 : 900.000) s'écartent fortement de la zone de dispersion des témoins.

Tiré de O. BUCHER, *Vierteljahresschrift d. naturforsch. Ges. Zurich,* 1947).

de vitalité et c'est pourquoi nous devons être extraordinairement attentifs lorsque nous interprétons les résultats. Si nous considérons maintenant la courbe de fréquence mitotique obtenue sous l'action de la *colchicine* à la concentration d'un 40 millionième, nous voyons qu'après un certain temps de latence se manifeste une très forte augmentation du nombre des mitoses, alors que la courbe de fréquence donnée sous l'influence de la *trypaflavine* à un 900 millième descend fortement. Les deux courbes se distinguent très nettement de la zone de dispersion des résultats obtenus dans les témoins. Nous pouvons donc, sur la base de ces simples dénombrements, conclure déjà avec certitude que la mitose est influencée par ces deux agents, mais différemment.

Discutons d'abord un peu plus en détail l'*action de la colchicine* et examinons, sur la figure 6, *l'augmentation du nombre des mitoses* dans les cultures vivantes en fonction de la concentration du poison et de la durée d'expérience; le résultat est véritablement impressionnant.

Nous devons maintenant nous demander comment on peut expliquer une telle accumulation de figures mitotiques dans l'auréole de croissance. *Deux possibilités d'interprétation* se présentent (cf. O. Bucher, 1945 b). On pourrait expliquer cette observation par une *excitation de l'activité mitotique*; autrement dit elle serait due à ce qu'un plus grand nombre de cellules entreraient en division dans un certain laps de temps. L'augmentation du nombre des figures mitotiques observables pourrait aussi être interprétée autrement, dans ce sens qu'il n'y aurait pas davantage de cellules entrant en mitose, mais que la division étant rendue plus difficile, ce qui entraîne une *prolongation du temps* nécessaire, un plus grand nombre de cellules resteraient au stade de mitose. Il s'agit donc d'une équation à deux inconnues : le coefficient mitotique (en tant que mesure de l'activité divisionnelle) et la durée de la mitose. Avec la seule méthode de numération des mitoses, que ce soit en cultures de tissus ou sur des préparations histologiques provenant d'animaux d'expérience ou de biopsies, nous ne pouvons pas résoudre la question posée.

C'est la raison pour laquelle nous utilisons une deuxième méthode d'appréciation : *l'analyse dynamique par le film*. Voici les résultats d'un film qui a été obtenu au cours d'une expérience d'à peu près 10 heures avec une culture soumise à l'action de la *colchicine* à une concentration d'un 20 millionième. Dans les 2-3 premières heures, les mitoses se déroulent dynamiquement et morphologiquement d'une façon normale. Dans les

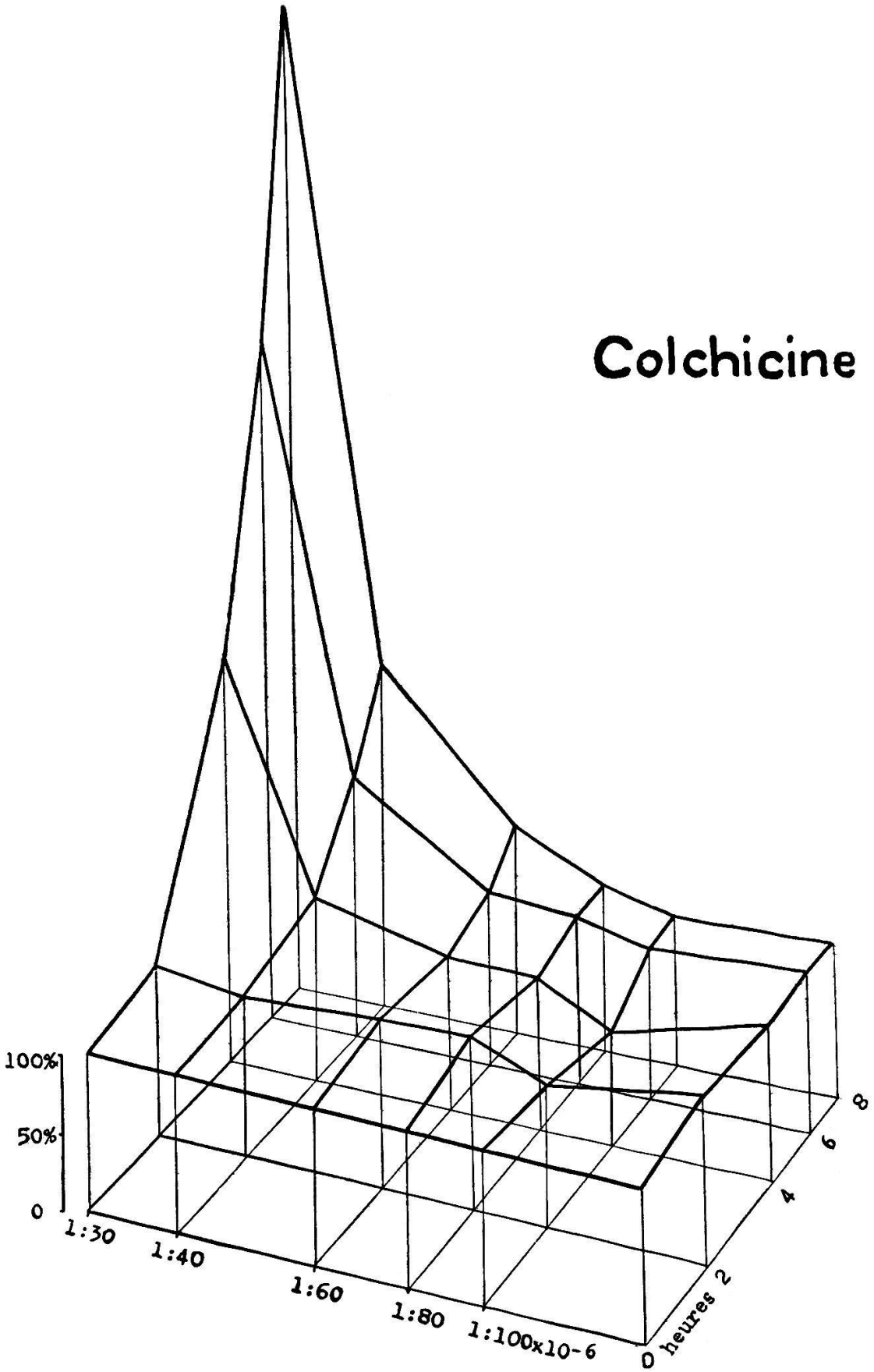

FIG. 6. — Représentation graphique du nombre des mitoses comptées dans l'auréole de croissance de cultures de fibrocytes, en fonction de la concentration de la colchicine et du temps d'expérience. (On a employé pour reporter ces deux dernières valeurs l'échelle logarithmique).

périodes suivantes, nous constatons que les mitoses s'arrêtent de plus en plus fréquemment à la métaphase. Les cellules manifestent de très forts mouvements amiboïdes et essaient inlassablement de se diviser, mais elles ne parviennent que très rarement à mener à bien la cytodiérèse (pour plus de détails, voir O. BUCHER, 1939).

De tels *films de la mitose* peuvent être appréciés quantitativement; pour cela on détermine d'abord le nombre d'images appartenant à chaque mitose ou à certains stades caryocinétiques. Ensuite leur durée peut être calculée à partir du nombre d'images et de la fréquence des prises de vues par minute.

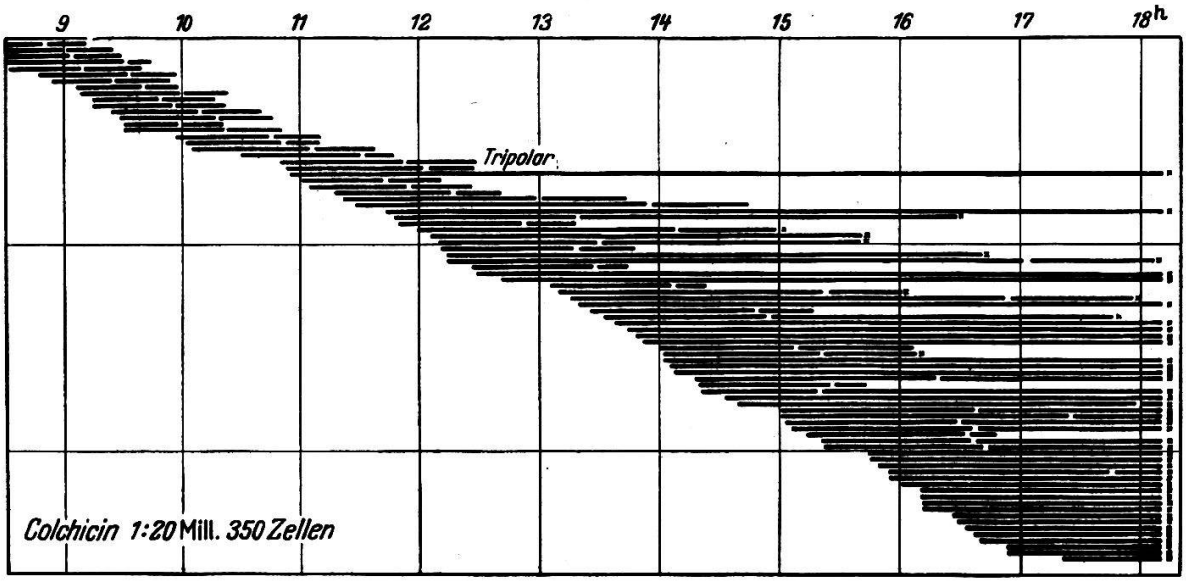

FIG. 7. — Graphique représentant l'allure divisionnelle, établi d'après un film d'une culture soumise à l'action de la colchicine à 1 : 20 millions. La prise de vues à cadence ralentie a duré 9 heures 50 minutes, à raison d'une image toutes les 30 secondes.
(Tiré de O. BUCHER, *Z. Zellforsch. 29*, 1939).

Graphiquement représentés, ces résultats nous offrent une image très exacte de l'allure divisionnelle d'une culture (fig. 7). Chaque trait représente une mitose; l'interruption du trait caractérise le moment de la cytodiérèse achevée. La longueur du trait représente la durée de la mitose. L'inclinaison de la courbe, définie par les points marquant le début des mitoses, nous donne une idée de la valeur du coefficient mitotique : cette courbe s'inclinerait de plus en plus à mesure qu'augmenterait le nombre des cellules entrant en division au cours d'une heure.

Nous voyons que sous l'action de la colchicine à partir de la deuxième heure d'expérience déjà, la durée de la division

s'allonge de plus en plus et qu'à partir de la sixième heure la plus grande partie des mitoses ne s'achève plus. Nous observons par conséquent à un moment donné un nombre toujours plus grand de stades de division; cette accumulation de mitoses s'explique par le fait que les cellules continuent à entamer la mitose, mais que toutes les cellules qui sont entrées en division y ont été bloquées. Le coefficient mitotique n'est pas du tout augmenté — au contraire, comparé avec les expériences de contrôle il a même quelque peu diminué — de sorte que l'augmentation considérable des mitoses visibles que nous avons établie par les courbes de fréquence mitotique se révèle une conséquence de la prolongation de la durée divisionnelle.

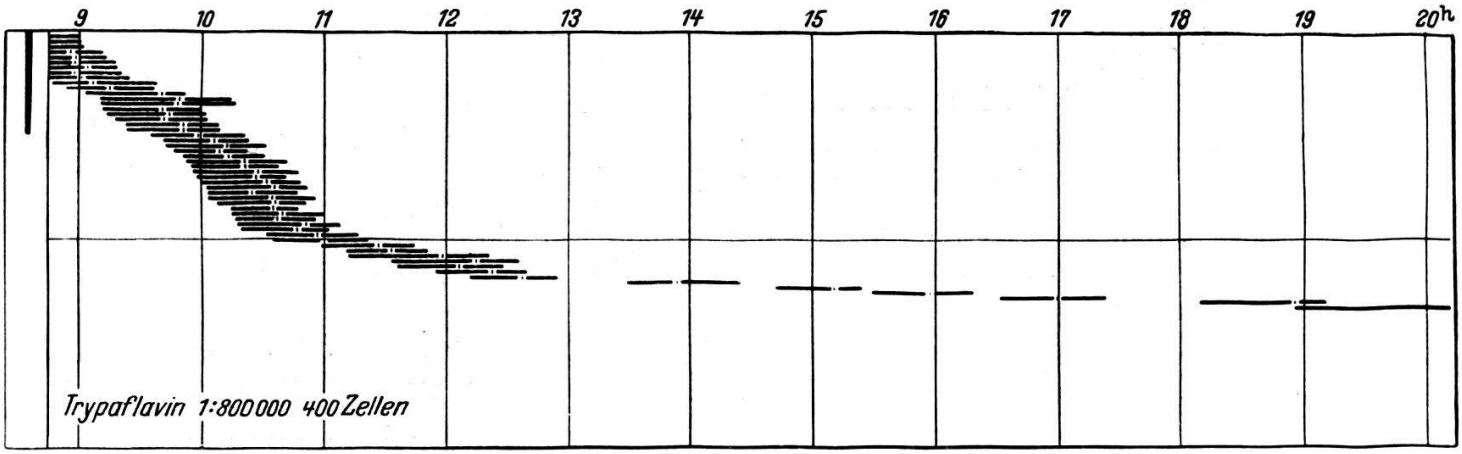

FIG. 8 — Graphique représentant l'allure divisionnelle, établi d'après un film d'une culture soumise à l'action de la trypaflavine à 1 : 800.000. La prise de vues à cadence ralentie a duré 11 ½ heures, à raison d'une image toutes les 15 secondes.
(Tiré de O. BUCHER, *Z. Zellforsch.* *29*, 1939).

La *trypaflavine* agit d'une manière entièrement différente. On se rappelle les courbes de fréquence mitotique (fig. 5). Considérons le résultat obtenu par le film accéléré avec des cultures traitées par une concentration de 1 : 800.000 (fig. 8). Il est exactement l'inverse de celui que nous avons obtenu lors des expériences avec la colchicine. Les films tournés sur des cultures influencées par de la trypaflavine nous démontrent que l'amorce de la mitose devient de plus en plus difficile, voire presque impossible après une exposition prolongée à l'action du poison. En premier lieu, on constate donc la forte diminution du coefficient mitotique. Les quelques mitoses qui se produisent encore occasionnellement se réalisent cependant dans une durée plus ou moins normale. La courbe de fréquence

mitotique donne cette fois — contrairement à celle de la colchicine — une vraie image de l'activité caryocinétique, car dans ce cas nous pouvons considérer la deuxième inconnue de notre équation, c'est-à-dire la durée de la mitose, comme pratiquement constante.

La *colchicine et la trypaflavine* agissent dans le détail — comme nous venons de le voir — d'une manière entièrement différente sur la destinée de la division. Dans le premier cas — que l'on peut nommer effet colchicinique — la mitose est bloquée à la métaphase; il n'y a pas d'arrangement ordonné des chromosomes à la plaque équatoriale parce que la formation du fuseau est perturbée. Dans le deuxième cas — on peut parler de l'effet trypaflavinique — c'est l'entrée en mitose qui est inhibée,

Malgré ces différences d'action sur la division de la cellule, l'*effet final sur la croissance* numérique est en principe le même; c'est-à-dire une inhibition de la prolifération du tissu (cf. O. Bucher, 1950 a, fig. 4). Dans le cas de l'effet trypaflavinique, cette inhibition est conditionnée par l'absence de divisions, celles-ci ne pouvant plus commencer; dans le cas de l'effet colchicinique, les divisions, bien que capables de commencer, ne peuvent pas s'achever.

Le traitement des cultures de tissus à *l'arsenic* (cf. O. Bucher, 1940), par exemple, donne du point de vue dynamique des résultats semblables à ceux du traitement à la colchicine, excepté qu'il est nécessaire d'utiliser des concentrations environ 50 fois plus grandes. On reconnaît la frappante similitude avec l'effet colchicinique dans la courbe de fréquence mitotique (O. Bucher, 1950 a, fig. 2). L'augmentation du nombre des figures mitotiques, si l'on emploie des concentrations assez fortes, est aussi due à un allongement de la durée de la caryocinèse, alors que le coefficient mitotique est quelque peu diminué, ce qui peut être prouvé de nouveau par la microcinématographie.

L'action de l'*uréthane* enfin (cf. O. Bucher, 1947 b, 1949, 1950 a), pour citer rapidement un autre poison de la mitose, est plus difficile à interpréter et rappelle l'effet trypaflavinique. Une concentration d'uréthane de 1:200 — donc une concentration beaucoup plus forte — diminue également le cœfficient mitotique. Cependant, les cellules qui ont réussi à franchir la difficulté de l'entrée en mitose peuvent l'achever sans que la durée mitotique soit prolongée.

L'uréthane et l'arsenic malgré leur action différente à hautes doses ont toutefois aussi une action commune : ces deux substances sont capables à faibles doses d'augmenter le coefficient mitotique.

La croissance des cultures de tissus peut en outre être appréciée en *mesurant planimétriquement tous les jours la surface de l'auréole de croissance* et en portant ces valeurs dans un système de coordonnées. Cette méthode n'est cependant pas très exacte et ne donne qu'une impression relativement grossière (cf. O. BUCHER, 1945 b, fig. 3 et 1949, fig. 1).

Nous voudrions encore parler d'une autre méthode d'analyse qui est particulièrement sensible. Cette méthode pourtant, contrairement à toutes les méthodes d'évaluation décrites précédemment, ne se pratique pas sur des cellules vivantes, mais sur des préparations fixées et colorées après une certaine durée d'expérimentation. Nous comptons alors les *différentes phases*

a b_1 b_2 c d_1 d_2 e

FIG. 9. — Représentation graphique de la fréquence relative des différentes phases de la mitose en pourcent du total des mitoses : formule mitotique.

a) prophase. b_1) premier stade de la métaphase (prémétaphase). b_2) deuxième stade de la métaphase (plaque équatoriale). c) anaphase. d_1) premier stade de la télophase. d_2) deuxième stade de la télophase. e) phase de reconstruction.

Tiré de O. BUCHER, *Vierteljahresschrift d. naturforsch. Ges. Zurich*, 1947).

de la mitose dont nous avons parlé (fig. 4) et nous calculons leur apparition en % du nombre total de mitoses. Nous procédons donc à l'égard des différentes phases mitotiques selon le même principe que le médecin établissant la formule sanguine à l'égard des différentes espèces de globules blancs, et par analogie avec la formule sanguine nous parlons d'une *formule mitotique*.

Le résultat de la numération des différentes phases de 6000 mitoses obtenues dans 142 cultures de tissu conjonctif normal est le suivant (fig. 9) : environ la moitié des mitoses se trouvent au stade de la prophase (18,5 %) et de la métaphase (prémétaphase 21 %, stade de la plaque équatoriale 13,5 %) alors que l'autre moitié comporte les anaphases (5,6 %), les télophases (prétélophase = le stade de séparation des corps cellulaires 6,9 %, et télophase tardive avec les cellules-filles non encore étalées 9,5 %) et les phases de reconstruction (25 %). Ces phases de reconstruction sont difficiles à différencier des prophases qui viennent de commencer. Elles représentent en moyenne un quart de toutes les mitoses et nécessitent —

si l'on s'exprime dynamiquement — environ un quart de la durée totale de la mitose.

Or, nous pouvons agir par des agents appropriés sur chacune des phases de la division, le plus facilement cependant au stade de la métaphase. Reportons-nous encore une fois à l'exemple de la *colchicine* dont l'action sur la mitose nous est déjà plus ou moins familière. Nous avons dit qu'elle agissait en perturbant la formation du fuseau et par conséquent aussi celle des plaques équatoriales; en d'autres termes : elle intervient en bloquant la

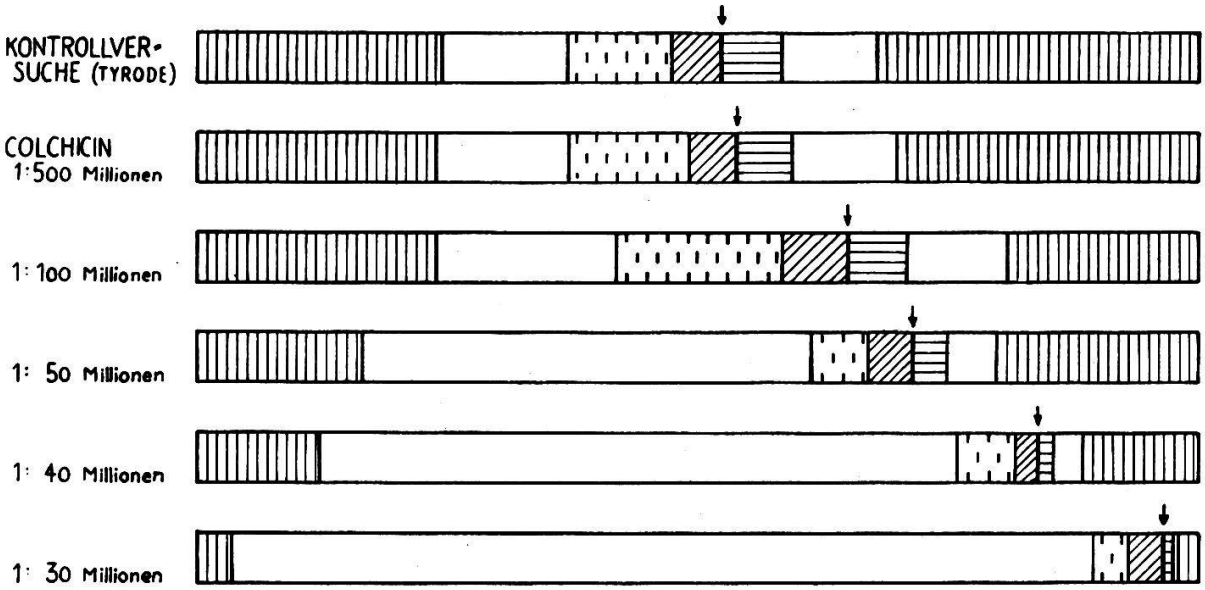

FIG. 10. — Représentation du déplacement dans le pourcentage des différentes phases de la mitose (cultures fixées après 9 heures de traitement à la colchicine).

Observer le déplacement à droite des anaphases — dont la fin est marquée ici d'une flèche verticale —, déplacement qui augmente avec la concentration.

Les stades de division sont symbolisés comme dans la figure 9.

Tiré de O. BUCHER, *Vierteljahresschrift d. naturforsch. Ges. Zurich,* 1947).

cinèse au stade de la prémétaphase. Les formules mitotiques mettent très bien en évidence ce phénomène (fig. 10). Les cultures ont été fixées en moyenne 9 heures après l'adjonction du poison à la concentration désirée. Nous reconnaissons qu'une concentration en colchicine de 1:100 millions provoque déjà une augmentation relative des métaphases et que, par conséquent, les anaphases — hachurées obliquement dans le diagramme — sont déplacées un peu vers la droite. On peut, en employant une fois de plus la terminologie hématologique, parler d'un

déplacement à droite des anaphases. Ce déplacement à droite s'accentue avec l'augmentation de la concentration. Si la concentration est de 1:30 000 000, le 86 % de toutes les mitoses sont des métaphases pathologiques.

Suivant la concentration l'action toxique peut varier non seulement en quantité mais aussi en qualité. Alors que de fortes concentrations influencent le plus fréquemment la métaphase et provoquent ainsi un déplacement des anaphases vers la droite, on peut par des concentrations faibles d'un certain nombre de substances, telles que la nicotine, l'uréthane, l'alcool, l'acétone, etc. modifier la deuxième moitié de la division; on obtient dans ce cas un déplacement des anaphases vers la gauche (cf. O. Bucher, 1947 a, fig. 8).

Avec l'augmentation de la concentration d'un poison de la mitose, la perturbation consécutive est plus forte, et en outre moins spécifique. Il est particulièrement intéressant de travailler avec les concentrations limites. Les premières recherches doivent toujours tenter de déterminer cette zone de concentration.

Considérons maintenant la *sensibilité des méthodes d'appréciation.* Un bon exemple pour la comparaison sera de nouveau celui que nous offre la colchicine. Par le dénombrement des mitoses dans la zone marginale des cultures vivantes de tissu conjonctif et par l'établissement des *courbes de fréquence mitotique* (fig. 5) nous pouvons encore saisir des concentrations du poison de 1 : 60 millions dans une période de recherches de 9-10 heures. La *formule mitotique* (fig. 10) montre déjà pour une concentration de 1 : 100 millions un déplacement significatif vers la droite. Nous avons cependant trouvé une méthode encore beaucoup plus sensible (O. Bucher, 1945 a). Un indicateur extrêmement fin pour l'appréciation de l'action d'un poison de la mitose est *le comportement des cellules en division à la métaphase.* Des altérations même très faibles entraînent souvent une augmentation des métaphases pathologiques, — pathologiques surtout en ce sens que des chromosomes sont déplacés.

Pour cette raison, après avoir mis en évidence les chromosomes en traitant nos préparations par la réaction de Feulgen, nous avons procédé au dénombrement des métaphases normales et pathologiques aussi bien dans la prémétaphase que dans le stade de la plaque équatoriale. Le résultat nous donne la *formule métaphasique* telle que la représente graphiquement la figure 11. La totalité des métaphases dans le premier stade (b_1)

et dans le deuxième stade (b_2) est donnée en % de toutes les phases de la division, la fréquence des formes pathologiques (b_1* et b_2*) en % du nombre des stades mitotiques considérés. Nous reconnaissons, comme dans la formule mitotique, la légère augmentation des deux stades métaphasiques, après l'action d'une concentration de un cent-millionnième de colchicine. Alors que la fréquence des prémétaphases augmente avec la concentration, les plaques équa-

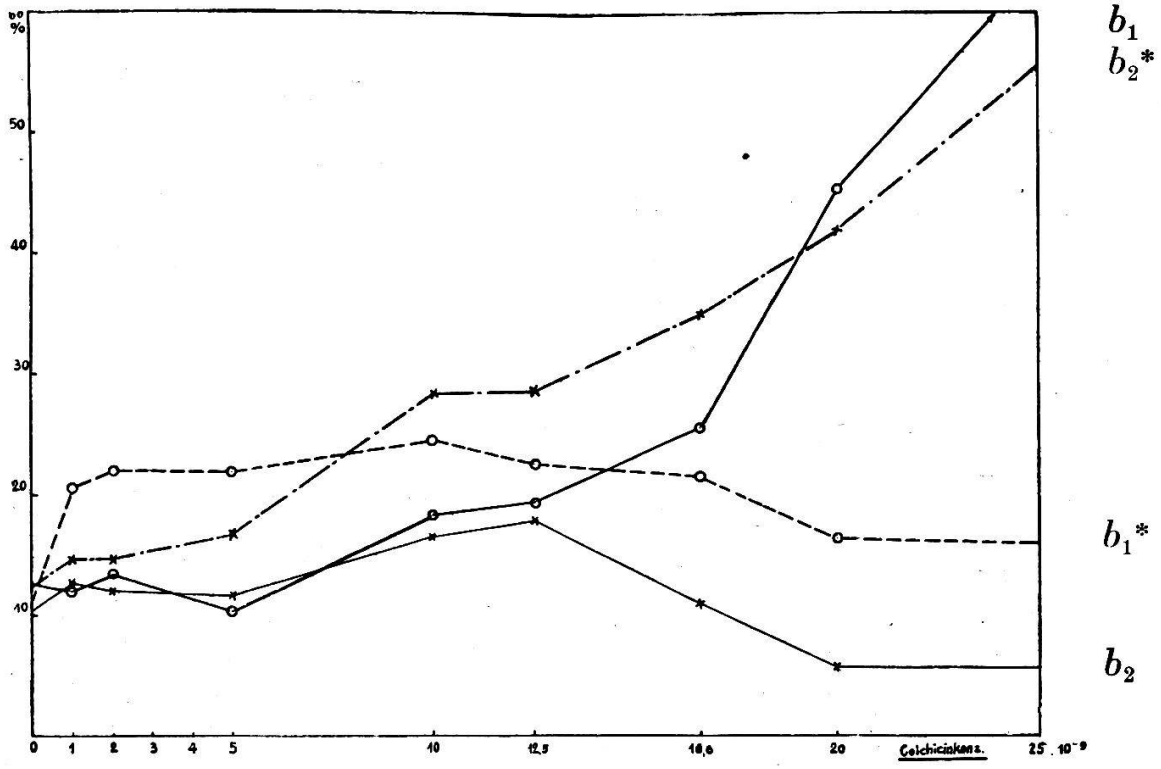

FIG. 11. — Pourcentage des métaphases (formule métaphasique) après action de colchicine à des concentrations variant entre 1 : 1 milliard (1.10^{-9}) et 1 : 40 millions (25.10^{-9}). Voir les détails dans le texte.

Tiré de O. BUCHER, *Vierteljahresschrift d. naturforsch. Ges. Zurich,* 1947).

toriales diminuent relativement. Mais le comportement des chromosomes est bien plus sensible. Déja pour une concentration de colchicine d'un milliardième, le pourcentage des prémétaphases avec chromosomes disloqués est presque doublé (on trouve ici 20,5 % par rapport aux 11 % des cultures témoins) [1].

[1] Si étonnant qu'il paraisse de prime abord que l'action d'une concentration en colchicine d'un millardième puisse encore être observée sur des cultures de tissus, on se rendra compte que dans un cm³ d'une telle solution existent encore environ 1500 milliards (1.5×10^{12}) de molécules de colchicine, ainsi qu'on peut le calculer à partir du poids moléculaire et du nombre de Lohschmidt.

Il est bien entendu que la *morphologie pathologique de la mitose* représente un chapitre important dans l'étude systématique d'un poison antimitotique. La place nous manque pour discuter plus en détail cette question dans le cadre de cet exposé. Nous n'avons signalé, parmi toutes les altérations de la mitose, que les *chromosomes disloqués* parce que d'une part ils peuvent nous servir de symptômes-tests pour établir la formule métaphasique et que, d'autre part ces perturbations sont particulièrement fréquentes dans les cultures traitées par des substances cancérigènes ou par des hormones sexuelles, ainsi que dans les tumeurs elles-mêmes.

Après traitement par la colchicine (O. Bucher, 1946) ou avec le Nitrogen Mustard (Hughes et Fell, 1949) les *mitoses multipolaires* sont aussi plus fréquentes.

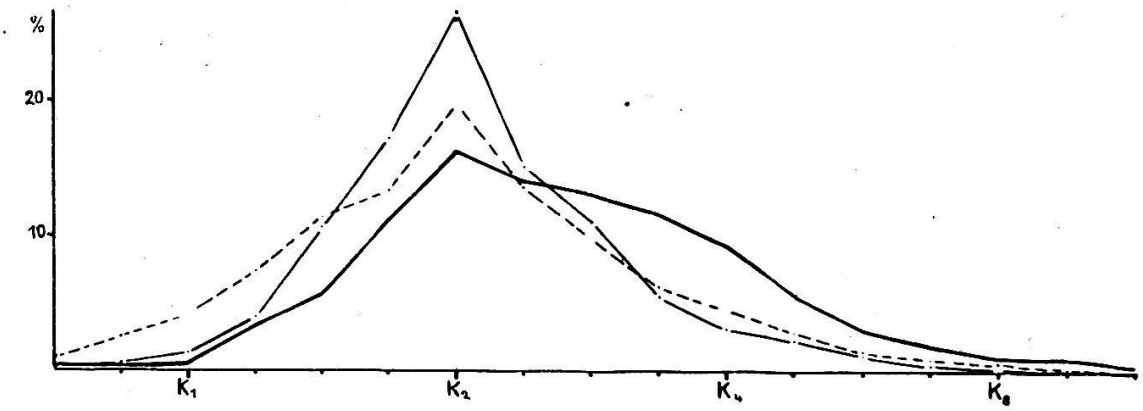

Fig. 12. — Courbes de fréquence des grandeurs nucléaires. La grandeur des noyaux est portée en abscisse selon l'échelle logarithmique, et les fréquences correspondantes — en pourcent — en ordonnées.

La courbe — qui est étirée à droite — représente les fréquences obtenues sur les cultures ayant subi une application de colchicine (1650 noyaux).

La courbe ------ représente les variations obtenues sur les cultures-témoins (600 noyaux), la courbe ———— . celles trouvées dans d'autres séries de cultures non influencées (2700 noyaux).

Il pourrait sembler paradoxal de vouloir parler de l'action d'un poison de la mitose, comme par exemple la colchicine, sur des cellules dites « au repos » — ou plutôt cellules métaboliques — c'est-à-dire qui ne se divisent pas. Dans ce but, nous avons procédé à la *mesure* de milliers *de noyaux* après avoir élaboré une méthode adéquate. Nous ne parlerons pas ici des problèmes assez compliqués de la méthode (pour détails voir O. Bucher, 1950 d, Bucher et Gattiker, 1950 a, 1950 b, Bucher et Horis-

BERGER, 1950). La figure 12 résumera seulement les variations de grosseur des noyaux dans des cultures de tissu conjonctif non traitées et traitées à la colchicine. La courbe des variations obtenues sur les cultures témoins est élancée et plus ou moins symétrique; elle présente un maximum de fréquence à la classe de volume K_2. Pour les cultures influencées par la colchicine, la courbe de fréquence du volume nucléaire est asymétrique, fortement étirée à droite, et par conséquent elle présente une base plus large. Le maximum de fréquence en K_2 n'est que faiblement marqué et ne comprend plus que les deux tiers environ de la valeur de la courbe témoin. On constate en revanche qu'il existe à peu près trois fois plus de noyaux dans la classe K_4 dont le volume nucléaire moyen est deux fois plus grand que dans la classe K_2. On interprète cette observation comme une tendance à la polyploïdie. A notre connaissance, c'est la première fois qu'une polyploïdie expérimentale est décrite dans les cellules animales cultivées in vitro. En outre, le nombre des *cellules à deux ou plusieurs noyaux* est augmenté dans des cultures traitées par la colchicine.

L'extraordinaire action des poisons antimitotiques à l'égard de la caryocinèse ne doit pas pour autant faire perdre de vue l'existence du problème de l'*amitose*, c'est-à-dire de la division cellulaire directe. La division cellulaire amitotique joue sûrement dans l'organisme un plus grand rôle qu'on ne l'a cru pendant fort longtemps. Dans les cultures de tissus non traitées, les amitoses sont très rares; mais sous l'influence de diverses conditions expérimentales et, d'après nos travaux sous l'influence de la colchicine également (cf. O. BUCHER, 1947 c), les amitoses augmentent. Nous pensons qu'il s'agit d'un effet indirect du traitement à la colchicine, lié à des modifications de l'organisation interne de la cellule, en particulier à la polyploïdisation.

Au cours des 10-15 dernières années de recherches sur les *poisons de la mitose*, on a beaucoup cherché à les classer. Le *principe d'une classification*, telle que je pourrais la concevoir sur la base de la littérature et de nos propres expériences, fera l'objet de mes dernières remarques.

Nous devons tout d'abord établir clairement qu'il existe des substances antimitotiques exerçant une *action directe* sur la division cellulaire et d'autres une *action indirecte*. Ces dernières influencent les mécanismes de régulation de l'organisme tout entier, qui ensuite agissent eux-mêmes sur la division cellulaire. Les actions directes et indirectes pourraient aussi être combinées. Il en résulterait que l'action cytotoxique directe serait modifiée

d'une manière déterminée par l'addition d'actions superordonnées, ce qui n'est pas tout à fait exclu pour la colchicine. Ceci pourrait expliquer les divergences d'interprétation des recherches de A.-P. Dustin et de nos résultats personnels.

Les *poisons de la mitose possédant une action directe* sur la division cellulaire peuvent être étudiés non seulement sur des animaux d'expérience, mais aussi dans des cultures de tissus in vitro. Ces substances se prêtent particulièrement bien à l'étude dans les cultures, d'une part parce que les mécanismes régulateurs humoraux et nerveux y sont rompus et que nous travaillons par conséquent dans des conditions plus simples et plus exactement déterminables, d'autre part — j'espère l'avoir montré — parce que dans cette méthode nous avons à disposition des techniques d'appréciation qu'on ne pourrait pas utiliser dans les expériences sur des animaux.

La plus grande partie des poisons de la mitose étudiés jusqu'à présent ont, malheureusement, la même *action sur la cellule normale* que sur *la cellule tumorale*. Cependant toutes ces recherches, qui sont finalement orientées vers la chimiothérapie des tumeurs, devraient aboutir à mettre en évidence des poisons antimitotiques qui, à concentration appropriée, n'agiraient pas sur les cellules normales mais seulement sur les cellules tumorales, dont le métabolisme est quelque peu différent. Que ce soit possible en principe, cela ressort des observations suivantes de H. Lettré (1941, 1950). Si l'on traite des cultures de fibrocytes avec de l'adrénaline, on observe une action toxique sur la mitose. Si l'on ajoute de plus un réducteur, comme par exemple la vitamine C ou le glutathion, la perturbation ne se manifeste pas, alors que l'adjonction d'un oxydant, comme par exemple la paraquinone, maintient l'action antimitotique. Le poison n'est donc pas l'adrénaline elle-même, mais un produit d'oxydation formé dans la cellule normale. (Du même coup nous reconnaissons que des substances synthétisées dans le corps-même pourraient avoir un rôle régulateur sur la division cellulaire). Si l'on ajoute de l'adrénaline à une culture de tumeur, l'action antimitotique ne se manifeste pas. Lettré a interprété cette constatation de la manière suivante : la cellule tumorale — probablement en raison de son métabolisme particulier que nous connaissons encore trop peu — est capable d'inactiver le métabolisme perturbateur de l'adrénaline, probablement en le réduisant de la même manière que le fait la vitamine C dans les expériences sur les cellules normales. Il est possible que les cellules tumorales échappent à l'action des substances physiologiques susceptibles de freiner l'activité divi-

sionnelle. Théoriquement on doit pouvoir prendre le chemin inverse et appliquer au corps un antécédent chimique d'un poison antimitotique qui ne pourrait être transformé en forme active que dans les cellules tumorales-mêmes, de telle sorte que celles-ci en deviennent les seules victimes. Il existe pour les chimistes de très nombreuses possibilités de recherches dans cette direction et l'examen de toutes ces substances est de nouveau étroitement lié à la culture des tissus.

Schématiquement on a divisé les poisons agissant sur la cellule en *poisons plasmatiques* ou *poisons métaboliques* et en *poisons nucléaires* ou *poisons de la mitose* selon que les plus petites concentrations sont capables de déclencher l'une ou l'autre de ces deux actions (cf. Brock, Druckrey et Herken, 1939; H. Haas, 1941). Toutefois ces deux actions ne peuvent pas toujours être aussi nettement distinguées que dans le cas, par exemple, de la colchicine, un des poisons les plus spécifiques de la mitose. Dans le cadre de notre exposé seuls les poisons de la mitose au sens strict nous intéressent.

Sous le nom de *poisons de la mitose* ou poisons antimitotiques A.-P. Dustin a considéré, déjà en 1938, *deux types principaux* :

1. Les « *poisons inhibiteurs de la caryocinèse* » qui possèdent la propriété de diminuer l'activité mitotique et dont le représentant le plus caractéristique est la trypaflavine que nous avons décrite. Ce groupe comporte en gros les « *poisons mitotiques radiomimétiques* » de P. Dustin junior (1947) dont je cite la définition suivante : « poisons qui à l'instar des radiations ionisantes inhibent l'entrée en prophase en amenant la destruction pycnotique des noyaux prêts à se diviser ». Appartiennent encore à ce groupe l'uréthane et le Nitrogen mustard entre autres.

2. Les « *poisons stathmocinétiques* » comme par exemple la colchicine et l'arsenic. Dustin junior nous en donne la définition suivante : « substances capables d'arrêter les mitoses à la métaphase, en empêchant l'évolution normale de l'appareil fusorial et des centromères ». « Chez les animaux, des mitoses ainsi bloquées sont pour une très grande part incapables de poursuivre leur cours ». Du fait que le blocage de la division est suivi d'une destruction du noyau à des concentrations toxiques assez fortes, on peut aussi parler de « *poisons caryoclasiques* » (A.-P. Dustin) ou d'*antimitotiques destructeurs* (F. E. Lehmann, 1945).

H. Lettré (1949), qui en tant que chimiste s'est intéressé aussi aux points d'attaque des différents poisons dans la cellule,

définit les poisons de la mitose comme des antibiotiques réagissant avec des éléments constitutifs de la cellule ou déplaçant certaines substances chimiques qui sont en rapport étroit avec la division nucléaire et cellulaire. Ceci serait par exemple le cas pour la trypaflavine qui se combinerait aux purines et aux pyrimidines des acides nucléiques. De cette manière, la formation de l'acide thymonucléique aux dépens de l'acide ribonucléique, formation qui commence déjà avant que l'on saisisse morphologiquement la prophase, serait rendue plus difficile ou même empêchée. Par conséquent, à une concentration suffisante, il n'y aurait plus formation de chromosomes et l'entrée en mitose serait impossible. Ce seraient donc — toujours selon cette théorie — les processus chimiques préparant la prophase qui seraient inhibés. On peut, en ajoutant de l'acide ribonucléique ou thymonucléique aux cultures de tissus, annuler l'inhibition due à la trypaflavine.

L'action de certains poisons de la mitose peut donc être diminuée, ou même neutralisée complétement, par l'emploi d'*antagonistes*, et dans d'autres cas cette action antimitotique peut être accentuée par l'action de *substances synergiques*. De telles recherches ne précisent pas seulement de nombreuses inconnues sur les points de fixation des poisons de la mitose dans la cellule, mais encore nous renseignent sur les processus chimiques dont la cellule est le siège.

Le lecteur appréciera lui-même le rôle joué par la culture des tissus dans les recherches concernant les poisons de la mitose. Il importe cependant de ne pas oublier que le tableau qui vient d'être esquissé de l'étude des poisons antimitotiques ne présente qu'une partie des possibilités offertes par la culture des tissus dans le cadre des recherches biologiques et médicales modernes.

BIBLIOGRAPHIE

BROCK, N., DRUCKREY, H. und HERKEN, H. — Ueber Kerngifte und Cytoplasmagifte. *Arch. exper. Pathol. 193*, 679-687, 1939.

BUCHER, O. — Der Einfluss von Colchicin und Trypaflavin auf den Wachstumsrhythmus und auf die Zellteilung in Fibrocytenkulturen *Z. Zellforsch. 29*, 283-322, 1939.

— Die Wirkung von Arsenik auf Fibrocytenkulturen. *Z. Zellforsch. 30*, 438-462, 1940.

— La culture des tissus. *Revue Ciba N° 20*, 645-684, 1942.

— Ueber die Wirkung sehr kleiner Colchicindosen nach Untersuchungen an in vitro gezüchteten Bindegewebeszellen. *Journal suisse de médecine 75*, 715-718, 1945 (a).

BÜCHER, O. — Hemmt oder fördert Colchicin die Zellteilung ? *Revue suisse de Zoologie 52*, 535-550, 1945 (b).

— Tripolare und tetrapolare Mitosen in Gewebekulturen von Kaninchen-Fibrocyten. Verhandl. d. Anat. an schweiz. Hochsch., Bern 1946; réf. *Bull. d'Histol. appl. 23*, 189-190, 1946.

— Cytopharmakologische Untersuchungen an Gewebekulturen in vitro. *Vierteljahresschr. Naturforsch. Ges. Zürich 92*, 221-238, 1947 (a).

— Zur Wirkung von Urethan auf Gewebekulturen in vitro. *Journal suisse de médecine 77*, 1929-1930, 1947 (b).

— Division nucléaire amitotique dans des cultures de fibrocytes après administration de colchicine. *Acta Anat. 4*, 60-67, 1947 (c)

— Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. Verlag Hans Huber, Bern 1948.

— Zur Wirkung von Aethylurethan auf den Teilungsrhythmus und den Teilungsverlauf in Gewebekulturen. Verhandl. d. Anat. an schweiz. Hochsch., Basel 1948; réf. *Bull. d'Histol. appl. 25*, 190-191, 1948.

— Die Wirkung von Aethylurethan auf die mitotische Zellteilung, untersucht an Gewebekulturen in vitro. *Helv. Physiol. Acta 7*, 37-54, 1949.

— Zur Wirkung einiger Mitosegifte auf die Gewebekultur. *Le Sang 21*, 382-389, 1950 (a).

— Frakturheilung in vitro. Verhandl. d. Anat. an schweiz. Hochsch., Fribourg 1949; réf. *Bull. d'Histol. appl. 27*, 15, 1950 (b).

— La vie cellulaire hors de l'organisme. *Revue méd. suisse romande 70*, 670-677, 1950 (c).

— Zur Methodik karyometrischer Untersuchungen an Gewebekulturen. *Mikroskopie 5*, 124-131, 1950 (d).

— Untersuchungen über die Regenerationsvorgänge an experimentell gesetzten Knochenbrüchen in der Kultur in vitro. *Acta Anat.* (sous presse).

— Karyometrische Untersuchungen an Gewebekulturen IV. Die experimentelle Beeinflussung der Kerngrösse durch Colchicin. *Arch. f. Vererbungsforsch. 26* (sous presse).

— und GATTIKER, R. — Karyometrische Untersuchungen an Gewebekulturen II. Die Kerngrössenverhältnisse in der unbehandelten Bindegewebekultur. *Acta Anat. 10*, 430-460, 1950.

— und GATTIKER, R. — III. Weitere Untersuchungen über die Kerngrössen in Kulturen von verschiedenen Geweben und von Geweben verschiedener Tiere. *Revue suisse de Zoologie 57*, 769-788, 1950.

— und HORISBERGER, B. — I. Zur Methodik der Kerngrössenmessung in Deckglaskulturen. *Acta Anat. 9*, 258-278, 1950.

— et WEIL, J.-TH. — L'influence d'un extrait osseux (Ossopan) sur la consolidation de fractures in vitro. *Experientia 7*, 38-40, 1951.

CAMERON, G. — Tissue Culture Technique. *Academic Press Inc., Publishers,* New-York 1950.

CHODKOWSKI, K. — Die karyoklastischen Gifte, ihr Einfluss auf den Organismus und ihre Bedeutung für die Pathologie (Sammelreferat). *Protoplasma 28,* 597-619, 1937.

DUSTIN, A.-P. — L'action des arsenicaux et de la colchicine sur la mitose. La stathmocinèse. *C. R. de l'Associat. des Anat. Bâle* 1938.

— A propos des applications des poisons caryoclasiques à l'étude des problèmes de pathologie expérimentale, de cancérologie et d'endocrinologie. *Arch. exp. Zellforsch. 22,* 395-405, 1938.

DUSTIN, P., *Jr.* — Quelques données récentes sur l'utilisation de la Chimiothérapie et des Radioisotopes dans la lutte contre le Cancer. *Bruxelles-Médical* 1947 (N° 48).

FELL, H. B. — Tissue Culture. The Advantages and Limitations as a Research Method. *Brit. Journ. Radiol. VIII, New Series, 85,* 27-31, 1935.

HAAS, H. — Ueber die Beeinflussung des Zellkerns durch Pharmaka. *Arch. exper. Pathol. u. Pharmakol. 197,* 284-291, 1941.

HUGHES, A. F.W. and FELL, H. B. — Studies on Abnormal Mitosis induced in Chick Tissue Cultures by Mustard Gas. *Quarterly J. Microscop. Science, 90,* part 1, 37-55, 1949.

LEHMANN, F. E. — Der Auf- und Abbau des Mitoseapparates beim Tubifex-Ei und seine stoffliche Beeinflussbarkeit. *Revue suisse de Zoologie 52,* 342-348, 1945.

LETTRÉ, H. — Mitosegiftforschung und ihre Beziehung zu Problemen der Enzymforschung. *Ergebnisse d. Enzymforsch. 10,* 269-301, 1949.

— Die Teilung normaler und bösartiger Zellen als biochemisches Problem. *Strahlentherapie 83,* 1-14, 1950.

— und ALBRECHT, M. — Zur Wirkung von β-Phenyläthylaminen auf in vitro gezüchtete Zellen. *Z. f. physiolog. Chemie 271,* 200-207, 1941.

LEVI, G. — La vita e l'acrescimento di parti separate dal tutto. *Centro di Studio per la Biologia,* vol. 1946.

VON MOELLENDORFF, W. — Ueber regulierbare Einwirkungen auf die Zahl und den Ablauf der Mitosen in Gewebekulturen. *Arch. exper. Zellforsch. 21,* 1-66, 1937.

— Die Phasenverteilung in der Fibrozytenkultur und deren Abwandlung durch Substanzzusätze. *Z. Zellforsch. 27,* 301-325, 1937.

— Durch carcinogene Kohlenwasserstoffe und Geschlechtshormone in Gewebekulturen erzielte Mitosenstörungen. *Klinische Wochenschrift 18,* 1098-1099, 1939.

VON MOELLENDORFF, W. — Mitosenschädigung durch Geschlechtshormone und das Tumorproblem. *Journal suisse de médecine 71*, N° 11, 1941.

PARKER, C. P. — Methods of Tissue Culture. 2nd edition. Paul-B. Hoeber, New-York, 1950.

STRANGEWAYS, T. S. P. — Technique of Tissue Culture « in vitro ». W. Heffer & Sons LTD., Cambridge 1924.

WEIL, J. TH. — La consolidation de fractures in vitro et l'influence de l'Ossopan. (Thèse Lausanne 1950). *Revue suisse de Pathol. générale et de Bactériol. 14*, 205-224, 1951.

Rédaction : Mlle Suzanne Meylan, professeur, Treyblanc 6, Lausanne.
Imprimerie Baud, avenue de l'Université 5, Lausanne.