Nº d'ordre 481

1980 178

50376

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

50376 19**8**0 178

THESE présentée à l'Université de Lille I pour l'obtention du grade de DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES par MAUD COLLYN d'HOOGHE

ETUDE MICROCINÉMATOGRAPHIQUE DE LA DURÉE DU CYCLE, DE LA DURÉE DE LA MITOSE ET DE LA PROBABILITÉ DE DIVISION DES CELLULES EMT6 SOUMISES OU NON A UNE IRRADIATION (RAYONS GAMMAS, IONS LOURDS)



Présentée le 19 Juin 1980, devant la commission d'examen

Président: M.M. DURCHON Examinateurs: M.M. G. BISERTE B. BOILLY E. MALAISE A.J. VALLERON

A LA MEMOIRE DE MON FRERE BRUNO,

A TOUTE MA FAMILLE et à TOUS MES AMIS.

Ce travail a été réalisé sous la direction de Monsieur le Professeur G. BISERTE, dans le Service de Biologie Cellulaire de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, Institut Jules Driessens, et de l'Unité 124 I.N.S.E.R.M.

Il a pu être mené à bien grâce à l'aide financière :

- de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale,

- de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique,

- de la Ligue Nationale Française de

Lutte contre le Cancer (Opération Espoir).

auxquels nous adressons nos plus vifs remerciements.

Monsieur le Professeur G. BISERTE a toujours été pour nous beaucoup plus qu'un Directeur de Recherche. Sa haute compétence scientifique et ses grandes qualités humaines constituent des exemples que nous aimerions suivre.

La confiance qu'il nous a toujours accordée, la gentillesse avec laquelle il nous a dirigé et son aide constante à résoudre les difficultés qui se présentaient quelles qu'elles soient, nous ont encouragé dans la réalisation de ce travail. Nous le prions aujourd'hui d'accepter l'expression de notre vive gratitude et de notre profond, respectueux et fidèle attachement.

Monsieur le Professeur M. DURCHON nous a fait le très grand honneur d'accepter la Présidence du Jury de cette thèse. Nous avons toujours bénéficié auprès de lui d'un excellent accueil et de conseils avisés. Nous le prions d'accepter le témoignage de notre reconnaissance et de notre déférence. Monsieur le Docteur E. MALAISE nous a formé à la Recherche. Son dynamisme intellectuel et sa haute compétence scientifique nous ont sans cesse stimulé. Qu'il veuille trouver dans ce mémoire notre profonde et respectueuse reconnaissance.

Monsieur le Docteur A.J. VALLERON n'a cessé de nous prodiguer des conseils toujours judicieux et de nous aider efficacement durant la réalisation de nos travaux et la rédaction de cette thèse. Nous lui exprimons, aujourd'hui, notre gratitude et notre sincère attachement.

Monsieur le Docteur B. BOILLY a accepté de prendre connaissance de ce travail et nous fait l'honneur de faire partie des Membres du Jury. Nous lui adressons nos plus vifs remerciements. Monsieur le Professeur A. DEMAILLE nous a autorisé à utiliser les appareils de Cobaltothérapie du Centre Oscar Lambret.

Nous le prions, aujourd'hui,

d'accepter l'expression de notre vive gratitude et de notre profond respect.

Monsieur le Docteur P. CAPPELAERE a guidé nos premiers pas dans la recherche et a manifesté un intérêt constant pour notre tavail.

Nous le prions d'accepter nos

plus vifs remerciements.

Ce travail est en partie le fruit d'un travail mené en équipe. Nous adressons, à cet égard, nos plus vifs remerciements à Messieurs D. HEMON et R. GILET avec qui nous avons eu le plaisir de collaborer.

Nous adressons nos plus vifs remerciements :

• à Mesdames A. BOULNOIS, M.F. CARLIER, J. GOUTTAS, D. LANTOINE et Monsieur Y. HERBIN, pour leur haute compétence technique, leur conscience et leur gentillesse. De par leurs qualités ils ont largement contribué à la réalisation de ce mémoire.

• à Madame M.T. GARET pour l'illustration photographique et Mademoiselle A. MOSTAERT à qui nous devons la frappe de ce mémoire.

• à Messieurs N. BONNINGUE et M. DELOOT pour leur aide précieuse dans la réalisation des différents appareils de prise de vues.

• à Monsieur le Docteur DECOQL et, Mademoiselle PLUQUAIN qui ont assuré la dosimétrie des irradiations réalisées à Lille.

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

15 Septembre 1979

DOYENS HONORAIRES De l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R.DEFRETIN, H.LEFEBVRE, M.PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit

et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P.GERMAIN, GLACET, GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOUGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARO, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R.DEFRETIN, M.PARREAU, J.LOMBARD.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. M.MIGEON.

PROFESSEURS - lère Classe

Μ.	BACCHUS Pierre
Μ.	BEAUFILS Jean-Pierre
Μ.	BECART Maurice
Μ.	BILLARD Jean
Μ.	BIAYS Pierre
Μ.	BONNOT Ernest
Μ.	BOUGHON Pierre
Μ.	BOURIQUET Robert
Μ.	CELET Paul
Μ.	COEURE Gérard
Μ.	CONSTANT Eugène
Μ.	CORDONNIER Vincent
Μ.	DEBOURSE Jean-Pierre
Μ.	DELATTRE Charles
Μ.	DELHAYE Michel
Μ.	DERCOURT Jean
Μ.	DURCHON Maurice
Μ.	ESCAIG Bertrand
Μ.	FAURE Robert
Μ.	FOURET René
Μ.	GABILLARD Robert
Μ.	GRANELLE Jean-Jacques
М.	GRUSON Laurent
Μ.	GUILLAUME Jean
Μ.	HECTOR Joseph
Μ.	HEUBEL Joseph

Astronomie. Chimie Physique Physique Atomique et Moléculaire Physique du Solide Géographie Biologie Végétale Algèbre Biologie Végétale Géologie Générale Analyse Electronique Informatique Gestion des Entreprises Géologie Générale Chimie Physique Géologie Générale Biologie Expérimentale Physique du Solide Mécanique Physique du Solide Electronique Sciences Economiques Algèbre Microbiologie Géométrie Chimie Minérale

. . . / . . .

LABLACHE-COMBIER Alain
LACOSTE Louis
LANSRAUX Guy
LAVEINE Jean-Pierre
LEBRUN André
LEHMANN Daniel
LENOBLE Jacqueline
LHOMME Jean
LOMBARD Jacques
LOUCHEUX Claude
LUCOUIN Michel
MAILLET Pierre
MONTREUIL Jean
PARREAU Michel
PAQUET Jacques
POUZET Pierre
PROUVOST Jean
SALMER Georges
SCHWARTZ Marie-Hélène
SEGUIER Guy
STANKIEWICZ François
TILLIEU Jacques
TRIDOT Gabriel
VIDAL Pierre
VIVIER Emile
WERTHEIMER Raymond
ZEYTOUNIAN Radyadour

Chimie Organique Biologie Végétale Physique Atomique et Moléculaire Paléontologie Electronique Géométrie Physique Atomique et Moléculaire Chimie Sociologie Chimie Physique Chimie Physique Sciences Economiques Biochimie Analyse Géologie Générale Analyse Numérique Minéralogie Electronique Géométrie Electrotechnique Sciences Economiques Physique Théorique Chimie Appliquée Automatique Biologie Cellulaire Physique Atomique et Moléculaire Mécanique

PROFESSEURS - 2ème Classe

Μ. AL FAKIR Sabah ANTOINE Philippe Μ. BART André Μ. Mme BATTIAU Yvonne Μ. BEGUIN Paul **BELLET** Jean Μ. **BKOUCHE Rudolphe** Μ. BOBE Bernard Μ. BODARD Marcel Μ. BOILLY Bénoni Μ. BOIVIN Jean-Claude М. BONNELLE Jean-Pierre Μ. BOSCO Denis Μ. Μ. BREZINSKI Claude Μ. BRIDOUX Michel BRUYELLE Pierre Μ. Μ. CAPURON Alfred CARREZ Christian Μ. Μ. CHAMLEY Hervé CHAPOTON Alain Μ. COOUERY Jean-Marie Μ. Mme CORSIN Paule CORTOIS Jean Μ. COURBIS Bernard Μ. COUTURIER Daniel Μ. CRAMPON Norbert Μ. Μ. **CROSNIER** Yves Mme DACHARRY Monique DEBRABANT Pierre Μ. DEGAUQUE Pierre Μ. DELORME Pierre Μ.

Algèbre Analyse Biologie Animale Géographie Mécanique Physique Atomique et Moléculaire Algèbre Sciences Economiques Biologie Végétale Biologie Animale Chimie Minérale Chimie Probabilités Analyse Numérique Chimie Physique Géographie Biologie Animale Informatique Géotechnique Electronique Psychophysiologie Sciences de la Terre Physique Nucléaire et Corpusculaire Sciences Economiques Chimie Organique Sciences de la Terre Electronique Géographie Géologie Appliquée Electronique Physiologie Animale

. . . / . . .

DE PARIS Jean-Claude Μ. DEPREZ Gilbert Μ. DERIEUX Jean-Claude Μ. DEVRAINNE Pierre Μ. DHAINAUT André Μ. Μ. DOUKHAN Jean-Claude Μ. DUBOIS Henri DUBRULLE Alain Μ. Μ. DUEE Gérard DYMENT Arthur Μ. Mme EVRARD Micheline FLAMME Jean-Marie Μ. FOCT Jacques Μ. M. FONTAINE Hubert M. FONTAINE Jacques Μ. FOURNET Bernard Μ. GOBLOT Rémi Μ. GOSSELIN Gabriel GOUDMAND Pierre Μ. GREVET Patrick М. GUILBAULT Pierre Μ. HERMAN Maurice Μ. Μ. HOUDART René JACOB Gérard М. JOURNEL Gérard Μ. M. KREMBEL Jean M. LAURENT François M1e LEGRAND Denise Mle LEGRAND Solange M. LEMAIRE Jean LENTACKER Firmin Μ. LEROY Jean-Marie М. LEROY Yves Μ. Μ. LEVASSEUR Michel М. LHENAFF René LOCQUENEUX Robert Μ. Μ. LOSFELD Joseph LOUAGE Francis Μ. M. MACKE Bruno M. MAHIEU Jean-Marie MAIZIERES Christian Μ. Mle MARQUET Simone MESSELYN Jean М. Μ. MIGEON Michel M. MIGNOT Fulbert MONTEL Marc М. Μ. MONTUELLE Bernard Mme N'GUYEN VAN CHI Régine M. NICOLE Jacques NOTELET Francis Μ. Μ. PARSY Fernand Mle PAUPARDIN Colette M. PECQUE Marcel M. PERROT Pierre M. PERTUZON Emile Μ. PETIT Francis Μ. PONSOLLE Louis Μ. **PORCHET Maurice** Μ. POVY Lucien **RACZY** Ladislas Μ. М. RICHARD Alain

Mathématiques Physique du Solide et Cristallographie Microbiologie Chimie Minérale **Biologie** Animale Physique du Solide Physique Physique Géologie Mécanique Chimie Appliquée Technologie de Construction Génie Mécanique Physique Electronique, Electrotechnique, Automatique Biochimie Structurale Algèbre Sociologie Chimie Physique Sciences Economiques Physiologie Animale Physique Spatiale Mathématiques Informatique Physique Atomique et Moléculaire Biochimie Automatique Algèbre **Algèbre** Physique Géographie Méthodologie Electronique, Electrotechnique, Automatique Sciences Economiques Géographie Physique Théorique Informatique Electronique Physique Physique Atomique et Moléculaire Automatique Probabilités Physique Atomique et Moléculaire Chimie Physique Analyse Numérique Physique du Solide Biologie et Biochimie Appliquée Géographie Chimie Analytique Electronique, Electrotechnique, Automatique Mécanique Biologie Physiologie Végétales Chimie Organique Chimie Appliquée Physiologie Animale Chimie Organique, Minérale et Analytique Chimie Physique Biologie Automatique Electronique Biologie

. . . / . . .

М.	RIETSCH François
Μ.	ROGALSKI Marc
М.	ROUSSEAU Jean-Paul
Μ.	ROY Jean-Claude
Μ.	SALAMA Pierre
Mme	SCHWARZBACH Yvette
Μ.	SCHAMPS Joël
Μ.	SIMON Michel
Μ.	SLIWA Henri
М.	SOMME Jean
Mle	SPIK Geneviève
Μ.	STERBOUL François
Μ.	TAILLIEZ Roger
Μ.	THERY Pierre
Μ.	TOULOTTE Jean-Marc
М.	VANDORPE Bernard
М.	VILETTE Michel
Μ.	WALLART Francis
Μ.	WATERLOT Michel
Μ.	WERNER Georges
Mme	ZINN-JUSTIN Nicole

Chimie Analyse Physiologie Animale Psychophysiologie Sciences Economiques Mathématiques Physique Sociologie Chimie Organique Géographie Biochimie Informatique Biologie Electronique, Electrotechnique, Automatique Automatique Chimie Minérale Résistance des Matériaux Chimie Géologie Générale Informatique Fondamentale Appliquée Algèbre

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE MICROCINÉMATOGRAPHIQUE DES DURÉES DU CYCLE ET DE LA MITOSE DANS DES GÉNÉALOGIES DE CELLULES EMT 6 EN CULTURE

I - INTRODUCTION	4
A - MITOSE, INTERVALLE INTERMITOTIQUE : DÉFINITIONS	4
 B - RAPPEL BREF DES DIFFÉRENTES MÉTHODES D'ÉTUDE DU CYCLE CELLULAIRE	6 7 7 7 8
 2) Méthodes isotopiques. a) l'autoradiographie. b) méthode du pourcentage des mitoses marquées (PMM). c) autres méthodes. 3) Conclusions. C - LA TECHNIQUE MICROCINÉMATOGRAPHIQUE : HISTORIQUE ET DIFFÉRENTS DOMAINES D'APPLICATION. 	8 8 10 12 12 14
II - MATERIEL ET METHODES	19
A - MÉTHODE DE CULTURE DES CELLULES EMT 6 1) Origine et entretien de la souche EMT 6	19 19
 Préparation des cultures pour l'observation microcinématographique 	22

В -	TECHNIQUE MICROCINÉMATOGRAPHIQUE	22
	1) Equipements photographiques	22
	 2) Analyse des films a) appareillage b) estimation de la durée de la mitose c) estimation de la durée du cycle d) reproductibilité des mesures 	26 26 26 27 27
	3) Description des données	27
	 4) Interprétation statistique des résultats, a) programmes de traitements informatiques, b) méthodes statistiques employées 	30 30 36
III -	RESULTATS ET DISCUSSIONS	38
A - 1	VARIATIONS DES PARAMÈTRES STATISTIQUES DES DURÉES DU CYCLE ET DE LA MITOSE EN FONCTION DES GÉNÉRATIONS	38
	 Evolution, au cours des générations, des durées moyennes du cycle et de la mitose des cellules EMT 6 	38
	2) Caractérisation de la variabilité des durées moyennes du cycle et de la mitose,,,,,,,,,,	38
	3) Discussion	42
B - 1	RELATIONS ENTRE LA DURÉE DU CYCLE ET DE LA MITOSE D'UNE MÊME CELLULE ET DES CELLULES APPARENTÉES	51
	 Corrélation entre la durée du cycle et de la mitose d'une même cellule 	51
	2) Etude des corrélations entre les paramètres de la mère et ceux de ses filles	53
	3) Coefficients de ressemblance entre deux cellules soeurs,	56
	4) Discussion,	56

I١	- DISCUSSION GENERALE : PROBLÈME DE LA RÉGULATION	
	DE LA DIVISION CELLULAIRE	61
	그는 것 같은 것이 있는 것 같은 것이 가지 않는 것 같은 것이 있었다. 한 것을 위해 주셨어.	
	1) Régulation de l'initiation de synthèse de l'ADN	63
	2) Régulation de la division cellulaire	66
١	- CONCLUSIONS	72

DEUXIEME PARTIE : ÉTUDE MICROCINÉMATOGRAPHIQUE DE LA DURÉE DU CYCLE, DE LA DURÉE DE LA MITOSE ET DE LA PROBABILITÉ DE DIVISION DES CELLULES EMT 6 SOUMISES À DIFFÉRENTES IRRADIATIONS

I - INTRODUCTION	74
 Généralités a) les lésions létales b) les lésions sub-létales et potentiellement létales c) les lésions non létales 	74 74 75 75
 2) Différents paramètres influençant la réponse d'une population cellulaire à une irradiation a) la dose b) l'âge de la cellule dans le cycle au moment de l'irradiation c) la nature des radiations utilisées d) autres facteurs : débit de dose,oxygénation et fractionnement 	76 76 79 81 82
3) Buts de notre travail	83
II - MATERIEL ET METHODES	85
A - RAPPEL DE DONNÉES PHYSIQUES	85
 Différents types de radiations, Transfert d'énergie linéique (TEL), Rendement en profondeur, 	85 86 87

B - 1	DIFFÉRENTS TYPES D'IRRADIATION	90
	 Radiations γ du ⁶Cobalt,	90
	a) ions d'hélium accélérés	92
	b) tons de neon acceleres	90
C - 1	MODIFICATIONS TECHNIQUES ENTRAÎNÉES PAR L'IRRADIATION	98
D		100
D -	PRESENTATION DES RESULTATS	100
	durée de la mitose : méthodes de calcul,	100
	 Méthode d'évaluation d'influence de l'âge de la cellule dans le cycle au moment de 	
	l'irradiation,	102
	3) Notion de probabilité de division,,,,,,,,	102
	4) Estimation des corrélations entre la mortalité chez deux cellules soeurs	102
III - ETUD	E COMPARATIVE DE L'ACTION DES RAYONS GAMMAS	
	DU °COBALI SUR LA DUREE DU CYCLE ET DE LA MITOSE	103
		102
A -	RÉSULTATS	103
	 Allongement de la durée du cycle (retard à la mitose) et allongement de la durée 	
	de la mitose en fonction de la dose de radiation	103
	2) Influence de l'âge de la cellule dans le cycle au moment du traitement	104
	a) allongement de la durée du cycle,,,,,,,,,,,,	104
	b) allongement de la durée de la mitose,	109
	3) Probabilité de division,	114

 B - DISCUSSION 1) Relation dose effet 2) Influence de l'âge de la cellule dans le cycle au moment de l'irradiation 3) Probabilité de division	114 114 120 124
<pre>IV - ETUDE DE L'ACTION DES IONS LOURDS ACCELERES SUR LA DUREE DU CYCLE ET LA PROBABILITE DE DIVISION</pre>	127
A - résultats	127
1) Relation entre la dose de différents types de radiations et la durée du cycle,,,,,	127
2) Relation entre l'âge de la cellule dans le cycle au moment de l'irradiation et la durée du cycle de la génération irradiée	131
3) Probabilité de division,	131
B - DISCUSSION	136
V - DISCUSSION GENERALE : PROBLÈME DE LA NATURE DU	
RETARD À LA MITOSE	142
1) Retard et survie cellulaire,	142
2) Retard et synthèse de l'ADN	144
 Etude des différents modèles proposés pour expliquer le retard à la mitose, 	145
4) Allongement de la durée de la mitose	149
VI - CONCLUSIONS	152

CONCLUSIONS GENERALES	154
BIBLIOGRAPHIE	157

ABREVIATIONS ET SYMBOLES UTILISES

ADN	Acide desoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
Cf	Cycle de la fille
Cm	Cycle de la mère
Cs	Cycle des soeurs
EBR	Efficacité Biologique Relative
g	gramme
Gy	Gray ; 1 Gy = 100 rads
h ou H	heure
IM	Indice Mitotique
mg	milligramme
m]	millilitre
mm	millimètre
mn	minute
n	nombre de valeurs individuelles
NS	Non Significatif
Tc	durée du cycle
TEL	Transmission d'Energie Linéaire
Tm	durée de la mitose

Cette thèse a fait l'objet des publications

suivantes :

- COLLYN-d'HOOGHE M., VALLERON A.J. and MALAISE E.P., (1977) -Time lapse cinematographic studies of cell cycle time and duration of mitosis. <u>Exp. Cell Res.</u>, <u>106</u>, 405-407. *Contrat INSERM 74.5.417.36*
- HEMON D., COLLYN-d'HOOGHE M., VALLERON A.J. and MALAISE E.P., (1978) - Statistical methods for the estimation and analysis of correlations between characteristics of cells observed using time lapse microcinematography. In "<u>Biomathematics</u> <u>and Cell Kinetics</u>, Elsevier/North-Holland Biomedical Press (A.J. Valleron & P.D. McDonald, eds).
- COLLYN-d'HOOGHE M., GILET R., CURTIS S. and MALAISE E.P., (1978)-Influence of ionizing radiations of different TEL on mitotic delay. 9e ESGCP Meeting, Paris, Mars
- COLLYN-d'HOOGHE M., HEMON D., VALLERON A.J. and MALAISE E.P., (1979) - Comparative effects of ⁶⁰Co γ rays on cell cycle time and mitosis duration. A time lapse cinematography study. <u>IVth International Colloquium on Microcinematography</u> as a research method in cytology, Hradec Kralove, Czechoslovakia, avril.
- COLLYN-d'HOOGHE M., GILET R., HEMON D., VALLERON A.J. et MALAISE E.P., (1979) - Etude comparative des effets des rayons y du ⁶⁰Co et des ions lourds accélérés (hélium et néon) sur le cycle cellulaire et sur la probabilité de division des cellules EMT 6 en culture. <u>Meeting of the</u> <u>French, Dutch and Belgian Radiobiologists</u>, Bruxelles.
- COLLYN-d'HOOGHE M., HEMON D., VALLERON A.J. and MALAISE E.P., (1980) - Comparative effects of ionizing radiations on cycle time and mitotic duration a time lapse cinematography study. <u>Radiation Research</u>, <u>81</u>, 384-392. <u>Contrat D.G.R.S.T. 79.70.240</u>

- GUIGUET M., COLLYN-d'HOOGHE M. and VALLERON A.J., (1980)

 S, G₂ and M phases durations are relatively as variable
 as G₁ duration. <u>The Cell Kinetics Society 4th Annual Meeting</u>.
 The Hyatt Regency Lexington, Kentucky, Mars.
- COLLYN-d'HOOGHE M, HEMON D., GILET R., CURTIS S., VALLERON A.J. and MALAISE E.P., (1980) - Comparative effects of ⁶⁰Co γ rays hélium and neon ions on cycle duration and division probability of EMT 6 cells. A time lapse cinematography study. <u>Int. J.</u> Radiat. Biol., (sous presse).

INTRODUCTION GENERALE

Lors de notre arrivée à l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, nous nous sommes intéressée à la culture de tissus et en particulier à la culture de cellules *in vitro*. En effet, le problème du cancer est lié à la multiplication cellulaire et les différents systèmes de culture *in vitro* fournissent des modèles de population cellulaire en croissance beaucoup plus simples et plus faciles à manipuler que les tumeurs expérimentales qui se développent *in vivo*. Ensuite, en fonction de nos goûts personnels et de notre formation de cinéticienne, nous avons tenté d'aborder le problème du cancer sous deux aspects :

a) l'un fondamental et théorique concerne la division cellulaire et ses mécanismes de contrôle.

L'existence de la variabilité de la durée du cycle et de la mitose pose en effet un problème théorique intéressant : pourquoi deux cellules "identiques" n'ont-elles pas la même durée de cycle cellulaire et la même durée de mitose ? Nous avons donc étudié, dans des généalogies de cellules EMT 6, les distributions des valeurs individuelles des durées du cycle et de la mitose, l'évolution de celles-ci dans le temps, les corrélations existant entre les cellules apparentées (mère-filles ou soeur-soeur) ainsi que les liens éventuels entre la durée du cycle et la durée de la mitose d'une même cellule.

Les données expérimentales qui ont permis l'étude de ces problèmes ont été obtenues en utilisant la microcinématographie qui est la seule technique permettant une mesure directe des durées du cycle et de la mitose, ainsi que l'évolution, génération par génération de ces paramètres. Ces études originales constituent la première partie de notre thèse. b) l'autre aspect plus "appliqué" concerne les modifications de la cinétique cellulaire provoquées par l'action de différentes radiations.

La réponse cellulaire à une irradiation dépend en effet de l'âge de la cellule dans le cycle au moment du traitement (Revues Générales de SINCLAIR, 1968 ; et de FRINDEL et TUBIANA, 1971). Avec des doses croissantes d'irradiation, les cellules de sensibilité intermédiaire sont progressivement tuées et il subsiste une population de cellules partiellement synchronisées (qui correspond aux cellules qui se trouvaient dans les phases de résistance au moment de l'irradiation). Cette population subira une nouvelle synchronisation du fait d'un blocage temporaire dans la phase G₂ du cycle cellulaire (ce blocage étant défini comme retard à la mitose). La réponse d'une population cellulaire à une deuxième dose d'irradiation ou à un deuxième traitement, dépendra donc de cette synchronisation d'où l'importance de bien connaître le retard à la mitose provoqué par l'irradiation et en particulier les variations de celui-ci en fonction de l'âge de la cellule dans le cycle au moment du traitement.

Les données expérimentales qui permettent d'étudier *in vitro* ces problèmes, peuvent être obtenues soit en utilisant des techniques indirectes telles que les techniques de marquage et de synchronisation cellulaire, soit des techniques directes telles que la microcinématographie. Cette dernière permet non seulement d'apprécier le retard à la mitose et l'allongement de la mitose provoqué par l'irradiation, mais renseigne à tout moment de l'âge de la cellule dans le cycle (ceci par rapport à la mitose précédente) et ne présente pas l'inconvénient des méthodes de marquage et de synchronisation qui peuvent perturber le métabolisme cellulaire et surajouter des artefacts à l'effet du traitement étudié.

Dans le but de diminuer la radiorésistance tumorale et d'améliorer ainsi les effets de la radiothérapie, l'utilisation des ions lourds de haute énergie a été envisagée au cours de ces dernières années (CASTRO et QUIVEY, 1977). Les avantages de l'utilisation des particules lourdes en radiothérapie sont en effet de deux types :

 les ions lourds accélérés sont particulièrement intéressants du point de vue de la distribution de la dose en profondeur puisque le maximum de la dose peut être délivré à plus de 10 cm du point de pénétration ; ceci permet de centrer l'irradiation au niveau de la tumeur en minimisant les effets au niveau des tissus sains suset sous-jacents,

 les différents facteurs qui limitent l'action létale des radiations de faible énergie (oxygénation et âge de la cellule dans le cycle au moment du traitement) ont beaucoup moins d'influence sur l'action des ions lourds accélérés.

De telles propriétés peuvent, seules ou combinées, augmenter l'efficacité biologique des radiations de haute énergie.

Il est toujours nécessaire de faire précéder une éventuelle utilisation clinique de recherches biophysiques et biologiques ; nous avons donc essayé de réaliser une étude aussi complète que possible de l'action de différents types de radiations : radiations gammas du ⁶⁰cobalt, ions d'hélium accélérés, ions de néon accélérés sur la cinétique de prolifération de cellules en culture. Ces études constituent la deuxième partie de cette thèse.

PREMIERE PARTIE

ÉTUDE MICROCINÉMATOGRAPHIQUE DES DURÉES DU CYCLE ET DE LA MITOSE DANS DES GÉNÉALOGIES DE CELLULES EMT 6

I - INTRODUCTION

A - MITOSE, INTERVALLE INTERMITOTIQUE : DÉFINITIONS

On appelle mitose la phase du cycle au cours de laquelle la cellule se divise en deux cellules filles : cette période débute au moment où les chromosomes commencent à se condenser quand la membrane nucléaire tend à disparaître et se termine au moment où apparaît une membrane entre les deux cellules filles, après que les deux cytoplasmes se soient euxmêmes séparés (*RUSCONI*, 1826 ; *MAYZEL*, 1875).

Une série de phénomènes biochimiques importants surviennent dans une cellule entre deux mitoses successives, en effet, pour qu'une cellule puisse se diviser, il faut qu'elle ait reproduit chacune de ses molécules d'acide desoxyribonucléique (ADN) de façon que les deux cellules filles reçoivent la totalité de l'information génétique. Il a été montré (HOWARD et PELC, 1951-1953 ; QUASTLER et SCHERMAN, 1959) que l'ADN ne se duplique que pendant une période déterminée de la vie de la cellule. En fonction de cette séquence d'événements, le cycle a été divisé en plusieurs phases (Fig. 1, p. 5) :

 immédiatement après la mitose, débute une phase dite de présynthèse et nommée G1 (de l'anglais Gap 1 ou "premier intervalle" entre la mitose et la synthèse de l'ADN);

2) il lui succède la phase de synthèse S pendant
 laquelle la cellule double son stock d'ADN ;

3) à la phase S succède la période dite de postsynthèse notée G2 ou 2e intervalle ;



Représentation schématique du cycle cellulaire

TC : durée du cycle TM : durée de la mitose (P : prophase, M : métaphase, A : anaphase, T : télophase) TG_1 : durée de la phase G_1 TS : durée de la phase S TG₂ : durée de la phase G₂ ne sont pas représentées dans ce schéma les cellules en G_O (au repos ou "hors cycle").

4) enfin survient la mitose ou phase de division
 cellulaire entraînant des changements physiques et morphologiques
 qui conduisent à la séparation des deux cellules filles.

Lorsque le destin d'une cellule peut être décrit selon le schéma précédent, on dira qu'elle est "dans le cycle" et l'intervalle intermitotique et le cycle cellulaire se confondent et sont tous deux définis comme le temps qui s'écoule entre deux mitoses successives ; ce sont par exemple, les cellules en croissance exponentielle *in vitro* ou les cellules épithéliales des cryptes de l'intestin grêle. Dans les populations cellulaires, à côté de ces cellules "dans le cycle" existent des cellules "hors cycle" qui peuvent être séparées en deux catégories :

d'autroit 1°) les cellules quiescentes ou cellules en GO qui ne synthétisent pas d'ADN et qui ne se divisent pas mais qui, sous l'effet d'un stimulus extérieur (chimiothérapie, irradiation, etc...) peuvent se "réveiller", c'est-à-dire rentrer dans le cycle. Ce sont par exemple les cellules régénératrices du foie après une hépatectomie partielle ou les lymphocytes dont la division peut-être stimulée par la phytohémaglutinine.

2°) les cellules fin qui sont comme les cellules quiescentes "hors du cycle" mais qui en plus ont perdu la capacité de se diviser. Le destin de telles cellules est soit la différenciation, soit la mort après vieillissement ; ce sont par exemple les leucocytes polymorphes, les hématies ou les cellules kératinisées de l'épiderme.

B - RAPPEL BREF DES DIFFÉRENTES MÉTHODES D'ÉTUDE DU CYCLE CELLULAIRE

Les méthodes d'étude du cycle cellulaire et de l'une ou plusieurs de ses phases sont très nombreuses et très variées et ont fait l'objet de nombreuses revues générales (*TUBIANA*, *1968-1971* ; *BASERGA*, *1976*). Nous ne dresserons pas ici la liste exhaustive de toutes ces méthodes, nous citerons pour mémoire les techniques les plus couramment utilisées.

1) Méthodes non isotopiques

a) méthode fondée sur les indices mitotiques La seule partie du cycle cellulaire qui soit différente des autres par sa seule morphologie concerne la mitose qui constitue une véritable fenêtre sur le cycle cellulaire. Dans une population (où toutes les cellules sont dans le cycle) on peut estimer la durée du cycle cellulaire à partir de l'indice mitotique (IM $\neq = 0,69 \frac{\text{IM}}{\text{TC}}$) (KNOWLTON, 1950 ; FRY, 1961 ; SMITH et al., 1962). Mais cette méthode est peu précise car, dans les conditions de croissance normales, le pourcentage des mitoses par rapport au nombre total de cellules ne dépasse jamais 5 %.

Quelques auteurs ont utilisé des méthodes basées sur l'arrêt des cellules en mitose pour mesurer, grâce à la vitesse d'accumulation des cellules en mitose, le taux de production cellulaire. Cependant, l'interprétation des résultats ainsi obtenus nécessite quelque prudence car la colchicine et la vincaleucoblastine qui sont généralement utilisées à cette fin, peuvent, selon la concentration utilisée, soit ne pas bloquer toutes les cellules en mitose et en laisser échapper quelques unes, soit au contraire perturber le cycle cellulaire (TANNOCK, 1967).

b) la cytophotométrie

La cytophotométrie constitue la méthode la plus directe qu'on puisse avoir pour séparer, dans une population de cellules, celles qui sont en G1, en S et en G2, en effectuant un microdosage de l'ADN après coloration quantitative spécifique (réaction de FEULGEN).

L'identification des cellules en phase S est obtenue en couplant cytophotométrie et autoradiographie (FRINDEL et al., 1967).

Le développement de systèmes à flux d'écoulement très perfectionnés et très automatisés permet maintenant l'obtention très rapide d'histogrammes comportant deux pics qui correspondent aux cellules en G1 et en G2 ; les cellules intermédiaires entre ces deux pics sont des cellules en phase S (KRISHAN, 1975 ; CRISMAN et TOBEY, 1974). La figure 2 (p. 9) montre un tel histogramme obtenu par nos soins à partir d'une culture de cellules EMT 6 en phase exponentielle de croissance.

c) méthode des fusions cellulaires

La fusion d'un noyau en interphase avec une cellule en mitose entraîne la condensation de la chromatine interphasique sous la forme de chromosomes prématures (JOHNSON et RAO, 1970 ; RAO et JOHNSON, 1972). La morphologie de ces chromosomes prématures indique la position dans le cycle du noyau interphasique. Les chromosomes prématures résultant de la condensation de la chromatine d'un noyau en G1 sont formés d'une simple chromatide (ADN simple brin) tandis que ceux résultant de la condensation d'un noyau en G2 sont formés d'un ADN à deux brins. Les chromosomes prématures d'un noyau en S présentent souvent l'aspect d'une chromatine pulvérisée. Il est donc possible d'estimer le pourcentage des cellules en G1, S et G2 en faisant fusionner une population de cellules asynchrones avec une population de noyaux en mitose (Revue Générale de RAO, 1977).

2) Méthodes isotopiques

a) l'autoradiographie

L'autoradiographie constitue la méthode expérimentale la plus utilisée en cinétique cellulaire. Si on ajoute au milieu cellulaire de la thymidine "marquée" (par exemple au tritium), cette thymidine sera incorporée dans l'ADN lors de la duplication de celui-ci. La thymidine est un précurseur de la thymine base purique entrant dans la composition de l'ADN et qui n s'incorpore pas dans l'ARN et seules les cellules en phase de synthèse (S) au moment du marquage seront radioactives. Si à un



CONTENU EN ADN

Figure 2

Contenu en ADN des cellules EMT 6 en phase exponentielle de croissance. La surface en pointillé correspond au nombre de cellules dans la phase G_1 . La surface hachurée correspond au nombre de cellules dans la phase G_2 + M. Le nombre de cellules dans la phase S est obtenu par différence.



moment quelconque choisi après le marquage, on fixe ces cellules puis on étale une émulsion sensible, après un certain temps de latence (exposition). On constatera en face des cellules "marquées" des grains noirs sur l'émulsion sensible. En faisant varier les intervalles de temps entre le marquage et la fixation des cellules, on pourra suivre le devenir des cellules en S au moment du marquage.

b) méthode du pourcentage des mitoses marquées (PMM)

La méthode du pourcentage des mitoses marquées reste la méthode autoradiographique la plus employée pour mesurer la durée du cycle cellulaire, ainsi que celle de ses différentes phases. Aussi nous paraît-il intéressant de la présenter sur le plan expérimental. Cette méthode, introduite par *PAINTER et DREW (1959)*; *et QUASTLER et SCHERMAN (1959)* est fondée sur l'étude de l'évolution du pourcentage des mitoses marquées après un marquage bref à la thymidine tritiée. Si on suppose :

. que la durée d'activité de la thymidine

est instantanée.

. que, au cours des différentes divisions cellulaires, la radioactivité présente dans une cellule mère se répartit entre les deux cellules filles. Il n'existe donc pas de perte de radioactivité en dehors d'une mort cellulaire,

. que les durées des phases du cycle sont constantes et fixes d'une cellule à l'autre et que la durée de la mitose est négligeable,

. que la population cellulaire n'est pas entièrement en S ou hors S au moment du marquage, on obtient alors une courbe en créneaux (Fig. 3a, p. 11) qui permet d'évaluer les durées moyennes du cycle cellulaire ainsi que celles des quatre phases qui le constituent.

D'une façon générale les courbes obtenues en pratique *in vitro* et surtout *in vivo* sont loin d'avoir la forme théorique décrite ci-dessus. Ceci s'explique par des écarts aux différentes hypothèses énoncées ci-dessus et en particulier par la variabilité des durées des phases du cycle





COURBE DES MITOSES MARQUEES.

- a) représentation schématique ; au début de l'expérience, au temps 0, les cellules en S sont marquées. A l'instant (t₁), la cohorte des cellules marquées a progressé dans le cycle et celles qui se trouvaient en fin de S au temps 0 sont arrivées en mitose : il apparaît des mitoses marquées.
- b) exemple de courbe expérimentale. En raison de la variabilité des durées des différentes phases du cycle d'une cellule à l'autre, la courbe s'amortit rapidement.

11

et du cycle d'une cellule à l'autre (Fig. 3b, p. 11).

c) autres méthodes

Pour compléter cette brève revue des méthodes d'études autoradiographiques du cycle cellulaire, il nous faut mentionner les techniques de double marquage ainsi que la méthode des fenêtres en S et en G2 imaginée par VALLERON et al. (1968).

3) Conclusions

Toutes ces méthodes énumérées ci-dessus ne permettent cependant pas une étude <u>directe</u> de la durée du cycle cellulaire. Elles utilisent souvent des cellules fixées 'et nécessitent l'action de certains agents soit bloquants (colchicine), soit marqueurs (thymidine marquée au tritium ou au carbone 14 par exemple) lesquels peuvent éventuellement influencer le paramètre étudié (*EHMANN et al.*, 1975; *BECK*, 1979).

En outre du fait que ces études concernent une population cellulaire considérée dans son ensemble, elles ne permettent d'obtenir que des durées moyennes du cycle cellulaire et de ses différentes phases et ne rendent compte de la dispersion des valeurs individuelles des paramètres étudiés qu'à la suite d'une interprétation mathématique des différentes valeurs obtenues qui suppose un grand nombre d'hypothèses biologiques discutables et souvent difficiles à vérifier : par exemple :

. selon les modèles utilisés, la distribution des valeurs individuelles du cycle et de ses différentes phases est considérée comme log-normale (BARRETT, 1966-1970 ; VALLERON et al., 1973 a et b 1974) ; comme suivant une distribution gamma (TAKAHASHI, 1966 ; HAHN, 1970) ; ou encore suivant une distribution normale (MAC DONALD, 1970 ; HARTMANN et PEDERSEN, 1970). • Les durées des différentes phases du cycle cellulaire sont considérées comme indépendantes les unes des autres (MAC DONALD, 1970).

• Enfin, les cellules d'une même population sont considérées comme indépendantes les unes des autres.

Seule la Microcinématographie permet une mesure directe du cycle cellulaire et de la mitose et présente par rapport aux autres méthodes les avantages suivants :

- Elle ne donne pas une valeur moyenne du cycle cellulaire et de la mitose, mais un grand nombre de valeurs individuelles qui permettent :

= l'étude des distributions des valeurs
individuelles du cycle cellulaire et de l'une de ses phases :
la mitose,

= l'étude de l'évolution de ces deux paramètres en fonction des générations,

= l'étude des corrélations entre les paramètres de deux soeurs.

- Nous avons montré qu'elle permet l'étude des corrélations entre la durée de la mitose et la durée du cycle d'une même cellule.

- Enfin, en connaissant de façon précise l'heure de la dernière mitose précédent tout acte thérapeutique (soit chimiothérapie, soit radiothérapie ou hyperthermie), on peut connaître très précisément l'âge de la cellule dans le cycle au moment du traitement, ceci sans utiliser tous les artifices nécessaires aux différentes expériences de synchronisation cellulaire.

Cependant, la microcinématographie a ses limites, si elle permet une étude très précise de la durée du cycle et de la mitose, elle ne permet en aucun cas d'étudier les autres phases du cycle cellulaire. Pour connaître la durée de toutes les phases du cycle cellulaire, elle devra être utilisée conjointement à d'autres méthodes (par exemple, la méthode du pourcentage des mitoses marquées).

C - LA TECHNIQUE MICROCINÉMATOGRAPHIQUE : HISTORIQUE ET

DIFFÉRENTS DOMAINES D'APPLICATION

La microcinématographie est née dans le Laboratoire de *LEWIS (1917)*, il eut le premier l'idée d'associer microscope et caméra pour ses études de pycnose. Ensuite, les progrès parallèles réalisés dans les domaines de cinématographie et de microscopie, établirent la microcinématographie comme nouvelle technique d'étude de la cellule.

Les premières recherches microcinématographiques furent surtout d'ordre morphologique et physiologique : étude des mouvements cellulaires, des phénomènes de phagocytose, de pynocytose et d'échanges intercellulaires, ainsi que celles des différents mécanismes qui conduisent à la mort cellulaire (fusion, dégénérescence, etc...).

Très vite, le domaine d'application de cette technique s'étendit de façon considérable et dès 1926, CANTI et DONALDSON ; 1927-1929 CANTI et SPEAR, eurent l'idée d'utiliser la technique microcinématographique pour étudier le cycle cellulaire. En effet, le cycle cellulaire est défini comme l'intervalle de temps séparant deux mitoses ; il suffisait donc d'observer une cellule pendant un temps suffisamment long pour repérer deux mitoses successives et obtenir ainsi une mesure très précise de la durée du cycle.

Cette technique d'étude du cycle cellulaire fut ensuite employée dans des domaines très divers : étude des durées de cycle des bactéries et des cellules de mammifères ainsi que celle de l'action des agents physiques (telles les radiations ou la température) des agents chimiques ou biologiques sur la durée du cycle cellulaire (Tableau I, pages 15, 16, 17 et 18).

TABLEAU I TECHNIQUE MICROCINEMATOGRAPHIQUE : différents domaines d'application ROSE G.G., 1965 I - ETUDES MORPHOLOGIQUES RICHART R.M., 1966 KASTEN F.H.., 1975 FELIX H. et STRAULI P, 1978 ABERCROMBIE M. et HEAYSMAN J.E., 1953 II - ETUDES DES MOUVEMENTS POMERAT C., 1958 CELLULAIRES ET INTRACELLULAIRES MOTA M. et al., 1964 CASTOR L.N., 1968 PONTEN J. et al., 1969 BEREITER-HAHN J. et al., 1972, 1978 AMBROSE E.J. et EASTY D.M., 1973 MORGAN W.D. et al., 1979 LEWIS M.R. et LEWIS W.H., 1917 III - ETUDES PHYSIOLOGIQUES HOSKINSG.C. et al., 1962 (phagocytose, pynocytose, etc...) GROPP A., 1963 COHN Z.A. et al., 1963 BHISEY A.N. et RANADIVE K.J., 1966 MELSON H., 1973 CHANG Y.T., 1977 MATTER A., 1979


TABLEAU [(suite 1)

IV - ETUDES DU CYCLE CELLULAIRE

A - Bactéries et procaryotes

1962

KELLY C.D. et RAHN 0.,1932

- Mammifères

മ

KOSUKA S. & HOSHINO M., 1961 SISKEN J.E. & KINOSITA R., 1961, 1962 Mac QUILKIN W.T. & EARLE W.R., 1962 DAWSON K.B. & al., 1965 SISKEN J.E. & MORASKA L., 1965 1978 1974. 1970 1928 FELL H.B. et HUGHES A.F., 1949 JACOBY F., 1958 HSU T.C. et al., 1959, 1960 BESSIS M. et NOMARSKI G., 1960 . et MOSCONA A., 1978 ABSHER R.G. et ABSHER P.M., 1' NORRBY K., 1977 et al. 1967, 1' SHIELDS R., 1977, 1978 a et b FOLKMAN J. et MOSCONA A., 1978 KOSUKA S. et MOORE G.E., 1966 QUESNEL L.B., 1963 KOCH A.L. et SCHAECHTER M., SCHAECHTER M. et al., 1962 JAGERS P. et NORRBY K., 1974 MINOR P.D., 1974 OLIVO O.M et DE LORENZI E., SHOWACRE J.L., 1968 FANTES P.A., 1977 VAN WIJK R., 1979

1956 HSU T.C., 1955 MOORHEAD P.S. et HSU T.C., CASTOR L.N., 1968 OHNUKI V., 1976

V - ETUDES DU DÉROULEMENT DE LA MITOSE



(suite 2) TABLEAU I

VI - ETUDES DES DISTRIBUTIONS DES VALEURS INDIVIDUELLES DU CYCLE CELLULAIRE

- Bactéries et procaryotes

4

POWELL E.O., 1955, 1958 Kubitshek H.E., 1962 Powell E.O. et Errington F.P., 1963

MIYAMOTO H. et al., 1973

FR0ESE G., 1964 KUBITSHEK H.E., 1971

- Mammifères a

VII - ETUDE DE L'ACTION DE DIVERS AGENTS SUR LE CYCLE CELLULAIRE

Radiations

CANTI R. G. et SPEAR F.G., 1929 SIMON-REUSS I. et SPEAR F.G., 1947 VOLLNER H., 1937

FR0ESE G., 1965, 1966

A - Agents physiques

MARIN G. et BENDER M.A., 1966 KOSUKA S. et MOORE G.E., 1966 THOMPSON L.H. et SUIT H.D., 1967, 1969 HURWITZ C. et TOLMACH L.J., 1969 THOMPSON L.H. et HUMPHREY R.M., J970 TROTT K.R. et al., 1970, 1974 SASAKI H., 1973 EHMANN U.K. et al., 1979 DEYS B.F. et STAP J., 1979

1969

Température

SCHMID P., 1967 SMITH B.J. et WIGGLESWORTH N.M., 1972 WOLF R. et al., 1979 BASS H. et al., 1978 SISKEN J.E. et al., 1965

TABLEAU I (suite 3)

B - Agents chimiques

SISKEN J.E. et WILKES E.,1967 KATSUMATA T. et al., 1973 BEDFORD A.J. et al., 1974 WIBE E. et al., 1978 DEYS B.F. et al., 1979 EHMANN U.K. et al., 1979 HABERMEHL K.O. et al., 1962 FONBRUNE P. et RECULARD P., 1963 JAGERS P. et NORBY K., 1974 PARANJPE M.S. et BOONE W., 1975

C - Agents biologiques
 (virus)

Cependant, dans tous ces travaux subsistent de grosses lacunes. A notre connaissance, personne n'a étudié de façon directe :

L'évolution de la durée de la mitose au cours des générations successives ;
La relation entre la durée du cycle et celle de l'une de ses phases : la mitose ;
Enfin, l'existence éventuelle des corrélations entre les durées de mitose des deux "soeurs" ainsi que celle de la "mère" et de ses deux "filles".

Nous avons pensé que la technique microcinématographique permettait d'étudier ces différents paramètres et nous avons appliqué cette technique à la cellule EMT 6 cultivée *in vitro*.

II - MATERIEL ET METHODES

A - Méthode de culture des cellules EMT 6

1) Origine et entretien de la souche EMT 6

Pour réaliser nos études microcinématographiques des durées du cycle cellulaire et de la mitose, nous avons recherché une souche cellulaire présentant les caractéristiques suivantes :

. Viabilité d'un petit nombre de cellules permettant un ensemencement pauvre au départ ; ceci afin d'observer le plus de générations possible avant que la densité de saturation ne soit atteinte.

. Cycle cellulaire court afin de pouvoir observer 5 à 6 générations successives dans des délais raisonnables.

. Faible mobilité cellulaire afin que les cellules ne quittent pas le champ du microscope au cours de l'observation.

. Enfin peu de tendance aux phénomènes de superposition ou d'entrecroisement lorsque la densité cellulaire s'accroît.

En fonction des différents critères énumérés ci-dessus, nous avons testé successivement différentes souches cellulaires (cellules KB, cellules de mélanome humain) et notre choix s'est fixé sur la cellule EMT 6. Cette cellule, issue d'un tout premier passage de la tumeur KHJJ de la Souris BALB/CKa, possède à la fois la possibilité de croître *in vivo* sous la forme d'une tumeur solide ainsi que *in vitro* sous la forme d'une culture en monocouche (ROCKWELL et KALLMAN, 1972).

Le milieu WAYMOUTH^{*} (dont la composition est donnée dans le Tableau II (p. 21), additionné de 10 % de sérum de foetus de Veau, de PENICILLINE^{***} (200 unités Internationales par ml) et de STREPTOMYCINE^{****} (0,25 mg par ml) est utilisé pour l'entretien de la cellule EMT 6. Les cultures "de réserve" sont repiquées deux fois par semaine : les cellules sont remises en suspension grâce à l'action d'une solution saline dépourvue de calcium et contenant de la TRYPSINE^{****} (1 g par litre). Après une incubation de 10 mn à

 Milieu sec en poudre WAYMOUTH 0011 - Laboratoires EUROBIO
 ** SPECILLINE (Benzyl Penicillinate de Sodium Cristallisé Laboratoires SPECIA - PARIS *** STREPTOMYCINE Base sulfate - Laboratoires Roger BELLON - PARIS
 **** TRYPSINE CHOAY cristallisée 2 fois - Laboratoires PRECIBIO

TABLEAU II

COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE DES EMT 6

Mi	OUTH MB 752/1		
	mg/l		mg/l
$CaCl_2 2H_2O$	120,0	L-Lysine HCl	240,0
KCL	150,0	L-Méthionine	50,0
KH2PO4	80,0	L-Phénylalanine	50,0
MgC1, 6H,0	240,0	L-Proline	50,0
$MgSO_{4}$ 7H ₂ O	200,0	L-Thréonine	75,0
NaCl	6.000,0	L-Tryptophane	40,0
NaHCOz	2.240,0	L-Tyrosine	40,0
Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	570,0	L-Valine	65,0
Glucose	5.000,0		
Glutathion	15,0	Acide Ascorbique	17,50
Hypoxanthine	25,0	D-Biotine	0,02
Rouge de Phénol	10,0	D-Ca-Pantothénate	1,00
L-Arginine HCl	75,0	Chlorure de Choline	250,00
Acide L-aspartique	60,0	Acide Folique	0,40
L-Cystéine HCl	90,0	i-inositol	0,83
L-Cystine	15,0	Nicotinamide	1,00
Acide-L-Glutamique	150,0	Pyridoxine HCl	1,00
L-Glutamine	350,0	Riboflavine	1,00
L-Glycine	50,0	Thiamine HCl	10,00
L-Histidine HCl H ₂ 0	168,0	Vitamine B 12	0,20
L-Isoleucine	25,0		
L-Leucine	50,0		4.
			н. Т
the second se	. 1		

Références.

WAYMOUTH, C.J., Nat. Cancer Inst., 22, 1003, 1959



37° C, les cellules sont dispersées mécaniquement à la pipette et sont ensemencées à raison de 10^6 cellules dans des bouteilles FALCON^{*} (75 cm²) contenant 30 ml de milieu. L'atmosphère finale dans la bouteille est constituée d'un gaz enrichi en CO₂ contenant 10 % de CO₂ ; 17,5 % O₂ et azote 72,5 %^{**}.

2) <u>Préparation des cultures pour l'observation</u> microcinématographique

En vue des études microcinématographiques, les cellules sont prélevées à partir d'une culture stock en phase de croissance exponentielle, c'est-à-dire 48 heures après l'ensemencement (Fig. 4, p. 23). Ces cellules sont remises en suspension selon la méthode décrite dans le paragraphe précédent et 150 000 cellules sont alors ensemencées dans des bouteilles plastique FALCON (25 cm²) contenant 10 ml de milieu WAYMOUTH additionné de 20 % de sérum de foetus de Veau. Cette concentration cellulaire permet de suivre la descendance de 6 à 8 cellules par film. Les cultures sont ensuite incubées à 37° C pendant 4 heures avant d'être placées sur la platine du microscope, ceci afin de leur permettre d'adhérer au support plastique. Aucun changement de milieu n'est effectué pendant l'expérience qui dure au maximum 5 jours.

B - TECHNIQUE MICROCINÉMATOGRAPHIQUE

1) Equipements photographiques

Nous disposons de 8 équipements microcinématographiques tous composés des éléments suivants (Fig. 5, p. 24) : un microscope relié directement à une caméra^{***} elle-même reliée à un intervallomètre qui déclenche une prise

* Flacons FALCON - OXNARD CA 93030 USA
 ** Compagnie Française des Produits Oxygénés
 *** Caméra PAILLARD-BOLEX 16 mm





Courbe de croissance de la cellule EMT 6 in vitro



Figure 5

Appareils d'enregistrement microcinématographique



de vue toutes les 4 + 0,05 minutes.

Afin d'éliminer toute influence de la lumière sur la durée du cycle, les appareils de microcinématographie sont groupés dans un local occulté. L'éclairage du champ d'expérience consiste en un éclairage de courte durée (0,5 seconde) uniquement au moment de la prise de vue. De plus des filtres permettant une lumière monochromatique verte interceptent le faisceau, évitent ainsi un "choc" aux cellules au moment de l'exposition et de plus assurent un meilleur contraste.

L'ensemble du système de prises de vues est entouré d'une enceinte thermostatée ; la platine du microscope est ainsi maintenue à 37° + 0,2 C par l'intermédiaire de deux résistances situées de part et d'autre du microscope et un thermorégulateur dont la sonde se situe au niveau de la platine du microscope. Un tel système de chauffage entraîne automatiquement des gradients de température dans l'enceinte thermostatée, mais l'utilisation d'un ventilateur pour homogénéiser la température augmenterait le risque de vibrations au niveau de la platine du microscope. L'existence de ce gradient ne nous gêne pas puisque la sonde du thermorégulateur, ainsi que le thermomètre de contrôle se trouvent sur la platine du microscope à l'endroit précis où se trouve la culture.

Le système optique utilisé a été choisi de façon à ce qu'il permette l'étude de la descendance de 6 à 8 cellules par film pendant 5 à 6 générations successives. Le meilleur compromis pour obtenir de telles conditions consiste à utiliser un objectif faible (4X) et une concentration de 150 000 cellules par FALCON (25 cm²).

Nous avons utilisé des films 16 mm KODAK-EASTMAN +X négatif 80 ASA développés dans du révélateur KODAK D 19.

2) Analyse des films

a) appareillage

Les films sont analysés sur une table de projection^{*} qui envoie l'image sur un verre dépoli avec un grandissement 20 X. Cette table d'analyse fonctionne en marche avant et arrière à trois vitesses différentes : vue par vue, 25 et 100 images par seconde. Un compteur électronique d'images est associé à cette table, il attribue un numéro à chaque vue et permet l'avance ou le retour automatique à une vue sélectionnée.

b) estimation de la durée de la mitose

Avant toute modification nucléaire au moment de la prophase, on observe une rétraction des différents prolongements cytoplasmiques cellulaires, la cellule augmente graduellement sa réfringence et prend une forme sphérique. Selon *LEWIS et LEWIS (1932)*; cette rétraction marque le début de la prophase alors que *STRANGEWAYS (1923)* considère que cette rétraction a lieu 2 à 10 minutes avant la prophase.

Comme la forme circulaire est atteinte graduellement, l'entrée en mitose peut être difficilement définie. Nous avons adopté, pour notre part, la méthode de mesure proposée par *HURWITZ et TOLMACH (1969)* : le début de la mitose est la première vue où la forme circulaire est constante. Ce repaire est certainement un peu décalé par rapport au commencement réel de la mitose mais il constitue un point commun qui survient très tôt dans le processus mitotique.

La fin de la mitose est la première vue qui montre une configuration en doublet, où une membrane visible apparaît entre les deux cellules filles. Ce dernier critère est beaucoup plus précis que celui de la séparation complète entre les deux cellules filles, séparation qui se déroule plus ou moins rapidement selon la densité cellulaire de la culture.

* Table de projection STEINBECK ST 1200 W - François BOGARD - Paris -

c) estimation de la durée du cycle

La durée du cycle est définie comme l'intervalle de temps séparant deux mitoses successives. Cette durée du cycle sera donc calculée à partir du nombre de vues s'écoulant entre la fin de la mitose de la mère et la fin de la mitose de la fille. La fin de la mitose étant établie selon les critères définis dans le paragraphe précédent (Fig. 6, p. 28).

d) reproductibilité des mesures

L'estimation des débuts et

fins de mitose avec les différents critères exposés ci-dessus, comporte nécessairement une part d'arbitraire. Nous avons comparé les valeurs de durée de cycle et de mitoses obtenues à l'occasion d'une double mesure faite sur les cellules de deux pédigrées. La seconde série de mesures a été faite à l'aveugle par rapport aux résultats de la première et à plusieurs semaines de celle-ci. Bien que, les deux séries ne donnent pas exactement le même résultat, la part de la variance totale de la durée du cycle et de celle de la mitose qui résulte de cette imprécision est faible (respectivement 1 % pour la durée du cycle et 11,3 % pour celle de la mitose).

3) Description des données

La figure 7, p. 29, représente les nombres de valeurs individuelles du cycle et de la mitose que nous avons obtenues pour chaque génération. La génération 0 est définie comme l'ensemble des cellules présentes dans le champ au début de l'expérience ; les générations 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7 résultent des divisions successives des cellules présentes dans la génération 0.

Le nombre de valeurs individuelles de durée de mitose par génération est souvent inférieur au nombre de valeurs du cycle cellulaire : en effet, selon la localisation de la cellule dans le champ et en particulier selon la densité cellulaire, il est possible de repérer un "doublet" caractéristique de la fin de mitose, donc de mesurer la durée du cycle



Représentation de la méthode d'estimation de la durée du cycle de la cellule EMT 6. Les chiffres indiquent les numéros de vue . IIM : intervalle intermitotique.





Nombre de valeurs individuelles de durées de cycle et de mitose pour chaque génération.

---o mitose

cycle cellulaire

La droite correspond au nombre de valeurs individuelles que l'on obtiendrait si aucune information n'était perdue.

alors qu'il est très difficile de cerner le moment précis où la cellule prend une forme sphérique constante donc de mesurer la mitose.

Il faut aussi reconnaître que certaines informations sont perdues au cours de l'étude d'un pedigree et le nombre de cellules ne double pas à chaque génération : certaines cellules quittent le champ d'observation, d'autres sont masquées par des débris cellulaires venant d'autres cellules qui sont mortes, d'autres encore sont inévitablement perdues lorsque le nombre de cellules dans le champ devient très important. Nous pensons comme *HURWITZ et TOLMACH (1969)* qu'aucun biais ne peut être introduit dans les résultats par l'absence de pedigree complet pour chaque cellule.

Nous remarquons également (Fig. 7, p.29). une chute très importante du nombre de mesures effectuées, aussi bien pour le cycle que pour la mitose des 6e et 7e générations. A ce stade de croissance, pour des raisons techniques, les rares mesures qui ont pu être effectuées s'adressent à des cellules "privilégiées", à la périphérie d'amas cellulaires. Si on décide d'arrêter les mesures des durées de cycle et de mitose à un moment précis après le début de l'enregistrement microcinématographique, on risque d'introduire un biais favorisant les cellules à cycle court alors qu'en limitant les études à un certain nombre de générations on évite ce biais (*POWELL*, 1955). Nous avons donc décidé de limiter nos études aux cinq premières générations.

4) Interprétation statistique des résultats

a) Programmes de traitements informatiques

L'analyse des différents films nous permet d'établir des pedigrees qui constituent de véritables arbres généalogiques cellulaires (Fig. 8, p.31).



Figure 8

Exemple de pedigree obtenu avec la cellule EMT 6

- a : durée du cycle
- b : âge de la cellule dans le cycle au moment de l'irradiation
- c : fusion cellulaire entre deux cellules soeurs
- L.: cellule qui quitte le champ
- 4: cellule qui dégénère



A l'intérieur de chaque pedigree, les cellules sont repérées par un système d'identification dont le principe a été décrit dans une méthode de simulation sur ordinateur de population en croissance (VALLERON et FRINDEL, 1973).

Deux problèmes se posent sur le plan informatique :

<u>le premier</u> est de trouver un système d'identification des différentes cellules de l'arbre généalogique qui permette un calcul rapide de la parenté entre deux quelconques d'entre elles ;

. <u>le_second</u> est de trouver comment mettre en mémoire puis retrouver les données relatives aux différents événements de la vie de chacune des cellules : par exemple, on souhaite être capable de calculer à un temps (t) donné dans quelles phases du cycle les cellules sont.

Un tel arbre généalogique est montré sur la figure 9, p.33). Dans cette figure sont représentées quatre générations successives en supposant qu'il n'y a ni mort, ni fuite cellulaire. Chaque branche de ce graphe représente une cellule, les nombres notés au-dessus de chaque cellule sont ceux utilisés pour l'identification. Le procédé de numérotation est simple et basé sur les faits suivants :

• si K générations sont étudiées, la numérotation ira de 1 à 2^{K} -1 (ainsi sur la figure ⁹, p.³³, les nombres vont de 1 à 2^{4} - 1 = 15).

• soient I et I_1 , les numéros respectifs d'une cellule et sa mère. La relation $I_1 = E(1/2)$ (où E signifie partie entière) est toujours vraie. Ainsi, on vérifiera que la mère de la cellule n° 13 est bien la cellule $E(\frac{13}{2}) = 6$; de même la mère de la cellule 6 est $E(\frac{6}{2}) = 3$.



Figure 9

Principe de numérotation des cellules au sein d'un pedigree



• si J et J' sont des cellules soeurs, on a la relation $E(\frac{J}{2}') = E(\frac{J}{2})$.

si J et J' sont des cellules "cousines-germaines" on a la relation :

$$E \begin{bmatrix} E & \frac{J}{2} \end{bmatrix} = E \begin{bmatrix} E & \frac{J}{2} \end{bmatrix}$$

Par de tels procédés, il est possible de calculer la parenté entre deux cellules quelconques.

Pour chaque cellule sont codés les éléments 'suivants (Fig. 1D, p.35).

- durée du cycle cellulaire exprimée en 1/10e d'heure,
- durée de la mitose exprimée en 1/100e d'heure,
- "distance" entre les cellules filles au moment de leurs mitoses respectives,
- éventuellement mort cellulaire avec comme critères la pycnose ou l'éclatement cellulaire,
- éventuellement la fuite cellulaire si la cellule quitte le champ,
- éventuellement le temps de fusion et le numéro d'identification de la cellule avec laquelle cette fusion a lieu.

Un premier programme permet

d'obtenir :

- a) pedigree par pedigree les paramètres suivants :
 - durée moyenne et variance du cycle pour chaque génération,
 - durée moyenne et variance de la mitose pour chaque génération,
 - nombre de durées de mitose et de durées de cycle observé à chaque génération.

 b) les mêmes résultats pour l'ensemble des générations du ou des pedigrees correspondants.



8 L 9

esosim^{eré}t / mlit

ub judéb islaQ

N[°]du Pédigree L

ENREGISTREMENT DES DONNEES DE MICROCINEMETOGRAPHIE

S 🛊

will up abos ab "N

1 5 3



oupitsitets esvlens'l ruog "seèboo" seènnob setnerêltib seb listèd

Un second programme permet

d'établir automatiquement les histogrammes des temps de cycle et des temps de mitose par génération ou toutes générations confondues, ainsi que de réaliser les différents tests statistiques de distribution.

b) méthodes statistiques employées

1°) Distribution des valeurs individuelles du temps de cycle cellulaire et du temps de la mitose.

Pour chaque génération l'écart de la distribution observée des temps de cycle et des temps de mitose aux distributions normale, log normale et récipronormale (Distribution normale de $\frac{1}{1c}$) a été mesuré par des tests du χ^2 (SCHWARZ, 1963). Ce test classique introduit par PEARSON est un moyen de juger de la valeur d'une hypothèse concernant une population dont on connaît un échantillon. Cette hypothèse doit être telle, qu'on puisse calculer soit χ^2 , soit une grandeur statistique distribuée comme χ^2 et le nombre de degrés de liberté. La table de PEARSON peut nous donner la probabilité P que dans un échantillon au hasard, la valeur de χ^2 ou de la grandeur statistique soit plus grande que la valeur observée. Ceci permet de fixer quelles valeurs de χ^2 sont "peu" probables, si l'hypothèse testée est vraie et -réciproquement-. Ceci permet donc, devant une valeur de χ^2 "anormalement" élevée de conclure que l'hypothèse testée n'est pas vraie. En pratique, "peu probable" est défini comme ayant 5 chances sur 100 de se produire. Si le χ^2 n'est pas anormalement élevé, l'hypothèse pourra être considérée comme admissible puisque le test ne fournira aucune évidence contre elle.

2°) Etude des corrélations entre les durées du cycle cellulaire et de la mitose de la mère et celles des deux filles.

Les méthodes statistiques

classiques ne sont pas directement adaptées à ce problème et

l'analyse statistique rigoureuse de nos données a nécessité la mise au point de nouvelles méthodes, dont celles publiées par *HEMON et al. (1978)*.

Pour mesurer la corrélation entre le temps du cycle de la mère et ceux des deux filles, nous avons calculé les coefficients de corrélation entre les cycles des mères et les temps de cycles moyens des deux filles lorsqu'on disposait de deux informations ou de la fille lorsqu'on ne disposait que d'une information. Nous avons procédé de la même manière pour le temps de mitose.

3°) Etude des corrélations entre les durées du cycle et de la mitose de deux soeurs.

La méthode classique du coefficient de corrélation ne peut être utilisée dans ce cas : les temps de cycle des deux soeurs jouent un rôle symétrique et il est difficile de parler de corrélation entre X et Y dans la mesure où dans chaque couple, il y a une ambiguïté sur ce qui est X, ou sur ce qui est Y. Nous avons utilisé pour résoudre le problème posé, le coefficient de corrélation intraclasse classiquement utilisé en génétique pour mettre en évidence des ressemblances familiales (FISHER, 1938). Ce coefficient, toujours compris entre 0 et 1, exprime le degré de ressemblance des paramètres mesurés sur deux cellules. Si les cycles des deux soeurs sont toujours rigoureusement identiques, le coefficient de corrélation intraclasse est égal à 1 ; si la ressemblance entre les deux soeurs n'est pas supérieure à celle qui existe entre deux cellules quelconques de la population, la valeur de ce coefficient ne sera pas significativement différente de O.

III - RESULTATS ET DISCUSSIONS

A - VARIATIONS DES PARAMÈTRES STATISTIQUES DES DURÉES DU CYCLE ET DE LA MITOSE EN FONCTION DES GÉNÉRATIONS

Evolution, au cours des générations,
 des durées moyennes du cycle et de la mitose des cellules EMT 6.

Les durées moyennes du cycle et de la mitose varient significativement en fonction des générations : plus élevées au niveau de la première génération, elles décroissent et se stabilisent pendant les deuxième et troisième générations, puis croissent toutes deux à partir de la 4e génération (Fig. 11, p. 39). Le tableau III (p. 40) résume les paramètres statistiques : moyenne (m), écart type (σ) et coefficient de variation (cv = $\frac{\sigma}{n}$) concernant le cycle et la mitose.

La dispersion des valeurs individuelles du cycle augmente avec l'âge de la culture, comme l'indiquent les valeurs des écarts-types et des coefficients de variation. Au contraire, la dispersion des valeurs individuelles de la mitose reste stable au cours des générations étudiées.

2) <u>Caractérisation de la variabilité des</u> des durées moyennes du cycle et de la mitose.

a) Etude graphique

Les différents histogrammes représentant les valeurs individuelles du cycle et de la mitose sont tous étalés vers la droite (Fig. 12, p. 41). Cette asymétrie des histogrammes, de plus en plus marquée lorsque l'âge de la culture augmente, est incompatible avec l'hypothèse d'une distribution normale des valeurs individuelles des temps de cycle et des temps de mitose.



TABLEAU III

DUREE DU CYCLE ET DE LA MITOSE EN FONCTION DES GENERATIONS

Générations	1	2	3	4	5	6
Durée du cycle cellulaire (h)	11,7 <u>+</u> 0,4	10,6 <u>+</u> 0,5	$ \begin{array}{r} 10,3 \pm 0,3 \\ 2,18 \\ 0,21 \\ (292) \end{array} $	12,0 <u>+</u> 0,7	15,5 <u>+</u> 0,8	21,1 <u>+</u> 1,3
Ecart-type (σ)	1,99	3,44		7,59	9,32	9,43
Coefficient de variation (CV = $\frac{\sigma}{n}$)	0,17	0,32		0,63	0,59	0,45
Nombre de valeurs	(85)	(164)		(465)	(494)	(185)
Durée de la mitose (1/100 h)	39,1 <u>+</u> 2,1	37,1 <u>+</u> 1,4	35,2 <u>+</u> 0,9	34,8 <u>+</u> 1,0	35,8 <u>+</u> 1,3	40,9 <u>+</u> 2,1
Ecart-type (σ)	9,66	9,12	8,09	10,18	12,50	12,82
Coefficient de variation (CV = $\frac{\sigma}{n}$)	0,25	0,24	0,23	0,29	0,35	0,31
Nombre de valeurs	(81)	(157)	(282)	(403)	(369)	(149)





Figure 12

Histogrammes des valeurs individuelles du cycle et de la mitose pour les générations : 1 (a) ; 3 (b) ; 5 (c) et toutes les générations groupées (d).



Nous avons regroupé l'ensemble de ces valeurs individuelles selon la méthode statistique de *HENRI*. Un exemple de cette représentation graphique est donnée dans la figure 13 (p. 43) : en abscisse sont portées les valeurs du cycle exprimées en logarithme et en ordonnée les pourcentages cumulatifs observés (en échelle probit).

Les courbes obtenues ne sont en aucun cas linéaires : la distribution des valeurs individuelles du cycle cellulaire n'est donc pas de type log normale.

Nous observons des courbes semblables pour les valeurs individuelles de la mitose (Fig. 14, p. 44).

b) Etude statistique

Nous avons testé par la méthode classique du χ^2 , les écarts entre les distributions observées et les distributions : normale, log normale et récipronormale (distribution normale de $\frac{1}{Tc}$ ou $\frac{1}{Tm}$). Les différents chiffres obtenus sont groupés dans le tableau IV (p. 45).

Les distributions des valeurs individuelles du cycle et de la mitose obtenues pour la cellule EMT 6, diffèrent de façon significative des distributions normale et log normale (exception faite des durées du cycle de la première génération). L'hypothèse d'une distribution récipronormale peut cependant être retenue pour les durées du cycle des deux premières générations ainsi que pour les durées de la mitose de la deuxième génération.

3) Discussion

Dans nos conditions de culture, les paramètres cinétiques de la cellule EMT 6 (durée de la mitose et durée du cycle cellulaire) varient avec l'âge de la culture : la durée et la variabilité de ces deux paramètres augmentent de façon significative après la troisième génération. Aussi bien pour la durée du cycle que pour celle de la mitose,





Représentation graphique de l'histogramme cumulatif des valeurs individuelles de la mitose (toutes générations groupées). Si la distribution des valeurs du cycle était log normale, les différents points expérimentaux (•) devraient s'aligner sur la droite tracée.



TABLEAU IV

ECARTS ENTRE LES DISTRIBUTIONS OBSERVEES ET LES DISTRIBUTIONS NORMALE (N), LOGNORMALE (LN) ET RECIPRONORMALE (RN) THEORIQUES. Les valeurs notées sont les valeurs des χ^2 avec deux degrés de liberté. Les distributions observées différent significativement des courbes théoriques quand la valeur du χ^2 est supérieure à : 5,991 (p < 0,05) ; 9,2 (p < 0,01) et 13,8 (p < 0,001). Les nombres entre parenthèses indiquent le nombre de cellules étudiées.

	Durée du cycle	2		Durée de la mitose	
GÉNÉRATIONS	N LN	RN	Générations	N	LN RN
1 (85)	3,8 1,5	1,4	1 (81)	26,2	12,6 8,6
2 (164)	87,4 12,5	2,5	2 (157)	27,1	29,1 3,6
3 (192)	22,9 9,2	50,7	3 (282)	17,7	61,6 54,4
4 (464)	424,4 126,6	217,0	4 (403)	42,2	29,1 25,8
5 (494)	359,6 93,6	509,8	5 (369)	46,2	23,3 23,8
6 (185)	8,4 12,7	25,2	6 (149)	50,9	11,2 6,6
Toutes les générations	583,8 414,0	89,7	Toutes les générations	215,1	122,4 83,9



les valeurs plus élevées observées au niveau de la génération 1, peuvent s'expliquer par les différentes modifications consécutives aux conditions de repiquage. L'allongement du cycle correspondrait au temps nécessaire à la réparation des lésions créées dans ces conditions expérimentales.

Les durées du cycle et de la mitose des deux générations suivantes sont stables, à ce stade de la croissance, la densité cellulaire est encore très éloignée de la saturation.

Ensuite, l'allongement de la mitose et surtout du cycle cellulaire apparaissent lorsqu'une proportion importante de cellules entrent en contact les unes des autres. A ce stade, on note une hétérogénéité de la répartition des divisions cellulaires : la prolifération ne concerne plus que quelques cellules "privilégiées" situées à la périphérie d'amas cellulaires.

Une variation analogue de la durée du cycle fut observée par *ABSHER et ABSHER (1974)*, sur des cultures de cellules fibroblastiques humaines (WI 38), alors que *STUBBLEFIELD (1962), DAWSON et al. (1965) et MIYAMOTO et al. (1973)* ont enregistré des durées de cycle parfaitement stables pendant plusieurs générations de culture de fibroblastes de hamster (DON), de cellules de sarcome de rat ainsi que des fibroblastes de souris (NCTC 929).

Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour rendre compte de la variation de la durée du cycle cellulaire et de la durée de la mitose au cours des générations :

a) une diminution de la concentration des éléments nutritifs du milieu de culture. En effet, à partir d'un certain stade de prolifération, on peut admettre que le milieu s'épuise et que les cellules ne disposent plus de tous les éléments nutritifs dont elles ont besoin (POWELL, 1958; PRESCOTT, 1962; COOK et COOK, 1962; POWELL et ERRINGTON, 1963).

b) une altération du pH du milieu de culture provoquée par l'accumulation des produits du catabolisme des cellules en croissance.

MIYAMOTO et al. (1973) ont évité ces deux causes éventuelles de variabilité en utilisant un milieu de culture très riche et très tamponné. Cependant, pour expliquer nos propres résultats, au niveau de la cellule EMT 6, il ne semble pas que ces deux nypothèses puissent être retenues : les éléments nutritifs sont en large excès au début de l'expérience par rapport au nombre de cellules ensemencées et le pH du milieu reste stable du ler au 5e jour de la culture (7,3 < pH < 7,1). De plus lorsque nous avons changé le milieu de culture au cours de la troisième génération après le repiquage, nous avons toujours retrouvé cet allongement brutal de la durée du cycle après la 4e génération.

c) la troisième explication possible, réside dans la densité de saturation cellulaire. La comparaison de nos résultats avec ceux obtenus par *STUBBLEFIELD (1962)*, *DAWSON et al. (1965) et MIYAMOTO et al. (1973)* est difficile, car aucun de ces auteurs ne donne la moindre information sur le degré de saturation cellulaire au moment de l'arrêt de leurs mesures. Pour la cellule EMT 6, il semble que la densité de saturation cellulaire joue un rôle prédominant puisque les modifications observées interviennent brutalement au moment où l'espace intercellulaire et la mobilité cellulaire deviennent très restreints.

ABERCROMBIE et AMBROSE (1958) et PONTEN (1969) ont montré l'existence d'une corrélation positive entre la mobilité cellulaire et la capacité de division et BURTON et CANHAM (1973) ont suggéré un échange de molécules entre les cellules lorsqu'elles arrivent en contact les unes des autres. Les divergences observées entre nos résultats et ceux des autres auteurs, résultent sans doute d'une sensibilité différente des souches cellulaires de diverses origines aux conditions de culture (milieu, pH, densité de saturation), ainsi que des différences importantes dans les densités cellulaires initiales (500 cellules par flacon pour *MIYAMOTO et al.* et 150 000 cellules par flacon dans nos expériences sur la cellule EMT 6).

A notre connaissance, aucune relation de l'évolution de la durée de la mitose en fonction des générations n'a fait jusqu'à présent l'objet d'un travail publié. Nos travaux ont montré que l'évolution de la durée de la mitose est parallèle à celle de la durée du cycle cellulaire. Il semble que les éléments externes qui agissent pour modifier le cycle cellulaire dans le sens d'un allongement lorsque l'âge de la culture augmente agissent de la même façon sur la durée de la mitose.

Quelle que soit la génération considérée, les histogrammes représentant les valeurs individuelles du cycle et de la mitose sont tous asymétriques et étalés vers la droite, donc vers les plus fortes valeurs.

Nombreux auteurs ont trouvé des résultats analogues sur des matériels biologiques d'origines très diverses : bactéries ou procaryotes (*PRESCOTT*, 1959 ; *COOK et al.*, 1962 ; *SCHAECHTER et al.*, 1962 ; *QUESNEL*, 1963) ou cellules de mammifères (*HSU*, 1959-1960 ; *MAC QUILKIN et EARLE*, 1962 ; *SISKEN et KINOSITA*, 1962 ; *FROESE*, 1965 ; *MARIN et BENDER*, 1966 ; *THOMPSON et SUIT*, 1967 ; *TROTT*, 1970).

Ces différents résultats éliminent définitivement l'hypothèse d'une distribution normale des valeurs individuelles du cycle cellulaire et d'autres types de distribution furent ensuite proposés par différents auteurs : *POWELL (1955 - 1963)* a proposé, pour rendre compte des résultats qu'il avait obtenus sur 4 souches bactériennes, une distribution de type PEARSON III.

KUBITSCHEK (1966) reprenant les résultats qu'il avait obtenus sur *Escherichia Coli (KUBITSCHEK, 1962)* ainsi que ceux de *COOK (1966)* sur les Euglènes, a montré que toutes les distributions étaient récipronormales (distribution normale de 1/TC).

SCHMID (1967) a réanalysé de façon statistique les résultats de PRESCOTT (1959) et de MAC DONALD (1958) sur Tetrahymena, les résultats de SISKEN et MORASCA (1965) sur les cellules amniotiques humaines, ceux de KUBITSCHEK (1966) sur Escherichia Coli et ceux de POWELL (1956) sur Bacillus Megaterium ; il a montré que la distribution normale des inverses du temps de cycle ne rendait pas compte de tous les résultats expérimentaux.

Enfin KUBITSCHEK (1971) a

étudié les distributions des valeurs individuelles de la durée du cycle chez les bactéries (*Escherichia Coli* et *Bacillus Megaterium*), les levures (*Saccharomyces Cerevisiae*) les Euglènes et les cellules de mammifères (cellules de rein de singe) ; il a montré que la distribution des inverses des temps de cycle (récipronormale) correspondait à tous les types cellulaires.*NORRBY (1967, 1970)* a trouvé les mêmes résultats sur des souches de cellules transformées d'origine humaine.

Les différents résultats, énumérés ci-dessus, montrent que le problème du type de la distribution des valeurs individuelles du cycle, assez largement étudié chez les bactéries et unicellulaires, et beaucoup moins fréquemment chez les cellules de mammifères, est loin d'être résolu ; ceci en

admettant qu'il ait un sens : c'est-à-dire qu'on puisse imaginer un modèle théorique du cycle valable pour tous les systèmes. La normalité était autrefois jugée caractérisant des phénomènes dont les causes étaient très nombreuses et additives. Mais une éventuelle infinité de causes additives a-t-elle plus de raisons d'agir sur Tc, log Tc ou sur $\frac{1}{Tc}$?

Nos études comparatives des différents types de distribution des valeurs individuelles du cycle décrits dans la littérature ne peuvent pas proposer un modèle unique qui puisse rendre compte des résultats obtenus au niveau de chaque génération.

Les différents résultats que nous avons obtenus, au niveau de la cellule EMT 6, sont partiellement en accord avec ceux de *NORRBY (1970)* et de *KUBITSHEK (1971)* selon lesquels la distribution log normale des temps de cycle ne rend pas compte de tous les résultats expérimentaux. Cependant, l'hypothèse d'une distribution récipronormale n'est vérifiée qu'au début de la culture et précisément pour les deux premières générations (ceci aussi bien pour le cycle que pour la mitose).

Il est à souligner que si les valeurs des durées de la mitose sont distribuées de façon log normale (ou récipronormale), et si on suppose que les différentes phases du cycle cellulaire sont indépendantes, les valeurs du cycle ne peuvent suivre le même type de distribution. En effet, la somme de plusieurs variables indépendantes et log normales ne peut pas être elle-même log normale. Il est également important de noter que nos résultats indiquent, pour les valeurs de la mitose, un histogramme étalé vers la droite et que ceci participe très certainement à l'asymétrie de l'histogramme des valeurs individuelles du cycle. *KUBITSCHEK* (1962) ; SISKEN et MORASCA (1965) et NORRBY (1967, 1970) ont proposé également une distribution récipronormale pour rendre compte de la variabilité de la durée de la mitose. En fait la discussion concernant le type des distributions des valeurs individuelles du cycle et de la durée de la mitose nous semble être de nature académique et, la plupart du temps, les différents expérimentateurs et biomathématiciens ont surtout besoin d'un modèle descriptif des différentes distributions. Nos différents résultats indiquent cependant que lorsqu'on s'adresse à des cellules en culture, la distribution normale des inverses des temps de cycle doit être préférée à la distribution log normale des valeurs du cycle cellulaire.

B - Relations entre la durée du cycle et de la mitose d'une même cellule et des cellules apparentées

1) <u>Corrélation entre la durée du cycle et</u> et de la mitose d'une même cellule.

La mesure simultanée, pour chaque cellule, de la durée du cycle et de la mitose, nous a permis de vérifier s'il existait un lien entre ces deux paramètres. Nous avons donc étudié les coefficients de corrélation entre la valeur du cycle (Tc) et la valeur de la mitose (Tm). Parce que les corrélations éventuelles de Tm avec Tc pourraient n'être que le reflet du fait que Tm est inclus dans Tc ; nous avons également étudié la corrélation entre la durée intermitotique ou interphase (Tc - Tm) et la durée mitotique pour chaque cellule.

Il existe une corrélation positive entre la durée du cycle et celle de la mitose, à partir de la troisième génération.

Pour les deux premières générations les coefficients de corrélation sont positifs, mais ne sont pas significativement différents de O (Tableau V, p.52).
TABLEAU V

CORRELATIONS ENTRE LA DUREE DE LA MITOSE (Tm) ET L'INTERVALLE INTERMITOTIQUE (Tc-Tm) OU LA DUREE DU CYCLE (Tc). n: indique le nombre de cellules utilisées. La signification statistique de ces corrélations est indiquée par NS (non significatif $p \ge 0,05$), *(p < 0,05), (p < 0,05), *(p < 0,01), ***(p < 0,001).

Générations	1	2	3	4	5	6
		1 - 7			270	140
n Tm, (Tc-Tm)	0,11	0,10	0,15	403 0,53	370	149 0,35
Tm, Tc	0,16	0,13	* 0,18 **	0,54 ***	0,50 ***	*** 0,36 ***

Ces résultats indiquent donc que, pour une même cellule, il existe une corrélation entre la durée du cycle et celle de la mitose ; cette corrélation est d'autant plus importante que l'âge de la cellule augmente.

2) <u>Etude des corrélations entre les paramètres</u> de la mère et ceux de ses filles.

Les corrélations mêre-filles sont significativement différentes de O, lorsqu'on compare les mêmes paramètres pour la mère et les deux filles : c'est-à-dire, durée de la mitose de la mère et durée moyenne des mitoses des deux filles, temps de cycle de la mère et temps de cycle moyen des deux filles (Tableau VI, p. 54) . Par contre, ces corrélations n'existent plus lorsqu'on compare des paramètres différents : mitose de la mère et cycle des deux filles et inversement (Tableau VI, p. 54).

Ainsi l'analyse des différents résultats obtenus permet de prévoir qu'une "mère" à cycle long donne plutôt naissance à des "filles" dont le cycle sera long. On peut également prévoir qu'une "mère" à durée de mitose longue donne plutôt naissance à des "filles" dont la durée de la mitose sera longue.

L'origine des corrélations mère-filles pourrait éventuellement s'expliquer par une variation parallèle des caractéristiques de la mère et de ses deux filles avec le temps et avec les conditions de culture. En effet (Tableau VII, p. 55), les durées du cycle et de la mitose varient non seulement avec les générations, mais sont aussi corrélées avec l'âge de la culture (t) au moment du début du cycle de la cellule. Pourtant, les corrélations partielles mère-filles, à un temps donné de naissance des filles, restent significatives pour les générations 2, 3 et 4. Pour la génération 5 cependant, les corrélations partielles mère-filles, deviennent non significatives et on peut supposer que les variations en fonction du TABLEAU VI

CORRELATIONS MERE-FILLES

Cm et Mm sont respectivement les durées du cycle et de la mitose de la mère ; Ch et Mh sont les durées moyennes du cycle et de la mitose des deux hilles. La signification statistique de ces corrélations est indiquée par NS (non significatif p > 0,05), *(p < 0,05], **(p < 0,01], ***(p < 0,001).

des paramètres et de ses 2 filles	Mm – C f	- 0,040 NS	- 0,254 *	- 0,175 NS	- 0,107 NS	
Corrélations entre différents de la mère	Cm – Mf	- 0,050 NS	- 0,526 ***	- 0,102 NS	- 0,131 NS	
les paramètres et de ses 2 filles	Mm-Mf	0,721 ***	0,824 ***	0,676 ***	0,423 *	
Corrélations entre identiques de la mère	Cm - Cf	0,332 *	0,591 ***	0,683 ***	0,317 *	
GÉNÉRATIONS des filles		2	M	4	2	



TABLEAU VII

CORRELATIONS MERE-FILLES EN FONCTION DU TEMPS ABSOLU

t est le temps absolu de naissance des cellules filles. Cm et Mm sont respectivement les durées du cycle et de la mitose de la mère. Ch et Mh sont les durées moyennes du cycle et de la mitose des deux hilles. La signification statistique de ces corrélations est indiquée par NS (non significatif p > 0,05), *(p < 0,05), $x \in [p \leq 0, 01]$, $x \in [p < 0, 001]$

ellule e de				•		
es entre la ce un temps donné	Mm-Mf/t	0,432	0 , 713 ***	0,655 ***	0,378 NS	
Corrélations partielle mère et ses filles à u naissance des filles	Cm-Cf/t	0,351 *	0,528 ***	0 , 608 ***	0,087 NS	
ions entre le temps de naissance es et les caractéristiques de la des filles	t-Mf	- 0,745 ***	- 0,761 ***	- 0,319 *	0,080 NS	
	t-Cf	- 0,170 NS	0,327 *	0,444 **	0,560 **	
	t-Mm	- 0,687 ***	- 0 .594 ***	- 0,665 ***	- 0,347 *	
Corrélat des fi]] mère ou	t-Cm	- 0,078 NS	0 ,430 ***	0 , 430 ***	0,662 ***	
Générations des filles		2	κ	4	5	

RUS

temps sont la cause principale des corrélations simples mèrefilles dans la génération 5 (Tableau VII, p. 55). Il nous faut cependant préciser que (t) ne rend compte que des caractéristiques générales du milieu, c'est-à-dire celles qui ne présentent pas de variations importantes d'un endroit à l'autre de la culture.

3) Coefficients de ressemblance entre

deux soeurs.

Les coefficients de ressemblance entre les cellules soeurs sont importants, significatifs et largement supérieurs aux corrélations "mère-filles" (Tableau VIII, p 57). Les variations avec l'âge de la culture ne peuvent expliquer ces corrélations puisque les corrélations partielles à un âge de naissance donné sont encore statistiquement significatives et seulement légèrement plus faibles que les corrélations simples.

La ressemblance entre les cellules soeurs ne s'explique pas non plus par les corrélations que les deux soeurs ont chacune avec leur mère, car les corrélations partielles entre les durées du cycle ou de la mitose des "filles" et les paramètres correspondant de la "mère" restent significatives ce qui veut dire que les corrélations mère-filles n'apparaissent pas comme la raison majeure expliquant les corrélations soeursoeur simples.

Un examen soigneux de ces corrélations montre cependant que la diminution des corrélations soeur-soeur due à l'ajustement de certaine caractéristique de la mère n'est pas cependant négligeable et est plus important pour la durée de la mitose que pour la durée du cycle.

4) Discussion

Nos résultats montrent que, de toute évidence, au moins à partir de la troisième génération, il existe un certain nombre de corrélations entre la durée de la mitose et celle du cycle cellulaire.

TABLEAU VIII

CORRELATIONS SOEUR-SOEUR

Cs et Ms sont respectivement les durées moyennes de cycle et de mitose de deux soeurs ; Cm et Mm sont les durées du cycle et de la mitose de leur mère ; t est le temps absolu de naissance des deux soeurs. La signification des tests statistiques est indiquée par NS (non significatif $p \ge 0,05$), *(p < 0,05), *(p < 0,01), ***(p < 0,001).

GÉNÉDATIONS	Corréla	tions simples	Corrélations par temps de naissa soeurs	rtielles à un nce des deux	Corrélations partielles pour un cycle donné ou pour une mitose donnée de la cellule mère	
des soeurs	Cs - Cs	Ms - Ms	Cs - Cs/t	Ms - Ms/t	Cs - Cs/Cm	Ms - Ms/Mm
2	0,302	0,829 ***	0,289 *	0,653 ***	0,248 NS	0,674 ***
3	0,668 ***	0,877 ***	0,636 ***	0,750 ***	0,532 ***	0,661 ***
4	0,867 ***	0,480 ***	0,837 ***	0,438 ***	0,754 ***	0,214 NS
5	0,922 ***	0,593 ***	0,888 ***	0,591 ***	0,913 ***	0,526 ***



Lorsque les conditions de culture sont favorables, la durée du cycle et de la mitose semblent indépendantes mais, lorsque des facteurs externes (telle la densité de saturation cellulaire) modifient le cycle ; la mitose est également modifiée.

KOSUKA et HOSHINO (1958, 1962) ont également montré une corrélation positive entre la durée du cycle et de la mitose de cellules HeLa. Selon eux, cette corrélation résulterait de deux autres corrélations : une existant entre la taille cellulaire et la mitose, l'autre existant entre la durée du cycle cellulaire et la taille de la cellule.

L'hypothèse d'indépendance des différentes phases du cycle cellulaire, couramment utilisée dans les modèles statistiques, n'est donc pas vérifié expérimentalement par nos résultats. Cependant, il est difficile d'évaluer quel "biais" apporte l'utilisation de cette hypothèse dans les modèles mathématiques utilisés en cinétique cellulaire.

D'une manière générale, les corrélations positives et significatives que nous avons observées entre le cycle de la mère et le cycle moyen des deux filles, sont plus élevées que celles reportées dans la littérature que ce soit pour les bactéries et organismes unicellulaires (POWELL, 1955, 1958 ; KUBITSCHEK, 1962 ; SCHAECHTER et al. 1962) ou pour les cellules de mammifères (FROESE, 1964 ; DAWSON et al., 1965 ; MIYAMOTO et al., 1973 ; ABSHER et ABSHER, 1974 ; VAN WIJK et al., 1977, 1979). A l'opposé de ces résultats NORRBY (1967) n'observe aucune corrélation mère-filles pour des cellules HeLa. Les corrélations entre la durée de la mitose de la mère et la durée moyenne des mitoses des deux filles sont également significatives. A notre connaissance, aucune étude d'une telle corrélation n'a jamais été entreprise ; les seules tentatives dans ce sens furent réalisées par *SCHAECHTER et al.* (1962), et KOCH et SCHAECHTER (1962) qui étudièrent de façon parallèle, la division cellulaire et la division "nucléaire" d'*Escherichia Coli* ; ces auteurs ont trouvé, pour toutes générations mélangées, une corrélation négative et significative (r =-0,34) entre la division nucléaire de la mère et celle de ses deux filles. Mais, il est très difficile de comparer la division "nucléaire" des bactéries au processus mitotique complexe des Eucaryotes. La signification biologique de ces corrélations mère-filles sera discutée ultérieurement dans le paragraphe réservé à l'étude du déterminisme de la division cellulaire.

Les durées du cycle et de la mitose des deux soeurs sont très fortement corrélées. En ce qui concerne la durée du cycle, nos résultats sont en accord avec ceux de nombreux auteurs sur les bactéries et les organismes unicellulaires (POWELL, 1955, 1958; KIMBALL et al., 1959; POWELL et ERRINGTON, 1963; KUBITSCHEK, 1962; SCHAECHTER et al., 1962; COOK et COOK, 1962; QUESNEL, 1963) ou les cellules de mammifères (MAC QUILKIN et EARLE, 1962; FROESE, 1964; KILLANDER et ZETTERBERG, 1965a et b;DAWSON et al., 1965; MIYAMOTO, 1973; MINOR et al., 1974; KRASNOW, 1978; BROOKS, 1979; VAN WIJK et al., 1977, 1979). Seuls HSU (1959) et SISKEN et al. (1961, 1965) ont mis en évidence de grandes variations entre les durées de cycle des deux soeurs. Mais aucun de ces auteurs n'a étudié de façon précise les coefficients de corrélation. Nous n'avons trouvé aucune référence d'étude de telles corrélations pour la durée de la mitose ; seuls *SCHAECHTER et al. (1962)* ont calculé de fortes corrélations entre les durées des "divisions nucléaires" des deux soeurs.

Ces différentes corrélations observées entre certains paramètres sélectionnés d'une population cellulaire peuvent être considérées sous deux aspects : biologique et cinétique.

 En effectuant une approche biologique du problème, on est tenté de conclure que certains facteurs "incontrôlés" peuvent avoir une influence importante sur la variabilité des durées des différentes phases du cycle cellulaire. Mais l'existence de fortes corrélations soeur-soeur ou mère-filles indiquent que quelques uns de ces facteurs sont liés aux similarités des cellules dans une même lignée parentale. En effet, il est très intéressant de constater qu'il existe une corrélation entre les durées du cycle ou de la mitose et l'âge de la culture et que nonobstant, les corrélations "soeur-soeur" et surtout les corrélations "mère-filles" tiennent. Quoiqu'il en soit, les caractères que la mère et ses filles, ou que deux soeurs ont en commun, sont des candidats potentiels pour expliquer les causes de la variabilité des cellules individuelles dans des conditions de culture contrôlées. En outre, il est intéressant de constater que les coefficients de corrélation soeur-soeur sont beaucoup plus élevés que les coefficients de corrélation mère-filles. Les facteurs de variation du cycle et de la mitose, sont donc à rechercher parmi les facteurs de ressemblance des cellules soeurs.

• D'un point de vue cinétique, on peut supposer que l'existence des corrélations très fortes entre les cellules doit avoir des conséquences sur le comportement d'une population cellulaire dans son ensemble. Bien qu'il ne soit pas vraisemblable que les corrélations observées dans les conditions de culture particulières que nécessite l'utilisation de la technique microcinématographique donnent une bonne estimation des corrélations existant *in vivo*, il est cependant possible de penser que de telles corrélations puissent exister également dans des conditions normales de croissance *in vivo*. De telles corrélations doivent donc être introduites dans la théorie générale du processus de branchement.

IV - DISCUSSION GENERALE

PROBLÈME DE LA RÉGULATION DE LA DIVISION CELLULAIRE

La grande variabilité de la durée de la mitose ainsi que les diverses corrélations observées, entre les différents paramètres du cycle cellulaire, posent le problème de la nature du contrôle de la division cellulaire, ainsi que du déterminisme de la mitose.

Les coefficients de variation (CV) de la durée du cycle des cellules EMT 6 (17 % < CV < 63 %) s'intégrent parfaitement parmi les résultats obtenus sur des matériels biologiques très divers (Tableau IX, p. 62). Il est assez surprenant de constater que la variabilité de la durée du cycle soit la même pour des organismes aussi différents que les bactéries, les protozoaires et les cellules de mammifères.

En fait, il existe dans les cellules des Eucaryotes deux grands phénomènes de régulation de la progression dans le déroulement du cycle : l'initiation de synthèse de de l'ADN, et la division cellulaire ou mitose.

TABLEAU IX

COEFFICIENTS DE VARIATION (CV) DU CYCLE CELLULAIRE : VALEURS REPORTEES DANS LA LITTERATURE

Bactéries et unicellulaires	CV %	Mammifères	CV %
COOK, 1962 (milieu salin Euglena gracilis (milieu complexe	15,9 11,5	DAWSON et al., 1965 Sarcomes de Rat	25,0
KUBITSCHEK, 1962 Tétrahymena	9,2	PUCK et STEFFEN, 1963 HeLa S3	9,0
BURNS, 1970 Saccharomyces cerevisiae 20° C 30° C 38° C	10,0 10,2 17,1	SISKEN et KINOSITA, 1963 Cellules amniotiques Poumon Chat	13,34 26,04
KUBITSCHEK, 1962 Escherichia Coli	18,1	MAC QUILKIN et EARLE, 1962 NCTC 929 L 2071	22,14
POWELL, 1955 Bacillus mycoides 35° C	49,6	KILLANDER et ZETTERBERG, 1965 NCTC 929	12,00
POWELL, 1956 Streptococcus foecalis 35° C Pseudomonas aeruginosa Chronobacterium proteigiosum Bacterium clocae	13,3 14,1 21,2 21,2	MIYAMOTO et al., 1973 NCTC 929 SISKEN et MORASCA, 1965 Cellules amniotiques humaines	15,00 13,6
SCHAECHTER et al., 1962 Division de la bactérie Division "nucléaire"	14,7-22,8 14,4-25,6		



Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer le contrôle du cycle cellulaire et tous ces modèles s'intéressent à l'un ou l'autre de ces phénomènes essentiels (Revues Générales FANTES et al., 1975 ; MITCHISON, 1977 ; PARDEE et al., 1978, 1979).

1) Régulation de l'initiation de synthèse de l'ADN

Chez les animaux supérieurs et les plantes, on considère d'une manière générale que la durée des phases (S + G2 + M) est constante et que la variabilité du cycle cellulaire est due en grande partie à la variabilité de la phase G1 (QUASTLER, 1959; TOBEY et al., 1967; MITCHISON, 1971 a). La régulation majeure serait donc située au niveau de l'initiation de la synthèse de l'ADN à la fin de la phase G1.

a) Initiateurs cytoplasmiques de la synthèse de l'ADN

Il existe des initiateurs de synthèse de l'ADN présents dans le cytoplasme (Revues Générales de *JOHNSON et RAO*, 1971 et de *MITCHISON*, 1971). La présence (par fusion provoquée) d'un noyau en phase S, accélère l'initiation de synthèse de l'ADN d'un noyau dans la phase G1 (*RAO et JOHNSON*, 1970 ; *DEWEY et al.*, 1973).

b) Masse critique pour l'initiation de la synthèse de l'ADN

KILLANDER (1965) a et b et KILLANDER et ZETTERBERG (1965) ont observé que la variabilité de la masse cellulaire des cellules L en phase S était significativement plus faible que la masse cellulaire immédiatement après la mitose. Ces auteurs ont proposé l'existence d'une "masse cellulaire critique" pour l'initiation de la synthèse de l'ADN. CASPERSON (1963) a montré qu'il était possible, par un traitement à l'actinomycine D, de stopper l'initiation de la synthèse de l'ADN en empêchant les cellules d'atteindre leur "masse cellulaire critique". Chez les bactéries, YCAS et al., (1965); DONACHIE et al. (1973, 1976) ont montré l'existence d'un rapport constant entre la masse cellulaire au moment de l'initiation de l'ADN et le nombre de chromosomes. La variabilité initiale de la masse cellulaire serait due à une inégale répartition du matériel non génétique (cytoplasme et certains composants comme les mitochondries, etc...) et ces erreurs pourraient être corrigées au cours de la phase G1 (*PRESCOTT*, *1959*; *SUDBERY et al.*, *1975*; *WORTHINGTON et al.*, *1976*). Une explication possible de la variabilité de la durée de la phase G1 serait que les petites cellules nouvellement formées après la mitose, nécessiteraient un temps plus long pour atteindre leur masse critique (*YEN et al.*, *1975*; *CARTER et al.*, *1978*). Par contre *FOX et al.* (*1970*) n'ont pas observé de corrélation entre la longueur de la phase G1 et la taille des cellules ovariennes de Hamster (CHO) à la mitose.

Plus récemment, *FOLKMAN et MOSCONA (1978)* ont mis en évidence une influence de la forme cellulaire sur l'initiation de synthèse de l'ADN.

c) Probabilité de transition

Une nouvelle conception du cycle cellulaire a été proposée de façon indépendante par deux groupes BURNS et TANNOCK (1970) ; SMITH et MARTIN (1973). Ces modèles de probabilité de transition suggèrent que chaque cycle cellulaire dépend d'un événement critique ou "transition" intervenant au hasard dans la phase G1 du cycle. La régulation de la prolifération cellulaire en fonction des conditions environnantes serait réalisée uniquement par des variations de la probabilité de transition. Dans la terminologie de SMITH et MARTIN (1973) le cycle est divisé en deux parties fondamentales : ,

- une phase B déterminée d'une durée constante qui inclut des phénomènes aussi importants que la synthèse del'ADN et la mitose et,

- une phase A indéterminée dans laquelle les cellules entrent après la mitose et restent pendant une période indéfinie en attendant que la transition critique intervienne. Parmi les arguments défendant l'hypothèse de la probabilité de transition, un des principaux réside dans l'observation que la différence des temps de cycle de deux soeurs est distribuée de façon exponentielle (*MINOR et SMITH*, 1974 ; SHIELDS, 1978). Or cette courbe ne peut être exponentielle que si la différence entre les deux cellules soeurs est due uniquement à une transition simple (SHIELDS, 1978) ; ceci implique également que deux soeurs ont deux phases B rigoureusement indentiques.

Quoique le modèle d'une seule transition dans le cycle cellulaire puisse rendre compte de nombreuses données expérimentales (SMITH et MARTIN, 1973, 1974 ; MINOR et SMITH, 1974 ; FOURNIER et PARDEE, 1975 ; ROBINSON et al., 1976 ; SHILO et al., 1976 ; BROOKS, 1976) ; il ne peut rendre compte de tous les résultats expérimentaux (SVETINA, 1977). De nouveaux modèles ont donc été proposés, incluant plusieurs points de transition en G1 (RIGNEY, 1979 ; BROOKS, 1980) ou une probabilité de transition dans la phase A du cycle et une également dans la phase B (BLAIR et ROTI-ROTI, 1979).

Il est maintenant clair que la durée de la phase B n'est pas constante d'une cellule à l'autre (SMITH, 1977 ; SHIELDS et SMITH, 1977) et nous avons nous-même montré combien la durée de la mitose est variable et que les phases G1 et G2 ont des variabilités relatives comparables (GUIGUET et al., 1980). MOSER (1967) suggère que la variabilité du cycle cellulaire est due à l'allongement ou à la contraction de toutes les phases du cycle cellulaire ; c'est ce que nous montrons également dans la deuxième partie de cette thèse : après une irradiation, la durée de la mitose et la durée du cycle sont allongées dans les mêmes proportions (Fig.29, p. 119).

2) Régulation de la division cellulaire

a) Protéines de division

C'est un des plus vieux modèles de contrôle de la division cellulaire proposé il y a plus de vingt ans par ZEUTHEN et RASMUSSEN (Revue Générale, 1971). Le modèle invoque la synthèse au cours du cycle d'une ou plusieurs "protéines de division". Ces protéines seraient à l'origine d'une structure initialement instable,puis complétée et stabilisée à un moment donné (point de transition) juste avant la mitose.

Chez Tetrahymena, les chocs thermiques,appliqués avant le point de transition, provoqueraient un allongement du cycle, alors qu'au delà du point de transition, la cellule serait insensible au traitement. Bien que ces protéines de division n'aient pas été identifiées il y aurait une structure analogue dans l'appareil oral des ciliés.

Les justifications de ce modèle proviennent d'un certain nombre de travaux effectués sur Tetrahymena, mais il est possible qu'un tel mécanisme de régulation intervienne chez les procaryotes et les eucaryotes primitifs (*MITCHISON*, 1971 (a)) et même chez les cellules de mammifères (*MIYAMOTO et al.*, 1973). Un tel modèle est d'ailleurs utilisé pour tenter d'expliquer les variations du retard à la mitose avec l'âge de la cellule au moment d'une irradiation (*DEWEY et HIGHFIELD*, 1976).

Il faut bien reconnaître cependant, que ce système de 'protéines de division' est peutêtre valable sur le plan biologique, mais il mériterait une démonstration biochimique plus justifiée ; et ceci n'est pas le cas.

b) Initiateurs de division

Ainsi que nous l'avons décrit dans le paragraphe a) (p.63)les expériences de fusions cellulaires ont mis en évidence l'existence d'un initiateur

cytoplasmique de la mitose (JOHNSON et RAO, 1971 ; RAO et al., 1975). D'autres travaux réalisés chez les plantes ont conduit RUSCH et al. (1966) ; SACHSENMAIER et al. (1972, 1975) à proposer un modèle de régulation de la division cellulaire : l'entrée en mitose serait déclenchée par la saturation d'un certain nombre de sites nucléaires qui formeraient un complexe réversible avec un initiateur cytoplasmique. Durant la mitose, le nombre de noyaux double et de nouveaux sites nucléaires deviennent disponibles avant d'être saturés à nouveau avant que la division suivante n'ait lieu. Mais, comme dans la plupart des modèles proposés, la molécule cytoplasmique qui effectue le contrôle est encore inconnue.

c) Taille critique pour l'initiation de la division cellulaire

Chez les Eucaryotes, il pourrait y avoir une "masse critique" à atteindre avant l'initiation de la division (Revues Générale, FANTES et al., 1975; FANTES, 1977) mais les données expérimentales vérifiant cette hypothèse sont encore limitées. La preuve la plus directe réside dans les expériences d'amputation, réalisées chez l'amibe il y a une cinquantaine d'années (HARTMANN, 1928) puis reprises par PRESCOTT (1956 a et b). En enlevant une partie importante du cytoplasme, on retarde la division de l'amibe ; en répétant l'amputation tous les jours, PRESCOTT a réussi à inhiber les divisions de l'amibe pendant 4 mois, l'amibe continue à grandir, mais ne peut atteindre la taille critique nécessaire à la division. Une autre preuve vient des travaux de NURSE (1975), sur un mutant thermosensible de la levure Schizosaccharomyces pombe; les résultats des différentes conditions de culture à 25 ou 35° C, peuvent être expliqués par un rôle de la taille dans l'initiation de la division cellulaire.

Dans les systèmes de cellules eucaryotes, l'inhibition spécifique de la synthèse de l'ADN et (ou) de la mitose, entraîne une modification du rapport <u>noyau</u> et une succession de mitoses à un rythme accéléré cytoplasme

pour retrouver une valeur normale de ce rapport (GALAVAZI et BOOTSMA, 1966 ; BREWER et RUSCH, 1968, MITCHISON et CREANOR, 1971 ; KRASNOW, 1978). DEVI et al. (1968) et SACHSENMAIER et al. (1970) ont également montré que la destruction sélective d'une partie du noyau par les rayons ultraviolets, entraîne des divisions cellulaires très rapprochées.

En fait, les lignées cellulaires animales présentent souvent une très grande dispersion de taille dans chacune des phases du cycle cellulaire (ANDERSON et al., 1970, 1979; MAC DONALD et MILLER, 1970; MEISTRICH et al., 1977; SKOG et al., 1979). YEN et al. (1975) avaient supposé que la corrélation entre les durées des phases G1 de deux cellules soeurs pouvait résulter de la similarité des tailles cellulaires, mais FOX et PARDEE (1970) et FOURNIER et PARDEE (1975) n'ont pas observé de corrélation entre la durée de la phase G1 et la taille cellulaire à la naissance. De plus des études récentes suggèrent que la durée de la phase G1 est corrélée avec la quantité de l'ADN plutôt qu'avec la taille cellulaire, DARZYNKIEWICZ et al., (1979); SHIELDS et al., (1978), ont montré que la taille cellulaire avait un rôle mineur par rapport à la transition de probabilité.

d) Contrĉle génétique de la division cellulaire

Les fortes corrélations observées entre la durée du cycle des cellules soeurs soutiennent l'hypothèse d'un contrôle génétique de la division cellulaire, mais, si le contrôle de la division était uniquement génétique, les variations devraient être héritées et comment dans ce cas, expliquer les moins bonnes corrélations mère-filles, ainsi que les variations des durées de cycle et de mitose en fonction des générations ? Le caractère instable de la cellule EMT 6, cellule transformée pourrait expliquer partiellement nos propres résultats, mais comment expliquer les très faibles corrélations mère-filles enregistrées au niveau de souches beaucoup plus stables ? POWELL (1955) et KUBITSCHEK (1966) mirent en évidence une influence des ancêtres sur la durée du cycle. Cette influence, ne serait pas visible sur une seule génération mais des mécanismes compensateurs non obligatoirement génétiques seraient légués par les ancêtres (VAN WIJK et al., 1979).

A l'opposé de ces résultats, *KRASNOW* (1978) pense que le seul rôle de la mère est de donner naissance à une cellule d'une certaine taille ; ceci seulement détermine la suite des événements. Selon ce dernier, les corrélations "grand-mère – petites-filles", "soeur-soeur" et "mère-filles" ne peuvent en aucun cas être expliquées par des facteurs héréditaires et sont seulement dues à une homogénéité de la taille cellulaire.

Les très fortes corrélations observées entre les paramètres des deux soeurs ne sont pas automatiquement liées à un contrôle génétique de la division cellulaire. KOCH et SCHAECHTER (1962) ont suggéré que ces corrélations pouvaient résulter d'un microenvironnement commun ou de modifications communes aux deux soeurs reçues au niveau de la membrane et FROESE (1965) a montré que les coefficients de corrélation entre la durée du cycle de deux cellules soeurs étaient beaucoup moins élevées lorsque les soeurs s'éloignaient l'une de l'autre (r = 0,71 pour les soeurs) qui restent voisines et r = 0,35, pour les soeurs qui s'éloignent.

Nous avons, nous-mêmes, relevé la localisation et la distance entre les cellules soeurs au moment de leurs mitoses respectives. Afin de tester si la ressemblance des soeurs était liée à leur proximité géographique, nous avons étudié les corrélations entre l'écart des durées du cycle et de la mitose et la distance des deux cellules soeurs en fin de mitose. Aucun des coefficients de corrélation observés n'est significatif (Tableau X, p. 70), ce qui veut dire que l'existence des corrélations soeur-soeur n'est pas liée à la proximité des deux soeurs. Il faut préciser que les mesures des distances entre deux soeurs ne s'effectuent qu'en fin de cycle, au moment de la mitose et que ces calculs ne TABLEAU X

CORRELATIONS ENTRE L'ECART DES DUREES DE CYCLE ET DE MITOSE ET LA DISTANCE ENTRE LES DEUX CELLULES NS (non significatif p > 0,05), *(p < 0,05). SOEURS EN FIN DE MITOSE.



tiennent pas compte de la distance parcourue au cours du cycle.

Il est clair qu'un certain nombre de ces modèles ne sont pas mutuellement exclusifs : une "protéine de division" peut être un "initiateur de division" et la concentration de celle-ci peut déterminer une "taille critique pour la division". Il est même possible que le même initiateur soit à la fois responsable de l'initiation de synthèse de l'ADN et, à une concentration plus forte, de l'entrée en mitose. Ceci est très attrayant pour les cellules de mammifères où il semble exister une durée constante entre ces deux phénomènes, bien que les expériences de fusions cellulaires soient contre le fait que l'inducteur de mitose soit le même que celui responsable de l'initiation de synthèse de l'ADN.

Il existe en fait deux points de contrôle dans le cycle cellulaire : la synthèse de l'ADN, et la division cellulaire. Les chemins des mécanismes qui contrôlent ces deux clefis, peuvent être parallèles (DONACHIE, 1973 ; HARTWELL, 1974). Des expériences très récentes (TUCKER et al., 1979 ; LLOYD, 1979) suggèrent même l'existence d'une corrélation entre la replication de l'ADN et le "cycle" des microtubules de l'appareil mitotique. La taille cellulaire semble être un élément important dans le contrôle du cycle cellulaire mais la plupart des modèles proposés proviennent d'études réalisées chez les Eucaryotes primitifs et des études plus complètes s'avèrent nécessaires pour comprendre les mécanismes de régulation opérant chez les cellules de mammifères.

V - CONCLUSIONS

Dans la première partie de cette thèse, nous avons présenté des résultats concernant les durées du cycle et de la mitose des cellules EMT 6 en culture. De l'ensemble de nos résultats plusieurs points peuvent être retenus :

 Les durées du cycle et de la mitose évoluent au cours des générations : plus élevées pour la première génération après le repiquage, les valeurs du cycle et de la mitose sont égales pour les génération 2 et 3, puis augmentent ensuite ;

 A partir de la génération 3, on observe une corrélation significativement différente de zéro entre les durées du cycle et de la mitose d'une même cellule ;

 Nous avons mis en évidence des corrélations significativement différentes de zéro entre les durées du cycle et de la mitose des cellules apparentées ("mère-filles" ; "soeur-soeur") ;

• Le modèle récipronormal (distribution normale des inverses du cycle cellulaire ou de la mitose), rend le mieu compte des distributions des valeurs individuelles des durées du cycle et de la mitose.

L'élucidation de la nature des facteurs de similarité entre les différentes cellules, pourrait permettre une meilleure connaissance de l'origine possible des variations individuelles.

Une explication définitive de ces corrélations ne peut être trouvée dans la littérature, quoique de nombreuses hypothèses aient été formulées (cf. paragraphe d, p. 68). Il est raisonnable de penser qu'en mesurant des facteurs de variabilité tels les _{ca}ractéristiques de la cellule mère, la densité cellulaire locale, le temps absolu de naissance des cellules, la taille cellulaire et la distance entre les cellules voisines, en utilisant la simple méthode analytique que constitue la microcinématographie, on puisse arriver à une meilleure compréhension de la ou des causes des corrélations observées et finalement de contribuer ainsi à orienter les études, notamment biochimiques ou ultrastructurales de la division cellulaire.

DEUXIEME PARTIE

ÉTUDE MICROCINÉMATOGRAPHIQUE DE LA DURÉE DU CYCLE, DE LA DURÉE DE LA MITOSE ET DE LA PROBABILITÉ DE DIVISION DES CELLULES EMT 6 SOUMISES À DIFFÉRENTES IRRADIATIONS.

I - INTRODUCTION

1 - GENERALITES

A la suite des premières applications des rayons X et des isotopes radioactifs, de nombreuses données cliniques ont été accumulées pour différents types de tumeurs traitées par irradiation. Les seuls critères d'efficacité de ces traitements étaient la probabilité de guérison ou de réapparition des tumeurs ainsi que la probabilité de lésions causées aux tissus normaux environnants.

En clinique, un certain nombre de règles empiriques furent instaurées, mais dans le but d'améliorer les différents schémas de traitement radiothérapique, une meilleure compréhension des phénomènes de prolifération et de mort cellulaire fut nécessaire.

On peut actuellement définir 3 grands types de lésions provoquées par les radiations : les lésions létales, les lésions potentiellement létales ou sub-létales et les lésions non létales.

a) les lésions létales

Les lésions <u>létales</u> sont celles qui entraînent la mort cellulaire soit immédiatement, soit de façon différée, c'est-à-dire au cours de la descendance.

La mort radiologique correspond à une perte définitive de la fonction de reproduction. En pratique, le seul critère important pour estimer de façon quantitative la mort reproductrice provoquée par l'irradiation est la clonogénicité ou aptitude des cellules à donner naissance à des colonies. Une cellule est généralement considérée comme viable lorsqu'elle donne naissance à une colonie, contenant au moins 50 cellules ; ce qui veut dire qu'elle est capable de donner naissance à 5 générations, donc de se diviser indéfiniment. Les méthodes du clonage *in vitro*, introduites par *PUCK et MARCUS (1955, 1956)* et celles des transplantations *in vivo (HEWITT, 1953 et HEWITT et WILSON, 1959)* permettent de quantifier la fraction de cellules survivantes après une irradiation ainsi que le rôle de certains paramètres sur la radiosensibilité.

b) les lésions sublétales et potentiellement

létales

En 1959, ELKIND a mis en évidence la réparation de lésions qu'il a appelées <u>sub-létales</u> (LSL) (ELKIND et SUTTON, 1959). Ce sont des lésions qui n'entraînent pas elles-mêmes la mort reproductrice de la cellule, mais qui la fragilisent à un traitement suivant. Ces lésions peuvent être réparées et expliquent le fait que lorsqu'une dose de radiations ionisantes est délivrée en deux fractions séparées de quelques heures, le taux de survivants est plus élevé que lorsque la dose est délivrée en une seule fois.

Ultérieurement, PHILLIPS et TOLMACH (1966) ont mis en évidence d'autres types de lésions qu'ils ont appelées <u>potentiellement létales</u> (LPL). Les réparations des lésions potentiellement létales s'observent lorsque après une irradiation, les cellules sont maintenues dans des conditions qui ne permettent pas la prolifération : inhibiteurs métaboliques (PHILLIPS et TOLMACH, 1966) ; privation de substances nutritives (HAHN et LITTLE, 1972) ; densité cellulaire élevée (HAHN et LITTLE, 1972).

c) les lésions non létales

Les lésions <u>non létales</u> provoquées par l'irradiation concernent principalement les modifications au niveau de la prolifération cellulaire. En effet, CANTI et SPEAR (1927) étudiant les indices mitotiques des cultures de cellules d'embryon de Poulet, furent les premiers à mettre en évidence une inhibition temporaire de la division cellulaire provoquée par l'irradiation. Ensuite le développement rapide des techniques en cinétique cellulaire, permit à un certain nombre d'auteurs de montrer que la durée du cycle des cellules irradiées, survivantes ou non, était allongée du fait d'un arrêt provisoire de la cellule dans le cycle (Tableau XI, p. 77 et 78).

Cet arrêt provisoire de la cellule dans le cycle fut défini comme délai mitotique ou retard à la mitose.

2 - DIFFERENTS PARAMETRES INFLUENCANT LA REPONSE D'UNE POPULATION

CELLULAIRE A UNE IRRADIATION

a) la dose

La courbe de survie, en fonction de la dose (en abrégé dans la suite de cet exposé : courbe de survie), permet de quantifier la relation entre la mort cellulaire reproductrice et la dose.

Les courbes de survie peuvent être de deux types : elles sont soit exponentielle d'emblée, soit de type sigmoïde ; dans ce dernier cas, elles présentent d'abord une partie incurvée appelée épaulement, suivie d'une partie exponentielle. On interprète généralement l'épaulement en admettant que les faibles doses de radiations créent surtout des lésions sub-létales et que c'est essentiellement l'accumulation des lésions sub-létales qui crée ensuite un événement létal. Pour évaluer l'importance de l'épaulement, un des procédés couramment utilisé, consiste à extrapoler la partie rectiligne de la courbe de survie jusqu'à l'axe des ordonnées. Le point d'intersection avec l'axe des ordonnées correspond au nombre d'extrapolation (n) qui est d'autant plus élevé que l'épaulement est plus important. Le deuxième paramètre qui permet de caractériser la courbe de survie est la dose létale moyenne ou Do. La Do correspond à la dose qui, dans la partie

TABLEAU XI

DIFFERENTS TRAVAUX AYANT MIS EN EVIDENCE UN RETARD A LA MITOSE PROVOQUE PAR UNE IRRADIATION

MICROORGANISMES

Tetrahyména

Algues

VÉGÉTAUX

Vicia Faba

Tradescantia

Pisum sativum

Méristèmes végétaux

CELLULES D'EUCARYOTES IN VITRO

EMBRYON de POULET

Cellules L

Sarcome S 180 Carcinome

Hépatome

СНО

BHK 21

V 79

HODGE et NACHTWEY, 1972 PAUL I.et al., 1973 ZIMMERMAN, 1973

GRUBER, 1976 PUJARA et al., 1970

JUNGLING et al., 1930 EVANS et al., 1959 NEARY et al., 1959 GEARD et MAKINO, 1977

BEATTY et BEATTY, 1954

VANT'HOF et al., 1970

DAS et ALFERT, 1961 KOVACS et VANT'HOF, 1971

CANTI et SPEAR, 1926, 1929 HARRINGTON, 1960 KUYPER et al., 1962

WHITFIELD et al., 1959 TILL et al., 1961 MAC et TILL, 1963 WHITMORE et al., 1967 THOMPSON et SUIT, 1967, 1969 LEEPER et al., 1973 SASAKI et al., 1977

MARZ et al., 1976

MUNRO, 1970 LEEPER et al., 1972, 1973 MILLER et al., 1973 DEWEY et al., 1976 SCHNEIDERMAN et al., 1977

LAFONTAINE et FIRKET, 1972

ELKIND et al., 1963 FROESE et al., 1966, 1968 YU et SINCLAIR, 1967 BACCHETTI et SINCLAIR, 1970 LUCKE HUHLE et al., 1979

SOURIS

RAT

HAMSTER

TABLEAU XI (suite)

μΔΜςτερ	L P 59	DEWEY et al., 1962, 1966
IIRMSTER	L 5178 Y	DOIDA et OKADA, 1969 EHMAN et al., 1974
CHIEN	a Alberto de Carlos de Carlos de Carlos Alberto de Carlos de Carlos de Carlos Alberto de Carlos de Carlos de Carlos de Carlos Alberto de Carlos de Carlos de Carlos de Carlos de Carlos de Carlos Alberto de Carlos de	ODARCHENKO et al., 1964
HOMME	HeLa NIK 3025	MIZUTANI et al., 1961 YAMADA et PUCK, 1961 TERASIMA et TOLMACH, 1963 FIRKET, 1966, 1968 FROESE et al., 1966, 1968 MARIN et BENDER, 1966 WALTERS et PETERSEN, 1968 HURWITZ et TOLMACH, 1969 LINDMO et al., 1979
	CELLULES D'EUCARY	OTES
	Embryons d'Oursins	FAILLA, 1969 RUSTAD, 1970
	Epiderme d'Insecte	BALDWIN, 1961
	Tumeurs de Souris	GOLDFEDER, 1951 KIM et EVANS, 1964 FRINDEL, 1970

Moëlle de Souris

Cellules de la cornée du Rat

Erythroblastes de Chien

Epidermes digestifs

Tumeurs humaines

FRINDEL, 1967

FRIEDENWALD et al., 1953 FRIEDMAN et al., 1955 FADDEEV, 1963

ODARCHENKO et al., 1964

KNOWLTON et al., 1949 WILLIAMS et al., 1958 WIERNIK et al., 1962

KOLLER, 1947 VOUTILAINEN, 1962

exponentielle, laisse $\frac{1}{8}$ (\simeq 37 %) de survivants (Fig. 15, p. 80).

En ce qui concerne le retard à la mitose, différents travaux ont également permis d'établir une relation quantitative entre la dose administrée et l'importance de l'arrêt dans le cycle. Pour des doses comprises entre 1 et 10 grays, nombreux auteurs ont montré que cette relation était linéaire et actuellement, on admet qu'une dose de 1 Gy de rayons X ou gammas, administrée à une population asynchrone, provoque en moyenne un retard à la mitose de 1 heure. (DEWEY et al., 1963 ; ELKIND et al., 1963 ; FROESE, 1966 ; YU et SINCLAIR, 1967 ; THOMPSON et SUIT, 1967, 1969 ; WALTERS et PETERSEN, 1968 ; DOIDA et OKADA, 1969 ; LEEPER et al., 1972 ; SASAKI et al., 1977).

Pour des doses inférieures à 1 Gy ou supérieures à 10 Gy, il semble que le retard à la mitose augmente avec le logarithme de la dose (*TILL*, 1961 ; WHITMORE et al., 1967 ; DOIDA et OKADA, 1969).

Aucune étude quantitative de l'influence de la dose d'irradiation sur la durée de la mitose des générations irradiée et post-irradiée, n'a jamais été effectuée jusqu'à présent.

b) l'âge de la cellule dans le cycle au moment

de l'irradiation

Les différentes techniques de synchronisation associées aux techniques de clonage, ont permis d'étudier la radiosensibilité de chacune des phases du cycle cellulaire.

On peut résumer les nombreuses études réalisées dans ce but de la façon suivante : en ce qui concerne la mort reproductrice, dans la plupart des lignées cellulaires, il existe deux pics de radiorésistance - le début de G1 et la fin de S-et deux pics de sensibilité -la mitose et le passage $G1 \rightarrow S-(Revues Générales FRINDEL et TUBIANA, 1971 ; FRINDEL, 1975)$



Figure 15



Exemple de courbe de survie obtenue après action des rayons γ du ⁶⁰Co sur des cellules EMT 6 en culture exponentielle *in vitro*.

Des études analogues ont été entreprises au niveau de la durée du cycle cellulaire, mais les résultats varient selon les auteurs et les souches cellulaires analysées. Cependant, d'une manière générale la réponse, selon l'âge, du retard à la mitose est pratiquement l'inverse de celle observée pour la survie cellulaire : le délai mitotique augmente du début de la phase G1 jusqu'au début de la phase G2, puis diminue brutalement lorsque la cellule est irradiée en fin de G2 (*Revue Générale*, *FRINDEL*, 1975).

Aucune étude de l'influence de l'âge de la cellule dans le cycle au moment de l'irradiation sur la durée de la mitose des générations irradiée et postirradiée n'a fait jusqu'à présent l'objet d'une publication.

c) la nature des radiations utilisées

Depuis les nombreuses études de courbe de survie (HALL et al., 1972 ; FOWLER, 1974), on sait que les particules de transmission d'énergie linéaire (TEL) (définition p. 86) élevée (particules α , neutrons, mesons I, ions lourds accélérés) ont une efficacité biologique relative (E.B.R.) (définition p.127), plus grande que les radiations de TEL faible (rayons X de 220 kv ; rayons γ du ⁶⁰ cobalt). De plus les radiations de TEL élevé présentent une meilleure répartition de la dose en profondeur et sont moins sensibles aux différents facteurs qui modifient la réponse cellulaire à l'irradiation, en particulier l'âge de la cellule dans le cycle (HALL et al., 1977) et l'oxygénation (TOBIAS, 1973 ; TOBIAS et al., 1978). Ces différences de comportement des ions lourds accélérés par rapport aux radiations de TEL faible expliquent l'intérêt qui leur est porté (GHIORSO et al., 1973 ; CASTRO et QUIVEY, 1977).

L'étude des effets non-létaux des ions d'hélium (BERRY et ANDREW, 1964 ; WITHERS, 1967 ; FEOLA et al., 1969 ; CHONG, 1971 ; RAJU et al., 1972 ; EL-MAHDI et al., 1974 ; LEITH et al., 1974 ; TODD et al., 1974 ; LEITH et al., 1975 a; WARD et al., 1976 ; GUICHARD et al., 1977 ; CURTIS et al., 1978 ; RAJU et al., 1978) et des ions de néon (SKARSGARD, 1967 ; TODD, 1967 ; LEITH et al., 1975 b, 1976 ; RAJU et al., 1976 ; CURTIS et al., 1978 ; RAJU et CARPENTER, 1978 ; RAJU et al., 1978) sur les cellules de mammifères est très bien documentée.

Les études consacrées à l'influence des ions d'hélium ou de néon, sur la durée du cycle cellulaire sont au contraire beaucoup plus rares. Le plus souvent ces recherches ont été conduites en utilisant comme critère soit le devenir de l'index mitotique (SKARSGARD, 1964 ; 1967), soit le retard de la croissance de l'ensemble d'une population (CURTIS, 1978), soit l'accumulation transitoire des cellules dans la phase G2 (LUCKE-HUHLE, 1979). Dans ce dernier cas, le faisceau des ions d'hélium n'était pas modifié par un dégradeur (définition p. 95) et à notre connaissance, aucune étude des effets des ions d'hélium et de néon sur la durée du cycle cellulaire n'a jamais été réalisée en situant les échantillons dans un Pic de Bragg étalé (définition p. 95). De plus, aucune étude n'a été menée jusqu'à présent, pour établir une relation entre l'âge de la cellule dans le cycle au moment du traitement et l'importance du retard à la mitose produit par des ions de haute énergie.

d) autres facteurs : débit de dose, oxygénation

et fractionnement

Depuis les premières courbes de survie établies par *HALL et BEDFORD (1964)* on sait que la réduction du débit d'irradiation diminue de manière appréciable le pourcentage de cellules survivantes. A dose égale de radiations ionisantes, les faibles débits (ceux qui sont couramment utilisés en curithérapie et qui se situent entre 0,5 Gy et 1 Gy par heure) laissent subsister un plus grand nombre de cellules survivantes que les débits aigus (égaux ou supérieurs à 30 Gy par heure) qui sont utilisés en radiothérapie classique par voie externe. L'interprétation de ce résultat est liée aux mécanismes de réparation qui interviennent en cours d'irradiation dans le cas des irradiations à faible débit et à l'importante redistribution des cellules dans le cycle (*MITCHELL et al.*, 1979 a, b, c).

De nombreuses études de courbes de survie ont également mis en évidence une <u>radiorésistance</u> des cellules mal oxygénées pendant l'irradiation. La radiosensibilité cellulaire diminue en fonction du taux d'hypoxie pour tendre vers une valeur minimale qui est environ trois fois plus faible que celle observée en présence d'oxygène (*DESCHNER et GRAY*, 1959). Ce résultat est important car dans de nombreuses tumeurs, les cellules situées à une distance supérieure à 100 µm du capillaire le plus proche sont mal vascularisées et vraisemblablement hypoxiques (*THOMLINSON et GRAY*, 1955 ; KALLMAN, 1972).

Enfin *ELKIND (1960)* a également montré que l'effet global d'une irradiation était plus faible si la dose était divisée en un certain nombre de fractions administrées à intervalles réguliers. Ceci peut être expliqué par la réparation des lésions sub-létales qui intervient entre deux fractions successives d'irradiation.

3 - BUTS DE NOTRE TRAVAIL

L'allongement du cycle provoqué par l'irradiation entraîne un ralentissement de la croissance de la population cellulaire et un blocage temporaire des cellules dans une phase donnée du cycle cellulaire qui modifie la sensibilité globale de la population cellulaire traitée, modification qu'il est essentiel de connaître avant d'appliquer un second traitement dans une série d'irradiations fractionnées par exemple.

Lorsque nous avons commencé ce travail, aucune donnée n'existait dans la littérature concernant :

- l'influence de la dose de rayons 'gammas du ⁶⁰cobalt et de l'âge de la cellule dans le cycle, au moment de l'irradiation sur la durée de la mitose,

- l'influence de rayonnements de TEL élevé (ions lourds accélérés) et de l'âge de la cellule dans le cycle au moment de l'irradiation sur la durée du cycle cellulaire.

Nous avons donc appliqué la technique microcinématographique à l'étude de ces différents problèmes en effectuant successivement, au niveau de la cellule EMT 6, cultivée *in vitro*.

a) une étude comparative de l'action de doses croissantes de rayons γ du ⁶⁰Co sur la durée du cycle cellulaire et sur la durée de la mitose en recherchant, pour chacun de ces paramètres, les variations en fonction de l'âge de la cellule dans le cycle au moment de l'irradiation. Nous avons également étudié l'influence des rayons γ sur la probabilité de division. Cette étude, en même temps qu'elle devait apporter des résultats originaux sur l'action des rayons γ sur la durée de la mitose avait l'avantage de nous permettre de tester notre méthode, puisqu'on pouvait trouver dans la littérature de nombreuses références concernant l'action des rayons γ sur les autres paramètres étudiés.

b) une étude comparative de l'action sur la durée du cycle cellulaire et la probabilité de division des radiations de différents TEL : radiations γ du ⁶⁰Co (TEL de l'ordre de 0,2 keV/µm) ions d'hélium accélérés (TEL de l'ordre de 20 keV/µm) et ions néon accélérés (TEL de l'ordre de 100 keV/µm) en recherchant également pour chaque type de radiation les variations du retard à la mitose en fonction de l'âge de la cellule dans le cycle au moment du traitement.

II - MATERIEL ET METHODES

Nous aborderons successivement dans ce

chapitre :

- un rappel des différentes données physiques caractéristiques des radiations que nous avons utilisées,

- des généralités concernant les modifications techniques entraînées par l'irradiation,

- une description des différents systèmes d'irradiation ainsi que les méthodes dosimétriques utilisées,

- enfin, nous préciserons la présentation des résultats et nous définirons les méthodes de calcul de la probabilité de division, ainsi que celle des corrélations existant entre l'apparition de la mort chez deux cellules soeurs.

A - RAPPEL DE DONNÉES PHYSIQUES

1) DIFFERENTS TYPES DE RADIATIONS

Le transfert d'énergie du rayonnement à la matière se ramène pratiquement à des collisions avec les électrons du milieu. Lorsque l'énergie, communiquée à l'électron "heurté", atteint des valeurs de l'ordre de grandeur de l'énergie de liaison, le choc peut porter l'électron sur une orbite plus externe sans éjection de cet électron hors de la molécule, il y a <u>excitation</u>. Lorsque l'énergie communiquée à l'électron est suffisante pour éjecter un ou plusieurs électrons hors d'un atome ou d'une molécule, <u>il y a ionisation</u> et la radiation est dite radiation ionisante.

Les radiations ionisantes peuvent être classées en deux grands groupes : les radiations directement ionisantes et les radiations indirectement ionisantes. Les radiations électromagnétiques (rayons X et Y) sont des radiations <u>indirectement ionisantes</u> : des électrons sont arrachés à l'atome cible avec émission de photons.

Lorsqu'un faisceau de photons parallèles pénètre dans un milieu, des électrons secondaires sont mis en mouvement, le flux d'électrons secondaires croît régulièrement jusqu'à une valeur maximale constante où les électrons secondaires mis en mouvement et les électrons secondaires arrêtés sont en nombre égaux ; c'est ce que l'on appelle <u>l'équilibre</u> électronique.

Les ions lourds accélérés sont des particules <u>directement ionisantes</u>. L'intérêt majeur de ces radiations, pour le radiothérapeute réside dans la distribution de la dose en profondeur (cf. paragraphe 3, p.87) qui permet une meilleure localisation de l'irradiation au niveau de la tumeur en minimisant les effets au niveau des tissus sains sus- et sous-jacents.

2) TRANSFERT d'ENERGIE LINEIQUE (TEL)*

L'effet produit par un rayonnement en un point du milieu irradié dépend essentiellement de la quantité d'énergie cédée au milieu mais aussi de la façon dont cette énergie a été cédée, laquelle dépend à la fois de la nature et de l'énergie du rayonnement.

La distribution spatiale de l'énergie au long d'une trajectoire s'exprime par la notion de transfert d'énergie linéaire (TEL) introduit par *ZIRKLE*. Le TEL représente l'énergie transférée à la matière par unité de longueur de la trajectoire de l'électron et s'exprime en keV/µm ; il correspond au quotient $\frac{dE}{dT}$ de l'énergie moyenne (dE) localement impartie au milieu par des particules chargées d'énergie

* TEL = LET ou linear energy transfer
spécifique traversant une distance (dl) : (définition de l'ICRU)*

En première approximation on peut utiliser le TEL moyen pour caractériser la distribution de l'énergie le long de la trajectoire. On peut également décomposer l'énergie transférée au milieu en parties qui sont distribuées avec une certaine valeur du TEL et on obtient ainsi une distribution spectrale de l'énergie à la matière.

3) RENDEMENT EN PROFONDEUR

Le flux d'énergie d'une irradiation diminue en profondeur puisqu'une certaine fraction est absorbée dans chacune des couches successives. On appelle <u>rendement en</u> <u>profondeur</u> d'un faisceau, le quotient des intensités du faisceau en profondeur et à l'entrée.

Dans le cas d'une irradiation y avec des photons de haute énergie, nous avons vu qu'il existait une augmentation de la dose dans les premiers millimètres traversés (ceci à la suite d'une mise en mouvement d'électrons secondaires), jusqu'au niveau dénommé l'équilibre électronique.

Ensuite le nombre d'électrons diminue ainsi que la dose (Fig. 16, p.88).

Dans le cas d'une irradiation avec des ions lourds accélérés tels les ions d'hélium et de néon, la courbe de Bragg est la représentation graphique de la variation de la dose en profondeur. L'allure de cette courbe traduit un accroissement du pouvoir d'arrêt des particules avec la profondeur (perte d'énergie par unité de longueur), suivie d'une décroissance rapide correspondant à l'arrêt des particules dans le milieu : pic de Bragg-(Fig. 17, p. 89).

* ICRU = International Commission on radiation units and measurements



- a) Variation de la dose absorbée au voisinage de la surface du milieu pour les rayonnements γ du $^{60}\,\text{Cobalt}$
- b) Détail de la variation de la dose dans les premiers millimètres du milieu traversé.



Variation de 1 de Bragg) ٦ dose en profondeur avec les ions de néon (courbe et pic

B - DIFFÉRENTS TYPES D'IRRADIATION

1) RADIATIONS Y DU ⁶ COBALT

Les irradiations γ de la cellule EMT 6 sont effectuées par l'intermédiaire d'un appareil de cobaltothérapie classique "gammatron ⁶⁰Cobalt type Siemens".

Pour chaque expérience la distance source-cellules est calculée grâce à la loi qui spécifie que la dose diminue avec l'inverse du carré de la distance, ceci de manière à conserver un débit constant de 1 Gy par minute.

Le faisceau de radiations est dirigé de haut en bas, le flacon de culture est donc situé à plat, perpendiculairement à celui-ci, sur une plaque de plexiglass (Fig. 18, p. 91). Les cellules sont ainsi recouvertes de milieu pendant toute la durée de l'irradiation. Nous avons vu (Fig. 16, p. 88) que la répartition de la dose de rayons γ n'est pas homogène en fonction de la profondeur : la courbe de cette répartition passe par un maximum (ou équilibre électronique) à 4 mm de profondeur dans un tissu. Dans le flacon de culture l'épaisseur du milieu recouvrant les cellules est de 4 mm ce qui situe les cellules juste au point d'équilibre électronique, au maximum de l'énergie du rayonnement du ⁶⁰Cobalt.

2) IRRADIATION DE TEL ELEVE

Toutes les irradiations de TEL élevé ont été réalisées dans le Laboratoire LAWRENCE à BERKELEY (U.S.A.) par Roland GILET (C.E.A. de GRENOBLE) et Stan CURTIS (LAWRENCE BERKELEY LABORATORY) ; l'analyse de tous les films obtenus ayant été réalisée à LILLE par nos soins.







Schéma du montage pour les irradiations gammas.

a) Ions d'hélium accélérés

Les ions d'hélium ont été accélérés jusqu'à une énergie de 228 MeV/nucleon au moyen du synchrocyclotron "184" du Laboratoire LAWRENCE. Le schéma du montage réalisépour les irradiations au moyen d'ions d'hélium est représenté dans la figure 19, p. 93).

• Un <u>collimateur</u> permet de ne laisser passer que la partie centrale du faisceau, plus homogène que la périphérie, et de centrer l'irradiation sur la cible avec un minimum d'irradiations périphériques.

• La dosimétrie des ions d'hélium est réalisée par l'intermédiaire de <u>chambres d'ionisation</u> emplies d'azote et comportant trois feuillets métalliques. La charge électrique, recueillie sur une surface circulaire centrale de 1 cm² est mesurée après chaque irradiation et la dose administrée est calculée automatiquement sur ordinateur par un programme qui utilise une valeur de l'énergie moyenne d'ionisation (W) de 34,9 eV par paire d'ions et un coefficient de 1,125 pour le pouvoir absorbant de l'eau par rapport à l'azote.

La variation d'énergie cédée

par les ions d'hélium au milieu étant importante, il est nécessaire de connaître avec précision l'épaisseur du matériau qu'ils traversent. On interpose donc, entre la source et l'échantillon, <u>une colonne d'eau</u> (ou fantôme d'eau) d'épaisseur variable modifiée par télécommande avec une précision de 1/10 mm.

Les différentes courbes de Bragg sont obtenues en effectuant le rapport des résultats de deux chambres d'ionisations différentes : une située en amont de la colonne d'eau, l'autre située en aval de celle-ci (Fig. 19, p.93).

La courbe de la répartition de l'ionisation en fonction de la profondeur dans un fantôme d'eau présente un pic (pic de Bragg, Fig. 20, p. 94) dont la largeur est petite comparée à celle d'une tumeur. Pour écréter ce pic



Schéma du montage réalisé pour les irradiations avec les ions lourds

- 1 : source du faisceau 2 : dégradeur d'énergie
- 3 : collimateur
- 4 : plusieurs chambres dosimètres
- 5 : fantôme d'eau
- 6 : échantillon biologique



ω

et le transformer en quelque sorte en un plateau correspondant à une distribution homogène de la dose sur une profondeur de quelques centimètres, utilisable en biologie et en médecine, les physiciens ont interposé, sur le trajet des ions d'hélium, <u>un dégradeur</u>, c'est-à-dire un filtre rotatif d'épaisseur variable (ridge filter). L'épaisseur de ce filtre est contrôlée et télécommandée par ordinateur et la distribution de la dose qui résulte finalement de l'action de ce dégradeur aboutit à ce que l'on appelle un pic de Bragg étalé. Pour les ions d'hélium, le pic de Bragg étalé se situe entre 16 et 24 cm de profondeur (Fig. 21, p. 96).

Pour toutes nos expériences réalisées avec les ions d'hélium, le matériel biologique (culture de cellules EMT 6 en bouteille plastique) a été placé dans une position verticale, au milieu du pic de Bragg étalé c'est-à-dire à 20 cm de profondeur. Dans ces conditions expérimentales, le TEL médian des ions d'hélium est compris entre 15 et 25 keV/µm (CURTIS, 1976).

b) Ions de néon accélérés

Le faisceau d'ions de néon a été obtenu en combinant l'accélérateur d'ions lourds (HILAC heavy ion linear accelerator) et le bévatron, combinaison que l'on appelle le BEVALAC. Les ions sont produits d'abord par le HILAC avec une énergie de 8,5 MeV/nucléon ; ils sont ensuite transportés dans le vide sur une longueur de 164,6 mètres (ceci en utilisant la pente naturelle de la colline de BERKELEY -pente de 30 %-) jusqu'au bévatron où ils subissent une ultime accélération, jusqu'à atteindre une énergie de 400 MeV/nucleon.

Le montage d'irradiation et les méthodes de dosimétrie sont identiques à ceux décrits pour les ions d'hélium accélérés. Dans le cas des ions de néon, le pic de Bragg étalé se situe entre 11 et 14 cm de profondeur (Fig. 22, p. 97).



Figure 21

Variation de la dose en profondeur des ions d'hélium après interposition sur le faisceau d'un dégradeur (Pic de Bragg étalé).





Toutes nos expériences utilisant des ions de néon accélérés ont été réalisées en plaçant le flacon de culture dans une position verticale, au milieu du pic de Bragg étalé ; c'est-à-dire à 12,5 cm de profondeur (Fig. 22, p. 97) Dans ces conditions expérimentales, le TEL médian des ions néon est voisin de 100 keV/µm (CURTIS, 1976).

Dans le but de calculer les efficacités biologiques relatives des ions d'hélium et de néon accélérés, une série d'irradiations γ au moyen du ⁶⁰Cobalt a été réalisée à BERKELEY. Le débit de dose de ces derniers était de 0,5 Gy par minute.

C - MODIFICATIONS TECHNIQUES ENTRAINÉES PAR L'IRRADIATION

La variabilité de la durée du cycle et de la durée de la mitose au cours des générations (*Premier chapitre de cette thèse et COLLYN et al., 1977*)^{U,}, nous a mis dans l'obligation de réaliser un témoin pour chaque expérience. Nous disposons de 6 systèmes d'enregistrement microcinématographique ; un d'entre eux, est réservé au flacon témoin qui, ensemencé et analysé simultanément aux autres flacons, subit, exception faite pour l'irradiation, les mêmes traitements et en particulier les mêmes déplacements que les flacons irradiés.

Nous avons choisi d'observer les cellules en moyenne, pendant deux générations complètes, avant d'effectuer l'irradiation. La durée du cycle cellulaire de la deuxième génération permet de contrôler le bon déroulement de la croissance avant le traitement. L'irradiation a lieu 48 heures après l'ensemencement, soit en moyenne durant la troisième génération après le repiquage ; cette génération est dénommée "<u>génération irradiée</u>" alors que la génération suivante est nommée "génération post-irradiée" (Fig. 23, p. 99).



Exemple de pedigree irradié. Les cellules sont irradiées 48 heures après l'ensemencement soit en moyenne au cours de la troisième génération après le repiquage.

- I : Génération irradiée
- PI : Génération post-irradiée
- 2e PI : 2e Génération post-irradiée.

Au moment de l'irradiation, tous les flacons (y compris le témoin) sont retirés de la platine du microscope et emmenés vers les différents systèmes d'irradiation. La phase critique de la méthode réside dans la difficulté suivante : afin d'obtenir, pour chaque cellule, un pedigree complet et de connaître avec précision l'âge de la cellule dans le cycle par rapport à la mitose précédente, il est capital de suivre les mêmes cellules avant et après l'irradiation et par conséquent de retrouver, après déplacement du flacon exactement le même champ d'observation. Afin de faciliter cette opération, différents repères sont gravés sur les parois du flacon plastique et, afin de connaître la position exacte de chaque cellule les unes par rapport aux autres, des "cartes topographiques cellulaires" sont dessinées avant tout déplacement du flacon. Du fait de la mobilité cellulaire, le délai entre le déplacement du flacon et le retour de celui-ci sur la platine du microscope doit être minimal ; ceci afin d'éviter que les cellules ne se déplacent trop les unes par rapport aux autres pendant l'interruption de l'enregistrement.

Toutes les irradiations sont réalisées, pour des raisons techniques, dans des locaux relativement éloignés du lieu où se trouvent les appareils microcinématographiques. Le transport des flacons s'effectue donc dans des boîtes isothermes maintenues à 37° C. L'irradiation se déroule à température ambiante, mais la durée de celle-ci n'excède jamais 10 minutes et les flacons sont aussitôt replacés dans la boîte isotherme pour le retour. Pendant le trajet du lieu d'irradiation au local d'étude, les flacons sont maintenus en position verticale, ceci afin d'éviter le frottement du milieu sur les cellules et par conséquent le décollement de celles-ci.

D - PRÉSENTATION DES RÉSULTATS

1) RETARD A LA MITOSE ET ALLONGEMENT DE LA DUREE DE LA MITOSE : méthodes de calcul

Pour une population de cellules irradiées, le retard à la mitose moyen est défini comme la différence entre la durée moyenne du cycle des cellules de cette population et le cycle moyen des cellules témoins dans la même génération. L'allongement de la mitose est défini et obtenu de la même façon.

En raison des problèmes de disponibilité des accélérateurs d'ions lourds et de la présence de seulement deux équipements de microcinématographie à BERKELEY, nous n'avons pas eu la possibilité de réaliser, comme nous l'avons fait pour les rayons γ du ⁶⁰Cobalt, simultanément un témoin et un irradié. Nous avons donc utilisé les appareils d'enregistrement de façon alternée, une semaine étant consacrée aux enregristrements des témoins, l'autre aux irradiations.

Les différents films réalisés aux U.S.A. ont été développés, copiés et les copies ont été envoyées à LILLE pour l'interprétation. La qualité optique de ces films ne permettant pas de mesurer la durée de la mitose, nous nous sommes donc limités à la mesure de la durée du cycle cellulaire et de la probabilité de division.

Nous avons fait porter notre étude de l'influence des radiations sur la durée du cycle et de la mitose des <u>générations irradiée</u> et <u>post-irradiée</u> (en moyenne troisième et quatrième génération après le repiquage). La variation spontanée des durées du cycle et de la mitose dans les générations suivantes ainsi que la difficulté d'interprétation des films et la perte d'information dues à la densité cellulaire, rendent difficile une interprétation statistique des résultats. Dans certains cas seulement, nous rendrons compte du comportement des 2e, 3e et 4e générations post-irradiées, notamment en ce qui concerne la probabilité de division. 2) METHODE D'EVALUATION DE L'INFLUENCE DE L'AGE DE LA CELLULE DANS LE CYCLE AU MOMENT DE L'IRRADIATION

Les variations des effets de l'irradiation en fonction de l'âge ont été étudiées en divisant le nombre de cellules en 5 groupes en fonction du délai entre la fin de la mitose précédente et le moment de l'irradiation ou du déplacement pour le témoin :

> 0 ā 2 h 2 ā 4 h 4 ā 6 h 6 ā 8 h et 8 h et plus

Les retard à la mitose et allongement de la mitose ont été déterminés de façon séparée pour chacun des groupes.

3) NOTION DE PROBABILITE DE DIVISION

L'effet létal des irradiations au sein des pedigrees a été apprécié en calculant la probabilité de division définie comme le pourcentage de cellules capables, pour une génération donnée, de donner naissance à deux cellules filles (WHITMORE et TILL, 1964, 1967).

En réalité, l'incapacité d'une cellule à se diviser se traduit par des phénomènes variés : pycnose, éclatement cellulaire, fusions cellulaires toujours observées entre deux cellules soeurs et souvent abortives à plus ou moins brève échéance, enfin cellules qui n'entrent pas en division pendant toute la durée de l'observation, bien que leur aspect morphologique semble normal.

4) ESTIMATION DES CORRELATIONS ENTRE LA MORTALITE CHEZ DEUX CELLULES SOEURS

Nous avons selon la méthode décrite par *HEMON et al. (1978)* recherché les corrélations éventuelles entre l'apparition de la mort chez deux cellules soeurs. La corrélation entre la mort des deux cellules soeurs peut être définie par l'équation :

$$P_{D} = \frac{(P_{0} \times P_{2} - P_{1}^{2})}{P(1 - P)}$$

ou

P₀ = probabilité pour qu'aucune soeur ne meure,
2 x P₁ = probabilité pour qu'une seule des soeurs meure, tandis que l'autre continue à se diviser,

P₂ = probabilité pour que les deux soeurs meurent,
P = P₁ + P₂ probabilité pour qu'une cellule donnée meure,

Si P_D est nulle, les trois probabilités P_0 , P_1 et P_2 prennent les valeurs attendues, dans le cas où il y a indépendance des cellules soeurs face à la mort. Au contraire si P_D est positif, P_2 et P_0 sont plus grandes, tandis que P_1 est plus petit. Ce qui veut dire que les deux soeurs ont un comportement identique face à la mort.

III - ETUDE COMPARATIVE DE

L'ACTION DES RAYONS GAMMAS DU ⁶⁰COBALT SUR LA DUREE DU CYCLE ET DE LA MITOSE

A - RÉSULTATS

1) ALLONGEMENT DE LA DUREE DU CYCLE (RETARD A LA MITOSE) ET ALLONGEMENT DE LA DUREE DE LA MITOSE EN FONCTION DE LA DOSE DE RADIATION

Afin d'étudier l'influence de la dose de rayons γ sur les durées du cycle et de la mitose des cellules EMT 6, nous avons administré, par l'intermédiaire d'un appareil de télécobaltothérapie des doses de 1, 3, 6 et 10 grays, à un débit constant de 1 Gy par minute. Les valeurs individuelles des durées de cycle ont été regroupées à partir de plusieurs expériences et les différentes valeurs moyennes obtenues pour les générations irradiée et post-irradiée sont rassemblées dans le tableau XII (p. 105) et illustrées par la figure 24 (p. 106). Plus la dose est importante, plus le retard à la mitose est élevé, c'est ainsi que pour la première génération irradiée, ce retard augmente de 1,6 h, pour 1 Gy à 2,0 h ; 5,1 h et 9,6 h pour 3,6 et 10 Gy respectivement.

Ce retard à la mitose diminue dès la deuxième génération suivant l'irradiation (génération postirradiée) quelle que soit la dose.

La durée de la mitose est également prolongée par l'irradiation ; elle augmente progressivement avec la dose de 0,33 h pour les cellules témoins à 0,68 h pour les cellules ayant reçu une dose de 10 Gy (Fig. 24, p. 106; Tableau XIII, p. 107).

L'allongement de la durée de la mitose d'une cellule irradiée est liée à la mort d'une ou deux cellules filles. Après une dose de 10 Gy, la durée moyenne de la mitose donnant naissance à deux filles qui continuent à se diviser est de 0,49 \pm 0,04 h, mais elle atteint une valeur de 0,72 \pm 0,05 h, quand une ou deux filles sont incapables de se diviser.

2) INFLUENCE DE L'AGE DE LA CELLULE DANS LE CYCLE AU MOMENT DE L'IRRADIATION

a) Allongement de la durée du cycle

Nous avons pour chaque dose, recherché la relation entre le retard à la mitose et l'âge de la cellule dans le cycle au moment de l'irradiation. Les différents résultats sont groupés dans le tableau XIV (p. 108). Quelle que soit la dose, on remarque que le retard à la mitose augmente progressivement quand la cellule est irradiée pendant les huit premières heures de son cycle, puis décroît brutalement quand

TABLEAU XII

DUREE DU CYCLE CELLULAIRE ET RETARD A LA MITOSE DES GENERATIONS IRRADIEE ET POST-IRRADIEE (IRRADIATIONS Y)

	Témoin	1 Gy	3 Gy	6 Gy	10 Gy
Génération irradiée					
Durée du cycle - moyenne (h) + erreur standard	10,00 + 0,20	11,60 + 0,48	12,00 <u>+</u> 0,20	15,10 <u>+</u> 0,40	19,60 <u>+</u> 0,50
CV : coefficient de variation Nombre de valeurs Retard (h)	0,14 49	0,26 38 1,6 <u>+</u> 0,5	0,16 96 2,0 <u>+</u> 0,3	0,29 118 5,1 <u>+</u> 0,5	0,24 90 9,6 <u>+</u> 0,5
GÉNÉRATION POST-IRRADIÉE					
Durée du cycle - moyenne (h) + erreur standard	10,9 + 0,22	11,7 + 0,50	11,0 + 0,28	13,7 <u>+</u> 0,53	14,5 + 0,69
CV : coefficient de variation	0,18	0,36	0,32	0,44	0,39
Nombre de valeurs	82	73	154	133	66
Retard (h)		0,8 <u>+</u> 0,5	0,1 + 0,4	2,8 <u>+</u> 0,5	3,6 <u>+</u> 0,7

Variation du irradiée en f représente un 0.00 une 0 retard à la mitose et de l'allongement de fonction de la dose de rayons γ du ⁶⁰Co. La ne augmentation théorique de l h par Gray. **___** ω Figure 24 6 10 DOSE [Gy] la mitose a ligne en de la génération pointillé BUS



TABLEAU XIII

DUREE DE LA MITOSE DES GENERATIONS IRRADIEE ET POST-IRRADIEE (RAYONS γ)

	Témoin	1 Gy	3 Gy	6 Gy	10 Gy
GÉNÉRATION IRRADIÉE					
Durée de la mitose - moyenne (h/100) + erreur standard	0,33 <u>+</u> 0,01	0,38 <u>+</u> 0,04	0,45 <u>+</u> 0,02	0,51 <u>+</u> 0,03	0,68 <u>+</u> 0,04
CV : coefficient de variation Nombre de valeurs	0,60 40	0,61 34	0,40 80	0,58 97	0,52 79
Allongement de la mitose (h/100)		4,9 <u>+</u> 4,0	11,4 <u>+</u> 2,0	18,2 <u>+</u> 2,9	35,2 <u>+</u> 3,8
GÉNÉRATION POST-IRRADIÉE	=======================================				
Durée de la mitose - moyenne (h/100) <u>+</u> erreur standard	0,34 <u>+</u> 0,09	0,37 <u>+</u> 0,01	0,43 <u>+</u> 0,01	0,52 <u>+</u> 0,03	0,56 + 0,04
Nombre de valeurs	65	50	108	92	56
Allongement de la mitose (h/100)		3,7 + 1,6	9,5 <u>+</u> 1,6	18,3 <u>+</u> 3,0	22,7 + 3,9



TABLEAU XIV

VARIATION DU RETARD A LA MITOSE DE LA PREMIERE GENERATION IRRADIEE EN FONCTION DE L'AGE DE LA CELLULE DANS LE CYCLE AU MOMENT DE L'IRRADIATION (n est le nombre de valeurs individuelles)

		AGE DE LA	CELLULE DANS	LE CYCLE AU M	OMENT DE L'IRR	ADIATION
DOSE		0 → 2 h	2 → 4 h	4 → 6 h	6 → 8 h	+ 8 h
1 Gy	Retard (h) + erreur standard	0,7 <u>+</u> 0,6	1,5 + 0,9	1,9 <u>+</u> 0,7	- 0,7 <u>+</u> 0,2	3,0 <u>+</u> 0,2
	n	4	15	14	2	3
3 Gy	Retard (h) + erreur standard	1,1 <u>+</u> 0,6	0,7 + 0,5	2,9 <u>+</u> 0,6	1,6 <u>+</u> 0,4	3,0 <u>+</u> 0,5
· · ·	n	15	12	20	29	19
6 Gy	Retard (h) + erreur standard	2,3 <u>+</u> 0,7	6,2 <u>+</u> 1,4	6,9 <u>+</u> 0,6	5,5 <u>+</u> 0,3	4,7 <u>+</u> 0,7
	n	9	19	26	43	21
10 Gy	Retard (h) <u>+</u> erreur standard	5,8 <u>+</u> 0,6	8,7 <u>+</u> 0,8	10,7 <u>+</u> 0,8	12,7 <u>+</u> 0,8	10,7 <u>+</u> 1,1
	n	15	23	17	13	22



la cellule est irradiée plus de huit heures après sa dernière mitose. Pour chaque groupe d'âge, nous avons observé une relation linéaire entre la dose d'irradiation et le retard à la mitose. Après avoir calculé la pente de chacune des différentes droites obtenues (Tableau XV, p. 110), nous avons pu tracer la figure 25 (p. 111) qui illustre les variations du retard à la mitose en fonction de l'âge de la cellule dans le cycle au moment du traitement.

b) Allongement de la durée de la mitose Nous avons, comme nous l'avons décrit pour le retard à la mitose, recherché pour chaque dose, la relation entre l'âge de la cellule dans le cycle au moment de l'irradiation et la durée de la mitose qui suit l'irradiation. Les différents résultats sont groupés dans le tableau XVI, (p. 112).

Pour chaque dose étudiée, l'allongement de la durée de la mitose de la première génération irradiée est constant lorsque la cellule est irradiée dans les huit premières heures de son cycle, puis augmente ensuite brutalement lorsque la cellule est irradiée plus de huit heures, après le début de son cycle. Nous avons également observé pour chaque groupe d'âge, une relation linéaire entre la dose de radiations γ et l'allongement de la mitose et nous avons pu tracer la figure 26 (p. 113) qui illustre les variations de la durée de la mitose en fonction de l'âge de la cellule dans le cycle au moment du traitement.

Malgré toutes les précautions prises, le seul fait de déplacer un flacon de culture au moment du traitement, entraîne la perte des cellules en mitose à ce moment précis. En effet, lors de la mitose, la cellule reprend sa forme sphérique et n'adhère plus au support plastique que d'une manière tangentielle et se décolle très facilement. Nous n'avons donc pas pu étudier le comportement des cellules exactement en mitose, au moment de l'irradiation.

TABLEAU XV

PENTES DES DIFFERENTES DROITES ILLUSTRANT LA RELATION LINEAIRE ENTRE LA DOSE ET L'AGE DE LA CELLULE DANS LE CYCLE

Age de la cellule dans le cycle	Retard (minute/0,01 Gy)	Allongement de la mitose (minute/Gy)
0 – 2 н	0,32 <u>+</u> 0,04	1,22 <u>+</u> 0,30
2 – 4 н	0,50 <u>+</u> 0,05	1,77 <u>+</u> 0,52
4 – 6 н	0,63 <u>+</u> 0,04	1,81 ± 0,31
6 – 8 н	0,84 <u>+</u> 0,10	1,82 <u>+</u> 0,43
+ 8н	0,36 <u>+</u> 0,05	3,68 <u>+</u> 0,56





Variation du retard à la mitose en fonction de l'âge de la cellule dans le cycle au moment de l'irradiation. L'âge cellulaire est mesuré par rapport à la mitose précédente. L'ordonnée indique le retard à la mitose en minute/Gy calculé au Tableau XV (p. 110).

> (aus ulle

TABLEAU XVI

VARIATION DE L'ALLONGEMENT DE LA MITOSE DE LA PREMIERE GENERATION IRRADIEE EN FONCTION DE L'AGE DE LA CELLULE DANS LE CYCLE AU

MOMENT DE L'IRRADIATION. (n représente le nombre de valeurs individuelles).

DOSE AGE DE LA CELLULE DANS LE CVCLE AL MOMENT DE 1 Gy Allongement de la mitose h/100 $8, 3 \pm 2, 8$ $11, 6 \pm 10, 6$ $0, 3 \pm 2, 0$ $-1, 2 \pm 5$ 5 ± 8 3 Gy Allongement de la mitose h/100 $8, 3 \pm 2, 8$ $11, 6 \pm 10, 6$ $0, 3 \pm 2, 0$ $-1, 2 \pm 5$ 3 Gy Allongement de la mitose h/100 $8, 3 \pm 2, 8$ $11, 6 \pm 10, 6$ $0, 3 \pm 2, 0$ $-1, 2 \pm 5$ 3 Gy Allongement de la mitose h/100 $12, 5 \pm 6, 1$ $7, 4 \pm 3, 2$ $19, 7 \pm 4, 9$ $6, 2 \pm 1$ 6 Gy Allongement de la mitose h/100 $8, 1 \pm 5, 0$ $30, 4 \pm 10, 0$ $25, 3 \pm 4, 3$ $10, 9 \pm 7$ 6 Gy Allongement de la mitose h/100 $8, 1 \pm 5, 0$ $30, 4 \pm 10, 0$ $25, 3 \pm 6, 7$ $35, 1 \pm 4$ 10 Gy $4, 0, 0$ $23, 7 \pm 6, 7$ $30, 1 \pm 5, 9$ $25, 3 \pm 6, 7$ $35, 1 \pm 4$ 10 Gy $4, 0, 0$ $23, 7 \pm 6, 7$ $30, 1 \pm 5, 9$ $25, 3 \pm 6, 7$ $35, 1 \pm 4$							
DOSE $0 + 2 h$ $2 + 4 h$ $4 + 6 h$ $6 + 8$ 1 GyAllongement de la mitose h/100 $8,3 \pm 2,8$ $11,6 \pm 10,6$ $0,3 \pm 2,0$ $-1,2 \pm 5$ 3 GyAllongement de la mitose h/100 $8,3 \pm 2,8$ $11,6 \pm 10,6$ $0,3 \pm 2,0$ $-1,2 \pm 5$ 3 GyAllongement de la mitose h/100 $12,5 \pm 6,1$ $7,4 \pm 3,2$ $19,7 \pm 4,9$ $6,2 \pm 1$ 6 GyAllongement de la mitose h/100 $12,5 \pm 6,1$ $7,4 \pm 3,2$ $19,7 \pm 4,9$ $6,2 \pm 1$ 6 GyAllongement de la mitose h/100 $8,1 \pm 5,0$ $30,4 \pm 10,0$ $25,3 \pm 4,3$ $10,9 \pm 7$ 710 GyAllongement de la mitose h/100 $23,7 \pm 6,7$ $30,1 \pm 5,9$ $25,3 \pm 6,7$ $35,1 \pm 4$ 9n10 14 20 16 15 9 9	· ·		AGE DE LA	CELLULE DANS	LE CYCLE AU M	OMENT DE L'IRR	VDIATION
1 Gy Allongement de la mitose h/100 $8,3 \pm 2,8$ $11,6 \pm 10,6$ $0,3 \pm 2,0$ $-1,2 \pm 5$ 2 n n 4 12 13 2 3 Gy Allongement de la mitose h/100 $8,3 \pm 2,8$ $11,6 \pm 10,6$ $0,3 \pm 2,0$ $-1,2 \pm 5$ 3 Gy Allongement de la mitose h/100 $12,5 \pm 6,1$ $7,4 \pm 3,2$ $19,7 \pm 4,9$ $6,2 \pm 1$ 6 Gy Allongement de la mitose h/100 $12,5 \pm 6,1$ $7,4 \pm 3,2$ $19,7 \pm 4,9$ $6,2 \pm 1$ 6 Gy Allongement de la mitose h/100 $8,1 \pm 5,0$ $30,4 \pm 10,0$ $25,3 \pm 4,3$ $10,9 \pm 7$ 6 Allongement de la mitose h/100 $8,1 \pm 5,0$ $30,4 \pm 10,0$ $25,3 \pm 4,3$ $10,9 \pm 7$ 10 Gy Allongement de la mitose h/100 $23,7 \pm 6,7$ $30,1 \pm 5,9$ $25,3 \pm 6,7$ $35,1 \pm 6$ 10 Gy Allongement de la mitose h/100 $23,7 \pm 6,7$ $30,1 \pm 5,9$ $25,3 \pm 6,7$ $35,1 \pm 6$ 10 Gy A $20,1 \pm 5,9$ $25,3 \pm 6,7$ $35,1 \pm 6$	DOSE		0 + 0	2 + 4 h	4 + 6 h	6 + 8 h	4 8 +
3 GyAllongement de la mitose h/10012,5 \pm 6,17,4 \pm 3,219,7 \pm 4,96,2 \pm 13 GyAllongement de la mitose h/10012,5 \pm 6,17,4 \pm 3,219,7 \pm 4,96,2 \pm 16 GyAllongement de la mitose h/1008,1 \pm 5,030,4 \pm 10,025,3 \pm 4,310,9 \pm 76 GyAllongement de la mitose h/1008,1 \pm 5,030,4 \pm 10,025,3 \pm 4,310,9 \pm 710 GyAllongement de la mitose h/10023,7 \pm 6,730,1 \pm 5,925,3 \pm 6,735,1 \pm 410 Gy \pm erreur standardn1420159	1 Gy	Allongement de la mitose h/100 + erreur standard	8,3 <u>+</u> 2,8	11,6 <u>+</u> 10,6	0,3 <u>+</u> 2,0	- 1,2 <u>+</u> 5,1	- 2,9 + 3,5
3 Gy Allongement de la mitose h/100 $12, 5 \pm 6, 1$ $7, 4 \pm 3, 2$ $19, 7 \pm 4, 9$ $6, 2 \pm 1$ $\frac{1}{2}$ erreur standard n 10 12 12 14 28 6 Gy Allongement de la mitose h/100 $8, 1 \pm 5, 0$ $30, 4 \pm 10, 0$ $25, 3 \pm 4, 3$ $10, 9 \pm 7$ $\frac{1}{2}$ erreur standard n 7 16 18 40 10 Gy Allongement de la mitose h/100 $23, 7 \pm 6, 7$ $30, 1 \pm 5, 9$ $25, 3 \pm 6, 7$ $35, 1 \pm 6$ $\frac{1}{2}$ erreur standard n 14 20 14 20 15 9 $25, 3 \pm 6, 7$ $35, 1 \pm 6$			4	12	13	2	n
6 $\frac{1}{2}$ 10 12 14 28 6 $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{28}{25,3}$ $\frac{28}{4,3}$ $\frac{28}{10,9}$ 6 $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{28}{25,3}$ $\frac{1}{4}$ $\frac{28}{40}$ 10 $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{4}$ $\frac{1}{4}$ 10 $\frac{1}{2}$ <td>3 Gy</td> <td>Allongement de la mitose h/100</td> <td>$12,5 \pm 6,1$</td> <td>7,4 <u>+</u> 3,2</td> <td>$19,7 \pm 4,9$</td> <td>$6,2 \pm 1,9$</td> <td>$15,9 \pm 3,8$</td>	3 Gy	Allongement de la mitose h/100	$12,5 \pm 6,1$	7,4 <u>+</u> 3,2	$19,7 \pm 4,9$	$6,2 \pm 1,9$	$15,9 \pm 3,8$
6 Gy Allongement de la mitose h/100 $8,1 \pm 5,0$ $30,4 \pm 10,0$ $25,3 \pm 4,3$ $10,9 \pm 7$ $\frac{1}{2}$ erreur standard n 7 16 18 40 10 Gy Allongement de la mitose h/100 $23,7 \pm 6,7$ $30,1 \pm 5,9$ $25,3 \pm 6,7$ $35,1 \pm 6$ $\frac{1}{2}$ erreur standard n 14 20 15 9 $25,3 \pm 6,7$ $35,1 \pm 6$	 		10	12	14	58	16
10 Gy Allongement de la mitose h/100 $23,7 \pm 6,7$ $30,1 \pm 5,9$ $25,3 \pm 6,7$ $35,1 \pm 6$ + erreur standard 14 20 15 9 25	6 GY	Allongement de la mitose h/100	8,1 ± 5,0	$30,4 \pm 10,0$	25,3 <u>+</u> 4,3	$10,9 \pm 7,0$	32,1 <u>+</u> 9,8
10 Gy Allongement de la mitose h/100 $23,7 \pm 6,7$ $30,1 \pm 5,9$ $25,3 \pm 6,7$ $35,1 \pm 6$ \pm erreur standard 14 20 15 9 15			7	16	18	40	16
$\frac{1}{n}$	10 Gy	Allongement de la mitose h/100	23,7 ± 6,7	30,1 ± 5,9	25,3 + 6,7	35,1 ± 6,7	55,1 <u>+</u> 9,1
			14	50	15	σ	21

112

BUS



Variation de l'allongement de la durée de la mitose en fonction de l'âge de la cellule dans le cycle au moment de l'irradiation. L'âge cellulaire est mesuré par rapport à la mitose précédente. L'ordonnée figure l'allongement de la mitose en minute/Gy calculé comme indiqué dans le Tableau XV, (p. 110).

3) PROBABILITE DE DIVISION

Simultanément à l'étude du cycle cellulaire et sur le même matériel biologique, nous avons analysé la perte de capacité de division. La probabilité de division qui est de 1 pour les cellules témoins est réduite après irradiation. 'Plus la dose est importante, plus la proportion de cellules incapables de se diviser est élevée.

C'est ainsi qu'après une dose de 10 Gy, la probabilité de division décroît de 0,77 \pm 0,04 pour la génération irradiée à 0,58 \pm 0,05 dans la génération postirradiée (Fig. 27, p. 115 et Tableau XVII, p. 116).

Nous avons, pour chaque dose et pour les trois générations qui suivent l'irradiation (génération irradiée, génération post-irradiée et deuxième génération postirradiée) calculé le nombre relatif de cellules survivant au moins trois générations : en effet, soient P_1 , P_2 P_3 , les pourcentages de cellules capables de se diviser dans les générations irradiée, post-irradiée et deuxième post-irradiée le nombre relatif de survivants aux trois générations est obtenu en effectuant le produit $P_1 \times P_2 \times P_3$. On s'aperçoit ainsi que la mort cellulaire au sein des pedigrees est incontestablement liée à la dose (Fig. 28, p. 117).

B - DISCUSSION

1) RELATION DOSE EFFET

Le retard à la mitose que nous trouvons est en moyenne de 1 heure par gray. Ceci est en accord parfait avec l'opinion générale (DEWEY et al., 1963 ; ELKIND et al., 1963; FROESE, 1966 ; THOMPSON et SUIT, 1967, 1969 ; WALTERS et PETERSEN, 1968 ; DOIDA et OKADA, 1969 ; HURWITZ et TOLMACH, 1969 ; LEEPER et al., 1972 ; SASAKI et al., 1969, 1972 a et b, 1977).



Variation de la probabilité de division des générations irradiée et post-irradiée en fonction de la dose de rayons γ du ⁶°Co.

> Génération irradiée Génération post-irradiée

> > Y.S.

TABLEAU XVII

PROBABILITE DE DIVISION DES GENERATIONS IRRADIEE ET POST-IRRADIEE EN FONCTION DE LA DOSE DE RAYONS GAMMAS. (n représente le nombre de valeurs individuelles)

	Témoin	1 Gy	3 Gy	6 Gy	10 Gy
			•		
GÉNÉRATION IRRADIEE					70 U T LL U
Prohabilité de division - moyenne	$1,00 \pm 0,00$	$0,97 \pm 0,03$	0,97 + 0,03	0, 34 + 0, UC	
+ erreur standard n	49	38	67	118	66
	-				
GÉNÉRATION POST-IRRADIEE					0 58 + 0 05
Probabilité de division - moyenne	$1,00 \pm 0,00$	0,97 ± 0,02	$0,96 \pm 0,02$	0,42 <u>+</u> 0,05	
+ erreur standard	82	75	155	137	63



Nombre relatif de survivants à la troisième génération en fonction de la dose de rayons γ du $^{6\,0}\text{Co.}$



D'autres auteurs ont également montré que le retard à la mitose était d'autant plus important que

la durée du cycle était plus longue. (DEWEY et al., 1964 ; SEYDEL, 1967 ; DENEKAMP, 1974). Les différentes valeurs que nous avons constatées (0,30 à 0,80 minute par 0,01 Gy pour un cycle témoin de 10,0h s'intègrent parfaitement sur la courbe proposée par DEWEY et al. (1964) ainsi que dans le tableau proposé par SEYDEL (1967).

L'influence d'une irradiation sur la durée de la mitose proprement dite, avait déjà été décrite précédemment (HURWITZ et TOLMACH, 1969). Toutefois, à notre connaissance, aucune relation quantifiée du phénomène génération par génération n'a fait jusqu'à présent l'objet d'une publication. La relation que nous trouvons entre la dose de radiations et l'allongement de la durée de la mitose est compatible avec un système de proportionnalité simple correspondant à une durée supplémentaire de 2 minutes par dose de 1 Gy.

Si l'on se borne à exprimer l'effet de l'irradiation sur la durée du cycle et sur celle de la mitose en unité de temps, par dose de radiations, il est difficile de comparer les deux effets. En effet, en durée absolue, l'influence d'une même dose de radiations est environ 30 fois plus faible sur la durée de la mitose que sur celle du cycle. La comparaison des deux effets est facilitée si l'allongement du cycle et de la mitose sont étudiés en pourcentage de la durée des témoins. Dans ce cas, nous constatons que, pour une dose de 6 Gy par exemple, le cycle est allongé de 51 % et la mitose de 55 % ; pour une dose de 10 Gy la durée du cycle et celle de la mitose sont pratiquement doublées (augmentation respective de 96 et de 100 %) (Fig. 29, p. 119).

Du point de vue de la relation dose-effet, il semble donc bien que les radiations ionisantes ont, à dose égale, une influence très comparable sur la durée du cycle et sur celle de la mitose des cellules EMT 6. En ce qui concerne l'allongement de la durée de la mitose, nos résultats semblent être





Retard à la mitose et allongement de la durée de la mitose de la génération irradiée exprimés en pourcentage de la durée du cycle et de la durée de la mitose des cellules témoins. La ligne représente une augmentation théorique du cycle et de la mitose de 10 % par Gray.

retard à la mitose
 allongement de la mitose

différents de ceux observés par *HURWITZ et TOLMACH (1969)*. Selon ces auteurs, l'allongement de la durée de la mitose est proportionnellement plus important que l'allongement de la durée du cycle. Cependant, la comparaison de leurs résultats et de ceux que nous avons observés est difficile et ceci pour au moins deux raisons :

a) les irradiations ont été effectuées par *HURWITZ et TOLMACH* directement après le repiquage, au cours d'une génération qui est déjà modifiée de façon spontanée, alors que dans nos expériences, l'irradiation se situe en moyenne au niveau de la troisième génération après le repiquage,

b) la durée de la mitose a été étudiée par HURWITZ et TOLMACH en regroupant les valeurs obtenues sur toutes les générations post-irradiées, alors que nous avons effectué nos études au niveau de la génération irradiée.

La variabilité des valeurs individuelles du cycle et de la mitose n'augmente pas avec la dose d'irradiation (0,16 < coefficient de variation pour le cycle < 0,29, Tableau XII, (p. 105); 0,40 < coefficient de variation pour la mitose < 0,60 ; Tableau XIII,p.107.Ce sont toutes les cellules de la population cellulaire qui sont modifiées par l'irradiation et le retard à la mitose moyen et l'allongement de la mitose moyen, rendent compte des effets des rayons γ sur la population globale.

2) INFLUENCE DE L'AGE DE LA CELLULE DANS LE CYCLE AU MOMENT DE L'IRRADIATION

Si le retard à la mitose varie, ainsi que nous l'avons montré, avec la dose d'irradiation gamma, il varie également de façon très sensible avec l'âge de la cellule dans le cycle au moment de l'irradiation. Il est cependant difficile de mettre nos résultats en relation avec ceux de la littérature dans la mesure où la phase sensible varie selon les auteurs (*Revues Générales de SINCLAIR*, 1968 ; *FRINDEL et TUBIANA*, 1971 ; *FRINDEL*, 1975) y compris quelquefois pour des auteurs étudiant le même système :

• Pour la cellule HeLa, *FIRKET et MAHIEU* (1966) (cellules synchronisées) et *FROESE* (1965) (microcinématographie) observent, pour le retard à la mitose une sensibilité maximale lorsque la cellule est en phase S au moment de l'irradiation. Sur les mêmes cellules, *PUCK et al.*, (1962, 1963) Index mitotiques ; *TERASIMA et TOLMACH* (1963) ; *TOLMACH et al.*, (1965)(synchronisation et numérations cellulaires), *HURWITZ et TOLMACH* (1969) (synchronisation et microcinématographie) et *FIRKET* (1969) (cellules synchronisées) enregistrent une sensibilité maximale lorsque les cellules sont dans la phase G₂ du cycle, alors que *WALTERS et PETERSEN* (1968) (accumulation de mitoses) n'observent aucune influence de l'âge de la cellule dans le cycle au moment de l'irradiation.

• Pour les cellules CHO, WALTERS et PETERSEN (1968) (méthode d'accumulation des mitoses) n'observent pas de variation du délai mitotique avec l'âge de la cellule au moment de l'irradiation, alors que DEWEY et al., (1966) (autoradiographies), LEEPER et al., (1972, 1973) (synchronisation cellulaire et numérations), et MILLER et al., (1973) (utilisant trois techniques de culture différentes : cellules en monocouche, cellules en suspension dans différents milieux) observent tous une augmentation de la sensibilité parallèle à l'âge de la cellule dans le cycle au moment du traitement.

• Au niveau des cellules L, DEWEY et HUMPHREY (1962, 1964) (courbes de croissance) ; WHITMORE et al., (1967) (Index mitotique) et THOMPSON et SUIT (1967, 1969) (microcinématographie) observent une augmentation de la sensibilité avec un retard maximum quand la cellule est irradiée en fin de S ou en début de G₂. • *KIM et EVANS (1964)* (cellules ascitiques d'Ehrlich) et *LINDMO et al. (1979)* (cellules humaines NHIK 3025) trouvent également un retard maximal lorsque les cellules sont irradiées en G₂.

• Enfin, au niveau des cellules de Hamster V 79, FROESE (1966) (microcinématographie) ; YU et SINCLAIR (1967) (cellules synchronisées) observent un retard maximal en S et G₂, alors que ELKIND et al. (1963) (synchronisation) n'observent aucune influence de l'âge cellulaire au moment de l'irradiation sur l'importance du retard à la mitose.

La variabilité de tous ces résultats semble due plus à la diversité des techniques utilisées (dont certaines sont très imprécises) plutôt qu'à la diversité des souches étudiées. Il semble maintenant bien établi, pour certaines lignées de cellules de mammifères, que la durée du cycle des cellules irradiées augmente progressivement en fonction de l'âge de la cellule dans le cycle au moment de l'irradiation et que, à partir d'un certain point de transition situé en G₂, le retard à la mitose diminue sensiblement (*BACCHETTI et al., 1970*; *LEEPER et al., 1972*; *SCHNEIDERMAN et al., 1972*; *LEEPER et al., 1973*; *RADLEY et al., 1973*; *HIGHFIELD et DEWEY*, *1975*; *DEWEY et HIGHFIELD, 1976*; *SCHNEIDERMAN et al., 1977*; *TOMASOVIC et DEWEY*, *1978 a et b*).

Les résultats que nous avons obtenusavec la cellule EMT 6 sont en parfait accord avec les auteurs cités ci-dessus.

Pour ce qui est de la mitose elle-même, la relation entre la position de la cellule dans le cycle au moment de l'irradiation et l'allongement de la durée de la mitose de la génération irradiée n'est pas connue. En particulier, pour les mêmes raisons que celles décrites précédemment, il est à nouveau très difficile de comparer nos résultats à ceux observés par *HURWITZ et TOLMACH (1969)*.
Contrairement à ce qui se passe pour la durée du cycle de la cellule EMT 6, l'allongement de la durée de la mitose reste constant, à dose égale de radiations lorsque l'irradiation a lieu pendant les 8 premières heures du cycle. Au delà de la 8e heure, tandis que le retard à la mitose se réduit brusquement, au contraire, la mitose s'allonge brutalement. Il apparaît donc clairement que le parallélisme observé entre l'allongement du cycle et l'allongement de la mitose (Fig. 29, p.119) après irradiation n'est qu'un résultat moyen. Lorsqu'on tient compte de l'âge auquel la cellule est irradiée, on trouve des résultats différents en ce qui concerne le cycle et en ce qui concerne la mitose.

Il faut rappeler qu'il ne nous a pas été possible d'étudier l'influence d'une irradiation intervenant au cours de la mitose elle-même pour des raisons techniques et par conséquent de vérifier le résultat démontré par différents auteurs ; à savoir un allongement de toutes les phases de la mitose lorsque l'irradiation intervient pendant celle-ci, mais les cellules irradiées en mitose meurent très souvent (STRANGEWAYS et al., 1923, 1926 ; KUYPER et al., 1962 ; GIESE, 1947 ; CARLSON, 1950, 1969).

Les différentes variations de sensibilité de la durée du cycle et de la durée de la mitose en fonction de l'âge de la cellule dans le cycle au moment de l'irradiation posent des problèmes généraux sur la nature du retard à la mitose et de l'allongement de la durée de la mitose provoqués par l'irradiation, problèmes que nous aborderons ultérieurement dans le chapitre : discussion et conclusions générales, à la fin de la deuxième partie de ce mémoire.

3) PROBABILITE DE DIVISION

Il faut distinguer la mort des descendants telle qu'on peut l'étudier dans le pédigree d'une cellule irradiée de la mort au sens clonogénique telle qu'on peut l'étudier par la méthode des colonies. Les deux phénomènes sont nécessairement liés, puisque la mort au sens clonogénique correspond en fait à une probabilité de division nulle des descendants. Toutefois, le lien entre les deux notions n'est pas absolu. En effet, une cellule qui cesse d'être clonogénique peut très bien avoir pendant une ou deux générations des descendants dont la probabilité de division ne sera pas nulle. D'autre part, une cellule qui reste clonogénique peut donner naissance à des descendants dont certains mourront autrement dit, des descendants dont la probabilité de division sera inférieure à 1 pendant quelques générations.

Nous avons par exemple, après une dose de 3 **G**y observé des morts cellulaires au sein de tous les pédigrees étudiés, alors qu'on sait par ailleurs que cette même dose de 3 Gy ne stérilise que 50 % des cellules.

Les réductions de probabilité de division dose-dépendantes, observées au niveau de la première génération irradiée sont comparables à celles reportées par *ELKIND (1963)*; *THOMPSON et SUIT (1967)*; *FROESE (1966)*; *WHITMORE (1967)*; *HURWITZ et TOLMACH (1969) et TROTT (1970)*.

Nous n'avons pas observé de variation significative de la probabilité de division en fonction de l'âge de la cellule dans le cycle au moment de l'irradiation : ces résultats sont à rapprocher de ceux de HURWITZ et TOLMACH (1969) mais diffèrent sensiblement de ceux de THOMPSON et SUIT (1967, 1969) ; WHITMORE et al. (1967) et TROTT (1970) ; qui observent une augmentation de sensibilité de la probabilité de division lorsque les cellules sont irradiées tard dans leur cycle.

Certains auteurs ont également décrit un lien entre l'allongement du cycle et la capacité d'une cellule à survivre après une irradiation. En effet, THOMPSON et SUIT (1967, 1969) (cellules LP 59) et FROESE et CORMACK (1968) ; CORMACK et FROESE (1971) (cellules V 79) observent des durées de cycle normales pour les clones viables, mais un allongement progressif du cycle pour les clones abortifs. Le parallélisme que nous observons entre la prolongation du cycle et la probabilité de division confirme leurs observations. Il n'est pas sans intérêt de constater qu'il existe également une corrélation entre l'allongement de la mitose et la mort cellulaire des descendants. Tout se passe en fait comme si une cellule qui a subi le maximum de dégâts au niveau de certaines "structures" hypothétiques, dont dépendent la durée de l'intervalle intermitotique et celle de la mitose était également celle qui donnera naissance à des descendants dont la probabilité de division sera plus faible ; la cellule survivante peut éliminer ainsi ses lésions au travers des générations successives et ce phénomène modifie la croissance des cellules irradiées en freinant la croissance des cellules survivantes.

Nous avons également recherché s'il existait un comportement semblable des cellules soeurs face à la mort cellulaire, en calculant les coefficients de corrélation entre l'apparition de la mort chez les cellules soeurs après une dose d'irradiation de 6 Gy, nous avons obtenu des coefficients très élevés et statistiquement différents de 0 (Tableau XVIII, p. 126), *THOMPSON et SUIT (1967) et FROESE (1966)*, ont également observé de telles similitudes de comportement de deux soeurs face à la mort cellulaire.

Il semble donc que les lésions non réparées chez la mère sont réparties entre les cellules soeurs qui conservent un comportement semblable face à la mort. Selon *FROESE* cependant, les corrélations diminuent quand les soeurs s'éloignent l'une de l'autre. Certaines interactions cellulaires pourraient donc modifier la réponse cellulaire à l'irradiation. TABLEAU XVIII

CORRELATIONS ENTRE LA MORT DES CELLULES SOEURS DANS LES GROUPES TEMOINS ET IRRADIES

	Témoin	Irradiés (6 Gy)
Nombre de paires de cellules soeurs	62	107
Probabilité estimée de la mort	0,019	0,117
Corrélation estimée entre la mort des cellules soeurs	- 0,019	- 0,502
Distribution des paires de cellules soeurs (a) (Deux monts (Une mont et Une mitose (Deux mitoses	0 (0,03) 3 (2,94) 76 (76,03)	7 (1,47) 11 (22,10) 89 (83, 43)
Valeur du χ² (b)	0,001	6,78
(a) Les chiffres donnés correspondent à d'une indépendance entre les cellul (b) Les valeurs du χ^2 de comparaison de semblables (deux morts ou deux surv	i ceux observés, les chiffres entre parenthi les soeurs. 15 nombres observés et attendus ont été obte 15 vantes), ceci à cause de la faiblesse des	eses sont les chiffres attendus dans le cas enus en regroupant les couples de cellules effectifs "attendus".

126

IV - ETUDE DE L'ACTION DES IONS LOURDS ACCELERES SUR LA DUREE DU CYCLE ET LA PROBABILITE DE DIVISION

A - RÉSULTATS

1) RELATION ENTRE LA DOSE DE DIFFERENTS TYPES DE RADIATIONS ET LA DUREE DU CYCLE CELLULAIRE

Nous avons observé une augmentation significative de la durée du cycle de la génération irradiée avec les trois types de radiations. Plus la dose est importante, plus le retard à la mitose est élevé et à doses égales, l'allongement du cycle provoqué par les ions de néon est significativement supérieur à celui induit par les ions d'hélium, ce dernier étant lui-même significativement supérieur au délai provoqué par les rayons γ (Fig. 30, p.128 et Tableau XIX, p. 129).

L'efficacité biologique d'une radiation (R) comparée aux rayons X est définie comme le rapport des doses $\frac{DX}{DR}$ où DX et DR sont respectivement les doses de rayons X et de la radiation testée qu'il faut administrer pour obtenir le même effet biologique. Initialement les rayons X étaient toujours pris comme radiation de référence. Actuellement, ils sont souvent remplacés par les rayons gammas du ⁶⁰Co ou du ¹³⁷Cs.

Afin de quantifier l'allongement du cycle en fonction de la dose, nous avons pour les trois types de radiations, ajusté trois droites des moindres carrés dans les points expérimentaux de la figure 30. Les pentes de ces différentes droites sont reportées dans le tableau XX (p. 130). En prenant les irradiations γ comme référence, nous avons calculé l'efficacité biologique relative (E.B.R.) des ions d'hélium et de néon, en effectuant le rapport des différentes pentes obtenues ; ces E.B.R. sont respectivement de 1,2 \pm 0,1 et 3,5 \pm 0,1 (Tableau XX, p. 130). Le retard à la mitose disparaît



Figure 30

Variation de la durée du cycle des générations irradiée et postirradiée en fonction de la dose de rayons γ du ⁶⁰Co**m**; d'ions d'hélium \triangle ; et d'ions de néon \bullet TABLEAU XIX

VARIATION DE LA DUREE DU CYCLE DES GENERATIONS IRRADIEE ET POST-IRRADIEE EN FONCTION DE LA DOSE ET DE LA NATURE DES RADIATIONS.

(cycle têmoin : 11,43 ± 0,04). (n représente le nombre de valeurs individuelles)

10 Gy	$23,7 \pm 1,1$ 53	$13,5 \pm 1,3$ 12	5 23,4 \pm 0,7 105	$\begin{array}{c c} 4 & 15,0 \pm 0,1 \\ 28 & 28 \\ \end{array}$			-
6 Gy		•	20,6 <u>+</u> 0, 76	$10,8 \pm 0,58 \pm 58$			
3 Gy	$14,5 \pm 0,2$ 97	$12,4 \pm 0,3$ 70	$15,8 \pm 0,3$ 92	$11,2 \pm 0,3$ 82	23,7 + 0,8	ec 12,0 <u>+</u> 0,7 30	
2 Gy					$17,5 \pm 0,5$	63 11,3 <u>+</u> 0,3 59	•
1 Gy	$13,1 \pm 0,4$ 25	$12,5 \pm 0,2$ 24	$14,4 \pm 0,2$ 61	12,7 <u>+</u> 0,3 55	$16,2 \pm 0,3$	12,1 \pm 0,2 97	
ĜÉNÉRATION IRRADIÉE	Durée du cycle - moyenne (h) <u>+</u> erreur standard n	GÉNÉRATION POST-IRRADIEE Durée du cycle - moyenne (h) <u>+</u> erreur standard n	GÉNÉRATION IRRADIÉE Durée du cycle - moyenne (h) <u>+</u> erreur standard n GÉNÉRATION POST-IRRADIÉE	Durée du cycle - moyenne (h) <u>+</u> erreur standard n	GÉNÉRATION IRRADIEE Durée du cycle - moyenne (h) <u>+</u> erreur standard	GÉNÉRATION POST-IRRADIÉE Durée du cycle - moyenne (h) <u>+</u> erreur standard n	
	ەر مى	J DN	D'HELIUM	SNOI	ИЕОИ	ION2 DE V	

BUS LILLE

129

TABLEAU XX

PENTES DES DIFFERENTES DROITES EXPRIMANT LE RETARD A LA MITOSE EN FONCTION DE LA DOSE ET E.B.R. DES DIFFERENTES RADIATIONS

RADIATION	PENTE (h/Gy) moyenne <u>+</u> erreur standard	E.B.R.
Rayons y du ⁶⁰ Co	1,1 ± 0,1	1
Ions d'hélium	1,4 ± 0,1	1,2 ± 0,1
Ions de néon	3,9 <u>+</u> 0,2	3,5 <u>+</u> 0,1



dès la génération post-irradiée (Fig. 30, p. 128), pour les trois types de radiations.

2) RELATION ENTRE L'AGE DE LA CELLULE DANS LE CYCLE AU MOMENT DE L'IRRADIATION ET LA DUREE DU CYCLE DE LA GENERATION IRRADIEE

Pour chaque groupe d'âge défini précédemment, nous avons recherché l'influence de l'âge de la cellule dans le cycle au moment de l'irradiation. Les différentes mesures réalisées aux Etats Unis, étant inférieures, en nombre à celles réalisées à Lille, nous avons dû regrouper les deux derniers groupes en considérant ensemble les cellules irradiées plus de 6 heures après leur dernière mitose.

Pour les ions de néon ainsi que ceux d'hélium, le retard à la mitose varie significativement avec l'âge de la cellule dans le cycle au moment de l'irradiation. Le retard à la mitose augmente avec l'âge de la cellule dans le cycle au moment de l'irradiation (Fig. 31, p. 132; Tableau XXI, p. 133) : le maximum étant atteint entre 4 et 6 heures, après la dernière mitose pour les ions d'hélium et au-délà de 6 heures après la dernière mitose pour les ions de néon et les rayons γ.

3) PROBABILITE DE DIVISION

Pour les trois types de radiations, la probabilité de division qui est de 0,99 pour les témoins diminue significativement avec la dose de radiations dans la génération irradiée, ainsi que dans la génération post-irradiée (Fig. 32, p.134 et Tableau XXII, p. 135). Nous n'observons pas de différences significatives entre les probabilités de division résultant des effets des ions d'hélium ou de rayons γ . Par contre, avec les ions de néon, la probabilité de division est à dose égale, significativement plus faible que celle obtenue avec les ions d'hélium et les rayons γ . Après une dose de 3 Gy, la probabilité de division de la génération irradiée tombe de 0,98 et 0,95,



Figure 31

Variation du retard à la mitose en fonction de l'âge de la cellule dans le cycle au moment de l'irradiation : rayons γ du ⁶⁰Co **=**---**=**; ions d'hélium Δ ---- Δ ; ions de néon **•**----**•** TABLEAU XXI

VARIATION DU RETARD A LA MITOSE DE LA GENERATION IRRADIEE EN FONCTION DE L'AGE DE LA CELLULE DANS LE CYCLE AU MOMENT DE L'IRRADIATION POUR CHAQUE TYPE DE RADIATION. LA VALEUR INDIQUEE EST LA PENTE EN h/Gy ± ERREUR STANDARD.

	DELA	VI ENTRE L'IRRADIA	TION ET LA MITOSE	PRECEDENTE
	4 5 4 0	2 + 4 h	4 + 6 h	4 9 +
Rayons y du ⁶⁰ Co	0,73 ± 0,06	$1,26 \pm 0,10$	1,37 ± 0,15	1,50 ± 0,07
Ions d'hélium	0,33 ± 0,06	1,31 ± 0,08	1,79 ± 0,07	1,68 ± 0,08
Ions de néon	3,22 ± 0,27	3,57 ± 0,33	3,86 ± 0,31	4,32 ± 0,24

133



Figure 32

Variation de la probabilité de division des générations irradiée et post-irradiée en fonction de la dose de : rayons γ du ⁶⁰Comions d'hélium $\triangle - \Delta$; ions de néon. • - •

134

- 2;

TABLEAU XXII

PROBABILITE DE DIVISION DES GENERATIONS IRRADIEE (G.1.) ET DES GENERATIONS POST-IRRADIEE (G.P.1.) POUR LES TROIS TYPES

ES.	
INDIVIDUELL	
VALEURS	
Ы	
NOMBRE	
AU	
CORRESPONDEN	
PARENTHESES	
ENTRE	
CHIFFRES	
LES	
RADIATIONS.	
DE	

Gy 10 Gy	44,3 (35)	14,9	,2 37,4 1) (99)	9) 19,2 (20)		
ی 			63	4 6 8 7 8 7 8 7 8 7 8 7		
3 GY	100 (87)	97,7 (127)	(06) 3 * 26	95,4 (144)	83,6	72,2
2 Gy					87,2 (82)	85,1 (97)
1 Gy	100 (25)	97 , 8 (45)	100 (61)	98 (92)	97,3 (49)	94,9 (167)
	(G.I.	[G.P.I.	(G. I.	[G.P.1.	(G.1. {	G. P. I.
	ү DU ⁶⁰ Со		Ions d'hélium		MC NÉON T	

respectiyement pour les rayons γ et les ions d'hélium, à 0,72 pour les ions de néon. Pour obtenir une réduction de probabilité de division identique à celle provoquée par une dose de 3 Gy d'ions néon, il faut une dose double d'ions d'hélium (6 Gy).

B - DISCUSSION

Nous avons utilisé le retard à la mitose moyen mesuré par la technique microcinématographique pour comparer les effets, sur la durée du cycle cellulaire de radiations de TEL aussi différents que les rayons γ du ⁶⁰cobalt, les ions d'hélium de 228 MeV (TEL médian de 15 à 25 keV/µm) et ceux des ions de néon (TEL médian de 100 keV/µm). Il est bien connu que les durées de cycle dans une population témoin présentent une grande variabilité individuelle même lorsque les cellules se multiplient de manière exponentielle dans des conditions de culture standardisées et étroitement contrôlées (COLLYN et al., 1977 et Première partie de cette thèse). On peut donc se demander dans quelle mesure la valeur moyenne du retard à la mitose rend bien compte de l'influence de l'irradiation sur l'ensemble de la population cellulaire. Nous avons donc étudié la distribution des valeurs individuelles du cycle des cellules irradiées et il apparaît bien, pour les trois types de radiations utilisées que ce sont toutes les cellules de la population irradiée qui ont la durée de leur cycle allongée et que le retard à la mitose moyen rend bien compte des effets des radiations sur la population cellulaire globale (Fig. 33, p. 137).

Les résultats obtenus au cours des

expériences avec les radiations gammas (effectuées aux U.S.A.) confirment la relation dose-effet linéaire que nous avons décrite précédemment *(COLLYN et al., 1980)*; et sont en bon accord avec les résultats de nombreux auteurs qui ont réalisé des expériences comparables avec des souches cellulaires différentes

136



Figure 33

Distribution des valeurs individuelles du cycle cellulaire de la génération irradiée :





(ELKIND et al., 1963; DEWEY et al., 1963; FROESE, 1966; WALTERS et PETERSEN, 1968; DOIDA et OKADA, 1969; LEEPER et al., 1972).

En ce qui concerne les radiations de TEL élevé, nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par NEARY et al., (1959) qui observent une relation linéaire entre le retard à la mitose provoqué par l'action des neutrons sur les racines de Vicia Faba par SCHLAG et al., (1978) et LUCKE-HUHLE et al., (1979) qui ont mis en évidence l'existence d'une relation linéaire entre l'arrêt des cellules en G $_2$ et la dose de mesons ${\mathbb M}$ ou d'ions lourds accélérés administrés à des cellules V 79. En opposition à ces relations dose-effet linéaires, SCHNEIDER et WHITMORE (1963) irradiant des fibroblastes de Hamster et des avec des rayons X et des neutrons et SKARSGARD cellules L (1964) utilisant des ions lourds de différents TEL pour irradier des cellules de Hamster ont décrit une relation de type exponentielle entre la dose et le retard à la mitose. Ces différences peuvent être au moins en partie expliquées par les très fortes doses utilisées par ces derniers auteurs.

Il est difficile de comparer les E.B.R. calculées à partir des courbes de survie à celles obtenues à partir de la durée du cycle *in vitro* et ceci d'autant plus que, dans le cas des courbes de survie, les E.B.R. varient avec la dose d'irradiation ce qui n'est pas le cas pour le retard à la mitose. En fonction de cette importante restriction, il semblerait cependant que l'E.B.R. que nous avons calculéepour les ions de néon accélérés se situe à la limite supérieure des valeurs trouvées par d'autres auteurs pour les pourcentages de survivants obtenus avec des doses élevées (Tableau XXIII, p. 139).

Ces résultats se rapprochent de ceux de GRAY et al. (1940) ; SCHNEIDER et WHITMORE (1963), SKARSGARD (1964, 1967) ; TODD et al. (1975 a et b) ; SCHLAG et al. (1978) ; et LÜCKE-HUHLE et al. (1979) qui ont observé, pour le retard à la

TABLEAU XXIII

RESUME DES DIFFERENTES EXPERIENCES BIOLOGIQUES REALISEES AVEC DES IONS LOURDS ACCELERES

Matériel biologique	E.B.R.	Références
Ions d'hélium		
Survie des cellules d'un lymphome de Souris	1,09 2,3 (anoxiques)	FEOLA et al., 1969 BERRY and ANDREWS, 1964
Survie des cellules épidermiques de Souris	1,04	WITHERS, 1967
Irradiation totale de Souris : - survie de 6 jours - survie de 20 jours	1,3 1,2	CYL CHONG, 1971
Survie des cellules de rein Humain T1	1,1 à 1,4 1,3 à 1,4 1,1 à 1,4	CYL CHONG, 1971 RAJU et al., 1972 TODD et al., 1974
Métastases pulmonaires	1,3 à 1,5	EL-MAHDI et al., 1974
Réaction de la peau de Souris	1,3 ā 1,4	LEITH et al., 1975
Survie des embryons après irradiation de la mère	1,1 à 1,1	WARD et al., 1976
Survie des EMT 6	doses ≽5 Gy 1,3 doses <5 Gy 2,3	GUICHARD et al., 1977
Survie des cellules V 79	1,2	RAJU et al., 1978
Recroissance des tumeurs R1	1,0 à 1,1	CURTIS et al., 1978
Survie des cellules des cryptes intestinales	1,10 à 1,3	FU et al., 1979
Ions de néon		
Cellules de Hamster : - survie - aberrations chromosomiques - délai mitotique	0,84 0,80 3	SKARSGARD, 1967
Survie de cellules de rein Humain	1 % survie 1 10 % survie 2 50 à 80 % survie 3	TODD, 1967
Tumeur intercérébrale de Souris	1 % survie 1,4	LEITH et al., 1975
Réaction de la peau	(Souris 1,4 < E,B.R.<1,7 (Hamster 1,3 < E.B.R.<1,8	LEITH et al., 1976 BUS
Survie des cellules V 79	2,2 à 2,5	RAJU et al., 1978
Réaction de la peau de Souris	1,7 à 2,0	RAJU et CARPENTER, 1978
Recroissance des tumeurs R1	1,7 à 1,8	CURTIS et al., 1978)
Survie des cellules de rein Humain	10 % survie 1,8 à 3	

mitose et pour différents types de radiations,des E.B.R. supérieures à celles obtenues à partir des courbes de survie.

Dans une récente publication, *LUCKE HUHLE* et al. (1979), ont montré que l'allongement du cycle provoqué par les radiations de TEL élevé était essentiellement dû à un blocage de la cellule dans la phase G_2 et selon ces auteurs, il existerait une très forte liaison entre le retard à la mitose et la mort cellulaire.

La technique cytofluorométrique qu'ils ont utilisée ne leur a pas permis d'étudier les variations du retard à la mitose en fonction de l'âge de la cellule dans le cycle au moment du traitement. A notre connaissance seuls NEARY et EVANS (1959) ont étudié avec des méthodes indirectes (Index mitotique) l'influence de l'âge des cellules des racines de Vícia Faba au moment de l'action de neutrons : ils ont mis en évidence une diminution du retard à la mitose en fonction de l'âge de la cellule dans le cycle, ainsi qu'une diminution de l'influence de l'âge lorsque le TEL des radiations augmente.

Utilisant une méthode d'étude directe du cycle cellulaire, telle que la microcinématographie qui permet de connaître à tout moment et avec une excellente précision l'âge de la cellule dans le cycle, nous avons au contraire mis en évidence une variation significative du retard à la mitose en fonction du délai séparant la dernière mitose et l'irradiation, ceci aussi bien pour les radiations de TEL élevé que pour les radiations de TEL faible. Ce lien entre l'âge de la cellule et le retard à la mitose diffère des résultats obtenus pour la survie cellulaire. En effet *SINCLAIR (1969)*; *ELKIND* (1971; *LEITH et al. (1971)*; *BIRD et BURKI (1975)*; *WITHERS* (1973); *RAJU et al. (1975)*; *HALL et al. (1969, 1972, 1977)* étudiant les effets létaux des irradiations, mirent en évidence une diminution, voire même, une disparition de l'influence de l'âge de la cellule dans le cycle lorsque le TEL des radiations augmentait.

La courbe obtenue pour les rayons γ ne présente pas de diminution du retard à la mitose pour les cellules irradiées tard dans le cycle ; l'explication réside dans le fait que pour les raisons expliquées précédemment, nous avons dû grouper les cellules traitées plus de 6 heures après l'irradiation et nous ne disposions pas d'un assez grand nombre de cellules irradiées au-delà du point de transition en G₂ pour mettre en évidence une diminution du retard à la mitose lorsque la cellule était irradiée plus de 8 heures après sa dernière mitose.

Ces différences de comportement observées entre la survie cellulaire et le retard à la mitose face à une augmentation du TEL des radiations utilisées, notamment : E.B.R. supérieures pour le retard à la mitose et différentes variations de sensibilité en fonction de l'âge de la cellule dans le cycle au moment du traitement, nous confirment dans notre hypothèse de l'existence de différents sites d'action impliqués dans les phénomènes de mort cellulaire et de retard à la mitose.

Quels que soient les rayonnements utilisés, nous avons observé une relation entre la dose et la réduction de probabilité de division des générations irradiée et post-TROTT (1969, 1974) et BLATTMAN (1974) bien que irradiée. travaillant sur des matériels biologiques et avec des rayonnements très différents : cellules L et rayons X ou α du polonium ; levures et ions d'hélium ou d'oxygène accélérés ; ont également mis en évidence une chute dose-dépendante de la probabilité de division surtout au niveau de la génération post-traitée. Pour les trois types de rayonnements nous ayons observé des morts cellulaires au sein de tous les pedigrees que la cellule soit clonogène ou pas. Ce phénomène, auquel s'ajoute un important allongement du cycle cellulaire modifie la croissance de la population cellulaire après irradiation, modification qu'il est essentiel de connaître lorsqu'on cherche à établir les meilleurs

schémas de traitement par irradiations fractionnées ou par association de plusieurs types de thérapeutique (radiothérapie + chimiothérapie par exemple).

V - DISCUSSION GENERALE

PROBLÈME DE LA NATURE DU RETARD À LA MITOSE

1) RETARD ET SURVIE CELLULAIRE

L'explication la plus simple du retard à la mitose serait de penser tels *YU et SINCLAIR*, *1967 ; SINCLAIR*, *1968* que le retard correspond au temps nécessaire pour la réparation des lésions responsables de la mort cellulaire. Mais la réponse cellulaire à une irradiation est très différente selon qu'on s'adresse à la survie cellulaire ou au retard à la mitose ; nous avons en effet successivement montré que :

la dose d'irradiation n'a pas le même effet sur la survie cellulaire et sur le retard à la mitose : la courbe de survie cellulaire comporte un épaulement non linéaire aux faibles doses, alors que le retard à la mitose augmente linéairement avec la dose,

• la réponse de la survie cellulaire en fonction de l'âge dans le cycle au moment de l'irradiation γ est pratiquement l'inverse de celle observée pour le retard à la mitose. Les cellules en mitose sont extrêmement sensibles à la mort cellulaire et les cellules en phase S radiorésistantes tandis que si on considère le retard à la mitose, la sensibilité augmente en fonction de l'âge de la cellule dans le cycle pour atteindre une valeur maximale en fin de S début de G₂. • Quand la transmission d'énergie linéaire des radiations augmente, l'influence de l'âge de la cellule dans le cycle au moment du traitement sur l'importance du retard à la mitose subsiste alors que de nombreux auteurs ont montré que dans ces conditions les variations de la survie cellulaire en fonction de l'âge disparaissent.

De plus un certain nombre d'auteurs ont également montré qu'il existait deux mécanismes de réparation différents pour ces deux types de lésions distinctes (retard et survie cellulaire). Si on inhibe la synthèse de l'ADN après l'irradiation, on augmente la mort cellulaire en inhibant les mécanismes de réparation liés à l'ADN, alors qu'on ne modifie pas le retard à la mitose (WALTERS et al., 1968 ; LEEPER et al., 1972). Au contraire une inhibition des synthèses protéiques après l'irradiation est sans effet sur la survie cellulaire alors qu'elle prolonge très nettement le retard à la mitose (WALTERS et PETERSEN, 1968 ; DOIDA et OKADA, 1969 ; BACCHETTI et al., 1970).

L'incorporation de BUdR^{*} (dont le rôle est de bloquer les synthèses d'acides desoxyribonucléiques) augmente la mort cellulaire et le nombre d'aberrations chromosomiques, mais n'a aucun effet sur le retard à la mitose (SCHNEIDER et al., 1966 ; BOOTSMA et al., 1968 ; DEWEY et al., 1971 ; MILLER et al., 1973). Enfin TOLMACH et al. (1976) et LEEPER et al. (1975) ont montré que ni le fractionnement des doses de radiation, ni l'incubation des cellules à des températures suboptimales après l'irradiation ne modifie la réparation du retard à la mitose d'une manière qui ressemble à la réparation des lésions sublétales ou potentiellement létales.

L'ensemble des résultats énumérés ci-dessus suggère qu'il existe peu de corrélations entre la mort cellulaire et le retard à la mitose et que les sites d'actions concernés par ces deux types de réponse à une irradiation sont distincts. Il est possible cependant que la survie cellulaire et le retard à la mitose dépendent l'un de l'autre, mais de façon * BUdR : 5-bromodeoxyuridine

143

inyerse : par exemple, une cellule irradiée dans la phase S peut survivre mieux parce qu'elle subit un délai assez long, lequel lui permettra de réparer une lésion avant que celle-ci ne soit exprimée (*ROSENBERG et al.*, 1976).

2) RETARD ET SYNTHESE DE L'ADN

EULER et HEVESY (1942) furent les premiers à mettre en évidence une diminution d'incorporation d'un traceur dans l'ADN après une irradiation; de nombreux travaux étudièrent ensuite l'action desirradiations sur la synthèse de l'ADN (Revue Générale de FRINDEL et TUBIANA, 1971).

Il faut des doses très fortes pour inhiber la synthèse de l'ADN (KELLY, 1957 ; FIRKET, 1958 ; LAJTHA et al., 1958 ; WHITFIELD et RIXON, 1959 ; FIRKET, 1969 ; TERASIMA et TOLMACH, 1963 ; SINCLAIR, 1967) ont montré que pour des doses supérieures à 5 Gy, la synthèse de l'ADN était affectée d'une façon mineure par l'irradiation dans les autres phases que la phase S. Quand la cellule est irradiée en S, la vitesse de synthèse de l'ADN est réduite, mais la quantité totale de l'ADN n'est pas altérée.

En fait nous pouvons admettre deux composantes pour le retard à la mitose :

• une prolongation de la durée de la phase S résultant d'une diminution de la vitesse de synthèse de l'ADN (SINCLAIR, 1968,1972 a et b; TERASIMA et TOLMACH, 1963) cette composante pourrait expliquer le délai non négligeable observé au niveau des cellules irradiées en G₁ (MILLER et al., 1973) mais ne peut expliquer à elle seule le retard à la mitose,

• un arrêt des cellules dans la phase G₂ du cycle cellulaire responsable de la plus grande partie du retard à la mitose (*SINCLAIR*, 1968, 1972 a et b ; *MILLER et al.*, 1973 ; *LINDMO et al.*, 1979). 3) ETUDE DES DIFFERENTS MODELES PROPOSES POUR EXPLIQUER LE RETARD A LA MITOSE

VALLERON et al, (1974) ont proposé trois modèles différents pour tenter d'expliquer le retard à la mitose (Fig. 34, p. 146) ;

• un modèle A où ils supposent qu'il existe un point X du cycle cellulaire où toutes les cellules présentes au moment de l'irradiation restent bloquées pendant un temps tx lorsqu'elles y arrivent. Les cellules irradiées à un âge au-delà du point X ne seraient donc pas retardées par l'irradiation (Fig. 34 a, p. 146).

• un modèle B où ils supposent que la transition à travers un point R du cycle cellulaire n'est possible que si la cellule dispose d'une certaine substance (S) hypothétique à ce moment ; à partir du moment où la cellule est irradiée, elle commence à réparer la lésion subie par la substance S. Dans ce modèle, les cellules irradiées à un âge supérieur à R ne sont pas retardées car le point critique R est franchi. De même une cellule irradiée longtemps avant R ne sera pas retardée, car elle aura eu le temps de réparer ses lésions avant d'atteindre R (Fig. 34 b, p. 146).

• Enfin un modèle C tenant compte de l'hypothèse de *SINCLAIR (1968)* selon laquelle il y aurait un allongement de la durée de la synthèse de l'ADN sous l'effet de l'irradiation. Le retard est d'autant plus important que l'irradiation intervient tôt dans la phase S, il diminue ensuite progressivement pour disparaître lorsque la cellule est irradiée au delà de S (Fig. 34 c, p. 146).

Les résultats que nous avons obtenus ne sont compatibles avec aucun de ces modèles, le retard à la mitose existe même lorsque la cellule est irradiée au début de G_1 , il augmente régulièrement avec l'âge de la cellule dans le cycle au moment du traitement puis diminue brutalement lorsque

- MATERIALISATION DE LA LESION





Différents modèles proposés pour expliquer la nature du retard à la mitose.



la cellule est irradiée plus de 8 heures après la mitose (Fig. 34 d, p. 146). Pour expliquer nos résultats expérimentaux il faudrait combiner les modèles A et B proposés par *VALLERON et al. (1974)* et supposer que le retard à la mitose comporte plusieurs composantes :

 l'une répondant au modèle A ou modèle de Bloc : toutes les cellules seraient touchées de la même façon, ceci expliquerait le retard à la mitose accusé par les cellules irradiées très tôt dans leur cycle,

 l'autre répondant au modèle B ou modèle de réparation expliquant l'augmentation progressive du retard à la mitose en fonction de l'âge de la cellule dans le cycle. Cette partie du retard à la mitose correspondrait à un processus de réparation qui prendrait un certain temps et qui de ce fait aurait d'autant plus d'influence sur le cycle qu'il commencerait plus tard.

La forme de la relation liant le retard à la mitose à l'âge de la cellule dans le cycle au moment de l'irradiation, ainsi que les résultats de nombreux auteurs montrant que les synthèses protéiques étaient indispensables à la réparation du retard à la mitose (TOBEY et al., 1966 ; DOIDA et OKADA, 1969 ; WALTERS et PETERSEN, 1968 ; HIGHFIELD et DEWEY, 1974) ont conduit DEWEY et al. (1976) à proposer un modèle d'action des radiations ionisantes faisant intervenir successivement deux structures moléculaires : une protéine précurseur (PS)^{*} synthétisée au cours du cycle et accumulée tout au long du cycle jusqu'à une quantité maximale en début de G₂. Ensuite, la cellule assemblerait les différentes unités de protéine précurseur (PS) en une structure moléculaire complète (CS)** essentielle pour la division cellulaire et elle-même peu sensible aux radiations. Quand la cellule atteint le point de transition (TP*** défini comme séparant la période d'accumulation de (PS) et

> * PS : Protein Structure = Protéine de structure ** CS : Completed Structure = Structure assemblée *** TP : Transition point = Point de transition

l'assemblement en CS), la quantité de PS diminue puisque PS est assemblée en CS. La structure finale CS est réfractaire à l'action de l'irradiation alors que la structure PS est la cible responsable du retard à la mitose. Le retard à la mitose serait donc maximal juste avant le point de transition en G₂ au moment où la quantité de PS est maximale et diminuerait ensuite, lorsque la structure CS serait assemblée. Les variations du retard à la mitose en fonction de l'âge que nous avons observées au niveau des cellules EMT 6 peuvent être expliquées par ce modèle.

D'autres expériences doivent cependant être entreprises pour identifier dans ou très près du noyau (MUNRO, 1959 ; EHMANN et al., 1979 ; WARTERS et HOFER, 1977, CODE et al., 1977), une structure comportant des lésions moléculaires qui entraînent un retard à la mitose et qui requièrent la synthèse protéique pour être réparées. La similarité des points de transition pour l'action des rayons X et celles des fortes concentrations en actynomycine D suggèrent que l'ADN ou la chromatine probablement localisés près de la membrane nucléaire, contenus dans le nucléole ou dans les centrosomes, seraient la cible (DEWEY et HIGHFIELD, 1976).

De plus la corrélation observée entre la phosphorylation de certains sites spécifiques des histones H_1 durant la phase G_2 et la progression des cellules dans cette même phase G_2 suggère que la phosphorylation de sous-fractions de l'histone H_1 est associée soit avec la condensation de la chromatine, soit avec l'activation de la polymérisation des micro-tubules (LAKE, 1973 ; BRADBURY et al., 1974 ; WALTERS et al., 1974 ; INGLIS et al., 1976). Ce rôle possible de la phosphorylation des protéines et confirmé par les études de TOMASOVIC et DEWEY (1978) qui montrent que les rayons X inhibent la phosphorylation de l'histone H_1 en inhibant la phosphodiestérase (WALTERS et al., 1974).

L'étude des différents mécanismes d'action des drogues qui réduisent le retard à la mitose devrait aider à identifier la cible responsable du retard à la mitose et à comprendre les processus biochimiques importants intervenant au cours de la phase G₂ (TOMASOVIC et DEWEY, 1978).

Cependant la possibilité que la cible soit le centre organisateur des microtubules ou le centriole comme le suggèrent *LEA (1955)* et *RUSTAD (1961, 1970)* doit être prise en considération car la maturation du centriole peut être inhibée par l'actinomycine D, c'est un organite qui est situé près de la membrane nucléaire et qui subit d'importantes variations péricentriolaires dans la phase G_2 du cycle.

4) ALLONGEMENT DE LA DUREE DE LA MITOSE

Il ne semble pas que l'on puisse interpréter l'allongement de la mitose en faisant appel à la même explication que celle suggérée par DEWEY pour le retard à la mitose. En effet, les variations de l'allongement de la durée de la mitose avec l'âge de la cellule au moment de l'irradiation, sont sensiblement distinctes de celles du retard à la mitose. On peut penser que les dégâts créés au niveau d'une structure moléculaire qui serait nécessaire au bon déroulement de la mitose, seraient à l'origine de l'allongement de la mitose elle-même. Cette structure présente dans la cellule en quantité constante du début du cycle jusqu'à la 8e heure, verrait sa quantité doubler au-delà de la 8e heure et se diviser par deux à la fin de la mitose. On comprendrait alors aisément que la sensibilité de la cellule à l'allongement de la mitose soit constante pendant les 8 premières heures du cycle et nettement augmentée au-delà. L'allongement de la durée de la mitose pourrait être mis à profit par la cellule, pour réparer la structure moléculaire endommagée au cours de l'interphase, mais cela implique que cette structure hypothétique serait normalement synthétisée avant la mitose et ne pourrait être réparée qu'après le début de la mitose.

JOCKUSCH et al. (1970) et AL BADER et al. (1978) ont mis en évidence chez respectivement Physarum polycephalum et les cellules HeLa, l'existence d'une protéine nucléaire spécifique de la phase G₂ et responsable de l'entrée en mitose. SISKEN et WILKES (1967) ont montré que lorsque des cellules amniotiques humaines étaient traitées dans la phase G₂ du cycle par un analogue de la phénylalanine (p-fluorophénylalanine) la durée de la mitose était considérablement allongée, alors que cette substance est sans effet lorsque les cellules sont traitées dans les autres phases du cycle cellulaire.

Cependant cette synthèse de nouvelles protéines, juste avant la mitose ne doit pas nous faire oublier que des modifications importantes interviennent également sur des protéines préexistantes : juste avant la mitose, la phosphorylation des protéines F_1 atteint son maximum (MARKS, 1973; BRADBURY, 1974; GURLEY et al., 1974, 1977) et la phosphorylation de l'histone F_1 représenterait une étape importante de l'entrée en mitose en initiant la condensation des chromosomes (GURLEY et al., 1974; BRADBURY, 1974).

Nous pouvons également penser à des lésions radio-induites au niveau des protéines du fuseau puisque les différentes drogues qui inhibent l'assemblage des microtubules ralentissent ou stoppent la progression au travers de la mitose (EIGSTI, 1955 ; BIESELE, 1958 ; DUSTIN, 1963 ; GELFANT, 1963 ; KIHLMAN, 1966 ; DEYSSON, 1968 ; SLUDER et BEGG, 1975 ; SLUDER, 1979).

Nous ne pouvons cependant pas exclure une autre interprétation possible de l'allongement de la mitose ; il se pourrait que les dégâts causés à une substance "hypothétique" ne soient pas réparés et que dès lors, la mitose soit ralentie simplement parce qu'elle se déroulerait dans de mauvaises conditions, mais dans ce cas la proportionnalité entre l'allongement de la mitose et la dose de radiations reste très difficile à expliquer. Nous avons montré qu'un allongement important de la durée de la mitose précédait la mort cellulaire : la cellule serait capable d'effectuer une ou deux divisions dans de très "mauvaises conditions" avant que l'effet létal soit exprimé. En fait, nos résultats ainsi que ceux de nombreux auteurs suggèrent que lorsque la cellule franchit un certain point de transition situé dans la phase G_2 du cycle plusieurs phénomènes importants interviennent : la cellule devient insensible au retard à la mitose, alors qu'elle devient très sensible à l'allongement de la durée de la mitose, la fraction de cellules survivantes mesurée par la méthode des colonies est réduite (*TERASIMA et TOLMACH*, 1963), et la cellule ne présente pas d'aberration chromosomique lors de la mitose suivante (*DEWEY*, 1975). Tous ces résultats soulignent l'importance du point de transition localisé dans la phase G_2 du cycle cellulaire.

VI - CONCLUSIONS

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous avons présenté des résultats concernant les effets de différents types de radiations sur la cinétique de prolifération des cellules EMT 6 en culture. De l'ensemble de nos résultats plusieurs points importants peuvent être soulignés :

- Après l'action des rayons γ du ⁶⁰ cobalt :

• les durées du cycle et de la mitose

sont allong_{ées} dans des proportions comparables : ces deux paramètres sont pratiquement doublés après une dose de 10 Gy,

• quand les filles des cellules irra-

diées meurent, le retard à la mitose et l'allongement de la durée de la mitose sont plus élevés que la moyenne,

• le retard à la mitose et l'allongement

de la durée de la mitose varient en fonction de l'âge de la cellule dans le cycle au moment de l'irradiation. Le retard à la mitose augmente progressivement lorsque les cellules sont irradiées pendant les 8 premières heures de leur cycle (avant un certain point de transition situé en G₂) alors que la mitose est faiblement allongée.

Au contraire, quand les cellules sont irradiées plus de 8 heures après le début de leur cycle (au-delà du point de transition), le retard à la mitose diminue brusquement alors que la mitose est allongée brutalement. Ces résultats semblent indiquer que deux lésions distinctes sont responsables du retard à la mitose et de l'allongement de la durée de la mitose. - En étudiant de façon comparative les effets de radiations de différents TEL, nous avons montré successivement les différents faits suivants :

• quel que soit le type de radiation utilisé (rayon γ, ions d'hélium ou ions de néon), on observe toujours une relation linéaire entre la dose d'irradiation et l'importance du retard à la mitose,

• les différentes valeurs d'efficacité relative (EBR), calculées pour la durée du cycle sont indépendantes de la dose et sont respectivement de 1,2 \pm 0,1 pour les ions d'hélium et 3,5 \pm 0,1 pour les ions de néon,

• les trois types d'irradiation étudiés (rayons γ , ions d'hélium et ions de néon), entraînent un retard à la mitose qui varie en fonction de l'âge de la cellule dans le cycle au moment du traitement,

 Enfin la probabilité de division diminue significativement avec la dose de radiations et, est, à dose égale, significativement plus faible pour les ions de néon que pour les ions d'hélium ou les rayons gammas.

- Ces différents résultats nous confirment dans notre hypothèse de l'existence de différents sites d'action impliqués dans les phénomènes de mort cellulaire et de retard à la mitose.

CONCLUSIONS GENERALES

Nous avons montré que la méthode microcinématographique est un "outil" très précis qui permet d'étudier, génération par génération, la durée du cycle cellulaire, la durée de la mitose et la probabilité de division de cellules en culture *in vitro*.

Il est certain que l'utilisation de cette méthode originale doit permettre des développements nouveaux dans une meilleure connaissance des différents mécanismes du contrôle de la division cellulaire ainsi que dans l'étude de l'action de nouveaux traitements applicables éventuellement pour améliorer la thérapcutique anticancéreuse.

L'observation du temps passé par chaque cellule sous forme sphérique avant sa division nous a permis d'avoir une estimation de la durée de la mitose de chaque cellule considérée individuellement. Nous avons montré que les durées de mitose étaient très dispersées, qu'elles étaient corrélées pour des cellules apparentées (soeur-soeur ou mèrefilles) et que la durée de la mitose était liée à celle du cycle cellulaire.

De nouvelles expériences entreprises très récemment nous indiquent de plus, une corrélation entre la durée de la mitose et la taille cellulaire. Nous comptons poursuivre ces recherches en étudiant *in vitro* la relation entre la durée de la mitose et la durée du cycle en fonction de la génération de culture, de l'age chronologique de la culture, de la taille et des mouvements cellulaires, ainsi que l'action de différents facteurs de croissance. Nous espérons ainsi apporter de nouvelles données au problème du déterminisme de la mitose : données qui doivent pouvoir être approfondies au moyen de modélisation. Si on fait une synthèse des traitements du cancer par irradiation, on peut considérer actuellement que la moitié des tumeurs sont radiorésistantes et ceci pour des raisons de localisation. En vue d'améliorer les résultats de la radiothérapie, les efforts des physiciens et des cliniciens convergent vers un but unique : l'amélioration de la distribution de la dose dans l'espace en recherchant un effort maximal au niveau de la tumeur et minimal au niveau des tissus sains. Les ions lourds accélérés semblent répondre à ces critères, mais nous n'avons malheureusement pas assez de recul pour juger si les différentes hypothèses basées sur toutes les expériences biologiques effectuées sur des cellules animales *in vivo* ou *in vitro* seront confirmées par les résultats cliniques.

Si on fait le bilan des études actuellement en cours avec les ions lourds accélérés les conclusions suivantes peuvent être dégagées :

- sur le plan biologique les ions d'hélium ne semblent pas présenter un très grand intérêt par rapport aux radiations usuelles. Les valeurs d'EBR obtenues tant pour la survie cellulaire que pour le retard à la mitose sont très voisines de celles obtenues pour les rayons γ du ⁶⁰Cobalt. Cependant les premiers résultats cliniques obtenus par *CASTRO et al. (1978)* aux Etats Unis semblent encourageants notamment pour les tumeurs du pancréas. Cette amélioration du traitement est probablement due à la meilleure distribution de la dose en profondeur réalisée lors d'une irradiation avec les ions d'hélium.

- Les ions de néon accélérés sont au contraire beaucoup plus efficaces que les radiations classiques pour provoquer la mort cellulaire ainsi que pour perturber la cinétique de prolifération des populations traitées, mais il faudra attendre 4 ou 5 années avant de connaître le résultat de leur application dans le domaine clinique, ceci d'autant plus que les premiers essais sont orientés vers des malades de très mauvais pronostic porteurs de tumeurs profondes et radiorésistantes. Nous comptons étendre nos études de l'action de différents traitements sur la durée du cycle et de la mitose en recherchant dans tous les cas, l'influence de l'âge de la cellule dans le cycle au moment du traitement. Nous nous intéresserons plus particulièrement à l'étude de l'action de divers traitements hyperthermiques et de diverses substances cytostatiques.

Pour ces études, nous utiliserons trois techniques que nous maîtrisons parfaitement :

- la technique des clones pour établir les courbes de survie et connaître la cytotoxicité du traitement utilisé,

- la microcinématographie,

- enfin, la cytofluorométrie de flux pour connaître à tout moment le pourcentage de cellules dans chacune des phases du cycle cellulaire et connaître la (ou les phases) du cycle dans laquelle les cellules sont bloquées. BIBLIOGRAPHIE
- ABERCROMBIE M. et HEAYSMAN J.E.M., (1953) Observations of the social behaviour of Cells in tissue culture. I - Sleed of movement of chick heart fibroblasts in relation to their mutual contacts. Exp. Cell. Res., 5, 111-131.
- ABERCROMBIE M. et AMBROSE E.J., (1958) Interference microscope studies of cell contacts in tissue culture. Exp. Cell. Res., 15, 332-345.
- ABSHER P.M., ABSHER R.G. et BARNES W.D. (1974) Genealogies of clone of diploid fibroblasts. Cinemicrophotographic observations of cell division patterns in relation to population age. Exp. Cell. Res., 88, 95-104.
- ABSHER R.G. et ABSHER P.M.,(1978) Mathematical models and computer simulations of proliferation of human diploid fibroblast clones. J. Theor. Biol., 72, 627-638.
- AL-BADER A.A., ORENGO A. et RAO P.N., (1978) G2 phase specific proteins of HeLa cells. Proc. Nat. Acad. Sci., 75, 6064-6068-.
- AMBROSE E.J. et EASTY D.M., (1973) Time lapse fibring of cellular interactions in organ culture II - Behaviour of malignant cells. <u>Differentiation</u>, <u>1</u>, 277-284.
- ANDERSON E.C., BELL G.I., PETERSEN D.F. et TOBEY R.A., (1969) -Cell growth and division. IV - Determination of volume growth rate and division probability. <u>Biophys. J.</u>, 9, 246-283.
- ANDERSON E.C., PETERSEN D.F. et TOBEY R.A., (1970) Density invariance of cultured chinese hamster cells with stage of the mitotic cycle. Biophys. J., 10, 630-645.
- BACCHETTI S. et SINCLAIR W.K., (1970) The relation of protein synthesis to radiation induced division delay in chinese hamster cells. Radiation Res., 44, 788-806.
- BALDWIN W.F., (1961) Latent radiation damage and synchronous cell division in epidermis of an insect. III - Spontaneous reversal of effects leading to delay during mitosis. <u>Radiation Res.</u>, 14, 426-431.
- BARRETT J.C., (1966) A mathematical model of the mitotic cycle and its application to the interpretation of percentage labelled mitoses data. J. Nat. Cancer. Inst., <u>37</u>, 443-450.
- BARRETT J.C., (1970) Optimized parameters for the mitotic cycle. Cell. and Tissue Kinetics, 3, 349-353.
- BASERGA R., (1976) Multiplication and division in mammalian cells. In the Biochemistry of Disease, M. Dekker, INC., New-York, 6.

BASS H. et MOORE J.L., (1978) - A study of thermal damage by time lapse cinemicrography. The B.J. of Radiol.51, 938.

- BEATTY A.V. et BEATTY J.W., (1954) Immediate effects of 200 r and 400 r X-radiation on microspores of tradescantia paludosa. Am. J. Botany, 41, 242-250.
- BECK H.P., (1979) Radiotoxic effects of incorporated ³H thymidine on cell population kinetics in fraction of labelled mitoses studies. Xth Meeting of the European Study group. for cell proliferation. Knokke Bruges, Belgique, p. 3.
- BEDFORD A.J., COOPER E.H. et KEMNY T.E., (1974) A kinetic analysis of death and survival in HeLa cells following exposure to methylazoxymethanol acetate. <u>Europ. J. Cancer.</u>, 10, 713-720.
- BEREITER-HAHN J., (1978) Intracellular motility of mitochondria : role of the inner compartment in migration and shape changes of mitochondria in XTH-cells. J. Cell. Sci., 30, 99-115.
- BEREITER-HAHN J. et MORAWE G., (1972) Stoffwechselabhängige mitochondriale Bewegungen in epithelialen Kaulquappenherzzellen in gewebekulturen. Cytobiologie, 6, (4), 447-467.
- BERRY R.J. et ANDREWS J.R., (1964) The response of mammalian tumor cells in vivo to radiations of differing ionization densities (LET). Ann. NY Acad. Sci., 114, 48-59.
- BESSIS M. MD et NOMARSKI G. Ph.D., (1960) Irradiation ultraviolette des organites cellulaires avec observation continue en contraste de phase. J. of Biophys. Biochem. Cyt., 8, 777-791.
- BHISEY A.N. et RANADIVE K.J., (1966) Cinematographic and cytochemical studies on phagocytosis in mouse fibrosarcoma cell line MFS₈ cultivated in vitro. <u>Exp. Cell Res.</u>, 44, 139-149.
- BIESELE J.J., (1958) Mitotic poisons and the cancer problem. Elsevier Scientific Pub. Co Amsterdam.
- BIRD R.P. et BURKI H.J., (1975) Survival of synchronized chinese hamster cells exposed to radiation of different linear-energy transfer. Int J.Radiat. Biol., 27, 105-120.
- BLAIR O.C. et ROTI-ROTI J.L., (1979) Correlation in G₁ transit time of sister cells synchronized by mitotic selection. Exp. Cell Research., 124, ° 2, 433-436.
- BLATTMANN H., (1974) Differential analysis of inactivation of yeast cells by X-rays, ⁴He and ¹⁶O ions. <u>5th. Int.</u> Cong. of Rad. Res., SEATTLE.

BOOTSMA D. et LOHMAN P.H.M., (1968) - Mitotic delay after X irradiation of synchronized mammalian cells cultivated in the presence of BUdR. Int. J. Radiat. Biol., 14, 69.

- BRADBURY E.M., INGLIS R.J. et MATTHEWS H.R., (1974) -Control of cell division by very lysine rich histone (F₁) phosphorylation. Nature. (Lond.), 247, 257-261.
- BREWER E.N. et RUSCH H.P., (1968) Effect of elevated temperature shocks on mitoses and on the initiation of DNA replication in Physarium Polycephalium. <u>Exp.,Cell Res.</u>, 49, 79-86.
- BROOKS R.F., (1976) Regulation of the fibroblast cell cycle by serum. <u>Nature</u>. 260, 248-250.
- BROOKS R.F., (1979) Cell cycles need two random transitions. XTH Meeting European study group for cell proliferation. Knokke, Belgium.
- BROOKS R.F., BENNET D.C. et SMITH J.A., (1980) Mammalian cell cycles need two random transitions. Reprint.
- BURNS F.J. et TANNOCK I.F., (1970) On the existence of a Go phase in the cell cycle. <u>Cell Tissue Kinet.</u>, <u>3</u>, 321-334.
- BURTON A.C. et CANHAM P.B., (1973) The behaviour of coupled biochemical oscillators as a model of contact inhibition of cellular division. J. Theor. Biol., 39, 555-580.
- CANTI R.G., (1928) Demonstration of a cinematograph film of living tissue and the effects of radium irradiation on the cells. Acta. Radiol. (Stockh). Suppl. 32, 193.
- CANTI R.G. et DONALDSON M., (1926) The effect of radium on mitosis in vitro. Proc. Roy Soc. Lond., <u>B 100</u>, 413-419.
- CANTI R.G. et SPEAR F.G., (1927) The effect of gamma irradiation on cell division in tissue culture in vitro. Proc. Roy. Soc. Lond., B 102, 92- 101.
- CANTI R.G. et SPEAR F.G., (1929)- The effect of gamma irradiation on cell division in tissue culture in vitro (Part. II). <u>Proc. Roy. Soc.</u>, B. <u>105</u>, 93-98.
- CARLSON J.G., (1950) Effects of radiation on mitosis. J. Cell Comp. Physiol., 35, 89-101.
- CARLSON J.G., (1969) X-ray induced prophase delay and reversion of selected cells in certain avian and mammalian tissues in culture. Rad. Res., 37, 15-30.

CARTER B.L.A. et JAGADISH M.N., (1978) - The relationship between cell size and cell division in the yeast saccharomyces cerevisiae. Exp. Cell Res., 112, 15-24.

- CASPERSSON T., FOLEY G.E., KILLANDER D. et LOMAKKA G., (1963) -Cytochemical differences between mammalian cell lines of normal and neoplastic origins. Correlation with heterotransplantability in syrian hamsters. Exp. Cell. Res., 32, 553-565.
- CASTOR L.N., (1968) Contact regulation of cell division in an epithelial- like cell line. J. Cell Physiol., <u>72</u>, 161-172.
- CASTRO J.R. et QUIVEY J.M., (1977) Clinical experience and expectation with helium and heavy ion irradiation. Int.J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 3, 127-132.
- CHANG Y.T., (1977) Cinemicrographic studies on granulopoiesis. J. Nat. Cancer Inst., 59, 1479-1484.
- CHONG CYL., (1971) Thesis LBL - 314 -
- COHN Z.A., HIRSCH J.G. et WIENER E., (1963) Ciba foundation Symposium on lysosomes. Editor de Reuck AVS, J. et A. Churchill London, p. 126.
- COLE A., CHEN R. et KRISTAL I., (1977) Division delay in CHO cells induced by partly penetrating alpha particles. Rad. Res., 70, 640-641.
- COLLYN-d'HOOGHE M., VALLERON A.J. et MALAISE E.P., (1977) -Time lapse cinematography studies of cell cycle and mitosis duration. Exp. Cell Res., 106, 405-407.
- COLLYN-d'HOOGHE M., GILET R., CURTIS S. et MALAISE E.P., (1978) - Influence of ionizing radiations of different TEL on mitotic delay. 9e ESGCP Meeting Paris, Mars 1978.
- COLLYN-d'HOOGHE M., HEMON D., VALLERON A.J. et MALAISE E.P., (1979) - Comparative effects of ⁶⁰Co γ rays on cell cycle time and mitosis duration. A time lapse cinematography study. IVth International Colloquium on microcinematography as a research method in cytology. HRADEC KRALOVE CZECHOSLOVAKIA.
- COLLYN-d'HOOGHE M., HEMON D., GILET R., VALLERON A.J.V., CURTIS S. et MALAISE E.P., (1979) - Etude comparative des effets des rayons γ du ⁶⁰Co et des ions lourds accélérés (hélium et néon) sur le cycle cellulaire et sur la probabilité de division des cellules EMT 6 en culture (étude microcinématographique). Meeting of the French, Dutch and Belgian radiobiologists. Abstracts. Bruxelles.

COLLYN-d'HOOGHE M., HEMON D., VALLERON A.J. et MALAISE E.P., (1980) - Comparative effects of ionizing radiations on cycle time and mitotic duration. A time lapse cinematography study. Rad. Res., 81, 384-392.

COLLYN-d'HOOGHE M., HEMON D., GILLET R., CURTIS S.B., VALLERON A.J. et MALAISE E.P., (1980) - Comparative effects ⁶⁰Co γ rays neon and helium ions on cycle duration and division probability of EMT 6 cells. A time-lapse cinematography study. Int. J. of Rad. Biol., (sous presse).

- COOK J.R. et COOK B., (1962) Effect of nutrients on the variation of individual generation times. Exp. Cell Res., 28, 524-530.
- CORMACK D.V. et FROESE G., (1971) A correlation between division delay and loss of colony-forming ability in cultured chinese hamster cells. Phys. Aspects of Rad. Quality., IAEA S.M., 145/26, 251-259.
- CRISSMANN H.A. et TOBEY R.A., (1974) Cell cycle analysis in 20 minutes. Science., 184, 1297-1298.
- CURTIS S.B., (1976) The OER of mixed high and low LET radiation. Radiat. Res., 65, 566-572.
- CURTIS S.B., TENFORDE T.S., PARKS D., SCHILLING W.A. et LYMAN J.T., (1978) - Response of a Rat Rhabdomyosarcoma to neon and helium ion irradiation. <u>Rad. Res.</u>, <u>74</u>, 274-288.
- DARZYNKIEWICZ Z., EVENSON D.P., STAIANO-COICO L; SHARPLESS T.K., MELAMED M.R.S.J.,(1979) - Correlation between cell cycle duration and RNA content. <u>Cell. Physiol.</u>, 100, 425-438.
- DAS N.K. et ALFERT M., (1961) Accelerated DNA synthesis in onion root meristem during X-irradiation. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 47, 1-6.
- DAWSON K.B., MADOC JONES H. et FIELD O.,(1965), Variation in the generation times of a strain of rat sarcoma in culture. Exp. Cell Res., 38, 75-84.
- DENEKAMP J., (1974) Changes in the rate of proliferation in normal tissues after irradiation. Int. Cong. of Rad. Res., SEATTLE.
- DESCHNER E.E. et GRAY L.H., (1959) Influence of oxygen tension on X-ray induced chromosomal damage in ehrlich ascites tumor cells irradiated in vitro and in vivo. Rad. Res., 11, 115-146.
- DEVI V.R., GUTTES E. et GUTTES S., (1968) Effects of ultraviolet light on mitosis in physarum polycephalum. Exp. Cell Res., 50, 589-598.

- DEWEY W.C., (1975) Chromatid and half chromatid aberrations in chinese hamster cells X-irradiated in metaphase, prophase, or G₂. <u>The cell cycle in malignancy and</u> <u>immunity</u>. 182-192.
- DEWEY W.C. et HUMPHREY R.M., (1962) Relative radiosensitivity of different phases in the life cycle of LP 59 mouse fibroblasts and ascites tumor cells. <u>Rad. Res.</u>, 16, 503-530.
- DEWEY W.C., HUMPHREY R.M. et CORK A., (1963) Comparison of cell multiplication and colony formation as criteria for radiation damage in cells grown in vitro. <u>Int. J.</u> Rad. Biol., 6, 463-471.
- DEWEY W.C., HUMPHREY R.M. et JONES B.A., (1964) Relationship between radiation induced mitotic delay and doublingtime of cells. Int. J. Rad. Biol., 8, 605-607.
- DEWEY W.C., HUMPHREY R.N. et SEDITA B.A., (1966) Cell cycle kinetics and radiation induced chromosomal aberrations studied with C¹⁴ and H³ labels. <u>Biophys. J.</u>, 6, 247-260.
- DEWEY W.C., MILLER H.H. et LEEPER D.B., (1971) -Chromosomal aberrations and mortality of X-irradiated mammalian cells : emphasis on repair. Proc. Nat. Acad. Sci., US, 68, 667-671.
- DEWEY W.C., MILLER H.H. et NAGASAWA H., (1973) Interactions between S and G₁ cells. Exp. Cell Res., 77, 73-78.
- DEWEY W.C. et HIGHFIELD D.P., (1976) G₂ block in chinese hamster cells induced by X irradiation, hyperthermia, cycloheximide or actinomycin D. Radiat. Res., 65, 511-528.
- DEYS B.F. et STAP J., (1979) Misonidazole cytotoxicity in well-oxygenated cells, a time-lapse cinematographic study. Xth. Meeting of the european study group for cell proliferation. Bruges. 9-13 Oct.
- DEYSSON G., (1968) Antimitotic substances. Int. Rev. Cytol., 24, 99-148.
- DOIDA Y. et OKADA S., (1969) Radiation induced mitotic delay in cultured mammalian cells L5178Y. <u>Radiat. Res.</u>, 38, 513-529.
- DONACHIE W.D., JONES N.C. et TEATHER R.M., (1973) -

Symp. Soc. Géne. Microbiol., 23, 9-44.

DONACHIE W.D., BEGG K.J. et VICENTE M., (1976) - Cell length, cell growth and cell division. Nature, 264, 328-332. DUSTIN P., (1963) - New aspects of the pharmacology of antimitotic agents. <u>Pharmacol. Rev.</u>, <u>15</u>, 449-480.

EHMANN U.K., NAGASAWA H., PETERSEN D.F. et LETT J.T., (1974) -Symptoms of X-ray damage to radiosensitive mouse leukemic cells : asynchronous populations. <u>Radiat. Res.</u>, <u>60</u>, 453-472.

- EHMANN U.K., WILLIAMS J.R., NAGLE W.A., BROWN J.A., BELLI J.A., LETT J.T., (1975) - Perturbations in cell cycle progression from radioactive DNA precursors. Nature, 258, 633-636.
- EHMANN U.K. et WHEELER K.T., (1979) Cinemicrographic determination of cell progression and division abnormalities after treatment with 1-3 bis (2-chloroethyl)-1nitrosourea. Europ. J. Cancer., 15, 461-474.
- EIGSTI O.J. et DUSTIN P., (1955) Colchicine in agriculture, medicine, biology and chemistry. Iowa State College Press., Ames Iowa.
- ELKIND M.M., (1971) Summary of general discussion on radiobiological aspects of fast neutrons in radiotherapy. Europ. J. Cancer, 7, 249-257.
- ELKIND M.M. et SUTTON H., (1959) X-ray damage and recovery in mammalian cells in culture. Nature, 184, 1293-1295.
- ELKIND M.M. et SUTTON H., (1960) Radiation response of mammalian cells grown in culture. Rad. Res., 13, 556-593.
- ELKIND M.M., HAN A. et VOLZ K.W., (1963) Radiation response of mammalian cells grown in culture. IV - Dose dependence of division delay and post-irradiation growth of surviving and non surviving hamster cells. J. Natl. Cancer Inst., 30, 705-721.
- EL-MAHDI A.M., SCHAEFFER J., ACETO H. et CONSTABLE W.C., (1974) - A comparison of radiation control of pulmonary metastases in C₃H mice by helium ions or cobalt photons. Cancer, 34, 130-135.
- EULER H.et HEVESY G., (1942) Wirkung der Röntgenstrahlen auf den umsatz der nukleinsäure im Jensen-Sarkom Kgl. Danke Vidensk Selsk. Biol. Med., 17, 3-38.
- EVANS H.J., NEARY G.J. et TONKINSON S.M., (1959) -The effect of oxygen on the induction by gamma radiation of mitotic delay in root tips of vicia faba. <u>Exp. Cell</u> Res., 17, 144-159.

FADDEEV A.N.(1963) - Disturbances of cell division with X-ray injury of crystalline lens. Fed. Proc., 22, 320-325.

- FAILLA P., (1969) Division delay in irradiated gametes of sea urchins. Radiology. 93, 643-648.
- FANTES P.A., (1977) Control of cell size and cycle time in schizosaccharomyces pombe. J. Cell Sci., 24, 51-67.
- FANTES P.A., GRANT W.D., PRITCHARD R.H., SUDBERY P.E. et WHEALS A.E., (1975) - The regulation of cell size and the control of mitosis. J. Theor. Biol., 50, 213-244.
- FELIX-HEIDI et STRAULI P., (1978) Intermediate sized filaments in leukemia cells. Virchows Arch., B. Cell Path., <u>28</u>, 59-75.
- FELL H.B. et HUGHES A.F., (1949) Quart. J. Microscop. Sci., 90, 355.
- FEOLA J.M., LAWRENCE J.H. et WELCH G.P., (1969) Oxygen enhancement ratio and RBE of helium ions on mouse lymphoma cells. Rad. Res., 40, 400-413.
- FIRKET H., (1958) Recherches sur la synthèse des acides desoxyribonucléiques et la préparation à la mitose. (Etude cytophotométrique et autoradiographique). <u>Arch.</u> Biol. (Liège), 68, 1.
- FIRKET H., (1969) Irradiation of synchronized cell cultures. Effect on mitotic delay and nucleic acid synthesis. Biophys.J. 6, 34-38.
- FIRKET H. et VERLY W.G., (1958) Autoradiographic visualization of synthesis of desoxyribonucleic acid in tissue culture with tritium labelled thymidine. Nature, 181, 274.
- FIRKET H. et MAHIEU P., (1966) Irradiation et protection de cultures synchrones de cellules HeLa. I - Effet sur le premier cycle cellulaire. <u>Int. J. Rad. Biol.</u>, 11, 245-253.
- FISHER R.A., (1938) Statistical methods for research workers. LONDON 1938.
- FOLKMAN J. et MOSCONA A.M., (1978) Role of cell shape in growth control. Nature, 273, 345-349.

- FONBRUNE P. et RECULARD P., (1963) Etude cinématographique des effets cytopathogènes du virus de rubarth en "microcultures" cellulaires spéciales. <u>Annales de l'Institut</u> Pasteur, 104, 335-346.
- FOURNIER R.E. et PARDEE A.B., (1975) Cell cycle studies of mononucleate and cytochalasin-B induced binucleate fibroblasts. Proc. Nat. Acad. Sci., 72, 869-873.
- FOWLER J.F., DENEKAMP J., DELAPEYRE C., HARRIS S.R. et SHELDON P.W., (1974) - Skin reactions after multifraction X-irradiation. Int. J. Rad. Biol., 25, 213-223.
- FOX T.O. et PARDEE A.B., (1970) Animal cells : non correlation of length of G₁ phase with size after mitosis. <u>Science</u>. 167, 80-82.
- FRIEDENWALD J.S. et SIGELMAN S., (1953) The influence of ionizing radiation on mitotic activity in the rat's corneal epithelium. Exp. Cell Res., 4, 1-31.
- FRIEDMAN N.B., SARGENT J.A. et DRUTZ E., (1955) Certain effects of irradiation and chemotherapy on cellular division and differentiation. Cancer Res., 15, 479-184.
- FRINDEL E., (1975) Perturbations of cellular kinetics by physical and chemical agents. The cell cycle in malignancy and immunity. 156-181.
- FRINDEL E., TUBIANA M. et VASSORT F., (1967) The generation cycle of mouse bone marrow. Nature. 214, 1017-1018.
- FRINDEL E., VASSORT F. et TUBIANA M., (1970) Effects of irradiation on the cell cycle of an experimental ascites tumor of the mouse. Int. J. Rad. Biol., 17, 329-337.
- FRINDEL E. et TUBIANA M., (1971) Radiobiology and the cell cycle. The Cell Cycle and Cancer. Baserga.R. The Biochemistry of disease, 6, 389-448.
- FROESE G., (1964) The distribution and interdepend nce of generation times of HeLa cells. <u>Exp. Cell. Res.</u>, <u>35</u>, 415-419.
- FROESE G., (1966) Division delay in HeLa cells and chinese hamster cells. A time lapse study. Int. J. Radiat. Biol., 10, 353-367.

- FROESE G. et CORMACK D.V., (1968) A correlation between division delay and loss of colony forming ability in chinese hamster cells irradiated in vitro. Int. J. Radiat. Biol., 14, 589-592.
- FRY J.M., LESHER S. et KOHN H.I., (1961) A method for determining mitotic time. Exp. Cell Res., 25, 469-471.
- FU K.K., PHILLIPS T.L., HEILBRON D.C., ROSS G. et KANE L.J., (1979) - Relative biological effectiveness of low and high LET radiotherapy beams for jejunal crypt cell survival at low doses per fraction. Radiology. <u>132</u>, 205-209.
- GALAVAZI G. et BOOTSMA D., (1966) Synchronization of mammalian cells in vitro by inhibition of DNA synthesis. II - Population dynamics. Exp. Cell Res., 41, 438-451.
- GEARD C.R. et MARINO S., (1977) Radiation induced delays in cell progression in vicia faba root meristems. <u>Rad. Res.</u>, <u>69</u> (3), 530-540.
- GELFANT S., (1963) Inhibition of cell division : a critical and experimental analysis. Int. Rev. Cytol., 14, 1-39.
- GHIORSO A., GRUNDER H., HARTSOUGH W., LAMBERTSON G., LOFGREN E., LOU K., MAIN R., MOBLEY R., MORGADO R., SALSIG W., SELPH F., (1973) - The bevalac : an economical facility for very high energetic heavy particle research (abstract), IEEE, Trans. Nucl. Sci., NS 20, 155.
- GIESE A.C., (1947) Radiations and cell division. Quart. Rev. of Biol., 22, 253-282.
- GOLDFEDER A., (1951) Further studies on radiosensitivity of analogous mouse mammary tumors dbrB and C₃H. <u>Radiology</u>. <u>57</u>, 845-861.
- GRAY L.H., MOTTRAM J.C. et READ J., (1940) Some experiments upon the biological effects of fast neutrons. British J. of Radio., 13, 371-388.
- GROPP A., (1963) Phagocytosis and pinocytosis. In cinemicrography in cell biology. Rose GG ed., 279-312.
- GRUBER H.E. et NACHTWEY D.S., (1976) X-ray induced division delay in chlamydomonas reinhardi. <u>Radiation Res.</u>, 66, 303-309.

- GUICHARD D.M., LACHET B. et MALAISE E.P., (1977) Measurement of RBE, OER and recovery of potentially lethal damage of a 645 MeV helium ion beam using EMT 6 cells. Rad. Res., 71, 413-429.
- GUIGUET M., COLLYN-d'HOOGHE M. et VALLERON A.J., (1980) -S, G₂ and M phases durations are relatively as variable as G₁ duration. The cell kinetics Society. 4th annual Meeting and exhibits. Mars. Lexington Kentucky.
- GURLEY L.R., WALTERS R.A. et TOBEY R.A., (1974) Cell cycle specific changes in histone phosphorylation associated with cell proliferation and chromosome condensation. J. Cell Biol., 60, 356-364.
- GURLEY L.R., WALTERS R.A., HILDEBRAND C.E., RATLIFF R.L., HOHMANN P.G., TOBEY R.A., (1977) - Sequential biochemical events related to cell proliferation. In Mechanisms and control of cell division. Ed. by T.L. Rost and EM Gifford. Dowden Hutchinson and Rossy, inc. 1977, 3-43.
- HABERMEHL K.O. et DIEFENTHAL W., (1962) Kinematographische Untersuchungen an fibroblasten nach infektion mit ektromelievirus (Mäusepocken). Arch. Für die gesamte Virus forschung. Vol. XI, 5, 629-643.
- HAHN G.M., (1970) A formalism describing the kinetics of some mammalian cell populations. <u>Mathemat. Biosc.</u>, 6, 295-299.
- HAHN G.M. et LITTLE J.B., (1972) Plateau phase cultures of mammalian cells. <u>Current topics in Rad. Res. Quaterly.</u> 8, 39-83.
- HALL E.J. et BEDFORD J.S., (1964) Dose rate : its effect on the survival of HeLa cells irradiated with gamma rays. Radiat. Res., 22, 305-315.
- HALL E.J., GROSS W., DVORAK R.F., KELLERER A.M. et ROSSI M.M., (1972) - Survival curves and age response functions for chinese hamster cells exposed to X rays or high LET alphaparticles. Radiat. Res., 52, 88-98.
- HALL E.J., GEARD C.R., POVLAS S. et ASTOR M., (1977) The oxygen enhancement ratio for high energy neutrons. Brit. J. Radiol., 50, 679-680.
- HARRINGTON H.(1960) Effect of irradiation on cell division and nucleic acid synthesis in strain U 12 fibroblasts. Biochim et Biophys. Acta, 41, 461-469.

HARTMANN M., (1928) -Zool. Jahrbuch, 45, 973.

- HARTMANN N.F. et PEDERSEN T., (1970) Analysis of the kinetics of granulosa cell populations in the mouse ovary. Cell Tissue Kinet., 3, 1-11.
- HARTWELL L.H., CULOTTI J., PRINGLE J.R. et REID B.J., (1974)
 Genetic control of the cell division cycle in yeast.
 Science, 183, 46-51.
- HEMON D., COLLYN-d'HOOGHE M., VALLERON A.J. et MALAISE E.P., (1978) - Statistical methods for the estimation and analysis of correlations between characteristics of cells observed using time lapse microcinematography. <u>Biomath.</u> <u>and Cell Kinetics</u>. Elsevier/North Holland, <u>Biomedical</u> <u>Press</u>. (VALLERON A.J. and Mc DONALD, eds).
- HEWITT H.B., (1953) Studies on the quantitative transplantation of mouse sarcoma. Brit. J. Cancer, 7, 367-383.
- HEWITT H.B. et WILSON C.W., (1959) A survival curve for mammalian leukaemia cells irradiated in vivo (implications for the treatment of mouse leukaemia by whole body irradiation). Brit. J. Cancer, 13, 69-75.
- HIGHFIELD D.P. et DEWEY W.C., (1974) X-ray induced G₂ block in chinese hamster cells in vitro. <u>Int. Cong. of</u> Rad. Res., SEATTLE.
- HIGHFIELD D.P. et DEWEY W.C., (1975) Use of the mitotic selection procedure for cell cycle analysis : emphasis on radiation induced delay. in <u>Methods in Cell Biol.</u>, D.M. Prescott ed., 9, 85-101.
- HODGE F.A. et NACHTWEY D.S., (1972) X-ray induced delay of cell division in synchronized tetrahymena pyriformis. Radiat. Res., 52, 603-617.
- HOSKINS G.C. et MONTGOMERY P.O.B., (1962) Nucleolar phagocytosis by HeLa and chang liver cells in tissue culture as studied by time lapse phase contrast cinematography. Exp. Cell Res., 26, 534-540.
- HOWARD A. et PELC S.R., (1951) Nuclear incorporation of P³² as demonstrated by autoradiographs. <u>Exp. Cell Res.</u>, 2, 178-187.
- HOWARD A. et PELC S.R., (1953) Synthesis of desoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. Heredity Suppl., 6, 261-273.
- HSU T.C., (1955) Mammalian chromosomes in vitro. VI Observations on mitosis with phase cinematography. J. of the Nat. Cancer Inst., 16, 691-703.

HSU T.C., (1959)

in Developmental Cytology, D. Rudnick ed., p. 47, Ronald Press - New York.

- HSU T.C., (1960) Generation time of HeLa cells determined from cine records. Texas Rep. Biol. Med., 18, 31-33.
- HURWITZ C. et TOLMACH L.J., (1969) Time lapse cinematographic studies of X-irradiated HeLa S₃ cells. I - Cell progression and cell desintegration. <u>Biophys. J.</u>, <u>9</u>, 607-633.
- HURWITZ C. et TOLMACH L.J., (1969) Time lapse cinemicrographic studies of X-irradiated HeLa S₃ cells. II - Cell fusion. Biophys. J., 9, 1131-1143.
- INGLIS R.J., LANGAN T.A., MATTHEWS H.R., HARDIE D.G. et BRADBURY E.M., (1976) - Advance of mitosis by histone phosphokinase. Exp. Cell Res., 97, 418-425.

JACOBY F., (1958) -

In Dynamics of Proliferating tissues. D. Price ed., p. 16-17. Univ. Chicago Press - Chicago Illinois.

- JAGERS P. et NORRBY K., (1974) Estimation of the mean and variance of cycle times in cinemicrographically recorded cell populations during balanced exponential growth. Cell Tissue Kinet., 7, 201-211.
- JOCKUSCH B.M., BROWN D.F. et RUSCH H.P., (1970) Synthesis of a nuclear protein in G₂ phase. <u>Biochem. Biophys.</u> <u>Res. Comm.</u>, <u>38</u>, 279-283.
- JOHNSON R.T. et RAO P.N., (1970) Mammalian cell fusion. II - Induction of premature condensation in interphase nuclei. Nature. 226, 717-722.
- JOHNSON R.T. et RAO P.N., (1971) Nucleo-cytoplasmic interactionsin the achievement of nuclear synchrony in DNA synthesis and mitosis in multinucleate cells. Biological Reviews, 46, 97-155.
- JUNGLING O. et LANGEDORFF H., (1930) Uber die Wirkung vershieden hoher Roñtgendosen auf den kernterlungs allauf bei Vicia Faba equina. Strahlen therapie, <u>38</u>, 1-7.
- KALLMAN R.F., (1972) The phenomenon of reoxygenation and its implications for fractionated radiotherapy. <u>Radiology</u>. 105, 135-142.

- KASTEN F.H., (1975) Time-lapse cinematography of synchronized CMP human tumor cells in culture. In the Cell cycle in malignancy and immunity. Published by Technical information center Energy Research and Development administration.
- KATSUMATA T., WATANABE M., TAKABE Y., TERASIMA T. et UMEZAWA H., (1973) - Cinemicrographic analysis of death in synchronously growing mouse L cells after exposure to bleomycin. <u>Gann</u>, 64, 71-79.
- KELLY L.S., (1957) Effect of radiation on DNA synthesis in mammalian cells. Progr. in Biophys. and Biophysical Chemistry. Ed. Butler and Katz, 8, p. 144-163
- KELLY C.D. et RAHN O., (1932) The growth rate of individual bacterial cells. J. Bacteriol., 23, 147-153.
- KIHLMAN B.A., (1966) Actions of chemicals on dividing cells. Prentice-Hall Inc., Englewood, Cliffs-NJ.
- KILLANDER D. et ZETTERBERG A., (1965) A quantitative cytochemical investigation of the relationship between cell mass and initiation of DNA synthesis in mouse fibroblasts in vitro. <u>Exp. Cell Res.</u>, 40, 12-20.
- KILLANDER D., (1965) Intercellular variations in generation time and amounts of DNA, RNA and mass in a mouse leukemia population in vitro. Exp. Cell Res., 40, 21-31.
- KILLANDER D. et ZETTERBERG A., (1965) Quantitative cytochemical studies on interphase growth. I - Determination of DNA, RNA and mass content of age determined mouse fibroblasts in vitro and of intercellular variation in generation time. Exp. Cell. Res., 38, 272-284.
- KIM J.H. et EVANS T.C., (1964) Effects of X-irradiation on the mitotic cycle of Ehrlich ascites tumor cells. <u>Rad. Res.</u>, 21, 129-143.
- KIMBALL R.F., CASPERSSON T.O., SVENSSON G. et CARLSON L.,(1959) - Quantitative cytochemical studies on Paramecium aurelia. I - Growth in total dry weight measured by the scanning interference microscope and X-ray absorption methods. Exp. Cell Res., 17, 160-172.
- KNOWLTON N.P. et WIDNER W.R., (1950) The use of X-rays to determine the mitotic and intermitotic time of various mouse tissues. Cancer Res., 10, 59-63.
- KOCH A.L. et SCHAECHTER M.J., (1962) A model for statistics of the cell division process. J. Gen. Microbiol., 29 435-454.

- KOLLER P.C., (1947) Effect of radiation on normal and malignant cell in man. <u>Brit. J. of Radiol.</u>, <u>Suppl 1</u>, 84-98.
- KOVACS C.J. et VAN'THOF J., (1971) Mitotic delay and the regulating events of plant cell proliferation DNA replication by a G₁-S population. <u>Rad. Res.</u>, <u>48</u>, 95-106.
- KOZUKA S. et HOSHINO M., (1958) Mitotic patterns of mitotic and intermitotic durations of HeLa cells in vitro. <u>Gann</u>, 49 Suppl., 226-227.
- KOZUKA S. et HOSHINO M., (1962) Cell size with special reference to multiplication of HeLa strain in vitro. II - Measurement of mitotic and intermitotic duration with special reference to size of nucleus. <u>Nagoya J. Med.</u> Sci., 24, 190-196.
- KOZUKA S. et MOORE G.F., (1966) Microcinematographic and autoradiographic study on the pattern of ³H thymidin uptake in the life cycle of the individual cell of the HeLa strain in vitro. J. Natl. Cancer Inst, 36, 623-630.
- KRASNOW R.A., (1978) Mass, length and growth rate in single cells. J. Theor. Biol., 72, 659-699.
- KRISHAN A., (1975) Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. <u>The J. of Cell Biol.</u>, 66, n° 1, 188-192.
- KUBITSCHEK H.E., (1962) Normal distribution of cell generation rate. Exp. Cell Res., 26, 439-450.
- KUBITSCHEK H.F., (1966) (a) Normal distribution of generation rates. Nature, 209, 1039-1040.
- KUBITSCHEK H.F., (1966) (b) Bacterial generation times : ancestral dependance and dependance upon cell size. Exp. Cell Res., 43, 30-38.

- KUYPER CH. M.A., LIEBECQ-HUTTER S. et CHEVREMONT-COMHAIRE S., (1962) - Effet des radiations ionisantes sur l'activité mitotique et les ADN de fibroblastes cultivés in vitro. Exp. Cell Res., 28, 459-479.
- LAFONTAINE N. et FIRKET H., (1972) Variations en fonction du cycle cellulaire, du délai mitotique induit par irradiation de cultures BHK 21. <u>Inter. J. Rad. Biol.</u>, 22, n° 6, 607-611.
- LAJTHA L.G., OLIVER R., KUMATORI T. et ELLIS F., (1958) On the mechanism of radiation effect on DNA synthesis. Rad. Res., 8, 1-16.
- LAKE R.S., (1973) Further characterization of the F1 histone phosphokinase of metaphase arrested animal cells. J. Cell Biol., 58, 317-331.
- LEA D.E., (1955) Actions of radiations on living cells. Cambridge University Press, p? 416, London/New York.
- LEEPER D.B., (1975) Radiation-induced division delay in CHO cells repair kinetics. The cell cycle in Malignancy and Immunity, 193-210.
- LEEPER D.B., SCHNEIDERMAN M.H. et DEWEY W.C., (1972) (a)
 Radiation induced division delay in synchronized chinese
 hamster ovary cells in monolayer culture. <u>Rad. Res.</u>,
 50, 401-417.
- LEEPER D.B., SCHNEIDERMAN M.H. et DEWEY W.C., (1972) (b) - Effect of culturing conditions on radiation induced cycle delay in synchronized chinese hamster ovary CHO cells X-irradiated in G₁. Int. J. Radiat. Biol., 21, 191-196.
- LEEPER D.B. et HAGEMAMM R.F., (1973) Repair kinetics of radiation induced mitotic delay. Biophys. J., 13, 179-185.
- LEEPER D.B., SCHNEIDERMAN M.H. et DEWEY C.W., (1973) Radiation induced cycle delay in synchronized chinese hamster cells. Comparison between DNA synthesis and division. Radiat. Res., 53, 326-338.
- LEITH J.T., SCHILLING W.A. et WELCH G.P., (1971) Survival of mouse skin epithelial cells after heavy particle irradiation. Int. J. Rad. Biol., 19, 603-609.
- LEITH J.T., SCHILLING W.A., LYMAN J.T., HOWARD J., TOBIAS C.A., BAKER D.G., (1974) - Comparison of skin responses of mice after 230 kVX-irradiation with responses after irradiation with cyclotron-Accelerated helium and Oxygen Ions. Int. Cong. of Rad. Res., SEATTLE.

- LEITH J.T., ARCELLANA V., LYMAN J.T. et WHEELER K.T., (1975)(b) - Response of a rat brain tumour to irradiation with accelerated neon ions. Int. J. Rad. Biol., 28, 91-98.
- LEITH J.T., SCHILLING W.A., LYMAN J.T., HOWARD J. et BAKER D.G., (1975) Comparison of skin. responses of mice after single or fractionated exposure to cyclotron-accelerated helium ions and 230 kV X-irradiation. Rad. Res., 62, 195-215.
- LEITH J.T., WOODRUFF K.H. et LYMAN J.T., (1976) Early effects of single doses of 375 MeV/nucleon ²⁰neon ions on the skin of mice and hamsters. <u>Rad. Res.</u>, 65, 440-450.
- LEWIS W.H. et LEWIS M.R., (1917) -

Anatomatical Record., 13, 359.

- LEWIS M.R. et LEWIS W.H., (1932) Malignant cells of walker rat sarcoma n° 338. Amer. J. Cancer, 16, 1153-1183.
- LINDMO T. et PETTERSEN E.O., (1979) Delay of cell cycle progression after X-irradiation of synchronized populations of human cells (NHIK 3025) in culture. <u>Cell. Tissue</u> <u>Kinet.</u>, <u>12</u>, 43-57.
- LLOYD C., (1979) Primitive model for cell cycle control. Nature, 280, 631-632.
- LÜCKE-HUHLE C. et SCHLAG H., (1979) Differences in cell cycle perturbation after irradiation depending on radiation ionisation density. Xth Meeting of the European Study Group for cell Proliferation. Bruges 9-13 oct.
- LUCKE-HUHLE C., BLAKELY E.A., CHANG P.Y. et TOBIAS C.A., (1979) (b) - Drastic G₂ arrest in mammalian cells after irradiation with heavy ions beams. <u>Rad. Res.</u>, <u>79</u>, 97-112.
- MAC DONALD B.B., (1958) Quantitative aspects of desoxyribose nucleic acid (DNA) metabolism in an amicronucleate strain of tetrahymena. <u>Biol. Bull.</u>, <u>114</u>, 71-78.
- MAC DONALD P.D.M., (1970) Statistical inference from the fraction labelled mitosis curve. <u>Biometrika</u>, <u>57</u>, 489.
- MAC DONALD H.R. et MILLER R.G., (1970) Synchronization of mouse L cells by velocity sedimentation technique. Biophys. J., 10, 834-842.
- MAC QUILKIN W.T., EARLE W.R., (1962) Cinemicrographic analysis of cell populations in vitro. J. Nat. Cancer Inst., 28, 763-799.

- MAK S. et TILL J.E., (1963) The effects of X-rays on the progress of L cells through the cell cycle. <u>Radiat. Res.</u>, 20, 600-618.
- MARIN G. et BENDER M.A., (1966) Radiation induced mammalian cell death : lapse time cinemicrographic observations. Exp. Cell Res., 43, 413-423.
- MARKS D., PAIK W.K. et BORUN T.W., (1973) The relationship of histone phosphorylation to desoxyribonucleic acid replication and mitosis during the HeLa S₃ cell cycle. J. of Biol. Chem., 248, 5660-5667.
- MARZ R., ZYLKA J.M., PLAGEMANN P.G.W., ERBE J., HOWARD R. et SHEPPARD J.R., (1977) - G₂ + M arrest of cultured mammalian cells after incorporation of tritium labelled nucleosides. J. of Cell Physiol., 90, 1-8.
- MATTER A., (1979) Microcinematographic and electron microscopic analysis of target cell lysis induced by cytotoxic T lymphocytes. Immunology. 36, n° 2, 179-190.
- MAYZEL W., (1875) Zbl. Med. Wiss., 13, 849-852.
- MEISTRICH M.L., MEYN R.E. et BARLOGIE B., (1977) Synchronization of mouse LP 59 cells by centrifugal elutriation separation. <u>Exp. Cell Res.</u>, 105, 169-177.
- MELSON H., OFTEBRO R. et SELJELID R., (1973) The cytotoxic effect of macrophages studied by time lapse microcinematography. Exp. Cell Res., 80, 388-393.
- MILLER D.R., DEWEY W.C. et MILLER H.H., (1973) X-rayinduced delay in the chinese hamster cell-cycle : dependence on phase irradiated under different culturing conditions, BUdR incorporation, and hypertonic treatment. Inter. J. of Radiat. Biol., 23, n° 6, 591-602.
- MINOR P.D. et SMITH J.A., (1974) Explanation of degree of correlation of sibling generation times in animal cells. Nature, 248, 241-243.
- MITCHELL J.B., BEDFORD J.S. et BAILEY S.M., (1979) Dose rate effects on the cell cycle and survival of S₃ HeLa and V 79 cells. Rad. Res., 79, n° 3, 520-536.
- MITCHELL J.B., BEDFORD J.S. et BAILEY S.M., (1979) -Dose rate effects in mammalian cells in Culture. III - Comparison of cell killing and cell proliferation during continuous irradiation for six different cell lines. Rad. Res., 79, 537-551.

- MITCHELL J.B., BEDFORD J.S. et BAILEY S.M., (1979) Dose rate effects in plateau phase cultures of S₃ HeLa and V 79 cells. Rad. Res., 79, 552-567.
- MITCHISON J.M., (1971) The biology of the cell cycle. Cambridge University Press, London.
- MITCHISON J.M., (1977) Cell cycle control models. In "Growth kinetics and Biochemical regulation of normal and malignant cells. Ed. by Drewink QB et Humphrey R.M., Williams and Wilkins Company 23-33.
- MITCHISON J.M. et CREANOR J., (1971) Induction synchrony in the fusion yeast schizosaccharomyces pombe. Exp. Cell Res., 67, 368-374.
- MIYAMOTO H., ZEUTHEN E. et RASMUSSEN L., (1973) Clonal growth of mousecells (strain L). J. Cell Sci., <u>13</u>, 879-888.
- MIZUTANI M., NAKANISHI Y.H. et POMERAT C.M., (1961) -Morphological and cytological study of human amnion cells in course of recovery from radiation injury. Texas Report Biol. et Med., 19, 811-824.
- MOORHEAD P.S. et HSU T.C., (1956) Cytologic studies of HeLa, a strain of human cervical carcinoma. III - Durations and characteristics of the mitotic phases. J. Nat. Cancer Inst., 16, 1047-1066.
- MORGAN W.D., WILLIAMS J.E., LEE C.W. et DAWE C.J., (1980) -Microcinematographic demonstration of synchronous and asynchronous myoepithelial contractions in mouse submandibular gland rudiments in organotypic culture. In Vitro. 15, 1013-1022.
- MOSER H., (1967) The mode of timing of DNA replication and of mitosis in cultured animal cells. Experimentia. 23, 913-916.
- MOTA M., HILDEBRANDT A.C. et RIKER A.J., (1964) Movements of cytoplasm between and during nuclear divisions in living tobacco cells of tissue cultures. <u>Agronomia Lusitana</u>. 26, 205-214.
- MUNRO T.R., (1959) Alpha irradiation of parts of single cells in tissue culture. III - Irradiation of chick fibroblasts during metaphase and anaphase. Exp. Cell Res., 18, 76-99.
- MUNRO T.R., (1970) The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of chinese hamster fibroblast Rad. Res., 42, 451-470.

- NEARY G.J., EVANS H.J., TONKINSON S.M. et WILLIAMSON F.S., (1959) - Relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma rays on Vicia Faba roots and effect of oxygen. Part. III. Mitotic Delay. <u>Int. J. Rad.</u> Biol., 1, 230-240.
- NORRBY K., JOHANNISSON G. et MELLGREN J., (1967) Proliferation in an established cell line. An analysis of birth death and growth rates. <u>Experimental Cell Res.</u>, <u>48</u>, 582-594.
- NORRBY K., (1970) Population kinetics of normal transforming and neoplastic cell lines. <u>Acta Path. Microbiol. Scand.</u>, 78, Supp. 214, 1-49.
- NORRBY K., (1977) A note on time lapse cinemicrography in studies of cell population kinetics. <u>Cell Tissue Kinet</u>., 10, 89-92.
- NURSE P., (1975) Genetic control of cell size at division in yeast. Nature Lond., 256, 547-551.
- ODARTCHENKO N., COTTIER H., FEINENDEGEN L.E. et BOND V.P., (1964) - Mitotic delay in more mature erythroblasts of the dog, induced in vivo by sublethal doses of X rays. Rad. Res., 21, 413-422.
- OHNUKI Y. et SATO H., (1976) Time-lapse cinematographic analysis of assembly and disassembly of mitotic spindles. The Irst Int. Congress on Cell Biology, Boston, 1976.
- OLIVO O.M. et de LORENZI E., (1928) -Rend. Reale Acad. Naz. lincei., 7, 936.
- PAINTER R.B. et DREW R.M., (1959) Studies on desoxyribonucleic acid metabolism in human cancer cell cultures (HeLa). I - The temporal relationships of desoxyribonucleic acid synthesis to mitosis and turnover time. Laboratory Investigation. 8, 278-285.
- PARANJPE M.S. et BOONE C.W., (1975) Intermittent sphering of Virus-transformed and other neoplastic cells observed by time lapse cinematography. <u>Exp. Cell Res.</u>, 94, n° 1, 147-151.
- PARDEE A.B., DUBROW R., HAMLIN J.L. et KLETZIEN R.F., (1978) - Animal cell cycle. Annual. R. Biochem., 47, 715-750.
- PARDEE A.B., SHILO B.Z. et KOCH A.L., (1979) Variability in the cell cycle. Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation, 6, 373-392.
- PAUL I.J. et ZIMMERMAN A.M., (1973) Macromolecular synthesis and cell division in X-irradiated tetrahymena.<u>Rad. Res.</u>, 55, 411-421.

PHILLIPS R.A. et TOLMACH L.J., (1966) - Repair of potentially lethal damage in X-irradiated HeLa cells. <u>Rad. Res.</u>, <u>29</u>, 413-432.

- POMERAT C.M., (1958) Cinematographic analysis of cell dynamics Fed. Proc., 17, 975-984.
- PONTEN J., WESTERMARK B. et HUGOSSON R., (1969) Regulation of proliferation and movement of human glia-like cells in culture, Exp. Cell Res., 58, 393-400.
- POWELL E.O., (1955) Some features of the generation times of individual bacteria. Biometrika, 42, 16-44.
- POWELL E.O., (1956) Growth rate and generation time of bacteria with special reference to continuous culture. J. Gen. Microbiol., 15, 492-511.
- POWELL E.O., (1958) An out line of the pattern of bacterial generation times. J. Gen. Microbiol., 18, 382-417.
- POWELL E.O. et ERRINGTON F.P., (1963) Generation times of individual bacteria : some corroborative measurements. J. Gen. Microbiol., 31, 315-327.
- PRESCOTT D.M., (1956) Relation between cell growth and cell division. II - The effect of cell size on cell growth rate and generation time in "amoeba proteus". <u>Exp. Cell Res.</u>, 11, 86-98.
- PRESCOTT D.M., (1956) Relation between cell growth and cell division. III - Changes in nuclear volume and growth rate and prevention of cell division un A.P. resulting from cytoplasmic amputations. <u>Expt. Cell Res.</u>, <u>11</u>, 94-98.
- PRESCOTT D.M., (1959) Variation in the individual generation times of TGHS. (Tetrahymena Geleü HS). Exp. Cell Res., 16, 279-284.
- PRESCOTT D.M. et BENDER M.A., (1962) Synthesis of RNA and protein during mitosis in mammalian tissue culture cells. <u>Exp. Cell Res.</u>, <u>26</u>, n°2, 260-268.

PUCK T.T. et MARCUS P.I., (1955) A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture. The use of X-irradiated cells to supply conditioning factors. <u>Proc. Nat. Acad. Scien.</u>, 41,, 432-437. PUCK T.T. et MARCUS P.I., (1956) - Action of X-rays on mammalian cells. J. Exp. Med., 103, 653-666.

- PUCK T.T. et YAMADA M.A., (1962) Chromosomal dynamics in irradiated mammalian cells. <u>Rad. Res.</u>, <u>16</u>, 589.
- PUCK T.T. et STEFFEN J., (1963) Life cycle analysis of mammalian cells. A Method for localizing metabolic events within the life cycle and its application to the action of colcemide and sublethal doses of X-irradiation. Biophys. J., 3, 379-397.
- PUJARA C.M., (1970) Radiation induced division and mitotic delay studies in green alga. Radiat. Res., 44, 413-420.
- QUASTLER H. et SHERMAN F.G., (1959) Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. Exp. Cell Res., 17, 420-438.
- QUESNEL L.B., (1963) A genealogical study of clonal development of Escherichia Coli. J. Appl. Bact., 26, 127-151.
- RADLEY J.M. et HODGSON G.S., (1973) G₂ terminal points of action of isoprenaline, X-irradiation, cycloheximidine and actinomycin D in the rat parotid gland. <u>Exp. Cell Res.</u>, 80, 237-244.
- RAJU M.R., GNANAPURANI M., MARTINS B., HOWARD J. et LYMAN J.T., (1972) - Measurement of OER and RBE of a 910 MeV helium ion beam, using cultured cells (T₁). <u>Radiology</u>, <u>102</u>, 425-428.
- RAJU M.R., TOBEY R.A., JETT J.H. et WALTERS R.A., (1975) -Age response for line CHO chinese hamster cells exposed to X-irradiation and alpha particles from plutonium. <u>Rad. Res</u>., <u>63</u>, n° 3, 422-433.
- RAJU M.R., BLAKELY E.A., HOWARD J., LYMAN J.T., KALOFONOS D.P., MARTINS B. et YANG T.C.H., (1976) - Human cell survival as a function of depth for a high energy neonion beam. <u>Rad. Res.</u>, 65, 191-194.
- RAJU M.R., AMOLS H.I., BAIN E., CARPENTER S.G., COX R.A. et ROBERTSON J.B., (1978) - A heavy particle comparative study part III. OER and RBE. Brit. J. of Rad., 51, 712-719.
- RAJU M.R. et CARPENTER S.G., (1978) A heavy particle comparative study. Brit. J. of Rad., 51, 720-727.
- RAO P.N., (1977) Cell kinetics by cell fusion."In growth kinetics and Biochemical regulation of normal and malignant cells." DREWINKO B. and HUMPHREY R.M. eds., The William Wilkins Company.

- RAO P.N. et JOHNSON R.T., (1972) Cell fusion and its application to studies on the regulation of the cell cycle. In Methods in cell physiology, DM Prescott ed., Vol. 5, Academic Press, New York, p. 75-125.
- RAO P.N., HITTLELMAN W.N. et WILSON B.A., (1975) -Mammalian cell fusion. VI - Regulation of mitosis in binucleate HeLa cells. Exp. Cell Res., 90, 40-46.
- RICHART R.M.D. et LERCH V.M.S., (1966) Time lapse cinematographic observations of normal human cervical epithelium dysplasia and carcinoma in situ. <u>J. Nat. Cancer Inst.</u>, 37, 317-324.
- RIGNEY D.R., (1979) Multiple transition cell cycle models may exhibit "Transition Probability" kinetics. Submitted to cell and Tissue Kinetics, Décembre.
- ROBINSON J.H., SMITH J.A., TOTTY N.F. et RIDDLE P.N., (1976) - Transition probability and the hormonal and density dependent regulation of cell proliferation. <u>Nature</u>, 262, 298-300.
- ROCKWELL S.C. et KALLMAN R.F., (1972) Characteristics of a serially transplanted mouse mammary tumor and its tissue culture adapted derivative. J. Nat. Cancer Inst., 49, 735-749.
- ROSE G.G., (1965) Time-lapse cinemicrography of cells in tissue culture. Bulletin of the Johns Hapkins Hospital. 116, 33-68.
- ROSENBERG H.M., ROBINSON J.K., HORNG M.F.L., GREGG E.C. et NYGAARD O.F., (1976) - Sensitivity To X-rays in terms of mitotic delay (S_d) and killing (S_k) : correlation between S_d and S_k for sub-lines of murine leukaemic cells. Int. Rad. Biol., 29, 197-200.
- RUSCH H.P., SACHSENMAIER W., BEHRENS K. et GRUTER V., (1966) -Synchronization of mitosis by the fusion of the plasmodia of physarum polycephalum. J. Cell. Biol., 31, 204-209.
- RUSCONI M., (1826) Sur le développement de la grenouille commune depuis le moment de sa naissance jusqu'à son état parfait. Milan 1826.
- RUSTAD R.C., (1961) The centriole hypothesis of radiationinduced mitotic delay. Path. Biol., 9, 493-494.
- RUSTAD R.C., (1970) Variations in the sensitivity to X-ray induced mitotic delay during the cell division cycle of the sea urchin egg. <u>Rad. Res.</u>, <u>42</u>, 498-512.

- SACHSENMAIER W., DONGES K., RUPFF H. et CZIHAK G., (1970) - Advanced initiation of synchronous mitoses in Physarum polycephalum following ultra-violet irradiation. Z. Naturf., 25 b, 866-871.
- SACHSENMAIER W., REMY U. et PLATTNER-SCHOBEL R., (1972) - Initiation of synchronous mitosis in Physarum polycephalum. Exp. Cell Res., 73, 41-48.
- SACHSENMAIER W., (1975) Control of synchronous nuclear mitosis in Physarum polycephalum. In Report of Dahlem Workshop on the Molecular Basis of Circadian Rhythms. J.W. Hastings and H.G. Schweiger, Eds., Berlin 1975, p. 409-420.
- SASAKI S., (1969) The distribution of the number of postirradiation cell division. <u>Tohoku J. Exp. Med.</u>, <u>97</u>, 347-361.
- SASAKI S., (1972) Growth fraction and cell cycle time of gamma rays irradiated mammalian cells. <u>The Tohoku</u> J. Exp. Med., 108, 225-237.
- SASAKI H., (1973) Time lapse photographic studies of pedigrees of X-irradiated HeLa cells. J. Rad. Res., 14, 248-257.
- SASAKI H., YOSHINAGA H. et KAWANO K., (1977) Correlation of generation times in two successive generations of X-irradiated FM 3 A cells. Rad. Res., 72, 364-369.
- SCHAECHTER M., WILLIAMSON J.P., HOOD J.R. et KOCH A.L., (1962) - Growth, cell and nuclear divisions in some bacteria. J. Gen. Microbiol., 29, 421-434.
- SCHLAG H., WEIBEZAHN K.F. et LUCKE-HUHLE C., (1978) -Negative pion irradiation of mammalian cells. II - Comparative analysis of cell cycle progression after exposure to Π-mesons and cobalt γ rays. Int. J. of Rad. Biol., 33, 1-10.
- SCHMID P., (1967) Temperature adaptation of the growth and division process of tetrahymena pyriformis. Exp. Cell Res., 45, 471-486.
- SCHNEIDER D.O. et WHITMORE G.F., (1963) Comparative effects of neutron and X-rays on mammalian cells. Rad. Res., 18, 286-306.

SCHNEIDER D.O. et JOHNS R.M., (1966) - Enhancement of radiation induced mitotic inhibition by BUdR incorporation in L-cells. Rad. Res., 28, 657-667.

- SCHNEIDERMAN M.H., DEWEY W.C., LEEPER D. et NAGASAWA H., (1972) - Use of the mitotic selection procedure for cell cycle analysis comparison between the X-ray and cycloheximide G₂ markers. Exp. Cell Res., 74, 430-438.
- SCHNEIDERMAN M.H., BRABY L.A. et ROESCH W.C., (1977) Division delay after low X-ray doses and treatment with cycloheximide. Rad. Res., 70 (1), 130-140.
- SCHWARTZ D., (1963) Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. <u>Flammarion Médecine Sciences</u>, 20, rue de Vaugirard PARIS.
- SEYDEL H.G., (1967) Mitotic delay after fractionated irradiation of autotransplants of a spontaneous mouse tumor. Am. J. Roentg., 100, 938-943.
- SHIELDS R., (1977) Transition probability and the origin of variation in the cell cycle. Nature, 267, 704-706.
- SHIELDS R., (1978) Further evidence for a random transition in the cell cycle. Nature, 273, 755-758.
- SHIELDS R. et SMITH J.A., (1977) Cells regulate then proliferation through alterations in transition probability. J. Cell Physiol., 91, 345-356.
- SHIELDS R., BROOKS R.F., RIDDLE P.N., CAPELLARO D.F. et DELIA D., (1978) - Cell size, cell cycle and transition probability in mouse fibroblasts. Cell, 15, 469-474.
- SHILO B., SHILO V. et SIMCHEN G., (1976) Cell cycle initiation in yeast follows first order kinetics. Nature, 264, 767-770.
- SHOWACRE J.L., (1968) Staging of the cell cycle with time lapse photography. Methods in cell Physiol., 3, 148-159.
- SIMON REUSS I. et SPEAR F.G., (1947) The effect of gamma radiation on mitosis in vitro. Brit. J. Radiol., 20, 63-70.
- SINCLAIR W.K., (1966) Radiation effects on mammalian cell populations in vitro. Proceedings of the third Int. Congress of rad Res. Cortina, 1966, p. 607-631 North Holland Publishing Co Amsterdam, 1967.

SINCLAIR W.K., (1968) - Cyclic X-ray responses in mammalian cells in vitro. Rad. Res., 33, 620-643.

- SINCLAIR W.K., (1969) Dependence of radiosensitivity upon age. In Time and dose Relationship in Radiation Biology as applied to Radiotherapy. Nat. Cancer Int. Mono., 1969.
- SINCLAIR W.K., (1972) Cell cycle dependence of the lethal radiation response in mammalian cells. <u>Current topics</u> <u>in Radiation Research Quaterly</u>. 7, 264-285.
- SINCLAIR W.K., (1972) Sensitivity to mitotic delay and stage in the cycle. Current Topics in Radiation Research Quaterly 7, 323-327.
- SISKEN J.E. et KINOSITA R., (1961) Timing of DNA synthesis in the mitotic cycle in vitro. J. Biophys. Biochem. Cytol., 9, 509-518.
- SISKEN J.E. et KINOSITA R., (1962) Variations in the mitotic cycle in vitro. Exp. Cell Res., 22, 521-525.
- SISKEN J.E., MORASCA L. et KIBBY S., (1965) Effects of temperature on the kinetics of mitotic cycle of mammalian cells in culture. Exp. Cell Res., 39, 103-116.
- SISKEN J.E. et WILKES E., (1967) The time of synthesis and the conservation of mitosis related proteins in cultured human amnion cells. J. Cell. Biol., 34, 97-110.
- SKARSGARD L.D., (1964) Survival and mitotic delay in chinese hamster cells after heavy ion and X-irradiation. Rad. Res., 22, 235-236.
- SKARSGARD L.D., (1967)

The radiobiology of cultured mammalian cells. Ed. Elkind MM Whitmore GF, New York Cordon Beach,p. 421.

- SKOG S., ELIASSON E. et ELIASSON E., (1979) Correlation between cell size and position within the division cycle in suspension cultures of chang liver cells. Cell Tissue Kinet., 12, 501-511.
- SLUDER G., (1979) Role of spindle microtubules in the control of cell cycle timing. J. Cell. Biol., 80, 674-692.
- SLUDER G. et BEGG D.A., (1975) Influence of spindle geometry on the timing of morphological events in the mitotic cycle. J. Cell. Biol., 67, 406.

- SMITH C.L. et DENDY P.P., (1962) Relation between mitotic index, duration of mitosis, generation time and fraction of dividing cells in a population. <u>Nature</u>, London, 193, 555-556.
- SMITH B.J. et WIGGLESWORTH N.M., (1972) Cell line which is temperature sensitive for cytokinesis. J. Cell. Physiol., 80, 253-259.
- SMITH J.A., (1977) Application of the theory of transition probability in "ageing" W I38 cells : similar behaviour of clonogenic cells from early and late passage cultures. Cell Biol. Internat. Reports, 1, 283-289.
- SMITH J.A. et MARTIN L., (1973) Do cells cycle ? Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 70, n° 4, 1263-1267.
- SMITH J.A. et MARTIN L., (1974) Regulation of cell proliferation in. Cell Cycle Controls.GM. Padilla, IL. Cameron, A. Zimmerman (Eds), Academic Press New York et Londres, 46-60.
- STRANGEWAYS T.S.P. et OAKLEY H.E.H., (1923) The immediate changes observed in tissue cells after exposure to soft X-rays while growing in vitro. Proc. Roy. Soc., B. 95, 373-381.
- STRANGEWAYS T.S.P. et HOPWOOD F.L., (1926) The effect of Xrays on mitotic cell division in tissue culture in vitro. Proc. Roy. Soc. Lond., B.100, 283-293.
- STUBBLEFIELD E. et MUELLER G.C., (1962) Molecular events in the reproduction of animal cells. II - The focalized synthesis of DNA in the chromosomes of HeLa cells. <u>Cancer</u> Res., 22, 1091-1099.
- SUDBERY P.E. et GRANT W.D., (1975) The control of mitosis in Physarum polycephalum. The effect of lowering the DNA : mass ratio by UV irradiation. <u>Exp. Cell Res.</u>, <u>95</u>, 405-415.
- SVETINA S., (1977) An extended transition probability model of the variability of cell generation times. <u>Cell Tissue</u> Kinet., 10, 575-581.
- TAKAHASHI M., (1966) Theoretical basis for cell cycle analysis. I- Labelled mitosis wave method. J. Theor. Biol., 13, 202-211.
- TANNOCK I.F., (1967) A comparison of the relative efficiencies of various metaphase arrest agents. <u>Exp. Cell. Res.</u>, 47, 345-356.

- TERASIMA T. et TOLMACH L.J., (1963) Variations in several responses of HeLa cells to X-irradiation during the division cycle. Biophys. J., 3, 11-33.
- THOMLINSON R.H. et GRAY L.H., (1955) The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. <u>Brit. J. Cancer</u>, 9, 539-549.
- THOMPSON L.H. et SUIT H.D., (1967) Proliferation kinetics of X-irradiated mouse L cells studied with time lapse photography. I - Experimental methods and data analysis. Int. J. Rad. Biol., 13, 391-397.
- THOMPSON L.H. et SUIT H.D., (1969) Proliferation kinetics of X-irradiated mouse L cells studied with time lapse photography II. Int. J. Rad. Biol., 15, 347-362.
- THOMPSON L.H. et HUMPHREY R.M., (1970) Proliferation kinetics of mouse LP 59 cells irradiated with ultra-violet light : a time lapse photographic study. Rad. Res., 41, 183-201.
- TILL J.E., (1961) Radiation effects on division cycle of mammalian cells in vitro. <u>Ann. New York Acad. Sci.</u>, 95, 911-919.
- TOBEY R.A., ANDERSON E.C. et PETERSEN D.F., (1966) RNA stability and protein synthesis in relation to the division of mammalian cells. <u>Proc. Nat. Acad. Sci.</u>, USA, 56, 1520-1527.
- TOBEY R.A., ANDERSON E.C. et PETERSEN D.F., (1967) The effect of thymidine on the duration of G₁ in chinese hamster cells. J. Cell Biol., 35, 53-59.
- TOBIAS C.A., (1973) Pretherapeutic investigations with accelerated heavy ions. Radiology. 108, 145-158.
- TOBIAS C.A., BLAKELY E.A., NGO F.Q.H. et CHATTERJEE A., (1978) - repair-misrepair (RMR) Model for the effects of single and fractionated doses of heavy accelerated ions. Rad. Res., 74, 589-590.
- TODD P., (1967) Heavy-ion irradiation of cultured human cells. Rad. Res., Suppl 7, 196-207.
- TODD P., (1974) Radiobiology with heavy charged particles directed at radiotherapy. Europ. J. Cancer., 10, 207-210.
- TODD P.W., (1975) Heavy-ion irradiation of human and chinese hamster cells in vitro. Rad. Res., 61, 288-297.

- TODD P., MARTINS B.I., LYMAN J.T., KIM J.H. et SCHROY C.B., (1974) - Spatial distribution of human cell survival and oxygen effect in a therapeutic helium ion beam. Cancer, 34, 1-5,
- TODD P., SHONK C.R., WEST G., KUGERMAN M.M. et DICELLO J., (1975) - Spatial distribution of effects of negative pions on cultured human cells. Radiol., 116, 179-180.
- TOLMACH L.J., TERASIMA T. et PHILLIPS R.A., (1965) X-ray sensitivity changes during the division cycle of HeLa S₃ cells and anomalous survival kinetics of developing microcolonies. In Cellular Radiation Biology. Williams et Wilkins, 376-396.
- TOLMACH L.J., GRIFFITHS T.D. et JONES R.W., (1976) -Susceptibility of X-ray arrested HeLa S₃ cells to additional arrest. Rad. Res., 66, 649-654.
- TOMASOVIC S.P. et DEWEY W.C., (1978) Comparative studies of the effects of drugs on X-ray induced G₂ delay. Rad. Res., 74, 112-128.
- TOMASOVIC S.P. et DEWEY W.C., (1978) Acceleration of CHO cells into mitosis and reduction of X-ray induced G delay by cordycepin. Exp. Cell Res., 114, 277-284.
- TROTT K.R., (1969) Mortality rate and recovery in pedigrees of irradiated mammalian cells in vitro. <u>Studia Biophys.</u>, 18 -127.
- TROTT K.R. et HUG O., (1970) Interclonal recovery of division probability in pedigrees of single X-irradiated mammalian cells. Int. J. Rad. Biol., 17, 483-486.
- TROTT K.R., (1974) Das proliferation muster unbestrahlter und röntgen bestrahlter saügetierzellen in vitro (zeitraffermikrokinematographische studien). Gesellschaft für strahlen und **umwelt** forschung mbH München, 1-179.
- TROTT K.R., (1974) Time lapse studies on generation time distributions and division probability in pedigrees of single mammalian cells after alpha-irradiation. Int. Cong. of Rad. Res., SEATTLE.
- TUBIANA M., (1968) La cinétique des populations de cellules. Ann. Biol. Clin. Fr., 26, 793-823.
- TUBIANA M., (1971) La cinétique de prolifération cellulaire. Publication de l'INSERM.
- TUCKER R.W, PARDEE A.Bet FUJIWARA K., (1979) Centriole ciliation is related to quiescence and DNA synthesis in 3T3 cells. Cell, 17, 527-535.

- VALLERON A.J., (1974) A method of computer simulation used to study some sublethal effects of irradiation on cell kinetics. <u>Math. Models in Biol. and Med.</u>, III, 131, North Holland Publishing Comp..
- VALLERON A.J., FRINDEL E. et TUBIANA M., (1968) Méthode de mesure in vivo de la distribution des durées des phases du cycle cellulaire. <u>C.R. Acad. Sci.</u> (Paris), 267, 2189-2192.
- VALLERON A.J., MARY J.Y. et FRINDEL E., (1973) (a) -Méthode d'analyse sur ordinateur des courbes de mitoses marquées. Biomedicine. 18, 118-123.
- VALLERON A.J. et FRINDEL E., (1973) (b) Computer stimulation of growing cell populations. <u>Cell Tissue Kinet.</u>, <u>6</u>, 69-79.
- VAN'THOF J., (1970) Mitotic delay in two biochemically different G₁ cell populations in cultured roots of pea (Pisum sativum). Radiat.Res., 44, 700-712.
- VAN WIJK R., VAN DE POLL K.W., AMESZ W.J.C. et GEILENKIRCHEN W.L.M., (1977) - Studies on the variations in generations times of rat hepatoma cells in culture. <u>Exp. Cell Res.</u>, 109, 371-379.
- VAN WIJK R. et VAN de POLL K.W., (1979) Variability of cell generation times in a hepatoma cell pedigree. <u>Cell Tissue</u> Kinet., 12, 659-663.
- VOLLNER H. et RAJEWSKY B., (1937) Mikrokinematographische studien über die wirkung von rontgenstrahlen auf normale und tumorzellen in gewebekulturen. <u>Strahlentherapie</u>. 60, 524-540.
- VOUTILAINEN A. et MAHONEN H., (1962) Uber die mitotische Aktivität maligner tumoren während der strahlentherapie Strahlentherapie,117 470-473.
- WALTERS R.A. et PETERSEN D.F., (1968) (a) Radiosensitivity of mammalian cells. I - Timing and dose dependence of radiation induced division delay. <u>Biophys. J.</u>, <u>8</u>, 1475-1486.
- WALTERS R.A. et PETERSEN D.F., (1968) (b) Radiosensitivity of mammalian cells. II - Radiation effects of macromolecular synthesis. Biophys. J., 8, 1487-1504.
- WALTERS R.A., GURLEY L.R. et TOBEY R.A., (1974) Effects of caffeine on radiation induced phenomena associated with cell cycle traverse of mammalian cells. <u>Biophys. J.</u>, 14, 99-118.

- WARD W.F., ACETO H. et SANDUSKY M., (1976) Repair of sublethal and potentially lethal radiation damage by Rat embryos exposed to gamma rays or helium ions. Radiology, 120, 695-700.
- WARTERS R.L. et HOFER K.G., (1977) Radionuclide toxicity in cultured mammalian cells. Elucidation of the primary site for radiation induced division delay. <u>Rad. Res.</u>, 69, 348-358.
- WAYMOUTH C., (1959) Rapid proliferation of sublines of NCTC clone 929 (strainL) Mouse cells in a simple chemically defined medium (MB 752/1). J. Nat. Cancer Inst., 22, 1003-1015.
- WHITFIELD J.F. et RIXON R.H., (1959) Effects of X-irradiation on multiplication and nucleic acid synthesis in cultures of L-strain mouse cells. Exp. Cell Res., 18, 126-137.
- WHITMORE G.F. et TILL J.E., (1964) Quantitation of cellular radiobiological responses. <u>Ann. Rev. Nucl. Sci.</u>, <u>14</u>, 347-374.
- WHITMORE G.F., TILL J.E. et GULYAS S., (1967) Radiation induced mitotic delay in L-cells. Rad. Res., 30, 155-171.
- WIBE E., OFTEBRO R., CHRISTENSEN T., LALAND S.G., PETTERSEN E.O. et LINDMO T., (1978) - Inhibitory effects of the new mitotic inhibitor 5-chloropyrimidin-2-one and of vincristine on human cells in vitro. Cancer Res., 38, 560-565.
- WIERNIK G., SHORTER R.G. et CREAMER B., (1962) Arrest of intestinal epithelial "turnover" by use of X-irradiation. <u>GUT.</u>, 3, 26-31.
- WILLIAMS R., TOAL J.N., WHITE J. et CARPENTER H.M., (1958) - Effect of total body X-irradiation from near-threshold to tissue lethal doses on small bowel epithelium of rat. I - Changes in morphology and rate of cell division in relation to time and dose. J. Nat. Cancer Inst., 21, 17-61.
- WITHERS H.R., (1967) The dose survival relationship for irradiation of epithelial cells of mouse skin. Brit. J. Rad., 40, 187-194.
- WITHERS H.R., (1973) Biological basis for high LET radiotherapy. Radiology, 108, 131-137.
- WOLF R., WICK R. et SAUER H., (1979) Mitosis in Physarum polycephalum. Analysis of time lapse films and DNA replication of normal and heat shocked macroplasmodia. Eur. J. of Cell Biol., 19, 49-59.

- WORTHINGTON D.H., SALAMONE M, et NACHTWEY D.S., (1976) -Nucleocytoplasmic ratio requirements for the initiation of DNA replication and fission in tetrahymena. Cell and Tissue Kinet.,9, 119-130.
- YAMADA M.A. et PUCK T., (1961) Action of radiation ^{on} mammalian cells. IV - Reversible mitotic lag in the S₃ HeLa cell produced by low doses of X rays. <u>Proc. Nat.</u> Acad. Sci., 47, 1181-1191.
- YCAS M., SUGITA M. et BENSAM A., (1965) A model of cell size regulation. J. Theor. Biol., 9, 444-470.
- YEN A., FRIED J., KITAHARA T., STRIFE A. et CLARKSON B.D., (1975) - The kinetic significance of cell size. I -Variation of cell cycle parameters with size measured at mitosis. Exp. Cell.Res.,95, 295-302.
- YU C.K. et SINCLAIR W.K., (1967) Mitotic delay and chromosomal aberrations induced by X-rays in synchronized chinese hamster cells in vitro. <u>J. Nat. Cancer Inst.</u>, 39, 619-629.
- ZEUTHEN E. et RASMUSSEN L., (1971) Synchronized cell division in protozoa. In Research in Protozoology. TT Chen. Ed. Vol. 4, Pergamon Press Oxford, p. 11-145.

