

CONDITIONS DE CLONAGE
ET DE CULTURE EN SUSPENSION
DE LA SOUCHE BHK 21/13 DE HAMSTER SYRIEN
SENSIBILITÉ DES CELLULES
AUX INHIBITEURS DU MÉTABOLISME
DES ACIDES NUCLÉIQUES

M. CABOCHE

avec la collaboration technique de Ginette GIFFARD

Laboratoire de Génétique cellulaire,
Centre de Recherches de Toulouse, I. N. R. A.,
B. P. 12, 31320 Castanet Tolosan

RÉSUMÉ

Les caractéristiques de la souche BHK 21/13 permettent de l'utiliser facilement comme outil génétique.

Les conditions de culture et de clonage de la souche sont analysées.

En milieu MEM contenant 8 p. 100 de sérum fœtal bovin dialysé l'efficacité d'étalement est médiocre (1 p. 100). En présence de sérine et d'asparagine une croissance clonale correcte est obtenue (25 p. 100 d'efficacité d'étalement). La souche BHK 21/31 S 13 adaptée à la culture en suspension prolifère en présence de ces métabolites à des concentrations cellulaires très basses (10^4 cellules/ml) avec un temps de doublement de 14 heures. La composition du milieu évolue au cours de la croissance, des quantités importantes d'alanine, de glycine et de proline sont rejetées dans le milieu à faible densité de population. Les cultures confluentes épuisent le milieu en amides. Les conditions optimales de clonage correspondent à un pH de 7,2 et une température de 37°C.

Le seuil de résistance de la souche à diverses drogues affectant le métabolisme des acides nucléiques est déterminé (bromodéoxyuridine, azaguanine, aminoptérine).

Le caryotype de la souche ($\bar{n} = 43$) observé après hydrolyse trypsique ménagée est comparé au caryotype de hamster syrien ($\bar{n} = 44$). Toutes les paires de chromosomes sont distinguées par cette méthode.

INTRODUCTION

La mise au point de technique de culture *in vitro* puis des conditions de clonage de certaines souches de cellules somatiques de mammifères (PUCK *et al.*, 1956) permettent d'étudier des mécanismes héréditaires jusque-là inaccessibles par l'étude

directe de ces animaux. Par exemple, les mutations affectant le métabolisme intermédiaire, le plus souvent létales ou cachées chez l'animal, peuvent être étudiées *in vitro*.

Des lignées résistantes à la 8-azaguanine et à la 5-bromodéoxyuridine et affectées dans le métabolisme des bases puriques ou pyrimidiques ont été isolées à partir de la souche BHK 21/13 (Mac PHERSON et STOCKER, 1962). Cette souche est donc un outil génétique intéressant. Cependant pour être utilisable en génétique, une lignée cellulaire doit posséder un certain nombre de propriétés :

— Elle doit être facilement clonable afin d'obtenir des lignées provenant d'une cellule isolée.

— Elle doit posséder une hérédité stable, évoluant peu au cours des divisions successives.

— Il est souhaitable enfin que ses conditions de culture rendent son emploi aisé (prolifération rapide dans un milieu de composition simple). La souche BHK 21/13, isolée à partir du rein de hamster syrien, possède des caractéristiques correspondant assez bien aux deux derniers points de cette description :

Elle se cultive à la fois en tapis et en suspension. Son caryotype est stable et proche de celui de l'animal. Enfin son temps de doublement très court (12 heures) rend son emploi très aisé en génétique, réduisant les temps de clonage de façon appréciable.

Cependant un problème subsiste au niveau des conditions de clonage. Les cellules sont usuellement cultivées en milieu de base Eagle modifié et complété selon Mac PHERSON et STOCKER (1962). Dans ce milieu l'efficacité d'étalement de la souche ne dépasse pas 1 p. 100. En outre l'emploi de tryptose et de sérum non dialysé comme complément au milieu synthétique rend difficile l'étude de l'action de certaines drogues sur le métabolisme. Ces drogues entrent en compétition avec des quantités parfois importantes de métabolites dont elles sont les analogues ou les inhibiteurs de synthèse. Dans ces conditions leur effet nocif peut être complètement masqué.

La mise au point de conditions de culture permettant un clonage facile de la souche a été effectuée et ceci dans un milieu dont tous les constituants de bas poids moléculaires sont connus. Ce milieu permet de cultiver les cellules soit en tapis soit en suspension à partir d'une faible densité de population initiale.

A l'aide de ce milieu de culture, le rôle de certains acides aminés dans la croissance à faible densité cellulaire a été mis en évidence. Le seuil de résistance à diverses drogues a été étudié.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. — Souches cellulaires

La souche BHK 21/13 (STOKER et MAC PHERSON, 1964) provient de l'ATCC (CCL₁₀). La souche BHK 21/13 adaptée à la culture en suspension à forte concentration cellulaire (CAPSTICK *et al.*, 1962) et appelée S 13 provient du Laboratoire de Virologie de Grignon (1).

La présence de PPLO dans les cultures n'a pu être décelée par la méthode de TODARO *et al.* (1971). Les souches sont conservées congelées à — 70°C dans le MEM contenant en outre 15 p. 100 de glycérol et 20 p. 100 de sérum foetal bovin.

(1) Adresse : Laboratoire de Virologie et d'Immunologie, 78 Thiverval-Grignon.

2. — Produits chimiques

Les acides aminés, les sucres, le pyruvate de sodium et le *Tris* employés dans cette étude sont des produits Merck *proanalysis*. L'hypoxanthine, la thymidine et la 5-bromodéoxyuridine sont des produits Calbiochem A grade. La thioguanine (2 amino-6 mercaptopurine) et l'iododéoxyuridine sont des produits Mann. Le 2-déoxyglucose, le 2-déoxygalactose, la 5-fluorodéoxyuridine et l'arabinofuranosyl cytosine sont fournis par Sigma. L'aminoptérine provient de Schuchardt. La colchicine est fournie par le laboratoire Houde. Enfin les milieux de culture, le sérum foetal bovin et le sérum de veau sont préparés par le laboratoire Eurobio.

3. — Milieux de culture

Les deux souches ont été initialement cultivées en tapis, en MEM tamponné Hanks (EAGLE, 1959) et complété avec des acides aminés non essentiels (10^{-4} M chacun), 4 p. 100 de sérum foetal bovin et 6 p. 100 de sérum de veau normal. Dans ce milieu les acides aminés non essentiels ont été remplacés par la sérine, l'asparagine et le pyruvate de sodium ($5 \cdot 10^{-4}$ M chacun). Le pH est maintenu entre 7 et 7,4 grâce à un tampon Hanks -*Tris* HCl 10^{-2} M. Dans ces dernières conditions de culture et à une température de 36,5°C, le temps de doublement de la souche est de 12 heures en phase exponentielle. Lorsque le milieu ne doit pas contenir les constituants dialysables du sérum, ce dernier est dialysé 24 heures contre l'eau courante puis contre 10 fois son volume de solution saline de Hanks pendant 6 heures à 4°C avec un renouvellement afin de redissoudre le précipité protéique formé par baisse de la force ionique. Dans ce milieu la croissance cellulaire est plus lente ($T = 15$ h) mais les conditions de test sont néanmoins aussi reproductibles.

La culture en suspension des deux souches peut être effectuée dans le milieu MEM (EAGLE, 1959), avec les modifications suivantes : addition de sérine, asparagine, pyruvate de sodium ($5 \cdot 10^{-4}$ M chacun) suppression du calcium, concentration dix fois plus élevée des phosphates et *Tris* HCl 10^{-2} M, pH 7,2 empêchant les remontées de pH au cours de l'agitation. Le milieu contient 6 p. 100 de sérum foetal bovin dialysé ou non (le sérum de veau rend les milieux turbides). Les cultures sont effectuées en bouteilles cylindriques de 250 ml contenant 100 ml de milieu et agitées orbitalement à 100 tr/mn. Les comptages sont effectués au Coulter Counter (précision des comptages ± 2 p. 100). Une croissance exponentielle de 3 jours sans arrêt de croissance après dilution peut être obtenue à partir de concentrations cellulaires initiales de 1 à $2 \cdot 10^4$ cellules/ml. L'entretien de la souche S 13 est effectuée par dilution au 1/50 deux fois par semaine dans le milieu à base de sérum non dialysé. Tous les milieux de culture sont stockés congelés à -20°C après addition de pénicilline (100 UI/ml) et de streptomycine (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et filtration sur filtre millipore GSPW 142 50.

4. — Étude du seuil d'action des drogues

À l'aide d'une pipette 500 cellules sont déposées en milieu standard pour culture en tapis dans chaque bouteille de culture (flacons de 60 cm³ en verre ayant 25 cm² de surface d'étalement). Les cellules sont incubées 6 heures, lavées deux fois avec la solution saline de Hanks, puis le milieu contenant la drogue est introduit. 8 jours après l'étalement des cellules, les colonies formées sont comptées après fixation au TCA 5 p. 100 et coloration au bleu de Unna. Les résultats sont exprimés soit en taux de survie : rapport du nombre de colonies obtenues avec drogue au nombre de colonies obtenues en milieu sans drogue ; soit en efficacité d'étalement : rapport du nombre de colonies obtenues après croissance au nombre de cellules initialement introduites. Seules les colonies visibles à l'œil nu sont comptées. Les colonies visibles au microscope et non visibles à l'œil nu sont des clones non viables ne proliférant plus dont il n'est pas tenu compte dans les comptages. Chaque concentration en drogue est testée sur 2 bouteilles identiques et chaque manipulation effectuée deux fois. (Précision des comptages ± 5 p. 100). La dose létale 10 p. 100 est déterminée avec une incertitude relative maximale 30 p. 100 sur la concentration en drogue.

5. — Dosages des acides aminés des milieux de culture

Les milieux sont déprotéinisés après addition de TCA 10 p. 100 et centrifugation du précipité (4 000 g pendant 50 mn). Le surnageant est extrait à l'éther jusqu'au retour à pH 6 afin d'éliminer le TCA et recentrifugé après extraction.

Des aliquotes de 500 μl sont analysés avec une chaîne autoanalyseur Beckman de dosage des acides aminés. Les concentrations en acides aminés dans les échantillons sont calculées par mesure de surface des pics des enregistrements. Deux chromatographies sont effectuées à partir de chaque échantillon. Elles permettent de doser la plupart des acides aminés non basiques et de séparer sérine et amides.

6. — *Caryotype*

Le caryotype de la souche BHK 21/13 indique que cette souche possède un total de 43 à 44 chromosomes assez difficiles à distinguer et à apparier par les techniques de coloration homogène. Une méthode inspirée de WANG et FEDOROFF, (1972) utilisant une hydrolyse ménagée à la trypsine avant coloration au Giemsa a été mise au point.

Après un blocage de 4 heures par la colcémide 2 $\mu\text{g/ml}$ les cellules sont soumises à un choc hypotonique de 40 mn dans le milieu suivant : sérum de veau 20 ml, eau distillée 80 ml, 250 unités de hyaluronidase (Choay) puis fixées 10 mn dans un mélange acide acétique alcool (1 V : 3 V) à 4°C.

Les lames sont hydrolysées par la trypsine (0,2 g/l) pendant 5 mn à 20°C dans le tampon suivant : chlorure de sodium 9 g, phosphate monopotassique 7,4 g phosphate disodique 20,6 g pH 6,7 q.s.p. 1 000 ml. L'hydrolyse est arrêtée par passage dans l'eau distillée puis les cellules sont colorées 7 mn au Giemsa à 4 p. 100 dans le tampon d'hydrolyse.

RÉSULTATS

1. — *Recherche d'un milieu permettant le clonage de la souche*

Les milieux MEM et 199 (MORGAN *et al.*, 1950) ne permettent pas un clonage correct de la souche BHK 21/13 (efficacité d'étalement inférieure à 1 p. 100). Seul le milieu MEM complété avec les acides aminés non essentiels (10^{-2} M chacun) permet cette croissance clonale en présence de sérum fœtal bovin.

TABLEAU I

*Efficacité d'étalement
de la souche S 13 en MEM complété avec les acides aminés non essentiels
et une quantité variable de sérum*

1 SF : 1 p. 100 de sérum fœtal bovin

1 SV : 1 p. 100 de sérum de veau

4 SFD + 6 SVD : complément sérique dialysé

Sérum dans le milieu (%)	Néant	5 SV	10 SV	4 SF	10 SF	30 SF	4 SF + 6 SV	4 SFD + 6 SVD
Efficacité d'étalement (%)	0	7	16	10	35	41	31	25

L'addition de diverses substances dans le milieu de culture n'a pas permis d'augmenter cette efficacité d'étalement (biotine, cyanocobalamine, insuline, glutathion, acide ascorbique, acide lipoiq, taurine, acide para-amino-benzoïque, ménadione, acétate, hypoxanthine, thymidine, uridine, AMP cyclique, fer, cuivre, zinc). De même l'addition de milieux de cultures plus complexes (NCTC 109, tryptose) n'a pas modifié cette efficacité d'étalement : seule l'addition d'une plus grande quantité de sérum fœtal a eu un effet positif (tabl. 1).

2. — *Rôle des acides aminés non essentiels dans les conditions de clonage*

En absence d'acides aminés non essentiels l'efficacité d'étalement de la souche est inférieure à 1 p. 100. Ces acides aminés ont été testés en milieu MEM contenant 8 p. 100 de sérum dialysé afin de déterminer leur effet sur les conditions de clonage (tabl. 2). La sérine et l'asparagine ont un effet prépondérant (fig. 1). Ces acides aminés

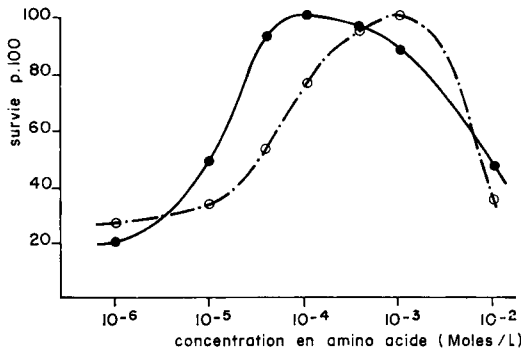


FIG. 1. — *Effet des concentrations en sérine et en asparagine sur l'efficacité d'étalement des BHK 21/13*

Les cellules sont lavées 2 fois dans la solution saline de Hanks, 6 heures après repiquage puis les milieux suivants sont introduits.

- MEM + 4 SFD + 6 SVD + Tris 10⁻² M + Asparagine 5 · 10⁻⁴ M + concentration variable en sérine.
- MEM + 4 SFD + 6 SVD + Tris 10⁻² M + sérine 5 · 10⁻⁴ M + concentration variable en asparagine.

Les résultats sont exprimés en taux de survie. Témoin 100 p. 100 de survie : MEM + 4 SFD + Tris 10⁻² M + sérine 5 · 10⁻⁴ M + asparagine 5 · 10⁻⁴ M.

TABLEAU 2

Rôle des acides aminés non essentiels et du pyruvate dans la croissance clonale

Efficacité d'étalement de la souche BHK 21/31 en milieu MEM contenant 8 p. 100 de sérum fœtal bovin dialysé. Chaque métabolite est apporté à la concentration de 5 · 10⁻⁴ M. Seuls les acides aminés jouant un rôle stimulant ont été mentionnés ici.

Complément	Efficacité d'étalement (%)
—	0
Sérine	0
Asparagine	1
Pyruvate	0
Proline	0
Sérine + asparagine	18
Sérine + pyruvate	0
Sérine + proline	0
Sérine + Asparagine + Pyruvate	23
Sérine + Asparagine + Proline	21
Acides aminés non essentiels (10 ⁻² M chacun)	27

ne sont cependant pas essentiels à la croissance puisqu'à forte densité cellulaire les BHK 21/23 poussent correctement en MEM non complété avec les acides aminés « non essentiels ».

Le pyruvate de sodium semble assurer une meilleure reproductibilité des manipulations de clonage : son rôle stimulant est particulièrement net lorsque les cellules ont été malmenées au cours du repiquage (passage trop long à 20°C, tapis resté trop longtemps en milieu acide, cellules trop trypsinées). Dans ce cas la présence du pyruvate de sodium restaure une efficacité d'étalement normale.

3. — Rôle des acides aminés non essentiels dans la croissance en suspension des S 13

La souche S 13 est usuellement entretenue à des concentrations cellulaires supérieures à 200 000 cellules/ml. Dans ces conditions, la phase de croissance exponentielle est très courte, de durée inférieure à 24 heures. Dans le milieu MEM 6 SE modifié pour la culture en suspension, la croissance à une concentration cellulaire inférieure à 100 000 cellules/ml s'est avérée très irrégulière. L'addition de sérine et d'asparagine ($5 \cdot 10^{-4}$ M) ou de l'ensemble des acides aminés non essentiels (10^{-2} M) dans ce milieu de culture permet d'obtenir de façon reproductible des croissances exponentielles d'une durée de 72 heures avec une concentration cellulaire initiale de 10 000 cellules/ml (fig. 2).

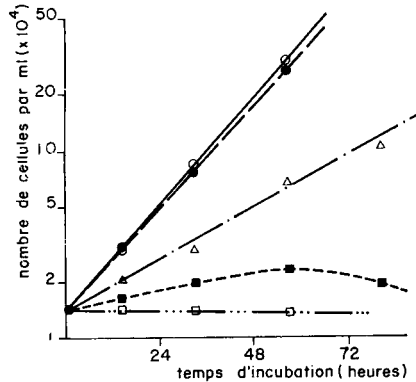


FIG. 2. — Rôle de la sérine et de l'asparagine dans la croissance en suspension des S 13

Une culture de cellules en fin de phase exponentielle est concentrée par centrifugation (100 g ; 5 mn) à $5 \cdot 10^6$ c/ml. Les cellules sont ensuite diluées à $1,5 \cdot 10^4$ c/ml en MEM 4 SFD, Tris 10^{-2} M, phosphates $5 \cdot 10^{-2}$ M, sans calcium, complété comme suit :

- sans complément
- + acides aminés non essentiels 10^{-2} M chacun
- + sérine $5 \cdot 10^{-4}$ M + asparagine $5 \cdot 10^{-4}$ M
- + asparagine $5 \cdot 10^{-4}$ M
- △ + sérine $5 \cdot 10^{-4}$ M

La croissance en suspension en milieu à base de sérum dialysé est possible dans les mêmes conditions (MEM + 6 SED + sérine et asparagine $5 \cdot 10^{-4}$ M) cependant une série de repiquages dans ce même milieu induit une décroissance progressive du rythme de division cellulaire.

La souche BHK 21/13 non adaptée à la culture en suspension prolifère aussi dans ces conditions mais son plateau de croissance est bas ($3 \cdot 10^5$ cellules/ml) alors que la souche S 13 prolifère jusqu'à la concentration de 10^6 cellules/ml).

4. — *Épuisement du milieu de culture et arrêt de croissance*

La composition du milieu de culture ne se modifie pas de façon similaire à faible densité de population et en culture confluente (tabl. 3).

Dans les conditions de clonage une quantité importante d'alanine est libérée par les cellules. A forte concentration, l'alanine inhibe la croissance si elle est le seul acide aminé non essentiel introduit dans le milieu de culture. Cet amino-acide est peut-être responsable de la diminution de l'efficacité d'établissement en milieu préconditionné dans les conditions de clonage (OELLERMAN et MILLER, 1969). Dans les conditions de confluences un certain nombre de métabolites disparaissent du milieu de culture ; sérine, asparagine et glutamine. D'autres voient leur concentration sérieusement diminuée : méthionine, leucine et isoleucine. D'autres enfin apparaissent : glycine et proline. La glutamine et l'asparagine ne disparaissent pas par simple désamination car les acides glutamiques et aspartiques n'apparaissent pas dans le milieu de façon notable. L'asparagine étant non essentielle à la croissance à forte densité de population, l'arrêt de croissance peut être imputé à une carence en glutamine.

TABLEAU 3

*Concentration en acides aminés
dans le milieu de culture en fonction des conditions de croissance*

Les résultats sont exprimés en multiples de 10^{-4} M ; les tirets correspondent à des valeurs inférieures à 10^{-5} M.

Témoin : milieu MEM complété avec sérine asparagine et pyruvate $5 \cdot 10^{-4}$ M, 4 p. 100 de sérum foetal bovin dialysé et 6 p. 100 de sérum de veau dialysé.

Clonage : le même milieu est successivement passé pendant 72 heures sur trois cultures de cellules étalées en conditions de clonage (100 cellules/cm²). Au troisième passage l'efficacité d'étalement est très diminuée (3 p. 100).

Confluence : même manipulation pour les conditions de confluence ($5 \cdot 10^4$ cellules/cm²) le pH est périodiquement ramené à 7,2 (dans ces conditions les cellules peuvent croître sans sérine et sans asparagine). Au troisième passage les cellules ne prolifèrent plus.

Acide aminé	Témoin	Clonage	Confluence
A. aspartique	0,1	—	0,1 *
A. glutamique	0,2	0,2	—
Glycine	—	2,0	4,9
Alanine	—	5,8	0,2
Sérine	4,0	2,5	0,1
Proline	—	0,6	2,1
Asparagine + glutamine ..	16,2	7,4	—
Méthionine	1,2	0,8	0,2
Isoleucine	3,8	2,5	0,6
Leucine	3,8	2,6	0,8

Ce fait est confirmé dans les conditions de culture en suspension : le plateau d'arrêt de croissance est élevé par addition de glutamine ; il n'est pas élevé par addition de glucose, de leucine, d'asparagine, de sérine, et de lysine ou par addition de sérum.

5. — Effet de pH sur la croissance et l'efficacité d'étalement

Le rythme de division cellulaire est maximum à pH 7,1 (fig. 3). La souche supporte mal les passages à pH acide (milieux épuisés) surtout dans les conditions de culture en suspension. L'efficacité d'étalement optimale est obtenue à pH 7,6 et décroît fortement aux pH acides. Les effets de pH sur l'efficacité d'étalement et le rythme de croissance de la souche dépendent de la nature du sucre introduit dans le milieu de culture. En présence de galactose les cellules ont une efficacité d'étalement optimale à pH 7,0 et un rythme de croissance maximum à pH 6,9. En présence de glucose les conditions de croissance optimales sont donc nettement plus alcalines que dans un milieu à base de galactose.

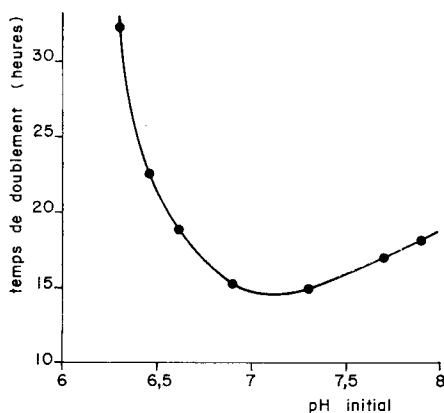


FIG. 3. — Effet du pH sur le rythme de division des S 13 cultivées en suspension

Les cultures sont effectuées en milieu standard. A l'aide d'acide chlorhydrique ou de soude (0,1 N), le milieu est amené au pH désiré au moment du repiquage. Avec une concentration cellulaire initiale de $1,5 \cdot 10^4$ c/ml les variations d'acidité enregistrées ne dépassent pas 0,1 unité pH au cours des premières 48 heures.

6. — Effet de la température sur la croissance et l'efficacité d'étalement

L'efficacité d'étalement de la souche BHK 21/13 est constante de 33°C à 38°C et chute brutalement à 39°C, lorsque les cellules sont étalées en milieu standard à base de sérum non dialysé. Dans les mêmes conditions de test la croissance n'est ralentie qu'au-dessous de 34°C ou au-dessus de 38,8°C (fig. 4).

En milieu à base de sérum dialysé l'efficacité d'étalement décroît graduellement pour les températures inférieures à 36,5°C. Cette décroissance n'est pas due à l'apparition d'un besoin supplémentaire en acides aminés non essentiels ou en bases puriques et pyrimidiques. Aux températures supérieures à 39°C les cellules deviennent géantes, prenant un aspect semblable à des cellules dont la synthèse d'ADN est inhibée.

7. — Seuil de résistance à diverses drogues (tabl. 4)

L'aminoptérine est toxique à très faible concentration (10^{-8} M); son effet peut être réversé par le mélange hypoxanthine (10^{-4} M), thymidine (10^{-5}) et glycine ($5 \cdot 10^{-4}$ M). L'étude des seuils de résistance à l'aminoptérine en l'absence d'un seul

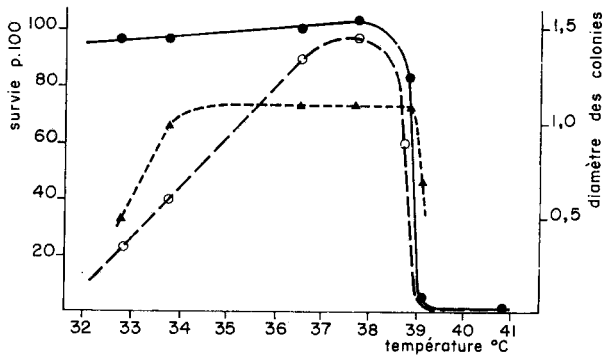


FIG. 4. — Effet de la température sur la croissance et l'efficacité d'étalement des BHK 21/13

Les températures sont estimées par mesure directe dans le milieu de culture 3 fois au cours de la manipulation à l'aide d'une microsonde (fluctuation $\pm 0,15^{\circ}\text{C}$).

- survie en milieu standard, sérum non dialysé.
- survie en milieu standard, sérum dialysé.
- ▲ Diamètre moyen des colonies en unités arbitraires.

TABLEAU 4

Seuils de résistance aux drogues de la souche BHK 21/13

Les cellules sont testées dans les conditions d'efficacité d'étalement en milieu MEM tamponné Hanks *tris* 10^{-2}M complémenté avec sérine, asparagine et pyruvate de sodium $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$, 4 p. 100 de sérum fœtal et 6 p. 100 de sérum de veau dialysé (D) ou non dialysé (ND). Les résultats sont exprimés en concentration en drogue donnant lieu à une survie de 10 p. 100 par rapport au témoin non traité (DL_{10} ou dose létale 10 p. 100). La croissance s'effectue en présence de drogue jusqu'au comptage des colonies.

Drogue	Complément sérique du milieu	DL_{10}
5-bromodéoxyuridine	ND	$4 \cdot 10^{-6}\text{M}$
5-iododéoxyuridine	ND	$2 \cdot 10^{-5}\text{M}$
5-fluorodéoxyuridine	D	$4 \cdot 10^{-9}\text{M}$
5-fluorodéoxyuridine + thymidine 10^{-5}M	D	10^{-6}M
Thymidine	D	$4 \cdot 10^{-4}\text{M}$
Aminoptérine	D	$1,5 \cdot 10^{-8}\text{M}$
Aminoptérine + H + G ⁽¹⁾	D	$6 \cdot 10^{-8}\text{M}$
Aminoptérine + H + T	D	$1,5 \cdot 10^{-8}\text{M}$
Aminoptérine + G + T	D	$1,5 \cdot 10^{-8}\text{M}$
Aminoptérine + H + G + T	D	10^{-4}M
Colchicine	ND	10^{-6}M
Colcéamide	ND	$2,5 \cdot 10^{-6}\text{M}$
8-azaguanine	ND	$3 \cdot 10^{-5}\text{M}$
Thioguanine	ND	$2 \cdot 10^{-7}\text{M}$
Arabinofuranosyl cytosine	ND	$4 \cdot 10^{-7}\text{M}$
2-déoxyglucose + galactose 10^{-2}M (2)	D	$2 \cdot 10^{-4}\text{M}$
2-déoxygalactose + glucose 10^{-2}M	D	$5 \cdot 10^{-4}\text{M}$

(1) H = hypoxanthine 10^{-4}M ; T = Thymidine 10^{-5}M ; G = Glycine $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$.

(2) Pour le test des analogues de sucres, le milieu ne contient pas initialement de glucose.

de ces trois métabolites met en évidence deux niveaux de sensibilité à l'aminoptérine.

La souche résiste mieux à l'action antimittotique de la colchicine et de la colcémide que les autres souches de cellules de mammifères. Ce fait a déjà été constaté chez le hamster syrien (BALIS, 1968). La sensibilité de la souche au 2-déoxygalactose indique que le galactose peut être utilisé compétitivement au glucose. Les analogues classiques de la thymidine et de la guanine sont toxiques à faible concentration et pourront donc être employés dans les sélections de mutants résistants.

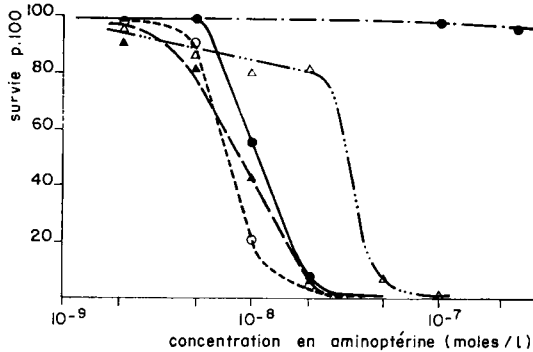


FIG. 5. — Sensibilité des BHK 21/13 à l'aminoptérine

Les tests sont effectués en milieu MEM Tris 10^{-2} M, 4 SFD + 6 SVL, contenant sérine, asparagine et pyruvate ($5 \cdot 10^{-4}$ M chacun). L'efficacité d'étalement en présence d'aminoptérine à concentration variable est testée dans les conditions suivantes :

- aucun complément
- hypoxanthine 10^{-4} M + glycine $5 \cdot 10^{-4}$ M + thymidine 10^{-5} M
- glycine $5 \cdot 10^{-4}$ M + thymidine 10^{-5} M (Carence en hypoxanthine)
- ▲ hypoxanthine 10^{-4} M + thymidine 10^{-5} M (carence en glycine)
- △ hypoxanthine 10^{-4} M + glycine $5 \cdot 10^{-4}$ M (carence en thymidine)

En présence des trois métabolites l'aminoptérine est très peu toxique à 10^{-6} M.

8. — Caryotype

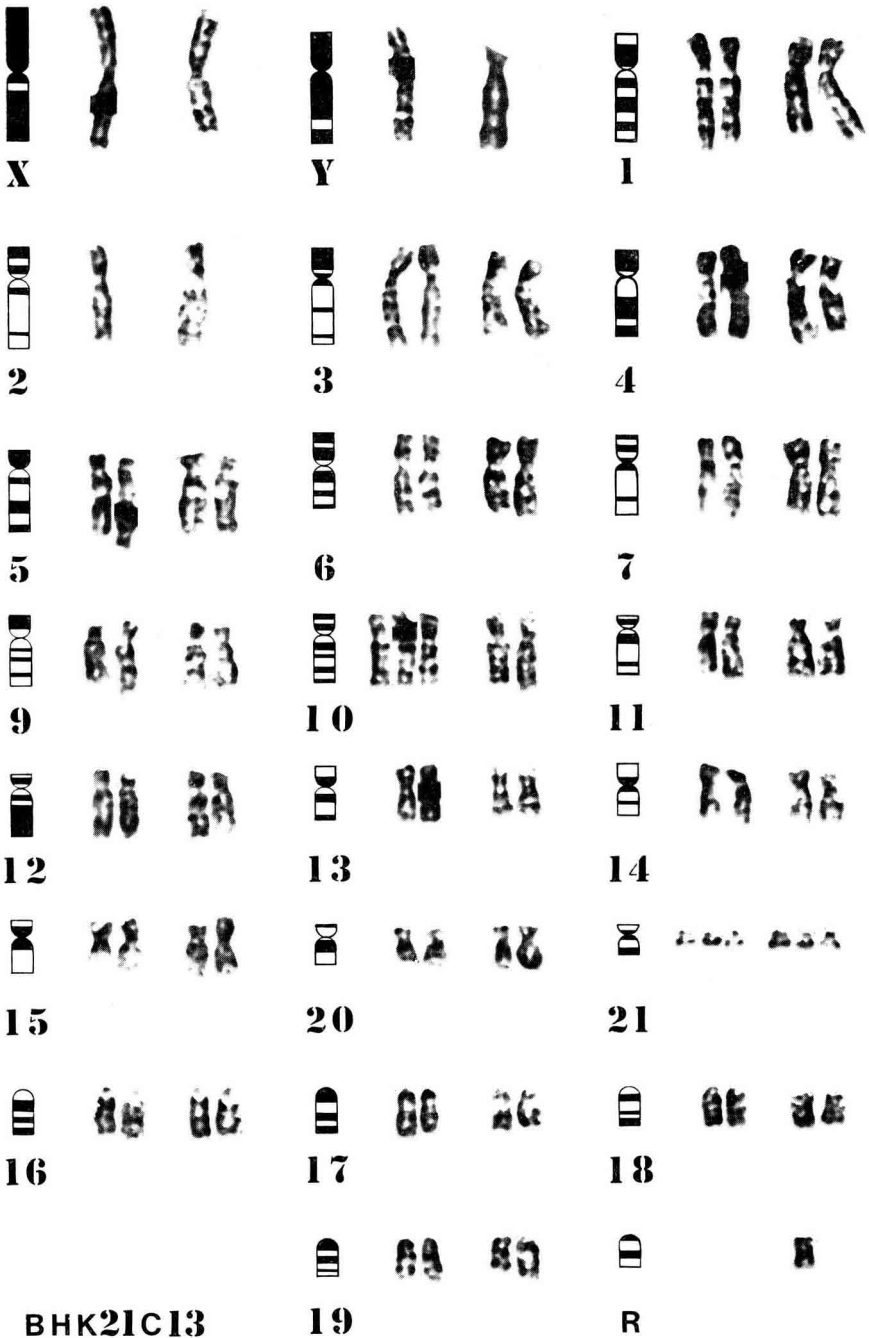
Le hamster syrien a un caryotype constitué de 44 chromosomes. La souche BHK 21/13 possède aussi ce même nombre de chromosomes (FISHER *et al.*, 1971). Après clonage en milieu à base de sérum dialysé nous avons obtenu une souche ayant un nombre modal de 43 chromosomes (tabl. 5).

TABLEAU 5

Fréquence du nombre de chromosomes par métaphase

La souche a été clonée en milieu à base de sérum dialysé et son caryotype effectué après 20 divisions dans ce milieu

Nombre de chromosomes	41	42	43	44	45	<i>n</i>
Pourcentage dans la population en métaphase	1	8	62	19	5	3



BHK21C13

19

R

FIG. 6. — Caryotype à bandes de la souche BHK 21|13 clonée en milieu à base de sérum dialysé

Deux métaphases caractéristiques, ayant 43 chromosomes chacune, sont analysées. L'une d'elles est trisomique pour le chromosome 10, l'autre possède un chromosome remanié (R). La paire 8 est absente dans les caryotypes analysés.

La densité de population cellulaire et le degré d'étalement des chromosomes influent sur les conditions d'hydrolyse, rendant la méthode assez délicate à employer de façon reproductible.

La technique de coloration après protéolyse ménagée permet de distinguer toutes les paires de chromosomes les unes des autres. La souche possède un caryotype mâle. En plus des chromosomes X et Y, un chromosome est présent à un seul exemplaire (n° 2). Une paire est absente (paire n° 8). Enfin la souche est trisomique pour le chromosome 21. Sur les 43 chromosomes du caryotype, 42 sont donc retrouvés régulièrement dans les métaphases, le chromosome supplémentaire pouvant varier (trisomie sur le chromosome 10 ou chromosome acrocentrique de petite taille).

L'aspect des chromosomes correspond assez bien aux observations faites par MARSHALL (1972) : les bandes sombres observées ici correspondent aux zones fluorescentes apparaissant après le traitement à la quinacrine (fig. 6). La comparaison des caryotypes a permis d'identifier le chromosome Y.

DISCUSSION

La mise au point de techniques de sélection de mutants du métabolisme intermédiaire chez BHK 21/13 nécessite une connaissance préalable des caractéristiques principales de cette souche (efficacité d'étalement, besoins nutritionnels, sensibilité à diverses drogues, caryotype).

L'efficacité d'étalement de la souche ne dépasse pas 40 p. 100 dans les meilleures conditions obtenues. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce résultat :

— Le milieu de culture contient un métabolite en quantité excessive (OELLERMAN et MILLER, 1969).

— un ou plusieurs métabolites supplémentaires sont nécessaires à une croissance optimale de la souche (HAM, 1965).

— Les conditions de repiquage (trypsination et dissociation) sont trop sévères (PUCK, 1956).

— Enfin la quantité de sérum introduite dans le milieu est insuffisante bien que déjà élevée (10 p. 100). 5 p. 100 de sérum dans le milieu de culture permettent une initiation correcte de la synthèse d'ADN (CLARKE *et al.*, 1970). Le sérum semble perdre un facteur de croissance par dialyse sans diminution importante de l'efficacité d'étalement. Le sérum intervient donc à plusieurs niveaux dans la croissance clonale : il apporte les globulines nécessaires à l'attachement et l'initiation du cycle cellulaire (FISHER *et al.*, 1959) ; (HEALY et PARKER, 1968) ; il apporte simultanément un ou plusieurs facteurs de croissance dialysables (METZER et MOSKOWITZ, 1960 ; HOLLEY et KIERMAN, 1968).

La sérine, l'asparagine et le pyruvate de sodium sont nécessaires à la croissance clonale de certaines souches (EAGLE et PIEZ, 1962 ; OELLERMAN et MILLER, 1969). En particulier la souche BHK 21/13 ne prolifère dans les conditions de clonage qu'en présence d'une concentration en sérine supérieure à 10^{-5} M et une concentration en asparagine supérieure à $5 \cdot 10^{-5}$ M. Aux fortes concentrations cellulaires la croissance devient possible en absence de ces métabolites car ils sont rejetés par les cellules dans le milieu et s'y accumulent à des concentrations permettant la croissance. La présence de sérine et d'asparagine permet de même la croissance en suspension des S 13 à une très faible densité cellulaire (jusqu'à 10^8 cellules/ml) ; de

nombreuses souches cellulaires prolifèrent difficilement au-dessous d'une concentration cellulaire inférieure à 10^5 cellules/ml ; on peut supposer qu'un milieu permettant le clonage de ces souches permettra leur culture en suspension à faible densité de population.

Plusieurs facteurs interviennent dans l'arrêt de croissance à forte concentration cellulaire : acidité du milieu (CECCARINI et EAGLE, 1971), épuisement en glutamine et en glucose (BLACKER *et al.*, 1971), enfin accumulation de métabolites devenant ainsi toxiques (proline et alanine). Les cellules s'accumulent en phase G_1 par inhibition de contact lorsqu'elles arrivent à confluence (OREN et KOHN 1969) ; cette accumulation est certainement favorisée par la disparition de la glutamine et d'une grande partie de l'isoleucine du milieu de culture (LEY et TOBEY, 1970).

La souche est sensible à des concentrations très faibles d'aminoptérine (10^{-8} M) en milieu à base de sérum dialysé. L'existence de deux seuils distincts de résistance partielle à l'aminoptérine pour la carence en thymidine ou en hypoxanthine est à rapprocher des résultats de ORKIN et LITTLEFIELD (1971). Les BHK 21/13 peuvent proliférer en présence d'aminoptérine si le milieu de culture contient en outre le mélange glycine, hypoxanthine, thymidine (LITTLEFIELD, 1963). La souche possède donc une thymidine kinase et une hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl-transférase. Ces caractéristiques sont révélées par ailleurs par la sensibilité de la souche à l'action de la 5-bromodéoxyuridine et l'iododéoxyuridine d'une part et de la 8-azaguanine et de la thioguanine d'autre part.

Le caryotype de la souche clonée montre un certain nombre de modifications par rapport au caryotype initial des BHK 21/13 (CAPSTICK *et al.*, 1962). La diminution progressive du nombre des chromosomes (de 44 à 43) au cours de la culture de la souche semble se confirmer (MARSHALL, 1971). La modification du caryotype a certainement pour origine les nouvelles conditions de culture employées pour l'entretien de la souche. De telles modifications, liées aux conditions de culture, ont été observées sur certaines souches de porc (ÉCHARD, 1972).

L'existence d'un caryotype stable, relativement peu remanié et dont on peut distinguer chaque paire de chromosomes, permet de considérer la souche BHK 21/13 comme un excellent outil d'étude génétique de l'hérédité des mammifères, la mise au point des conditions de clonage de cette souche en milieu à base de sérum dialysé permet d'étudier le mode d'action de diverses drogues et en particulier de sélectionner différents types de mutants résistants à ces drogues avec ou sans mutagenèse préalable. Des travaux d'isolement et de caractérisation de résistants à la 8-azaguanine, à la 5-bromodéoxyuridine, à l'aminoptérine, à la colchicine et au 2-déoxygalactose sont en cours. L'existence d'un certain nombre de particularités métaboliques de la souche (résistance partielle à la colchicine et à la colcémide, besoins en asparagine), la prédisposent à être employée dans les hybridations interspécifiques avec des lignées de porc pour l'étude des groupes de liaison de cet animal. La croissance clonale de la souche est possible en absence de proline, glycine, alanine, acides aspartique et glutamique. La sélection d'auxotrophes pour l'un quelconque de ces aminoacides est donc possible (KAO et PUCK, 1968). Sa mise au point est effectuée.

REMERCIEMENTS

Nous remercions M^{lle} Yvette CAPDIVILA du Laboratoire de Physiologie végétale de la Faculté des Sciences de Toulouse qui a effectué les chromatographies d'acides aminés ainsi que le professeur ZALTA de l'Institut de Physiologie de la Faculté des Sciences de Toulouse dont les critiques nous ont été précieuses pour la préparation du manuscrit.

SUMMARY

CLOWNING CONDITIONS AND SUSPENSION GROWTH
OF THE SYRIAN HAMSTER'S STRAIN BHK 21/13.
STRAIN SENSIBILITY TO DRUGS AFFECTING NUCLEIC ACID METABOLISM

Because of its characteristics, the strain BHK 21/13 is easily used as a genetic tool. Its growth and cloning conditions are here studied. The plating efficiency of the strain is low (1 p. 100), when cultivated in Eagle's Minimum Essential Medium containing 8 p. 100 of dialyzed fetal calf serum. If serine and asparagine are added, a satisfactory clonal growth is obtained (25 p. 100 of plating efficiency). In the presence of these two amino acids BHK 21/13 S 13 a line adapted to suspension growth, develops with a fourteen hours doubling time at low cell population density (10⁴ cells/ml). Medium composition evolves during the growth of BHK 21/13 cells : great quantities of alanine, glycine and proline are transferred in the medium at low cell population density. Confluent layers consume medium amides. Optimal cloning conditions are obtained at pH 7,2 and 37°C.

The strain sensibility to drugs affecting nucleic acids metabolism is studied (bromodeoxyuridine, azaguanine, aminopterin).

The karyotype of the strain ($\bar{n} = 43$) is observed after trypsin treatment and Giemsa staining and compared to the syrian hamster karyotype ($\bar{n} = 44$). Each pair of chromosomes is distinguished by this method.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BALIS M. E., 1968. *Antagonists and nucleic acids*. North-Holland publishing company Amsterdam, 57-58.
- BIRNBOIS M. C., 1970. Optimal conditions for counting of precipitated 3 H-RNA on glass fiber filters. *Analyt. Biochem.* **37**, 178-182.
- BLAKER G. J., BIRGH J. R., PIRT S. J., 1971. The glucose insulin and glutamine requirements of suspension cultures of Hela cells in a defined culture medium. *J. Cell. Sci.* **9**, 529-537.
- CAPSTICK P. B., TELLING R. C., CHAPMAN W. G., STEWART D. L., 1962. Growth of a cloned strain of hamster kidney cells in suspended cultures and their susceptibility to the virus of foot and mouth disease. *Nature*, **195**, 1163-1164.
- CECCARINI C., EAGLE H., 1971. pH as a determinant of cellular growth and contact inhibition. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **68**, 229-233.
- CLARKE G. D., STOKER H. G. P., LUDLOW A., THORNTON M., 1970. Requirements of serum for DNA synthesis in BHK 21 cells. Effect of density, suspension and virus transformation. *Nature*, **227**, 789-801.
- EAGLE H., 1959. Amino acids metabolism in mammalian cell cultures. *Sciences* **130**, 432-437.
- EAGLE H., PIEZ K., 1962. The population dependent requirement by culture mammalian cells for metabolites wich they can synthesise. *J. Exp. Med.* **116**, 29-43.
- ERCHARD G., 1973. Étude des bandes chromosomiques du porc et de trois différentes souches de rein de porc en culture (PK 15, F et RP). *Ann. Génét. Select. anim.* **5** (sous presse).

- FISCHER A. B., MANOJLOVIC N., KUMBERT E., BECK E. G., 1971. Zytogenetische charakterisierung der zelllinien BHK 21 C 13 und BHK 21 C 13 S. *Arch. Virusforsch.*, **33**, 375-843.
- FISHER H. W., PUCK T. T., SATO G., 1959. Molecular growth requirements of single mammalian cells III. Quantitative colonial growth of single S₃ cells in medium containing synthetic small molecular constituents and two purified fractions. *J. Exp. Med.* **109**, 649-659.
- HAM R. G., 1965. Clonal growth of mammalian cells in chemically defined synthetic medium. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **53**, 288-93.
- HEALY G. M., PARKER R. C., 1968. Cultivation of mammalian cells in defined media with protein and non protein supplements. *J. Cell. Biol.* **50**, 539-553
- HOLLEY R. W., KIEMAN Y. A., 1968. « Contact inhibition » of cell division in 3 T 3 cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **60**, 300-304.
- LEY K. D., TOBEY R. A., 1970. Regulation of initiation of DNA synthesis in chinese hamster cells II. Induction of DNA synthesis and division by isoleucine and glutamine in G₁ arrested cells in suspension culture. *J. Cell. Biol.* **47**, 453-459.
- LITTLEFIELD W. J., 1963. The inosinic acid pyrophosphorylase activity of mouse fibroblasts partially resistant to 8-azaguanine. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **50**, 568-573.
- MAC PHERSON I., STOCKER, 1962. Polyma transformation of hamster cell clones an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology*, **16**, 147-151.
- MARSHALL R., 1972. Karyotype of the BHK 21 C 13 cell line of the syrian hamster determined with the aid of quinacrine staining. *Chromosoma*, **37**, 395-404
- METZGAR D. P., MOSKOWITZ M., 1960. Separation of growth promoting activity from horse serum by dialys. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **104**, 363-365.
- MORGAN J. F., MORTON H. J., PARKER R. C., 1950. Nutrition of animal cells in tissue culture. I. Initial studies on a synthetic medium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **73**, 1-12.
- OELLERMAN R. A., MILLER E. M., 1969. The influence of conditioned media and non essential amino-acid supplementation on the growth of cells *in vitro*. *J. Cell. Physiol.*, **74**, 299-306.
- OREN R., KOHN A., 1969. Density dependent inhibition of cell growth in cultures of primary and established lines of cells. *J. Cells Physiol.*, **74**, 307-314.
- PUCK T. T., MARCUS P. I., CIERIURA S. J., 1956. Clonal growth of mammalian cells *in vitro*. Growth characteristics of colonies from single Hela cells with and without a feeder layer. *J. Exp. Med.* **103**, 273-283.
- STOCKER M., MAC PHERSON I., 1964. Syrian fibroblast cell line BHK 21 and its derivatives. *Nature*, **203**, 1355-1357.
- TODAR G. J., AARONSON S. A., RANDS E., 1971. Rapid detection of mycoplasma infected cultures. *Expt. Cell. Res.*, **65**, 256-257.
- WANG H., FEDOROFF S., 1972. Banding in human chromosomes treated with trypsin. *Nature New biology*, **235**, 52-54.

ANNEXE

ABRÉVIATIONS

ADN	Acide déoxyribonucléique
BHK	Baby Hamster Kidney
EDTA	Acide éthylène diaminetétraacétique
MEM	Minimum Essential Medium (EAGLE)
SF	Sérum foetal bovin
SV	Sérum de veau
SVD	Sérum de veau dialysé
TCA	Acide trichloroacétique
Tris	trishydroxyméthyleaminométhane