

**SÉLECTION ET CARACTÉRISATION
DE CLONES RÉSISTANTS
A LA 5-BROMODÉOXYURIDINE
OU A LA 5-FLUORODÉOXYURIDINE
A PARTIR DE LA SOUCHE *BHK 21/13***

M. CABOCHE

avec la collaboration technique de F. BENNE

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

RÉSUMÉ

Des clones résistants à la 5-bromodéoxyuridine (25 µg/ml) ont été sélectionnés après mutagenèse à partir de la souche BHK 21/13. Aucun clone résistant spontané n'a pu être isolé dans les mêmes conditions de sélection. Sur dix clones résistants testés, un clone réverse spontanément, un autre après mutagenèse. Le taux des mutations spontanées de résistance estimé chez les résistants par test de fluctuation est élevé ($5 \cdot 10^{-6}$ /cellule/génération). Les fréquences de mutations induites par les mutagènes chez les révertants sont en moyenne dix fois plus élevées que celles du clone sauvage.

Les clones sélectionnés résistants à la 5-bromodéoxyuridine sont résistants à d'autres analogues de la thymidine (5-fluorodéoxyuridine et 5-iododéoxyuridine). Il en est de même pour ceux sélectionnés pour leur résistance à la 5-fluorodéoxyuridine. Ces clones résistants n'incorporent pas la thymidine exogène de façon appréciable ; corrélativement ils ne prolifèrent pas en milieu HAGT et leur croissance n'est pas affectée par la présence de thymidine concentrée. Enfin les clones résistants ont une activité thymidine kinase inférieure à 3 p. 100 de l'activité de la souche sauvage.

Dans les conditions de culture les clones révertants ne peuvent être distingués de la souche sauvage ; ils ont les mêmes caractéristiques de croissance et de sensibilité aux analogues de la thymidine. L'activité thymidine kinase est présente à un degré moindre dans les clones révertants (35 p. 100) que dans la souche sauvage. L'enzyme est inductible en présence d'aminoptérine. Aucun mutant des conditions d'induction de l'enzyme n'a pu être isolé. Ces résultats permettent une première analyse critique de la nature des mutants isolés.

ABRÉVIATIONS

- ADN : Acide déoxyribonucléique ;
ATP : Adénosine triphosphate ;
5-BUdR : 5-bromodéoxyuridine ;
EDTA : Éthylène diamine tétraacétate ;
EMS : Éthyle méthane sulfonate ;
5-FUdR : 5-fluorodéoxyuridine ;
5-IUdR : 5-iododéoxyuridine ;
MNNG : N-méthyle N'-nitro N-nitrosoguanidine ;
Tris : *tris*-hydroxyméthyle-amino-méthane.

INTRODUCTION

Les techniques de mutagenèse et de sélection mises au point dans le cas des cultures de cellules somatiques de mammifères (CHU *et al.*, 1969) ; CHU et MALLING, 1968 ; KAO et PUCK, 1968) permettent d'estimer les fréquences des mutations spontanées et celles des mutations induites. Dans ce domaine, les travaux ont porté principalement sur un gène lié au chromosome X, le marqueur de résistance à la 8-azaguanine.

Parce que l'étude similaire d'un locus autosomal pouvait apporter des renseignements nouveaux, nous avons étudié le caractère de résistance à la 5-bromodéoxyuridine sur la souche BHK 21/13 (LITTLEFIELD et BASILICO, 1966).

Des travaux antécédents ont montré que des souches de cellules de souris adaptées à des concentrations croissantes en 5-BUdR sont déficientes en activité thymidine kinase (KIR *et al.*, 1963). Une étude partielle des fréquences de mutations induites par les mutagènes a permis de préciser l'origine du mécanisme de résistance (CLIVE *et al.*, 1972). Les loci porteurs des gènes responsables de cette résistance sont autosomaux chez l'Homme (MILLER *et al.*, 1971) et très probablement chez les autres mammifères puisqu'ils ne sont pas liés au chromosome X dans tous les cas étudiés.

Le caryotype de la souche BHK 21/13 est très voisin de celui du hamster syrien dont elle provient. Les gènes affectés dans le mécanisme de résistance au 5-BUdR sont donc probablement présents à double exemplaire dans cette souche, comme chez l'animal dont elle provient. L'intérêt particulier de la souche pour l'étude du mécanisme de résistance au 5-BUdR est mis à profit dans cette étude : dans une première partie les fréquences des mutations de résistance sont estimées grâce au système de sélection mis au point par LITTLEFIELD (1964) ; des révertants sont obtenus ; leur stabilité génétique est décrite. Dans une seconde partie sont comparées les caractéristiques *in vivo* des clones sensibles et résistants. Enfin, les activités thymidine kinase des diverses souches sont dosées, ce qui permet de préciser la nature des mutations.

MATÉRIEL, ET MÉTHODES

1. — *Souches et clones dérivés*

La souche BHK 21/13 (STOCKER et Mac PHERSON, 1964) provient de l'American Type Culture Collection (CCL₁₀). Elle est cultivée à 36,5°C en Milieu Essentiel Minimum (EAGLE, 1959) tamponné avec les sels de Hanks, *Tris* HCl 10⁻²M pH 7,2 et additionné de sérine, d'asparagine et de pyruvate de sodium (5.10⁻⁴M chacun) auquel on ajoute 4 p. 100 de sérum fœtal bovin et 6 p. 100 de sérum de veau. Ce milieu (MEM CL) permet le clonage de la souche avec une efficacité d'étalement de 31 p. 100 (CABOCHE, 1973).

La présence de PPLO dans les cultures peut modifier le métabolisme cellulaire et provoquer l'apparition d'activités enzymatiques nouvelles dans les extraits cellulaires. De tels contaminants n'ont pu être décelés dans les cultures par la méthode de TODARO *et al.*, 1971.

Un clone (C₃) ayant un nombre modal de 43 chromosomes a été isolé après deux clonages successifs dans le milieu de clonage dont le sérum a été préalablement dialysé (MEM CLD). La dialyse est effectuée 24 heures contre l'eau courante puis 6 heures à 4°C contre une solution de chlorure de sodium 0,15 M, avec un renouvellement. Tous les clones décrits dans cet article dérivent de ce clone C₃ dont les caractéristiques de croissance et de sensibilité aux drogues sont identiques à celles de la souches BHK 21/13.

La souche BHK 21/13 et les différents clones isolés sont conservés à -70°C dans le milieu de culture complémenté par 15 p. 100 de glycérol et 20 p. 100 de sérum fœtal bovin.

2. — *Produits chimiques*

Les milieux de culture, le sérum fœtal bovin et le sérum de veau sont préparés par le Laboratoire Eurobio et conservés congelés. Le 5-BUDR, l'hypoxanthine, la thymidine, l'ATP sont des produits Calbiochem. (A grade). Le 5-FUDR, la 2-déoxycytidine et l'EMS sont des produits Sigma. Le 5-IUDR est obtenu chez Mann et l'aminoptérine chez Schuchardt. La MNNG est fournie par Aldrich ; les acides aminés, le *Tris* et le 2-mercaptoéthanol sont des produits Merck pro analysis. La ³H-méthyle thymidine (15 Ci/mM, CMM 79) et la ¹⁴C-8-hypoxanthine (47 mCi/mM ; CMM 142) sont fournies par le C. E. A.

3. — *Test de sensibilité aux drogues*

Les cellules sont repiquées en MEM CL (1 000 cellules par bouteille en verre de 25 cm² de surface d'étalement) et incubées 16 heures à 36,5°C. Après lavage dans la solution saline de Hanks, le milieu contenant la drogue est introduit puis les cultures sont incubées 8 jours. Après fixation à l'acide trichloroacétique 10 p. 100, les colonies sont colorées au bleu de Unna et comptées.

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 au nombre de cellules étalées initialement. Pour une souche donnée ces mesures sont dans un rapport constant.

4. — *Courbes de croissance*

Dix cultures identiques (10⁵ cellules dans chaque bouteille de 25 cm² de surface d'étalement) sont repiquées en MEM CL, 16 ou 24 heures plus tard, alors que les cultures sont en phase de croissance exponentielle, les cellules sont lavées dans la solution saline de Hanks préchauffée et le milieu testé est introduit. Les comptages sont effectués 0, 6, 24, 48, 72, 96 heures après le changement de milieu : le milieu testé est retiré, les cellules sont alors décollées après 10 mn d'incubation à 37°C dans le milieu de dissociation : EDTA-Na 0,2 g ; NaCl 8,0 g ; KCl 0,2 g ; Na₂HPO₄ 1,1 g ; KH₂PO₄ 0,2 g ; glucose 0,2 g H₂O q.s.p. 1 L pH 7,4 (PAUL, 1961). Le dénombrement des cellules de la suspension obtenue est effectué au « Coulter Counter ». Une phase de croissance exponentielle de 36 heures est observée dans les cultures témoins.

5. — *Mutagenèses et expression des mutations*

Deux millions de cellules sont étalées en bouteille de 75 cm² de surface d'étalement, en MEM CL. Le mutagène est introduit après dilution dans le MEM CL, préchauffé, 6 heures après le repiquage et pour une durée de 16 heures. Après mutagenèse les cellules sont lavées et le milieu est périodiquement renouvelé pendant 5 jours jusqu'à ce que toutes les cultures traitées soient confluentes, afin de permettre l'expression des mutations. Un témoin de survie est effectué dans les mêmes conditions de mutagenèse sur des cellules étalées dans les conditions de clonage. Les survies (S) observées sont reproductibles d'une manipulation à l'autre (EMS 150 µg/ml : S = 85 p. 100 ; EMS 300 µg/ml : S = 65 p. 100 EMS 400 µg/ml : S = 27 p. 100 : MNNG 0,5 µg/ml S = 10 p. 100 ; MNNG 1 µg/ml S = 2 p. 100).

6. — *Conditions de sélection*

Un minimum de 10⁶ cellules sont simultanément soumises à sélection à une densité de population initiale de 4. 10³ cellules/cm² en bouteilles de 50 cm² de surface d'étalement. Pour la sélection de résistants au 5-BUDR 25 µg/ml ou au 5-IUDR 40 µg/ml les cellules sont directement repiquées en présence de drogue en MEM S (milieu Essentiel Minimum de EAGLE complété par l'ensemble des acides aminés non essentiels (10⁻²M) et le pyruvate de sodium (5. 10⁻⁴M). Pour la sélection de résistants au 5-FUDR le milieu MEM CLD contenant la drogue (0,01 µg/ml) est introduit 6 heures après le repiquage, après que les cellules aient été lavées dans la solution saline de Hanks afin d'éliminer la thymidine résiduelle.

La sélection de révertants à partir de clones résistants au 5-BUDR est effectuée en milieu MEM CL contenant en outre les métabolites suivants : hypoxanthine 10⁻⁴M, aminoptérine 10⁻⁵M, thymidine 10⁻⁶M ainsi que les acides aminés non essentiels à la concentration de 5. 10⁻⁴M (milieu HAGT, LITTLEFIELD, 1964). Le milieu est introduit 16 heures après repiquage en MEM CL. Au cours des sélections effectuées les milieux sont renouvelés toutes les 48 heures la première semaine, puis une ou deux fois par la suite. Les clones sélectionnés sont observables de 9 à 13 jours après le début de la sélection indiquant un léger ralentissement de la croissance dans ces conditions, en particulier pour la sélection de révertants.

Les colonies obtenues sont prélevées par grattage à l'aide de l'extrémité d'une pipette pasteur et repiquées dans le milieu employé au cours de la sélection.

7. — *Incorporation des radioéléments**Incubation.*

Dix cultures identiques (10⁵ cellules dans chaque bouteille de 25 cm² de surface d'étalement) sont repiquées en MEM CL et incubées 48 heures (6 à 8. 10⁵ cellules en phase exponentielle par bouteille au début des incorporations). Les cellules sont lavées en solution saline de Hanks préchauffée. Elles sont ensuite incubées en présence de ³H-méthyle thymidine 1 µCi/ml, en MEM CLD contenant 10⁻⁵M de thymidine ou en présence de ¹⁴C-8-hypoxanthine 0,1 µCi/ml en MEM CLD contenant 10⁻⁵M d'hypoxanthine. Après un temps variable d'incubation à 37°C les incorporations sont arrêtées dans la glace et les tapis cellulaires sont lavés dans la solution saline de Hanks à 4°C. Les cellules sont ensuite congelées en présence de mélange dissociant (voir matériel méthodes, 4).

Récolte de la fraction précipitable et mesure de la radioactivité incorporée.

Après décongélation les cellules sont rapidement décollées par pipettage ; 400 µg de sérum albumine bovine et 100 µg d'ADN de sperme de saumon sont ajoutés avant précipitation au TCA 10 p. 100 final. Les précipités conservés 10 mn à 4°C, sont ensuite collectés sur filtre Whatman GFC. Les filtres sont passés successivement dans deux bains de TCA 10 p. 100, un bain d'alcool absolu et un bain d'éther éthylique puis séchés sous infra-rouges.

Après 30 mn d'incubation à 20°C dans 0,5 ml de solvène Packard 25 p. 100 (dilué dans le toluène) les échantillons sont comptés en scintillation liquide dans le mélange scintillant suivant : PPO 5 g ; diméthyle POPOP 0,25 g q.s.p. un litre de toluène (BIRNBOIM, 1970). Le rendement des comptages est de 35 p. 100 pour le tritium et de 80 p. 100 pour le carbone 14.

8. — *Dosage de la thymidine kinase**Préparation de l'extrait enzymatique.*

2. 10⁷ cellules sont récoltées en fin de phase exponentielle, 24 heures après le dernier renouvellement du milieu de culture (généralement le milieu HGT, milieu de sélection des révertants

dans lequel l'aminoptérine est omise). Les cellules sont ensuite centrifugées et lavées dans la solution saline de Hanks. Le culot est remis en suspension dans 0,5 ml du tampon suivant : *Tris*-HCl 10 mM pH 8 ; 2-mercaptoéthanol 1 mM ; KCl 0,1 M et thymidine 0,1 mM. Il est ensuite soniqué 15 secondes à 4°C (Braun-Sonic 300 avec une microsonde, force 60). Le lysat est centrifugé à 4 000 g pendant 30 mn et le surnageant est récupéré.

Incubation.

Une méthode inspirée de BOLLUM et POTTER (1958) et de BREITMAN (1963) est employée. L'incubation est démarrée après addition d'enzyme à 4°C et effectuée à 37°C. Les constituants du mélange d'incubation sont aux concentrations finales suivantes : *Tris* HCl 50 mM pH 8, MgCl₂ 2,5 mM, ATP 5 mM, thymidine 20 μM, ³H-méthyle thymidine 10 μCi/ml dans un volume total de 100 μl contenant 10 μl d'extrait enzymatique. Des aliquotes de 20 μl du mélange sont prélevés à des temps variables après le début de l'incubation et déposés sur disque de papier WHATMAN DE 81. Les disques sont immédiatement plongés dans une solution de formiate d'ammonium 2.10⁻³M pendant 30 mn, passés dans un bain d'alcool absolu, un bain d'éther et séchés sous infra-rouges. Ils sont enfin comptés en scintillation liquide sans solubilisation préalable. Les incorporations, exprimées en μμM de thymidylate synthétisé, sont proportionnelles au temps d'incubation et à la quantité d'enzyme introduite. Les protéines des extraits sont dosées par la méthode de folin (LOWRY *et al.*, 1951) ; la sérum-albumine bovine est utilisée comme standard de concentration protéique. Les activités enzymatiques des extraits sont exprimés en μμM de thymidylate synthétisé par minute et par milligramme d'extrait enzymatique.

RÉSULTATS

I. — *Origine génétique des différents clones et estimation des fréquences des mutations*

L'origine des différents clones étudiés est décrite dans le tableau I.

Fréquence des mutations pour l'obtention de résistants au 5-BUdR

Les expériences de reconstitution montrent que les résistants au 5-BUdR prolifèrent sans modification appréciable de leur efficacité d'étalement dans les conditions de sélection employées (CABOCHE, manuscrit en préparation). Les fréquences des mutations sont donc estimées en divisant le nombre de colonies obtenues au cours d'une sélection par le nombre de cellules soumises à sélection et par l'efficacité d'étalement de ces cellules soumises à sélection.

Aucun clone résistant spontané au 5-BUdR 25 μg/ml n'a été obtenu malgré de nombreux essais répétés. 2 · 10⁷ cellules provenant de dix cultures indépendantes ont été soumises à sélection après croissance en absence de drogue pendant un minimum de 30 générations ; le taux de mutation spontanée de résistance au 5-BUdR 25 μg/ml est donc probablement inférieur à 5 · 10⁻⁸/cellule/génération pour le clone C3.

Des résistants au 5-BUdR peuvent être obtenus si l'on effectue une sélection préalable à basse concentration en drogue (10 μg/ml) puis une sélection en 5-BUdR 25 μg/ml. Les mutants obtenus ne sont pas nécessairement spontanés car le 5-BUdR est mutagène et peut donc *a priori* induire sa propre mutation de résistance. (HUBBERMAN et HEIDELBERGER, 1972). Il est possible d'obtenir des résistants au 5-BUdR, après mutagenèse en une seule étape de sélection. Les fréquences de mutation induites sont faibles et ne sont pas proportionnelles aux concentrations en mutagène employées (tabl. 2) (CABOCHE, manuscrit en préparation).

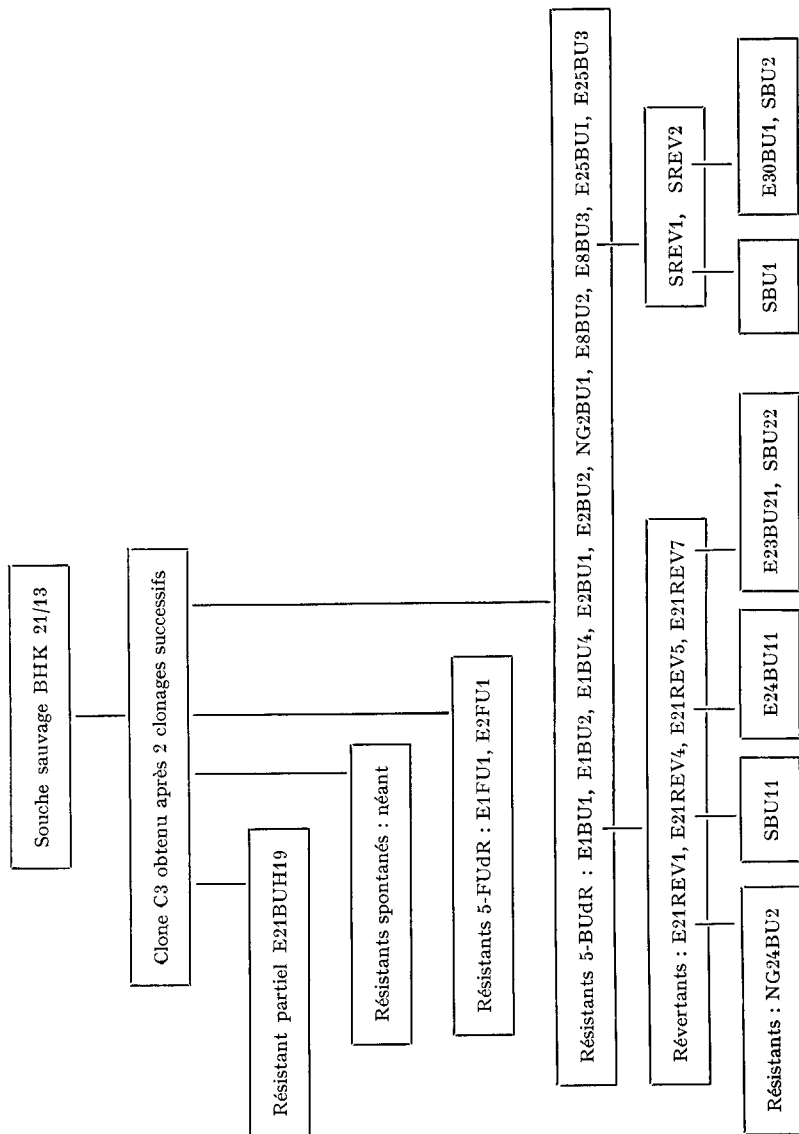
TABLEAU I. — Relations entre les différents clones testés

L'obtention d'un clone mutant nécessite en général une mutagenèse suivie d'une sélection. Ces deux opérations successives seront résumées chacune dans la dénomination du clone par un ensemble de lettres caractérisant la nature du mutagène ou de l'agent de sélection suivie d'un chiffre indiquant le numéro de la mutagenèse ou du clone récolté ; S : mutant spontané ; REV : révertant.

Mutagenèses : E : mutagenèse à l'EMS ; NG : mutagenèse à la MNNG.

Sélections : BU : résistant au 5-BUdR ; FU : résistant au 5-FUdR.

(ex : C2.E2.BU1 ; C3 : clone de départ ; E2.BU1 : clone n° 1 sélectionné pour sa résistance au 5-BUdR après mutagenèse n° 2 à l'EMS).



La sélection de résistants partiels (5-BUdR 15 $\mu\text{g/ml}$) après mutagenèse permet d'obtenir de nombreux clones, affectés de façon diverse dans leur métabolisme (croissance ralentie, mutants « leaky » pour l'activité thymidine kinase, enfin mutants affectés dans une fonction non déterminée, autre que la thymidine kinase). Ces divers mutants, bien que stables dans leurs propriétés n'ont pas été étudiés de façon détaillée. Leurs caractéristiques sont intermédiaires entre celles de la souche sauvage et celles des résistants au BUdR 25 $\mu\text{g/ml}$ (C3 E21 BUH 19, fig. 2). Ces mutants ne sont pas contre-sélectionnés de façon appréciable par passage en milieu HAGT.

TABLEAU 2

Estimation des fréquences de mutation induite après mutagenèse

Les mutagenèses et les sélections sont effectuées dans les conditions décrites aux méthodes.

Souche = souche soumise à sélection après élimination des éventuels mutants spontanés présents avant la mutagenèse.

N = nombre total de cellules soumises à la sélection.

La fréquence de mutation est déterminée déduction faite des résistants spontanés apparaissant dans les témoins dans l'intervalle de temps compris entre mutagenèse et sélection.

Lorsque plusieurs manipulations ont été effectuées pour la mesure de la même fréquence de mutation induite une moyenne arithmétique des résultats est donnée.

Nombre de manipulations effectuées	Souche	Mutagenèse	Sélection	N ($\times 10^6$)	Fréquence de mutation ($\times 10^{-6}$)
3	C3	EMS 250 $\mu\text{g/ml}$	5-BUdR 25 $\mu\text{g/ml}$	8	6,3
3	C3	EMS 400 $\mu\text{g/ml}$	5-BUdR 25 $\mu\text{g/ml}$	5	14,7
2	C3	MNNG 0,5 $\mu\text{g/ml}$	5-BUdR 25 $\mu\text{g/ml}$	2,5	20,1
2	C3	EMS 400 $\mu\text{g/ml}$	5-FUdR 0,1 $\mu\text{g/ml}$	1,6	10,5
2	C3	EMS 400 $\mu\text{g/ml}$	5-IUdR 40 $\mu\text{g/ml}$	1,6	5,4
1	C3	EMS 300 $\mu\text{g/ml}$	5-BUdR 15 $\mu\text{g/ml}$	1,0	330
2	C3.E2.BU1	EMS 300 $\mu\text{g/ml}$	HAGT	1,2	18
2	C3E2.BU1.E21.Rev 7	EMS 300 $\mu\text{g/ml}$	5-BUdR 25 $\mu\text{g/ml}$	2,0	48
1	C3.E2.BU1.E21.Rev 1	EMS 400 $\mu\text{g/ml}$	5-BUdR 50 $\mu\text{g/ml}$	1,5	90
1	C3.E2.BU1.E21.Rev 1	MNNG 1 $\mu\text{g/ml}$	5-BUdR 50 $\mu\text{g/ml}$	1,5	180
2	C3.E8.BU3.S.Rev 2	EMS 300 $\mu\text{g/ml}$	5-BUdR 50 $\mu\text{g/ml}$	1,2	28

Réversion des mutations de résistance au 5-BUdR.

Dix clones indépendants, résistants au 5-BUdR 25 $\mu\text{g/ml}$ ont été soumis à sélection de révertants en milieu HAGT. Dans les conditions de sélection employées la survie des révertants n'est pas modifiée par la présence du résistants (fig. 1). Cependant il est important de renouveler fréquemment le milieu HAGT celui-ci se dégradant rapidement en début de sélection, probablement par altération de la thymidine.

Un clone résistant réverse spontanément (C3.E8BU3) avec un taux de réversion de l'ordre de grandeur de 10^{-7} /cellule/génération ; un clone réverse après mutagenèse à l'EMS (C3E2BU1) mais ne réverse pas spontanément (tabl. 2) ; enfin un

clone résistant est simultanément résistant à l'EMS (C₃E₂BU₂). Aucun des autres clones testés n'a réversé spontanément ou après mutagenèse à l'EMS.

Les divers clones résistants au 5-BUdR obtenus sont donc stables, les mutations pouvant réverser à un taux faible.

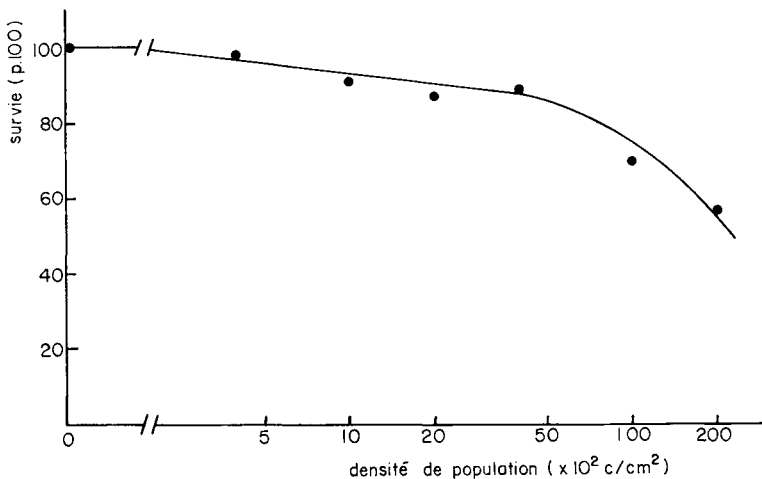


FIG. 1. — Effet de la présence de cellules résistantes à la 5-bromodéoxyuridine sur l'efficacité d'étalement d'un clone révertant en milieu HAGT

Le révertant C₃E₂BU₁E₂IREV7 est repiqué dans les conditions de clonage en milieu HAGT, en présence d'une concentration variable en résistant à la 5-bromodéoxyuridine (C₃E₂BU₁). Témoin de survie : révertant seul.

Obtention de résistants au 5-BUdR à partir des révertants

Les clones révertants se distinguent de la souche C₃ par une caractéristique importante : même après plusieurs passages en milieu HAGT, éliminant les résistants éventuels, les cultures sont progressivement envahies par des résistants au 5-BUdR 25 µg/ml alors que le clone C₃ est remarquablement stable à cet égard.

Trois tests de fluctuation ont été effectués (tabl. 3). Dans les deux premiers cas les cellules ont été clonées en milieu HAGT et différents clones ont été cultivés en absence d'agent de sélection pendant un temps court (2 repiquages) jusqu'à confluence. Les clones résistants ont été sélectionnés en MEM. S 5-BUdR 50 µg/ml. Bien qu'ils portent sur un petit nombre de résistants sélectionnés ces deux tests ont permis d'affirmer d'une part que l'apparition des résistants n'est pas due à une contamination des clones révertants dont ils proviennent, d'autre part que le caractère de résistance apparaît de façon aléatoire et n'est donc pas un phénomène d'adaptation au moment de la sélection (LURIA et DELBRUCK, 1943). Le troisième test a permis une mesure plus précise des taux de mutation dans les conditions standard de sélection.

Les mutations de résistance sont inductibles par mutagenèse EMS ou MNNG ; la mesure des fréquences des mutations induites est compliquée par l'apparition de résistants spontanés au cours du temps d'expression qui suit la mutagenèse. Les fréquences de mutations induites sont dix fois plus élevées que les fréquences de mutations de résistance induites à partir du clone C₃ (tabl. 2).

Des résistants au 5-BUdR 25 µg/ml ont pu être isolés à partir de chacun des 7 clones révertants testés, avec ou sans mutagenèse préalable à la sélection. Les clones résistants obtenus sont stables et comparables à cet égard aux clones résistants obtenus après mutagenèse du clone C3.

TABLEAU 3

Taux de mutation spontanée de résistance déterminé à partir des révertants

Dans les différents tests réalisés le nombre de divisions cellulaires effectuées par les cultures soumises à sélection est connu avec précision. La détermination des taux de mutation par cellules et par génération a donc été possible par deux méthodes : (1) en observant le nombre de clones ou aucun mutant n'est apparu ; (2) en observant le nombre de clones mutants obtenus après sélection. (LURIA et DELBRUCK, 1943). Les mesures étant effectuées sur un faible nombre de cultures indépendantes (1) est une mesure par excès.

DS/M représente le rapport de la déviation standard du nombre de colonies pour l'ensemble des clones testés sur la valeur moyenne de ce nombre de colonies par clone. La mesure de ce paramètre montre que le phénomène de résistance spontané est aléatoire, même si l'on tient compte de ce qu'une partie réduite des clones est effectivement testée pour la présence de résistants éventuels.

Mutant	C3.E2.BU1.E21.Rev 1	C3.E8.BU3.S.Rev 2	C3.E8.BU3.S.Rev 2
Nombre de clones testés	15	17	20
Population finale/clone	$3 \cdot 10^8$ C	$3 \cdot 10^8$ C	$25 \cdot 10^8$ C
Cellules testés/clone	$6 \cdot 10^5$ C	$6 \cdot 10^5$ C	$6 \cdot 10^5$ C
Efficacité d'étalement	22 %	30 %	30 %
Concentration en 5-BUdR pendant la sélection	50 µg/ml	50 µg/ml	25 µg/ml
Fraction des clones sans résistants	0,60	0,59	0,20
Nombre moyen de résistants par clone (2)	19	49	1 180
Taux de mutation (1)	$2,7 \cdot 10^{-6}/\text{cxg}$	$2,0 \cdot 10^{-6}/\text{cxg}$	$6,1 \cdot 10^{-6}/\text{cxg}$
Taux de mutation (2)	$1,5 \cdot 10^{-6}/\text{cxg}$	$3,4 \cdot 10^{-6}/\text{cxg}$	$5,4 \cdot 10^{-6}/\text{cxg}$
DS/M	1,49	2,17	1,35

*Fréquences des mutations induites
pour l'obtention de résistants au 5-IUdR et au 5-FUdR*

Les résultats sont très comparables à ceux de la sélection de résistants au 5-BUdR. Cependant plusieurs problèmes rendent plus délicate la mise au point des conditions de sélection de résistants au 5-IUdR : des concentrations élevées en drogue doivent être employées si l'on veut bloquer la croissance du clone C3 dans les conditions de sélection. A ces concentrations en 5-IUdR l'efficacité d'étalement du résistant est diminuée et les clones obtenus après sélection sont en très mauvais état.

Le 5-FUdR tue par contre très bien le clone C3, mais aux concentrations employées ($4 \cdot 10^{-8}$ M) la présence de faibles concentrations de thymidine peut masquer son effet : un milieu de sélection à base de sérum dialysé est donc nécessaire pour obtenir des conditions de sélections reproductibles. Les clones résistants obtenus

sont stables en absence de drogue. Les fréquences des mutations induites sont comparables à celles obtenues pour la sélection de clones résistants au 5-BUdR 25 $\mu\text{g/ml}$ (tabl. 2).

2. — Caractéristiques des clones mutants en culture

Résistance comparée des clones mutants aux analogues de la thymidine dans les conditions d'efficacité d'étalement.

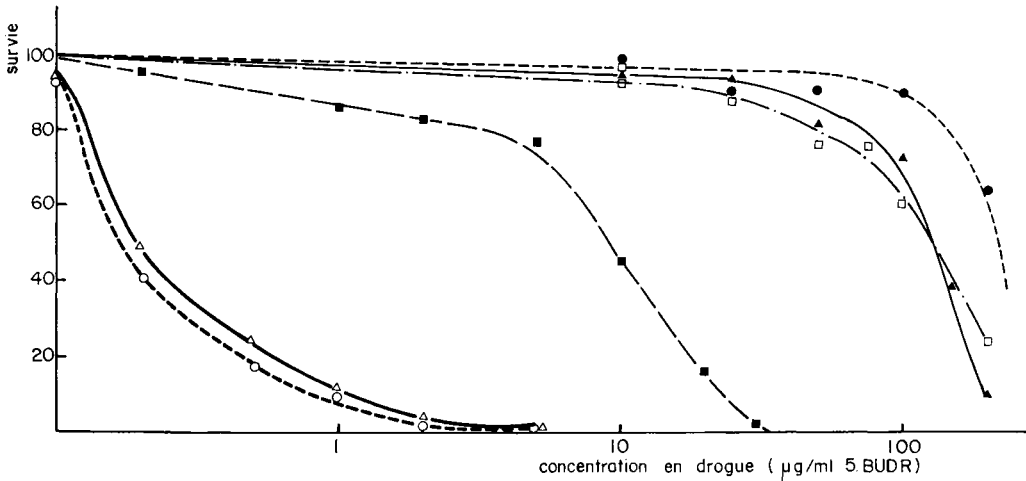


FIG. 2. — *Effet de la concentration en 5-bromodéoxyuridine sur l'efficacité d'étalement des clones mutants*

- - - - - ○ C₃
- ▲ - - - - ▲ C₃.E8BU₃
- △ - - - - △ C₃.E8BU₃.SREV₂
- - - - - ■ C₃.E8BU₃.SREV₂.E₃₀BU₁
- - - - - ● C₃.E₂₁FU₁
- - - - - □ C₃.E₂₁BUH₁₉

Les cellules sont repiquées dans les conditions de clonage en MEM.CL.6 heures plus tard le milieu MEM.S contenant la drogue à des concentrations variables est introduit (Témoin de survie : MEM.S).

Les différents clones sélectionnés pour leur résistance au 5-BUdR sont aussi résistants au 5-FUdR et au 5-IUdR dans les conditions où le clone C₃ et les clones révertants sont tués. Cette résistance croisée est observée aussi pour les clones sélectionnés pour leur résistance au 5-FUdR (tabl. 4). Alors qu'une concentration de 0,2 $\mu\text{g/ml}$ en 5-BUdR réduit la survie du clone C₃ et des clones révertants de 50 p. 100, une concentration de 100 $\mu\text{g/ml}$ est nécessaire pour produire le même effet sur la survie des clones résistants au 5-BUdR et au 5-FUdR. (fig. 2). Les seuils de résistance au 5-FUdR sont dans le même rapport : le clone C₃ et les révertants sont tués à une concentration de $4 \cdot 10^{-8}\text{M}$ alors que les clones sélectionnés pour leur résistance au 5-BUdR et au 5-FUdR ne sont tués qu'à une concentration supérieure à 10^{-5}M (fig. 3), (tabl. 4).

Une dégradation du 5-FUdR en fluorouracile pourrait expliquer la toxicité relativement importante de la drogue à l'égard des clones résistants : en particulier la thymidine phosphorylase pourrait être responsable de cette dégradation (OD'ONO-

TABLEAU 4

Effet de diverses drogues sur la croissance des mutants dans les conditions de clonage

Les milieux ont été introduits 16 heures après repiquage dans les conditions d'efficacité d'étalement.

Les résultats de la première colonne (EFF.ET) sont les mesures des efficacités d'étalement des différentes souches en MEM CL. Les autres résultats sont exprimés en pourcentage de survie par rapport à ces témoins.

HAGT : Milieu de sélection des révertants.

5-BUdR : MEM.S contenant 25 µg/ml de 5-BUdR.

5-IUdR : MEM.S contenant 20 µg/ml de 5-IUdR.

5-FUdR : MEM.S contenant 0,1 µg/ml de 5-FUdR.

TdR : MEM.CL contenant 250 µg/ml de thymidine.

TdR + CdR = MEM CL contenant 250 µg/ml de thymidine et 25 µg/ml de déoxycytidine.

8-AG = MEM.S contenant 15 µg/ml de 8-azaguanine.

ARA.C = MEM.CL contenant 2 µg/ml d'arabinofuranosylcytosine.

Souche	Milieu de test								
	EFF.ET (%)	HAGT (%)	5-BUdR (%)	5-IUdR (%)	5-FUdR (%)	TdR (%)	TdR + CdR (%)	8-AG (%)	ARA-C (%)
C3.....	31	96	0	0	0	0	105	0	0
C3.E8.BU3	29	0	95	85	83	100	110	0	0
C3.E2.BU1	22	0	60	38	66	70	—	—	—
C3.E1.FU1	29	0	85	64	58	97	88	0	0
C3.E8.BU3.S. Rev 2	30	87	0	0	0	0	108	0	0
C3.E2.BU1.E21 Rev 4	22	98	0	—	0	0	—	—	—
C3.E8.BU3.S Rev. 2. E30 BU1	27	0	89	73	90	94	84	0	0
C3.E2.BU1.E21 Rev 4. S.BU12 ..	24	0	64	—	50	72	—	—	—

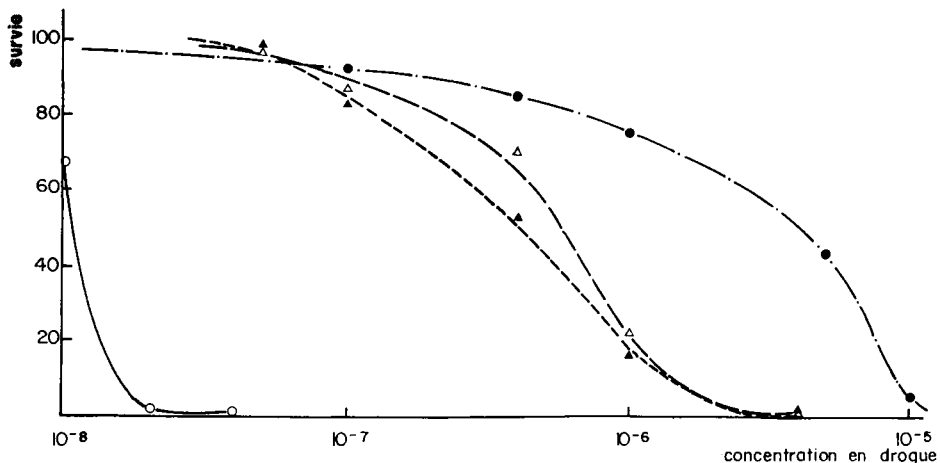


FIG. 3. — Résistance comparée au fluorouracile et au 5-FUdR du clone C3 et d'un clone sélectionné pour la résistance au 5-FUdR $4 \cdot 10^{-7}M$

- ——— ○ clone C3, résistance au 5-FUdR
- △ ——— △ clone C3, résistance au fluorouracile
- ——— ● clone C3.ErFUr, résistance au 5-FUdR
- ▲ ——— ▲ clone C3.ErFUr, résistance au fluorouracile

Les manipulations sont effectuées en MEM CLD dans les conditions de clonage témoin de survie : MEM CLD seul

VAN et NEUHARD, 1970). Cependant l'addition d'uracile dans le milieu de culture ne modifie pas cette toxicité du 5-FUdR.

Utilisation de la thymidine exogène.

Le 5-BUdR, le 5-FUdR et le 5-IUdR sont des drogues de structure analogue à celle de la thymidine. Les résistants à ces drogues sont généralement altérés dans le métabolisme de la thymidine exogène (KIT *et al.*, 1963). Deux observations permettent de vérifier cette hypothèse dans les conditions de culture.

La thymidine concentrée ($10^{-3}M$) bloque la biosynthèse de l'ADN (XÉROS, 1962) et ce blocage peut être reversé par addition de 2'-déoxycytidine (tabl. 4). Les clones résistants au 5-BUdR ou au 5-FUdR ne sont pas sensibles à cet effet toxique contrairement au clone C3 et aux clones révertants : le métabolite intervenant dans ce mécanisme d'inhibition, la thymidine triphosphate (HARTMAN, 1970), n'est donc pas synthétisé en quantité suffisante chez le résistants.

L'étude de l'incorporation en culture, de thymidine radioactive dans les acides nucléiques montre que les clones résistants au 5-BUdR incorporent la thymidine tritiée à un rythme très ralenti (fig. 4), inférieur à 5 p. 100 des incorporations de la

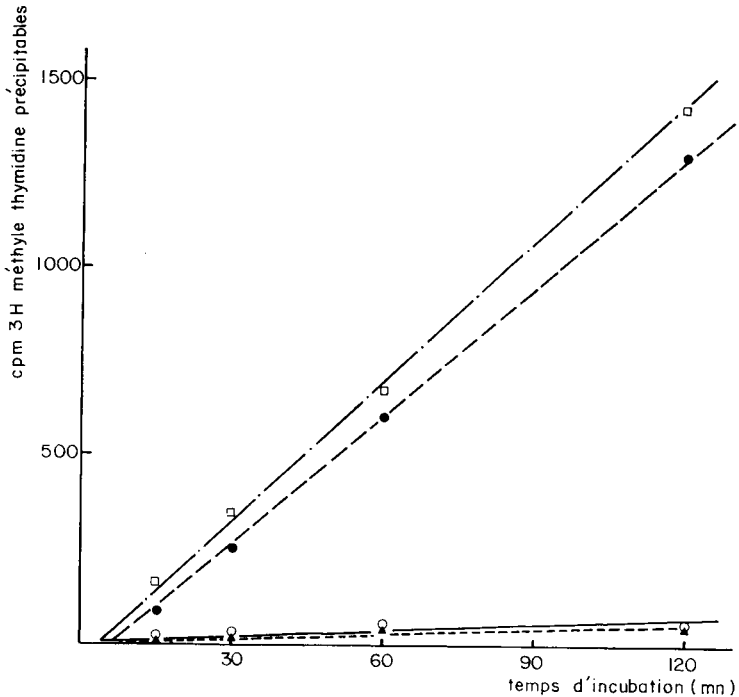


FIG. 4. — Incorporations de 3H -méthyle thymidine par les différents types de mutants obtenus

Les incorporations ont été effectuées dans les conditions décrites aux méthodes. Afin de comparer les vitesses d'incorporation des différentes souches des cultures témoins ont été incubées en présence de ^{14}C -8-hypoxanthine $0,1 \mu Ci/ml$ $10^{-8}M$, pendant une heure. Les incorporations de 3H -méthyle thymidine sont exprimées en CPM $^3H/100$ CPM ^{14}C précipitables incorporés dans les cultures témoins en une heure.

- — — — □ C3
- — — — ○ C3 E8BU3
- — — — ● C3 E8BU3 SREV2
- ▲ - - - - - ▲ C3 E8BU3 SREV2 E30BU1

souche sauvage et des révertants. En contre partie, aucune différence notable dans le rythme d'incorporation de l'uridine et de l'hypoxanthine radioactives n'a pu être mise en évidence entre les différents mutants et le clone C3.

Comparaison des effets de l'aminoptérine sur le clone C3 et les clones résistants

L'aminoptérine bloque la synthèse endogène d'hypoxanthine, de glycine et de thymidine (BALIS, 1968) ; en présence de ces trois métabolites les efficacités d'étalement du clone C3 et des clones révertants ne sont pas affectées ; par contre les divers clones résistants testés sont incapables de proliférer dans ces conditions (tabl. 4).

Alors qu'une concentration en thymidine de $5 \cdot 10^{-7}M$ permet de restaurer une efficacité d'étalement normale du clone C3 repiqué en milieu HAG (milieu HAGT où la thymidine est omise) des concentrations supérieures à $10^{-4}M$ ne permettent pas la croissance des résistants dans ce milieu (fig. 5).

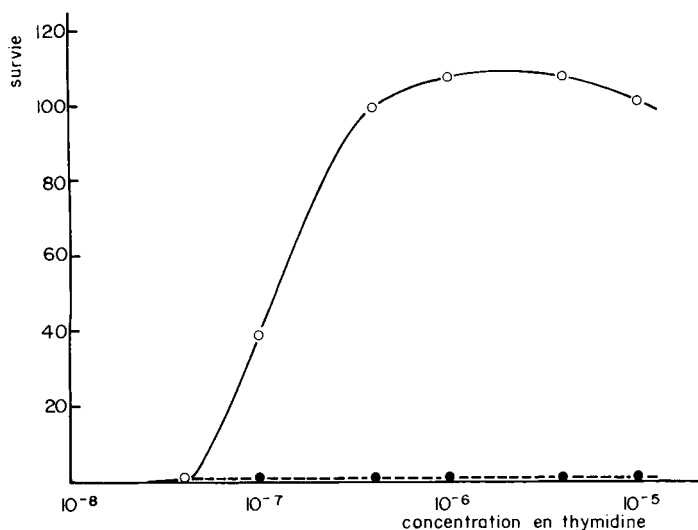


FIG. 5. — Effet de la présence de thymidine exogène sur l'efficacité d'étalement de cellules dont la synthèse de thymidine est bloquée par l'aminoptérine

Les cellules sont repiquées dans les conditions de clonage en MEM.CL. 6 heures plus tard les cellules sont lavées dans la solution saline de Hanks et le milieu MEM.CL D. contenant de l'hypoxanthine $10^{-4}M$, de la glycine $5 \cdot 10^{-4}M$, de l'aminoptérine $5 \cdot 10^{-4}M$ et une concentration variable en thymidine est ajoutée. (Témoin de survie : MEM.CL.).

○ ——— ○ C3
● - - - - ● C3 E8 BU3

Cet ensemble de résultats montre que les résistants au 5-BuDR et au 5-FuDR sont affectés dans la voie d'utilisation de la thymidine exogène.

Courbes de croissance comparées dans différents milieux de sélection.

La mesure des temps de doublement des clones mutants en milieu de sélection de résistants ou de révertants donne des résultats en accord avec les observations précédentes. La thymidine et ses analogues ne sont pas incorporés par les résistants (tabl. 5). Les rythmes de prolifération de clone C3 et des révertants sont légèrement ralentis en milieu HAGT sans modification appréciable de la densité de population

à confluence. Le résistant est plus rapidement tué en milieu HAGT que ne sont le clone C3 et les clones révertants en présence de 5-BUdR : dans ce dernier cas une à deux divisions cellulaires s'effectuent entre l'introduction du 5-BUdR et l'arrêt de croissance.

TABLEAU 5

Caractéristiques de la croissance des différents types de mutants dans les conditions de sélection

Les temps de doublement ont été déterminés graphiquement dans la partie exponentielle des courbes de croissance et sont exprimés en heures.

La densité cellulaire maximum atteinte par les cultures est exprimée en nombre de cellules par cm^2 . Les milieux de test ne sont pas renouvelés au cours de la croissance.

T représente le temps écoulé entre le repiquage et l'obtention de la densité cellulaire maximale.

Souche	Milieu	Temps de doublement	Densité cellulaire maximale ($\times 10^4$)	T
C3	MEM.S.....	9,5	5,1	48
	MEM.S 5-BUdR 25 $\mu\text{g/ml}$...	24,0	1,1	44
	HAGT	12,0	4,8	60
C3.E8.BU3	MEM.S.....	13,5	5,1	60
	MEM.S 5BUdR 25 $\mu\text{g/ml}$...	12,0	4,4	60
	HAGT	∞	0,4	10
C3.E8.BU3.S.Rev 2	MEN.S.....	10,5	5,9	60
	MEM.S 5-BUdR 25 $\mu\text{g/ml}$...	23,0	1,1	48
	HAGT	11,5	5,6	60
C3.E8 BU3 S Rev 2.E30 BU1	MEM.S.....	9,0	5,9	50
	MEM.S 5-BUdR 25 $\mu\text{g/ml}$...	9,5	5,9	56
	HAGT	∞	0,4	24

3. — Dosage de l'activité thymidine kinase des différents clones obtenus

Conditions de dosage.

Les clones résistants au 5-BUdR ou au 5-FUdR n'incorporent pas la thymidine exogène. Les deux hypothèses les plus simples concernant le mécanisme de blocage des incorporations sont d'une part l'absence de perméation pour la thymidine et d'autre part l'absence d'enzyme convertissant la thymidine en thymidylate, ces deux mécanismes pouvant être liés (SCHUSTER et HARE, 1971).

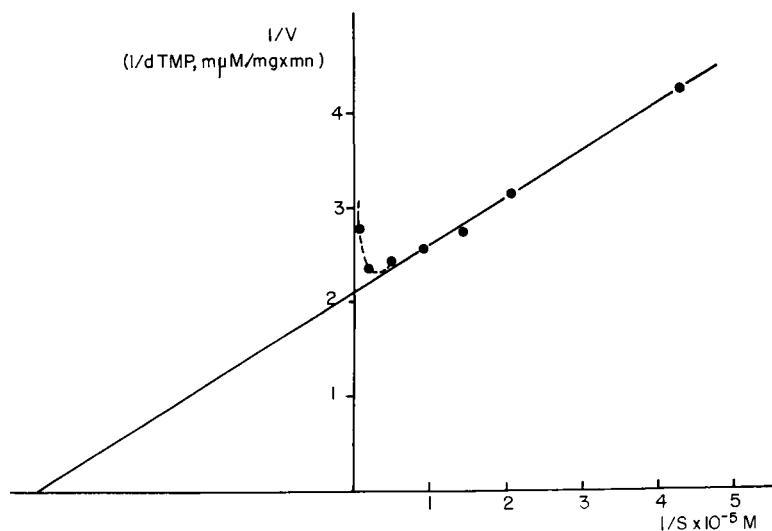
La seconde hypothèse est relativement simple à tester ; il faut cependant assurer au préalable la mise au point de méthodes de dosage reproductibles. Le tableau 6 montre que l'enzyme est instable et supporte en particulier assez mal les congélations et passages à température ambiante, surtout en absence de substrat. Les extraits enzymatiques sont donc préparés en présence de thymidine 10^{-4}M (BRESNICK et THOMPSON, 1965) et sont dosés dans les 4 heures qui suivent la préparation de l'extrait. La réaction est immédiatement démarrée après addition de l'enzyme à 4°C , la vitesse de réaction à 4°C représentant 5 p. 100 de la vitesse de réaction à 37°C .

TABLEAU 6

Effet de divers facteurs sur la mesure de l'activité de thymidine kinase

Le bruit de fond des incorporations est relativement important (2 p. 100 des CPM incorporables) ; il est dû à une adsorption résiduelle de la thymidine sur les filtres, non éliminée après lavage. Il est très stable pour une manipulation donnée. Les mesures d'activité enzymatiques des extraits sont effectuées par différence (avec ou sans ATP), la quantité d'ATP présente dans les extraits étant négligeable.

Incubation	CPM	CPM-B	P. 100 d'activité résiduelle
Mélange complet	3 380	3 080	100
Sans enzyme (B)	300	—	—
Sans ATP	315	15	0,5
ATP $10^{-4}M$	580	280	9,1
Enzyme conservé 4 h à $4^{\circ}C$..	3 410	3 110	101
Enzyme conservé 4 h à $37^{\circ}C$.	530	230	6,5
Enzyme conservé 24 h congelé à $-20^{\circ}C$	2 640	2 340	76,0

FIG. 6. — Détermination du K_m de la thymidine kinase pour la thymidine

Un extrait enzymatique de cellules incubées en milieu HAGT en phase exponentielle a été préparé dans le tampon d'homogénéisation ne contenant pas de thymidine. La quantité de thymidine introduite avec l'extrait a été négligée (l'extrait enzymatique est diluée 100 fois dans ces conditions d'incubation).

Le substrat froid est introduit à concentration variable en présence de $3H$ méthyle thymidine à concentration constante. La réaction est démarrée par addition d'enzyme et arrêtée dans la glace puis des aliquotes sont immédiatement déposés sur papier Wathman DE 81.

Les résultats sont exprimés en millimicromoles de déoxythymidine monophosphate formées par minute et par milligramme de protéine. La cinétique d'incorporation n'est pas « michaelienne » aux fortes concentrations en substrat.

L'enzyme se dénature dans les conditions d'incubation à des températures supérieures à 40°C. L'étude de la vitesse de réaction en fonction de la concentration en thymidine montre que le substrat est inhibiteur de la réaction enzymatique aux fortes concentrations, la vitesse maximum de réaction étant atteinte pour une concentration en thymidine de $4 \cdot 10^{-8}$ M. Le K_M de l'enzyme pour la thymidine est de $2,5 \cdot 10^{-8}$ M (fig. 6).

Régulation de l'activité thymidine kinase.

Les constituants du milieu de culture (EKER, 1966 a ; la phase de croissance cellulaire (WEISSMAN *et al.*, 1960) et l'étape du cycle cellulaire dans lequel une cellule se trouve (BRENT *et al.*, 1965) influent sur l'activité thymidine kinase présente dans cette cellule.

TABLEAU 7

*Effet des conditions de culture
sur l'activité thymidine kinase du clone C3 et d'un clone révertant spontané*

Les activités enzymatiques sont exprimées en micromoles de thymidylate formé par milligramme de protéine et par minute ($\mu\mu\text{M}/\text{mg}/\text{mn}$).

HGT : Milieu HAGT de sélection des révertants dans lequel l'aminoptérine est omise.

MEM.S + 5-BUdR : milieu de sélection des résistants au BUdR 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

MEM.S. + H + A : Milieu de sélection contenant de l'hypoxanthine 10^{-4} M et de l'aminoptérine $2 \cdot 10^{-6}$ M.

Souche	Milieu de culture	Phase de croissance	Activité enzymatique
C3	MEM.CL	Stationnaire	96
C3	MEM.CL	Exponentielle	204
C3	HGT	Stationnaire	308
C3	HGT	Exponentielle	330
C3	MEM.S + 5-BUdR	Exponentielle	330
C3	MEM.S + H + A	Exponentielle	570
C3	HAGT	Exponentielle	640
C3.E8 BU3.S Rev 2	MEM.CL	Stationnaire	20
C3.E8 BU3.S Rev 2	HGT	Exponentielle	148
C3.E8 BU3.S Rev 2	HAGT	Exponentielle	320

Les effets du milieu de culture et de la phase de croissance sur l'activité de la thymidine kinase ont été testés (tabl. 7) sur le clone C3. Contrairement aux observations d'EKER (1966) la présence de thymidine exogène n'inhibe pas la synthèse de l'enzyme, mais semble au contraire maintenir un niveau stable d'activité enzymatique même en phase stationnaire. La thymidine joue donc probablement un rôle protecteur de l'enzyme dans les conditions de confluence. (WEISSMAN, 1960 ; LITTLEFIELD, 1965). L'aminoptérine seule ou en présence de thymidine, accroît de façon très nette le niveau d'activité des extraits ; son effet se manifeste en moins de 24 heures de traitement des cultures. Une protection de l'activité enzymatique par l'aminoptérine, analogue de celle exercée par la thymidine, ne peut être exclue.

Comparaison des activités enzymatiques des différents mutants.

Les activités thymidine kinase des clones révertants et du clone C3 sont inducibles ou protégées par l'aminoptérine (tabl. 7). Les clones révertants ont un niveau d'activité enzymatique voisin de 35 p. 100 de celui du sauvage.

TABLEAU 8

Activités enzymatiques de différents clones mutants

Les activités enzymatiques sont mesurées après croissance en milieu HGT (voir méthodes) sont exprimées par $\mu\text{M}/\text{mg}/\text{mn}$. DL 10 p. 100 = concentration en 5-BUdR réduisant la survie du clone testé à 10 p. 100 de sa valeur en MEM.CL dans les conditions de clonage.

HAGT : croissance en milieu de sélection des révertants (+ : croissance ; - : cellules tuées).

Souche	DL ₁₀ (%)	HAGT	Activité spécifique	P. 100 témoin
C3	1 g/ml	+	380	100
C3.E8 BU3	200 $\mu\text{g}/\text{ml}$	—	2	0,5
C3.E2 BU1	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	—	12	3
C3.NG2 BU1	300 $\mu\text{g}/\text{ml}$	—	0	0
C3.E2 FU1	300 $\mu\text{g}/\text{ml}$	—	6	1,5
C3.E21 BUH19	25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	±	326	87
C3.E2 BU1.E21 Rev 1	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	—	125	33
C3.E2 BU1.E21 Rev 4	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	+	163	43
C3.E8 BU3.S Rev 2	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	+	148	39
C3.E2 BU1.E21 Rev 1.NG24 BU2	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	—	8	2
C3.E2 BU1.E21 Rev 7.E28 BU21	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	—	2	0,5
C3.E2 BU1.E21 Rev 4.S BU11	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	—	0	0
C3.E8 BU3.S Rev 2.E30 BU1	250 $\mu\text{g}/\text{ml}$	—	3	0,8

Les résistants étant affectés dans leur croissance en présence d'aminoptérine les extraits ont été dosés après croissance en milieu HGT, en fin de phase exponentielle. Tous les clones résistants au 5-BUdR ou au 5-FUdR testés sont déficients en thymidine kinase. Le résistants partiel C3.E21BUH19 (fig. 2) à un niveau d'activité identique au clone C3, il est donc affecté sur une autre fonction que les clones résistants au 5-BUdR 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. (BRESLOW et GOLDSBY, 1969). La capacité de prolifération en milieu HAGT des clones testés (tabl. 8) est toujours associée à la présence d'une activité thymidine kinase importante dans les extraits cellulaires correspondants.

DISCUSSION

Nature héréditaire et spécifique de la résistance aux analogues de la thymidine

Des clones affectés dans le métabolisme de la thymidine sont obtenus à partir de la souche BHK 21/13. Des clones, sélectionnés pour leur résistance au 5-BUdR ou au FUdR conservent leurs caractéristiques de résistance même après croissance prolongée en absence d'agent de sélection. Le mécanisme de résistance est donc héréditaire.

La résistance aux drogues est parfois provoquée par une modification aspécifique de la perméation cellulaire (MEZGER FREED, 1971). Le mécanisme de résistance des clones décrits ici est au contraire spécifique : les clones résistants sont incapables d'utiliser la thymidine exogène ; ils ne sont pas affectés dans le métabolisme de l'hypoxanthine, de l'uridine ou du glucose exogènes ; ils sont résistants aux analogues structuraux de la thymidine et à eux seuls ; enfin ils sont déficients en activité thymidine kinase.

Divers essais de distinction entre clones révertants et sauvages dans les conditions de culture ont échoué. Des clones partiellement résistants au 5-BUdR 15 µg/ml sans être affectés dans l'activité thymidine kinase ont été isolés. Ils sont à rapprocher des souches décrites par BRESLOW et GOLDSBY (1969). L'apparition de tels clones résistants à une fréquence élevée après mutagenèse est certainement un obstacle à une sélection efficace des auxotrophes par la technique de traitement au 5-BUdR décrite par KAO et PUCK (1968).

Origine génétique du mécanisme de résistance

Les tests de fluctuation effectués sur les clones montrent que les clones résistants apparaissent de façon aléatoire dans les cultures, en absence d'agent de sélection. Les clones résistants ne sont pas induits par l'agent de sélection, le mécanisme de résistance n'est donc pas une simple adaptation à la croissance en présence de drogue au cours de la sélection.

Le mécanisme de résistance est par contre induit par des drogues (EMS, MNNG) ayant un pouvoir mutagène sur les bactéries et les cellules eucaryotes (CHU et MALLING, 1968).

Le mécanisme héréditaire de résistance aux analogues toxiques de la thymidine peut donc s'interpréter en termes génétiques.

Gènes affectés par les mutations

Plusieurs hypothèses permettent d'expliquer l'apparition des mutations de résistance en culture ; celles-ci peuvent être la conséquence d'haploïdisations partielles par perte de chromosomes, de délétions ou enfin de mutations ponctuelles affectant le génome cellulaire.

L'examen des caryotypes des clones mutants par les techniques de banding (CABOCHE, 1973) est en cours afin d'observer d'éventuelles modifications. Cependant un mécanisme de mutations par délétion localisée ou généralisée à une paire de chromosomes est peu compatible avec l'existence de révertants. S'il est certain que le mécanisme de résistance aux analogues de la thymidine est d'origine génétique, seule la mise en évidence d'une thymidine kinase partiellement déficiente chez certains mutants permettrait d'affirmer avec certitude que les mutations affectent les gènes de structure de l'enzyme (enzyme thermosensible, K_M modifié, séquence protéique altérée). La thymidine kinase est en effet une enzyme dont la synthèse est soumise à régulation : les dérivés phosphorylés de la thymidine (EKER, 1965) en particulier la thymidine triphosphate, interviennent dans un mécanisme de répression de la synthèse de la thymidine kinase (WEISSMAN, 1960 ; BRENT, 1965).

A défaut de preuves, les présomptions en faveur de mutations affectant les gènes de structure sont les suivantes : le taux de mutation de résistance du clone

sauvage ($5 \cdot 10^{-11}$ /cellule/génération; CLIVE *et al.*, 1972) est approximativement le carré du taux de mutation de résistance des révertants ($5 \cdot 10^{-8}$ /cellule/génération). Les clones révertants sont donc génétiquement bien distincts du clone sauvage. L'activité thymidine kinase des clones révertants représente 35 p. 100 de l'activité du clone sauvage. Elle conserve les mêmes caractères d'inductibilité en milieu HAGT que ceux du clone sauvage. Ces divers résultats sont peu compatibles avec l'hypothèse de mutations affectant les gènes de régulation. En particulier les révertants obtenus à partir de mutants affectés sur un gène répresseur sont le plus souvent constitutifs.

Les gènes impliqués dans le mécanisme de résistance sont autosomaux (MILLER *et al.*, 1971). Ils sont donc probablement présents à double exemplaire dans la cellule.

Le mécanisme de résistance au 5-BUdR peut donc s'interpréter dans les termes suivants : les deux gènes de structure de la thymidine kinase doivent être inactivés pour obtenir un clone résistant aux analogues toxiques de la thymidine. Les clones révertants sont hétérozygotes. Les taux de mutations spontanées et les fréquences de mutations induites sont très différentes selon qu'un ou deux gènes doivent être inactivés, ceci contrairement aux observations faites par HARRIS (1971). La contradiction entre ces résultats est peut-être liée au choix des marqueurs employés.

Mécanismes des mutations

Les mutations spontanées à partir des hétérozygotes peuvent avoir deux origines principales : modification au niveau du gène de structure fonctionnel restant ; crossing over somatique permettant l'obtention d'un homozygote résistant. La mesure du taux de mutation spontanée de résistance ($5 \cdot 10^{-8}$ /cellule/génération) ne permet pas de trancher définitivement entre ces deux hypothèses. Un taux de crossing-over somatique de cet ordre de grandeur est faible mais compatible avec les mesures faites chez la levure (YOSR *et al.*, 1967). Les résultats peuvent s'interpréter en supposant le gène proche du centromère ou les taux de crossing-over plus faibles pour les cellules de mammifère en culture que chez les levures.

Le taux de mutation spontanée de résistance à la 8-azaguanine varie de 10^{-8} à 10^{-9} /cellule/génération selon les souches cellulaires employées (CHU *et al.*, 1968) (MORROW, 1970). Cette mesure donne un ordre de grandeur de la fréquence des mutations spontanées affectant un seul gène de structure. Les taux de mutation mesurés à partir des hétérozygotes sont élevés mais compatibles avec ces résultats. Avec cette hypothèse, l'obtention de clones résistants spontanés à partir du clone sauvage hétérozygote se produirait à un taux de $2,5 \cdot 10^{-11}$ /cellules/génération, hypothèse compatible avec les résultats de CLIVE (1972).

Les mesures de fréquence de mutations induites ne permettent pas non plus de trancher entre les deux hypothèses. La mutagenèse à l'EMS accroît les taux de crossing-over (YOSR *et al.*, 1967) aussi bien que les taux de mutations affectant les gènes de structure. Le mécanisme d'apparition des clones résistants après mutagenèse du clone sauvage peut donc avoir pour origine une mutation suivie d'un crossing-over ou d'une seconde mutation. Dans les deux cas l'accumulation d'hétérozygotes dans les cultures dites sauvages est probablement un phénomène préalable à l'apparition des clones résistants.

La mise en évidence de crossing-over dans les cultures de cellules somatiques nécessite donc l'emploi de méthodes plus élaborées : l'obtention de clones hétérozygotes pour deux marqueurs d'un même chromosome autosomal pourrait faciliter de telles observations.

Reçu pour publication en octobre 1973.

SUMMARY

SELECTION AND CHARACTERIZATION OF 5-BROMODEOXYURIDINE OR 5-FLUORODEOXYURIDINE RESISTANT CLONES AFTER MUTAGENESIS OF BHK 21/13 CELLS

Resistant clones to 5-bromodeoxyuridine (25 µg/ml) have been selected after mutagenesis of BHK 21/13 strain. No spontaneous resistant clone has been isolated in the same selection procedure. Among ten clones tested, one of them is spontaneously revertant and one is induced to reversion by mutagenesis. The revertants' spontaneous mutation rate of resistance is estimated by fluctuation test ($5 \cdot 10^{-6}$ per cell and per generation). The estimated mutation frequencies induced by mutagen on revertants are about ten time higher than on the wild type.

Clones selected for their 5-bromodeoxyuridine resistance are cross resistant to others thymidine analogues (5-fluorodeoxyuridine and 5-iododeoxyuridine). This is also the case of 5-fluorodeoxyuridine resistant clones. The resistant clones are not able to use exogenous thymidine, they do not grow in HAT medium and growth is not inhibited by concentrated thymidine. Thymidine kinase activity of resistant clones is always 3 p. 100 lower than the wild type one.

In growth conditions, revertants clones cannot be distinguished from the wild type. Their thymidine kinase activity is 35 p. 100 the wild type one. The enzyme is inducible by aminopterin which blocks endogenous thymidine biosynthesis. No mutant of the enzyme inducibility has been selected. The nature of involved mutations is discussed.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BALIS M. E., 1968. Antagonists and nucleic acids. *North holland publishing company-Amsterdam*, 89-97.
- BIRNBOIM H. C., 1970. Optimal conditions for counting of precipitated ^3H -RNA on fiber filters. *Analyt. Biochem.* **37**, 178-182.
- BRENT T. P., BUTTLER J. A. N., CRATHORN A. R., 1965. Variations in phosphokinase activity during the cell cycle in synchronous populations of Hela cells. *Nature*, **207**, 176-177.
- BRESLOW R. E., GOLDSBY R. A., 1969. Isolation of thymidine transport mutants of chinese hamster cells. *Expl. cell, res.* **55**, 339-346.
- BRESNICK E., THOMPSON U. B., 1965. Properties of deoxythymidine kinase partially purified from animal tumors. *J. Biol. Chem.* **240**, 3967-3974.
- BOLLUM F. J., POTTER V. R., 1958. Incorporation of thymidine into deoxyribonucleic acid by enzymes from rat tissues. *J. Biol. Chem.* **233**, 478-482.
- BREITMAN T. R., 1963. The feedback inhibition of thymidine kinase. *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 153-155.
- CABOCHE M., 1973. Conditions de clonage et de culture en suspension de la souche BHK 21/13. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* (à paraître).
- CHU E. H. Y., MALLING H. V., 1968. Mammalian cell genetics. II. Chemical induction of specific mutations in chinese hamster cells *in vitro*. *Proc. Natn. Acad. Sci.* **61**, 1306-1312.
- CHU E. H. Y., BRIMER P., JACOBSON K. B., MERRIAM V., 1969. Mammalian cell genetics. I. Selection and characterization of mutations auxotrophic for L. glutamine or resistant to 8-azaguanine in chinese hamster cells *in vitro*. *Genetics*, **62**, 359-377.
- CLIVE D., FLAMM W. G., MACHESKO M. R., BERNHEIM N. J., 1972. A mutational assay system using the thymidine kinase locus in mouse lymphoma cells. *Mutation Res.*, **16**, 77-887.

- EAGLE H., 1959. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science* **130**, 432-437.
- EKER P., 1966. Studies on thymidine kinase of human liver cells in culture. *J. Biol. Chem.* **241**, 659-662.
- HARRIS M., 1971. Mutation rates in cells at different ploidy levels. *J. Cell. physiol.* **78**, 117-184.
- HARTMAN S. C., 1970. Purines and pyrimidines in GREENBERG, *Metabolic pathways, Nucleic acids protein synthesis, and coenzymes*. 3^e édition Academic Press New York and London. 56-58.
- HUBERMAN E., HEIDELBERGER C., 1972. The mutagenicity to mammalian cells of pyrimidine nucleoside analogues. *Mutation Res.* **14**, 130-132.
- KAO F. T., PUCK T. T., 1968. Genetics of somatic mammalian cells. VII. Induction and isolation of nutritional mutants in chinese hamster cells. *Proc. Natn. Acad. Sci.* **60**, 1275-1281.
- KIT S., DUBBS D. R., PIEKARSKI L. J., HSU T. C., 1963. Deletion of thymidine kinase activity from L cells resistant to bromodeoxyuridine. *Exp. Cell. Res.* **31**, 297-312.
- LITTLEFIELD J. W., 1964. Selection of hybrids from matings of fibroblasts *in vitro* and their presumed recombinants. *Science*, 145, 709.
- LITTLEFIELD J. W., 1965. Studies on thymidine kinase in cultured mouse fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta*, **95**, 14.
- LITTLEFIELD J. W., BASILICO C., 1966. Infection of thymidine kinase-deficient BHK cells with polyoma virus. *Nature*, **211**, 250-252.
- LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L., RANDALL R. J., 1951. Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265.
- LURIA S. E., DELBRUCK M., 1943. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics*, **28**, 491-511.
- MEZGER-FREED L., 1971. Puromycin resistance in haploid and heteroploid frog cells : gene or membrane determined. *J. Cell. Biol.* **51**, 3, 742-751.
- MILLER O. J., ALLDERDICE P. W., MILLER D. A., BREG W. R., MIGEON B. R., 1971. Human thymidine kinase gene locus : Assignment to chromosome 17 in a hybrid of man mouse cells. *Science*, **173**, 244-245.
- MORROW J., 1970. Genetic analysis of azaguanine resistance in an established mouse cell line. *Genetics*, **65**, 279-287.
- O'DONOVAN G. A., NEUHARD J., 1970. Pyrimidine metabolism in microorganisms. *Bacteriol. Rev.* **34**, 287-343.
- PAUL J., 1961. *Cell and tissue culture*. 2nd edition Livingstone Edinburgh and London, 206-207.
- SCHUSTER G. S., HARE J. D., 1971. The role of phosphorylation in the uptake of thymidine in mammalian cells. *In vitro*, **6**, 6, 427-436.
- STOKER M., MAC PHERSON I., 1964. Syrian hamster fibroblasts cell line BHK 21 and its derivatives. *Nature*, **203**, 1355-1357.
- TODARO G. J., ARRONSON S. A., RANDE E., 1971. Rapid detection of mycoplasma infected cell cultures. *Exp. Cell. Res.* **65**, 256-257.
- WEISSMAN S. M., SMELLIE R. M. S., PAUL J., 1960. Studies on the biosynthesis of deoxyribonucleic acid by extracts of mammalian cells. IV. The phosphorylation of thymidine. *Bioch. Biophys. Acta.*, **45**, 101-110.
- XEROS N., 1962. Deoxyriboside control and synchronization of mitosis. *Nature*, **194**, 682-683.
- YOST H. T., CHALEFF R. S., FINERTY J. P., 1967. Induction of mitotic recombination in *saccharomyces cerevisiae* by Ethyl methane sulphonate. *Nature*, **215**, 660-661.
-