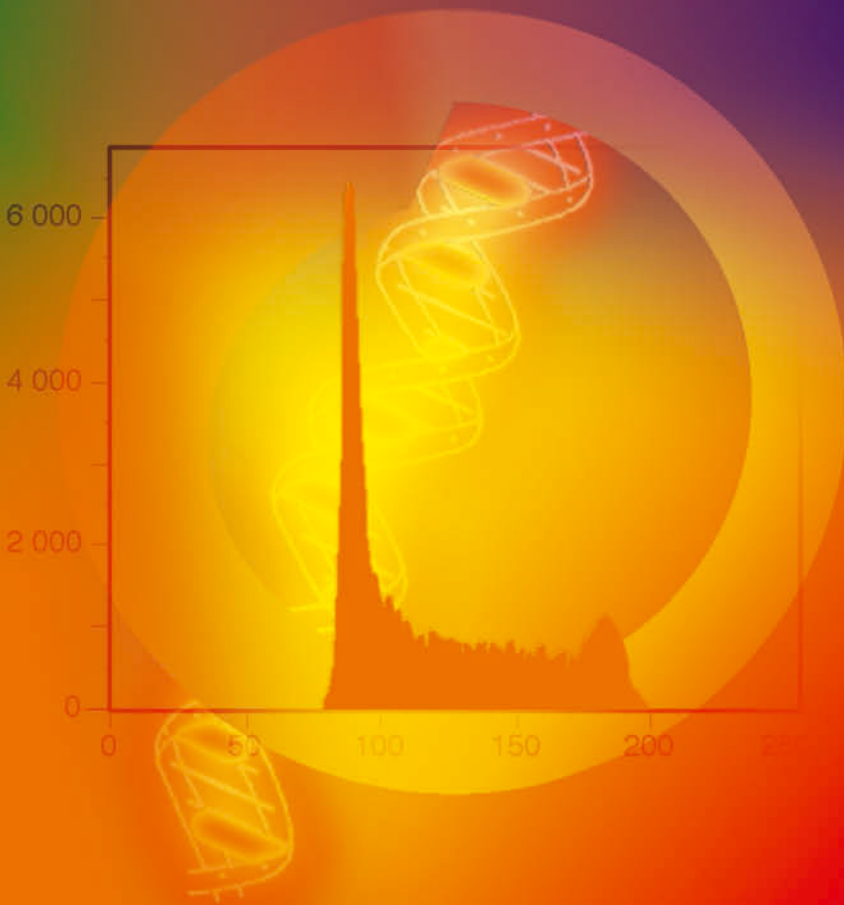


Coordonneurs

Didier Grunwald • Jean-François Mayol • Xavier Ronot

# Cycle cellulaire et cytométrie en flux



Editions  
**TEC**  
& **DOC**

**E**  
**M**  
inter

*Lavoisier*



# Cycle cellulaire et cytométrie en flux

Didier Grunwald  
Jean-François Mayol  
Xavier Ronot  
Coordonnateurs



11, rue Lavoisier  
75008 Paris

## Chez le même éditeur

*Spectrométrie de masse en couplage avec la chromatographie en phase gazeuse*  
S. Bouchonnet, 2009

*Labo-stat – Guide de validation des méthodes d'analyse*  
M. Feinberg, 2009

*Biochimie médicale – Marqueurs actuels et perspectives*  
G. Durand, J.-L. Beaudeau, 2008

*Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses et de contrôle sanitaire*  
C. Delarras, 2007

*La cytométrie en flux*  
W. Ronot, D. Grunwald, J.-F. Mayol, J. Boutonnat, 2006

*Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications*  
G. Burgot, J.-L. Burgot, 2<sup>e</sup> édition, 2006

*Biologie cellulaire – Biologie du développement*  
Académie des sciences, 2005

*Radicaux libres et stress oxydant – Aspects biologiques et pathologiques*  
J. Delattre *et al.*, 2004

*Aide-mémoire de biochimie et de biologie moléculaire*  
F. Widmer, R. Beffa, 3<sup>e</sup> édition, 2004

*Communications et signalisations cellulaires*  
Y. Combarrous, 3<sup>e</sup> édition, 2004

*Méthodologie expérimentale – méthodes et outils pour les expérimentations scientifiques*  
J.-N. Baléo *et al.*, 2003

*Absorption et fluorescence – Principes et applications*  
J.R. Albani, 2002



© LAVOISIER, 2010

ISBN : 978-2-7430-1201-4

Toute reproduction ou représentation intégrale ou partielle, par quelque procédé que ce soit, des pages publiées dans le présent ouvrage, faite sans l'autorisation de l'éditeur ou du Centre français d'exploitation du droit de copie (20, rue des-Grands-Augustins - 75006 Paris), est illicite et constitue une contrefaçon. Seules sont autorisées, d'une part, les reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective, et, d'autre part, les analyses et courtes citations justifiées par le caractère scientifique ou d'information de l'œuvre dans laquelle elles sont incorporées (Loi du 1<sup>er</sup>-juillet 1992 - art. L 122-4 et L 122-5 et Code pénal art. 425).

# Liste des auteurs

**Delphine Aldebert**

UMR CNRS 5163  
Université Joseph Fourier  
Domaine de la Merci  
38700 La Tronche  
delphine.aldebert@ujf-grenoble.fr

**Florence Bourgain-Guglielmetti**

Laboratoire de biochimie cellulaire, groupe  
cycle cellulaire  
CNRS UMR 7098  
Université Pierre et Marie Curie – Paris VI  
case courrier 265  
9, quai Saint-Bernard  
75252 Paris cedex 05

**Jean-Philippe Breittmayer**

Inserm U 576  
Hôpital de l'Archet  
151, route de St-Antoine de Ginestière  
BP 3079  
06202 Nice  
Jean-Philippe.BREITTMAYER@unice.fr

**Spencer C. Brown**

CNRS UPR 2355, IFR 87  
Institut des sciences du végétal CNRS  
Bâtiment 24  
Avenue de la Terrasse  
91198 Gif-sur-Yvette  
Spencer.Brown@isv.cnrs-gif.fr

**Olivier Catrice**

CNRS UPR 2355, IFR 87  
Institut des sciences du végétal CNRS  
Bâtiment 24  
Avenue de la Terrasse  
91198 Gif-sur-Yvette

**Agnès Chassevent**

Laboratoire de cytométrie en flux  
Centre Paul Papin  
2, rue Moll  
49933 Angers cedex 9  
a.chassevent@unimedia.fr

**Cécile Cottet**

IE, responsable microscopie confocale  
INSERM U884  
Laboratoire de bioénergétique  
fondamentale et appliquée  
2280, rue de la piscine  
38041 Grenoble cedex 9  
CCottet@ujf-grenoble.fr

**Françoise Durrieu**

Institut Bergonié  
229, cours de l'Argonne  
33076 Bordeaux cedex

**Martine Ffrench**

Laboratoire central d'hématologie  
Centre hospitalier Lyon Sud  
69495 Pierre-Bénite cedex  
martine.ffrench@chu-lyon.fr

**Isabelle Gasnereau**

Laboratoire de biochimie cellulaire, groupe  
cycle cellulaire  
CNRS UMR 7098  
Université Pierre et Marie Curie – Paris VI  
case courrier 265  
9, quai Saint-Bernard  
75252 Paris cedex 05

**Gerarld Gregori**

UMR CNRS 6117  
Case 901  
Bâtiment TPR1  
163, avenue de Luminy  
13288 Marseille cedex 09  
gregori@com.univ-mrs.fr

**Didier Grunwald**

iRTSV  
CEA-Grenoble  
17, rue des Martyrs  
38054 Grenoble cedex 9  
didier.grunwald@cea.fr

**Gilles L'Allemain**

UMR CNRS 6543  
Institut de signalisation, biologie  
du développement et cancer  
Centre de biochimie  
Parc Valrose  
06100 Nice  
lallemai@unice.fr

**Bruno Layrac**

BD Biosciences  
11, rue Aristide Bergès  
38800 Le Pont de Claix  
Bruno\_LAYRAC@europe.bd.com

**Jacques Mathieu**

Département de radiobiologie  
et de radiopathologie  
Centre de recherche du service de santé  
des Armées  
24, avenue des Maquis du Grésivaudan  
BP 87  
38702 La Tronche cedex  
jdmathieu@crssa.net

**Jean-François Mayol**

Unité de radio hématologie expérimentale  
Centre de recherches du service de santé  
des Armées  
24, avenue des Maquis du Grésivaudan  
BP87  
38702 La Tronche cedex  
mayol@crssa.net

**Peter Mergaert**

CNRS UPR 2355, IFR 87  
Institut des sciences du végétal CNRS  
Bâtiment 24  
Avenue de la Terrasse  
91198 Gif-sur-Yvette

**Jean-François Mirjole**

OncoDesign  
20, rue Jean Mazen  
21076 Dijon cedex  
jfmirjole@oncodesign.com

**Jacques Robert**

Institut Bergonié  
229, cours de l'Argonne  
33076 Bordeaux cedex  
robert@bergonie.org

**Xavier Ronot**

Laboratoire de dynamique cellulaire  
École pratique de hautes études  
IFRT 130, UMR CNRS 5525  
Université Joseph Fourier  
Domaine de la Merci  
38706 La Tronche cedex  
xavier.ronot@ujf-grenoble.fr

**Béatrice Satiat-Jeunemaitre**

CNRS UPR 2355, IFR 87  
Institut des sciences du végétal CNRS  
Bâtiment 24  
Avenue de la Terrasse  
91198 Gif-sur-Yvette

**Céline F. Sautel**

Laboratoire adaptation et pathogénie  
des micro-organismes  
CNRS UMR 5163  
Institut J Roget  
BP 170  
Grenoble cedex 9  
sautel.celine@gmail.com

**Joëlle Sobczak-Thépot**

Université Pierre et Marie Curie  
Laboratoire de biologie du développement  
CNRS UMR 7622  
9, quai Saint-Bernard  
75005 Paris  
Joelle.Sobczack\_Thepot@upmc.fr

**Sonja Siljak-Yakovlev**

Laboratoire écologie, systématique  
et évolution  
UMR-CNRS 8079  
Bâtiment 360  
Université de Paris-Sud XI  
91405 Orsay cedex

**Lionel Valenti**

Sedifa-Laboratoire  
4, avenue du Prince héréditaire Albert  
98000 Monaco

# *Avant-propos*

Depuis l'introduction de la cytométrie en flux (CMF) en biologie cellulaire, les applications n'ont cessé de croître. Parmi celles-ci, l'analyse du cycle cellulaire constitue un des principaux domaines d'investigation.

La compréhension de ce mécanisme essentiel, autant pour le développement que pour la survie des organismes, a été marquée par plusieurs étapes :

- en 1882, mise en évidence des différents aspects morphologiques de la mitose (du grec *μυτος* : filament) et de l'interphase (Flemming, 1882) ;
- en 1948, découverte, par Boivin et Vendrely, des phases pré-mitotique et post-mitotique caractérisées par deux intervalles ou « gaps », entre la mitose et la synthèse de l'ADN d'une part, et entre la synthèse de l'ADN et la mitose, d'autre part ;
- en 1953, localisation, par Howard et Pelc, de la synthèse d'ADN pendant l'interphase et subdivision du cycle cellulaire en quatre phases : G1, S, G2 et M ;
- en 1957, introduction, par Quastler et Sherman, de la première méthode d'étude quantitative du cycle cellulaire, fondée sur l'incorporation de thymidine tritiée au sein de l'ADN pendant la phase S et l'étude de son évolution au cours du temps ;
- en 1965, le développement de la CMF, née des premiers essais de numération cellulaire automatisée décrits par Moldavan en 1934, marqua un changement d'orientation important dans les techniques de cinétique cellulaire, celle-ci étant fondée sur la substitution du marquage radioactif de l'ADN par un marquage fluorescent ;
- en 1969, Van Dilla sera le précurseur des mesures d'ADN par fluorescence, puisqu'il a été le premier à démontrer une relation linéaire entre le contenu en ADN et l'intensité de la fluorescence fournie par des cellules dont l'ADN était coloré par la réaction de Feulgen. Il est aussi le précurseur des études du cycle cellulaire par le biais des histogrammes de distribution de l'ADN définissant clairement les phases G0/G1, S et G2/M du cycle cellulaire ;

- en 1971, les premières études d'actions de médicaments sur la cinétique cellulaire ont été réalisées par l'équipe de Göhde, précurseur de l'analyse du cycle cellulaire et de ses perturbations par des agents pharmacologiques ;
- en 1975, environ 20 ans après l'établissement du premier caryotype humain, une équipe pionnière dans le domaine de la CMF réalise pour la première fois un caryotype en flux (Gray *et al.*, 1975) ;
- en 1984, détermination de la ploïdie par CMF sous la forme d'un index d'ADN : rapport entre le contenu en ADN des cellules en G1 à analyser, sur le contenu en ADN de cellules normales diploïdes de référence (Hiddeman *et al.*, 1984).

Aujourd'hui, aucune étude portant sur le cycle cellulaire et ses acteurs moléculaires, sur les relations prolifération/différentiation, sur le contenu en ADN et les mesures de ploïdie, sur les dérèglements du cycle et l'oncogénèse, et bien d'autres aspects encore de cette formidable machinerie qui maintient nos organismes en vie, ne peut se passer des multiples informations fournies par la CMF. De plus, au-delà de l'outil indispensable qu'il constitue pour le chercheur fundamentaliste, la CMF appliquée à l'étude du cycle cellulaire est largement mise à contribution dans le milieu hospitalier, permettant un suivi simple et rapide des patients, dans le cas d'affections impliquant un dysfonctionnement de la prolifération.

Après un rappel théorique sur le cycle cellulaire, sur les fluorochromes spécifiques de l'ADN et les différents types d'analyse, cet ouvrage illustre différents aspects de l'analyse du contenu en ADN et son implication dans des domaines aussi variés que biologie cellulaire, pharmacologie, pathologie cellulaire, microbiologie, parasitologie ou biologie végétale.

## Bibliographie

- Bergerat JP, Barlogie B, Göhde W, Johnston DA, Drewinko B (1979). In vitro cytotoxic response of human colon cancer cells to cis-dichlorodiammineplatinum (II). *Cancer Res*, **39** : 4356-4363.
- Boivin A, Vendredly R, Vendrely C (1948). L'acide désoxyribonucléique du noyau cellulaire dépositaire des caractères héréditaires ; arguments d'ordre analytique. *C.R. Acad. Sci*, **226** : 1061-1063
- Flemming GW (1882). *Ze/substranz. Kern und Zell-Theilung*. Vogel leipzig, p. 2.
- Göhde W, Dittrich W (1971). Cytostatic effect of daunomycin in impulsecytometric test. *Arzneimittelforschung*, **21** : 1656-1658.
- Gray JW, Carrano AV, Steinmetz LL, Van Dilla MA, Moore DH 2nd, Mayall BH, Mendelsohn ML (1975). Chromosome measurement and sorting by flow systems. *Proc Natl Acad Sci USA*, **72** : 1231-1234.
- Howard A, Pelc SR (1953). Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity*, **6** : 261-273.
- Moldavan A (1934). Photo-electric technique for the counting of microscopical cells. *Science*, **80** : 188-189.
- Quastler H, Sherman FG (1959). Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. *Exp Cell Res*, **17** : 420-438.
- Van Dilla MA, Trujillo TT, Mullaney PF, Coulter JR (1969). Cell microfluorometry: a method for rapid fluorescence measurement. *Science*, **163** : 1213-1214.



# Table des matières

<b>Liste des auteurs</b> .....	III
<b>Avant-propos</b> .....	VII

## Chapitre 1

<b>Le cycle cellulaire et sa régulation</b> ( <i>Jacques Robert et Françoise Durrieu</i> ) .....	1
Introduction .....	1
1. Les phases du cycle cellulaire .....	2
1.1. La phase G1 .....	2
1.2. La phase S .....	2
1.3. La phase G2 .....	2
1.4. La phase M .....	3
2. Techniques d'étude du cycle cellulaire .....	3
2.1. Les fusions cellulaires .....	4
2.2. Les mutants thermosensibles de la levure .....	4
2.3. Études du cycle cellulaire <i>in vitro</i> .....	5
3. Les protéines effectrices du contrôle du cycle cellulaire .....	6
3.1. Les cyclines et les kinases cycline-dépendantes .....	6
3.2. Les kinases inhibitrices WEE1 et MYT1 .....	8
3.3. Les phosphatases .....	8
3.4. Les inhibiteurs protéiques des CDK .....	9
3.5. Les mécanismes biochimiques de régulation du cycle cellulaire .....	9
4. Contrôle des différentes phases du cycle cellulaire .....	10
4.1. La transition G1 → S et la synthèse de l'ADN .....	10
4.2. La transition G2 → M et la mitose .....	12
4.3. Le contrôle de l'état de l'ADN .....	14
5. Altérations oncogéniques du contrôle du cycle cellulaire .....	15
Conclusion .....	16

## Chapitre 2

### Fixation des échantillons pour l'analyse du cycle cellulaire

<i>(Cécile Cottet-Rousselle)</i> . . . . .	19
Introduction . . . . .	19
1. La fixation : ce qu'il faut savoir . . . . .	20
1.1. Les alcools . . . . .	20
1.2. Les aldéhydes . . . . .	21
1.3. La procédure de fixation . . . . .	22
2. Effet du fixateur sur l'analyse du contenu en ADN . . . . .	22
2.1. Stœchiométrie . . . . .	24
2.2. Répartition des cellules dans les phases du cycle cellulaire . . . . .	24
2.3. Coefficient de variation (CV) . . . . .	24
3. Influence du fixateur . . . . .	25

## Chapitre 3

### Les fluorochromes pour l'analyse du cycle cellulaire et de la prolifération

<i>(Jean-François Mayol)</i> . . . . .	27
1. Fluorochromes pour l'analyse du cycle cellulaire . . . . .	27
1.1. Les interactions entre l'ADN et les fluorochromes . . . . .	28
1.1.1. Les intercalants . . . . .	29
1.1.2. Fluorochromes spécifiques de paires de bases . . . . .	30
1.1.3. Notion de stœchiométrie . . . . .	30
1.2. Fluorochromes pour l'analyse mono-paramétrique du cycle cellulaire en fonction des sources d'excitation . . . . .	32
1.2.1. Source à 320-350 nm (ultraviolet) . . . . .	32
1.2.2. Source à 405 nm (violet) . . . . .	34
1.2.3. Source à 488 nm (bleu) . . . . .	35
1.2.4. Source à 633 nm (rouge) . . . . .	39
1.3. Fluorochromes utilisés pour une analyse multiparamétrique du cycle cellulaire . . . . .	40
1.3.1. Co-marquage de l'ADN et de l'ARN avec l'acridine orange . . . . .	40
1.3.2. Marquage de l'ARN avec la pyronine Y . . . . .	41
2. Fluorochromes pour l'analyse de la prolifération . . . . .	42
2.1. Les sondes polaires . . . . .	43
2.1.1. CFSE ou CFDA-SE . . . . .	43
2.1.2. Carboxy-DFFDA, SE . . . . .	45
2.1.3. Diacétate de carboxyéosine succinimidyl ester . . . . .	45
2.1.4. Acétate de SNARF-1 acide carboxylique succinimidyl ester . . . . .	45
2.1.5. DDAO-SE . . . . .	45
2.2. Les sondes lipophiles . . . . .	46
2.2.1. La famille des PKH . . . . .	46
2.2.2. DiO, DiL, DiD . . . . .	47
2.3. Autres types de fluorochromes pour l'étude de la prolifération : les quantum dots . . . . .	47

3. Compensations de fluorescence et analyse du cycle cellulaire . . . . .	48
4. Notions de sécurité pour l'utilisation des fluorochromes du cycle cellulaire . . . . .	50
4.1. Manipulation de ces fluorochromes . . . . .	50
4.2. Nettoyage de l'environnement de travail . . . . .	50
4.3. Élimination des déchets . . . . .	50

### Chapitre 4

<b>Analyse mono- et multiparamétrique du cycle cellulaire</b> ( <i>Xavier Ronot, Jean-François Mayol, Stéphane Léonce et Didier Grunwald</i> ) . . . . .	53
1. Distribution monoparamétrique du cycle cellulaire . . . . .	53
1.1. Distribution théorique . . . . .	53
1.2. Distribution réelle . . . . .	54
1.3. Estimation des fractions de cellules dans les phases G0/1, S et G2/M . . . . .	56
1.3.1. Méthode non paramétrique, dite « du miroir » . . . . .	57
1.3.2. Méthodes paramétriques . . . . .	57
1.3.3. Polynôme du second degré . . . . .	58
1.3.4. Méthode des gaussiennes . . . . .	58
1.4. Validité des méthodes mathématiques . . . . .	59
1.5. Interprétation des histogrammes de distribution de l'ADN . . . . .	60
1.6. Pièges . . . . .	61
2. Analyse multiparamétrique . . . . .	63
2.1. Mesure de la phase S par incorporation de BrdU . . . . .	63
2.1.1. Principe du marquage BrdU . . . . .	63
2.1.2. Analyse . . . . .	64
2.1.3. Résultats . . . . .	65
2.2. Mesure de la durée du cycle . . . . .	67
2.3. Détection des cellules en quiescence . . . . .	68
2.3.1. ADN et ARN . . . . .	69
2.3.2. ADN et protéines . . . . .	69
2.3.3. ADN et métabolisme . . . . .	70
2.4. Analyse du cycle cellulaire reposant sur l'expression des cyclines et d'autres protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire . . . . .	71
2.4.1. Les cyclines . . . . .	71
2.4.2. Discrimination des G2 et des mitoses . . . . .	72
Conclusion . . . . .	73

### Chapitre 5

<b>Cytogénétique en flux</b> ( <i>Didier Grunwald</i> ) . . . . .	75
Introduction . . . . .	75
1. Préparation des chromosomes pour l'analyse en flux . . . . .	76
1.1. Choc hypotonique . . . . .	76
1.2. Broyage mécanique . . . . .	77
1.3. Milieux de dispersion et de conservation . . . . .	77
1.4. Coloration . . . . .	78

2. Analyse en flux . . . . .	79
2.1. Réglage de l'appareil . . . . .	79
2.2. Réduction du bruit de fond . . . . .	79
2.3. Taille des fichiers . . . . .	81
3. Résultats . . . . .	81
3.1. Caryotypes en flux monoparamétrés . . . . .	81
3.2. Caryotypes en flux biparamétrés . . . . .	84
4. Applications . . . . .	85
4.1. Analyse . . . . .	85
4.2. Tri de chromosomes . . . . .	85
4.3. Développements particuliers . . . . .	86
4.4. La cytogénétique en flux : état des lieux . . . . .	86

### Chapitre 6

#### **Quiescence, sénescence et mort cellulaire : des phases particulières du cycle cellulaire** (*Jean-Philippe Breittmayer et Jean-François Mayol*) . . . . . 91

Introduction . . . . .	91
1. Analyse des phénomènes de quiescence et de sénescence . . . . .	91
1.1. Double marquage des acides nucléiques à l'acridine orange . . . . .	93
1.2. Double marquage au Hoechst 33342 (ADN) et à la pyronine Y (ARN) . . . . .	94
2. Analyse de la mort cellulaire par CMF . . . . .	96
3. Les principaux marqueurs de la mort cellulaire en CMF . . . . .	100
3.1. La fragmentation de l'ADN . . . . .	100
3.1.1. La phase sub-G1 . . . . .	101
3.1.2. La méthode TUNEL . . . . .	103
3.2. L'activité caspase . . . . .	103

### Chapitre 7

#### **Analyse de la division cellulaire par dilution de fluorochrome** (*Cécile Cottet-Rousselle, Jacques Mathieu et Lionel Valenti*) . . . . . 109

Introduction . . . . .	109
1. Propriétés des fluorochromes à « dilution » . . . . .	110
1.1. Les PKH . . . . .	110
1.1.1. Caractéristiques . . . . .	110
1.1.2. Distribution intracellulaire . . . . .	111
1.1.3. Applications . . . . .	112
1.2. Le CFSE . . . . .	112
1.2.1. Caractéristiques . . . . .	112
1.2.2. Applications . . . . .	112
1.3. Les PTIR renommés CellVue . . . . .	113
1.3.1. Caractéristiques . . . . .	113
1.3.2. Applications . . . . .	114
1.4. Spectres d'excitation et d'émission . . . . .	114
1.5. Autres fluorochromes disponibles . . . . .	114
1.5.1. DiI, DiO, DiD . . . . .	114
1.5.2. Les quantum dots . . . . .	116
1.5.3. Les autres . . . . .	116

2. Conditions et protocoles de marquage . . . . .	118
2.1. Marquage aux PKH, PTIR et CellVue . . . . .	118
2.2. Marquage au CFSE . . . . .	119
2.3. Mise en culture des cellules et stimulation . . . . .	120
2.4. Immunophénotypage . . . . .	120
3. Mesure de la prolifération par CMF . . . . .	120
3.1. Mesure . . . . .	121
3.2. Analyse des résultats . . . . .	122
3.2.1. Analyse descriptive . . . . .	122
3.2.2. Analyse semi-quantitative . . . . .	123
3.2.3. Analyse quantitative . . . . .	125
4. Synthèse : avantages et limites . . . . .	126
Conclusion : comparaison sondes polaires/sondes lipophiles . . . . .	127

### Chapitre 8

<b>Analyse de la mitose et de la cytotidérèse (Joëlle Sobczak-Thépot, Isabelle Gasnereau et Florence Bourgain-Guglielmetti)</b> . . . . .	131
Introduction . . . . .	131
1. Aspects théoriques de la mitose . . . . .	131
1.1. Les stades de la mitose . . . . .	131
1.2. Le point de contrôle d'entrée en mitose (la transition G2/M) et la mitose précoce . . . . .	133
1.3. Les caractéristiques moléculaires de l'état mitotique : objectif métaphase . . . . .	135
1.4. La transition métaphase/anaphase ou l'autorisation de sortie de mitose, la mitose tardive . . . . .	136
2. Aspects théoriques de la cytotidérèse . . . . .	137
2.1. Définition de la cytotidérèse . . . . .	137
2.2. Les multiples acteurs nécessaires à la cytotidérèse . . . . .	138
3. Détection des cellules mitotiques par CMF . . . . .	139
3.1. Les outils disponibles . . . . .	139
3.2. Les cyclines mitotiques permettent de distinguer mitose précoce et mitose tardive . . . . .	139
3.3. La synchronisation cellulaire permet d'enrichir une culture de cellules animales pour la phase de mitose . . . . .	139
3.4. Les outils à développer . . . . .	143
4. Détection des cellules en cytotidérèse par CMF . . . . .	144
4.1. Le signal de fluorescence de l'ADN des cellules en cytotidérèse est caractéristique . . . . .	144
4.2. Perspectives : quels outils développer pour mieux identifier les cellules en cytotidérèse ? . . . . .	144
Conclusion . . . . .	147
Annexe : les surprises de la synchronisation cellulaire . . . . .	147

## Chapitre 9

**Cycle cellulaire et pharmacologie des anticancéreux**

<i>(Jean-François Mirjolet)</i> . . . . .	151
Introduction . . . . .	151
1. Cycle cellulaire et points de contrôle . . . . .	152
1.1. Les différentes phases du cycle cellulaire . . . . .	152
1.2. Les points de contrôle . . . . .	153
2. « Cibles » du cycle cellulaire, molécules associées et apport de la CMF . . . . .	154
2.1. Cibles au niveau de la phase G1 . . . . .	155
2.1.1. Inhibiteurs de Cdk ( <i>cyclin-dependent kinase</i> ) . . . . .	156
2.1.2. Inhibiteurs de la voie Ras . . . . .	156
2.2. Cibles au niveau de la phase S . . . . .	157
2.2.1. Anti-métabolites . . . . .	158
2.2.2. Inhibiteurs de topo-isomérases . . . . .	161
2.3. Cibles au niveau de la phase G2 . . . . .	162
2.3.1. Inhibiteur de Chk1 (checkpoint kinase 1) . . . . .	162
2.3.2. CBP501, inhibiteur de Cdc25c . . . . .	163
2.4. Cibles au niveau de la phase M . . . . .	163
2.4.1. Taxanes . . . . .	164
2.4.2. Aurora kinases . . . . .	165
2.4.3. Inhibiteurs de kinésine-5 . . . . .	167
Conclusion . . . . .	168

## Chapitre 10

**Quantification de l'ADN en hématologie** (*Martine Ffrench*

<i>et Agnès Chassevent</i> ) . . . . .	171
Introduction . . . . .	171
1. Considérations générales . . . . .	172
2. Étude de la ploïdie . . . . .	173
2.1. Conditions pratiques d'étude et terminologie . . . . .	173
2.2. Intérêt pronostique . . . . .	174
2.3. Intérêt dans le suivi . . . . .	176
3. Étude du cycle cellulaire . . . . .	177
3.1. Intérêt clinique . . . . .	177
3.2. Simple marquage d'ADN . . . . .	178
3.2.1. Éliminations des doublets . . . . .	179
3.2.2. Discrimination entre cellules en G2 et cellules en G1 d'un clone dupliqué . . . . .	181
3.3. Double marquage bromodéoxyuridine/iodure de propidium (BrdU/IP) . . . . .	182
3.3.1. Mesure du pourcentage de cellules en phase S . . . . .	183
3.3.2. Mesure de la durée de la phase S et du temps potentiel de doublement . . . . .	183
4. Mise en évidence de l'hétérogénéité cellulaire par multimarquages . . . . .	184
4.1. Hétérogénéité de la population cellulaire globale . . . . .	184
4.1.1. Application dans les lymphomes . . . . .	184
4.1.2. Application dans les myélomes . . . . .	185

4.2. Hétérogénéité de la population cellulaire maligne . . . . .	185
4.3. Exemple du double marquage CD45-ADN dans les leucémies aiguës . . . . .	186
Conclusion . . . . .	187

### Chapitre 11

<b>Le cycle cellulaire et l'endoréplication chez les végétaux</b> ( <i>Spencer Brown, Olivier Catrice, Sonja Siljak-Yakovlev, Peter Mergaert et Béatrice Satiat-Jeunemâtre</i> ) . . . . .	191
1. Le cycle cellulaire dans le contexte du développement . . . . .	191
2. Régulation de la prolifération : une machinerie moléculaire de base commune aux eucaryotes . . . . .	192
3. La biologie cellulaire de la prolifération : spécificités de la cellule végétale . . . . .	195
4. Prolifération cellulaire et cycle des organites intracellulaires : un dialogue fonctionnel . . . . .	196
5. Durée d'un cycle cellulaire : de quelques heures à quelques jours . . . . .	197
6. Analyser et suivre le cycle cellulaire . . . . .	198
7. Endoréplication et définitions afférentes . . . . .	201
8. Endoréplication fondamentale . . . . .	205
9. Endoréplication et biotechnologie . . . . .	207
10. Endoréplication partielle progressive chez une plante monocotylédone . . . . .	207
Conclusion . . . . .	209

### Chapitre 12

<b>Analyse du cycle cellulaire chez les parasites</b> ( <i>Delphine Aldebert et Céline Sautel</i> ) . . . . .	215
Introduction . . . . .	215
1. Cytométrie en flux et parasites en médecine humaine . . . . .	216
2. Cycle cellulaire et parasites . . . . .	216
3. Plasmodium . . . . .	217
3.1. Production de populations synchronisées . . . . .	218
3.2. Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux . . . . .	218
4. Toxoplasma . . . . .	220
5. Leishmania et Trypanosoma . . . . .	224
6. Giardia lamblia . . . . .	226
Conclusion . . . . .	227

### Chapitre 13

<b>Analyse de l'ADN et du cycle cellulaire des bactéries marines</b> ( <i>Gérald Grégori</i> ) . . . . .	231
Introduction . . . . .	231
1. Cytométrie en flux et microbiologie . . . . .	233
2. Analyse des acides nucléiques bactériens par CMF . . . . .	235
3. Contenu en ADN et cycle cellulaire des bactéries déterminés par CMF . . . . .	240
3.1. Recommandations pour l'analyse des acides nucléiques bactériens par CMF . . . . .	242

3.1.1. Liquide de gaine . . . . .	242
3.1.2. Optimisation du cytomètre en flux . . . . .	243
3.1.3. Gérer le « bruit » . . . . .	243
3.2. Standards et contrôles . . . . .	244
4. Analyser les acides nucléiques pour accéder à la viabilité cellulaire . . . . .	244
Conclusion . . . . .	247

### Chapitre 14

<b>Cycle cellulaire : bonnes pratiques et contrôle qualité (Bruno Layrac) . . . . .</b>	<b>251</b>
Introduction . . . . .	251
1. Contrôle du cytomètre . . . . .	252
1.1. Paramètres testés. . . . .	252
1.1.1. Puissance Laser . . . . .	252
1.1.2. Alignement optique, photomultiplicateurs (PMT) et stabilité fluidique. . . . .	253
1.1.3. Linéarité de la réponse du cytomètre. . . . .	255
1.2. Produits de contrôle du cytomètre . . . . .	257
1.3. Contrôle du cytomètre – Conclusion . . . . .	257
2. Préparation des échantillons. . . . .	257
3. Réglages du cytomètre . . . . .	258
3.1. Réglages de l'amplification des détecteurs. . . . .	259
3.2. Réglage du (ou des) seuil(s). . . . .	261
3.3. Réglage des compensations . . . . .	262
3.4. Vitesse de passage des échantillons . . . . .	262
3.5. Nombre de cellules à analyser . . . . .	263
4. Réactifs de contrôle . . . . .	264
Conclusion . . . . .	265

### Chapitre 15

#### Exemples de protocoles

1. Analyse monoparamétrique du cycle cellulaire avec l'iodure de propidium. . . . .	267
2. Analyse simultanée du contenu en ADN, d'antigène de surface et d'antigène nucléaire (Ki67) . . . . .	267
3. Analyse du cycle cellulaire à l'aide du Hoechst 33 342 et de la pyronine Y . . . . .	268
4. Mesure du cycle cellulaire par CMF après incorporation de BrdU. . . . .	269
5. Détection des cellules mitotiques par l'anticorps anti-MPM2. . . . .	271
6. Détection des cyclines A2 et B1 dans les cellules humaines. . . . .	271
7. Protocole de marquage au PKH . . . . .	272
8. Protocole de marquage au CFSE (établi pour des cellules PBMC) . . . . .	273
9. Préparation de chromosomes en suspension . . . . .	273
10. Synchronisation chimique de cellules BY2. . . . .	274





Le cycle cellulaire est sans conteste le processus primordial sur lequel repose toute la biologie, son ultime étape étant la division, fondement de la multiplication cellulaire. À travers elle, les organismes vivants se développent dans toute leur complexité, car, à chaque cycle, au-delà de leur accumulation, les cellules s'orientent progressivement vers des fonctions spécifiques ou la mort pour certaines d'entre elles. Cette délicate balance entre prolifération, différenciation et mort est depuis longtemps l'objet de l'attention des biologistes, car la rupture de cet équilibre peut déboucher sur un phénomène de prolifération incontrôlée, à l'origine de pathologies tumorales.

Parmi les nombreuses approches utilisées pour étudier les mécanismes complexes impliqués dans les contrôles du cycle cellulaire, la cytométrie en flux (CMF) a permis de faire avancer la connaissance de manière particulièrement significative. Les potentialités de cette technique, autant par l'aspect multiparamétrique des analyses que par la possibilité de tri qu'elle offre, ont permis d'aborder le cycle cellulaire sous de multiples aspects : estimation précise des phases du cycle, mesure de la prolifération, expression relative des protéines régulatrices, mesure de ploïdie... – études réalisées aussi bien sur des cellules eucaryotes, animales ou végétales, que sur des procaryotes tels que les bactéries.

**Cycle cellulaire et cytométrie en flux** a été conçu comme un guide pratique qui offre une vision aussi large que possible des champs d'application de la CMF à l'étude du cycle, aussi bien à partir de concepts théoriques que d'exemples pratiques.

Écrits par des spécialistes du domaine, les différents chapitres mettent en avant les avantages, mais aussi les problèmes et les pièges, que l'utilisateur pourrait rencontrer. De plus, des protocoles essentiels, validés par les auteurs eux-mêmes, permettent d'aborder la technique avec un minimum de déboires et d'obtenir rapidement des résultats fiables et riches en informations pertinentes, qui leur permettront de développer leur projet avec confiance.

Cet ouvrage s'adresse ainsi aussi bien aux chercheurs fundamentalistes curieux de disséquer cette fonction primordiale de la cellule qu'aux cliniciens en quête de méthodes efficaces pour diagnostiquer leurs patients, orienter les traitements et suivre leur action.

**Didier Grunwald**, docteur d'université, est ingénieur au CEA (Commissariat à l'énergie atomique) à Grenoble.

**Jean-François Mayol** est chercheur à l'unité de radiohématologie expérimentale au Centre de recherches du service de santé des armées.

**Xavier Ronot** est directeur d'études au Laboratoire CaCys (cancer, cycle cellulaire et sénescence de l'EPHE (École pratique de hautes études).

978-2-7430-1205-2



9 782743 012052