

Georgia Barlovatz-Meimon
Xavier Ronot

Culture de cellules animales

3^e édition

 **Inserm**


TEC & DOC

Culture de cellules animales

3^e édition

Chez Lavoisier Tec & Doc :

Cycle cellulaire et cytométrie en flux, par Didier Grunwald, Jean-François Mayol et Xavier Ronot

La cytométrie en flux, par Xavier Ronot, Didier Grunwald, Jean-François Mayol et Jean Boutonnat

Communications et signalisations cellulaires, par Yves Combarous

L'évolution biologique au XXI^e siècle : Les faits, les théories, par Roger Dajoz

Biologie de l'évolution et médecine (Coll. Monographies), par Christian Frelin et Bernard Swynghedauw

Labo-Stat : Guide de validation des méthodes d'analyse, par Max Feinberg

Chez Lavoisier Médecine Sciences :

Biologie moléculaire de la cellule, par B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts et P. Walter

Biologie moléculaire de la cellule – Livre d'exercices, par J. Wilson et T. Hunt

L'essentiel de la biologie cellulaire, par B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts et P. Walter

Immunologie, par L. Chatenoud et J.-F. Bach

Manuel de poche de biologie cellulaire, par H. Plattner et J. Hentschel

Biologie moléculaire et médecine, par J.-C. Kaplan et M. Delpech

Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire, par B. Hainque, B. Baudin et P. Lefebvre

Biochimie et biologie moléculaire, par P. Kamoun, A. Lavoinne et H. de Verneuil

Histologie, par J.-P. Dadoune

Georgia BARLOVATZ-MEIMON

Xavier RONOT

Culture de cellules animales

3^e édition

Préface de Monique Adolphe

Postface de Jacques Demongeot


TEC & DOC
editions.lavoisier.fr

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt concernant le contenu de cet ouvrage.

Ouvrage réalisé avec le concours de l'Inserm
(Institut national de la santé et de la recherche médicale)

Couverture :

Photo 1 : Visualisation des filaments d'actine dans un doigt de migration d'un tissu MDCK. (Crédit : cliché O. Cochet)

Photo 2 : Cellules provenant d'un adénocarcinome mammaire, MDA-MB-231. Au cours d'un test de migration après blessure *in vitro*, on note la présence de PAI-1 (en vert) dans de petits bourgeonnements membranaires. (Crédit : collection Michel Malo, laboratoire IBISC)

Photo 3 : Photographie de cellules cultivées sur microporteur. Cellules rénales humaines sur Cytodex® 3. (Crédit : cliché CNRS-Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, Nancy)

Photo 4 : Cellules RT112 (lignée dérivée d'une tumeur vésicale humaine). Marquage en fluorescence de la tubuline (vert) et de l'ADN (bleu). (Crédit : collection Véronique Frachet, laboratoire CaCyS, EPHE)

Photo 5 : Culture de pneumocytes de type II isolés de poumon de rat fœtal qui se transforment en pneumocytes I en 48h sur plastique (en vert la protéine T1 α) (Crédit : cliché Bernadette Chailley-Heu)

Photo 6 : Explant de cochlée de souris. Sur cette portion, on visualise les cellules ciliées (rouge, marquage myosine 7a), les neurones auditifs et les fibres nerveuses (vert, marquage neurofilament 200). (Crédit : cliché Florence François)

Direction éditoriale : Fabienne Roulleaux

Édition : Brigitte Peyrot

Fabrication : Estelle Perez-Le Du

Composition et couverture : Patrick Leleux PAO, Caen

Impression et brochage : L.E.G.O. S.p.a., Lavis, Italie

© 2014, Lavoisier, Paris

ISBN : 978-2-7430-1989-1

LISTE DES COLLABORATEURS

- ABERDAM Daniel, Directeur de Recherche Inserm, UMRS976, Hôpital Saint-Louis, Paris.
- ALFAIDY Nadia, Chargée de Recherche Inserm, Laboratoire Biologie du Cancer et de l'Infection, Unité Mixte INSERM-CEA-UJF U1036, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, CEA-Grenoble, Université Joseph Fourier, Grenoble.
- ANDRÉAU Karine, Maître de Conférences, Laboratoire des Réponses Moléculaires et Cellulaires aux Xénobiotiques, Unité Biologie Fonctionnelle et Adaptative, CNRS UMR 8251, Université Paris-Diderot, Paris.
- AUXENFANS Céline, Praticien Hospitalier, Laboratoire des Substituts Cutanés, Banque de Tissus et Cellules, Hôpital Édouard Herriot, UMR5305, IBCP, Lyon.
- BAEZA-SQUIBAN Armelle, Professeure des Universités, Laboratoire des Réponses Moléculaires et Cellulaires aux Xénobiotiques, Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative, UMR CNRS 8251, Université Paris-Diderot, Paris.
- BARLOVATZ-MEIMON Georgia, Professeure Émérite, Université Paris-Est, Créteil et Laboratoire IBISC (Informatique, Biologie Intégrative et Systèmes Complexes), Université d'Évry-Val d'Essonne/Genopole, Évry.
- BARTHOLIN Laurent, Chargé de Recherche Inserm, UMR Inserm 1052, CNRS 5286, Université Lyon 1, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Centre Léon Bérard, Lyon.
- BLANCHARD Fabrice, Ingénieur de Recherche, Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, UMR CNRS 7274, ENSAIA, Vandœuvre-lès-Nancy.
- BONGRAND Pierre, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Laboratoire Adhésion Cellulaire et Inflammation, Inserm UMR1067, CNRS UMR 7333, Université Aix-Marseille, Marseille.
- BOUBLIK Yvan, Ingénieur de Recherche CNRS, UMR 5237 CNRS, Centre de Recherches de Biochimie Macromoléculaire (CRBM), Montpellier.
- BOURBON Jacques, Directeur de Recherche CNRS, Inserm U955, Institut Mondor de Recherche Biomédicale, Créteil.
- BROCARD Jacques, Chargé de Recherche Inserm, Institut de Neurosciences, Centre de Recherche Inserm U836, Grenoble.
- BROUILLET Sophie, Assistante Hospitalo-Universitaire, Laboratoire d'Aide à la Procréation-CECOS, Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, Université Joseph Fourier, Grenoble.
- CALVO Fabien, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Service de Pharmacologie, Centre d'Investigations Cliniques, Inserm UMRS 940 Hôpital Saint-Louis, Paris.
- CAMBAR Jean, Professeur des Universités, Laboratoire de Biologie Cellulaire, FRE CNRS 3396 Pharmacochimie, UFR des Sciences Pharmaceutiques, Université Bordeaux-Segalen, Bordeaux.
- CARTIER-MICHAUD Amandine, Post-doctorante, CRCM Marseille, Equipe Adhésion et Interactions Tumeur/Hôte, Marseille.
- CERUTTI Martine, Directrice de Recherche CNRS, UP33044, Baculovirus et Thérapie, Saint Christol-lès-Alès.
- CHARRIÈRE-BERTRAND Cécile, Maître de Conférences, Université Paris-Est Créteil, et laboratoire IBISC (Informatique, Biologie Intégrative et Systèmes Complexes), Évry.
- CHEVALOT Isabelle, Professeure des Universités, Université de Lorraine, Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, UMR CNRS 7274, ENSAIA, Vandœuvre-lès-Nancy.
- COCHET-ESCARTIN Olivier, Docteur, Laboratoire Physicobiologie aux Mésoéchelles, UMR 168, Institut Curie, Centre de Recherche CNRS UPMC, Paris, France. Physics Department, University of California, San Diego, USA.
- CORRE Guillaume, Chercheur/Post-doctorant, UMR Inserm U951 Immunologie Moléculaire et Biothérapies Innovantes, Généthon, Université d'Évry-Val d'Essonne, École Pratique des Hautes Études, Évry.
- COUSSERANS François, Ingénieur d'Études, UMR1333 INRA - DGIMI, Université Montpellier 2, Montpellier.
- CURTET-BENITSKI Sandrine, Assistante Ingénieure, Inserm U823, Épigenétique et Signalisation Cellulaire, Institut Albert Bonniot, La Tronche.

DAMOUR Odile, Praticien Hospitalier, Laboratoire des Substituts Cutanés, Banque de Tissus et Cellules, Hôpital Édouard Herriot ; UMR5305, IBCP, Lyon.

DE GUERRA Arnaud, Responsable Pôle Recherche et Union européenne, Direction Médicale et Scientifique, Agence de la Biomédecine, Saint-Denis La Plaine.

DEUGNIER Marie-Ange, Chargée de Recherche Inserm, Institut Curie, Centre de Recherche, CNRS UMR144, Mécanismes Moléculaires du Développement de la Glande Mammaire, Paris.

DI-CICCO Amandine, Assistante Ingénieure, Institut Curie, Centre de Recherche, CNRS UMR144, Mécanismes Moléculaires du Développement de la Glande Mammaire, Paris.

DORANGE Germaine, Professeure des Universités, UFR Médecine et Sciences de la Santé, Département Génie biologique, IUT Brest, Université de Bretagne Occidentale, Brest.

DOS SANTOS Morgan, Docteur, Laboratoire des Substituts Cutanés, Banque de Tissus et Cellules, Hôpital Édouard Herriot, Lyon.

DROGUET Mickael, Maître de Conférences des Universités, UFR Médecine et Sciences de la Santé, Département Génie biologique, IUT Brest, Université de Bretagne Occidentale, Brest.

DUCAROUGE Benjamin, Post-doctorant, UMR 5286 Équipe Apoptose Cancer et Développement, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Centre Léon Bérard, Lyon.

DUGAIL Isabelle, Directrice de Recherche Inserm, UMRS U1166, Équipe 6 Nutriomics, Inserm, Paris.

DUPONT Joëlle, Directrice de Recherche INRA, UMR Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Centre Val-de-Loire, Tours.

DUPRESSOIR Thierry, Professeur des Universités, Directeur d'Études Laboratoire de Pathologie Comparée des Invertébrés, École Pratique des Hautes Études, UMR1333 INRA - DGIMI, Université Montpellier 2, Montpellier.

EDOM-VOVARD Frédérique, Post-doctorant, Centre de Recherche en Myologie, UMRS974 UPMC, Inserm, FRE 3617 CNRS-AIM, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris.

FABRE Isabelle, Chef du pôle Contrôles biologiques des produits biologiques et des plantes, Direction des Contrôles, Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM), Vendargues.

FEIGE Jean-Jacques, Directeur de Recherche Inserm, Laboratoire Biologie du Cancer et de l'Infection, Unité Mixte INSERM-CEA-UJF U1036, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, CEA-Grenoble, Université Joseph Fourier, Grenoble.

FILIPPUTTI-GILQUIN Anne-Laure, Assistante Ingénieure, Responsable Culture Cellulaire, Société CreaCell, La Tronche.

FRABOULET Sandrine, Maître de Conférences des Universités, UFR Chimie-Biologie, Université Joseph Fourier, Grenoble.

FRANÇOIS Florence, Ingénieure d'Études, Institut des Neurosciences de Montpellier, Inserm U1051, Montpellier.

FRESHNEY Ian, PhD, honorary Senior Research Fellow, Center for Oncology and Applied Pharmacology, part of the Cancer Research UK Beatson Laboratories, University of Glasgow, Royaume-Uni.

FROMENT Pascal, Chargé de Recherche INRA, UMR Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Centre Val-de-Loire, Tours.

FROMIGUÉ Olivia, Chargée de Recherche Inserm, Inserm UMR 981, Université Paris Sud, Institut Gustave Roussy, Villejuif.

GABILLARD Jean-Charles, Chargé de Recherche INRA, UR1037, Laboratoire de Physiologie et Génomique des Poissons, Rennes.

GABOYARD-NIAY Sophie, Chef de Projet R&D, Sensorion, Institut des Neurosciences de Montpellier, Montpellier.

GIRODON François, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Service d'Hématologie Biologique, Centre Hospitalier Universitaire de Dijon et Université de Bourgogne, Dijon.

GRUNWALD Didier, Ingénieur/Chercheur, iRTSV, CEA, Grenoble.

GUEDON Emmanuel, Chargé de Recherche CNRS, Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, UMR CNRS 7274, ENSAIA, Vandœuvre-lès-Nancy.

GUGUEN-GUILLOUZO Christiane, Directrice de Recherche Émérite, Inserm U991 Foie, Métabolisme et Cancer, Université de Rennes 1, Rennes.

GUYOT Mélanie, Docteur, IPMC, Université de Nice-Sophia Antipolis, Nice.

HABERT René, Professeur des Universités, UMR Inserm U967-CEA, Université Paris-Diderot, Sorbonne Paris-Cité, Laboratoire de Développement des Gonades, Centre CEA, Fontenay-aux-Roses.

HOFFMANN-CUCUZ Pascale, Professeure des Universités, Praticien Hospitalier, Service de Médecine de la Reproduction, Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble ; Laboratoire Biologie du Cancer et de l'Infection, Unité Mixte Inserm-CEA-UJF U1036, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, CEA-Grenoble, Université Joseph Fourier, Grenoble.

JACQUIER-SARLIN Muriel, Maître de Conférences, Institut des Neurosciences, Inserm U836, Université Joseph Fourier, Grenoble.

KADRI Malika, Technicienne, Laboratoire Cancer Cycle cellulaire et Sénescence (CaCyS), FRE AGIM 3405 UJF-CNRS-EPHE, Université Joseph Fourier, Grenoble.

KLEMAN Jean-Philippe, Chercheur, Institut de Biologie Structurale, UMR 5075 CNRS/CEA, Université Joseph Fourier, Grenoble.

L'AZOU Béatrice, Maître de Conférences, Laboratoire de Biologie Cellulaire, UFR des Sciences Pharmaceutiques, Université Bordeaux-Segalen, Inserm 1026 Bioingénierie Tissulaire, Bordeaux.

LAINÉ Michèle, Maître de Conférences, Institut des Neurosciences, Inserm U836, Université Joseph Fourier, Grenoble.

LARDEUX Bernard, Chargé de Recherche CNRS, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Inserm U913, Centre Hospitalier Universitaire Hôtel-Dieu, Nantes.

LEGENDRE Audrey, Ingénieure-Chercheur, Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), Laboratoire de Toxicologie Expérimentale, Fontenay-aux-Roses.

LEGUEN Isabelle, Chargée de Recherche INRA, UR1037, Laboratoire de Physiologie et Génomique des Poissons, Rennes.

LEMAZURIER Emmanuel, Chef de Projets, Institut National de l'Environnement et des Risques (INERIS), Verneuil-en-Halatte.

LIVERA Gabriel, Professeur des Universités, UMR Inserm U967-CEA, Université Paris-Diderot, Sorbonne Paris-Cité, Laboratoire de Développement des Gonades, Centre CEA, Fontenay-aux-Roses.

LOYER Pascal, Chargé de Recherche, Inserm UMR 991 Foie, Métabolisme et Cancer, Hôpital Pontchaillou, Rennes.

MAGUER-SATTA Véronique, Directrice de Recherche CNRS, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, U1052-UMR5286, Université Lyon 1, Lyon.

MALO Michel, Maître de Conférences, Université d'Évry-Val d'Essonne, et laboratoire IBISC (Informatique, Biologie Intégrative et Systèmes Complexes), Évry.

MARC Annie, Directrice de Recherche CNRS, Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, UMR CNRS 7274, ENSAIA, Vandœuvre-lès-Nancy.

MARIE Pierre, Directeur de Recherche CNRS, Inserm UMR 1132 et Université Paris-Diderot, Sorbonne Paris-Cité, Hôpital Lariboisière, Paris.

MARTEL-FRACHET Véronique, Maître de Conférences, École Pratique des Hautes Études, Laboratoire Cancer Cycle cellulaire et Sénescence (CaCyS), FRE AGIM 3405 UJF-CNRS-EPHE, Grenoble.

MAYNADIÉ Marc, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Service d'Hématologie Biologique, Centre Hospitalier Universitaire de Dijon et Université de Bourgogne, Dijon.

MAYOL Jean-François, Chief Scientific Officer, TransCure bioServices SAS, Biopark, Archamps Technopôle.

MODROWSKI Dominique, Chargée de Recherche Inserm, Inserm UMR 1132 et Université Paris-Diderot, Sorbonne Paris-Cité, Hôpital Lariboisière, Paris.

MOULY Vincent, Directeur de Recherche CNRS, Centre de Recherche en Myologie, UMRS 974 UPMC, Inserm, FRE 3617 CNRS-AIM, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris.

MOURAH Samia, Praticien Hospitalier, Service de Pharmacologie, Laboratoire de Pharmacologie-Génétique, Inserm UMRS 940, Hôpital Saint-Louis, Paris.

NEGRONI Elisa, Post-doctorante, Centre de Recherche en Myologie, UMRS 974 UPMC, Inserm, FRE 3617 CNRS-AIM, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris.

NEUNLIST Michel, Directeur de Recherche Inserm, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Inserm U913, Centre Hospitalier Universitaire Hôtel-Dieu, Nantes.

OLMOS Eric, Maître de Conférences, Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, UMR CNRS 7274, ENSAIA 7274, Vandœuvre-lès-Nancy.

OUDAR Olivier, Professeur des Universités, Inserm U698, Unité 1148 – LVTS, Université Paris 13, Paris.

PAGÈS Gilles, Directeur de Recherche, Institut Cancer et Vieillesse de Nice (IRCAN) UMR CNRS 7284/U Inserm 1081, Centre Antoine Lacassagne, Université de Nice-Sophia Antipolis, Nice.

PAIN Bertrand, Directeur de Recherche, Inserm U846, USC 1361, INRA, Bron.

PALDI Andras, Professeur des Universités, UMR Inserm U951 Immunologie Moléculaire et Biothérapies Innovantes, Généthon, Université d'Évry-Val d'Essonne, École Pratique des Hautes Études, Évry.

PELISSIER-ROTA Marjolaine, Doctorante, Inserm U836, Institut des Neurosciences, Grenoble.

PIERRES Anne, Directrice de Recherche, Laboratoire Adhésion Cellulaire et Inflammation, Inserm UMR1067, CNRS UMR 7333, Université Aix-Marseille, Marseille.

POMMIER Roxane, Doctorante, UMR Inserm 1052, CNRS 5286, Université Lyon 1, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Centre Léon Bérard, Lyon.

PRULIÈRE-ESCAPASSE Virginie, Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier, Service d'ORL et de Chirurgie Cervico-Faciale, Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil ; Inserm U955, Institut Mondor de Recherche Biomédicale, Créteil.

PUEL Jean-Luc, Professeur des Universités, Institut des Neurosciences de Montpellier, Inserm U1051, Montpellier.

QUIGNOT Nadia, Chercheur – Chef de Projets scientifiques, LA-SER Analytica, Strategy & Decision Analytics, Paris.

ROBIN Marie-Anne, Directrice de Recherche, Inserm U991 Foie, Métabolisme et Cancer, Université de Rennes 1, Rennes.

ROCHAIS Francesca, Chargée de Recherche Inserm, IBDM UMR 7288, Marseille.

ROCHET Nathalie, Chargée de Recherche Inserm, FRE 3502 CNRS, Université de Nice, Faculté de Médecine, Nice.

ROLLI-DERKINDEREN Malvyne, Chargée de Recherche, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Inserm U913, Centre Hospitalier Universitaire Hôtel-Dieu, Nantes.

RONOT Xavier, Directeur d'Études, École Pratique des Hautes Études, Laboratoire Cancer Cycle cellulaire et Sénescence (CaCyS), FRE AGIM 3405 UJF-CNRS-EPHE, Grenoble.

ROUILLER-FABRE Virginie, Professeure des Universités, UMR Inserm U967-CEA, Université Paris-Diderot, Sorbonne Paris-Cité, Laboratoire de développement des Gonades, Centre CEA, Fontenay-aux-Roses.

SALASC Fanny, Doctorante, Laboratoire de Pathologie Comparée des Invertébrés, École Pratique des Hautes Études, UMR1333 INRA - DGIMI, Université Montpellier 2, Montpellier.

SENÉ Sylvain, Professeur des Universités, CNRS, LIF, UMR7279, Université d'Aix-Marseille, Marseille ; Institut Rhône-alpin des systèmes complexes, IXXI, Lyon.

SILBERZAN Pascal, Directeur de Recherche, Laboratoire Physico-chimie Curie, UMR 168, Institut Curie, Centre de Recherche CNRS UPMC, Paris.

STOCKHOLM Daniel, Maître de Conférences, UMR Inserm U951 Immunologie Moléculaire et Biothérapies Innovantes, Généthon, Université d'Évry-Val d'Essonne, École Pratique des Hautes Études, Évry.

SUPIRAMANIAN-THURASAMY Ajitha, Post-doctorante, Laboratoire CRRET, Université Paris-Est Créteil.

TALARMIN Hélène, Maître de Conférences des Universités, Laboratoire de Physiologie, IUT Génie biologique, Faculté de Médecine, Brest.

THEPOT Amélie, Chef de Projet R&D, Laboratoire des Substituts Cutanés, Banque de Tissus et Cellules, Hôpital Édouard Herriot, Lyon.

VALCOURT Ulrich, Maître de Conférences, UMR Inserm 1052, CNRS 5286, Université Lyon 1, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Centre Léon Bérard, Lyon.

VALLESE Denis, Doctorant, Centre de Recherche en Myologie, UMRS 974 UPMC, Inserm, FRE 3617 CNRS-AIM, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris.

VENAIL Frederic, Praticien Hospitalier Universitaire, Institut des Neurosciences de Montpellier, Inserm U1051 ; Service ORL, Centre Hospitalier Universitaire Gui-de-Chauliac, Montpellier.

VIGOUROUX Clotilde, Pharmacienne, Banque de Tissus et Cellules, Hôpital Édouard Herriot, UMR5305, IBCP, Lyon.

VINCENT David, Post-doctorant, Beatson Institute for Cancer Research, Wnt signaling and Colorectal Cancer, Glasgow, Royaume-Uni.

VITTEZ Daniel, Chargé de Recherche Inserm, Laboratoire Biologie du Cancer et de l'Infection, Unité Mixte Inserm-CEA-UJF U1036, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, CEA-Grenoble, Université Joseph Fourier, Grenoble.

Sommaire

Liste des collaborateurs	V
Préface M. ADOLPHE	XXV
Avant-propos G. BARLOVATZ-MEIMON, X. RONOT	XXVII
Liste des abréviations	XXIX
Chapitre 1. Origine de la culture de cellules I. FRESHNEY	1

PARTIE I **BIOLOGIE ET ENVIRONNEMENT DES CELLULES EN CULTURE**

Chapitre 2. Adhésion cellulaire A. PIERRES, P. BONGRAND	13
Introduction	13
Les interactions adhésives régulent la quasi-totalité des fonctions cellulaires	13
Le comportement des cellules adhérentes dépend très significativement des propriétés physiques du substrat ..	14
L'adhésion cellulaire repose essentiellement sur de très nombreux récepteurs membranaires spécialisés	15
Méthodes d'étude de l'adhésion cellulaire : aspects généraux	17
Propriétés mécaniques et/ou cinétiques de l'adhésion	17
Étude morphologique de l'adhésion cellulaire	20
Régulation de l'adhésion cellulaire	24
Régulation de la répulsion stérique	24
Régulation de l'expression des récepteurs d'adhésion	24
Régulation fonctionnelle des récepteurs d'adhésion : modifications conformationnelles	24
Microagrégation (clustering)	24
Localisation des récepteurs sur les extrémités des protrusions membranaires	25
Modification de l'interaction des récepteurs d'adhésion avec le cytosquelette d'actine	25
Contrôle du détachement des cellules adhérentes	25
Modifications conformationnelles	25
Rupture mécanique des liaisons	26
Diminution de la rigidité membranaire	26
Protéolyse de molécules impliquées dans l'adhésion	26
Insertion d'éléments répulsifs dans la zone d'adhésion	26
Comment l'adhésion à un substrat peut-elle modifier le comportement cellulaire ?	26
Signaux engendrés par l'occupation des récepteurs d'adhésion	26
Regroupement de quelques molécules susceptibles d'interagir pour produire un signal	27

Génération de forces et mécanotransduction à l'interface cellule-substrat.	27
Contrôle de l'organisation du cytosquelette	28
Importance de l'étalement : effet de la forme sur le comportement cellulaire	28
Conclusion	29
Chapitre 3. Variabilité non génétique dans les cultures cellulaires G. CORRE, D. STOCKHOLM, A. PALDI ...	33
Historique	33
Cellule unique et population cellulaire	34
Fluctuations d'origine interne	35
Bruit moléculaire : la loi des petits nombres	35
Bruit structural : compartimentation subcellulaire et dynamique chromatinienne	36
Stochasticité expression génique	37
Fluctuations d'origine externe	40
Milieu nutritif et métabolisme cellulaire	40
Organisation spatiale des cellules <i>in vitro</i>	40
Variations liées aux manipulations expérimentales	41
Maîtriser les fluctuations	42
Conclusion	42
Chapitre 4. Aspects physiques des comportements collectifs épithéliaux O. COCHET-ESCARTIN, P. SILBERZAN	45
Structure et régulation du tissu épithélial	45
Mouvements collectifs de tissus <i>in vivo</i>	47
Étude de mouvements collectifs de tissus <i>in vitro</i>	48
Techniques expérimentales	48
Particularités du mouvement collectif	50
Polarisation du mouvement collectif	54
Études théoriques de la migration collective	55
Modèles continus	55
Modèles discrets	55
Conclusion	58
Chapitre 5. Défis de la culture de cellules animales en bioréacteur A. MARC, E. GUEDON, E. OLMOS, F. BLANCHARD, I. CHEVALOT	61
Principaux réacteurs en mode agité	61
Différents modes d'alimentation du milieu de culture	61
Systèmes de culture placés en incubateur	62
Bioréacteurs contrôlés	62
Influence de l'environnement cellulaire	63
Du milieu avec sérum jusqu'au milieu chimiquement défini	63
Méthodes de criblage de la formulation du milieu de culture	64
Éléments nutritifs solubles	64
Gaz dissous	65
Paramètres physicochimiques	65
Culture des cellules sur microporteurs	65
Différents types de supports	65
Principaux paramètres opératoires	65
Expansion cellulaire en système de culture agité	67
Analyses et régulations en ligne sur le bioréacteur	67
Mesure et régulation de la température	67
Mesure et régulation de la concentration en oxygène dissous	67

Mesure et régulation de la concentration en dioxyde de carbone dissous.	68
Mesure et régulation du pH.	69
Nouveaux outils d'analyse en ligne.	69
Analyse des cellules.	69
Analyse des composés solubles.	69
Chapitre 6. Sphéroïdes O. OUDAR.	71
Définition, historique, intérêts, avantages.	71
Obtention, caractérisation des sphéroïdes.	72
Protocoles.	75
Formation des sphéroïdes.	75
Transfert et culture cellulaire.	75
Conclusion.	76
Chapitre 7. Dynamique du microenvironnement cellulaire A. SUPIRAMANIAN, A. CARTIER-MICHAUD, C. CHARRIÈRE-BERTRAND, M. MALO, G. BARLOVATZ-MEIMON.	77
De la matrice extracellulaire au microenvironnement.	77
Le microenvironnement évolue avec le dialogue cellules/matrice.	78
Le « matrisome » humain.	79
La matrice extracellulaire, une combinatoire aux rôles pléiotropiques.	83
Un acteur exemplaire du dialogue cellule/matrice, la fibronectine.	83
La dynamique du microenvironnement constitue un système complexe.	86
Une dynamique particulière : le microenvironnement tumoral.	87
Exploration de toutes ses facettes.	87
Les nouveaux venus du microenvironnement : exosomes, microvésicules et autres « débris cellulaires ».	94
L'exemple de PAI-1, frein ou promoteur de la migration cellulaire et acteur direct de la transition mésenchymo-amaeboïde (MAT).	96
Conclusion.	102
Annexes.	110
Chapitre 8. Bonnes pratiques de culture cellulaire S. CURTET-BENITSKI, A.-L. FILIPUTTI-GILQUIN.	118
Matières premières.	118
Cellules.	119
Milieux, additifs et réactifs.	120
Consommables.	121
Matériels.	121
Postes de sécurité microbiologique.	121
Incubateurs à CO ₂	122
Centrifugeuses.	123
Autres équipements.	123
Main-d'œuvre.	123
Formation du personnel.	123
Hygiène et sécurité.	124
Milieu : le laboratoire de culture cellulaire.	124
Niveaux de sécurité biologique et organisation.	124
Désinfection des locaux.	124
Évacuation des déchets.	124
Méthodes.	125
Conclusion.	126
Annexe.	127

Chapitre 9. Cryopréservation des cellules	X. RONOT, M. KADRI, V. MARTEL-FRACHET	128
Aspects physicochimiques de la formation des cristaux		128
Effets biophysiques de la formation de glace		129
Déshydratation cellulaire		129
Stress mécanique		129
Cristallisation intracellulaire		129
Choc thermique		129
Effets biologiques de la formation de glace		129
Agents cryoprotecteurs		131
Conditions de congélation		132
Matériel cellulaire		132
Identification des cryotubes pour l'archivage		132
Dispositifs de congélation		132
Cryoconservateurs		132
Congélation à -80 °C		133
Décongélation		133
Hygiène et sécurité		134
Congélation sans sérum		134
Conservation de courte durée		134
Transport des cellules		134
Conclusion		135
Annexe		136

PARTIE II TECHNIQUES ET MÉTHODES

Chapitre 10. Viabilité, cytotoxicité, génotoxicité	A. BAEZA-SQUIBAN, K. ANDRÉAU	139
Méthodes d'étude de la viabilité cellulaire		140
Approches morphologiques		140
Méthodes de quantification de la viabilité cellulaire		140
Quantification des cellules mortes par la perte d'intégrité de la membrane plasmique		143
Méthodes utilisant l'exclusion de colorants vitaux		143
Méthodes utilisant la libération d'enzymes intracellulaires		143
Détection couplée des cellules mortes et des cellules vivantes		144
Cytotoxicité : étude spécifique des différentes voies de mort cellulaire		144
Classification des différents types de mort cellulaire		144
Détection et mesure spécifique de l'apoptose		144
Détection et mesure spécifique de la nécrose régulée		149
Détection et mesure spécifique de l'autophagie		149
Méthodes d'étude de la prolifération cellulaire		149
Dénombrement des cellules		149
Quantification des acides nucléiques		149
Incorporation d'un précurseur de l'ADN		150
Mesure de l'impédance électrique cellulaire		150
Étude du cycle cellulaire		150
Méthodes d'étude de la génotoxicité : le test des comètes		150
Conclusion		151

Chapitre 11. Apport de la cytométrie en flux à la culture cellulaire	J.-F. MAYOL	153
Principe de la cytométrie en flux		153
Réseau fluide		153
Système optique		153
Interface informatique		155
Différents types de marquages		155
Anticorps		155
Sondes		156
Transfection		156
Compensations de fluorescence		157
Interprétation des résultats		157
Régions et conditionnement des graphes		157
Pourcentages		157
Valeurs absolues		157
Intensités de fluorescence		158
Applications		159
Caractérisation phénotypique de sous-populations présentes		159
Mesure d'une intensité de fluorescence		159
Étude de la viabilité, de la mort cellulaire		159
Cycle cellulaire et prolifération		161
Fonctions cellulaires		163
Cellules souches		164
Biologie végétale		164
Microbiologie, virologie		165
Tri cellulaire		165
Nouveaux développements		165
Chapitre 12. Imagerie cellulaire	J.-P. KLEMAN, D. GRUNWALD	168
Préservation du vivant		168
Conditions de culture et maintien de l'homéostasie		168
Maintien de la température		169
Milieux de culture spécifiques, maintien du pH		169
Stress radiatifs, stress oxydatifs		170
Microscopes pour l'observation des cellules vivantes		170
Principes généraux de la microscopie		170
Microscopie optique		172
Microscopie de fluorescence		174
Dépasser les limites techniques de la résolution optique		185
Chapitre 13. Transfert de gènes dans les cellules en culture	P. LOYER	188
Définitions et historique du transfert de gènes		188
Transfert horizontal de gènes : le modèle bactérien		190
Captation d'ADN par les cellules d'eucaryotes en culture		190
Transfection d'ADN par des molécules polyanioniques : lipofection et polyfection		191
Transfection par procédés physiques		191
Transfert de gènes par infection virale : la transduction		192
Plasmides et génomes viraux modifiés pour le transfert de gènes		193
Transfection, transduction, oligonucléotides antisens et ARN interférence		195
Applications du transfert d'acides nucléiques dans les cellules en culture		195
Études de la fonction des gènes et des protéines		196
Établissement de lignées cellulaires recombinantes		202
Thérapie génique <i>ex vivo</i>		205
Choix méthodologique du transfert de gènes : quels outils pour quelles applications ?		205
Études de séquences régulatrices de la transcription et de la maturation des ARN		206

Localisation subcellulaire de protéines et identification de leurs partenaires.	206
Impact de la surexpression accrue et de l'extinction de gènes sur les cellules en culture	207
Établissement de lignées cellulaires recombinantes	208
Chapitre 14. Méthodes informatiques en biologie G. BARLOVATZ-MEIMON, S. SENÉ.....	217
Vision globale de la bio-informatique actuelle	218
Bio-informatique des séquences.....	218
Bio-informatique des structures	220
Bio-informatique des réseaux	221
Traitement de l'information.....	223
Une application traditionnelle : la phylogénie	224
Réseaux et modélisation	225
Modélisation théorique : le cas des réseaux d'automates.....	226
Modélisation appliquée.....	230
Conclusion.....	232
Annexes.....	235

PARTIE III PHARMACOTOXICOLOGIE *IN VITRO*

Chapitre 15. Voies de signalisation majeures impliquées dans la survie et la prolifération cellulaire M. GUYOT, G. PAGÈS	241
Généralités sur le fonctionnement du couple ligands/récepteurs	241
Différents modes de transmission du signal	243
Récepteurs membranaires majeurs	244
Récepteurs à activité tyrosine kinase.....	244
Récepteurs couplés aux protéines G	245
Récepteurs des cytokines couplés à la kinase JAK	245
Récepteurs du <i>Transforming Growth Factor</i> β (TGF β)	246
Voies de signalisation principales	247
Voie de l'AMP cyclique (AMPc)	247
Voie de la phospholipase C (PLC).....	247
Voie de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K).....	248
Voies des <i>Mitogen Activated Protein Kinases</i> (MAPK)	248
Modifications pathologiques	251
Convergence, divergence et interférence entre les différentes voies de signalisation.....	252
Conclusion.....	252
Chapitre 16. De la cible à la molécule S. MOURAH, F. CALVO	255
Angiogenèse tumorale	255
Mécanisme de l'angiogenèse tumorale.....	255
« Switch » angiogénique	255
Processus de l'angiogenèse tumorale	256
Les facteurs VEGF et leurs récepteurs (VEGFR)	257
VEGF (VEGF-A)	257
Récepteurs des VEGF.....	258
Activités biologiques du système VEGF/VEGFR	258
Les anti-angiogéniques	258
Objectifs de la thérapie anti-VEGF.....	259
Bevacizumab (Avastin®)	259

PARTIE IV

SYSTÈMES INTÉGRÉS ET CULTURES SPÉCIALISÉES

Chapitre 17. Cellules souches	263
Cellules souches et cellules souches embryonnaires B. PAIN.....	263
Totipotence et clonage	263
Pluripotence et cellules souches embryonnaires	264
Conclusion	267
La niche des cellules souches : enjeux conceptuels et technologiques pour l'étude des mécanismes normaux et tumoraux V. MAGUER-SATTA, N. ROCHET	269
Concepts et problématiques	269
Exemple de modélisation de la niche osseuse en culture 3D au sein d'un biomatériau	277
Conclusion générale et perspectives	285
Chapitre 18. Ingénierie de la cornée : vers des modèles de plus en plus complexes	
C. VIGOUROUX, O. DAMOUR, D. ABERDAM, C. AUXENFANS	291
Modèles 3D	291
Épithélium pluristratifié sans stroma	291
Épithélium avec stroma (hémi-cornée)	292
Cornée reconstruite complète	293
Sources potentielles de cellules capables de se différencier en cellules épithéliales de cornée humaine ...	294
Cellules souches embryonnaires humaines (hESC)	294
Cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPS)	294
Chapitre 19. La peau reconstruite : un outil d'étude de pharmacotoxicologie et de création d'un modèle <i>in vitro</i> M. DOS SANTOS, A. THEPOT, O. DAMOUR, C. AUXENFANS	297
De la peau humaine aux équivalents cutanés : motivations ayant suscité leur développement	297
Modèles simples développés pour les tests d'innocuité	298
Modèles tridimensionnels et tests d'efficacité	299
Peaux reconstruites dans les matrices d'origine humaine ou animale	299
Peaux reconstruites dans une matrice biologique d'origine biosynthétique	300
Création de modèle <i>in vitro</i> : exemple du vieillissement	302
Modifications chimiques du support	302
Modifications biologiques	303
Conclusion	303
Chapitre 20. Culture de cellules nerveuses J. BROCARD, S. FRABOULET	305
Cultures primaires de cellules nerveuses	305
Phylogénie des cellules nerveuses	305
Neurones du système nerveux central	307
Neurones granulaires du cervelet : un modèle de migration	307
Autres cellules nerveuses en culture	308
Lignées cellulaires	308
Différenciation de cellules souches	309
Cas des cellules humaines	309
Modifications de cultures matures	309
Substrats et supports	311
Transfection/infection	312
Protocoles	313
Considérations générales	313
Culture de ganglions spinaux de poulet	314
Culture de neurones hippocampiques ou corticaux	314

Culture de neurones granulaires de cervelet	315
Co-cultures à partir de neurosphères	316
Transfection au phosphate de calcium	317
Chapitre 21. Muscle squelettique : structure, origine et techniques de culture cellulaire	
F. EDMOND-VOVARD, D. VALLESE, E. NEGRONI, V. MOULY	319
Structure et origine du muscle squelettique	319
Structure du muscle squelettique adulte : les fibres musculaires	319
Origine du muscle squelettique	320
Cellules satellites	322
Technique de culture cellulaire	325
Complexité de l'organe	325
Pourquoi utiliser les cultures de cellules ?	325
Cultures primaires	326
Lignées et immortalisation	327
Fibres isolées	329
Culture en trois dimensions (3D)	329
Chapitre 22. Cellules cardiaques F. ROCHAIS	333
Introduction	333
Structure et fonction du cœur	333
Développement du cœur	334
Cellule cardiaque	336
Cultures de cellules cardiaques	337
Quelques rappels historiques	338
Isolement et culture primaire de cellules cardiaques	338
Lignées cellulaires établies	342
Cardiomyocytes issus de cellules souches pluripotentes	343
Cultures de modèles complexes	344
Culture d'explants	344
Ingénierie tissulaire	344
Conclusion	344
Chapitre 23. Culture de cellules endothéliales : applications à l'étude de l'angiogenèse	
D. VITTET, S. BROUILLET, P. HOFFMANN, N. ALFAIDY, J.-J. FEIGE	347
Fonctions et propriétés physiologiques de l'endothélium vasculaire	347
Angiogenèse	348
Caractérisation des cellules endothéliales	348
Morphologie	348
Marqueurs cellulaires	349
Protocoles de préparations de cultures cellulaires endothéliales (méthodes d'isolement)	350
Cellules macrovasculaires. Exemple des cellules endothéliales humaines de la veine ombilicale (HUVEC)	351
Cellules microvasculaires. Exemple des cellules endothéliales humaines placentaires (HPEC)	352
Préparations commerciales	353
Intérêt des cultures de cellules endothéliales	353
Modèles 2D (bidimensionnels) d'angiogenèse	353
Modèles 3D (tridimensionnels) d'angiogenèse	354
Perspectives futures des cultures de cellules endothéliales	357
Chapitre 24. Culture de cellules ostéoblastiques P. MARIE, D. MODROWSKI, O. FROMIGUÉ	360
Origine et différenciation des ostéoblastes	360
Obtention de cellules ostéoblastiques	361
Cellules provenant du stroma médullaire	361

Cellules dérivées de l'os	362
Autres sources de cellules de type ostéoblastique	362
Ostéocytes	362
Lignées cellulaires	362
Utilisation des cellules ostéoblastiques	363
Études phénotypiques	363
Études phénotypiques <i>ex vivo</i>	364
Applications thérapeutiques des cellules ostéoblastiques	366
Analyse transcriptomique et protéomique	366
Thérapie cellulaire et génique	366
Conclusions et perspectives	368
Chapitre 25. Système hématopoïétique M. MAYNADIÉ, F. GIRODON	372
Hématopoïèse	372
Localisation de l'hématopoïèse	372
Cellules de l'hématopoïèse	372
Microenvironnement ou stroma médullaire	374
Facteurs régulateurs de l'hématopoïèse	375
Cultures de cellules hématopoïétiques	377
Cultures et érythropoïèse	377
Techniques de cultures	377
Les différents types de cellules cultivables	378
Exemples d'application des cultures cellulaires	378
Chapitre 26. Hépatocytes et foie : modèles de référence et nouvelles approches stratégiques	
M.-A. ROBIN, C. GUGUEN-GUILLOUZO	382
Cultures primaires d'hépatocytes issus de parenchyme hépatique adulte	383
Nécessité de déstructurer le tissu par digestion enzymatique : principe et bilan fonctionnel	383
Cultures primaires en monocouche (2D)	384
Modulation fonctionnelle par les facteurs environnementaux	385
Obtention et différenciation d'hépatocytes à partir de cellules souches	390
Cellules souches d'origine tissulaire adulte	390
Cellules souches embryonnaires (ESC)	390
Lignées cellulaires immortalisées et/ou transformées	393
Lignées d'hépatomes issues de tumeurs	393
Lignée humaine HepaRG	394
Lignées d'hépatocytes immortalisées	397
Innovations technologiques	397
Développement de microsystèmes ou « puces » à cellules	397
Cultures tridimensionnelles (3D)	398
Structuration de bioréacteurs avec fluidique associée	398
Applications des modèles hépatiques <i>in vitro</i>	398
Étude des fonctions hépatiques et de leur régulation	398
Étude du métabolisme et de la toxicité des xénobiotiques	399
Applications thérapeutiques	402
Chapitre 27. Système intestinal B. DUCAROUGE, M. PELISSIER-ROTA, M. ROLLI-DERKINDEREN, B. LARDEUX, M. LAINÉ, M. NEUNLIST, M. JACQUIER-SARLIN	409
Généralités sur le système digestif	409
Principales populations cellulaires de l'épithélium digestif	412
Cellules souches et organoïdes	414
Cellules prolifératives des cryptes (cellules non transformées)	416
Cellules épithéliales intestinales immortalisées	418

Cellules différenciées dérivées des villosités intestinales (cellules non transformées)	419
Lignées d'adénocarcinomes : modèles de la différenciation épithéliale	420
Régulation des fonctions de la barrière épithéliale	426
Par le mésenchyme et la matrice extracellulaire	426
Par le système nerveux entérique	433
Conclusion	440
Chapitre 28. Cultures de cellules rénales B. L'AZOU, J. CAMBAR	448
Rappels	448
Structure et fonctions du rein	448
Cibles des principaux xénobiotiques	451
Techniques des cultures cellulaires rénales	454
Modèles rénaux <i>in vitro</i> complexes	454
Différents types de cultures de cellules	456
Cultures de cellules glomérulaires	456
Cultures de cellules vasculaires corticales rénales	461
Cultures de cellules tubulaires	462
Cultures et complexification des modèles	467
Conclusion	469
Chapitre 29. Culture de cellules épithéliales respiratoires V. PRULIÈRE-ESCAPASSE, J. BOURBON	476
Organisation et fonctions des épithéliums du tractus respiratoire chez les mammifères	476
Description morphologique	476
Fonctions de l'épithélium mucociliaire des voies de conduction	479
Fonctions de l'épithélium alvéolaire	485
Modèles de culture primaire des cellules épithéliales des voies aériennes de conduction	487
Culture d'explants	487
Culture de cellules dissociées	487
Épithélium respiratoire humain reconstitué en xénogreffe	489
Modèles de culture primaire des cellules épithéliales alvéolaires	489
Isolement et purification	489
Maintien des pneumocytes en culture primaire : milieux et supports de culture	490
Lignées cellulaires épithéliales respiratoires	493
Lignées exprimant un phénotype cellulaire des voies de conduction	494
Lignées exprimant un phénotype cellulaire alvéolaire	495
Dérivation <i>in vitro</i> de cellules épithéliales respiratoires à partir de cellules souches	496
Applications des cultures de cellules épithéliales respiratoires	497
Chapitre 30. Culture cellulaire de testicule et d'ovaire pour l'étude de la fonction de reproduction P. FROMENT, N. QUIGNOT, A. LEGENDRE, V. ROUILLER-FABRE, G. LIVERA, J. DUPONT, R. HABERT, E. LEMAZURIER	502
Fonction de reproduction	502
Fonction testiculaire	502
Fonction ovarienne	508
Développement des gonades	512
Cultures cellulaires testiculaires	516
Modèles d'études fondamentales <i>in vitro</i>	516
Protocoles de culture de cellules testiculaires	518
Cultures cellulaires ovariennes	528
Modèles cellulaires	528
Protocoles de culture de cellules ovariennes	529

Chapitre 31. Culture primaire de cellules pancréatiques exocrines de souris.	
<i>Un outil indispensable pour la compréhension de l'étiologie de la carcinogénèse pancréatique</i> U. VALCOURT, R. M. POMMIER, D. F. VINCENT, L. BARTHOLIN	544
Biologie du pancréas	545
Culture des cellules acineuses dispersées ou d'acini dispersés	548
Isolement et culture d'acini dispersés	549
Considérations générales et précautions	549
Protocole	550
Analyse du phénotype des cellules pancréatiques primaires	555
Extraction des protéines	556
Extraction des acides ribonucléiques messagers	556
Analyse du phénotype des cellules	557
Protocoles complémentaires d'isolement et de culture des cellules acineuses pancréatiques	558
Concentration en acides aminés	558
Importance du pH	558
Méthode de Sphyris et al. (2005)	558
Méthode de Bläuer et al. (2011) : culture organotypique	559
Conclusion	561
Chapitre 32. Culture de cellules de l'oreille interne de mammifère : de la physiopathologie à la thérapie F. FRANÇOIS, S. GABOYARD-NIAY, J.-L. PUEL, F. VENAIL	564
Cultures de cellules de cochlée	564
Culture organotypique d'explant de cochlée	565
Culture organotypique de tranche de cochlée	565
Applications des cultures organotypiques de cochlée	566
Cultures primaires de vestibule	567
Les différentes techniques	568
Applications	569
Conclusion	570
Chapitre 33. Caractéristiques moléculaires et propriétés fonctionnelles des cellules épithéliales mammaires A. DI-CICCO, M.-A. DEUGNIER	572
Développement de la glande mammaire	572
Caractéristiques moléculaires des cellules épithéliales mammaires	572
Organisation et marqueurs spécifiques de l'épithélium mammaire	572
Fractionnement des cellules épithéliales mammaires et analyse par cytométrie en flux	573
Interactions paracrines	575
Propriétés fonctionnelles des cellules épithéliales mammaires	575
Potentiel régénératif et clonogénique des cellules basales/myoépithéliales	575
Activité clonogénique des cellules luminales	576
Conclusion	576
Chapitre 34. Système adipocytaire I. DUGAIL	578
Fonction des adipocytes	578
Modèles adipocytaires en culture	579
Pré-adipocytes de la fraction stroma-vasculaire du tissu adipeux	579
Lignées adipocytaires	580
Conditions de culture	580
Milieux de culture	581
Exigences en sérum	581
Repiquages	581
Induction de la différenciation, contrôles de qualité	582

Transfert de gènes	582
Intérêt des cultures d'adipocytes.....	582

PARTIE V AUTRES MODÈLES

Chapitre 35. Cultures primaires de cellules cardiaques de bivalves marins G. DORANGE, M. DROGUET, H. TALARMIN	587
Espèces cibles.....	588
Choix du cœur.....	589
Anatomie et structure du cœur	589
Anatomie.....	589
Structure	589
Physiologie.....	592
Cultures primaires de cellules cardiaques.....	592
Prélèvement du cœur.....	592
Isolement des cellules cardiaques	594
Conditions de culture	595
Évolution des cultures.....	595
Croissance cellulaire	597
Capacité fonctionnelle des cellules cardiaques en culture.....	599
Essais de subculture.....	600
Cryopréservation des cellules isolées	601
Quelques exemples d'application des cultures en toxicologie.....	602
Effet de l'acide okadaïque sur les cellules cardiaques de palourde.....	602
Effet du tributylétain sur des cardiomyocytes d'huître.....	603
Effet du cadmium sur les cardiomyocytes d'huître	604
Conclusion.....	604
Chapitre 36. Cultures primaires de branchies et de muscles de truite arc-en-ciel I. LEGUEN, J.-C. GABILLARD.....	607
Conditions de culture cellulaire pour poissons téléostéens	607
Culture primaire de branchies de truite.....	607
Isolement des cellules branchiales.....	608
Culture sur support solide	609
Culture sur support perméable.....	609
Culture primaire de cellules satellites de truite.....	611
Méthode d'extraction des cellules satellites de truite	612
Caractérisation des cellules satellites en culture.....	612
Chapitre 37. Enjeux fondamentaux et biotechnologiques de la culture des cellules d'arthropodes F. COUSSERANS, Y. BOUBLIK, F. SALASC, M. CERUTTI, T. DUPRESSOIR.....	615
Pourquoi cultiver des cellules d'arthropodes ?.....	615
Génomique structurale	615
Génomique fonctionnelle.....	615
Modèles animaux	616
La culture de cellules d'arthropodes existe depuis le début du 20 ^e siècle.....	616
Culture de cellules d'arthropodes et agents infectieux	616
« Montée en puissance » des cultures de cellules d'arthropodes	617
Spécificités techniques	618

Production de protéines hétérologues et/ou recombinantes	620
Les différents systèmes	620
« Humanisation » des systèmes de production de protéines recombinantes en cellules d'insecte	623
Glycosylation dans les cellules d'insecte	623
« Humanisation » de la voie de biosynthèse des N-glycanes	624
Perspectives	626
Production de particules virales	627
Vaccins	627
Vecteurs	629
Conclusion	630

PARTIE VI LÉGISLATION

Chapitre 38. Aspects éthiques et réglementaires de l'utilisation des cellules, tissus et produits du corps humain : applications aux études <i>in vitro</i> I. FABRE, A. DE GUERRA	639
Législation : historique des lois relatives à la bioéthique	639
Les premières lois de bioéthique	639
Sanctions en cas d'infractions en matière d'éthique médicale	641
Organes	641
Prélèvements à fins scientifiques sur personnes décédées	642
Tissus, cellules, produits du corps humain et dérivés	642
Dispositions communes	642
Prélèvement et collecte	642
Autorisation des établissements effectuant les prélèvements	643
Préparation, conservation et utilisation des tissus, des cellules et de leurs dérivés	643
Recherche sur l'embryon et les cellules souches embryonnaires	644
Autres modèles cellulaires prospectifs issus d'éléments du corps humain : un cadre législatif moins contraignant	644
Cellules souches adultes	644
Cellules souches pluripotentes induites	645
Textes relatifs à l'importation et à l'exportation d'organes, de tissus et de cellules du corps humain	645
Pour les organes	645
Pour les tissus, cellules	645
Brevetabilité des éléments du corps humain et de ses dérivés	646
Directive européenne relative à la protection juridique des inventions biotechnologiques	646
Encadrement juridique communautaire et international dans les différents domaines de la bioéthique	646
Droit communautaire	646
Droit international	647
Conclusion	647
Postface – Considérations éthiques sur l'usage futur des cultures cellulaires J. DEMONGEOT	649
Index	663

Apport de la cytométrie en flux à la culture cellulaire

11

J.-F. MAYOL

Principe de la cytométrie en flux

La cytométrie en flux (CMF) est une technique permettant la mesure (-métrie) des propriétés optiques de cellules (cyto-) transportées par un liquide vecteur (flux). La CMF permet d'effectuer une analyse multiparamétrique de cellules individualisées, en suspension, grâce au passage de ces cellules devant un laser révélant leurs propriétés de diffusion et de réfraction lumineuse ainsi que d'émission de fluorescence. L'objectif de cette technique est de caractériser une ou plusieurs sous-populations cellulaires et d'en déterminer la proportionnalité par rapport à une population parente ou le nombre absolu.

La cytométrie en flux repose sur différents éléments : un système fluide, un système optique, et une interface informatique, bien sûr, sans oublier les cellules qui doivent être en suspension monodispersée et qui auront fait l'objet d'un marquage.

Système fluide

Afin que les cellules soient analysées individuellement, la suspension monodispersée « chaotique » doit être transformée en un défilement ordonné de cellules. Cette étape se produit grâce au phénomène d'hydrofocalisation grâce auquel la suspension cellulaire est enrobée par un liquide de gaine circulant à une vitesse supérieure et qui va étirer la suspension cellulaire jusqu'à ce que les cellules s'alignent les unes derrière les autres (**figure 11-1**). Les régulations des vitesses du liquide de gaine et du liquide échantillon se font grâce au contrôle des pressions d'air appliquées sur ces liquides. L'utilisateur a la possibilité de faire varier la pression sur le liquide échantillon, ce qui permet de moduler le débit d'analyse de l'échantillon en élargissant ou en rétrécissant la veine liquide de l'échantillon au sein du liquide de gaine.

Système optique

Le système optique d'un appareil de cytométrie est composé de deux parties, chargées respectivement de l'excitation des cellules et de la collecte des signaux lumineux. Les lasers sont utilisés dans la très grande majorité des appareils de cytométrie. Ils offrent plusieurs avantages pour leur utilisation comme source d'excitation : (i) leur longueur d'onde d'émission est très étroite (une seule valeur de longueur d'onde), (ii) leur puissance permet une très bonne excitation des fluorochromes (de 10 à 100 mW), et (iii) la cohérence du faisceau lumineux permet de perdre très peu d'énergie lumineuse lors du trajet qui conduit les photons de la sortie du tube laser au point d'intersection avec la veine liquide et les cellules. Les appareils de cytométrie sont généralement équipés d'un à trois lasers, mais certains appareils peuvent comporter jusqu'à sept lasers afin d'augmenter encore la quantité de fluorochromes analysables simultanément. Le laser va intercepter les cellules dans une cellule en quartz dont l'indice de réfraction est proche de celui du liquide contenant l'échantillon afin de limiter la dispersion du signal lumineux.

L'interception de la veine liquide contenant les cellules à analyser par le laser est à l'origine de l'émission de photons de fluorescence ou de diffusion. Ces photons peuvent avoir des longueurs d'onde très diverses en fonction des fluorochromes par lesquels ils sont émis. La deuxième partie de l'optique de l'appareil de cytométrie en flux a pour fonction de collecter ces photons et de les séparer selon leur longueur d'onde. Ce constituant du cytomètre est le banc optique (**figure 11-2**). Il est formé de différents composants (cités par ordre d'interaction avec le signal lumineux) :

— une lentille de collection recueillant une partie de la lumière émise au point d'interception avec le laser. Dans certains cas, cette lentille de collection va amener les

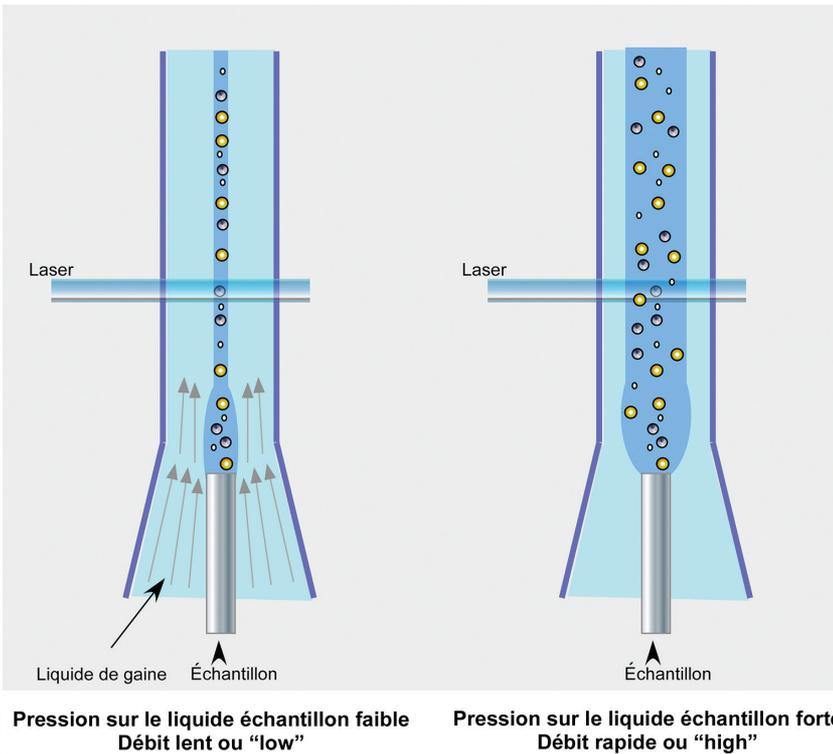


Figure 11-1 Phénomène d'hydrofocalisation permettant l'alignement des cellules les unes derrière les autres et influence de la pression appliquée sur le liquide échantillon sur la qualité de l'hydrofocalisation.

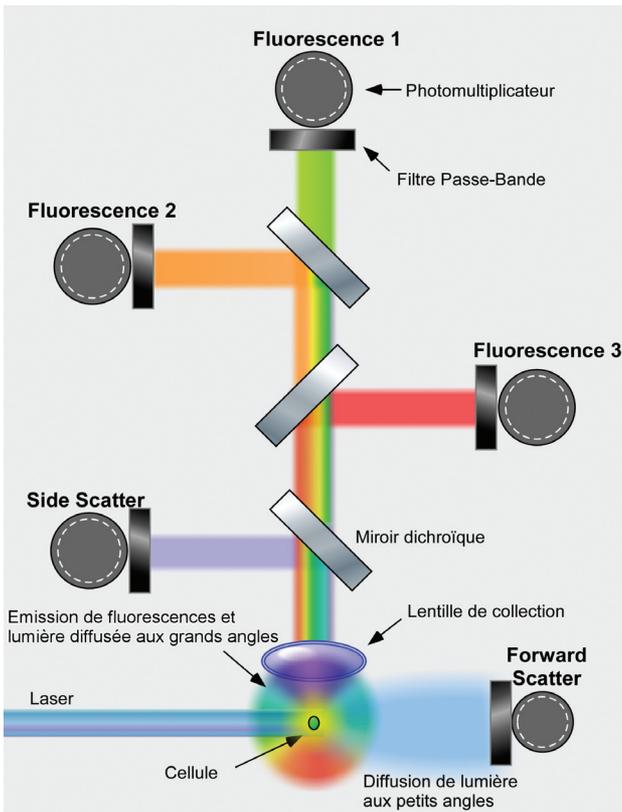


Figure 11-2 Représentation d'un banc optique et des différents éléments qui le composent.

photons dans un réseau de fibres optiques conduisant le signal lumineux vers le banc optique proprement dit. Dans d'autres cas, la lentille de collection est accolée au banc optique et la transmission du signal lumineux est directe ;

- des miroirs dichroïques segmentant le signal lumineux en fonction de la longueur d'onde des photons qui le composent. Cette segmentation a pour but de séparer les photons selon le fluorochrome qui les a émis. Ces miroirs dichroïques peuvent avoir plusieurs propriétés : soit ils laissent passer les photons dont la longueur d'onde est inférieure à une valeur donnée, ils sont alors dits « *short-pass* » ou passe-bas (par exemple, 488SP), le reste des photons est alors réfléchi dans une autre direction, soit ce sont les photons de longueur d'onde plus élevée qui passent, le miroir dichroïque est alors qualifié de « *long-pass* » ou passe-haut (par exemple, 530LP) ;

- des filtres passe-bande placés devant les photomultiplicateurs effectuant une ultime sélection de la longueur d'onde des photons qui seront par la suite quantifiés. Ces filtres transmettent seulement une certaine largeur de bande passante de longueurs d'onde ; les autres photons sont alors absorbés par ce filtre. Par exemple, un filtre BP515/30 laisse passer tous les photons dont la longueur d'onde est comprise entre 500 et 530 nm ;

- les photomultiplicateurs (PMT) permettant de transformer les photons en électrons, c'est-à-dire transformer un signal lumineux en signal électrique quantifiable. Les PMT sont constitués d'une dizaine de dynodes traversées par un courant de haut voltage. L'interaction des

électrons avec cette succession de dynodes permet une amplification du signal électrique. Lorsque l'utilisateur règle la sensibilité de détection de l'appareil, il joue sur les voltages appliqués aux PMT. Le signal électrique en sortie de PMT est proportionnel à la quantité de photons qui y sont entrés. Ce signal électrique est alors transmis vers l'interface informatique de l'appareil qui traite le signal.

Interface informatique

L'objectif de ce paragraphe n'est pas de rentrer dans les détails du traitement électronique du signal. Toutefois, il est important d'évoquer le fait que les appareils de cytométrie, tout comme les appareils photos, sont devenus numériques depuis une dizaine d'années. Cette numérisation précoce offre un grand nombre d'avantages. Le signal brut, en sortie de PMT, est directement enregistré par le système informatique, les étapes de traitement de signal comme le choix de l'échelle (linéaire ou logarithmique) ou les compensations de fluorescence peuvent être retouchés en post-acquisition, alors que ce n'est pas le cas pour les appareils de génération plus ancienne.

Différents types de marquages

La CMF permet de mettre en évidence des sous-populations cellulaires sur la base de marquages permettant de discriminer plusieurs sous-types cellulaires entre eux. Ces marquages révèlent un phénotype particulier qui peut être l'expression de certains antigènes extracellulaires, intracytoplasmiques, le contenu en ADN, la capacité de dégrader ou d'éliminer certains colorants, l'expression de protéines fluorescentes, ou encore le degré de polarisation mitochondriale.

Anticorps

L'utilisation d'anticorps couplés à des fluorochromes pour la détection d'antigènes membranaires représente la très grande majorité des applications de la CMF. Un large choix de réactifs est proposé pour réaliser des marquages multicolore (tableau 11-I), et il est maintenant courant de réaliser des expérimentations avec six réactifs fluorescents simultanément. Cependant, il a été montré qu'il est

Tableau 11-I Principaux fluorochromes pouvant être couplés à des anticorps utilisés en cytométrie en flux

Laser UV (350 nm)

Longueurs d'onde d'émission	Fluorochromes
425-450 nm	Alexa-Fluor® 350

Laser Violet (405 nm)

Longueurs d'onde d'émission	Fluorochromes
420-460 nm	Pacific Blue™, Alexa Fluor® 405, Cascade Blue®, eFluor® 450, VioBlue®, Brillant Violet 421™
500-550 nm	Alexa Fluor® 430, AmCyan, VioGreen™, Pacific Orange™, Qdot® 655, Brillant Violet 510™, Krome Orange™
> 560 nm	Brillant Violet 570™, Brillant Violet 605™, Brillant Violet 650™, Brillant Violet 711™, Brillant Violet 785™

Laser Bleu (488 nm)

Longueurs d'onde d'émission	Fluorochromes
510-545 nm	FITC, Alexa Fluor® 488
560-590 nm	PE
600-650 nm	PE-Texas Red, PE-Alexa Fluor® 610, Qdot® 605
670-720 nm	PerCP, PE-Cy5, PerCP-Cy5.5, PE-Cy5.5, PE-Alexa Fluor® 647, PerCP-eFluor® 710, PE-Dyomics 647, SpectralRed™
> 750 nm	PE-Cy7, PE-Vio770™

Laser Rouge (633-635 nm)

Longueurs d'onde d'émission	Fluorochromes
640-680 nm	APC, Alexa Fluor® 647, eFluor® 660, Dyomics 647, DyLights® 647, Cy5
> 730 nm	APC-Cy7, BD™ APC-H7, APC-eFluor® 780, APC-Vio770™, APC-AlexaFluor® 750, APC-Cy5.5

possible de réaliser des marquages avec 17 fluorochromes différents (Perfetto et al., 2004).

Le marquage de cellules avec des anticorps doit être fait dans des conditions où la concentration d'anticorps est en large excès par rapport à la quantité d'antigène à détecter. Les quantités de réactif préconisées par les fournisseurs assurent à l'utilisateur de se trouver dans ces conditions de marquage. Toutefois, une concentration trop importante d'anticorps peut être à l'origine d'une augmentation du bruit de fond. Il est recommandé de réaliser des titrages d'anticorps afin de déterminer quelle est la concentration de réactif qui permet d'avoir le meilleur rapport signal/bruit dans des conditions de marquage prédéfinies (type cellulaire, concentration cellulaire, température et durée d'incubation). Cette étape peut très souvent aussi être la source d'économies importantes pour le laboratoire car elle permet de diminuer la quantité de réactif utilisée par marquage.

Les fluorochromes associés aux anticorps peuvent avoir des poids moléculaires très variables, comme l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) qui est une petite molécule (332,31 g/mol) ou l'allophycocyanine (APC) qui est beaucoup plus imposante (104 000 g/mol). À titre de comparaison, un anticorps (IgG) a un poids moléculaire d'environ 150 000 g/mol, ce qui signifie que le couplage de cet anticorps avec l'un ou l'autre des deux fluorochromes cités ci-dessus n'aura pas la même incidence sur ses propriétés de diffusion. Ainsi, il est généralement admis qu'il convient d'utiliser des anticorps couplés à des fluorochromes de petite taille pour réaliser des marquages intracytoplasmiques afin que les anticorps puissent facilement se lier à leur cible dans un environnement où règne un fort encombrement stérique. Toutefois, les différences de rendements quantiques des fluorochromes sont aussi à prendre en compte dans ce genre de situation.

Sondes

Certaines molécules chimiques peuvent avoir une grande affinité pour certains composants de la cellule et peuvent être utilisées comme colorant fluorescent pour mettre en évidence certaines cibles (**tableau 11-II**). Contrairement à un marquage avec des anticorps, un marquage avec une sonde ne doit généralement pas être réalisé avec un large excès de réactif. En effet, ce marquage doit être réalisé dans des conditions stœchiométriques, c'est-à-dire des conditions où le nombre de molécules fluorescentes est proportionnel à la quantité de molécules cibles. Les conditions stœchiométriques de marquage dépendent de la concentration de sonde, du pH, de la force ionique ou du niveau d'accessibilité des molécules cibles. Dans certains cas, comme pour le marquage des acides nucléiques, une trop forte concentration de sonde peut être à l'origine d'une perte de stœchiométrie. Une trop forte concentration de réactif peut être aussi à l'origine d'une augmentation du marquage non spécifique, comme cela peut être le cas

Tableau 11-II Liste non exhaustive des sondes utilisables par cytométrie en flux en fonction de leur cible

Cibles	Sondes fluorescentes
ADN	Iodure de propidium Hoechst DAPI 7 amino-actinomycineD TO-PRO 3
ARN	Acridine Orange Pyronine Y
Mitochondries	DiOC ₆ (3) Rhodamine 123 JC-1 Mitotracker Nonyl Acridine Orange
Indicateurs d'ions	SNARF (pH) Indo-1 (Ca ²⁺) Fluo-4 (Ca ²⁺)
Traceurs	CFSE PKH 26, PKH 67 CellVue

dans des protocoles de marquage potentiel-dépendant des mitochondries : pour des concentrations relativement élevées de sondes, un marquage de la membrane plasmatique apparaît en plus du marquage des membranes mitochondriales. Enfin, il faut aussi considérer l'effet de ces sondes sur la viabilité et la fonctionnalité cellulaire si le marquage doit se faire sur des cellules vivantes. Bien souvent, des sondes sont décrites comme étant « vitales », voire « supravitales ». Ces termes indiquent seulement qu'elles influent peu sur la viabilité des cellules durant un temps d'incubation court ; toutefois, à long terme, elles entraînent bien souvent des effets délétères sur la viabilité ou sur la fonctionnalité cellulaire. Par exemple, le marquage de cellules avec du Hoechst 33342, ciblant les acides nucléiques, va entraîner un blocage transitoire des cellules dans le cycle cellulaire et modifier leur profil de différenciation (Steuer et al., 1990 ; Tobey et al., 1990 ; Adamski et al., 2007).

Transfection

Le dernier type de fluorescence qu'il est courant d'analyser par cytométrie en flux est celui de cellules transfectées par une protéine fluorescente. Les protéines fluorescentes de type *Green Fluorescent Protein* (GFP) sont issues d'une protéine de méduse et ont été dérivées de telle façon que les nouvelles protéines mutées émettent à des longueurs d'ondes variées. D'autres protéines fluorescentes ont aussi

été isolées à partir de corail. Ainsi, il est possible de trouver des vecteurs de transfection pour des *yellow fluorescent protein*, *red fluorescent protein*, *cyan fluorescent protein*, *blue fluorescent protein* et bien d'autres... Ces transfections peuvent avoir différents objectifs : la simple identification d'un type cellulaire au sein d'une population hétérogène, l'étude de l'expression de gènes, l'évaluation d'interactions intermoléculaires, l'étude du cycle cellulaire... La cytométrie en flux permet d'analyser l'expression simultanée de multiples protéines fluorescentes. Toutefois, les réglages de l'appareil de cytométrie sont parfois délicats, notamment le réglage des compensations (Telford et al., 2012).

Compensations de fluorescence

Les spectres de fluorescence des fluorochromes généralement utilisés sont relativement larges et asymétriques. Ainsi, une partie de la fluorescence émise par une molécule donnée peut être détectée par d'autres photomultiplicateurs que celui dédié à la quantification du signal de ce fluorochrome. Ce phénomène génère un signal de fluorescence non souhaité qui peut perturber l'interprétation des résultats. Il est alors nécessaire de soustraire ce signal, c'est le rôle du réglage des compensations. Ce présent chapitre n'a pas pour objet de rentrer dans les détails de ce type de réglages. Toutefois, il est important de savoir qu'ils doivent être réalisés d'une manière parfaitement rigoureuse pour garantir des résultats de qualité (Roederer, 2001 ; Bayer et al., 2007).

Interprétation des résultats

Régions et conditionnement des graphes

Pour chacune des fluorescences analysées, la cellule se voit attribuer une valeur sur une échelle arbitraire. Ainsi, il est possible de catégoriser des sous-populations cellulaires en fonction de leurs intensités de fluorescence. La représentation des résultats peut se faire sur des histogrammes monoparamétriques (**figure 11-3A**) figurant la répartition d'un nombre d'événements en fonction du canal de fluorescence, ou sur des histogrammes biparamétriques où les populations cellulaires sont visualisées sous la forme de nuages de points (**figure 11-3B**).

Il est possible de délimiter des régions autour des différentes populations cellulaires identifiées afin d'en connaître la représentativité, mais aussi de créer de nouveau graphes conditionnés sur une population choisie. Ainsi, la population cellulaire préalablement sélectionnée devient la population parente pour la détermination des pourcentages des sous-populations présentes dans ce nouveau graphe.

Différentes stratégies existent pour organiser les régions :

- une organisation hiérarchique où les régions sont établies en cascade. Il y a alors des populations de parents, de grands-parents, d'arrière-grands-parents... ;
- une organisation booléenne où les régions se trouvent sur un même niveau hiérarchique, mais elles sont combinées grâce à des opérateurs logiques « *and* », « *or* », « *not* », « *and not* » ou « *or not* » ;
- avec une approche globale où tous les phénotypes possibles sont analysés.

Aucune de ces stratégies n'est meilleure qu'une autre. Chacune s'applique dans des situations où l'interprétation des données nécessite une logique de combinaison de régions particulières.

Pourcentages

Dès la création de la cytométrie en flux, les résultats ont été donnés sous la forme de pourcentages indiquant la représentativité d'une sous-population par rapport à une solution parente. Il est important de bien prendre en compte que, pour la rigueur des résultats, ces deux entités doivent être parfaitement définies. Généralement, l'utilisateur s'applique à tracer avec précision la région permettant de définir sa population d'intérêt, mais le pourcentage donné ne sera juste que si la population parente a bien été définie, elle aussi. Ainsi, il est nécessaire de bien éliminer de cette population parente tous les événements pouvant être à l'origine d'artefacts ou n'étant pas des cellules : les doubles, les débris, les cellules mortes (Kuonen et al., 2010).

La mesure de pourcentages est assujettie à une incertitude qui dépend directement du nombre de cellules analysées. Cette incertitude peut être calculée grâce à la loi de Poisson où elle est représentée par un coefficient de variation. Il est communément accepté qu'en biologie, ce coefficient de variation doit être inférieur à 5 %, ainsi le nombre minimal de cellules d'intérêt à analyser est de 400. Cette incertitude peut paraître encore élevée ; et si l'expérimentateur souhaite avoir un coefficient de variation de 1 %, il lui faudra alors analyser 10 000 cellules d'intérêt. Dans ces deux exemples, le nombre d'événements total à enregistrer n'est pas celui indiqué. Il faut relativiser ce nombre par rapport au pourcentage représenté par la population d'intérêt. Dans ces deux cas, si la population d'intérêt représente 4 % du total, il faudra analyser un total de 10 000 cellules pour avoir un coefficient de variation de 5 % et 250 000 cellules pour un coefficient de variation de 1 %.

Valeurs absolues

Il est parfois intéressant d'exprimer les résultats en valeur absolue (en nombre de cellules par unité de volume) plutôt qu'en pourcentage. Différentes stratégies permettent d'arriver à ce type de résultat selon l'appareil à la disposition de l'expérimentateur. En effet, certains appareils ont la possibilité de mesurer précisément le volume

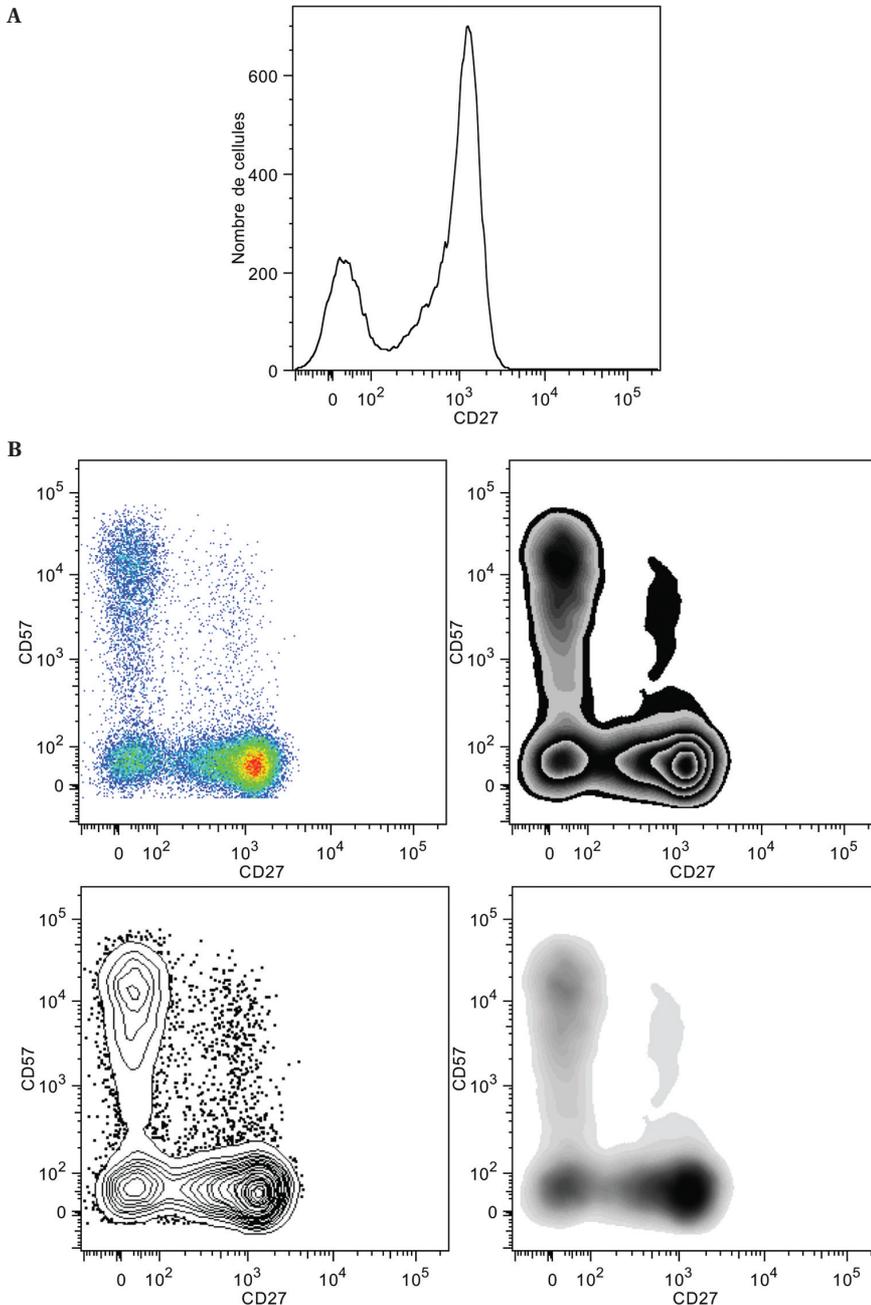


Figure 11-3 Différentes représentations possibles des données de cytométrie : (A) histogramme monoparamétrique, (B) histogrammes biparamétriques selon différents types (*pseudo-color*, *zebra*, *contour* et *density*).

d'échantillon aspiré et ainsi de pouvoir rendre des résultats en valeur absolue. Pour les appareils n'étant pas équipés de ce module, il est possible de mélanger volume à volume des billes fluorescentes de concentration connue (billes pour compte absolu), puis, soit par un produit en croix soit grâce à un module intégré, il est possible d'obtenir des résultats en concentration cellulaire.

Intensités de fluorescence

Pour certaines applications, les variations d'intensité de fluorescence peuvent présenter un intérêt tout

particulier, pour suivre le niveau d'expression d'un antigène, pour observer de fines variations de polarisation mitochondriale, de pH intracytoplasmique, de concentration ionique...

Les appareils de cytométrie en flux permettent de mesurer différents paramètres relatifs à l'intensité de fluorescence. Toutefois, ces valeurs sont données avec une unité arbitraire car l'intensité de fluorescence mesurée dépend de nombreux paramètres dont la configuration du banc optique, le pH ou le voltage appliqué sur le photomultiplicateur. Ainsi, il est possible de mesurer la moyenne arithmétique, le mode, la moyenne géométrique, et la

médiane. Ces deux dernières valeurs sont préférentiellement utilisées pour déterminer une MFI (*Mean or Median Fluorescence Intensity*) car elles sont moins sensibles aux valeurs extrêmes.

Afin de savoir si une différence existe entre deux valeurs d'intensité de fluorescence mesurée, le calcul d'un RFI (*Relative Fluorescence Intensity*) peut être réalisé. Il est calculé grâce au rapport :

MFI de l'échantillon/MFI du témoin

Il est considéré que, si ce RFI est supérieur à 1,5, une différence existe, bien que cela ne repose sur aucune loi statistique. Des tests statistiques existent pour mettre en évidence une différence significative entre deux intensités de fluorescence. Ce sont les tests de Kolmogorov-Smirnov et du Chi(T) qu'il est possible de réaliser grâce à certains logiciels spécialisés dans l'interprétation des données de cytométrie (Cox et al., 1988 ; Roederer et Hardy, 2001). Toutefois, il peut être bon de rappeler qu'une différence significative entre deux échantillons ne traduit pas forcément un effet biologique.

Afin de déterminer la quantité d'antigènes exprimée par des cellules, il est possible de réaliser des calibrations à l'aide de billes spécifiques à cette application. Différentes stratégies existent à partir de billes recouvertes ou imprégnées de quantités connues de fluorochromes (Gratama et al., 1998 ; Lavabre-Bertrand, 2006). Ces billes permettent d'établir une courbe étalon faisant la relation entre l'intensité de fluorescence et la concentration antigénique. Des logiciels permettent alors de transformer automatiquement l'unité arbitraire de fluorescence en concentration antigénique.

Applications

Dans ce chapitre, nous aborderons uniquement les applications de la cytométrie en flux qui sont les plus utilisées dans le domaine de la culture cellulaire, c'est-à-dire hors des phénotypages d'échantillons de type hématologique ou immunologique qui représentent le pan le plus large des applications de la cytométrie.

Caractérisation phénotypique de sous-populations présentes

Cette application est la plus classique des applications de cytométrie. Elle est basée sur l'analyse phénotypique des cellules. Lorsque des cellules cultivées *in vitro* ont des caractéristiques hétérogènes, la cytométrie en flux permet de mettre en évidence cette hétérogénéité en révélant la présence de différentes sous-populations sur la base de l'expression d'antigènes membranaires ou intracellulaires. Il est alors possible de connaître le pourcentage ou la concentration cellulaire de chacune des sous-populations identifiées. Ce type d'application permet, par exemple, de

suivre les étapes de différenciation de cellules cultivées, que ce soit à partir de cultures primaires (De Smedt et al., 2011) ou à partir de cellules immortalisées (Liu et al., 2004). Le champ d'application de la caractérisation de différentes sous-populations présentes n'est, bien entendu, pas limité à l'étude de la différenciation, et de très nombreuses autres études sont possibles.

Mesure d'une intensité de fluorescence

À travers la mesure d'une intensité moyenne de fluorescence, il est aussi possible d'obtenir différents résultats à partir de cellules cultivées *in vitro*. Cela permet, par exemple, après marquage intracellulaire, de déterminer le niveau de synthèse d'une cytokine (Shooshtari et al., 2010). Cette logique peut, bien sûr, être appliquée à d'autres molécules synthétisées par les cellules à condition qu'elles soient fluorescentes ou qu'elles puissent être mises en évidence grâce à un marqueur fluorescent. Dans certains cas, il est nécessaire de bloquer la sécrétion ou l'exocytose qui peuvent fausser l'interprétation, afin que le niveau de fluorescence mesurée soit bien proportionnel au niveau de synthèse.

La mesure d'une intensité de fluorescence permet aussi de déterminer le niveau de différenciation de certains types cellulaires. Les cellules souches hématopoïétiques CD34+ isolées à partir de moelle osseuse peuvent être cultivées *in vitro*. Le suivi de l'intensité d'expression de cet antigène grâce à un marquage immunofluorescent permet de suivre le processus de différenciation qui se traduit par une diminution de l'expression du CD34 (Wu et al., 2001). Cela permet, par exemple, d'évaluer l'effet de facteurs de croissance sur ce processus de différenciation.

Étude de la viabilité, de la mort cellulaire

Différents types de mort cellulaire sont décrits (Galluzzi et al., 2012). Toutefois, dans le domaine de la cytométrie en flux, seuls trois types de mort cellulaire sont classiquement caractérisés : la nécrose, l'apoptose et la sénescence. Brièvement, la nécrose est le résultat d'une toxicité directe d'un agent chimique ou physique qui se traduit par une augmentation du volume cellulaire, une altération des organites cellulaires et une rupture de la membrane conduisant à la lyse des cellules. L'apoptose est un mode de mort où la cellule intervient dans sa propre destruction, caractérisée par une réduction du volume cellulaire, une condensation de la chromatine, une fragmentation nucléaire, le maintien de l'intégrité membranaire jusqu'aux étapes finales du processus de mort qui conduit à la formation des corps apoptotiques. La sénescence non répliquative est caractérisée par l'arrêt irréversible de l'activité de prolifération, mais un grand nombre de fonctions cellulaires sont maintenues (adhérence, sécrétion, activité métabolique...). Ce n'est qu'après une période de

quelques semaines à quelques mois que la cellule entame les étapes finales de sa mort.

La caractérisation et la quantification des cellules viables dans une culture sont très largement utilisées lors de tests de toxicité, de cytotoxicité, lors de l'évaluation de la bonne santé des cellules après expansion ou lors du test de nouvelles conditions de culture. Au-delà de ces quelques applications, il est recommandé de réaliser un marquage permettant d'identifier les cellules viables dès lors que des analyses sont réalisées sur des cellules fraîches car les cellules mortes ou moribondes peuvent fixer non spécifiquement des anticorps couplés à des fluorochromes et être la source de faux positifs. Les marquages de viabilité sont très généralement basés sur la mise en évidence de la perte de

l'intégrité membranaire des cellules mortes. Le principe repose sur l'utilisation d'une molécule fluorescente ayant une cible intracellulaire (**tableau 11-III**) ; la membrane des cellules viables étant intègre et la membrane des cellules mortes étant altérée, un différentiel de marquage entre ces deux populations peut être observé.

La cytométrie en flux permet aussi la caractérisation des cellules apoptotiques ; de nombreuses techniques existent pour mettre ces cellules en évidence (Vermees et al., 2000 ; Wlodkowic et al., 2010). Ces techniques s'appuient sur des modifications phénotypiques ou fonctionnelles apparaissant lors du processus de mort (**tableau 11-IV**).

L'étude des phénomènes d'apoptose doit bien prendre en considération l'aspect dynamique de la mort cellulaire.

Tableau 11-III Principales molécules fluorescentes utilisées pour les tests de viabilité par cytométrie en flux

Sonde	Excitation	Émission	Remarques
DAPI	UV	461	
Hoechst 33 258	UV	461	
Iodure de propidium	UV, Bleu	617	Spectre d'émission très large qui limite son emploi dans des protocoles multicolore
Homodimère-1 d'éthidium	UV, Bleu	617	Idem Iodure de propidium
7-aminoactinomycineD	Bleu	647	Spectre décalé dans le rouge par rapport à l'iodure de propidium, compatible avec l'emploi de la phycoérythrine
Calcéine AM	Bleu	517	Reste séquestré par les cellules vivantes qui deviennent fluorescentes, les cellules mortes sont non-marquées
Calcéine <i>Blue</i> AM	UV	435	
Calcéine <i>Violet</i> AM	Violet	452	
Sytox <i>Blue</i>	Violet	470	
Sytox <i>Red</i>	Rouge	658	
Sytox <i>Green</i>	Bleu	523	
YO-PRO 1	Bleu	509	
PO-PRO 1	Violet	465	
TO-PRO 3	Rouge	661	
LIVE/DEAD [®] Fixable Dead Cell Stain Kits	UV	450	L'échantillon peut être fixé après marquage avec ce réactif
	Violet	451 ou 526	
	Bleu	520 ou 615	
	Rouge	665 ou 775	
Fixable Viability Dye eFluor [®]	Violet	450 ou 506	L'échantillon peut être fixé après marquage avec ce réactif
	Rouge	660 ou 780	
BD Horizon Fixable Viability Stain 450	Violet	450	L'échantillon peut être fixé après marquage avec ce réactif

Tableau 11-IV Principales techniques utilisées pour caractériser les cellules apoptotiques par cytométrie en flux

Évènement cellulaire	Techniques	Remarques
Activation des caspases	Inhibiteurs de caspases couplés à des fluorochromes	Existe sous la forme de différents kits, spécifiques d'une seule caspase, ou permettant de mettre en évidence l'activation d'un ensemble de caspases
Dépolarisation mitochondriale	Marquage des mitochondries avec des molécules fluorescentes lipophiles cationiques permettant de mettre en évidence des variations du niveau de polarisation mitochondriale	Différents marqueurs sont disponibles : le DiOC ₆ (3), le JC-1, le MitoTracker Red, la rhodamine 123, le TMRM
Externalisation de la phosphatidylsérine	Marquage avec l'annexine V	L'annexine V peut être couplée à différents fluorochromes. Sa liaison avec la phosphatidylsérine ne peut se faire qu'en présence de Ca ²⁺ . Le décollement de cellules adhérentes peut être à l'origine de l'apparition de faux-positifs
Fragmentation de l'ADN	Détection du pic sub-G ₁ , technique TUNEL	Se pratique sur des cellules fixées, permet le stockage des cellules avant leur analyse

Chacune de ces techniques s'appuie sur un processus cellulaire qui n'apparaît pas au même temps que les autres. C'est pourquoi, il n'est pas recommandé de présenter des résultats en « pourcentage de cellules apoptotiques », mais en « pourcentage de cellules positives pour l'annexine V » par exemple, car les résultats obtenus avec chacune de ces techniques ne sont pas comparables entre eux (Galluzzi et al., 2009).

La détection de cellules sénescents par cytométrie en flux repose sur la mise en évidence de l'expression de la SA- β -galactosidase, une enzyme exprimée spécifiquement par les cellules en sénescence non répliquative grâce à un substrat fluorogène de cette molécule (Zhao et al., 2010 ; Cho et Hwang, 2011 ; Bordoni et al., 2012). Le niveau d'expression de cette enzyme peut devenir détectable seulement quelques jours après le stress à l'origine de l'induction de la sénescence.

Quel que soit le mode de mort cellulaire étudié, il est important de rappeler que ces processus sont dynamiques et que, bien souvent, la caractérisation des phénomènes impliqués est plus fiable lors d'une étude en cinétique.

Cycle cellulaire et prolifération

Grâce à l'analyse du contenu en ADN des cellules, il est possible de connaître leur répartition dans les différentes phases du cycle cellulaire (2n chromosomes : phases G₀/G₁, 4n chromosomes : G₂/M, compris entre 2n et 4n : phase S). Classiquement, le cycle cellulaire est représenté sur un histogramme monoparamétrique où il est possible d'identifier les pics correspondant à ces différentes phases (**figure 11-4**). La difficulté principale est de réaliser

une discrimination précise de ces différents pics afin de connaître avec précision la répartition des cellules dans les phases du cycle (Ronot et al., 2010). Cette discrimination est d'autant plus aisée que les pics sont fins, c'est-à-dire que le coefficient de variation est le plus petit possible. Les facteurs influençant ce paramètre sont le débit cellulaire, la

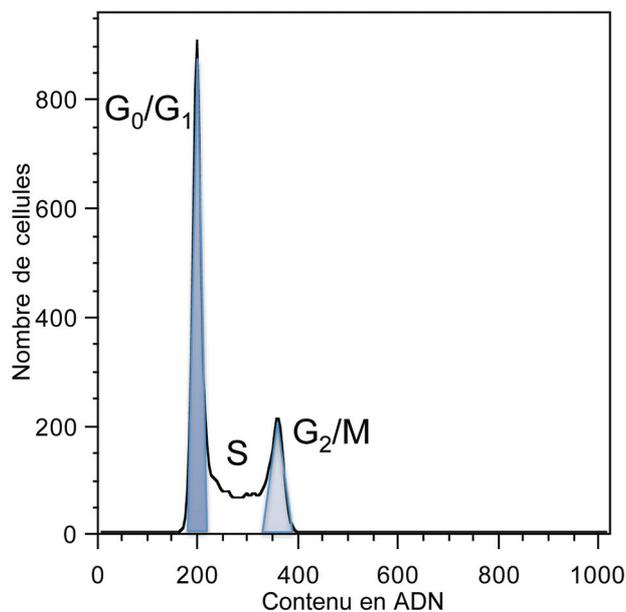


Figure 11-4 Représentation en histogramme monoparamétrique du contenu en ADN d'une population cellulaire pour l'étude du cycle cellulaire et ses différentes phases : G₀/G₁, S et G₂/M.