

# Table des matières

Liste des auteurs .....	III
Avant-propos .....	VII

## Chapitre 1

<b>Le cycle cellulaire et sa régulation (Jacques Robert et Françoise Durrieu) .....</b>	<b>1</b>
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

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

*(Cécile Cottet-Rousselle)* . . . . . 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

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

*(Jean-François Mayol)* . . . . . 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*

<b>Quiescence, sénescence et mort cellulaire : des phases particulières du cycle cellulaire</b> ( <i>Jean-Philippe Breittmayer et Jean-François Mayol</i> ) . . . . .	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*

<b>Analyse de la division cellulaire par dilution de fluorochrome</b> ( <i>Cécile Cottet-Rousselle, Jacques Mathieu et Lionel Valenti</i> ) . . . . .	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 cytodierèse</b> ( <i>Joëlle Sobczak-Thépot, Isabelle Gasnereau et Florence Bourgain-Guglielmetti</i> )	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 cytodierèse	137
2.1. Définition de la cytodierèse	137
2.2. Les multiples acteurs nécessaires à la cytodierèse	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 cytodierèse par CMF	144
4.1. Le signal de fluorescence de l'ADN des cellules en cytodierèse est caractéristique	144
4.2. Perspectives : quels outils développer pour mieux identifier les cellules en cytodierèse ?	144
Conclusion	147
Annexe : les surprises de la synchronisation cellulaire	147

**Cycle cellulaire et pharmacologie des anticancéreux**

(Jean-François Mirjolet) . . . . . 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 (*cyclin-dependent kinase*) . . . . . 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-isomérase . . . . . 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

et Agnès Chassevent) . . . . . 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-Jeunemaître</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