



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Analyse du DNA par cytométrie de flux: approche des problèmes méthodologiques rencontrés lors de l'analyse

Vandenbroucke, Nathalie

Award date:
1994

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

FACULTES UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTE DES SCIENCES



ANALYSE DU DNA PAR CYTOMETRIE DE FLUX.
APPROCHE DES PROBLEMES METHODOLOGIQUES RENCONTRES
LORS DE L'ANALYSE.

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de licenciée en Sciences
biologique
par

VANDENBROUCKE Nathalie

Septembre 1994

Facultés Universitaire Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tél. 081/72.41.11 - Télex 59222 Facnam-b - Téléfax 081/72.44.20

Analyse du DNA par cytométrie de flux. Approche des problèmes méthodologiques rencontrés lors de l'analyse.

VANDENBROUCKE Nathalie

Résumé

La cytométrie de flux est une technique d'exploration cytologique qui peut être utilisée pour analyser rapidement le contenu en ADN des cellules en suspension.

Le marquage de l'ADN (par l'iodure de propidium), bien que couramment utilisé dans certains laboratoires, n'est pas réalisé sans mal; quatre problèmes majeurs sont étudiés et traités :

- Après perméabilisation (par la saponine), la conformation des monocytes, principalement, est modifiée; cette modification se traduit, sur le cytogramme, par un déplacement de cette population de monocytes qui vient se superposer à la population de lymphocytes.

- Le coefficient de variation de la phase G_0 / G_1 est trop élevé pour permettre une analyse précise de la ploïdie et des différentes phases du cycle cellulaire.

- Lors d'un double marquage (marquage de protéines membranaires et de l'ADN) utile pour délimiter le type cellulaire à étudier, les pics de fluorescence verte positif et négatif se rapprochent et il devient difficile d'isoler la population cellulaire à étudier.

- Le pourcentage de cellules se trouvant dans les différentes phases du cycle cellulaire n'est pas toujours représentatif de la "réalité".

Les lymphocytes humains normaux sont, en général, diploïdes et la majorité se retrouvent en phase G_0 / G_1 . Ces cellules sont dépourvues de jonctions intercellulaires et ne nécessitent pas de traitements spéciaux pour les séparer.

Pour ces différentes raisons, ces lymphocytes sont souvent utilisés comme standard et sont également employés lors de mes analyses.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques (Zoologiques)

Septembre 1994

Promoteur : P. Devos

Co-promoteur : J.P. Dinant & P. François

Au terme de ce mémoire, qu'il me soit permis de remercier monsieur J.P. Dinant pour son accueil au sein de son laboratoire.

Je tient également à adresser mes plus vifs remerciements à monsieur P. François pour sa coopération, pour ses orientations et critiques tant pour la pratique que pour la rédaction de ce mémoire.

J'exprime toute ma reconnaissance au Père P. Devos S.J. pour sa gentillesse, sa disponibilité et ses nombreux encouragements.

Je remercie également monsieur J.J. Mollet pour ses conseils et la sympathie qu'il m'a témoignée durant l'élaboration du travail expérimental.

Merci aussi à tous les membres du laboratoire dont les conseils et les encouragements m'ont permis de progresser dans mon apprentissage. Que monsieur A. Deprez trouve ici l'expression de toute ma sympathie.

C'est du fond du coeur que je remercie ma famille et amis pour leur présence et leur soutien.

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION	1
1.1. ADN et cycle cellulaire	1
1.1.1. L'ADN cellulaire	1
a. Structure	1
b. La réplication	1
1.1.2. Le cycle cellulaire	2
a. La phase G ₁	2
b. La phase S	3
c. La phase G ₂	4
d. La phase M	4
1.2. Mise en évidence de l'ADN et du cycle cellulaire	5
1.2.1. L'autoradiographie	5
1.2.2. La microscopie et la microcinématographie	6
1.2.3. La cytométrie de flux	7
a. Analyse de la réplication de l'ADN	8
b. Analyse statique	9
1° / Analyse monoparamétrique du contenu en ADN	9
• Principe	9
• Marqueurs fluorescents	10
* Chromomycine, mithramucine, olivomycine	10
* Hoechst 33258 et Hoechst 33342	11
* DAPI et DIPI	11
* 7-aminoactinomycine D	12
* Acridine orange	12
* Bromure d'éthidium et iodure de propidium	12
* les antigène associés à la prolifération	13
PCNA	14
Ki-67	14
2° / Analyse multiparamétrique du cycle cellulaire	15
* Double marquage ARN / ADN	15
* Double marquage protéines / ADN	15
c. Analyse cinétique	16
1.3. Notion de prolifération et de croissance cellulaire	18
1.3.1. Contrôle en phase G ₁	18
1.3.2. Transition G ₂ - M	20
1.4. Notion de malignité	21
1.4.1. Définition	21

1.4.2. Facteurs impliqués dans la genèse de la malignité	22
a. Les cancérogènes chimiques	22
b. Les radiations	23
c. Les virus	23
1° / Les virus à ARN	24
2° / Les virus à ADN	25
1.4.3. Anomalies nucléaires associées	26
1.5. Application clinique à l'étude du DNA et du cycle cellulaire en pathologie humaine.	27
1.5.1. Etude de la prolifération tumorale	27
a. Diagnostic	27
b. Pronostic	27
c. Suivi thérapeutique	28
1.5.2. Action des drogues antinéoplasiques	30
1.6. But du travail	31
2. MATERIEL ET METHODES	32
2.1. Matériel	32
2.2. Méthodes	34
2.2.1. La cytofluorimétrie	34
a. Le système	34
b. Analyse en cytométrie de flux	36
c. Analyse du pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire (analyse PARA 1)	37
2.2.2. Méthode de marquage de l'ADN avec l'iodure de propidium	38
2.2.3. Concentré de cellules mononucléées à partir d'un échantillon sanguin	42
2.2.4. Méthode de marquage des immunoglobulines de surface	43
3. RESULTAT ET DISCUSSION	44
3.1. Premier problème : superposition des deux populations, monocytes et lymphocytes	45
3.1.1. Analyse du problème	45
3.1.2. Résolution du problème	46
3.1.3. Conclusion	48
3.2. Deuxième problème : coefficient de variation élevé	49
3.2.1. Analyse du problème	49
3.2.1. Résolution du problème	49
- 4 précautions à prendre	50
- influence de la perméabilisation	55
- influence de la concentration en iodure de propidium	55
- influence du temps d'incubation de l'iodure de propidium et de la RNAase	57

- influence du lavage	59
- influence de la puissance du laser	60
- influence de la lyse et de la fixation	62
- influence du double marquage	64
3.2.3. Conclusion	67
3.3. Troisième problème : En double marquage, les pics de fluorescence verte positif et négatif se rapprochent	69
3.3.1. Analyse du problème	69
3.3.2. Résolution du problème	69
- influence de la saponine	69
- influence de l'iodure de propidium	70
3.3.3. Conclusion	72
3.4. Quatrième problème : le pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire n'est pas représentatif de la réalité	73
3.4.1. Analyse du problème	73
3.4.2. Résolution du problème	73
- influence du coefficient de variation	73
- influence du photomultiplicateur de la fluorescence rouge	74
- influence de la formation de doublets	75
- influence de la formation de débris	75
3.4.3. Conclusion	75
4. CONCLUSION	77
5. BIBLIOGRAPHIE	
6. ANNEXE	

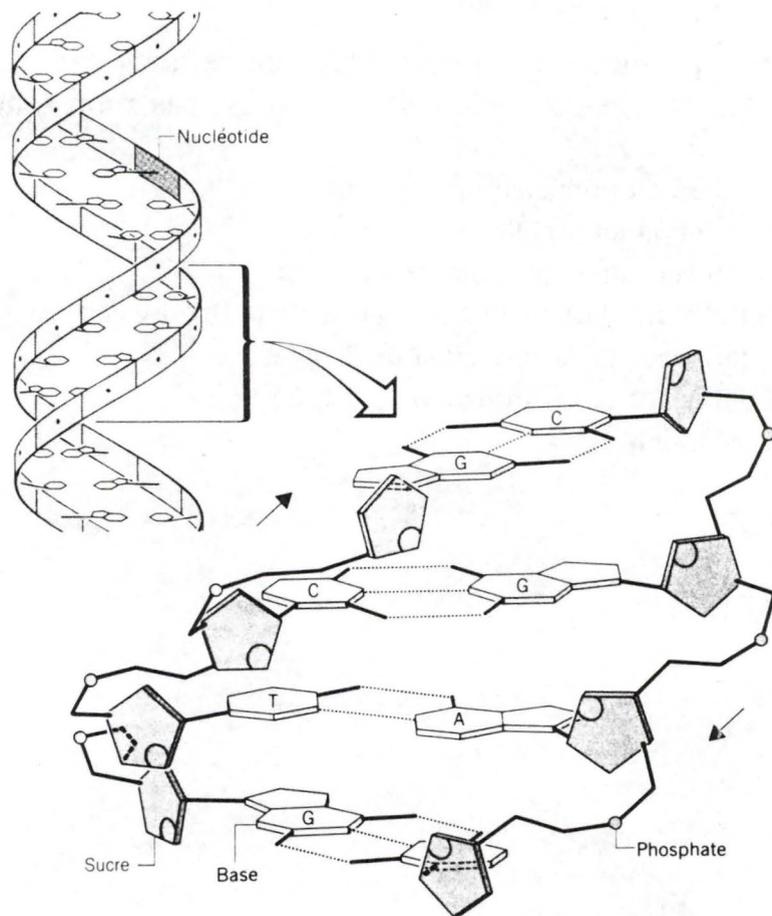


Figure 1 : structure de l'ADN

INTRODUCTION

1.1. ADN et cycle cellulaire

1.1.1. L'ADN cellulaire

a. Structure¹

Formés de molécules, les êtres vivants sont des systèmes organisés, en perpétuel état de renouvellement. Echangeant à tout instant avec le milieu dans lequel ils se trouvent des flux d'information, de matière et d'énergie, ils doivent conserver leurs structures, maintenir leur individualité et ceci grâce au programme génétique qui est propre à chacun d'eux.

Ce programme génétique est porté par l'ADN (acide désoxyribonucléique).

En fait, la molécule d'ADN se présente sous forme de deux chaînes hélicoïdales enroulées autour d'un même axe et maintenues sous forme d'une structure à deux brins ou structure bicaténaire grâce à l'appariement des bases se faisant en vis à vis sur l'une et l'autre chaîne : les appariements sont toujours adénine-thymine (2 liaisons non covalentes) et guanine-cytosine (3 liaisons non covalentes). Les deux chaînes ont une polarité opposée : ce sont des chaînes antiparallèles de telle sorte que les extrémités 3' et 5' sont inversement placées dans chacun des deux brins. (*figure 1*)

b. La réplication¹²

Toutes les cellules somatiques d'un organisme eucaryote dérivent les unes des autres et ont le même contenu génétique. Cela exige que la transmission de l'information d'une génération cellulaire à la suivante se fasse selon des mécanismes et des régulations extrêmement précis, impliquant des risques minimes d'erreurs.

La synthèse de l'ADN est semi conservative. Avant la division de la cellule, les 2 chaînes de l'ADN se séparent et chacune sert de matrice pour la synthèse de la chaîne complémentaire, si bien que l'on aboutit à la synthèse de 2 molécules identiques d'ADN chacune de ces molécules comprenant une des chaînes initiales. Ainsi s'explique la nécessité de cette structure bicaténaire de l'ADN et le fait que des

Il existe trois ADN polymérases chez les mammifères.

Notez que les ADN polymérases des eucaryotes ne possèdent que l'activité de synthèse d'ADN, contrairement aux enzymes bactériennes qui possèdent de nombreuses autres activités, comme par exemple l'activité exonucléolytique (voir Tableau 14.2).

	ADN polymérase α	ADN polymérase β	ADN polymérase γ
Localisation Fonction	nucléaire réplication	nucléaire réparation	nucléaire et mitochondriale réplication mitochondriale
Activité relative Masse (daltons) N° de sous-unités	~ 80 % 110-220 000 plusieurs	10-15 % 45 000 1	2-15 % 60 000 1
Didéoxythymidine Aphidicoline	sans effet inhibiteur	inhibiteur sans effet	inhibiteur sans effet

Tableau 1 : les ADN polymérases chez les mammifères

cellules provenant de la division d'une même cellule ont des ADN pratiquement identiques et identiques à celui de la cellule mère.

Les monomères de ces synthèses sont les nucléotides triphosphates, c'est-à-dire des dérivés des nucléotides comprenant 3 phosphates successifs en position 5'. Les 2 derniers phosphates sont éliminés lors de la polymérisation.

Les enzymes capables de synthétiser de nouvelles molécules d'ADN à partir d'une matrice sont appelées ADN polymérasés (*tableau 1*). Chez les eucaryotes, il existe plusieurs ADN polymérasés. L'ADN polymérase α est responsable de la fonction de réplication.

Toutes les polymérasés sont capables d'allonger une chaîne d'ADN en ajoutant, un par un, des nucléotides à l'extrémité 3' OH. Le choix du nucléotide qui est ajouté à la chaîne en cours d'élongation est dicté par l'appariement de celui-ci avec la molécule qui sert de matrice.

1.1.2. Le cycle cellulaire ^{3 4 5 6}

Dans les cellules eucaryotes, la réplication de l'ADN n'est effectuée que durant une partie du cycle cellulaire. La période qui sépare deux mitoses (interphase) est divisée en différentes phases.

La cellule commence le cycle cellulaire à l'état diploïde et le reste pendant la phase G_1 . C'est durant la phase S qu'est synthétisé l'ADN. A la fin de la phase S, la cellule est tétraploïde et le reste durant toute la phase G_2 . Durant la mitose (M), un nombre diploïde de chromosomes va être réparti dans chacune des cellules filles. (*figures 2 et 3*)

Les périodes précédant et succédant la phase S sont appelées G_1 et G_2 car elles représentent des étapes intermédiaires (ou "gaps") dans la synthèse de l'ADN.

En conséquence, le cycle cellulaire apparaît comme la succession de quatre phases successives G_1 , S, G_2 , M.

a. La phase G_1

En G_1 , les chromosomes d'une cellule comportent chacun une molécule d'ADN. Les cellules sont dites diploïdes.

Durant cette période G_1 , les cellules croissent; des molécules de types variés y sont fabriquées. La phase G_1 est nécessaire pour une éventuelle phase S (les mécanismes moléculaires contrôlant le cycle cellulaire seront développés dans le § 1.3.).

La durée de G_1 varie selon les types cellulaires. Pour beaucoup de cellules, cette phase G_1 peut durer quelques heures. Par contre pour d'autres (les cellules

Diagram to illustrate the stages of the cell cycle in proliferating cells. Nondividing cells leave the cell cycle and become differentiated, i.e., nerve cells and muscle cells. Resting cells (G_0), such as peripheral lymphocytes, may reenter the cell cycle under the appropriate stimulus.

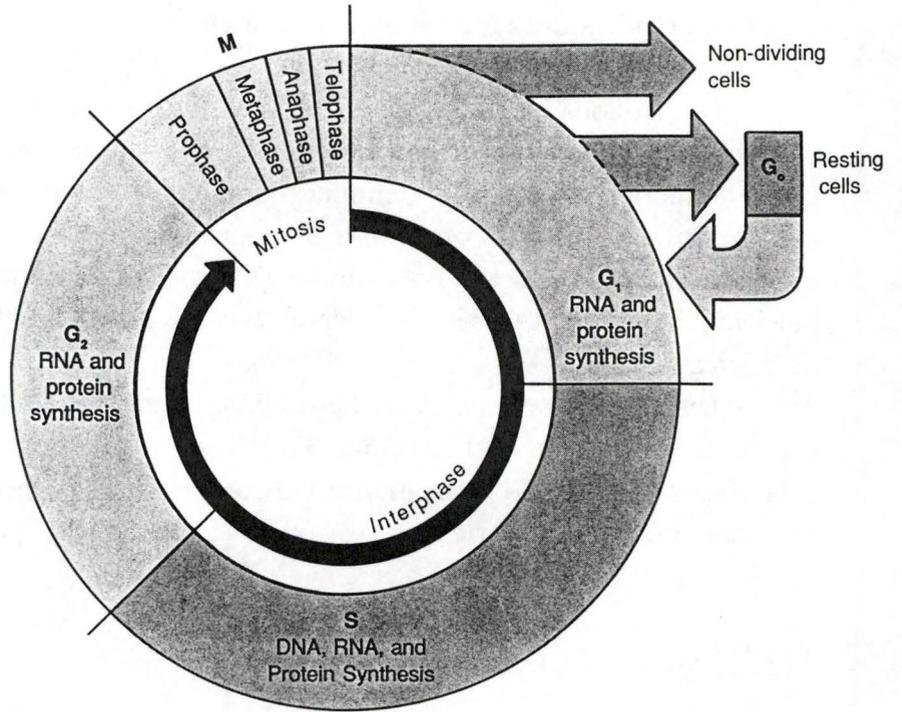
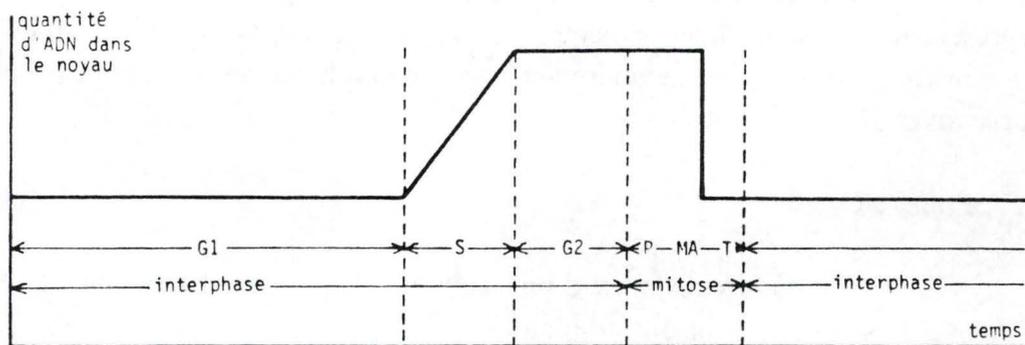


Figure 2 : le cycle cellulaire



Variations de la quantité d'ADN du noyau durant l'interphase et la mitose.

Figure 3

embryonnaires précoces, par exemple), la phase G_1 peut être négligeable. En fait, la cinétique observée de l'intervalle G_1 dépend du cycle antérieur. Les cellules qui n'ont pas de phase G_1 apparente peuvent accomplir la synthèse des molécules avant la mitose. ⁸

Les neurones, par exemple, peuvent rester pendant une longue période à l'état de non prolifération ou état de repos souvent appelé G_0 . Les cellules en culture peuvent aussi être à l'état G_0 (exemple : des fibroblastes cultivés dans un milieu pauvre en nutriment). Ces cellules au repos ont un contenu d'ADN non dupliqué comme pour les cellules en phase G_1 , mais les cellules en G_0 et en G_1 diffèrent pour beaucoup d'autres propriétés. Les cellules en G_0 décroissent en taille car leurs protéines et leurs molécules d'ARN sont dégradés et ne sont pas synthétisés rapidement. Ces cellules sont capables de proliférer à nouveau sous l'influence de divers facteurs (exemple : si du sérum est ajouté au milieu de culture, les fibroblastes vont retourner en phase G_1 et continuer le cycle cellulaire). ⁷

Le point de non-retour se trouve à un stade tardif de la phase G_1 et il est souvent appelé point de restriction (R) car c'est en ce point que les cellules s'arrêtent lorsque les conditions extérieures limitent leur progression dans le cycle. Il est possible qu'il puisse exister plusieurs points de restriction légèrement différents en G_1 correspondant aux contrôles multiples de la prolifération cellulaire.

b. La phase S

La transition entre la phase G_1 et S est caractérisée par l'initiation de la réplication des premières unités de réplication.

Le passage d'une cellule dans la phase S entraîne cette cellule vers une division cellulaire.

Durant la phase S du cycle cellulaire, le contenu entier d'ADN du noyau doit être complètement et précisément répliqué en une période de quelques heures (pendant six à huit heures). ⁸

Toutes les unités de réplication ne sont pas initiées simultanément au début de la phase S, mais les initiations sont réparties pendant toute la durée de cette phase. Les unités de réplication d'une cellule de mammifère se répliquent en 15 minutes en moyenne. La réplication de l'ADN nucléaire est continue au cours de la phase S, et les unités de réplication doivent par conséquent être initiées presque en continu pendant toute cette période. Les différentes unités de réplication sont initiées selon un certain ordre chronologique. Ainsi, les gènes que l'on qualifie de gènes de maintenance, qui codent pour des protéines synthétisées en permanence dans toutes les cellules, se répliquent tôt.

En plus de la réplication de l'ADN, l'architecture complexe du chromosome doit être dupliqué. Cela implique l'assemblage des nucléosomes et l'échafaudage des

chromosomes.

Si la synthèse protéique est inhibée dans une cellule en phase S, la réplication de l'ADN s'arrête rapidement. On peut penser que la synthèse des histones est nécessaire pour que la réplication de l'ADN se poursuive ou que certains facteurs d'initiation protéiques doivent être synthétisés pour déclencher l'initiation des différentes unités de réplication.

c. La phase G₂

Lorsque la réplication de l'ADN est complète, la phase S se termine et la cellule est en phase G₂, période en général courte, qui s'étend jusqu'au début de la mitose. En G₂, les chromosomes d'une cellule sont dupliqués : ils comportent 2 molécules d'ADN situées dans l'une de leurs 2 chromatides. Les cellules sont dites tétraploïdes. Plusieurs synthèses se produisent en phase G₂ et certains de leur produits sont nécessaires au déroulement ultérieur de la mitose. C'est le cas, par exemple, du facteur de maturation (MPF : "Maturation Promoting Factor") protéine impliquée dans la condensation des chromosomes.

d. La phase M

Lorsque la cellule entre en mitose, la plupart des molécules nécessaires au déroulement de celle-ci sont déjà présentes. Il n'y a plus de transcription dans des cellules en mitose. Ce sont principalement des remaniements dans l'architecture d'édifices moléculaires ou des transformations biochimiques de molécules préexistantes qui sont responsables des changements structuraux que l'on observe au cours de la division.

La cytogénèse est la division de l'ensemble de la cellule qui donne deux cellules filles. L'ensemble de la cytogénèse et de la mitose constitue la division cellulaire.

Pour des cellules eucaryotes en prolifération rapide, la durée du cycle cellulaire ou le temps de doublement de la population est d'environ 20 heures dont la moitié à peu près dans la période de synthèse d'ADN (S). Pour les populations normales différenciées et proliférantes, ces doublements successifs conduisent à une maturation complète, qui elle-même aboutit à l'arrêt de la synthèse d'ADN et de la division, avec l'expulsion du noyau (cas des hématies), ou sa pycnose (cas des granulocytes, leucocytes granuleux, polymorphonucléaires) ou sa mise en sommeil (cas des lymphocytes). Quoi qu'il en soit, tout s'arrête.⁹

L'apoptose est la forme de mort naturelle, programmée des cellules nucléées (par exemple, les lymphocytes).⁹

1.2. Mise en évidence de l'ADN et du cycle cellulaire

Notre connaissance du cycle cellulaire a beaucoup progressé ces dernières années grâce à l'apport des techniques d'autoradiographie, d'histochimie, de synchronisation cellulaire, de microcinématographie et surtout de cytométrie de flux (CMF) .¹⁰

Toutes ces techniques sont complémentaires.

1.2.1. L'autoradiographie¹¹

L'autoradiographie consiste en un marquage des molécules cellulaires par des isotopes radioactifs. Elle rend possible l'étude qualitative et quantitative du renouvellement des constituants cellulaires sans perturber les conditions physiologiques du milieu.

Si on introduit dans les cellules un petit nombre de molécules marquées par un atome radioactif, les molécules marquées se mélangent aux molécules homologues non marquées et se comportent comme elles; le sort des molécules marquées nous renseigne sur celui de toute la population moléculaire.

La thymidine ^3H - un constituant de l'ADN porteur d'un atome d'hydrogène radioactif - est incorporée à l'ADN lors de sa synthèse. Si la thymidine ^3H n'est laissée qu'un court instant, seuls les noyaux contenant l'ADN nouvellement synthétisé à partir de thymidine ^3H seront radioactifs.

En recouvrant les coupes de tissus d'une couche d'émulsion photographique spéciale, les atomes de tritium présents dans l'ADN nouveau émettent des rayonnements β de faible énergie qui heurtent les cristaux de bromure d'argent de l'émulsion; ces derniers se comportent comme des microdétecteurs, enregistrent les radiations et permettent ainsi de localiser leur source.

Les cellules qui ont synthétisé de l'ADN, à n'importe quel moment de la période de marquage (et qui se sont trouvées par conséquent en phase S), peuvent être identifiées par la présence de grains d'argent localisés sur leur noyau.

La radiation peut aussi être mesurée dans un compteur à scintillation grâce aux petits éclairs lumineux qu'elle provoque dans un liquide scintillant.

Mais l'autoradiographie prend du temps¹². De plus, les éléments radioactifs peuvent présenter des dangers réels et les expériences ne peuvent se réaliser que sur des cultures cellulaires.

Pour être précise, cette technique nécessite une haute purification des cellules à analyser. On peut, par exemple, mesurer la réponse proliférative des cellules B. Mais, la purification des cellules B à partir des cellules sanguines humaines mononucléées est difficile; elle implique la l'élimination des cellules T, des monocytes et des cellules NK par diverses méthodes. Chacune de ces étapes de purification implique une perte de cellules B et ne peut soustraire totalement les cellules non B. Même dans les meilleures conditions, avec des cellules sanguines normales mononucléées, il est difficile de concilier une pureté suffisante avec une perte acceptable de cellules B. ¹³

1.2.2. La microscopie et la microcinématographie ¹⁴

Une des premières réaction mettant en évidence et pouvant quantifier l'ADN est la réaction nucléale de Feulgen. Elle est introduite en histologie par Feulgen et Rossenbeck en 1924. L'hydrolyse acide ménagée sépare sélectivement de l'ADN les bases puriques conduisant à un produit de dégradation polynucléotidique privé de ses bases puriques. La rupture de la liaison des bases puriques avec les molécules de désoxyribose fait apparaître des groupements pseudo - aldéhydiques. Ces groupements vont réagir avec la fuchsine décolorée par l'acide sulfureux de Schiff, en donnant un produit de condensation de couleur magenta caractéristique. ¹⁵

La réaction de Feulgen peut être aussi réalisée avec un marqueur fluorescent comme l'acriflavine qui forme un dérivé de Schiff. ¹⁶

Mais cette méthodologie précise est cependant lourde à mettre en oeuvre et n'est pas très bien adaptée à l'étude de grandes séries, nécessaires en recherche clinique. ¹⁷

Grâce aux microscopes à contraste de phase et à fond noir, il est possible d'examiner les cellules lorsqu'elles sont vivantes, sans congélation ou fixation qui pourraient altérer certains composants cellulaires. On peut ainsi observer les mouvements impliqués dans des processus comme la mitose. Comme ces mouvements cellulaires sont trop lents pour être observés en temps réels, il est souvent utile d'effectuer par intervalles des suites de photographies ou d'enregistrements vidéo. La méthode consiste à enregistrer des prises de vues successives séparées par un court intervalle de temps de telle sorte que, lorsque le film ou la cassette vidéo sont projetés ou passés à vitesse normale, les événements paraissent très accélérés.

Cette méthode permet de mesurer directement la durée de la phase M et la durée totale d'un cycle cellulaire. La fréquence des figures mitotiques permet aussi d'estimer l'activité de prolifération cellulaire.

De plus, au cours des dernières années, les caméras vidéo et la technologie associée au traitement d'images ont eu une importante répercussion sur la microscopie

photonique. Il est possible d'observer des cellules sur de longues périodes à de très faibles niveaux d'éclairage, évitant ainsi les effets nocifs d'une lumière (et d'une chaleur) intense prolongée; et grâce à des systèmes de renforcement d'images, il est possible d'examiner des molécules fluorescentes dans les cellules vivantes. ¹⁶

Puisque les images produites par des caméras vidéo sont digitales et rapidement stockées sur support informatique, elles peuvent être introduites et traitées de plusieurs façons dans un ordinateur, pour en tirer l'information cachée. Il est possible, grâce à un tel traitement d'images, de compenser divers défauts optiques des microscopes, de façon à atteindre la limite théorique de résolution.

1.2.3. La cytométrie de flux

La cytométrie de flux peut être utilisée pour mesurer des caractéristiques cellulaires. Quand une suspension de cellules vivantes ou non, marquées ou non par des molécules fluorescentes est placée dans un cytomètre de flux, l'appareil mesure l'intensité des rayons diffractés par chaque cellule et l'intensité de fluorescence de ces cellules; les cellules peuvent alors être séparées selon leur taille, leur contenu cellulaire et leur propre intensité de fluorescence.

Il est possible d'étudier, par cytométrie de flux, le cycle cellulaire au moyen de marqueurs spécifiques de l'ADN et du cycle cellulaire.

3 stratégies peuvent être utilisées: ¹⁸

- La 1^{ère} stratégie est l'analyse de la réplication de l'ADN. Elle se base sur l'incorporation, dans les cellules répliquant l'ADN, d'un analogue à la thymidine, le bromodéoxyuridine.
 - La 2^{ème} stratégie est une analyse statique. Dans un simple échantillon d'une biopsie ou d'une culture cellulaire, un ou plusieurs paramètres révèlent la distribution, à un moment donné, des phases du cycle cellulaire. Les cellules peuvent, par exemple, être marquées avec un colorant qui devient fluorescent lorsqu'il se lie à l'ADN, de sorte que le taux de fluorescence est directement proportionnel à la quantité d'ADN contenu dans chaque cellule.
 - La 3^{ème} stratégie est l'analyse cinétique. Elle étudie, par exemple, l'accumulation de cellules en culture bloquées dans une phase du cycle cellulaire ou étudie la traversée de cellules en culture synchronisées à travers le cycle cellulaire.
- Pour des raisons éthiques, l'utilisation des 2^{ème} et 3^{ème} stratégies ne sont pas praticables *in vivo* dans les investigations cliniques en général.

a. Analyse de la réplication de l'ADN ^{12 18 19}

Des études sur la traversée du cycle cellulaire, la synthèse de l'ADN et la prolifération cellulaire ont été significativement améliorées par l'utilisation de précurseurs à ADN marqués.

Nous avons, précédemment, parlé de la thymidine tritiée qui peut être efficacement détectée et quantifiée dans les cellules répliquant l'ADN par autoradiographie ou grâce à un compteur à scintillation. Des molécules plus récentes, non radioactives, tel que l'analogue de base bromodéoxyuridine (BrdU), ont été substituées aux précurseurs radiomarqués.

La BrdU est un analogue de la thymidine qui est incorporé dans l'ADN des cellules pendant la phase S de la synthèse de l'ADN en lieu et place de la thymidine. Si des cellules ayant incorporé la BrdU sont ensuite marquées par un anticorps monoclonal anti BrdU ²⁰ couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et analysées au cytomètre de flux (un simple laser à argon peut être utilisé), seules les cellules ayant incorporé le BrdU pendant la phase S présentent une fluorescence verte. De plus, si l'incubation des cellules avec le BrdU est brève (inférieure à 30 minutes), le nombre de cellules ayant incorporé le BrdU correspond au nombre de cellules en phase S.

Toutefois, les anticorps anti BrdU actuellement disponibles ne reconnaissent que le BrdU incorporé dans l'ADN simple brin. Cela nécessite une dénaturation partielle de l'ADN par la chaleur, par des traitements acides (HCl, HCl / pepsine), ou par des nucléases.

L'incorporation de BrdU durant la réplication de l'ADN peut être augmentée significativement si la synthèse *de novo* de thymidine est bloquée avec la fluorodéoxyuridine.

Cette technique présente plusieurs avantages par rapport à l'utilisation de la thymidine tritiée. Outre l'utilisation de molécules non radioactives, une augmentation dans la fiabilité statistique et une augmentation de vitesse ¹³ sont assurées. Comme la BrdU est non toxique et n'interfère pas avec le métabolisme et la division cellulaire, une utilisation extensive de BrdU peut être faite dans des études *in vitro* de populations cellulaires en réplication. Le BrdU peut aussi être utilisé *in vivo* si la dose ne dépasse pas les 500 mg. ^{21 22}

A. Histogramme théorique du contenu en ADN d'une population cellulaire

B. Histogramme réel du contenu en ADN d'une population cellulaire obtenu par CMF

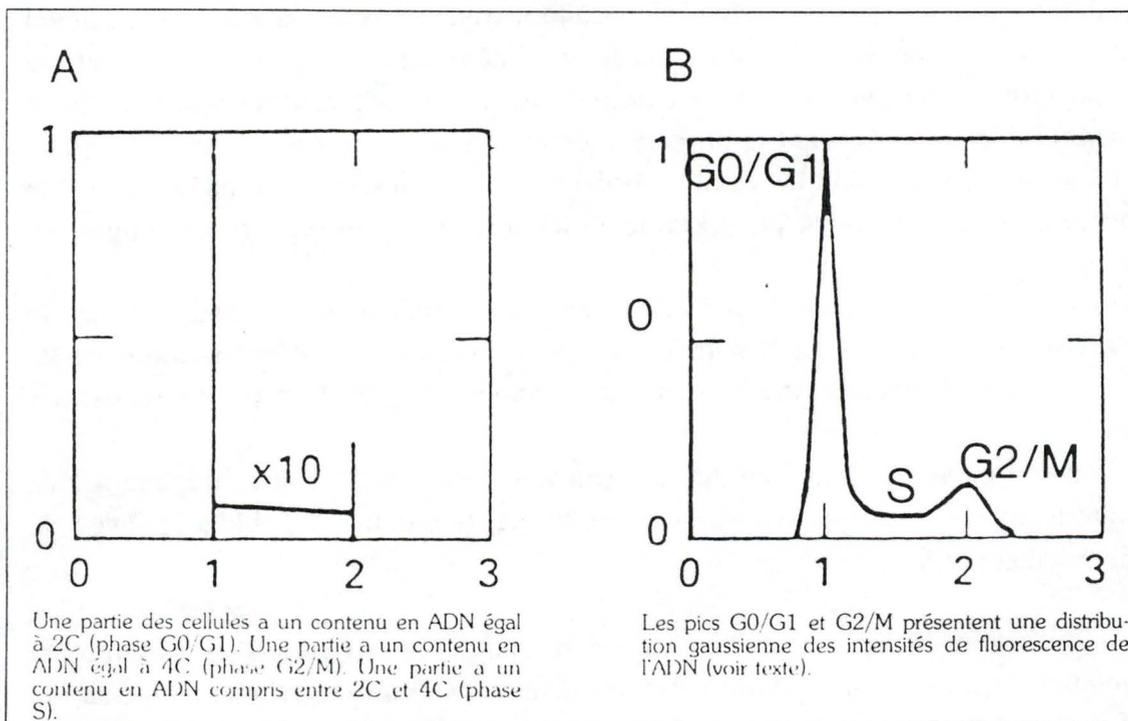


Figure 4 : comparaison des histogrammes théorique et réel

b. Analyse statique

1° / Analyse monoparamétrique du contenu en ADN

• Principe ^{10 12 23 24}

Si un marqueur fluorescent est fixé à l'ADN de façon stoechiométrique, lors de l'analyse des cellules par cytométrie de flux, il est possible de relier leur contenu en ADN à la quantité de fluorescence émise par le marqueur.

Dans une population cellulaire asynchrone en croissance exponentielle, une partie des cellules se trouve dans les phases G_0 ou G_1 , elles ont un contenu fixe en ADN égal à $2N$. Une autre partie se trouve en moins grande quantité dans les phases G_2 ou M (elles ont un contenu en ADN égal à $4N$). Enfin les cellules se trouvant en phase S ont une quantité d'ADN comprise entre $2N$ et $4N$.

En cytométrie de flux, on dit souvent que les cellules ayant un contenu en ADN égal à $2N$ ont un index DNA (DI) égal à 1; les cellules qui ont un contenu en ADN égal à $4N$ ont un DI de 2. L'index DNA est une formule utilisée pour exprimer la position du pic d'histogramme (en nombre de canal) en référence à la position du pic du canal diploïde habituellement déterminé par des mesures contrôles de lymphocytes normaux (ces lymphocytes sont utilisés comme étalons; leur DI est de 1. Les érythrocytes de saumons, de truites ou de poulets peuvent aussi être utilisés; les érythrocytes de truites, par exemple, ont un DI de 0,789) ²⁵.

Si on compare les histogrammes théoriques et réels, on note une distribution gaussienne des intensités de fluorescence des pics correspondant aux contenus en ADN $2N$ et $4N$. Ces différences entre histogrammes théoriques et réels sont dues aux erreurs de mesure propres au cytomètre d'une part, aux variations du marquage d'autre part. (*figure 4*)

Pour une population cellulaire homogène (lignée cellulaire), plus le coefficient de variation (CV) du pic G_0/G_1 de l'histogramme réel est faible, plus l'histogramme réel et l'histogramme théorique se confondent. Dans ce cas, le calcul du nombre de cellules dans chacune des phases G_0/G_1 , S , G_2/M est aisé. En revanche, pour des CV plus grands, le recouvrement des phases G_0/G_1 et S d'une part, S et G_2/M d'autre part devient important; le calcul du nombre de cellules dans chaque phase devient alors plus difficile et nécessite l'utilisation de logiciels spécifiques. De faibles valeurs de CV (1 à 2 %, lorsque le coefficient est exprimé en pour-cent) pour la mesure de l'ADN peuvent être obtenues si les suspensions de lymphocytes quiescents sont préparées avec précaution. Pour la mesure du contenu DNA d'autres tissus humains ou animaux, des CV plus importants sont habituellement observés. Des CV de 2 à 5 % sont habituels dans les mesures de DNA de tumeurs humaines solides.

Spectral Characteristics of Some Fluorescent Probes Useful for Flow Cytometry, Suitable Light Sources, and their Wavelengths*

Excitation Wavelength	Suitable Sources	Emission Wavelength	DNA Stains	RNA Stains	Protein Labels
Ultraviolet	He-Cd laser, 325 nm; Ar laser, 351-363 nm; Kr laser, 350-356 nm; Hg arc lamp, 366 nm	Blue	Hoechst dyes, DAPI		SITS, coumarins
Blue	Hg arc lamp, 436 nm; He-Cd laser, 441 nm; Ar laser, 457 nm	Green	Chromomycin A3, mithramycin, olivomycin	Thioflavine T	Lucifer yellow
Blue-green	Kr laser, 476/482 nm Ar laser, 488 nm	Green Orange, red	Acridine orange Ethidium, propidium		Fluorescein Phycocerythrin
Green	Ar laser, 515/528 nm; Kr laser, 520/530 nm; He-Ne laser, 543 nm; Hg arc lamp, 546 nm	Orange	Ethidium, propidium	Pyronin Y Acridine orange Pyronin Y	Phycocerythrin, tetramethylrhodamine
Yellow	Kr laser, 568 nm; R6G dye laser, 570-620 nm; Hg arc lamp, 577/579 nm; He-Ne laser, 594 nm	Red			Phycocyanin, Texas red, NRTIC
Red	He-Ne laser, 633 nm; Kr laser, 647 nm	Deep red	Oxazine 750, LD700, rhodamine 800	Oxazine 1, brilliant cresyl blue	Allophycocyanin

ABBREVIATIONS: DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; LD700, a laser dye; R6G, rhodamine 6G; SITS, 4-acetamido-4'-isothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid; NRTIC, an isothiocyanate derivative of rhodamine 101.

Tableau 2 : différents marqueurs fluorescents utiles en cytométrie de flux; différents lasers peuvent être utilisés lors de l'emploi de ces marqueurs

Dans un échantillon à analyser, s'il existe deux populations cellulaires ayant des index DNA forts proches (1.0 et 1.2 par exemple), les deux pics ne pourront être séparés dans un pic ayant un CV de 4 % ou plus.

Il est à noter que le CV de la mesure du DNA est une valeur en soit, comme il peut fournir des données sur l'hétérogénéité cellulaire ou des détériorations possibles du contenu en ADN.

La forme de la courbe Gaussienne est aussi importante pour des CV $\geq 3\%$. Si la courbe Gaussienne est parfaitement symétrique, la probabilité que le pic représente une seule population de cellules est élevée. Dans l'autre cas, si la courbe est non symétrique, la possibilité qu'il y ait recouvrement de 2 populations doit être considérée.²⁴

• Marqueurs fluorescents

Un grand nombre de marqueurs de l'ADN sont utilisés en cytométrie de flux en raison de leurs propriétés de fluorescence. Certains se fixent préférentiellement sur les bases A-T, d'autres sur les bases G-C, enfin d'autres s'intercalent à l'ADN de manière aléatoire. Tous doivent s'employer à dose saturante afin que l'intensité de fluorescence émise soit proportionnelle à la quantité d'ADN présent dans la cellule.¹⁰

Ces colorants sont pour la plupart des drogues et peuvent être utilisés comme inhibiteurs de la réplication.⁶

Plusieurs auteurs ont analysé ces différents marqueurs.^{12 18 26 27}

* Chromomycine, mithramycine, olivomycine

Les anticorps fluorescents mithramycine, chromomycine A₃ et olivomycine ont été utilisés par Crissman *et al*²⁸ pour la mesure du contenu d'ADN. Ces substances, en présence de magnésium, forment des complexes avec les guanines (cytosine, guanine) dans l'ADN mais ne se lient pas avec l'ARN; ainsi, elles fournissent une coloration spécifique de l'ADN même sans traitement à la RNAase.

La fluorescence est proportionnelle au contenu G-C de l'ADN. L'émission maximale des complexes olivomycine, chromomycine et mithramycine avec l'ADN est respectivement de 545, 555, et 575 nm. L'excitation maximale des complexes est approximativement de 440 nm (bleu violet).

On peut utiliser le laser à ion argon (457 nm) pour l'excitation mais le laser à cadmium hélium (441nm) et l'arc lampe mercure (436 nm) sont, de loin, préférables. (tableau 2)

Le rendement de ces complexes est plutôt faible.

* Hoechst 33258 et Hoechst 33342

Les colorations Hoechst 33252 et Hoechst 33342 se lient préférentiellement à un groupe de 4 à 5 paires de bases voisines de l'appariement A-T dans l'ADN.

Les complexes colorant Hoechst - ADN ont une excitation maximale dans le rang des ultraviolets à plus ou moins 350 nm et une émission maximale à environ 450 nm. L'arc lampe mercure (350 nm), les sources lumineuses du laser hélium-cadmium (325 nm), ou le laser à argon (351/363 nm) peuvent être utilisés. Une puissance relativement faible est suffisante pour l'excitation.

Hoechst 33342 peut colorer l'ADN dans des cellules intactes, vivantes. Sous certaines conditions de culture ces colorants diffusent facilement à travers les membranes cellulaires. Cependant, ces colorations sont toxiques à plusieurs cellules vivantes et la prise ainsi que la rétention diffèrent pour les différents types cellulaires. L'exportation du colorant peut être inhibée avec du verapamil (qui bloque les canaux à calcium).

Les cellules peuvent aussi être perméabilisées et les noyaux colorés avec de faibles concentrations pour éviter une fluorescence non spécifique.

* DAPI et DIPI

L'utilisation de deux composés phénylindole (DAPI et DIPI), colorants A-T spécifiques, permet d'obtenir des coefficients de variations excellents.

Le maximum d'excitation du complexe fluorochrome - ADN se trouve dans la région de l'ultraviolet (approximativement de 350 nm) tandis que l'émission maximale est dans la région bleue grise (500 nm) (les lasers utilisés pour les colorants Hoechst peuvent également l'être pour la coloration DAPI).

Ces colorations ont l'avantage de former des complexes avec l'ADN ayant des rendements extrêmement élevés. En effet, Coleman *et al*²⁹ ont rapporté la visualisation, par un microscope fluorescent, de simples particules virales colorées.

DAPI peut aussi colorer l'ADN de cellules intactes vivantes. Cette coloration diffuse facilement à travers les membranes cellulaires. Mais, il peut exister, comme pour Hoechts 33342, une exportation transmembranaire. La fixation et la perméabilisation sont donc nécessaires.

Sous plusieurs conditions, DAPI va former des complexes fluorescents avec

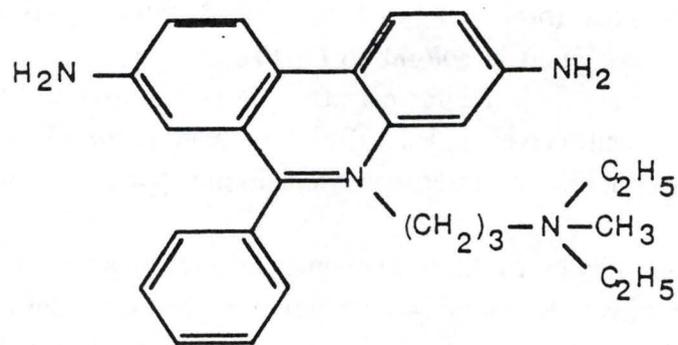


Figure 5 : structure de l'iodure de propidium

l'ARN. Un traitement à la RNAase peut dès lors fournir des précisions dans la distribution de l'ADN à partir des cellules colorées au DAPI.

* 7-aminoactinomycine D

La 7-aminoactinomycine D peut être utilisée en cytométrie de flux pour l'analyse de l'ADN mais la distribution de l'ADN obtenue n'est pas précise pour des applications cliniques ou autre.

En fait la 7-aminoactinomycine semble être affectée par la structure chromatine car l'accessibilité de l'ADN pour cette coloration et l'intensité de coloration peuvent être augmentées par des extractions acides d'histones nucléaires.

DAPI par contre ne semble pas être fortement affecté par la structure de la chromatine; une extraction acide d'histones nucléaires n'augmente que faiblement l'intensité de la coloration.

* Acridine orange

L'acridine orange se lie à l'acide nucléique double brin et à l'acide nucléique simple brin par une sorte d'entassement moléculaire.

Un effet métachromatique est observé. En effet, dans des conditions définies, l'interaction du colorant avec l'ADN double brin donne une fluorescence verte alors que son interaction avec l'acide nucléique simple brin (ARN ou ADN dénaturé) donne une fluorescence rouge. L'acridine orange est, dès lors, plus souvent utilisée pour une analyse multiparamétrique ARN/ADN.

Le laser à argon donne une source lumineuse adéquate pour l'analyse du contenu ADN/ARN

* Bromure d'éthidium et iodure de propidium

L'analyse de l'ADN est souvent accomplie en utilisant l'iodure de propidium (*figure 5*) et le bromure d'éthidium. Ces fluorochromes forment des complexes avec les doubles brins d'ADN et d'ARN en s'intercalant entre les paires de bases.

Des excitations ultraviolettes (320 à 360 nm) ou bleues vertes (480 à 550 nm) produisent des fluorescences rouges oranges lorsque l'iodure de propidium ou le bromure d'éthidium est lié à l'acide nucléique.

Le rendement est assez élevé, un laser d'une relative faible puissance peut être utilisé. De simples petits lasers à argon peuvent dès lors servir à l'analyse.

Les spécimens doivent être traités à la ribonucléase pour éliminer un élargissement artificiel de la distribution du contenu d'ADN qui résulterait de la fluorescence du complexe fluorochrome - ARN. Des études ont été faites en comparant des échantillons avec et sans RNAse. Sans RNAase, un élargissement et souvent un dédoublement des pics G_0/G_1 sont fréquemment observés et le rapport $4N/2N$ est supérieur à 2 pour des hépatocytes de souris.

Une coloration stoechiométrique optimale de l'ADN peut encore être assurée sur noyau isolé. On évite ainsi les artefacts dus aux agrégats nucléaires et à la structure chromatine. La quantité de fluorochrome (IP) intercalé dans la double hélice d'ADN est plus importante lorsque le chromatine est dans un état décondensé, un plus grand nombre de sites de fixation étant démasqués.³⁰

La concentration finale en iodure de propidium doit être saturante. Si tous les sites de fixation ne sont pas saturés, on observe une diminution de l'intensité de fluorescence et une augmentation du CV.³¹

L'iodure de propidium est préféré au bromure d'éthidium, ce dernier fournissant des CV plus élevés.

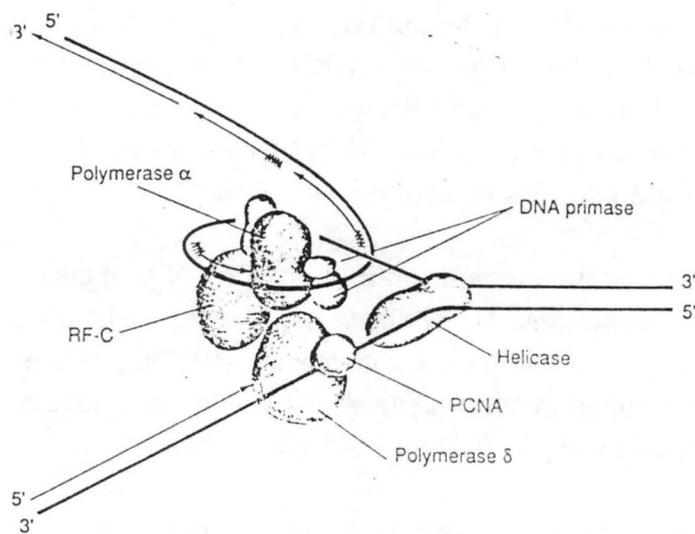
* Les antigènes associés à la prolifération

La concentration d'une multitude de produits cellulaires, principalement des protéines, varie brusquement au cours du cycle cellulaire.

Pour des raisons de limites dans le temps de demi vie biologique de ces substances et dans les mesures sensibles, seulement quelques protéines sont susceptibles d'une analyse cytométrique.

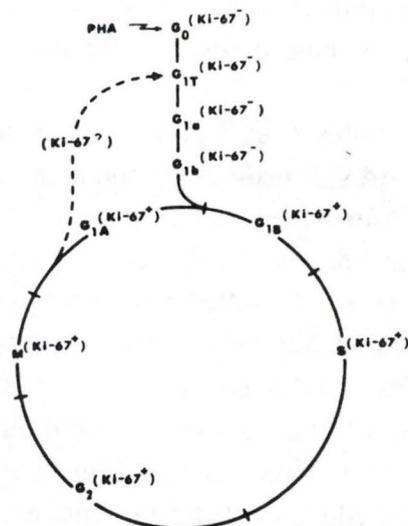
Souvent, des difficultés dans la coloration de l'antigène intracellulaire sont dues à son inaccessibilité, ou à sa perte ou sa coloration non spécifique. Les cellules peuvent être perméabilisées par fixation, ou alternativement, la membrane cellulaire peut être enlevée par traitement sur des cellules non fixées avec un détergent non ionique. Dans le cas d'un antigène qui est plus ou moins soluble ou qui a un temps de demi vie court, les cellules peuvent être fixées instantanément (formaldéhyde, méthanol, éthanol, mélange de formaldéhyde avec des détergents non ioniques). Cependant, une fixation trop importante avec du formaldéhyde peut altérer certains épitopes.

Différentes catégories de marqueurs peuvent être cataloguées. Ces marqueurs



Schematic representation of a eukaryotic replication fork showing concerted action by DNA polymerase α and δ on opposite sides of the fork.
 [Reprinted from (96) with permission of ICSU Press]

Figure 6 : les polymérasés α et δ lors de la réplication de l'ADN



Occurrence of cell proliferation-associated nuclear antigen defined by monoclonal antibody Ki-67 during start sequences and during cell cycle of PHA-stimulated PBL.

Figure 7 : expression de Ki-67 lorsque les cellules sont stimulées par PHA durant le cycle cellulaire

sont détectés par un anticorps conjugué au FITC. Les marqueurs les plus fréquemment utilisés sont PCNA et Ki-67. Ce sont des antigènes associés à plusieurs phases du cycle cellulaire.

PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen ou protéine auxiliaire de l'ADN polymérase δ ou cycline) ^{32 33 34}

PCNA est une protéine nucléaire de 36 kD; elle est hautement associée aux sites de réplication de l'ADN. Le taux de synthèse du PCNA corrèle directement avec la vitesse de prolifération cellulaire et la synthèse d'ADN. Le taux élevé de PCNA apparaît dans le noyau durant la phase G₁ tardive, immédiatement avant l'amorce de la synthèse d'ADN, devient maximale durant la phase S et décline durant les phases G₂ et M. PCNA est principalement présent dans le noyau bien qu'une faible coloration cytoplasmique ait occasionnellement été montrée .

Nous avons dit précédemment que l'ADN polymérase α est responsable de la fonction de réplication. En fait, il en existe une deuxième : l'ADN polymérase δ . Les deux polymérases jouent des rôles différents et ont des affinités différentes pour des inhibiteurs ou pour des activateurs : la polymérase α n'est pas affectée par l'addition de PCNA, tandis que le processus de la polymérase δ peut être fortement augmenté en présence de ce facteur. (*figure 6*)

PCNA a initialement été identifié avec un antisérum humain mais maintenant plusieurs anticorps monoclonaux sont disponibles. Cependant selon le choix de l'anticorps et la procédure pour la fixation et la coloration, les anticorps anti PCNA peuvent identifier soit les cellules en phase S seulement, soit le cycle entier. Par exemple, pour l'anticorps monoclonal anti PCNA pc10, la phase S est exprimée exclusivement si les cellules sont traitées avec un détergent suite à la fixation au méthanol, sinon, si les cellules sont directement fixées au méthanol, toutes les cellules en cycle sont colorées.

Ki-67 ^{35 36 37}

Ki-67 est un anticorps monoclonal dirigé contre un antigène nucléaire présent seulement dans les cellules en prolifération. L'antigène nucléaire détecté par l'anticorps monoclonal Ki-67 est exprimé dans toutes les phases du cycle cellulaire (G₁, S, G₂ et M) mais pas dans les cellules au repos en G₀. Lorsque les cellules en phase G₀ sont stimulées par un mitogène comme le phytohémagglutinine A (PHA), elles rentrent en phase G_{1T} puis en phase G_{1a} mais n'expriment toujours pas de fluorescence. Ce n'est que dans la phase suivante G_{1b} que l'antigène est exprimé. (*figure 7*)

En utilisant des techniques d'immunohistochimie, il a été possible de localiser Ki-67 : pour les cellules en culture se trouvant en interphase, la coloration maximale due à la réaction avec Ki-67 est vue dans le noyau, particulièrement à sa périphérie et dans les composants fibrillaires denses.

Les caractéristiques biochimiques de l'antigène ne sont pas connues actuellement.

2° / Analyse multiparamétrique du cycle cellulaire

Cette analyse se fait le plus souvent en associant un marqueur de l'ADN (par exemple, l'iodure de propidium qui fluoresce en rouge) et un autre marqueur cellulaire couplé à un fluorochrome (par exemple, l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) qui fluoresce en vert). Un même composé comme l'acridine orange peut émettre à deux longueurs d'onde différentes selon ses sites de fixation. ¹⁰

* Double marquage ARN / ADN

L'analyse d'un cytogramme ADN / ARN permet de décrire plusieurs compartiments du cycle cellulaire assimilés à différentes phases : la phase G₀, au contenu en ARN très bas; la phase G₁, au contenu en ARN plus élevé; la phase S et phase G₂ / M dont le contenu en ADN a doublé. ¹⁰ Un équilibre correct entre les fluorescences rouges et vertes dépend d'une standardisation précise des concentrations de cellules et de fluorochromes ainsi que du temps de coloration. ^{17 25}

* Double marquage protéines / ADN

L'analyse combinée de l'ADN cellulaire et des antigènes de membrane s'est imposée pour deux raisons : ³⁸

- Il est possible par cytométrie de mesurer l'expression de telle ou telle protéine cellulaire en fonction de la position des cellules dans les différentes phases du cycle si l'anticorps (qui sera couplé à un fluorochrome) dirigé contre cette protéine est disponible.
- La sélection des cellules par leur phénotype immunologique permet l'analyse d'une population cellulaire homogène. La quantification de leur contenu en ADN apporte alors des informations plus riches et plus sensibles tant pour la mesure de la ploïdie que pour l'étude du cycle cellulaire.

Cette analyse combinées peut se faire avec n'importe quel marqueur de l'ADN pourvu que le laser soit équipé d'une source qui puisse exciter le marqueur de l'ADN et d'une source qui puisse exciter les fluorochromes "attachés" à l'anticorps : la

coloration Hoechst peut, par exemple être utilisée mais alors, il faudra utiliser deux sources lumineuses (exemple : l'analyse simultanée du contenu en ADN et des antigènes membranaires des lymphocytes T activé a permis de classifier les antigènes membranaires en fonction des phases du cycle cellulaire ³⁹).

La BrdU est aussi utilisés en combinaison avec des marqueurs cytoplasmiques ou membranaires. Une seule longueur d'onde et donc un seul laser à argon est utilisé. Mais il faut pouvoir perméabiliser la membrane et dénaturer l'ADN, méthodes nécessaires pour une bonne coloration du BrdU; les processus utilisés peuvent altérer et déstabiliser les marqueurs membranaires. Récemment, des méthodes ont été rapportées utilisant des nucléases pour dénaturer l'ADN (méthode plus douce). Les anticorps dirigés contre les protéines doivent être couplés à la phycoérythrine. ¹⁸

L'iodure de propidium est sans nulle doute le marqueur le plus souvent utilisé actuellement pour la mesure simultanée de l'ADN et de marqueurs membranaires ou cytoplasmiques (exemples : voir matériel et méthode) : il produit une intense fluorescence rouge quand il est excité à 488 nm (longueur d'onde facilement émise par le laser à argon) et les marqueurs des protéines couplés à du FITC émettent une fluorescence verte quand ils sont excités par cette même longueur d'onde. ⁴⁰

Cette technique de double marquage de l'ADN et des antigènes de surface n'est exploitable qu'avec une intensité correcte du marquage de membrane (sites antigéniques nombreux, anticorps de bonne qualité). En cas contraire, la fluorescence rouge de l'iodure de propidium masque le marquage membranaire. Il faut alors modifier la concentration de l'iodure de propidium ou renforcer le marquage de membrane. ³⁸

La dénaturation de l'ADN n'est donc plus nécessaire mais il faut toujours veiller à perméabiliser la membrane cellulaire suffisamment pour l'entrée de l'iodure de propidium mais pas de trop pour ne pas déstabiliser les marqueurs membranaires. ³⁷

c. Analyse cinétique ³⁶

L'analyse du cycle est encore facilitée par l'utilisation d'importantes populations de cellules en culture qui sont toutes dans une même phase du cycle. Il existe plusieurs méthodes pour obtenir de telles populations cellulaires synchrones. L'une des techniques les plus anciennes consiste à exposer les cellules à une substance qui agit au cours d'une étape spécifique du cycle et arrêter ainsi la progression des cellules au-delà de cette étape. Si l'exposition est prolongée, toutes les cellules se trouvent stoppées à ce même stade, de sorte qu'à la levée de ce blocage, elles terminent leur cycle de manière synchrone. Les lymphocytes peuvent,

par exemple, être traités à la déféroxamine qui est un inhibiteur réversible de la phase S des lymphocytes humains en prolifération.⁴¹ Un autre exemple est le blocage de l'initiation de la réplication de l'ADN par la fluorodéoxyuridine (déjà mentionnée plus haut) qui bloque la synthèse de thymidine.

Il faut cependant noter qu'au cours d'un cycle, plusieurs processus se déroulent simultanément et il n'est pas possible d'affirmer que toutes les cellules seront bloquées par la drogue de façon bien coordonnée. C'est pour cette raison qu'il est préférable, lorsque cela est possible, d'utiliser des méthodes de préparation de cellules synchrones qui n'interfèrent pas avec la progression normale des cellules dans le cycle.

Pour de nombreuses cellules de mammifères en culture, le plus simple et le meilleur des procédés utilise le fait que les cellules "s'arrondissent" en phase M, par suite d'une modification de leur cytosquelette. Les cellules ainsi arrondies, en phase M, adhèrent si peu à la boîte de culture qu'elles peuvent être récupérées par agitation douce. Les cellules en mitose collectées par cette technique d'agitation constituent une population synchrone qui va presque immédiatement entrer en phase G₁ du cycle.

1.3 Notion de prolifération et de croissance cellulaire ^{5 6 7 42 43}

La *prolifération cellulaire* peut être définie comme l'accroissement dans le nombre de cellules résultant d'achèvement de cycle cellulaire. Cette notion ne peut être confondue à la notion de *croissance cellulaire* qui consiste en un accroissement de la masse cellulaire.

La différence entre la vitesse de "production cellulaire" et perte cellulaire par mort cellulaire établit la vitesse de prolifération nette d'une population cellulaire particulière. Dans l'organisme, ce paramètre peut être influencé par la migration cellulaire. ¹⁸

Les contrôles de la croissance cellulaire les mieux connus se réalisent pendant les phases G_1 et $G_2 - M$.

1.3.1. Contrôle en phase G_1

La prolifération des différents types cellulaires est gouvernée par différentes combinaisons de facteurs de croissance protéiques. Ces facteurs agissent à très faible concentration et la majorité d'entre eux servent de médiateurs chimiques locaux pour favoriser la régulation de la densité des populations cellulaires. L'apport de nutriment est aussi important pour la prolifération cellulaire. De plus, la majorité des cellules normales sont incapables de se diviser à moins d'être ancrées à la matrice extracellulaire. Des cellules carencées en facteurs de croissance, en nutriments ou privées d'adhérence matricielle, s'arrêtent après la mitose et entrent dans un état quiescent particulier G_0 , dont elles ne peuvent sortir qu'après plusieurs heures, lorsqu'elles sont à nouveau mises en présence de facteurs de croissance et de nutriments. Dès qu'une cellule a dépassé le point de restriction en G_1 , elle achève rapidement les phases S, G_2 et M, quel que soient les facteurs de croissance de nutriments ou d'adhérence.

Plusieurs facteurs de croissance ont été isolés et partiellement caractérisés. Les facteurs de croissance connus jusqu'ici affectent plusieurs types de cellules : cellules du sang, du système nerveux, des tissus mésenchymateux et des tissus épithéliaux. Ils sont directement et spécifiquement impliqués dans la stimulation de la division cellulaire. Le facteur de croissance dérivé des plaquettes, ou PDGF en est un exemple : il est supposé stimuler la division des cellules du tissu conjonctif et des cellules du muscle lisse au niveau d'une lésion, pour favoriser la cicatrisation. Le PDGF est libéré des granules α des plaquettes lors de la coagulation du sang. Différents facteurs de croissance semblent jouer des rôles clés dans la régulation de la différenciation cellulaire des cellules souches pour former divers types de cellules

sanguines matures. La différenciation des lymphocytes B, par exemple, ne se réalise quand présence des lymphocytes T et de leurs produits. Les cellules B, stimulées par l'antigène, l'Il-1 et l'Il-4 (1^{ier} produit des lymphocytes T à agir sur les lymphocytes B), grossissent, et entre en cycle cellulaire (l'Il-4 induit une expression privilégiée d'Ig G₁). La cellule B rencontre ensuite une molécule produite par les lymphocytes T, l'Il-5 qui est impliquée dans la croissance des cellules B et la production d'immunoglobuline (principalement des Ig A). La protéine suivante, produite par les cellules T, qui agit sur les cellules B est l'Il-6. Cette interleukine concentre ses effets sur la différenciation finale des lymphocytes B en plasmocytes où elle accroît la synthèse d'immunoglobuline. ⁴⁴

Il existe également des facteurs inhibiteurs de la croissance (exemple : facteur de croissance transformant [TGF- β] qui inhibe la croissance de certaines cellules : il bloque la prolifération des cellules épithéliales en culture, mais n'a aucune action sur les fibroblastes)

Ainsi, l'exposition de cellules à des quantités accrues d'un facteur de croissance ou à des quantités diminuées d'un facteur inhibiteur de la croissance peut altérer l'équilibre de la croissance cellulaire.

Les facteurs de croissance peuvent agir de trois façons :

- 1° / Ils peuvent être synthétisés ailleurs dans l'organisme et véhiculés dans la circulation vers leurs cellules cibles (mode d'action endocrine).
- 2° / Ils peuvent être synthétisés dans certaines cellules qui les sécrètent pour agir sur les cellules voisines. Cependant, les cellules qui synthétisent le facteur de croissance ne sont pas elles-même affectées, car elles ne possèdent pas les récepteurs appropriés. Ce mode d'action est dit paracrine.
- 3° / Certains facteurs de croissance peuvent affecter les cellules qui les synthétisent. Ce troisième mode d'action est appelé autocrine. Par exemple, un facteur peut être sécrété et se fixer ensuite à sa cellule d'origine pourvu que cette cellule possède les récepteurs appropriés.

Ces facteurs de croissance agissent par liaison à des récepteurs transmembranaires. Ces récepteurs ont tous la même structure type : domaine extracellulaire qui se liera au facteur de croissance, domaine transmembranaire, et domaine cytoplasmique. Les récepteurs ont une forte affinité pour leur facteur de croissance. Ils transmettent le message à travers la membrane plasmique jusqu'à l'intérieur de la cellule (transduction du signal). Le message affectera finalement un ou plusieurs processus engagés dans la mitose.

Un certain nombre de récepteurs possèdent une activité tyrosine kinase. Ils phosphoryleront certaines protéines kinases intracellulaires (sérines, thréonines et surtout tyrosine). Ces protéines, à leur tour, vont activer d'autres protéines kinases (cascades de phosphorylations et de déphosphorylations). Ces protéines kinases activées peuvent modifier la liaison des protéines de régulation sur des séquences spécifiques de l'ADN. Un des substrats majeurs est la protéine kinase C,

indispensable à la prolifération. La protéine kinase C peut par exemple phosphoryler la protéine Jun, la protéine Jun étant un facteur de régulation de transcription. D'autres récepteurs ne possèdent pas l'activité tyrosine kinase. Ils sont liés à une protéine G. Le complexe facteur de croissance-récepteur active cette protéine G, à l'origine d'autres cascades de phosphorylations-déphosphorylations. En plus des protéines phosphorylées, différentes molécules sont impliquées dans les cascades de régulation : Ca^{2+} , calmoduline, nucléotides cycliques, prostaglandines,...

L'activation de la prolifération peut être due, non seulement à la sécrétion du facteur de croissance lui-même, mais aussi à la synthèse du récepteur spécifique faute duquel le facteur de croissance serait inutile : l'excès de récepteur peut être un facteur d'excès de pousse, son défaut être la cause de l'aplasie d'une lignée. C'est la présence des récepteurs à tel ou tel facteur de croissance qui fait que telle ou telle espèce cellulaire lui est sensible.

1.3.2. Transition G2 - M

Le processus de mitose est lui aussi dépendant de facteurs intracellulaires. L'entrée en mitose est contrôlée par le MPF (maturation promoting factor). L'injection de MPF actif dans les cellules à n'importe quel stade du cycle mène à la dissociation de la membrane nucléaire et à la condensation des chromosomes, caractéristique de la mitose. Le MPF est constitué de deux sous unités : une protéine kinase appelée aussi $p34^{cdc2}$ et une cycline.

Le taux de MPF activé varie à travers le cycle cellulaire, le maximum étant lors de la mitose. L'activation du MPF semble être impliquée dans plusieurs événements :

- 1° / déphosphorylation de certains résidus tyrosine, sérine, thréonine de la sous unité $p34^{cdc2}$ (comme la Thr 14 et la Tyr 15) et phosphorylation d'autres résidus de cette sous unité (comme la Thr 161).

- 2° / accumulation de cyclines nouvellement synthétisées

- 3° / association des sous unités kinase et cycline

- 4° / phosphorylation de la cycline par $p34^{cdc2}$

Comme la cycline est rapidement dégradée, si sa synthèse est arrêtée, la cycline ne se lie plus à la sous unité $p34^{cdc2}$ et n'active plus le MPF. La sous unité $p34^{cdc2}$ est rephosphorylée au niveau des résidus Thr 14 et Tyr 15. la protéine retourne à un état inactif et la cellule se retrouve en interphase.

1.4 Notion de malignité ⁴⁵

1.4.1. Définition

L'organisme est en renouvellement continu : lorsque destruction et reconstruction se compensent statistiquement, l'organisme renferme une masse tissulaire active relativement constante. Cela implique l'existence de phénomènes dits homéostatiques contrôlant le renouvellement des tissus. Ce contrôle exercé par l'organisme apparaît notamment dans les phénomènes de réparation des brèches tissulaires grâce à la production d'éléments cicatriciels et dans la régénération des tissus amputés, ou hyperplasie régénératrice.

Les tissus nouveaux, ou tissus néoformés, remplissent alors plus ou moins parfaitement le rôle de ceux qu'ils remplacent. Mais le fait essentiel est que ce processus réparateur soit limité dans le temps et dans l'espace. On l'explique par la conjonction d'influences stimulatrices venant de diverses parties de l'organisme (tissus lésés, réaction neuroendocrinienne) et d'influences inhibitrices naissant au sein du tissu rénové lui-même.

C'est l'échec de tels mécanismes régulateurs qui caractérise le phénomène tumoral. Il s'agit d'une prolifération tissulaire échappant au contrôle que l'organisme met ordinairement en oeuvre, ce qui se caractérise par une croissance autonome et persistante du tissu.

Les cellules cancéreuses sont définies par deux propriétés : elles et leur descendance (1) se reproduisent à l'encontre des contraintes normales et (2) envahissent et colonisent des territoires normalement réservés à d'autres cellules. C'est la combinaison de ces caractères qui rend les cancers particulièrement dangereux. Une cellule anormale isolée qui ne prolifère pas plus que ses voisines normales ne provoque pas de dommage significatif, quelles que soient les autres propriétés fâcheuses qu'elle peut avoir; mais si elle prolifère sans contrôle, elle donnera une tumeur ou néoplasme - une masse de cellules anormales qui augmentera sans rémission. Toutefois tant que les cellules néoplasiques restent groupées en une masse unique, la tumeur est dite bénigne et l'ablation chirurgicale de la masse conduit habituellement à une guérison complète. Une tumeur n'est considérée comme un cancer que si elle est maligne, c'est à dire uniquement si les cellules ont la capacité d'envahir le tissu environnant. L'invasion implique généralement une capacité de s'échapper, de pénétrer dans le sang ou les vaisseaux lymphatiques et de former des tissus secondaires ou métastases en d'autres régions du corps.

La majorité des cancers ont pour origine une seule tumeur primaire isolée;

ceci suggère qu'ils dérivent, par division cellulaire, d'une seule cellule qui a subi quelque modification héréditaire qui lui permet de croître plus vite que ses voisines.

1.4.2. Facteurs impliqués dans la genèse de la malignité

En général, un cancer ne peut être entièrement imputé à un seul événement ou à une seule cause; les cancers résultant en règle générale de la rencontre fortuite dans une cellule donnée, de plusieurs accidents indépendants dont les effets sont cumulatifs. On a estimé qu'il faut environ 3 à 7 événements aléatoires indépendants, chacun de faible probabilité, pour transformer une cellule en une cellule cancéreuse.

L'environnement de la cellule influe sur la fréquence de ces accidents de multiples façons et la majorité des cancers devraient être considérés comme le résultat d'un processus aléatoire dont la probabilité est augmentée par la contribution de facteurs de l'environnement. Il existe cependant certains agents exceptionnellement carcinogènes qui augmentent la probabilité des événements critiques de sorte qu'il devient pratiquement sûr, pour une dose suffisamment élevée, qu'une cellule, au moins, de l'organisme deviendra cancéreuse.

3 grands groupes d'agents induisent des cancers. ^{42 46}

a. Les cancérigènes chimiques

On a montré que de nombreux produits chimiques assez disparates sont vraisemblablement carcinogènes, lorsqu'ils sont injectés expérimentalement à des animaux ou étalés de façon répétée sur leur peau. Certains de ces produits carcinogènes agissent directement sur les cellules cibles; beaucoup d'autres n'agissent qu'après avoir été transformés en une forme plus réactive par des processus métaboliques -notamment par un groupe d'enzymes intracellulaires, connus sous le nom de cytochrome P₄₅₀ oxydase, qui en temps normal, facilitent la conversion des toxines ingérées et des matériaux liposolubles étrangers en composés inoffensifs et facilement excrétés, mais qui, pour certaines substances, ne peuvent y parvenir et dans ce cas, les transforment en produits carcinogènes directs.

Bien que les produits carcinogènes connus soient très divers, la majorité d'entre eux ont au moins une propriété en commun : ils provoquent des mutations

b. Les radiations

Les radiations peuvent aussi induire des cancers. Le développement de l'utilisation des rayons à des fins médicales ou industrielles a été accompagné d'une augmentation parallèle du pourcentage des cancers dans certaines professions.

Il existe de nombreux exemples de cancers induits par les rayons X et la radioactivité. Bien que les radiations puissent être à l'origine de cancers dans pratiquement tous les tissus de l'organisme, certains tissus, tels que les glandes mammaires, la moelle osseuse et la glande thyroïde y sont plus particulièrement sensibles.

Les rayons X et la radioactivité induisent la transformation des cellules par mutation ou réarrangement chromosomique des gènes impliqués dans la régulation de la reproduction cellulaire et dans la différenciation.

En plus des effets directs sur le DNA, les rayons X et radioactivité provoquent la formation de radicaux libres dans les tissus. Les \bullet OH, les superoxydes et les autres radicaux formés peuvent réagir avec le DNA et d'autres macromolécules entraînant des dommages moléculaires.

Les rayons ultraviolets (responsables des cancers de la peau) peuvent induire la formation de dimères de pyrimidine. Des sites apuriniques et apyrimidiques peuvent provenir de l'élimination des bases correspondantes. Des ruptures d'un brin ou des 2 brins de DNA ou des pontages entre les chaînes peuvent survenir.

c. Les virus ⁴⁷

Les virus sont responsables d'un nombre limité de cancers humains. Les cancers d'origine virale ne représentent vraisemblablement pas plus de 1 % des cancers humains.

Le mode d'action des virus oncogènes dans le développement du cancer a été l'objet d'un nombre impressionnant de travaux et continue à être une question très étudiée. L'approche la plus courante consiste à analyser la transformation de cellules normales en culture sous l'action d'un virus oncogène.

Les virus peuvent infecter des cellules normales et les transformer en cellules tumorales, du fait de l'introduction de l'ARN ou de l'ADN porté par le virus.

Un virus à potentialité tumorale perturbe les contrôles normaux de la division cellulaire en provoquant une modification permanente de la composition génétique de la cellule hôte, de sorte que la cellule commence à synthétiser une protéine qui l'emporte sur les contrôles normaux. De tels virus forment ainsi des moyens d'identifier les mécanismes qui sont normalement responsables des contrôles de la

division cellulaire.

1° / Les virus à ARN

Jusqu'à présent, les découvertes les plus importantes sont le résultat d'études sur les virus tumorigènes à ARN, appelés aussi rétrovirus. Après l'infection d'une cellule par un rétrovirus, son ARN est copié en ADN par transcription inverse et le cDNA est alors inséré dans le génome de l'hôte. Si un gène est capable d'induire des cellules normales à subir une transformation et à se diviser sans cesse rapidement comme des cellules cancéreuses, ce gène est appelé *oncogène*. Ce gène n'est pas nécessairement indispensable à la survie ou la reproduction du virus lui-même.

Les proto-oncogènes sont les équivalents normaux des oncogènes portés par certains rétrovirus.

Lors de l'analyse de l'oncogène src, on a observé qu'il était une copie légèrement altérée d'un gène d'origine cellulaire désigné c-src. Le gène cellulaire actif dans la physiologie de la cellule normale est appelé proto-oncogène puisqu'il peut être converti en un oncogène. Il est hautement probable que l'oncogène viral v-src tire son origine de l'insertion d'un proto-oncogène cellulaire dans le génome viral. A l'occasion d'une infection par le virus RSV, le gène v-src modifié s'intègre au génome cellulaire et peut ensuite s'exprimer.

Plusieurs mécanismes modifient l'expression et la structure des proto-oncogènes et participent à leur transformation en oncogènes.

• Insertion d'un promoteur

Certains rétrovirus n'ont pas d'oncogènes mais peuvent aussi être la cause de cancers. Quand ces rétrovirus infectent des cellules, une copie de cDNA de leur génome de RNA est synthétisé par transcriptase inverse et le cDNA est intégré dans le génome hôte. Les deux extrémités des copies du cDNA des rétrovirus comportent des séquences appelées LTR (longues répétitions terminales). Ces séquences de LTR sont des promoteurs puissants. Si, après infection, le cDNA s'intègre près d'un gène, en amont, le LTR adjacent agit à la façon d'un promoteur et active la transcription du gène.

• Insertion d'un enhancer

Dans certains cas, le cDNA est inséré en aval du gène, ou en amont de ce gène, mais orienté dans la direction inverse. Ce cDNA peut aussi activer la transcription du gène car il joue le rôle d'un enhancer et agit sur un promoteur situé dans une orientation adéquate en amont du gène.

Tableau 3 : Les oncogènes

The oncogenes

Acronym	Oncogene found in:		Subcellular location of protein	Nature of encoded protein
	Animal retrovirus	Nonviral tumor		
CLASS I: PROTEIN KINASES				
<i>src</i>	Rous avian sarcoma		Plasma membrane	Tyrosine-specific protein kinases (phosphorylate tyrosine residues)
<i>yes</i>	Yamaguchi avian sarcoma			
<i>fps (fes)</i>	Fujinami avian sarcoma (and feline sarcoma)		Cytoplasm	
<i>abl</i>	Abelson murine leukemia	Chronic myelogenous leukemia	Plasma membrane	
<i>ros</i>	UR II avian sarcoma		Cytoplasmic membranes	
<i>fgr</i>	Gardner-Rasheed feline sarcoma			Tyrosine-specific protein kinase derived from EGF receptor
<i>erbB</i>	Avian erythroblastosis		Plasma membrane	
<i>net</i>		Neuroblastoma	Plasma membrane	Receptorlike tyrosine-specific protein kinase
<i>fms</i>	McDonough feline sarcoma		Cytoplasmic membranes	Receptorlike protein
<i>mos</i>	Moloney murine sarcoma		Cytoplasm	Protein kinases specific for serine or threonine
<i>raf (mil)</i>	3611 murine sarcoma			
CLASS II: p21 PROTEINS				
<i>Ha-ras</i>	Harvey murine sarcoma	Bladder, mammary skin carcinomas	Plasma membrane	Guanine nucleotide-binding proteins with GTPase activity
<i>Ki-ras</i>	Kirsten murine sarcoma	Lung, colon carcinomas	Plasma membrane	
<i>N-ras</i>		Neuroblastoma leukemias	Plasma membrane	
CLASS III: NUCLEAR PROTEINS				
<i>myc</i>	Avian MC29 myelocytomatosis		Nuclear matrix	Proteins possibly involved in regulating transcription
<i>N-myc</i>		Neuroblastoma	Nuclear matrix	
<i>myb</i>	Avian myeloblastosis	Leukemia	Nuclear matrix	
<i>ski</i>	Avian SKV770		Nucleus	
<i>fos</i>	FBJ osteosarcoma		Nuclear matrix	
<i>p53</i>		(Demonstrated by cell transformation)	Nucleus	
CLASS IV: GROWTH FACTORS				
<i>sis</i>	Simian sarcoma		Secreted	Derived from PDGF gene
MISCELLANEOUS				
<i>Blym</i>		Avian bursal lymphomas		
<i>rel</i>	Avian reticuloendotheliosis			
<i>erb A</i>	Avian erythroblastosis			
<i>ets</i>	Avian E26 myeloblastosis			
<i>met</i>		Murine osteosarcoma		

• Translocation chromosomique

Plusieurs cellules tumorales présentent des anomalies chromosomiques. La translocation est un type de modification chromosomique observé. Dans la translocation, un fragment d'un chromosome est détaché et rattaché à un autre chromosome. Des translocations caractéristiques se retrouvent dans un certain nombre de cellules tumorales. Le chromosome Philadelphie est une importante translocation qui affecte les chromosomes 9 et 22 dans la leucémie myéloïde chronique. Le lymphome de Burkitt est un cancer à croissance rapide des lymphocytes B humains. Dans certains cas, une translocation réciproque est observée, les chromosomes 8 et 14 interviennent dans cette translocation

• Amplification génique

L'amplification d'un gène se retrouve dans plusieurs tumeurs. Certains oncogènes cellulaires sont susceptibles d'être amplifiés.

• Mutation ponctuelle

L'analyse de la séquence du proto-oncogène c-ras des cellules humaines normales et de l'oncogène v-ras provenant d'un cancer de la vessie chez les humains démontrent qu'ils ne diffèrent que par une seule base, résultant en la substitution de l'acide aminé à la position 12 de la protéine p21. Cette mutation dans la protéine p21 semble modifier sa conformation et diminuer son activité GTPasique. Ce phénomène peut causer le renversement de l'équilibre cellulaire vers un état favorisant la transformation.

Plus de 20 proto-oncogènes ont été identifiés jusqu'à maintenant grâce à leur présence dans les rétrovirus. (*tableau 3*)

Ces proto-oncogènes codent vraisemblablement des composants clés du système normal de contrôle sociaux de la division cellulaire.

Certains proto-oncogènes codent des facteurs de croissance; certains des récepteurs de facteurs de croissance; d'autres des protéines régulatrices intracellulaires qui sont impliquées dans l'adhérence cellulaire et d'autres enfin des protéines qui participent à la transmission des signaux de division cellulaire jusqu'au noyau.

2° / Les virus à ADN

Les virus à ADN peuvent aussi provoquer l'apparition de cancers
Le virus peut pénétrer dans une cellule hôte et peut y rester par suite d'un accident génétique qui abouti à l'incorporation stable du virus dans un ou plusieurs des chromosomes de la cellule hôte. Dans ces circonstances, le gène viral (resté fonctionnel) qui active le mécanisme de réplication peut encore être transcrit, faisant ainsi entrer la cellule hôte en phase S et la forçant à effectuer des cycles de division

répétés. Le gène viral agit comme un oncogène, provoquant une transformation cancéreuse. Il est cependant différent des autres classes d'oncogènes du fait qu'il n'a pas d'homologue dans le génome normal de la cellule hôte; il a évolué en tant que particule essentielle du matériel du virus pour son mode de propagation normal, et non par mutation à partir du proto-oncogène.

La prolifération des cellules normales est aussi régulée par des molécules de contrôle inhibitrices qui correspondent à des gènes suppresseurs de tumeurs. Donc, un seul oncogène ne peut exercer son effet dominant en provoquant un comportement cancéreux que si le système de contrôle est déjà sévèrement perturbé par la perte ou l'inactivation des deux copies d'un gène suppresseur de tumeur. Une analyse moléculaire de cellules tumorales de patients atteints de cancer révèle une collection complexe et hétérogène de lésions génétiques y compris l'activation d'un oncogène et la perte d'un gène suppresseur de tumeur.

1.4.3. Anomalies nucléaires associées

La taille et la forme des cellules cancéreuses ainsi que le nombre et la structure de leurs chromosomes varient souvent de façon anormale. En effet, une morphologie nucléaire anormale est une des caractéristiques utilisées par les pathologistes pour diagnostiquer un cancer.

Lorsque l'on cultive des cellules cancéreuses, on trouve souvent qu'elles ont un caryotype extraordinairement instable : les gènes sont amplifiés ou éliminés et les chromosomes sont perdus, dupliqués ou transloqués avec une fréquence plus élevée que dans les cellules normales en culture. Une telle variabilité chromosomique pourrait être simplement la conséquence de cycles de division cellulaire précipités, survenant dans une cellule différenciée qui est mal adaptée à une prolifération rapide; ou bien elle pourrait refléter une déficience génétique dans le mécanisme ou le contrôle de la réplication, de la réparation ou de la recombinaison de l'ADN, survenant par mutation somatique dans l'un des nombreux gènes impliqués dans ces processus complexes. Une telle mutation serait susceptible d'augmenter la probabilité de mutation ultérieure dans d'autres classes de gènes.

1.5. Application clinique à l'étude du DNA et du cycle cellulaire en pathologie humaine

Ces applications sont essentiellement de 2 types : ¹⁰

- étude de la prolifération des tumeurs malignes;
- action des drogues antinéoplasiques.

1.5.1. Etude de la prolifération tumorale ^{17 48 49}

L'analyse du DNA (ploïdie et études des différentes phases du cycle cellulaire) est une technique intéressante pour l'étude de lésions néoplasiques. Cette technique fournit une quantification rapide, précise, objective et reproductible du contenu en ADN cellulaire et de l'activité de prolifération qui n'est pas toujours disponible avec les examens en microscopie optique. Cette information est utilisée dans certaines circonstances pour confirmer la présence de tumeur. L'analyse de l'ADN peut fournir, pour certaines tumeurs, une estimation précise du pronostic des patients. Cependant, ni le contenu en ADN, ni l'analyse des différentes phases du cycle cellulaire n'est utile pour d'autres tumeurs. Dès lors, l'analyse de l'ADN par cytométrie de flux est recommandée seulement pour certaines circonstances.

a. Diagnostic

Les premiers paramètres ont montré une telle fréquence d'aneuploïdie dans les tumeurs solides que s'est posé le problème de l'utilisation de ce paramètre comme élément diagnostique. Le taux important de faux négatifs a rapidement entraîné son abandon. L'analyse de l'ADN ne peut, à elle seule, être un paramètre diagnostique. Pour les tumeurs dont le diagnostic morphologique est difficile, une analyse de l'ADN aneuploïde peut renforcer des diagnostics cytologiques et histologiques.

b. Pronostic

L'évaluation du pronostic est d'une particulière importance dans le traitement de la maladie cancéreuse puisqu'il détermine le choix thérapeutique. Un certain nombre de facteurs pronostics existent. Ils sont - soit d'ordre morphologique : il s'agit d'évaluer le degré de différenciation de la tumeur - soit d'ordre clinique : ils intéressent la tumeur et son extension (envahissements ganglionnaires, présence ou absence de métastase).

Tableau 4 : répartition des différentes tumeurs en trois groupes suivant la puissance de l'analyse du DNA

**Flow Cytometric Applications
DNA Analysis**

SUMMARY OF CLINICAL SIGNIFICANCE OF DNA ANALYSIS

Group I - DNA Analysis Indicated In Routine Patient Care

Neoplasm	DNA Abnormality	Clinical Significance
Bladder Carcinoma	Abnormal DNA Content Increased S-Phase Fraction	Clinical Aggressiveness, Recurrence, Decreased Survival Clinical Aggressiveness ?
Borderline Ovarian Tumors	Abnormal DNA Content	Aggressive Clinical Course
Breast Carcinoma	Abnormal DNA Content Increased S-Phase Fraction	Decreased Survival Decreased Survival, Absence Steroid Receptors
Colorectal Carcinoma	Abnormal DNA Content Increased S-Phase Fraction	Disease Recurrence, Decreased Survival Decreased Survival
Endometrial Carcinoma	Abnormal DNA Content	Decreased Survival
Hydatidiform Mole	Abnormal DNA Content	Persistent Trophoblastic Disease
Malignant Melanoma	Abnormal DNA Content	Decreased Survival (Cutaneous Phase Only)
Multiple Myeloma	Decreased DNA Content (Hypodiploidy)	Decreased Survival
Neuroblastoma	Abnormal DNA Content	Increased Survival, Required For Protocol Assignment
Medulloblastoma	Abnormal DNA Content	Decreased Survival
Ovarian Carcinoma	Abnormal DNA Content	Decreased Survival, Independent Prognostic Indicator
Prostatic Carcinoma	Abnormal DNA Content	Disease Progression, Decreased Survival

Group II - DNA Analysis Indicated In Selected Cases

Acute Lymphoblastic Leukemia	Abnormal DNA Content	Increased Survival
Adrenocortical Neoplasms	Abnormal DNA Content	Recurrence, Metastasis
Astroglial Tumors	Abnormal DNA Content Increased S-Phase Fraction	Decreased Survival Decreased Survival
Barré's Esophagus	Abnormal DNA Content	Disease Progression
Esophageal Carcinoma	Abnormal DNA Content	Subgroups With Extremely Poor Prognosis
Germ Cell Tumors	Abnormal DNA Content	Decreased Survival
Hodgkin's Disease	Increased S-Phase Fraction	Decreased Survival
Lung Carcinoma (Non-Small Cell)	DNA Content, High % Aneuploid Cells Multiploidy	Decreased Survival, Metastasis Very Poor Survival
Myelodysplasia	Decreased DNA content (Hypodiploidy)	Decreased Survival
Non-Hodgkin's Lymphoma	Increased S-Phase Fraction	Decreased Survival
Soft Tissue Tumors (Selected)	Abnormal DNA Content	Decreased Survival
Thyroid Carcinoma	Abnormal DNA Content	Decreased Survival, Correlation Strongest For Papillary
Uterine Cervical Carcinoma	Abnormal DNA Content Increased S-Phase Fraction	Clinical Aggressiveness, Decreased Survival Clinical Aggressiveness

Group III - DNA Analysis Indicated For Research Only

Carcinoid Tumors	DNA Content, S-Phase Fraction	Significance Controversial
Gastric Carcinoma	Abnormal DNA Content, Multiploidy	Most Cases Multiploid, Significance Controversial
Hepatic Neoplasms	DNA Content, S-Phase Fraction	Inadequate Data
Meningiomas	DNA Content, S-Phase Fraction	Inadequate Data
Parathyroid Tumors	DNA Content, S-Phase Fraction	Inadequate Data
Pituitary Tumors	DNA Content, S-Phase Fraction	Inadequate Data
Rectal Carcinoma	Abnormal DNA Content	No Prognostic Significance Reported
Renal Carcinoma	DNA Content, S-Phase Fraction	Inadequate Data
Squamous Cell Tumors Of Head & Neck	Abnormal DNA Content	Significance Controversial
Thyroid Adenomas	Abnormal DNA Content	Significance Controversial
Urethral/Penile Carcinoma	DNA Content, S-Phase Fraction	Inadequate Data

Ces différentes données peuvent être exprimées en calculant un score qui définit le stade de la maladie. De plus, récemment, sont apparus des paramètres d'ordre biologique, comme les récepteurs hormonaux pour le cancer du sein. Malgré cela, un pourcentage important d'échec est observé; c'est pourquoi les cliniciens apprécient les nouveaux paramètres susceptibles de leur apporter une aide pour une définition plus précise et parmi les nouveaux paramètres, l'aneuploïdie apparaît comme un bon candidat.

Pour un bon nombre de tumeurs (neuroblastome, carcinome du sein, du colon, de la vessie, des ovaires, etc) on a prouvé que l'analyse de l'ADN par cytométrie de flux donne un pronostic précis, qui est utile et corrèle bien avec d'autres informations. Dans un 2^{ème} groupe de tumeur, la corrélation statistique est relativement faible mais l'analyse de l'ADN peut fournir une aide clinique. Dans un 3^{ème} groupe de tumeur, l'analyse de l'ADN n'est pas une valeur statistique valable au temps présent (tableau 4).^{24 50 51}

c. Suivi thérapeutique

Quelques patients traités pour un carcinome ont été suivis aux Etats - Unis en testant l'aneuploïdie des cellules recueillies par lavages vésicaux.

Plus récemment, à Saint-Cloux, une étude a été réalisée sur une série de 61 patientes atteintes du cancer du sein et recevant 3 cures de chimiothérapies. Ces résultats ont montré que les cellules tumorales diploïdes et à petits noyaux ne se modifiaient pas pendant le traitement; à l'inverse, dans les tumeurs aneuploïdes à gros noyaux, on observe des modifications cellulaires importantes et une régression tumorale. Ces paramètres pourraient peut - être montrer une résistance ou une sensibilité à une chimiothérapie.¹⁷

Plusieurs problèmes concernant la réalisation de l'analyse de l'ADN par cytométrie de flux dans les laboratoires biologiques de routine ont été résolus ces dernières années.⁵²

L'analyse du contenu en ADN nécessite la coloration d'une suspension cellulaire homogène. Les cellules dépourvues de jonctions intercellulaires (cellules sanguines, cellules de la moelle osseuse, tissu lymphoïde) sont idéales pour les mesures en cytométrie et ne nécessitent pas d'efforts spéciaux. Il est aussi relativement aisé d'obtenir une suspension cellulaire à partir de culture cellulaire. Cependant la préparation d'une suspension de cellules entières intactes de tumeurs solides humaines est plus difficile. Le résultat peut dépendre de l'organe; des cellules entières d'organes parenchymateux, tel que le foie sont relativement faciles à obtenir en utilisant une méthode de perfusion. Par contre, les cellules épithéliales,

liées par des desmosomes, sont extrêmement difficiles à séparer à cause des jonctions cellulaires importantes qui ne se dissocient pas sans dommages de la membrane cellulaire. Plusieurs traitements (enzymatiques, détergents, mécaniques) ont été utilisés pour la préparation de suspension cellulaire. Le cytoplasme peut être fortement endommagé. Les résultats obtenus sont pauvrement reproductibles et généralement, ne peuvent être considérés comme fiables.^{24 31}

Pour détourner ce problème, des méthodes ont été développées afin d'isoler les noyaux intacts qui permettront l'analyse en cytométrie de flux de composants nucléaires tels que l'ADN. La grande majorité des tumeurs sont disponibles sur du matériel fixé à la formaline et plongé dans la paraffine. Ce problème a été élégamment résolu avec le développement d'une méthode relativement simple d'extraction de noyaux intacts. Les sections sont déparaffinées dans du xylène et sont réhydratées dans des solutions alcooliques. Un traitement à la pepsine acide est utilisée afin d'isoler les noyaux.

Les résultats sont bons lorsque le matériel est originellement fixé dans une solution de formaldéhyde ou de formaldéhyde / acétone / acide acétique; ils sont insatisfaisants lorsque les tissus sont fixés dans une solution de Bouin ou dans une solution à base de mercure.

Les débris interfèrent avec les résultats; il est donc préférable d'utiliser les techniques de préparation d'échantillons qui produisent le moins de débris possible.

Le deuxième problème a été le mélange de cellules "normales" avec des cellules tumorales. Ce problème semble être résolu par l'utilisation d'anticorps spécifiques d'un type cellulaire comme seconde coloration dans l'analyse des échantillons.

Les néoplasmes hématopoïétiques conviennent parfaitement à une analyse en cytométrie de flux. Contrairement aux cellules d'autres tumeurs, les cellules de lymphome sont facilement dispersées par des moyens mécaniques sans perte significative de surface cellulaire ou d'antigène cytoplasmique. De plus les anticorps contre les antigènes associés aux cellules lymphomateuses sont nombreux et sont facilement disponibles dans le commerce.⁴⁰

Les marqueurs distinguant les cellules néoplasiques des cellules non néoplasiques peuvent être utilisés avec la coloration de l'ADN si une analyse précise des fractions du cycle cellulaire et de la ploïdie des cellules tumorales est désirée. Cette technique de coloration permet la détection de tumeurs où les composants néoplasiques diploïdes et aneuploïdes coexistent; cette anomalie ne peut être reconnue par une simple coloration de l'ADN.⁴⁰

L'analyse de l'ADN ne donne pas un pronostic valable pour les lymphomes de Hodgkin. Un petit pic aneuploïde a été montré dans quelques cas, mais la majorité est normale. Le problème est que les composants malins de la tumeur ne comprennent seulement qu'une faible fraction des cellules totales. Le développement

récent d'anticorps contre les cellules Sternberg Reed permet la détection, la focalisation et l'analyse de l'ADN d'une petite population cellulaire parmi les cellules réactives et normales de la tumeur.

1.5.2. Action des drogues antinéoplasiques ¹⁰

Toutes les drogues agissant sur la prolifération cellulaire peuvent être étudiées par cytométrie de flux, comme par exemple :

- le méthotrexate : substance anticancéreuse, inhibiteur de la dihydrofolate réductase ⁴²
- l'hydroxyurée : il inhibe l'action de la nucléoside diphosphatase réductase ³
- l'ARA-C ou cytosine arabinoside : elle est incorporée à l'ADN et bloque sa synthèse ⁵
- l'antracycline : comme la mithramycine, l'olivomycine, la chromomycine A₃; elles s'intercalent aux brins d'ADN et d'ARN ⁵

Dans le laboratoire de l'hôpital cardiologique Haut-Levêque, l'action des différentes drogues utilisées dans le traitement des leucémies aiguës myéloïdes est systématiquement étudiée dans chaque cas afin de définir une meilleure stratégie thérapeutique. ¹⁰

1.6. But du travail

L'analyse de l'ADN (calcul de la ploïdie et du pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire) n'est pas encore utilisée dans le laboratoire de biologie clinique de Auvelais.

Or, des hémopathies (leucémies lymphoïdes chroniques ou LLC,...), et des lymphocytoses réactionnelles (mononucléoses,...) sont souvent rencontrées dans ce laboratoire; et la cytométrie de flux semble être une bonne méthode pour l'analyse de ces maladies.

Une analyse multiparamétrique est nécessaire pour délimiter le type cellulaire à étudier. L'emploi de l'iodure de propidium est le plus souvent utilisé pour le marquage de l'ADN. C'est le fluorochrome le plus facile à employer lors d'un double marquage. Un simple laser à argon peut exciter l'iodure de propidium et les marqueurs membranaires grâce à une seule longueur d'onde.

Cette analyse, bien que couramment utilisée dans certains laboratoires, n'est pas réalisée sans mal.

Mon travail consistera à analyser les différents problèmes rencontrés lors de la mesure de l'ADN par cytométrie de flux.

Cette analyse sera essentiellement étudiée sur des lymphocytes "normaux".

MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel

2.1.1. Echantillons (prélèvements biologiques)

Sang récolté sur EDTA.

les échantillons sont traités dans un délai ne dépassant pas 12 heures.

2.1.2. Réactifs

Saponine : agent perméabilisant (Sigma chemical; S-2149)

RNAase A : 41 Kunitz unit / mg (Sigma chemical; R-5503)

solution de tampon phosphate :

PBS (Phosphate Buffered Saline): solution prête à l'emploi
(Sigma Chemical P-4417)

- chlorure de sodium à 137 mmoles
 - chlorure de potassium à 2,7 mmoles
 - tampon phosphate à 10 mmoles
 - 200 ml H₂O distillée
- pH 7,4

solution de RPMI-1640 : solution prête à l'emploi (Sigma chemical; R-0883)

solution de Tris HCl

- 1 ml de Tris 1 M
 - 0,5 ml de solution MgCl₂ 1M
 - 100 ml d'eau distillée
- pH 7

solution de fixation : fixative liquid reagent; coulter immunology

solution de lyse : solution hypotonique d'érythrolyse dont la composition est la suivante :

- 1 gr de KHCO₃
- 8,26 gr de NH₄Cl
- 0,037 gr de EDTA
- 500 ml d'H₂O distillée

2.1.3. Les anticorps monoclonaux conjugués

Fragments F(ab')₂ à une dilution de 10 µl pour 200 µl de PBS

- CD4 (OKT₄) : anticorps monoclonal de souris pan T Helper anti-humain conjugué au FITC (ortho)
- CD8 (OKT₈) : anticorps monoclonal de souris pan T cytotoxique anti-humain conjugué au FITC (ortho)
- CD3 (OKT₃) : anticorps monoclonal de souris pan T anti-humain conjugué au FITC (Ortho)

2.1.4. Les anticorps monoclonaux non conjugués

Fragments F(ab')₂ à une dilution de 10 µl pour 200 µl de PBS

- CD19 (B₄NC) : anticorps monoclonal de souris pan B anti-humain CD19 non conjugué (coultre immunology)

2.1.5. Les fluorochromes

Isothiocyanate de fluorescéine (FITC) conjugué au fragment F(ab')₂ d'immunoglobuline anti-souris de lapin (Dako) (fluorescence verte)

L'iodure de propidium, fluorochrome utilisé pour la coloration de l'ADN donne une fluorescence rouge; il s'intercale entre les paires de bases d'ADN et d'ARN (Sigma Chemical; P-4170)

L'isothiocyanate de fluorescéine et l'iodure de propidium sont excitables à 488 nm

2.1.6. Appareillage

- EPICS "C" : cytofluorimètre avec laser argon 5 watts

La longueur d'onde utilisée pour le phénotypage et la mesure de la quantité d'ADN est de 488 nm.

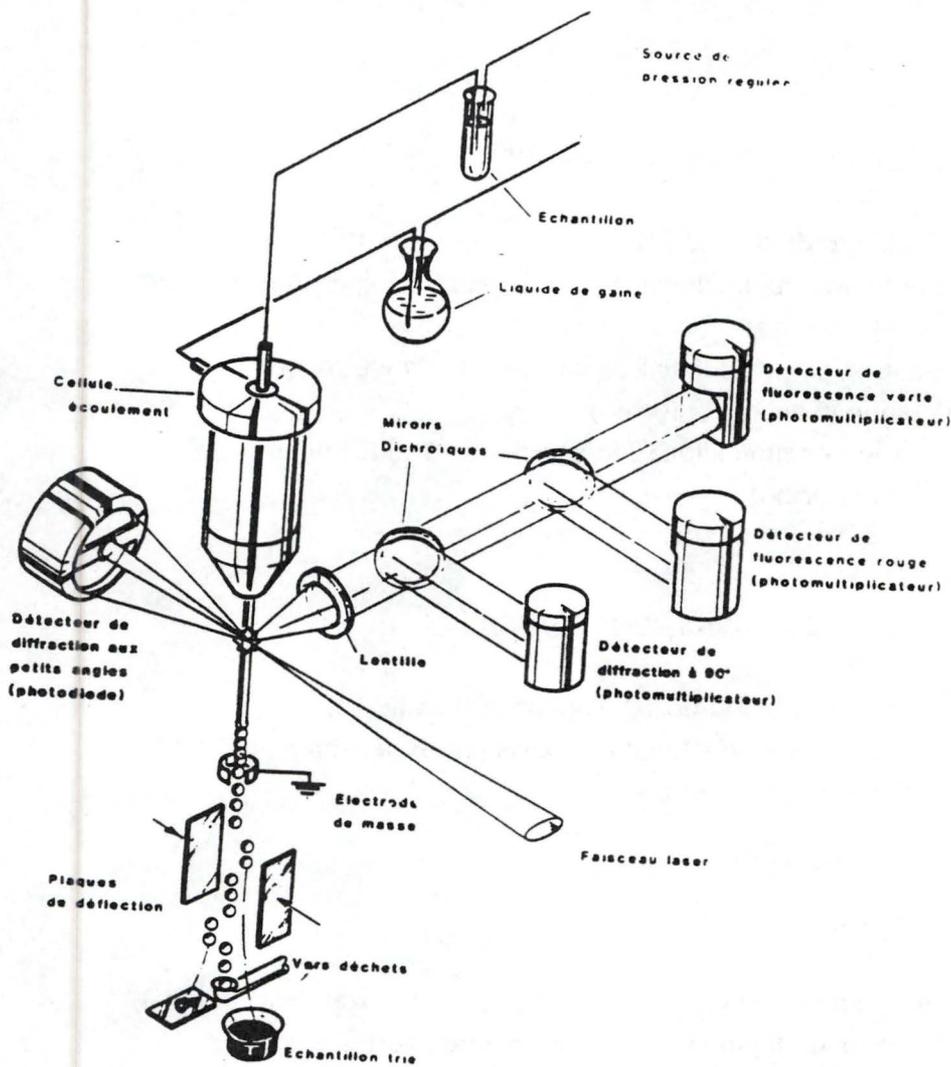
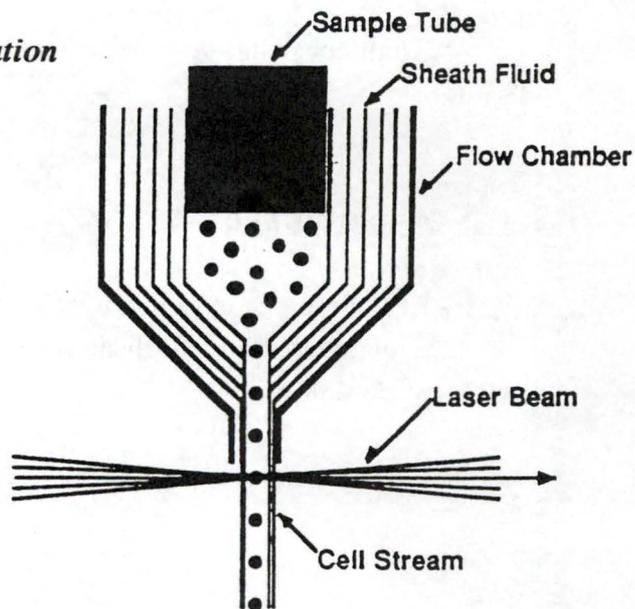


Figure 8 : principe de fonctionnement du cytomètre de flux

Figure 9 : représentation schématique de la focalisation hydrodynamique



Close-up of the flow chamber. The cell stream is injected into the center of a stream of faster-moving fluid. The stream, and the special geometry of the flow chamber, force the cells into single file. The cells emerge from the tip of the flow chamber in a thin stream of sheath fluid.

2.2. Méthodes

2.2.1. La cytofluorimétrie ^{53 54}

La cytofluorimétrie de flux est une technique d'exploration cytologique basée sur des principes optiques, électriques et informatiques. Elle permet une analyse multiparamétrique, cellule par cellule, précise et rapide. Les cellules préalablement mises en suspension, monodispersées et préparées spécifiquement au type d'analyse, sont dirigées par une gaine fluide vers une zone d'analyse où elles sont interceptées par un faisceau lumineux. Les différents signaux optiques résultants de cette interception (lumières diffusées et fluorescences émises), qui sont fonction des propriétés biologiques des cellules, sont recueillis par des détecteurs qui les transforment en signaux électriques. Ceux-ci sont traités par un module informatique. (*figure 8*)

a. Le système

1° / La focalisation hydrodynamique

C'est par le système physique que l'appareil peut séparer les unes des autres les cellules en suspension, dans un flux continu de liquide.

La suspension cellulaire est injectée dans une veine de liquide à forte section qui ne peut s'écouler que par un cylindre de faible diamètre. Comme le diamètre du dispositif diminue mais que le flux reste constant, la vitesse du liquide augmente et permet la séparation des cellules. (*figure 9*)

2° / Acquisition des données

• Le faisceau excitateur

La lumière excitatrice la mieux adaptée à la CMF est celle générée par effet laser. Le faisceau lumineux ainsi obtenu est monochromatique (d'une longueur d'onde donnée), de forte puissance, stable et concentré sur une faible surface (proche de la section d'une cellule).

•Collecte des signaux

L'interception des cellules par le faisceau de lumière excitatrice génère un certain nombre de signaux optiques dont l'intensité est corrélée avec des propriétés cellulaires.

Ces signaux sont :

- La lumière diffusée sous un petit angle ($< 12^\circ$) (FLS) dont l'intensité est corrélée avec la taille des cellules et leur viabilité.
- La lumière diffusée à angle droit (diffusion à 90°) (RLS ou 90° LS) dont l'intensité est corrélée à la morphologie, à la réfringence du cytoplasme (qui exprime entre autre la viabilité) et au rapport nucléo-cytoplasmique.
- Les lumières de fluorescence. Les cellules qui ont été marquées par un fluorochrome vont émettre dans toutes les directions de l'espace une fluorescence de longueur d'onde différente de celle du faisceau exciteur. L'intensité de la fluorescence émise sera fonction du nombre de molécules du fluorochrome fixées sur la cellule ou sur des constituants cellulaires.

Ces différents signaux optiques sont focalisés, séparés et acheminés vers le système de détection. La focalisation est assurée par des lentilles convergentes. Un arrangement judicieux de miroirs dichroïques et de filtres permet de séparer les différents signaux optiques en fonction de leur longueur d'onde : les miroirs dichroïques réfléchissent une longueur d'onde donnée et transmettent les autres; les filtres transmettent également une longueur d'onde donnée mais absorbent (filtres absorbants) ou détruisent (filtres interférentiels) les autres. Après avoir traversé ces différents circuits optiques, les lumières sont acheminées vers des photomultiplicateurs qui transforment les informations lumineuses en signaux électriques traités, le plus souvent, par informatique.

3° / le traitement des données

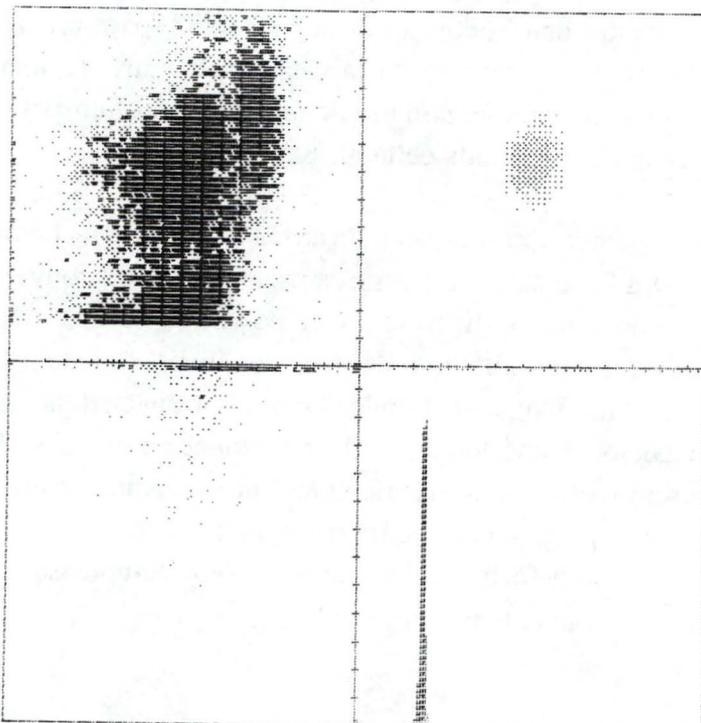
•Conversion des signaux

Les signaux lumineux qui viennent frapper le photomultiplicateur provoquent de la part de ce dernier la production d'un courant dont la tension dépend de la quantité de photons reçus. Ainsi, la diffusion de lumière ou la fluorescence d'une cellule sera transformée en un signal électrique. Ces signaux électriques vont être pris en charge par un convertisseur analogique digital qui va quantifier l'amplitude de chaque signal en un numéro de canal : de 1 à 256 (ou 1024) canaux selon l'amplification choisie.

```

H1: 07 04 1 19016 X 716
H2: 07 04 1 19016 X 716
H3: 07 04 1 19016 X 716
H4: 07 1004 RFL

```



25NOV93.004

Figure 10 : simple marquage à l'iodure de propidium

H_1 : cytogramme; les deux paramètres sont :
la taille (en ordonnée) et le contenu
cellulaire (en abscisse)

H_4 : histogramme; nombre d'événements
(cellules) en fonction de l'intensité de la
fluorescence rouge

Sur le cytogramme 1 est délimitée une zone
d'intérêt : la population de lymphocytes;
celle - ci est à nouveau représentée en H_2
l'intensité de la fluorescence rouge n'est
mesurée que pour la population de
lymphocytes

La valeur du canal peut être codée en bits qui seront utilisables par l'unité informatique.

• Représentation des résultats

* Traitement graphique

Les données reçues par l'unité informatique sont représentées sous forme d'histogrammes de distribution des fréquences dont l'abscisse (étalonnée de 0 à 256 ou 1024) représente l'intensité du paramètre étudié (en canaux) et dont l'ordonnée représente le nombre d'événements (chaque cellule étant considéré par l'ordinateur comme un événement) (*figure 10*). Comme chaque cellule peut émettre plusieurs signaux différents en fonction de leur direction ou de leur longueur d'onde, il est possible de combiner sur une même représentation 2 paramètres indépendants : nous sommes en présence d'un histogramme biparamétrique ou "cytogramme". (*figure 10*) Il est possible d'obtenir des histogrammes et des cytogrammes conditionnels : ceux-ci sont établis à partir des événements qui répondent à des critères de sélection définis par une zone d'intérêt (fenêtre) délimitée sur un histogramme ou cytogramme. Cela permet de limiter l'analyse à une population donnée au sein d'un échantillon hétérogène et d'éliminer les débris, doublets ou agrégats cellulaires.

* Traitement numérique

Ce traitement donne à chaque échantillon des valeurs caractéristiques tels que le nombre et la proportion des événements dans les différentes zones d'intérêt et les valeurs statistiques des paramètres pour une population ou une sous-population donnée [moyenne, dispersion (coefficient de variation),...]. Il permet en outre de calculer la répartition des cellules dans les différentes phases ($G_{0/1}$, S, G_2+M) du cycle cellulaire pour lequel des modèles mathématiques ont été développés. Cette analyse se fera ultérieurement, à partir des données stockées sur support physique (analyse PARA 1).

• Le stockage des données

Les données acquises sont sauvegardées sur support physique (disquette).

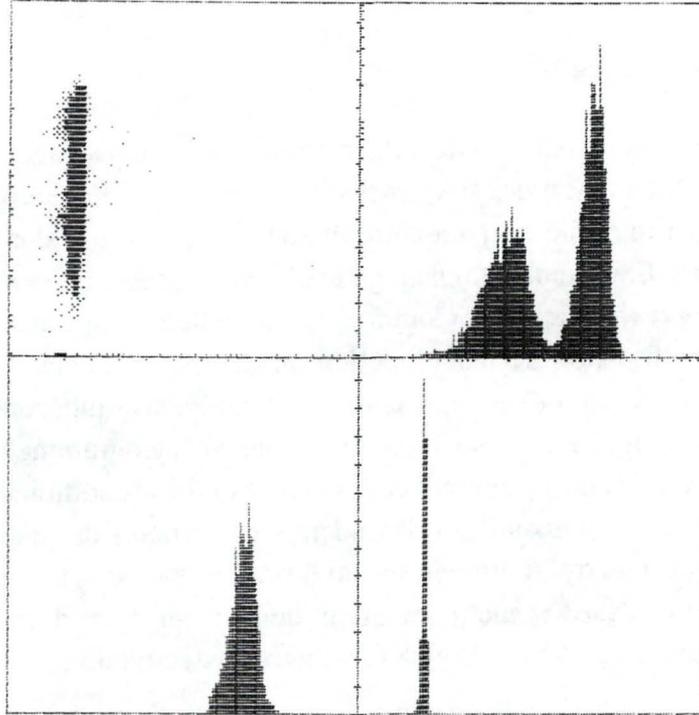
b. Analyse en cytométrie de flux

Une étude multiparamétrique est fréquemment réalisée : pour chaque cellule

```

H1: 2P 64-1 RFL W LGFL
H2: 1P 256-1 LGFL
H3: 1P 256-2 LGFL
H4: 1P 128-4 RFL

```



14DEC93.018

Figure 11 : double marquage (marqueur membranaire et iodure de propidium)

H_1 : cytogramme; les deux paramètres sont : la fluorescence verte (FITC) et la fluorescence rouge (iodure de propidium)

H_2 : histogramme; nombre de cellules en fonction de l'intensité de la fluorescence verte

H_4 : histogramme; nombre de cellules en fonction de l'intensité de la fluorescence rouge

Sur le cytogramme 1 est délimité une zone d'intérêt : la population de lymphocytes possédant la protéine marquée; cette population est à nouveau représentée en H_3 ; la mesure de l'intensité de la fluorescence rouge n'est mesurée que pour cette population

sont déterminées la taille, la morphologie et une ou deux fluorescences. Chacun des paramètres est consigné dans un histogramme et leur combinaison deux à deux dans un cytogramme. Histogramme et cytogramme peuvent être conditionnels.

Pour le marquage de l'ADN, les paramètres sont :

- 1° / la taille,
- 2° / le contenu cellulaire,
- 3° / la fluorescence rouge (488 nm) de l'iodure de propidium intercalé à l'ADN,
- 4° / en double marquage, la fluorescence verte (488 nm) du FITC.

Sur un premier cytogramme "taille-contenu cellulaire", est délimitée une zone d'intérêt correspondant à la population cellulaire à étudier (les lymphocytes). (*figure 10*)

Lorsqu'un simple marquage est réalisé (marquage de l'ADN), l'appareil va fournir, pour la population cellulaire étudiée, une distribution du nombre de cellules en fonction de l'intensité de fluorescence. Comme la quantité d'iodure de propidium fixée par chaque cellule est proportionnelle à son contenu en ADN, on dispose d'une représentation graphique du contenu en ADN établi cellule par cellule. (*figure 10*) Il est ainsi possible de calculer la répartition des cellules dans les différentes phases $G_{0/1}$, S, $G_2 + M$ du cycle cellulaire et de mettre en évidence le cas échéant la présence de un ou plusieurs clones cellulaires ADN aneuploïdes.

Lorsqu'un double marquage est réalisé, l'appareil va fournir, pour la population cellulaire étudiée (lymphocytes), une distribution du nombre de cellules en fonction de l'intensité des fluorescences. (*figure 11*)

Il est ainsi possible d'identifier deux sous-populations cellulaires : celle n'exprimant pas la protéine membranaire étudiée et celle exprimant cette protéine (protéine liée à un anticorps conjugué au FITC). Si on délimite, sur ce cytogramme, une zone d'intérêt correspondant à la population cellulaire exprimant la protéine membranaire, on obtient un 3^{ème} histogramme montrant la distribution du nombre de cellules en fonction de l'intensité de la fluorescence rouge.

c. Calcul du pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire (analyse PARA 1) ⁵⁵

L'analyse PARA 1 calcule le pourcentage de cellules se trouvant dans les différentes phases du cycle cellulaire.

L'analyse se fait de la façon suivante :

1° / l'utilisateur introduit à l'ordinateur différentes données :

- il donne une approximation du coefficient de variation;
- il donne le nombre de pics présents;
- il détermine les limites inférieures et supérieures de chaque pic;

- il choisit le nombre de déviation standard (n);
En général, il donne un $n = 2$; un parallélisme peut être réalisé avec l'écart - type d'une distribution normale où 95 % des valeurs seront toujours comprises entre la moyenne et deux écarts - types.

2° / l'ordinateur recherche la position des optimum (le mode) inscrit à l'intérieur des limites données par l'utilisateur.

3° / Grâce au mode, au coefficient de variation et au nombre de déviation standard, l'ordinateur calcule les limites inférieures et supérieures de chaque pic :

$$\text{limites inférieures} = \text{mode} - \text{CV} * n * \text{mode}$$

$$\text{limites supérieures} = \text{mode} + \text{CV} * n * \text{mode}$$

La position du pic est alors correctement déterminée

4° / Il peut aussi calculer la déviation standard des pics.

5° / A partir de toutes ces données, il peut déterminer la surface des différents pics. La surface restante, située entre les pics G_0 / G_1 et $G_2 - M$ sert comme approximation de la phase S.

6° / Une correction des doublets est réalisée.

Lorsque deux cellules diploïdes passent en même au niveau du laser, celui - ci ne comptera qu'une seule cellule qui sera tétraploïde, le pic $G_2 - M$ risque d'être surestimer. Si 3 cellules passent en même temps, le laser ne comptera qu'une seule cellule ayant un contenu en ADN égal à 6 N. Un troisième pic se formera. L'ordinateur peut considérer ce troisième pic comme étant formé de triplet et l'ajoute à la phase G_0 / G_1 . Connaissant le nombre de triplets, il peut connaître le nombre de doublets et faire la même correction.

7° / Il peut ainsi calculer le pourcentage de cellule se trouvant dans les différentes phases du cycle cellulaire :

- nombre total de cellules = $(G_0 / G_1) + (S) + [(G_2 - M) - \text{doublets}] + 2 * \text{doublets} + 3 * \text{triplets}$
- % $G_0 / G_1 = 100 * [(G_0 - G_1) + 2 * \text{doublets} + 3 * \text{triplets}] / \text{total}$
- % S = $100 * S / \text{total}$
- % $G_2 - M = 100 * [(G_2 - M) - \text{doublets}] / \text{total}$
- % doublets = $200 * \text{doublets} / \text{total}$
- % triplets = $300 * \text{triplets} / \text{total}$

2.2.2. Méthodes de marquage de l'ADN avec l'iodure de propidium

La littérature propose des méthodes fort variées pour le marquage de l'ADN avec l'iodure de propidium.

Ces méthodes varient en fonction du détergent ou de l'agent perméabilisant

utilisé. Comme le but de mon mémoire est de pouvoir faire une analyse combinée de phénotypage et du contenu en ADN, le détergent ne peut être utilisé.

Méthode 1 : Selon Paul Karl Horan ⁵⁶

- fixer les cellules dans de l'éthanol à 70 % pendant 30 minutes
- laver avec du tampon phosphate
- ajouter la RNAase (concentration initiale : 1 mg/ml)
- incuber 30 minutes à 37 °c
- ajouter l'iodure de propidium (concentration initiale : 5 mg/100ml)
- incuber 30 minutes à température ambiante
- laver avec du tampon phosphate
- resuspendre dans du tampon phosphate

[Méthode 2 : Selon Vindelov et al ⁵⁷ (avec extraction de noyaux intacts]

- les cellules sont suspendues dans 200µl de tampon citrate (250 000 cellules)
- ajouter 1800 µl de solution de trypsine (concentration initiale : 30 µg/ml)
- mélanger par inversion
- incuber 10 minutes à température ambiante
- ajouter 1500 µl de solution contenant l'inhibiteur de trypsine (concentration initiale : 500 µg/ml) et la RNAase (concentration initiale : 100 µg/ml)
- mélanger par inversion
- incuber 10 minutes à température ambiante
- ajouter 1500 µl de solution froide contenant l'iodure de propidium (concentration initiale de 400 µg/ml)
- mélanger
- incuber dans un bain de glace et à l'abri de la lumière
- analyser 15 minutes à 3 heures après addition de l'iodure de propidium

Méthode 3 : Selon Schmid et al ¹³

- la suspension cellulaire (10⁶ cellules/ml) est fixée dans une solution de paraformaldéhyde 0,25 %
- incuber 60 minutes à 4 °c
- ajouter une solution de Tween 20 à 0,2 % (polyoxyéthylène - sorbitan monolaurate, Sigma)
- incuber 15 minutes à 37 °c
- laver avec du tampon phosphate
- resuspendre dans du tampon phosphate contenant 10 µg/ml d'iodure de propidium et 11 Kunitz units de RNAase
- incuber à 4 °c et à l'abri de la lumière pendant 30 minutes

Méthode 4 : Selon Martine Ffrench et Jean-Pierre Magaud ³⁸

- mettre 100 µl d'une solution de RNAase (concentration initiale : 1 mg/ml) à 100 µl de suspension cellulaire en éthanol (environ 10⁶ cellules/ml)
- ajouter 1 ml de tampon phosphate
- ajouter 100 µl de solution d'iodure de propidium (concentration initiale : 47 µg/ml)
- incuber 3 minutes avant l'analyse

Méthode 5 : Variante; méthode simplifiée

- ajouter 1 ml de solution d'iodure de propidium (concentration initiale : 50 µg/ml) à une suspension cellulaire de 10⁶ cellules
- vortexer
- ajouter 20 µl de RNAase (concentration initiale : 50 mg/ml)
- incuber 30 minutes à 37° c avant l'analyse

Méthode 6 : Selon Rigg et al ⁵⁸

- les cellules sont suspendues dans du tampon phosphate (10⁶ cellules)
- les cellules sont perméabilisées avec de la saponine 0,1 %
- incuber 5 minutes à température ambiante
- ajouter l'iodure de propidium (concentration initiale : 50 µg/ml) et la RNAase (concentration initiale : 1 mg/ml)
- incuber 1 à 5 minutes avant l'analyse

Méthode 7 : selon Suranyi et a ⁵⁹

- les cellules sont fixées dans de l'éthanol 50% pendant 24 heures au moins
- les cellules sont lavées et centrifugées
- l'iodure de propidium est ajouté (concentration finale de 40 µg par ml)
- incuber pendant 30 minutes avant l'analyse

Lors de son mémoire, L. Delestienne a analysé l'action de plusieurs agents perméabilisant sur les antigènes membranaires.

Il en est ressorti que :

- Lorsque l'on perméabilise les lymphocytes avec du KCl/méthanol, formaldéhyde/acétone, éthanol-acide acétique/formaldéhyde/acétone, la fluorescence observée est non spécifique.
- Lorsque l'on perméabilise les lymphocytes avec de la lysolécithine, on observe aussi une fluorescence non spécifique pour les lymphocytes B.
- Lorsque l'on perméabilise les lymphocytes avec la saponine, les résultats semblent être meilleurs.

La saponine est un perméabilisant. Il interagit avec le cholestérol des membranes et forme des agrégats. Des larges pores sont formés. La saponine est utilisée pour former de larges "trous" et permettre aux petites molécules et aux macromolécules d'entrer dans le cytoplasme. ⁶⁰

L'utilisation de saponine comme perméabilisant est aussi conseillée par A. Bernard pour le double marquage (marquage de protéines intracellulaires et membranaires). Les cellules ne sont pas trop altérées avec l'emploi de la saponine. ⁶¹

G.J. Mick a aussi utilisé la saponine pour perméabiliser les adipocytes de rats : il a pu ainsi étudier différentes voies métaboliques. ⁶²

M. Wassler, a étudié l'action de la saponine sur les hépatocytes de rats : il démontre que les membranes plasmiques des hépatocytes deviennent perméables lorsque la saponine est ajoutée à une concentration de 0,040 mg par ml (cette concentration permet la sortie de 50 % de la quantité cellulaire totale de lactate

déshydrogénase).⁶³

Pour mes manipulations, j'ai donc perméabilisé les cellules avec la saponine. Je me suis référée à la méthode 6; méthode utilisant la saponine comme perméabilisant.

Les méthodes décrites dans les articles varient aussi en fonction de la concentration en iodure de propidium. Cette concentration finale varie de 4,7 μg par ml (méthode 4) à 120 μg par ml (méthode 2). Le temps d'incubation varie aussi. Certains auteurs disent que l'analyse peut se faire après une minute; d'autres préconisent une attente de 30 minutes au moins.

La RNAase est indispensable pour éviter la fluorescence de l'ARN double brin. Seul un groupe de chercheur ne la pas utilisée : ils disent que la RNAase ne modifie pas la l'histogramme de l'ADN (méthode 7). Les autres auteurs utilisent tous l'enzyme mais de grandes différences entre les articles sont observées. La concentration et le temps d'incubation sont différents à chaque article. Les auteurs des méthodes 2 et 5 utilisent la même RNAase (Sigma R-4875). Les premiers préconisent 0,15 mg d'enzyme dans un volume final de 5 ml (ils laissent incuber 10 minutes à température ambiante). Les seconds utilisent 1 mg d'enzyme dans un volume final de 1 ml (ils laissent incuber 30 minutes à 37° c).

Il n'y a pas de technique générale de référence.

Ces techniques dépendent

- du type cellulaire étudié;
- pour une même localisation, du volume du prélèvement;
- du but recherché (simple ou double marquage impliquant la préservation ou non de l'intégrité de la cellule).

L'"état" de l'appareil (bouchage,...) peut également influencer l'analyse de l'ADN.⁶⁴

Lors de la mise en route d'une technique d'analyse du contenu en ADN, il nous est recommandé de réaliser des études de reproductibilité afin de bien cerner les performances de la technique.⁶⁴

La mesure de la proportion des différentes phases du cycle cellulaire est une mesure relative. L'emploi d'un standard est donc nécessaire.⁶⁵ Les lymphocytes quiescents seront utilisés comme standard externe : ils sont utilisés avant et après chaque échantillon à analyser⁶⁵. Ils peuvent aussi être utilisés comme standard interne : l'échantillon est analysé seul puis, en présence de l'étalon⁶⁴. Ces lymphocytes quiescents ont un contenu en ADN égal à 2 N ou un index DNA de 1. Pour plus de facilité lors de la comparaison de plusieurs histogrammes, nous allons essayer de placer le pic correspondant à la phase G_0 / G_1 des lymphocytes quiescents au niveau du canal 200 [à cet endroit, la linéarité est observée (voir chapitre "résultat - discussion")].

La mesure de la proportion des différentes phases du cycle cellulaire de cellules à analyse sera réalisée après l'analyse des lymphocytes quiescents, sans changer les différents paramètres du cytomètre. La proportion des cellules se trouvant dans les

différentes phases du cycle cellulaire sera calculée en fonction de la proportion des lymphocytes quiescents dans ces différentes phases du cycle.

Mais préalablement, une étude sur les lymphocytes quiescents sera nécessaire : différents paramètres seront analysés afin de connaître les conditions optimales d'étude.

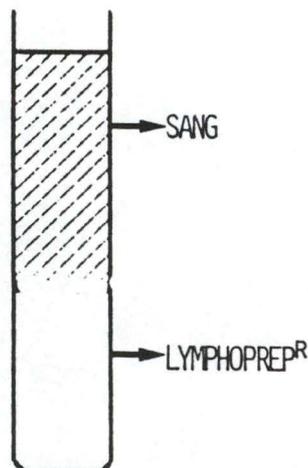
Afin de mieux analyser les effets des différents paramètres, on utilisera une concentration cellulaire constante (10^6 cellules lymphocytaires dans $50 \mu\text{l}$ de tampon phosphate). Pour arriver à cette concentration de lymphocytes, le lymphoprep sera employé.

2.2.3. concentré de cellules mononuclées à partir d'un échantillon sanguin

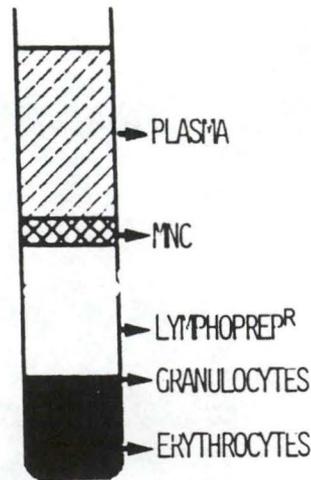
Le lymphoprep^R est une solution stérile, présentant une densité de $1,0077 \pm 0,0001 \text{ g/ml}$. Cette solution sert à séparer les cellules mononuclées à partir du sang, par centrifugation.

méthode :

- Placer dans un tube de 12 ml, 3 ml de Ficoll isopaque : le lymphoprep^R (de Nycomed)
- Ajouter au minimum 3 ml de sang EDTA (déposer délicatement les cellules sur le ficoll)



- centrifuger 15 minutes à 2300 tours/minute
- récupérer avec précaution l'anneau de cellules mononuclées (MNC) à l'aide d'une pipette pasteur.



- transférer les MNC dans un tube de 5 ml
- laver 3 fois les cellules avec du tampon phosphate :
 - * ajouter aux MNC 2 ml de tampon phosphate
 - * centrifuger 3 minutes à 1100 RPM
 - * éliminer le surnageant
- compter les cellules sur un compteur cellulaire
- resuspendre les cellules dans du tampon phosphate de sorte que 10^6 cellules soient contenues dans une solution de $50 \mu\text{l}$
- la suspension cellulaire est visualisée au microscope.

2.2.4. Méthode de marquage des immunoglobulines de surface.

Cette méthode est habituellement utilisée dans le laboratoire de biologie clinique de Auvélais.

- $200 \mu\text{l}$ d'anticorps monoclonaux conjugués ou non conjugués dilués sont ajoutés à une suspension cellulaire contenant 10 millions de cellules
- vortexer
- si marquage direct (anticorps monoclonaux conjugués) :
 - incuber 30 minutes à 4°C
 - laver 1 fois avec du tampon phosphate
 - centrifuger 3 minutes à 1100 RPM
 - éliminer le surnageant
- si marquage indirect (anticorps monoclonaux non conjugués) :
 - incuber 15 minutes à 4°C
 - laver 1 fois avec du tampon phosphate
 - centrifuger 3 minutes à 1100 RPM
 - éliminer le surnageant
 - ajouter $10 \mu\text{l}$ de FITC et $200 \mu\text{l}$ de tampon phosphate
 - vortexer

RESULTAT ET DISCUSSION

Lors de l'analyse de l'ADN en cytométrie de flux par simple marquage (marquage de l'ADN), puis par double marquage (marquage de l'ADN et de protéines membranaires), nous avons décidé de nous référer à la méthode 6 utilisant la saponine comme perméabilisant. Mais, rapidement, quatre problèmes majeurs se sont présentés :

- 1° / Sur le cytogramme, après perméabilisation à la saponine, une superposition des populations de monocytes et de lymphocytes est observée.
- 2° / Le coefficient de variation est élevé.
- 3° / Lors du double marquage, les pics de fluorescence verte (analyse des marqueurs membranaires) positif et négatif se rapprochent. Le pourcentage de fluorescence verte positive est plus difficile voire impossible à mesurer.
- 4° / Le pourcentage de cellules se trouvant dans les différentes phases du cycle cellulaire n'est pas toujours représentatif de la réalité.

Nous avons essayé de résoudre ces problèmes et ainsi d'améliorer l'analyse de l'ADN en simple et en double marquage. Pour cela, nous avons analysé différents paramètres propres à la méthode ou propres à l'appareil.

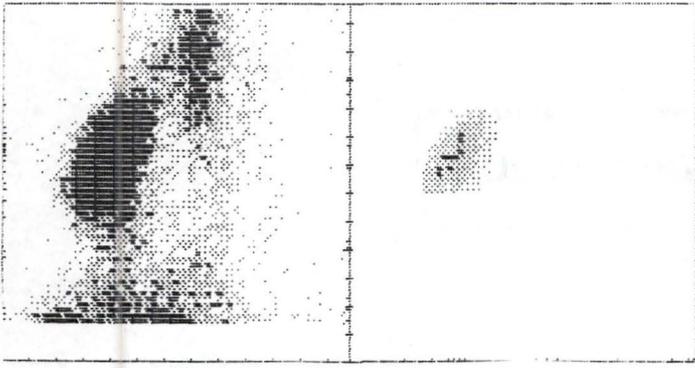


Figure 12 : les cellules sont en suspension dans du PBS et n'ont pas été perméabilisées avec de la saponine; les deux populations monocytes et lymphocytes sont bien séparées

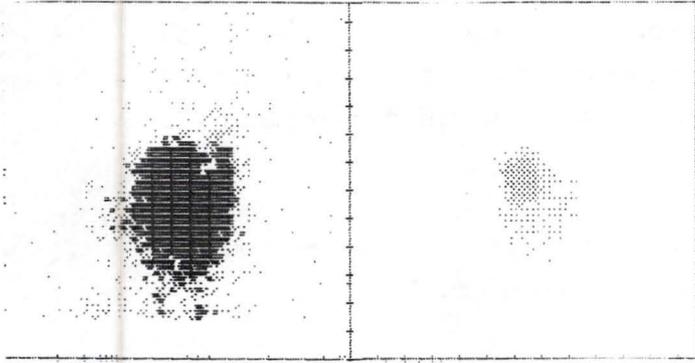
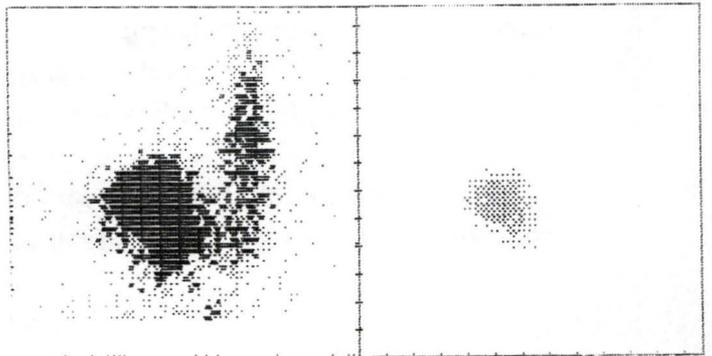


Figure 13 : les cellules sont perméabilisées avec du PBS; la séparation des deux populations, monocytes et lymphocytes est beaucoup moins nette

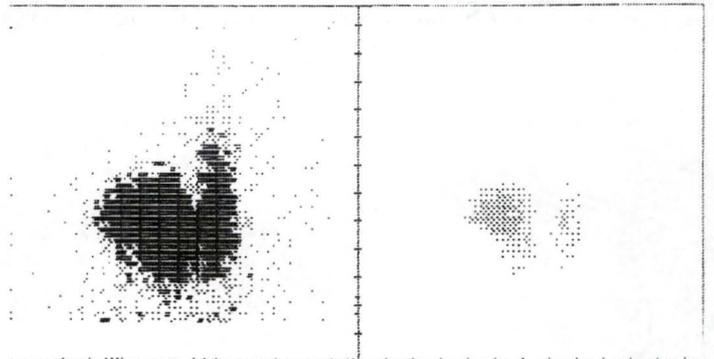
Figure 14 : après l'addition de la saponine, la population de monocytes se déplace et vient se superposer à la population de lymphocytes

- a) après 1 minute*
- b) après 2 minutes*
- c) après 3 minutes*

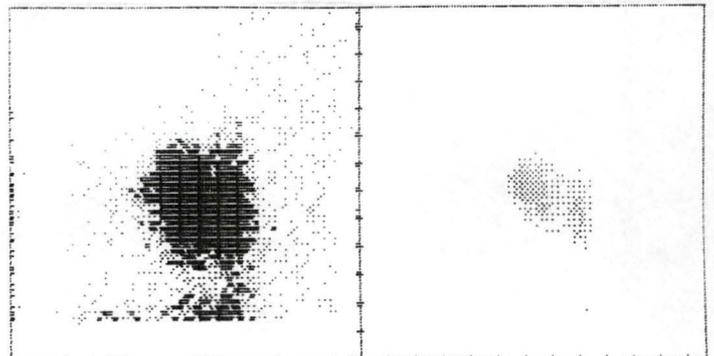
a)



b)



c)



3.1. Premier problème : superposition des deux populations monocytes et lymphocytes

3.1.1. Analyse du problème

Après perméabilisation des cellules mononuclées, l'intensité des rayons FLS et RLS diffractés par les monocytes devient identique à celle des rayons diffractés par les lymphocytes. Sur le cytogramme FLS - RLS ("taille - contenu cellulaire"), cela se traduit par une superposition des deux populations, monocytes et lymphocytes; et il devient impossible, dès lors, de séparer correctement les lymphocytes des monocytes. (*figure 12 et 13*)

Si, immédiatement après addition de la saponine, de l'iodure de propidium et de la RNAase, les cellules sont analysées au cytomètre de flux, nous observons une évolution : l'intensité de la lumière diffractée par les monocytes ne reste pas constante au cours du temps. Au début, les lymphocytes et les monocytes diffractent des rayons d'amplitudes différentes mais, quelques minutes plus tard, les rayons diffractés par ces cellules ont pratiquement les mêmes intensités. Sur l'écran, nous observons parfaitement le déplacement de la population de monocytes; la population de lymphocytes reste pratiquement à la même place. (*figure 14*)

Ce déplacement de la population de monocytes est aussi observée par les auteurs de la méthode 6. ⁵⁸

Lors de son mémoire, L. Delestienne avait déjà observé ce phénomène lorsque les cellules étaient traitées à l'éthanol / acide acétique et au formaldéhyde / acétone. ⁵³

Une hypothèse a été émise pour expliquer ce phénomène :

En présence de saponine, les membranes cellulaires sont fragilisées et deviennent plus perméables; le liquide intracellulaire pourrait sortir plus facilement de la cellule. Les cellules se rétractent; la taille n'est plus reconnue comme telle. Les constituants cellulaires pourraient peut-être être aussi modifiés par une attaque intracellulaire de la saponine.

Cette modification de la taille et du contenu cellulaire pourrait être à l'origine de la modification des intensités des rayons RLS et FLS diffractés par les monocytes. Seuls les monocytes se déplacent car la modification de leur taille et de leur contenu cellulaire est plus frappante : les monocytes ont une taille plus élevée, un cytoplasme plus étendu et plus de granulations que les lymphocytes.

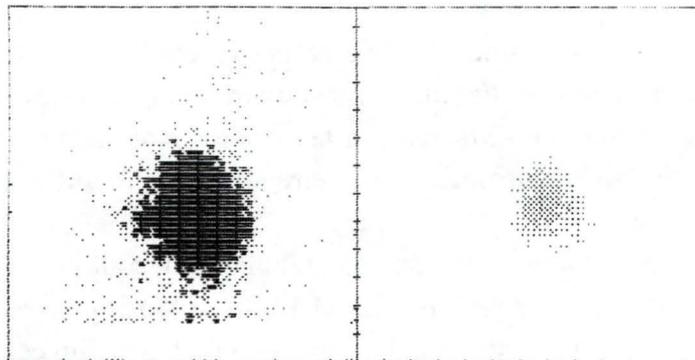


Figure 15 : après 3 minutes d'incubation en présence de saponine, les cellules sont lavées; les deux populations monocytes et lymphocytes sont superposées

Les cellules traitées à la saponine et colorées au May Grunwald / giemsa ont été observées au microscope. Une altération de la membrane est observée. Cette membrane est toujours présente mais elle est fragilisée. Les cellules traitées résistent moins à des actions mécaniques comme le buffy coat.

M.Wassler avait aussi observé une modification des constituants intracellulaires due à l'action de la saponine : si 1 ml de solution contenant 0,5 mg de saponine est ajoutée à une suspension cellulaire de 10^6 cellules et laissé pendant 30 minutes, la membrane interne des mitochondries est attaquée.⁶³

Cette superposition de populations observée sur le cytogramme doit impérativement être éliminée car pour que l'analyse (ploïdie et calcul du pourcentage de lymphocytes dans les différentes phases du cycle cellulaire) soit précise, nous devons avoir une population de lymphocytes la plus pure possible, sans interférence des monocytes.

Trois expériences ont été réalisées pour essayer d'éviter le déplacement de la population de monocytes.

3.1.2. Résolution du problème

a. Expériences :

1° / Nous avons comparé plusieurs solutions de suspension : PBS, RPMI, Tris HCl. Les résultats restent identiques : le déplacement de la population des monocytes est toujours observé; cette population vient se superposer à la population de lymphocytes.

2° / Nous avons pris différentes concentrations en saponine (0,5 ml de ces solutions est ajoutée à une suspension cellulaire de 10^6 cellules)

- 10 mg de saponine dans 10 ml de PBS
- 20 mg de saponine dans 10 ml de PBS
- 2 mg de saponine dans 10 ml de PBS

Ces concentrations sont celles analysées par les auteurs de la méthode 6.⁵⁸

Le déplacement est toujours observé quelle que soit la concentration utilisée.

3° / Après traitement des cellules à la saponine (concentration : 10 mg dans 10 ml de PBS), nous les avons lavées avec du tampon phosphate (PBS).

Si, après 3 minutes d'incubation des cellules en présence de saponine, nous lavons les cellules, lors de l'analyse en cytométrie de flux, la superposition des deux populations est toujours observée (*figure 15*). Le même résultat est observé

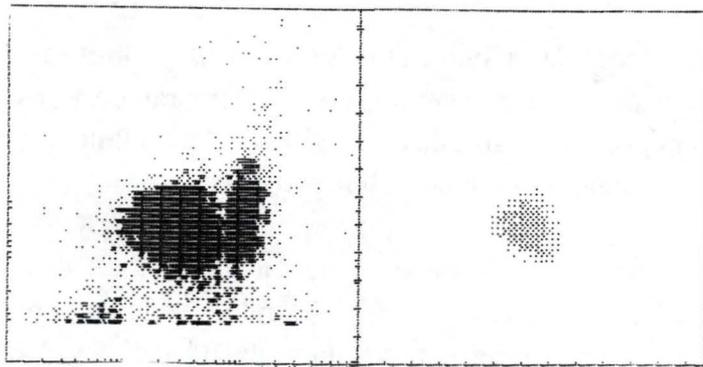


Figure 16 : après une minute d'incubation en présence de saponine, les cellules sont lavées; les deux populations monocytes et lymphocytes ne sont plus superposées

pour un temps d'incubation de deux minutes. Par contre, lorsque le temps d'incubation en présence de saponine est de l'ordre de la minute, après lavage avec du PBS, la population de monocytes ne s'accroche plus à la population de lymphocytes. Sur l'histogramme, la population de monocytes se retrouve à droite de la population de lymphocytes. (*figure 16*)

Le lavage des cellules n'est pas effectué par les auteurs de la méthode 6.

b. Discussion

L'emploi de différentes concentrations n'améliore pas le résultat. Le déplacement est toujours observé. La saponine même avec de faibles concentrations agit suffisamment pour que la population de monocytes se déplace et se superpose à la population de lymphocytes. Les auteurs de la méthode 6 avaient déjà trouvé que la diminution des intensités des rayons FLS et RLS se produisait pour toutes les concentrations analysées. Ils ont par la suite choisi une concentration égale à 10 mg dans 10 ml de PBS, concentration que nous utiliserons aussi.⁵⁸

Le lavage des cellules, arrête le déplacement de la population de monocytes pour autant que l'incubation ne dépasse pas la minute.

Sur l'histogramme, après trois minutes d'incubation, la population de monocytes est superposée à la population de lymphocytes. La saponine a eu le temps de fragiliser la membrane cellulaire; la fuite cellulaire est encore réalisée et l'intensité des rayons FLS des monocytes est modifiée. La saponine a aussi eu le temps de modifier le contenu cellulaire; l'intensité des rayons RLS est modifiée.

Par contre, après une minute, la saponine a toujours le temps de fragiliser la membrane cellulaire (d'où modification de l'intensité des rayons FLS), mais n'a pas pu modifier suffisamment le contenu cellulaire; la modification de l'intensité du rayon RLS est moins forte. La population de monocytes ne se superpose plus à la population de lymphocytes.

Après une minute d'incubation, la saponine a pu perméabiliser suffisamment les cellules et l'introduction de l'iodure de propidium et de la RNAase est toujours réalisée après le lavage (ce fait sera confirmé plus loin), mais la saponine n'a pas agi assez longtemps pour altérer la morphologie cellulaire. Le lavage des cellules après une minute d'incubation en présence de saponine est indispensable pour individualiser les deux populations (lymphocytes et monocytes). Ce lavage sera toujours réalisé lors des autres analyses.

L'emploi de solutions de suspensions différentes, par contre, n'améliore pas le résultat. Le PBS sera donc dorénavant toujours utilisé.

Donc, ajouter 500 μ l de saponine (saponine concentrée à 0,1%, concentration utilisée par les auteurs de l'article de référence) à 50 μ l de suspension cellulaire

(10^6 cellules). laisser incuber 1 minute à température ambiante puis laver avec du tampon phosphate.

3.1.3. Conclusion

Le premier problème est donc résolu : le lavage des cellules après une minute d'incubation en présence de saponine diminue le temps d'action de la saponine et évite la superposition des populations lymphocytes et monocytes.

3.2. Deuxième problème : coefficient de variation élevé

3.2.1. Analyse du problème

Avoir un petit coefficient de variation est essentiel. Le pic G_0 / G_1 doit être le plus fin possible, ceci pour deux raisons :

- Si le pic G_0 / G_1 est large, un pic aneuploïde proche du pic G_0 / G_1 ne pourra pas être individualisé; il sera annexé au pic G_0 / G_1 .²⁴
- Plus le pic G_0 / G_1 est fin, plus l'analyse sera précise. Lorsque le pic est large, l'emploi de logiciels et de formules mathématiques plus compliquées est nécessaire pour "estimer" les proportions des cellules se trouvant dans les différentes phases.¹⁰

Lors de l'analyse de l'ADN des lymphocytes "normaux", nous obtenions souvent des résultats dont les CV des pics G_0 / G_1 étaient élevés (souvent des CV supérieurs à 5). Or, normalement, des CV de l'ordre de 1 à 2 % peuvent être atteints pour des lymphocytes "normaux".

3.2.2. Résolution du problème

Afin de mieux comparer les résultats, nous avons, dès le départ, calibré la suspension cellulaire : 10^6 cellules traitées à la saponine pendant une minute puis lavées, sont resuspendues dans 550 μ l de PBS auquel est rajouté un volume constant d'iodure de propidium (25 μ l) et de RNAase (50 μ l).

L'analyse sera réalisée sur 10000 cellules.

Pour chaque comparaison, un seul paramètre varie.

Le problème sera d'abord analysé sur des cellules simplement marquées à l'iodure de propidium (simple marquage). Lorsque le CV des pics G_0 / G_1 aura pu être diminué, les cellules seront marquées à l'iodure de propidium et à un marqueur membranaire (double marquage).

a. Les cellules sont marquées uniquement à l'iodure de propidium

Lors de l'analyse de l'ADN, pour éviter un CV trop élevé, plusieurs précautions doivent être prises :

1° / Quatres précautions doivent être prises

• 1^{ière} précaution :

Le rayon laser doit être correctement centré par rapport flux de liquide. Un alignement précis du système optique est nécessaire : un mauvais alignement entraîne un coefficient de variation élevé.

Une fois aligné, le système optique ne bouge presque pas. Toute fois, un contrôle est nécessaire pour vérifier le bon alignement du laser.

Le contrôle de l'alignement consiste 1° / à mesurer les intensités du rayon FLS et du rayon de fluorescence verte ou rouge diffracté et diffusé par une suspension de particules standard, de même taille et fluorescentes et 2° / à déterminer le coefficient de variation de chacune de ces mesures. Un mauvais alignement est observé lorsque les pourcentage de coefficient de variation obtenu excède la valeur indiquée.^{55 31}
Ce contrôle est réalisé toutes les semaines par les membres du laboratoire.

• 2^{ième} précaution :

Il faut laisser écouler les cellules à travers le circuit pendant 5 minutes au moins. L'explication a été donnée par Vindelov. Le liquide de sheath utilisé est une solution saline. La liaison de l'iodure de propidium est réduite car la force ionique de la solution saline est élevée. Il faut attendre 5 minutes (temps de lecture) jusqu'à vidange complete des tubages de cette solution saline et stabilisation de la fluorescence.⁵⁷

* Expérience

Une expérience confirmant ces hypothèses est réalisée :

Une comparaison est réalisée entre 2 méthodes; seul varie le temps d'écoulement des cellules dans le cytomètre. Le temps d'incubation des cellules en présence d'iodure de propidium et de RNAase est le même, il est de 5 minutes (correspondant aux 4 minutes d'incubation et à la minute de passage pour la 1^{ière} méthode et aux 5 minutes de passage pour la méthode 2)

Donc, après lavage des cellules traitées à la saponine, l'iodure de propidium (25 μ l à une concentration de 10 mg pour 10 ml) et la RNAase (50 μ l à une concentration de 10 mg pour 1 ml) sont ajoutés. Après le temps d'incubation décrit, les cellules sont analysées au cytomètre.

Les coefficients de variation sont, lors de mes analyses, toujours exprimés en pourcentage.

Mesure du coefficient de variation en fonction du temps de passage.

échantillon sanguin n°	4 min. d'incubation 1 min. de passage	5 min. de passage	différence
1	6,11	4,02	2,09
2	6,38	4,54	1,84
3	5,72	3,85	1,87

Le nombre d'échantillons sanguins analysé est faible, mais déjà, nous voyons une nette différence entre les deux méthodes : les CV sont plus élevés lorsque le temps d'écoulement des cellules à travers le circuit n'est que d'une minute.

Une analyse statistique est réalisée : une comparaison des deux moyennes (observation pairée) sera employée. Elle est détaillée en annexe (1° /) : le temps de passage des cellules à travers les circuits du cytomètre a une influence sur le coefficient de variation. Avec un temps de passage de 5 minutes, la largeur du pic est diminuée.

* Discussion

Malgré le peu d'échantillons comparés, nous avons la quasi certitude (probabilité de se tromper < à 0,001) de l'influence du temps d'écoulement des cellules dans les circuits du cytomètre.

Donc, lors de l'analyse de l'ADN en cytométrie de flux en utilisant l'iodure de propidium comme marqueur fluorescent, un passage préliminaire des cellules pendant 5 minutes à travers le cytomètre est nécessaire. Après ce délai l'analyse peut être effectuée.

Une autre solution serait d'utiliser une solution isotonique comme liquide de sheath. Cette solution a aussi été évoquée par Vindelov.

• 3^{ième} précaution

Le circuit amenant les cellules vers le laser (aiguilles, "tubing") doit être propre. En effet, une contamination (due à une fluorescence parasite ?) se forme peu à peu avec le temps. Les CV deviennent alors de plus en plus élevés.

* Expériences

Plusieurs expériences nous ont amenés à cette conclusion :

1° / Comparons les premières mesures réalisées chaque jour. La procédure utilisée est la même; seuls, les échantillons sanguins analysés proviennent de personnes différentes. Les échantillons ont été analysés au cytomètre de flux après 10 minutes exactement.

Mesure du coefficient de variation en fonction du jour.

[] d'IP utilisée	date	CV
10 mg / 10 ml de PBS	28 octobre	4,33
	2 novembre	6,20
	3 novembre	6,27
	5 novembre	7,68
	9 novembre	16,06
50 mg / 10 ml de PBS	16 novembre	5,13
	18 novembre	8,07
	19 novembre	21,82

Au début, nous prenions une concentration en iodure de propidium égale à 10 mg pour 10 ml de PBS. Comme les résultats du 9 novembre étaient trop élevés, nous avons augmenté la concentration en iodure de propidium. Le CV a diminué mais les jours suivants, il a réaugmenté.

L'évolution du coefficient de variation est donc bien marquée. Cette variation n'est pas due à la méthode mais on pourrait penser qu'elle est due aux échantillons (variation résiduelle).

2° / Une autre expérience a été réalisée le 17 novembre. Lors de cette expérience, nous voulions analyser l'effet de la concentration en iodure de propidium sur le CV.

Quatre concentrations différentes ont été employées.

- [] = A : 10 mg d'iodure de propidium dans 10 ml de PBS
- [] = 2 A : 20 mg d'iodure de propidium dans 10 ml de PBS
- [] = 3 A : 30 mg d'iodure de propidium dans 10 ml de PBS
- [] = 5 A : 50 mg d'iodure de propidium dans 50 ml de PBS

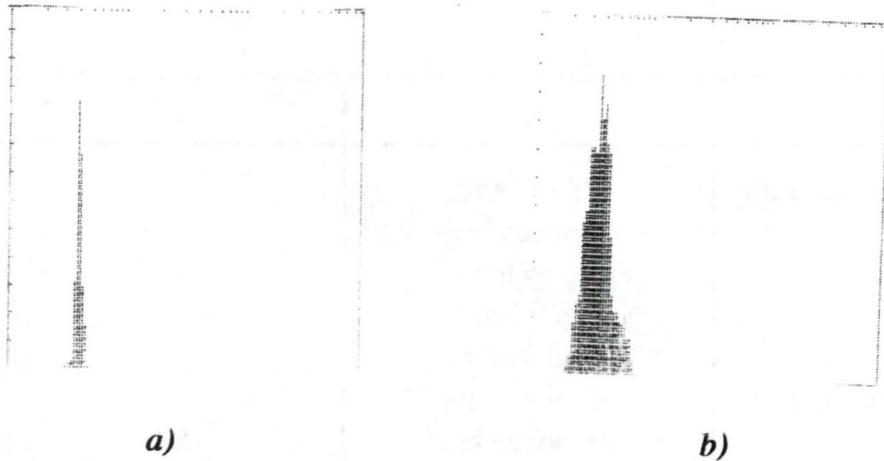


Figure 17 : influence de l'état du tubing :
a) échantillon analysé sur le nouveau tubing : $CV = 4,54$
b) échantillon analysé sur l'ancien tubing : $CV = 19,06$

Un même échantillon sanguin a été analysé en utilisant ces différentes concentrations (première série d'analyse). Lorsque cet échantillon a été passé quatre fois avec les différentes concentrations, nous avons recommencé l'expérience avec le même échantillon, la même méthode et les mêmes concentrations en iodure de propidium. Après cette deuxième série d'analyses, une troisième a été réalisée (toujours avec le même échantillon). En voici les résultats :

	[] = A	[] = 5 A	[] = 3 A	[] = 2 A
1 ^{ère} série d'analyses	17,69	4,45	5,59	7,19
2 ^{ème} série d'analyses	12,20	4,10	5,06	7,08
3 ^{ème} série d'analyses	9,59	3,98	4,62	4,91

Pour un même échantillon passé plusieurs fois au cytomètre afin d'être analysé, si les paramètres utilisés sont les mêmes, avec un ancien tubing, les CV sont différents; ils diminuent avec le nombre de passages (les CV diminuent beaucoup plus lorsque les concentrations sont égales à A et 2A).

Une analyse statistique ne peut être réalisée. C'est une analyse de la variance à deux critères de classification : la classification est croisée, les paramètres (concentrations et séries) sont fixes et une seule analyse est réalisée pour chaque combinaison possible.

3° / Une troisième comparaison a été réalisée le 25 novembre. Un même échantillon a été analysé deux fois le même jour, dans des conditions identiques, seul le "tubing" diffère.

ancien tubing	nouveau tubing
CV = 19,06	CV = 4,54

Même si une analyse statistique ne peut être réalisée (un seul échantillon ayant été comparé), la différence entre le CV obtenu avec un ancien et un nouveau "tubing" est grande et l'influence de l'état du circuit peut être facilement supposée (figure 17).

* discussion

Trois faits sont observés :

- Le coefficient de variation augmente en fonction du temps (journallement)
- Un échantillon passé plusieurs fois au cytomètre de flux le même jour voit son CV diminuer.
- Un même échantillon passé dans un ancien tubing a un CV beaucoup plus élevé que lorsqu'il est passé dans le nouveau tubing.

Par ces différentes expériences, nous pouvons constater l'influence de l'état du circuit amenant les cellules vers le laser.

La cause de l'élargissement du pic en fonction de l'ancienneté du circuit n'a pu être trouvée. Nous pensons qu'une contamination par une fluorescence en était la raison principale.

Quatre marqueurs fluorescents sont utilisés pour une analyse en cytométrie de flux :

- marqueurs FITC
- phycoérythrine
- thioflavine B (pour le marquage des réticulocytes)
- iodure de propidium

Il est difficilement imaginable de penser que le marqueur FITC puisse avoir un effet négatif sur la fluorescence rouge de l'iodure de propidium. Au contraire, la fluorescence de l'iodure de propidium peut masquer la fluorescence verte du FITC. ³⁸

Serait - ce dû aux autres fluorescences ?

Cette hypothèse n'a jamais été décrite dans des articles ou livres scientifiques.

Quoi qu'il en soit, il devient impossible de comparer des échantillons analysés au cytomètre ayant un "tubing" ancien. Malheureusement, cette constatation a été découverte tard lors de la réalisation de mon mémoire (25 novembre). Par conséquent, beaucoup d'analyses réalisées ne peuvent être considérées comme valables et faute de temps, le nombre d'échantillons analysés pour chaque comparaison sera faible.

Par la suite, toutes les expériences ont été réalisées à l'aide du "tubing" propre. Les CV obtenus n'ont pas été supérieurs à 5. Mais c'est déjà trop élevé; des modifications doivent encore être effectuées

Nous n'avons pas changé l'entièreté du circuit; seul le tubing a été remplacé.

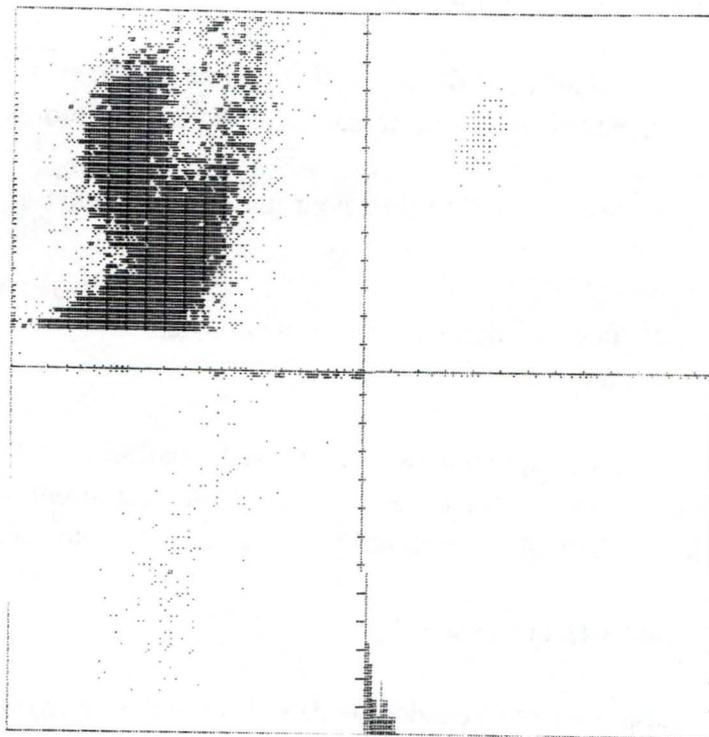


Figure 18 : influence de la perméabilisation : les cellules ne sont pas perméabilisées par la saponine; la fluorescence rouge est très faible (elle se retrouve fort à gauche)

Si nous avons changé tout le circuit, le CV aurait peut-être pu être meilleur.

• 4^{ème} précaution

La vitesse de passage des cellules à travers le circuit doit être constante et faible (100 à 200 cellules par seconde) afin d'éviter une augmentation des agrégats et du CV. ^{24 64}

Malheureusement, les expériences pouvant confirmer cela n'ont pas été réalisées avec un "tubing" propre et ne peuvent être considérées comme valables.

Lorsque ces quatre précautions sont prises, nous pouvons analyser l'influence des plusieurs paramètres propres à la méthode ou au cytomètre.

2° / Analyse de l'influence de différents paramètres

• Influence de la perméabilisation

La perméabilisation est importante pour permettre l'entrée de l'iodure de propidium et de la RNAase dans la cellule. Si nous ne mettons pas la saponine, peu de marqueurs fluorescents rentreront dans la cellule et l'intensité de fluorescence sera insignifiante (*figure 18*).

• Influence de la concentration en iodure de propidium

Nous voulions déjà analyser l'influence de la concentration en iodure de propidium le 17 novembre. Elle n'est pas correcte car elle est influencée par un autre facteur.

Une autre expérience a été réalisée par la suite :

* Expérience

Trois concentrations ont été choisies :

- $|| = A$: 10 mg d'iodure de propidium dans 10 ml de PBS
- $|| = A / 10$: 1 mg d'iodure de propidium dans 10 ml de PBS
- $|| = 5 A$: 50 mg d'iodure de propidium dans 10 ml de PBS

Les analyses sont effectuées après 5 minutes de passage des cellules à travers les circuits du cytomètre.

Mesure du coefficient de variation en fonction de la concentration en iodure de propidium.

échantillon sanguin n°	$ = A / 10$	$ = A$	$ = 5 A$
1	7,6	4,06	3,71
2	8,66	4,44	4,03

Une influence des concentrations est nettement observée.

Une analyse statistique peut être effectuée : c'est une analyse de la variance à deux critères de classification (ANNOVA 2); la classification est croisée et mixte (concentration : paramètre fixe; échantillon : paramètre aléatoire) avec une seule analyse pour chaque combinaison possible. Cette analyse est détaillé en annexe (2° /) et confirme l'hypothèse : la concentration a une influence sur la largeur du pic (probabilité de se tromper est inférieure à 0,01)

* discussion

Il y a donc bien influence de la concentration en iodure de propidium. Une concentration en iodure de propidium de $A / 10$ (dans un volume de $25 \mu\text{l}$) n'est pas suffisante; tous les sites de fixation n'étant pas saturés, le coefficient de variation est élevé.

Une concentration égale à 10 mg d'iodure de propidium dans 10 ml de PBS semble être suffisante; si les cellules sont colorées avec 5 fois plus d'iodure de propidium, le coefficient de variation ne diminue pas beaucoup plus.

Donc, $25 \mu\text{l}$ d'iodure de propidium dont la concentration est de 10 mg pour 10 ml de PBS sera utilisé pour marquer l'ADN. Nous pouvons aussi prendre une concentration 5 fois supérieure mais alors, lors du double marquage, la fluorescence de l'iodure de propidium risque de masquer la fluorescence vert du FITC.

• influence de l'incubation

Le temps d'incubation de l'iodure de propidium et de la RNAase varie beaucoup d'un article à l'autre (voir chapitre "matériel et méthodes"); par conséquent, nous allons essayer de voir son influence.

Si l'iodure de propidium n'a pas eu le temps de s'intercaler aux brins d'ADN, les sites de fixation ne seront pas saturés en fluorochromes et le CV risque d'être élevé.

Si la RNAase n'a pas eu le temps d'agir, l'iodure de propidium risque de se fixer également sur les brins d'ARN et de fausser les interprétations (le CV sera là aussi plus élevé).

L'incubation se fait hors du cytomètre, à l'obscurité. Lorsque le temps d'incubation sera écoulé, les cellules sont analysées après 5 minutes de passage afin d'éliminer le liquide de sheath.

* 2 expériences seront réalisées

1^{ère} expérience : influence du temps d'incubation

2 possibilités seront analysées :

- les cellules passeront directement au cytomètre et seront analysées après 5 minutes de passage;
- les cellules seront incubées pendant 25 minutes à température ambiante en présence d'iodure de propidium et de RNAase.

Mesure du coefficient de variation en fonction du temps d'incubation.

échantillon sanguin n°	25 min. d'incubation		différence
	5 min. de passage	5 min. de passage	
1	4,02	3,79	0,23
2	3,13	3,49	- 0,36
3	4,54	4,54	0,00
4	3,63	3,88	- 0,25
5	3,64	3,82	- 0,18
6	3,69	3,47	0,22
7	3,54	3,15	0,39
8	4,08	4,18	- 0,10

Apparemment nous ne voyons pas d'influence de l'incubation. Une analyse statistique sera effectuée. C'est une comparaison de deux moyennes (observation pairée). Cette analyse sera décrite en annexe (3°/). D'après l'analyse statistique, nous ne pouvons pas dire s'il y a une influence du temps d'incubation.

2^{ème} expérience : effet de la température

Trois possibilités seront analysées :

- incubation à température ambiante pendant 25 minutes
- incubation à 37° c pendant 25 minutes
- incubation dans la glace pendant 25 minutes

Mesure du coefficient de variation en fonction de la température d'incubation.

échantillon sanguin n°	à 37° c	à t° ambiante	dans la glace
1	3,25	3,47	3,39
2	4,07	4,18	4,27

Peu d'échantillons ont été analysés et apparemment, il n'y a pas d'influence de la température.

Une analyse statistique peut être effectuée : c'est une analyse à deux critères de classification (ANNOVA 2); la classification est croisée et mixte (paramètre fixe : température; paramètre aléatoire : échantillon sanguin) et il n'y a qu'une seule analyse pour chaque combinaison possible. Cette analyse est détaillée en annexe (4°/). Avec cette analyse, nous ne pouvons pas savoir s'il y a une influence de la température.

* Discussion

Avec ces deux expériences, nous ne pouvons pas dire s'il y a une influence ou non de l'incubation.

Le nombre d'échantillon analysés est beaucoup trop petit pour pouvoir en tirer une bonne conclusion. Un nombre plus grand devrait être analysé. D'autre part, les coefficients de variation sont élevés et l'effet de l'incubation n'est peut-être pas visible. Avec un CV plus faible, l'analyse devient plus fine et l'effet de l'incubation pourrait mieux se voir. L'analyse de l'effet de l'incubation devrait être étudiée à ce moment - là.

Si le coefficient de variation ne diminue toujours pas lorsque les échantillons sont incubés pendant 25 minutes, une autre analyse pourrait être effectuée : voir si l'addition de RNAase a un effet sur la diminution du coefficient de variation. Une comparaison pourrait être réalisée. Dans un premier cas, nous incubons les cellules en présence de la RNAase et de l'iodure de propidium. Dans le deuxième cas, nous ne mettons que de l'iodure de propidium. Si le coefficient de variation ne diminue toujours pas après addition de la RNAase, alors, soit l'action de l'ARNase ne diminue pas le coefficient de variation, soit l'ARNase ne rentre pas dans la cellule (mais rappelons que 50 % du contenu total cellulaire en lactate déshydrogénase peut sortir de la cellule lorsque 1 ml contenant 0,040 mg de saponine est ajoutée à 10^6 cellules et laissé pendant 30 minutes.⁶³ Or, nous mettons 0,5 ml contenant 0,5 mg de saponine à une suspension cellulaire de 10^6 cellules et la RNAase a un poids moléculaire 10 fois plus petit que la lactate déshydrogénase).

Une méthode de coloration pourrait toutefois être utilisée pour vérifier la perméabilité des membranes à la RNAase. C'est la méthode de Brachet qui colore l'ADN en vert et l'ARN en rouge. Cette coloration rouge disparaît après traitement de l'ARN par la ribonucléase. Cette méthode a été déjà utilisée afin d'étudier la perméabilité des cellules vivantes à la ribonucléase.⁶⁶

Lors des expériences suivantes, après addition de l'iodure de propidium ($25 \mu\text{l}$ à une concentration de 10 mg dans 10 ml de PBS) et de RNAase ($50 \mu\text{l}$ à une concentration de 10 mg dans 1 ml de PBS), les cellules mononuclées passent directement au cytomètre de flux et sont analysées après 5 minutes de passage.

• Influence du lavage sur le coefficient de variation

Nous avons vu que le lavage est nécessaire pour pouvoir bien séparer les lymphocytes des monocytes. Mais, après le lavage, les cellules doivent être encore perméables à l'iodure de propidium (et à la RNAase ?)

Si les cellules deviennent moins perméables à l'iodure de propidium et à la RNAase, les sites de fixation ne seront plus saturés en fluorochromes, et le coefficient de variation sera plus élevé.

Nous allons donc regarder l'effet du lavage sur le coefficient de variation.

* Expérience

Les cellules sont traitées de 2 façons différentes

- 500 μ l de saponine, 25 μ l d'iodure de propidium et 50 μ l de RNAase sont ajoutés à 50 μ l de suspension cellulaire.
- 500 μ l de saponine est ajoutée à une suspension cellulaire, après une minute d'incubation, les cellules sont lavées, centrifugées et resuspendues à 550 μ l de PBS auquel est ajouté 25 μ l d'iodure de propidium et 50 μ l de RNAase.

Mesure du coefficient de variation en fonction du lavage.

pas de lavage	lavage	différence
4,02	3,36	0,66
3,65	3,43	0,22
3,61	3,86	- 0,25
3,59	3,20	0,39
3,54	3,72	- 0,18

A première vue, nous ne voyons pas de différence des CV en fonction du traitement utilisé. Il semble que le lavage n'affecte pas le CV.

Une analyse statistique est effectuée ; c'est une comparaison de deux moyennes (observation pairée). cette analyse est décrite dans l'annexe (5°/). D'après cette analyse, nous ne pouvons pas dire s'il y a une influence du lavage.

* Discussion

Apparemment, le lavage n'augmente pas le CV. Les cellules sont donc toujours perméables à l'iodure de propidium (et peut - être à la RNAase ?). C'est une excellente chose, les cellules peuvent être lavées après une minute d'incubation des cellules en présence de saponine.

Une étude plus approfondie sur un nombre plus important d'échantillons pourrait là aussi être effectuée.

• Influence de la puissance du laser

Lorsque l'intensité du rayon incident augmente, la probabilité de frappe des photons sur les molécules fluorescentes est augmentée et la fluorescence émise s'accroît aussi. Lorsque le nombre de molécules excitées correspond au nombre de molécules incorporées à l'ADN, nous arrivons à une saturation et l'intensité augmentée du rayon incident n'augmente plus la fluorescence émise par la cellule. D'autre part, une intensité trop forte peut provoquer un changement de structure des

molécules fluorescentes (ces molécules étant trop souvent excitées). Une diminution de fluorescence pourrait alors être observées (ce phénomène est appelé blenching).⁶⁷

L'intensité étant proportionnelle à la puissance du laser, nous allons voir si une augmentation de la puissance du laser influence la quantité de fluorescence émise et donc le coefficient de variation.

* Expérience

Trois puissances seront utilisées :

- 200 mWatt
- 300 mWatt
- 500 mWatt

Mesure du coefficient de variation en fonction de la puissance du laser.

échantillon sanguin n°	200 mW	300 mW	500 mW
1	3,47	3,16	3,09
2	2,59	2,67	2,56
3	3,14	3,28	3,26

Apparemment nous ne voyons pas de différence des CV en fonction de la puissance du laser.

Une analyse statistique peut être réalisée. C'est une analyse de la variance à deux critères de classification; la classification est croisée et mixte (paramètre fixe : puissance du laser; paramètre aléatoire : échantillon sanguin) et il n'y a qu'une seule analyse effectuée pour chaque combinaison possible (voir annexe 6° /). Nous ne pouvons pas dire s'il y a une influence de la puissance du laser.

* Discussion

Nous n'avons pas pu voir une influence de la puissance du laser sur le CV. Le nombre d'échantillons observés étant faible, une analyse plus large devrait être réalisée.

Lors des prochaines expériences, nous utiliserons une puissance de 500 mWatt, puissance généralement utilisée pour le marquage membranaire.

b. Les cellules subissent un marquage de l'ADN et un marquage des membranes cellulaires (double marquage)

• Influence du produit de lyse et du produit de fixation

Lors d'un marquage membranaire, les cellules sont régulièrement soumises à un produit de lyse érythrocytaire et à une solution de fixation.

La solution de lyse érythrocytaire permet la lyse des globules rouges qui pourraient rester malgré l'utilisation du ficoll et la formation d'un concentré de cellules mononuclées. Lorsque les globules rouges sont détruits, la suspension cellulaire n'est plus contaminée par les érythrocytes.

La solution de fixation est habituellement utilisée lorsqu'un marquage membranaire doit être lu dans un délai plus long, il sert à fixer les cellules.

*** Expérience**

Influence du produit de lyse érythrocytaire

Avant le traitement des cellules à la saponine, la solution de lyse est ajoutée. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, les cellules sont lavées et la saponine est ajoutée.

Deux cas sont comparés :

- la solution de lyse n'est pas ajoutée à la suspension cellulaire et les cellules sont directement traitées à la saponine.
- la solution de lyse est ajoutée à la suspension cellulaire et les cellules sont traitées par la suite à la saponine.

Mesure du coefficient de variation en fonction de la lyse érythrocytaire.

pas de lyse	lyse	différence
3,63	3,39	0,24
3,97	3,61	0,36

Apparemment, nous ne voyons pas de différence lorsque les érythrocytes restants subissent la lyse.

Malgré le peu d'échantillon analysé, une analyse statistique est réalisée; c'est une comparaison de deux moyennes (observation pairée). cette analyse est détaillée en annexe (7° /). D'après cette analyse, nous ne pouvons pas dire si la lyse des érythrocytes a une influence sur le coefficient de variation.

Influence de la lyse des érythrocytes et du produit de fixation

Directement après la lyse des érythrocytes, les cellules peuvent être fixées. Les cellules sont alors incubées pendant une à deux minutes puis lavées avec du tampon phosphate.

deux cas sont comparés :

- Les cellules ne sont pas lysées et ne sont pas fixées; elles sont directement perméabilisées par la saponine.
- Les cellules sont lysées et fixées avant d'être perméabilisées avec de la saponine.

Mesure du coefficient de variation en fonction de la lyse érythrocytaire et de la fixation.

pas de lyse pas de fixation	lyse fixation	différence
3,55	11,78	- 8,23
3,67	8,43	- 4,76
4,60	9,85	- 5,25
3,87	8,49	- 4,62
3,86	10,52	- 6,66

Nous observons une augmentation des CV lorsque les cellules sont soumises à la lyse des érythrocytes et à la fixation des cellules.

Une analyse statistique est réalisée; c'est une comparaison de deux moyennes (observations pairées). En annexe, l'analyse est détaillée (8° /) : la lyse et la fixation ont une influence sur le coefficient de variation; ensemble, elles augmentent la dispersion.

* Discussion

Deux fait sont observés :

- 1° / En ce qui concerne le produit de lyse des érythrocytes, la variation du CV n'est pas assez forte et le nombre d'échantillons analysés est trop faible pour pouvoir dire s'il y a une influence de ce produit. Une analyse avec plus d'échantillons devrait encore être réalisée. Notons aussi que le produit de lyse des érythrocytes n'est pas vraiment nécessaire; la saponine détruit elle-même les érythrocytes. ⁶⁸
- 2° / Par contre l'autre expérience est beaucoup plus significative : en présence du produit de lyse érythrocytaire et du produit de fixation, le CV est fortement augmenté.

Nous ne connaissons pas la composition du liquide de fixation mais, celui - ci contient entre autre du formol. Le formaldéhyde fixe les protéines et ne les dénature presque pas. Il convient parfaitement pour les techniques histochimiques car il laisse de nombreux sites antigéniques. Mais il peut quand même y avoir perte de certains constituants cellulaires comme les acides nucléiques. C'est pour cette raison, qu'après fixation, le pic de la phase G₀ / G₁ devient plus large. ⁶⁹

• Influence du marquage des antigènes membranaires

Un double marquage est essentiel pour l'étude des hémopathies et des lymphocytoses réactionnelles (les cellules à analyser étant mélangées à d'autres cellules sanguines).

Lors d'un double marquage il est aussi essentiel de vérifier si le coefficient de variation n'augmente pas. Les cellules sont traitées de la façon suivante :

- un marquage membranaire est réalisé
- les cellules sont perméabilisées à la saponine
- après une minute d'incubation, elles sont lavées et centrifugées
- elles sont resuspendues dans 650 μ l de PBS et une solution d'iodure de propidium et une solution de RNAase sont ajoutées
- les cellules sont analysées au cytomètre

* Expérience

Un même échantillon sera traité de deux façons différentes :

Les cellules sont :

- soit marquées uniquement avec l'iodure de propidium (simple marquage)
- soit marquées avec un marqueur membranaire dirigé contre les cellules T helper (CD₄), conjugué au FITC et colorées avec l'iodure de propidium (double marquage)

En voici les résultats :

Mesure du coefficient de variation en fonction du simple ou double marquage.

simple marquage	double marquage	différence
3,68	3,87	- 0,19
3,78	4,08	- 0,30
3,60	3,97	- 0,37
3,39	3,60	- 0,21
2,71	2,83	- 0,12
2,63	3,01	- 0,38
2,33	2,82	- 0,49
2,54	2,96	- 0,42

Lors du double marquage, nous voyons le CV augmenter.

Une analyse statistique peut être réalisée : c'est une comparaison de deux moyennes (observations pairées). cette analyse est décrite en annexe (9° /) : le double marquage a une influence sur le coefficient de variation; celui - ci est augmenté lorsque les cellules sont aussi colorées par un marqueur membranaire.

* Discussion

Apparemment, le double marquage aurait une influence sur le coefficient de variation. Le fluorochrome FITC aurait une influence sur le marquage de l'iodure de propidium et augmenterait le coefficient de variation. Cette observation ne corrèle pas avec ce qui a été décrit dans la littérature qui dit qu'au contraire, l'iodure de propidium a une influence sur le FITC, la fluorescence du premier marqueur masquant la fluorescence du deuxième marqueur.

Une autre conclusion, plus vraisemblable pourrait être donnée. Pour le simple marquage, comme pour le double marquage, l'analyse est réalisée pour 10 000 cellules. Pour le simple marquage, sur l'histogramme représentant l'analyse de l'ADN, seuls les lymphocytes seront analysés (donc moins de 10 000 cellules). Pour

le double marquage, sur l'histogramme représentant l'analyse de l'ADN, seuls les lymphocytes qui sont marqués par un marqueur membranaire seront représentés; le nombre de cellules analysées sera donc inférieur au nombre de cellules analysées lors du simple marquage. Or, une dispersion est d'autant plus faible que le nombre d'observation est grand.

Cette conclusion peut être confirmée par d'autres expériences.

* Justification

1° / Pour un même échantillon sanguin, nous pouvons marquer les T Helper (marquage des CD₄) mais nous pouvons aussi marquer les cellules B immatures et matures (marquage des CD₂₀). Les lymphocytes B sont beaucoup moins nombreux que les lymphocytes T; par conséquent, sur 10000 cellules comptées, le nombre de lymphocytes B analysés sera inférieur au nombre de lymphocytes T Helper analysés.

Mesure du coefficient de variation en fonction de la population cellulaire étudiée.

marquage des T Helper	marquage des L _B	différence
3,01	5,70	- 2,69
2,64	4,90	- 2,26
3,22	6,01	- 2,79

Nous observons une différence des coefficients de variation. Le CV du pic G₀ / G₁ est plus élevé lors de l'analyse du contenu en ADN des lymphocytes B. Une analyse statistique peut être réalisée. C'est une comparaison de deux moyennes (observations paires). Cette analyse est décrite en annexe (10° /). Cette analyse montre que le coefficient du pic G₀ / G₁ sera différent pour une population de lymphocytes B et pour une population de lymphocytes T Helper.

2° / Dans les LLC, par contre, nous avons une prolifération des lymphocytes B, sur les 10 000 cellules analysées, le nombre de lymphocytes B sera donc élevé.

Mesure du coefficient de variation du pic G₀ / G₁ de la population de lymphocytes B dans le cas d'une LLC.

marquage des lymphocytes B	
	2,88
	3,38
	3,13
	3,55
	3,37
	3,52
	3,60
	3,70

* Discussion

Lors de la première expérience, le nombre de lymphocytes B est beaucoup plus petit que le nombre de lymphocytes T Helper et nous observons une augmentation du coefficient de variation pour l'analyse de lymphocytes B. Lors de la deuxième expérience, le nombre de lymphocytes B a augmenté et le coefficient de variation, lui, a diminué (par rapport au coefficient de variation obtenu lors de l'analyse de lymphocytes B non proliférants).

Ces deux expériences ne peuvent pas justifier la première hypothèse qui dit que le marqueur FITC a une influence sur le marquage de l'iodure de propidium (Pourquoi le marqueur FITC des B4NC de cellules B non proliférantes agirait - il plus sur le marquage de l'iodure de propidium que le même marqueur FITC des B4NC de cellules B proliférantes ?)

Par contre, ces deux expériences justifient bien la deuxième hypothèse : le coefficient de variation est donc bien influencé par le nombre de cellules à analyser.

Lors du comptage, le cytomètre ne distingue pas les différents types cellulaires. Il n'existe pas de programme permettant le comptage d'un type cellulaire spécifique. Par conséquent, pour analyser le contenu en ADN de 10000 lymphocytes T Helper, par exemple, il faut d'abord connaître le pourcentage de ces lymphocytes et, par une règle de trois, nous connaissons le nombre total de cellules que le cytomètre doit compter.

3.2.3. Conclusion

Le coefficient de variation est donc influencé par :

- un bon alignement du laser
- le temps de passage des cellules à travers le circuit
- la vitesse de passage des cellules au niveau du laser
- l'état du circuit
- la perméabilisation
- la concentration en iodure de propidium
- le produit de fixation
- le nombre de cellules à analyser

Plusieurs autres analyses doivent encore être approfondies car le nombre d'échantillons analysés n'est pas suffisamment grand pour pouvoir tirer une conclusion correcte :

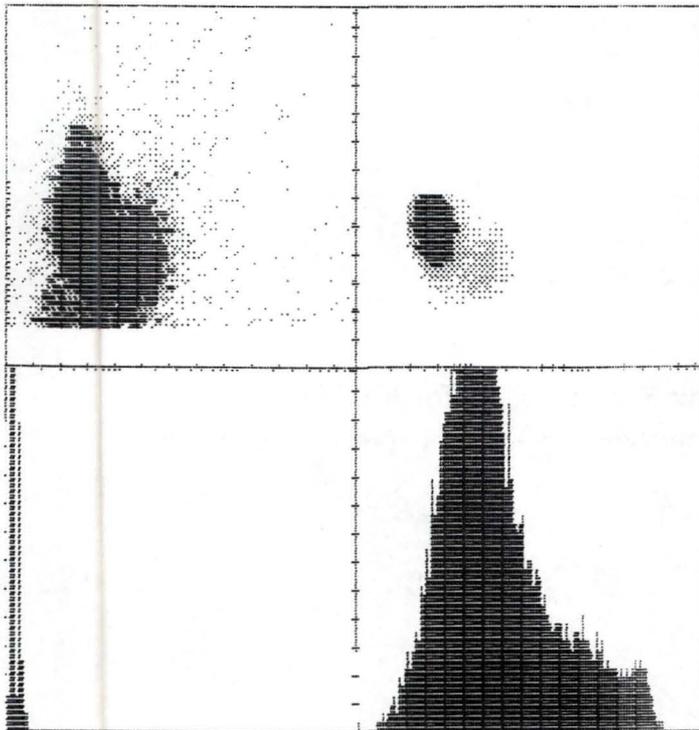
- influence du lavage
- influence de l'incubation
- influence de la puissance du laser

Malgré toutes ces analyses effectuées, le coefficient de variation est encore élevé (il fluctue entre 3 et 4 %). Des analyses supplémentaires doivent encore être réalisées pour observer l'influence d'autres facteurs :

- le circuit devrait - il être entièrement changé ?
- l'alignement du laser pourrait peut-être être vérifié chaque jour avant l'analyse des échantillons comme le conseille le manuel d'utilisation du cytomètre
- D'autres fixateurs qui perméabilisent la membrane pourraient être employés (l'éthanol par exemple). Il est fréquemment utilisé lors du marquage de l'ADN. Il a déjà la propriété de dissoudre l'ARN (c'est peut-être pour cette raison que les auteurs de la méthode 8 n'utilisent pas de RNAase; ils ne voient de modification de l'histogramme avec l'addition de la RNAase). Mais la majorité des scientifiques utilisant l'éthanol comme agent perméabilisant ajoutent de la RNAase.

Si la RNAase ne peut entrer après traitement à la saponine, il faudrait envisager ces autres agents perméabilisants.

Il existe un nouveau perméabilisant : PermeaFix (commercialisé par ORTHO), réactif qui peut fixer et perméabiliser les cellules en suspension. Ce produit permet la détection de molécules intracellulaires tout en préservant l'immunoréactivité membranaire, la structure et la morphologie cellulaire. Les intensités des rayons RLS et FLS diffractés par les cellules restent identiques et les marqueurs sont toujours détectés par les anticorps monoclonaux. Une étude de l'analyse de l'ADN en employant ce perméabilisant serait aussi intéressante.



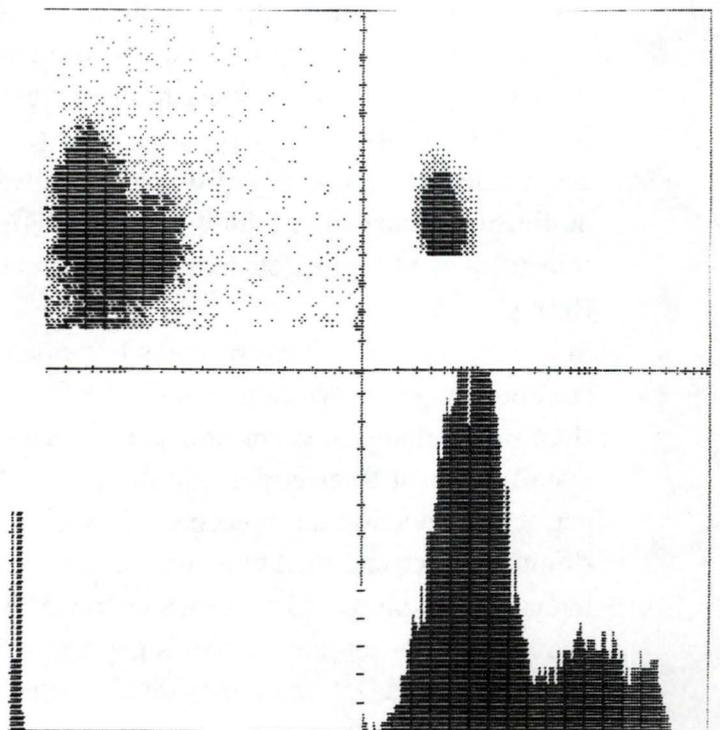
a)

Figure 19 : influence de la saponine : la population de monocytes est trop rapprochée de la population de lymphocytes; répercussion sur le marquage des protéines de surface ici, les CD_8

a) l'entièreté des deux populations est analysée : nous ne voyons plus qu'un seul pic

b) seul la population de lymphocytes est analysée : nous pouvons voir le pic positif séparé du pic de négatif

c) cellules non traitées à la saponine; la population de lymphocytes est analysée : nous voyons les deux pics pics positif et négatif



b)

3.3. Troisième problème : lors du double marquage, les pics de fluorescence verte (analyse des marqueurs membranaires) positifs et négatifs se rapprochent.

3.3.1. Analyse du problème

L'analyse multiparamétrique est intéressante pour l'étude des lymphocytes lors de maladies comme les hémopathies et les maladies réactionnelles. Les lymphocytes qui prolifèrent sont parfois en quantité infime par rapport à la totalité des lymphocytes. Si un marqueur membranaire propre aux lymphocytes proliférants est connu et commercialisé, il est possible de réaliser une étude multiparamétrique et ainsi d'isoler les lymphocytes proliférants ayant le marqueur de membrane et d'analyser leur contenu en ADN. ^{40 52}

Lorsqu'un marqueur membranaire est ajouté à cette suspension de cellules mononuclées, deux populations de lymphocytes sont identifiables sur le cytogramme : une population positive, dont les cellules sont marquées par le marqueur membranaire et une population négative, avec des cellules non marquées par le marqueur membranaire.

Le contrôle négatif est très important car les cellules sont volontiers autofluorescentes et il peut exister une fixation non spécifique des anticorps.

Le pourcentage de cellules positives peut être mesuré et la population peut être isolée afin de connaître son contenu en ADN. ⁶¹

Lors d'une analyse multiparamétrique (introduction de l'iodure de propidium), les deux populations positives et négatives se rapprochent, se confondent même. Il est alors difficile voir impossible d'isoler les lymphocytes à analyser.

3.3.2. Résolution du problème

• Influence de la saponine

En présence de saponine, les deux populations monocytes et lymphocytes se superposent (ce fait a déjà été discuté auparavant). Si ces deux populations ne sont pas séparées et que nous analysons l'entièreté des deux populations, l'histogramme (nombre de cellules en fonction de la fluorescence verte) ne présentera qu'un seul pic. Les deux pics positif et négatif se rejoignent (*figure 19*) et ne peuvent parfois ne former qu'un seul pic. La formation d'un seul pic est due à la présence de la

c)

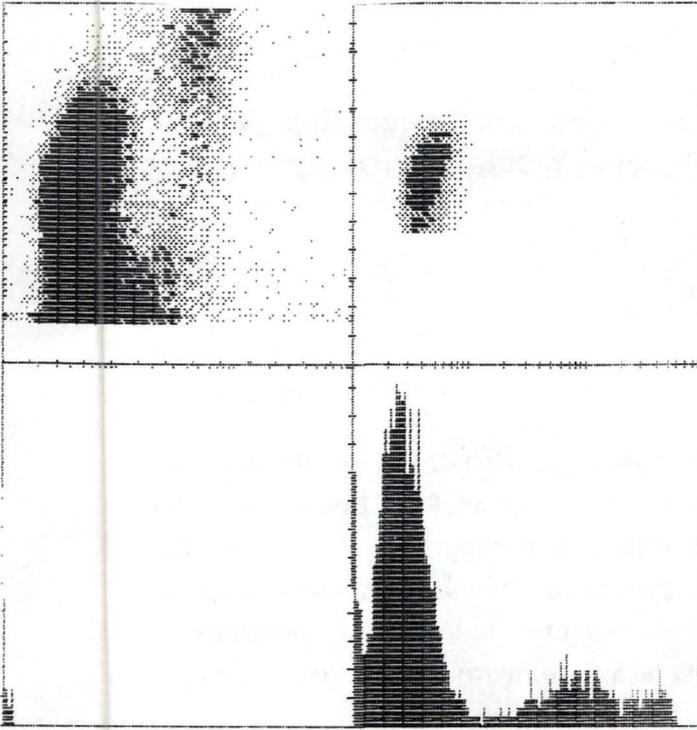
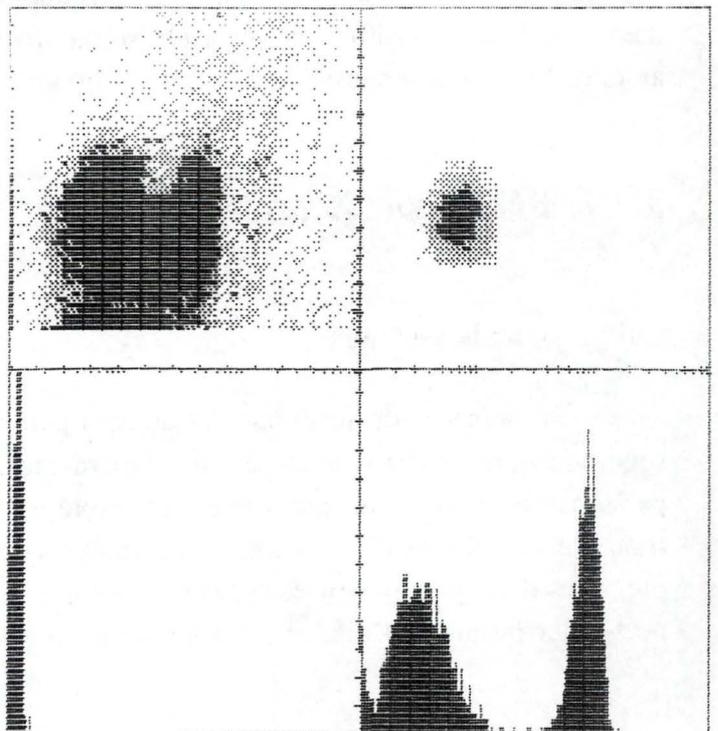


Figure 20 : marquage des CD₄; les cellules sont incubées 1 minute en présence de saponine puis lavées; la population de lymphocytes est plus facilement analysée : les deux pics positif et négatif sont bien séparés



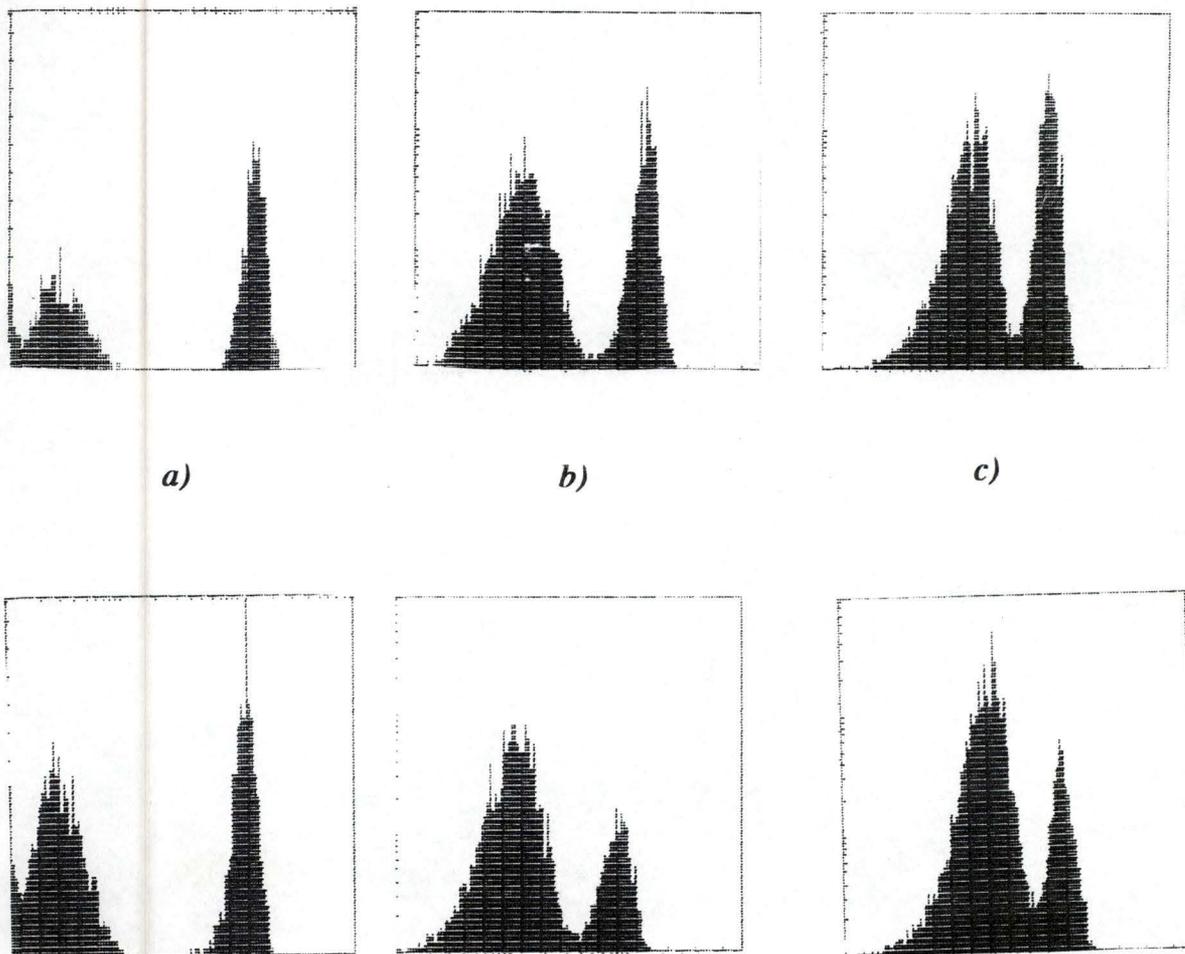


Figure 21 : influence de la concentration en iodure de propidium sur le marquage des CD₄; deux échantillons sont représentés (en haut et en bas)

- a) les cellules sont en suspension dans du PBS; elle ne sont pas perméabilisées**
- b) les cellules sont incubées 1 minute en présence de saponine et lavées; l'iodure de propidium (concentration de 10 mg dans 10 ml de PBS) et la RNAase sont ajoutés**
- c) les cellules sont incubées 1 minute en présence de saponine et lavées; l'iodure de propidium (concentration de 50 mg dans 10 ml de PBS) et la RNAase sont ajoutés**

population de monocytes analysée en même temps que la population de lymphocytes car si une petite partie de la population de lymphocytes est analysée sans présence de monocytes, les deux pics positif et négatif sont à nouveau séparés (*figure 19*).

Ces observations ont été réalisées sans la présence de l'iodure de propidium.

Le lavage des cellules après une minute d'incubation en présence de saponine est donc essentiel. Les deux populations monocytes et lymphocytes ne sont plus superposées et les lymphocytes peuvent être plus facilement isolés. Les pics de positif et négatif sont bien séparés et la mesure du pourcentage de lymphocytes marqués est facilement réalisée (*figure 20*).

• Influence de l'iodure de propidium

En présence de l'iodure de propidium, les pics positifs et négatifs se rapprochent.

* Analyse du problème

Nous pouvons par exemple observer l'influence de l'iodure de propidium sur le marquage des CD₄.

En présence de l'iodure de propidium à une concentration de 10 mg dans 10 ml de PBS, les pics sont rapprochés; ils sont accolés mais ne se superposent pas.

En présence de l'iodure de propidium à une concentration 5 fois plus élevée, les 2 populations positive et négative se rapprochent et il devient parfois difficile d'isoler la population de T Helper. (*figure 21*)

* Et pour les autres marquages?

Plusieurs autres marqueurs ont été étudiés : marquage des CD8, CD3 et CD20.

Nous avons utilisé le marqueur OKT8 (CD₈) car il est utile pour la détermination des mononucléoses. Les lymphocytes T cytotoxiques (CD₈) prolifèrent lors de la mononucléose.

Nous avons utilisé le marqueur B₄NC car il est utile pour la détermination des leucémies lymphoïdes chroniques (LLC). Les lymphocytes B prolifèrent lors des LLC.

Nous avons utilisé le marqueur OKT3 car il est présent sur tout lymphocyte T (pan T).

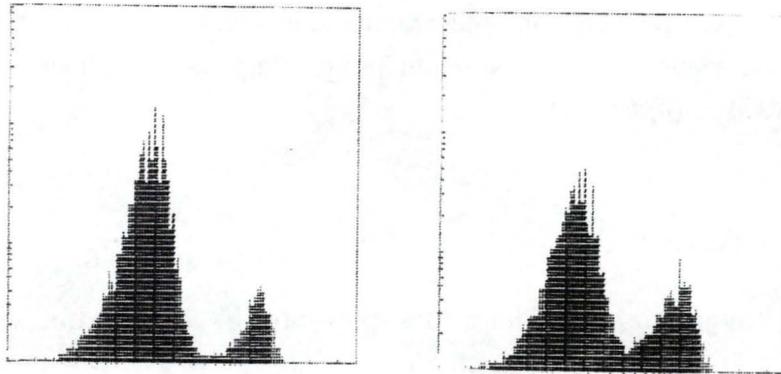


Figure 22 : double marquage : marquage des CD₈ (anticorps conjugué au FITC) et de l'ADN (iodure de propidium); deux échantillons sont représentés

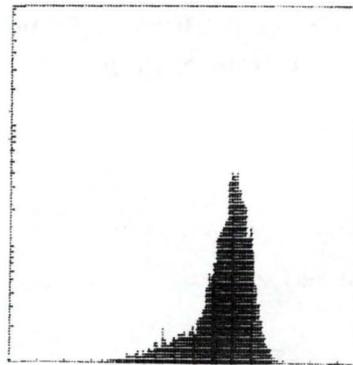


Figure 23 : double marquage : B₄NC et marquage de l'ADN

Lors du marquage des CD₈ (par un anticorps conjugué au FITC) et de l'ADN (par l'iodure de propidium à une concentration de 10 mg dans 10 ml de PBS), les populations positives et négatives ne se superposent pas. Cette constatation n'est basée que sur un nombre restreint d'échantillons et une analyse approfondie devrait être réalisée. (figure 22)

Le marquage des CD₃ a été préféré au marquage des CD₁₁, les premiers étant plus fluorescents que les seconds. Mais, ce marquage des CD₃ n'a été effectué que sur des lymphocytes qui n'ont pas été lavés une minute après incubation en présence de saponine. Cette analyse doit encore être réalisée.

Pour les B₄NC, les pics de fluorescence positive et négative sont bien séparés lors de l'analyse d'échantillons sanguins ne présentant pas de prolifération de lymphocytes B. Mais pour les échantillons sanguins d'individus atteints de LLC, les populations positives et négatives se superposent. (figure 23)

Le problème est donc toujours présent; l'iodure de propidium interfère toujours avec les marqueurs FITC.

* Explication

Deux hypothèses sont émises :

- L'influence de l'iodure de propidium pourrait être expliquée par un phénomène moléculaire appelé quenching³⁸: l'iodure de propidium masque la fluorescence verte du FITC.

Le quenching est une réduction de la fluorescence due à la présence d'autres molécules (effet de compétition).⁷⁰

Cela se traduit au niveau des histogrammes par une diminution de la fluorescence verte du FITC. Le pic de fluorescence verte va se déplacer vers la gauche.

- Les fluorescences sont détectées au niveau des photomultiplicateurs; ils transforment les informations lumineuses en signaux électriques.

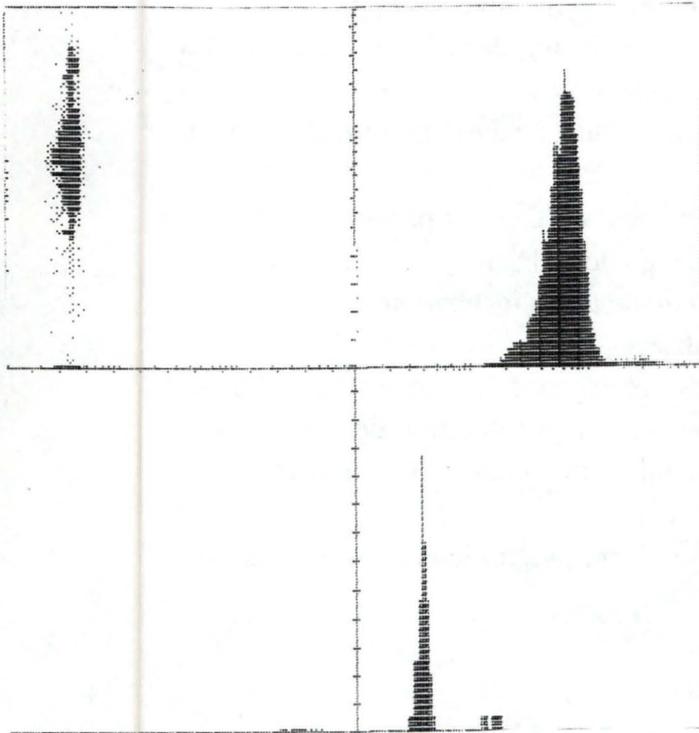
IL arrive parfois que la fluorescence rouge active les détecteurs de la fluorescence verte ou que la fluorescence verte active les détecteurs de la fluorescence rouge. Ce phénomène est appelé "interférence croisée" et peut fausser les analyses.

Le cytomètre possède dans ses programmes, une possibilité de correction de ces "interférences croisées".^{24 55 71}

* Une correction au niveau du cytomètre peut - elle améliorer les résultats ?

Deux corrections sont possibles :⁵⁵

- Soit elle enlève une portion de fluorescence rouge



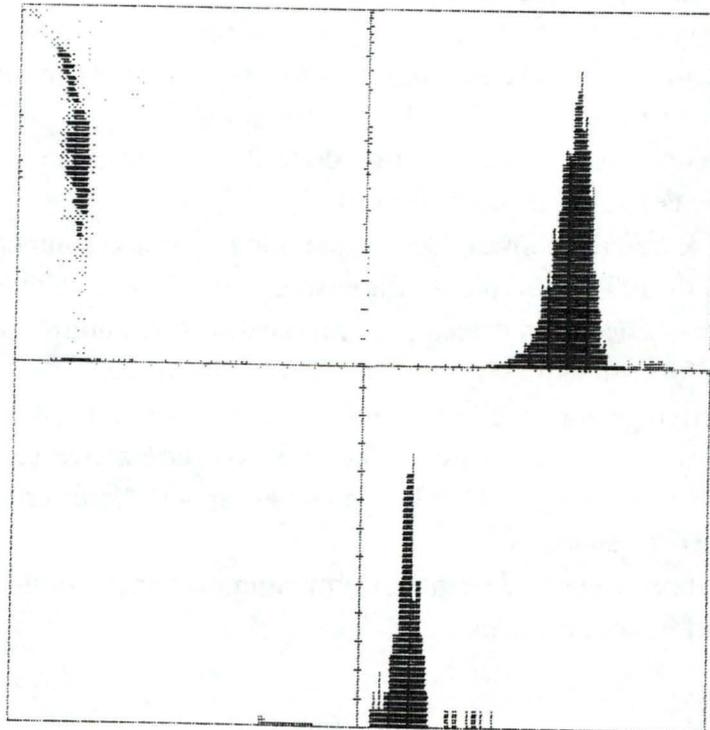
a)

Figure 24 : la séparation des pics positif et négatif est - elle améliorée lors de la correction par le cytomètre ?

a) pas de correction

b) correction : le cytomètre enlève de la fluorescence rouge; les deux pics positif et négatif ne sont mieux séparés et le pic correspondant à la phase G_0 / G_1 a augmenté est plus large

b)



- Soit elle enlève une portion de fluorescence verte

Nous avons essayé les deux corrections; la séparation entre les deux populations n'est pas augmentée. De plus, si l'intensité de fluorescence rouge est diminuée, une augmentation du CV du pic G_0 / G_1 est observée. (figure 24)

* discussion

Une correction des interférences croisées n'améliore pas les résultats, au contraire, une augmentation du coefficient de variation peut être observée si l'intensité de la fluorescence rouge est diminuée.

Le phénomène observé semble donc plutôt dû à un effet de quenching : une augmentation de la fluorescence rouge (concentration élevée en iodure de propidium) agit sur la fluorescence verte et en diminue son intensité.

La concentration en iodure de propidium égale à 10 mg pour 10 ml de PBS semble être trop élevée pour l'analyse de certains marqueurs membranaires (les B_4NC lors de l'analyse d'échantillons sanguins d'individus atteints de LLC). Mais une diminution de la concentration en iodure de propidium risque d'élargir le pic G_0 / G_1 . Avant de pouvoir diminuer la concentration en iodure de propidium, il faut d'abord trouver d'autres facteurs qui pourraient diminuer suffisamment le coefficient de variation. Ainsi, une diminution de la concentration pourrait être encore acceptable et cet iodure de propidium, en quantité plus faible produira moins d'interférences avec le marqueur FITC. Le marquage des protéines membranaires sera donc meilleur.

3.3.3. conclusion

Le marquage des marqueurs membranaires est influencé par deux facteurs :

- La saponine qui modifie la morphologie des monocytes. Ceux - ci vont se superposer à la population de lymphocytes et vont fausser l'analyse des marqueurs membranaires. La solution à ce problème est bien sûr le lavage des cellules après une minute d'incubation en présence de saponine.
- L'iodure de propidium à une concentration de 10 mg dans 10 ml de PBS peut interférer avec les marqueurs membranaires. Une diminution de la concentration devrait être réalisée mais auparavant, une étude plus approfondie sur le coefficient de variation doit être faite.

3.4. Quatrième problème : le pourcentage des cellules se trouvant dans les différentes phases du cycle cellulaire n'est pas toujours représentatif de la réalité

3.4.1. Analyse du problème

Lors de la mise en route d'une technique d'analyse du contenu en ADN, il nous est recommandé de réaliser des études de reproductibilité afin de bien cerner les performances de la technique. La proportion des différentes phases du cycle cellulaire existantes dans une population donnée interprétée par le cytomètre de flux doit être la plus proche possible de la "réalité".

Nous utilisons des lymphocytes "normaux"; pour ces lymphocytes, nous savons que le pourcentage de cellules en phase G_0 / G_1 doit être proche de 100. Pourtant, lors de l'analyse, nous obtenons souvent un pourcentage proche de 85; le pourcentage peut même parfois descendre à 75.

3.4.2. Résolution du problème

Peu d'expériences ont été réalisées afin d'améliorer la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire.

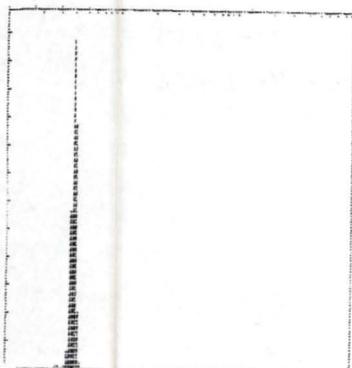
• influence du coefficient de variation

L'influence du coefficient de variation sur la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire a déjà été évoqué auparavant : plus le coefficient de variation est large, moins l'analyse sera précise et l'emploi de logiciels plus sophistiqué sera nécessaire¹⁰. Or, le cytomètre de flux se trouvant à Auvelais ne possède pas ces logiciels.

Nous pouvons par exemple calculer la moyenne et l'écart - type des phases G_0 / G_1 obtenus en fonction des coefficients de variation

14DEC93.02504D
PARA1 ANALYSIS RESULTS

DNA IP LIN



1.	%G0-G1	=	95.06
2.	%S	=	4.93
3.	%G2+M	=	0.00
4.	%DOUB	=	0.00
5.	%TRIP	=	0.00
6.	%CV	=	3.82
7.	1ST PEAK POS	=	205.96
8.	2ND PEAK POS	=	411.92
9.	3RD PEAK POS	=	0.00
10.	1ST PEAK HGT	=	321.39
11.	2ND PEAK HGT	=	0.00
12.	3RD PEAK HGT	=	0.00
13.	1ST PEAK SD	=	7.88
14.	2ND PEAK SD	=	15.76
15.	3RD PEAK SD	=	0.00
16.	TRANS POS	=	0.00
17.	TRANS PEAK	=	0.00

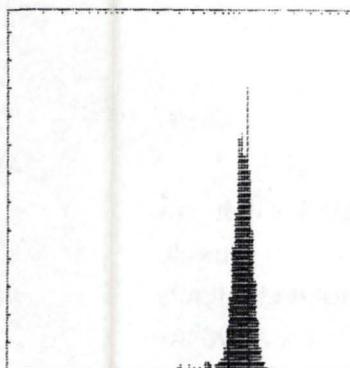
Figure 25 : influence du photomultiplicateur sur la proportion des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire

a) le pic G_0 / G_1 se trouve au niveau du canal 200

b) le pic G_0 / G_1 se trouve au niveau du canal 700

14DEC93.02604D
PARA1 ANALYSIS RESULTS

DNA IP LIN



1.	%G0-G1	=	73.03
2.	%S	=	7.25
3.	%G2+M	=	19.70
4.	%DOUB	=	0.00
5.	%TRIP	=	0.00
6.	%CV	=	3.55
7.	1ST PEAK POS	=	699.47
8.	2ND PEAK POS	=	1398.94
9.	3RD PEAK POS	=	0.00
10.	1ST PEAK HGT	=	111.20
11.	2ND PEAK HGT	=	15.00
12.	3RD PEAK HGT	=	0.00
13.	1ST PEAK SD	=	24.87
14.	2ND PEAK SD	=	49.74
15.	3RD PEAK SD	=	0.00
16.	TRANS POS	=	0.00
17.	TRANS PEAK	=	0.00

CV compris entre :	moyenne des phases G_0 / G_1	écart - type
1,5 et 2,5	90,30	2,04
2,51 et 3,5	84,88	5,66
3,51 et 4,5	83,33	7,03
4,51 et 5,5	80,58	9,13

Plus le coefficient de variation augmente, plus la phase G_0 / G_1 diminue et plus l'écart - type sera grand (par exemple, pour des échantillons dont nous avons obtenu des coefficients de variation compris entre 4,51 et 5,5, la proportion des cellules se trouvant en phase G_0 / G_1 varie énormément d'un échantillon à l'autre. Cette variation est beaucoup moins marquée lorsque les échantillons analysés ont un coefficient de variation compris entre 1,5 et 2,5).

La première chose à faire est donc de diminuer le coefficient de variation.

Mais d'autres facteurs peuvent aussi influencer cette analyse.

• Influence du photomultiplicateur de la fluorescence rouge

Le photomultiplicateur transforme les informations lumineuses en signaux électriques.

* Expérience

Lorsque le voltage du photomultiplicateur est augmenté, la population se déplace vers la droite. On a l'impression que le pic est plus large pourtant le CV reste le même. Par contre, l'analyse de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire donne des résultats totalement différents. (*figure 25*)

* Discussion

Dans le chapitre "matériel et méthodes", nous avons dit qu'il était préférable de placer le pic correspondant à la phase G_0 / G_1 au niveau du canal 200. A cet endroit, la linéarité est observée. En effet comme dit F.Spyratos, en cytométrie de flux, "2 et 2 ne font pas toujours 4...".⁶⁴

Plusieurs auteurs ont déjà signalé l'influence du photomultiplicateur sur la linéarité :

lorsque le voltage du photomultiplicateur est trop élevé, la linéarité n'est plus observée. ^{31 64}

• Influence de la formation de doublets

Si deux cellules diploïdes passent en même temps au niveau du laser, le cytomètre interprétera ce phénomène comme étant une seule cellule tétraploïde. L'analyse de l'ADN pourrait donc être faussée par cette possibilité de formation de doublets ^{31 64}. L'analyse PARA 1 peut corriger cette fausse interprétation (la correction est montrée dans "matériel et méthode").

• Influence de la formation de débris

La formation de débris peut aussi interférer avec les mesures ^{31 64}. Ce phénomène est surtout vérifié lorsque l'attaque des cellules par les détergents est forte; ce qui n'est pas notre cas. De plus, la population à analyser est ciblée pour, d'une part isoler cette population de la population de monocytes et d'autre part, isoler la population positive (marquée au niveau de l'antigène membranaire) de la population négative. Le fait de cibler la population à analyser diminue la possibilité de trouver des débris.

3.4.3. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons vu l'influence de plusieurs facteurs sur l'analyse du pourcentage du cycle cellulaire.

Ces facteurs sont :

- le coefficient de variation
- le photomultiplicateur et de la linéarité
- présence de doublets
- présence de débris

De tous ces facteurs, un seul peut encore être amélioré (le CV pourrait encore diminuer).

Jusqu'à présent, nous avons souvent eu des pourcentages de cellules en phase G_0 / G_1 inférieur à 90. C'est peut-être dû à un coefficient de variation trop élevé.

Il semble que, pour l'instant, parmi les groupes de chercheurs utilisant l'iodure de propidium pour l'analyse de l'ADN, le coefficient de variation du pic G_0 / G_1 ne constitue plus un problème. Toutefois, l'analyse de la répartition des autres phases du cycle cellulaire reste toujours problématique. D'autres facteurs pourraient - ils encore influencer l'analyse de l'ADN ?

CONCLUSION

Ce travail a permis de mettre en évidence les différents problèmes pratiques de l'analyse du DNA par cytométrie de flux (analyse de la ploïdie et des différentes phases du cycle cellulaire).

Quatre problèmes principaux ont été analysés et traités entièrement ou partiellement.

Le premier problème (superposition des populations lymphocytaires et monocytaires) semble résolu si les cellules sont lavées après l'incubation d'une minute avec la saponine.

Le deuxième problème (coefficient de variation trop élevé) a été résolu partiellement. En effet, des CV de l'ordre de 1 à 2 % devraient idéalement être obtenus.

La réduction du CV à des valeurs acceptables est un préalable à l'étude du troisième et du quatrième problème.

Par la suite, ces quatre problèmes étant résolus, une étude sur un grand nombre d'échantillons "normaux" devrait être réalisée en respectant les conditions analytiques bien définies. Après quoi, l'étude du contenu en ADN pourrait être appliquée aux pathologies malignes relevant de l'hématologie et de l'oncologie.

ANNEXE

1° / Influence du temps de passage des cellules à travers les circuits du cytomètre

Mesure du coefficient de variation en fonction du temps de passage des cellules à travers les circuits du cytomètre.

échantillon sanguin n°	4 min. d'incubation 1 min. de passage	5 min. de passage	différence
1	6,11	4,02	2,09
2	6,38	4,54	1,84
3	5,72	3,85	1,87

$$H_0 : m_d = 0 \text{ contre } H_1 : m_D < > 0$$

La moyenne des différences est de 1,93

L'écart type est de 0,14

t_{obs} est donc égal à 24,53

Pour $(n-1) = 2$; $t_{0,999} = 22,33$; t_{obs} étant supérieur à $t_{0,999}$, il y a rejet de H_0 avec une probabilité de se tromper inférieur à 0,001. Le temps de passage des cellules à travers le circuit du cytomètre a une influence sur le coefficient de variation. Un passage préliminaire de 5 minutes des cellules dans le circuit diminue le coefficient de variation.

2° / Influence de la concentration en iodure de propidium

Mesure du coefficient de variation en fonction de la concentration en iodure de propidium.

échantillon sanguin n°	[] = A / 10	[] = A	[] = 5 A
1	7,6	4,06	3,71
2	8,66	4,44	4,03

H_0 = les moyennes des CV obtenus sont égales quelle que soit la concentration utilisée.

H_1 = les moyennes ne sont pas toutes égales.

L'analyse ANNVA 2 étudie la variation des moyennes.

Table d'analyse de la variance :

source de variation	SCE	degré de liberté	CM	F_{obs}
concentration	22,23	2	11,12	131,6
échantillon sanguin	0,52	1	$5,16 \cdot 10^{-1}$	
interaction	0,17	2	$8,45 \cdot 10^{-2}$	
total	22,92	5		

F_{obs} est égal à 131,6. Comme $F_{2;2;0,99}$ est égal à 99,00; F_{obs} étant supérieur à $F_{2;2;0,99}$ il y a rejet de H_0 avec une probabilité de se tromper égale à 0,01. La concentration a une influence sur le coefficient de variation.

3° / Influence du temps d'incubation

Mesure du coefficient de variation en fonction du temps d'incubation.

échantillon sanguin n°	25 min. d'incubation		différence
	5 min. de passage	5 min. de passage	
1	4,02	3,79	0,23
2	3,13	3,49	- 0,36
3	4,54	4,54	0,00
4	3,63	3,88	- 0,25
5	3,64	3,82	- 0,18
6	3,69	3,47	0,22
7	3,54	3,15	0,39
8	4,08	4,18	- 0,10

$H_0 : m_D = 0$ contre $H_1 : m_D < > 0$

La moyenne des différences est de $- 6,25 \cdot 10^{-3}$

L'écart - type est de 0,26

t_{obs} est donc égal à $- 6,7 \cdot 10^{-2}$

Pour $(n - 1) = 7$, $t_{0,6} = 0,263$; $|t_{obs}|$ étant inférieur à $t_{0,6}$, il n'y a pas rejet de l'hypothèse nulle; on ne peut pas dire s'il y a une influence de l'incubation de l'iodure de propidium et de la RNAase.

4° / Effet de la température

Mesure du coefficient de variation en fonction de la température d'incubation.

échantillon sanguin n°	à 37° c	à t° ambiante	dans la glace
1	3,25	3,47	3,39
2	4,07	4,18	4,27

H_0 : les moyennes des CV sont égales quelle que soit la température utilisée

H_1 : les moyennes ne sont pas toutes égales

Table d'analyse de la variance :

source de variation	SCE	degré de liberté	CM	F
température	$3,74 \cdot 10^{-2}$	2	$1,87 \cdot 10^{-2}$	5,04
échantillon sanguin	0,97	1	0,97	
interaction	$7,43 \cdot 10^{-3}$	2	$3,72 \cdot 10^{-3}$	
total	1,01	5		

F_{obs} est donc égal à 5,04. Comme $F_{2;2;0,95}$ est égal à 19; F_{obs} étant inférieure à $F_{2;2;0,95}$ il n'y a pas rejet de l'hypothèse nulle; on ne peut pas dire si la température d'incubation a une influence sur la diminution du coefficient de variation.

5° / Influence du lavage

Mesure du coefficient de variation en fonction du lavage.

pas de lavage	lavage	différence
4,02	3,36	0,66
3,65	3,43	0,22
3,61	3,86	- 0,25
3,59	3,20	0,39
3,54	3,72	- 0,18

$$H_0 : m_D = 0 \text{ contre } H_1 : m_D < > 0$$

Moyenne des différences : 0,17

écart - type : 0,38

t_{obs} est donc de 0,98

pour $(n - 1) = 4$, $t_{0,9}$ est égal à 1,533; t_{obs} étant inférieur à $t_{0,9}$, il n'y a pas de rejet de l'hypothèse nulle; nous ne pouvons pas dire si le lavage a une influence sur le CV.

6° / Influence de la puissance du laser

Mesure du coefficient de variation en fonction de la puissance du laser.

échantillon sanguin n°	200 mW	300 mW	500 mW
1	3,47	3,16	3,09
2	2,59	2,67	2,56
3	3,14	3,28	3,26

H_0 : les moyennes des CV sont toutes égales quelle que soit la puissance du laser utilisé

H_1 : les moyennes ne sont pas toutes égales

table d'analyse de la variance

source de variation	SCE	degré de liberté	CM	F_{obs}
puissance	$1,47 \cdot 10^{-2}$	2	$7,34^{-2}$	0,35
échantillon	0,79	2	0,39	
interaction	$8,50 \cdot 10^{-2}$	4	$2,13^{-2}$	
totale	0,89	8		

F_{obs} est donc égal à 0,35. $F_{2;4;0,95}$ est égal à 6,94. Comme F_{obs} est inférieur à $F_{2;4;0,95}$ il n'y a pas de rejet de l'hypothèse nulle. Nous ne pouvons pas dire si la puissance du laser a une influence sur le CV.

7° / Influence du produit de lyse

Mesure du coefficient de variation en fonction de la lyse érythrocytaire.

pas de lyse	lyse	différence
3,63	3,39	0,24
3,97	3,61	0,36

$$H_0 : m_D = 0 \text{ contre } H_1 : m_D < > 0$$

moyenne des différences : 0,30

écart - type : $8,48 \cdot 10^{-2}$

t_{obs} est donc égal à 5

Pour $(n-1) = 1$; $t_{0,95}$ est égal à 6,134; t_{obs} étant inférieur à $t_{0,95}$, il n'y a pas de rejet de l'hypothèse nulle. Nous ne pouvons pas dire si le produit de lyse a une influence sur le coefficient de variation.

8° / Influence du produit de lyse et du produit de fixation

Mesure du coefficient de variation en fonction de la lyse érythrocytaire et de la fixation.

pas de lyse pas de fixation	lyse fixation	différence
3,55	11,78	- 8,23
3,67	8,43	- 4,76
4,60	9,85	- 5,25
3,87	8,49	- 4,62
3,86	10,52	- 6,66

$$H_0 : m_D = 0 \text{ contre } H_1 : m_D < > 0$$

moyenne des différences : - 5,90

écart - type : 1,53

t_{obs} est donc égal à - 8,63

Pour $(n - 1) = 4$, $t_{0,9995}$ est égal à 8,610; $|t_{obs}|$ étant supérieur à $t_{0,9995}$, il y a rejet de l'hypothèse nulle avec une probabilité de se tromper de 0,0005. La lyse et la fixation ont donc une influence sur le coefficient de variation; ensemble, la lyse et la fixation augmentent la dispersion.

9° / Influence du double marquage

Mesure du coefficient de variation en fonction du simple ou double marquage.

simple marquage	double marquage	différence
3,68	3,87	- 0,19
3,78	4,08	- 0,30
3,60	3,97	- 0,37
3,39	3,60	- 0,21
2,71	2,83	- 0,12
2,63	3,01	- 0,38
2,33	2,82	- 0,49
2,54	2,96	- 0,42

moyenne des différences : - 0,31

écart - type : 0,13

t_{obs} est donc égal à - 6,88

pour $(n - 1)$, $t_{0,9995}$ est égal à 5,405; $|t_{obs}|$ étant supérieur à $t_{0,9995}$, il y a rejet de l'hypothèse nulle. Le double marquage a une influence sur le coefficient de variation, celui - ci est augmenté lorsque les cellules sont aussi colorées par un marqueur membranaire.

10° / Influence du type de population analysée

Mesure du coefficient de variation en fonction du type de population à analyser.

marquage des T Helper	marquage des L _B	différence
3,01	5,70	- 2,69
2,64	4,90	- 2,26
3,22	6,01	- 2,79

$H_0 : m_D = 0$ contre $H_1 : m_D < > 0$

moyenne des différences : - 2,58

écart - type : 0,28

t_{obs} : - 15,87

Pour $(n-1) = 2$, $t_{0,995} = 9,925$; $|t_{obs}|$ étant supérieur à $t_{0,995}$, il y a rejet de l'hypothèse nulle; les coefficients de variation obtenus sont différents en fonction des populations cellulaires étudiées.

BIBLIOGRAPHIE

1. B.LEWIN (1988),
Genes, traduction de *Genes 3*,
Médecine-Sciences Flammarion 41-49
2. B.LEWIN (1988),
Genes, traduction de *Genes 3*,
Médecine-Sciences Flammarion 312-318
3. D.M.PRESCOTT (1989),
La cellule : principes moléculaires des structures et des fonctions cellulaires,
Médecine-Sciences Flammarion, 406-437
4. C.C.WIDNELL, K.H.PFENNINGER (1990),
Essential cell biology,
William and Wilkins, 58-65
5. A.KORNBERG, T.A.BAKER (1992),
DNA replication, second edition,
W.H.Freeman and company, 439-470, 758-769
6. B.ALBERTS, D.BRAY, J.LEWIS, M.ROFF, K.ROBERTS, J.D.WATSON (1989),
Biologie moléculaire de la cellule, deuxième édition,
Médecine-Sciences Flammarion, 727-763
7. A.B.PARDEE (1989),
"G₁ events and regulation of cell proliferation",
Science vol.246, 603-608
8. R.A.LASKEY, M.P.FAIRMAN, J.J.BLOW (1989),
"S phase of the cell cycle",
Science vol.246, 609-613
9. Y.NAJEAN (1992),
"La croissance des cellules hématopoïétiques. 1. Cinétique de la prolifération",
Hématologie, Le concours médical, 3042-3050

10. F.LACOMBE (1991),
"Technique d'étude du cycle cellulaire par cytométrie de flux en hématologie et en cancérologie",
revue française des laboratoires n° 218 (1991), 29-36
11. B.ALBERTS, D.BRAY, J.LEWIS, M.ROFF, K.ROBERTS, J.D.WATSON (1989),
Biologie moléculaire de la cellule, deuxième édition,
Médecine-Sciences Flammarion, 174-176, 728-729
12. H.M.SHAPIRO (1989),
"Flow cytometry of DNA content and other indicators of proliferative activity",
Arch Pathol Lab Med vol.113, 591-597
13. J.STOREK, I.SCHMID, S.FERRARA, A.SAXON (1992),
"A novel B cell stimulation / proliferation assay using simultaneous flow cytometric detection of cell surface markers and DNA content",
Journal of immunological methods vol.151, 261-267
14. B.ALBERTS, D.BRAY, J.LEWIS, M.ROFF, K.ROBERTS, J.D.WATSON (1989),
Biologie moléculaire de la cellule, deuxième édition,
Médecine-Sciences Flammarion, 141-142
15. P.GONTER, G.JOLLES (1969),
Histochimie normale et pathologique 1,
Gauthier - Villars, 341-378
16. D.J.ARNDT - JOVIN, T.M.JOVIN (1989),
"Fluorescence microscopy of living cells in culture",
Methods in cell biology vol.30 part.B, edited by D.Lansing Taylor, 417-448
17. A.DESLACES, M.BEUZELIN, M.FERRERO, F.SPYRATOS, M.BRIFFOD (1989),
"Etude du cycle cellulaire par cytofluorimétrie : intérêt dans les tumeurs solides",
édité par le service des relations publiques de la société Coultronics
18. J.K.LARSEN (1992),
"Cell proliferation : analysis by flow cytometry",
Nouv Rev Fr Hematol vol.34, 317-335
19. R.S.RILEY, E.J.MAHIN (1989),
Flow cytometry : clinical application,
ASCP Workshop # 9072, ASCP National Meeting, 63-74

20. "Monoclonal antibody to 5-bromo and 5-iododeoxyuridine : a new reagent for detection of DNA replication",
Science vol.218 (1982), 474-475
21. G.D.WILSON, N.J.MCNALLY, S.DISCHE, M.I.SAUDERS, C.DES ROCHERS,
A.A.LEWIS, M.H.BENETT (1988),
"Measurement of cell kinetics in human tumors in vivo using
bromodeoxyuridine incorporation and flow cytometry",
Br. J. Cancer vol.58, 423-431
22. A.RICCARDI, M.GIORDANO, M.GIRINO, S. BRUGNATELLI, G.UCCI,
G.MAZZANI (1991),
"In vivo bromodeoxyuridine and flow cytometry : clinical significance in acute
non - lymphoblastic leukemia",
Eur J Cancer vol.27 n°7, 882-887
23. R.P.WERSTO, R.L.LIBLIT, L.G.KOSS (1991),
"Flow cytometric DNA analysis of human solid tumor : a review of the
interpretation of DNA histograms",
Human Pathology vol.22 n°11, 1085-1098
24. L.G.KOSS, B.CZENIAK, F.HERZ, R.P.WERSTO (1989),
"Flow cytometric measurement of DNA and other cell components in human
tumors : a critical appraisal",
Human Pathology vol.20 n°6, 528-548
25. O.E.IVERSEN, O.I.LAERUM (1987),
"Trout and salmon erythrocytes and human leukocytes as internal standards for
ploidy control in flow cytometry",
Cytometry 8, 190-196
26. H.M.SHAPIRO (1988),
Practical flow cytometry, second edition,
Alan R. Liss, Inc, 132-141
27. H.M.SHAPIRO (1986),
"Technical developments in flow cytometry",
Human Pathology vol.17 n°7, 649-651
28. H.A.CRISSMAN, R.A.TOBEY (1974),
"Cell cycle in 20 minutes",
Science vol.184, 1297

29. COLEMAN AW, MAGUIRE MJ, COLEMAN RJ (1981),
"Mithramycin - and 4' - 6 - diamino - 2 - phenylindole (DAPI) - DNA staining for fluorescence microspectrophotometric measurement of DNA in nuclei, plastids, and virus particules",
J Histochem Cytochem vol.29, 959
30. P.VAGO, B.LAMY, V.AGUILAR, S.ABOUDKHIL, G.GODLEWSKI, J.P.BUREAU (1990),
"Approche qualitative de l'analyse du contenu en ADN par cytométrie de flux",
Ann. Biol. Clin. vol.48, 726-731
31. R.C.MCCARTHY, T.J.FETTERHOFF (1989),
"Issues for quality assurance in clinical flow cytometry",
Arch. Pathol. Lab. Med. vol.113, 658-666
32. P.KURKI, M.VAANDERLAAN, F.DOLBEAR, J.GRAY, E.M.TAN (1986),
"Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) / cycling during the cell cycle",
Experimental Cell Research vol.166, 209-219
33. R.BRAVO (1986),
"Synthesis of the nuclear protein cyclin (PCNA) and its relationship with DNA replication",
Experimental Cell Research vol.163, 287-293
34. M.P.FAIRMAN (1990),
"DNA polymerase δ / PCNA : actions and interactions",
Journal of cell science vol.95, 1-4
35. J.GERDES, H.LEMKE, H.BAISCH, H-H.WAKER, U.SCHWAB, H.STEIN (1984),
"Cell cycle analysis of a cell proliferation - associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67",
Journal of immunology vol.133 n°4, 1710-1715
36. R.VERHEIJEN, H.J.H.KUIJPERS, R.O.SCHLINGEMANN, A.L.M.BOEHMER, R.VAN DRIEL, G.J.BRAKENHOFF, F.C.S.RAMAKERS (1989),
"Ki-67 detects a nuclear matrix - associated proliferation - related antigen. 1. Intracellular localization during interphase",
Journal of cell science vol.92, 123-130
37. K.SASAKI, T.MURAKAMI, M.KAWASAKI, M. TAKAHASHI (1987),
"The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive antigen expression",
Journal of cellular physiology vol.133 (1987), 579-584

38. M.FRENCH, J-P.MAGAUD,
"Analyse simultanée de l'ADN cellulaire et des antigènes de membrane"
39. T.COTNER, J.M.WILLIAM, L.CHRISTENSON, H.M.SHAPIRO, T.B.STROM,
J.STROMINGER (1983),
"Simultaneous flow cytometric analysis of human T cell activation expression
and DNA content",
J. Exp. Med. vol.157, 461-472
40. R.C.BRAYLAN, N.A.BENSON (1989),
"Flow cytometric analysis of lymphomas",
Arch. Pathol. Lab. Med. vol.113, 627-633
41. H.M.LEDERMAN, A.COHEM, J.W.W.LEE, H.M.FREEDMAN, E.W.GELFAND
(1984),
"Deferoxamine : a reversible S - phase inhibition of human lymphocyte
proliferation",
Blood vol.64 n° 3 (1984), 748-753
42. D.K.GRANNER, P.A.MAYES, R.K.MURRAY, V.W.RODWELL (1989),
Précis de biochimie, septième édition,
les presses de l'université Laval, édition Eska
43. Y.NAJEAN (1992),
"La croissance des cellules hématopoïétiques. 2. Les facteurs de croissance
cellulaire",
Hématologie, le concours médical, 3166-3172
44. I.ROITT, J.BROSTOFF, D.MALE (1989),
Immunologie fondamentale et appliquée, deuxième édition,
MEDSI / McGraw - Hill, 8.9-8.10
45. B.ALBERTS, D.BRAY, J.LEWIS, M.ROFF, K.ROBERTS, J.D.WATSON (1989),
Biologie moléculaire de la cellule, deuxième édition,
Médecine-Sciences Flammarion, 1187-1217
46. D.M.PRESCOTT (1989),
La cellule : principe moléculaire des structures et des fonctions cellulaires,
Médecine-Science Flammarion, 442-465
47. B.LEWIN (1988),
Genes, traduction de *Genes 3*,
Médecine-Sciences Flammarion 696-716

48. G.AUER (1990),
DNA : a clinical parameter,
livre sponsorisé par Becton Dickinson Immunocytometry Systems
49. R.S.RILEY, E.J.MAHIN (1989),
Flow cytometry : clinical applications,
ASCP Workshop # 9072, ASCP National Meeting, 75-105; annexe E
50. D.SECKINGER, E.SUGARBAKER, O.FRANKFURT (1989),
"DNA content in human cancer : application in pathology and clinical medecin",
Arch Pathol Lab Med vol.113, 919-926
51. D.E.MERKEL, W.L.MCGUIRE (1990),
"Ploidy, proliferative activity and prognosis : DNA flow cytometry of tumors",
Cancer vol.65, 1194-1205
52. C.J.HERMAN, T.P.MCGRAW, R.J.MARDER, K.D.BAUER (1987),
"Recent progress in clinical quantitative cytology",
Arch Pathol Lab Med vol.111, 505-512
53. L.DELESTIENNE (1992),
"Les immunoglobulines de surface et intracytoplasmiques par cytométrie de flux.
Application à la détection précoce de pathologies lymphoïdes chroniques B",
mémoire présenté pour l'obtention du grade de licencié en Sciences biologiques,
FUNDP
54. P.VAGO, J.P.BUREAU (1989),
"Cytométrie en flux : principes et méthodes d'étude des cellules",
Ann. Pathol. vol.9 n° 4, 289-294
55. *Coulter Epics C system : Product Reference Manual*,
Technical Communication Coulter Electronics, Inc (1984)
56. P.K.HORAN,
"Méthode de coloration de DNA au moyen de l'iodure de propidium"
57. VINDELOV ET AL (1983),
"A detergent - trypsin method for the preparation of nuclei for cytometric DNA
analysis"
cytometry 3, 323-327

58. K.M.RIGG, B.K.SHENTON, I.A.GIVAN, R.M.R.TAYLOR, T.W.J.LENNARD (1989),
"A flow cytometric technique for simultaneous analysis of human mononuclear cell surface antigens and DNA",
Journal of immunological methods vol.123, 177-184
59. P.SURANYL, L.MATYUS, I.SONKOLY, G.Y.SZEGEDI (1984),
"Cellular DNA content of T helper, T suppressor and B lymphocytes in SLE",
Clin. exp. Immunol. vol.58, 37-41
60. R.B.GENNIS (1989),
Biomembranes : molecular structure and function,
Springer - Verlag, 320
61. A.BERNARD, G.POMIER (1991),
"Application à l'étude des techniques d'immunocytologie",
encyclopédie médico - chirurgicale, édition techniques
62. G.J.MICK, T.BONN, J.STEINBERG, K.MCCORMICK (1988),
"Preservation of intermediary metabolism in saponin - permeabilized rat adipocytes",
The journal of biological chemistry vol.263 n°22, 10667 - 10673
63. M.WASSLER, I.JONASSON, R.PERSSON, E.FRIES (1987),
"Differential permeabilization of membranes by saponin treatment of isolated rat hepatocytes",
Biochem. J. vol.247, 407 - 415
64. F.SPYRATOS,
"Analyse du contenu en ADN par cytométrie de flux en cancérologie : recommandations générales", Centre René Huguenin, S^t - Cloux, France
65. L.L.VINDELOV, I.J.CHRISTENSEN, N.I.NISSEN (1983),
"Standardization of High - resolution flow cytometric DNA analysis by the simultaneous use of chicken and trout red blood cells as internal reference standards",
cytometry vol.3 n°5, 328 - 321
66. DE ROBERTIS, NOWINSKI, SAEZ (1961),
General cytology, 3^{ème} édition,
W.B.Saunders company

67. H.M.SHAPIRO (1988),
Practical flow cytometry, second edition,
Alan R. liss, Inc, 44-45
68. M.FLORKIN (1959),
Introduction biochimique à la médecine,
éditeurs Masson et C^{ie}
69. M.LECLERCQ (1992-1993),
Méthode morphologique d'analyse de la cellule,
cours de 2^{ième} licence biologie
70. F.W.D.ROST (1992),
Fluorescence microscopy, vol.1,
Cambridge university press
71. R.S.RILEY, E.J.MAHIN (1989),
Flow cytometry : clinical application,
ASCP Wokshop # 9072, ASCP National Meeting, 111