

*C. R. Soc. Biol.*, 1988, 182, 400-408.

**Biologie animale.**

**Points de contrôle du cycle cellulaire  
en culture primaire *in vitro*  
sous l'action de la 20-OH Ecdysone  
chez le Coléoptère *Tenebrio***

par GEORGE M. HAPP \*  
et JEAN-JACQUES LENOIR-ROUSSEAUX \*\* (\*)

\* *Zoology Dpt., U. of Vermont, 05405 Burlington USA*

\*\* *Lab. Biologie du Développement, UFR Sciences,  
U. Paris XII, 94010 Créteil,*

(reçue le 4 novembre 1988).

*Summary.* — The male accessory gland, of *Tenebrio molitor* that secretes the adult spermatophore, presents for the pupal stage, a cell cycling arrest in G2 at the peak of ecdysteroid. Glands from newly-ecdysed pupa, dissociated with trypsin and cultured in Landureau's S-20 medium with or without 10 % heat-inactivated FCS, form loose networks of muscle cells and form aggregates of epithelial cells. Cells were incubated for 24 hr in basal medium and then in medium with 20-hydroxyecdysone ( $10^{-8}$  to  $10^{-4}$  M) for 24 hr. In the last 2 hr, cell cycling was blocked with colchicine. Mitotic activity increased logarithmically with hormone dose; the rate of increase with FCS was double that without FCS.

The accumulation of cells in G2 estimated by FACS using an Ortho-paradigm, increased with hormone dose ( $10^{-9}$  to  $10^{-5}$  M) and demonstrated that the molting hormone acts in G1 as well as in G2.

*Résumé.* — La glande annexe mâle de *Tenebrio molitor* est constituée par une tunique musculaire enveloppant un épithélium qui sécrète chez l'adulte un spermatophore. Nous explorons la phase de prolifération qui culmine chez la nymphe simultanément au pic d'hormone de mue (20-OH Ecdysone), laissant les cellules épithéliales bloquées en G2. Les cellules prélevées à la mue nymphale et dissociées à la trypsine élaborent, en milieu Landureau S20, un réseau musculaire contractile sur lequel reposent des agrégats de cellules épithéliales. Ces cellules ensemencées à  $5 \times 10^3$ /ml sont incubées 24 h à 25° C, puis soumises à l'hormone de mue 24 h dont les deux dernières en présence de  $4 \times 10^{-7}$  M de colchicine. Le dénombrement des figures mitotiques ainsi bloquées en présence de doses croissantes d'hormone ( $10^{-8}$  à  $10^{-4}$  M) révèle un

(\*) Correspondance : Univ. Bourgogne Lab. Zoologie CNRS URA 55; 6, Boulevard Gabriel, F-2100 Dijon.

accroissement exponentiel de l'indice mitotique ( $y = 21,029x^{0,1063}$ ) qui est doublé ( $y = 41,985x^{0,1108}$ ) avec l'apport de 10 % de sérum de veau fœtal inactivé.

L'accumulation des cellules en G2 est estimée par le rapport  $G2 + M/G0 + G1$  au moyen d'un Ortho Diagnostic System 50H Dual laser Cytofluorograph associé à un 2150 Data Handling System, après isolement des noyaux au NP 40 et coloration à l'iodure de propidium. L'analyse démontre une corrélation logarithmique du rapport  $G2 + M/G0 + G1$  et des doses croissantes d'hormone ( $10^{-9}$  à  $10^{-5}$  M). La courbe dose-réponse obtenue montre un effet plateau de  $10^{-5}$  à  $10^{-4}$  M et un effet inhibiteur-cytotoxique à  $10^{-3}$  M. Ces faits confirment l'accélération par l'hormone de mue du cycle cellulaire [Szopa et coll. (25); Happ et coll. (2); Yaginuma et coll. (3)] obtenu en culture d'organe de glande, en démontrant sans équivoque que l'hormone de mue agit en G1 et en G2 par deux points de contrôle.

Chez le Coléoptère *Tenebrio molitor*, insecte à métamorphose complète, nous avons étudié sur la glande annexe mâle (constituée d'une tunique musculaire enveloppant un épithélium qui sécrète chez l'adulte un spermatophore), la phase de prolifération qui culmine chez la nymphe simultanément au pic d'hormone de mue. Nous avons montré en culture d'organe que l'hormone de mue a un effet mitogène (1) et qu'elle accélère le cycle cellulaire (2). Dans le traitement actuel, nous nous sommes posé la question de savoir, compte tenu de l'évolution des phases du cycle cellulaire de la glande chez la nymphe (3), quels sont les effets de doses croissantes de 20-OH Ecdysone sur les cellules isolées de la glande au cours du cycle cellulaire en culture primaire.

*Animaux, matériels et méthodes.* — Les conditions d'élevage et de datation physiologique des « vers de farine », de même que les techniques de dissection en solution saline et le milieu de culture, ont été précédemment décrites (4).

**DISSOCIATION.** — 50 glandes prélevées immédiatement après la mue larve-nymphe sont dissociées en présence de 0,05 % de trypsine (Sigma type III) dans une solution saline contenant 83 mM NaCl, 30 mM KCl, 45 mM saccharose, 20 mM HEPES, à pH 7,2 soit 180 mOsmoles.

La dissociation est effectuée sous agitation vigoureuse pendant 10 minutes, puis arrêtée avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF; Eurobio, Seromed), inactivé à 56° C pendant 1 heure, puis filtré à 0,22  $\mu$ m. Après filtration sur toile à bluter (20  $\mu$ m), le culot obtenu par centrifugation à 180 g pendant 10 mn est mis en suspension dans le milieu Landureau S20, afin de contenir  $5 \times 10^5$  cellules/ml.

**MISE EN CULTURE.** — Après adhérence en 20 minutes des cellules ensemencées sur boîte de 35 mm de diamètre à raison de 250  $\mu$ l, le milieu est porté à 1 ml. Après 24 heures d'incubation le milieu est renouvelé, contenant ou non 10 % de SVF et des concentrations croissantes d'hor-

mone. Les incubations durent 24 heures, dont les 2 dernières en présence de  $4 \times 10^{-7}$  M de colchicine.

**CYTOFLUORIMÉTRIE EN FLUX (FACS, 5, 6, 7).** — Elle a été effectuée au Vermont sur un « Ortho Diagnostic System Modèle 50H Dual-Laser Cytofluorograph » couplé à un traitement de données « 2150 Data handling system ».

**ISOLEMENT NUCLÉAIRE.** — Les glandes entières sont dissociées en tampon citrate (40 mM de citrate de Na à pH 7,6; 250 mM de saccharose; 5 % DMSO). Les noyaux sont isolés par une solution mère contenant 3,4 mM de citrate de Na à pH 7,6; 0,5 mM Tris et 0,1 % de NP40 au moyen d'une seringue de 1 ml montée sur une aiguille de calibre 23 (3). Après cultures primaires, les noyaux sont isolés en les incubant après 2 rinçages en solution saline dans le tampon citrate (100  $\mu$ l) (8), puis un tampon Tris 50 mM à 0,1 % de NP40 en présence de 50 mM de NaCl, 1 mM EDTA pendant 10 minutes à 0° C (9).

**COLORATION.** — La fraction nucléaire des glandes entières est mise à incuber à 0° C en présence de RNase (1 mg/ml de solution mère citrate) puis filtrée sur toile à bluter de 20  $\mu$ m. L'iodure de propidium dissous dans la solution mère est ajouté à la concentration finale de 420  $\mu$ g/ml (9). La fraction nucléaire des cultures primaires est incubée à 0° C en présence de RNase (1 mg/ml de tampon Tris), puis filtrée sur toile à bluter de 20  $\mu$ m. L'iodure de propidium dissous dans un tampon  $\text{NaHCO}_3$  30 mM et NaCl 30 mM à pH 8,1 est ajouté à la concentration finale de 20  $\mu$ g/ml.

*Résultats.* — La culture *in vitro* de cellules épithéliales et de myocytes obtenue par dissociation trypsique se caractérise par une adhérence

FIG. 1. — Dénombrement des phases du cycle cellulaire pendant 24 heures de culture incluant les 2 dernières en présence de colchicine ( $4 \times 10^{-7}$  M). Les cultures primaires ensemencées 24 heures avant l'expérimentation, sont obtenues par dissociation trypsique de cellules prélevées sur la glande annexe mâle du ver de farine, au moment de l'exuviation nymphale. Les barres verticales représentent l'erreur standard à la moyenne (SEM).

Indice mitotique : Croissement exponentiel de l'indice mitotique en fonction de l'élévation de la dose d'hormone de mue (20-OH Ecdysone) par dénombrement des plaques métaphasiques sur Squash à l'orcéine acétique.

Présence de sérum de veau fœtal inactivé à 56° C et filtré (---). Absence de sérum (—).

Accumulation en G2 : L'identification des populations de noyaux, isolés au NP40 et colorés à l'iodure de propidium, des différentes phases du cycle est obtenue par cytofluorimétrie en Flux (Ortho Diagnostic System 50H). L'évolution du rapport  $G2 + M/G0 + G1$  reflète une accumulation en phase G2 corrélable de façon logarithmique ( $y = 0,5212 \log x^{+12,15}$ ) à des doses croissantes de 20-OH Ecdysone comprises entre  $10^{-9}$  et  $10^{-5}$  M. Évolution de l'indice  $(G2 + M/G0 + G1) \times 100$  sur culture en présence de sérum de veau fœtal inactivé (—0—). Témoins en présence de colchicine seule. Toutes les mesures ont été effectuées sur 5 mises en culture.

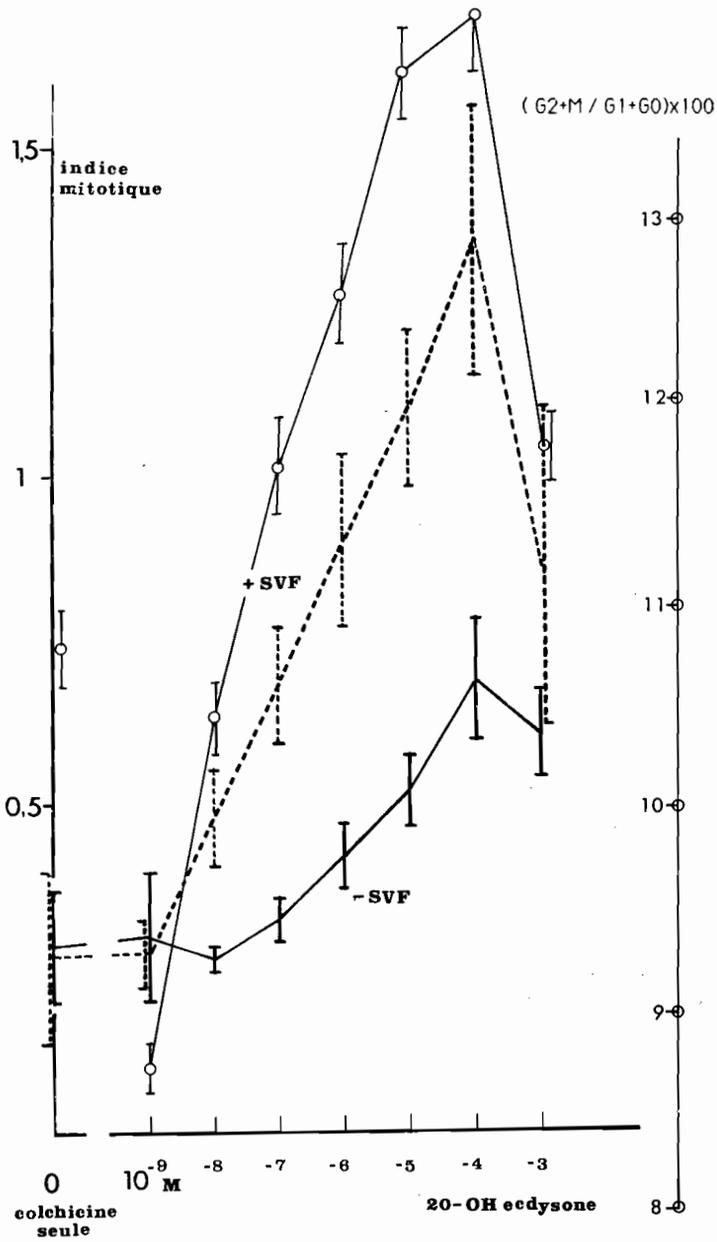


FIG. 1.

rapide (20 min). La différenciation s'effectue en moins de 36 heures pour les deux populations cellulaires. Il se constitue un réseau de cellules musculaires spontanément contractiles, soit mononucléées, soit regroupant de 2 à 16 noyaux enclavés dans des éléments striés identifiables aux stries Z. Les cellules épithéliales sphériques se regroupent en agrégats, dont l'étude ultrastructurale révèle la présence de granules de sécrétion identifiables à certains des types décrits par Dailey et coll. (10). Le diamètre des noyaux de ces cellules est double de celui des noyaux des cellules musculaires. Ces dernières tendent à fusionner, tandis que les cellules épithéliales se divisent. La culture, tout en préservant les types cellulaires, survit de 2 à 3 mois par renouvellement pour moitié du milieu toutes les semaines.

L'application durant 24 heures de 20-hydroxyecdysone (Fig. 1) allant de  $10^{-9}$  à  $10^{-3}$  M révèle un effet dose-réponse sur le dénombrement des plaques métaphasiques par blocage à la colchicine ( $4 \times 10^{-7}$  M) pendant les 2 dernières heures de culture. La présence de sérum de veau fœtal inactivé et filtré, double l'indice mitotique observé avec des doses croissantes de 20-hydroxyecdysone comprises entre  $10^{-8}$  et  $10^{-4}$  M. En effet, la pente de la droite de régression exponentielle cumulant le nombre de plaques métaphasiques pour 5 000 cellules est de 21 (la fonction exponentielle de corrélation étant :  $y = 21,029^{x^{0,1063}}$ ) en l'absence de sérum, alors qu'elle est de 42,9 (la fonction exponentielle de corrélation étant :  $y = 42,985^{x^{0,1108}}$ ) en présence de sérum. Dans le milieu dépourvu de sérum, l'indice mitotique n'est significativement pas différent en l'absence de 20-hydroxyecdysone qu'en la présence de faibles doses d'hormone ( $10^{-9}$  à  $10^{-7}$  M). Par contre en présence de sérum, la 20-hydroxyecdysone accroît l'indice mitotique dès  $10^{-8}$  M. Un effet plateau ou même inhibiteur de la 20-hydroxyecdysone en présence de sérum se manifeste au-delà de  $10^{-4}$  M.

Compte tenu de la présence de deux types cellulaires et de la non-synchronisation du cycle cellulaire des cellules épithéliales, nous avons exprimé la variation des populations de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire sous la forme d'un indice représentant le rapport  $G2 + M/G0 + G1$  multiplié par 100 (Fig. 1). Ce rapport traduit l'accumulation des cellules en phase  $G2 + M$ , lorsqu'on accroît les doses de 20-hydroxyecdysone de  $10^{-9}$  à  $10^{-5}$  M. L'analyse statistique démontre une corrélation logarithmique de ce rapport ( $y = 0,5212 \log x + 12,15$ ) en fonction de l'accroissement de la concentration d'hormone exprimée en micromoles. L'accumulation maximale des cellules en phase  $G2 + M$  est acquise à la concentration physiologique maximale du pic d'ecdystéroïdes hémolympatiques de la nymphe (1). Un effet plateau se manifeste de  $10^{-5}$  à  $10^{-4}$  M; une chute du rapport apparaît à  $10^{-3}$  M (soit 100 fois la dose physiologique maximale), ramenant ce dernier à une valeur comparable à la concentration 100 fois inférieure au pic physiologique. La culture témoin en l'absence d'hormone montre un rapport à peine significativement différent de la dose  $10^{-8}$  M de 20-hydroxyecdysone.

*Discussion.* — Le travail actuel n'a pas pour but d'entrer dans la polémique de la fonction prolifération et/ou différenciation de l'hormone de mue ou 20-OH Ecdysone (11 à 14), mais de démontrer que, dans les conditions expérimentales adoptées, cette hormone accélère le cycle cellulaire avant que ne s'instaure la différenciation par la production de protéines spécifiques de la glande annexe mâle du ver de farine produisant le spermatophore.

Nos travaux antérieurs (2, 3) ont établi, qu'à l'issue de l'élévation nymphale du titre hémolympatique de 20-OH Ecdysone, les cellules de la glande annexe, s'accumulent en phase G2 du cycle cellulaire. En effet, si l'on exprime les résultats récemment publiés (3) en utilisant le rapport  $G2 + M/G0 + G1$  (Fig. 2), on met en évidence, après le pic

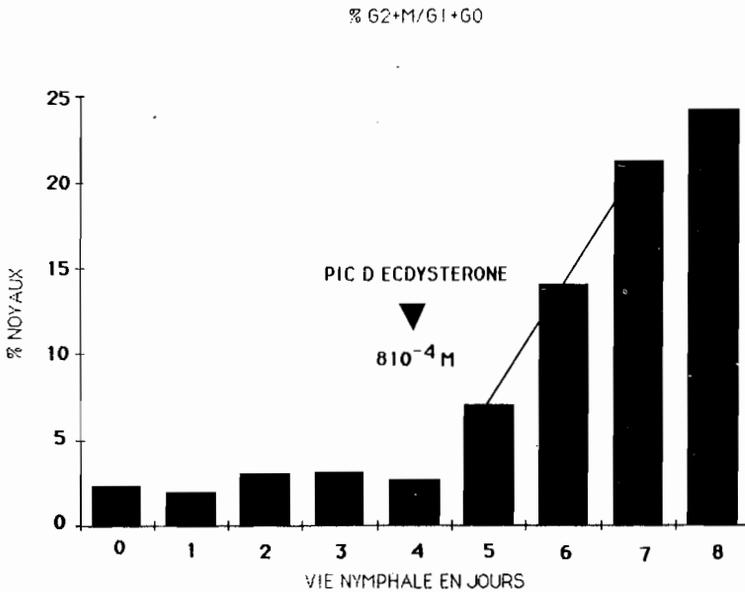


FIG. 2. — Évolution du rapport  $G2 + M/G0 + G1$  à chaque jour du développement nymphal (de 0 à 8 jours) à partir du dénombrement des % de noyaux dans les différentes phases du cycle, après prélèvement de la glande annexe mâle du ver de farine, selon (3).

(4<sup>e</sup> jour) d'ecdystéroïdes nymphal ( $6 \times 10^{-8}$  M) (1), une incrémentation des cellules en phase G2 jusqu'au jour 7. Cette accumulation en G2 culmine au jour 8 à l'indice 24, soit 10 fois plus qu'au jour 0 où l'hormone de mue n'est qu'à la concentration de  $10^{-7}$  M (1). La population de cellules en G1 décline pendant la nymphose de 30 % à près de 3 % au jour 8, moment de l'exuviation imaginale.

Nous constatons, qu'il y ait ou non présence de sérum (Fig. 1), que

les cellules cultivées à la concentration culminante d'hormone ( $10^{-5}$  M) sont, soit les plus nombreuses, bloquées significativement en plaques métaphasiques, soit les plus nombreuses accumulées en phase G2 en la présence de sérum. La non-prise en compte des cellules en phase S résulte de la procédure d'isolement des noyaux, rompant les figures métaphasiques bien qu'agrégées par la colchicine et libérant les chromosomes ( $n = 10$ ) (15) dans le bruit de fond hors des canaux G1 et G2 du cytofluorimètre. L'étude cytonumérique des plaques métaphasiques par squashes à l'orcéine acétique compense cette lacune. L'amplification du nombre de plaques métaphasiques par le sérum de veau fœtal inactivé et filtré suggère l'intervention de facteurs de croissance. L'effet amplificateur du sérum (Eurobio), dès la dose  $10^{-8}$  M par rapport à l'absence de sérum *in vitro*, suggère un mécanisme de seuil déclenché par de l'hormone de mue, pour de telles doses qui sont physiologiques *in vivo*. Les doses maximales *in vitro*  $10^{-4}$  M et  $10^{-3}$  M, suggèrent un effet de rétro-contrôle négatif *in vivo*. L'utilisation de sérum Seromed, n'a révélé d'effet amplificateur qu'à la dose de  $10^{-4}$  M, significativement différent de ce que l'on observe en l'absence de sérum (Fig. 3). La courbe dose-réponse de l'accumulation des cellules en G2 soulève de nombreuses questions.

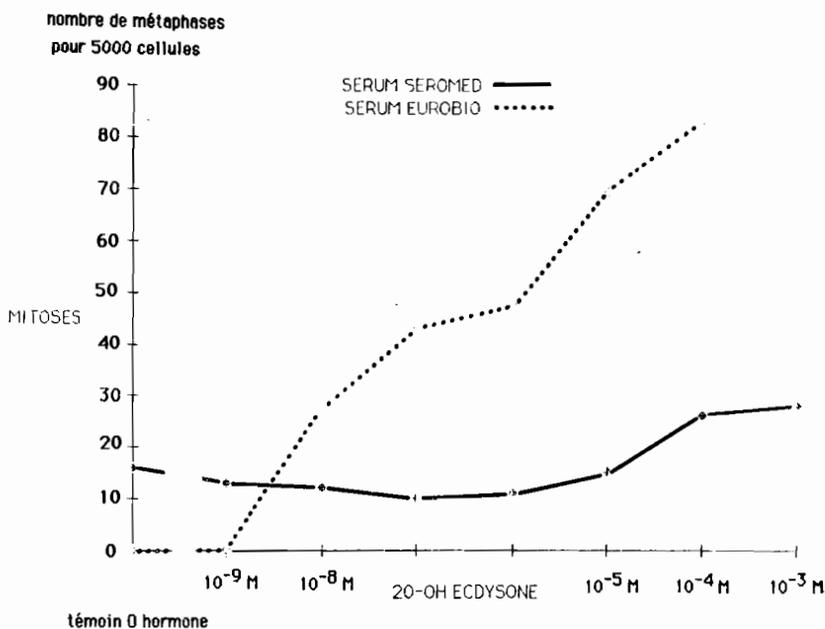


FIG. 3. — Évolution des plaques métaphasiques sur une même mise en culture en utilisant deux sérums inactivés et filtrés (Seromed, Eurobio) en présence de doses croissantes de 20-OH Ecdysone, selon le même protocole que pour la figure 1.

Plus on accroît la concentration de 20-OH Ecdysone par unité de temps, en bloquant par la colchicine le cycle cellulaire en métaphase, plus on recrute de cellules en G1, afin de les faire circuler dans ce cycle. En d'autres termes, le résultat le plus important de cette expérimentation est de recruter d'autant plus de cellules que la dose d'hormone est élevée, dans l'intervalle des doses physiologiques, en raccourcissant les transitions G1, S, G2. La question est de savoir, si les cellules évoluent vers une immobilisation spontanée en G2 ou si l'hormone ne fait que lancer les cellules dans le cycle sans être responsable de leur blocage en phase G2 (16, 17, 18). La présence de colchicine conduit à penser que les cellules, bien qu'immobilisées en phase M, offrent un point de contrôle en G1 du cycle cellulaire par l'hormone de mue en plus du point de contrôle en G2, démontré par la culture d'organes (3) en présence d'hydroxyurée. Les cellules d'insecte présenteraient comme la levure (19), 2 points de contrôle en G1 et en G2 au cours du cycle cellulaire. La question se pose de savoir, si cette double commutation des cellules au cours du cycle (20) fait intervenir les protéines kinases et/ou l'activation du « Mitotic Promoting Facteur » (MPF), si par ailleurs ce stéroïde qu'est l'hormone de mue agit en commutateur en amont des points de contrôle.

L'intérêt de notre matériel expérimental est d'avoir permis de mettre en évidence qu'une même hormone, la 20-OH Ecdysone, conduit le cycle cellulaire par commutation en G1 et G2 (Fig. 4). Notre expérimentation suggère une unicité dans le monde vivant du ou des points de contrôle, en posant le problème de l'homologie du rôle des gènes *cdc*

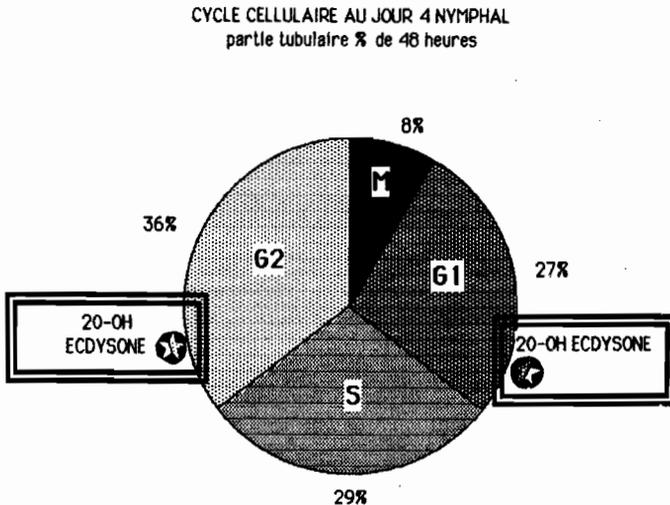


FIG. 4. — Schématisation hypothétique de deux points de contrôle (\*) du cycle cellulaire de la partie tubulaire de la glande, selon Happ et coll. (2). La colchicine bloque en phase M, l'hydroxy-urée en début de phase S.

de la levure (19, 20, 21), du MPF chez l'amphibien (22) et de la protéine p34 des cellules Hela du mammifère (20), ainsi que le suggère par ailleurs le rôle de l'Ecdysone sur l'ovocyte en méiose du Criquet (23) et de la 20-OH Ecdysone sur l'ovocyte de *Manduca* (24) (\*\*).

## BIBLIOGRAPHIE

1. Delbecque J. P., Thèse, Dijon, 1983, 59 p.
2. Happ G. M., McLeod B. J., Szopa T. M., Bricker C. S., Lowell T. C., Sankel J. H. & Yuncker C., *Dev. Biol.*, 1985, 107, 314-324.
3. Yaginuma T., Kai H. & Happ G. M., *Dev. Biol.*, 1988, 126, 173-181.
4. Lenoir-Rousseaux J. J. & Gautron J., *C. R. Soc. Biol.*, 1986, 180, 704-712.
5. Barranco S. C., Ed. by H. Busch, S. T. Crooke & Y. Daskal, *Acad. Press*, 1979, 19, 455-473.
6. Darzynkiewicz Z., Ed. by E. Gray & Z. Darzynkiewicz, *Humana Press*, 1986, 9, 255-290.
7. Darzynkiewicz Z., Traganos F. & Kimmel M., Ed. by E. Gray & Z. Darzynkiewicz, *Humana Press*, 1986, 10, 291-335.
8. Puck T. T. & Steffen J., *Biophys. J.*, 1963, 3, 379-397.
9. Pollack A. & Moulis H., Block N. & Irvin III G. L., *Cytometry*, 1984, 5, 473-481.
10. Dailey P. J., Gadzama N. M. & Happ G. M., *J. Morphol.*, 1980, 166, 289-322.
11. Besson M. T., Cordier G., Quenedey B., Quenedey A. & Delachambre J., *Cell. Tissue Kinet.*, 1987, 20, 413-425.
12. Fain M. J. & Alvarez C., *J. Insect. Physiol.*, 1987, 33, 697-705.
13. Kato Y. & Riddiford L. M., *Development*, 1987, 100, 227-236.
14. O'Connor J. D. & Stevens B., Gene regulation by steroid hormones II, Ed. by A. K. Roy & J. H. Cark, Springer-Verlag N. Y., 1983, 5, 93-99.
15. Weith A., *Chromosoma* (Berl.), 1985, 91, 287-296.
16. Quenedey A., Quenedey B., Delbecque J. P. & Delachambre J., *Cell. Tissue Res.*, 1983, 232, 493-511.
17. Stevens B., Alvarez C. M., Bohman R. & O'Connor J. D., *Cell.*, 1980, 22, 675-682.
18. Stevens B. & O'Connor J. D., *Dev. Biol.*, 1982, 94, 176-182.
19. Murray A. W., *Nature*, 1987, 327, 14-15.
20. Draetta G. & Beach D., *Cell.*, 1988, 54, 17-26.
21. Breeden L. & Nasmyth K., *Nature*, 1987, 329, 651-654.
22. Dunphy W. G. & Newport J. W., *J. Cell Biol.*, 1988, 106, 2047-2056.
23. Lanot R., Thiebold J., Costet-Coriot M. F., Benveniste P. & Hoffmann J. A., *Dev. Biol.*, 1988, 126, 212-214.
24. Friedländer M. & Reynolds S. E., XVIII Int. Congress Entomol., 1988, 111C3, 121.
25. Szopa T. M., Lenoir-Rousseaux J. J., Yuncker C. & Happ G. M., *Dev. Biol.*, 1985, 107, 325-336.

(\*\*) Nous remercions tout particulièrement C. Rey ainsi que S. Vibert-Guigue pour leur aide technique.

Nous voudrions également remercier pour leurs critiques constructives J. Delachambre, J. P. Delbecque et A. Quenedey. Ce travail est dédié aux membres du laboratoire de Biologie Animale et de Cytologie de Paris XII et plus particulièrement aux Professeurs Le Moigne et J. Gautron.