

Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie
Université de Tlemcen

Sénescence et Mort cellulaire

Techniques d'analyse

Dr. Zeyneb HADJIDJ
hadjidj.z@gmail.com



Identification des cellules apoptotiques

L'identification des cellules apoptotiques est basée sur ses caractéristiques :

Morphologiques

Biochimiques

Moléculaires



Evènements apoptotiques

1. Stade précoce :

- Translocation de la phosphatidylsérine vers le feuillet externe de la membrane plasmique
- Perte du potentiel de la membrane mitochondriale
- Libération du cytochrome C et de l'ATP
- Activation des caspases-8 et 9

2. Stade intermédiaire :

- Activation des caspase-3, 6 et 7
- Rétrécissement cellulaire
- Activation des nucléases

3. Stade avancé :

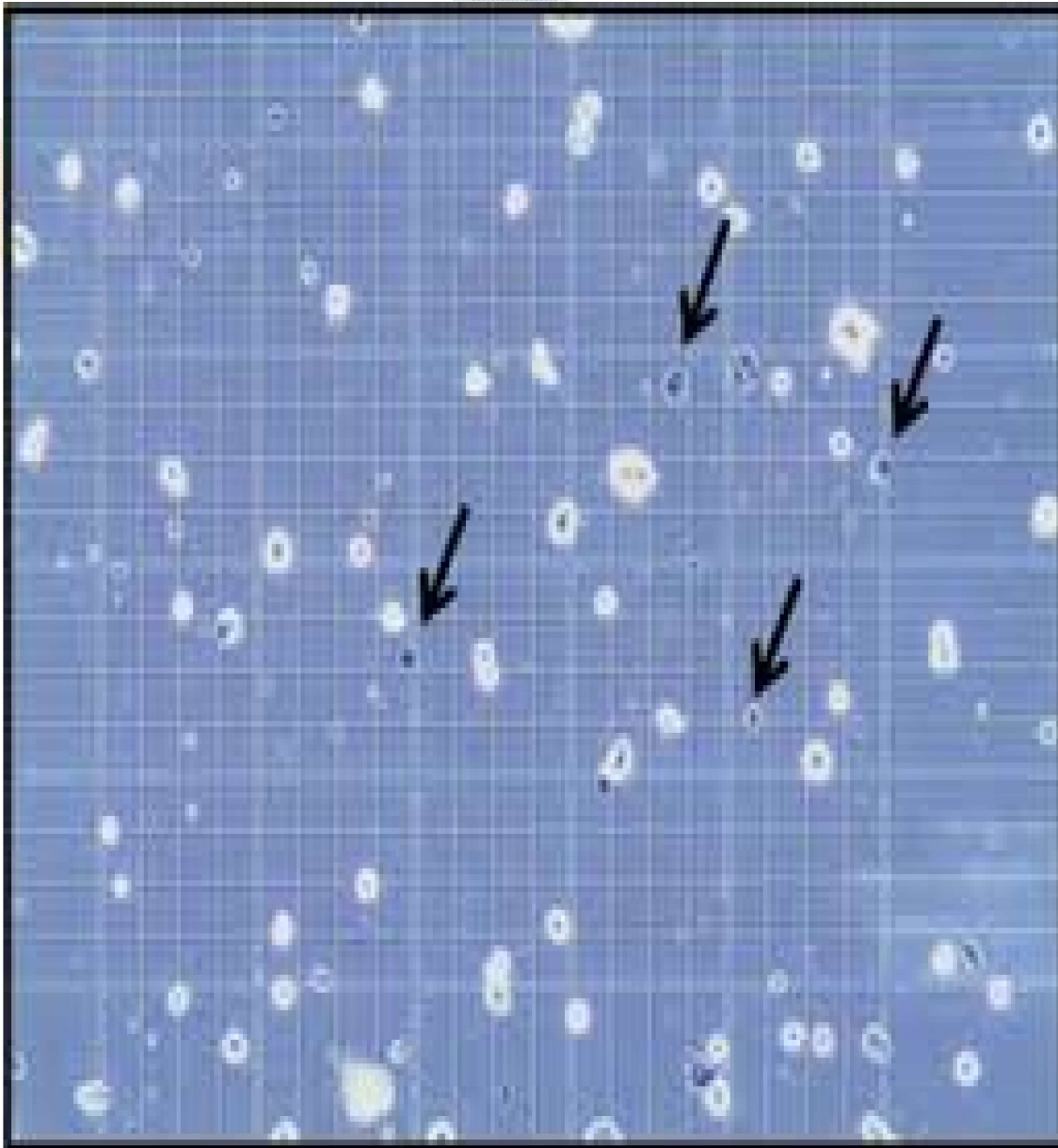
- Fragmentation de l'ADN
- Effondrement nucléaire
- Formation de corps apoptotiques
- Phagocytose par les macrophages



Colorants de viabilité

- Test d'exclusion au Bleu Trypan (TBET)
- MTS ou MTT,

- Offrent une indication générale sur la survenu de l'apoptose
- Doivent être approfondies par d'autres techniques plus spécifiques



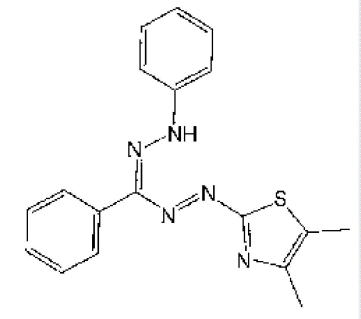
**Test d'exclusion au
bleu Trypan (TBET)**

Aspirate media
MTT solution

3 ½ h
DMSO solubilization

Absorbance 570 nm

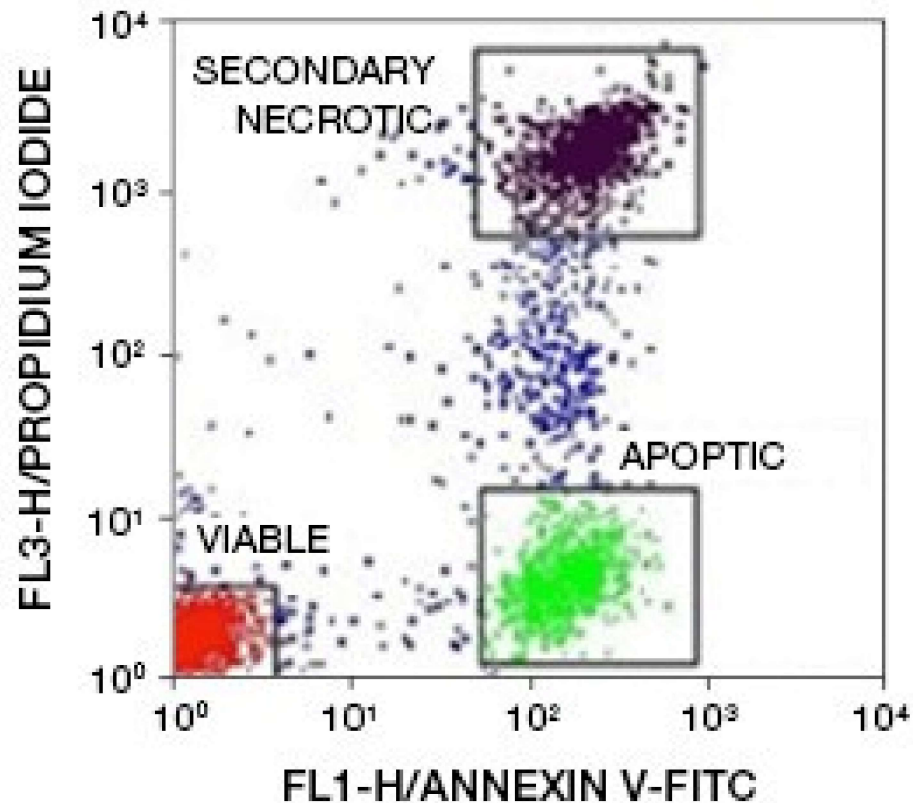
Mitochondrial Reductase



Purple Formazan

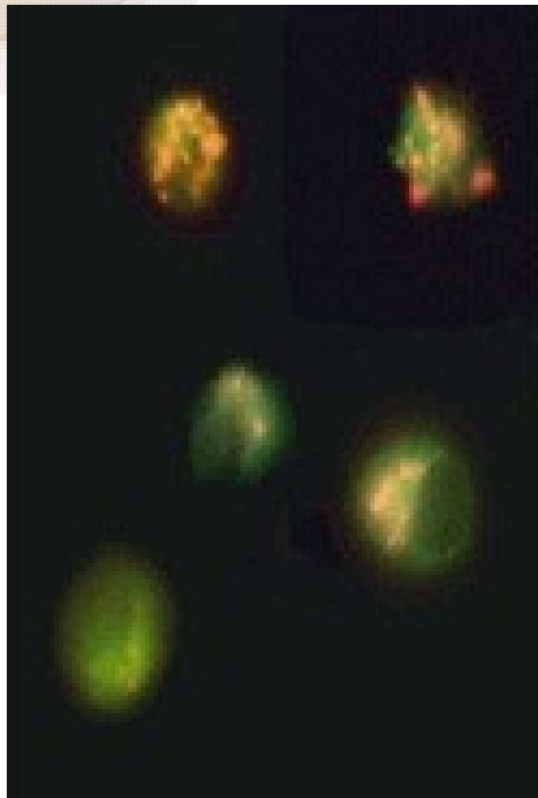
Test MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium)

L'externalisation de la phosphatidylsérine (PS)



- Conjugués d'annexine-V
- Annexine V versus iodure de propidium
- Cytométrie en flux
- Microscopie à fluorescence

Membrane mitochondriale



- Ester éthylique de tétraméthylrhodamine (TMRE)
- Ester méthylique de tétraméthylrhodamine (TMRM)
- JC-1

Activation des caspases

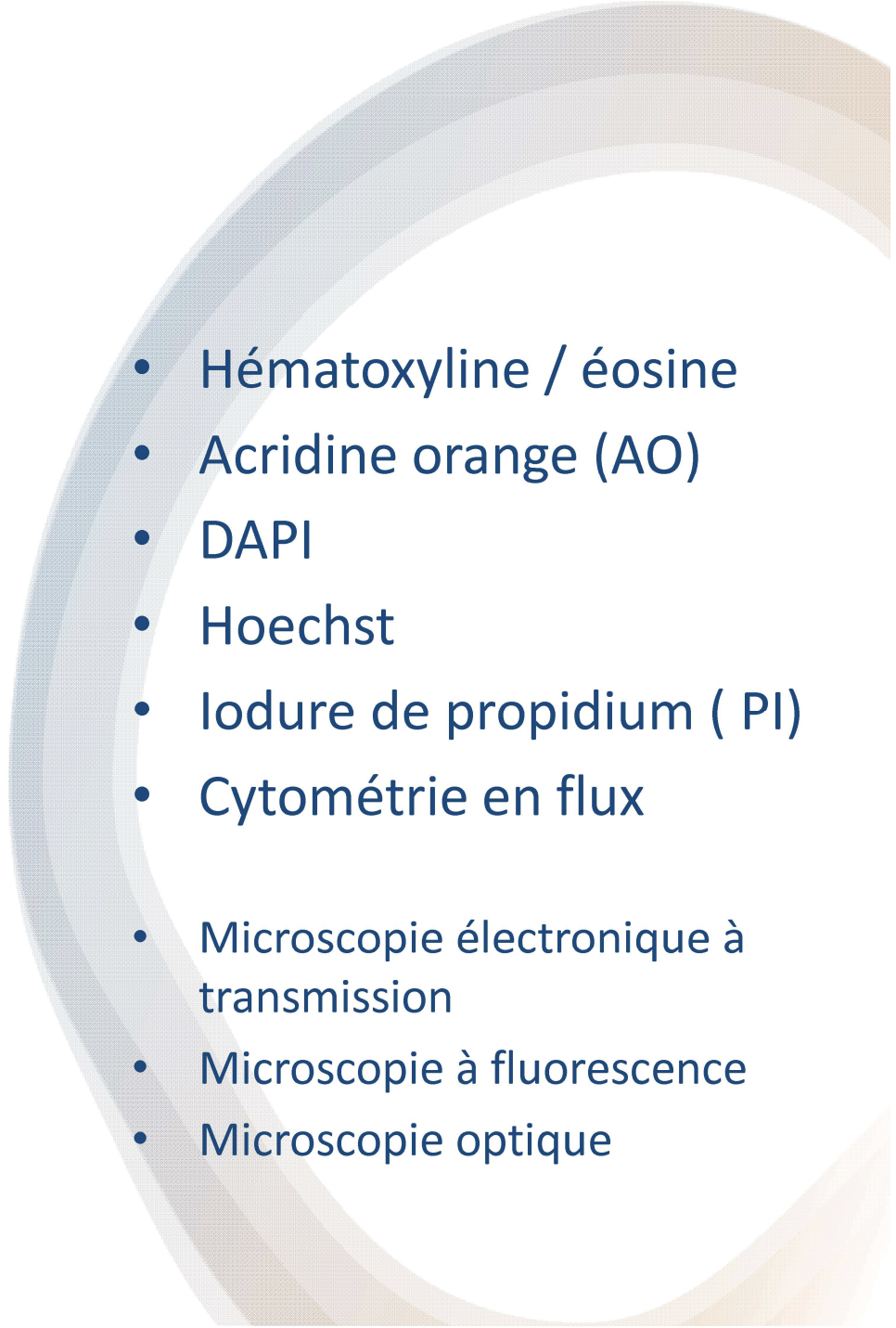
Pro-caspases clivés :

- Caspases initiateurs activés
- Caspases exécuteurs activés

- Western blot
- Immunofluorescence
- immunohistochimie

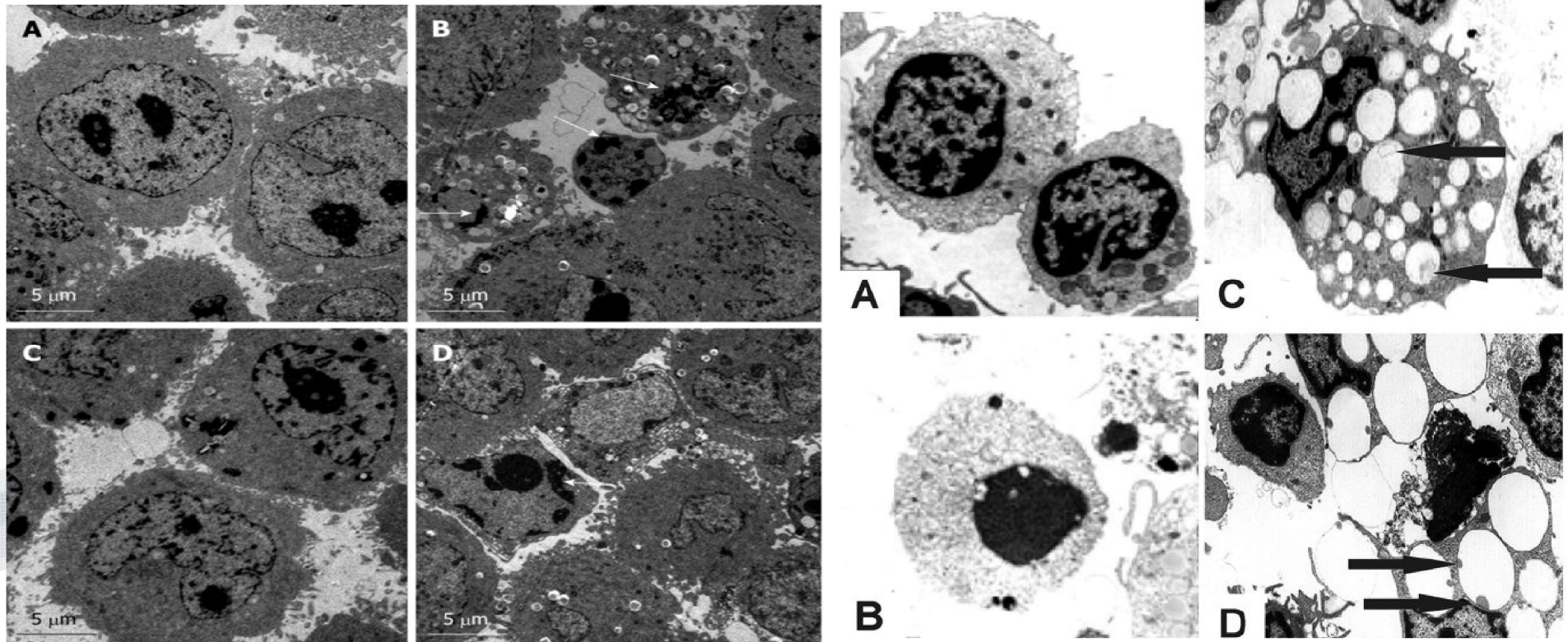


Changements morphologiques

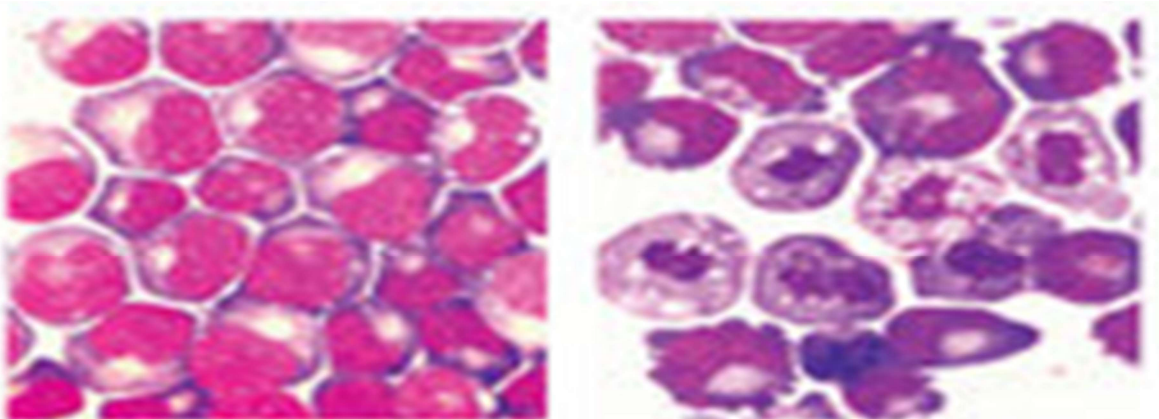
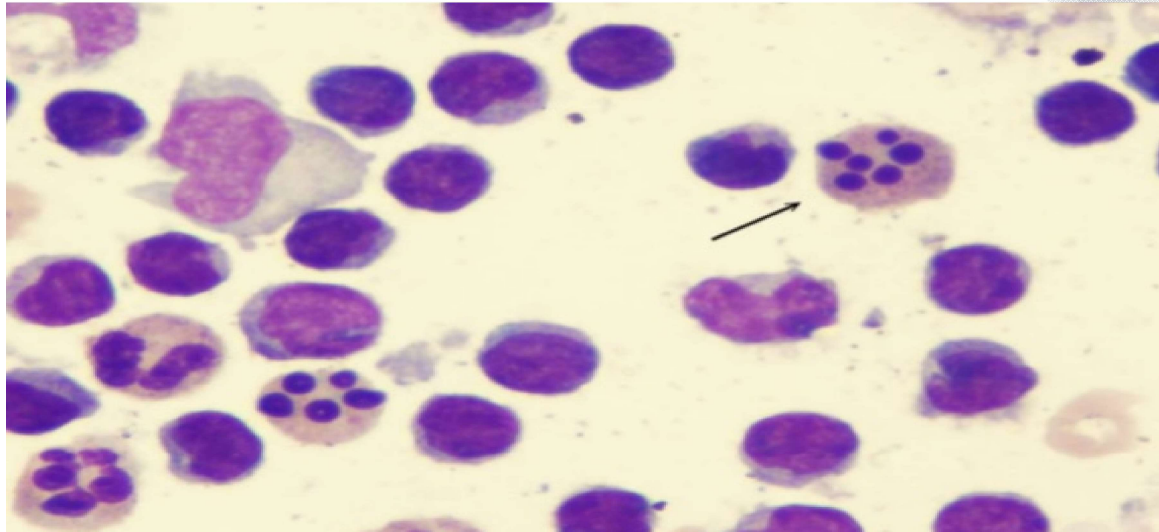
- 
- Hématoxyline / éosine
 - Acridine orange (AO)
 - DAPI
 - Hoechst
 - Iodure de propidium (PI)
 - Cytométrie en flux

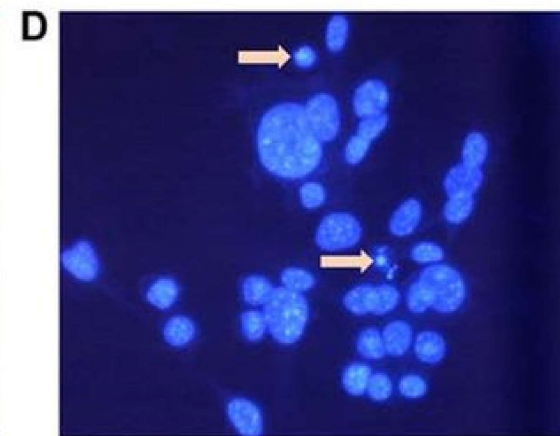
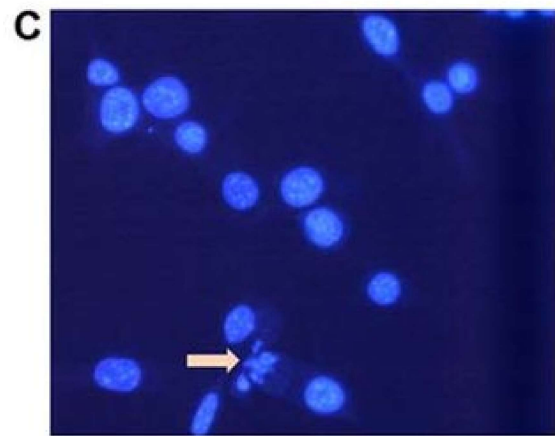
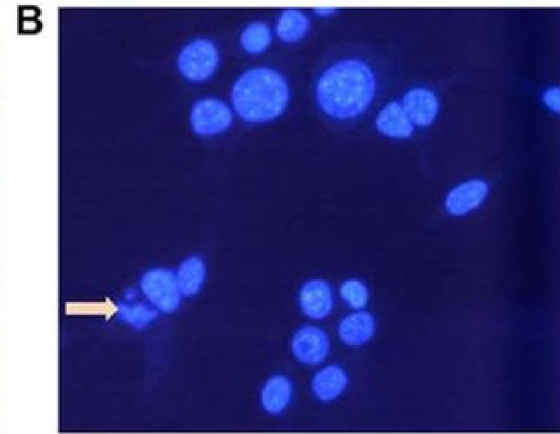
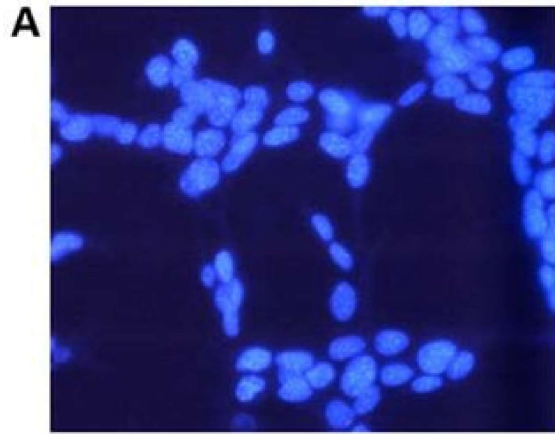
 - Microscopie électronique à transmission
 - Microscopie à fluorescence
 - Microscopie optique

Microscopie électronique à transmission



Microscopie optique

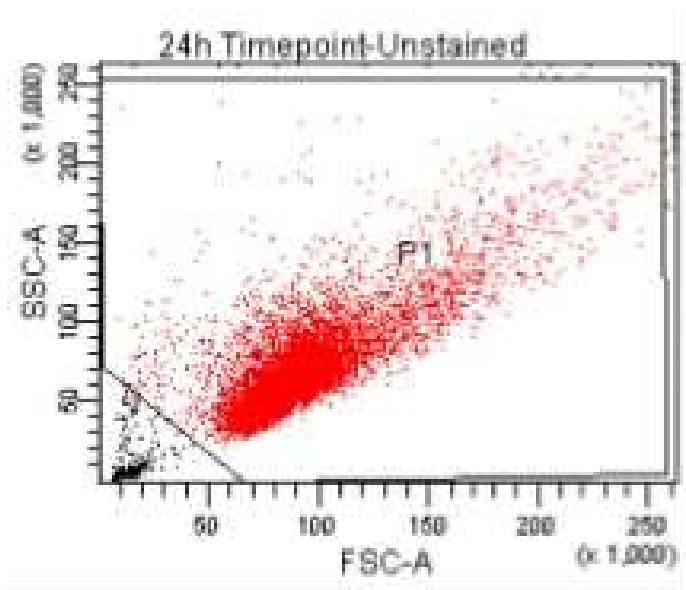




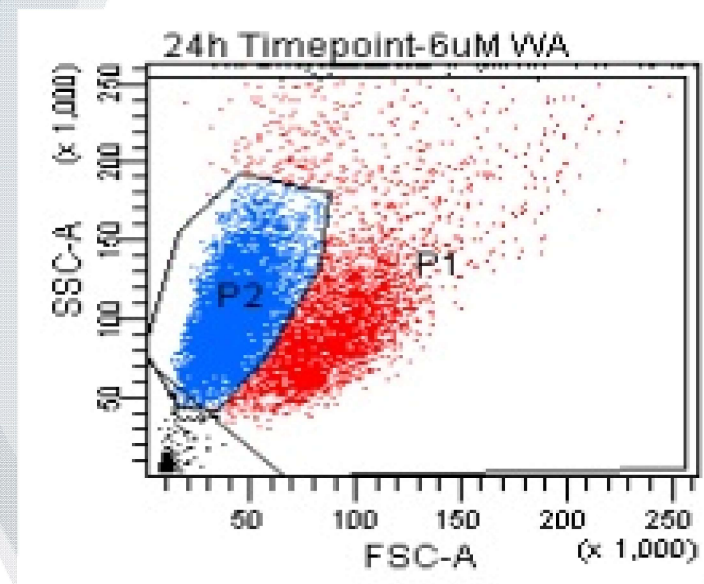
Hoechst et DAPI

Rétrécissement cellulaire

- Microscopie
- Cytométrie en flux

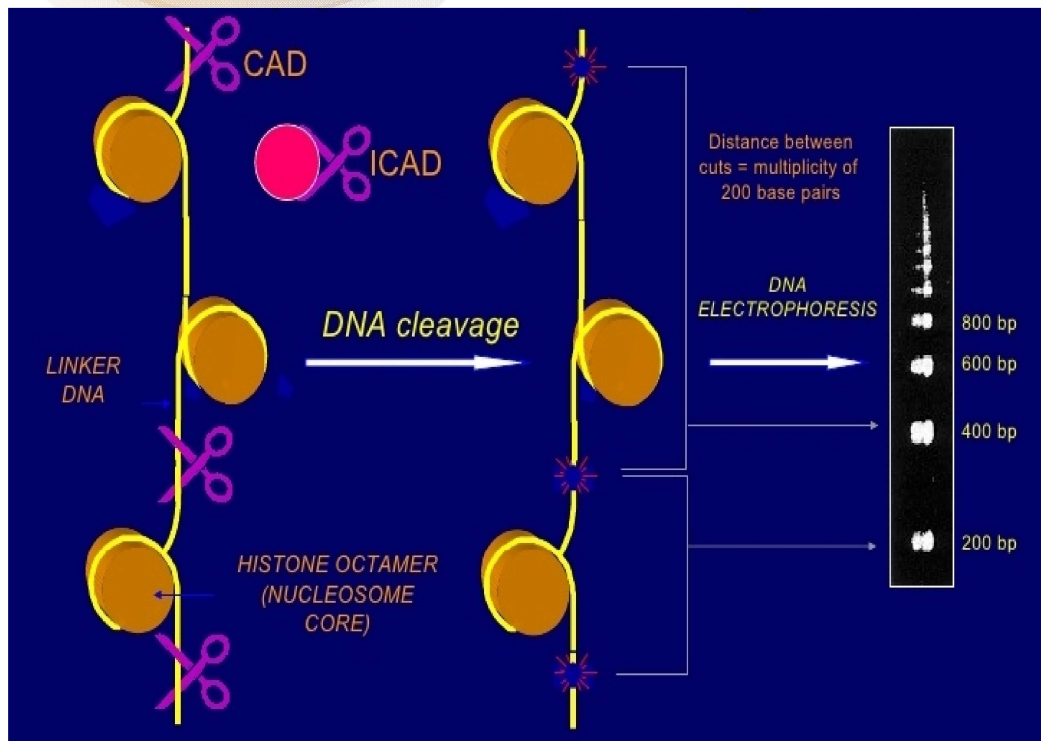


Cellules normales



Cellules apoptotiques

Fragmentation d'ADN



La détection des fragments d'ADN est réalisée par :

- Electrophorèse sur gel d'agarose
- Méthode TUNEL
- Méthode Sub-G1

Fragmentation d'ADN

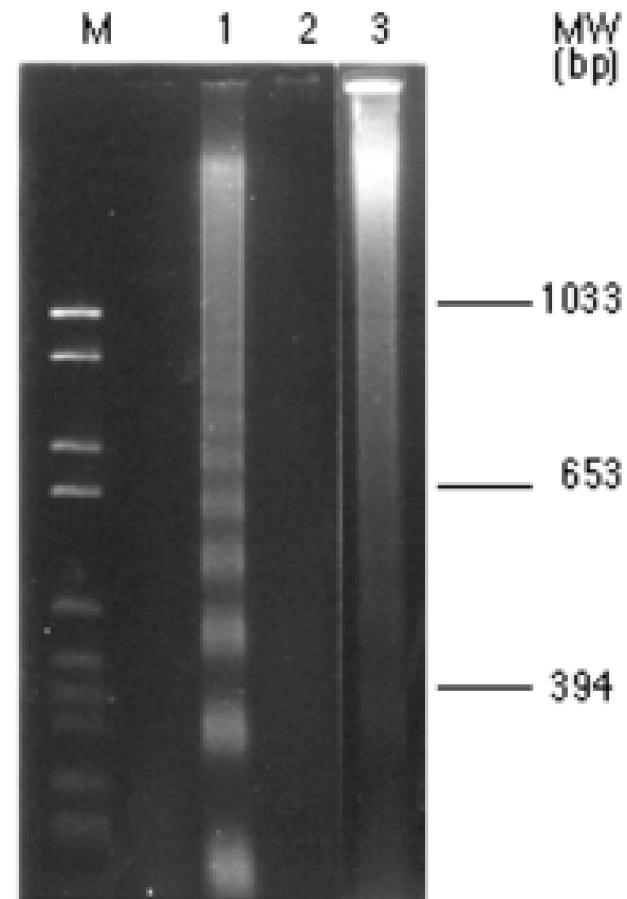
Électrophorèse d'ADN de cellules Jurkat traitées avec une molécule cytotoxique sur un gel d'agarose conventionnel

M: marqueur de poids moléculaire

Zone 1 : ADN de cellules apoptotiques,

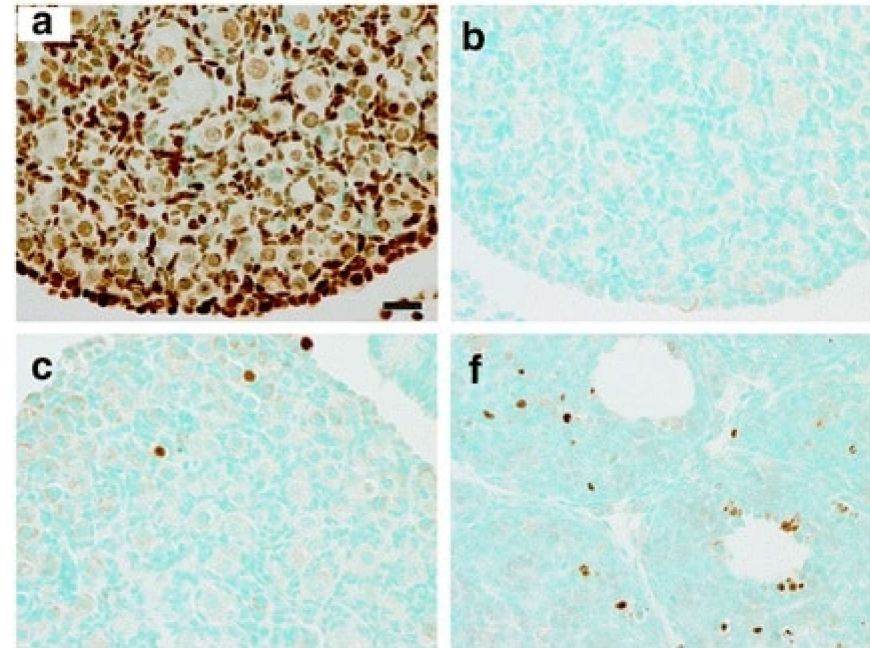
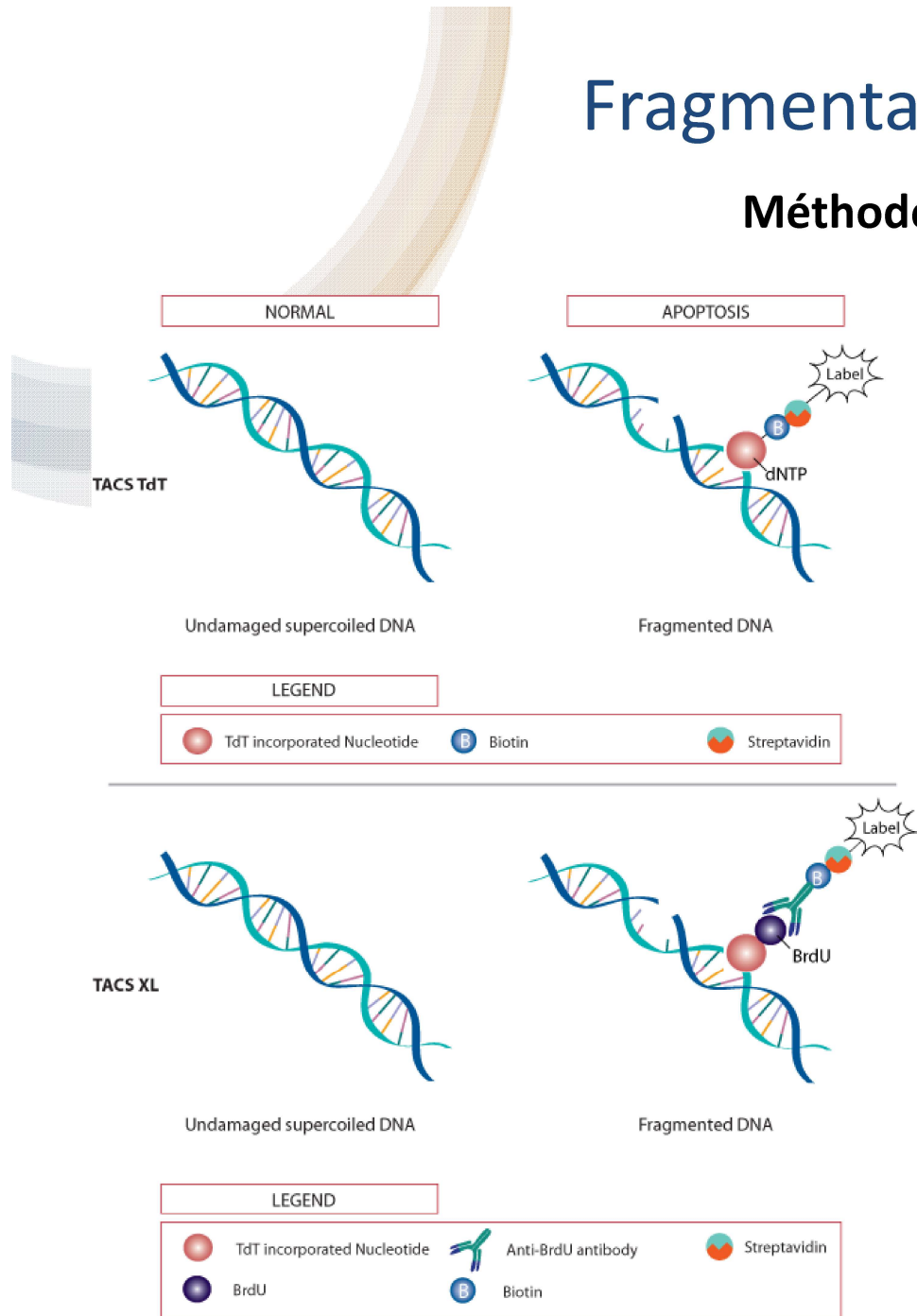
Zone 2 : ADN de cellules non traitées

Zone 3: ADN de cellules nécrotiques,



Fragmentation d'ADN

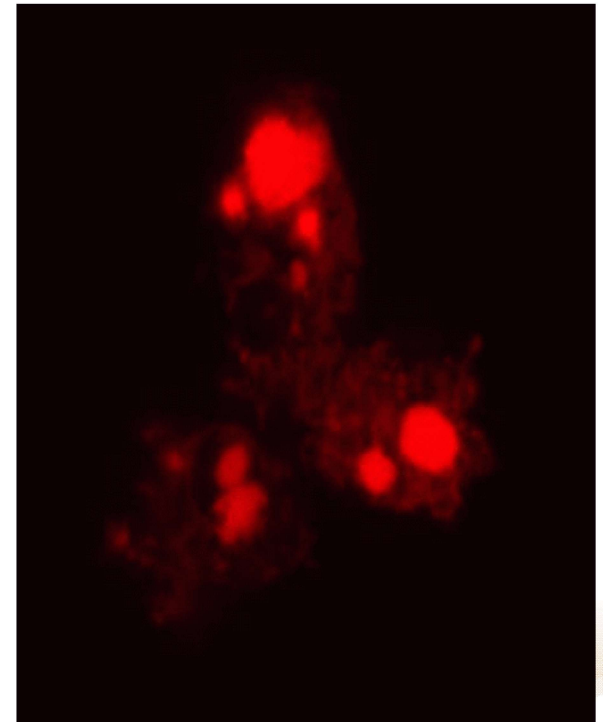
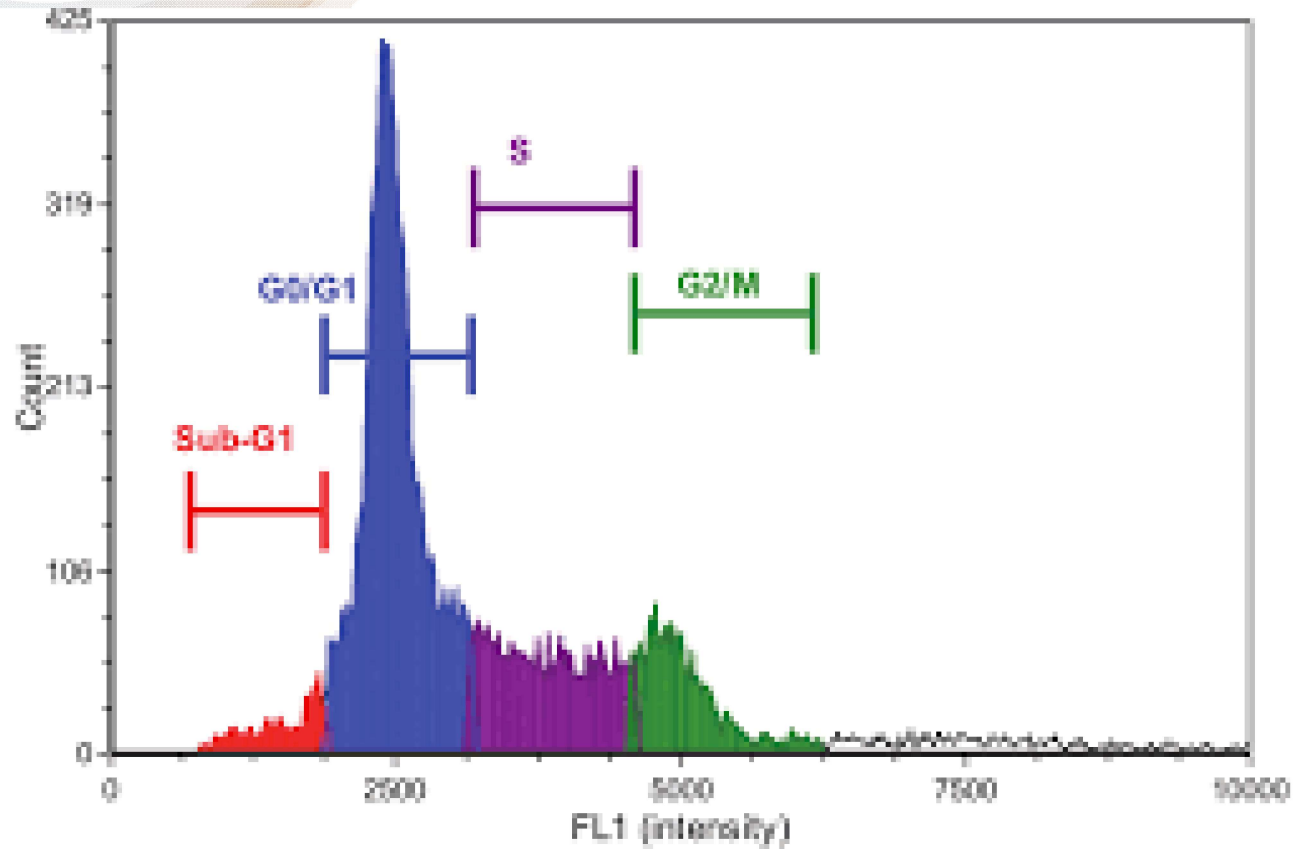
Méthode TUNEL



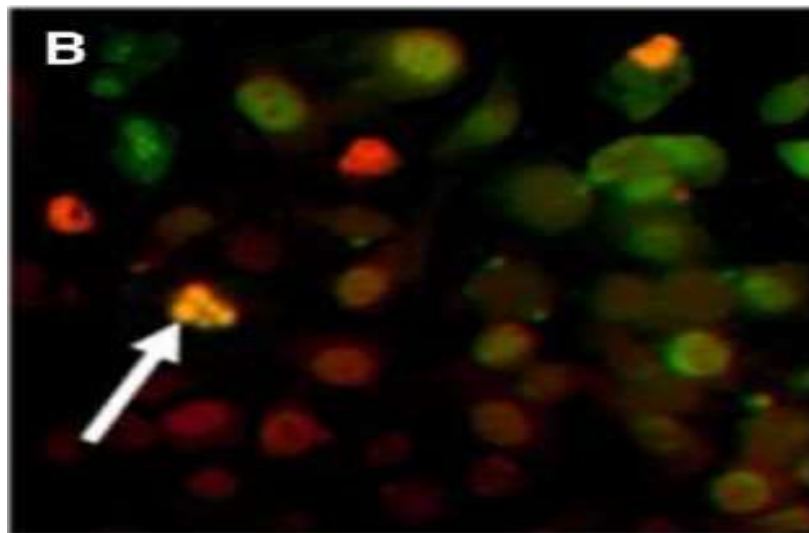
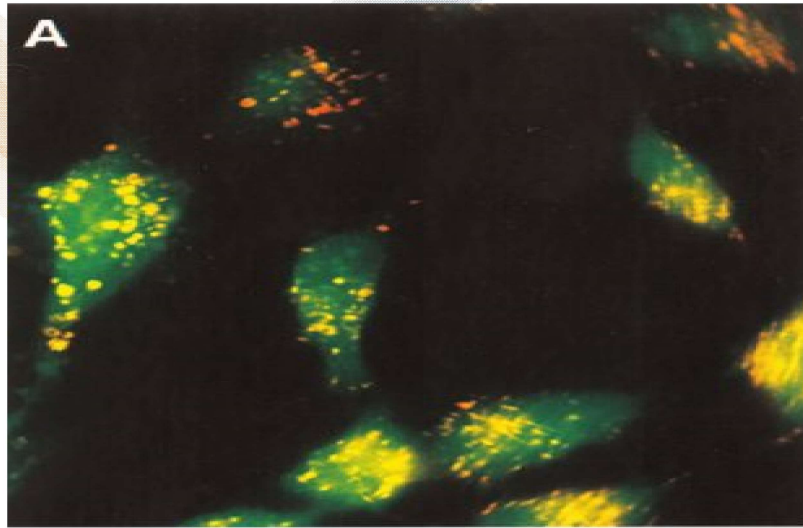
a. contrôle positif. b. Contrôle négatif sans enzyme TdT. c et f. images expérimentales représentatives. Les noyaux colorés avec le test TUNEL sont bruns. Les coupes sont contre-colorées avec du vert de méthyle.

Fragmentation d'ADN

Méthode Sub-G1



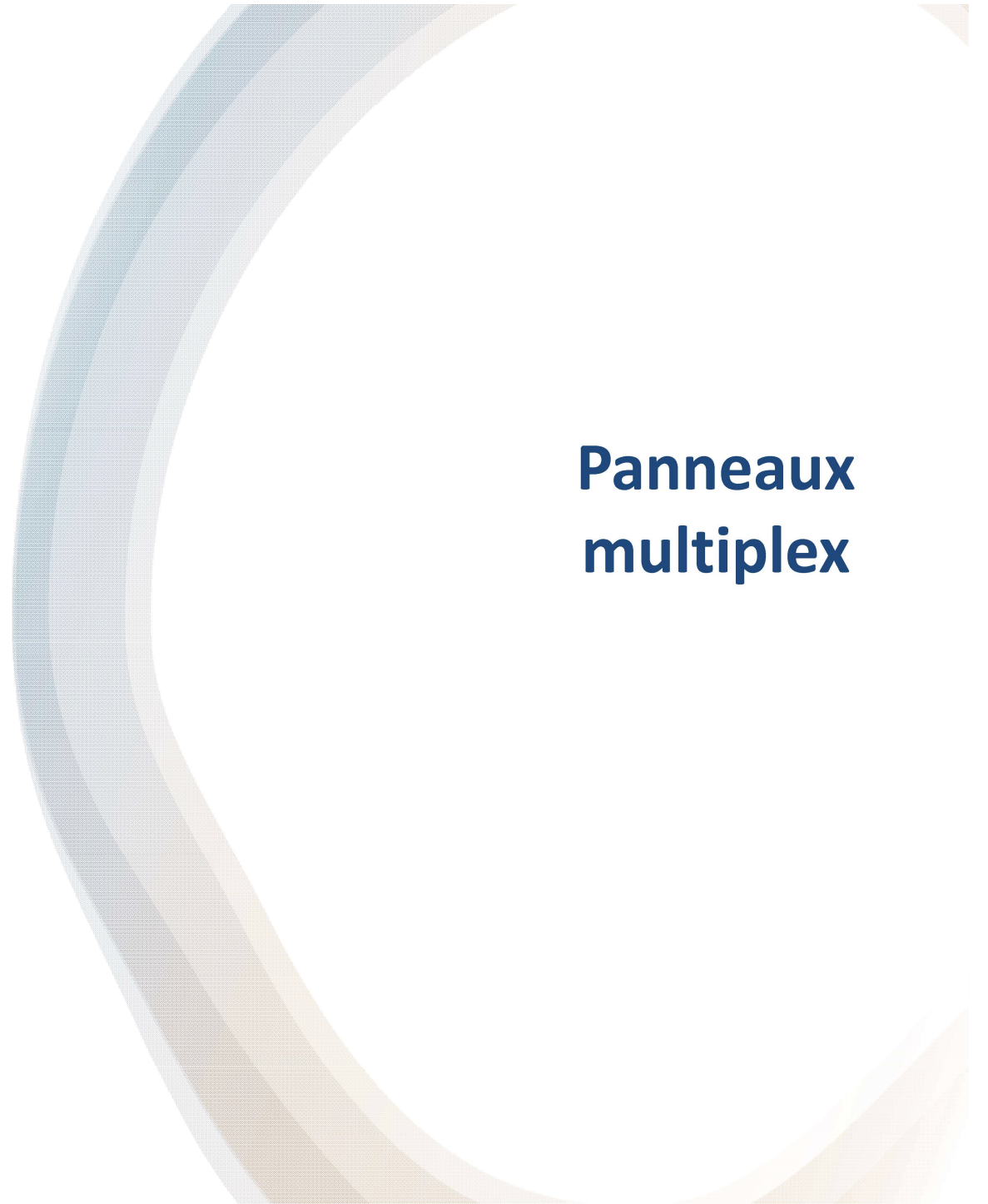
Corps apoptotiques



- Orange d'acridine (AO)
- Hématoxyline + éosine
- Cytométrie en flux
- Microscopie optique
- Microscopie électronique

Analyse
immunologique de
plusieurs marqueurs
d'apoptose à la fois

**Panneaux
multiplex**



Contrôles positifs et négatifs

- Contrôle positif
- Contrôles traités dans les mêmes conditions pour tenir compte des effets des solvants : contrôle négatif
- Contrôles spécifiques à l'application pour contrôler des facteurs tels que l'autofluorescence dans les expériences d'immunofluorescence : : contrôle négatif
- Contrôles de charge pour le transfert en Western blot.

Bibliographie

- <https://doi.org/10.1385/1-59745-213-0:279>
- <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb1803s12>
- <https://doi.org/10.1038/nrd3373>
- <https://www.abcam.com/kits/apoptosis-assays>
- <https://www.merckmillipore.com/INTL/en/life-science-research/antibodies-assays/assays-overview/apoptosis/5vKb.qB.1QkAAAFAD6M.1ZcK,nav?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F>