

Les mitochondries sont des organelles à double membrane que l'on croit avoir été intégrées dans la structure des cellules eucaryotes via la symbiose de protéobactéries dans une cellule anaérobie pré-eucaryote (hôte) il y a 1,5 à 2 milliards d'années. Selon la pensée moderne (pionnière par Mitchell;), un rôle essentiel des mitochondries est de produire de l'ATP via la phosphorylation oxydative (OXPHOS). Dans ce processus, l'énergie chimique stockée dans les nutriments (glucides, graisses, etc.) est convertie en un gradient électrochimique à travers la membrane mitochondriale interne via les complexes de la chaîne de transport d'électrons (ETC). Ce gradient électrochimique agit comme une réserve d'énergie. L'ATP synthase utilise cette énergie stockée pour convertir l'ADP en ATP. Cette image du rôle dans la bioénergétique des mitochondries est maintenant largement acceptée. Un second rôle de la mitochondrie est dans la voie dite de l'apoptose intrinsèque. Cette voie converge (au sens figuré et littéralement) à la membrane de la mitochondrie. Sur certains signaux de mort cellulaire [tels que les espèces réactives de l'oxygène (ERO), dommages à l'ADN, etc.], la membrane externe des mitochondries devient suffisamment perméable pour libérer le cytochrome C (CytC), ainsi que l'endonucléase G Smac/Diablo et d'autres protéines de l'espace intermembranaire, qui activent de façon irréversible les caspases en aval pour réaliser le processus d'apoptose.

L'apoptose est la mort cellulaire programmée qui s'accompagne de nombreux changements morphologiques et biochimiques de l'architecture cellulaire. Cela résulte non seulement de la mort cellulaire, mais aussi de l'élimination efficace des cellules apoptotiques par les phagocytes. Les cellules apoptotiques présentent un nombre de caractéristiques communes qui comprennent : le rétrécissement cellulaire, et de la membrane plasmique, le détachement cellulaire, la condensation nucléaire, la fragmentation de l'ADN, l'externalisation de la phosphatidylsérine (PS) et l'activation des caspases. En revanche, la mort cellulaire nécrotique est caractérisée par une membrane plasmique rapide, un gonflement des organites et une rupture de la membrane plasmique sans aucune des caractéristiques de l'apoptose. En dehors des stress physiques sévères, la mort cellulaire nécrotique résultent souvent des activités de l'infection virale et les activités des toxines bactériennes. Alors que la mort cellulaire nécrotique est caractérisée par la libération de «signaux de danger» endogènes et l'inflammation subséquente, l'apoptose est largement tolérigénique. Par conséquent, des précautions doivent être prises lors de l'évaluation si les cellules meurent via l'apoptose ou la nécrose.

Ici, nous mettons en évidence un certain nombre de tests, en utilisant la **cytométrie en flux**, pour déterminer si les cellules ont subi l'apoptose ou d'autres modes de mort cellulaire.

Détection d'ADN fragmenté comme signe de la mort cellulaire apoptotique par cytométrie en flux

La fragmentation de l'ADN intranucléosomale est une **caractéristique majeure de l'apoptose**. La fragmentation de l'ADN peut être évaluée par cytométrie de flux. L'analyse de l'état de réplication d'une population cellulaire (profil du cycle cellulaire) peut être facilement réalisée avec le colorant fluorescent Propidium iodide (PI), qui se lie stoechiométriquement aux acides nucléiques entraînant une émission de fluorescence proportionnelle à la teneur en ADN de la cellule. La logique derrière l'approche est la suivante: les cellules quiescentes et G1 ont deux copies chromosomiques, tandis que les cellules subissant une mitose G2 / M ont le double de la quantité d'ADN et auront donc le double de l'intensité de fluorescence des cellules G1. Les cellules en phase S auront un signal fluorescent entre G1 et G2 / M, car ces cellules synthétisent l'ADN sur leur chemin vers G2 / M (figure 1A).

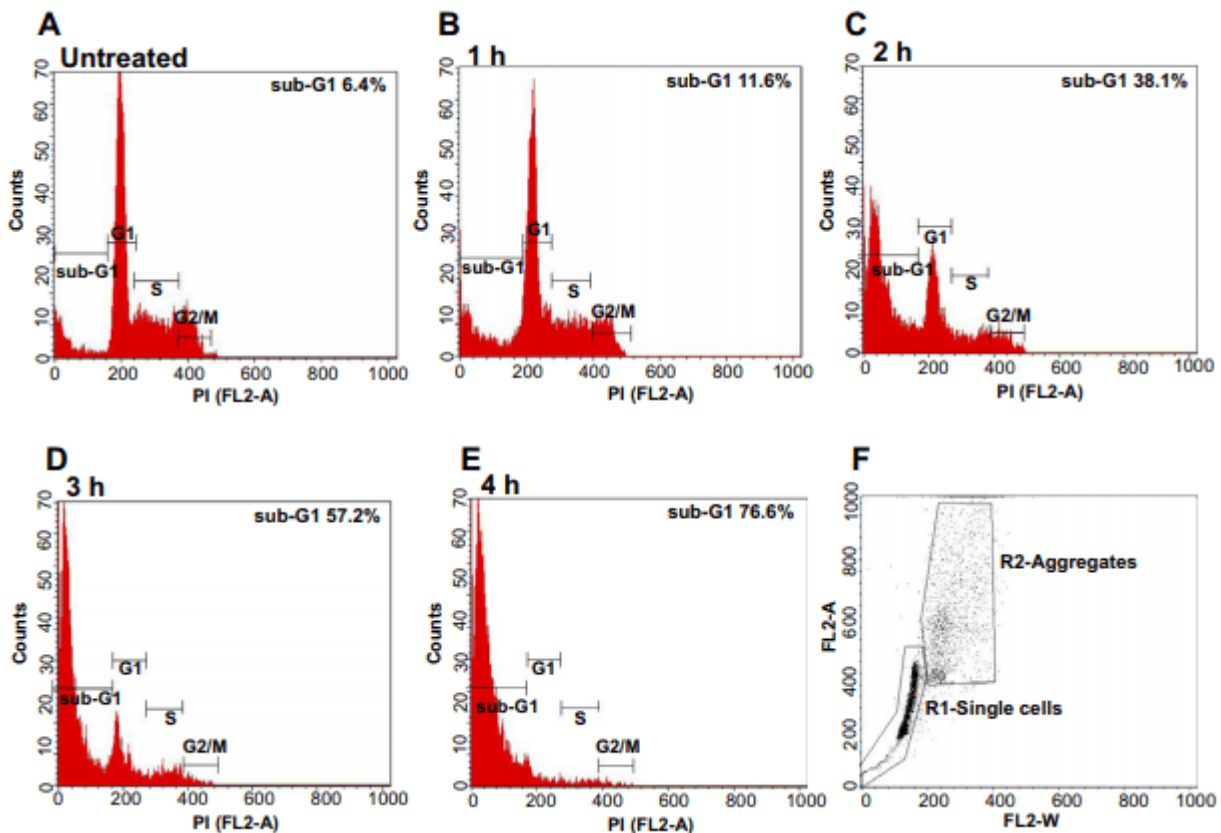


Figure 1. Mesure de la fragmentation de l'ADN pendant l'apoptose par cytométrie de flux.

Les cellules Jurkat ont été traitées avec 200 ng / ml d'anti-Fas (CH-11). Les cellules ont été récoltées aux points temporels indiqués (A-E) et analysées par cytométrie de flux. (F) Gating stratégie pour discriminer les agrégats de cellules à partir de cellules individuelles.

En raison de la génération de fragments d'ADN de faible poids moléculaire pendant l'apoptose, les cellules subissant l'apoptose peuvent être facilement identifiées sur des histogrammes de contenu d'ADN sous forme de cellules avec une fraction hypodiploïde ou « sub-G1 » (figure 1B-E). La teneur en ADN cellulaire est mesurée en utilisant un colorant fluorescent après fixation cellulaire avec de l'éthanol. La fixation cellulaire ne retient pas les petits fragments nucléaires dans les cellules apoptotiques. Ces fragments d'ADN de faible poids moléculaire s'échappent pendant les étapes de lavage suivantes. En conséquence, les cellules apoptotiques contiennent une fraction d'ADN relative aux cellules viables qui peuvent être facilement distinguées par cytométrie de flux.

Méthodologie

Le protocole suivant est adapté aux cellules en suspension, cependant, si vous utilisez des cellules adhérentes n'oubliez pas de récolter le surnageant (cellules apoptotiques tardives se détachent et flotter dans le milieu) en plus des cellules adhérentes / semi adhérentes sur la plaque et procéder comme indiqué ci-dessous:

1. L'apoptose a été induite dans 2×10^6 cellules Jurkat par incubation avec 200 ng / ml d'anticorps anti-Fas (CH-11) pendant 1 à 4 h. Les cellules sont récoltées aux points de temps désirés et centrifugées à 400 g pendant 5 minutes. Les cellules sont lavées avec du PBS pH 7,2 et centrifugées à 400 g pendant 1 minute.
2. Resuspendre les cellules dans 1 ml d'éthanol glacé à 70% et incuber pendant au moins 1 h à -20°C pour fixer (les cellules peuvent être conservées jusqu'à 6 mois à -20°C).
3. Centrifuger les cellules à 2500g pendant 5 min (une vitesse de centrifugation plus élevée est nécessaire car les cellules fixées deviennent flottantes et peuvent ne pas réussir à s'agglomérer ou coller sur le côté de l'épendorf). Aspirer l'éthanol sans perturber le culot cellulaire et remettre en suspension avec 1 ml de tampon de lavage phosphate-citrate (Na₂HPO₄ 200 mM, acide citrique 100 mM) suivi par une centrifugation à 2500 g pendant 1 min.
4. Pour colorer les noyaux, préparer du PBS pH 7,2 contenant de l'iodure de propidium 10 µg / ml et de la RNase A 100 µg / ml (inclus pour dégrader l'ARN et empêcher la coloration PI de l'ARN) et incuber avec les cellules pendant 30 min.

5. Les échantillons sont prêts pour l'analyse par cytométrie de flux (pas besoin de laver PI / RNase mais cela peut être fait si désiré).

Réglage des paramètres corrects pour l'analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux

Quelques considérations doivent être prises en compte lors de l'utilisation de la cytométrie en flux pour l'analyse du cycle cellulaire:

A) Assurez-vous que le canal de fluorescence 2 (FL2) est réglé sur une échelle linéaire (LIN). Il est plus difficile de distinguer la fluorescence différentielle entre les pics G0 / G1 et G2 / M sur une échelle logarithmique (LOG). L'amplification LIN permet une séparation nette entre les pics G0 / G1 et G2 / M.

B) Un problème commun à contrôler pendant l'analyse du cycle cellulaire est l'agrégation des cellules. Par exemple, les cellules peuvent coller ensemble et traverser simultanément l'interception laser du cytomètre de flux. Dans les deux cas, deux cellules de G0 / G1 collées ensemble ou traversant l'interception laser en même temps auront une signature de fluorescence équivalente à une cellule dans G2 / M. Par conséquent, le nombre d'événements enregistrés comme G2 / M sera être artificiellement élevé. Une façon d'exclure ces événements consiste à exclure les événements de cellules non uniques de l'analyse en utilisant les propriétés de dispersion (FSC / SSC).

C) Pour faire la distinction entre l'agrégation cellulaire et les cellules individuelles, sélectionnez un tracé avec le paramètre FL2-A comme axe y et FL2-W comme axe des x (figure 1F). Les cellules individuelles (G0 / G1 ou G2 / M) auront des valeurs de largeur d'impulsion (FL2-W) similaires, mais les agrégats auront des valeurs de largeur d'impulsion plus grandes (en raison de l'augmentation de la largeur des cellules). Dans l'exemple (figure 1F), des cellules individuelles ont été déclenchées (cellules individuelles R1) et les histogrammes FL2-A (figure 1A-E) ont été formatés pour afficher uniquement les événements dans cette région (R1-cellules uniques) .

Sources:

[ScienceDirect](#) Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry

[Magazine Science](#).