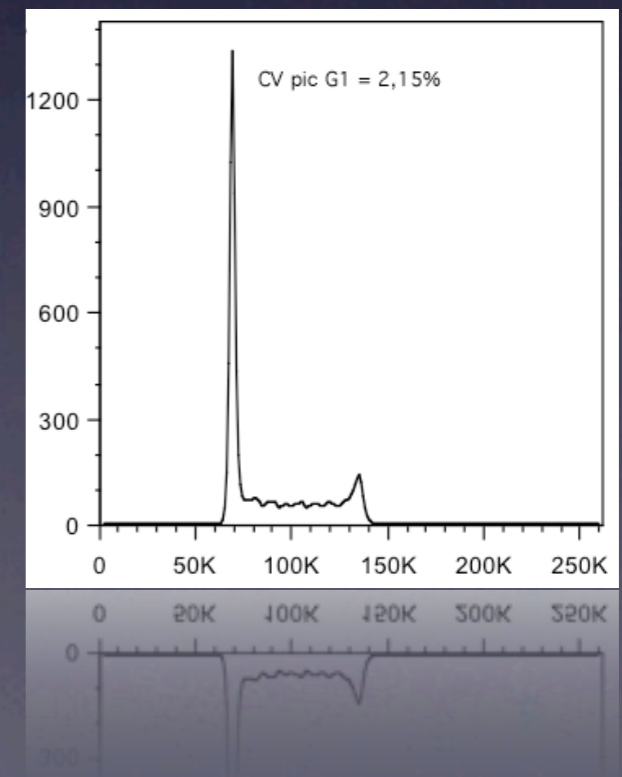


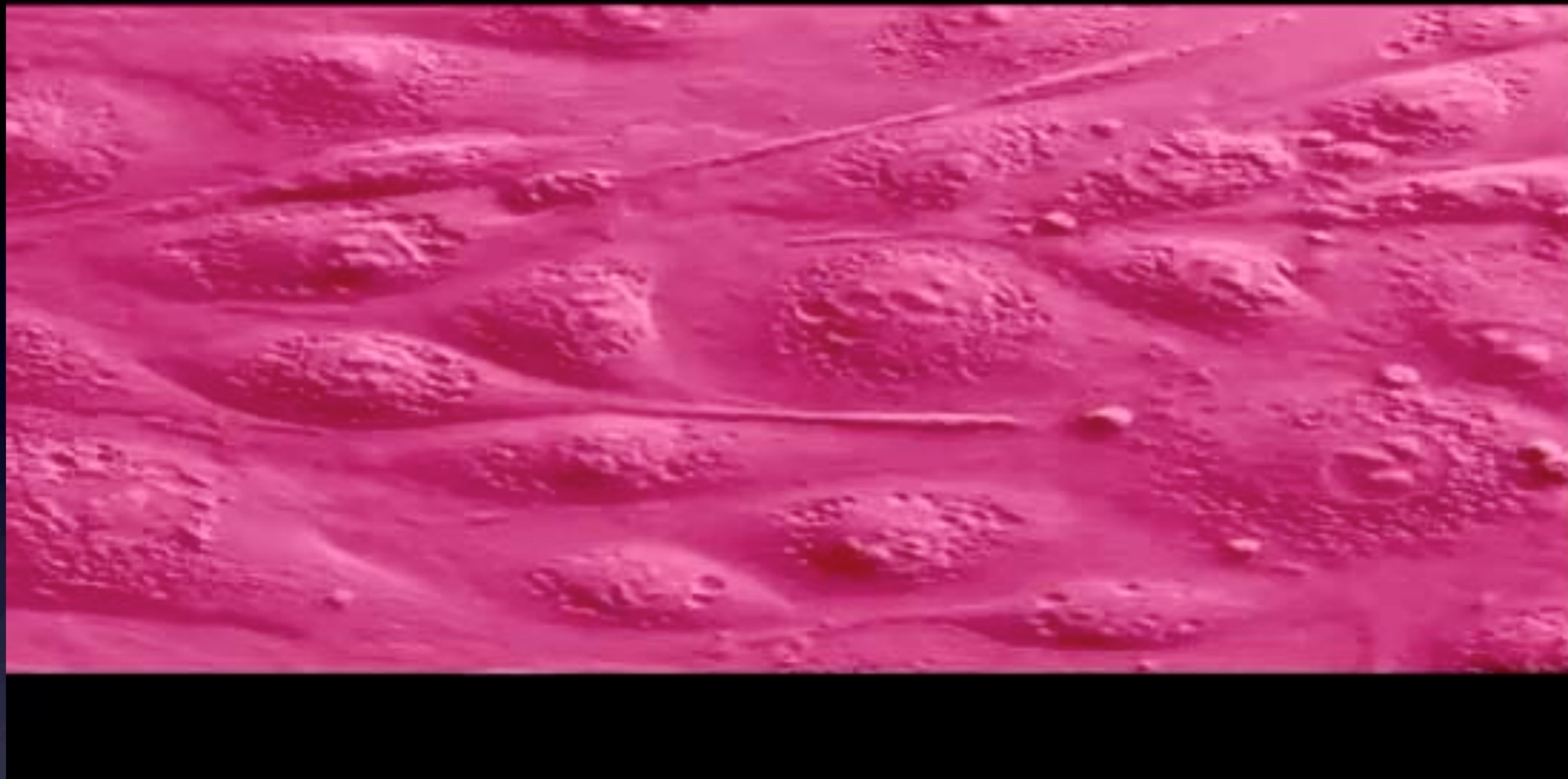
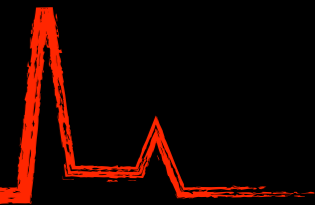
Les Fluorochromes du cycle cellulaire

Préparation des cellules, choix de la sonde, prolifération

Jean-François Mayol

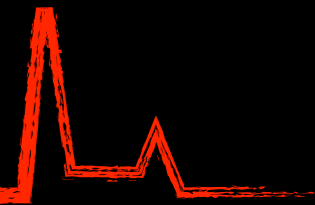


Le Cycle Cellulaire

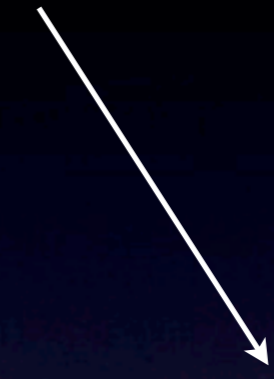


Processus primordial pour l'homéostasie tissulaire
Régulation très fine, avec de nombreuses zones
d'ombre

Le Cycle Cellulaire



Perturbation du cycle cellulaire



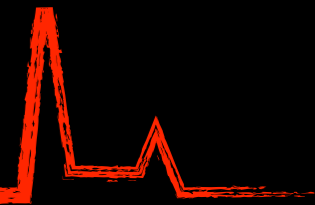
Arrêt du cycle
Sénescence

Mort cellulaire

Prolifération
incontrôlée



Le Cycle Cellulaire



Intérêt de l'étude du cycle cellulaire

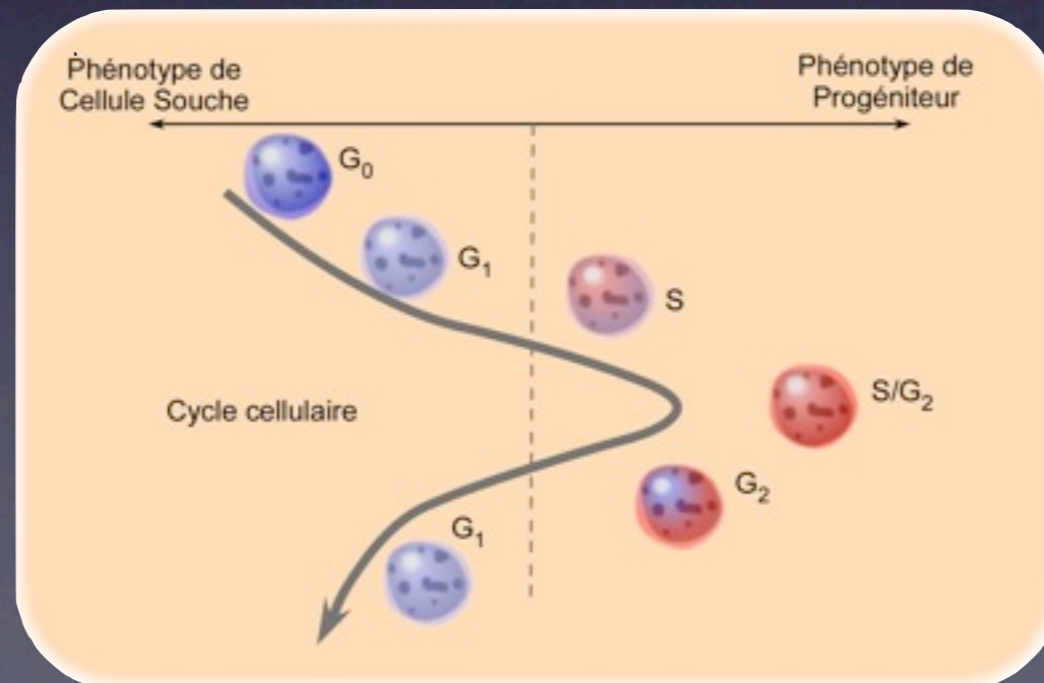
Pharmacologie anti-cancéreuse

Diagnostic clinique

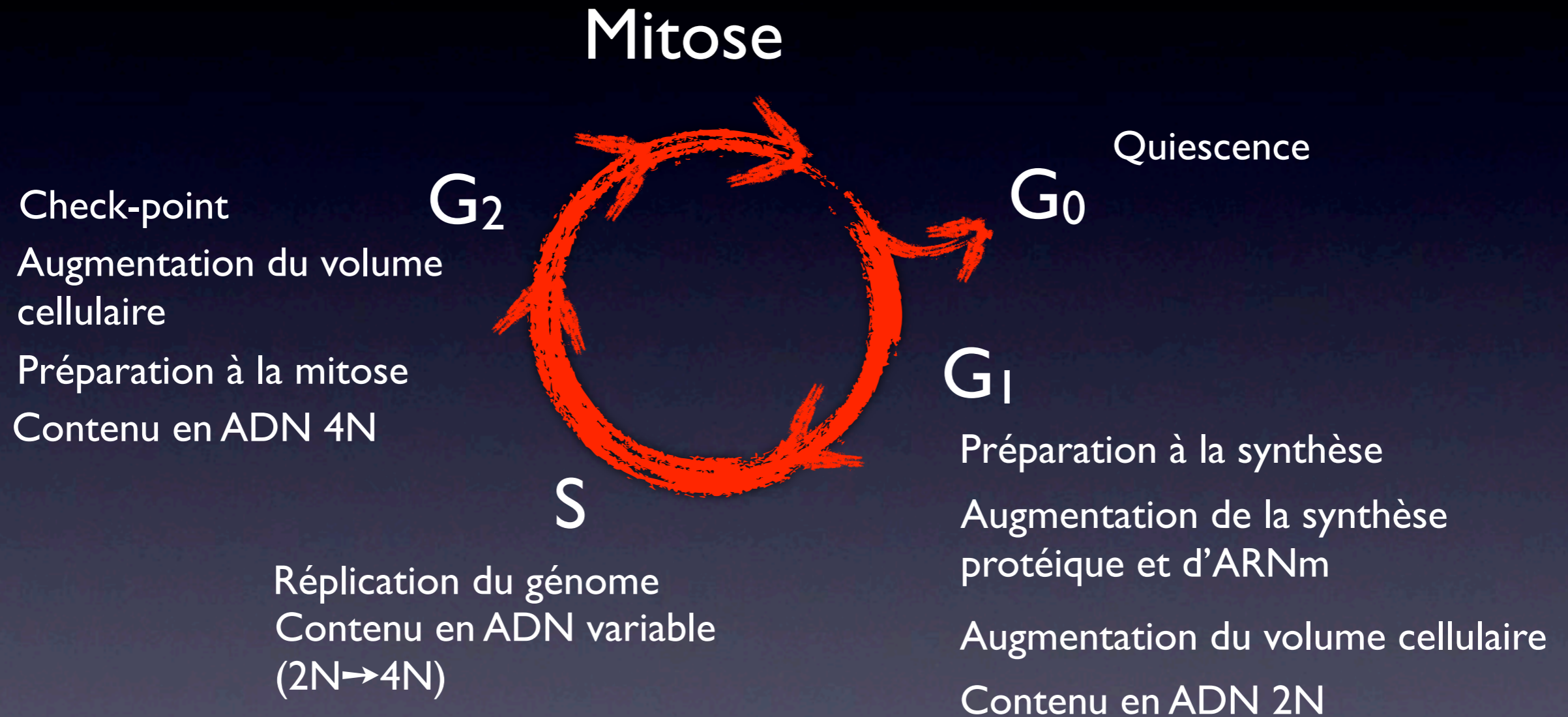
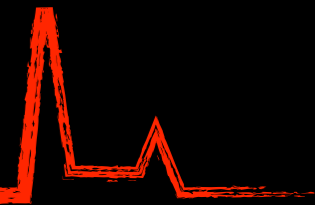
Etudes des effets d'agents génotoxiques

Etude de la prolifération

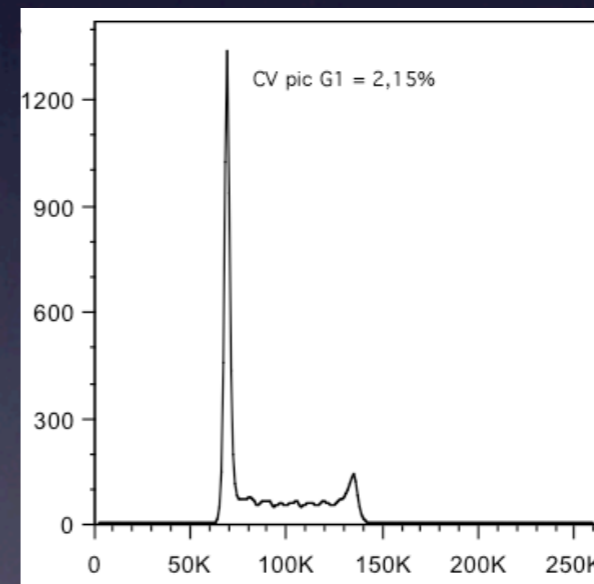
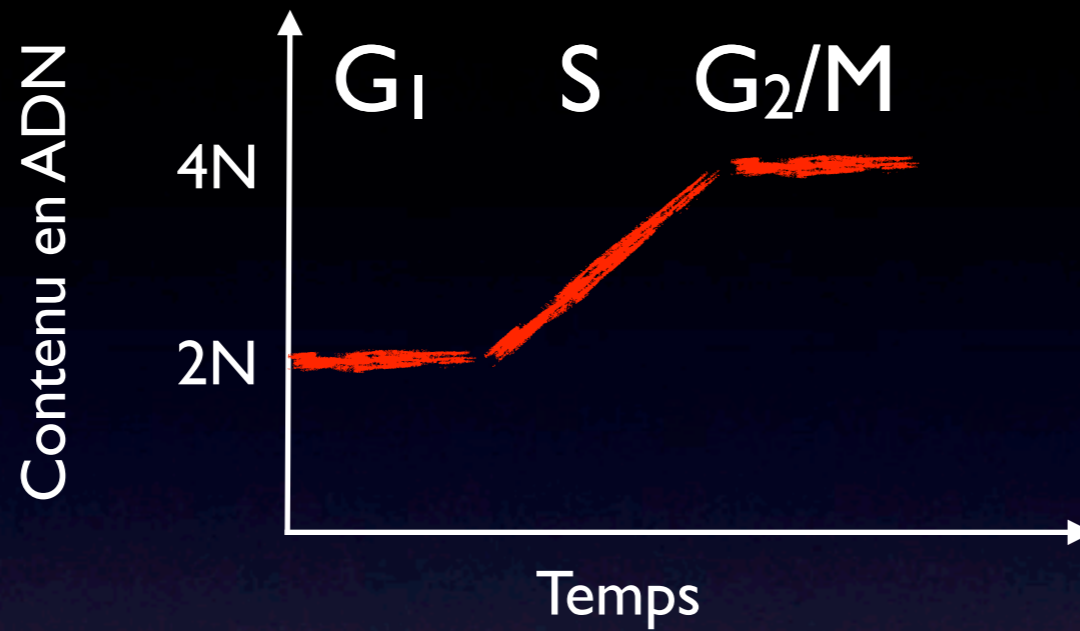
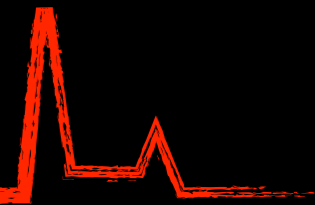
Cycle cellulaire et fonctionnalité cellulaire




Les Phases du cycle



Les Phases du cycle



Cycle cellulaire = contenu en ADN



Les fluorochromes pour l'analyse du cycle cellulaire

La préparation des cellules

Cuisine : comment avoir un bon CV

La prolifération cellulaire

Les fluorochromes



Dapi Hoechst TO-PRO-3 7-AAD
Iodure de Propidium
Bromure d'éthidium DRAQ 5 Acridine Orange
Pyronine Y Vybrant Dye Cycle
Chromomycine A3 Sytox

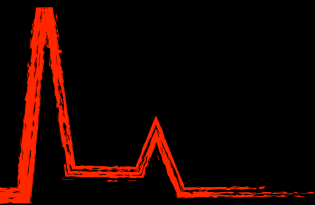
Caractéristiques :

Spectre de fluorescence

Mode de liaison aux acides nucléiques

Hydrosolubilité - Liposolubilité

Les fluorochromes



Modes de liaison aux acides nucléiques

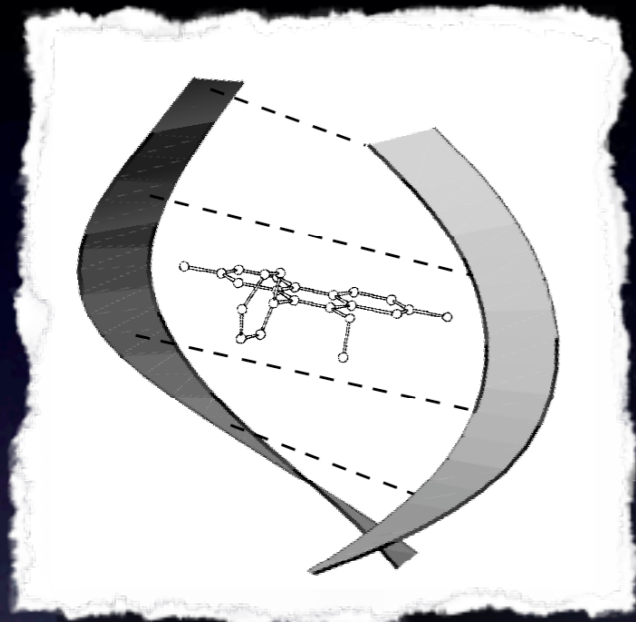
Les intercalants

Dans une double hélice

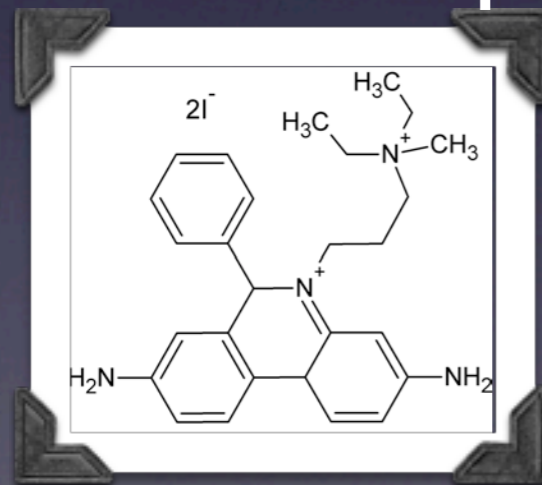
ADNADN

ADNARN

ARNARN



Iodure de Propidium



Perméabilisation

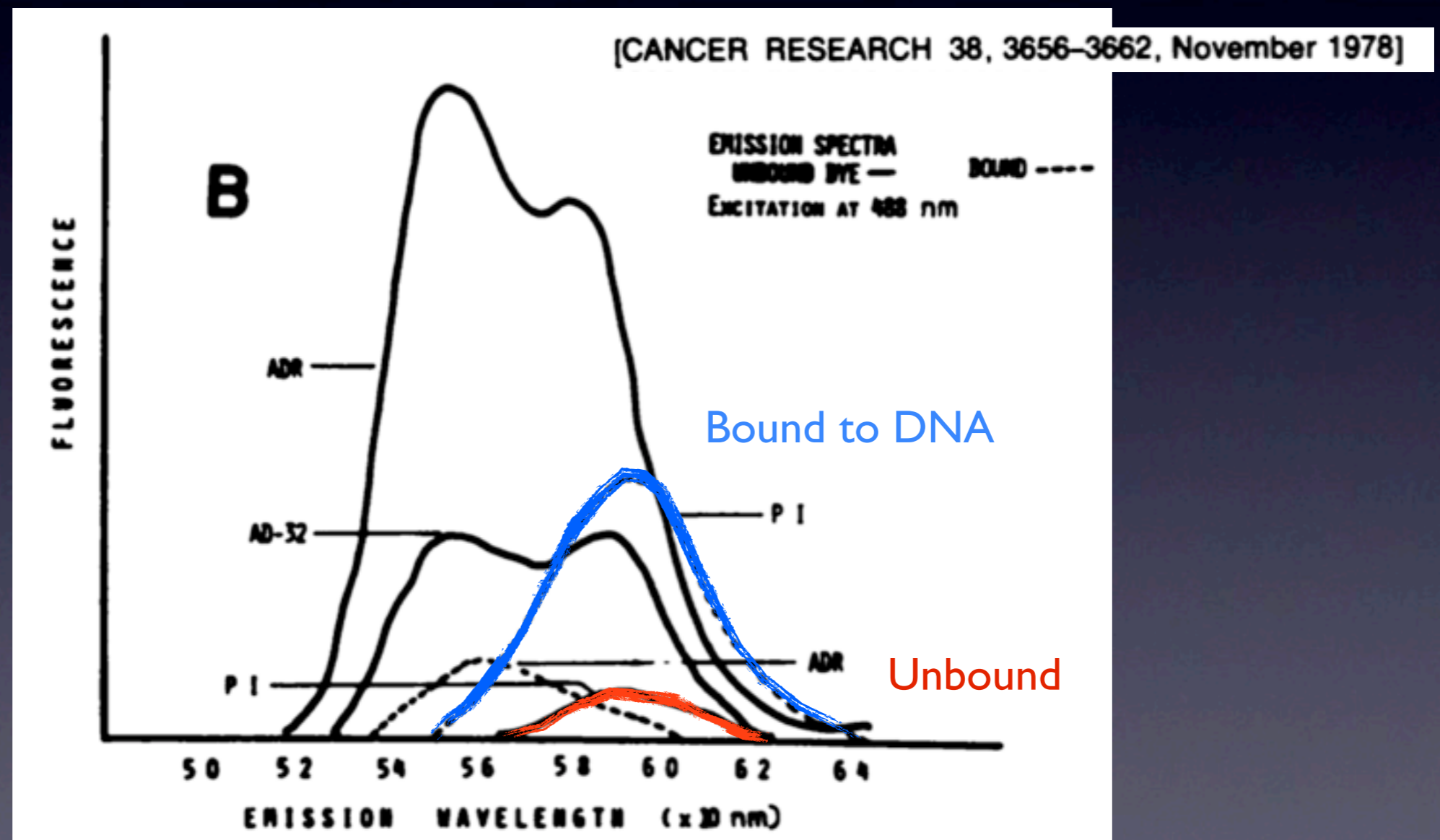
Élimination des ARN

Les fluorochromes

Modes de liaison aux acides nucléiques

Les intercalants

Modification des propriétés spectrales



EMISSION WAVELENGTH (x 10 nm)

20 25 30 35 40 45 50

Les fluorochromes

Modes de liaison aux acides nucléiques

Les intercalants

Effets de la concentration saline

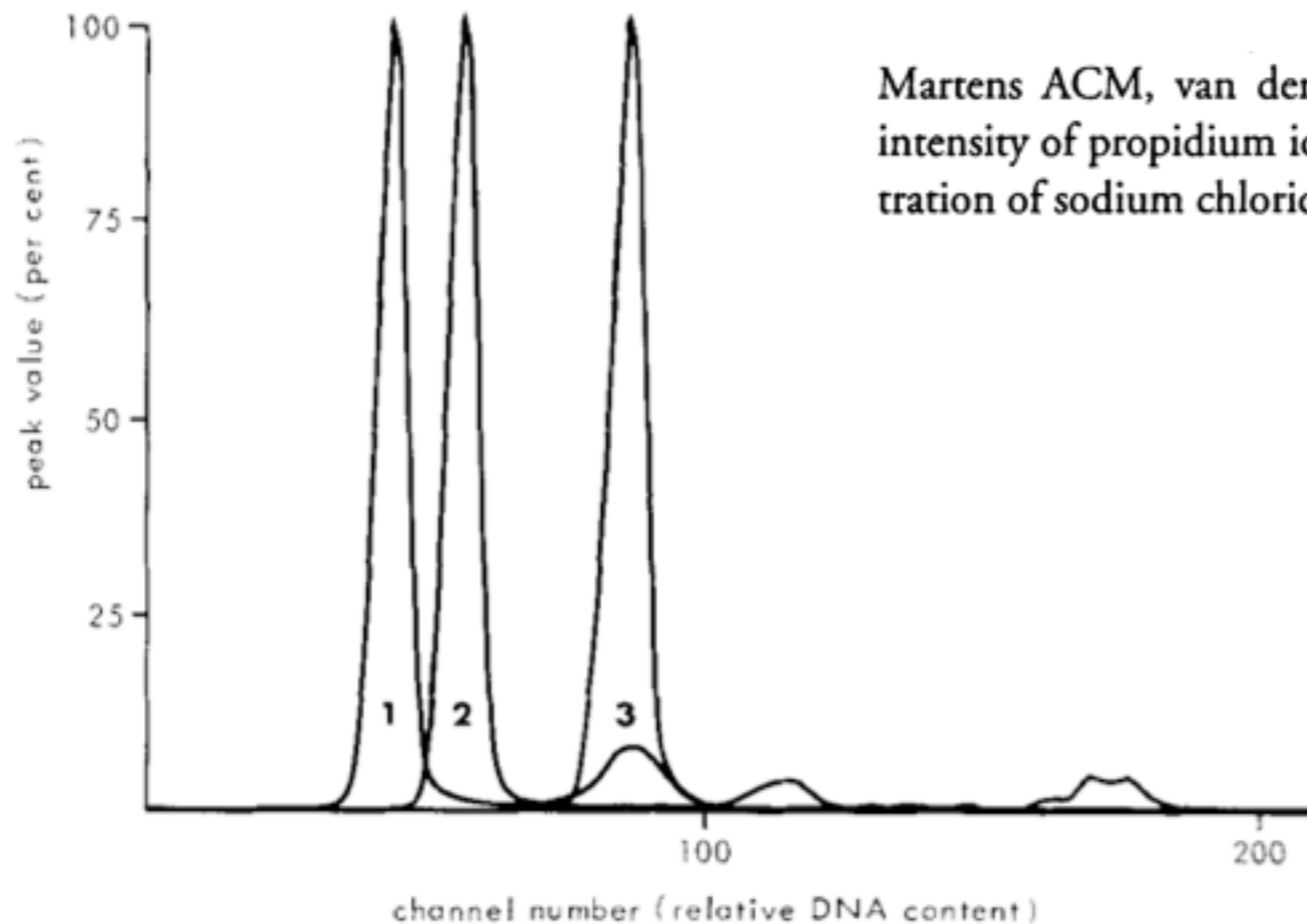


FIG. 3. The influence of the NaCl concentration during DNA measurements in thymocytes under stable conditions after staining with PI and resuspension in three different solutions. Curve 1, NaCl, 0.15 M; curve 2, NaCl, 0.075 M; curve 3, distilled water.

0.15 M; curve 2, NaCl, 0.075 M; curve 3, distilled water.
with PI and resuspension in three different solutions. Curve 1, NaCl,
measurements in thymocytes under stable conditions after staining

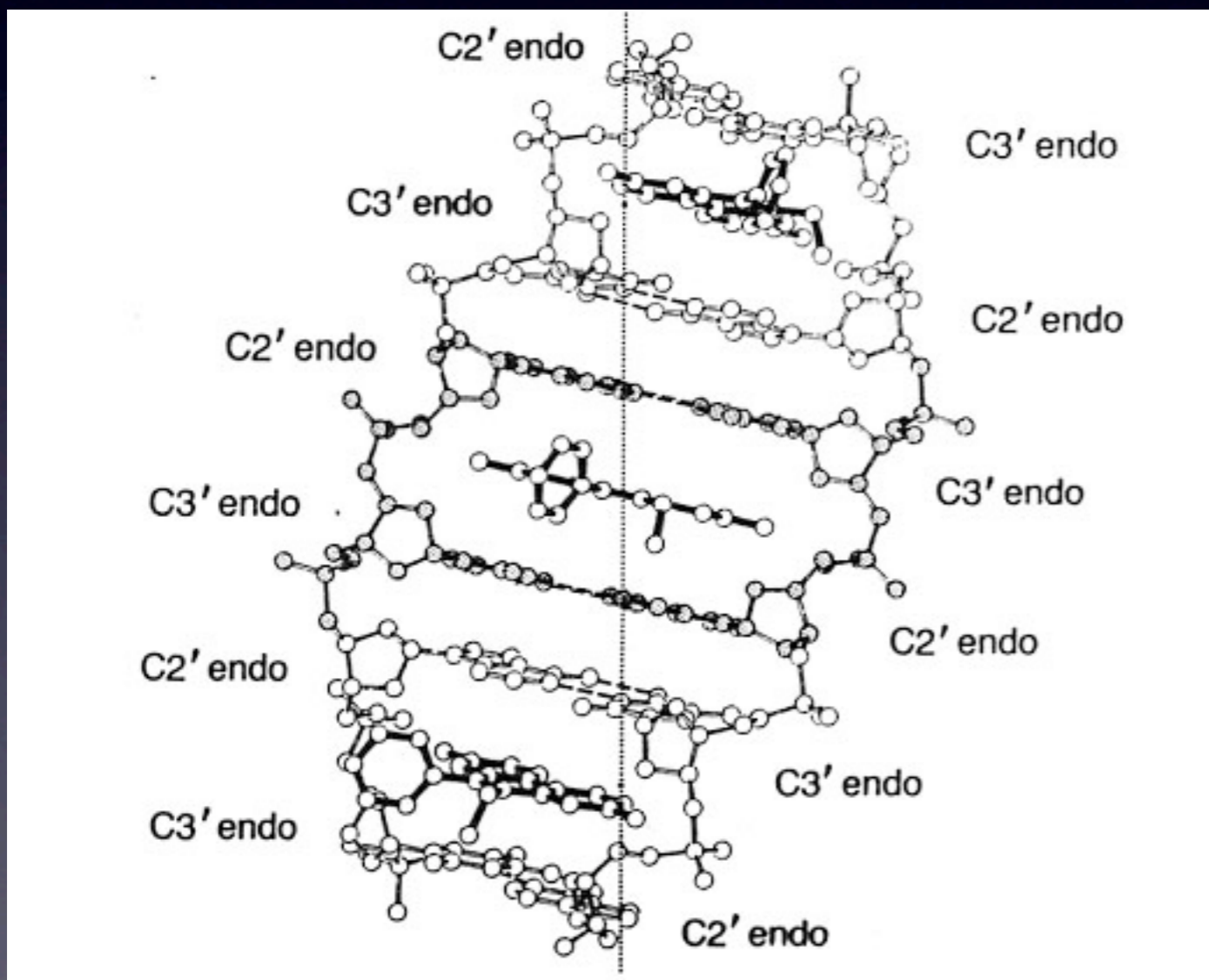
FIG. 3. The influence of the NaCl concentration during DNA

Les fluorochromes

Modes de liaison aux acides nucléiques

Les intercalants

Problèmes de *Stacking*



Déformation de la double hélice
(réduction de 26°)

Dénaturation des structures tertiaires

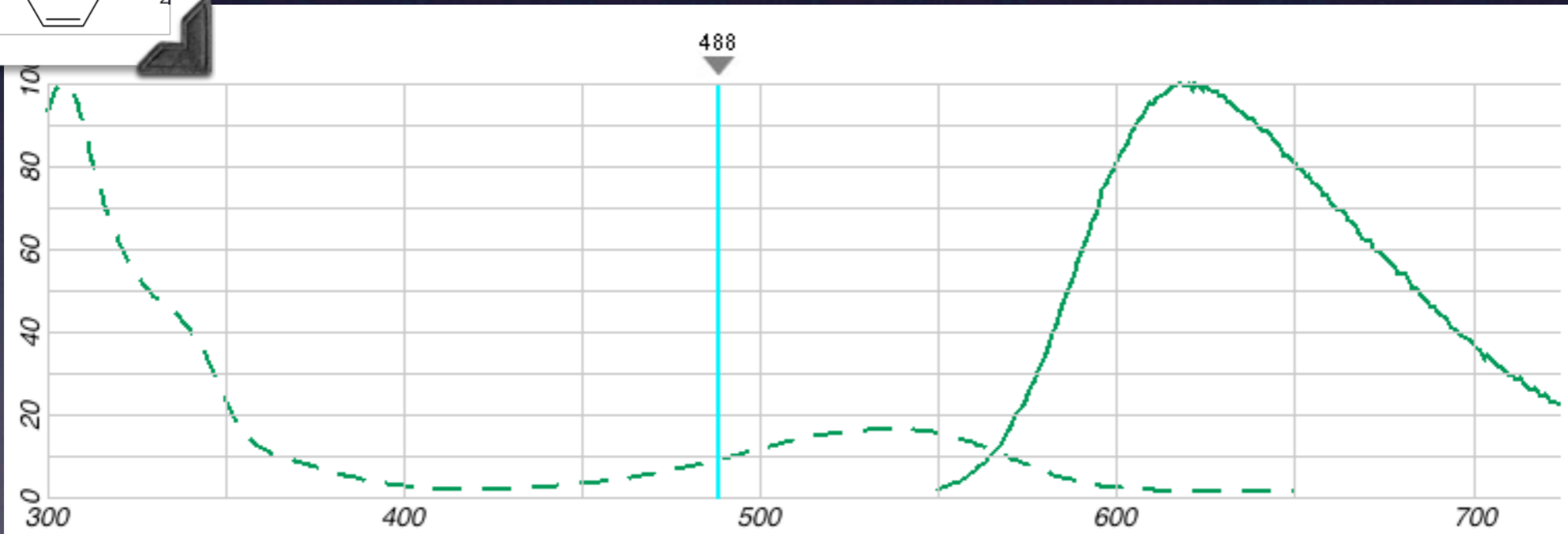
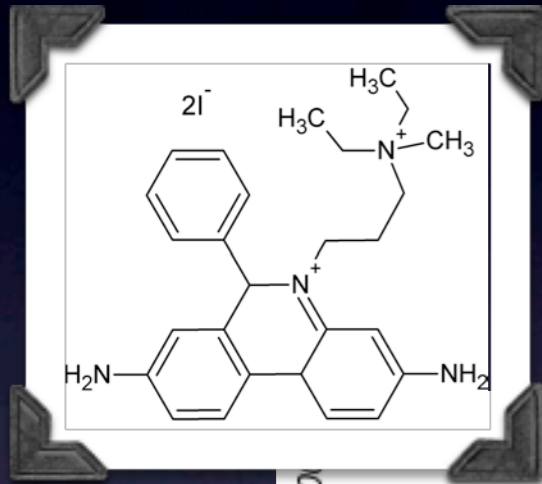
Augmentation de la variabilité du
marquage

Les fluorochromes

Modes de liaison aux acides nucléiques

Les intercalants

Iodure de propidium



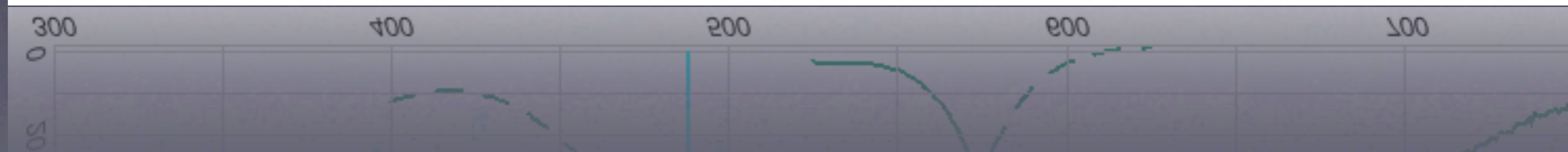
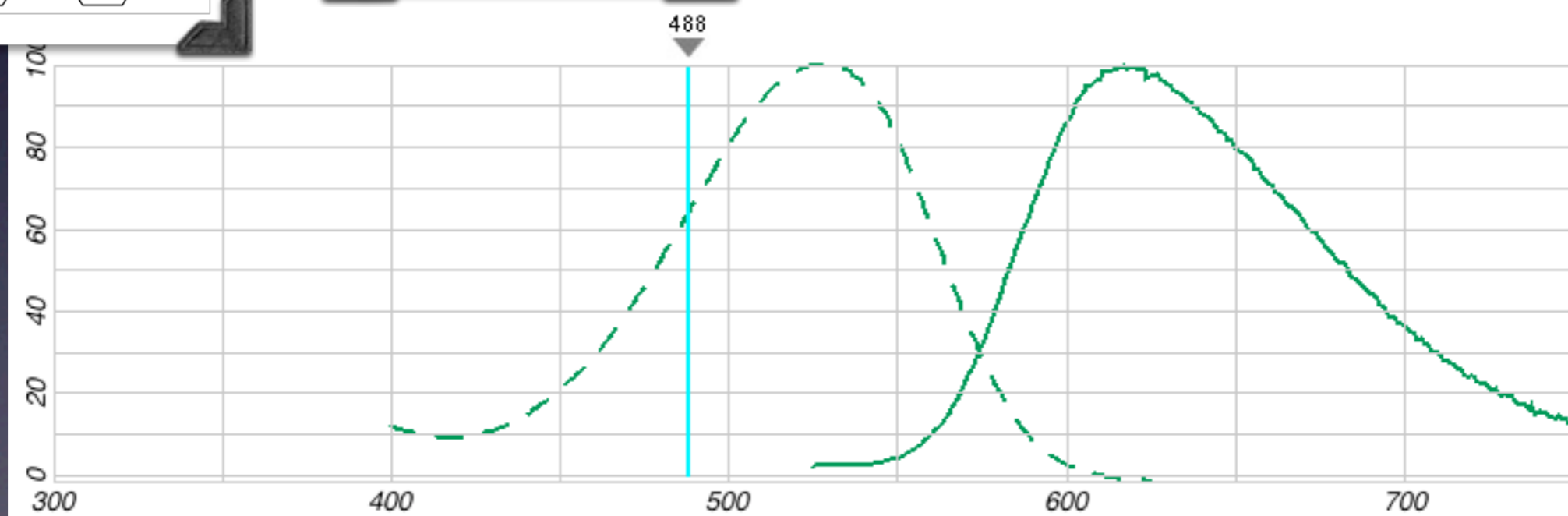
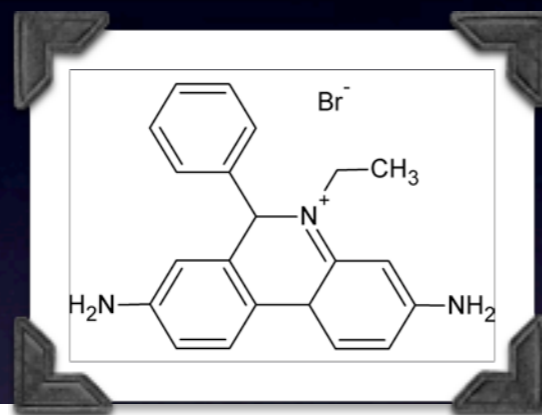
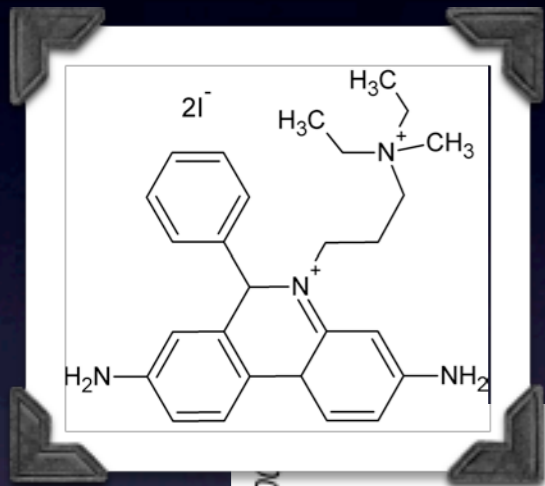
Les fluorochromes

Modes de liaison aux acides nucléiques

Les intercalants

IP

Ethidium



Les fluorochromes

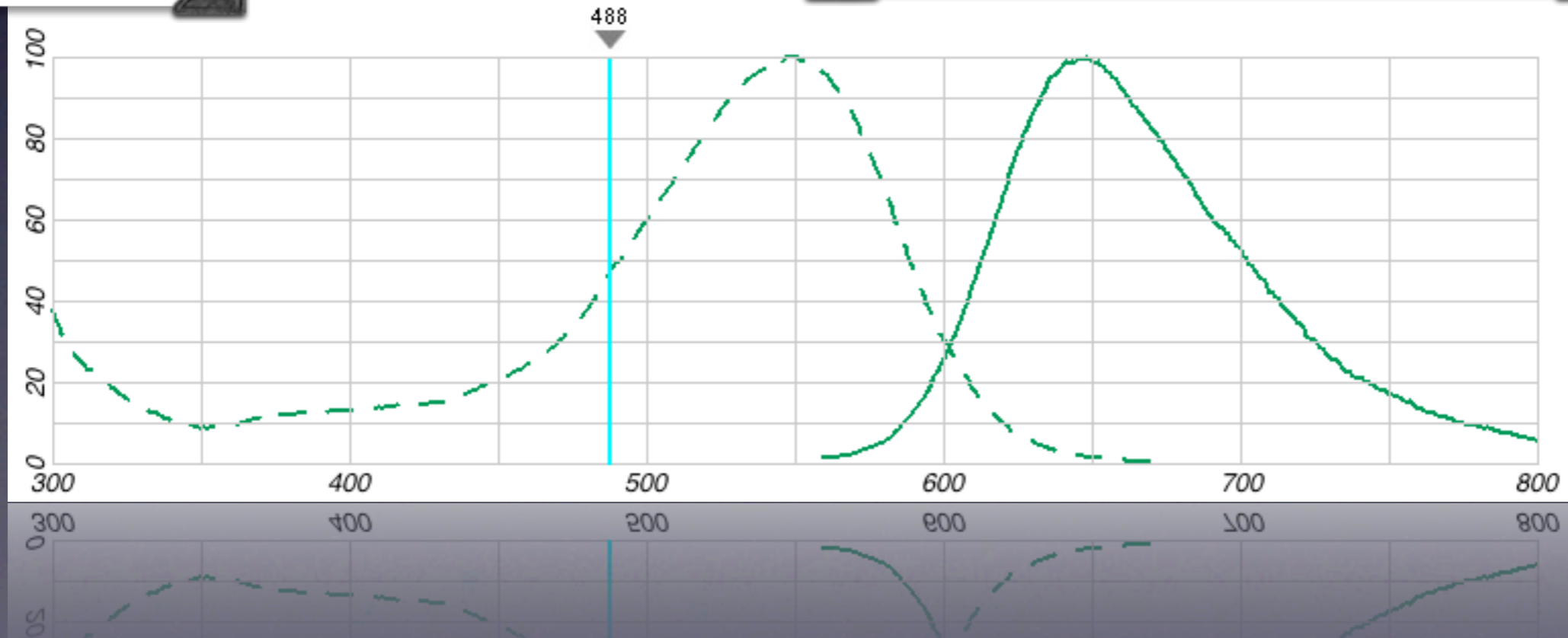
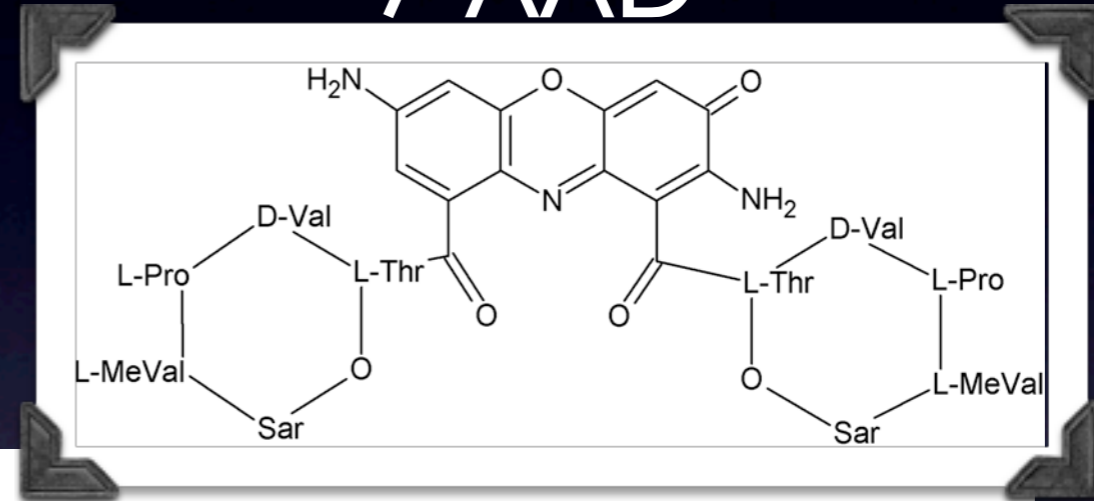
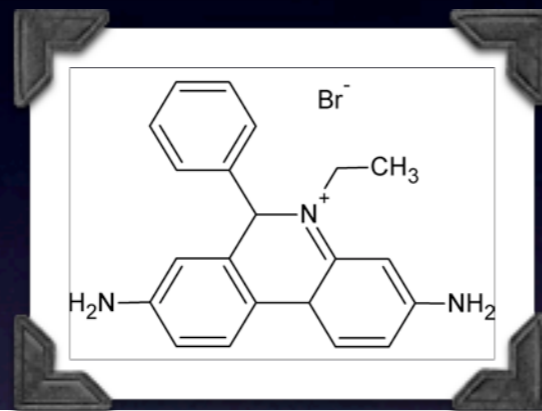
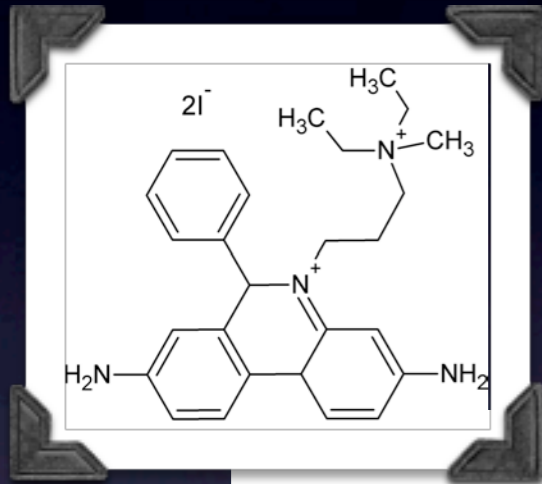
Modes de liaison aux acides nucléiques

Les intercalants

IP

Ethidium

7-AAD



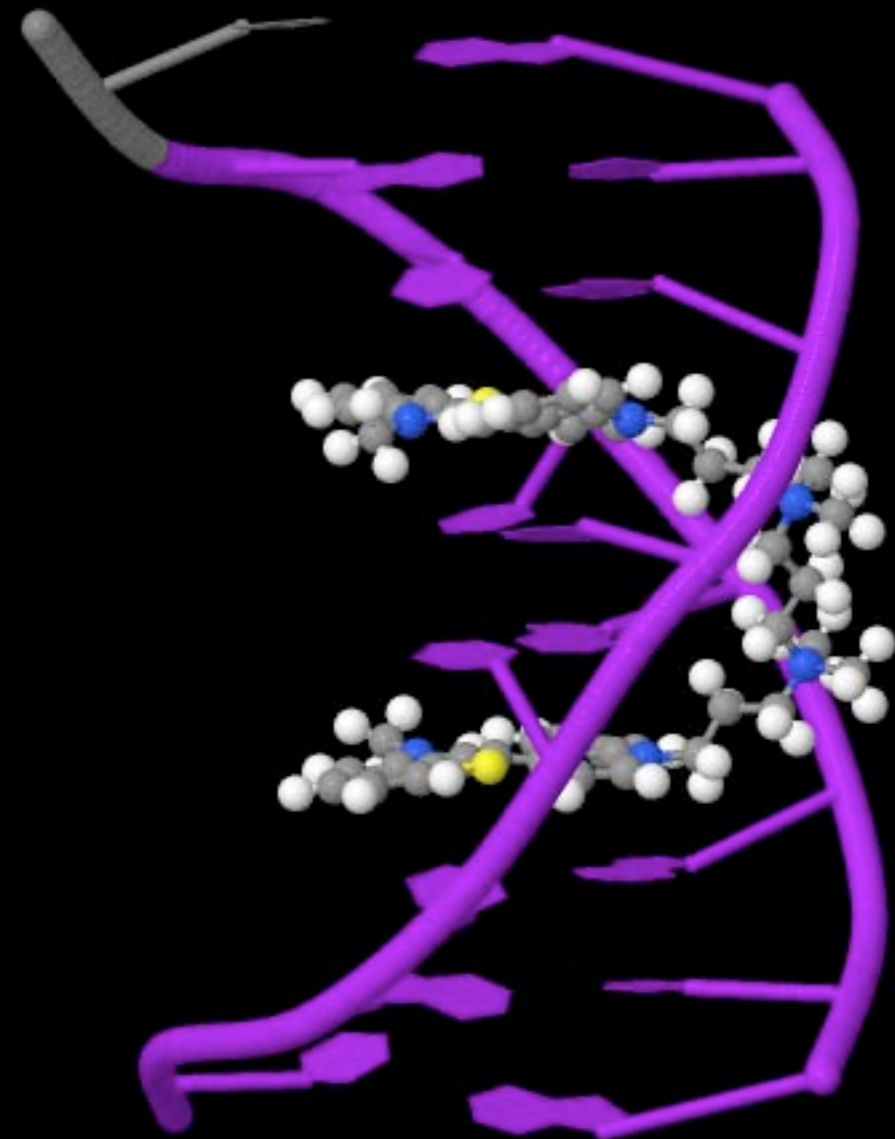
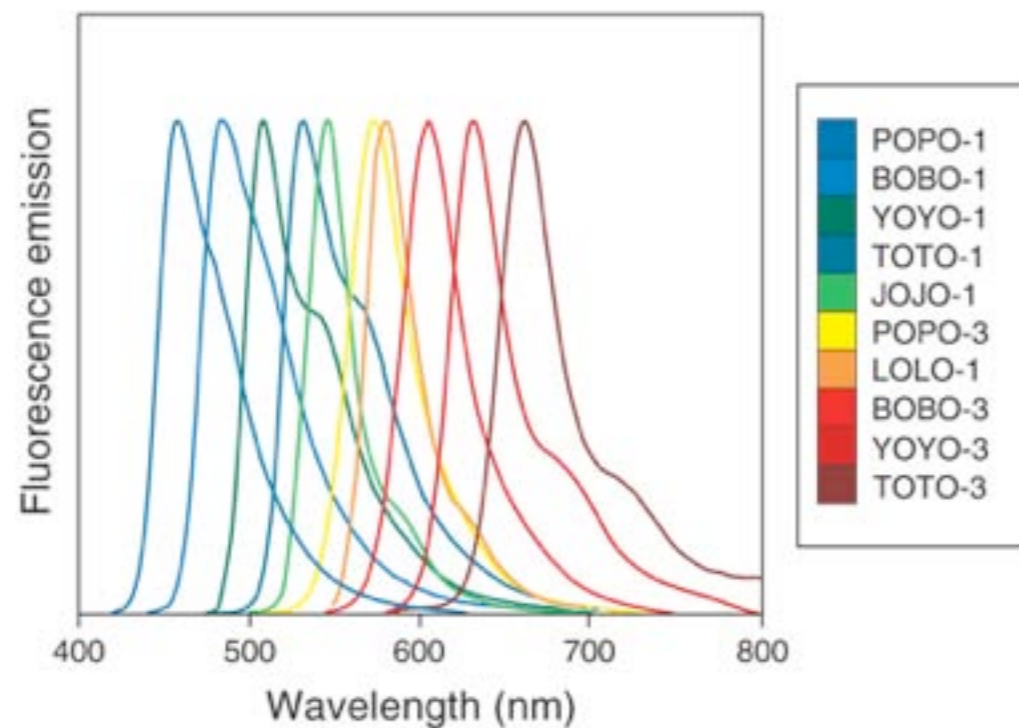
Les fluorochromes

Modes de liaison aux acides nucléiques

Les intercalants

TOTO, JOJO et leurs amis
Dimères de cyanines

Invitrogen.com



Les fluorochromes

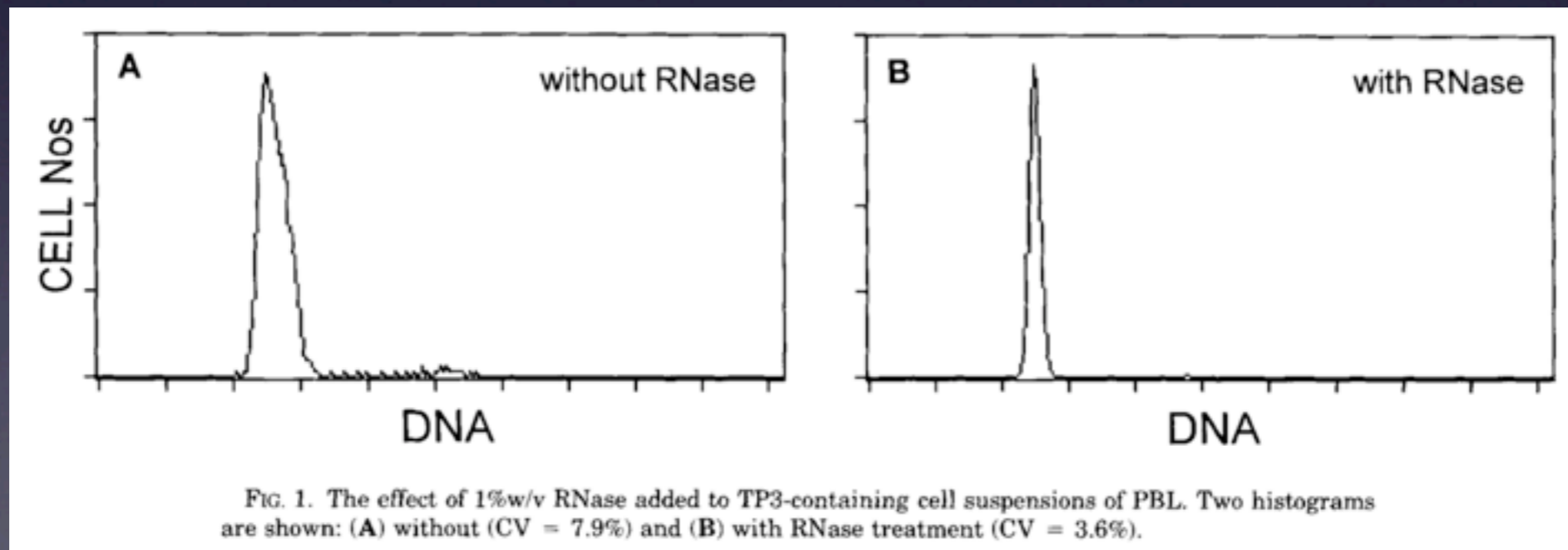
Modes de liaison aux acides nucléiques

Les intercalants

TO-PRO et compagnie

Monomères de cyanines

TO-PRO 3



are shown: (A) without (CV = 7.9%) and (B) with RNase treatment (CV = 3.6%).

FIG. 1. The effect of 1%w/v RNase added to TP3-containing cell suspensions of PBL. Two histograms

DNA

DNA

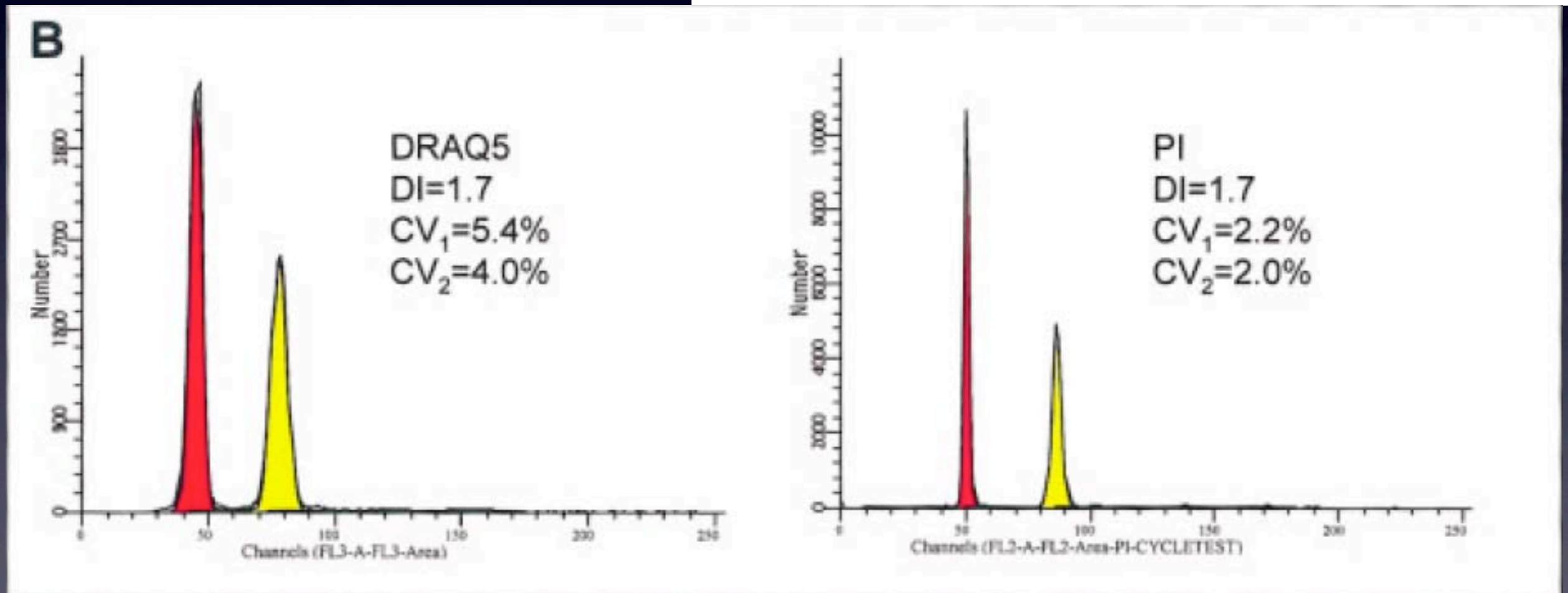
Les fluorochromes

Modes de liaison aux acides nucléiques

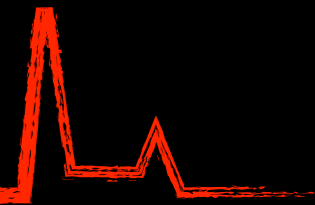
Les intercalants

DRAQ5 Diffuse librement à travers les membranes

Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 58B:47-52 (2004)

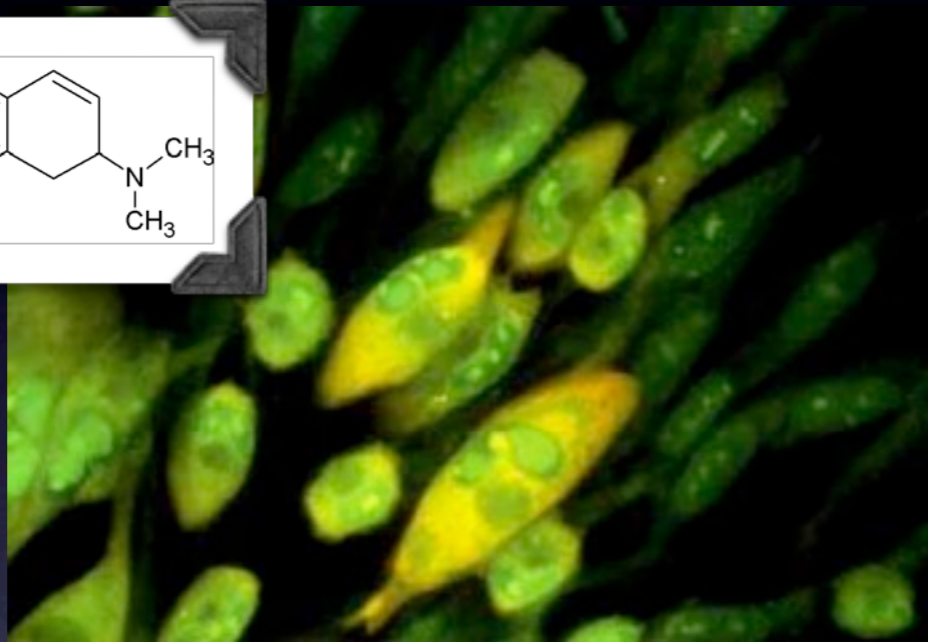
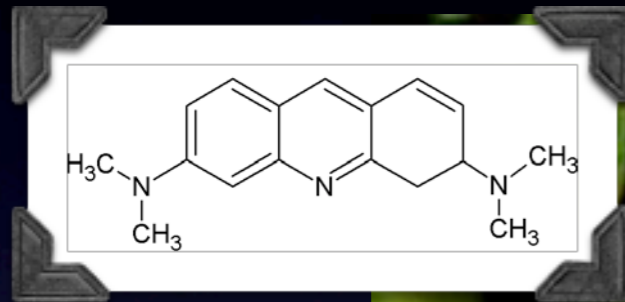


Les fluorochromes



Modes de liaison aux acides nucléiques

Acridine Orange



Les intercalants

Fluorescence verte :ADN (530nm)

Fluorescence orange :ARN (640nm)

ou ADN Dénaturé

Traitement RNase + dénaturation acide

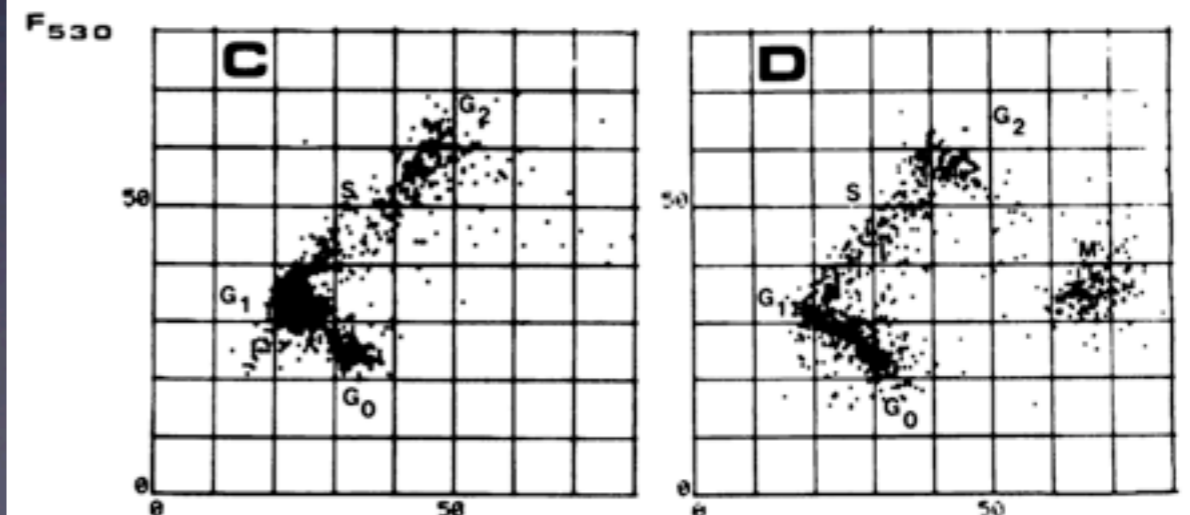
Problèmes de diffusion

Ajout d'AO dans le liquide de gaine

Contamination des tubulures

Javel

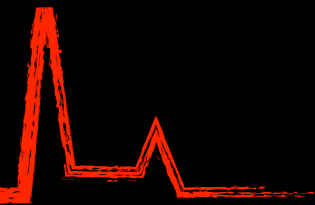
[CANCER RESEARCH 37, 4635-4640, December 1977]



F_{600}

F_{600}

Les fluorochromes

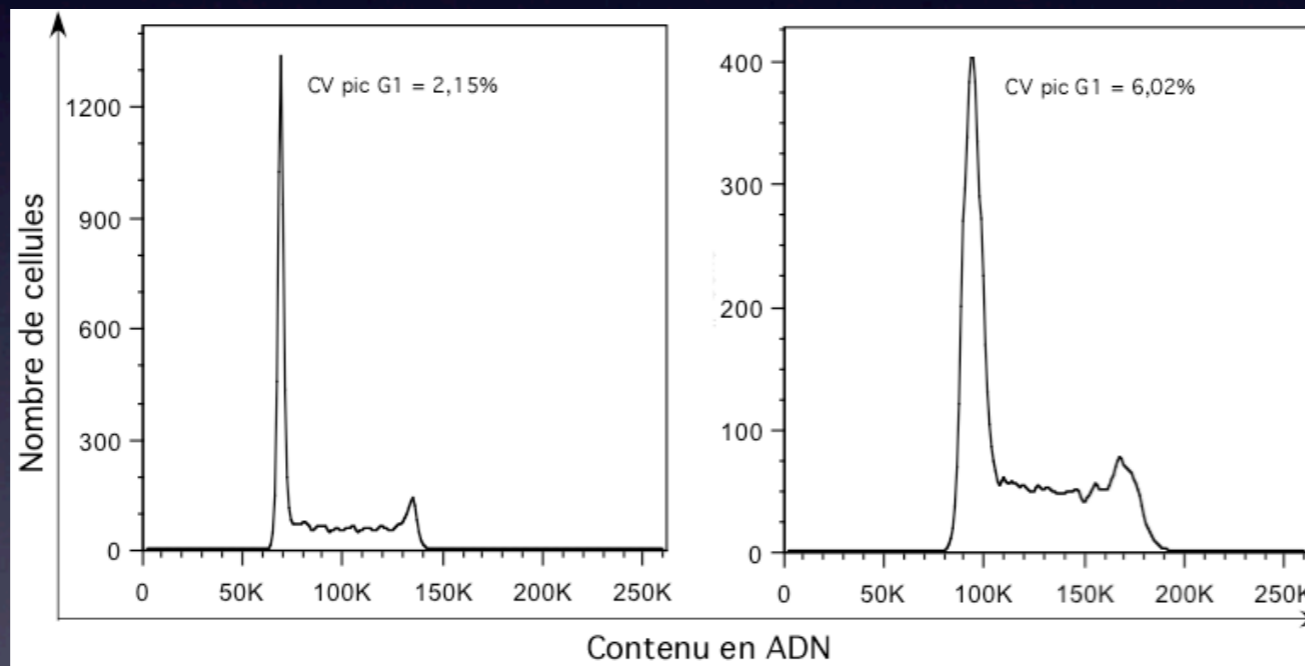


Modes de liaison aux acides nucléiques

Les intercalants

Molécules cationiques: nécessité de perméabilisation

Ne sont pas spécifiques de l'ADN



Les fluorochromes



Modes de liaison aux acides nucléiques

Les intercalants

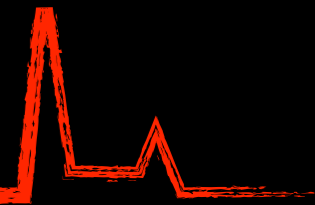
Molécules cationiques: nécessité de perméabilisation

Ne sont pas spécifiques de l'ADN

Molécules les plus utilisées pour l'analyse du cycle cellulaire

Seuls utilisables pour les comparaisons de taille de génome
(biologie végétale)

Les fluorochromes



Modes de liaison aux acides nucléiques

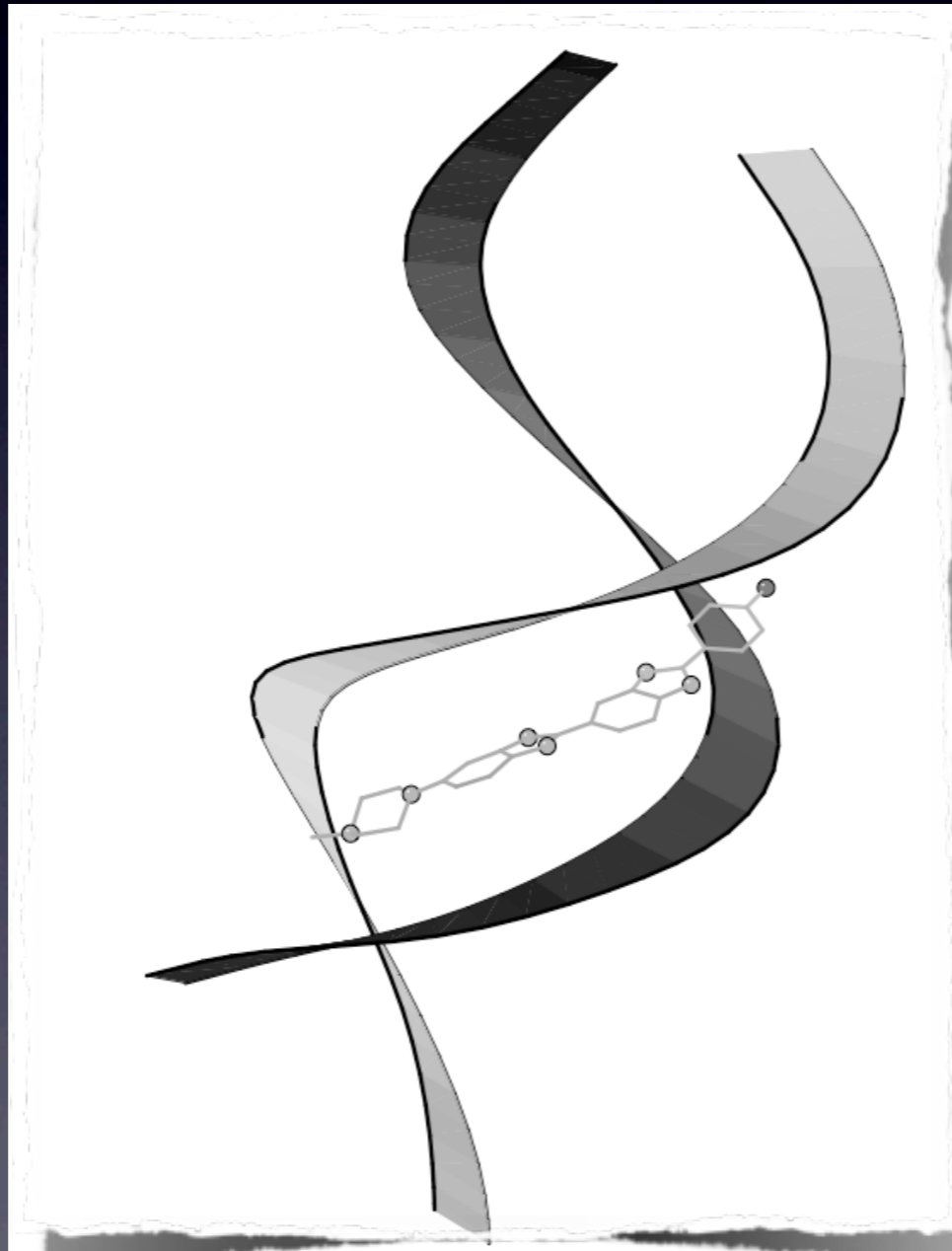
Les intercalants

Molécule	Abs max (nm)	Em max (nm)
Iodure de Propidium	535	617
7 AAD	546	647
TO-PRO 3	642	661
DRAQ 5	622	641
Acridine Orange	500/460	530-640

Les fluorochromes

Modes de liaison aux acides nucléiques

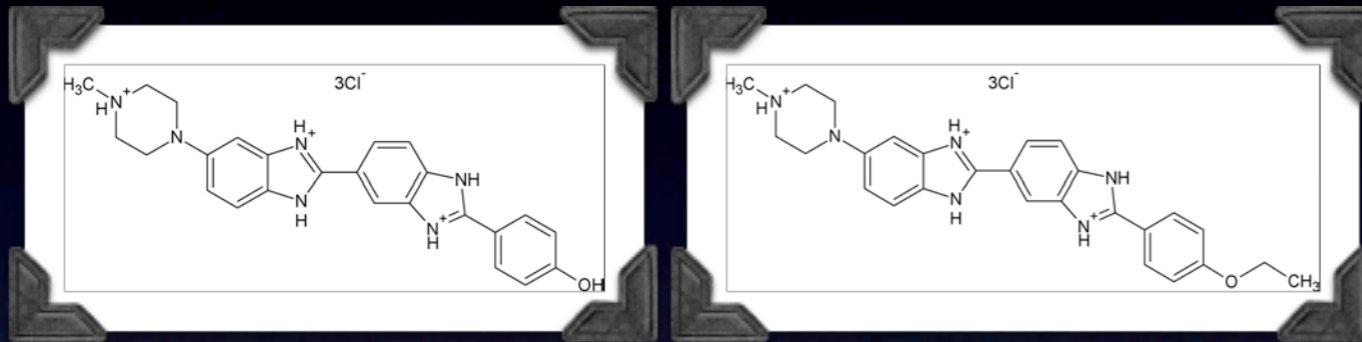
Liaison électrostatiques



Les fluorochromes

Modes de liaison aux acides nucléiques

Liaison électrostatiques



Hoechst

33 258

33 342

Cellules
fixées

Cellules
fixées
+ vivantes

Régions riches en
bases AT

Pas de traitement RNase

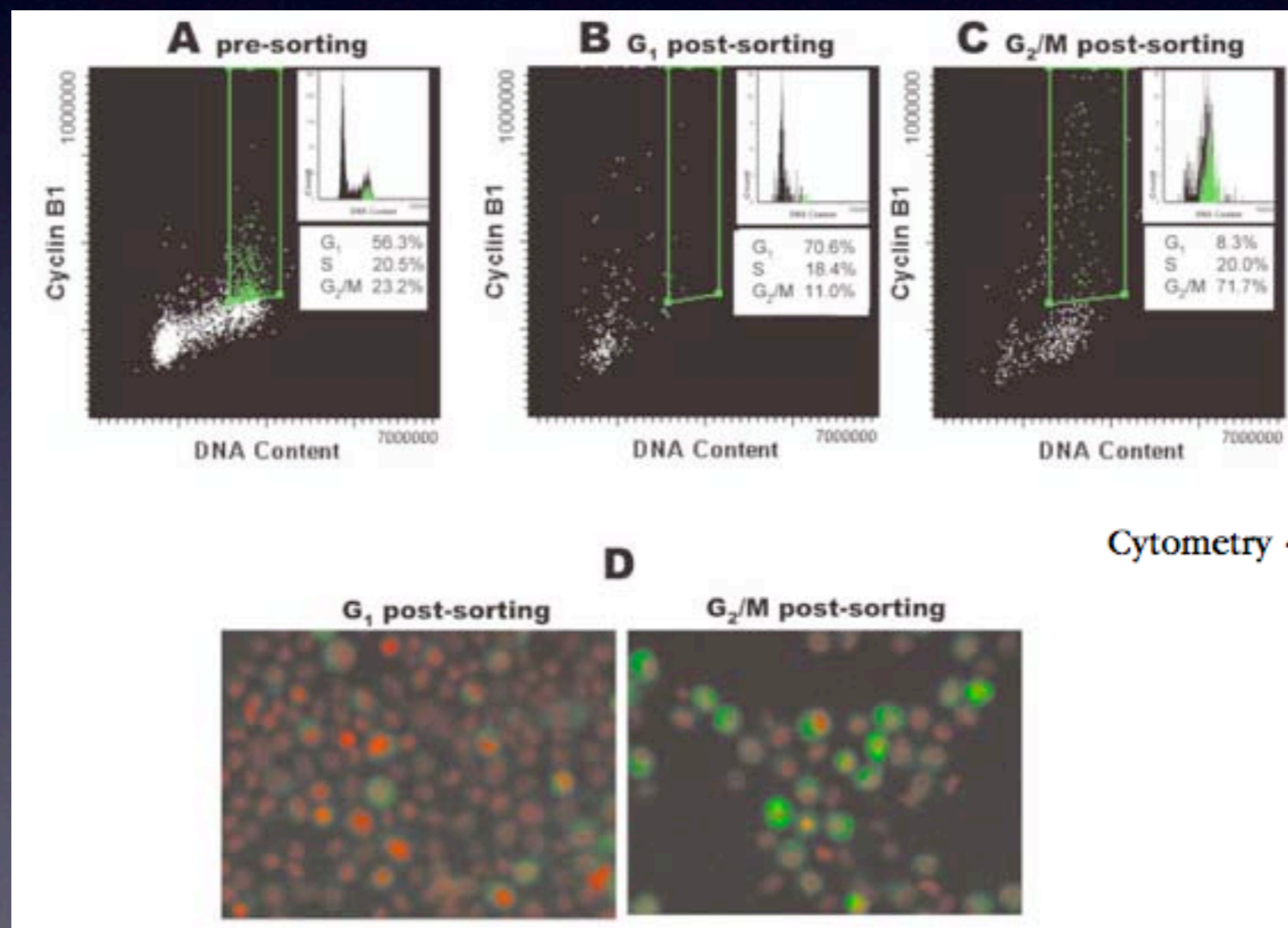
Les fluorochromes

Modes de liaison aux acides nucléiques

Liaison électrostatiques

Hoechst 33 342

Tri de cellules vivantes en fonction de leur phase du cycle



Cytometry 49:170-175 (2002)

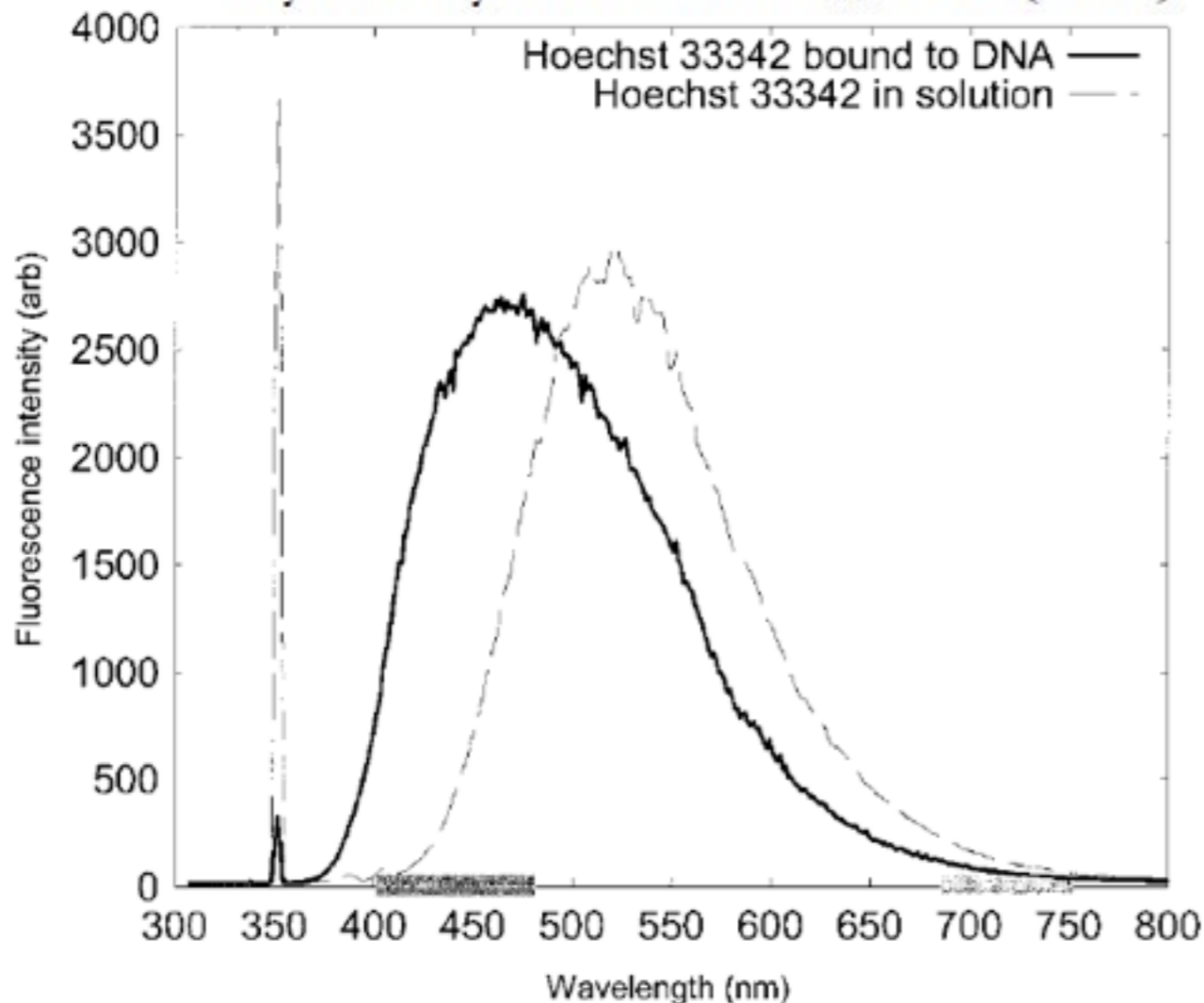
Les fluorochromes

Modes de liaison aux acides nucléiques

Liaison électrostatiques

Hoechst 33 342

Cytometry Part A 60A:173-181 (2004)



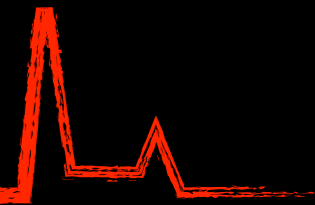
Hoechst non lié à l'ADN : fluo 510 nm



Rendement quantique x60

Hoechst lié à l'ADN : fluo 460 nm

Les fluorochromes



Modes de liaison aux acides nucléiques

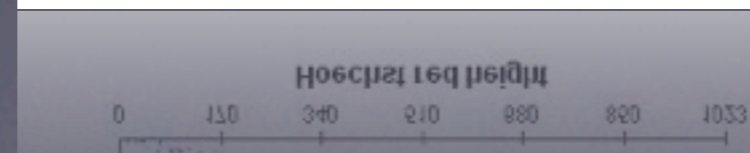
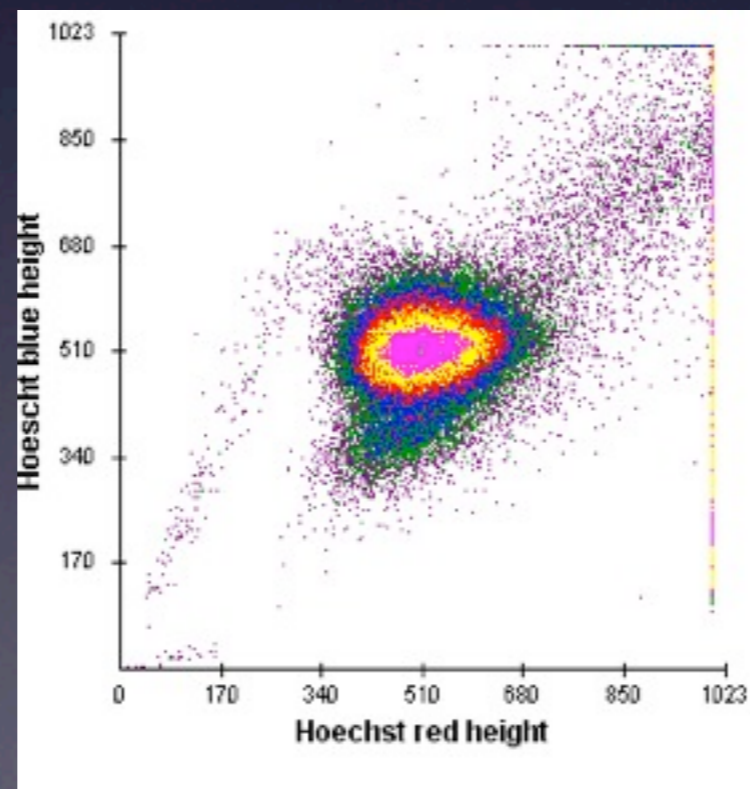
Liaison électrostatiques

Hoechst 33 342

Exclusion par pompes de chimiorésistance

Propriété utilisée pour la caractérisation des cellules souches

Goodell, M.A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A.S., and Mulligan, R.C. (1996). Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 183, 1797-1806.



Les fluorochromes

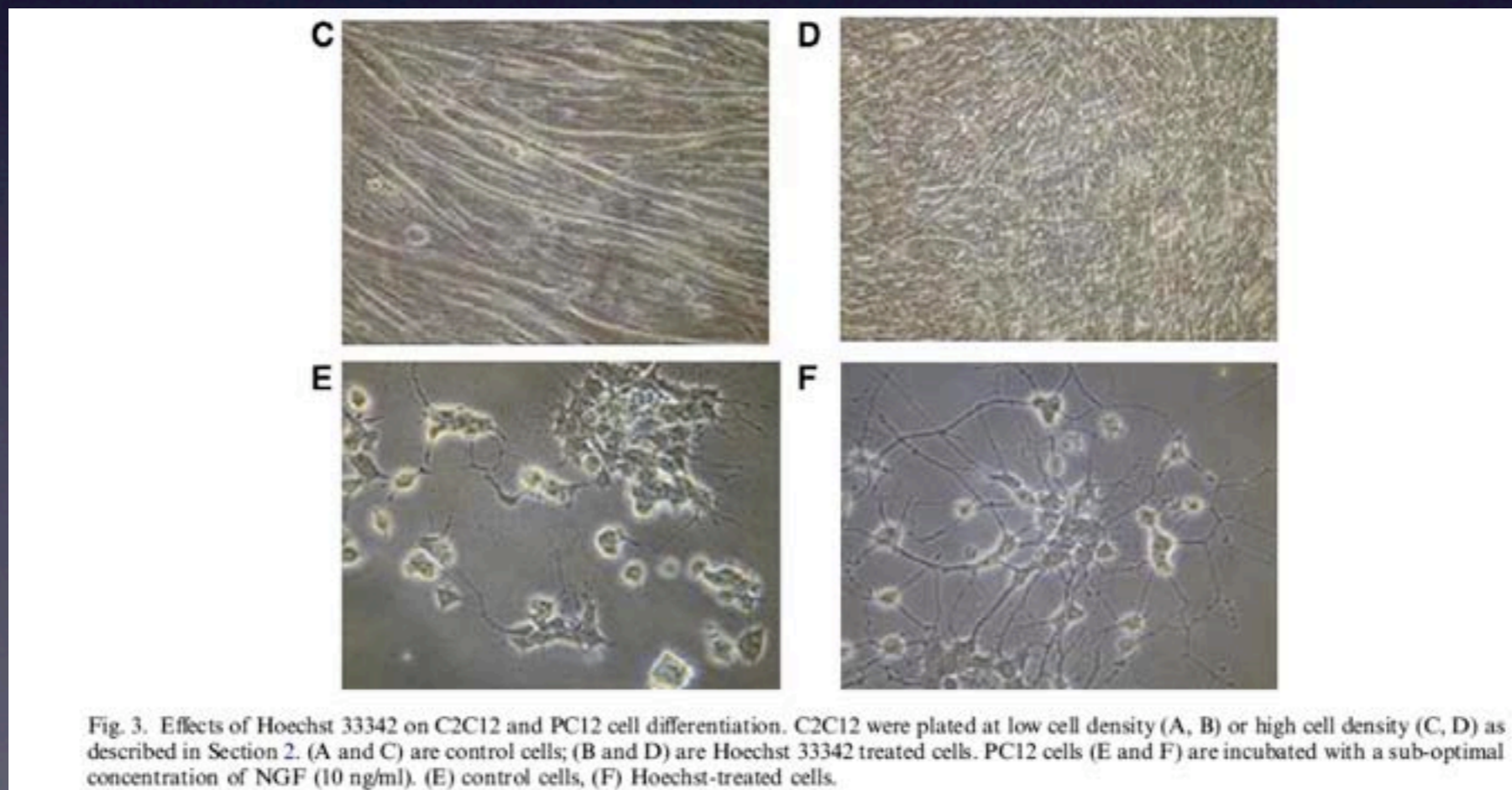
Modes de liaison aux acides nucléiques

Liaison électrostatiques

Hoechst 33 342

Se fixe sur les régions riches en bases AT

TATA Box : effets sur la différenciation



Les fluorochromes



Modes de liaison aux acides nucléiques

Liaison électrostatiques

Hoechst 33 342

Se fixe sur les régions riches en bases AT

TATA Box : effets sur la différenciation

Bloquage du cycle cellulaire

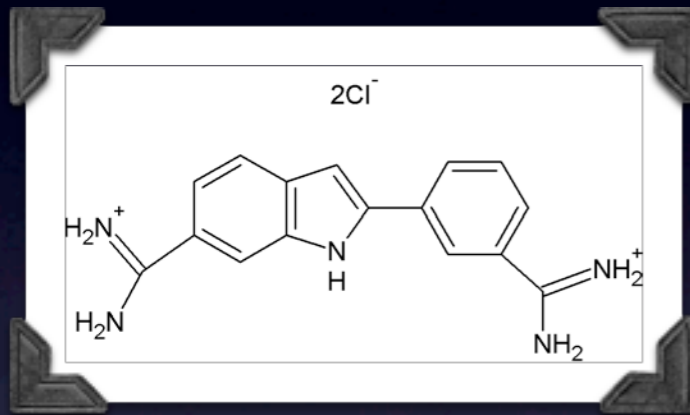
Sensibilise les cellules aux effets génotoxiques des UV

Les fluorochromes

Modes de liaison aux acides nucléiques

Liaison électrostatiques

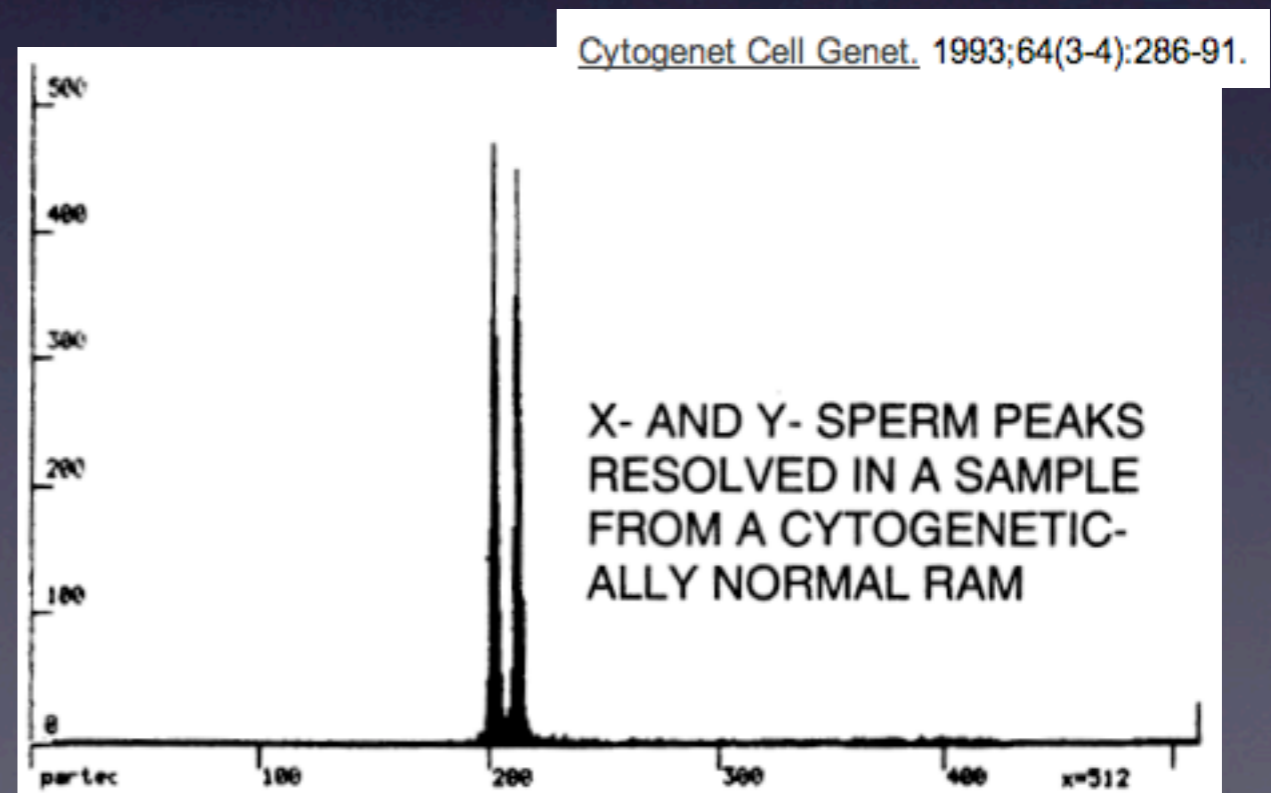
DAPI



Petit sillon de la double hélice
région riche en bases A-T
«Semi-perméant»

Très bons CV

Différence d'intensité de
fluorescence : 4,8 %
CV : 0,6 - 0,8%

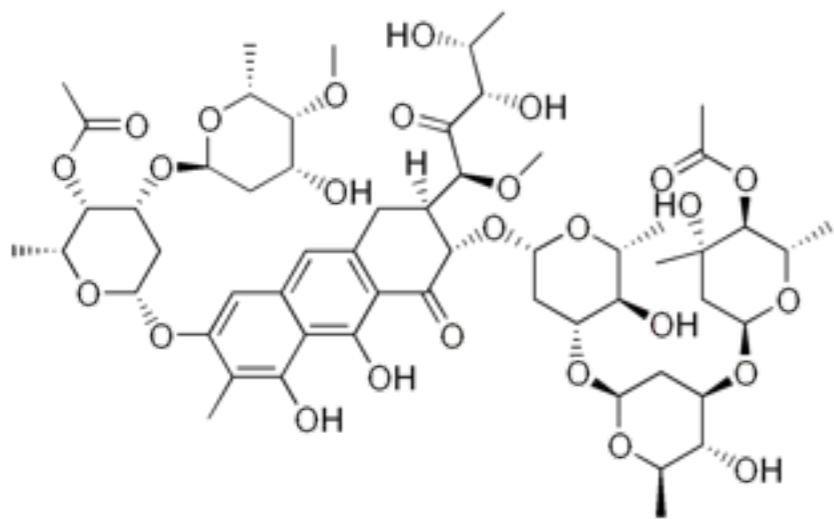


Les fluorochromes

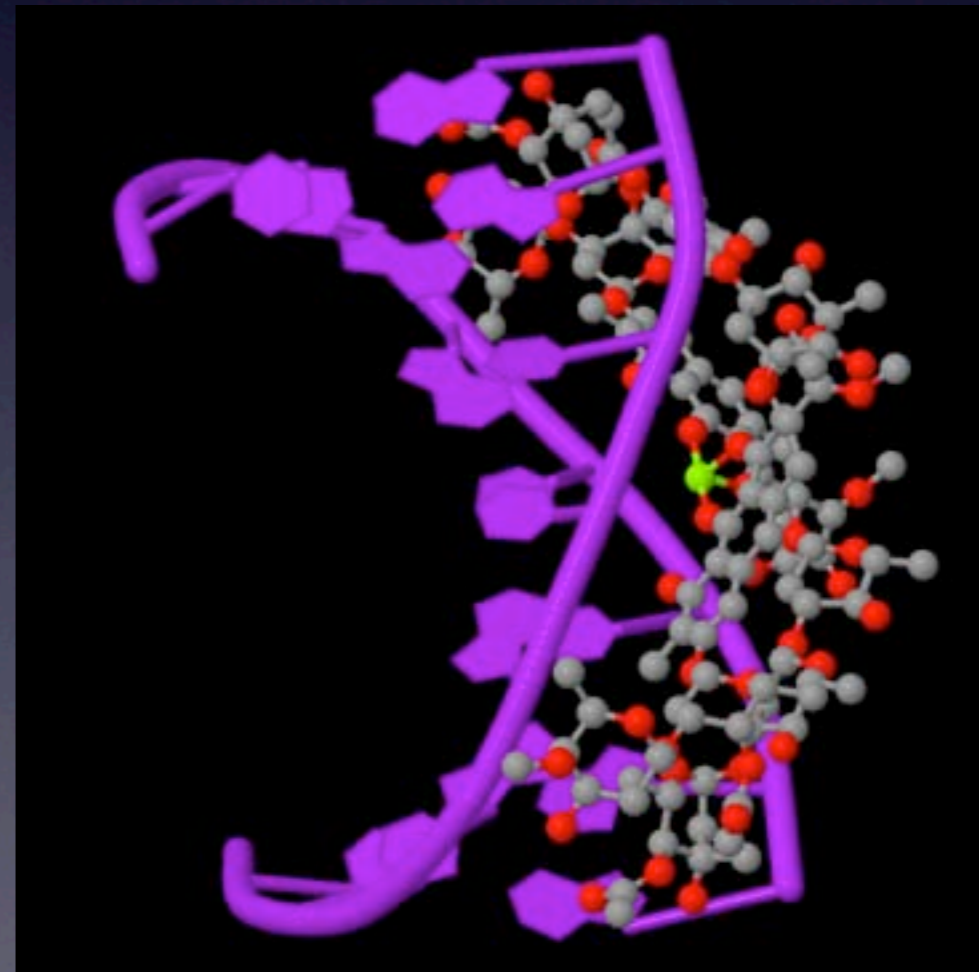
Modes de liaison aux acides nucléiques

Liaison électrostatiques

Chromomycine A et Mithramycine

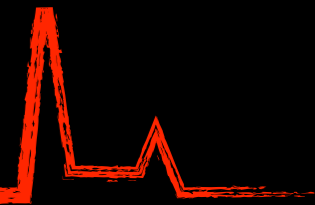


Régions riches en G-C



Antibiotiques spécifiques de
l'ADN

Les fluorochromes



Modes de liaison aux acides nucléiques

Liaison électrostatiques

Molécule	Abs max (nm)	Em max (nm)
Hoechst 33 258	350	461
Hoecht 33 342	352	461
DAPI	358	461
Chromomycine A3	440	555
Mithramycine	440	575

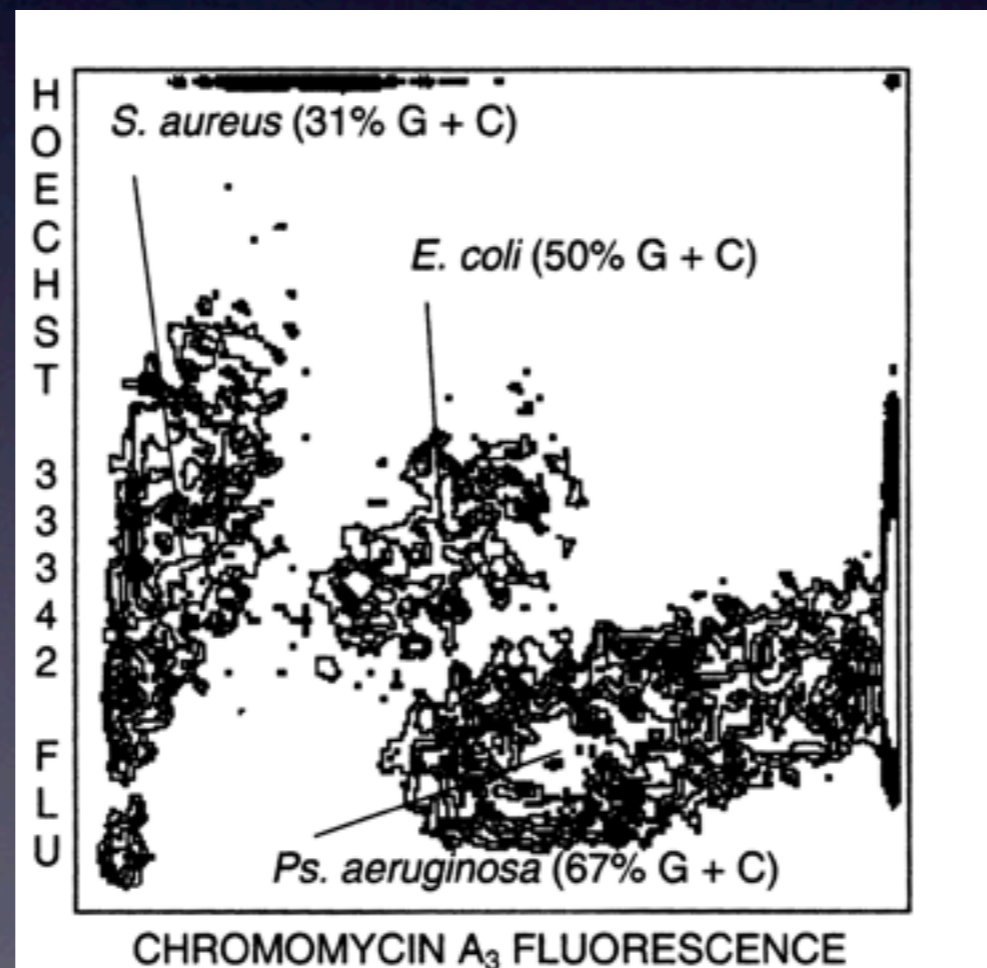
Les fluorochromes

Modes de liaison aux acides nucléiques

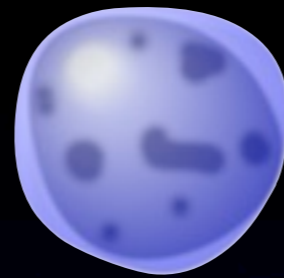
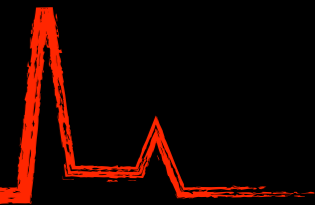
Liaison électrostatiques

Non utilisables pour faire de la «masse» d'acide nucléiques

Utilisable pour estimation rapport G-C/A-T



Préparation des cellules



Etude Monoparamétrique

Cellule vivante ou fixée ?

Cellule entière ou noyau ?

Laser / sonde fluorescente

Etude Multiparamétrique

Cellule vivante ou fixée ?

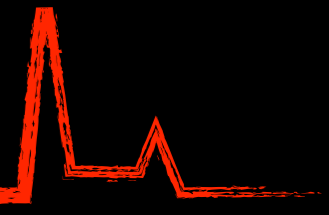
Cellule entière ou noyau ?

Compatibilité des fluorochromes ?

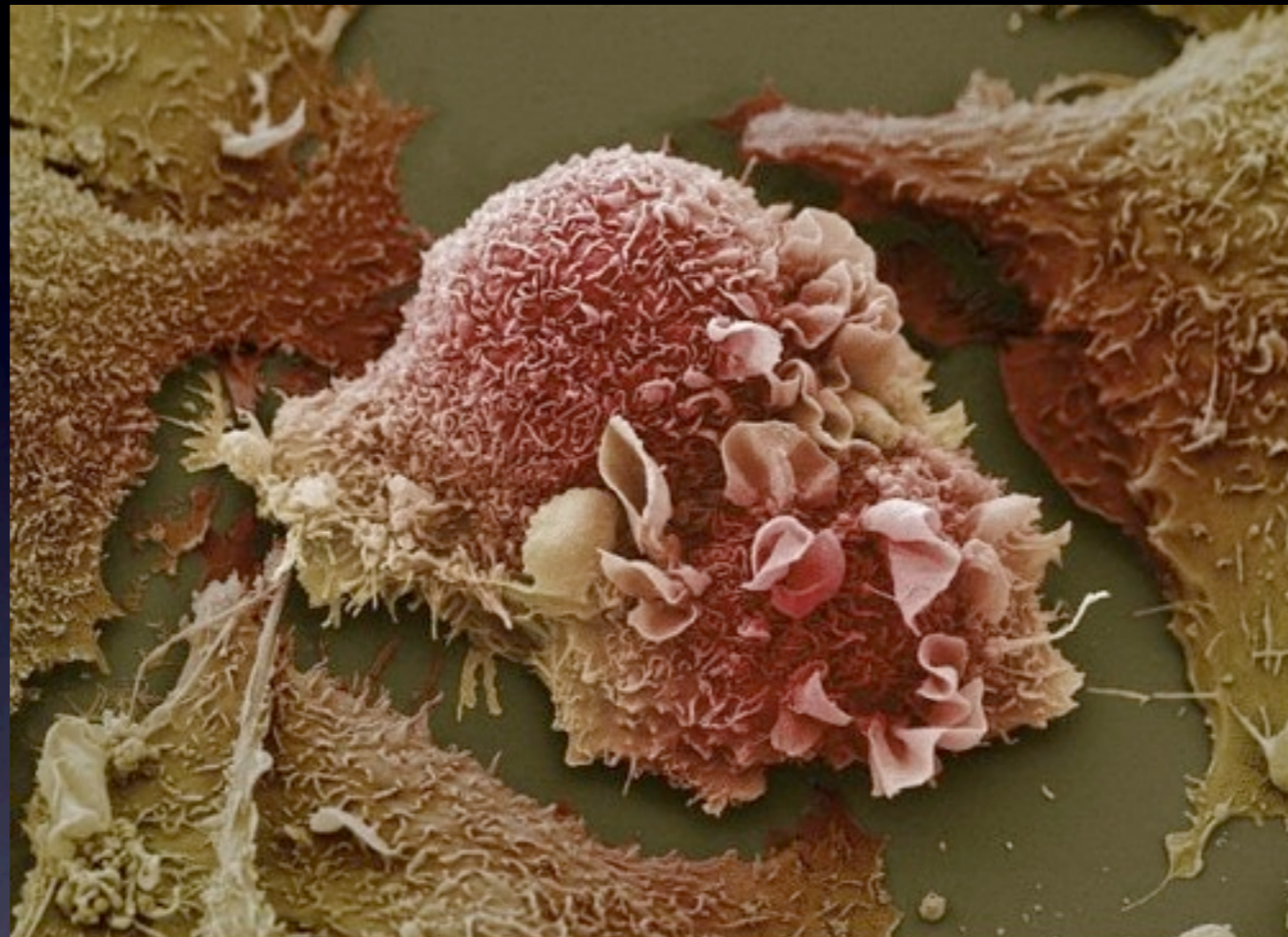
Compatibilité des techniques de
préparation et de fixation ?

Technique de préparation

Préparation des cellules



Attention aux cellules adhérentes



Les cellules en mitose se décollent, ne pas jeter les surnageants de culture et les solutions de lavage

Préparation des cellules



Cellules entière ou noyaux isolés ?



Protocole rapide

Accès aux antigènes
membranaire

Moins de débris

Accès au noyau facilité

Meilleurs CV

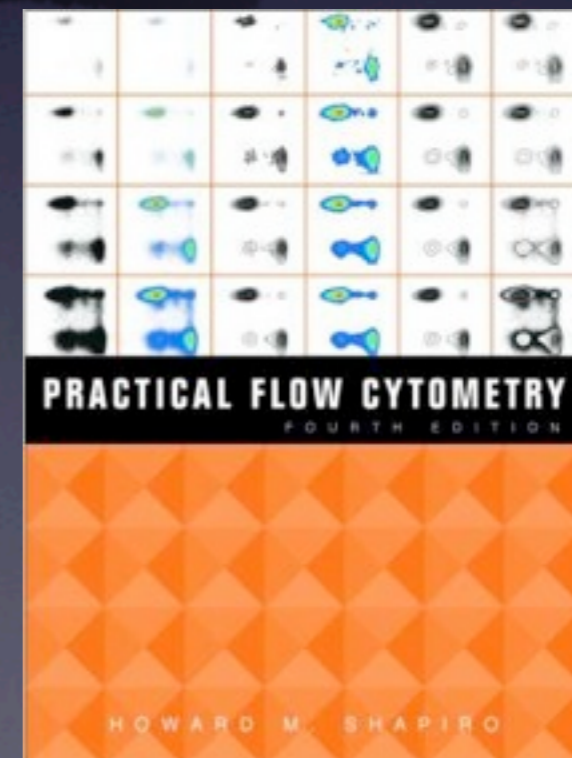
Diminution de la quantité
d'ARN

Détection des Ag
«nucléaires»
(BrdU, Ki-67, H2AX, ...)

Préparation des cellules

Mode de fixation

“Though I’m no linguist, I have heard
that every Eskimo
Learns sixteen different words describing
different kinds of snow.
I find it hard to understand how
histochemists live
And work with but a solitary word for fixative.”

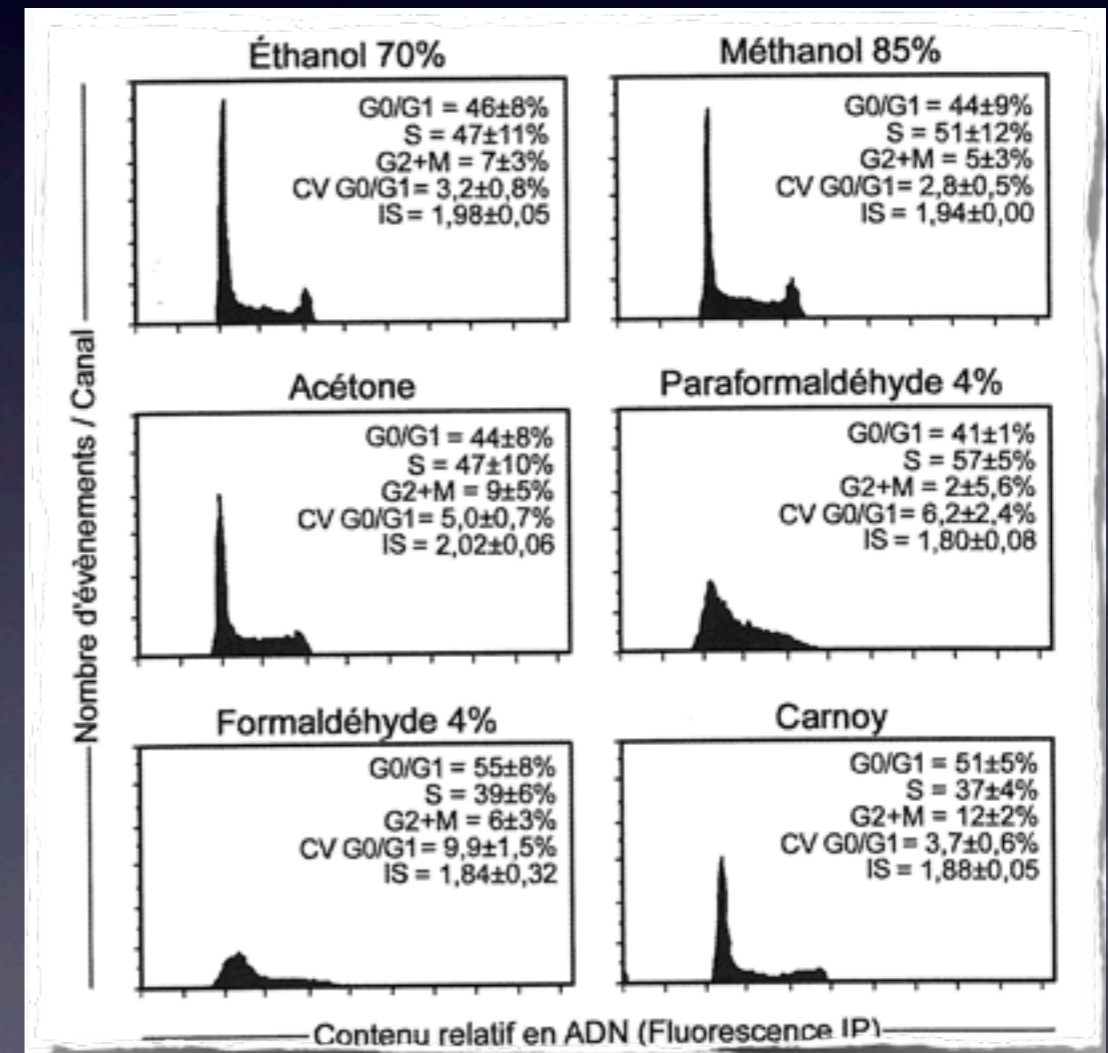
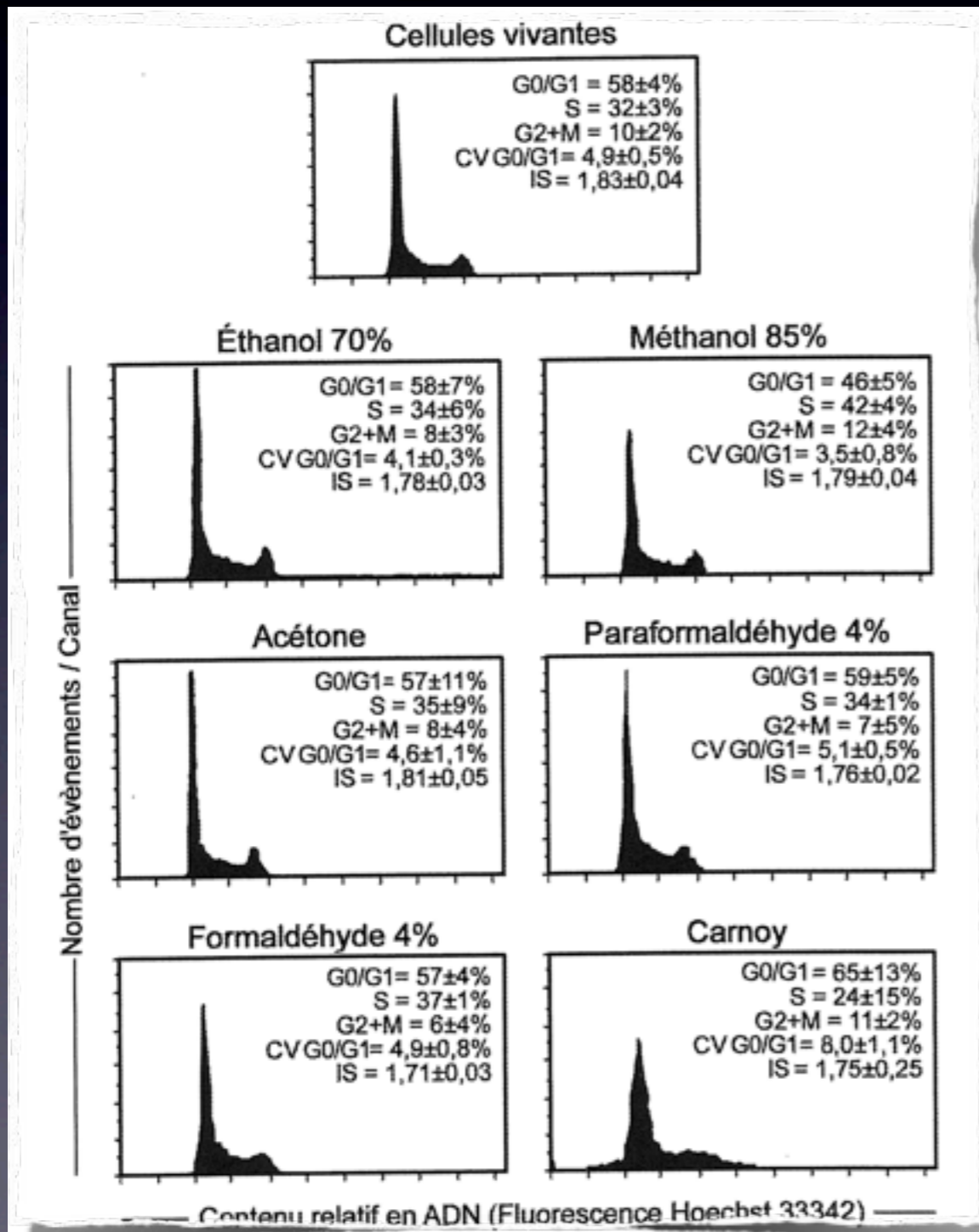


Préparation des cellules

Quel fixateur ?

Hoechst

IP



Préparation des cellules



Quel fixateur ?

- Ethanol :
- précipite les protéines en les dénaturant
 - dissout les lipides complexes
 - détruit le chondriome et l'appareil de golgi
 - structure des acides nucléiques préservée

Pas de détection d'antigènes protéiques

Agit comme agent de perméabilisation

Longue conservation des échantillons

Compatible avec les intercalants

Préparation des cellules



Quel fixateur ?

- Aldéhydes :
- coagulation et insolubilisation des protéines
 - maintient de l'intégrité membranaire
 - préserve l'état structural des organites
 - formation de ponts internes aux bases G-C

Compatible avec un marquage de surface préalable

Nécessite un agent de perméabilisation (Saponine, Triton X100, ...)

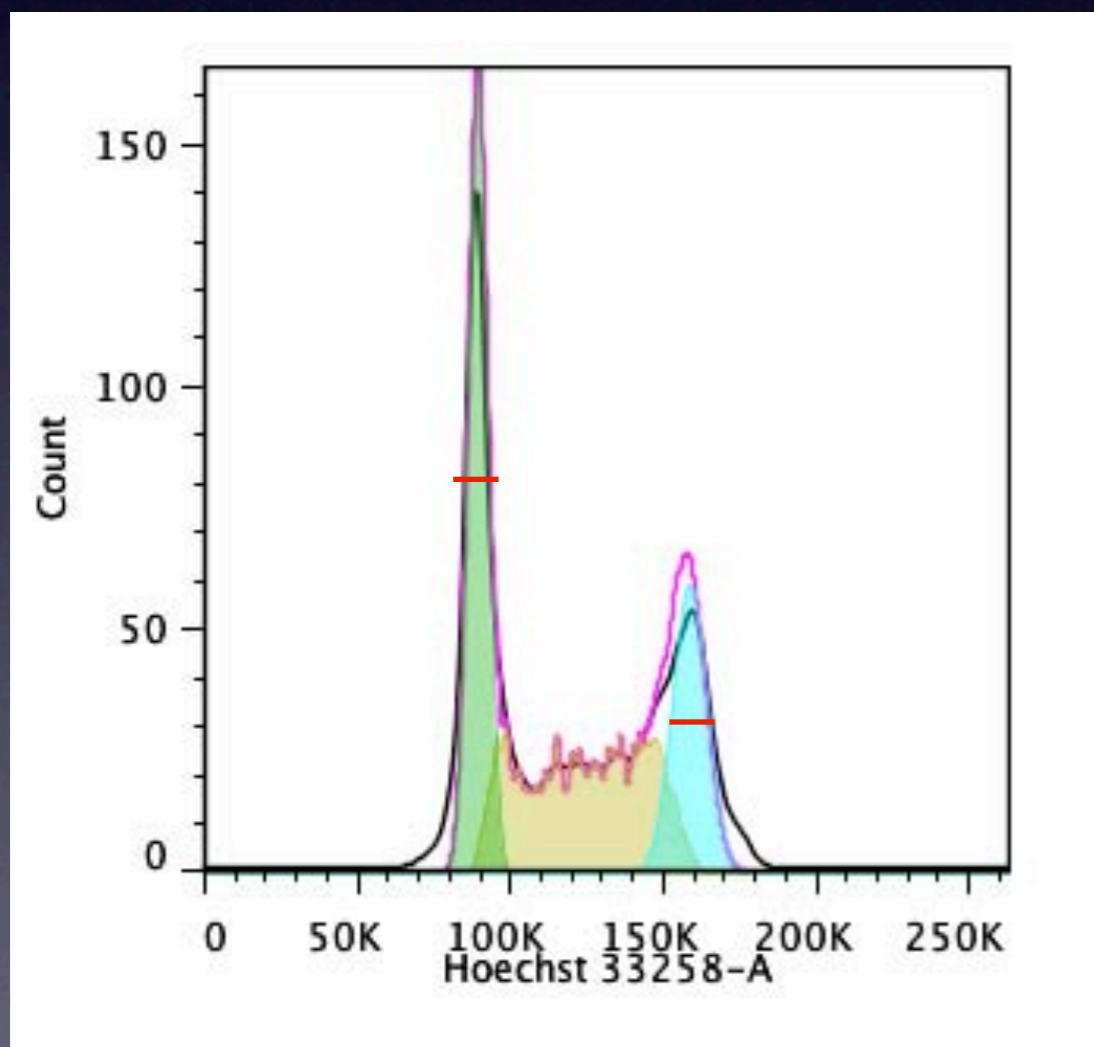
Incompatibilité avec les intercalants

Analyse des cellules

Comment avoir un bon CV



$$\text{Coeff Variation} = \frac{\text{Ecart - Type}}{\text{Moyenne}}$$



Ecart type = $0,425 \times$ largeur à mi-hauteur

```
2011-11-15_No treatment 0Gy.fcs
Cell Cycle
Watson
RMS = 1,59
Freq. G1 = 35,08
Freq. S = 40,1
Freq. G2 = 22,86
G1 Mean = 89173
G2 Mean = 158182
G1 cv = 4,91
G2 cv = 5,04
Freq. sub-G1 = 5,43
Freq. super-G2 = 2,39

3578
```

Analyse des cellules



Comment avoir un bon CV

Capacités d'analyse de l'appareil

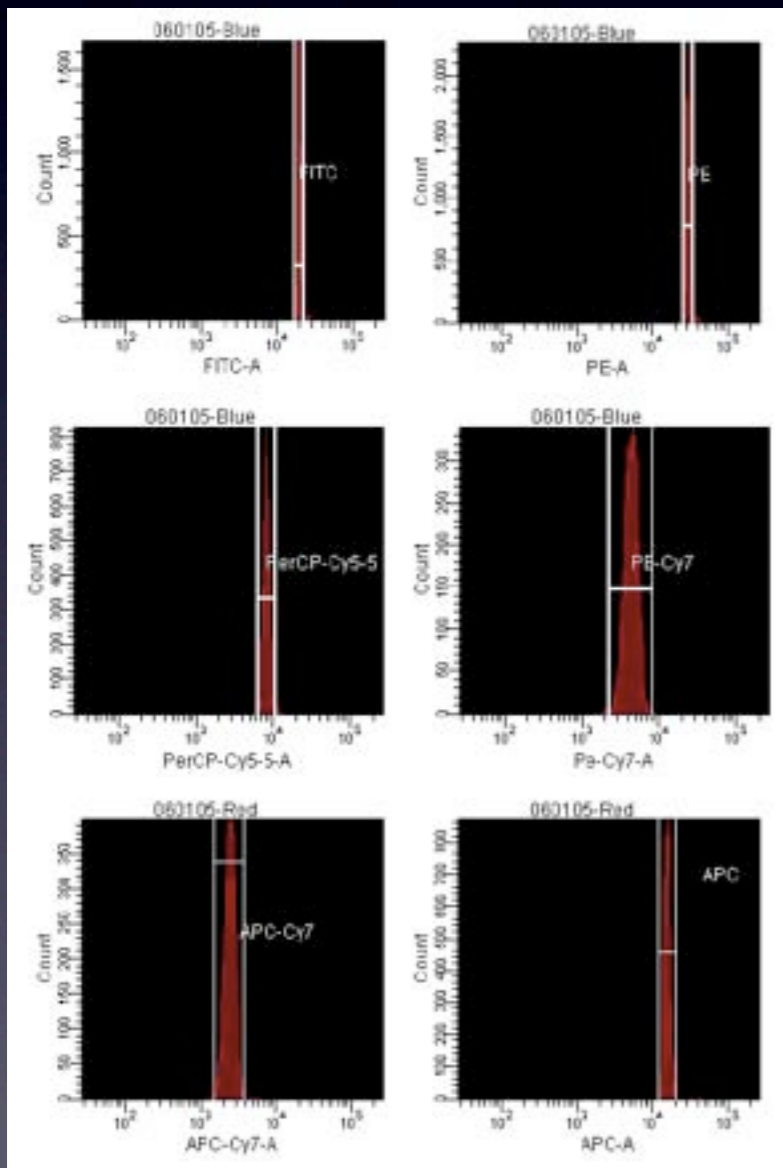
Préparation de l'échantillon

Conditions d'analyse

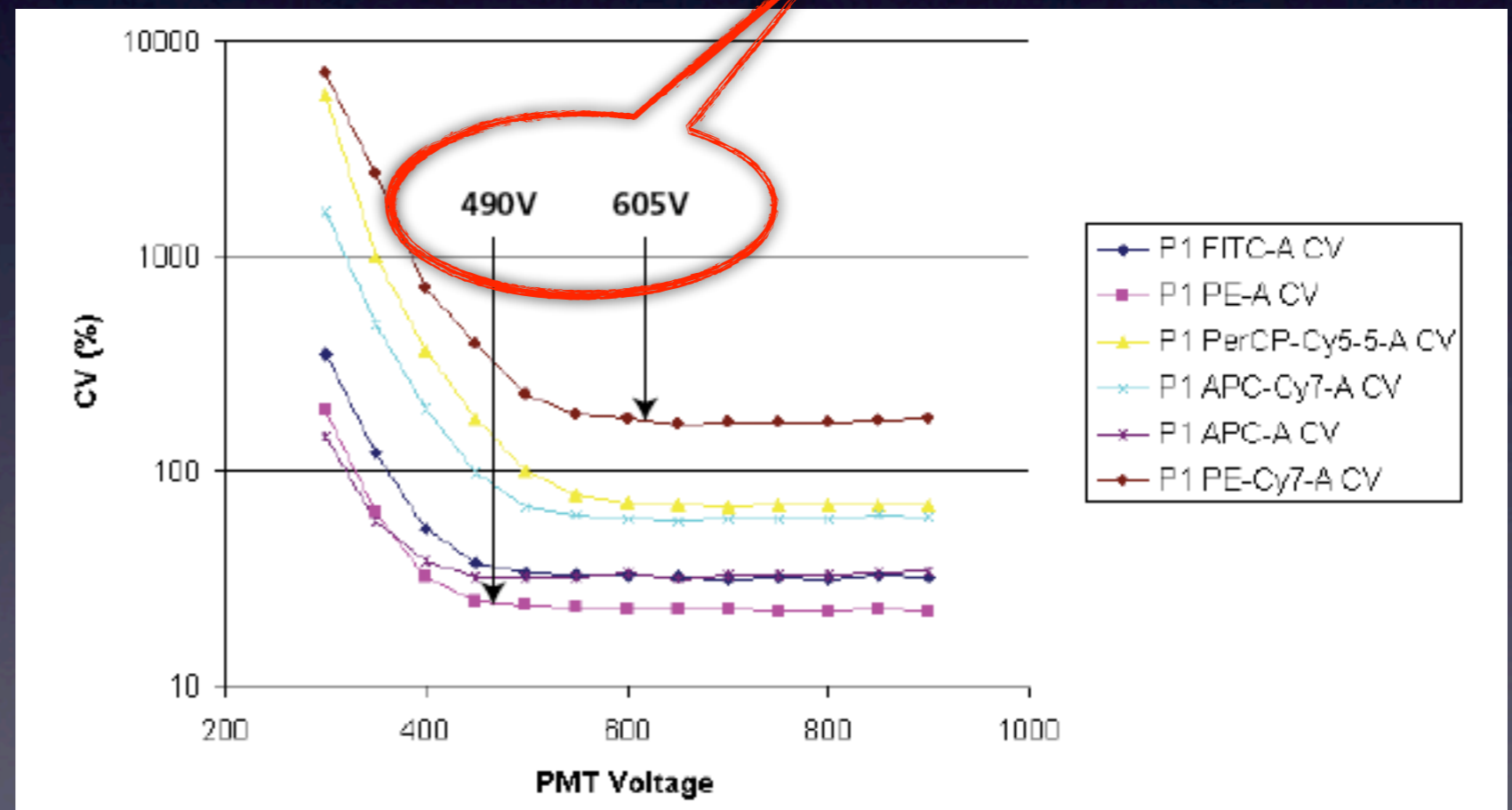
Analyse des cellules

Comment avoir un bon CV

Capacités d'analyse de l'appareil



Valeurs minimales de voltage

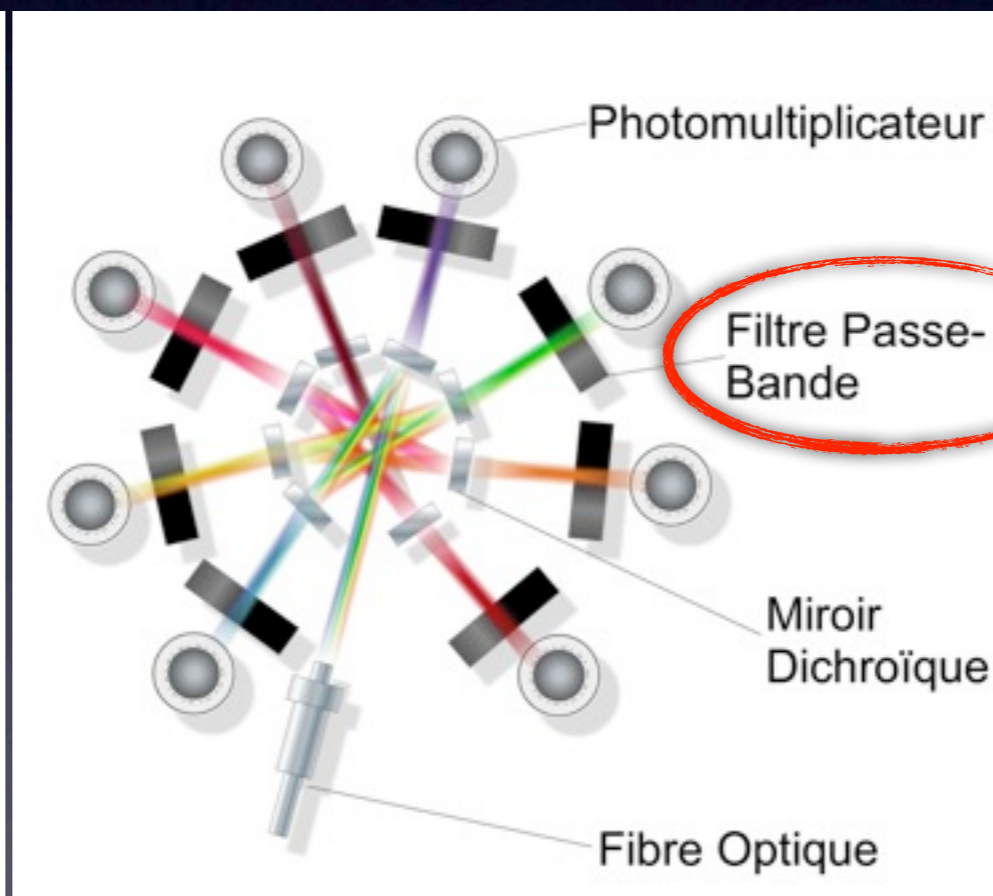
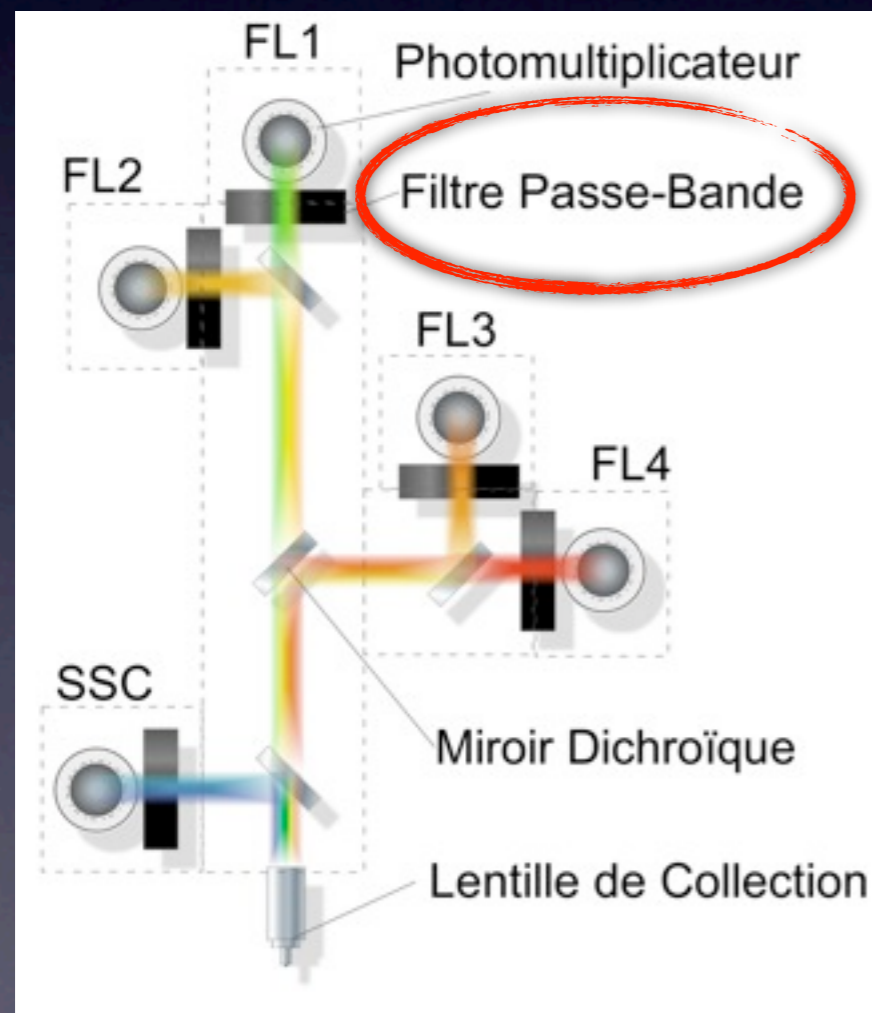


Analyse des cellules

Comment avoir un bon CV

Capacités d'analyse de l'appareil

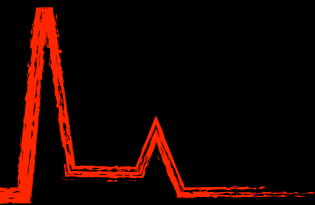
Dépend de la configuration optique



Alignement

Filtres

Analyse des cellules



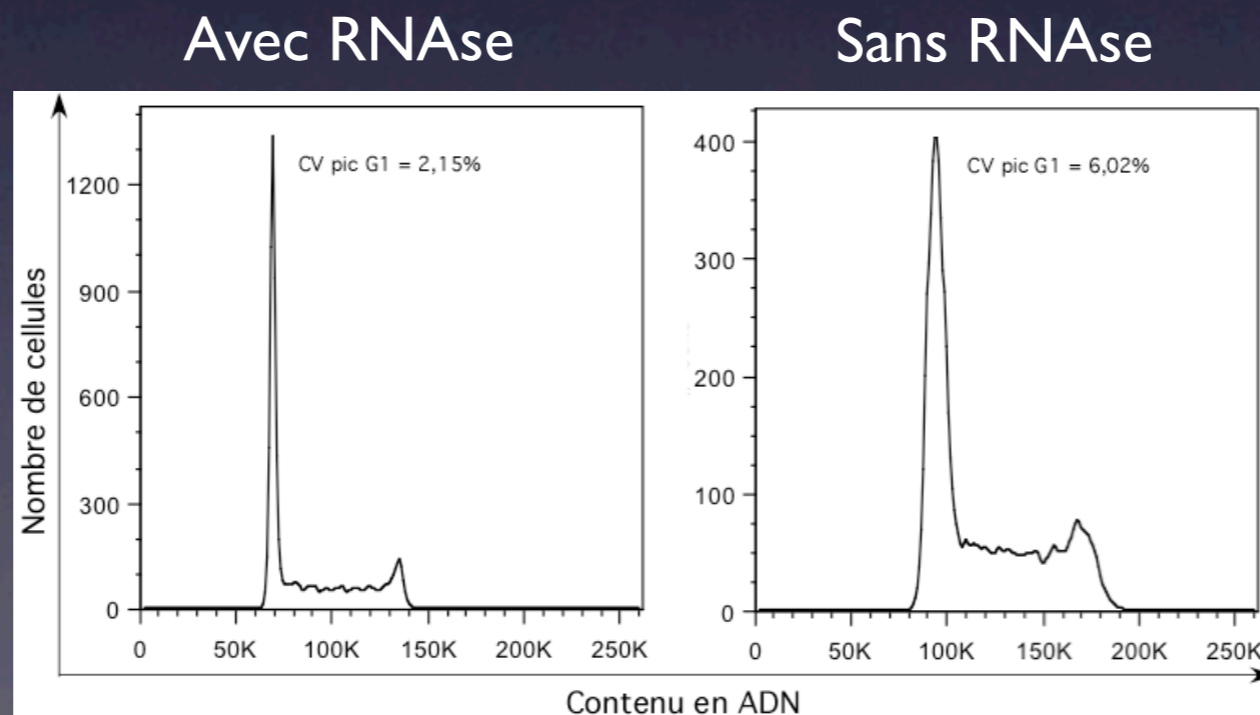
Comment avoir un bon CV

Préparation de l'échantillon

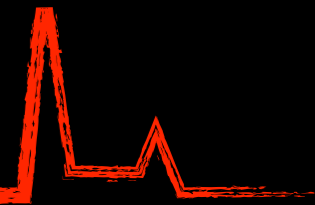
Dépend du fluorochrome utilisé (Best : DAPI, IP, Hoechst)

Cellule entière ou noyau

Intercalants : qualité traitement RNase



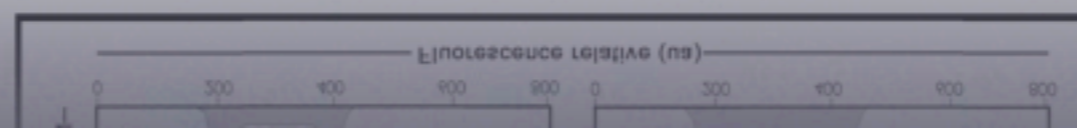
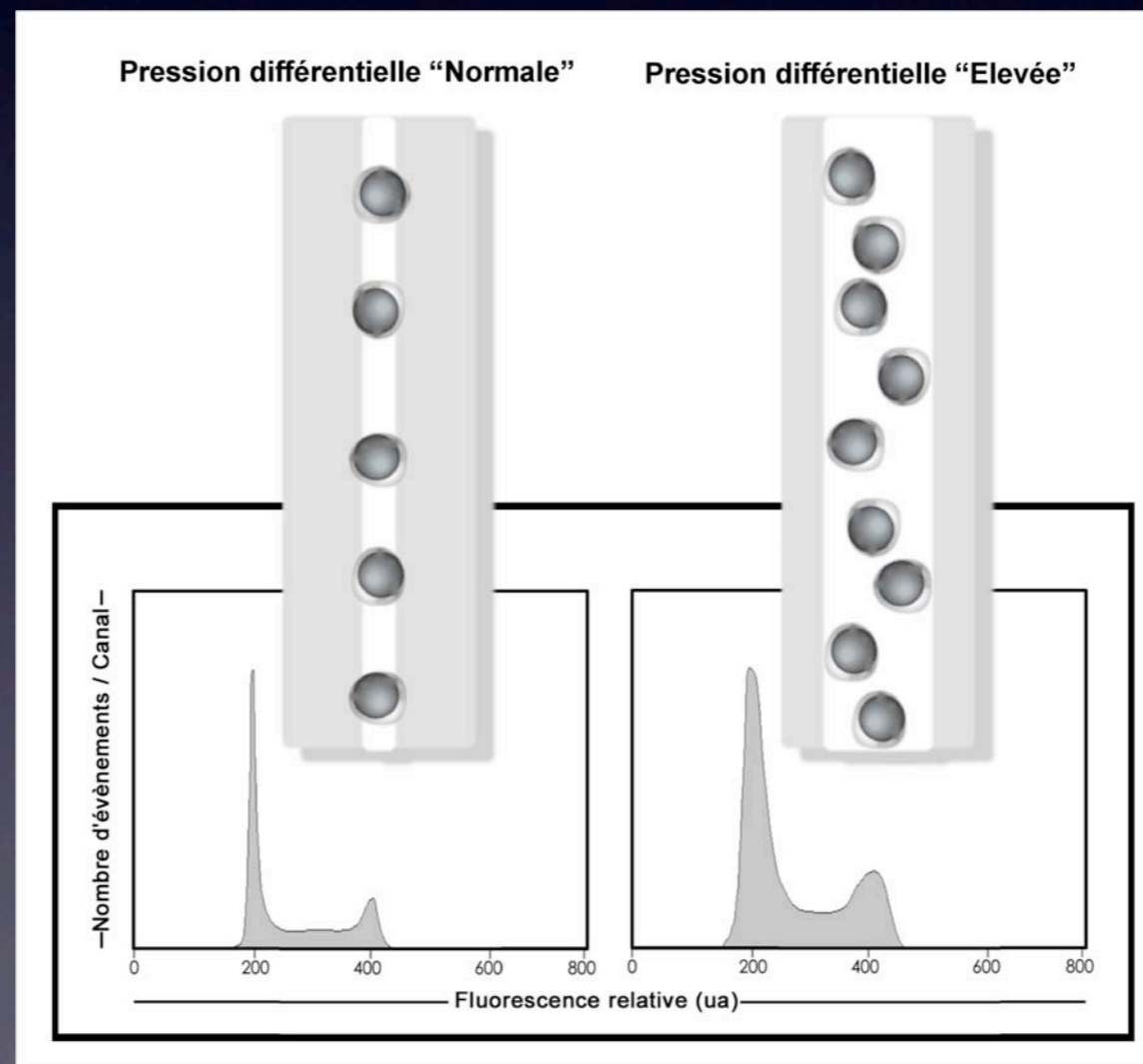
Analyse des cellules



Comment avoir un bon CV

Conditions d'analyse

Débit d'analyse



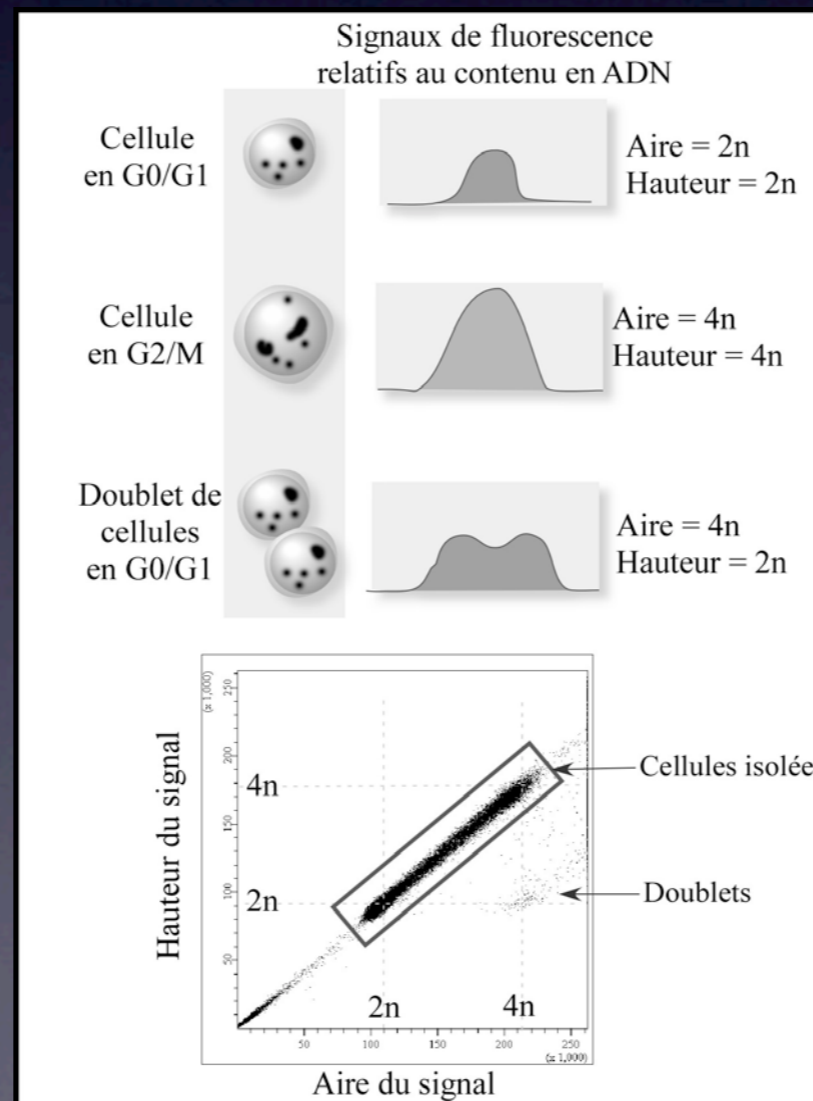
Analyse des cellules

Comment avoir un bon CV

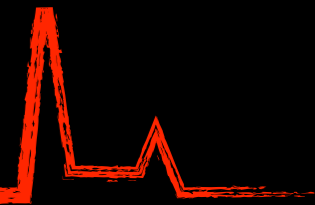
Conditions d'analyse

Concentration cellulaire

Trop de doublets < Optimum < Débit analyse trop élevé

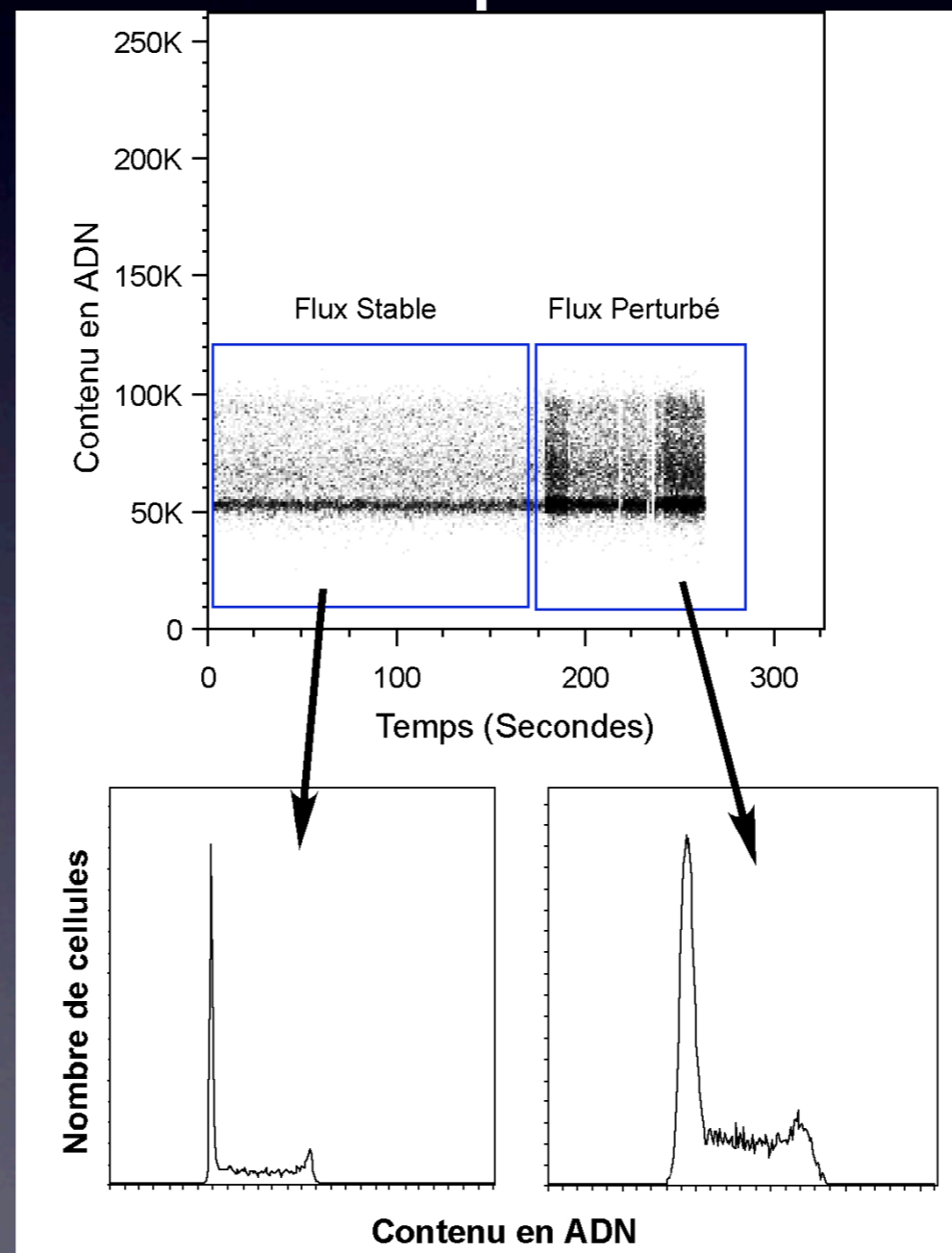


Analyse des cellules



Comment avoir un bon CV

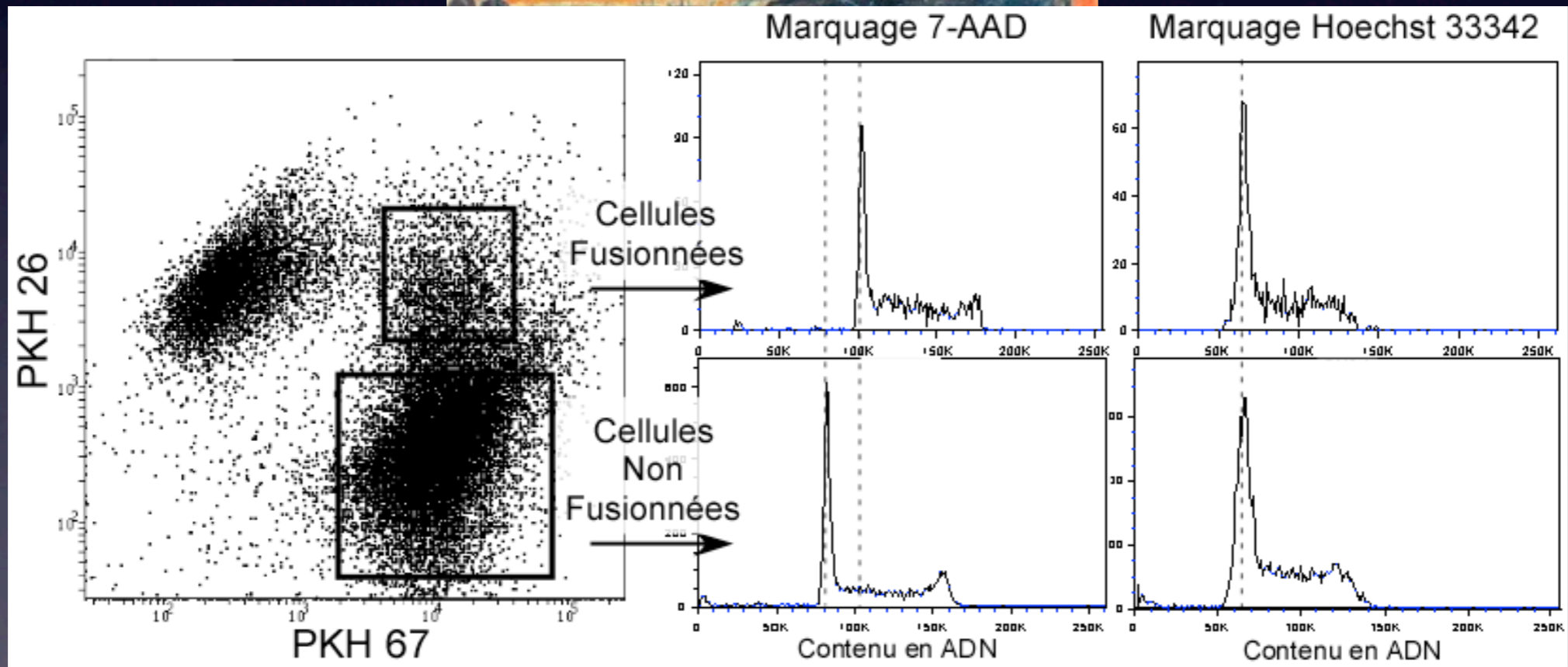
Utiliser le paramètre «Temps»



Contenu en ADN

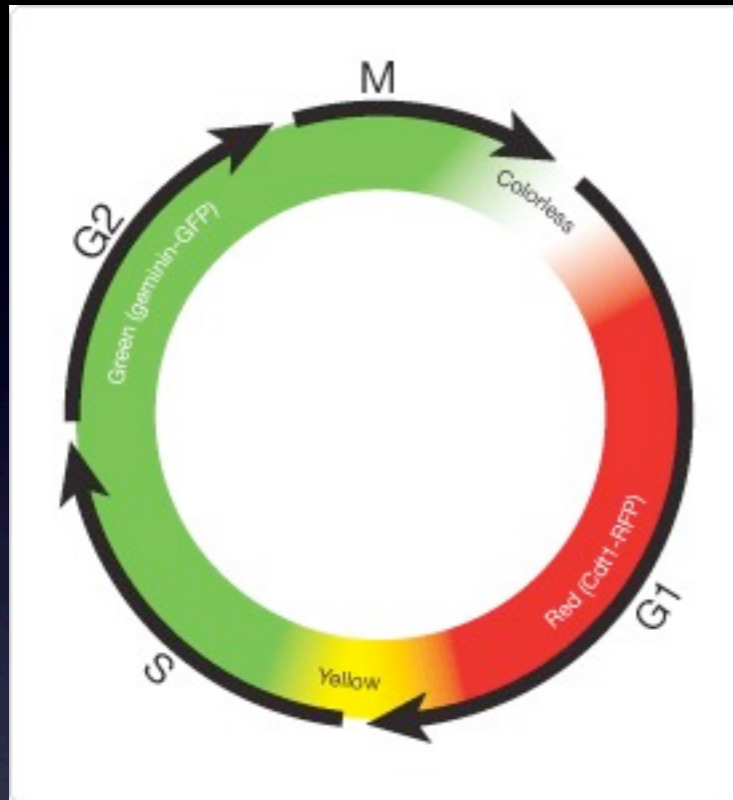
Analyse des cellules

Compensations et cycle cellulaire



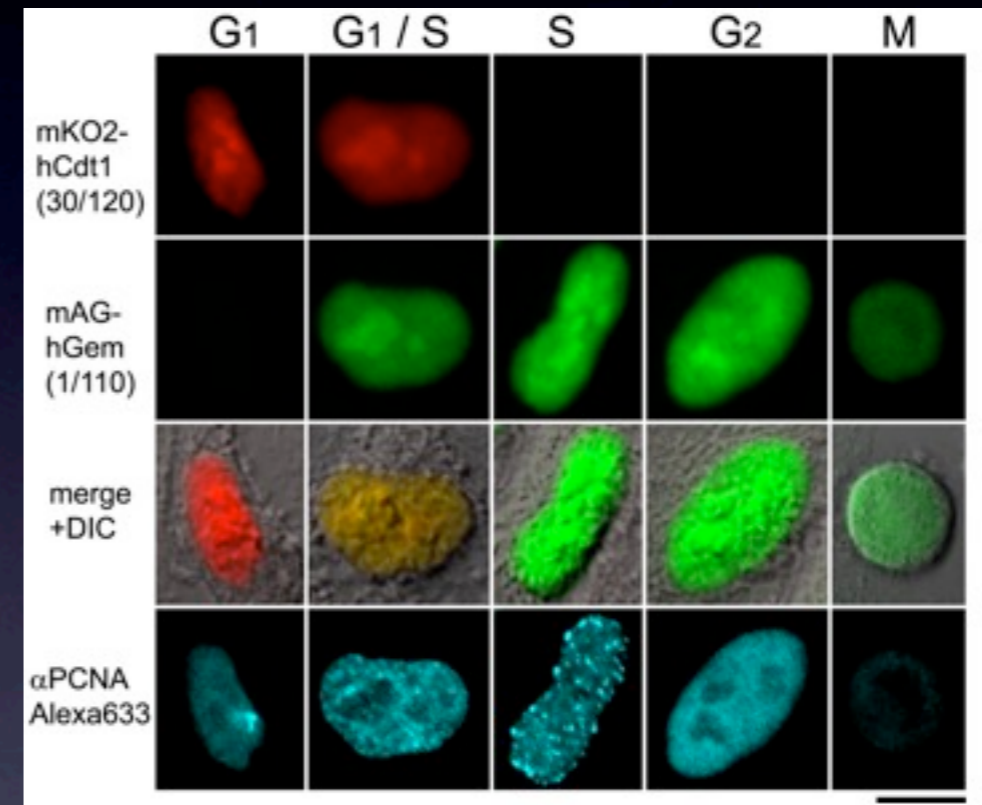
Systeme FUCCI

Cellules transfectées avec deux régulateurs du cycle

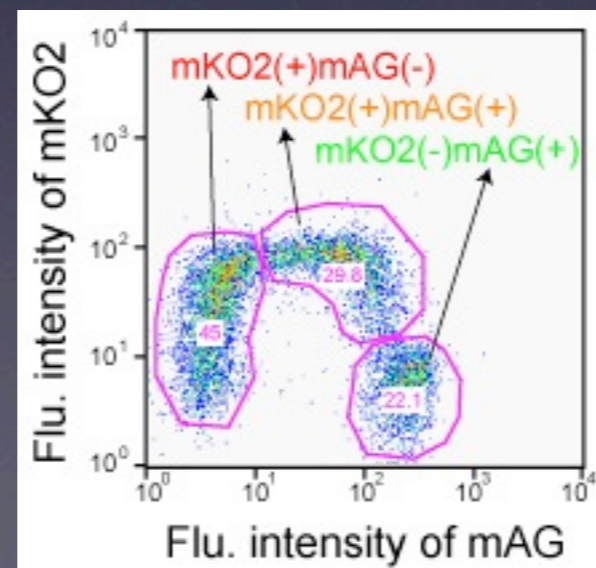


Geminin

Cdt-1

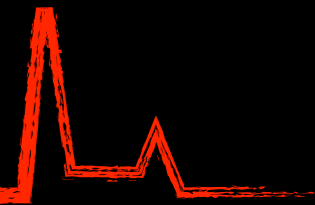


Cdt-1



Geminin

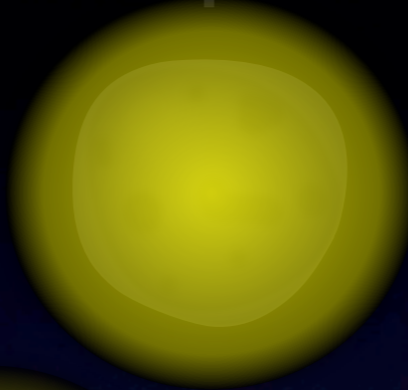
Prolifération cellulaire



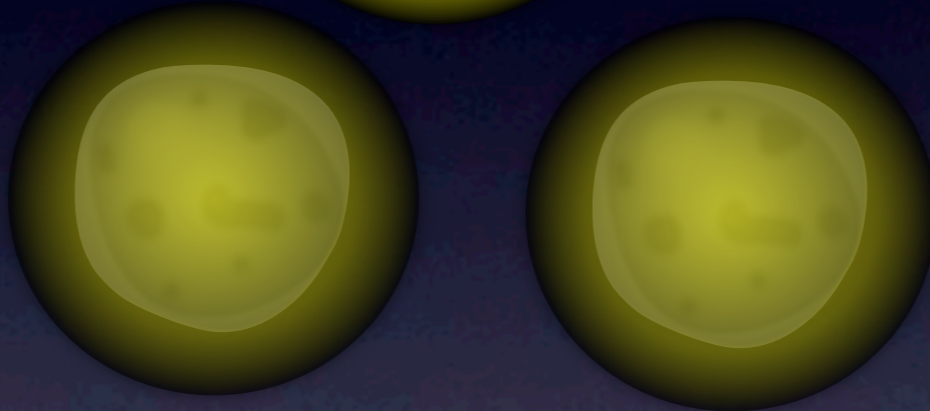
Principe

Génération

0



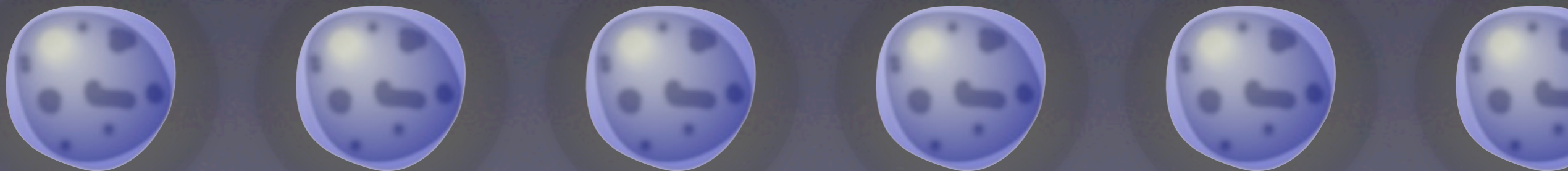
1



2



3



Prolifération cellulaire

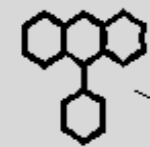
Fluorochromes

Compartiment
extracellulaire

Sonde Polaire

Sonde Lipophile

Diffusion passive
à travers la membrane



Composé
non-fluorescent

Estérases

Formation d'une liaison
covalente et rétention
dans la cellule

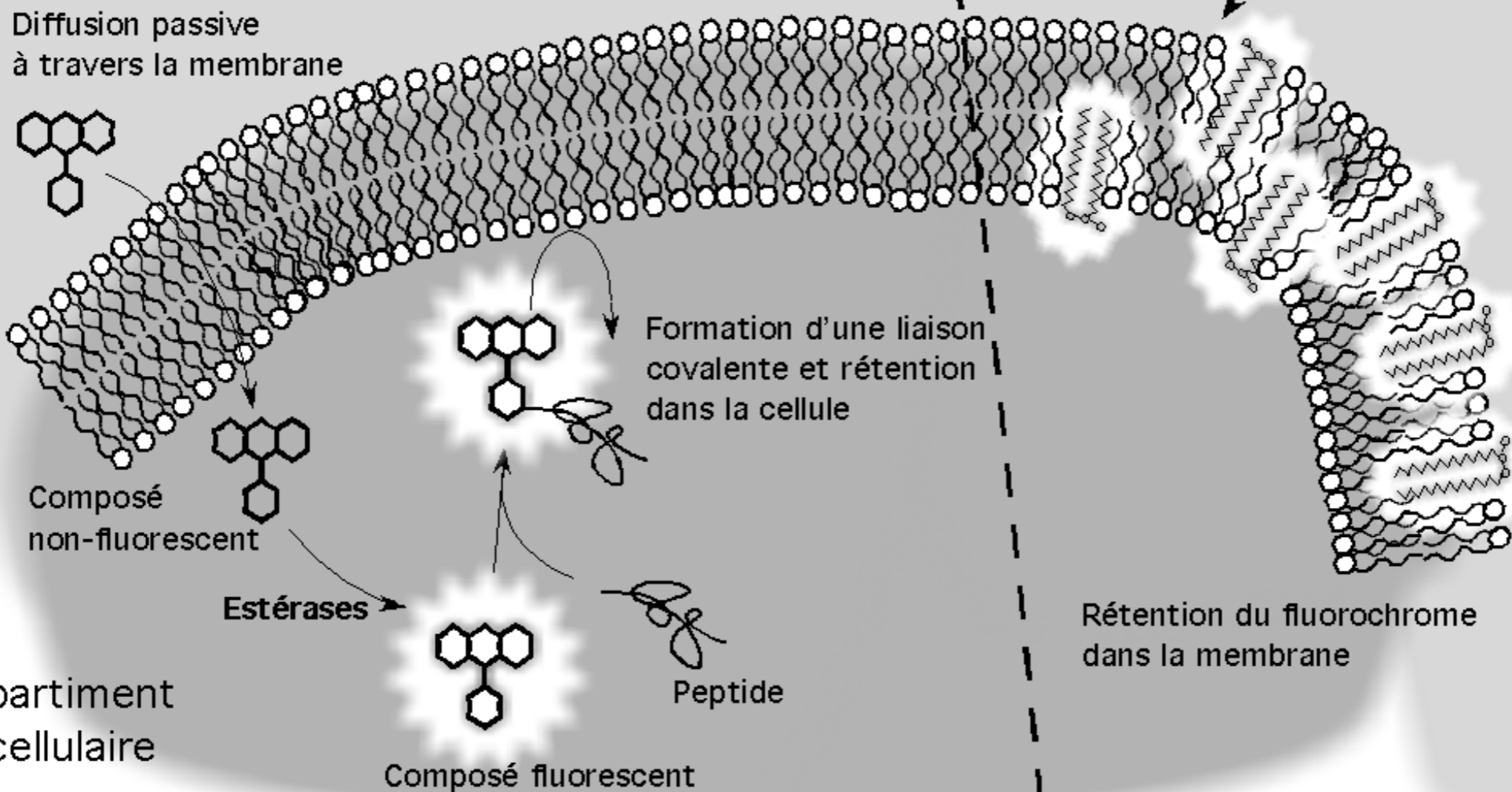
Peptide

Composé fluorescent

Insertion du fluorochrome
lipophile dans la bicouche lipidique

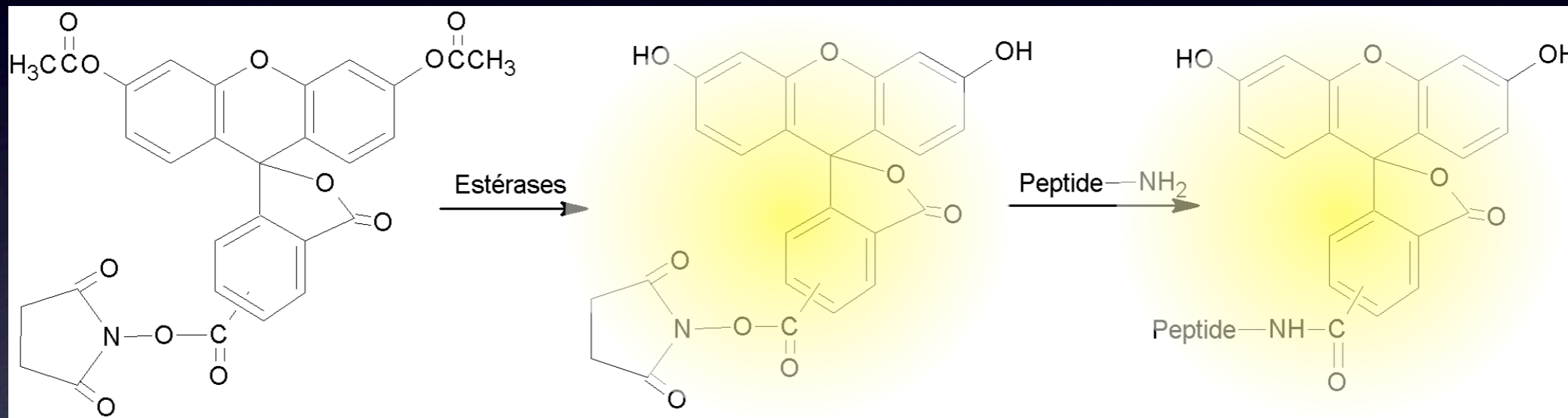
Rétention du fluorochrome
dans la membrane

Compartiment
intracellulaire

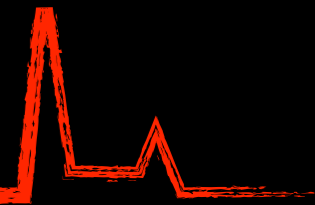


Prolifération cellulaire

Sondes polaires



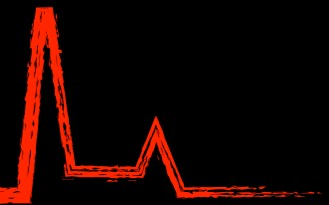
Prolifération cellulaire



Sondes polaires

Molécule	Abs max (nm)	Em max (nm)
CFSE	492	517
Carboxy-DFFDA, SE	496	524
Diacétate de carboxyéosine succinimidyl ester	519	542
Acétate de SNARF-1 acide carboxylique succinimidyl ester	548	587
DDAO-SE	647	657

Prolifération cellulaire



Sondes polaires

Efflux du fluorochrome



Plateforme d'Imagerie Cellulaire et Tissulaire (PICT)

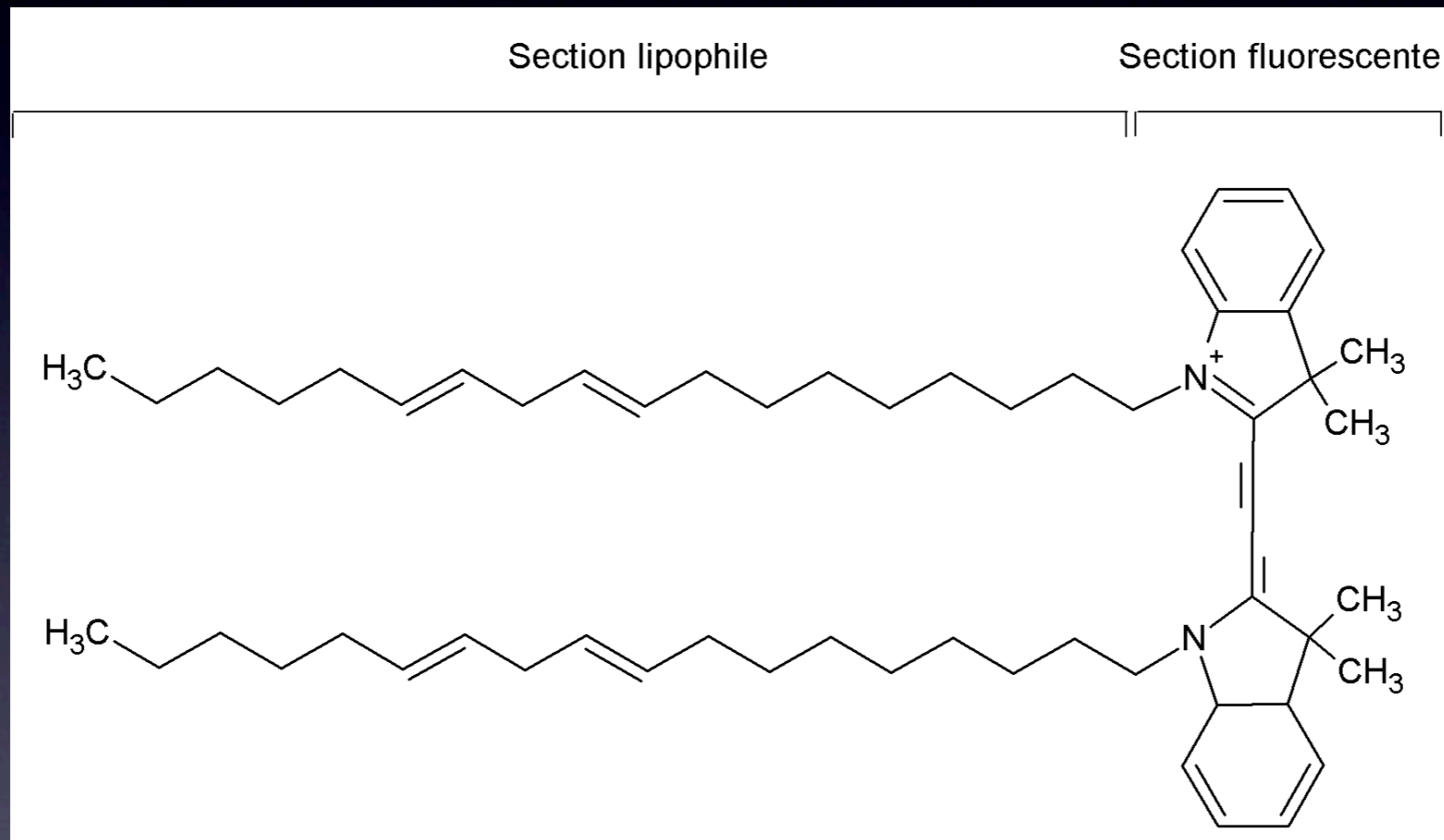
Imagerie en Vidéomicroscopie sur Axiovert 200M

relargage du CFSE par des cellules marquées

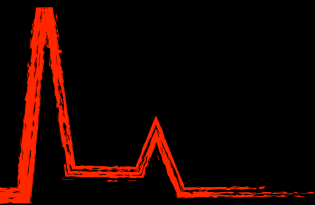
CeCIL

Prolifération cellulaire

Sondes lipophiles



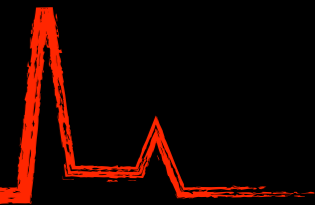
Prolifération cellulaire



Sondes lipophiles

Molécule	Abs max (nm)	Em max (nm)
DiO	484	501
PKH2	490	504
DiI	549	565
PKH67	490	504
PKH26	551	567
DiD	644	665

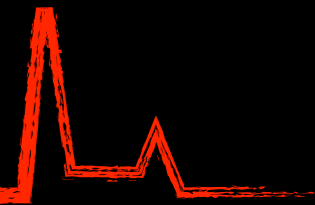
Prolifération cellulaire



Sondes lipophiles

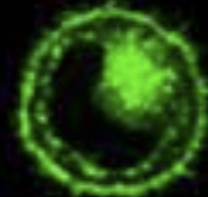
Molécule	Abs max (nm)	Em max (nm)
CellVue Maroon	647	667
CellVue Claret	655	675
CellVue Plum	652	671
CellVue Burgundy	683	707
CellVue Lavendar	420	461
CellVue NIR 815	786	814
CellVue NIR 780	745	776
CellVue Jade	478	508
CellVue Red	567	588

Prolifération cellulaire



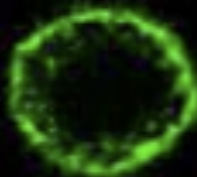
Sondes lipophiles

0 Min



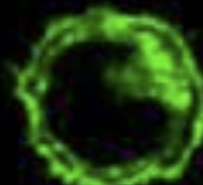
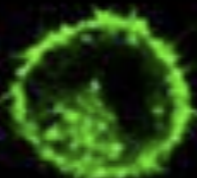
20 Min

5 Min



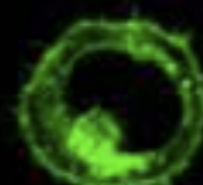
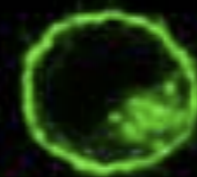
23 Min

7 Min



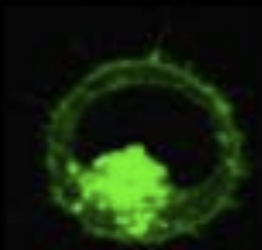
26 Min

11 Min



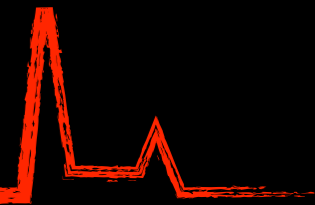
30 Min

16 Min



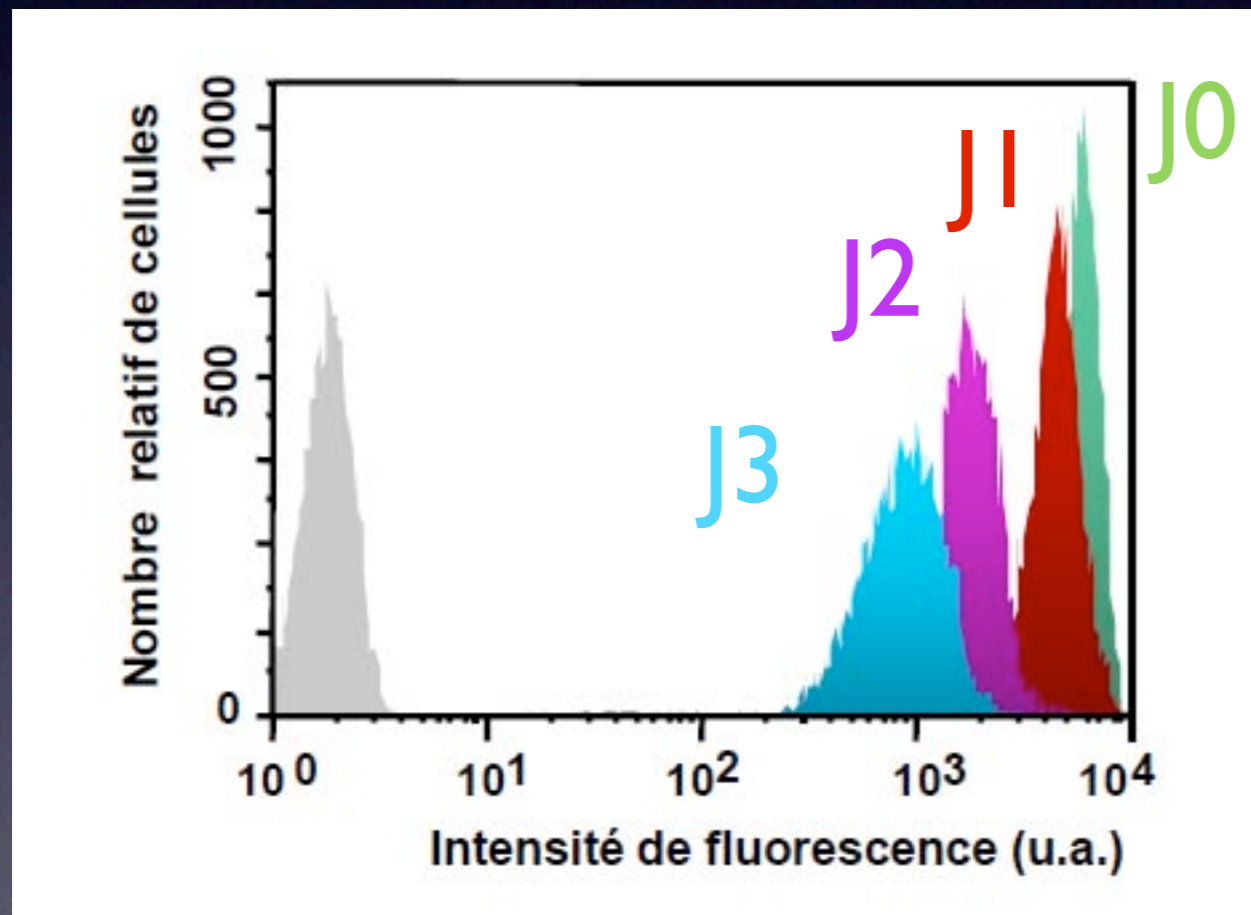
35 Min

Prolifération cellulaire



Interprétations

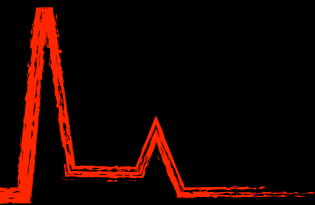
Lignée mono ou oligo-clonale



Indice de prolifération =

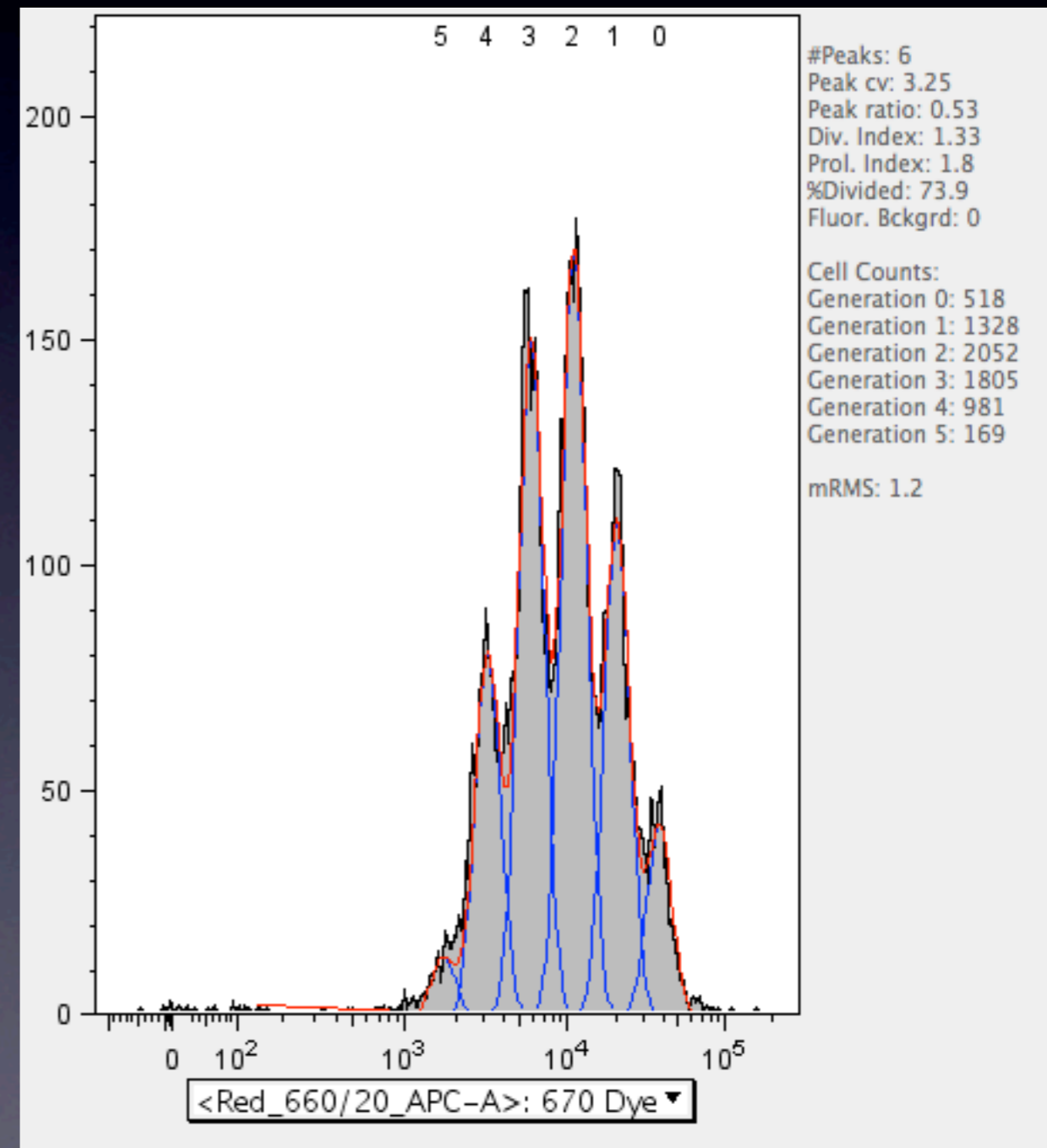
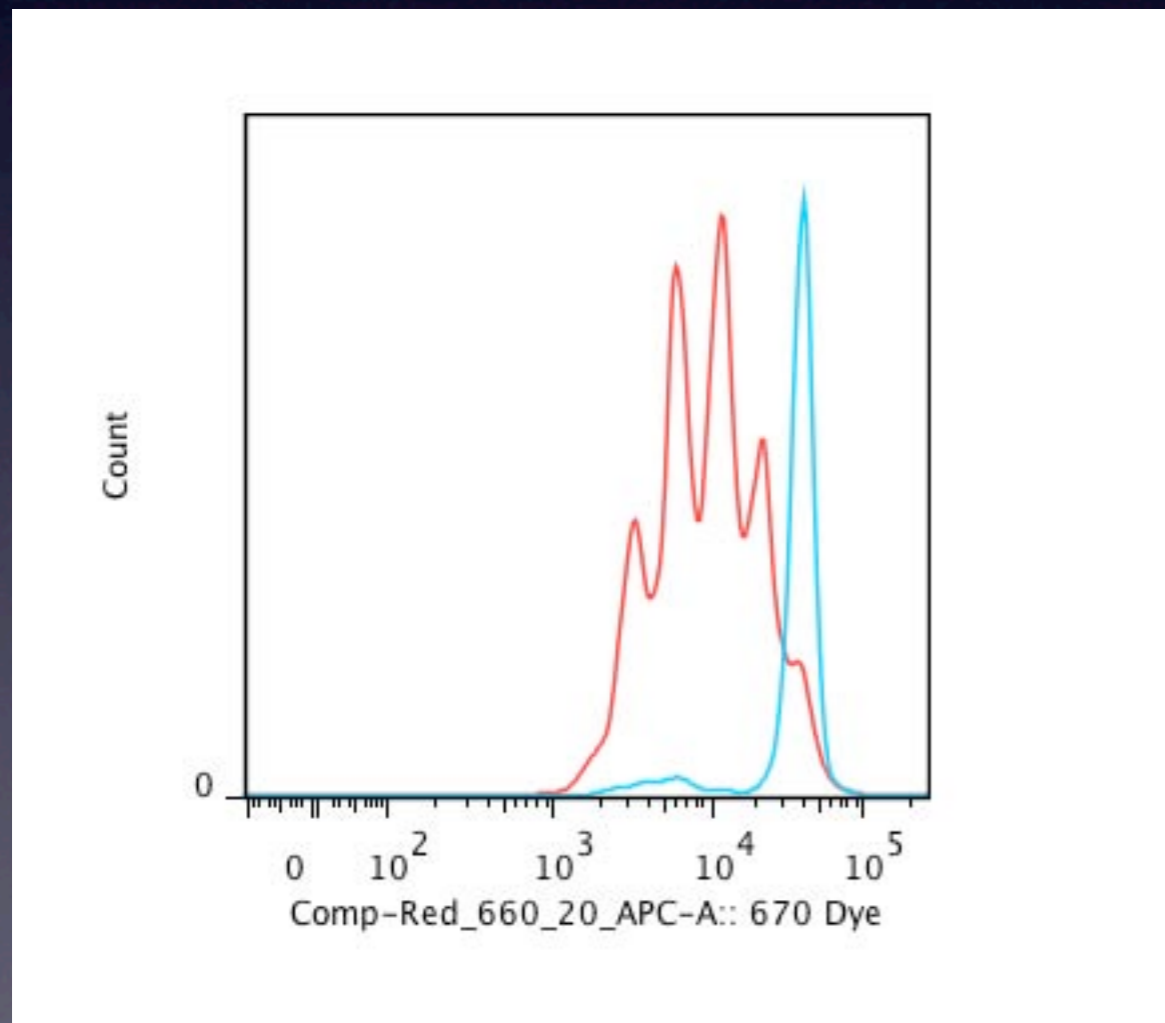
$$\frac{\text{Mean Fluo } J_0}{\text{Mean Fluo } J_n}$$

Prolifération cellulaire



Interprétations

Lignée poly-clonale
Lymphocytes T



Merci pour votre attention !!

