

Université de Bourgogne

Coloration cellulaire et immunomarquage, sondes fluorescentes,  
quantification et caractérisation de populations cellulaires....

Gérard LIZARD

Université de Bourgogne / Laboratoire Bio-peroxIL (EA 7270) / Inserm, Dijon, France

# Colorations Cellulaires et Cytométrie en Flux

---

## - Fluorochromes liés:

- Anticorps + fluorochromes
- Protéines + fluorochromes (Annexine-V FITC; LC3 GFP.....)

## - Fluorochromes libres:

- Physiologie cellulaire (ERO, ERN, mort cellulaire, flux de calcium....)

## - Fluorochromes sont:

- soit de petites molécules (FITC, PE,.....)
- soit de grosses molécules (protéines: GFP, YFP.....)

# Fluorochromes, Fluorescence et ... Phosphorescence

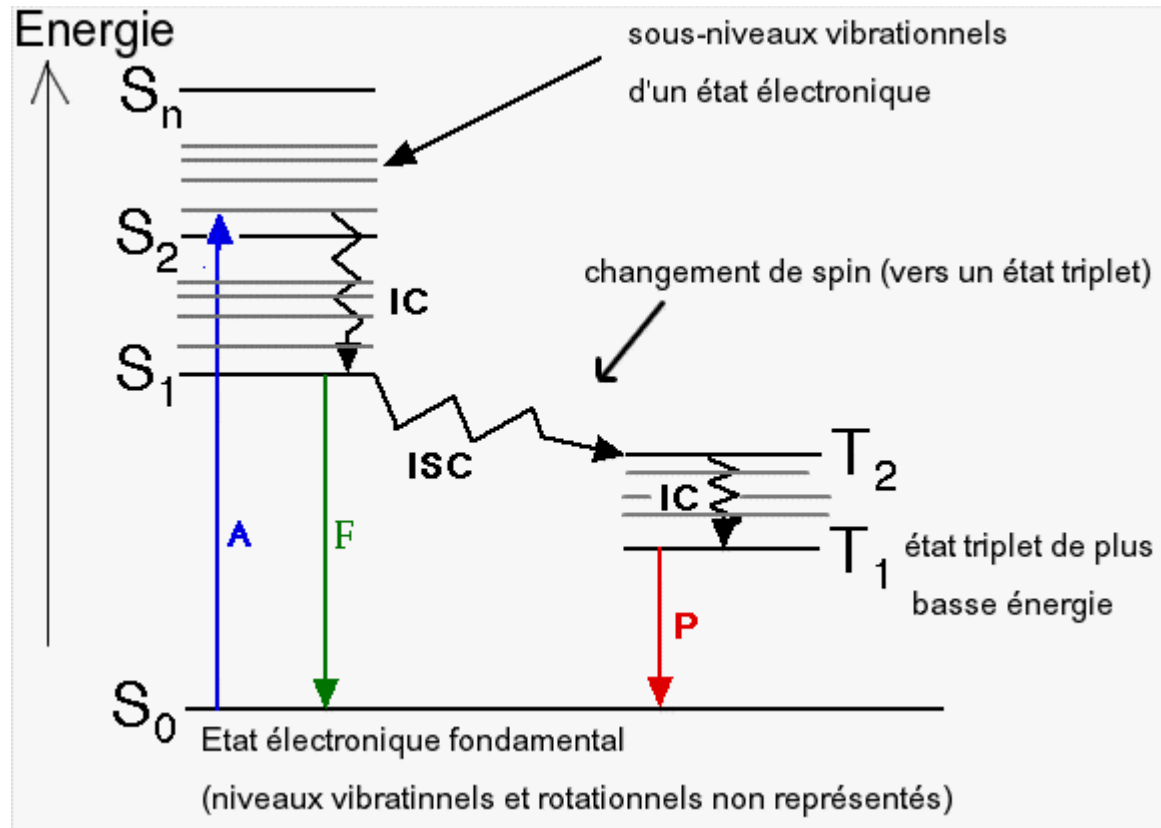
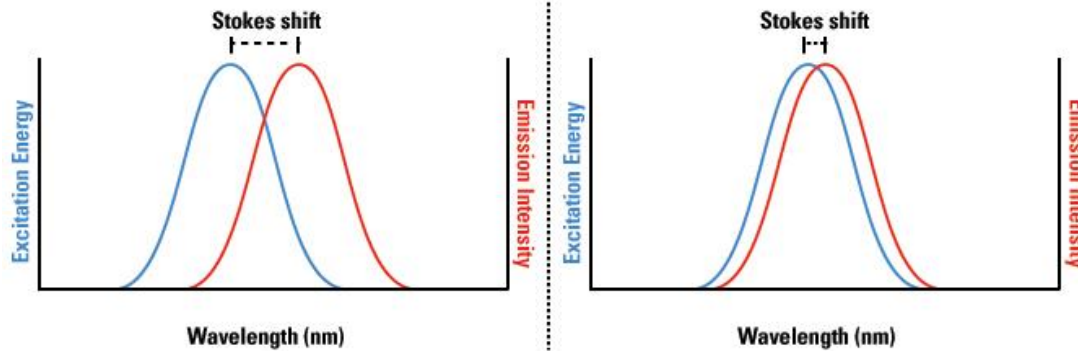
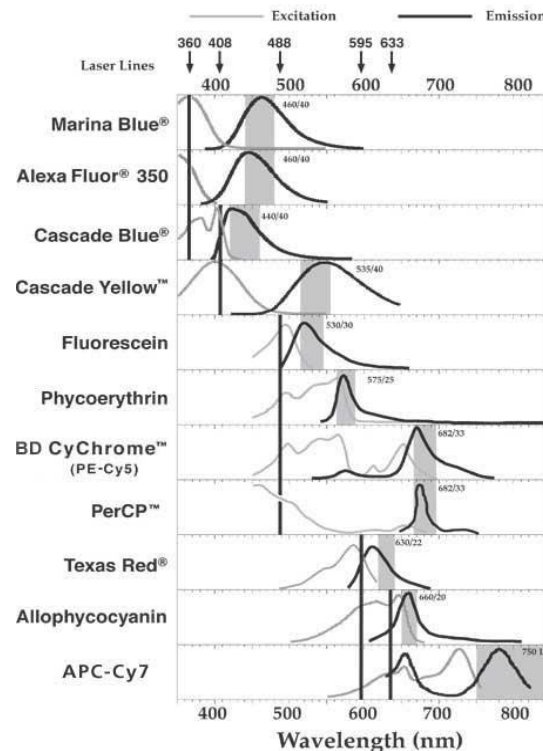


Diagramme dit de Jablonski  
permettant de définir la **fluorescence** et la **phosphorescence**

# Caractéristiques des Fluorochromes



Fluorochrome Dyes Used in Flow Cytometry



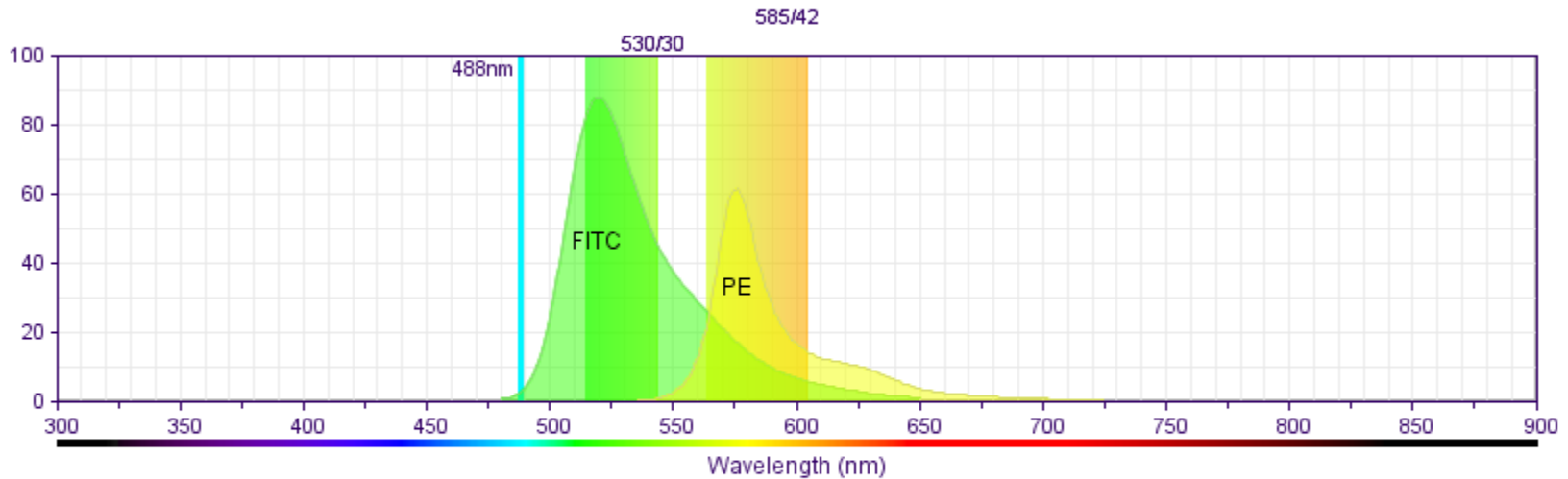
- Un bon fluorochrome doit avoir un 'Stokes shift' (écart de Stokes) assez élevé

- Un fluorochrome peut présenter plusieurs pics d'excitation et d'émission (toutefois un seul  $\lambda_{ExMax}$  et un seul  $\lambda_{EmMax}$ )

- Les caractéristiques des fluorochromes conditionnent leur utilisation simultanée

# FLUOROCHROMES – Spectra Viewer

Options Curves: 2 Cytometer: Any Cytometer Laser: 488  Show Em *Only* when Ex % > 5 Cursor Location: (Place Cursor)

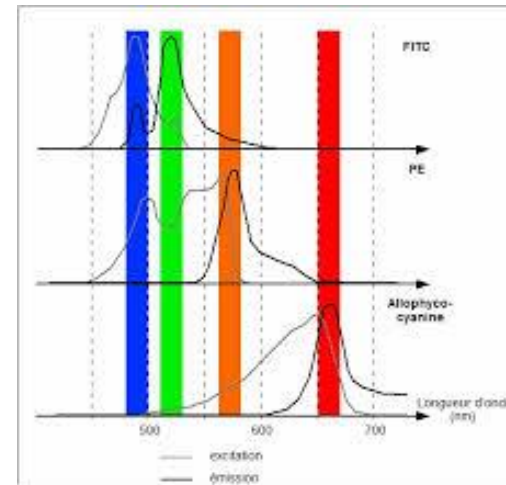
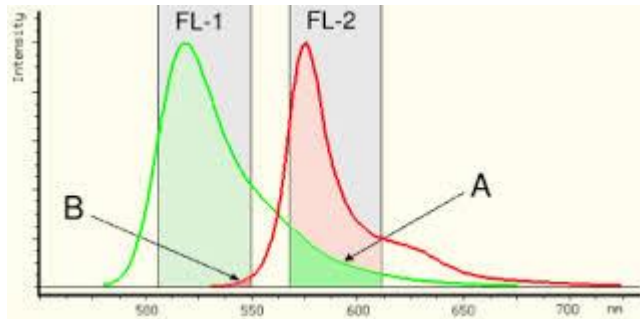


Fluorochrome	%	<input type="checkbox"/> Ex	<input checked="" type="checkbox"/> Em	<input checked="" type="checkbox"/> Filters	FITC	PE
FITC	88	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	530/30	<input checked="" type="checkbox"/>
PE	62	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	585/42	<input checked="" type="checkbox"/>

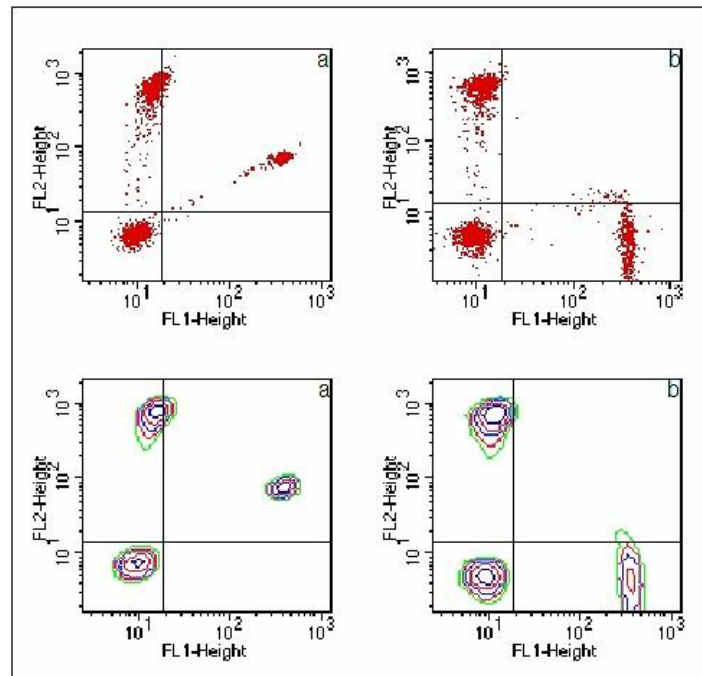
<http://www.lifetechnologies.com/greater-china/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html.html>

[http://www.bdbiosciences.com/research/multicolor/spectrum\\_viewer/index.jsp](http://www.bdbiosciences.com/research/multicolor/spectrum_viewer/index.jsp)

# Notion de Compensation de Fluorescence



- La compensation de fluorescence s'impose quand les pics d'émission de fluorescence se chevauchent au niveau de la bande passante où est collectée la fluorescence
- La compensation de fluorescence est **une soustraction électronique** de signal indésirable.



# Conditions d'Utilisation : Optimiser chaque Fluorochrome

---

- Définir les conditions optimales pour chaque fluorochrome libre

*(les adapter à chaque type cellulaire)*

- ✓ concentrations (quenching)
- ✓ temps d'incubation
- ✓ température
- ✓ pH
- ✓ lavage ou non
- ✓ fixation (dégradation)
- ✓ lumière (photosensibilité)
- ✓ diffusion, relargage dans le milieu de culture
- ✓ interactions entre fluorochromes (transfert d'énergie)

# Fluorochromes Libres : Etude de la Physiologie Cellulaire

---

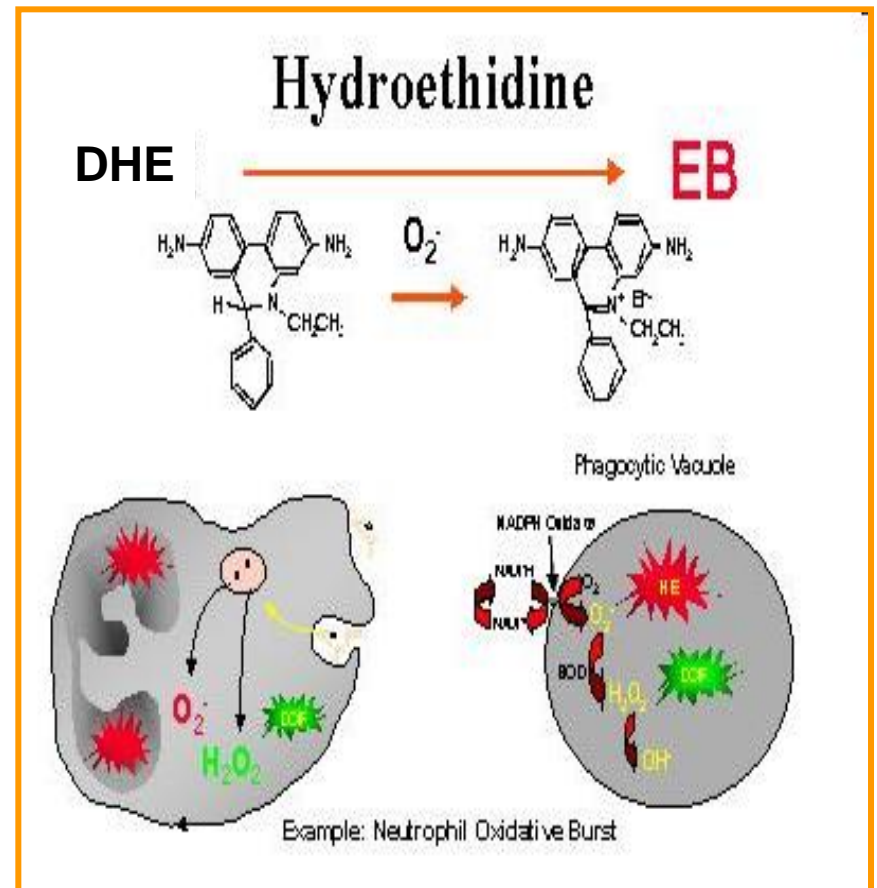
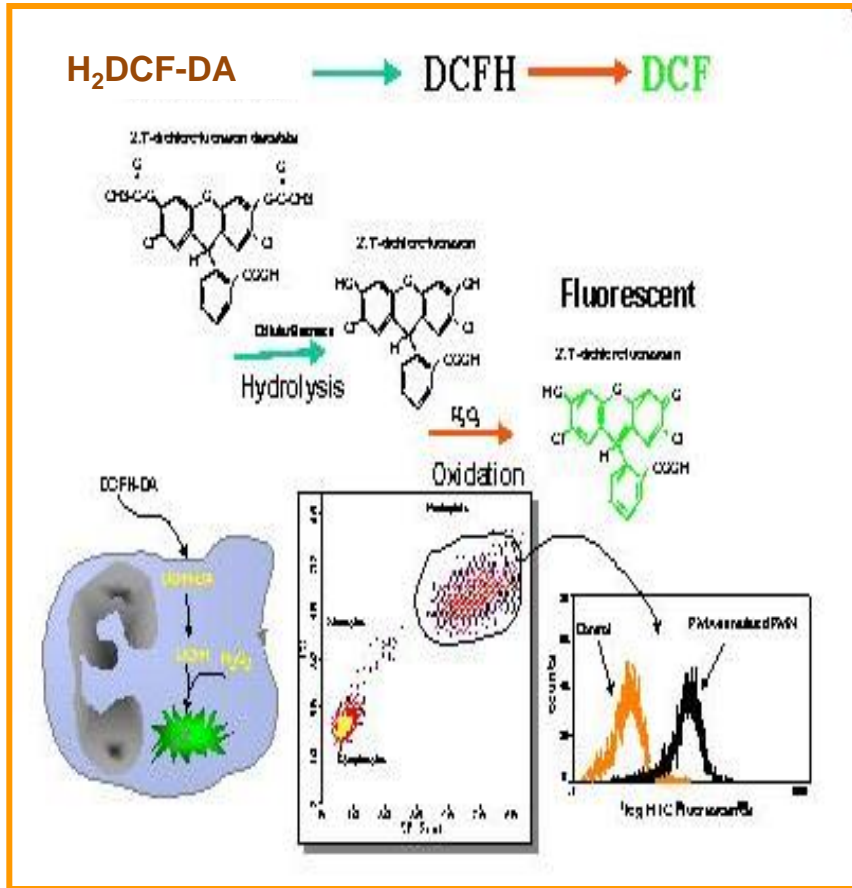
Etude sur cellules vivantes:

- Pas de fixation possible
- Analyse extemporanée requise
- Réaliser des séries d'analyses de taille raisonnable (Même temps de coloration pour tous les échantillons)
- Insérer des contrôles biologiques négatifs et positifs pour valider les résultats obtenues (fonctionnalité des cellules, fonctionnalité du fluorochrome)
- Cytomètre requis sur site



# Mesure de la Surproduction de Radicaux Oxygénés

*Dichlorofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA) et Dihydroethidium (DHE)*



# Physiologie Cellulaire par Cytométrie en Flux - Présentation des Résultats

## Histogrammes de Fluorescence -

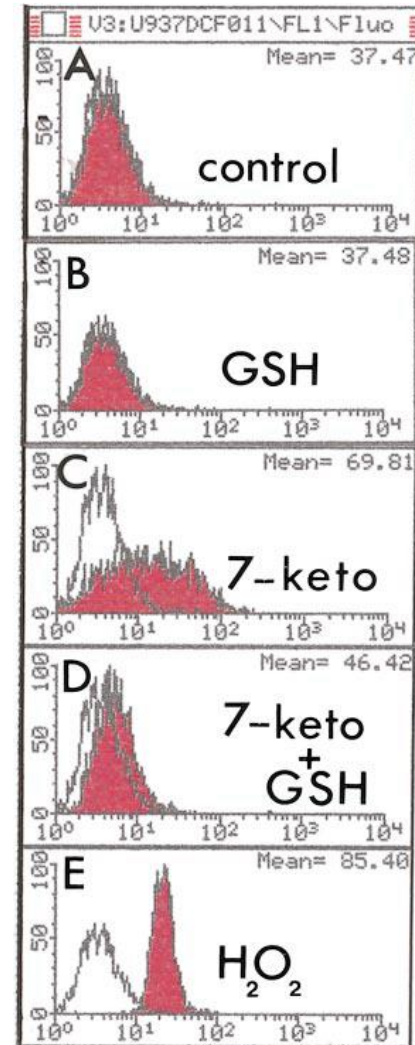
Impairment of ROS production by glutathione during 7-ketocholesterol-induced apoptosis. Analysis of ROS production in untreated U937 cells (control) (A), glutathione-treated cells (10 mmol/l) (GSH) (B), 7-ketocholesterol-treated cells (40 mg/ml) (7-keto) (C), and 7-ketocholesterol (40 mg/ml) plus glutathione (10 mmol/l)-treated cells (7-keto/GSH) (D).

At the end of the incubation time, ROS production was quantified by flow cytometry after staining with H<sub>2</sub>DCF-DA, and a **positive control (E) was performed with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> used at 1 volume final concentration.**

The DCF fluorescence resulting from the oxidation of H<sub>2</sub>DCF-DA was measured on 10,000 cells on a logarithmic scale of fluorescence of four decades of log by using a FACScan flow cytometer; data shown are representative of three independent experiments.

Shaded histograms: ROS production revealed by the fluorescence of DCF resulting from the oxidation of H<sub>2</sub>DCF-DA; unshaded histograms: spontaneous fluorescence of the cells.

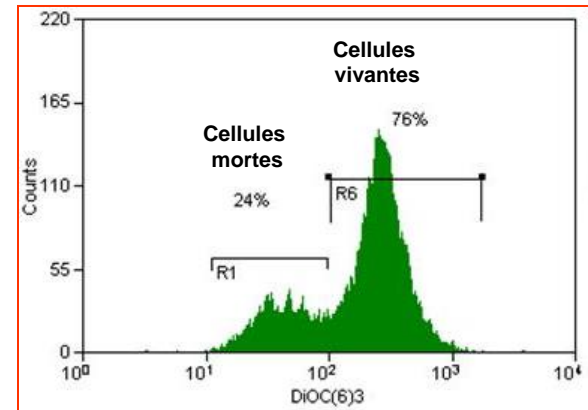
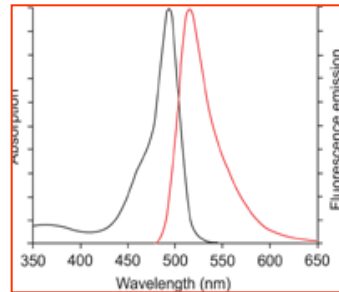
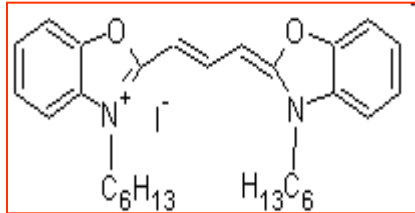
*Lizard G et al. FASEB J 1998;12, 1651–1663.*



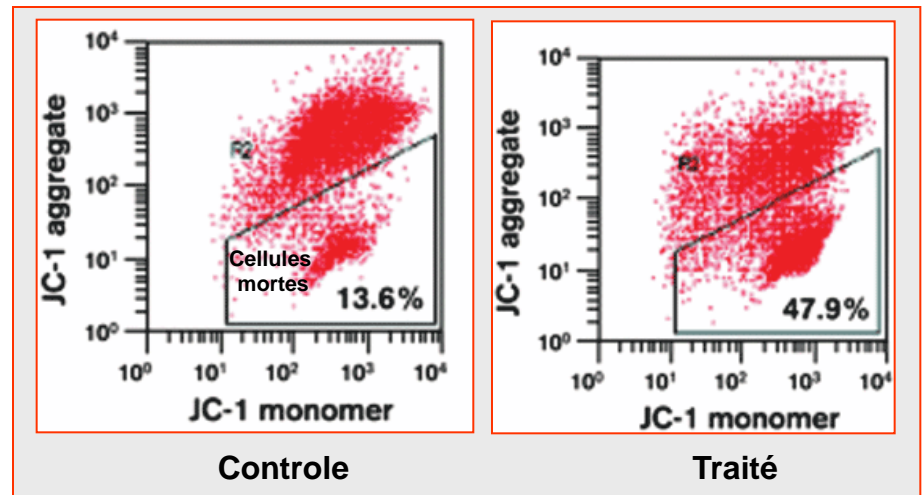
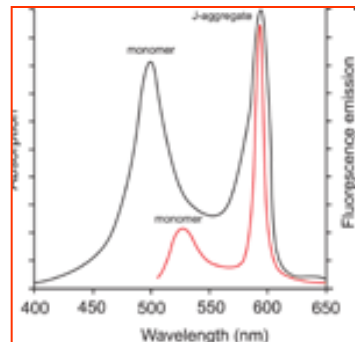
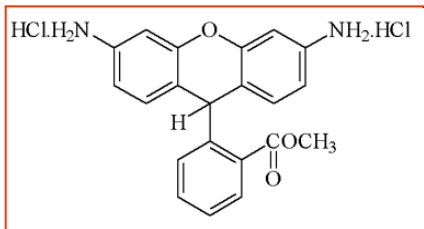
# Potentiel Transmembranaire Mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ )

## Coloration avec DiOC<sub>6</sub>(3) ou JC1

- **DiOC<sub>6</sub>(3)** (40 nM ; permet de détecter les cellules avec des mitochondries dépolarisées ou hyperpolarisées)



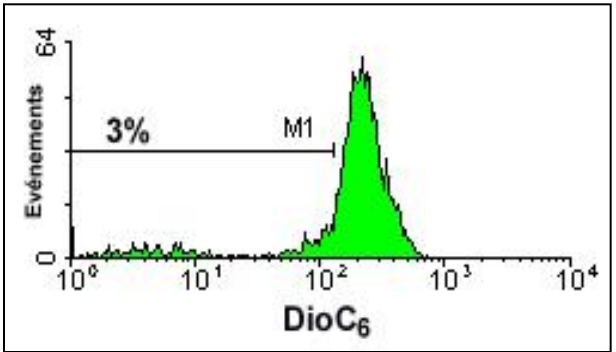
- **JC-1** (1  $\mu\text{g/mL}$  ; permet la distinction des cellules vivantes (colorées en rouge) et mortes ( avec des mitochondries dépolarisées et colorées en vert))



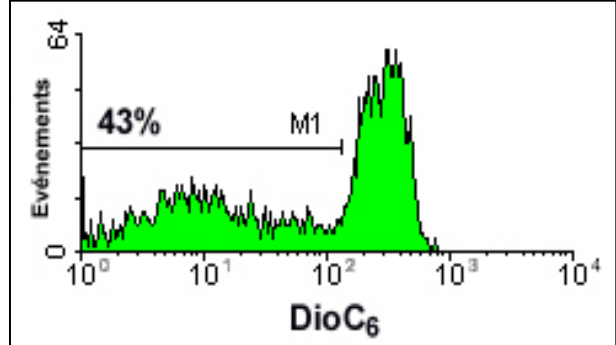
# Physiologie Cellulaire par Cytométrie en Flux - Présentation des Résultats Graphiques (% de cellules) – DiOC6(3)

## Coloration au DiOC6(3)

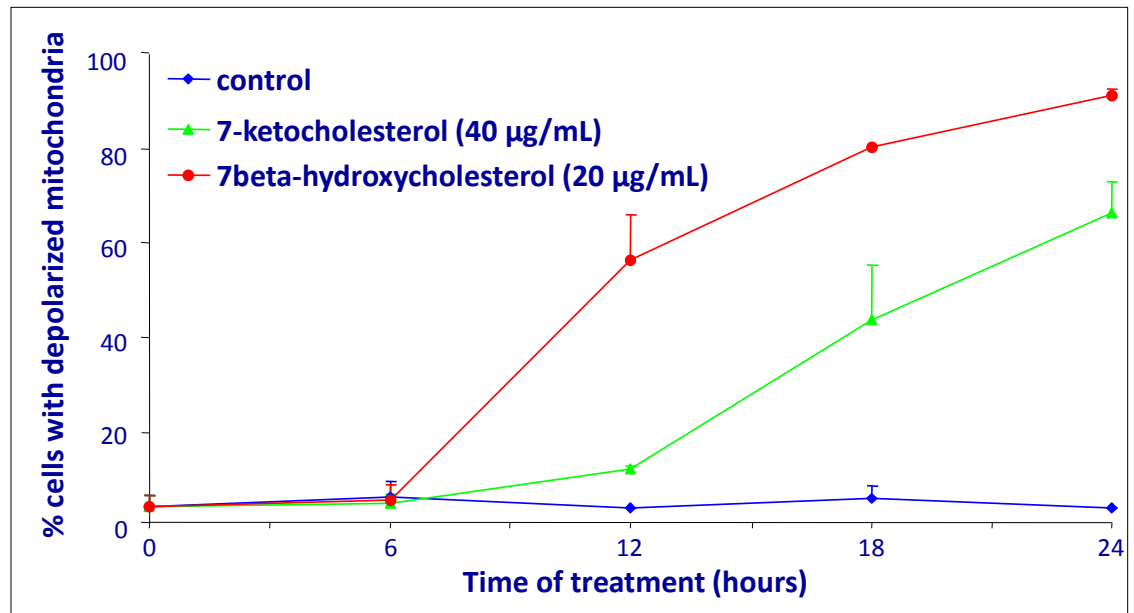
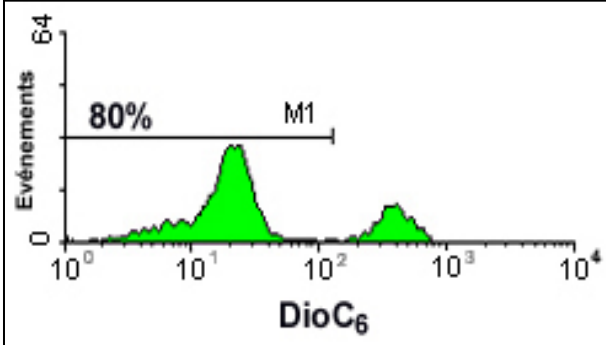
Control



7-ketocholesterol

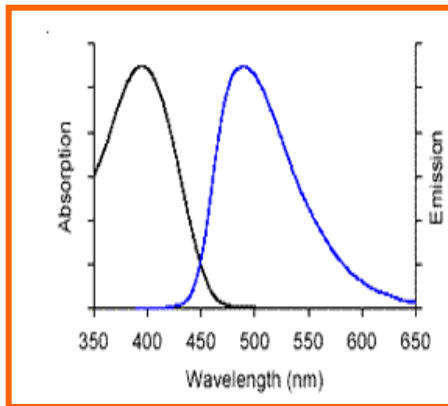
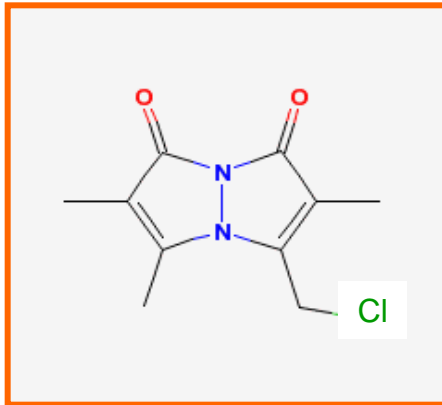


7β-hydroxycholesterol

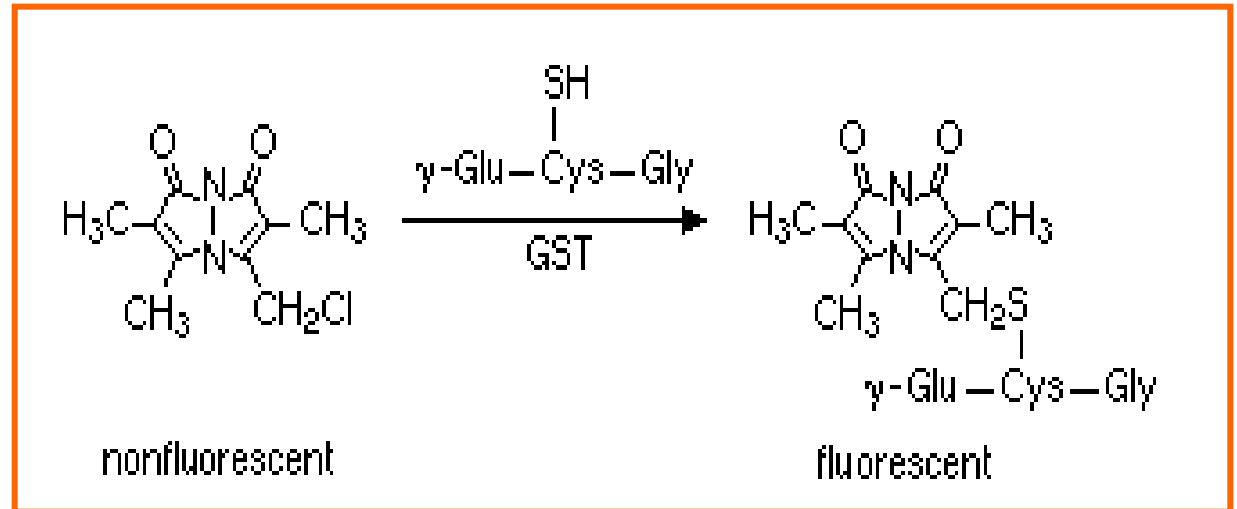


# Systeme Non-Enzymatique de Défenses Anti-Radicalaires

## Mesure du Taux de Glutathion Réduit (GSH)

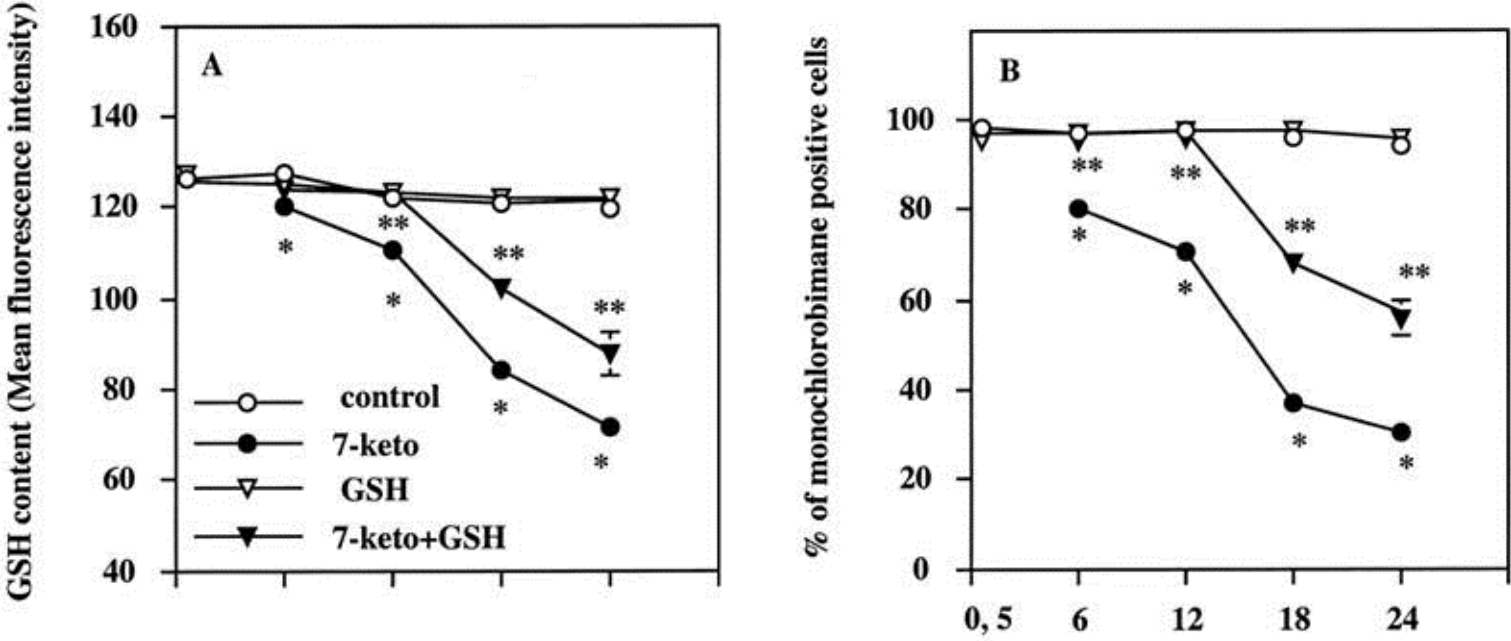


**Monochlorobimane**



# Physiologie Cellulaire par Cytométrie en Flux - Présentation des Résultats Graphiques (IMF et % de cellules) - Monochlorobimane

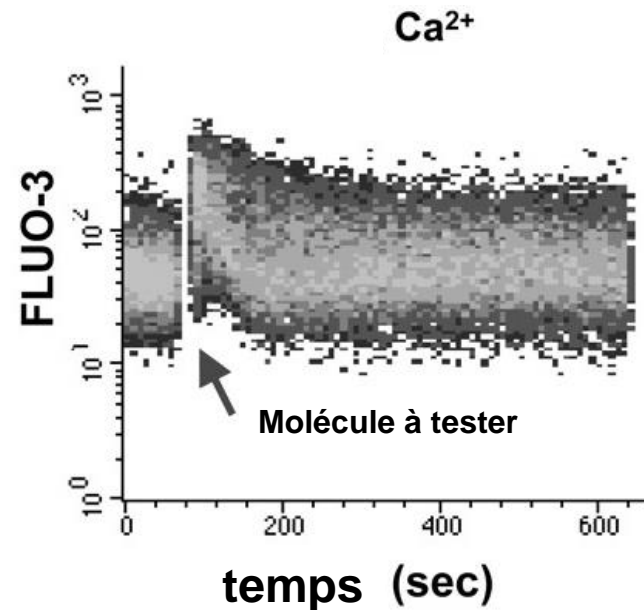
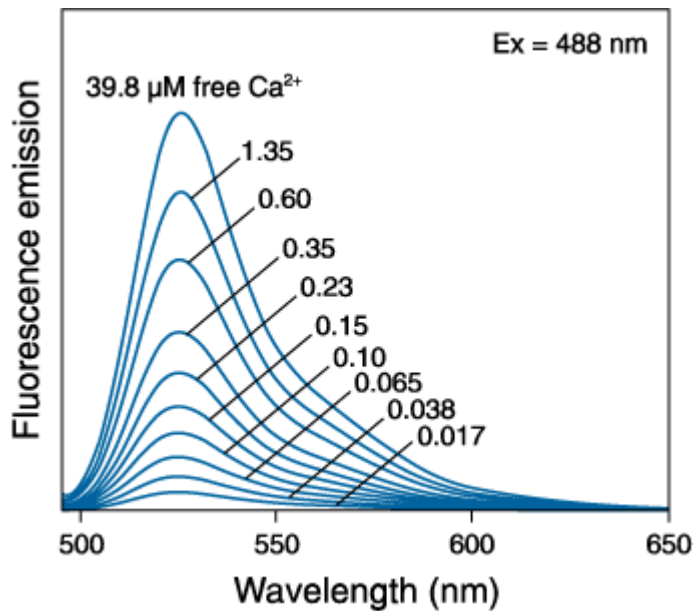
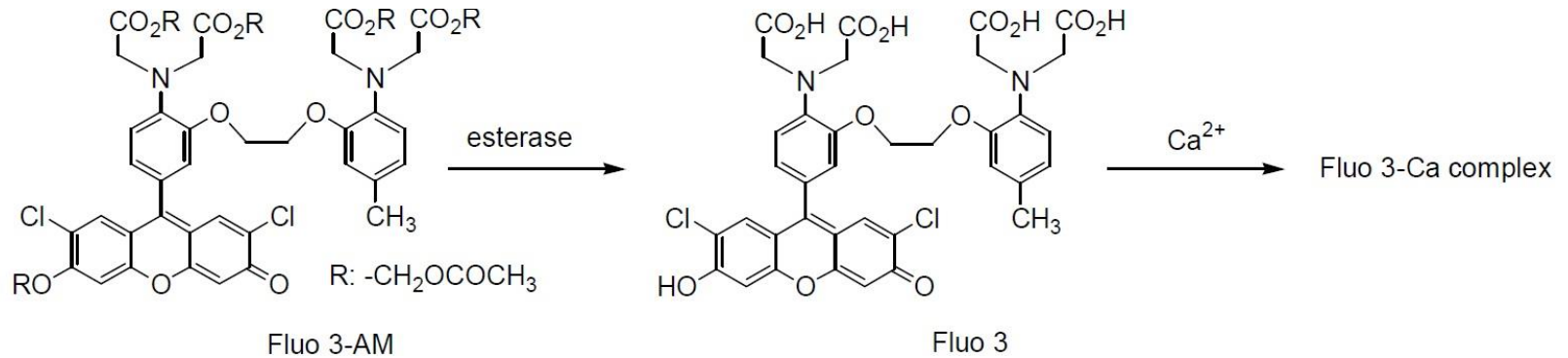
## Coloration au monochlorobimane (MCB)



A - Quantification de la quantité de glutathion réduit (GSH) intracellulaire

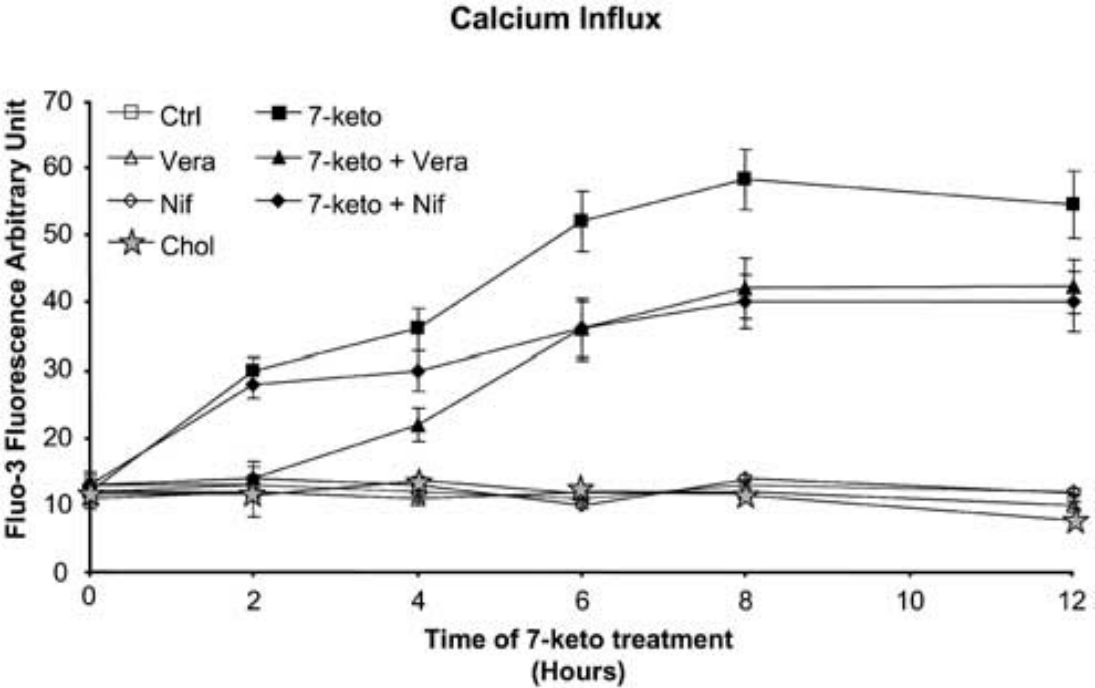
B – Quantification du % de cellules MCB positives (contenant du GSH quantifiable avec le MCB)

# Mesure du Calcium Intracellulaire (Influx) avec le Fluo-3AM



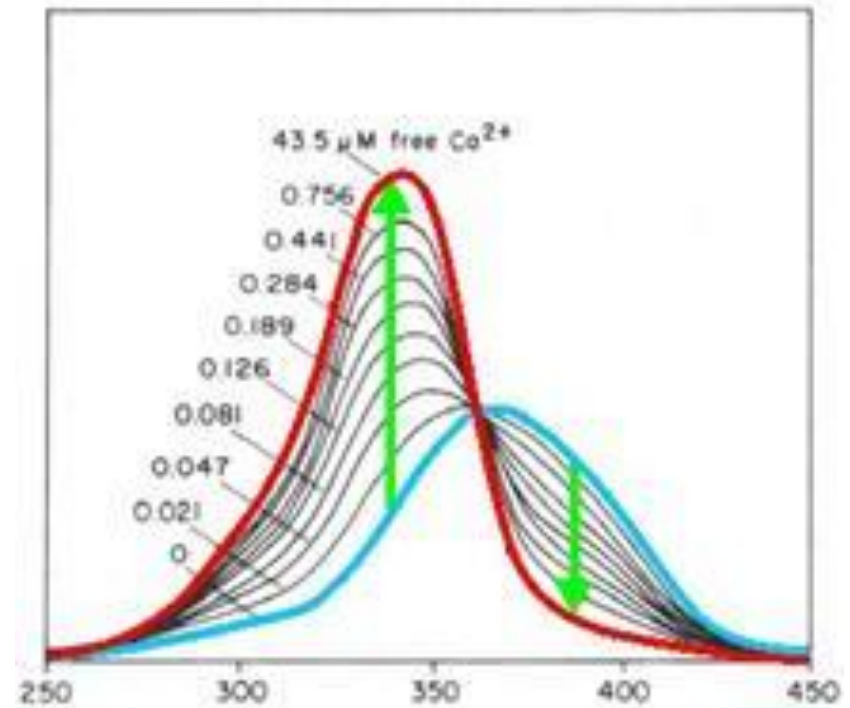
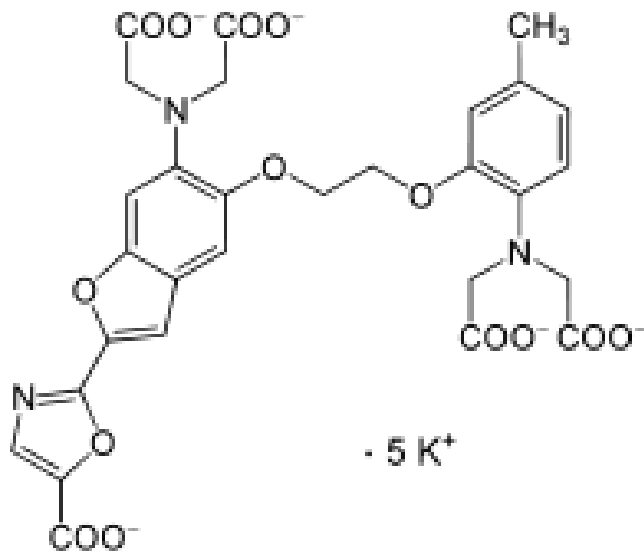
# Physiologie Cellulaire par Cytométrie en Flux - Présentation des Résultats Graphiques (IMF) – Flux de Calcium (Fluo-3AM)

## Coloration au Fluo-3AM





# Mesure du Taux de Calcium Intracellulaire avec le Fura-2 (sonde ratiométrique)



Une sonde ratiométrique tel que le Fura-2 permet de mesurer des taux de calcium intracellulaire en s'affranchissant des variations dues à l'incorporation de la sonde qui peut varier d'une cellule à l'autre.

# Domaines d'Application des Fluorochromes

---

- **Biologie Cellulaire** (stress oxydatif, mort cellulaire, métabolisme,
- **Pharmacologie** (screening)
- **Toxicologie** (molécules ou mélanges de molécules, produits naturels...)
- **Biosurveillance**

\* **Nombre important de données générées** (% , IMF.....)

\* **Méthodes globales d'analyse: cytomique**

# De la Cytométrie en flux à la Cytomique

---

## Cytomique et Cytome : Définition

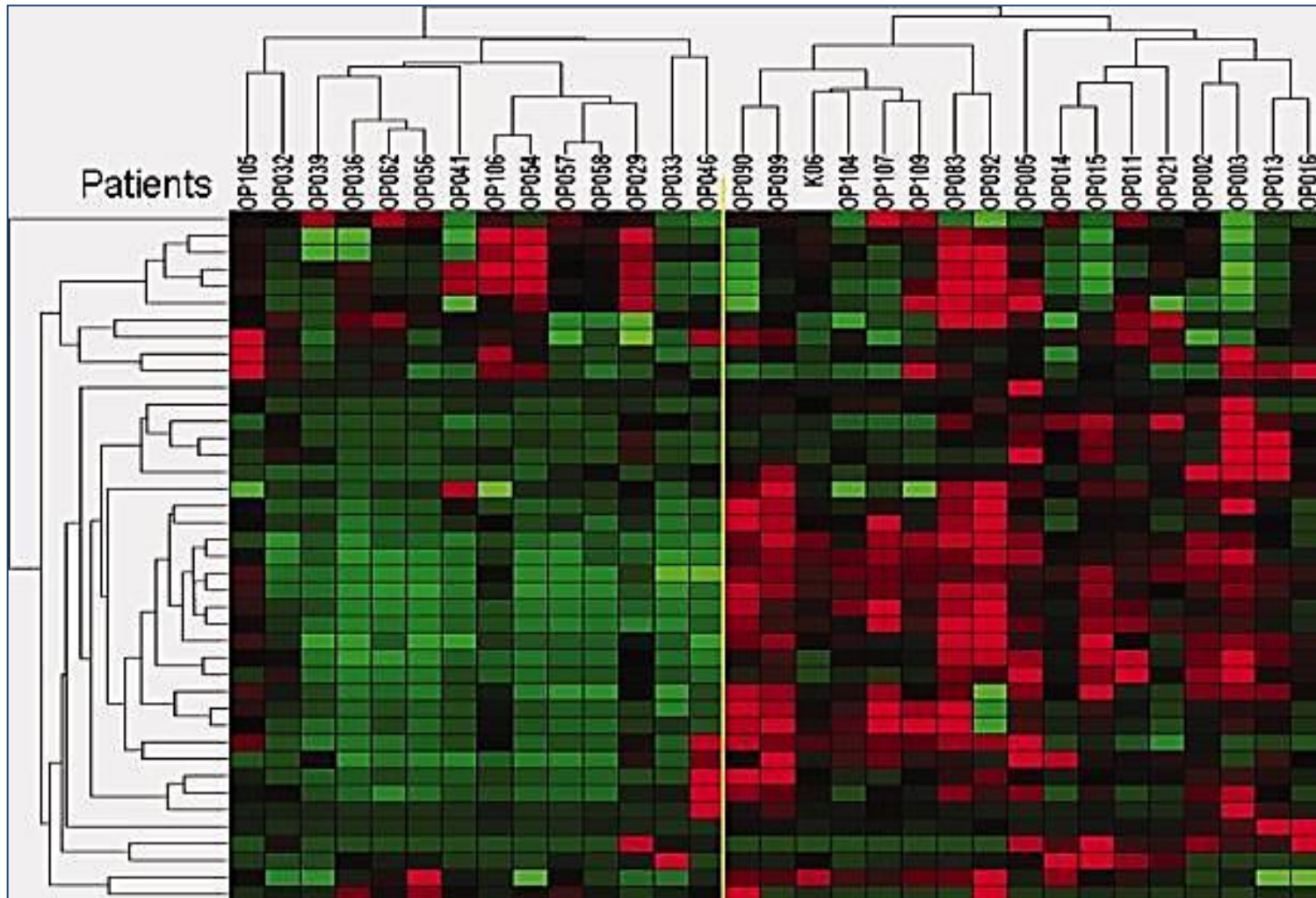
- L'analyse exhaustive visant à définir l'état d'une cellule à un moment donné et dans un contexte donné, en intégrant plusieurs paramètres, porte le nom de **cytomique**.
- La cytomique correspond à l'analyse du **cytome** : ensemble des constituant morphologiques, antigéniques et fonctionnels qui permettent non seulement de définir mais aussi de **modéliser l'état et le fonctionnement d'une cellule à un instant t**.

➤ **Cytomique: méthode alternative aux modèles animaux en toxicologie et pharmacologie**

Analyses statistiques multifactorielles

# Cytomique : Présentation de Données

## Cytométrie code-barres



	Sans effet
	Peu d'effet
	Avec effet

Extraits Lipidiques de Moules		
OL (Oualidia)	JL (Jorf Lasfar)	ES

			OL (Oualidia)	JL (Jorf Lasfar)	ES
<b>Approche Analytique Biochimie: (GC/MS)</b>	<b>Métaux lourds</b>	Cd			
		Cr			
		Pb			
	<b>Profils lipidiques</b>	Acides Gras			
		Phospholipides			
		Oxystérols			
Phytostérols					
<b>In Vivo (Rats)</b>	<b>Glycémie et fonction rénale</b>	Glycémie			
		Urée			
		Acides urique			
		Créatinine			
	<b>Fonction hépatique</b>	Transaminases			
		Phosphatase			
	<b>Bilan lipidique</b>	Triglycérides			
		CT			
		C-HDL			
		C-LDL			
		CT/C- HDL			
	<b>In vitro (cellules MIN6)</b>	<b>Prolifération et mort cellulaire</b>	Prolifération		
LDH					
Mort cellulaire (IP)					
Cycle cellulaire					
<b>Organites cellulaires</b>		$\Delta\Psi_m$			
		Lysosomes			
		Peroxisomes			
<b>Equilibre RedOx</b>		GSH			
		$O_2^{\bullet-}$			
		$H_2O_2$			
		NO			
	Peroxydation lipidique				
	Insuline				

**(Boumhras M et al., Environ Toxicol 2013)**