



Université de Bourgogne

## EXPLORATION DU METABOLISME CELLULAIRE PAR CYTOMETRIE EN FLUX ET EN IMAGES

Amira ZARROUK,<sup>1, 2</sup> Anne VEJUX,<sup>1</sup> Gérard LIZARD<sup>1</sup>

1 - Université de Bourgogne/Equipe Bio-peroxIL (EA 7270) / INSERM, Dijon, France

2 - Université de Monastir, Laboratoire de Biochimie- UR 'Nutrition Humaine et Désordres Métaboliques', Monastir, Tunisie

Vèmes Journées Nationales de Cytométrie en Flux (JNCF-2013)

الايام الوطنية الخامسة للقياس الخلوي المتدفق

Faculté de Pharmacie de Monastir, TUNISIE : 7-9 Mars 2013

Gérard Lizard, EA7270,  
Université de Bourgogne / INSERM

# Métabolisme cellulaire : aspect biochimique

PubMed

20 février 2012

Metabolism + Cytometry

**87 397 citations**

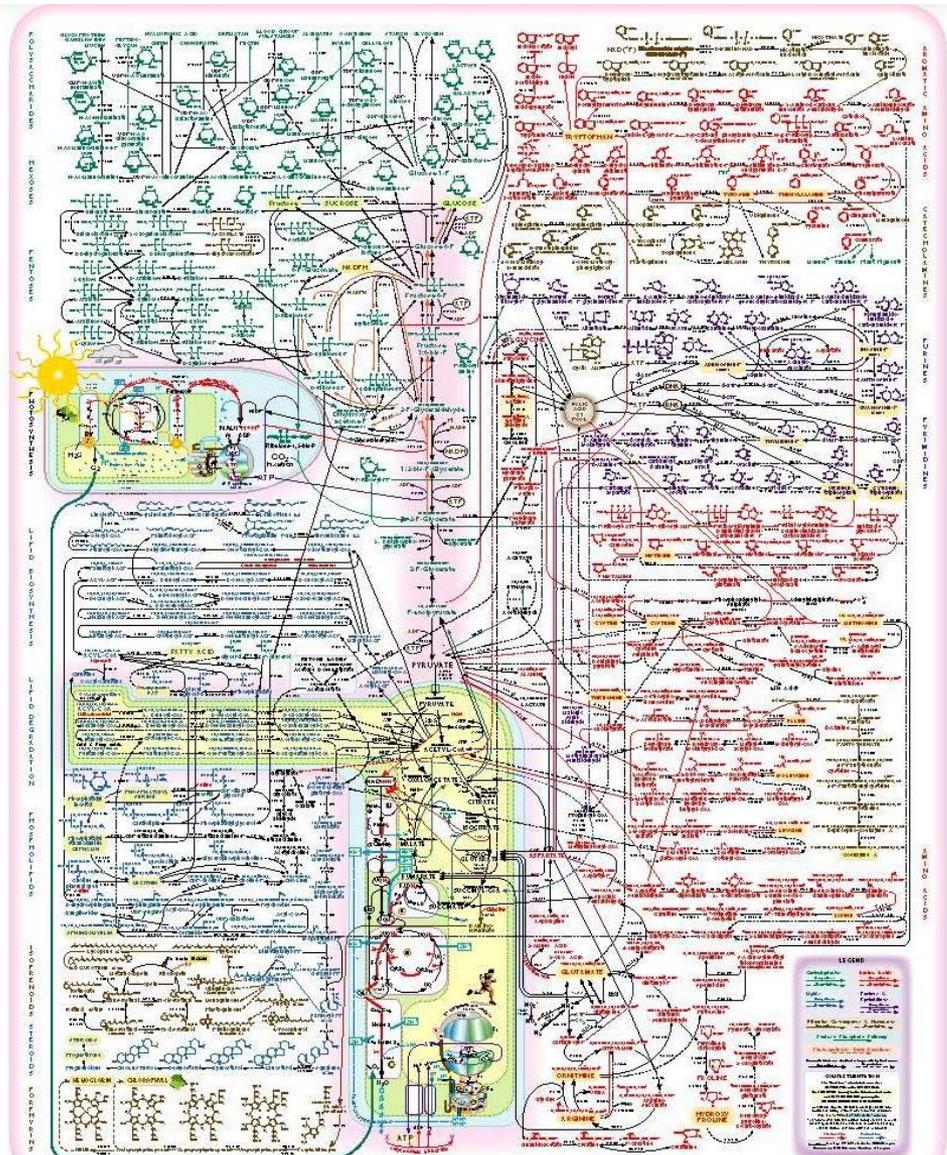
• Metabolism + Cytometry + Lipids  
**7 741 citations**

• Metabolism + Cytometry + Cholesterol  
**731 citations**

• Metabolism + Cytometry + Carbohydrates  
**10 222 citations**

• Metabolism + Cytometry + Glucose  
**1 494 citations**

**Chemistry is the logic of biological phenomena – Reginald H Garrett**



# Métabolisme cellulaire : aspect biochimique

---

Le **métabolisme** regroupe l'ensemble des activités cellulaires qui se déroulent de manière ininterrompue pour permettre à la cellule de remplir des fonctions qui lui sont spécifiques.

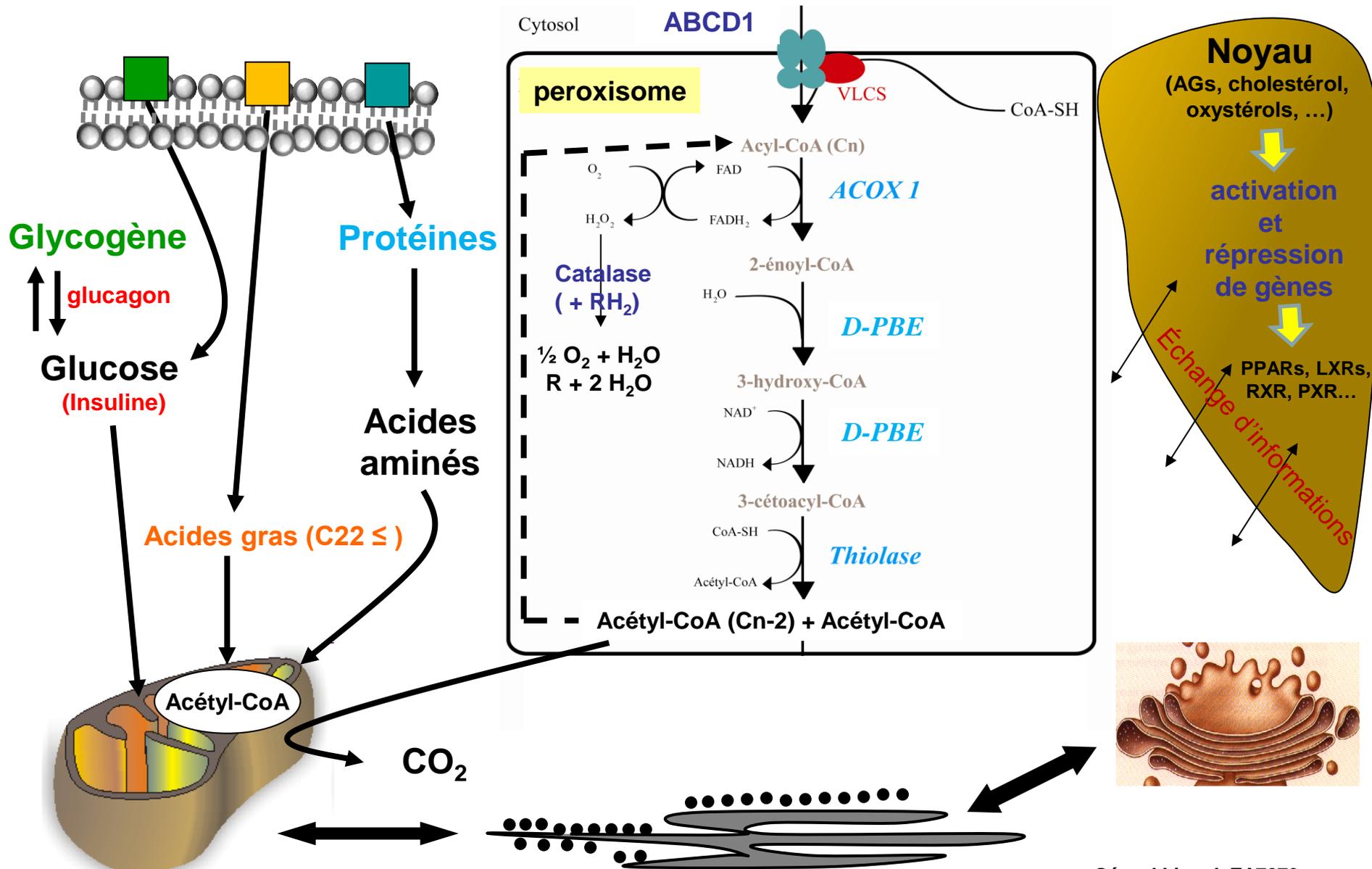
C'est un processus complexe et ordonné comprenant plusieurs aspects étroitement liés (métabolisme énergétique, lipidique, glucidique, protéique, nucléique, oxydatif) qui fait intervenir des processus de dégradation (*catabolisme*) et de synthèse organique (*anabolisme*).

Le métabolisme cellulaire est un mécanisme adaptatif sujet aux pressions de l'environnement (**syndrome métabolique**).

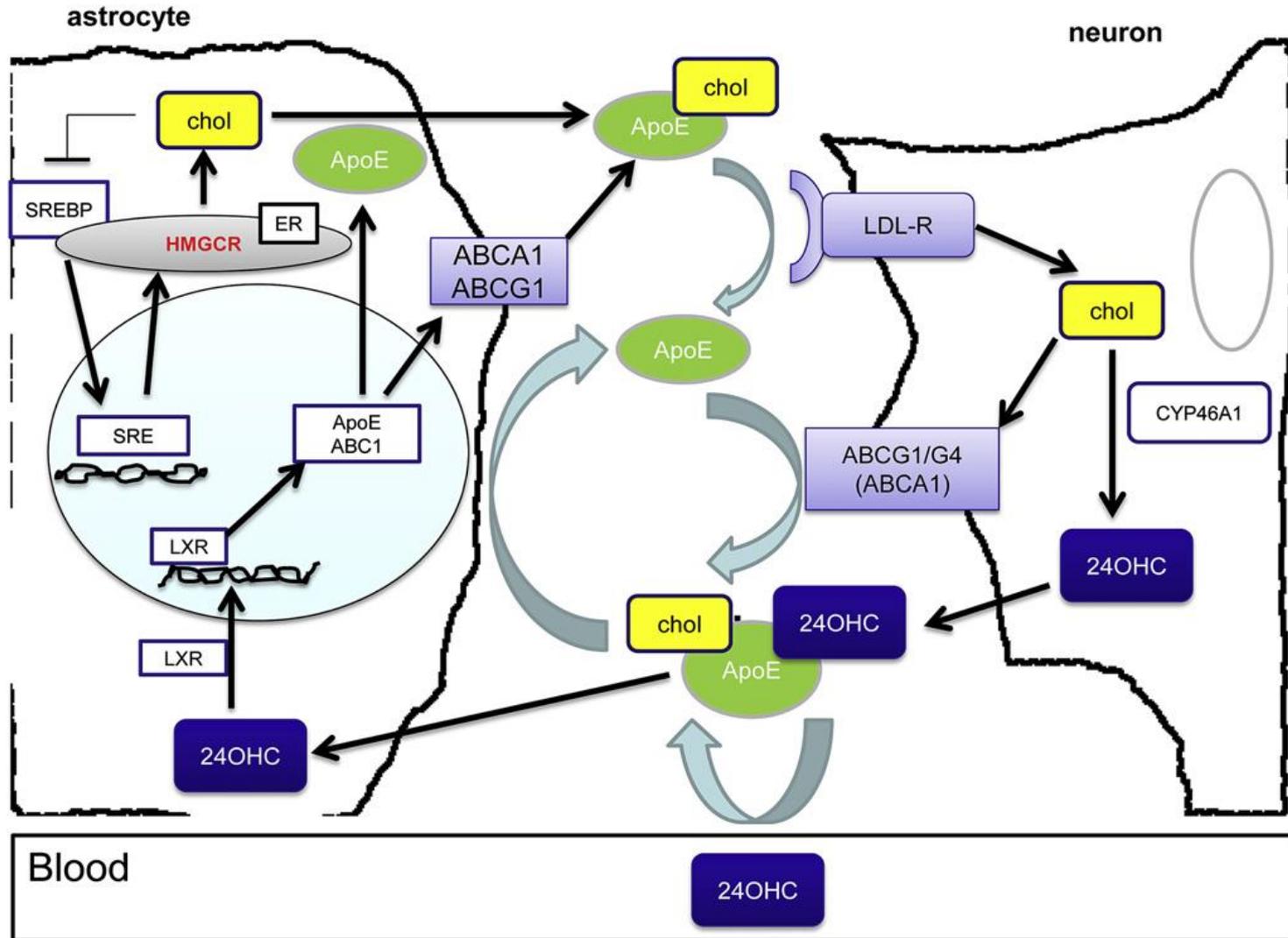
Il existe de nombreuses pathologies (maladies génétiques) liées à des troubles du métabolisme (**diabète de type 1, leucodystrophies peroxysomales, ...**).

# Métabolisme Lipidique Hépatique

Acides gras à très longue chaîne  $\geq C22$  (alimentation, métabolisme)



# Métabolisme Lipidique Cérébral

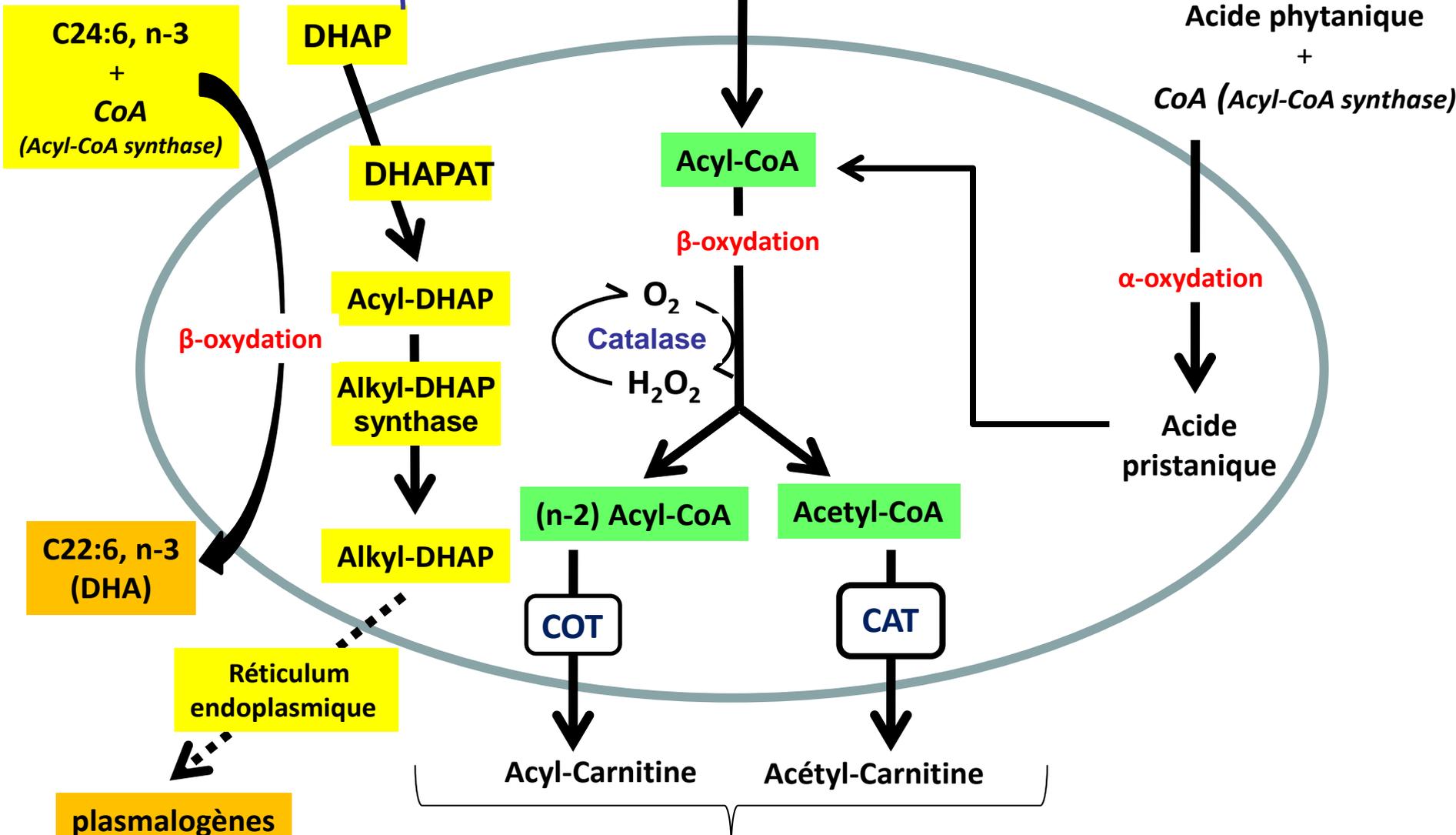


Voies métaboliques affectées dans la maladie d'Alzheimer et Démences du type Alzheimer

VLCFAs (FAs  $\geq$  C22)  
Eicosanoïdes  
Acide dicarboxylique  
Intermédiaires des acides biliaires (DHCA, THCA)

+ CoA  
(Acyl-CoA synthase)

Voies métaboliques affectées dans les leucodystrophies peroxysomales

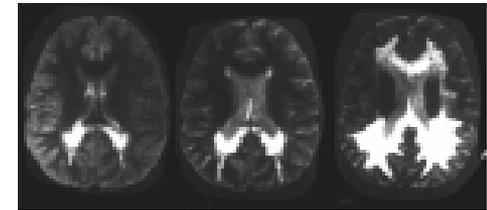
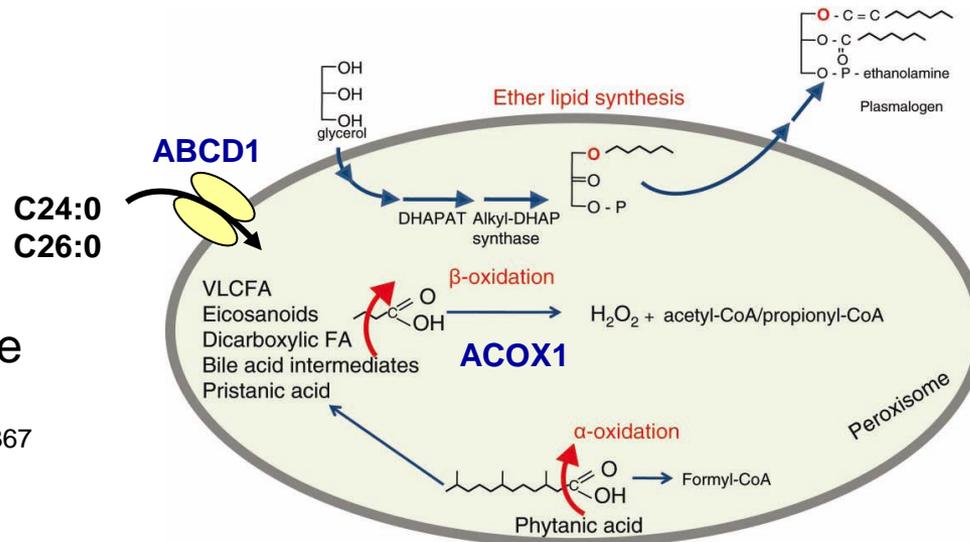


Oxydation mitochondriale ou élongation

# Statut Peroxysomal et Physiopathologie des Leucodystrophies (X-ALD, P-NALD)

## Fonctions du peroxysome

Baes M & Aubourg P  
*Neuroscientist* 2009; 15; 367



- **X-ALD** (X-Linked Adrenoleukodystrophy)  
 fréquente : 1:17 000  
 déficience en ABCD1  
 déficience en  $\beta$ -oxydation peroxysomale  
 accumulation d'AGTLCs (C24:0; C26:0)

- **P-NALD** (Pseudo Neonatal ALD)  
 très rare  
 déficience en ACOX1  
 déficience en  $\beta$ -oxydation peroxysomale  
 accumulation d'AGTLCs & déficience en DHA

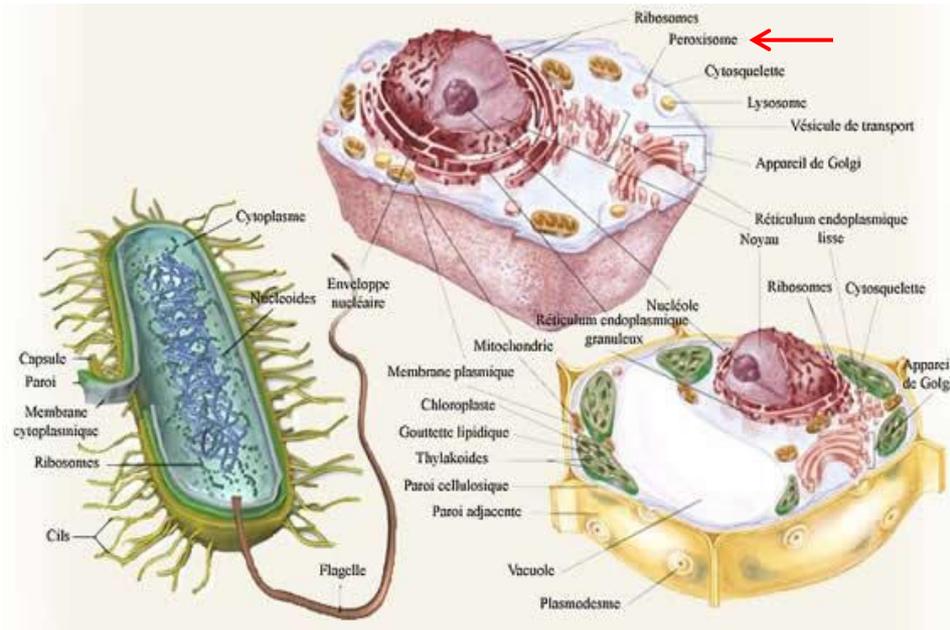
# Implication du métabolisme lipidique, peroxysomal et mitochondrial dans les maladies neurodégénératives

---

- Peroxysome et AGTLCs
  - \* leucodystrophies peroxysomales,
  - \* Incidence de dysfonctions peroxysomales sur
    - viabilité cellulaire,
    - stress oxydant
    - inflammation
    - myélinisation
  
  - \* Vieillesse / démences
  
- Relations peroxysome – mitochondrie
  
- Métabolisme du cholestérol et démences (maladie d'Alzheimer)
  
- Métabolisme du cholestérol et démyélinisation (leucodystrophies, sclérose en plaque)

**Outils et méthodes de cytométrie  
pour l'étude du métabolisme peroxysomal, mitochondrial,  
oxydatif et lipidique**

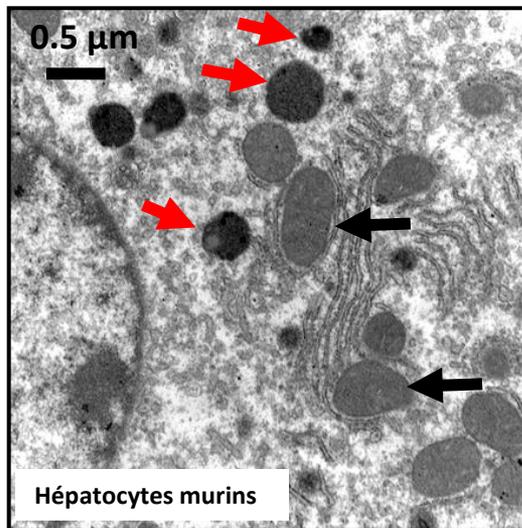
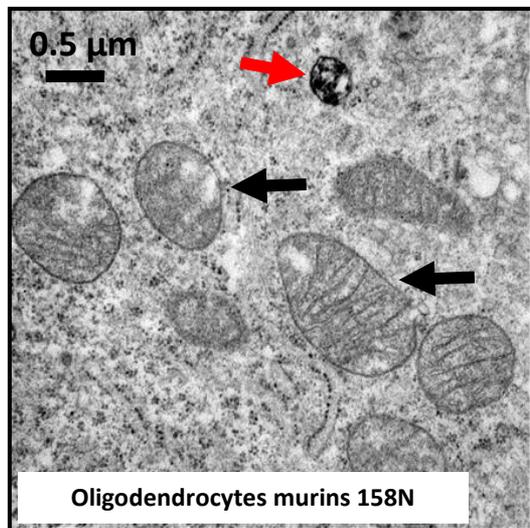
# Le peroxysome



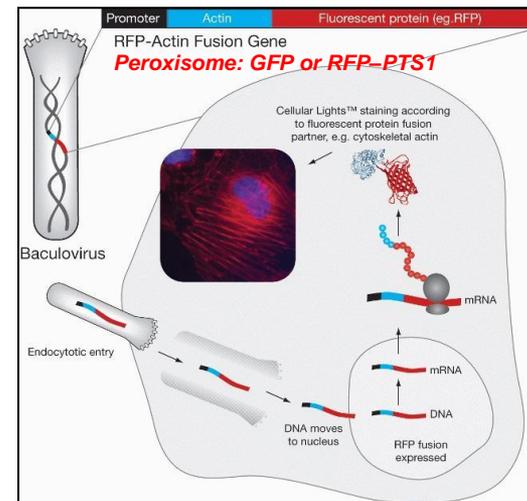
- Organite cellulaire souvent rond (0,1 à 1  $\mu\text{m}$  de diamètre)
- Présent dans les cellules animales et végétales à l'exception des érythrocytes
- Pas d'ADN

# Caractérisation *in situ* du peroxysome

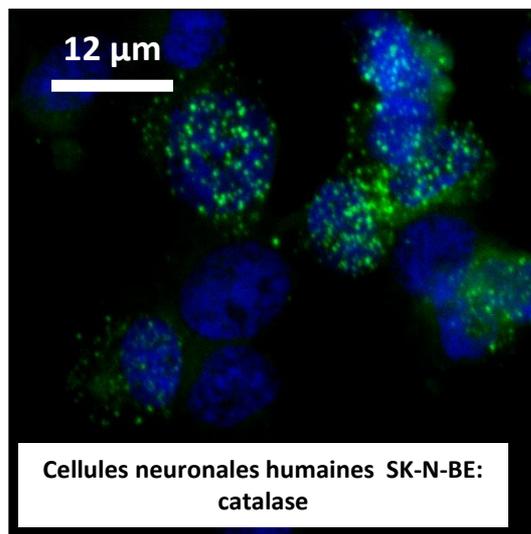
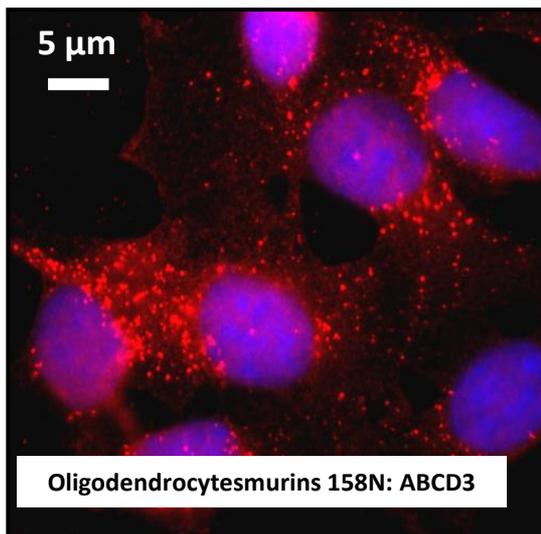
## - Microscopie électronique à transmission (activité catalase)



## - Fluorescent protein-based markers for peroxisomes

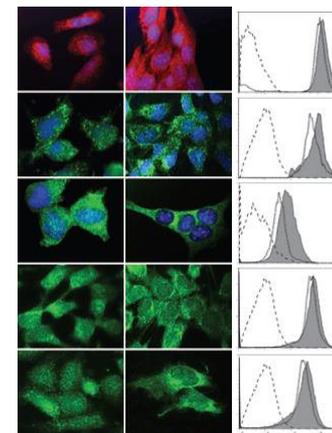


## - Microscopie confocale (ABCD3, catalase)



## - Cytométrie en flux

- ABCD1
- ABCD3
- Catalase
- ACOX1
- L-PBE



# Caractérisation de la biogénèse et du métabolisme peroxysomal

---

## - **Biogénèse peroxysomale**

- Microscopie électronique à transmission
- Immunofluorescence (ABCD3; catalase)



Microscopie confocale



Reconstruction-3D



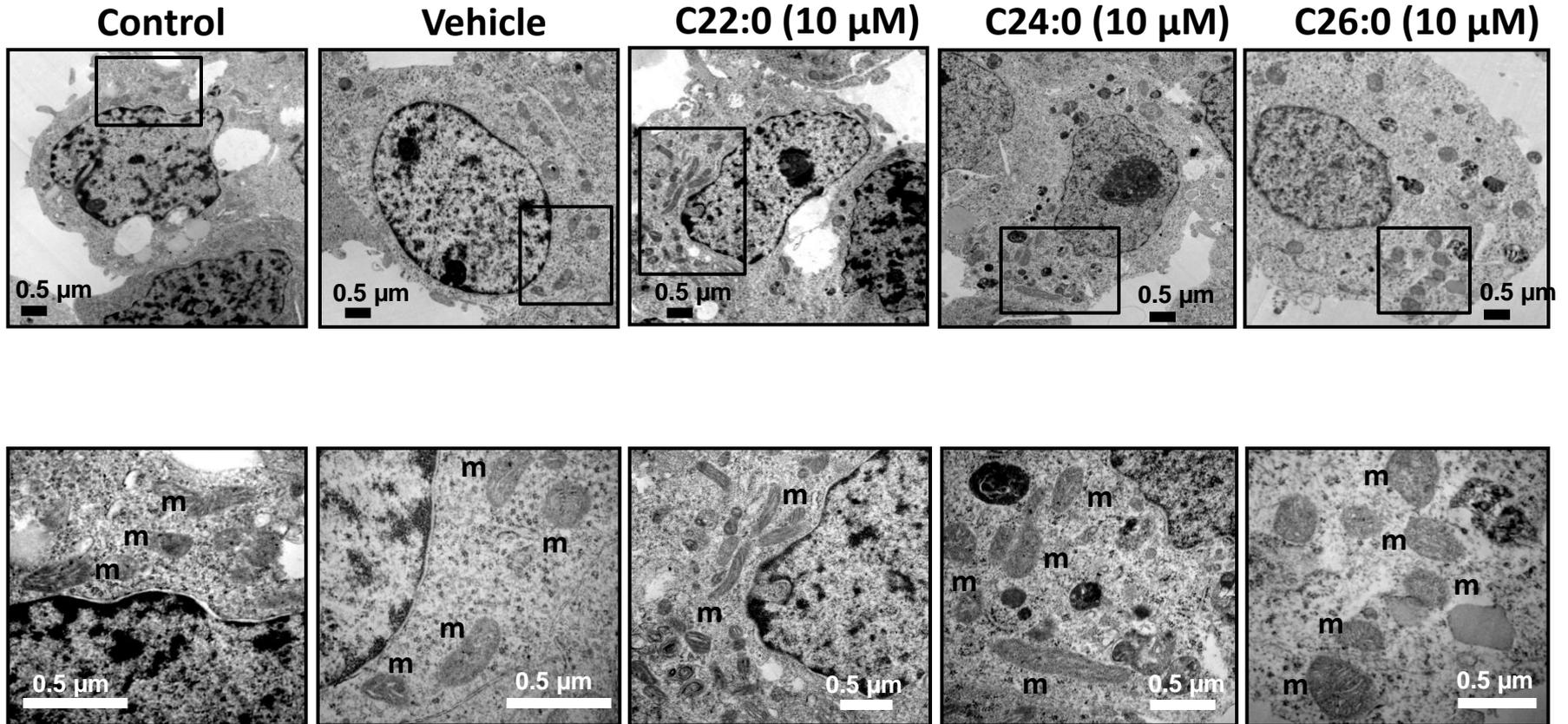
Analyse d'images (quantification)

- PAGE / Western blotting
- RT-qPCR

## - **Activité peroxysomale**

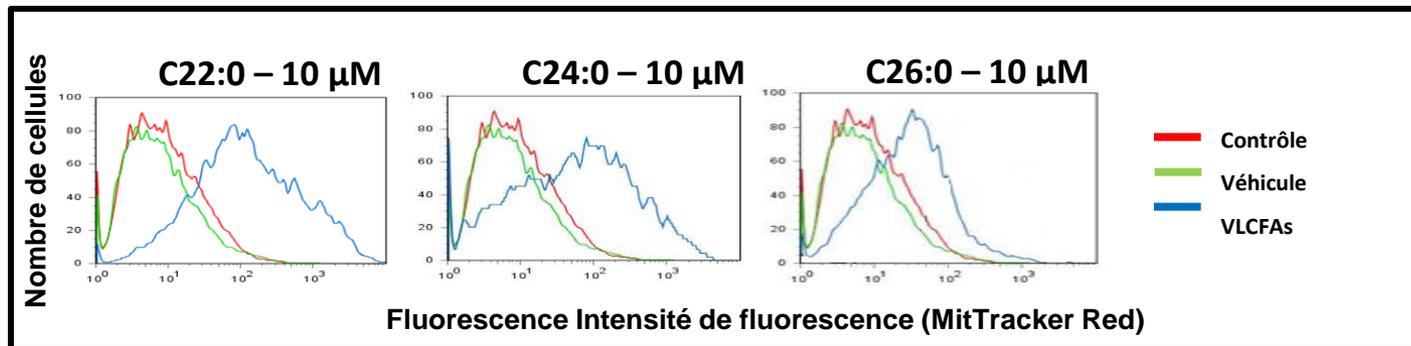
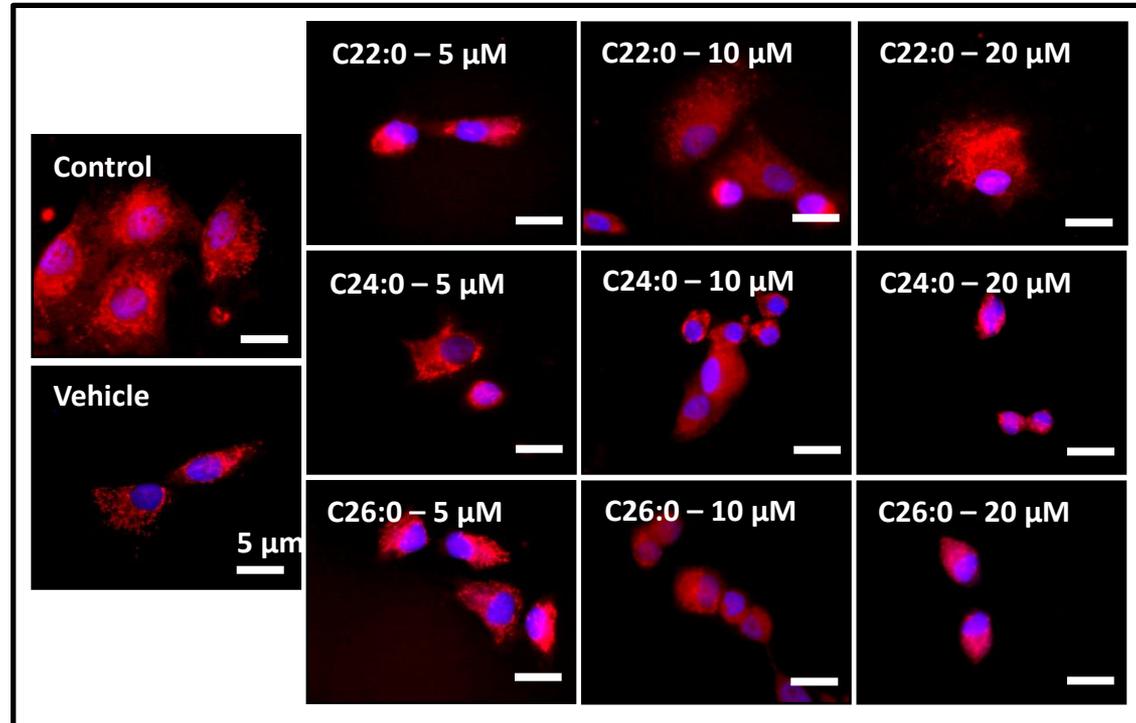
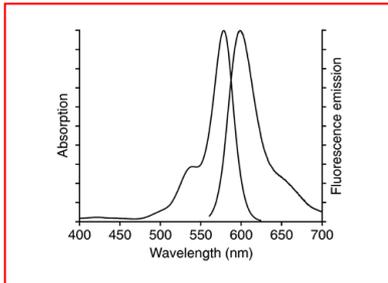
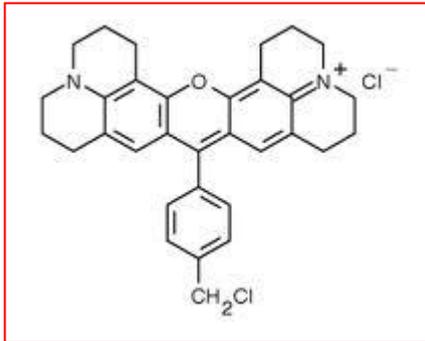
- $\beta$ -oxydation
- activité catalase
- activité ACOX1
- taux de DHA
- taux de C24:0 et C26:0; rapports: C24:0/C22:0; C26:0/C22:0
- taux d'acide phytanic

# Caractérisation *in situ* de la mitochondrie (MET)



# Topographie mitochondriale et quantification

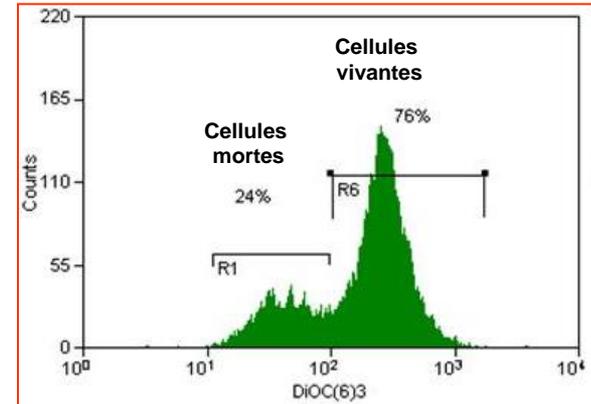
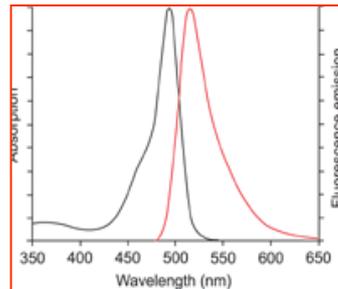
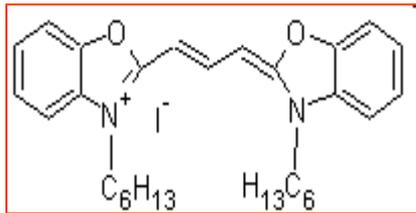
## MitoTracker Red



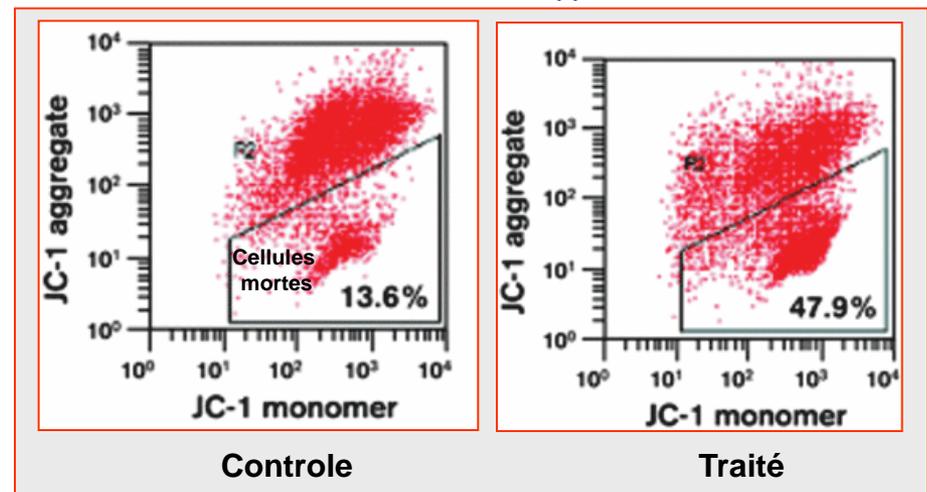
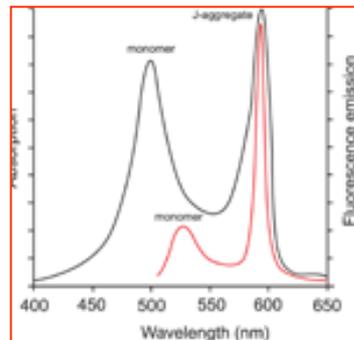
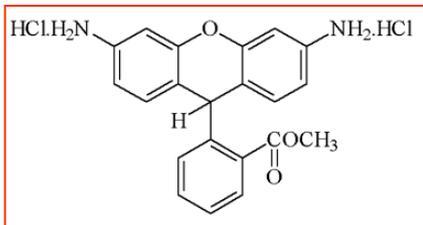
# Potentiel Transmembranaire Mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ )

## 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 µg/mL ; permet la distinction des cellules vivantes (colorées en rouge) et mortes ( avec des mitochondries dépolarisées et colorées en vert))



# Fluorochromes adaptés à la détection d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

## Espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

- Peroxyde d'hydrogène ;  $H_2O_2$
- Radical hydroxyl ;  $HO\cdot$
- Acide hypochlorique ;  $HOCl$
- Oxyde nitreux ;  $\cdot NO$
- Peroxynitrite ;  $ONOO^-$
- Anion superoxyde;  $O_2^{\cdot -}$

## Fluorochromes et réactifs

CM-H2DCFDA ; AM-H2DCFDA ; Dihydrocalcéine AM;  
Dihydrorhodamine 123 ; Dihydrorhodamine 6G ;  
H2DCFDA ; Lucigénine ; Luminol

3'-(*p*-Aminophényl) fluorescéine) ; 3'-(*p*-Hydroxyphényl) fluorescéine)  
CM-H2DCFDA ; AM-H2DCFDA ; Proxyl fluorescamine ; TEMPO-9-AC

Aminophényl fluorescéine ; Dihydrorhodamine 123 ; Luminol

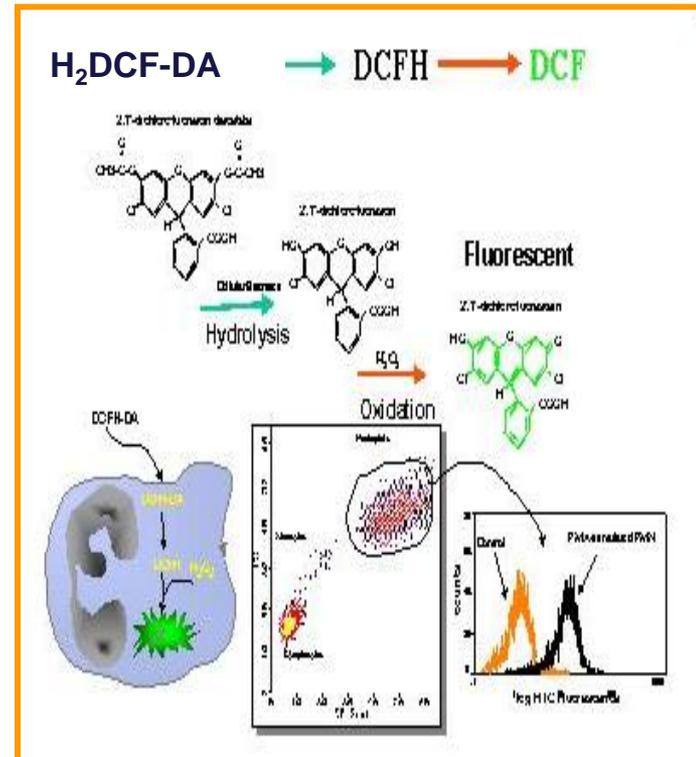
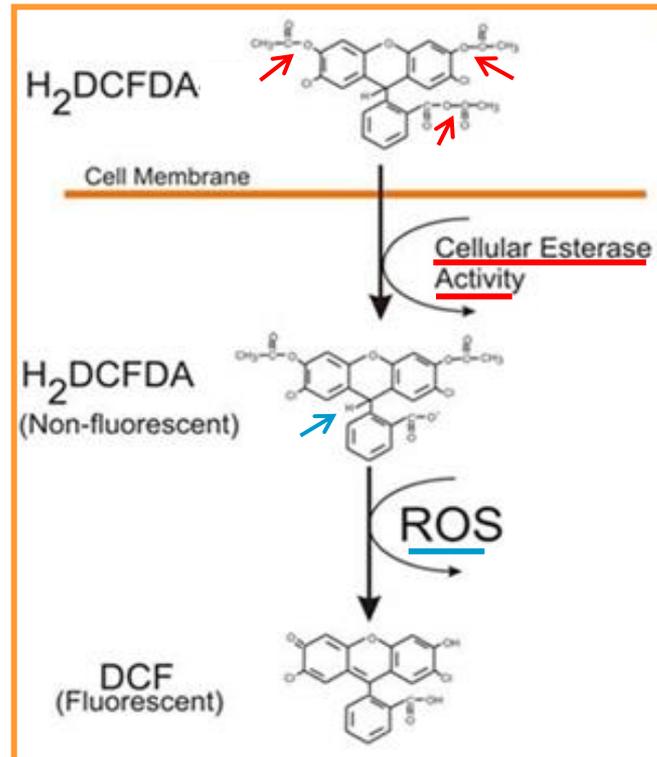
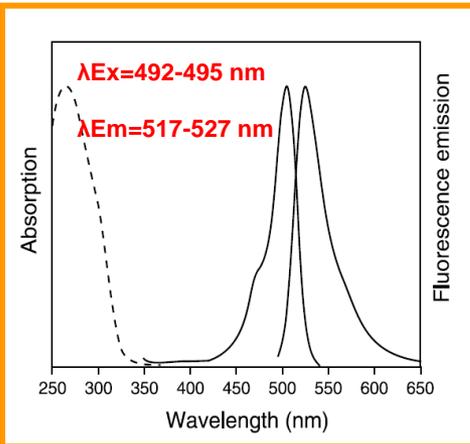
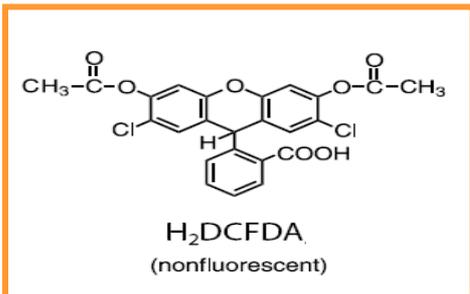
DAF-FM ; DAF-FM diacétate ; 2,3-Diaminonaphthalène ; Luminol

3'-(*p*-Aminophényl) fluorescéine) ; 3'-(*p*-Hydroxyphényl) fluorescéine;  
H2DCFDA; CM-H2DCFDA ; AM-H2DCFDA ; Coelenterazine;  
Dihydrorhodamine 123 ; Dihydrorhodamine 6G ; Luminol

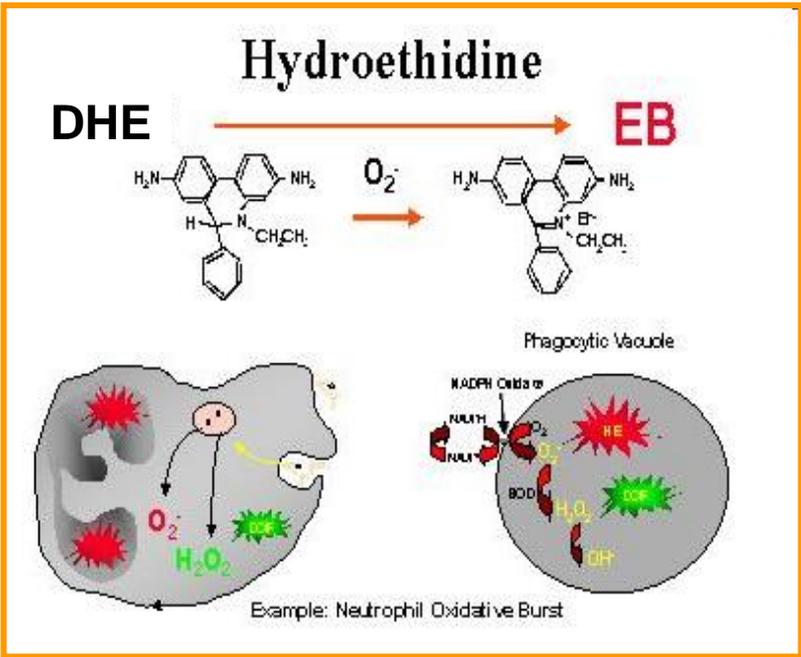
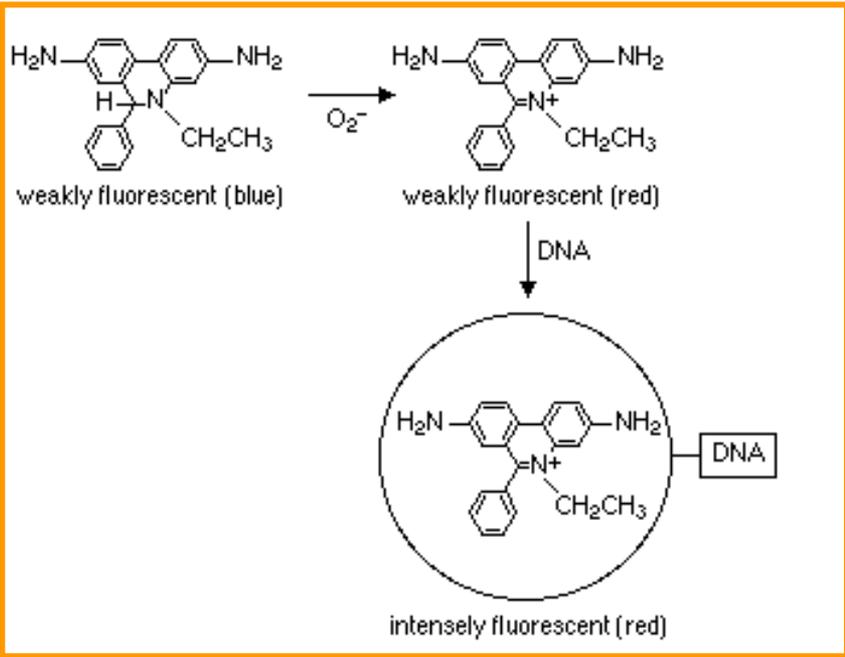
Coelentérazine ; Dihydroéthidium ; Lucigénine ; Luminol ; MTT;  
NBT; Mitosox



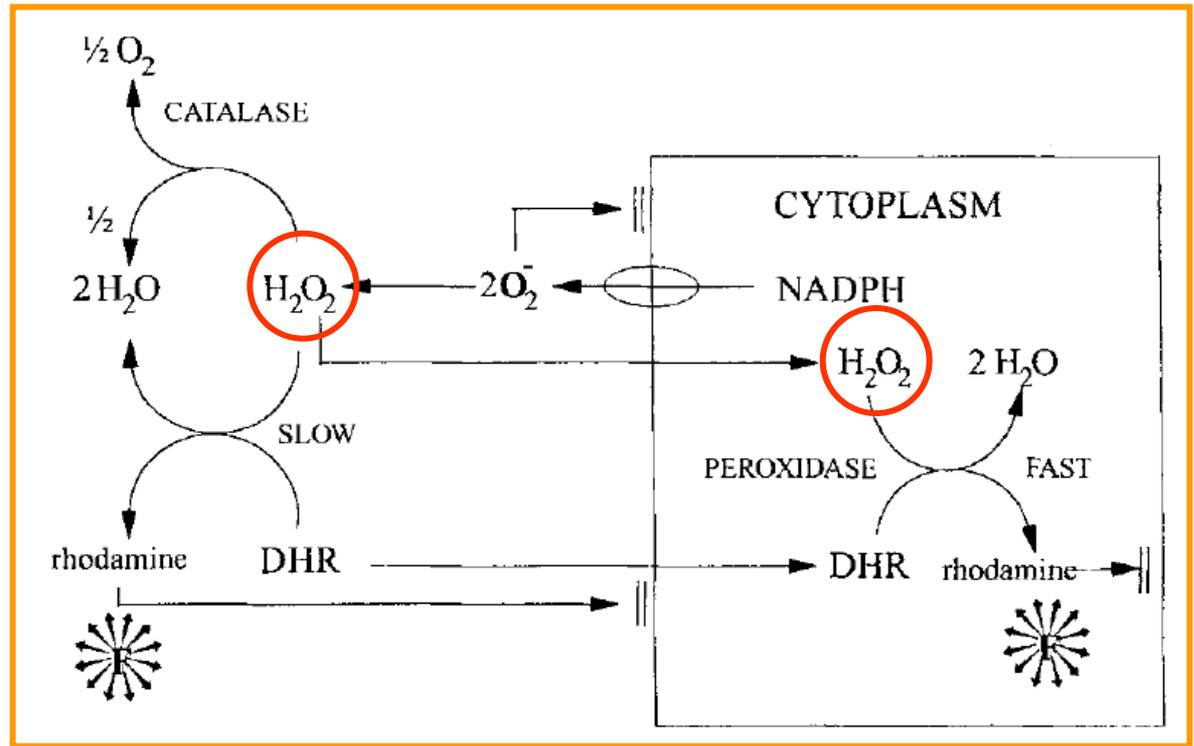
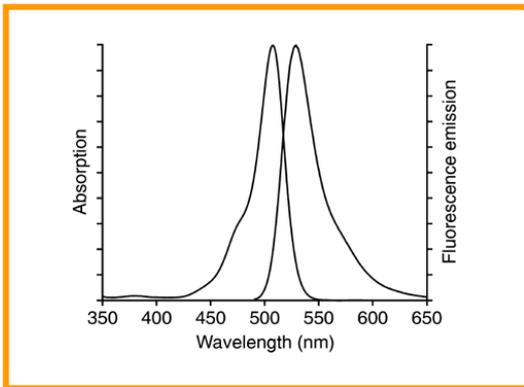
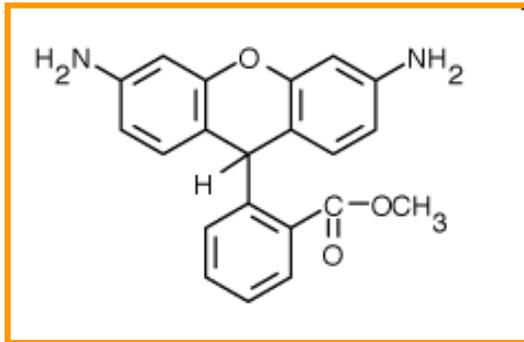
# H<sub>2</sub>DCF-DA (2', 7'-dichlorofluorescein diacetate) : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ; HO· ; ONOO<sup>-</sup> ...



# Dihydroethidium (DHE) : Anion Superoxyde $O_2^{\cdot-}$

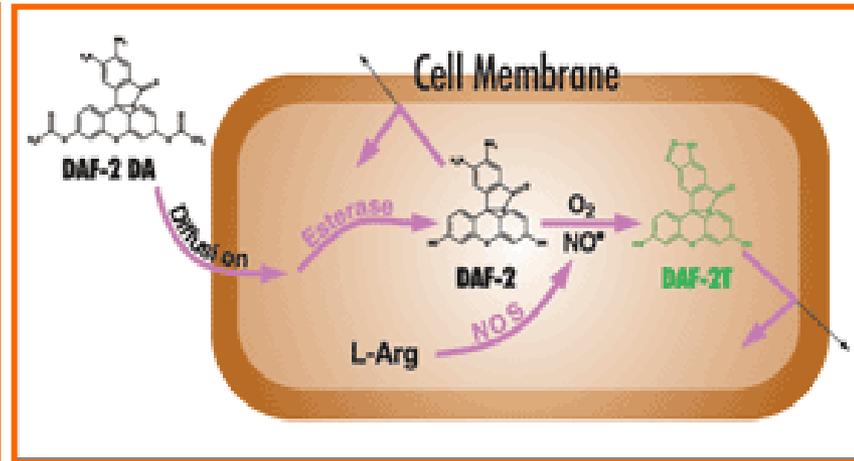
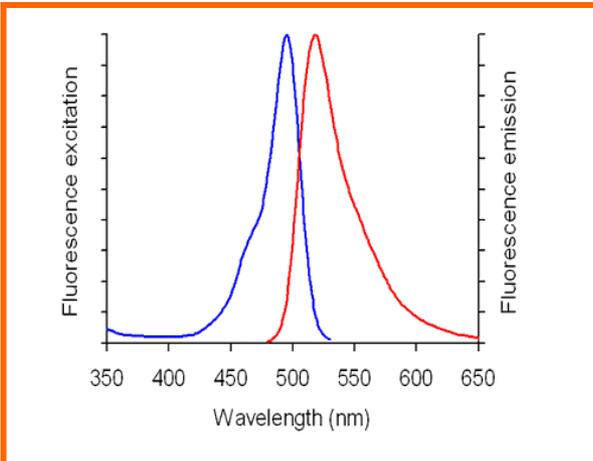
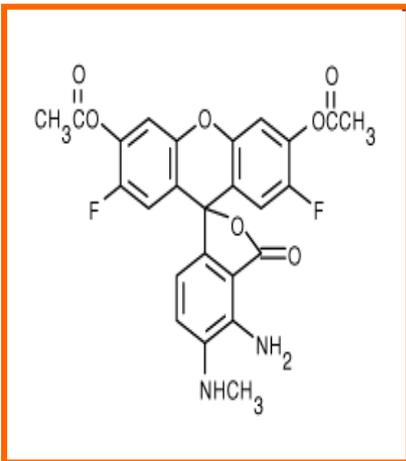
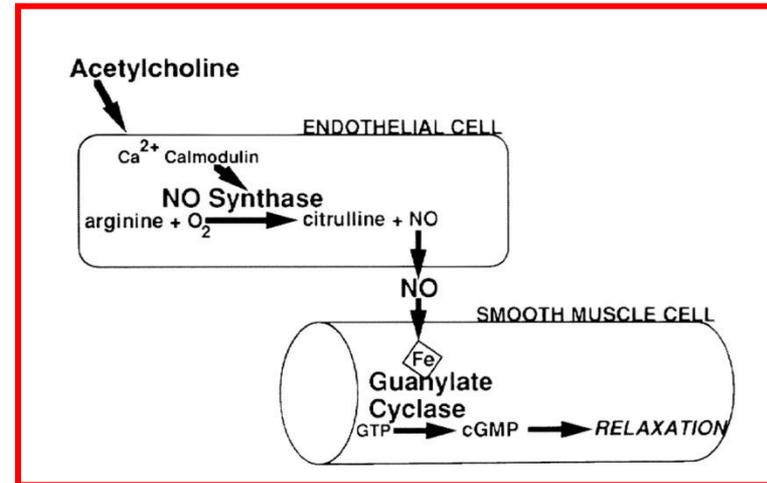
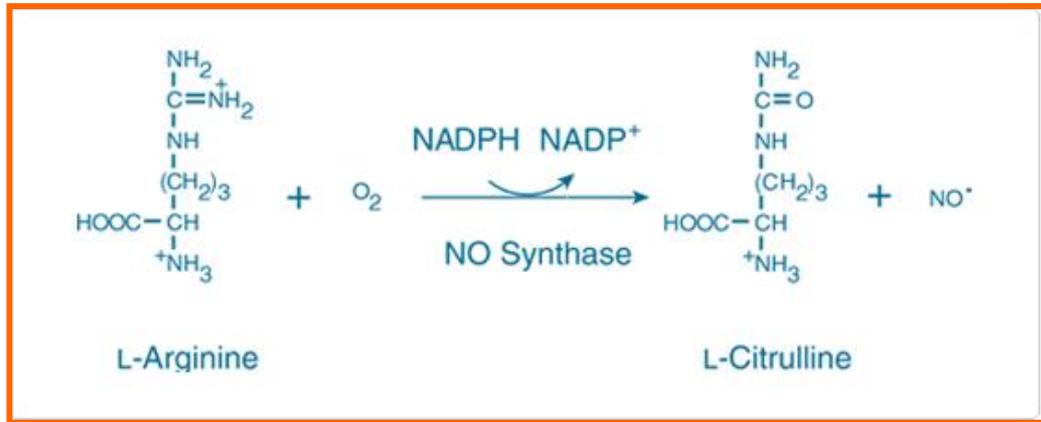


# Dihydrorhodamine 123 : $\text{H}_2\text{O}_2$ ; $\text{HOCl}$ ; $\text{ONOO}^-$



HENDERSON LM, CHAPPELL JB *Eur J Biochem* 1993, 217 (3): 973 - 980

# Détection de l'Oxyde Nitrique (-NO) par la Diaminofluorescéine (DAF)

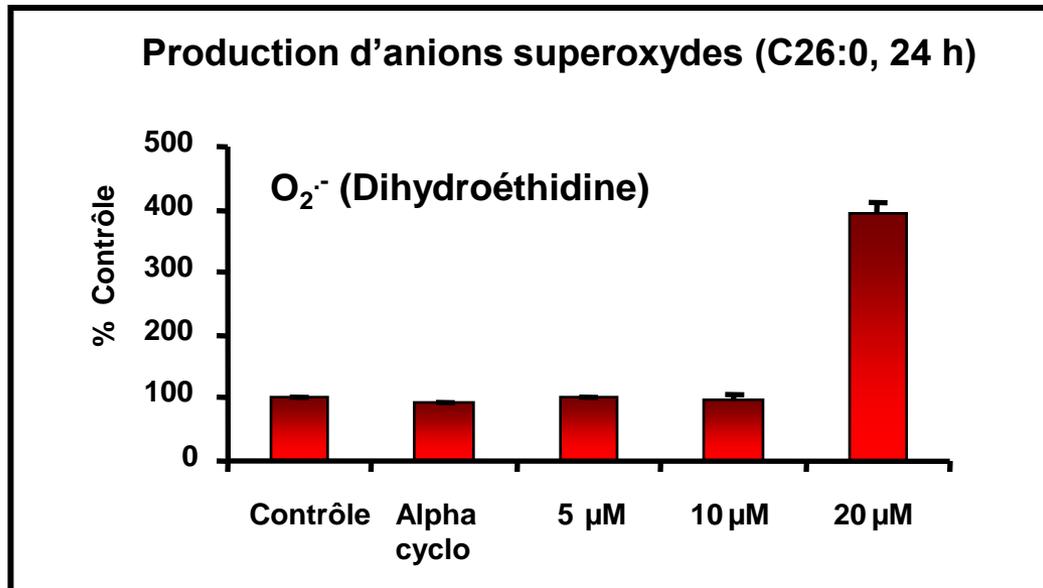
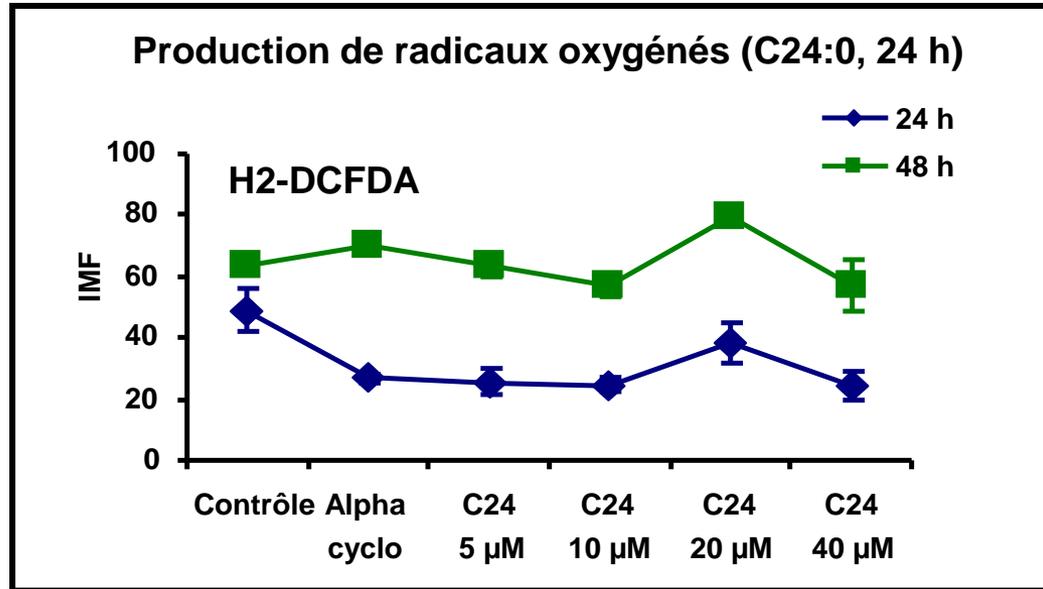


DAF-FM  
diacétate 4-amino-5-méthylamino-2',7'-difluorofluorescéine diacétate

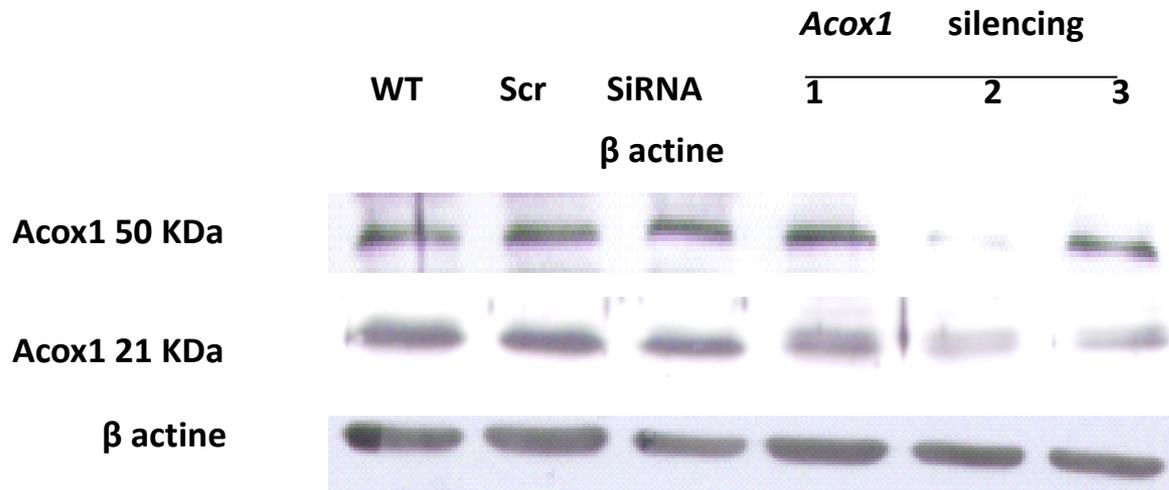
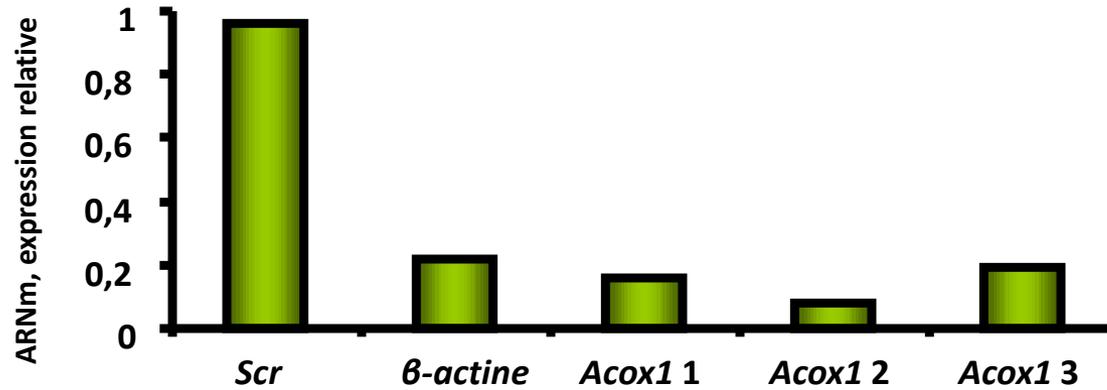
# **Interaction Métabolisme Peroxysomale et Métabolisme Oxydatif :**

## **Rôle d'ACOX1**

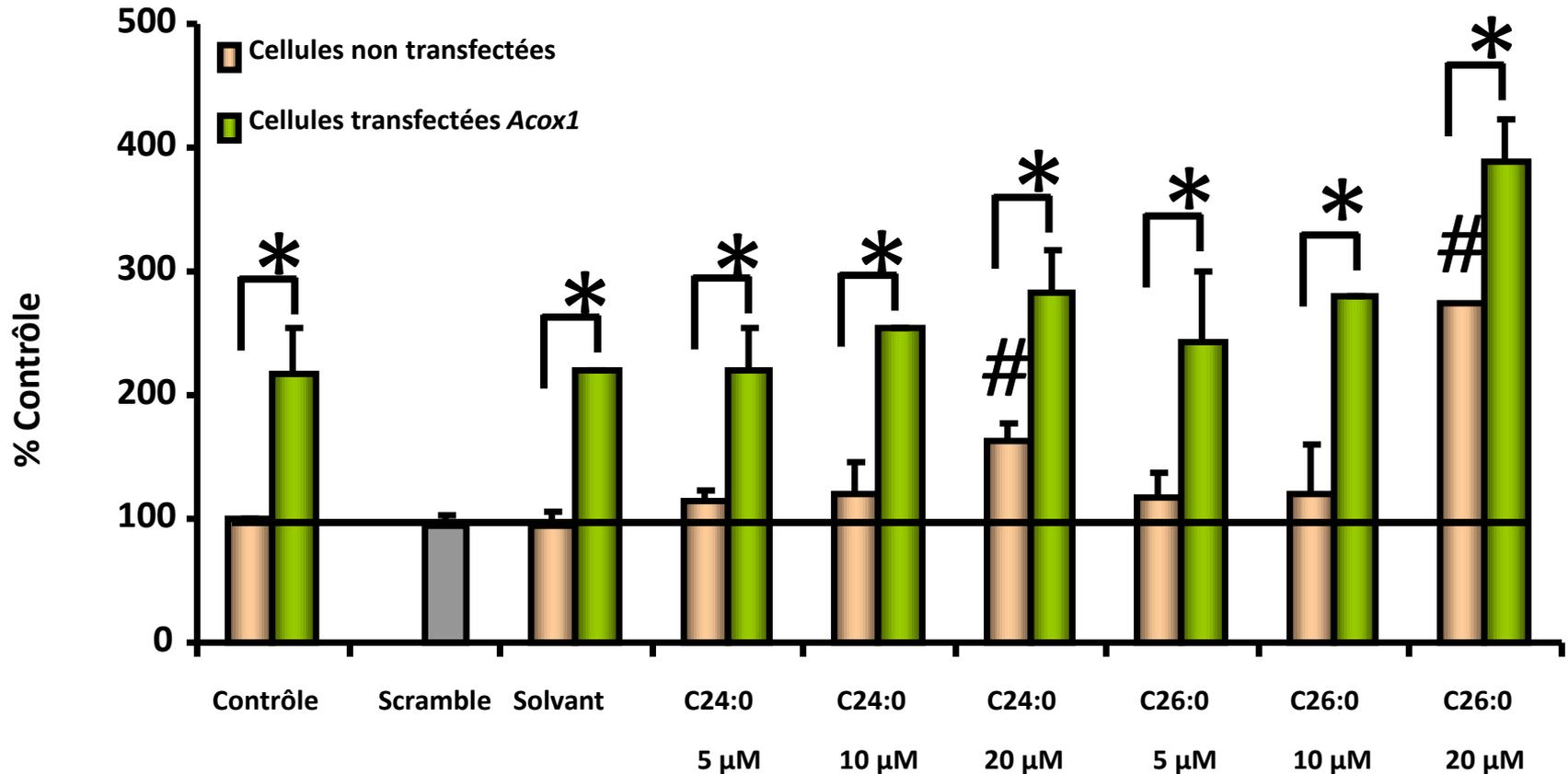
# Effet de C24:0 et C26:0 sur la Production de Radicaux Oxygénés



# Extinction d'Acox1 par différents siRNAs

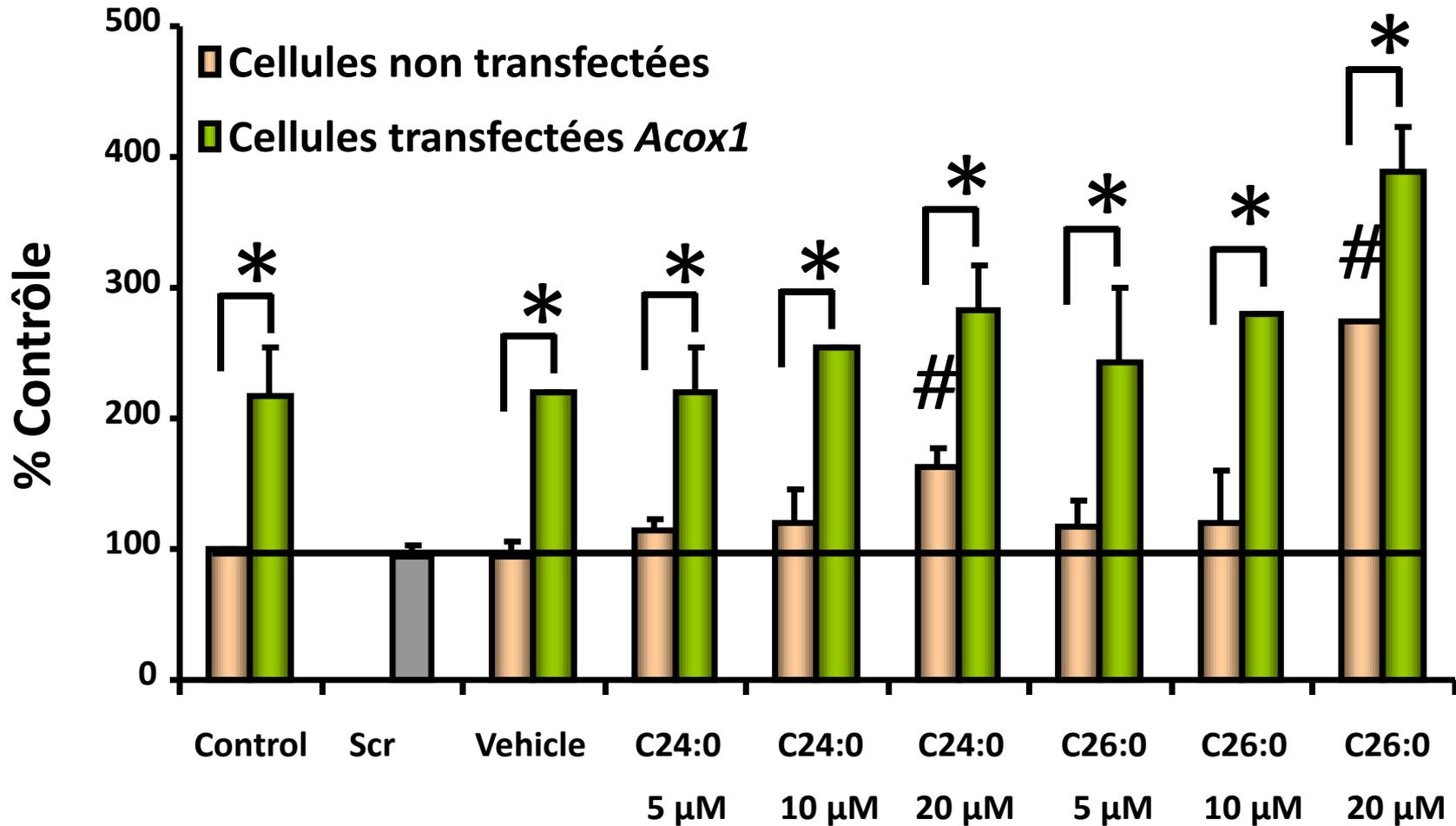


# Conséquence de l'Inactivation d'*Acox1* sur la Production d'Anions Superoxydes



✓ Production d'anions superoxydes (Dihydroéthidine)

# Effet de l'inactivation d'*Acox1* sur la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



✓ Production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Dihydrorhodamine 123)

# **Interaction Métabolisme Peroxysomale et Métabolisme Lipidique :**

## **Rôle d'ABCD1**

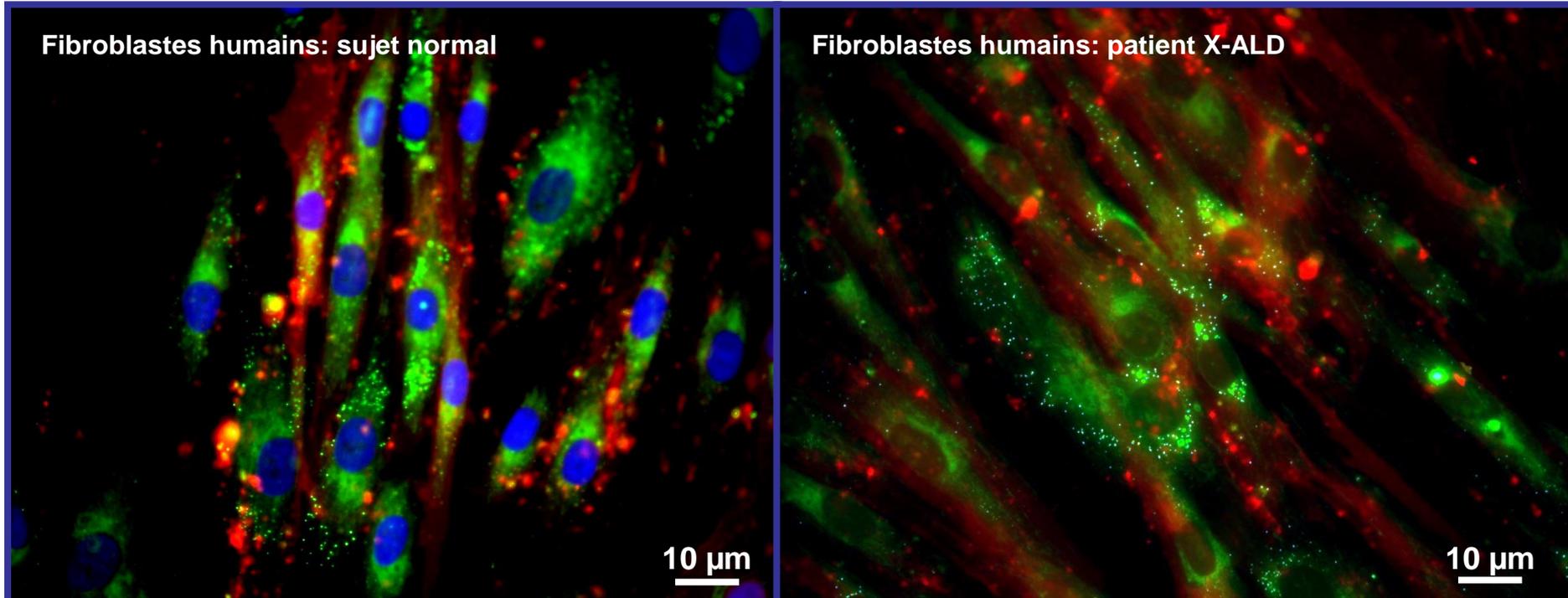
# Colorants Dédiés à l'Analyse des Lipides

Colorants	Cibles	Utilisation	Applications
<b>Noir Soudan</b>	Gouttelettes lipidiques	Microscopie en champs clair, imagerie	Maladies métaboliques et dégénératives
<b>Oil Red O</b>	Lipides neutres	Microscopie en champs clair, imagerie, biochimie	Toxicologie, maladies métaboliques et dégénératives

# Fluorochromes Dédiés à l'Analyse des Lipides

Sondes	Cibles	Utilisation	Applications
<b>Nile Red</b>	Lipides polaires et neutres	Microscopie, cytométrie en flux, analyse spectrale	Phospholipidose, stéatose
<b>HCS LipidTOX</b>	Lipides neutres et phospholipides	Microscopie, analyse spectrale	Phospholipidose, stéatose
<b>Filipine</b>	Cholestérol non estérifié	Microscopie, cytométrie en flux	Hypercholestérolémie
<b>BODIPY</b>	Lipides neutres	Microscopie, cytométrie en flux	Métabolisme des lipides, radeaux lipidiques
<b>Laurdan</b>	Phospholipides	Polarisation de fluorescence, microscopie confocale multiphotonique	Fluidité membranaire, radeaux lipidiques
<b>Mérocyanine 540</b>	Phospholipides	Microscopie, cytométrie en flux	Externalisation des phosphatidylsérines
<b>Cis-parinaric acid</b>	Acides gras insaturé	Microscopie, cytométrie en flux	Peroxydation lipidique
<b>DPH</b>	Lipides de la membrane plasmique	Polarisation de fluorescence	Fluidité membranaire

# LipidTOX : Distinction Lipides Polaires et Lipides Neutres



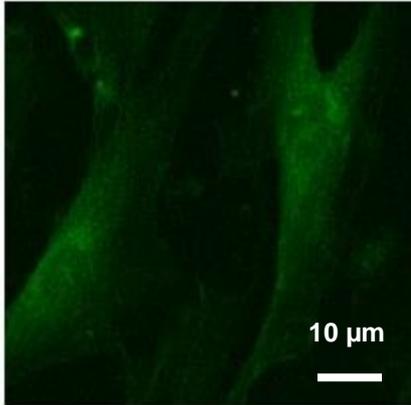
## LipidTOX (Réf H34158; Invitrogen)

\*Lipides neutres: fluorescence verte \* Lipides polaires: fluorescence rouge  
Contrairement au Nile Red, l'extinction de fluorescence est faible  
Microscopie confocale possible dans de bonnes conditions

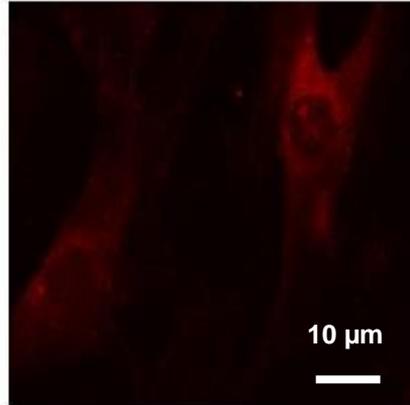
# HCS LipidTOX™ : phospholipidose et stéatose

## Fibroblastes humains normaux

LipidTox



500 => 536 nm

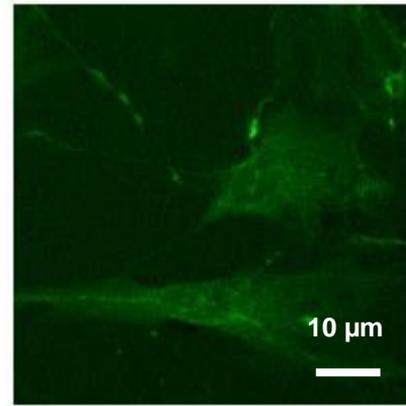


590 => 620 nm

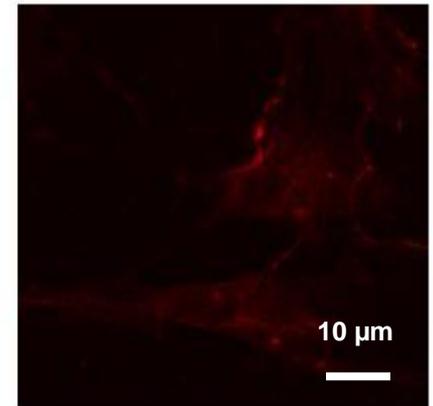
Excitation 405nm ou 488 nm

contrôle

LipidTox



500 => 536 nm



590 => 620 nm

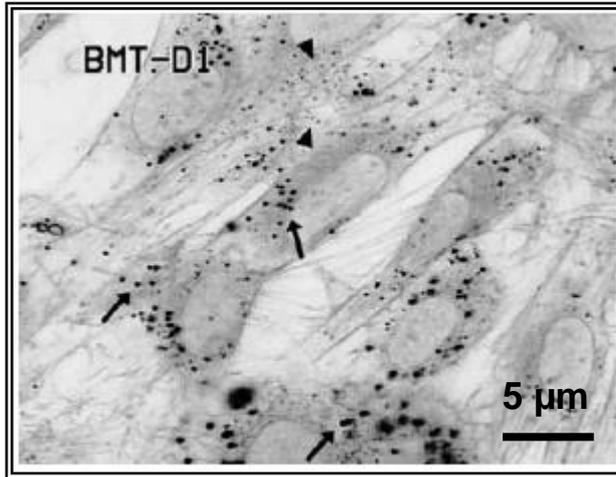
Excitation 405nm ou 488 nm

Acide gras C24:0

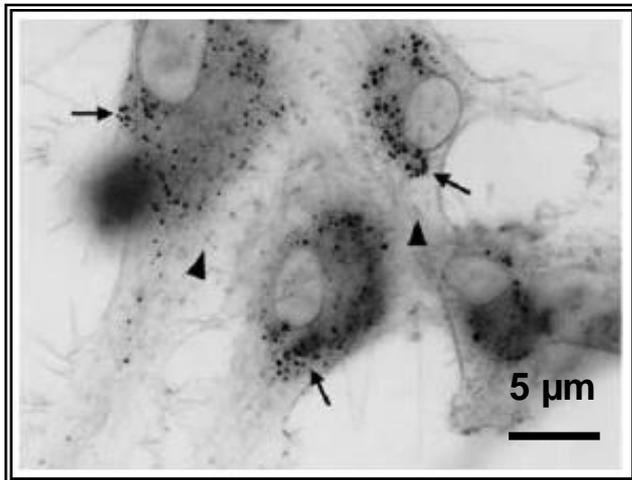
Diminution des lipides polaires et modifications de la répartition spatiale des lipides neutres et polaires (Résultats: Baarine M, Seguin A, Kahn E, Lizard G – Inserm 678 et 866, Paris-Dijon)

# Oil Red-O : Quantification Intracellulaire des Lipides Neutres

## Fibroblastes vivants observés en **contraste de phase**



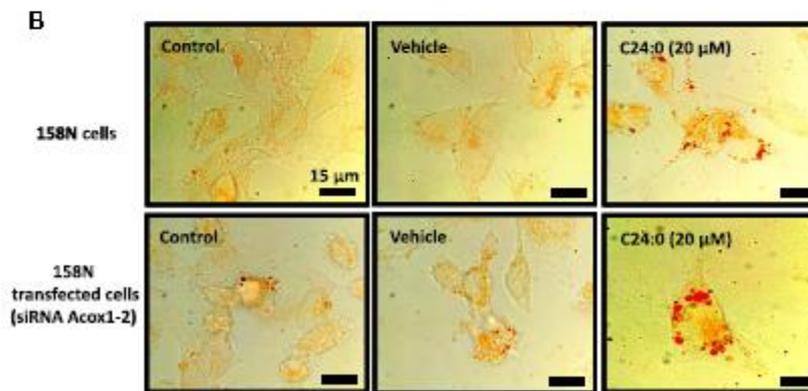
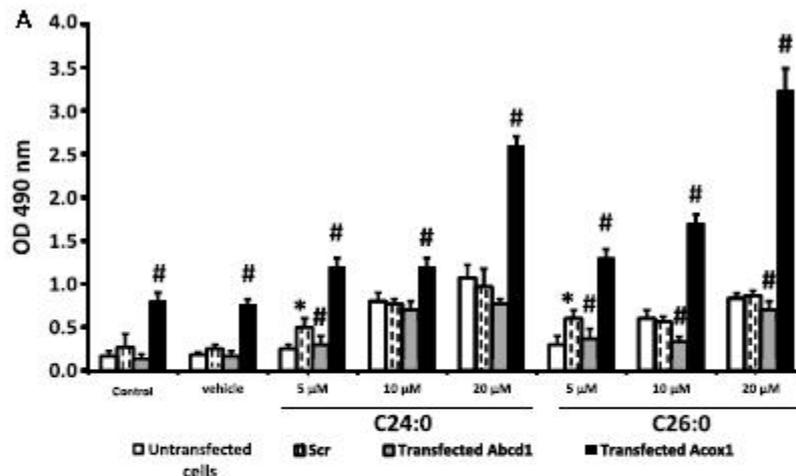
**Gouttelettes lipidiques** visibles en vidéomicroscopie: granules sombres de fort contraste de diamètre 0,3 à 0,6  $\mu\text{m}$  (flèche) et granules plus petits de faible contraste (tête de flèche)



**Mouvement des gouttelettes lipidiques :** régions du cytoplasme contenant les gouttelettes de fort contraste (flèche) avec un mouvement oscillatoire, et les gouttelettes de faible contraste (tête de flèche) qui se déplacent à travers le cytoplasme

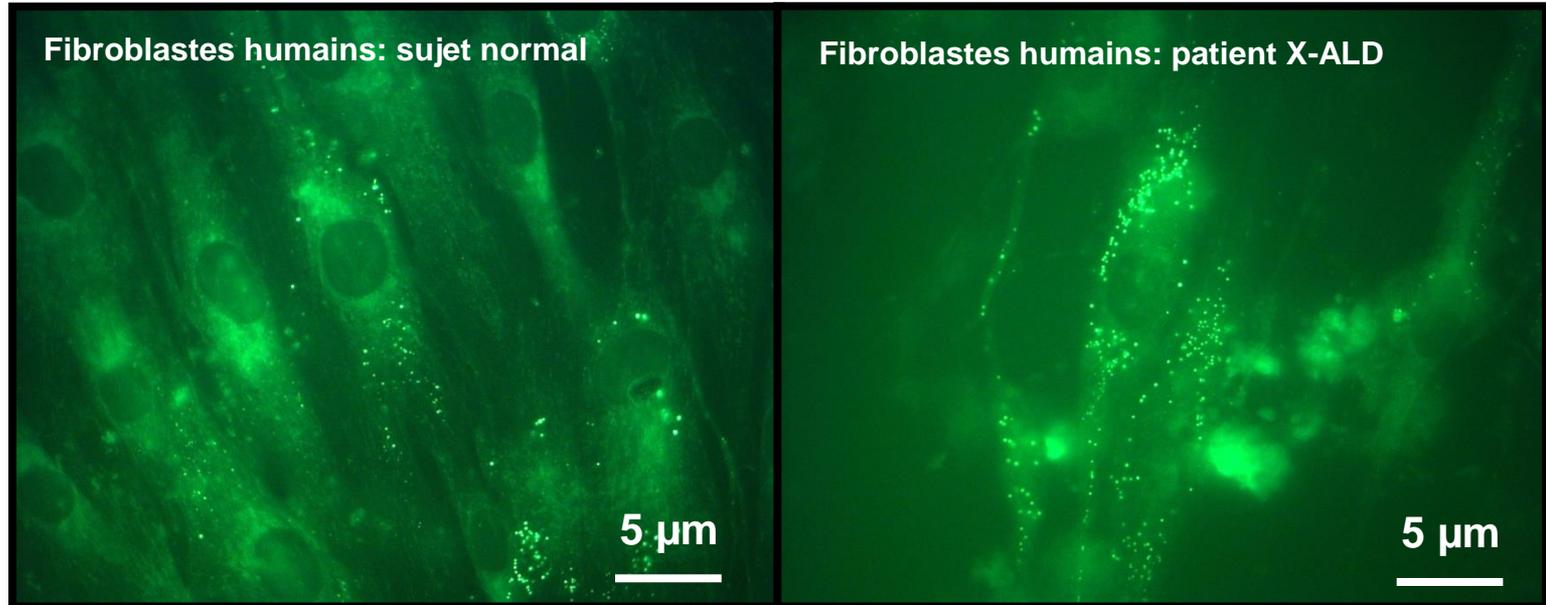
# Conséquences de l'Inactivation d'Abcd1 et Acox1 sur le Métabolisme Lipidique

M. Baarine et al. / Neuroscience 213 (2012) 1-18



# Bodipy : Analyse des Lipides Neutres

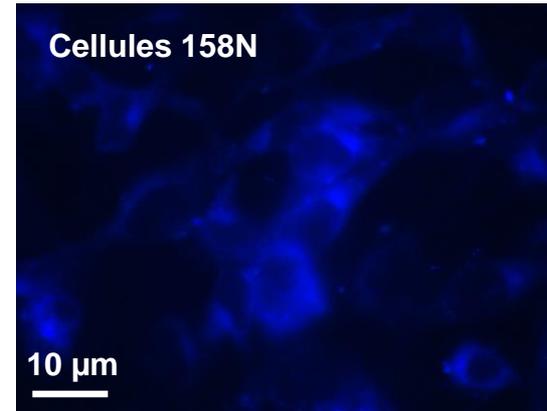
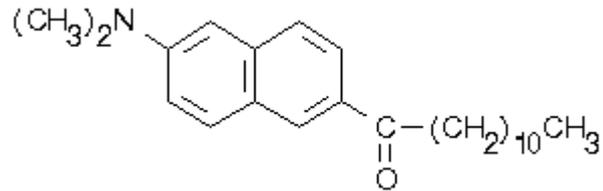
---



**Bodipy. 493/503; Réf D3922; Invitrogen**

Résultats: Seguin A, Baarine M, Lizard G - Inserm 866, Dijon, France

# Laurdan : Organisation des Bicouches Lipidiques



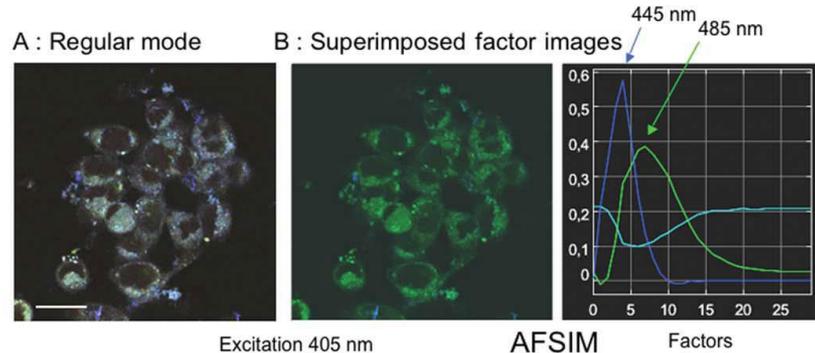
## Laurdan

LAURDAN, which is reported to be excited with the UV light (360 nm) and emits a blue fluorescence (440 nm) in the ordered lipid phase and a green fluorescence (490 nm) in the disordered lipid phase

- \* Spectre de fluorescence sensible à la polarité et à la phase dans laquelle se trouve la bicouche lipidique
- \* Fortement accroché dans le cœur hydrophobe de la bicouche avec sa partie fluorescente localisée au niveau des glycérols et des phospholipides
- \* Le laurdan est utilisé pour la détection des **radeaux lipidiques**

# Incidence du 7-Cétocholestérol sur la Désorganisation des Radeaux Lipidiques: Microscopie Confocale et Analyse Spectrale

## Analysis of LAURDAN coloration on 7KC-treated 158N oligodendrocytes

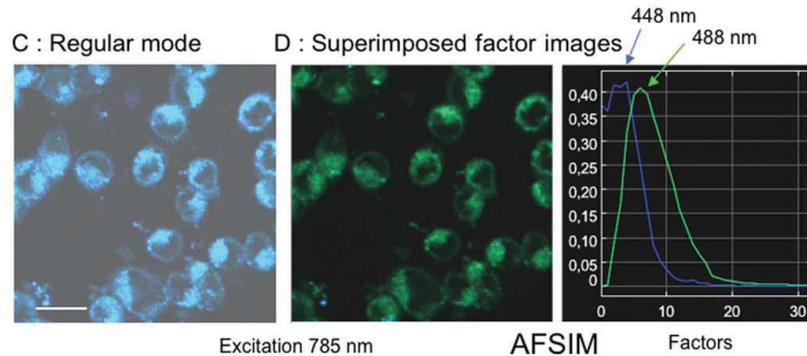


Emission spectral image sequence : 410-420 => 690-700 nm

Superimposed emissions : 410 <=> 470 nm

500 <=> 536 nm 590 <=> 620 nm

## Analysis of LAURDAN coloration on 7KC-treated 158N oligodendrocytes



Emission spectral image sequence : 393-403 => 713-723 nm

Superimposed emissions :

443 <=> 473 nm 483 <=> 513 nm

# CONCLUSIONS

---

- Plusieurs approches de cytométrie (flux, image) permettent d'appréhender le métabolisme grâce à différents fluorochromes et colorants
- Les méthodes de cytométrie (flux, image) sont appropriées pour aborder différents aspects du métabolisme cellulaire et en particulier le métabolisme lipidique
- L'identification des mécanismes moléculaires et des cibles nécessite des approches complémentaires (chromatographie gazeuse, spectrométrie de masse, western blotting, ...)