



Université de Bourgogne

EXPLORATION DU METABOLISME CELLULAIRE PAR CYTOMETRIE EN FLUX ET EN IMAGES

Amira ZARROUK,^{1, 2} Anne VEJUX,¹ Gérard LIZARD¹

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

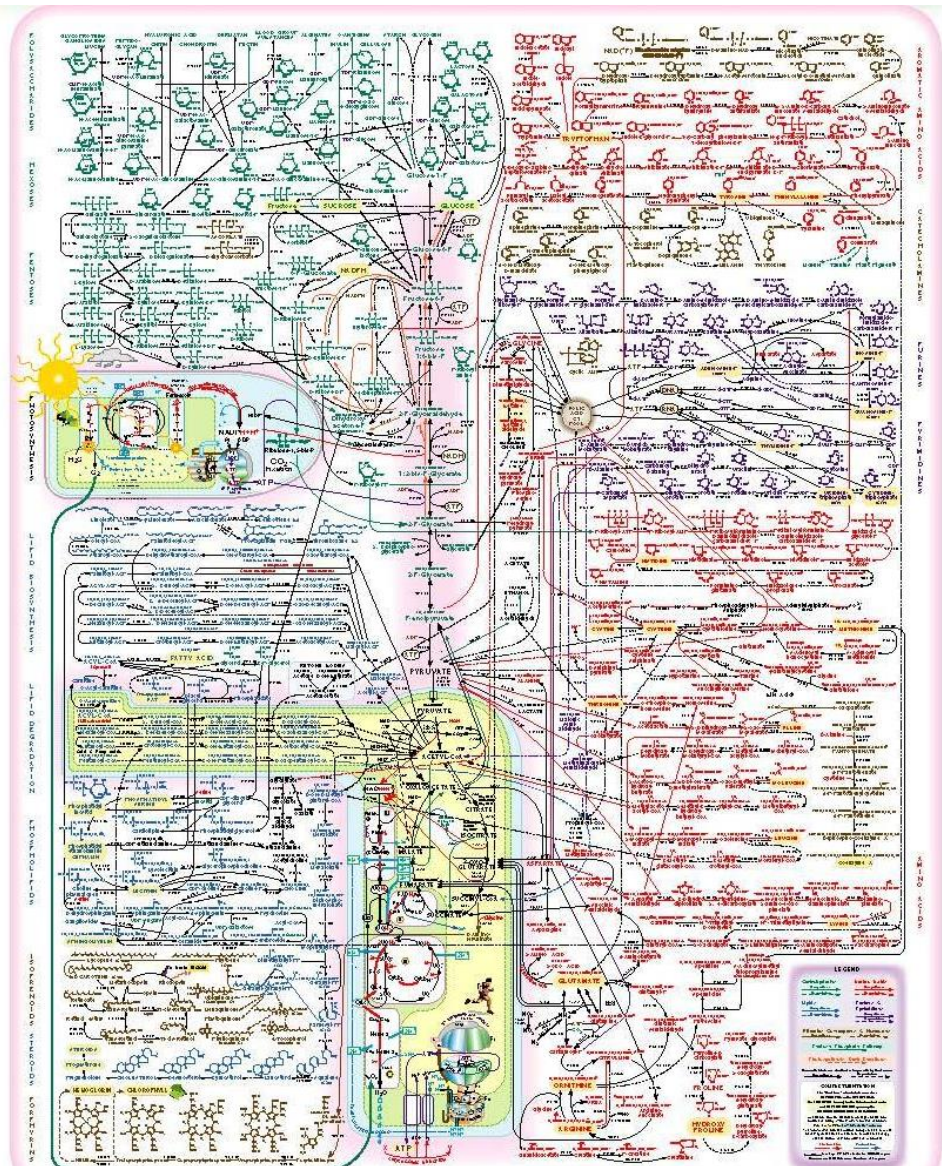
• Metabolism + Cytometry + Lipids
7 741 citations

• 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.

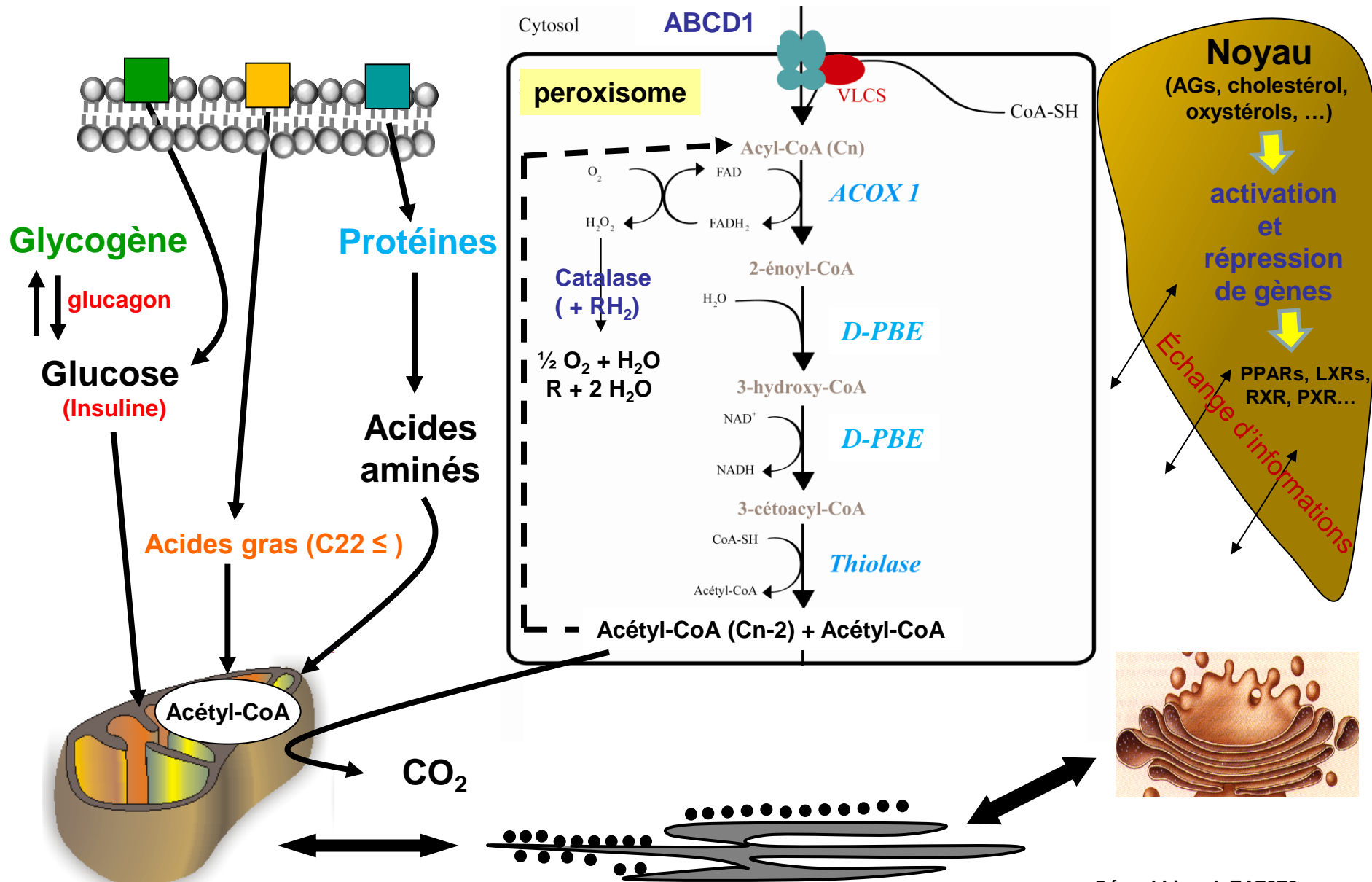
C'est un processus complexe et ordonné comprenant plusieurs aspects étroitement liés (métabolisme énergétique, lipidique, glucidique, protéique, nucléique, oxydatif) qui fait intervenir des processus de dégradation (*catabolisme*) et de synthèse organique (*anabolisme*).

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

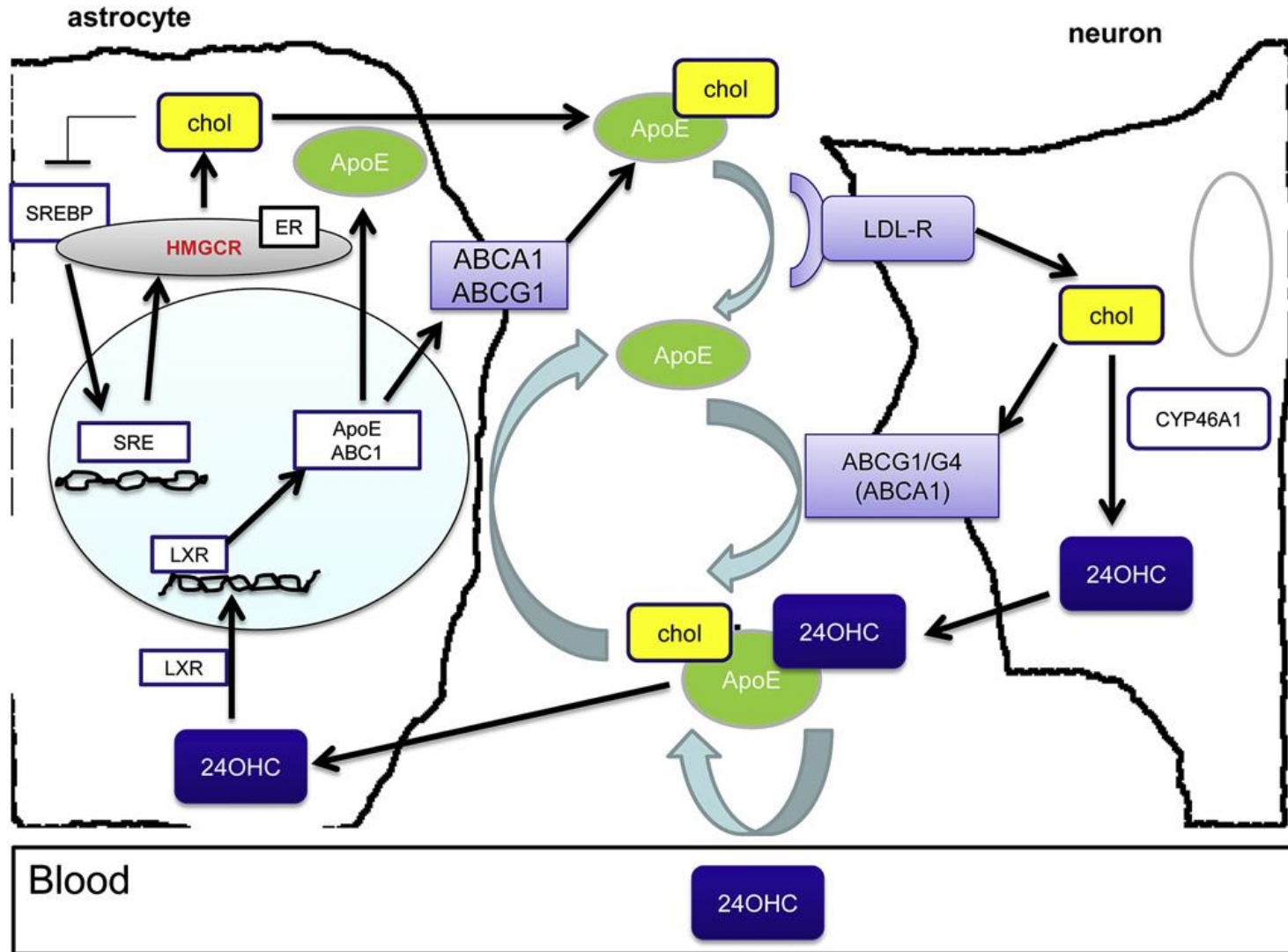
Il existe de nombreuses pathologies (maladies génétiques) liées à des troubles du métabolisme (**diabète de type 1, leucodystrophies peroxysomales, ...**).

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

C24:6, n-3
+ CoA
(Acyl-CoA synthase)

DHAP

DHAPAT

Acyl-CoA

Acide phytanique
+ CoA (Acyl-CoA synthase)

β -oxydation

β -oxydation

α -oxydation

O₂
Catalase
H₂O₂

Acyl-DHAP

Alkyl-DHAP synthase

(n-2) Acyl-CoA

Acetyl-CoA

Acide pristanique

C22:6, n-3 (DHA)

Alkyl-DHAP

COT

CAT

Réticulum endoplasmique

Acyl-Carnitine

Acétyl-Carnitine

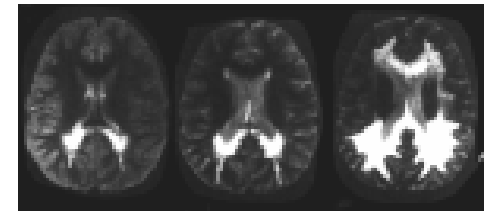
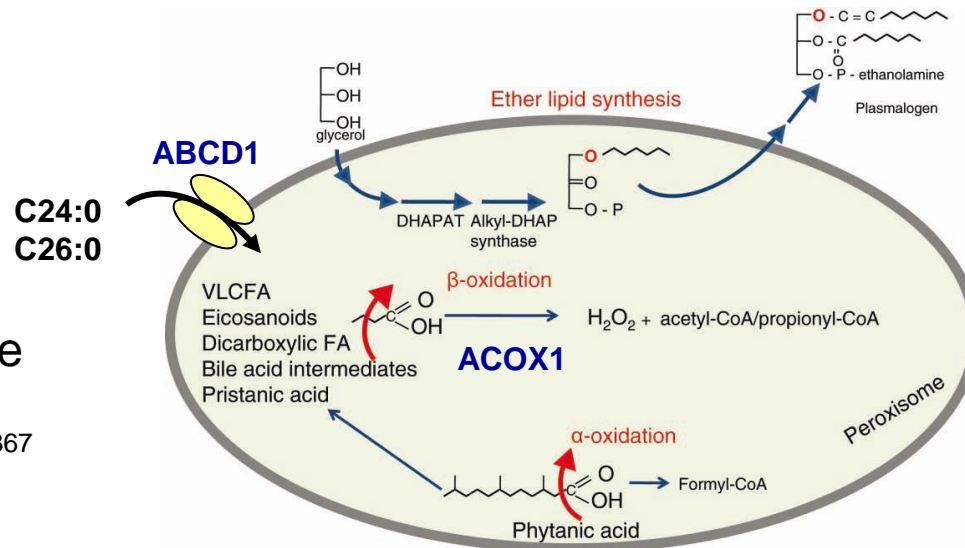
plasmalogènes

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 β -oxydation peroxysomale
 accumulation d'AGTLCs (C24:0; C26:0)

- **P-NALD** (Pseudo Neonatal ALD)
 très rare
 déficience en ACOX1
 déficience en β -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

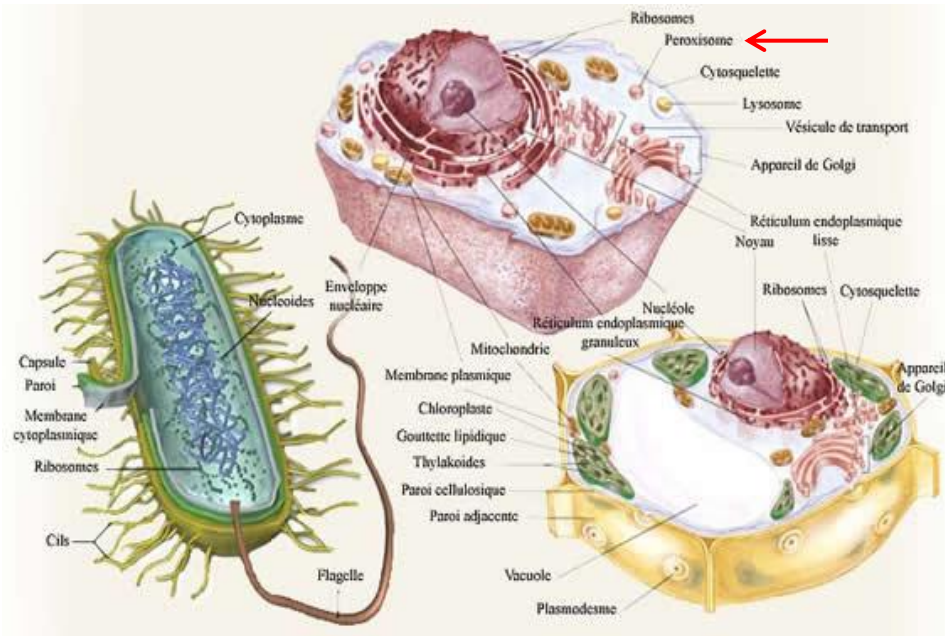
- Relations peroxysome – mitochondrie

- 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**

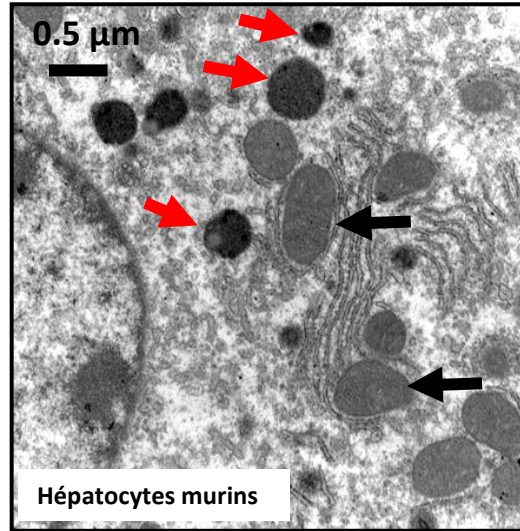
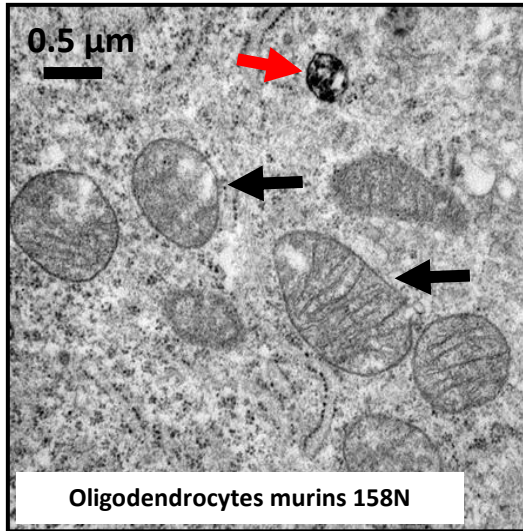
Le peroxysome



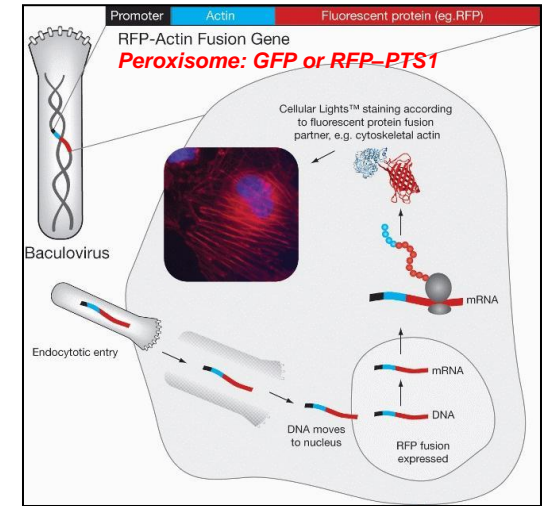
- Organite cellulaire souvent rond (0,1 à 1 μm de diamètre)
- Présent dans les cellules animales et végétales à l'exception des érythrocytes
- Pas d'ADN

Caractérisation *in situ* du peroxysome

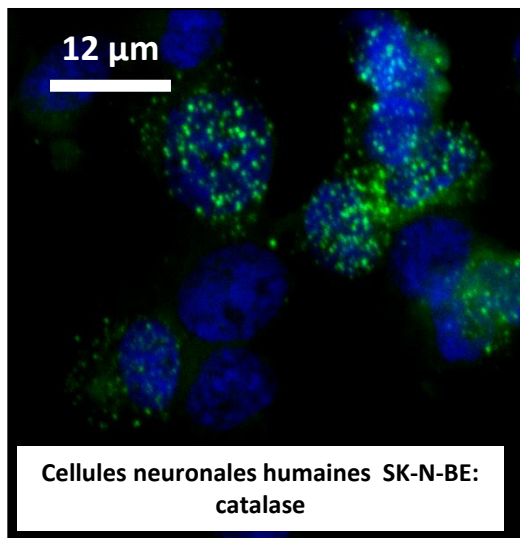
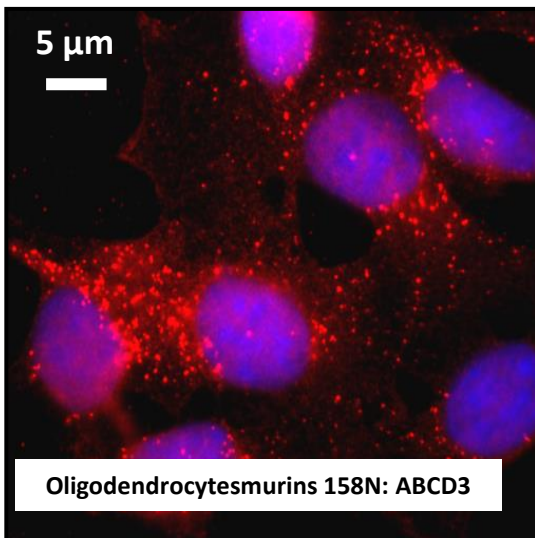
- Microscopie électronique à transmission (activité catalase)



- Fluorescent protein-based markers for peroxisomes

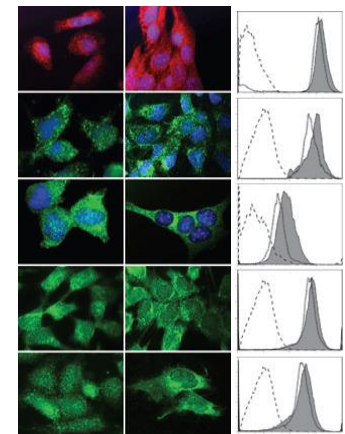


- Microscopie confocale (ABCD3, catalase)



- 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



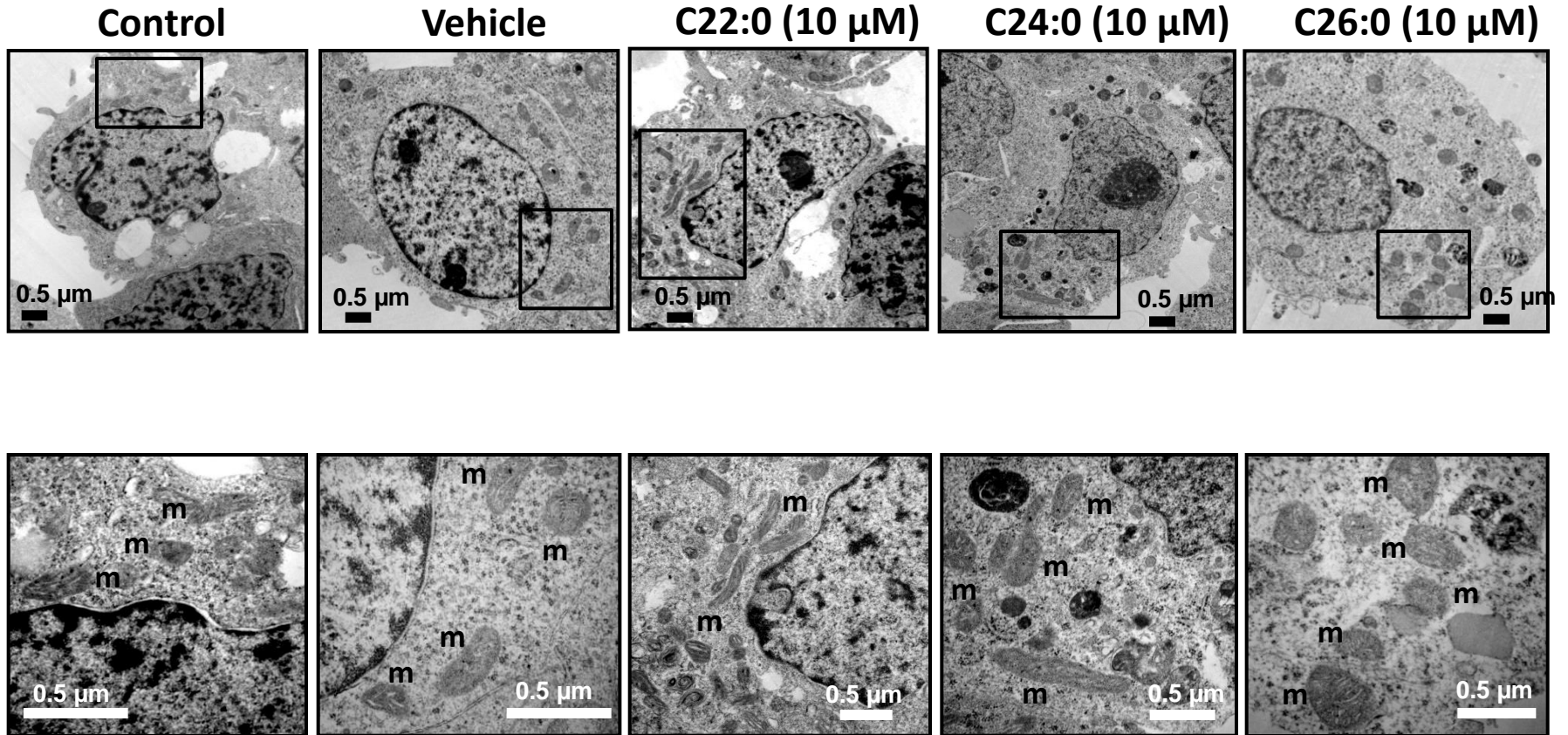
Analyse d'images (quantification)

- PAGE / Western blotting
- RT-qPCR

- **Activité peroxysomale**

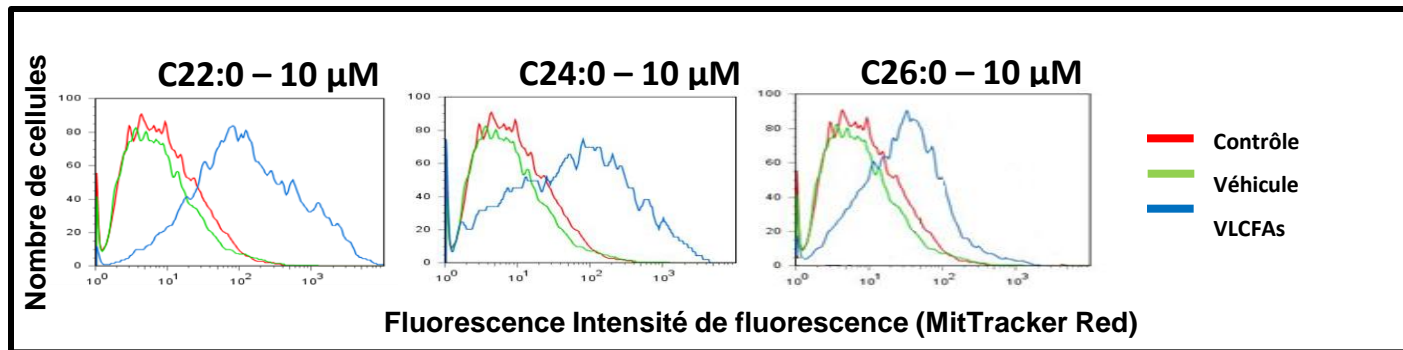
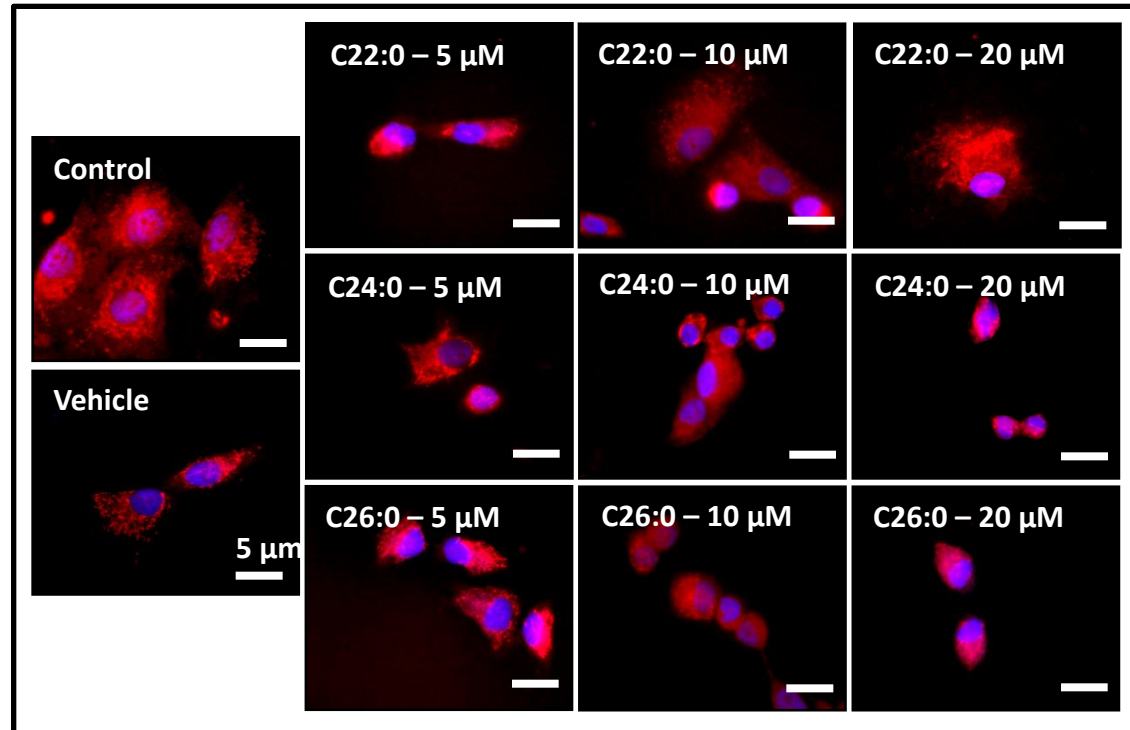
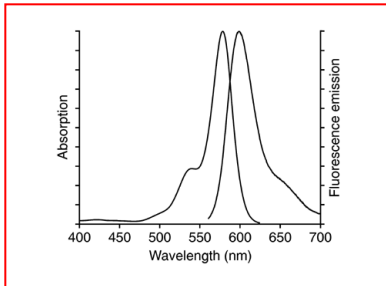
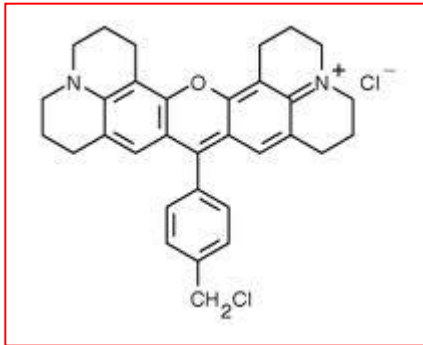
- β -oxydation
- activité catalase
- activité ACOX1
- taux de DHA
- taux de C24:0 et C26:0; rapports: C24:0/C22:0; C26:0/C22:0
- taux d'acide phytanic

Caractérisation *in situ* de la mitochondrie (MET)



Topographie mitochondriale et quantification

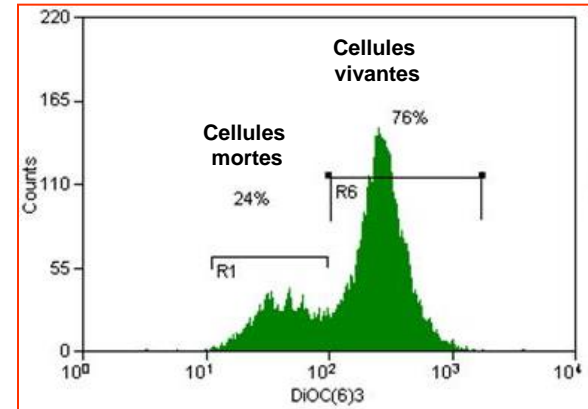
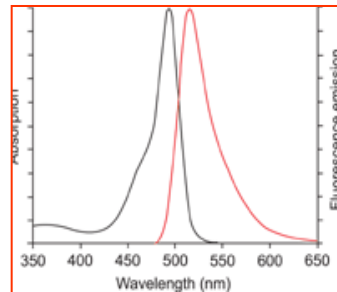
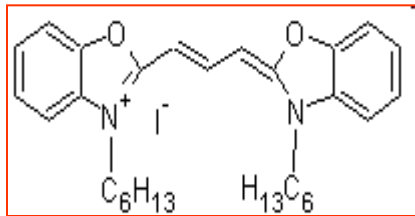
MitoTracker Red



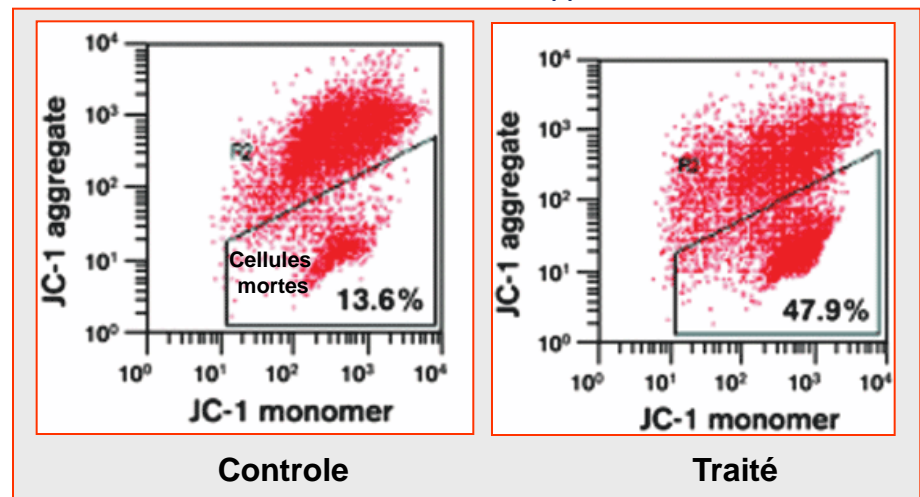
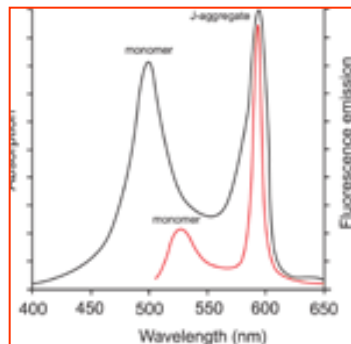
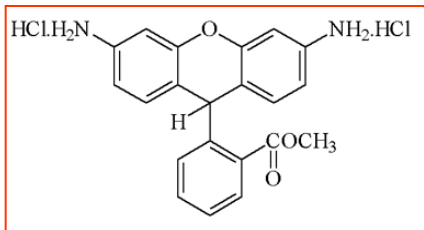
Potentiel Transmembranaire Mitochondrial ($\Delta\Psi_m$)

Coloration avec DiOC₆(3) ou JC1

- **DiOC₆(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

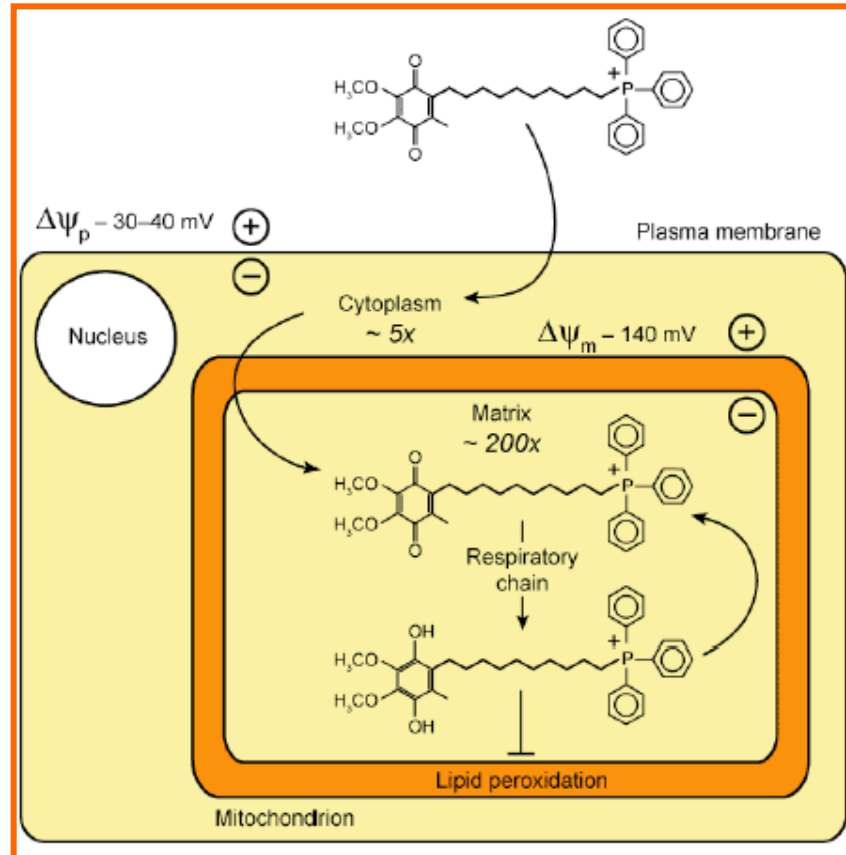
Aminophényl fluorescéine ; Dihydrorhodamine 123 ; Luminol

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

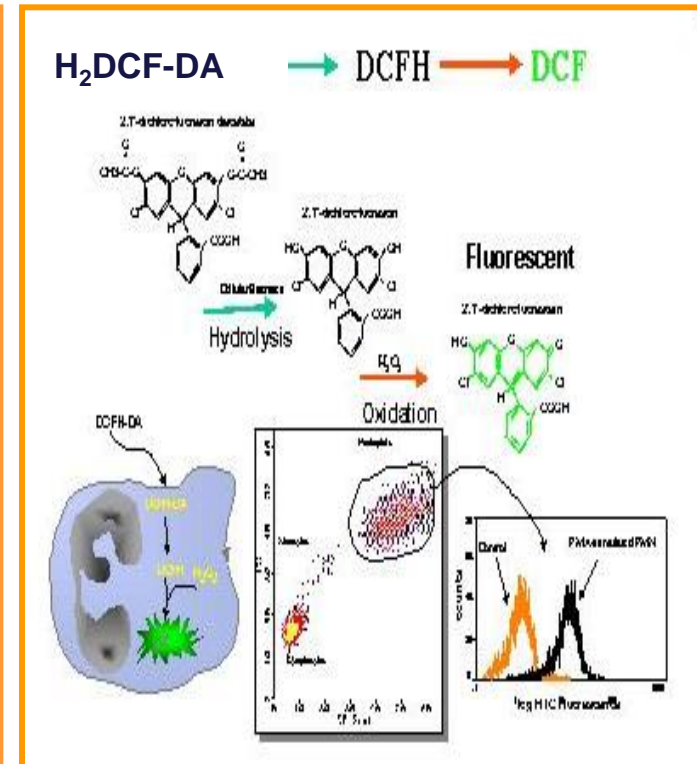
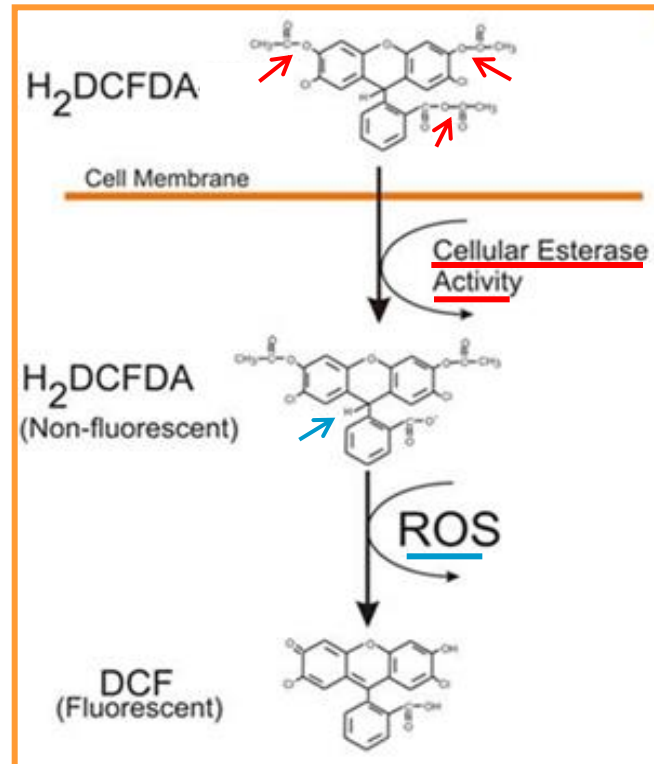
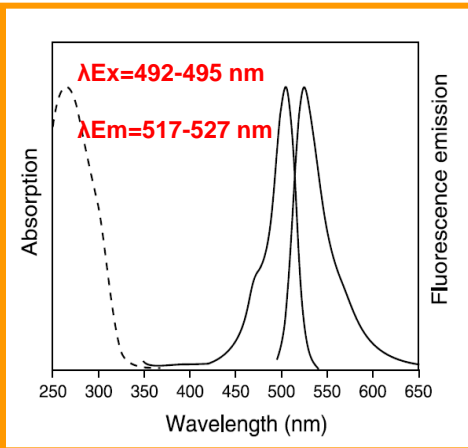
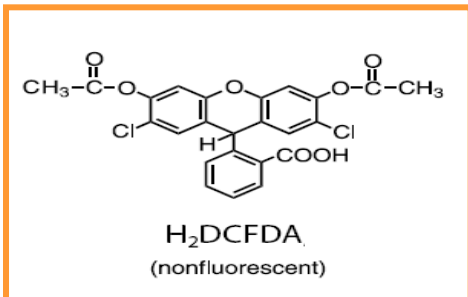
3'-(*p*-Aminophényl) fluorescéine) ; 3'-(*p*-Hydroxyphényl) fluorescéine;
H2DCFDA; CM-H2DCFDA ; AM-H2DCFDA ; Coelenterazine;
Dihydrorhodamine 123 ; Dihydrorhodamine 6G ; Luminol

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

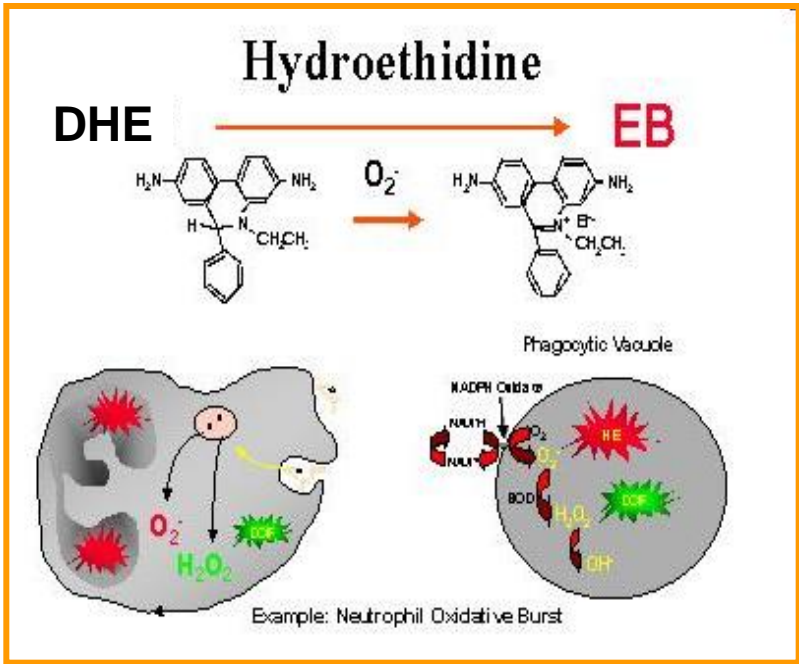
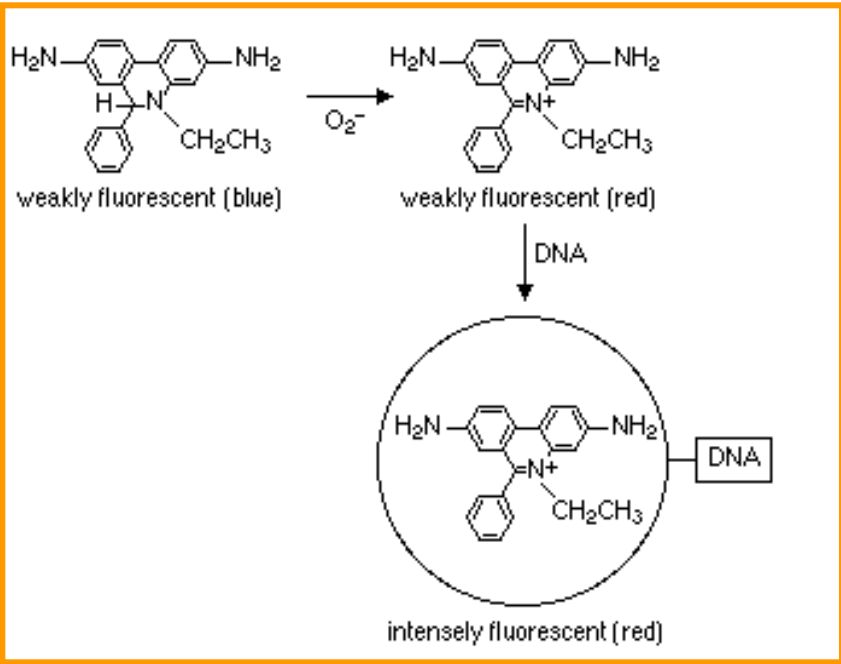
Mesure de la Production d'Anions Superoxydes ($O_2^{\cdot -}$) Mitochondriaux avec le MitoSox



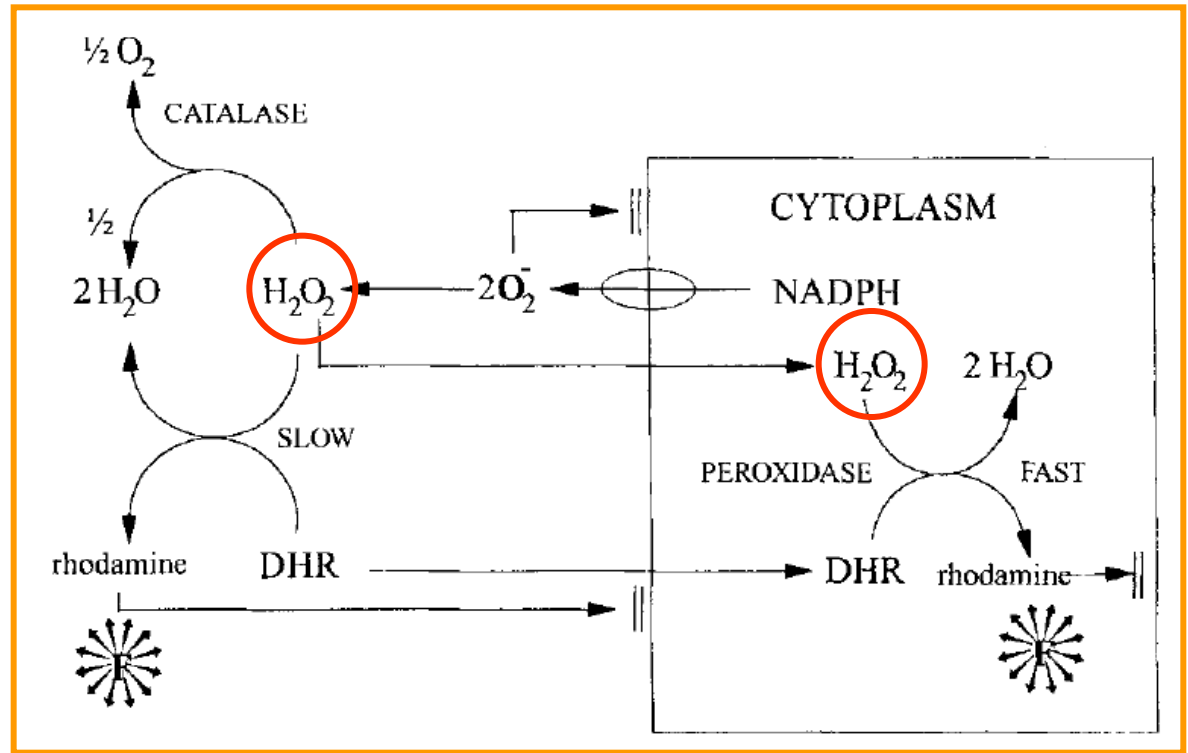
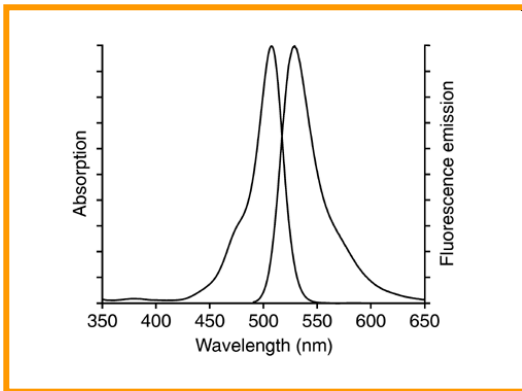
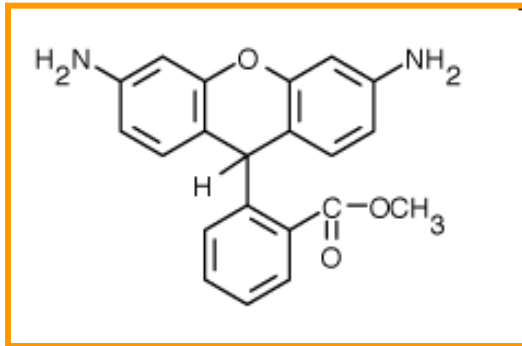
H₂DCF-DA (2', 7'-dichlorofluorescein diacetate) : H₂O₂ ; HO· ; ONOO⁻ ...



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

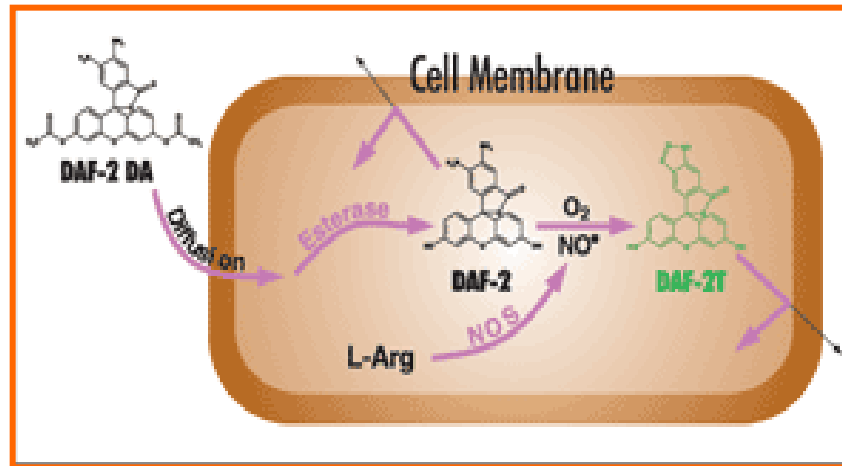
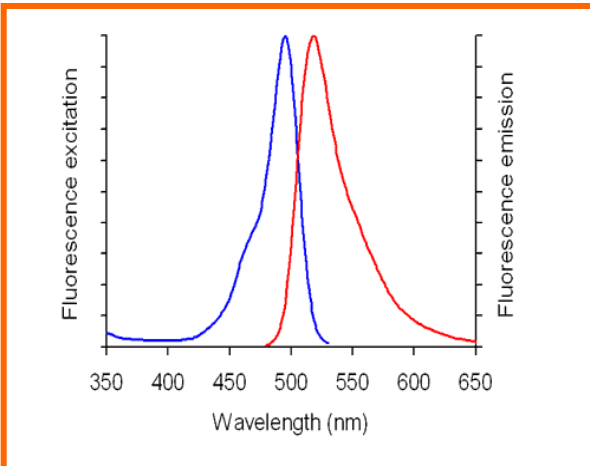
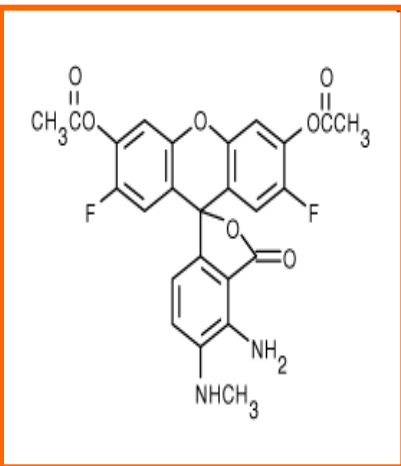
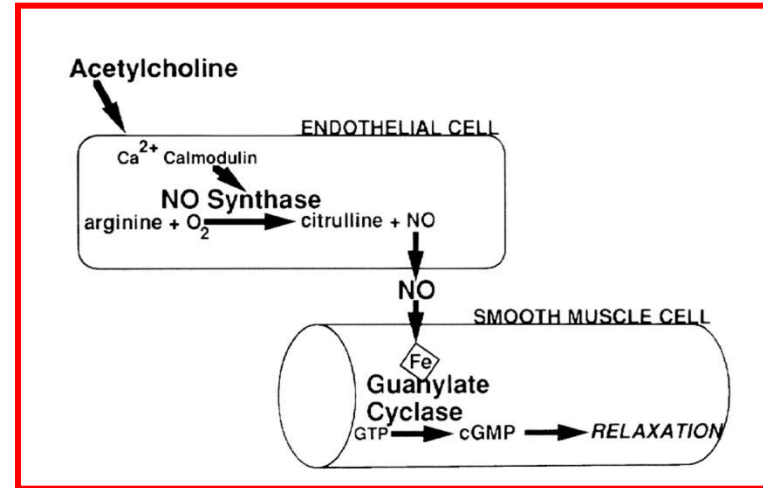
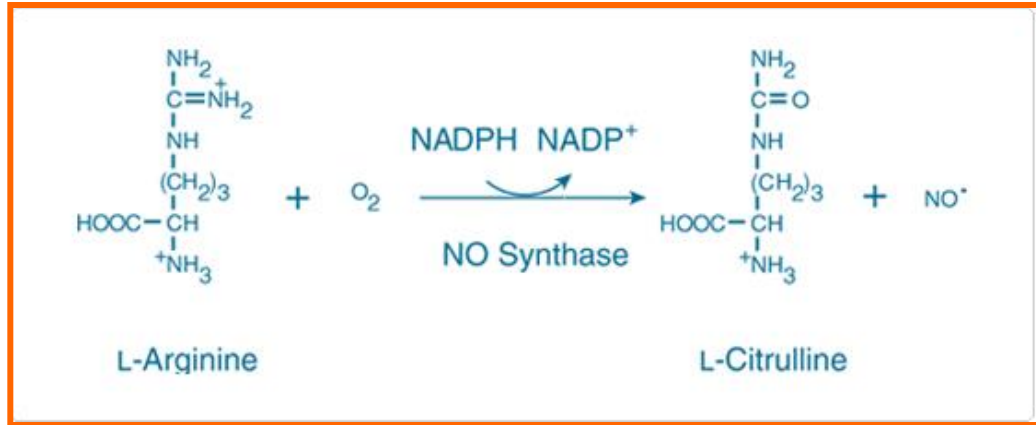


Dihydrorhodamine 123 : H_2O_2 ; HOCl ; ONOO^-



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

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

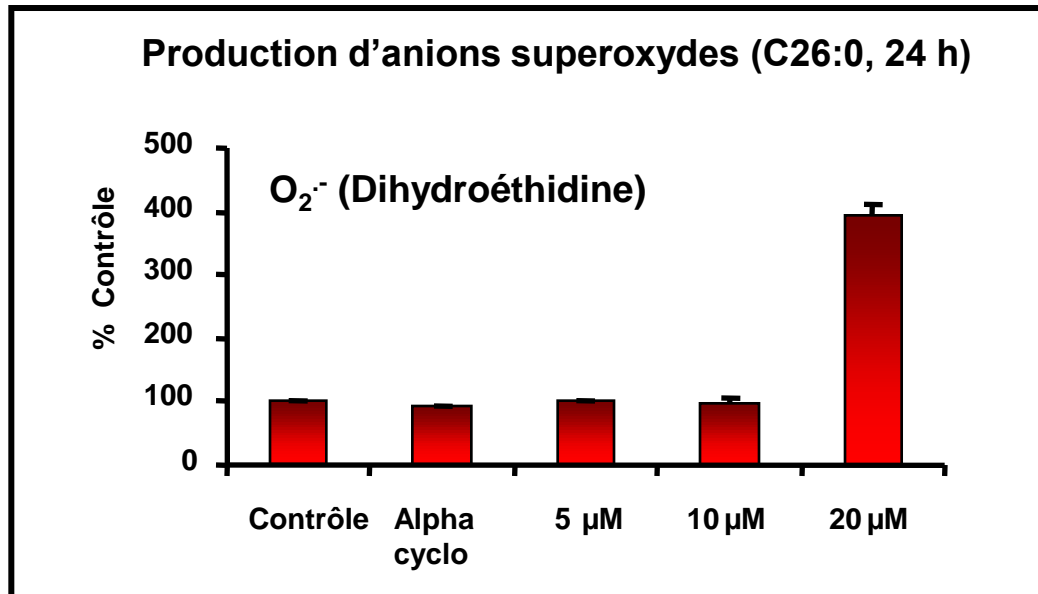
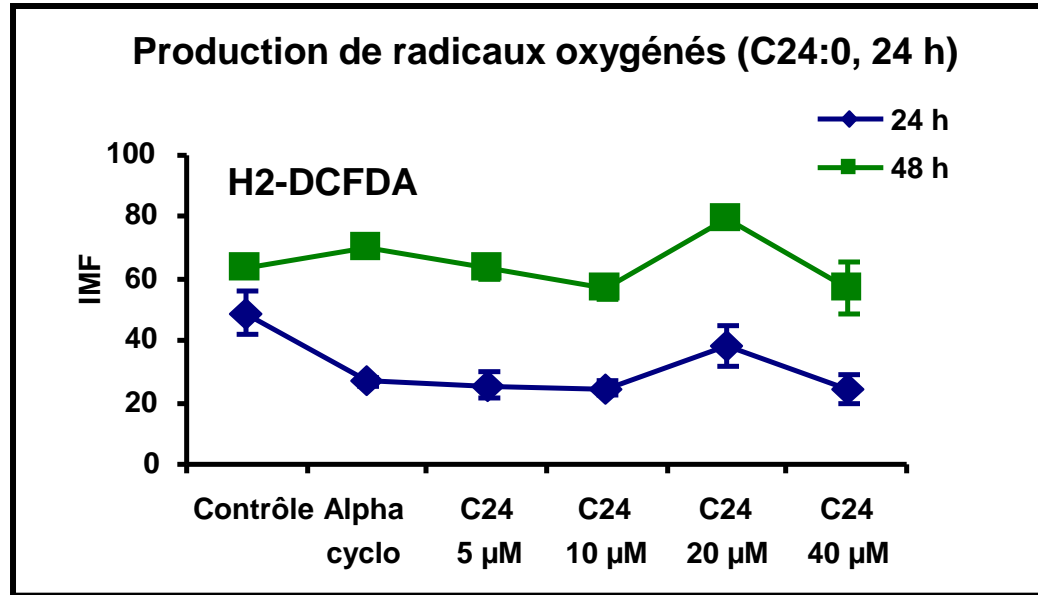


DAF-FM
diacétate 4-amino-5-méthylamino-2',7'-difluorofluorescéine diacétate

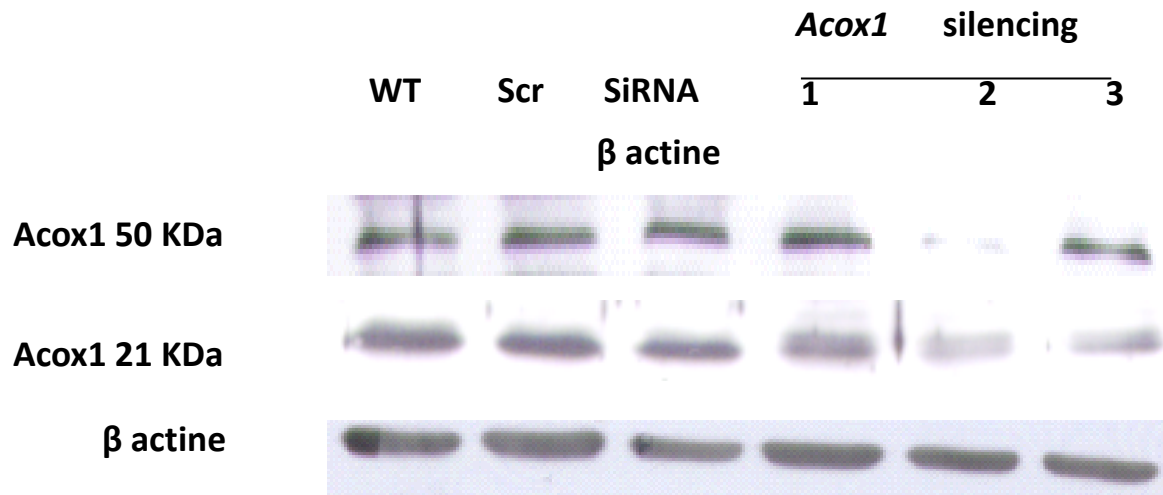
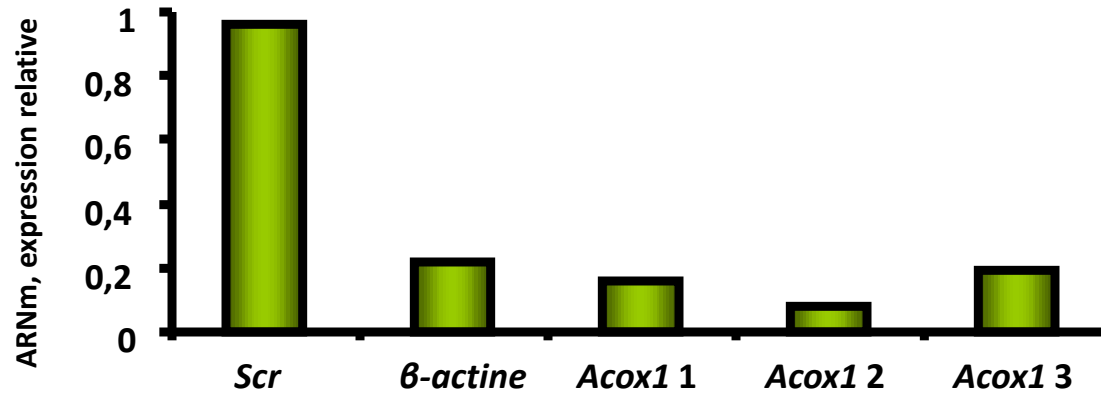
Interaction Métabolisme Peroxysomale et Métabolisme Oxydatif :

Rôle d'ACOX1

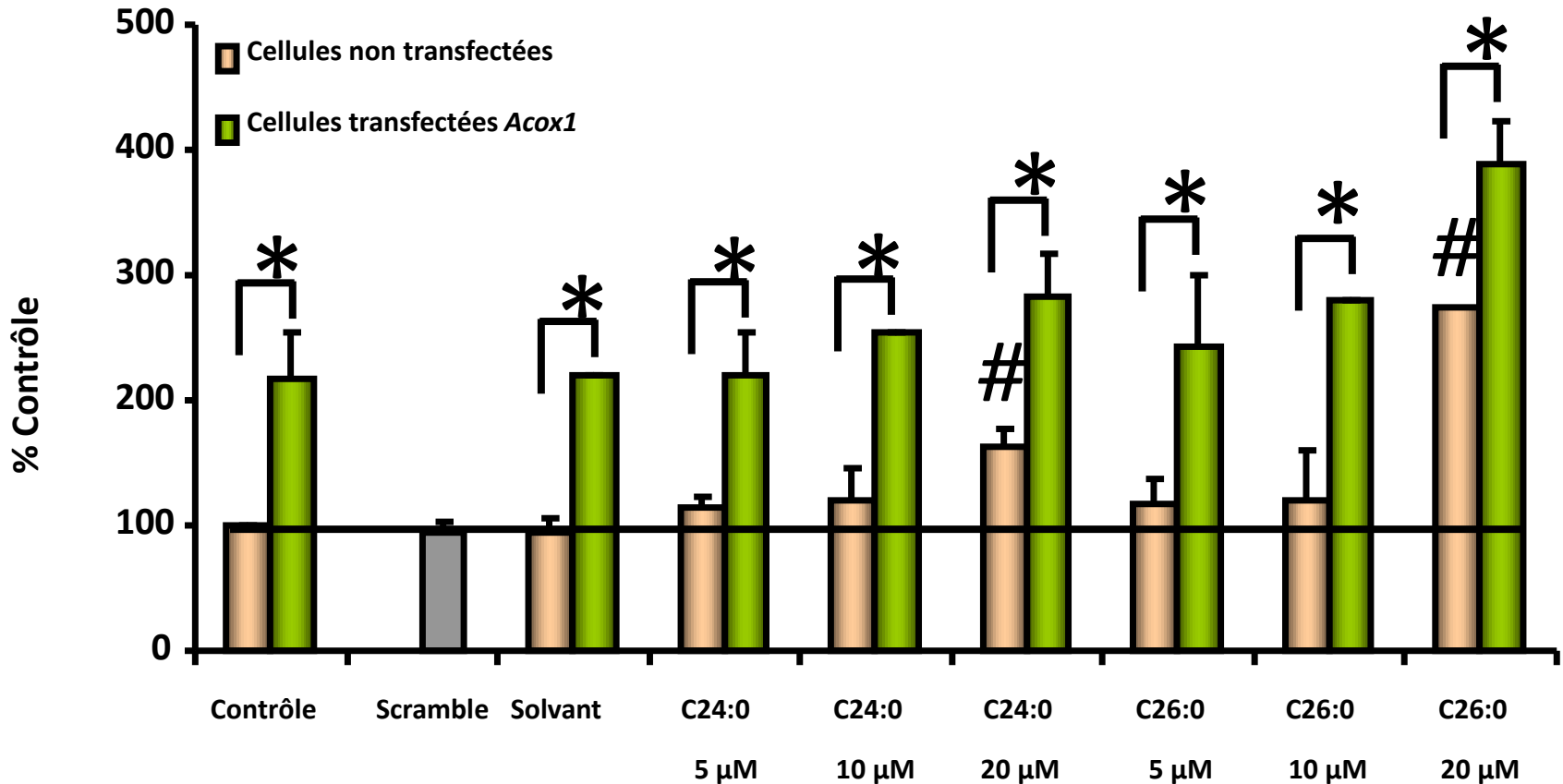
Effet de C24:0 et C26:0 sur la Production de Radicaux Oxygénés



Extinction d'Acox1 par différents siRNAs

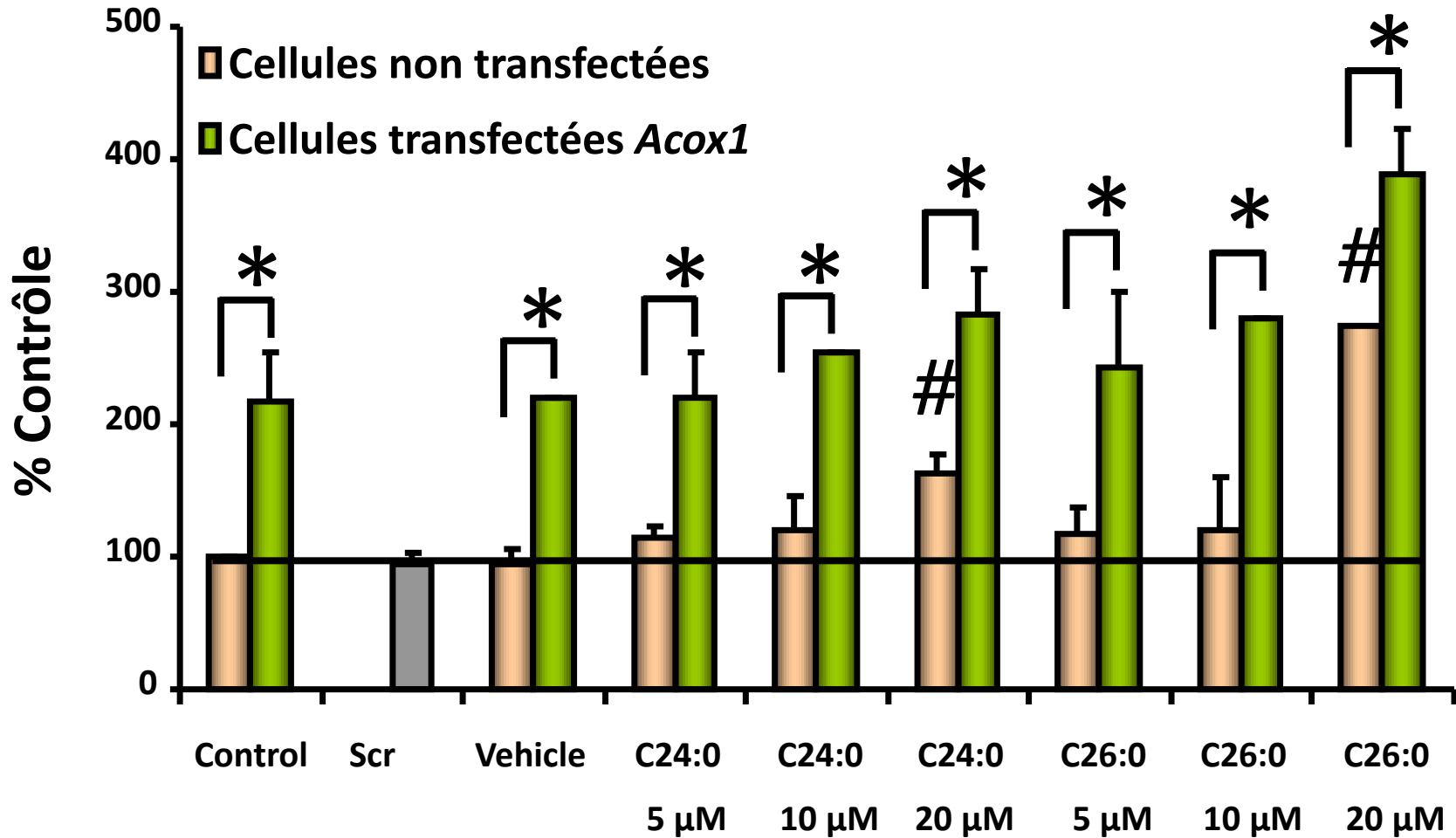


Conséquence de l'Inactivation d'*Acox1* sur la Production d'Anions Superoxydes



✓ Production d'anions superoxydes (Dihydroéthidine)

Effet de l'inactivation d'*Acox1* sur la production de H₂O₂



✓ Production de H₂O₂ (Dihydrorhodamine 123)

Interaction Métabolisme Peroxysomale et Métabolisme Lipidique :

Rôle d'ABCD1

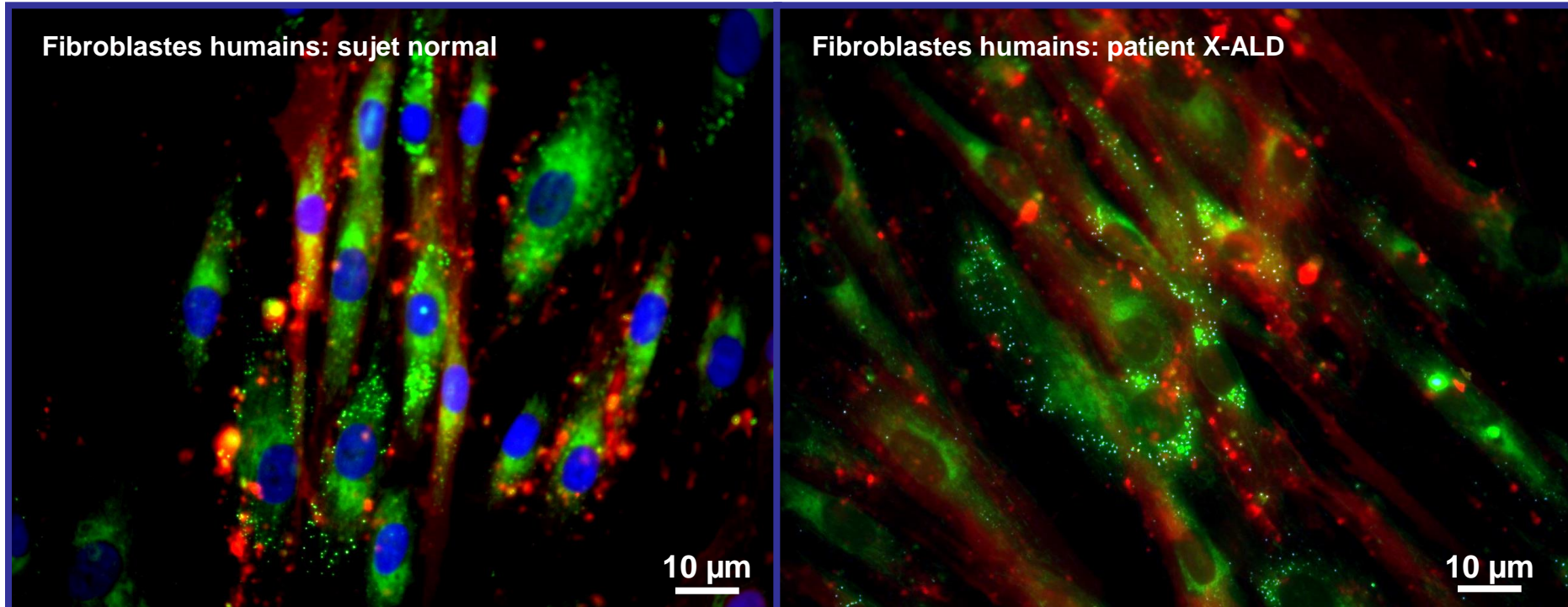
Colorants Dédiés à l'Analyse des Lipides

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

Fluorochromes Dédiés à l'Analyse des Lipides

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

LipidTOX : Distinction Lipides Polaires et Lipides Neutres



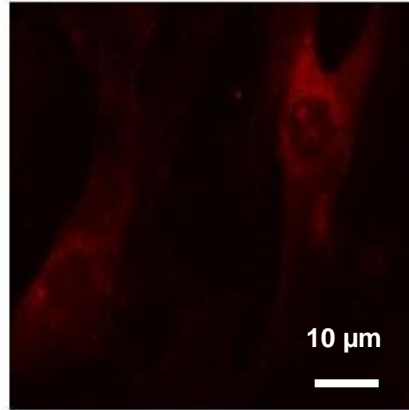
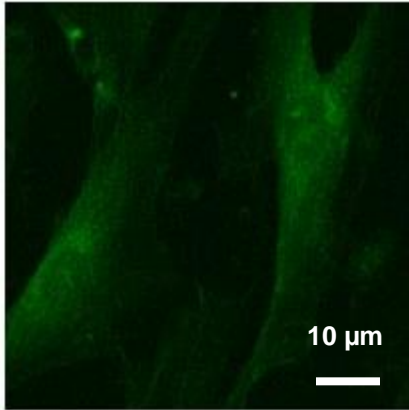
LipidTOX (Réf H34158; Invitrogen)

*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

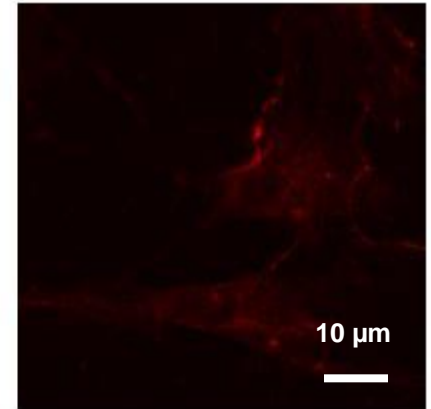
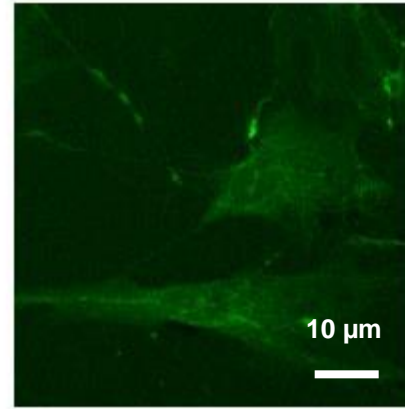


500 => 536 nm

590 => 620 nm

Excitation 405nm ou 488 nm

LipidTox



500 => 536 nm

590 => 620 nm

Excitation 405nm ou 488 nm

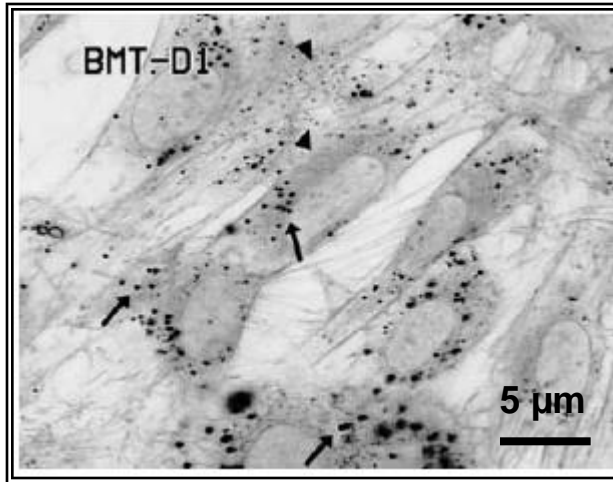
contrôle

Acide gras C24:0

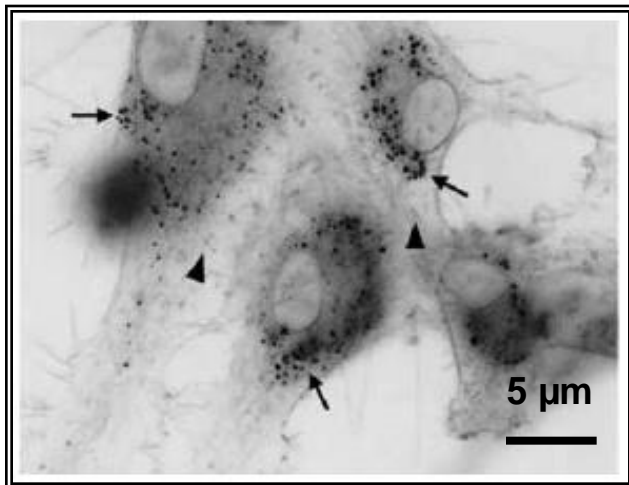
Diminution des lipides polaires et modifications de la répartition spatiale des lipides neutres et polaires (Résultats: Baarine M, Seguin A, Kahn E, Lizard G – Inserm 678 et 866, Paris-Dijon)

Oil Red-O : Quantification Intracellulaire des Lipides Neutres

Fibroblastes vivants observés en **contraste de phase**



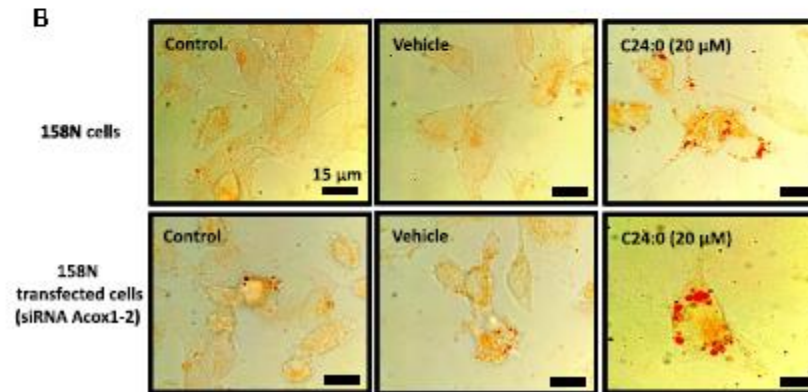
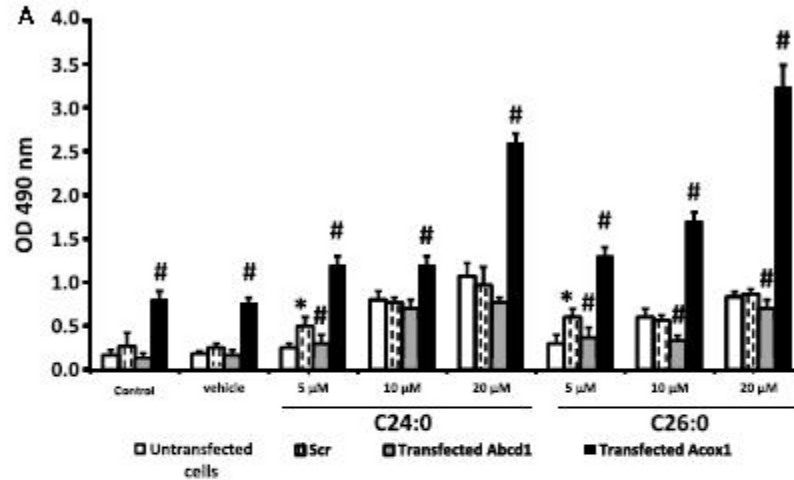
Gouttelettes lipidiques visibles en vidéomicroscopie: granules sombres de fort contraste de diamètre 0,3 à 0,6 μm (flèche) et granules plus petits de faible contraste (tête de flèche)



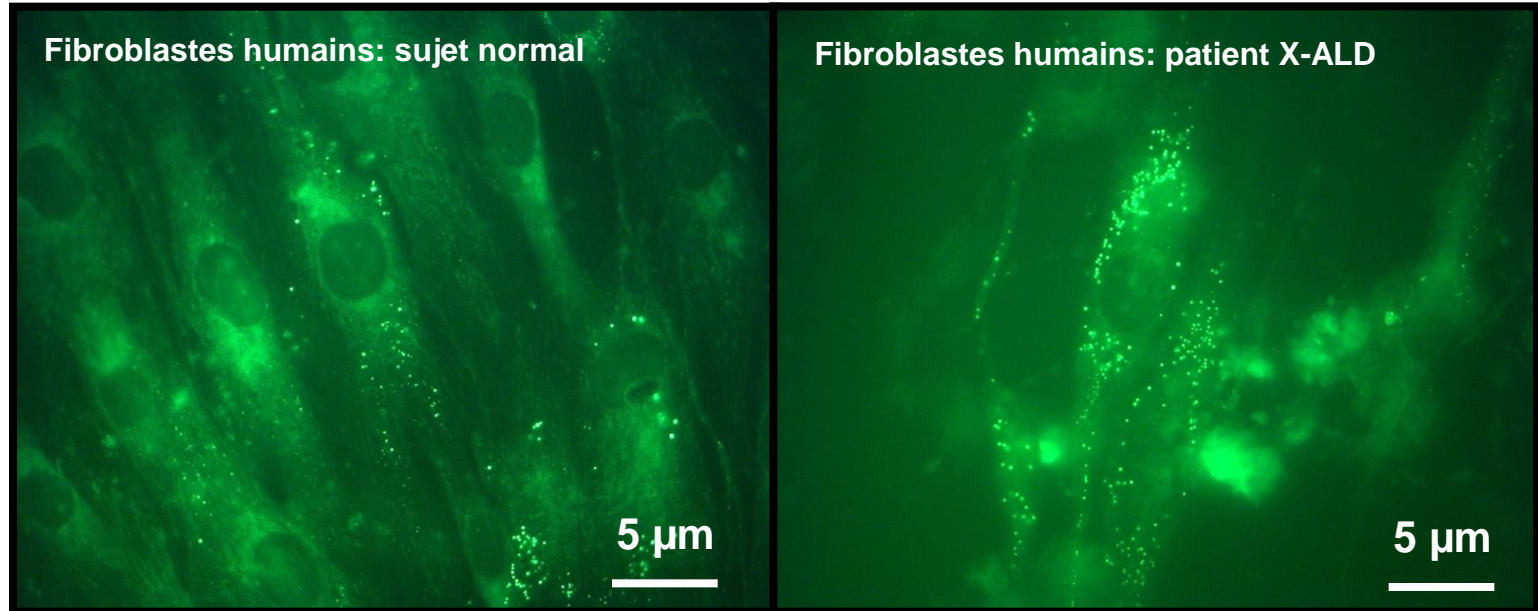
Mouvement des gouttelettes lipidiques : régions du cytoplasme contenant les gouttelettes de fort contraste (flèche) avec un mouvement oscillatoire, et les gouttelettes de faible contraste (tête de flèche) qui se déplacent à travers le cytoplasme

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

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



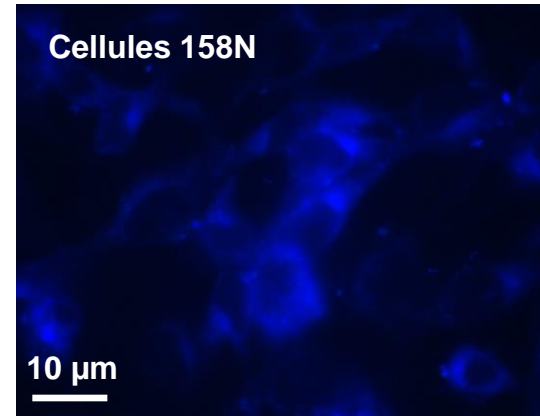
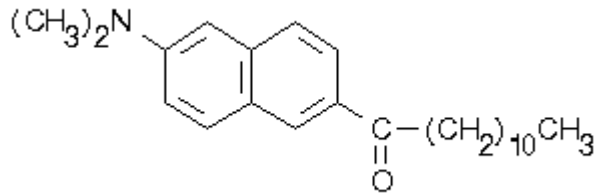
Bodipy : Analyse des Lipides Neutres



Bodipy. 493/503; Réf D3922; Invitrogen

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

Laurdan : Organisation des Bicouches Lipidiques



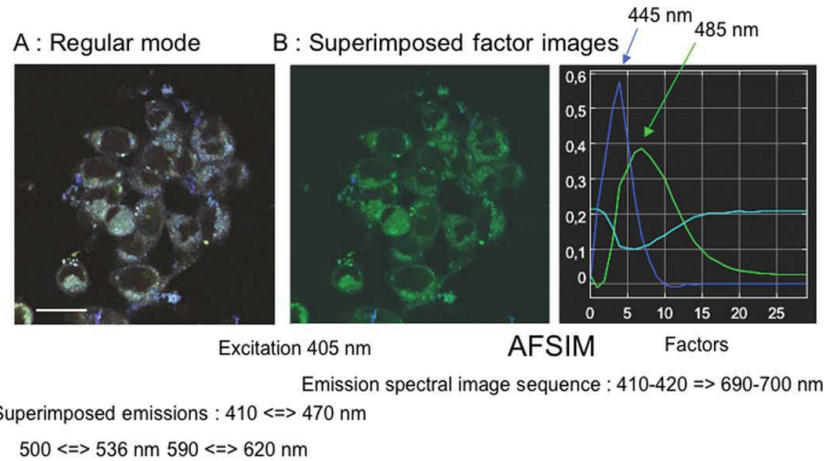
Laurdan

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

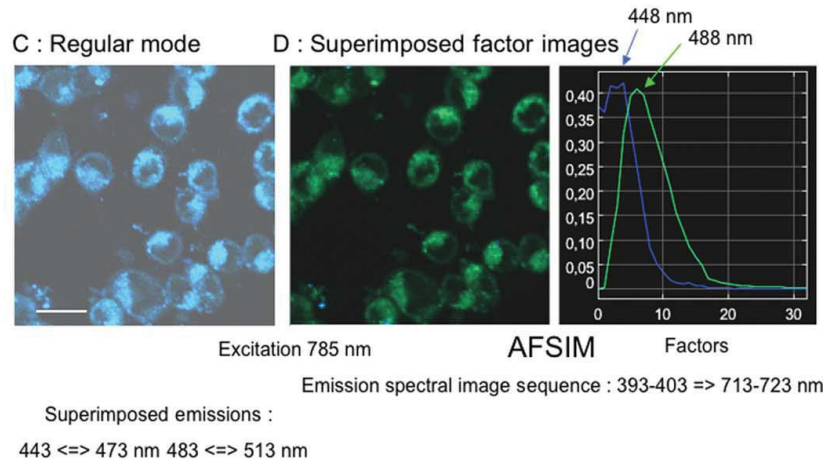
- * Spectre de fluorescence sensible à la polarité et à la phase dans laquelle se trouve la bicouche lipidique
- * Fortement accroché dans le cœur hydrophobe de la bicouche avec sa partie fluorescente localisée au niveau des glycérols et des phospholipides
- * Le laurdan est utilisé pour la détection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



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



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, ...)