

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

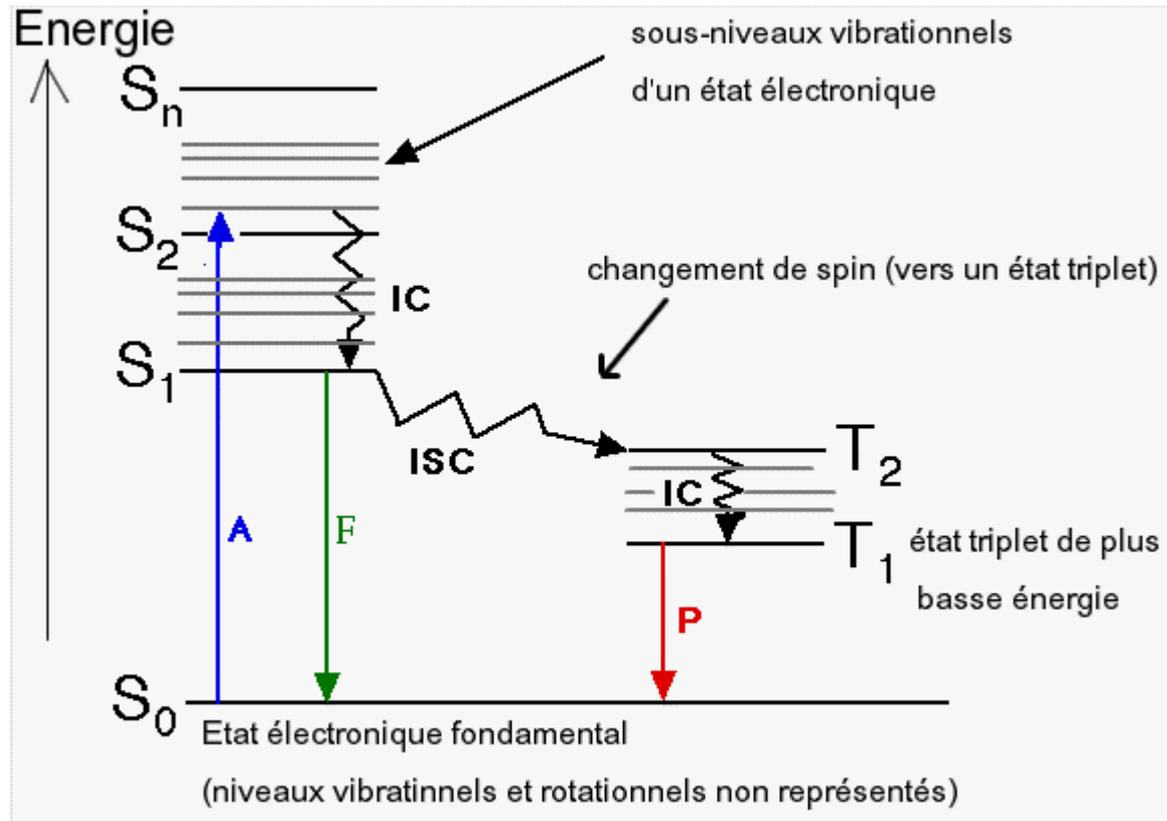
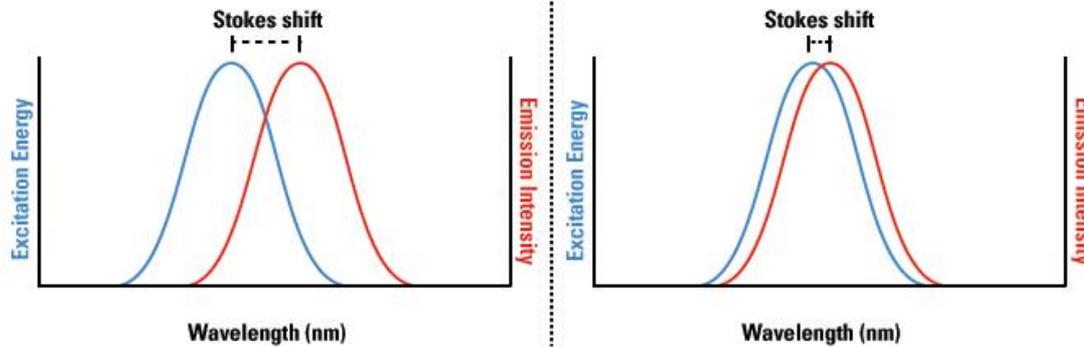
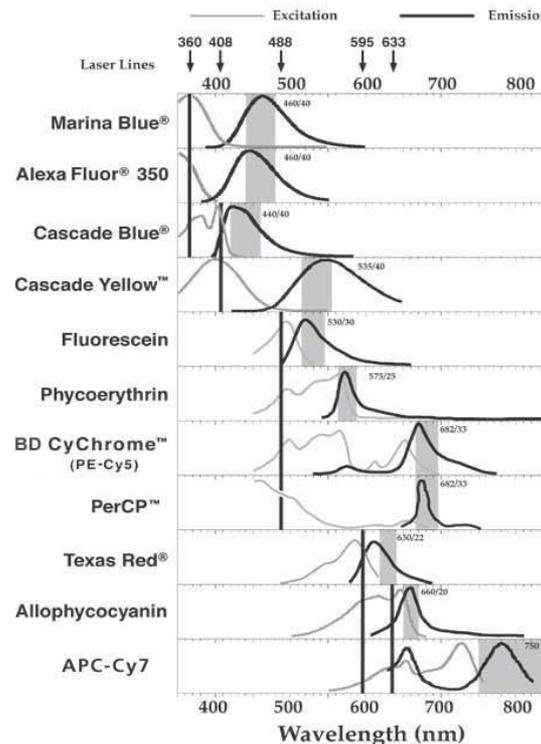


Diagramme dit de Jablonski permettant de définir la **fluorescence** et la **phosphorescence**

Caractéristiques des Fluorochromes



Fluorochrome Dyes Used in Flow Cytometry



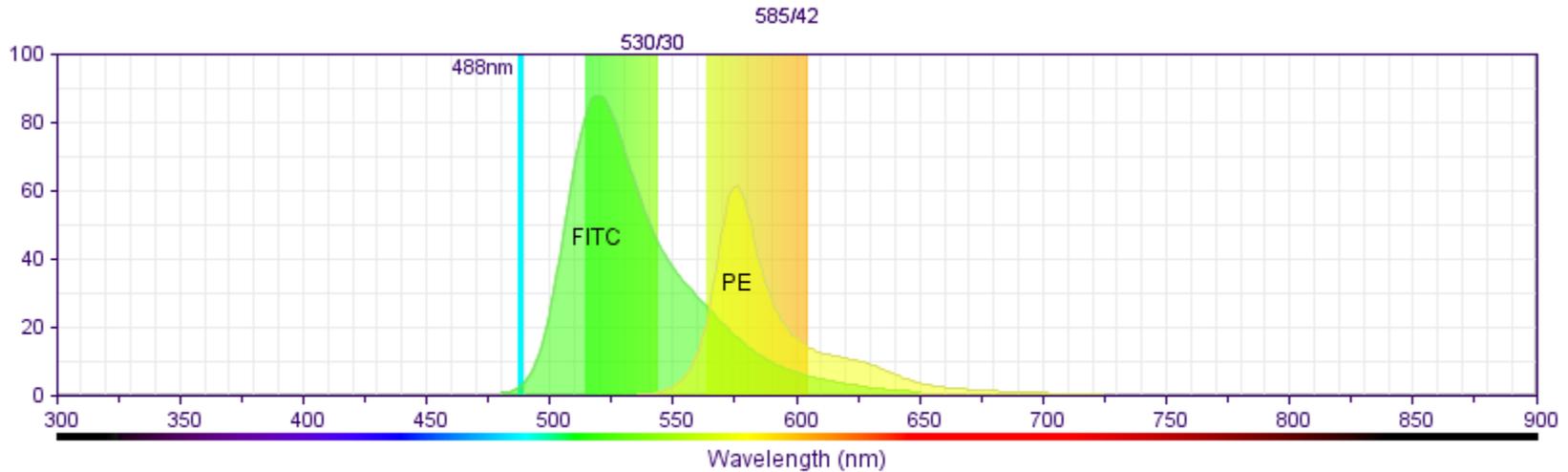
- Un bon fluorochrome doit avoir un 'Stokes shift' ( cart de Stokes) assez élevé

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

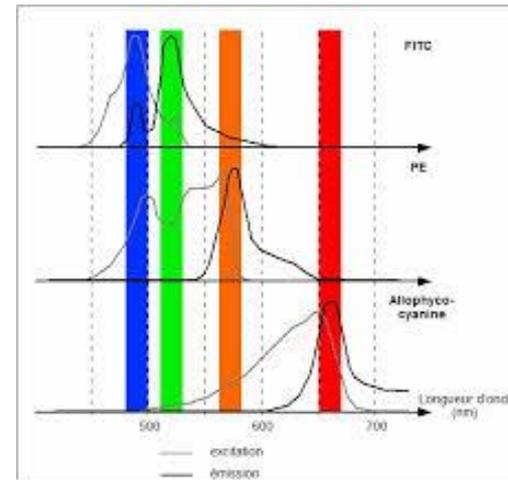
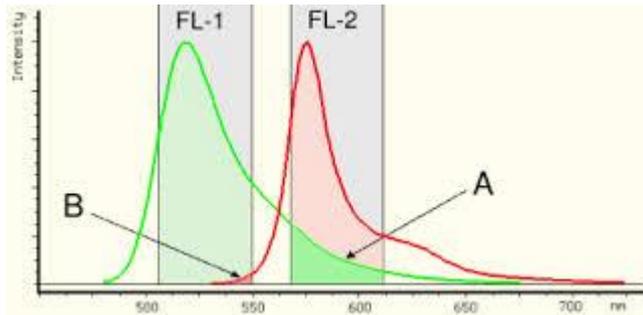


Fluorochrome	%	<input type="checkbox"/> Ex	<input checked="" type="checkbox"/> Em	<input checked="" type="checkbox"/> Filters	FITC	PE
FITC	88	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	530/30	<input checked="" type="checkbox"/>
PE	62	<input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

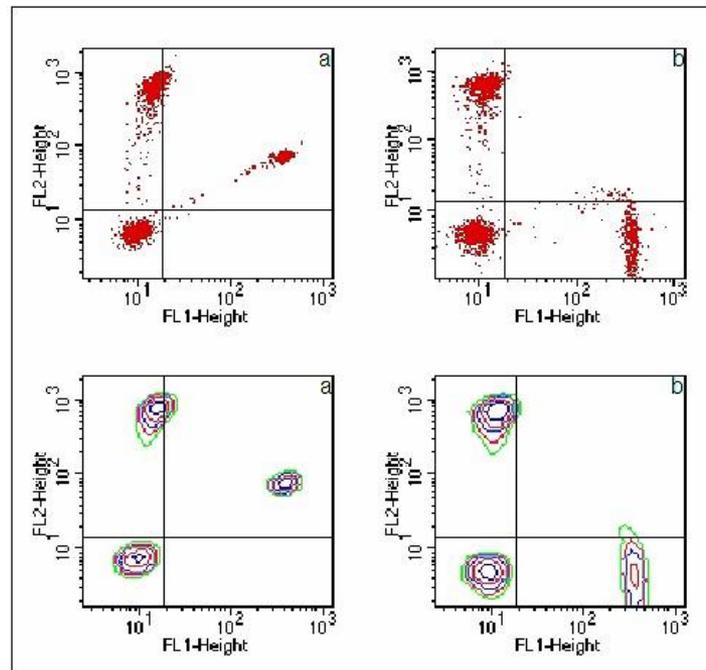
<http://www.lifetechnologies.com/greater-china/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html.html>

http://www.bdbiosciences.com/research/multicolor/spectrum_viewer/index.jsp

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)

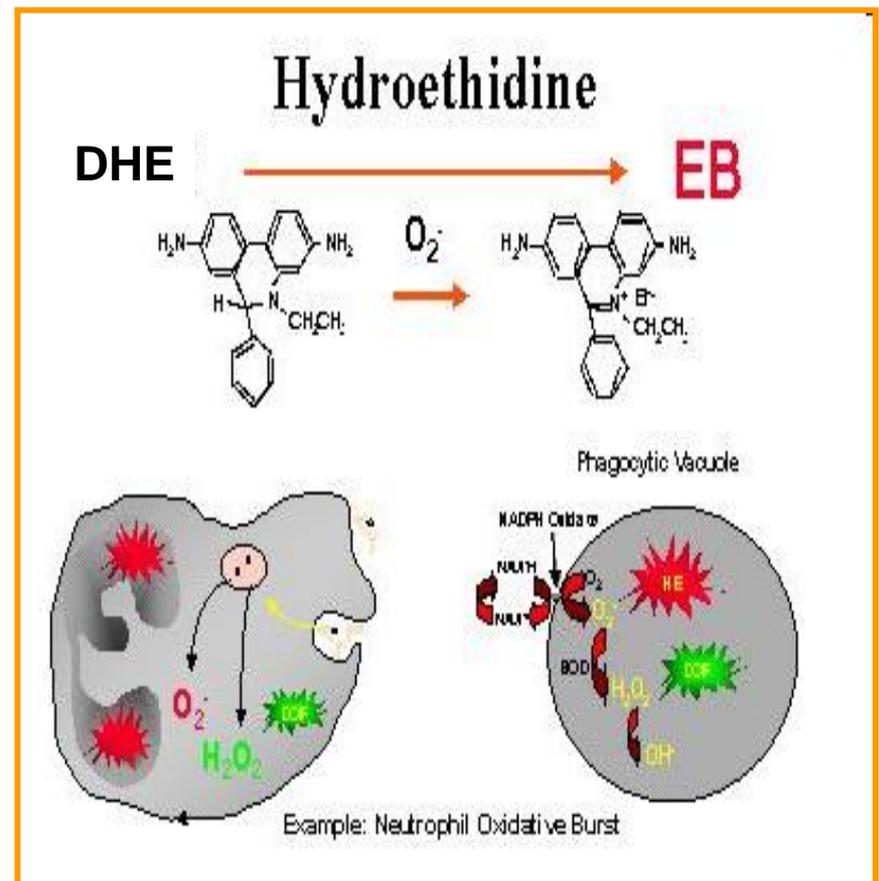
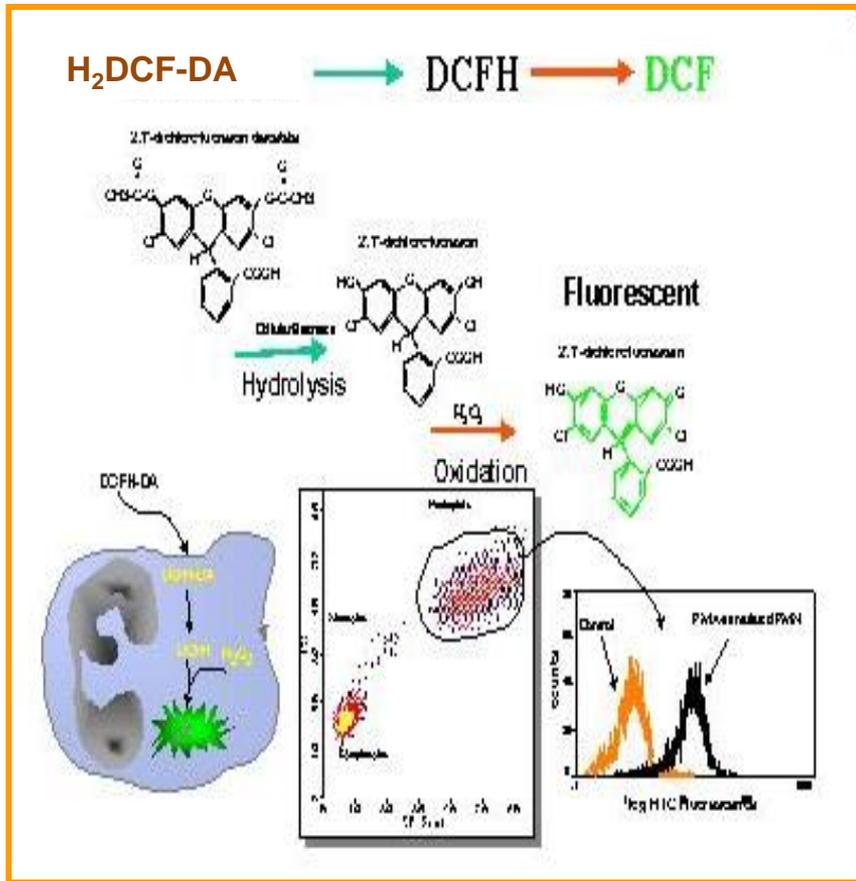
Fluorochromes Libres : Etude de la Physiologie Cellulaire

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 (H₂DCF-DA) et Dihydroethidium (DHE)



Physiologie Cellulaire par Cytométrie en Flux - Présentation des Résultats

Histogrammes de Fluorescence -

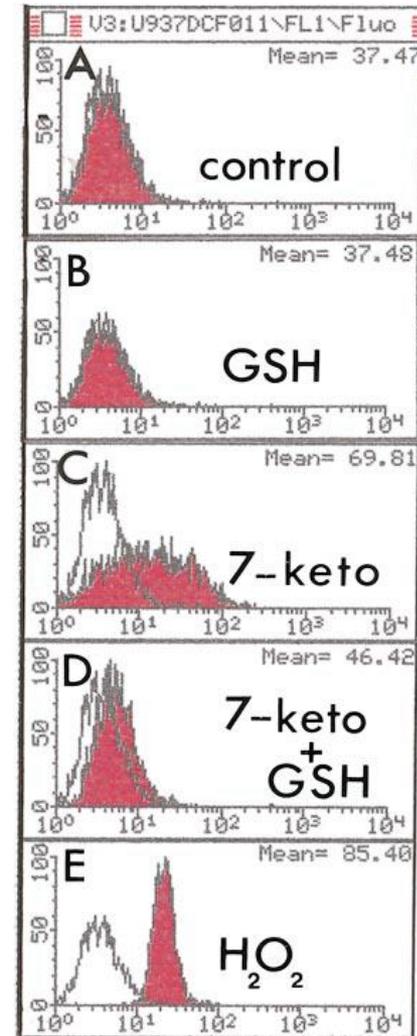
Impairment of ROS production by glutathione during 7-ketocholesterol-induced apoptosis. Analysis of ROS production in untreated U937 cells (control) (A), glutathione-treated cells (10 mmol/l) (GSH) (B), 7-ketocholesterol-treated cells (40 mg/ml) (7-keto) (C), and 7-ketocholesterol (40 mg/ml) plus glutathione (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 H₂DCF-DA, and a **positive control (E) was performed with H₂O₂ used at 1 volume final concentration.**

The DCF fluorescence resulting from the oxidation of H₂DCF-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 H₂DCF-DA; unshaded histograms: spontaneous fluorescence of the cells.

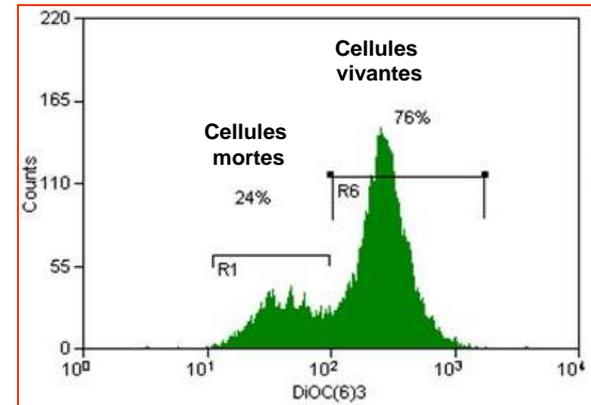
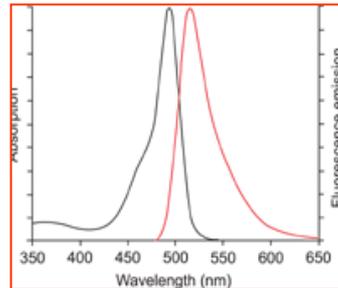
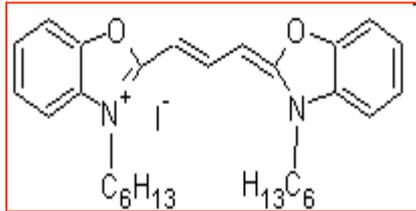
Lizard G et al. FASEB J 1998;12, 1651–1663.



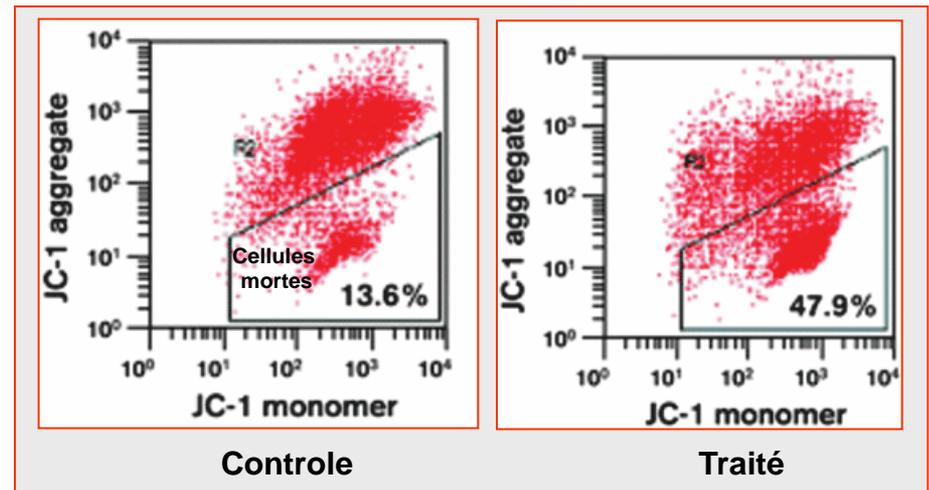
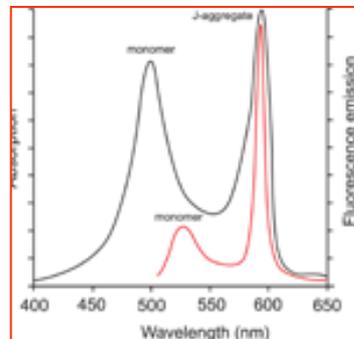
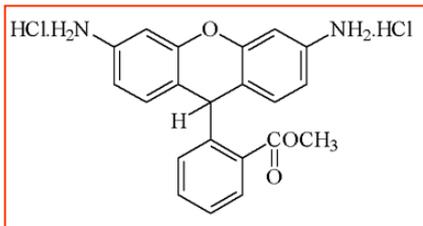
Potentiel Transmembranaire Mitochondrial ($\Delta\Psi_m$)

Coloration avec DiOC₆(3) ou JC1

- **DiOC₆(3)** (40 nM ; permet de détecter les cellules avec des mitochondries dépolarisées ou hyperpolarisées)



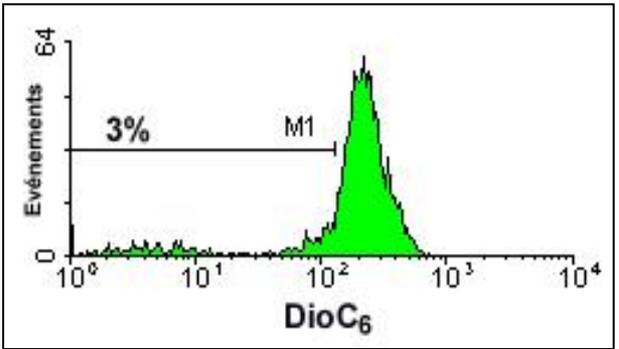
- **JC-1** (1 µg/mL ; permet la distinction des cellules vivantes (colorées en rouge) et mortes (avec des mitochondries dépolarisées et colorées en vert))



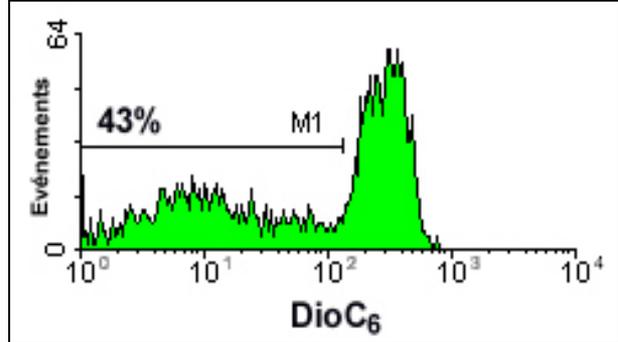
Physiologie Cellulaire par Cytométrie en Flux - Présentation des Résultats Graphiques (% de cellules) – DiOC6(3)

Coloration au DiOC6(3)

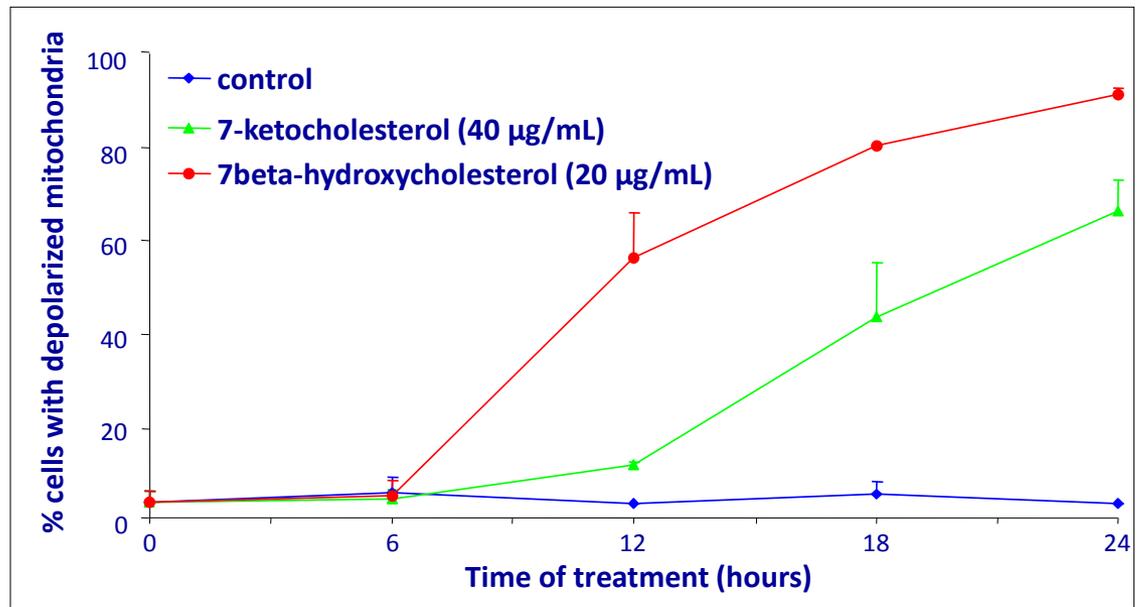
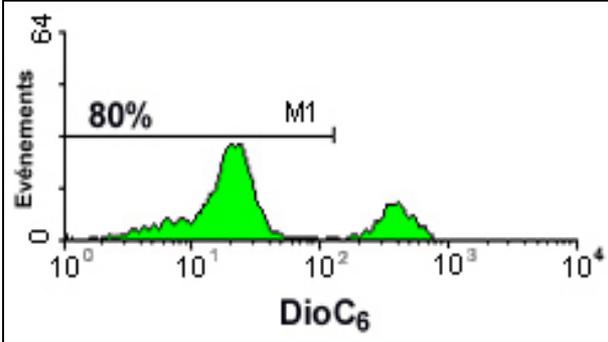
Control



7-ketocholesterol

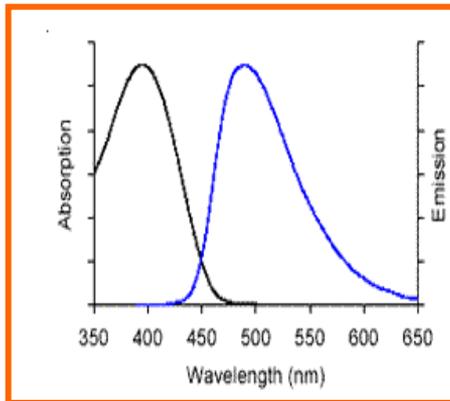
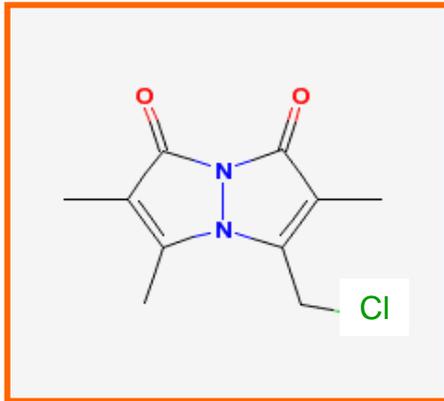


7β-hydroxycholesterol

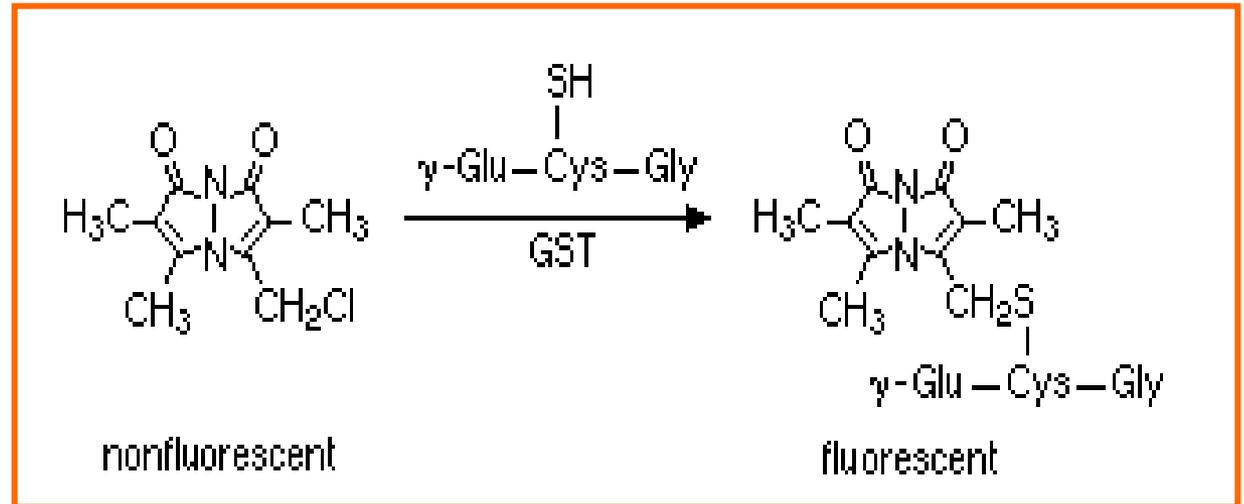


Systeme Non-Enzymatique de Défenses Anti-Radicalaires

Mesure du Taux de Glutathion Réduit (GSH)

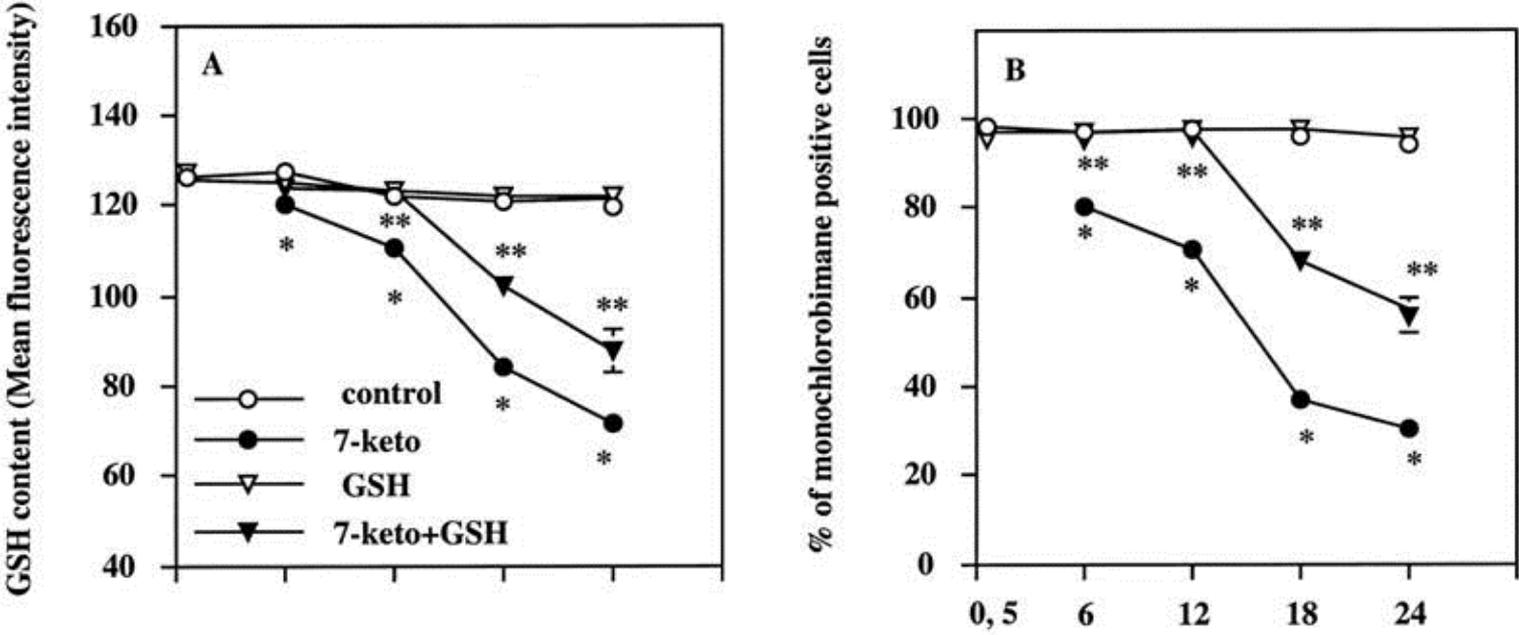


Monochlorobimane



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

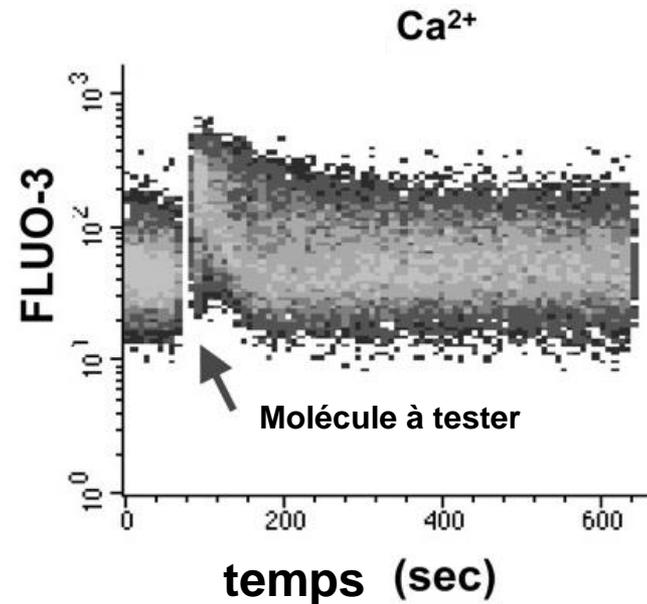
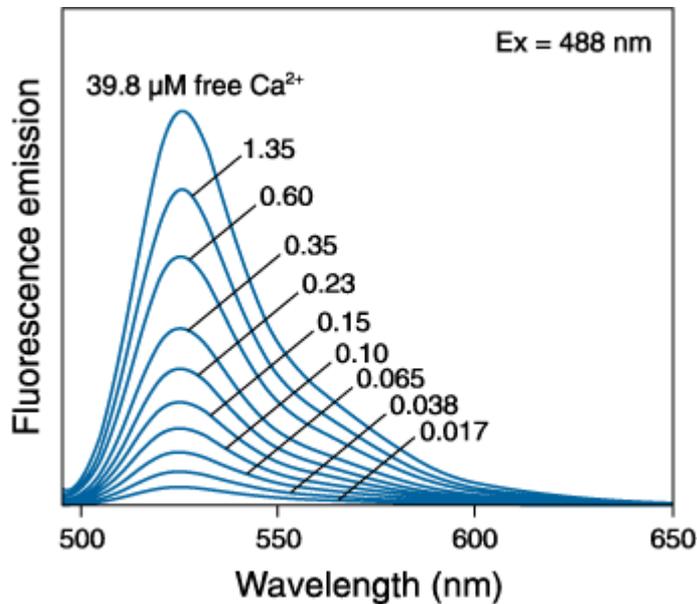
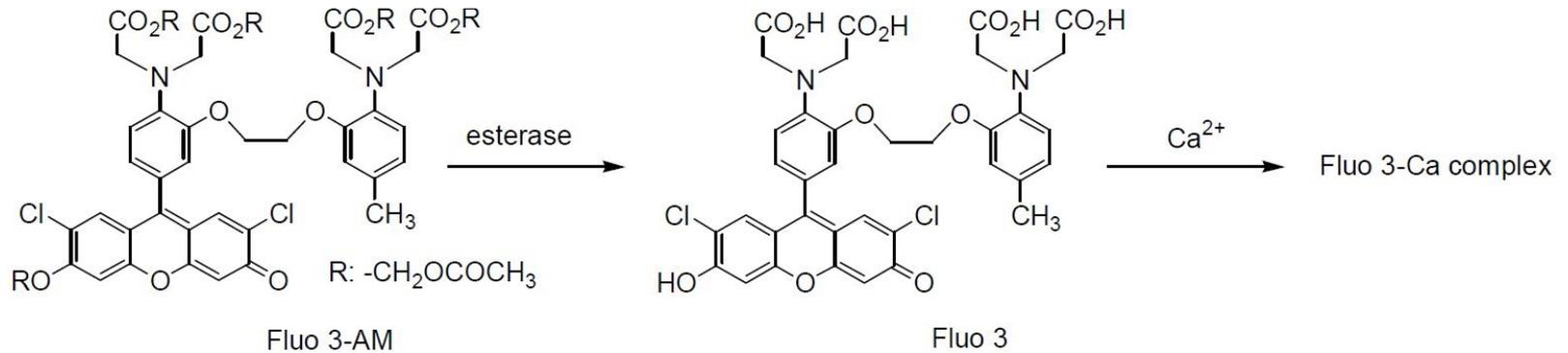
Coloration au monochlorobimane (MCB)



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

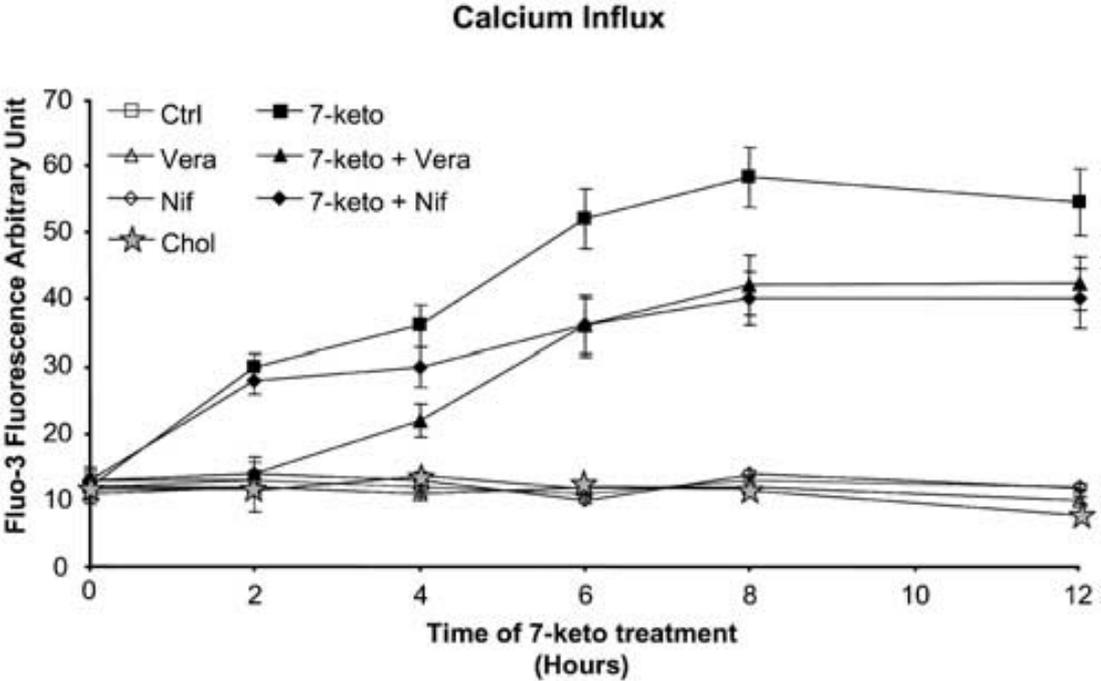
B – Quantification du % de cellules MCB positives (contenant du GSH quantifiable avec le MCB)

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

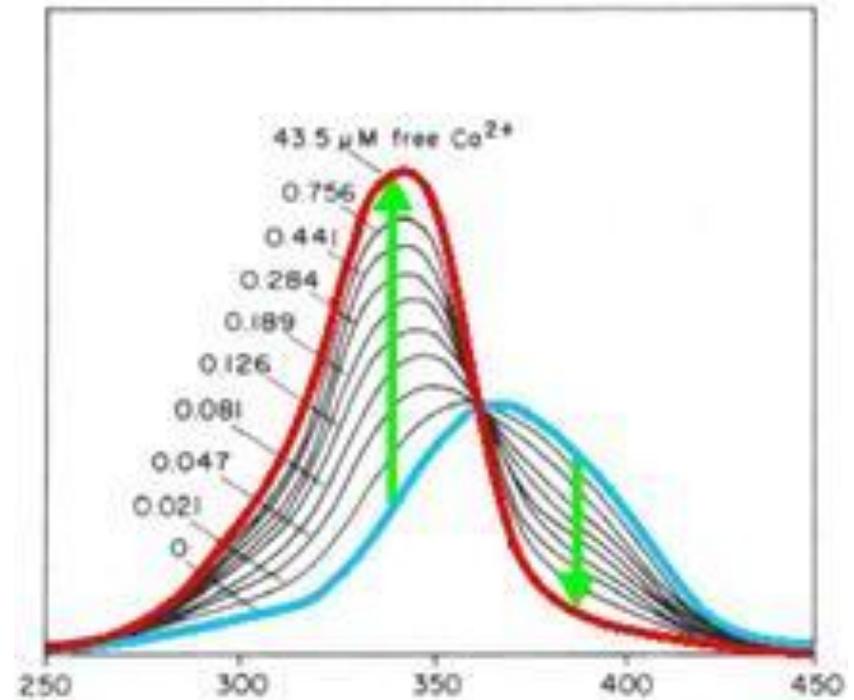
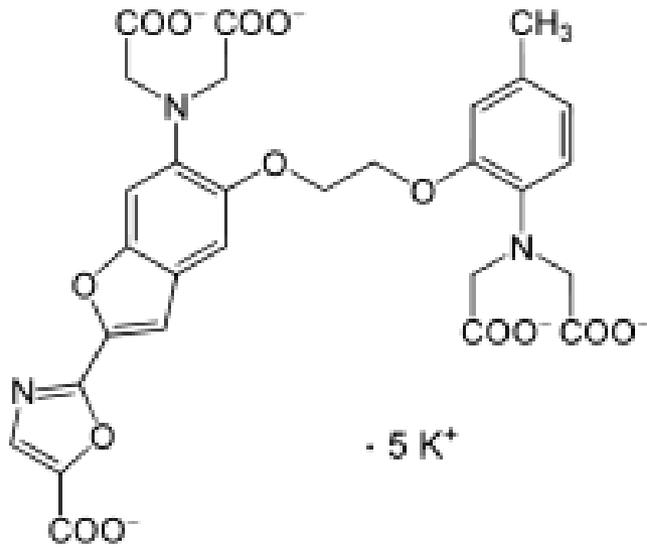


Physiologie Cellulaire par Cytométrie en Flux - Présentation des Résultats Graphiques (IMF) – Flux de Calcium (Fluo-3AM)

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

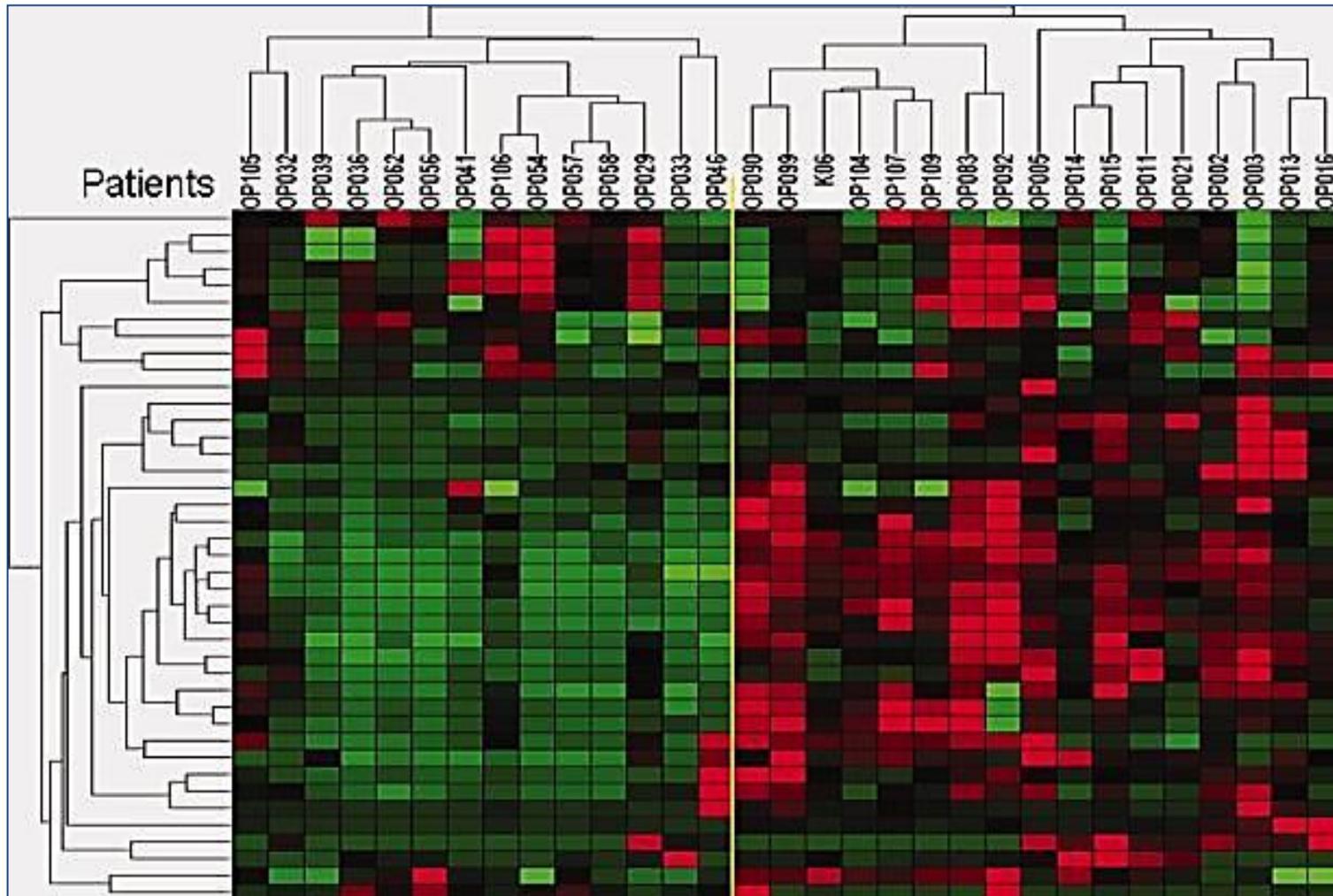
- L'analyse exhaustive visant à définir l'état d'une cellule à un moment donné et dans un contexte donné, en intégrant plusieurs paramètres, porte le nom de **cytomique**.
- La cytomique correspond à l'analyse du **cytome** : ensemble des constituant morphologiques, antigéniques et fonctionnels qui permettent 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	
Approche Analytique Biochimie: (GC/MS)	Métaux lourds	Cd			
		Cr			
		Pb			
	Profils lipidiques	Acides Gras			
Phospholipides					
Oxystérols					
Phytostérols					
In Vivo (Rats)	Glycémie et fonction rénale	Glycémie			
		Urée			
		Acides urique			
		Créatinine			
	Fonction hépatique	Transaminases			
		Phosphatase			
	Bilan lipidique	Triglycérides			
		CT			
		C-HDL			
		C-LDL			
		CT/C- HDL			
	In vitro (cellules MIN6)	Prolifération et mort cellulaire	Prolifération		
LDH					
Mort cellulaire (IP)					
Cycle cellulaire					
Organites cellulaires		$\Delta\Psi_m$			
		Lysosomes			
		Peroxisomes			
Equilibre RedOx		GSH			
		$O_2^{\bullet-}$			
		H_2O_2			
	NO				
	Peroxydation lipidique				
	Insuline				

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