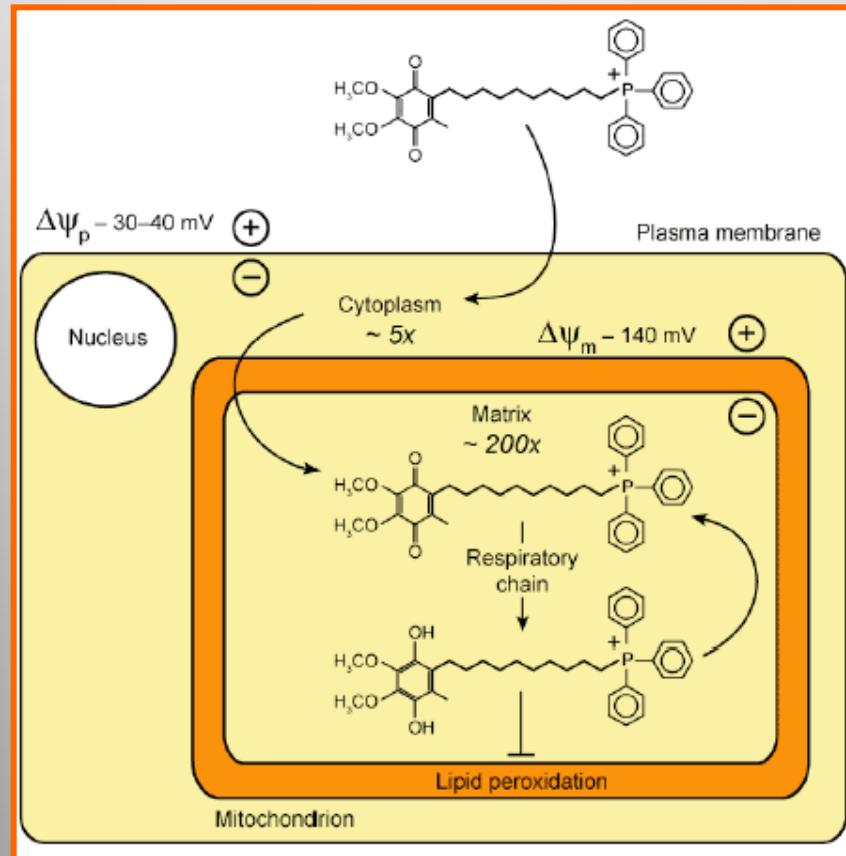
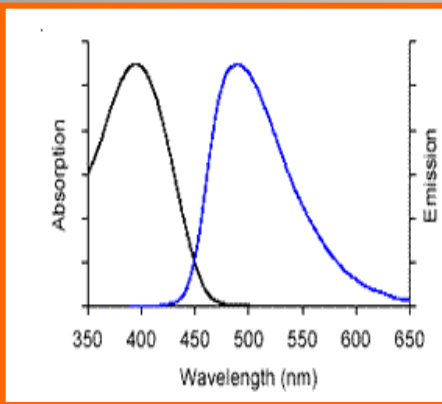
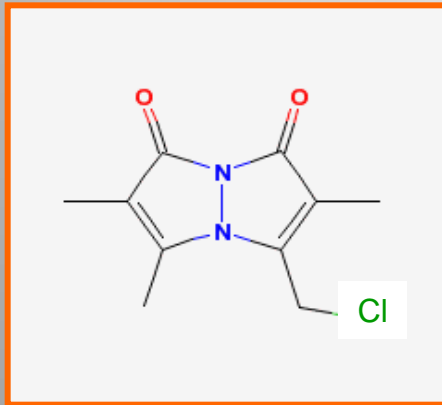


Mesure de la Production d'Anions Superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) Mitochondriaux avec le Mitosox

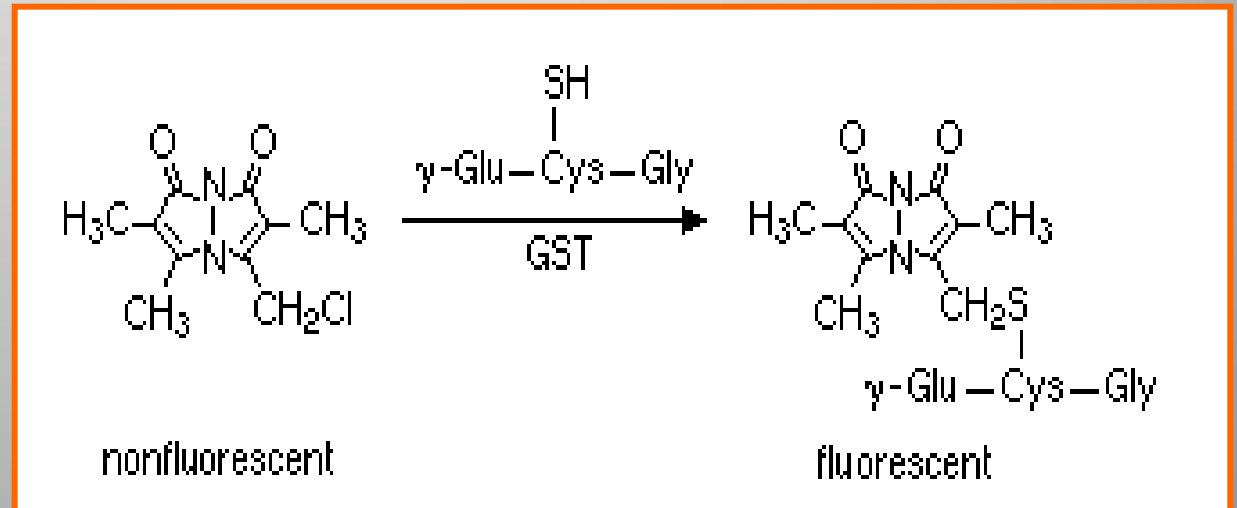


Système Non-Enzymatique de Défenses Anti-Radicalaires

Mesure du Taux de Glutathion Réduit (GSH)



Monochlorobimane



Systeme Enzymatique de Defenses Anti-Radicalaires

Mesure des Taux de SOD et Catalase

- Utilisation d'Anticorps

- * Anti-SOD

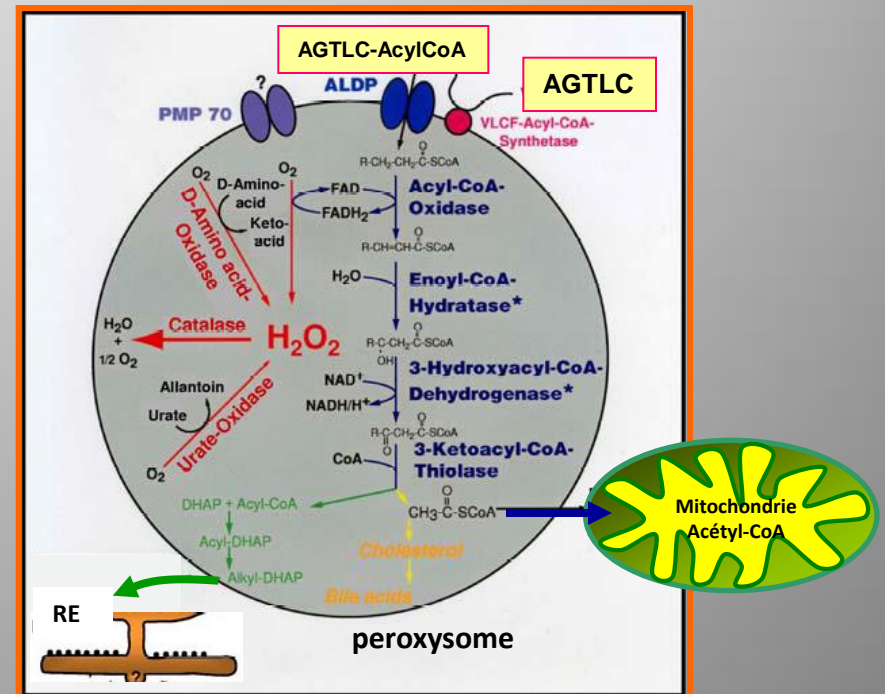
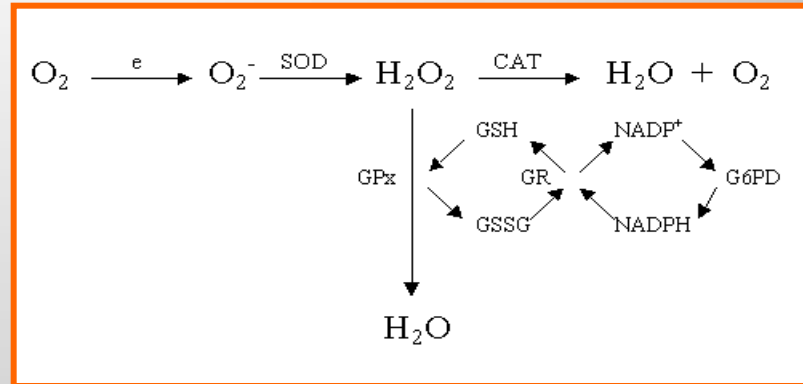
CuZn-SOD (SOD1) cytoplasme
Mn-SOD (SOD2) mitochondries

CuZn-SOD (SOD3) membrane cytoplasmique

- * Anti-catalase (CAT)

- Utilisation de Fluorochromes

- * Activite catalase



Origine des Radicaux Oxygénés, Voies Métaboliques Associées : Développements Pharmacologiques

- Confirmation de l'intervention d'un stress oxydatif

* Utilisation d'antioxydants tels que VitE, GSH, N-acétylcystéine (NAC), Trolox...

- Origine des radicaux oxygénés

• Xanthine Oxydase, NAD(P)H oxydase (utilisation de diphénylène iodonium (DPI), Apocynine), NO synthase (utilisation de nitro-L-arginine méthyl ester (L-NAME), aminoguanidine, NG-nitro-L-Arginine (NLA),)

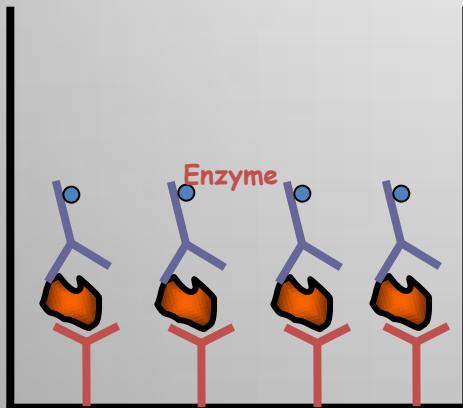
- Voies métaboliques impliquées

* Utilisation d'inhibiteurs de voies métaboliques

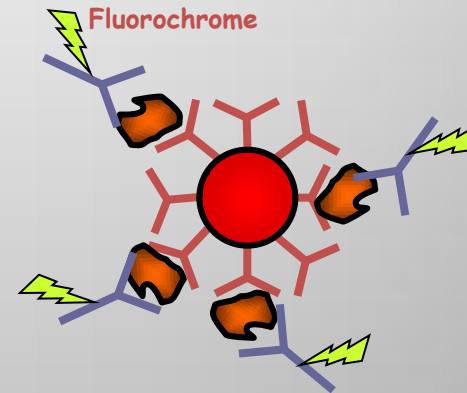
Etude de l'Inflammation par Cytométrie en Flux

✓ Techniques d'analyses

- Cytokines intracellulaires : Ac et immunofluorescence sur cellules
- Cytokines secrétées: analyses moléculaires sur microbilles

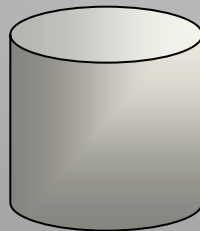


ELISA



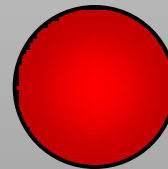
SAT

(suspension array technology)



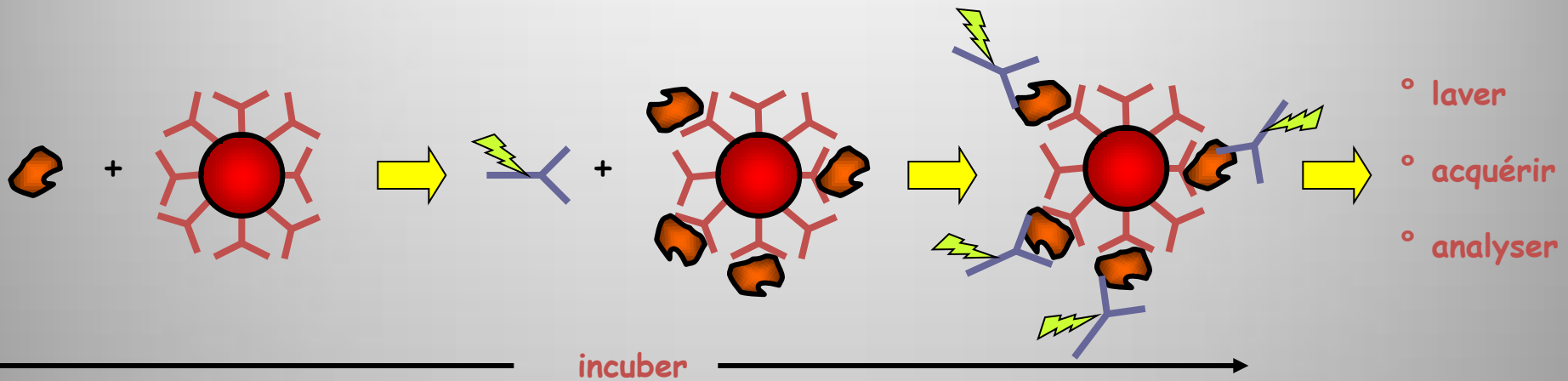
micropuits

=

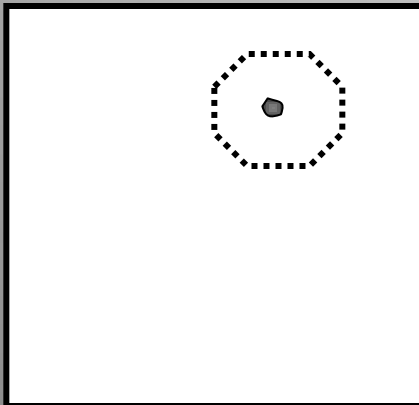


microbille

Cytometric Bead Array (CBA)



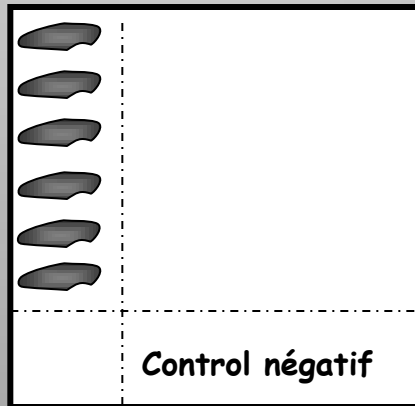
FSC



SSC

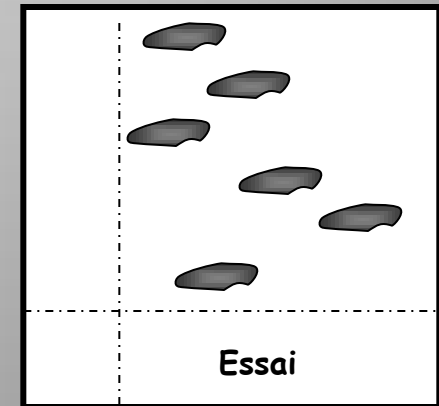
FL3

IL-8 ●
IL-1β ●
IL-6 ●
IL-10 ●
TNF-α ●
IL-12 ●



FL2

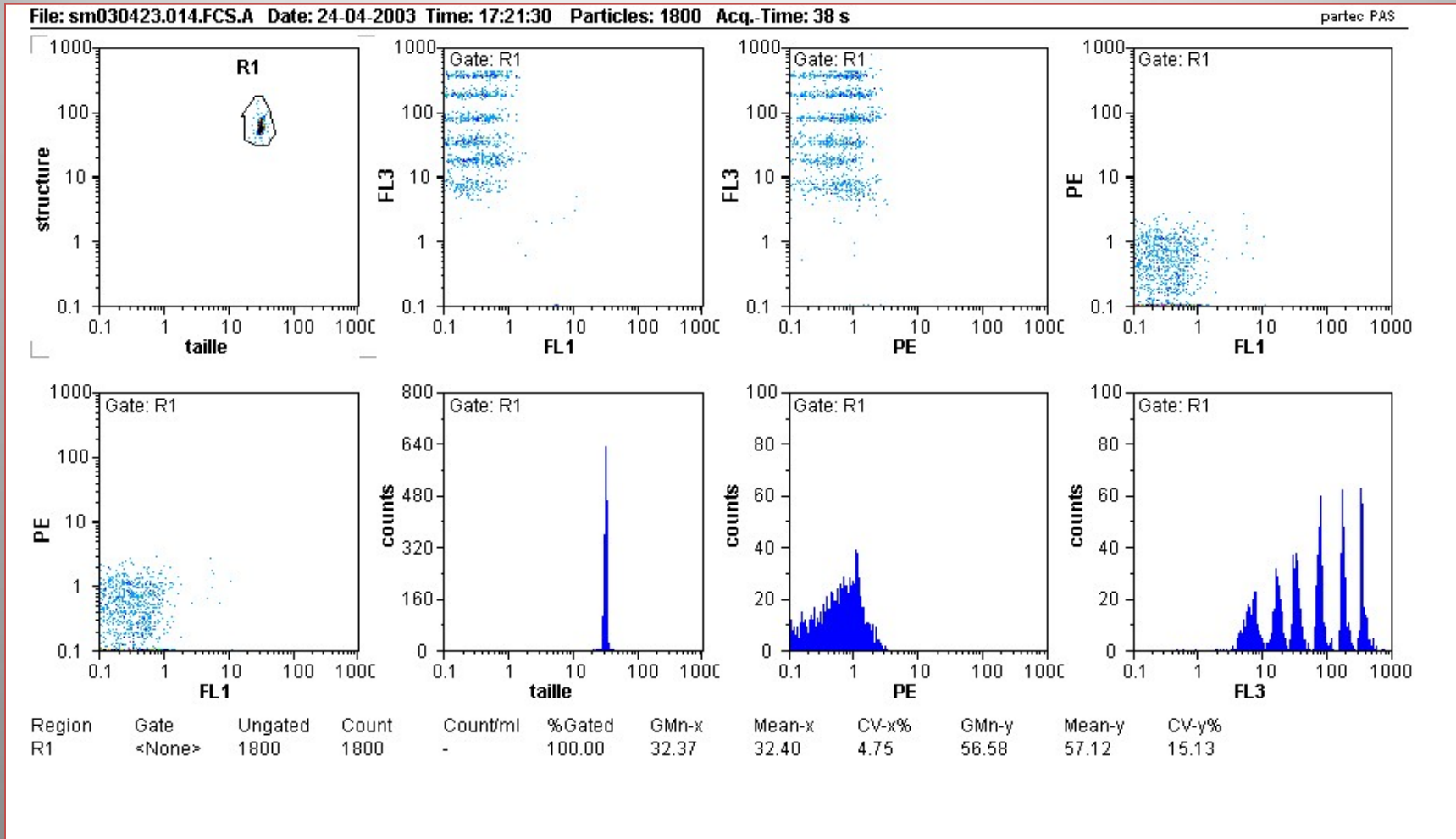
FL3



FL2

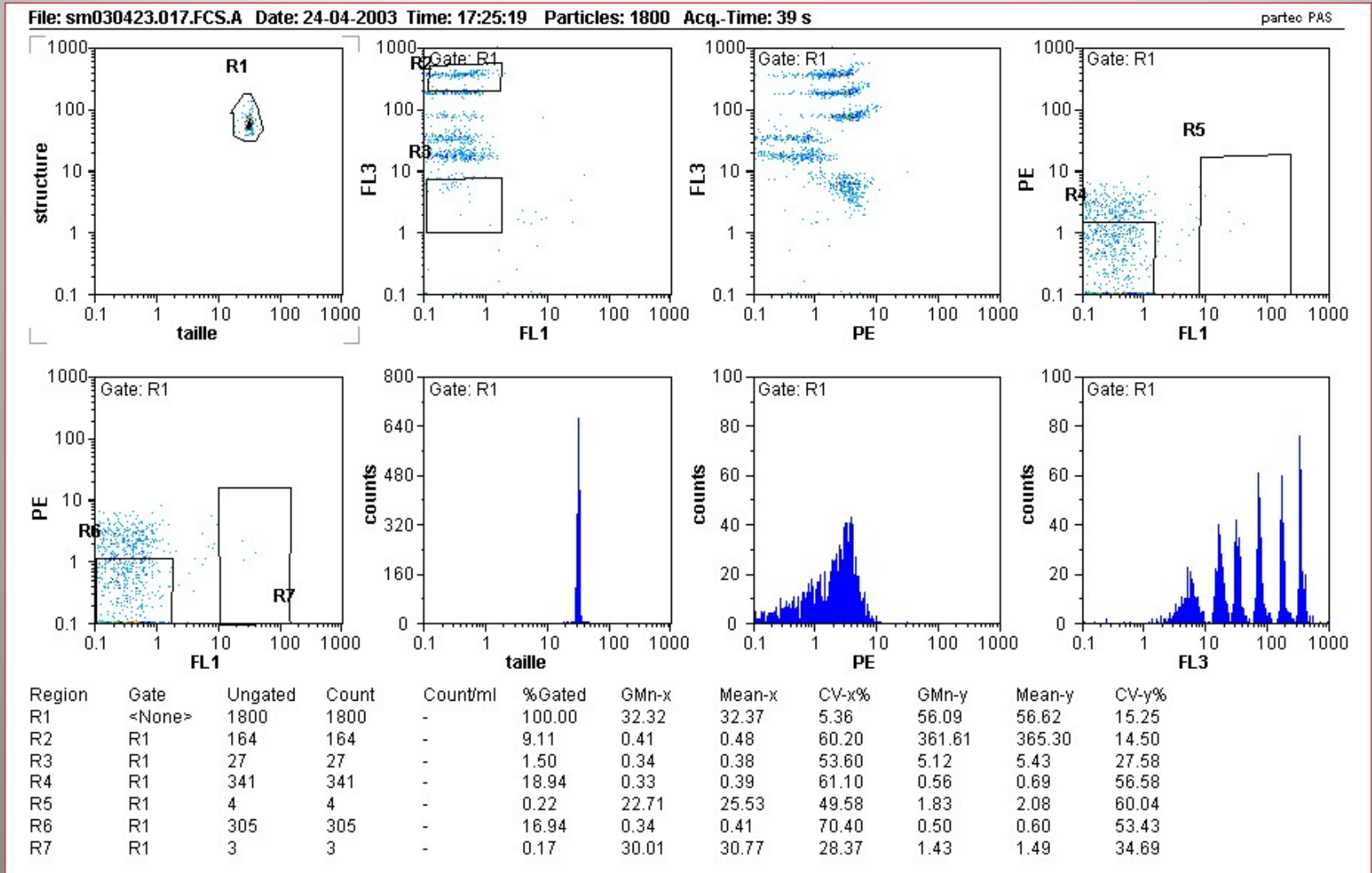
Analyse d'Interleukines chez des Prématurés: Diagnostic d'Infections Materno-Fœtales Précoces

Profil cytokinique normal (5-10 µl de sérum)



Analyse d'Interleukines chez des Prématurés: Diagnostic d'Infections Materno-Fœtales Précoces

Profil cytokinique anormal (5-10 µl de sérum)



Etude des Organelles (Mitochondries, Lysosomes, Peroxysomes) par Cytométrie en Flux

✓ Mitochondries

* activité mitochondriale

- potentiel transmembranaire mitochondriale ($\Delta\Psi_m$):
fluorochromes cationiques et lipophiles
Rh123, DiOC6(3), JC1, TMRM

- * **masse mitochondriale** (quantité et taille des mitochondries)
MitoTrackers, Nonyl Acridine Orange (NAO)

✓ Lysosomes

* activité lysosomale

- pompes à protons, acidité du compartiment lysosomal:
Acridine Orange (AO) (rouge (lysosomes intègres); vert (lysosomes altérés))

- * **masse lysosomale** (nombre de lysosomes): LysoTrackers

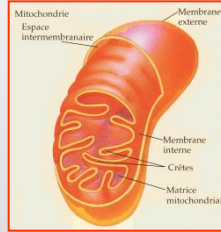
✓ Peroxysomes

- * **activité peroxysomale** (non réalisable par CMF)

- * **masse peroxysomale** (nombre de lysosomes) :
immunofluorescence (Ac anti-ABCD3; Ac anti-catalase)

Quantification et Caractérisation de la Mort Cellulaire par Cytométrie en Flux

Cellule vivante



Cellule morte



**Point de
non retour
Diminution de $\Delta\Psi_m$**

**Apoptose
Autophagie
Nécrose ; Nécroptose**

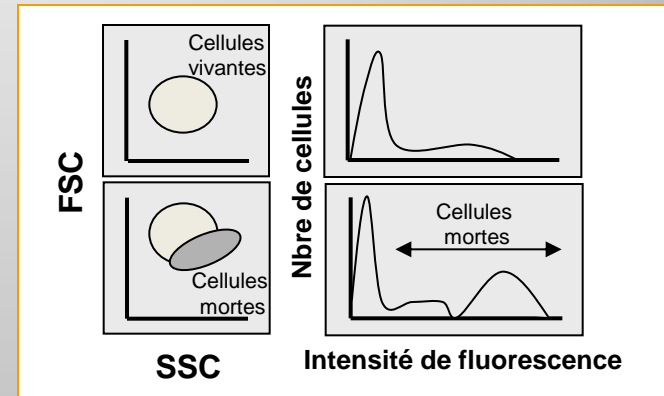
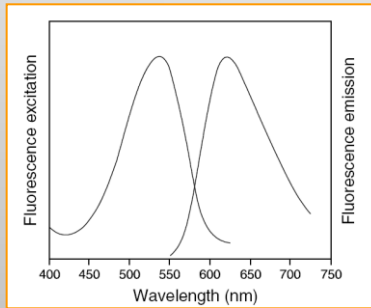
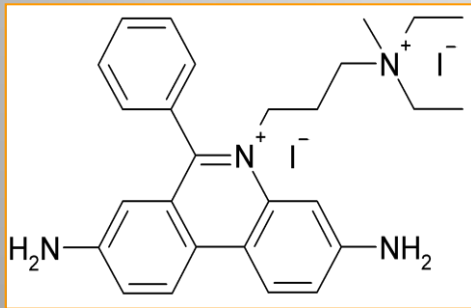
- Evènements toujours associés à la mort cellulaire : externalisation de phosphatidylsérine ; chute de potentiel mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) ; augmentation de perméabilité de la membrane cytoplasmique ; dégradation de l'ADN.

- Evènements éventuellement associés à la mort cellulaire : flux ioniques ; déstabilisation de la membrane lysosomale ; acidification du cytoplasme ; activation d'enzymes (sérines protéases; caspases) ; surproduction de radicaux oxygénés ; diminution des défenses anti-radicalaires; induction de la sécrétion de cytokines....

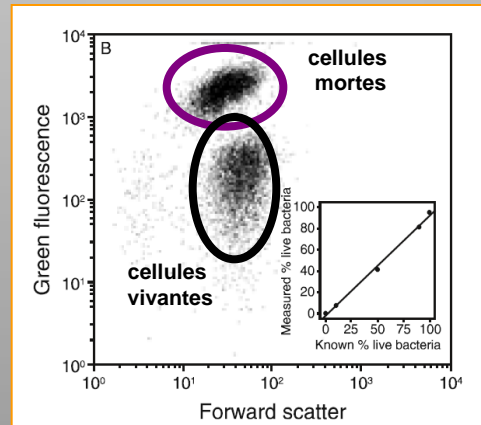
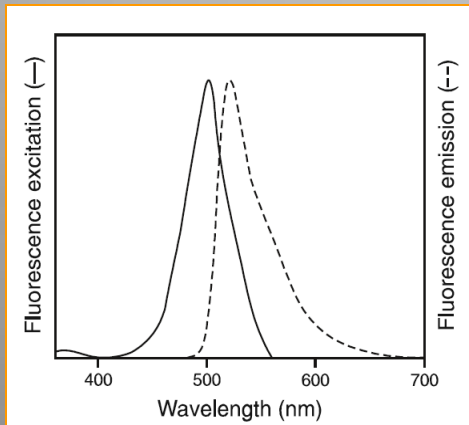
Evaluation de la Viabilité Cellulaire : Coloration à l'Iodure de Propidium ou au SYTOX Green

Intégrité de la membrane cytoplasmique

- **Iodure de propidium** (1-10 $\mu\text{g/mL}$; colore les cellules mortes en rouge)



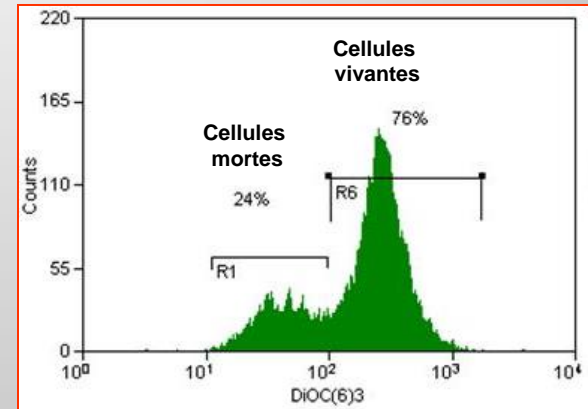
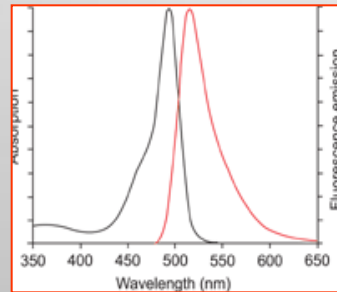
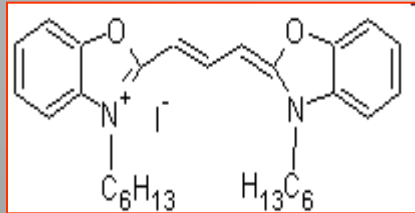
- **SYTOX Green** (0,5 μM ; colore les cellules mortes en vert)



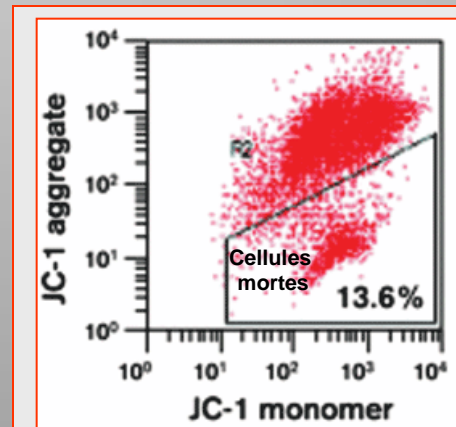
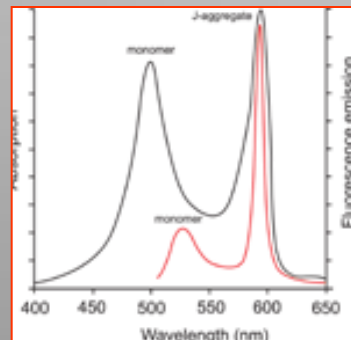
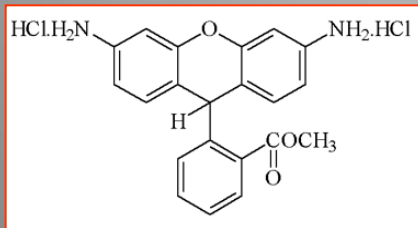
Potentiel Transmembranaire Mitochondrial ($\Delta\Psi_m$)

Coloration avec DiOC₆(3), JC1 ou TMRM

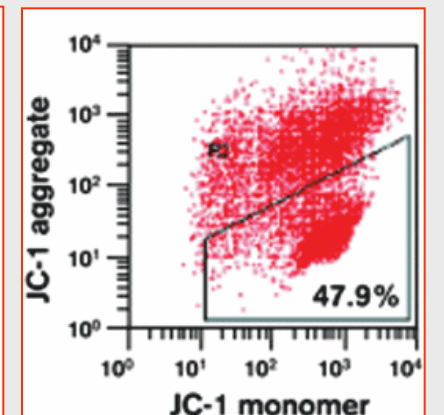
- **DiOC₆(3)** (40 nM ; permet de détecter les cellules avec des mitochondries dépolarisées ou hyperpolarisées)



- **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))

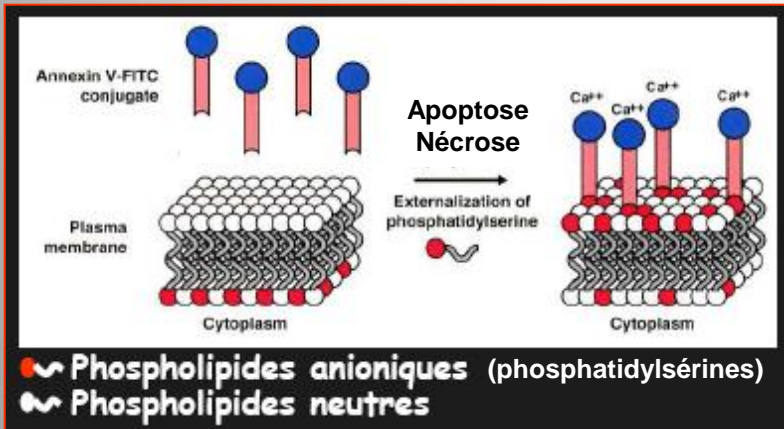


Controle

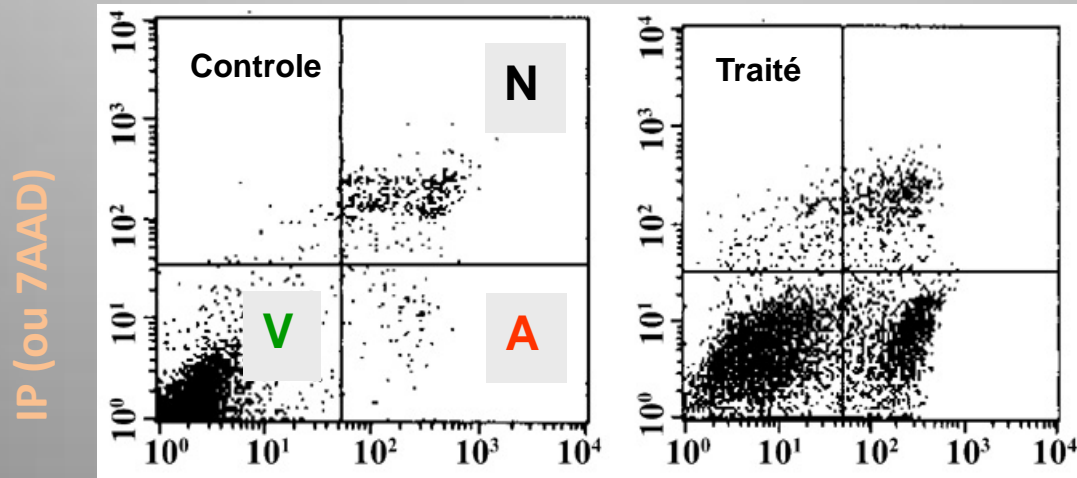


Traité

Mesure de l'Externalisation des Phosphatidylsérines



Cellules	Annexine V	IP
Vivantes (V)	-	-
Apoptotiques (A)	+	-
Nécrotiques (N)	+	+

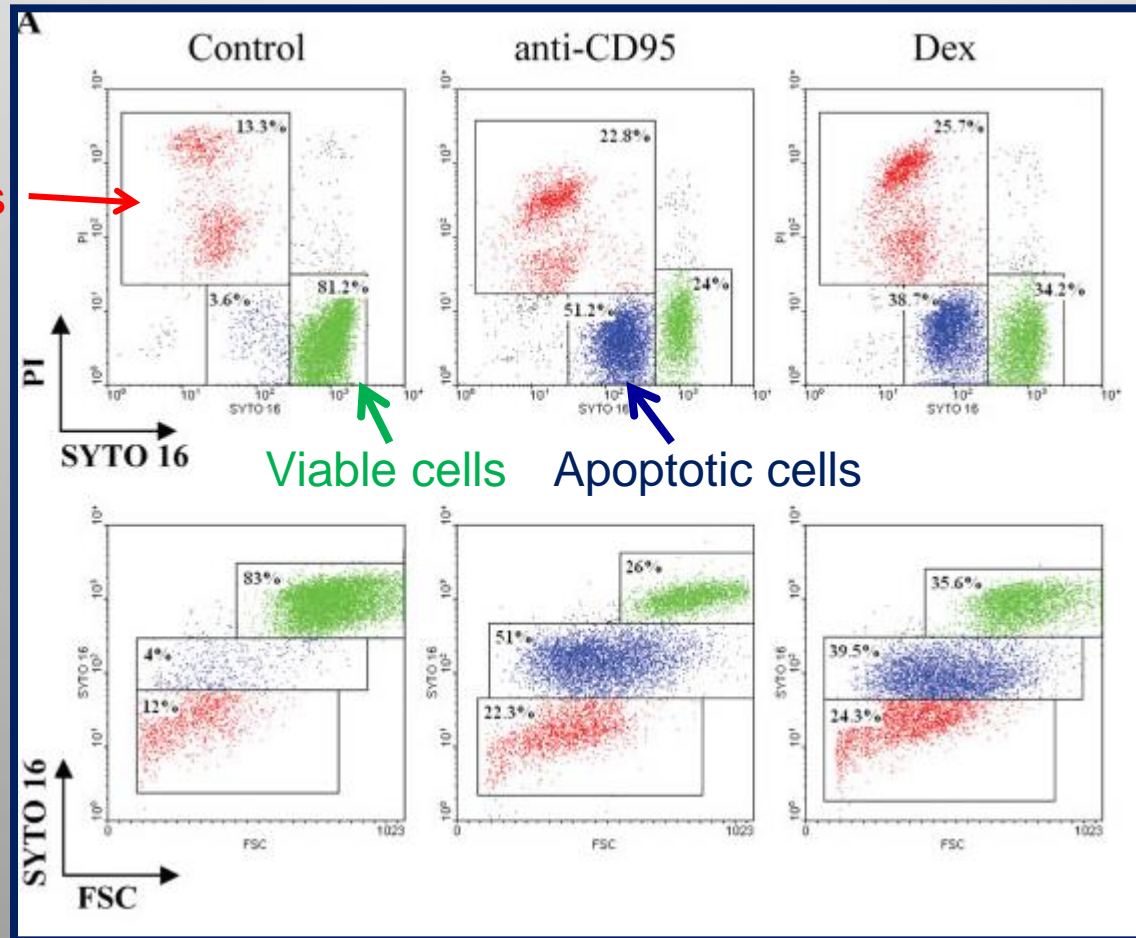


IP: iodure de propidium
7 AAD: 7 amino actinomycine D

Annexine V - FITC

Coloration Iodure de Propidium – SYTO16

Necrotic cells



Towards an Understanding of Apoptosis Detection by SYTO Dyes

Donald Wlodkovic, Joanna Skommer and Jukka Pelkonen *Cytometry Part A* 71A:61–72 (2007)

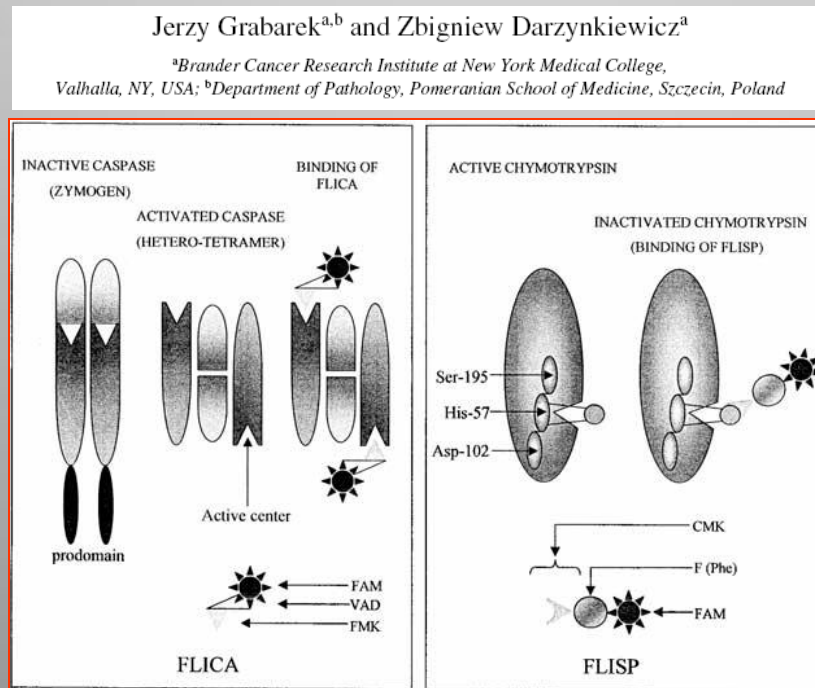
Mesure d'Activités Enzymatiques

° Mesures d'activités estérases membranaires

- Présentes dans les cellules vivantes / absentes dans les cellules mortes

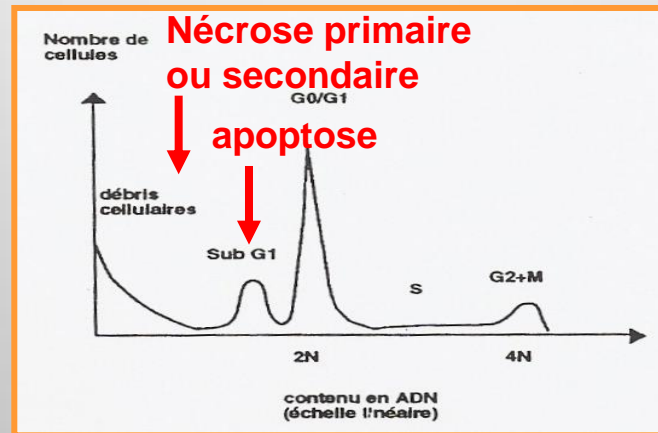
Fluorochromes disponibles: Di-acétate de carboxyfluoresceine (CFDA),
Calcéine-AM, BCECF-AM

° Mesure d'activités caspases (FLICA: Fluorescent Inhibitors of Caspases) et sérine protéases (FLISP: Fluorescent Inhibitors of Serine Proteases)



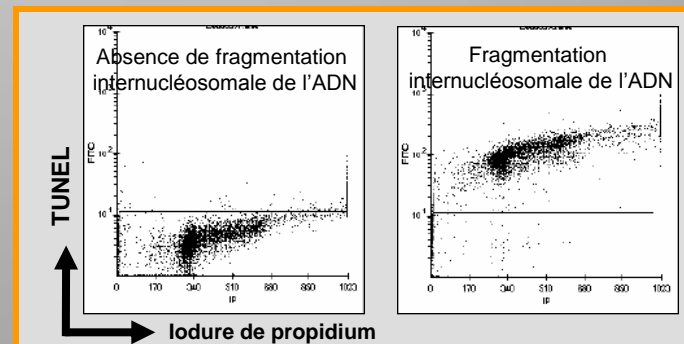
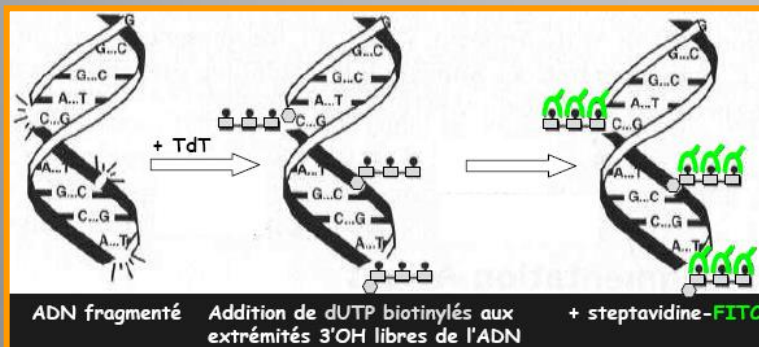
Fragmentation Inter-Nucléosomale de l'ADN : Sub-G1 et TUNEL

✓ Coloration de l'ADN à l'iodure de propidium

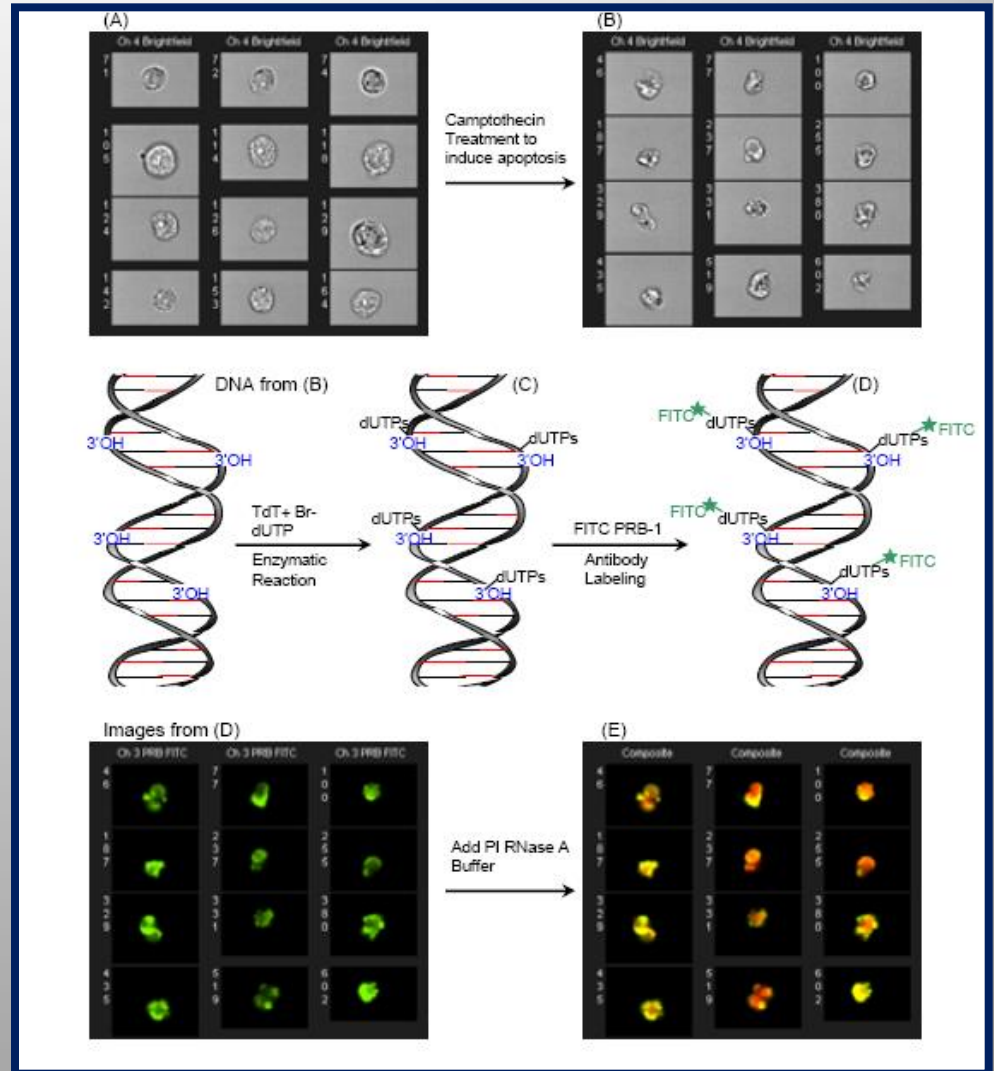
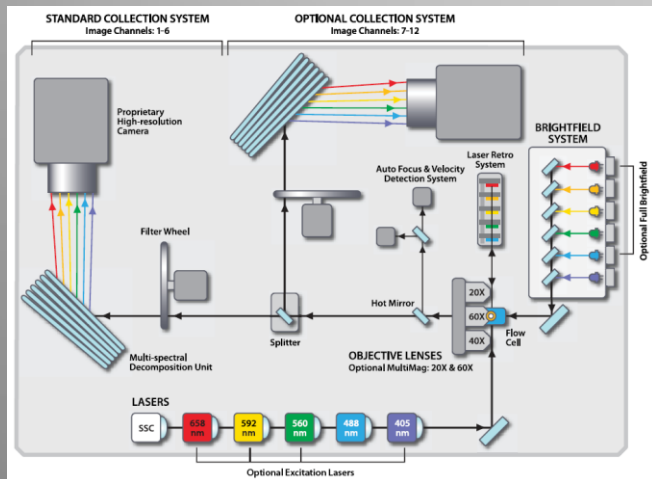
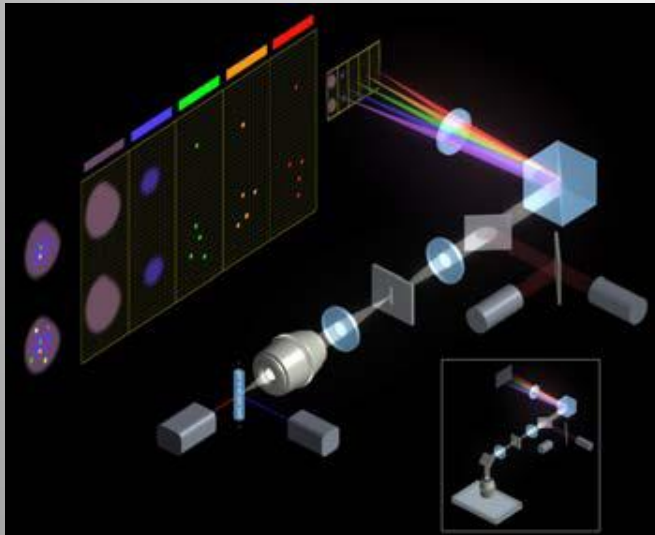


✓ Technique TUNEL

(terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin nick end labelling)



TUNEL (Amnis technology) : CMF + imagerie



<http://www.amnis.com>

Henery S et al. Apoptosis 2008, 13: 1054-1063

Gérard Lizard, Inserm, Université de Bourgogne
Dijon, France

Conclusions

- Toxicologie (nanotoxicologie) et CMF

✓ Méthodes applicables in vitro et in vivo

- Domaines d'application

✓ Biologie humaine, animale et végétale

✓ Pharmacologie

✓ Nutrition / Alimentation (contrôles alimentaires)

✓ Environnement (biosurveillance)

✓ Cosmétologie