

Cytométrie en flux appliquée à l'étude de :

- La prolifération et du contenu en ADN
- La viabilité cellulaire
- Des organites cellulaires
- Du stress oxydant et de l'inflammation (analyse multiplexe)



Dr Gérard LIZARD

Faculté des Sciences Gabriel

EA7270 (Biochimie du Peroxysome, Inflammation et Métabolisme Lipidique)

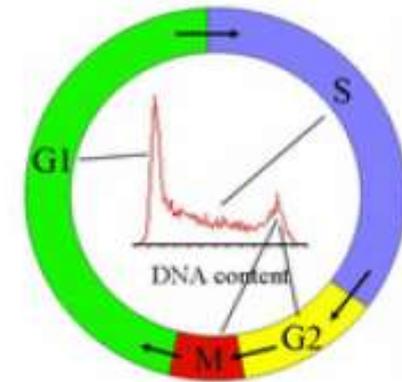
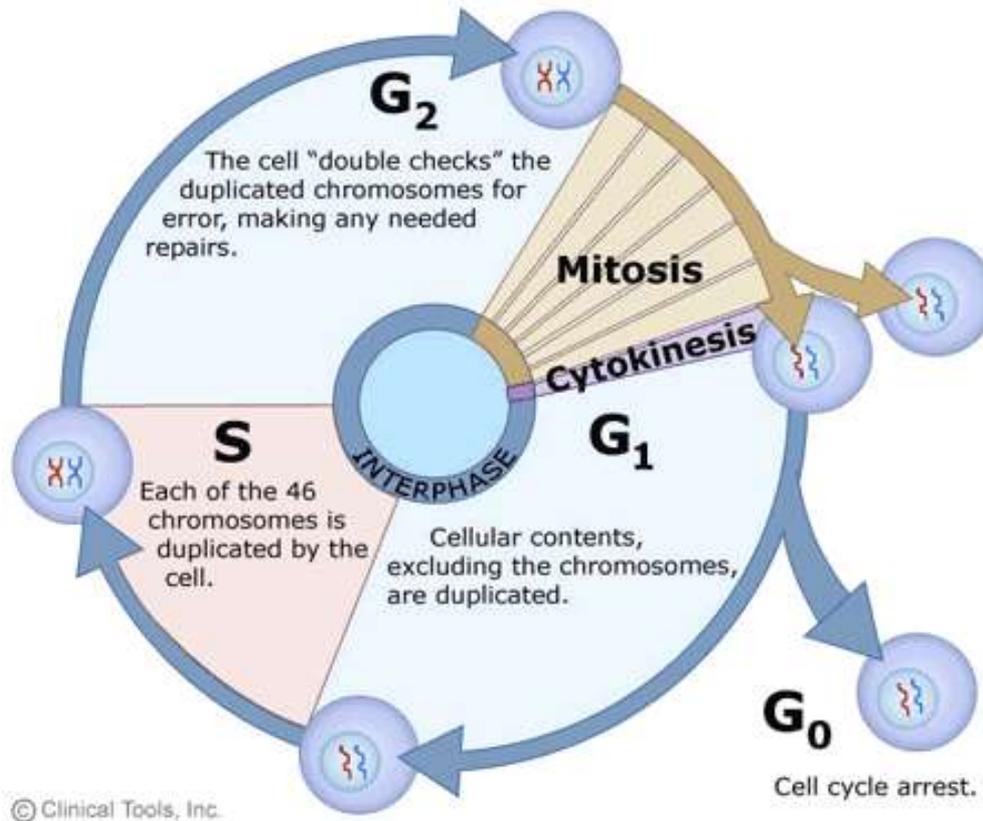
Univ. Bourgogne Franche-Comté / Inserm, Dijon, France

Cytométrie en flux appliquée à l'étude de :

- La prolifération et du contenu en ADN

**(utilisation de la coloration de l'ADN pour l'étude
de la mort cellulaire)**

Phases du cycle cellulaire et histogramme de répartition en cytométrie en flux



Analyse du cycle cellulaire et du contenu e ADN (ploïdie) : coloration de l'ADN

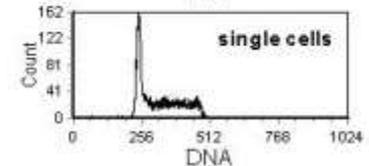
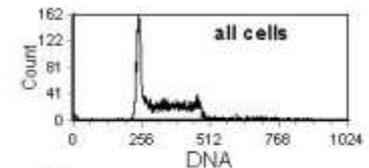
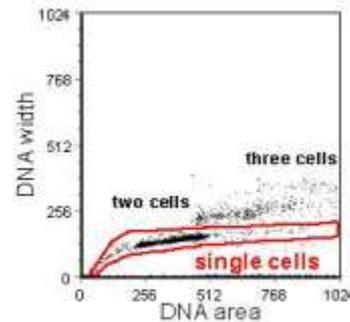
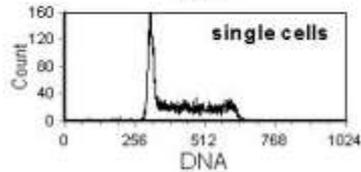
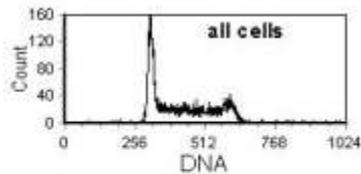
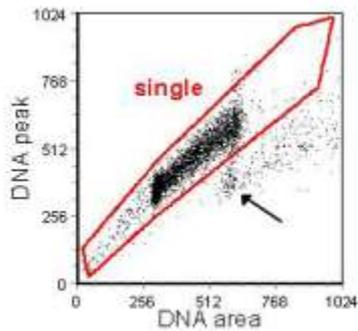
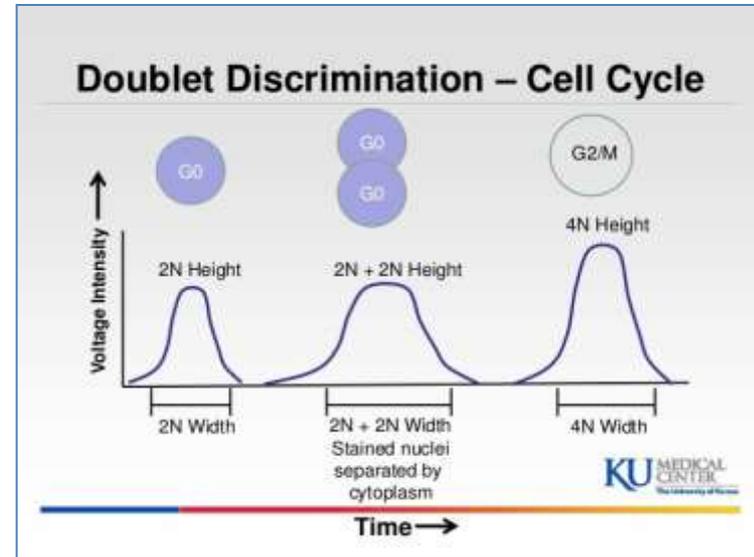
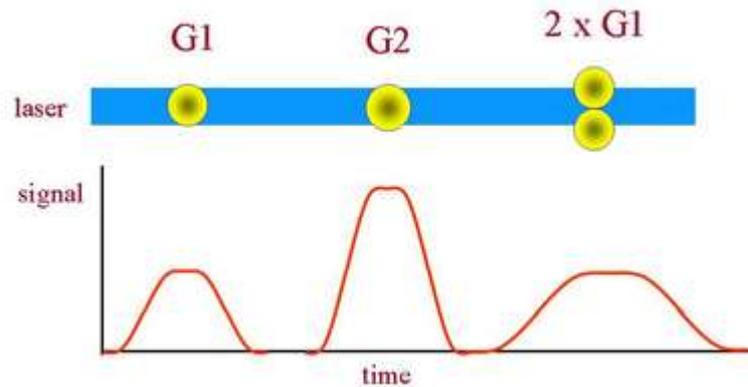
Colorant vitaux :

- Hoechst 33342 (A-T)
- Hoechst 33258 (A-T)
- DAPI (A-T)

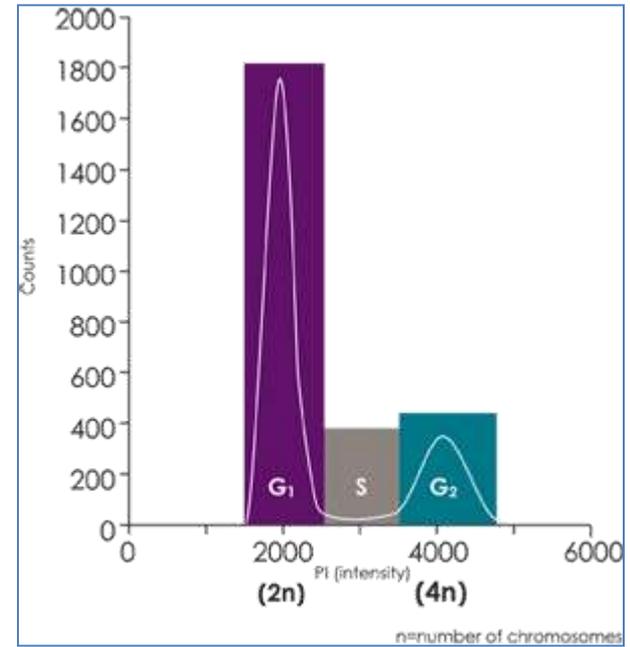
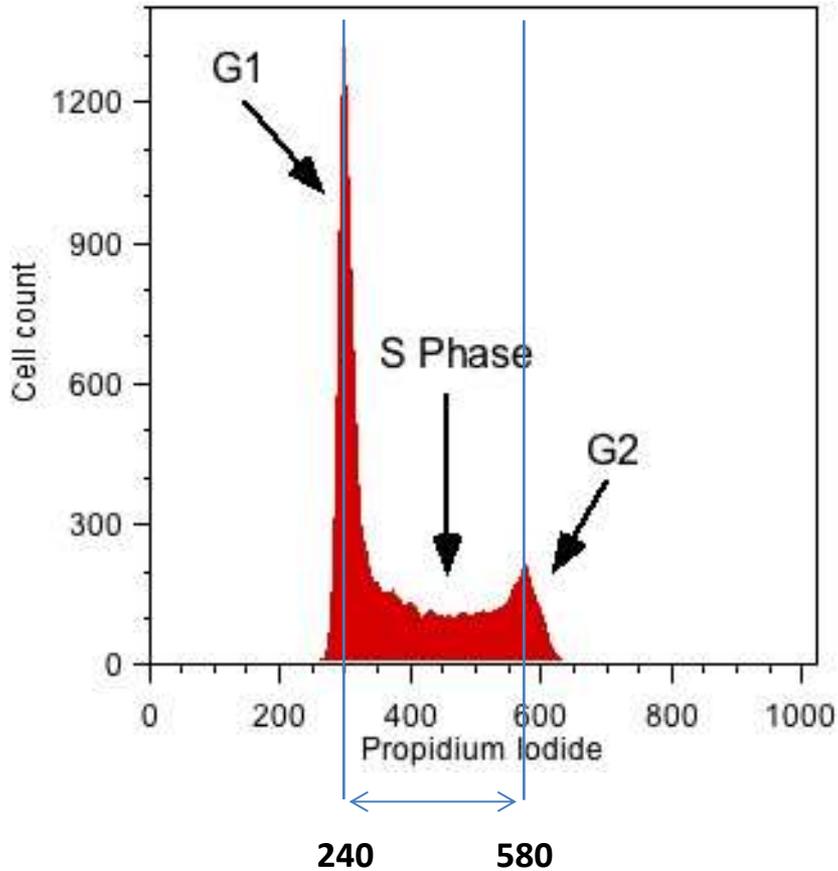
Colorant non vitaux :

- Iodure de propidium (Intercalant stochiométrique de l'ADN / Non spécifique de l'ADN (colore les ARN de transfert))
- 7AAD (7-amino actinomycine D)

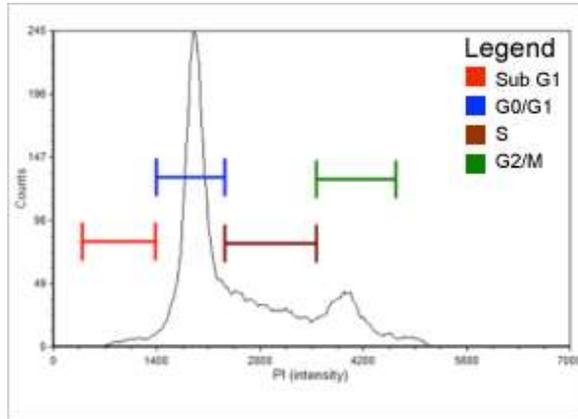
Exclusion de doublets et linéarité du cytomètre



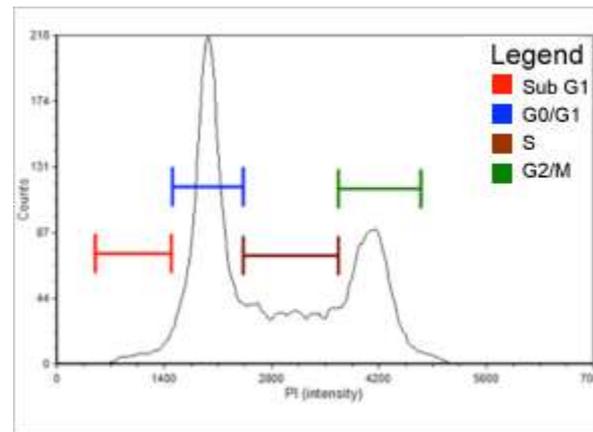
Analyse 'basique' du cycle cellulaire



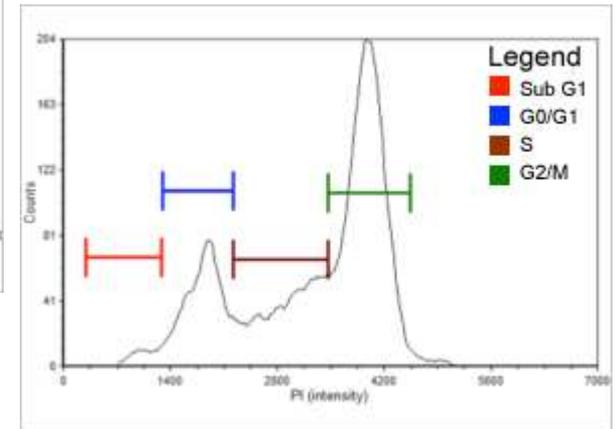
Cycle cellulaire : étude pharmacologique



Contrôle

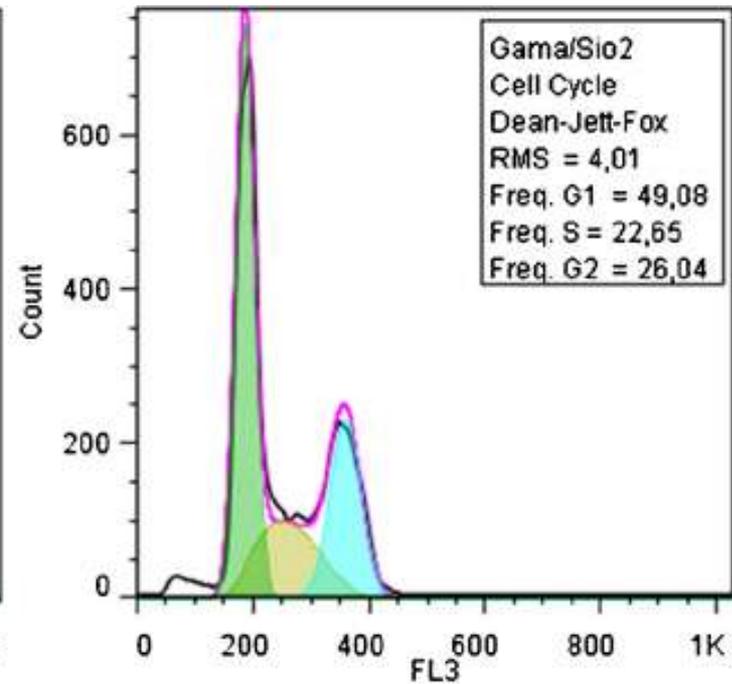
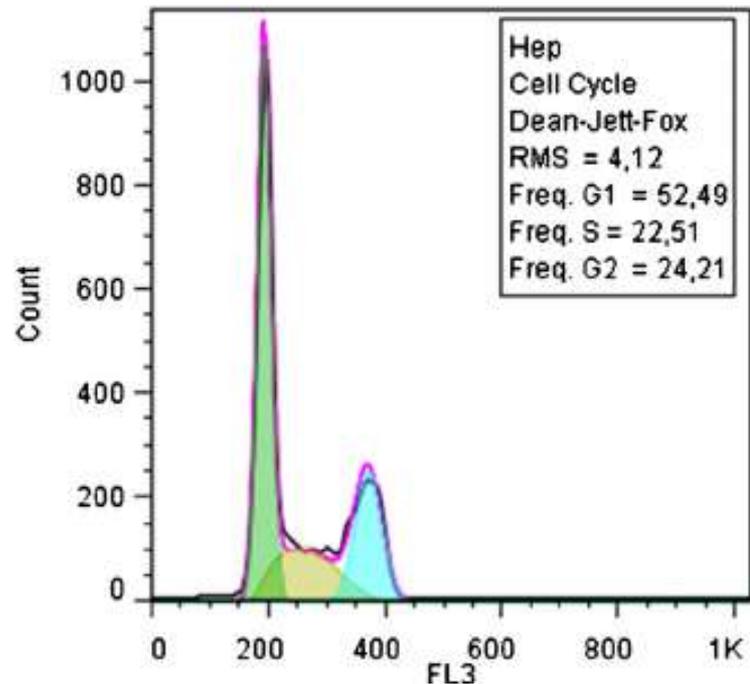


Produit x



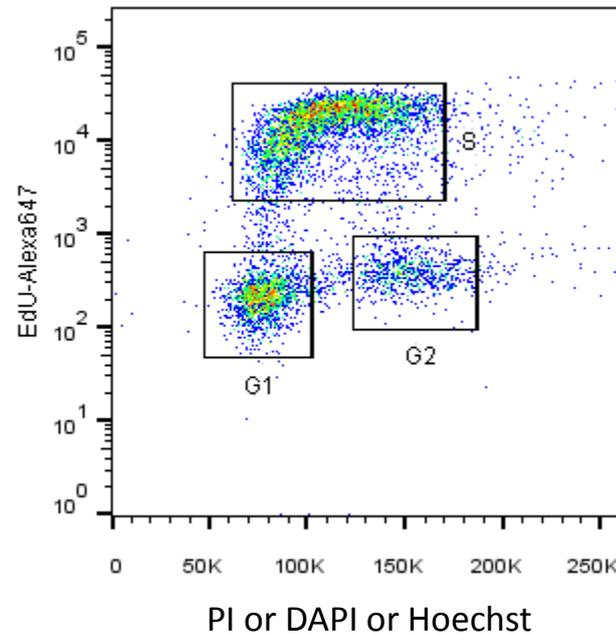
Produit y

Analyse du cycle cellulaire : méthode de Dean & Jett (déconvolution)

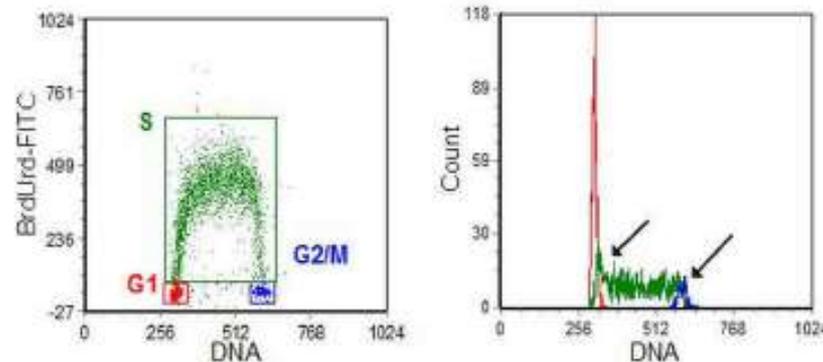


La technique BUdR : détermination des cellules en phases G1, S et G2/M

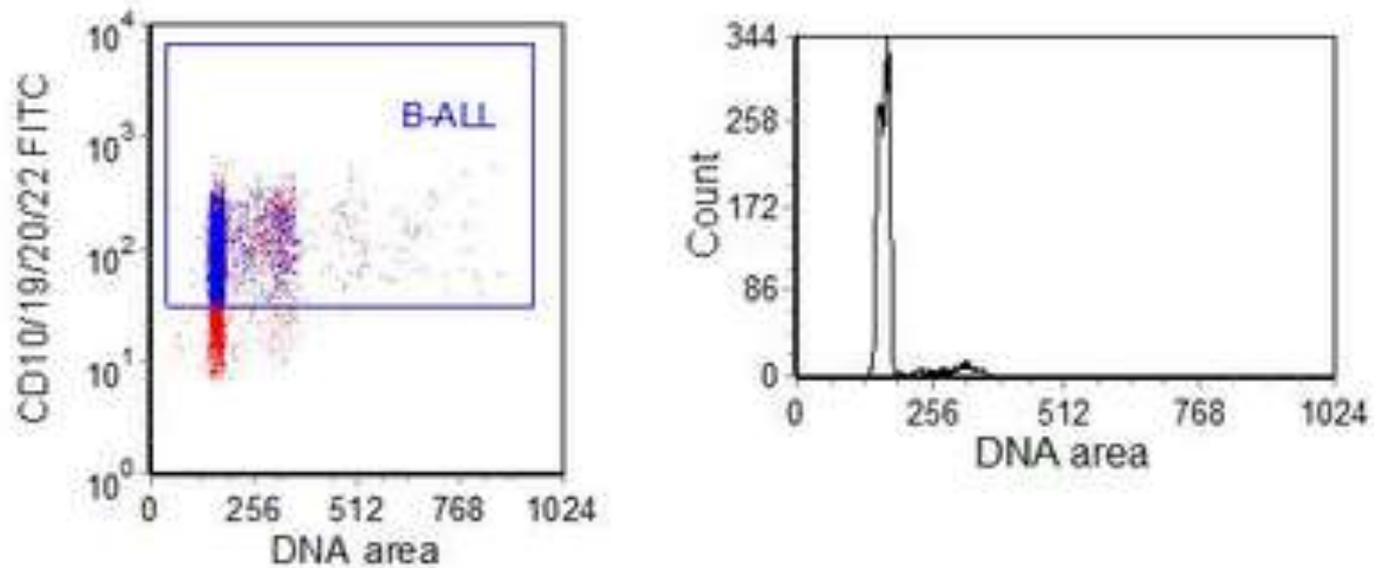
- bromodésoxyuridine (BUdR)
- Cellules vivantes (in vivo, in vitro)
- Equivalent à l'incorporation de thymidine tritiée H^3TdR



- Détermination des cellules en G1, S et G2/M
- Détermination du temps de doublement

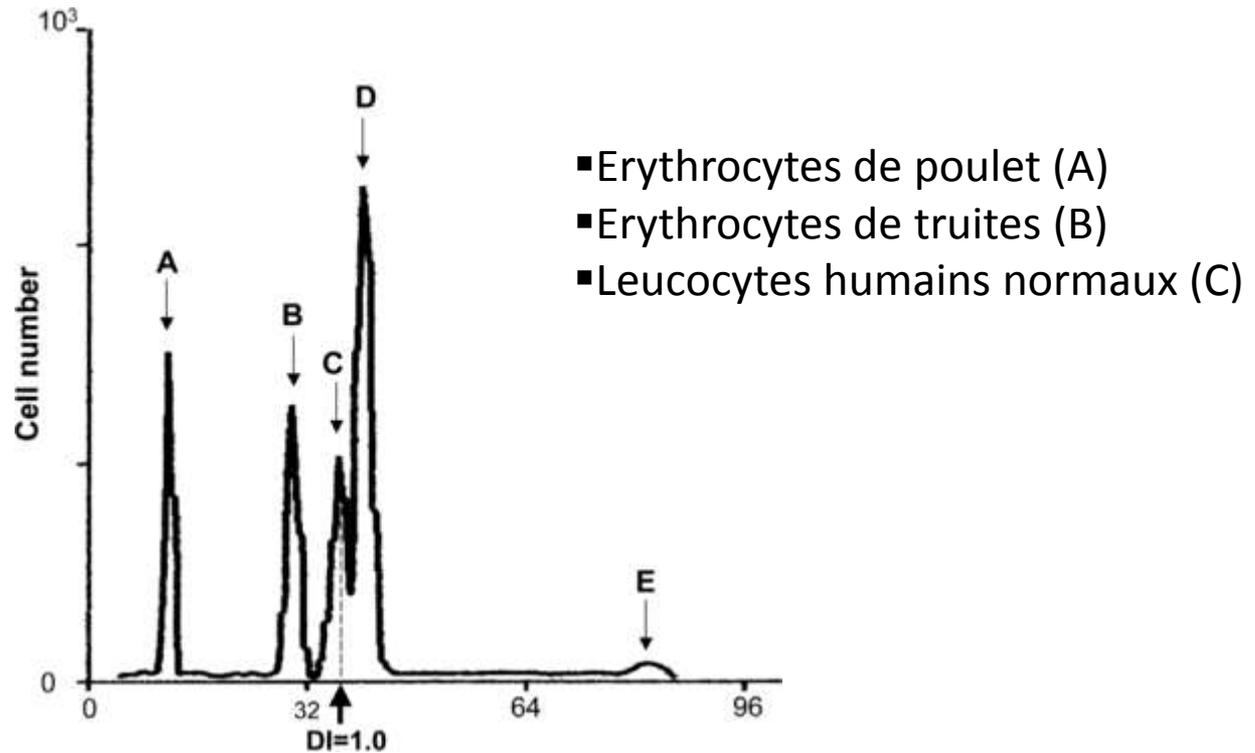


Analyse simultanée cycle cellulaire – expression antigénique



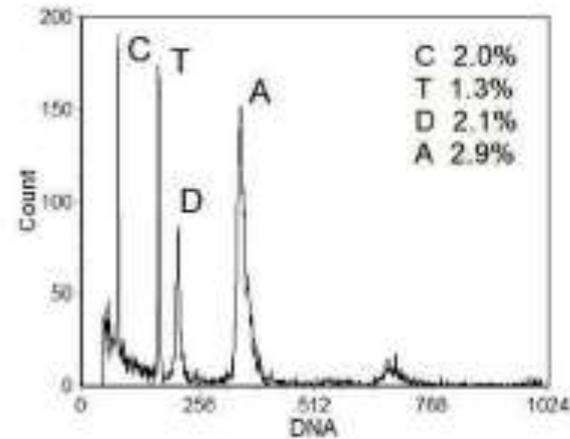
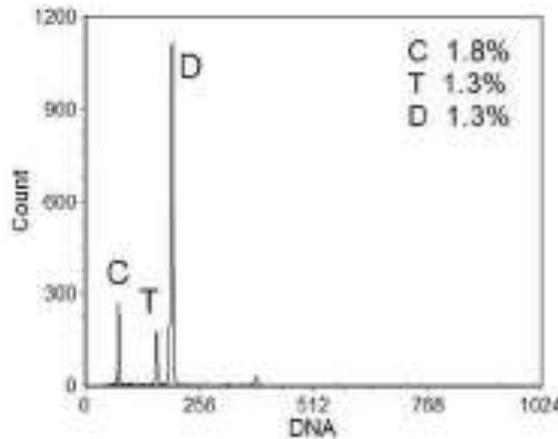
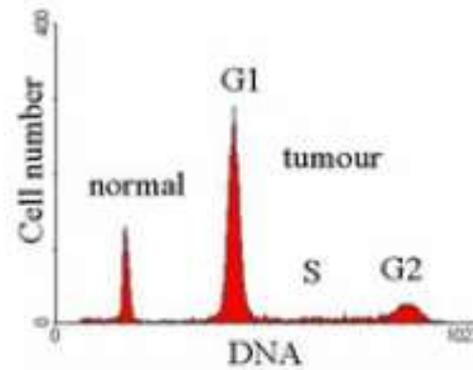
Définir si l'expression d'antigènes dépend de phase(s) du cycle cellulaire ou se rapporte à la mort cellulaire (Sub-G1)

Ploidie et standard(s) interne(s)



DNA content analysis of human breast cancer biopsy specimen according to the protocol developed by Vindelov et al. Cellular DNA content was measured in a sample obtained from a fine needle aspirate of a surgical biopsy of human breast cancer and stained with PI. Chicken erythrocytes and trout erythrocytes were included as internal standard. The peaks from left to right represent **chicken (A)** and **trout (B)** erythrocytes, **diploid normal nuclei (C; DI = 1.0)**, hyperdiploid (DI > 1.0) population of tumor G_{0/1} phase cells (D) and G₂ population of tumor cells (E). **Under proper conditions of DNA staining, the ratio of the mean DNA content of diploid human cells to chicken erythrocytes is 2.857, the ratio to trout erythrocytes is 1.258 and the ratio of mean DNA content in trout vs chicken erythrocytes is 2.28.** Another landmark of linearity in DNA content analysis is the ratio of G₂ to G₁ peaks, which is expected to be 2.0. Modified after Vindelov and Christensen.

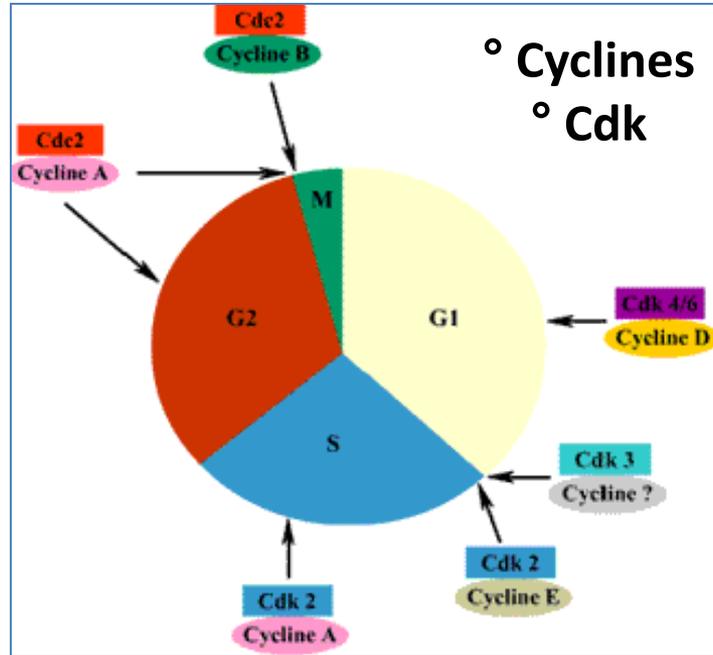
Ploidie et histogrammes de répartition



- * Analyse du cycle cellulaire et de la ploïdie sur échantillons frais ou déparaffinés (études rétrospectives)
- * CV du pic G0/G1 < 3

Etude la Prolifération Cellulaire

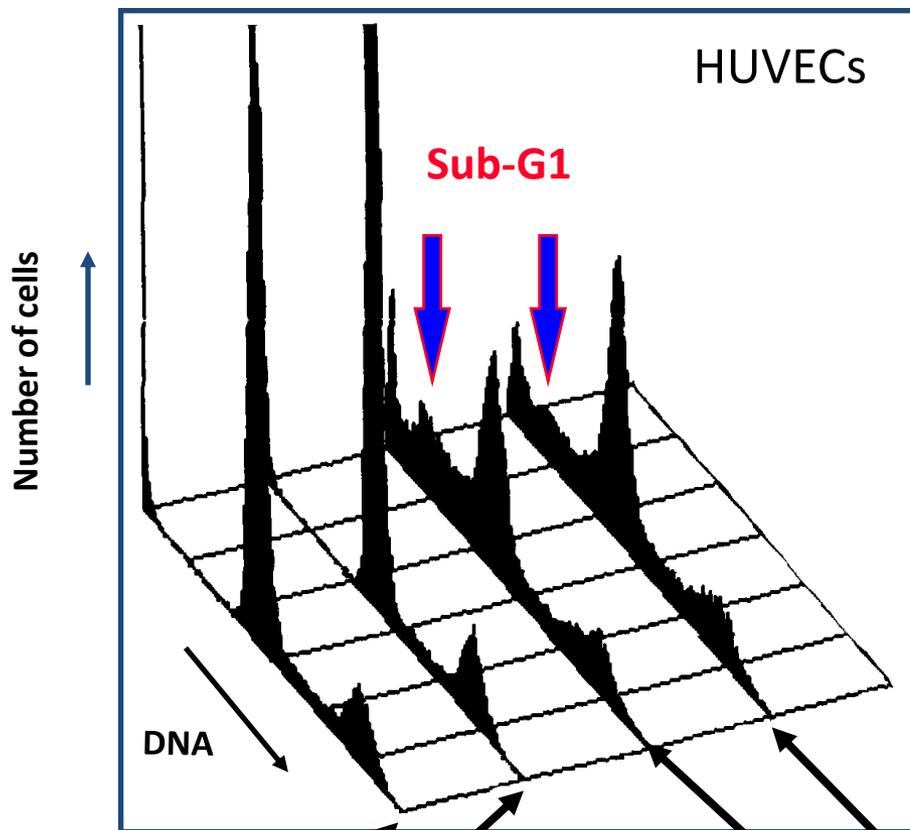
Protéines associées aux phases du cycle cellulaire



° Marqueurs de prolifération

- * Antigène Ki-67 (G1, S, G2 et M)
- * PCNA (réplication et réparation de l'ADN)

% cellules avec de l'ADN fragmenté : cellules Sub-G1

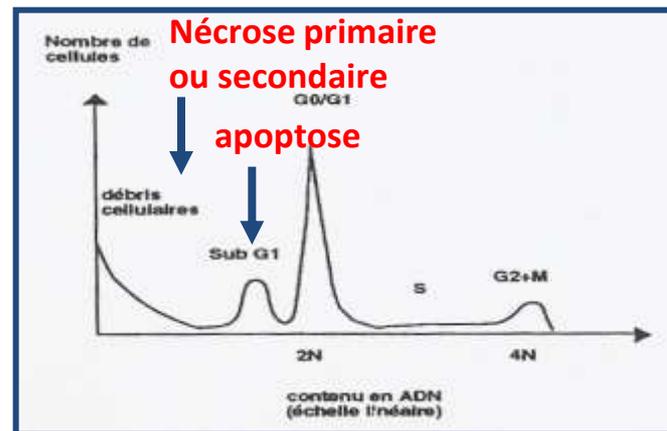


control
cholesterol

7-ketocholesterol

7 β -hydroxycholesterol

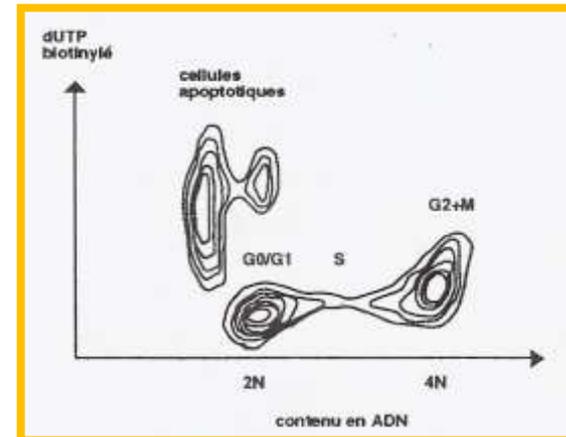
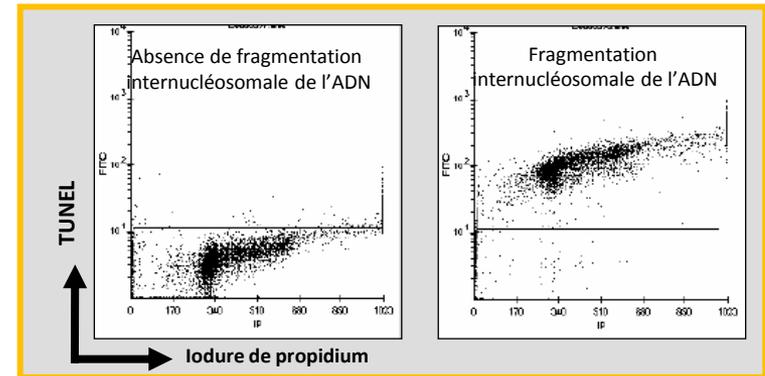
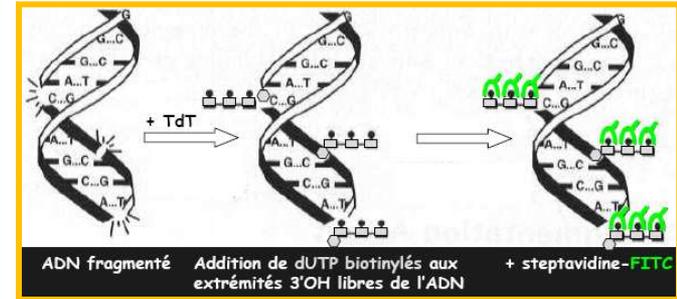
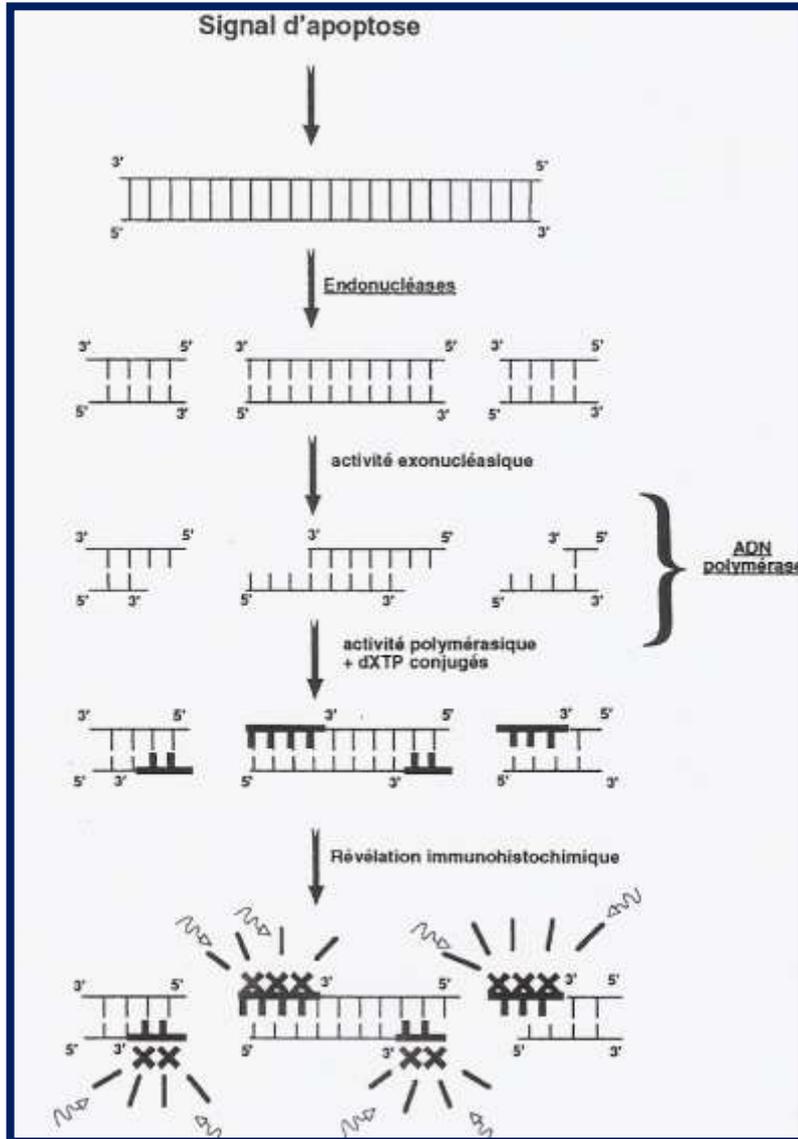
✓ Coloration de l'ADN
à l'iodure de propidium



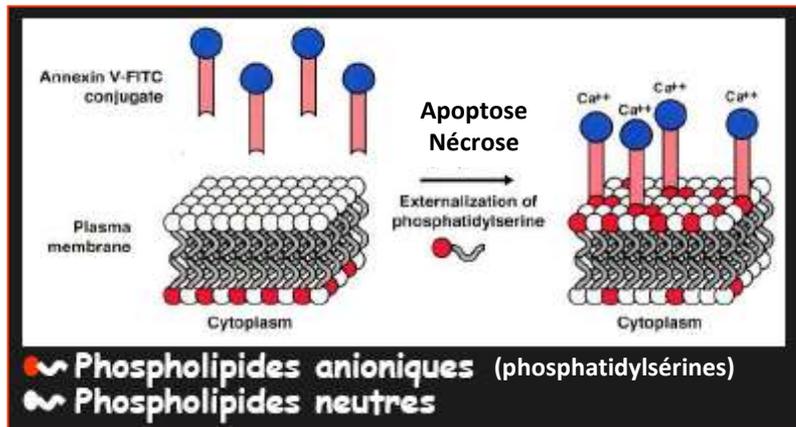
% SubG1 = % cellules apoptotiques = % de cellules
avec une fragmentation internucléosomal de
l'ADN

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

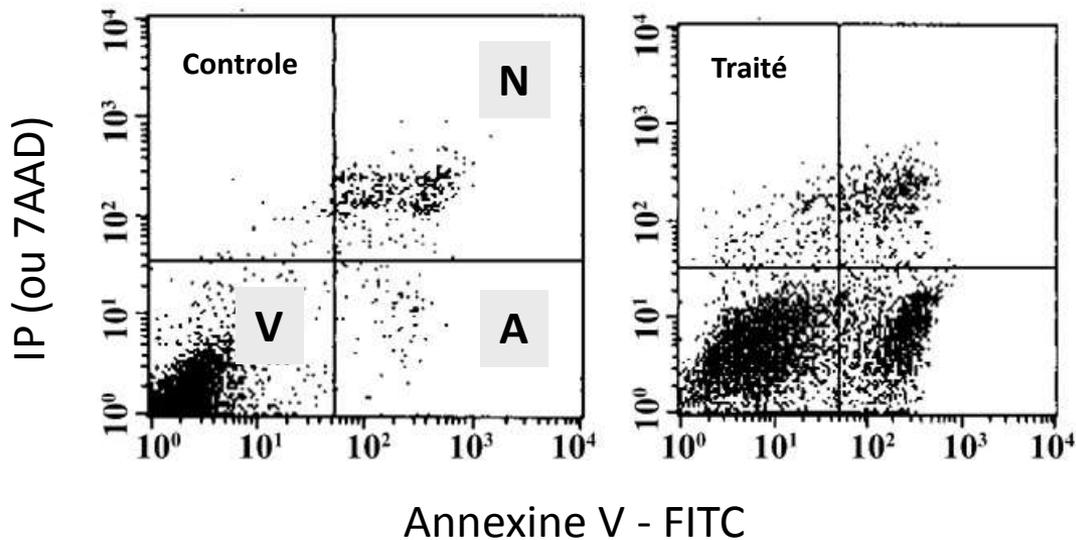
% de cellules avec de l'ADN fragmenté (**fragmentation inter-nucléosomale**)



Mesure de l'Externalisation des Phosphatidylsérines



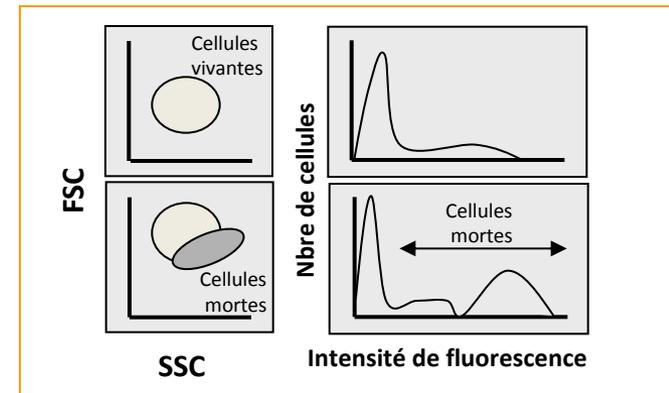
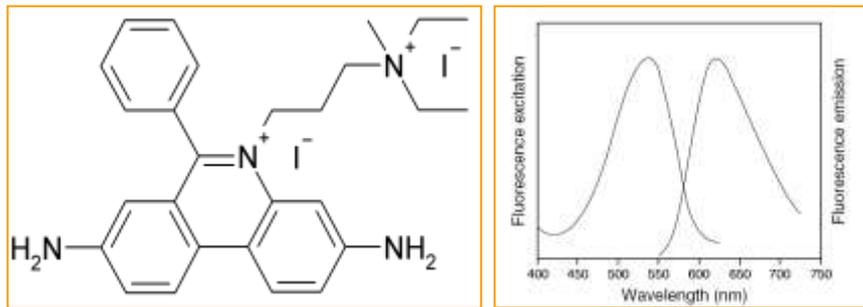
Cellules	Annexine V	IP
Vivantes (V)	-	-
Apoptotiques (A)	+	-
Nécrotiques (N)	+	+



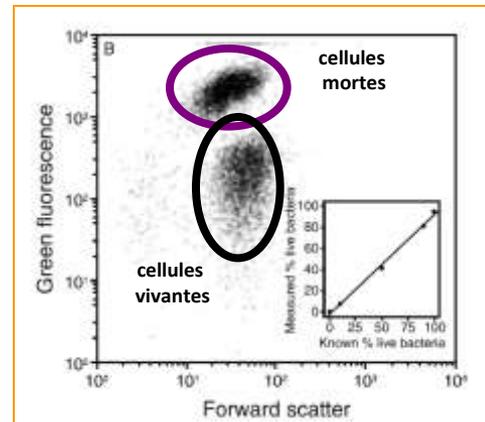
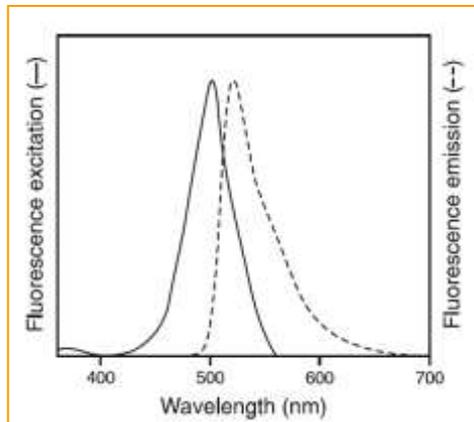
Evaluation de la viabilité cellulaire : coloration à l'iodure de propidium ou au SYTOX Green

Intégrité de la membrane cytoplasmique

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

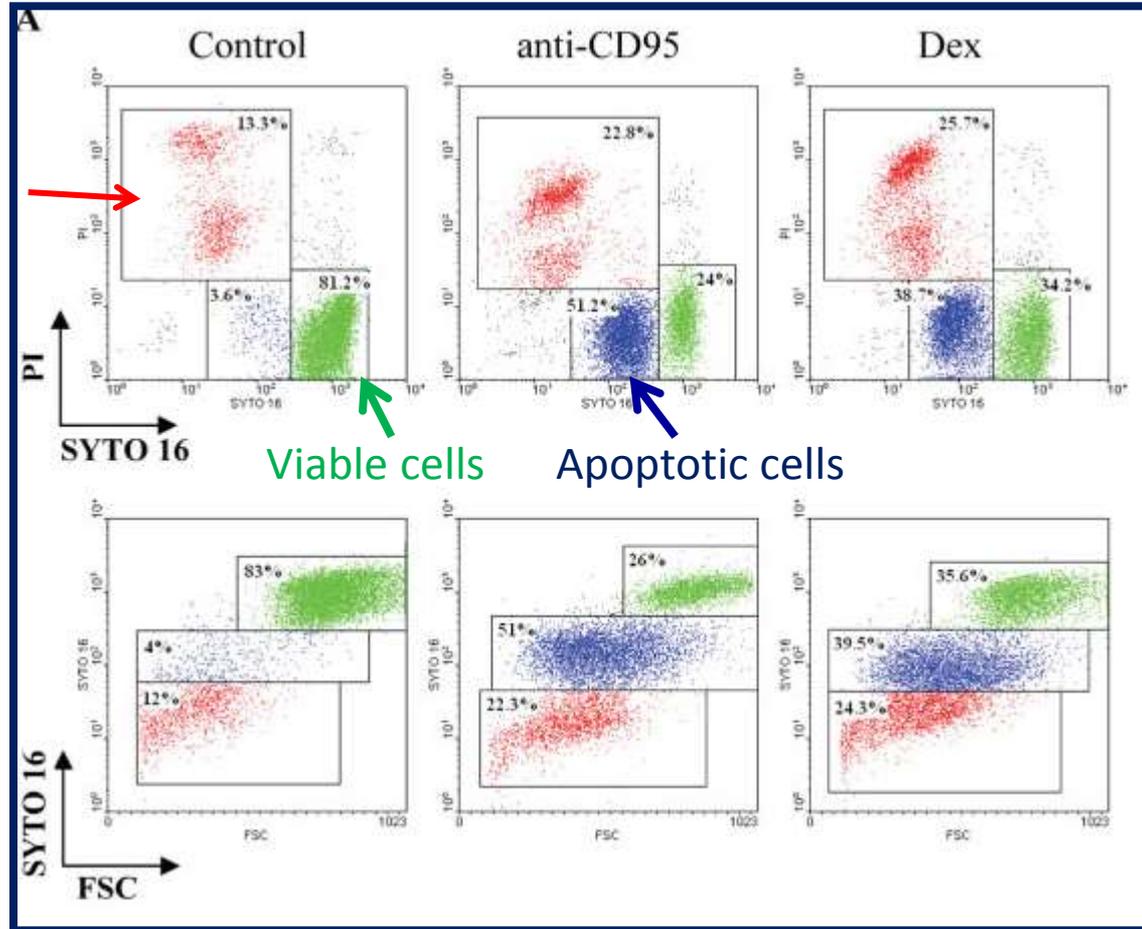


- **SYTOX Green** (0,5 μM ; colore les cellules mortes en vert)



Coloration Iodure de Propidium – SYTO16

Necrotic cells



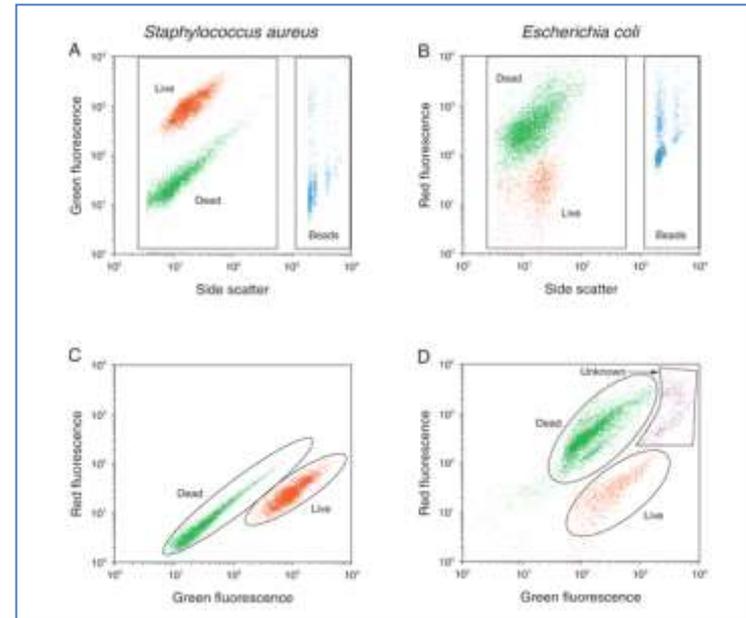
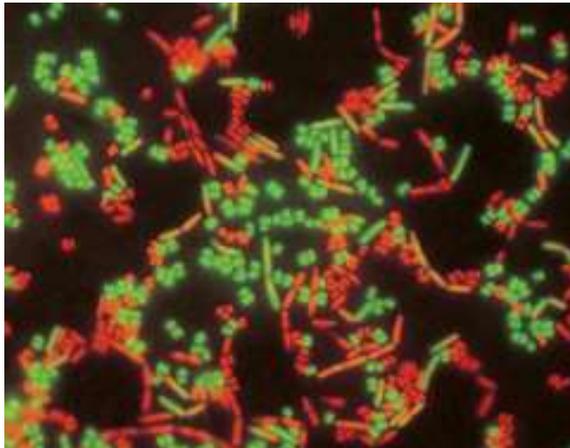
Towards an Understanding of Apoptosis Detection by SYTO Dyes

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

Coloration de l'ADN : numération de bactéries, distinction de bactéries vivantes et mortes

SYTO9 (bactéries vivantes)

Iodure de Propidium (bactéries mortes)



SYTO® 9

Propidium Iodide

Excitation/Emission (nm) 480/500

490/635

Standard filter set

FITC

Texas Red®

Storage conditions

≤20°C, protect from light

≤20°C, protect from light

Cytométrie en flux appliquée à l'étude de :
-Des organites cellulaires
(mitochondries, lysosomes, peroxysomes)

Etude des Organites (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 (Red / Green), 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)

Etude des organites cellulaires (mitochondrie, lysosome, peroxysome) par cytométrie en flux

Cellule vivante



Cellule morte



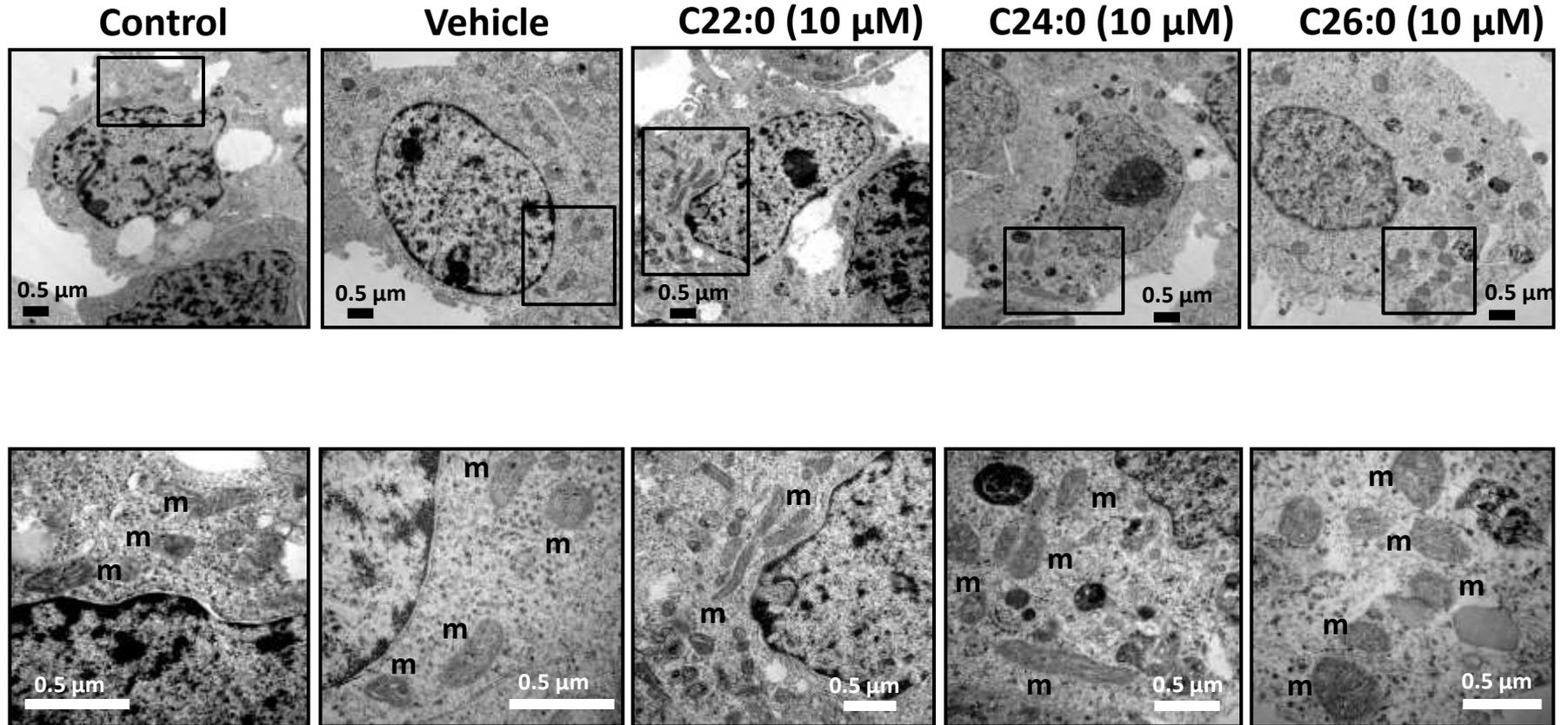
**Point de
non retour
Diminution de $\Delta\Psi_m$**

**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.

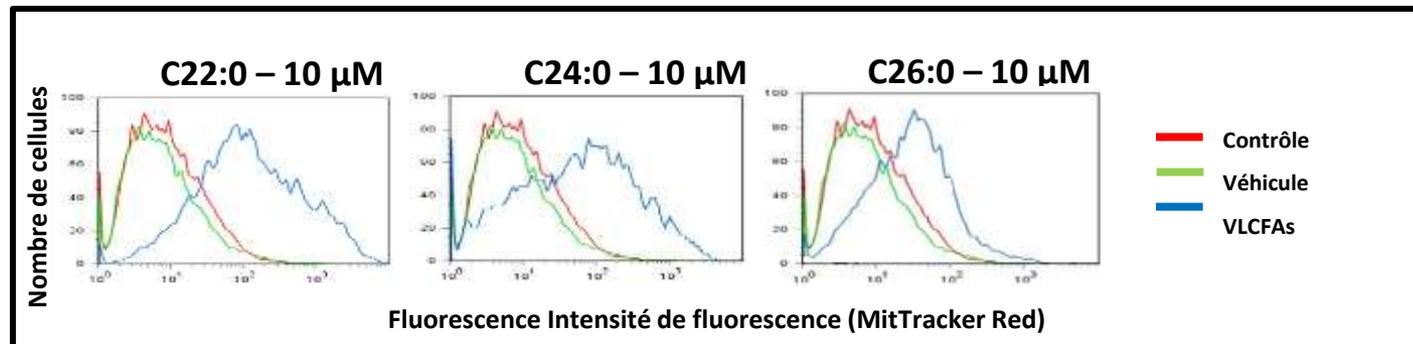
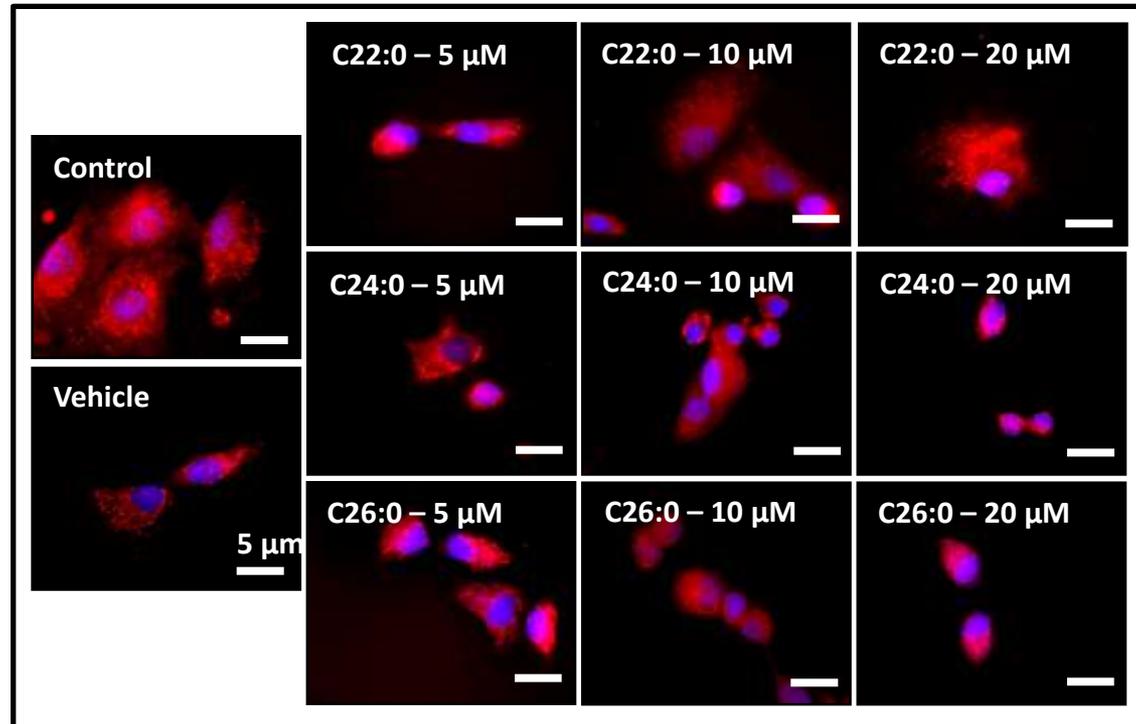
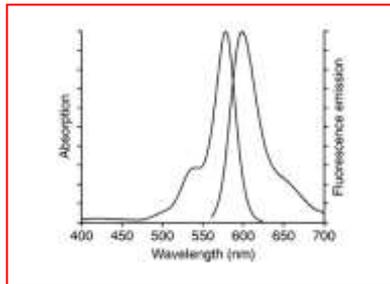
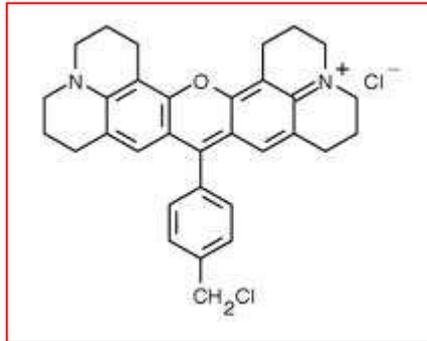
- Evènements éventuellement associés à la mort cellulaire : flux ioniques ; déstabilisation de la membrane lysosomale ; acidification du cytoplasme ; activation d'enzymes (sérines protéases; caspases) ; surproduction de radicaux oxygénés ; diminution des défenses anti-radicalaires; induction de la sécrétion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

Caractérisation *in situ* de la mitochondrie (MET)



Topographie mitochondriale et quantification

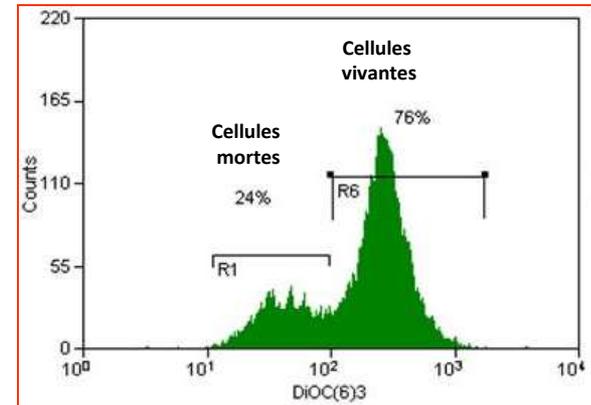
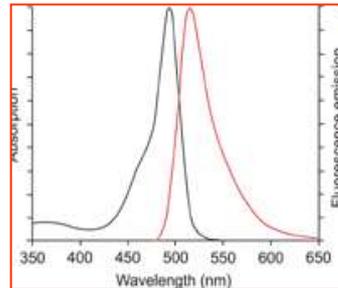
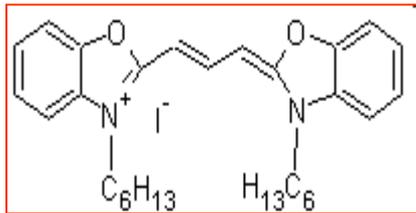
MitoTracker Red



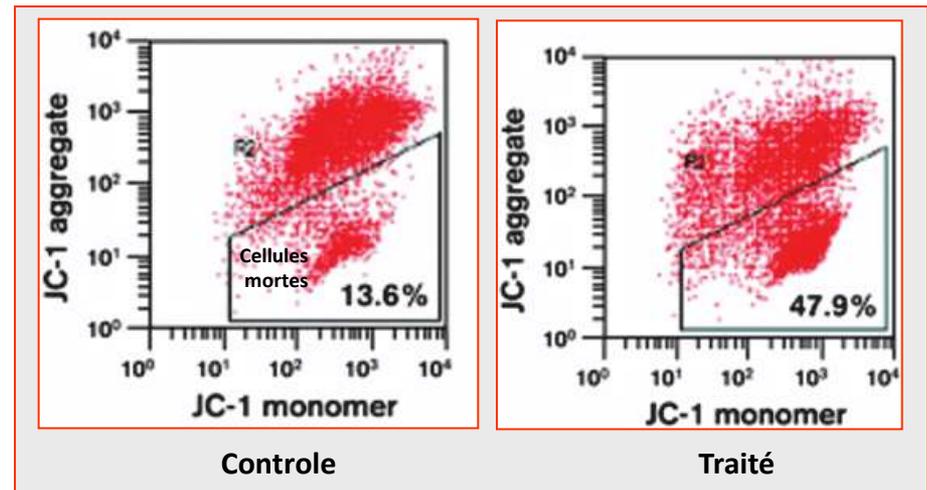
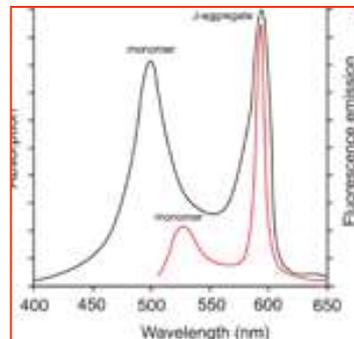
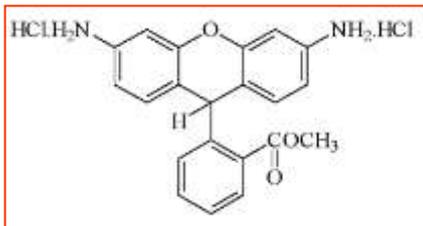
Potentiel Transmembranaire Mitochondrial ($\Delta\Psi_m$)

Coloration avec DiOC₆(3) ou JC1

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



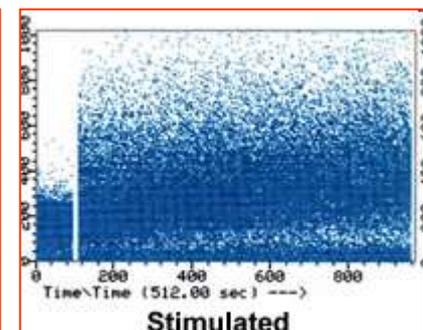
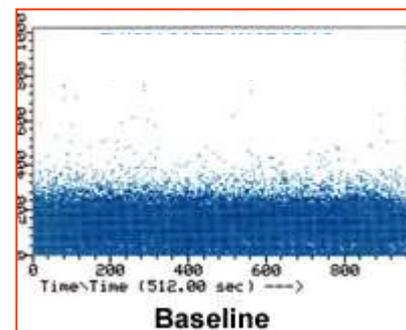
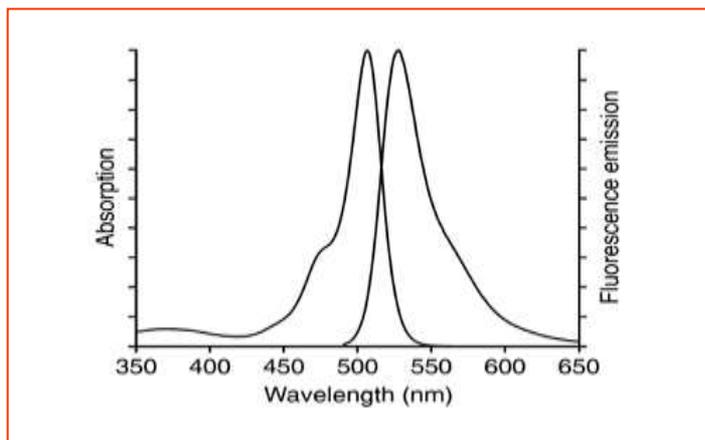
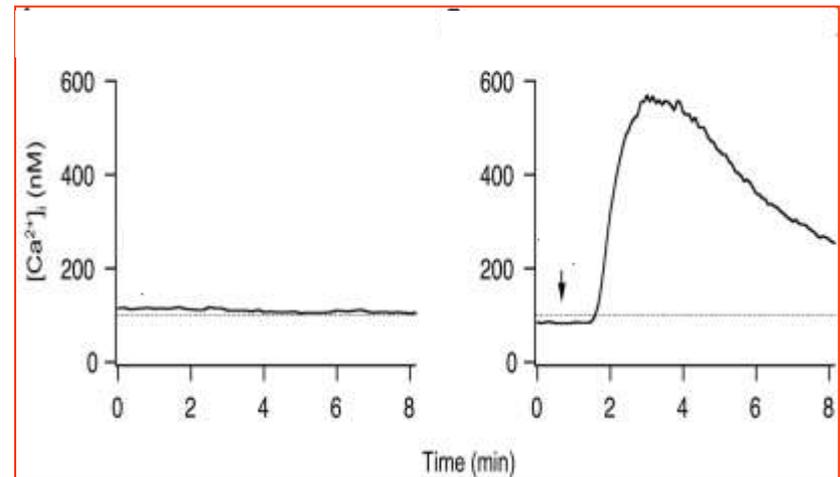
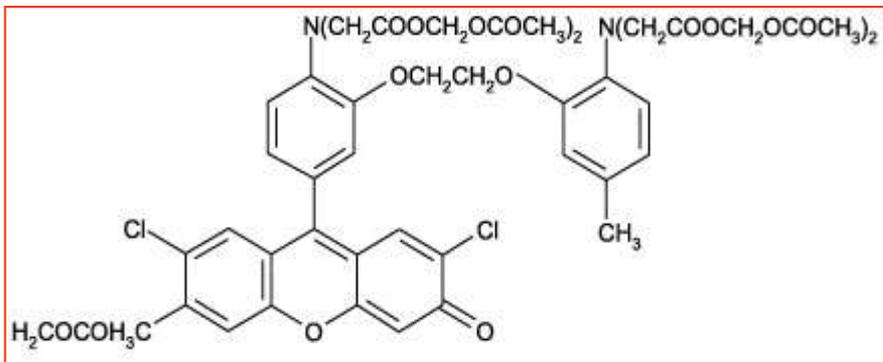
- **JC-1** (1 µg/mL ; permet la distinction des cellules vivantes (colorées en rouge) et mortes (avec des mitochondries dépolarisées et colorées en vert))



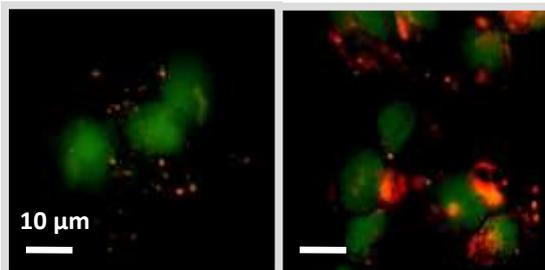
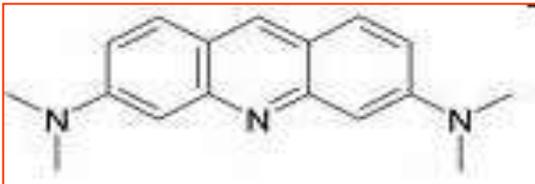
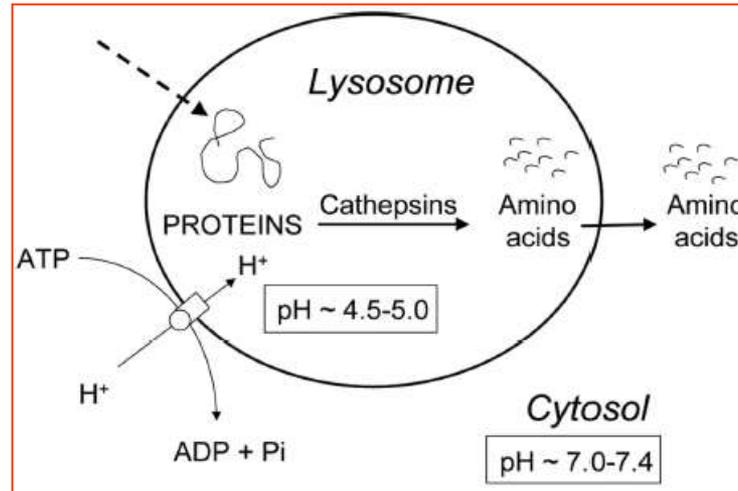
Analyse des Flux Calciques avec le Fluo-3AM

* Origines des flux calciques :

- extracellulaires (canaux ioniques)
- Intracellulaires (**mitochondries**, réticulum endoplasmique)



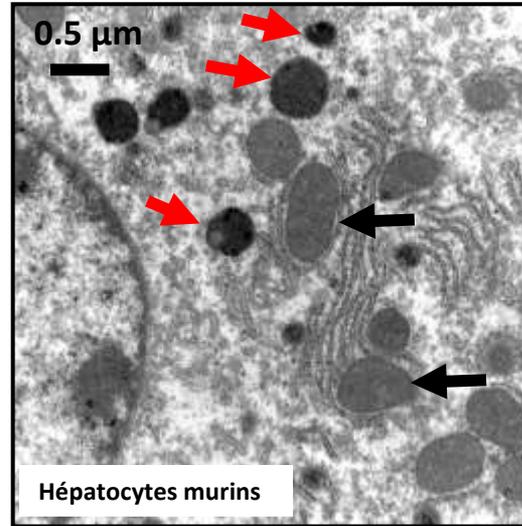
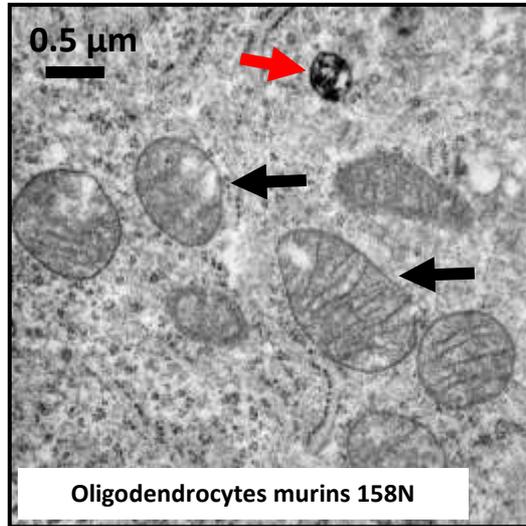
Analyse de la Déstabilisation de la Membrane Lysosomale avec l'Acridine Orange



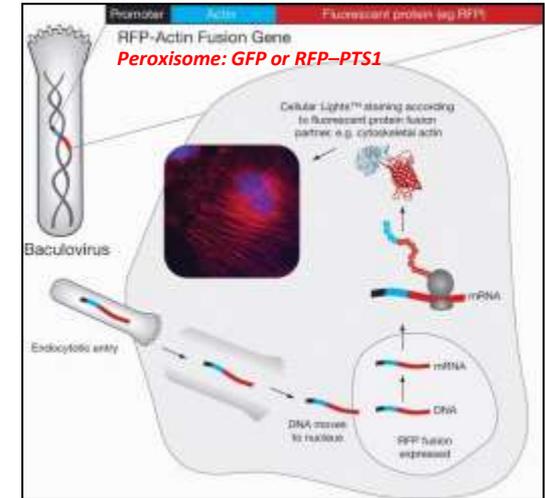
- Lysosomes avec membranes fonctionnelles :
 - **Fluorescence verte**
- Lysosomes avec membranes déstabilisées :
 - **Fluorescence orange**

Caractérisation *in situ* du peroxysome

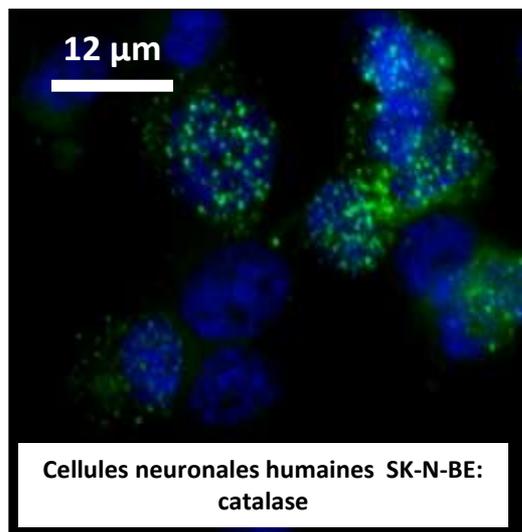
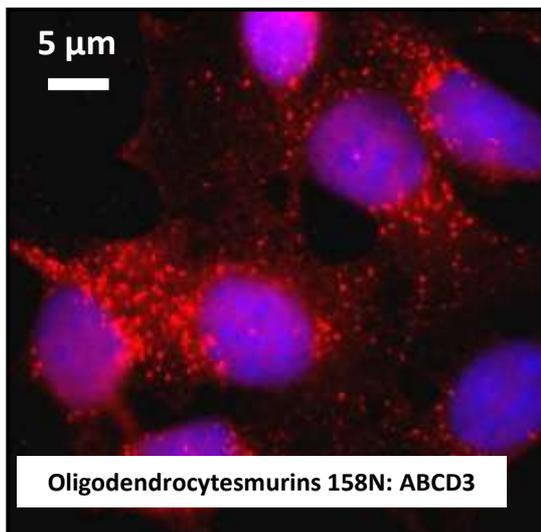
- Microscopie électronique à transmission (activité catalase)



- Fluorescent protein-based markers for peroxisomes

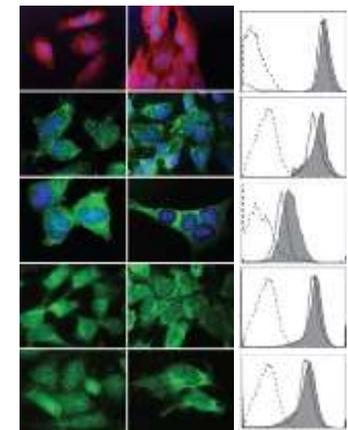


- Microscopie confocale (ABCD3, catalase)



- Cytométrie en flux (cellules 158N)

- 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

Cytométrie en flux appliquée à l'étude de :
- Du stress oxydant

Origine des Espèces Radicalaires Et Réponses Cellulaires Associées

Sources endogènes

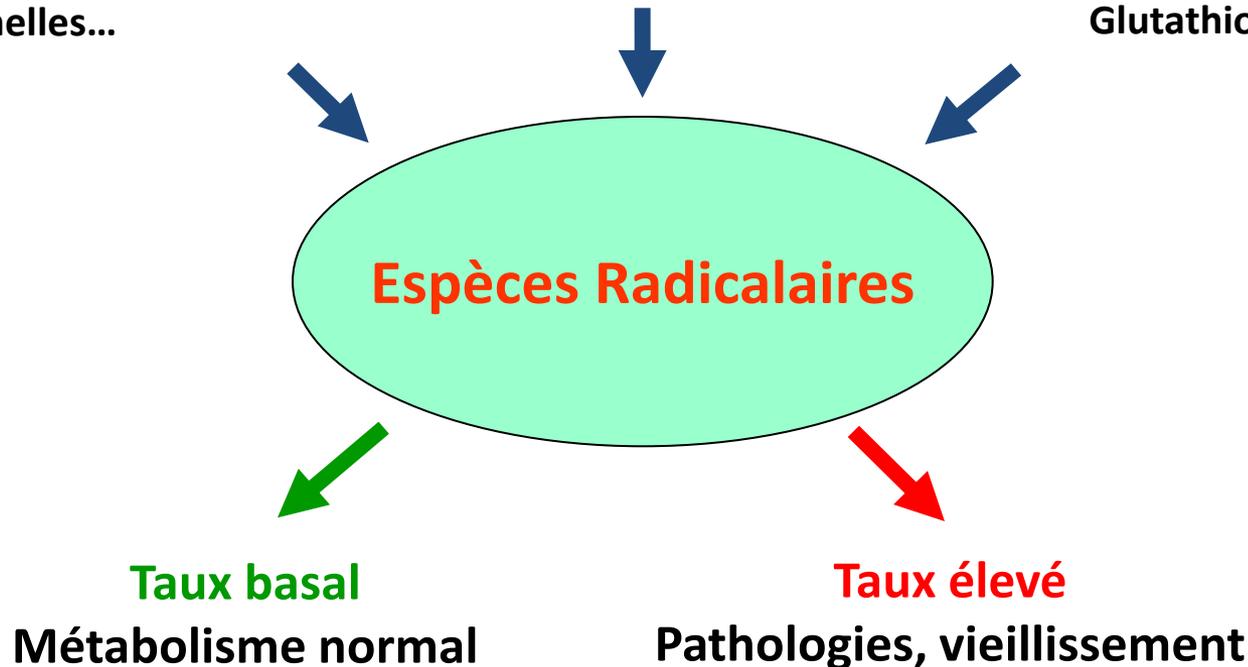
- Mitochondrie
- Peroxysomes
- Enzymes: cytosol; organelles...

Sources exogènes

- Physiques (radiations; UV)
- Chimiques (xénobiotiques; ...)
- Mécaniques

Défenses anti-oxydantes

- Système enzymatique
SOD₍₁₋₃₎, Catalase, GPx₍₁₋₈₎
- Système non-enzymatique
Glutathion, Vit (A, C, E)



Nomenclature des espèces radicalaires

Nomenclature of reactive species

Free radicals^a

Nonradicals

Reactive oxygen species (ROS) Espèces radicalaires de l'oxygène

Superoxide, $O_2^{\bullet -}$	Hydrogen peroxide, H_2O_2
Hydroxyl, OH^{\bullet}	Hypobromous acid, $HOBr^b$
Hydroperoxyl, HO_2^{\bullet}	Hypochlorous acid, $HOCl^c$
	Ozone O_3
Peroxyl, RO_2^{\bullet}	Singlet oxygen ($O_2^1\Delta g$)
Alkoxy, RO^{\bullet}	Organic peroxides, $ROOH$
Carbonate, $CO_3^{\bullet -}$	Peroxynitrite, $ONOO^-^d$
Carbon dioxide, $CO_2^{\bullet -}$	Peroxynitrous acid, $ONOOH^d$

Reactive chlorine species (RCS) Espèces radicalaires du chlore

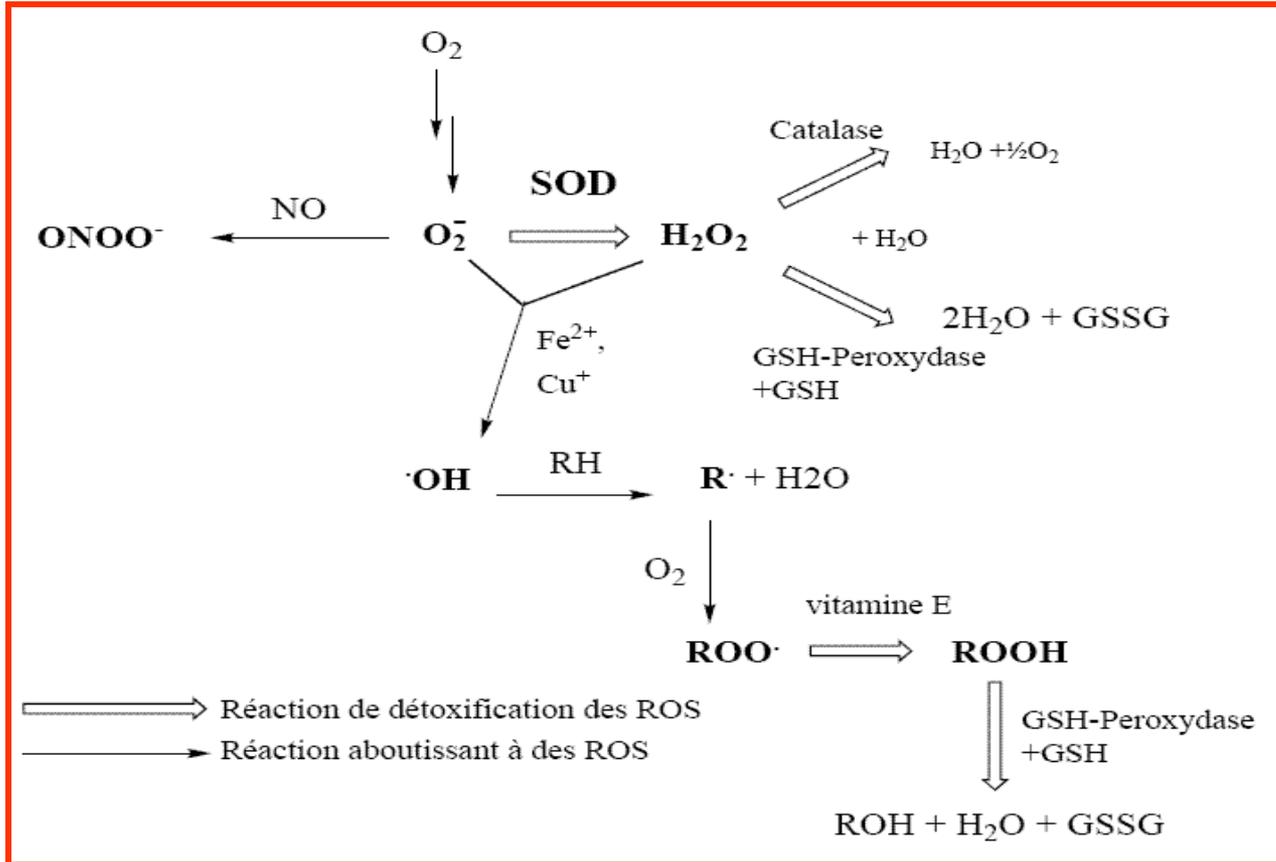
Atomic chlorine, Cl^{\bullet}	Hypochlorous acid, $HOCl^c$
	Nitryl (nitronium) chloride, NO_2Cl^e
	Chloramines
	Chlorine gas (Cl_2)

Reactive nitrogen species (RNS) Espèces radicalaires de l'azote

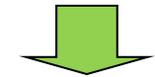
Nitric oxide, NO^{\bullet}	Nitrous acid, HNO_2
Nitrogen dioxide, NO_2^{\bullet}	Nitrosyl cation, NO^+
	Nitroxyl anion, NO^-
	Dinitrogen tetroxide, N_2O_4
	Dinitrogen trioxide, N_2O_3
	Peroxynitrite, $ONOO^-^d$
	Peroxynitrous acid, $ONOOH$
	Nitronium (nitryl) cation, NO_2^+
	Alkyl peroxynitrites, $ROONO$
	Nitryl (nitronium) chloride, NO_2Cl^e

Stress Oxydant :

Espèces Réactives de l'Oxygène + Défenses Anti-Radicalaires + Cibles Cellulaires



Cibles Cellulaires

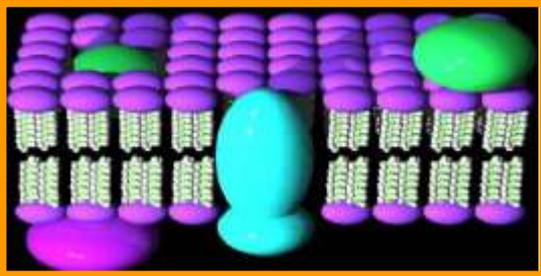


Modifications Fonctionnelles



Pathologies

Cibles moléculaires des Espèces Réactives de l'Oxygène et de l'Azote



- Oxydation et dégradation des **acides gras**;
peroxydation lipidique - formation de 4-HNE et MDA
- Oxydation du **cholestérol** (oxystérols; 7-cétocholestérol)
- Oxydation des **phospholipides membranaires**

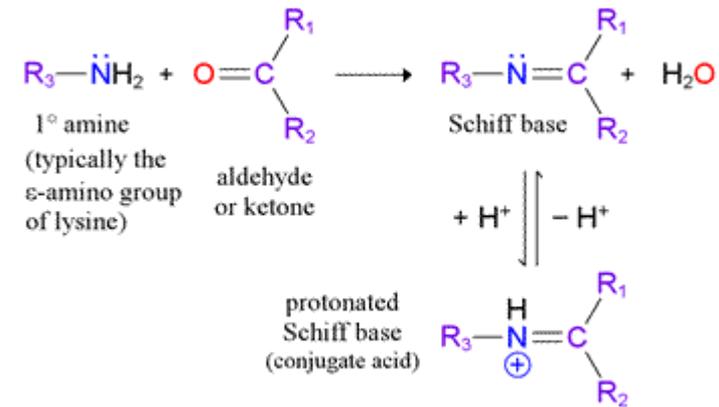
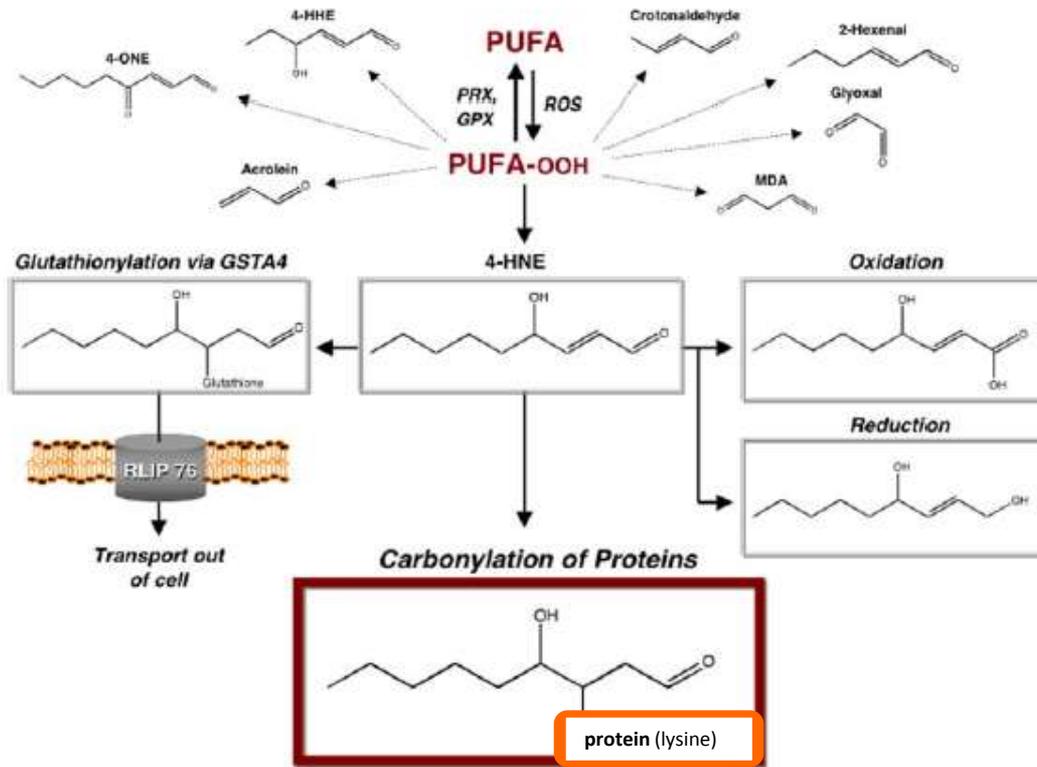


- Oxydation de l'**ADN**: formation de 8-hydroxyguanine, coupures simple brin ou double brin de l'ADN et/ou délétions (mutations)



- Modifications oxydatives des **protéines**
(carbonylation protéique)

Stress oxydant et modification protéique (carbonylation protéique/formation de bases de Schiff) par des aldéhydes



FK **ular fates of α,β -unsaturated aldehydes and carbonylated proteins.** ROS stimulate peroxidation of polyunsaturated fatty acids (PUFA), an oxidative event that is reversible through reduction by peroxidase (PRX) and glutathione peroxidase (GPX) enzymes. The lipid hydroperoxides (PUFA-OOH) generated are unstable and lead to a variety of reactive aldehydes. The lipid peroxidation products generated include the α,β -unsaturated aldehydes 4-HNE, 4-ONE, 4-hydroxy-(2E)-hexenal (4-HHE), (2E)-hexenal, crotonaldehyde, and acrolein as well as the dialdehydes glyoxal and malondialdehyde (MDA). GSTA4 catalyzes the conjugation of the highly reactive α,β -unsaturated aldehydes to glutathione, leading to their efflux from the cell by the glutathione conjugate transporter RLIP76. In addition, oxidation by aldehyde dehydrogenase or reduction by alcohol dehydrogenase, aldehyde reductase, or aldose reductase converts free aldehydes into less toxic molecules. The α,β -unsaturated aldehydes that escape cellular metabolism serve as electrophiles in the covalent modification of proteins via non-enzymatic Michael addition. The resulting aliphatic carbonyl adducts on cysteine, histidine, or lysine residues may alter the activity of protein targets or cause them to become degraded by the proteasome.

Mise en évidence de processus oxydants par cytométrie en flux

- Détection d'espèces réactives de l'oxygène, du chlore et de l'azote
- Détection de l'état des défenses anti-radicalaires
- Détection des altérations cellulaires associées à une surproduction d'espèces radicalaires de l'oxygène

Outils disponibles en cytométrie en flux

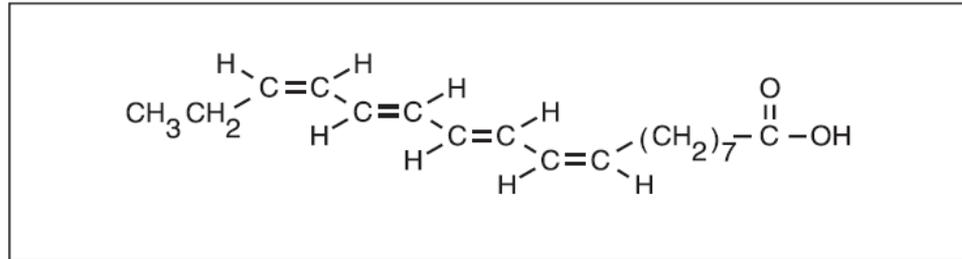
- des fluorochromes
- divers anticorps

Mesure de la peroxydation lipidique

- Peroxydation lipidique

- * Utilisation d'anticorps anti 4-HNE

- * Utilisation d'acide cis-parinaric



- Oxydation du cholestérol

- * Utilisation d'anticorps anti-7-cétocholestérol

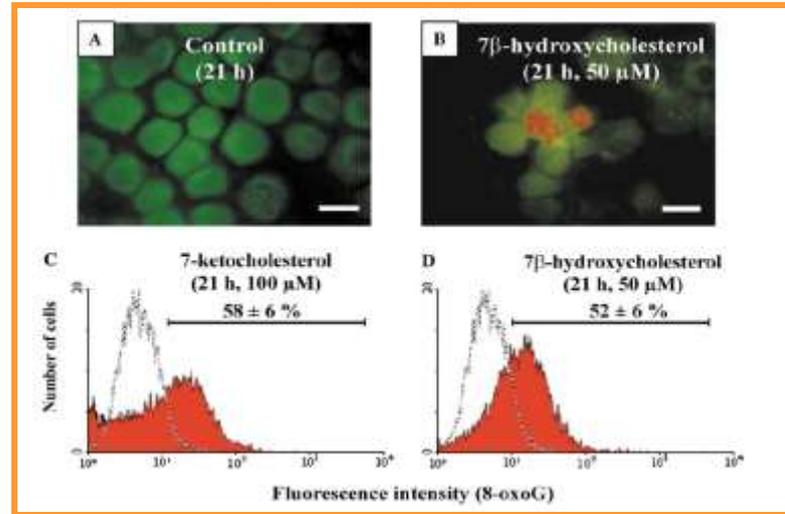
Oxydation de l'ADN

Oxydation de la guanine et/ou formations d'adduits

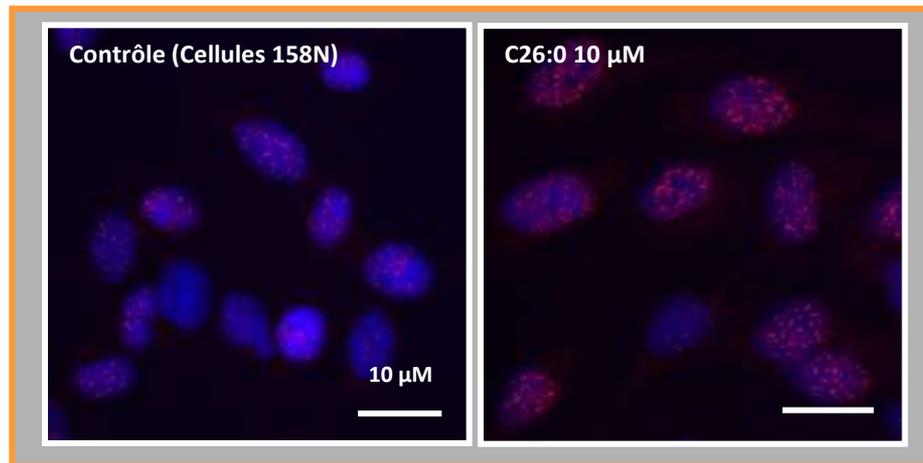
• Oxydation de la guanine :

Génération de 8-hydroxyguanine (8-oxoG)

MONIER S et al, *Biochem Biophys Res Commun* 2003,
303: 814-824



* Peroxydation lipidique : génération de 4-HNE et d'adduits nucléaires de 4-HNE

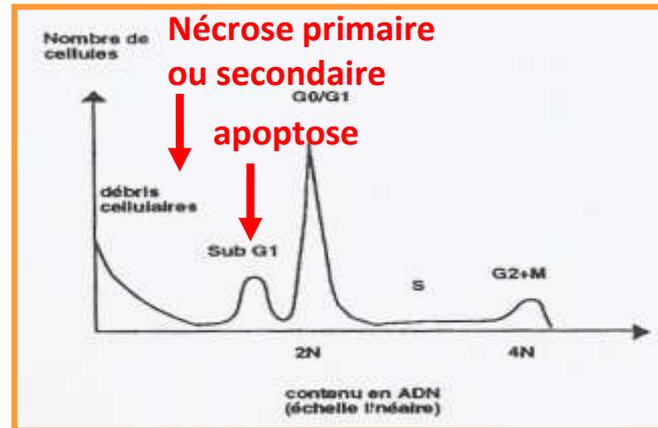


Anticorps anti - 4HNE + anticorps conjugué couplé Alexa 594
+ contre coloration nucléaire au Hoechst 33342

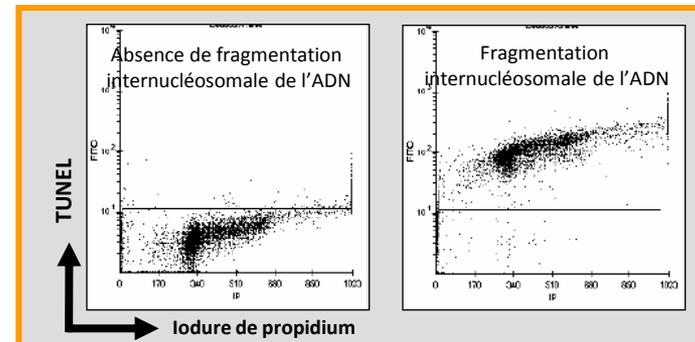
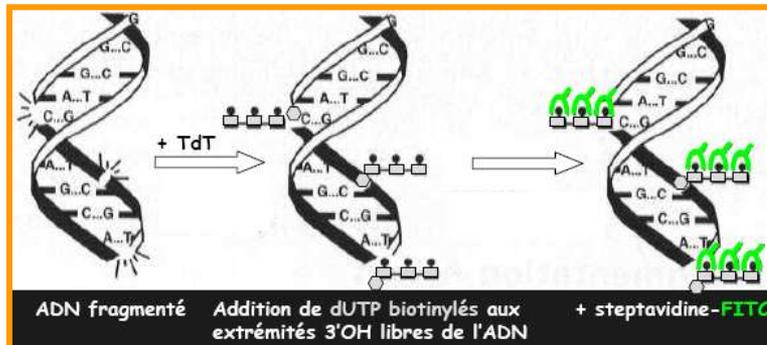
Oxydation de l'ADN

Dégradation simple et/ou double brin

- * Coloration de l'ADN à l'iodure de propidium



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



Fluorochromes disponibles pour la détection d'espèces réactives de l'oxygène, du chlore et de l'azote

Espèces réactives de l'oxygène, du chlore 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

H2DCFDA ; Dihydrocalcéine AM; **Dihydrorhodamine 123 (DHR-123)** ; Dihydrorhodamine 6G

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

Aminophényl fluorescéine ; **Dihydrorhodamine 123 (DHR-123)**

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

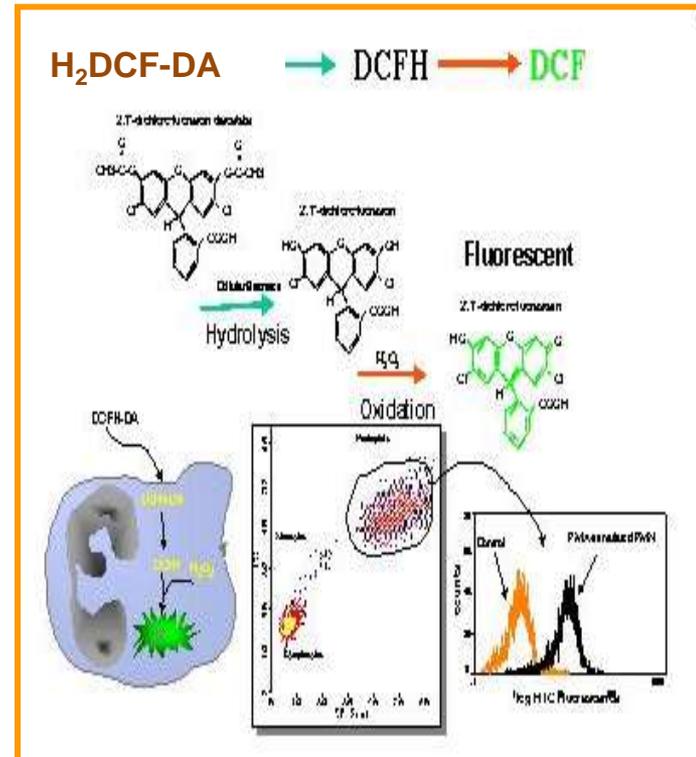
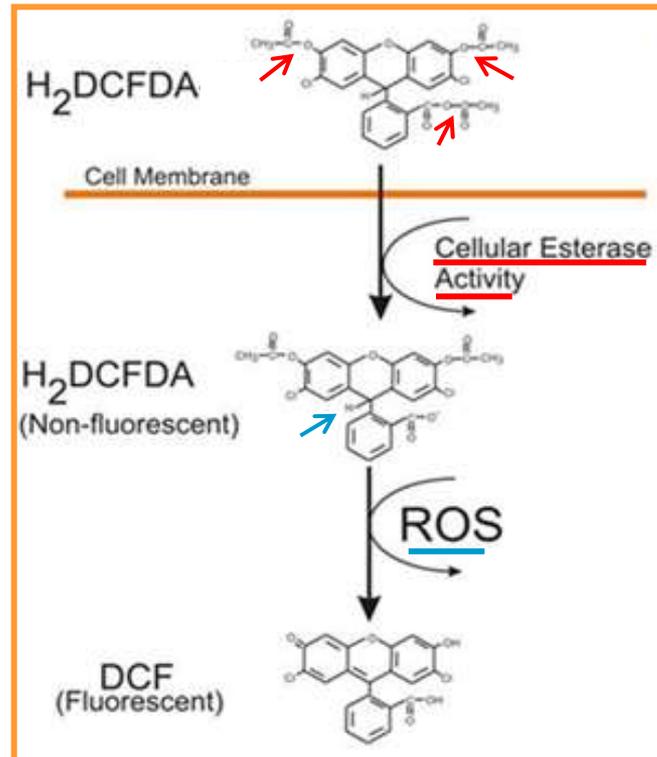
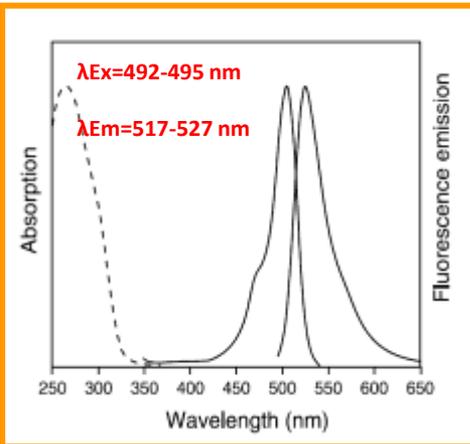
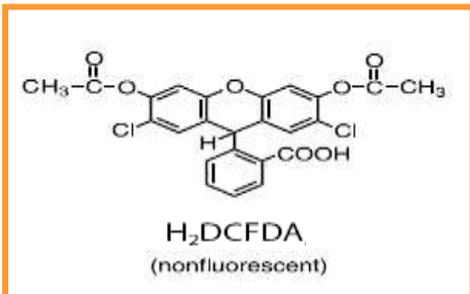
3'-(*p*-Aminophényl) fluorescéine) ; 3'-(*p*-Hydroxyphényl) fluorescéine;
H2DCFDA ; Coelenterazine; **Dihydrorhodamine 123**;
Dihydrorhodamine 6G

Coelentérazine ; **Dihydroéthidium** ; **Mitosox**

Sensibilité du fluorochrome H₂DCF-DA à différentes espèces radicalaires

<i>Reactive species</i>	<i>HPF</i>	<i>APF</i>	<i>DCFH</i>
OH [•]	730	1200	7400
ONOO ⁻	120	560	6600
Hypochlorite ⁻	6	3600	86
Singlet O ₂	5	9	26
Superoxide ⁻	8	6	67
H ₂ O ₂	3	<1	190
NO [•]	6	<1	150
ROO [•]	17	2	710
Autoxidation of the probe	<1	<1	2000

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



Conditions d'analyse du H₂DCF-DA par cytométrie en flux

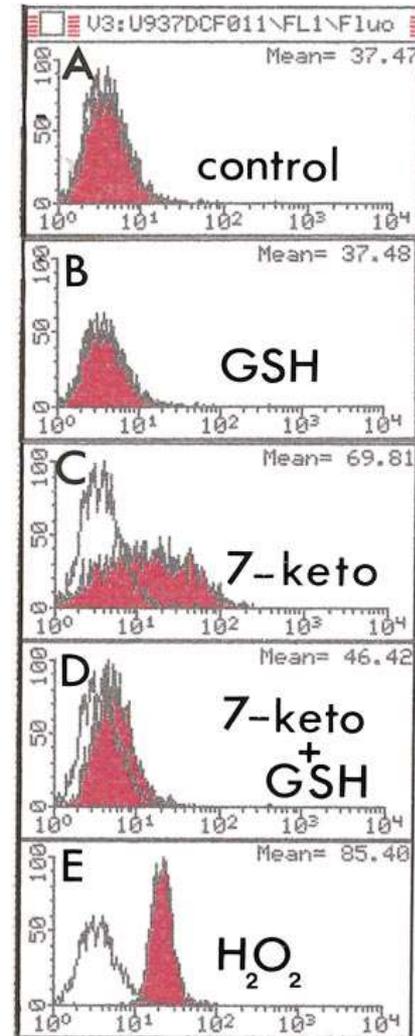
Impairment of ROS production by glutathione during 7-ketocholesterol-induced apoptosis. Analysis of ROS production in untreated U937 cells (control) (A), glutathione-treated cells (10 mmol/l) (GSH) (B), 7-ketocholesterol-treated cells (40 mg/ml) (7-keto) (C), and 7-ketocholesterol (40 mg/ml) plus glutathione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

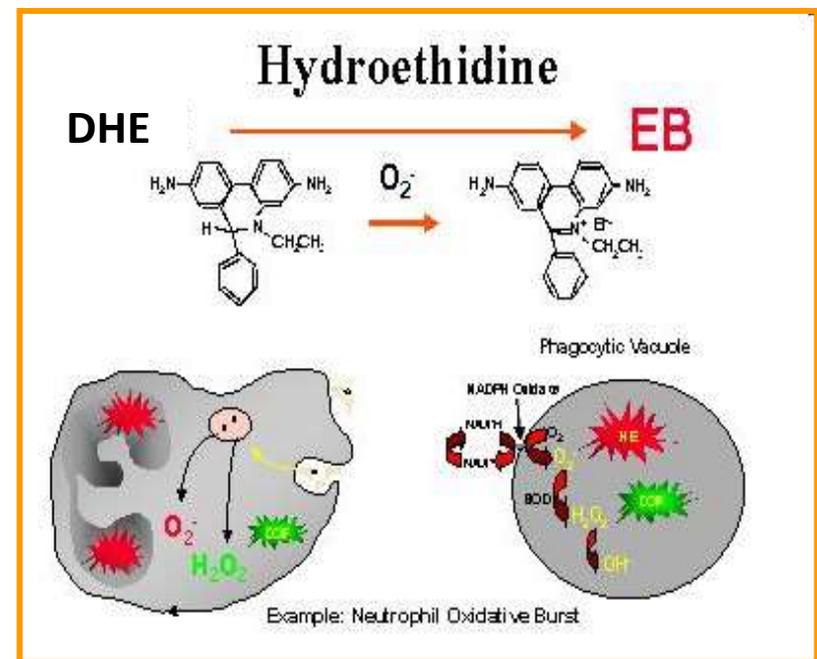
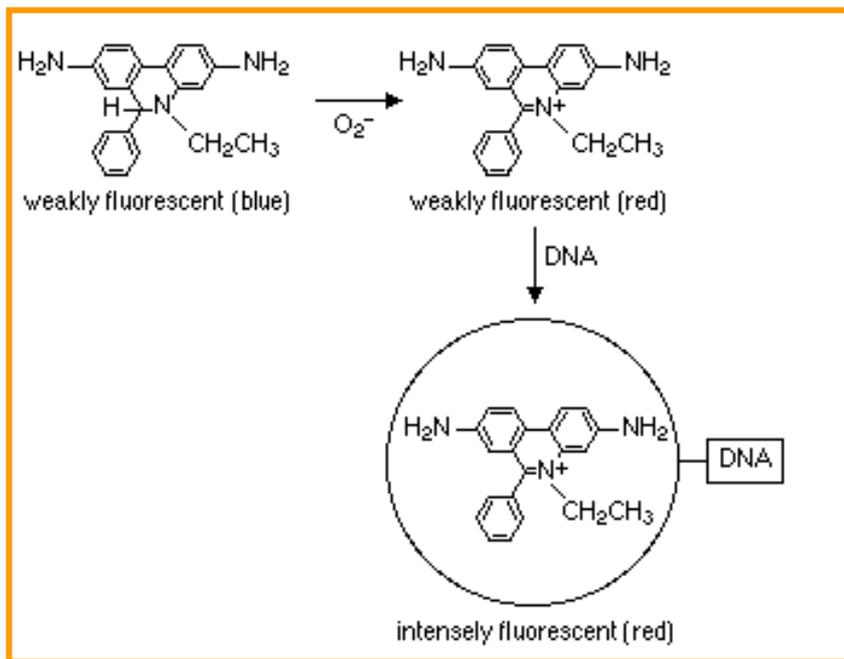
The DCF fluorescence resulting from the oxidation of H₂DCF-DA was measured on 10,000 cells on a logarithmic scale of fluorescence of four decades of log by using a FACScan flow cytometer; data shown are representative of three independent experiments.

Shaded histograms: ROS production revealed by the fluorescence of DCF resulting from the oxidation of H₂DCF-DA; unshaded histograms: spontaneous fluorescence of the cells.

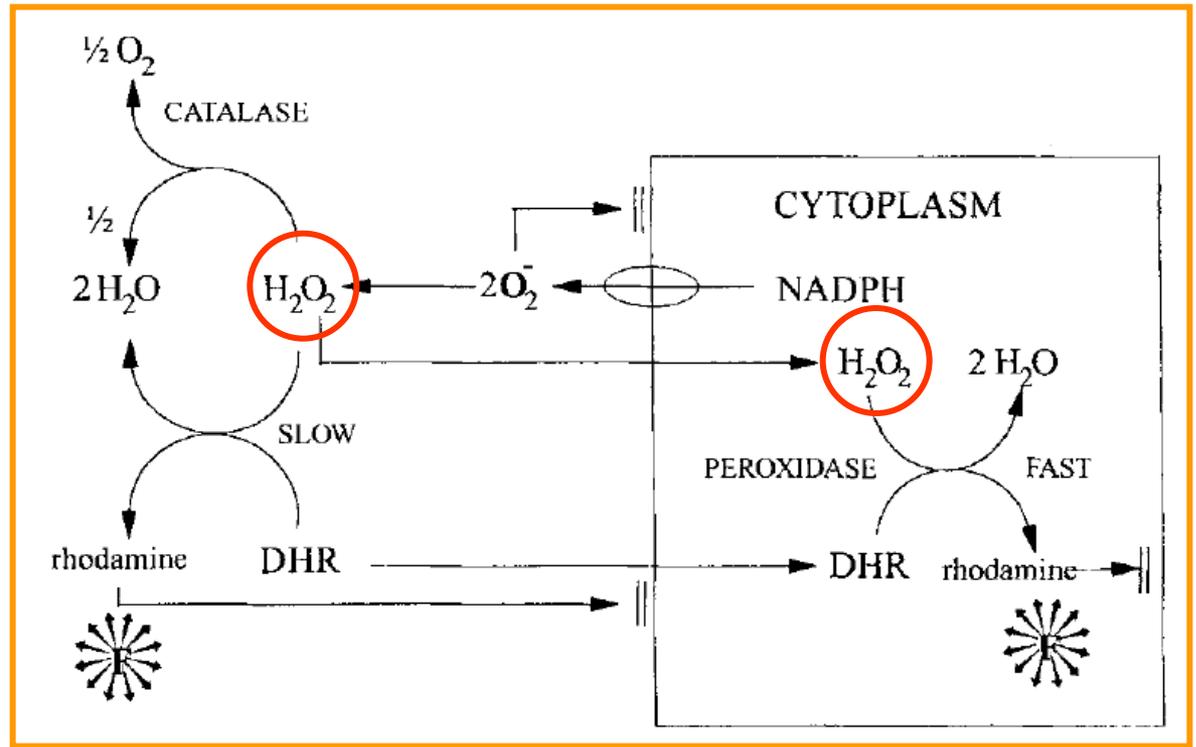
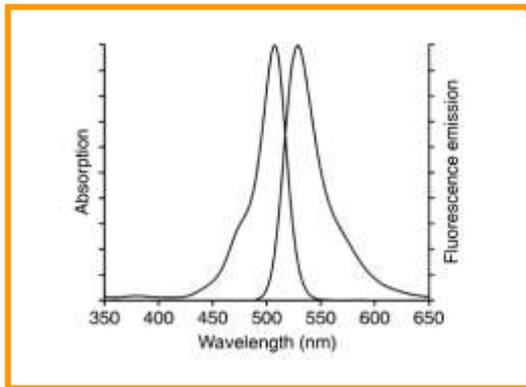
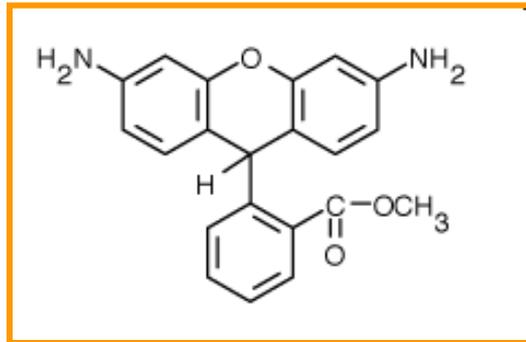
Lizard G et al. *FASEB J* 1998;12, 1651–1663.



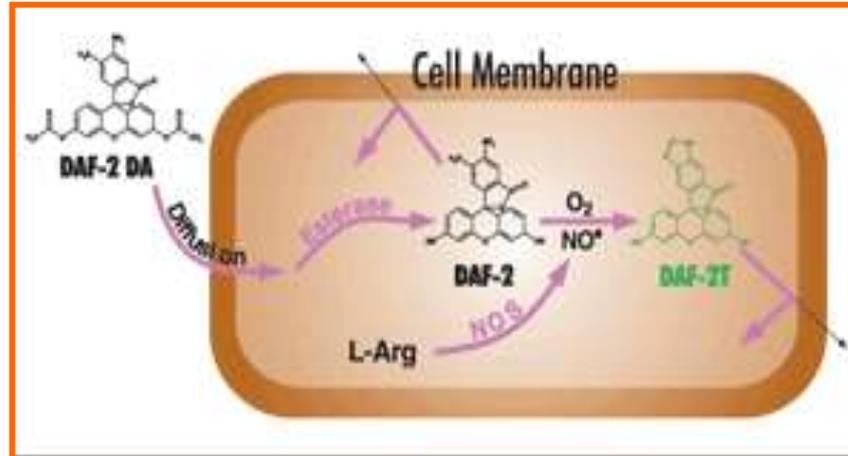
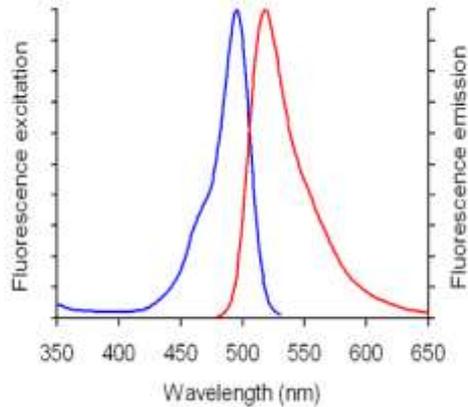
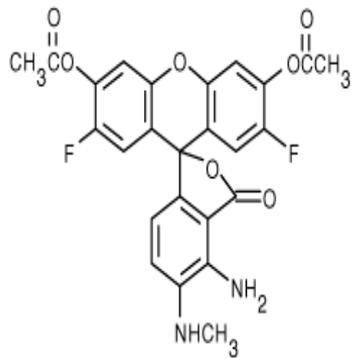
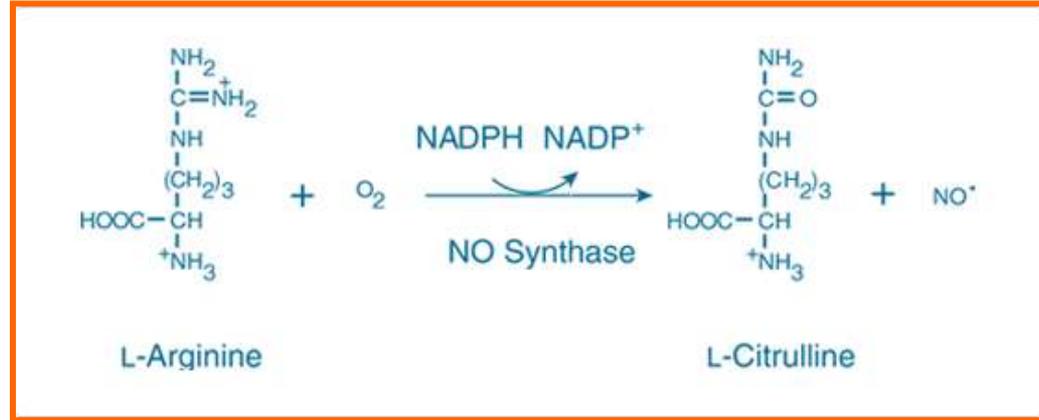
Dihydroethidium (DHE) : anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$



Dihydrorhodamine 123 : H_2O_2 ; HOCl ; ONOO^-



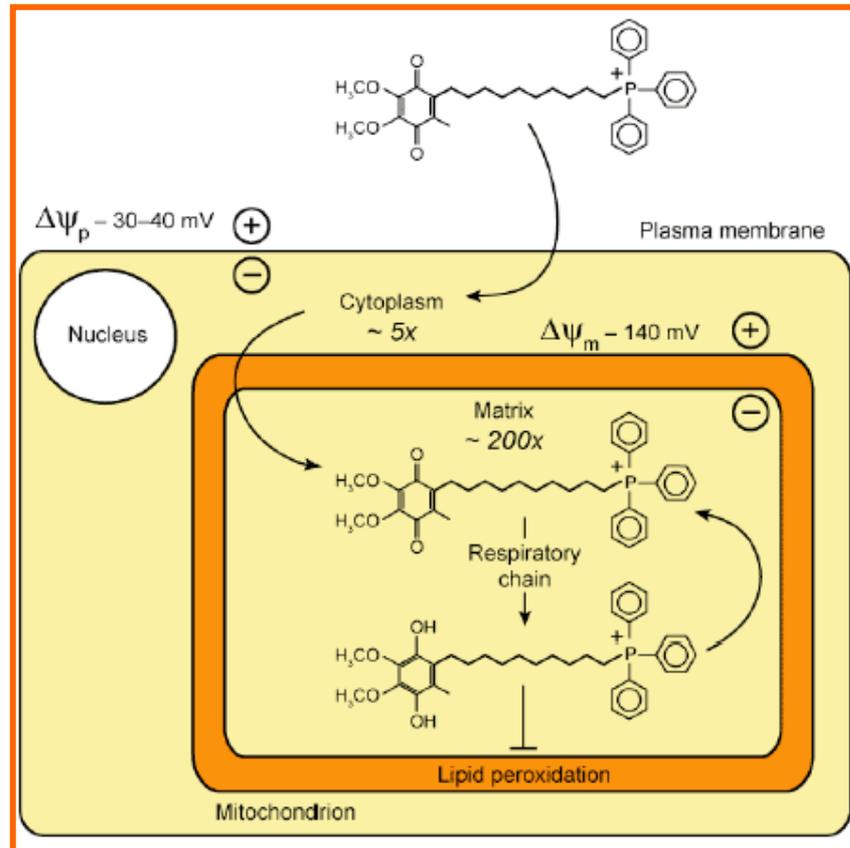
Détection de l'Oxyde Nitreux ($\cdot\text{NO}$) par la Diaminofluorescéine (DAF)



DAF-FM

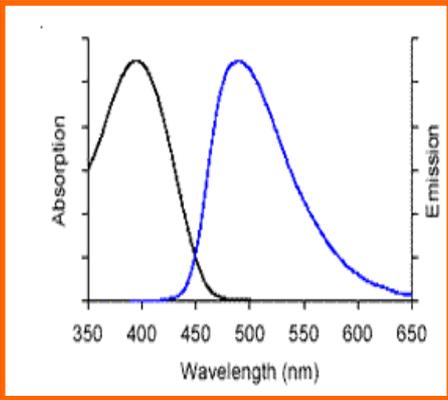
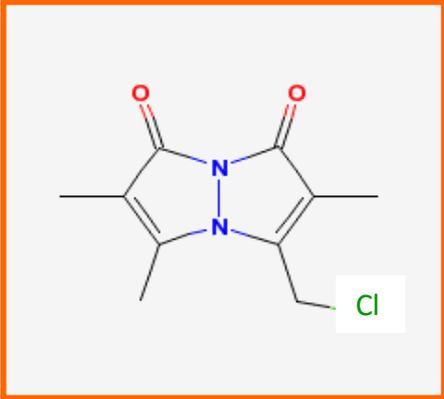
diacétate 4-amino-5-méthylamino-2',7'-difluorofluorescéine diacétate

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

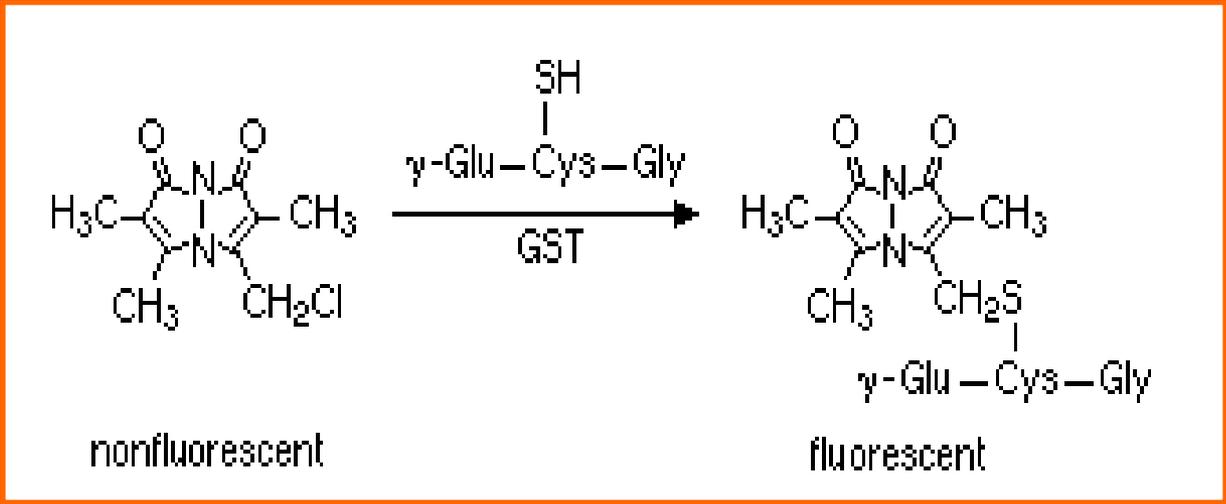


Systeme Non-Enzymatique de Defenses Anti-Radicalaires

Mesure du Taux de Glutathion Réduit (GSH)



Monochlorobimane



Système Enzymatique de Défenses Anti-Radicalaires

Mesure des Taux de SOD et Catalase

- Utilisation d'Anticorps

- * Anti-SOD

CuZn-SOD (SOD1) cytoplasme

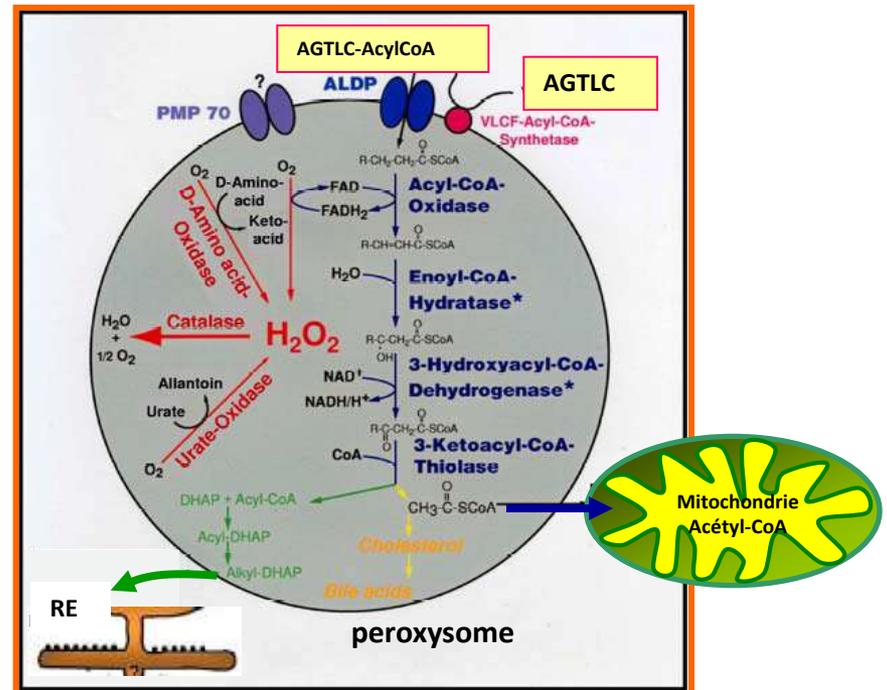
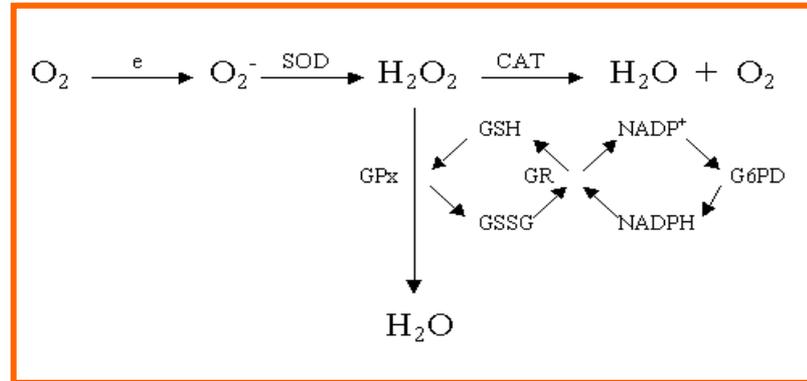
Mn-SOD (SOD2) mitochondries

CuZn-SOD (SOD3) membrane cytoplasmique

- * Anti-catalase (CAT)

- Utilisation de Fluorochromes

- * Activité catalase



Origine des radicaux oxygénés, voies métaboliques associées : développements pharmacologiques

- Confirmation de l'intervention d'un stress oxydant

* 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)) , 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