

Détection de la dysfonction mitochondriale d'origine médicamenteuse à l'aide du test MitoXpress Xtra sur des mitochondries isolées

Auteurs

Ryan McGarrigle
Conn Carey
James Hynes
Agilent Technologies, Inc.

Résumé

Les mitochondries sont des régulateurs fonctionnels de la vie et de la mort de la cellule et jouent donc un rôle central dans l'étiologie de nombreuses maladies. L'altération de la fonction mitochondriale a été identifiée comme un important contributeur à la toxicité d'origine médicamenteuse, ce qui intéresse particulièrement l'industrie pharmaceutique. La méthode de choix pour évaluer la fonction mitochondriale a longtemps été la mesure de la consommation d'oxygène. Cependant, la complexité des mesures et la faible cadence propre aux approches utilisant des électrodes polarographiques traditionnelles telles que l'électrode de Clark ont limité l'applicabilité de ces mesures informatives, en particulier dans le contexte du criblage de composés. Nous décrivons ici comment le test de consommation d'oxygène Agilent MitoXpress Xtra peut résoudre ce problème, en permettant la mesure à haute cadence de la consommation d'oxygène mitochondriale par fluorescence dans un format microplaque à 96 ou 384 puits. Nous verrons également les principaux paramètres d'optimisation et décrirons des données expérimentales, illustrant comment effectuer le criblage de bibliothèques de composés et des analyses de type dose-réponse.

Introduction

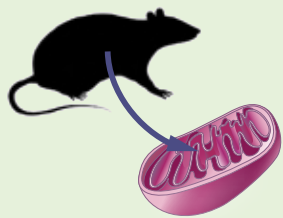
La dysfonction mitochondriale est impliquée dans l'étiologie de nombreux états pathologiques et a été identifiée comme l'un des principaux mécanismes de toxicité d'origine médicamenteuse [1-6]. Historiquement, l'analyse de la consommation d'oxygène a été la méthode de choix pour évaluer la fonction mitochondriale, car elle mesure directement l'activité de la chaîne de transporteurs d'électrons (CTE) et fournit, pour les mitochondries couplées, des informations spécifiques sur la phosphorylation oxydative (OXPHOS). Traditionnellement, la mesure de la consommation d'oxygène de mitochondries isolées est réalisée à l'aide de méthodes polarographiques à faible cadence. Mais cette approche ne fournit ni la cadence ni la commodité nécessaires pour examiner plusieurs conditions expérimentales en parallèle, qu'il s'agisse de cribler des bibliothèques de composés, d'évaluer les relations dose-réponse ou de déterminer le mécanisme d'action. Nous décrivons ici comment le test de consommation d'oxygène Agilent MitoXpress Xtra permet d'obtenir des informations sur la vitesse de consommation d'oxygène des mitochondries tout en profitant de la commodité et de la cadence des tests sur lecteurs de plaques à fluorescence. La cadence fournie, ainsi que les volumes de mesure plus faibles que dans les analyses polarographiques traditionnelles, permettent de générer des jeux de données notablement plus importants à partir d'une seule préparation mitochondriale.

L'efficacité de ces mesures est assurée par le capteur MitoXpress Xtra. Puisque l'émission du capteur est annulée par l'oxygène moléculaire, la diminution de la concentration en oxygène dissous due à l'activité de la CTE se traduit par une augmentation du signal de MitoXpress Xtra. Une couche d'huile minérale est déposée dans chaque puits du test pour limiter la diffusion de l'oxygène ambiant et des mesures de cinétique sont effectuées avec un lecteur de plaques à fluorescence afin de permettre une évaluation pratique et à haute cadence de l'activité de la CTE. La baisse des vitesses de variation du signal par rapport à un contrôle non traité suggère une inhibition de l'activité de la CTE, tandis que l'augmentation du signal indique une augmentation de la respiration, qui est due soit à une augmentation de l'activité de la CTE, soit au découplage entre la CTE et OXPHOS. De plus, comme avec les approches polarographiques traditionnelles, l'utilisation de substrats spécifiques de complexes de la CTE peut fournir des informations sur le mécanisme. Mais l'approche à base de microplaques suivie ici permet de mesurer toutes les conditions utiles en parallèle, simplifiant la configuration du test et évitant les erreurs d'interprétation des données dues à la détérioration progressive de la préparation mitochondriale.

Nous présentons ici un aperçu de la manière dont ces mesures sont effectuées, en insistant sur les principaux paramètres d'optimisation et sur l'application de ces mesures au criblage de composés et aux analyses dose-réponse.

Étapes préalables à l'analyse

1. Préparer les solutions mères de glutamate/malate, succinate et ADP
2. Préparer le FCCP, la roténone et l'antimycine A
3. Isoler les mitochondries à partir de foie de rat

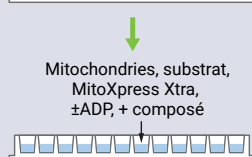


Flux de tâches de l'analyse

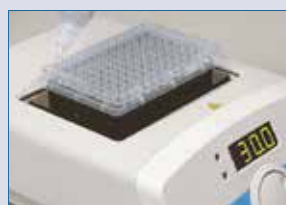


Charger les mitochondries et les substrats sur la plaque

Microplaque de 96 ou 384 puits



Mitochondries, substrat, MitoXpress Xtra, $\pm$ ADP, + composé



Ajouter MitoXpress + huile minérale

Huile minérale

Compatible avec des pipettes multicanaux



Mesurer + analyser

Lecteur de plaques à fluorescence Ordinateur



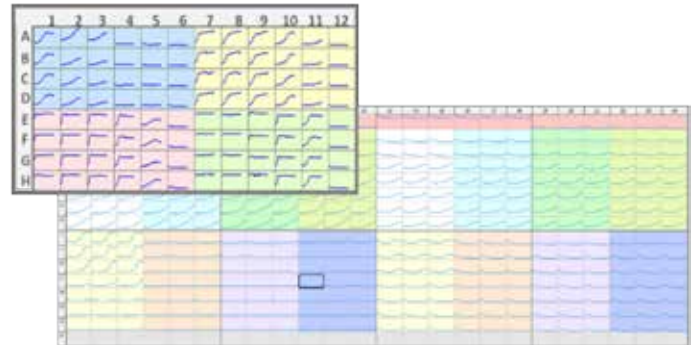
Optimisation de l'analyse

Optimisation de la concentration en protéine mitochondriale

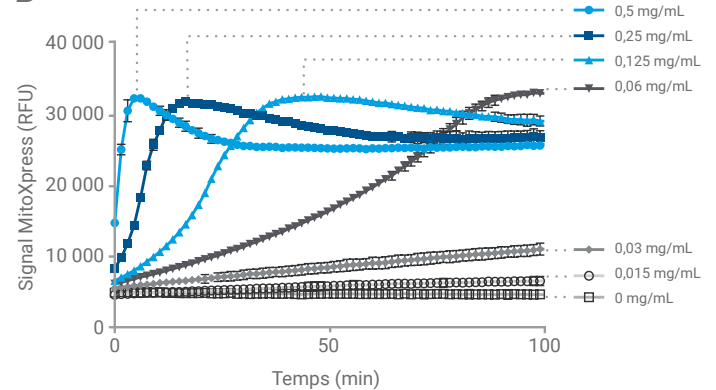
La consommation d'oxygène par mg de protéine mitochondriale est spécifique du tissu et peut être affectée par la procédure d'isolement employée. La consommation d'oxygène est également influencée par les substrats respiratoires fournis et par la disponibilité de l'ADP. Afin de garantir la fiabilité de l'analyse, les composés doivent être testés à des concentrations en protéine optimisées de façon à observer de fortes variations de signal pour les échantillons non traités, rendant ainsi plus fiable la détection de l'augmentation ou de la baisse d'activité. Contrairement aux analyses polarographiques traditionnelles, la cadence permise par l'utilisation du format microplaque (à 96 ou 384 puits) facilite cette optimisation.

La figure 1 présente des données expérimentales dans lesquelles les dilutions protéiques sont évaluées avec des substrats respiratoires adaptés, en présence et en absence d'ADP. L'augmentation de la concentration en protéine mitochondriale se traduit par une diminution plus rapide de l'oxygène, qui est détectée en temps réel sous la forme d'une augmentation plus rapide du signal de la sonde. Comme le montre clairement la figure 1A, la cadence rendue possible par l'utilisation de microplaques permet d'évaluer de multiples conditions sur une seule plaque.

A



B



C

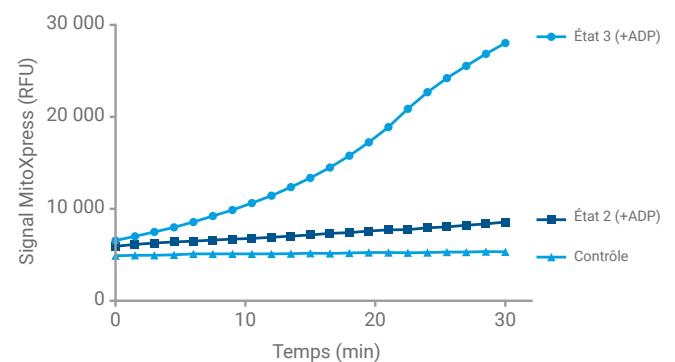


Figure 1. (A) Exemples de disposition de plaque et courbes de signal obtenues pour les formats à 96 et 384 puits. Chaque groupe de l'exemple à 96 puits correspond à un titrage protéique avec les substrats suivants : glutamate/malate (en bleu), succinate (en jaune), glutamate/malate + ADP (en rose) et succinate + ADP (en vert). (B) Exemple de courbes de signal du titrage protéique pour la respiration induite par l'ADP avec le succinate (de 0 à 0,5 mg/mL). (C) Effet de l'addition d'ADP sur la consommation en oxygène mitochondriale.

Les concentrations suivantes sont représentatives des concentrations protéiques optimisées typiques :

- Respiration basale avec le glutamate/malate : 1 mg/mL
- Respiration induite par l'ADP avec le glutamate/malate : 0,125 mg/mL
- Respiration basale avec le succinate : 0,5 mg/mL
- Respiration induite par l'ADP avec le succinate : 0,25 mg/mL

La figure 1B illustre un exemple de variations du signal dues à l'optimisation de la concentration protéique de la respiration induite par l'ADP avec le succinate (puits E7–H12). Une concentration de 0,25 mg/mL entraîne une variation du signal rapide mais mesurable, qui est parfaitement adaptée au criblage de composés susceptibles d'inhiber les complexes II–IV de la CTE.

Une telle optimisation facilite également l'évaluation du couplage mitochondrial, fournissant des informations sur la qualité de la préparation mitochondriale. Cette évaluation s'effectue en déterminant le rapport entre les vitesses en présence d'ADP (état 3) et les vitesses en présence du substrat uniquement (état 2). Plus ce rapport du contrôle respiratoire (RCR) est élevé, meilleur est le couplage entre l'activité de la CTE et la production d'ATP. Des valeurs basses indiquent au contraire une dégradation des membranes mitochondriales. Les données expérimentales représentées dans la figure 1C illustrent l'augmentation de l'activité entraînée par l'addition d'ADP.

Mesure de l'altération de la fonction mitochondriale

La figure 2 illustre des données typiques de l'altération de la fonction mitochondriale. L'antimycine A bloque le complexe III de la chaîne de transporteurs d'électrons, inhibant ainsi la consommation d'oxygène, tandis que l'agent découplant classique FCCP entraîne une augmentation de la consommation d'oxygène en dissipant le potentiel membranaire mitochondrial.

Lors du criblage de composés, les mesures sont généralement effectuées dans l'état 2 (sans ADP) pour le criblage d'agents découplants et dans l'état 3 (après addition d'ADP) pour le criblage d'inhibiteurs. Le format microplaque permet d'atteindre une cadence importante de par la possibilité de réaliser les mesures sur des plaques à 96 ou 384 puits. C'est un avantage notable par rapport aux approches polarographiques à faible cadence traditionnelles.

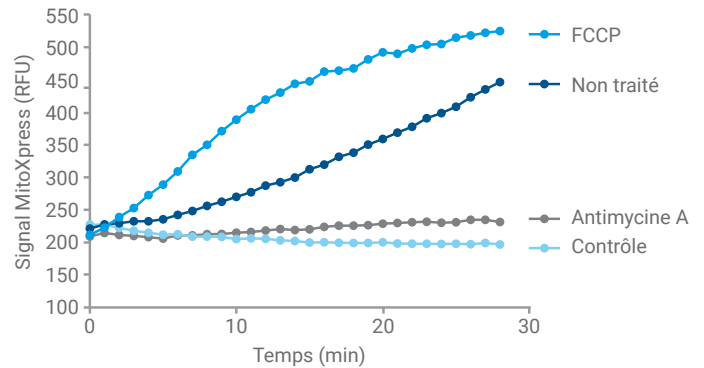


Figure 2. Données typiques illustrant la détection de l'altération de la fonction mitochondriale à l'aide du test de consommation d'oxygène MitoXpress Xtra.

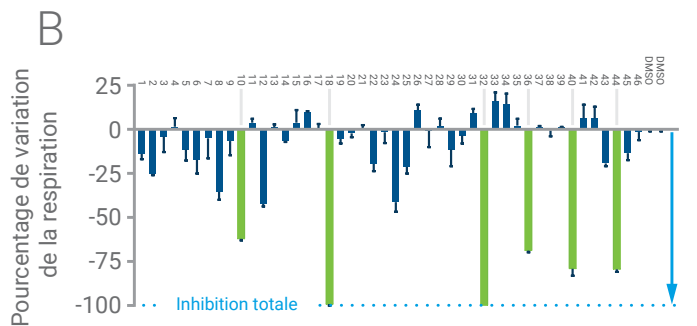
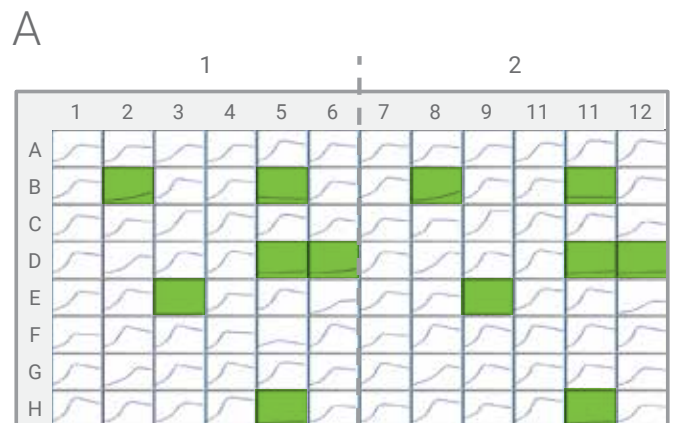


Figure 3. 46 composés peuvent être évalués en double sur une même plaque avec la disposition présentée en A. Deux contrôles (DMSO) sont inclus sur la plaque. Les données sont présentées sous forme de variation du pourcentage d'inhibition (B). Les composés pour lesquels l'inhibition est importante sont signalés et les données sont transposées pour l'analyse dose-réponse (en vert).

La figure 3 illustre comment 46 composés peuvent être criblés en double sur une seule et même plaque à 96 puits. Les composés sont ajoutés dans des puits parallèles sur chaque moitié de la plaque. Les baisses importantes de la respiration sont facilement identifiables (sur fond vert).

Les analyses dose-réponse peuvent être réalisées pour plusieurs composés sur une seule plaque et les données sont facilement transposables en valeurs de CI_{50}/CD_{50} . Les données sur les vitesses des courbes de signal sont représentées en fonction des concentrations utilisées dans les analyses dose-réponse (figure 4B). Les résultats peuvent être comparés à la littérature ou aux données internes du laboratoire.

Augmentation de la cadence

Les mesures effectuées sur des mitochondries isolées à l'aide de MitoXpress Xtra sont compatibles avec le format plaque à 384 puits, permettant une augmentation supplémentaire d'un facteur quatre. Il est encore possible d'accroître la cadence en employant des techniques de manipulation des liquides, comme des pipettes à 384 canaux à une étape et des systèmes d'automatisation basiques. Le test permet d'utiliser les mitochondries directement après l'isolement sans préparation des plaques et le temps d'analyse est généralement d'environ 30 à 45 min. Il est donc possible d'effectuer plusieurs expériences par jour/préparation.

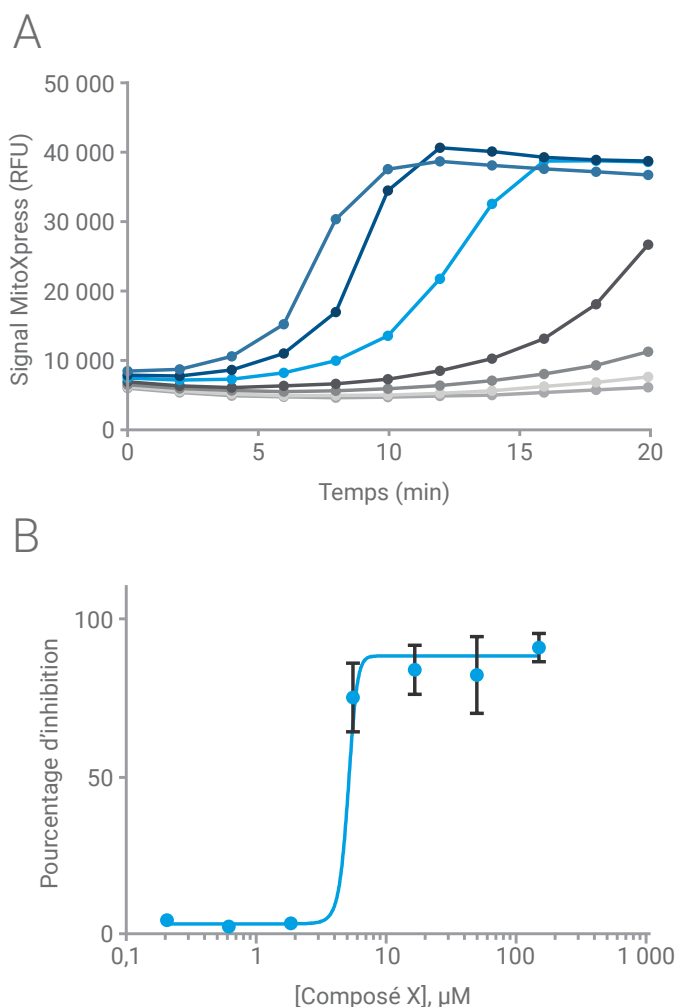


Figure 4. (A) Courbes de signal représentatives d'une dose-réponse du composé d'intérêt (B) Courbe CI_{50} représentative d'un inhibiteur mitochondrial obtenue à partir des pentes mesurées. Les données ont été normalisées par rapport aux vitesses des contrôles non traités.

Matériel et méthodes (protocole)

Préparation de la plaque à 96 puits

- Préparer les plaques sur un chauffe-plaques à 30 °C.
- Reconstituer la sonde MitoXpress Xtra dans 1 mL de H₂O. Diluer au 1/10^e dans le tampon de mesure (saccharose 250 mM, KCl 15 mM, EGTA 1 mM, MgCl₂ 5 mM, K₂HPO₄ 30 mM, pH 7,4) et ajouter 100 µL dans chaque puits.
- Pour tester les composés, ajouter 1 µL de composé dans un solvant approprié aux puits du test.
- Diluer les mitochondries à la concentration souhaitée dans le tampon de mesure et ajouter 50 µL aux puits du test. Dissoudre le substrat (succinate ou glutamate/malate) et l'ADP (si nécessaire) dans le tampon de mesure, puis ajouter 50 µL de cette solution aux puits du test pour atteindre une concentration en substrat finale de 25 mM (succinate) ou 12,5/12,5 mM (glutamate/malate) et une concentration en ADP finale de 1,65 mM.
- Ajouter 100 µL d'huile minérale (préchauffée à 30 °C) dans chaque puits. Cela augmente la sensibilité du test en réduisant les interférences par l'oxygène ambiant.

Remarque : le temps de préparation des plaques doit être le plus court possible. En cas d'utilisation d'une plaque à 384 puits, modifier les volumes en conséquence (voir les ressources techniques supplémentaires).

Mesure

- Insérer la plaque préparée dans le lecteur de plaques à fluorescence préréglé sur 30 °C.
- Mesurer le signal du capteur à intervalles de 1,5 min pendant 10 à 30 min à des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de respectivement 380 et 650 nm, comme indiqué dans le manuel d'utilisation.
- La cinétique de l'intensité de la fluorescence de la sonde MitoXpress Xtra a été mesurée à l'aide d'un lecteur de plaques à fluorescence. Les réglages pour certains lecteurs peuvent être demandés à cellanalysis.support@agilent.com ou sont disponibles dans le guide de l'instrument [11].
- L'intensité du signal (en RFU) a été représentée en fonction du temps, comme décrit en [10], en utilisant le modèle pré-configuré de traitement des données de BMG (qui peut être demandé à l'adresse cellanalysis.support@agilent.com).

Si l'équipement le permet, la fluorescence en temps résolu (TRF) doit être utilisée pour maximiser les performances analytiques. Le manuel d'utilisation de MitoXpress Xtra indique les réglages recommandés pour les mesures de TRF. Les protocoles instrumentaux sont disponibles sur agilent.com (voir les ressources supplémentaires).

Remarque : les mitochondries doivent être fraîchement préparées en suivant le protocole de l'utilisateur et ne doivent pas rester sur la glace plus longtemps que la durée recommandée dans la littérature [9] (en général, moins de 4 à 6 h pour les mitochondries de foie de rat). Les tampons de mesure doivent être fraîchement préparés le jour des mesures.

Traitement des données

Les données sont généralement interprétées d'une façon semi-quantitative en déterminant la vitesse d'augmentation du signal du capteur MitoXpress Xtra. Cette vitesse est ensuite utilisée pour comparer les échantillons traités et non traités et obtenir des relations dose-réponse.

Les vitesses peuvent être déterminées en mesurant les pentes des portions linéaires des courbes cinétiques. Le pourcentage d'activité peut être calculé en normalisant les résultats par rapport aux contrôles non traités :

$$\text{Pourcentage d'activité} = (\text{vitesse de l'échantillon traité} / \text{vitesse du contrôle non traité}) \times 100$$

Les courbes CI₅₀/CD₅₀ représentent le pourcentage d'activité en fonction de la concentration en composé (une échelle logarithmique en base 10 est utilisée en abscisse).

Même si elle n'est généralement pas nécessaire, une évaluation plus quantitative peut être réalisée en transposant les données de fluorescence en concentrations d'oxygène [9].

Conclusion

Le test de consommation d'oxygène MitoXpress Xtra permet une évaluation pratique, sensible et directe de la fonction mitochondriale. Puisque ce dosage par fluorescence est compatible avec les plaques à 96 et 384 puits, il fournit la cadence requise pour le criblage de composés et les analyses dose-réponse. Toutes les conditions expérimentales sont préparées en parallèle et aucune intervention supplémentaire n'est nécessaire pendant les mesures, offrant ainsi une procédure d'analyse simple et évolutive. En outre, la quantité de données pouvant être générées à partir d'une seule préparation mitochondriale est maximisée grâce aux temps de mesure raccourcis (< 30 min), à la cadence élevée et aux faibles volumes de mesure (< 150 µL) de la méthode. La disponibilité de ces solutions coïncide avec l'adoption croissante de ces réactifs aussi bien dans les laboratoires universitaires que dans le cadre de la découverte de médicaments, ce qui permet de cribler des médicaments en fonction de leurs effets sur les mitochondries, de faciliter la conception de l'analyse et d'éviter les effets toxiques.

Ressources techniques supplémentaires

- Publications : [6–9]
- Manuel d'utilisation du test de consommation d'oxygène MitoXpress Xtra [10]
- Protocole d'isolement et de mesures des mitochondries avec le test de consommation d'oxygène MitoXpress
- Guide de configuration de l'instrument : fiches techniques [11]
- Webinaire : Challenges in Assessing Mitochondrial Toxicities and Liabilities in Drug Discovery (Obstacles à l'évaluation de la toxicité et de l'altération mitochondriales dans la découverte de médicaments) [12]

Références

1. Wallace, K.B., *Mitochondrial off targets of drug therapy*. Trends in Pharmacological Sciences, 2008. **29**(7): p. 361–366.
2. Mattson, M.P. and G. Kroemer, *Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection*. Trends in Molecular Medicine, 2003. **9**(5): p. 196–205.
3. Sullivan, P.G. and M.R. Brown, *Mitochondrial aging and dysfunction in Alzheimer's disease*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2005. **29**(3): p. 407–10.
4. Bender, A., et al., *High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease*. Nat Genet, 2006. **38**(5): p. 515–7.
5. Lin, M.T. and M.F. Beal, *Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases*. Nature, 2006. **443**: p. 787.
6. Hynes, J., et al., *Investigation of drug-induced mitochondrial toxicity using fluorescence-based oxygen-sensitive probes*. Toxicol Sci, 2006. **92**(1): p. 186–200.
7. Will, Y., et al., *Analysis of mitochondrial function using phosphorescent oxygen-sensitive probes*. Nature Protocols, 2007. **1**: p. 2563.
8. Hynes, J., R.L. Swiss, and Y. Will, *High-Throughput Analysis of Mitochondrial Oxygen Consumption*. (1940–6029 (Electronic)).
9. Hynes, J., C. Carey, and Y. Will, *Fluorescence-Based Microplate Assays for In Vitro Assessment of Mitochondrial Toxicity, Metabolic Perturbation, and Cellular Oxygenation*. Curr Protoc Toxicol, 2016. **70**: p. 2.16.1–2.16.30.
10. MitoXpress Xtra Oxygen Consumption User Manual. Disponible sur : https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/MitoXpress_Xtra_Oxygen_Consumption_Assay.pdf.
11. Instrument Set-up Guide. Disponible sur : <https://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/mitoxpress-ph-xtra-consumables/mitoxpress-xtra-oxygen-consumption-assay#literature>.
12. Challenges in Assessing Mitochondrial Toxicities and Liabilities in Drug Discovery. Disponible sur : https://seahorseinfo.agilent.com/acton/fs/blocks/showLandingPage/a/10967/p/p-0182/t/page/fm/0?utm_term=Register%20Now&&utm_content=landing+page&utm_source=Act-On+Software&utm_medium=landing+page&sid=TV2:1Z6zBff-8C#register.

www.agilent.com/chem/cell-analysis

**Destiné à la recherche uniquement.
Ne pas utiliser à des fins diagnostiques.**

Ces informations peuvent être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
Imprimé aux États-Unis, le 8 mars 2019
5994-0784FR

