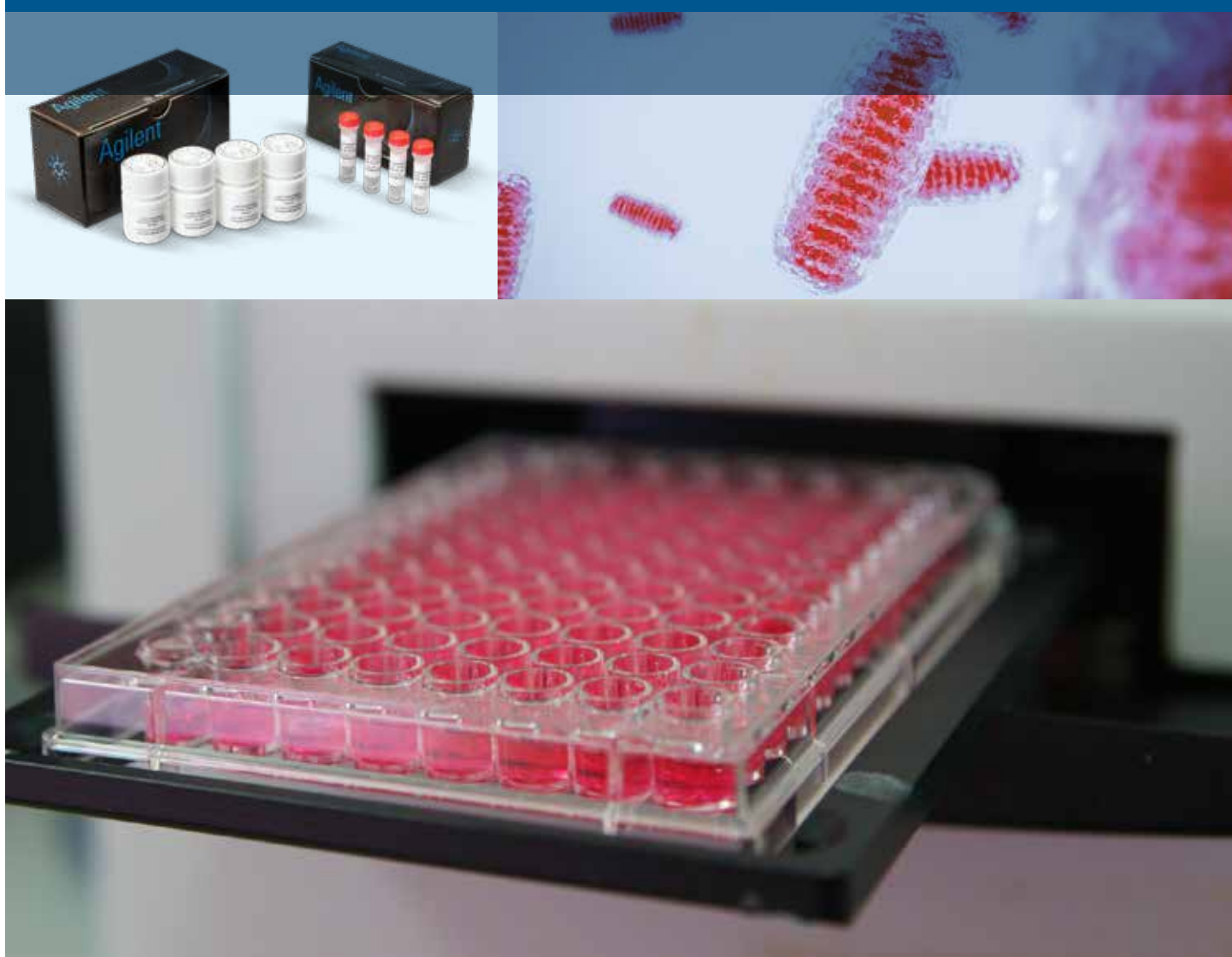


Solutions Agilent pour la mesure du métabolisme cellulaire sur votre lecteur de plaques



Exploitez pleinement le potentiel de votre lecteur de plaques



Découvrez comment le test de consommation d'oxygène MitoXpress Xtra d'Agilent, le test de la glycolyse pH-Xtra et le test oxygène intracellulaire MitoXpress peuvent vous aider à :

- Mesurer l'activité mitochondriale et la glycolyse dans des cellules vivantes.
- Dépasser la limite des analyses cellulaires indirectes pour des évaluations de mesure et de mélange informatives directes de la fonction mitochondriale, de l'activité glycolytique et de l'oxygénation cellulaire.
- Multiplexer d'autres analyses pertinentes.
- Aller au-delà de la monocouche pour les mesures de cellules en suspension, de cultures microbiennes et de cultures spécifiques en 3D.
- Augmenter votre cadence avec des analyses métaboliques simples à mélanger et à mesurer dans des microplaques normalisées.
- Mesurer facilement des mitochondries isolées avec une cadence élevée.
- Explorer la connexion entre la disponibilité de l'oxygène et le métabolisme cellulaire altéré.

Test de consommation d'oxygène MitoXpress Xtra

Mesurer la consommation d'oxygène cellulaire



Les mesures de la consommation d'oxygène sont des indicateurs fonctionnels clés du métabolisme cellulaire et plus spécifiquement de la fonction mitochondriale. L'utilisation de ce type de mesure pour examiner le métabolisme des cellules vivantes offre des indications mécaniques importantes sur la fonction cellulaire et le rôle d'un métabolisme perturbé dans la progression de la maladie.

Le test de consommation d'oxygène MitoXpress Xtra est un outil précieux pour étudier le métabolisme. Il permet une mesure cinétique simple du métabolisme aérobie et peut être réalisé sur des microplaques normalisées à l'aide d'un lecteur de plaques fluorescent. Durant la respiration, la concentration en oxygène dans l'échantillon diminue, ce qui provoque une augmentation du signal du MitoXpress Xtra, et permet une mesure de la consommation d'oxygène.

La Figure 1 représente un examen de la consommation d'oxygène de cardiomyocytes humains produits par iPSC (Cor.4U, NCardia) en utilisant le test MitoXpress Xtra. Dans les cellules traitées avec un découpleur FCCP, le taux de variation du signal a augmenté en raison d'une augmentation de la respiration. En revanche, le traitement avec un inhibiteur de la respiration mitochondriale, l'antimycine A, provoque l'effet opposé, le taux de variation du signal décroît en raison de la diminution de la consommation d'oxygène. Ces mesures peuvent être réalisées avec une large gamme de formulations de milieux, ce qui permet une certaine souplesse dans la conception du test.

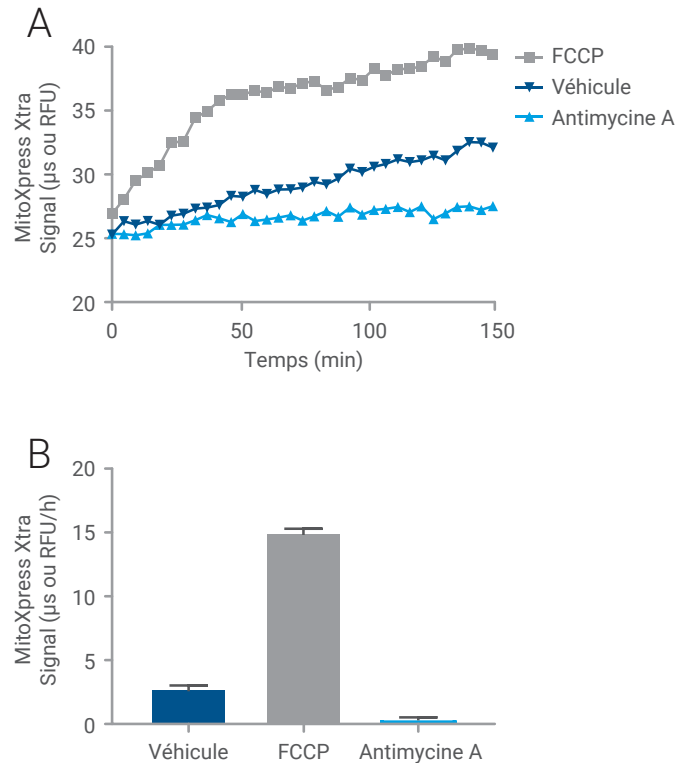


Figure 1. (A) Examen de la consommation d'oxygène Cor.4U (NCardia) mesurée en utilisant le MitoXpress Xtra. Quand les cellules respirent, elles appauvrissent la quantité d'oxygène dissous, ce qui provoque une augmentation du signal MitoXpress Xtra. Le traitement avec l'antimycine A (un inhibiteur de la respiration mitochondriale) inhibe la consommation d'oxygène, et donc réduit le taux de variation du signal du capteur. Le traitement avec le FCCP (découpleur) augmente la consommation d'oxygène, ce qui augmente le taux de variation du signal du capteur. (B) Ces effets métaboliques peuvent être évalués en analysant le taux de variation du signal MitoXpress Xtra, les taux le plus bas indiquant une activité métabolique aérobie réduite.

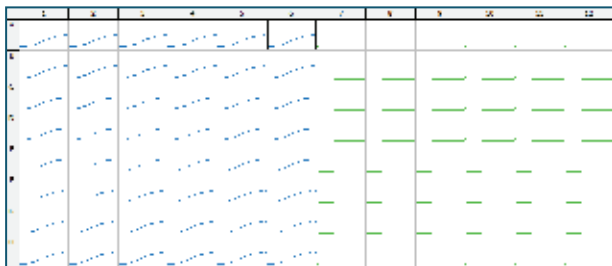
Les solutions MitoXpress pour la toxicologie

Dépister la toxicité induite par les médicaments

Le dysfonctionnement mitochondrial induit par les médicaments, mis en cause dans certaines catégories de médicaments, contribue de manière significative à l'intoxication du foie, du cœur, des reins, des muscles et du système nerveux central.

Grâce au format des microplaques et aux performances de l'analyse, le test MitoXpress Xtra propose une solution adaptée pour le dépistage précoce du rôle mitochondrial induit par les médicaments et la génération de courbes de dose-réponse (Figure 2). Ces études peuvent être réalisées avec une gamme de modèles *in vitro* pertinents, y compris des hépatocytes primaires et des cardiomyocytes et hépatocytes produits à partir d'hiPSC.

A



B

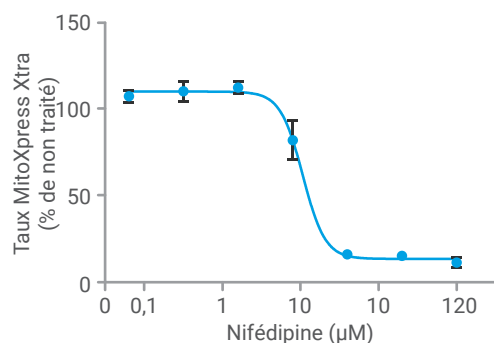
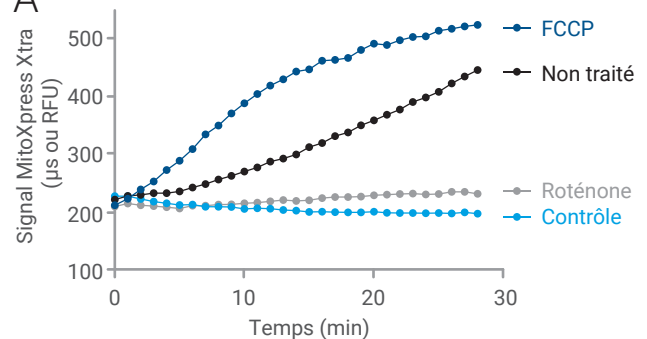


Figure 2. (A) Mesure de la consommation d'oxygène dans des cellules hiPS-HEP (Clontech) en utilisant le MitoXpress Xtra et montrant un facteur Z' d'environ 0,7. (B) Courbe de dose-réponse pour la nifédipine (bloqueur des canaux calciques) sur la respiration mitochondriale dans des cardiomyocytes Cor.4U. Les valeurs ont été obtenues à partir des pentes normalisées par rapport au contrôle du véhicule.

Mesure de la respiration dans des mitochondries isolées

La mesure de la respiration de mitochondries isolées n'a jamais été aussi accessible, grâce au MitoXpress Xtra. Ce test permet des évaluations directes, pratiques et à haut rendement sur des microplaques de l'activité de la chaîne de transport des électrons (ETC) sur des lecteurs de plaques conventionnels (Figure 3A). Il permet un dépistage approprié de composés et l'analyse de la relation dose-réponse (Figure 3B). De plus, l'utilisation de combinaisons spécifiques de substrats et d'inhibiteurs permet une évaluation plus détaillée de la mécanique des complexes ETC individuels et des protéines mitochondriales associées. Comparé aux approches polarographiques traditionnelles, le volume d'échantillon nécessaire comparativement plus bas requis par le test MitoXpress Xtra permet d'obtenir davantage de réplicats par isolement. Ces besoins en faibles volumes d'échantillon augmentent de manière significative la quantité de données pouvant être générée à partir d'une seule préparation mitochondriale, notamment lors de l'utilisation de plaques à 384 puits.

A



B

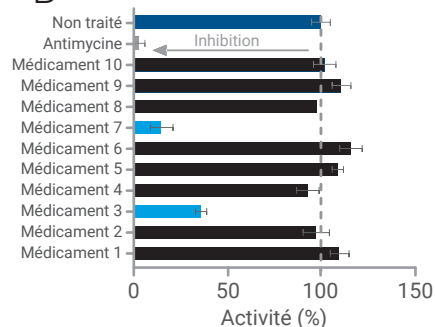


Figure 3. Respiration de mitochondries isolées (foie de rat) (A) montrant une inhibition et un découplage à la suite d'un traitement avec des modulateurs mitochondriaux classiques. (B) Dépistage avec un panel de médicaments inconnus en utilisant les mitochondries de foie de rat afin d'identifier les dysfonctionnements mitochondriaux induits par les médicaments (médicaments 3 et 7).

Les solutions MitoXpress Xtra pour le multiplexage

Évaluation multiplexée et multiparamétrique de la fonction mitochondriale

D'autres renseignements sur la réponse cellulaire peuvent être obtenus en combinant les tests MitoXpress Xtra ou pH Xtra avec la mesure d'autres paramètres de lecteurs de plaques, tels que le potentiel de membrane mitochondriale (MMP), les espèces réactives à l'oxygène (ROS) ou le contenu ATP cellulaire. Cela permet aux chercheurs de mieux caractériser l'impact des traitements ou de l'évolution des conditions sur la fonction cellulaire. Cela aide également à contextualiser les perturbations métaboliques observées sans avoir à mener des traitements en parallèle ou à utiliser des plateformes technologiques disparates.

L'utilisation de mesures multiplexées sur la viabilité d'une cellule (calcéine AM) et de la respiration mitochondriale (MitoXpress Xtra) afin de mieux comprendre l'effet hors cible d'un traitement médicamenteux sur la fonction cellulaire en est un exemple (Figure 4).

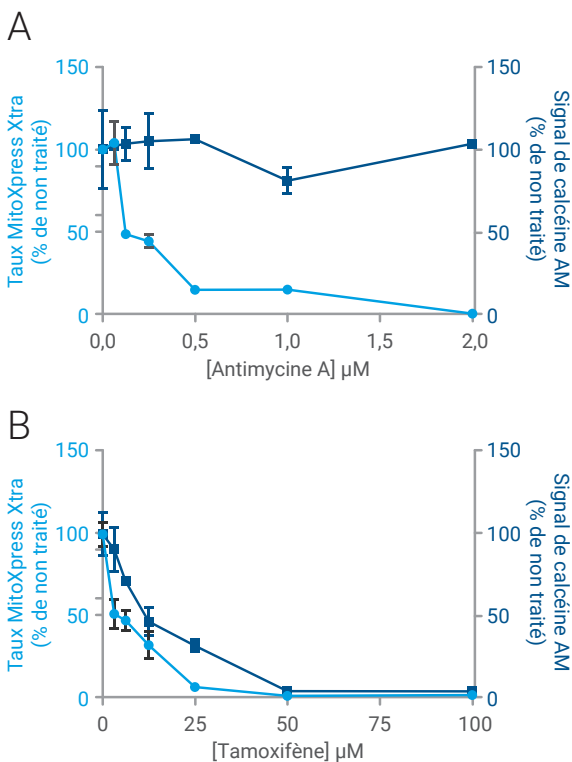


Figure 4. Mesure multiplexée MitoXpress Xtra et de la Calcéine AM dans des cellules HepG2 traitées avec (a) de l'antimycine A et (B) du tamoxifène pendant 24 heures. Les deux médicaments réduisent la respiration mitochondriale (bleu clair). Le tamoxifène a un impact significatif sur la viabilité, alors que l'antimycine A ne réduit pas de manière significative la viabilité de la cellule (bleu foncé). Cela suggère que l'impact de l'antimycine A sur la respiration est la conséquence d'un mécanisme mitochondrial plus direct.

Les indicateurs de fonction mitochondriale tels que le MMP et la production de ROS peuvent aussi être évalués en parallèle de la consommation d'oxygène. Ces paramètres sont particulièrement intéressants pour l'étude du rôle des mitochondries dans la physiologie cellulaire.

La Figure 5 illustre les mesures multiplexées de MitoXpress Xtra et du MMP (en utilisant JC-1) dans des cellules HepG2 traitées avec des modulateurs métaboliques : le FCCP et l'antimycine A. Les deux composés diminuent le potentiel de membrane. Cependant des effets distincts sur la consommation d'oxygène peuvent être observés, ce qui montre que la mesure de multiples paramètres pertinents peut apporter un éclairage supplémentaire.

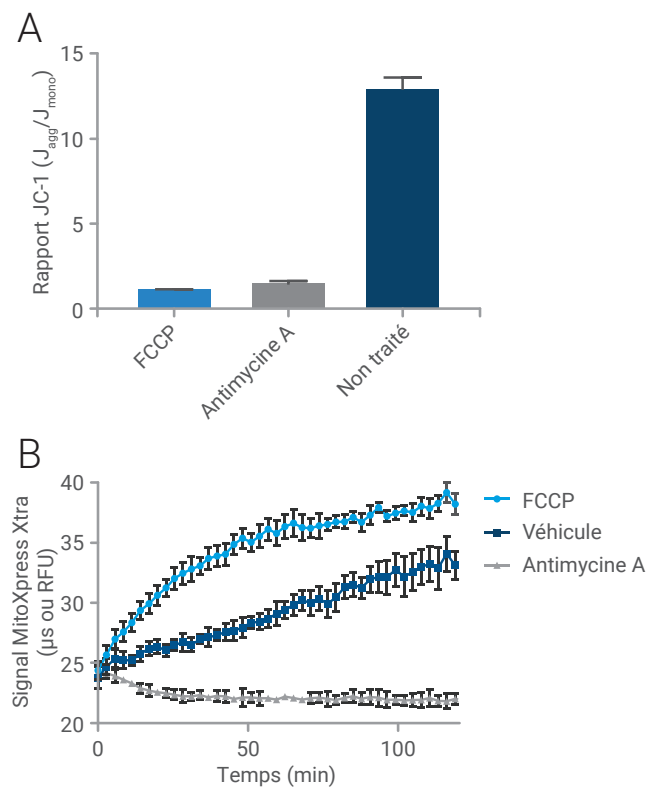


Figure 5. Mesures de MitoXpress Xtra et JC-1 dans le même puits. Les cellules HepG2 ont été traitées avec de l'antimycine A ou du FCCP. Les deux composés ont provoqué une baisse du MMP (A), FCCP a provoqué une baisse caractéristique de la consommation d'oxygène, alors que l'antimycine A a inhibé la respiration (B).

Solutions MitoXpress Xtra pour la mesure du métabolisme microbien

Mesure de la prolifération microbienne, du métabolisme et de la réponse aux antibiotiques

Le test MitoXpress Xtra offre une méthode basée sur une lecture de plaques simple et sensible, afin de mesurer la croissance de cellules procaryotes ou de détecter des composés antimicrobiens sans besoin de dilutions d'échantillon multiples ou de longues études sur gélose. C'est également un bon moyen d'étudier le métabolisme microbien.

Le format de lecture de plaques offre le rendement et la résolution nécessaires pour le dépistage et la génération appropriée de données IC_{50} ou MIC. La Figure 6 montre que cette méthode a été appliquée pour évaluer la prolifération microbienne, générer des données sur la relation dose-réponse et évaluer les effets métaboliques spécifiques du traitement du composé pour deux composés dans la levure.

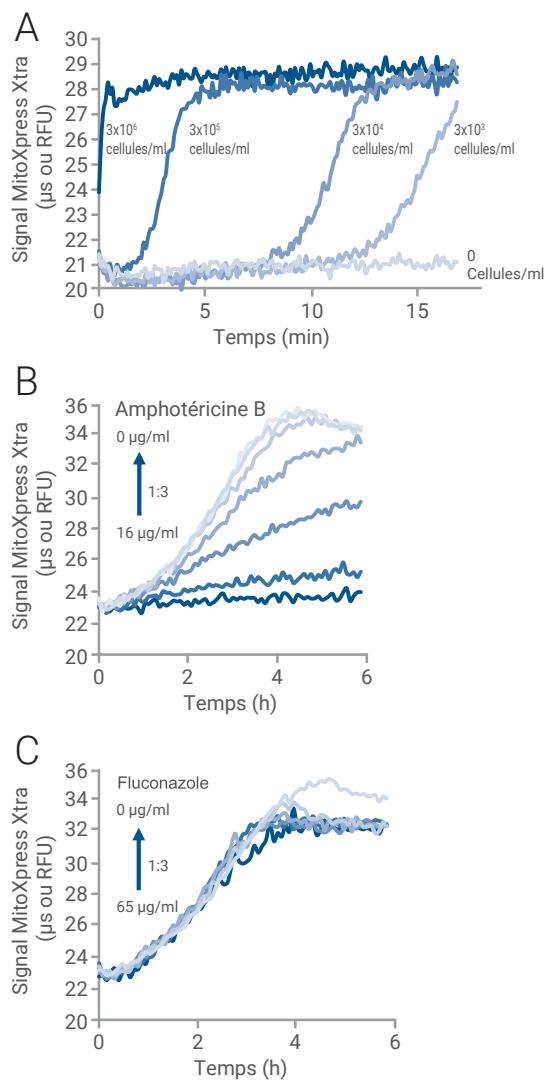


Figure 6. Profils d'appauvrissement en oxygène de *C. albicans* mesurés à des concentrations d'ensemencement décroissantes. (A) *C. albicans* a été traitée avec des concentrations croissantes d'amphotéricine B (B) et de fluconazole. (C) L'amphotéromycine B a provoqué des baisses de consommation d'oxygène en fonction de la dose alors que le fluconazole n'a provoqué aucune baisse de la consommation d'oxygène. Ces observations sont en accord avec le mode d'action du médicament.

Test de glycolyse pH-Xtra

Mesurer l'activité glycolytique



Les mesures d'acidification extracellulaire qui sont des moyens d'étude de l'activité glycolytique hautement informatifs, sont réalisés de manière appropriée avec des lecteurs de plaques à fluorescence à résolution temporelle (TRF), en utilisant le test de glycolyse pH-Xtra. L'acidification extracellulaire est provoquée en grande partie par la conversion du pyruvate en lactate, ce qui entraîne une réduction du pH du tampon du test. Le capteur pH Xtra détecte de façon sensible cette réduction du pH sous forme d'une augmentation du signal du capteur.

Ces mesures de pH offrent d'importantes indications sur le rôle central joué par l'activité glycolytique altérée dans une large gamme de processus physiologiques et pathophysiologiques, dont le cancer et l'adaptation cellulaire à l'hypoxie.

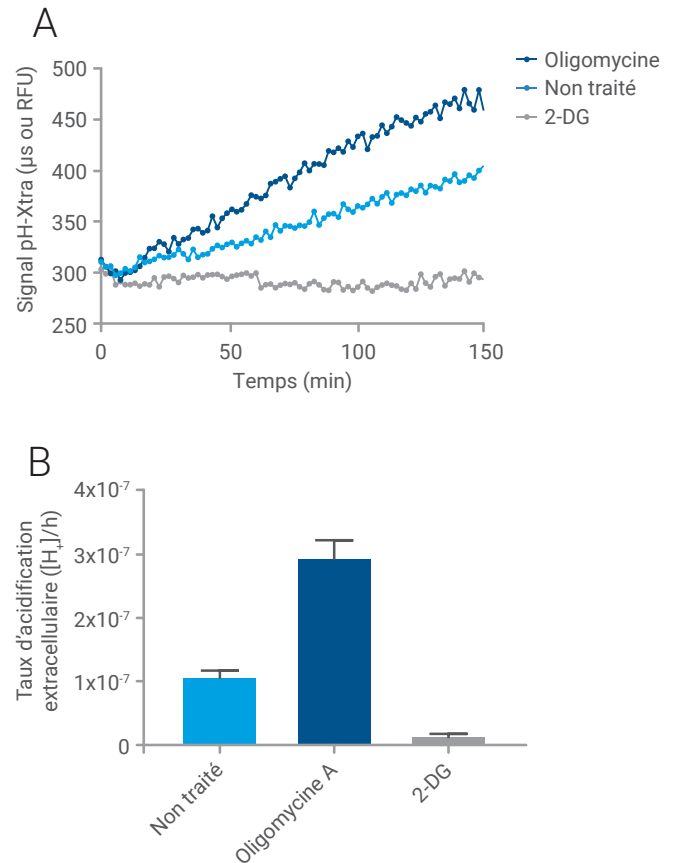


Figure 7. (A) Examen de l'activité glycolytique A549 mesurée en utilisant le test de glycolyse pH Xtra. Le traitement avec l'inhibiteur hexokinase 2-déoxyglucose (2-DG) inhibe l'acidification extracellulaire observée au moyen de la diminution de la variation du signal du capteur. Le traitement avec l'oligomycine A, un inhibiteur de la production d'ATP mitochondrial, conduit à l'augmentation de la production d'ATP glycolytique afin de maintenir l'homéostasie de l'énergie cellulaire. (B) La modification de l'acidification extracellulaire peut être évaluée de manière appropriée soit par le pH, soit par l'échelle ionique $[H^+]$ au fil du temps.

Solutions MitoXpress Xtra et pH Xtra

Mesurer le métabolisme des cellules dans des cultures en 3D

La lecture de plaques basée sur la mesure du métabolisme cellulaire peut aussi être réalisée dans des cultures en suspension et dans des systèmes de culture en 3D spécifiques (par exemple RAFT™, Mimetix® et Alvetex®). La culture des cellules en 3D permet le développement d'interactions intracellulaires complexes, ce qui permet de réduire l'écart entre les systèmes biologiques *in vitro* et *in vivo*. La Figure 8 illustre comment les tests MitoXpress Xtra et pH Xtra ont été utilisés pour mesurer le métabolisme cellulaire dans des matrices en 3D (RAFT, Lonza) sans perturber l'intégrité de la structure en 3D.

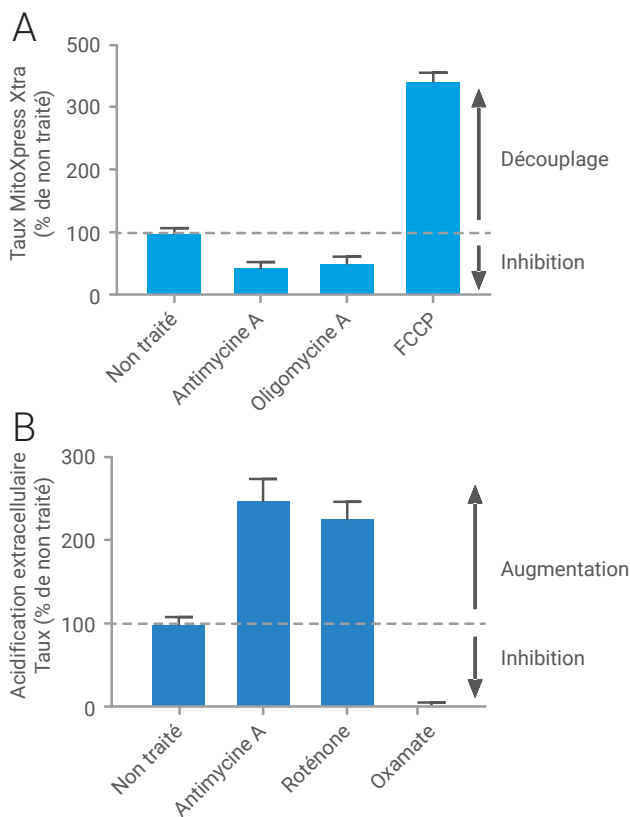


Figure 8. (A) Effet relatif d'un traitement médicamenteux sur la consommation d'oxygène dans des cultures A549 RAFT en 3D, mesuré à l'aide du test MitoXpress Xtra. (B) Effet relatif d'un traitement médicamenteux sur les taux d'acidification extracellulaire dans des cultures HepG2 RAFT, mesuré à l'aide du test de glycolyse pH Xtra.

Mesure combinée de la glycolyse et de la consommation d'oxygène

L'utilisation combinée de MitoXpress Xtra et pH Xtra permet d'évaluer l'équilibre du métabolisme cellulaire, ce qui sert de base pour des études métaboliques ultérieures. La Figure 9 illustre comment ces analyses combinées sont utilisées pour étudier l'équilibre entre la consommation d'oxygène et la glycolyse pour divers types de cellules. La figure montre aussi comment la variation de disponibilité du substrat peut moduler cet équilibre métabolique.

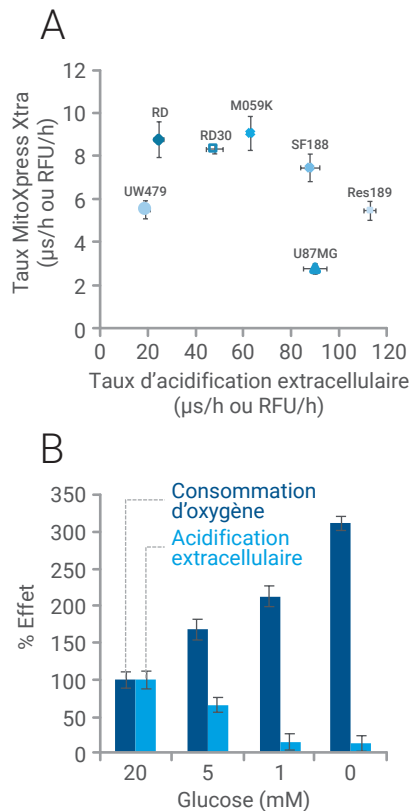


Figure 9. (A) Analyse combinée de la glycolyse et de la respiration mitochondriale dans des lignées de cellules cancéreuses en utilisant MitoXpress Xtra et pH Extra. (B) Effet de la disponibilité du glucose sur le métabolisme de cellules U87MG. L'augmentation de la disponibilité du glucose conduit à une diminution de la respiration et à une augmentation de la glycolyse (données reproduites avec l'aimable autorisation du Dr Karl Morten, Université d'Oxford, Royaume-Uni).

Test oxygène intracellulaire MitoXpress Intra

Oxygénation intracellulaire et hypoxie



La disponibilité de l'oxygène au niveau cellulaire a une influence significative sur la physiologie cellulaire, la transduction du signal et le métabolisme. Il en résulte que la décroissance des concentrations en oxygène plus appropriée d'un point de vue physiologique est utilisée dans les études *in vitro*, particulièrement dans le métabolisme du cancer, la découverte de nouveaux médicaments, et la recherche cardiovasculaire et neurologique. Cependant, un des éléments clés de tels modèles *in vitro* est la capacité à surveiller l'oxygénation cellulaire, car des fluctuations de ce paramètre dynamique peuvent parasiter l'interprétation des données. La compréhension de la profondeur et de la durée de l'état d'oxygénation rencontré par le modèle cellulaire revêt, par conséquent, une importance significative.

Le test MitoXpress Xtra offre une solution en mesurant les concentrations en O_2 intracellulaire dans des cellules vivantes. Le réactif est absorbé par la cellule et peut être surveillé en utilisant des lecteurs de plaques à fluorescence avec la capacité de réaliser des mesures de fluorescence à résolution temporelle (TRF) à double lecture. Le capteur répond alors en temps réel à toute modification de la concentration en oxygène intracellulaire induite par les modifications des conditions atmosphériques ou de la respiration cellulaire.

En plus d'être un outil de surveillance informatif, l'analyse permet également aux chercheurs de faire un lien entre les réponses métaboliques et les niveaux d'oxygène disponibles. Ces paramètres sont extrêmement importants dans des domaines comme l'ischémie, le métabolisme du cancer et l'hypoxie. La Figure 10 montre comment le test MitoXpress Intra peut être utilisé pour révéler les différences significatives entre les niveaux d'oxygène cellulaires appliqués et rencontrés. Ces différences dépendent du nombre de cellules, de la prolifération, du type et de l'équilibre métabolique, ce qui fait que le degré d'hypoxie rencontré par les cellules ne peut pas être déduit de la concentration en oxygène environnemental.

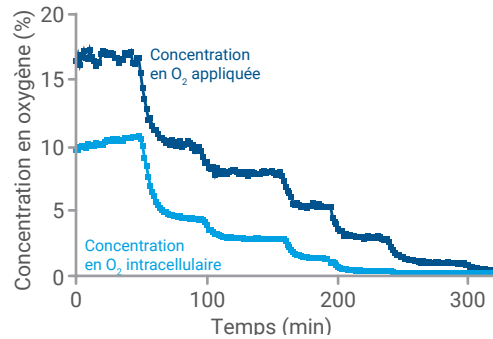


Figure 10. Surveillance des concentrations de O_2 dans des échantillons contenant des cellules HepG2 cultivées dans un milieu de culture 3D (RAFT™, Lonza) en réponse à la décroissance des conditions atmosphériques en O_2 . Avec un niveau de O_2 atmosphérique, les cellules rencontrent des niveaux d'oxygénation d'environ 10 % en moyenne, alors qu'avec 5 % de O_2 environnemental, les niveaux d'oxygénation approchent 0 % de O_2 .

Cette réduction de l'oxygénation peut avoir des conséquences physiologiques importantes et, si elle n'est pas mesurée, conduire à une mauvaise interprétation des données en raison du manque de visibilité des niveaux d'oxygénation rencontrés par le modèle cellulaire à l'étude. Ceci est illustré dans la Figure 11 où 40 % de la stabilisation HIF est observée à un niveau d'oxygénation cellulaire d'environ 1,5 % de O_2 . Cependant, sans la mesure de l'oxygénation, on aurait pu supposer que ce niveau de stabilisation en lien avec le niveau d'oxygène serait d'environ 5 % de O_2 .

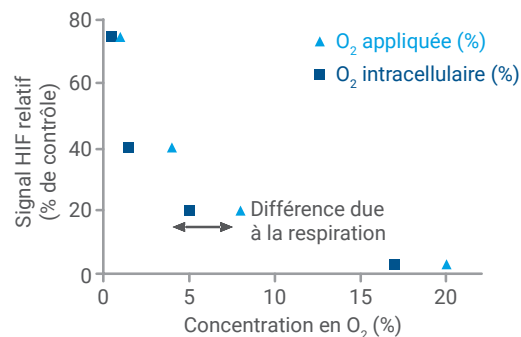


Figure 11. Stabilisation HIF mesurée en utilisant un rapporteur HIF luminescent dans des cellules HT-1080 suivies pour des conditions décroissantes en oxygène. La stabilisation HIF est liée aux concentrations d'oxygène appliquées (bleu clair) et aux véritables niveaux d'oxygénation rencontrés par les cellules, mesurés en utilisant le MitoXpress Intra (bleu foncé). Ces données illustrent que, à moins que l'oxygénation cellulaire ne soit mesurée, des conclusions erronées telles que la relation entre la disponibilité en oxygène et la stabilisation HIF seront établies. (données reproduites avec l'aimable autorisation du Dr Karl Morten, Université d'Oxford, Royaume-Uni).

Solutions MitoXpress Intra

Étude du métabolisme du cancer dans des conditions hypoxiques

La surveillance de l'oxygénation cellulaire en temps réel en utilisant le MitoXpress Intra permet aux chercheurs de déterminer précisément le degré d'hypoxie rencontré par un modèle cellulaire. Tout comme le test MitoXpress Xtra, le test MitoXpress Intra peut être combiné avec d'autres analyses basées sur la lecture de plaques, y compris les mesures de viabilité, de MMP et de ROS. Ceci est particulièrement pertinent pour la recherche sur le métabolisme du cancer, pour laquelle la connexion entre l'environnement de la tumeur hypoxique, la flexibilité métabolique et le phénotype cancéreux revêt une importance considérable.

Un exemple en est illustré dans la Figure 12, où des mesures multiplexées de l'oxygénation cellulaire et de l'activité glycolytique sont réalisées en utilisant les tests MitoXpress Intra et les tests de la glycolyse pH-Xtra. Les mesures sont réalisées dans des conditions hypoxiques et sous oxygène atmosphérique, avec des données qui soulignent l'impact de l'oxygénation sur l'activité glycolytique.

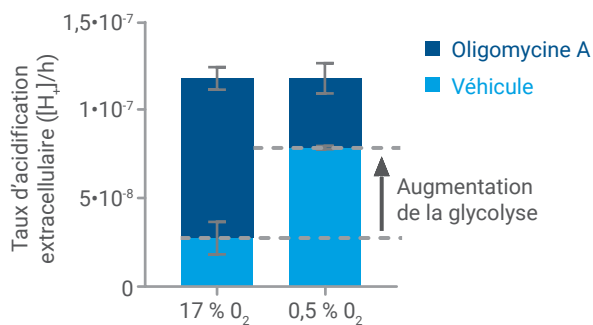
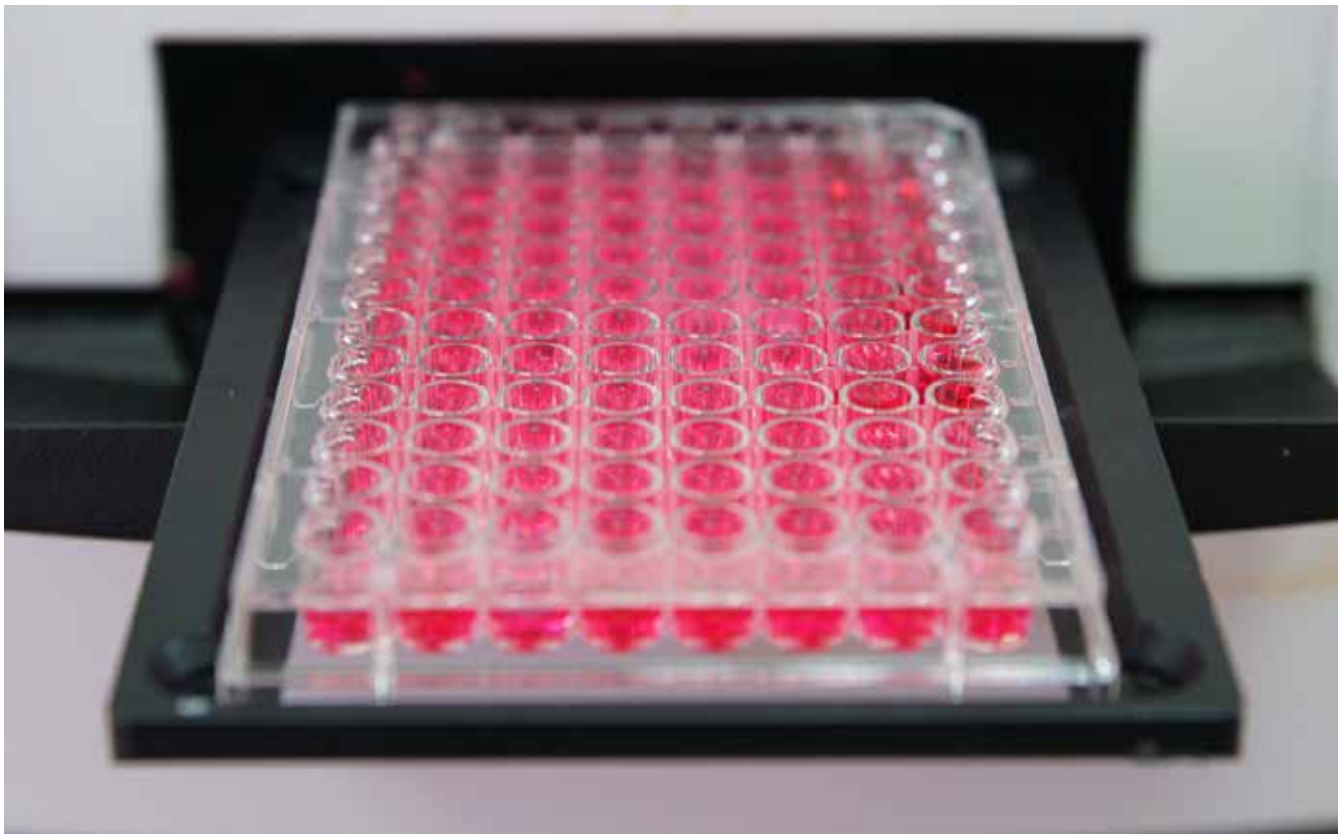


Figure 12. Acidification extracellulaire de cellules A549 mesurée avec le test de glycolyse pH Xtra multiplexée avec le MitoXpress Intra afin de mesurer les niveaux d'oxygène intracellulaire dans des conditions hypoxiques imposées par l'unité de contrôle atmosphérique du lecteur de plaques. Le taux d'acidification extracellulaire basal des cellules traitées avec un véhicule a augmenté approximativement d'un facteur trois pour l'hypoxie (bleu clair), alors que la capacité glycolytique mesurée avec un traitement à l'oligomycine (bleu foncé, un inhibiteur de la production d'ATP mitochondrial) demeure constant.

L'avantage Agilent

Le métabolisme renforce les réponses cellulaires et par conséquent, est une mesure fonctionnelle essentielle en biologie cellulaire. Avec sa gamme de capteurs métaboliques compatibles avec des lecteurs de plaques à fluorescence, Agilent offre maintenant une gamme de solutions intégrées pour l'examen du métabolisme cellulaire in vitro. Les applications illustrées ici sont des exemples de la manière dont ces analyses peuvent être utilisées pour analyser le métabolisme et la fonction cellulaire. Pour des ressources supplémentaires, des protocoles plus détaillés et pour découvrir comment nos capteurs métaboliques solubles peuvent vous aider à répondre à vos questions en recherche, visitez www.agilent.com ou contactez-nous directement à cellanalysis.support@agilent.com.



Gamme d'analyse de cellules Agilent

Nos technologies leaders du marché pour l'analyse de cellules vivantes en temps réel ont aidé des chercheurs à repousser les limites d'un certain nombre de domaines de recherche.

En savoir plus sur notre gamme complète de solutions en visitant notre site web à **www.agilent.com/chem/discoverxf**

En savoir plus

www.agilent.com/en/products/cell-analysis/mitoexpress-ph-xtra-consumables

Base de données de publications

www.agilent.com/publications-database/

Base de données de références cellulaires

www.agilent.com/cell-reference-database/

Webinaires

www.agilent.com/en/training-events/eseminars/cell-analysis-webinar-series

Assistance technique partout dans le monde

cellanalysis.support@agilent.com

USA et Canada

1-800-227-9770 ; sélectionnez l'option 3 puis 8

Europe

Royaume-Uni : 0500 096 7632

Allemagne : 0800 180 66 78

Autres pays de l'UE : +45 3236 9878

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

Ces informations peuvent être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
Publié aux États-Unis, le 11 février 2019
5994-0683FR