

1) PRINCIPE

Mesure du potentiel de membrane mitochondriale pour cellules en suspension ou adhérentes après traitement à la trypsine..

Le JC-1 est une sonde potentiométrique lente, excitable à 488nm qui à faible potentiel de membrane émet une fluorescence verte (527nm) fraction monomérique et à forts potentiel forme des J-agrégats rouges (585nm). La formation de ces agrégats est linéaire entre **30-180mV**, ce qui permet son utilisation dans les mesures potentiométriques.

En cytométrie en flux, les formes monomères (canal vert), et agrégats (canal rouge), peuvent être analysés à la fois au cours d'une même expérience.

Le JC-1 est très utilisé pour la détection du potentiel de membrane mitochondriale des cellules en apoptose.

Methods Enzymol 260,406-(1995). Proc. Natl. Acad. Scie. USA 88,3671 (1991).

2) REACTIFS

Sonde fluorescente: JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide; Mol Probes T-3168). Soluble DMSO.

Contrôle découplant: CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone, Sigma, soluble DMSO. Protonophore (H⁺ ionophore et découplant de la phosphorylation oxydative mitochondriale, et des nombreux effets sur le calcium intracellulaire; (Alvarado et al. Am. J.Physiol 274, 481-491, 1998.

Contrôle dépolarisant : Valinomycine, K⁺ ionophore, (V0627 Sigma), soluble DMSO
Ionophore cyclodepsipeptide sélectif de K⁺, (potasium ionophore qui découple la phosphorylation oxydative, induit l'apoptose dans des thymocytes murins, (Furlong I.J. et al, Cell Death Differ 5, 214-221 1998)

3) MARQUAGE JC-1

Afin de déterminer la concentration de JC-1 optimale pour le phénotype cellulaire à étudier, il faut établir au préalable une courbe de concentration de JC-1 (100nM-20uM) VS intensité de fluorescence. Les fortes concentrations de JC-1 agrègent le fluorochrome et dépolarisent d'avantage la membrane mitochondriale. Un témoin interne non traité doit être inclus dans l'expérience.

Charge de fluorophore

- Disposer 1x10⁶ de cellules à analyser dans 1 ml de milieu de culture approprié,
- Ajouter le JC-1 à une concentration préalablement établie avec la courbe (1-5uM final en générale) et incuber à 37°C, 5% CO₂ pendant 20min.
- Centrifuger les cellules à 150g pendant 10 min.
- Resuspendre le culot cellulaire dans 1ml de milieu complet
- Analyse en cytométrie en flux.

4) ANALYSE

A-Construction de la courbe de concentration JC-1 vs intensité de fluorescence

Déterminer cette concentration de préférence quelques jours avant d'effectuer les analyses de potentiel de membrane.

Dot plot 1: X1= SSC (granularité);
Y1= FSC (taille)

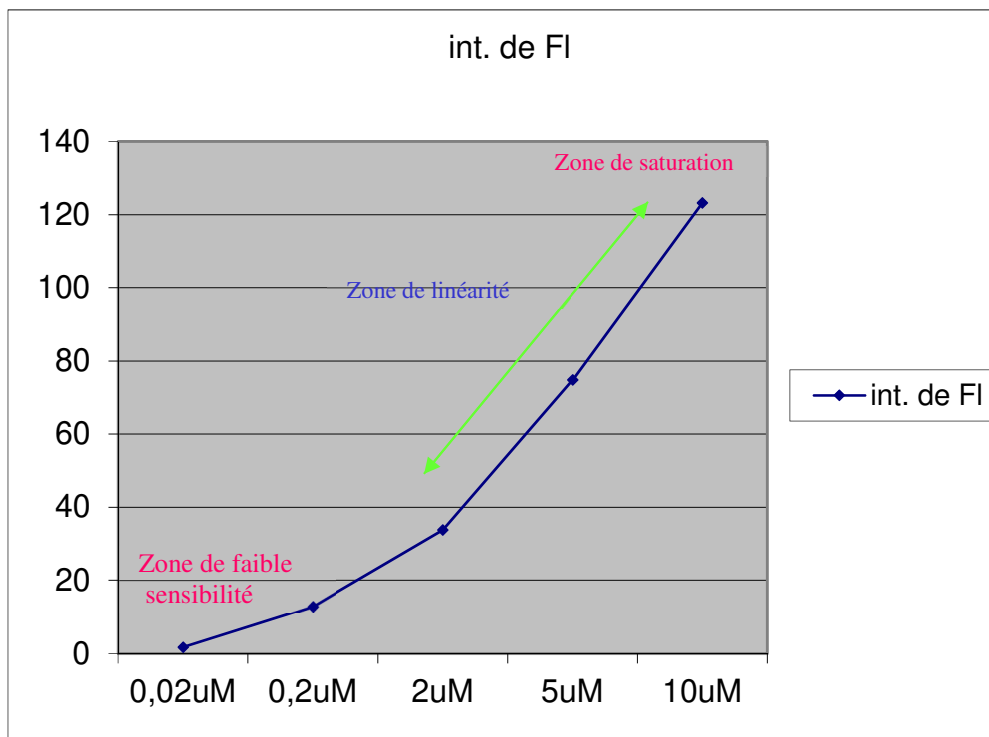
Etablir une fenêtre d'analyse dans l'histogramme 1 afin de prendre en compte uniquement les cellules en bon état (**R1**) et éliminer les doubles cellulaires.

Histogramme 2: monoparamétrique= X2 (fluorescence **rouge/orange** du *JC-1*:575nm), conditionné sur **R1**.

Placer un curseur sur toute l'échelle X afin d'obtenir la moyenne/médiane d'intensité de fluorescence pour chaque valeur de concentration de JC-1.

Tracer la courbe de concentration. JC-1 vs intensité de fluorescence.

Concentration de travail : entre 3uM et 8uM de JC-1.



B- Analyse du potentielle de membrane mitochondriale

Dot Plot 3 (sur cellules traitées et témoin non traités)

X3= SSC (structure);
Y3= FSC (taille)

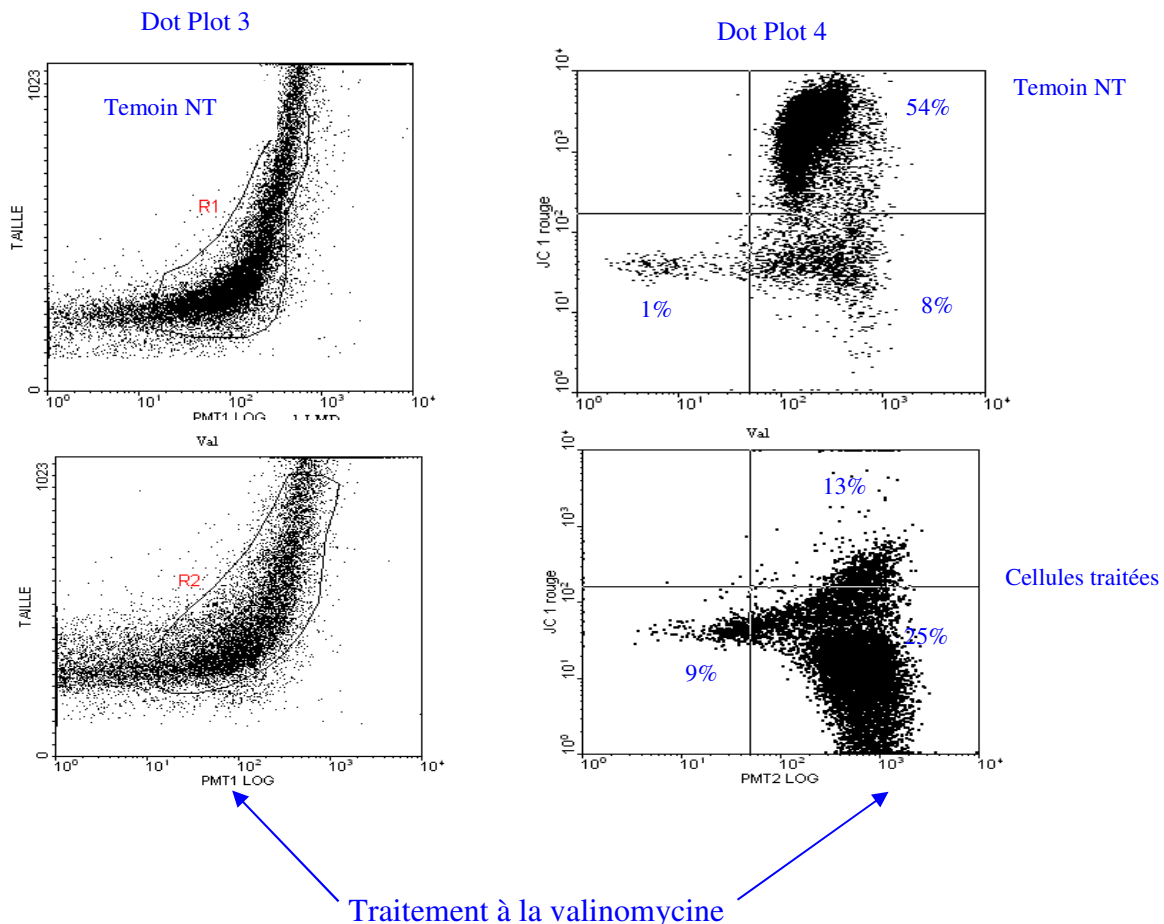
Dessiner une fenêtre d'analyse dans l'histogramme 3 afin de prendre en compte uniquement les cellules en bon état (**R1 et R2** pour témoin et cell traitées respectivement)

Dot Plot 4 (conditionné sur R1 ou R2)

X4= Fluorescence JC-1 (verte log)
Y4=Fluorescence JC-1 (rouge log)

Etablir les valeurs de compensation entre les PMTs qui capturent respectivement la fluorescence verte et rouge. Procéder d'abord avec le témoin non traité et en suite avec les cellules traitées au CCCP ou à la valinomycine.

C- Résultats



Commentaires

Le JC-1 est une carbocyanine cationique de réponse lente. Son utilisation est préconisée pour étudier la dépolarisation mitochondriale via apoptose ainsi que la régulation mitochondriale du Ca⁺⁺

Etant donnée sa structure cationique, cette sonde peut provoquer une dépolarisation mitochondriale à fortes doses; d'où l'intérêt à bien calculer la concentration optimale à utiliser comme expliqué précédemment à l'aide de la courbe de concentration de JC-1 vs intensité de FI.