

15 – 17 octobre 2018

Groupement Hospitalier EST
Bâtiment B13
59 Bd Pinel
69500 BRON

12 personnes maximum
(4 par atelier)



Contacts : beatrice.morio@inra.fr, anne-laure-bulteau@ens-lyon.fr

Animateurs : Claire Crola da Silva, Yves Gouriou et Julien Courchet

Programme pédagogique

Lundi matin → **Accueil (8h-9h)**

→ **Théorie cytométrie (9h-12h : 3h):**

- Rappels cytométrie
- Etude des mitochondries par cytométrie en flux :
 - au sein de la cellule
 - sur mitochondries isolées

Pause déjeuner : 12h - 13h

Lundi après-midi → **Pratique PREPARATION MITOCHONDRIES (13h-16h : 3h)**

Techniques classique et rapide de préparation de mitochondries isolées

- Atelier 1 : tissus mous (foie, cerveau)
- Atelier 2 : tissus durs (cœur, muscle)

Pause: 16h – 16h30

→ **Théorie microscopie (16h30-19h)**

- Microscopie champ large et utilisation des sondes FRET, comment bien utiliser une sonde, les différentes techniques d'analyses
- Les accessoires nécessaires : sources lumineuses & lasers, contrôle environnemental, systèmes de microperfusion
- Choix des consommables : plastiques, milieux...
- Quel marqueur choisir ?
- Quelles informations peut-on recueillir ?
- Principes d'analyse

Apéro et FAQ: 19h

Mardi matin

Petit déjeuner : 8h – 9h

→ 3 ateliers de 4 personnes : **tour 1 (9h – 13h)**

→ Pratique FACS (Claire Crola da Silva):

- Equipement/BD Biosciences Fortessa X20 (4 lasers, 16 détecteurs de fluorescence)
- Modèles : mitochondries isolées, lignée H9C2, (cardiomyocytes adultes)
- Conditions et sondes : Marquages sur cellules et mitochondries isolées. Sondes TMRM, DiI C1, MitoSox red, Nonyl Acridine Orange et mitotracker
- Objectifs : Analyse multiparamétriques des fonctions mitochondriales : applications sur cellules entières et mitochondries isolées
- Réglages des scatters sur population mitochondries isolées, identification de population d'intérêt par marquage spécifique des mitochondries (NAO, mitotracker,...)
- Mesures de potentiel membranaire, production de ROS et masse mitochondriale à l'aide à l'utilisation de sondes fluorescentes
- Analyse et traitement d'imagerie (1h)

→ Pratique Photoinactivation ciblée (Julien Courchet):

- Equipement Nikon Ti Eclipse + caméra CMOS Orca Flash 4, laser/confocal Nikon C2
- Modèles : lignées HELA ou COS, culture primaire de neurones
- Conditions et sondes : marquage des mitochondries avec la sonde codée génétiquement mito-KillerRed ou contrôle mito-DsRed. Coexpression de mito-roGFP2 ou PercevalHR. Imagerie cellule unique objectif 40x, microscopie en temps réel sur 10-30 minutes.
- Objectifs : planifier/réaliser une expérience de photoinactivation de mitochondries localement avec les contrôles appropriés.
 - Détermination des paramètres d'illumination optimaux selon le type cellulaire : intensité laser, longueur d'onde, format de la ROI...
 - Suivi des modifications mitochondriales : stress oxydant (mito-roGFP2) et changements morphologiques
 - Observation des conséquences métaboliques locales : ratio ATP/ADP (PercevalHR)
- Analyse et traitement d'imagerie (1h)

→ Pratique Biosenseurs ATP, Calcium (Yves Gouriou):

- Equipement système Leica
- Modèles : lignée H9C2
- Conditions et sondes : Tests en situation d'hypoxie – reperfusion, utilisation des sondes génétiques :
 - FRET ATP (Ateam mito; Imamura H PNAS 2009)
 - FRET calcium (4mtD3cpv; Palmer et al Chem Biol 2006)
- Objectifs : Mesure de l'ATP et du calcium mitochondrial
- Analyse et traitement d'imagerie (1h)

Pause déjeuner : 13h - 14h30

Mardi après-midi → 3 ateliers de 4 personnes : **tour 2 (14h30 – 18h30)**

Diner dans un bouchon lyonnais : 20h

Mercredi matin

Petit déjeuner : 8h – 9h

→ 3 ateliers de 4 personnes: **tour 3 (9h – 13h)**

Pause déjeuner : 13h - 14h30

Mercredi après-midi → **Compléments sur les analyses d'image, bilan, discussion (14h30 – 17h)**

Retours