

Mesure de flux calcique intracellulaire

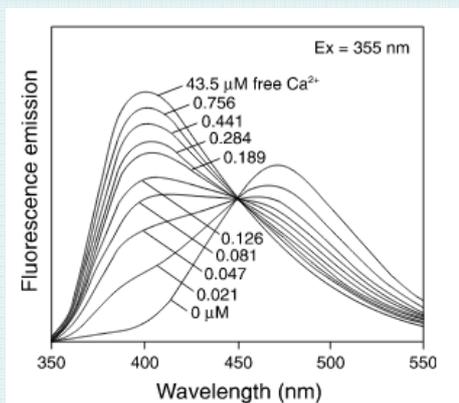
Introduction

Le calcium est impliqué dans de nombreux processus physiologiques (libération de neurotransmetteurs, contraction musculaire, coagulation sanguine...) et dans la signalisation cellulaire où il agit comme un second messager suite à l'activation des protéines hétérotrimériques Gq via les récepteurs couplés aux protéines G.

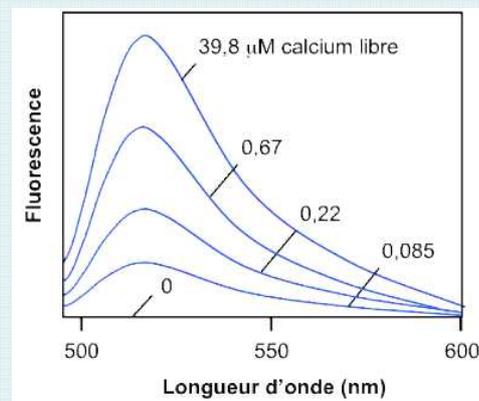
Ce test permet de suivre de manière dynamique les variations de concentration intracytoplasmique de calcium sur des cellules vivantes.

Principe

Les mesures de flux calciques sont réalisées via l'utilisation d'une sonde fluorescente sensible au calcium (Indo1 ou Fluo4). Selon la nature de la sonde, sa liaison avec le calcium induit une variation de son intensité de fluorescence et éventuellement un déplacement de son spectre d'émission :



Spectre d'émission de l'**Indo1**
dans des solutions contenant
0 à 39,8 µM de calcium



Spectre d'émission du **Fluo4**
dans des solutions contenant
0 à 39,8 µM de calcium

Les sondes sont rendues perméantes par l'ajout d'un groupement acétométhylester (AM), et peuvent ainsi sous cette forme passer la membrane plasmique des cellules. La partie AM est libérée à l'intérieur de la cellule par des estérases intracellulaires.

Les mesures sont réalisées sur un lecteur semi-robotisé (Flexstation3® Molecular Devices) qui permet de détecter en temps réel la libération de calcium intracellulaire.

Protocole

Sonde calcique :

Indo1-AM (λ_{ex} 338nm / λ_{em1} 401nm, λ_{em2} 475nm)

Fluo4-AM (λ_{ex} 494nm / λ_{em} 516nm)

Format : 96 ou 384 puits

Cellules : HEK293 en suspension (possibilité de travailler sur d'autres lignées)

- 1) Chargement des cellules avec la sonde
- 2) Décollement des cellules et distribution dans la plaque
- 3) Mesure du signal de base
- 4) Traitement des cellules avec les composés d'intérêt + mesure

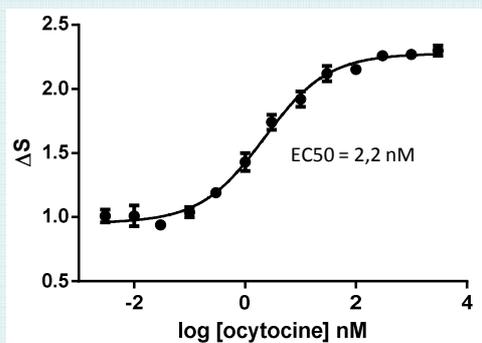
Possibilité de faire jusqu'à 3 traitements consécutifs.

Stimulation du récepteur de l'ocytocine et mesure du signal calcique associé

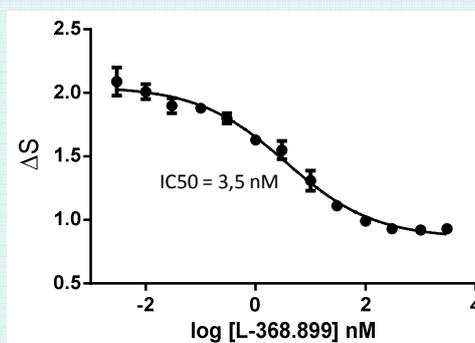
Format : 384 puits

Cellules : HEK293 surexprimant de récepteur de l'ocytocine

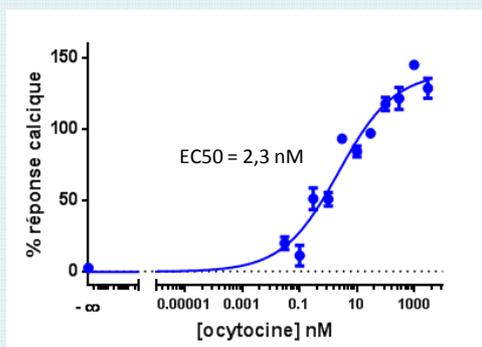
Test agoniste, sonde Indo1



Test antagoniste, sonde Indo1



Test agoniste, sonde Fluo4



Test antagoniste, sonde Fluo4

