

Optimisation de l'efficacité et des performances des analyses Seahorse XF avec la station automatique de pipetage Agilent Bravo

Auteurs

Lisa Winer
George W. Rogers
Sarah E. Burroughs
Brian P. Dranka
Agilent Technologies, USA

Résumé

Il est largement admis que les étapes de préparation manuelle des échantillons peuvent influencer la qualité des données des analyses, en particulier celles des analyses de cellules. La préparation manuelle d'échantillons (y compris par pipette) peut introduire des erreurs et peut prendre beaucoup de temps. Le pipetage automatisé dans le cadre de la préparation d'échantillons pour analyses Agilent Seahorse XF est présentée ici afin d'éviter les erreurs potentielles et réduire le temps de préparation pratique. Lorsqu'elle est utilisée dans un flux de tâches d'analyse de routine, la station automatique de pipetage Agilent Bravo (Bravo) permet : 1) une réduction de la variabilité due aux erreurs manuelles, 2) une amélioration de la cohérence et de la reproductibilité dans et entre les microplaques, 3) une réduction du temps de manipulation pour la préparation des analyses XF. Dans l'ensemble, l'automatisation des étapes de pipetage d'une analyse Seahorse XF a permis d'améliorer l'efficacité de la préparation d'échantillons et la cohérence des données obtenues, en particulier pour des applications dans la recherche de nouveaux médicaments, telles que l'évaluation de routine de composés et les études sur la relation dose-réponse.

Introduction

Les analyses de cellules nécessitent souvent plusieurs étapes de pipetage qui peuvent avoir une influence sur la qualité des données. Une préparation d'échantillons douteuse peut entraîner une variabilité inacceptable entre les puits, les plateaux, ou les analyses de réplicats. Ces étapes de pipetage peuvent également nécessiter beaucoup de main d'œuvre, en particulier lors de la réalisation d'analyses multiplexées et/ou d'un grand nombre d'analyses de réplicats, comme c'est souvent le cas dans les projets de recherche de nouveaux médicaments.

Par exemple, bien qu'un opérateur manuel qualifié puisse effectuer un lavage des cellules de manière uniforme, la probabilité est toujours grande que le lavage manuel des cellules endommage la monocouche. Ces dommages peuvent provenir d'erreurs courantes, telles que celles illustrées sur la Figure 1. Il s'agit notamment de dommages ou de pertes de cellules en grattant la surface de la monocouche (panneau B), de délogement de cellules peu adhérentes par un pipetage vigoureux (panneau C), ou d'un retrait de trop de support qui expose la monocouche à l'air et entraîne des dommages ou un détachement (panneau D). Le pipetage manuel peut également introduire des bulles pouvant endommager les cellules ou avoir un impact sur le volume final du puits.

Pour résoudre ces problèmes lors d'analyses Seahorse XF, plusieurs étapes clés du pipetage manuel peuvent être automatisées avec la station automatique de pipetage Agilent Bravo. La réalisation de ces étapes de manipulation de liquides via la station Bravo permet au chercheur d'améliorer la qualité des données et de réduire le temps de préparation (pratique) des analyses. Ces deux avantages permettent d'augmenter la productivité grâce à des données plus cohérentes et à un allongement du temps libre pendant une analyse XF.

Dans cette note d'application, des méthodes permettant d'automatiser trois étapes clés de la manipulation de liquides associées à la préparation d'analyses XFe96 sont présentées : le lavage des cellules, la préparation de solutions d'injection, et le chargement de ces solutions dans la cartouche pour XFe96. Des exemples sont ensuite fournis pour illustrer chaque étape de l'automatisation, notamment des données d'analyse, ainsi que les gains estimés en temps libre.

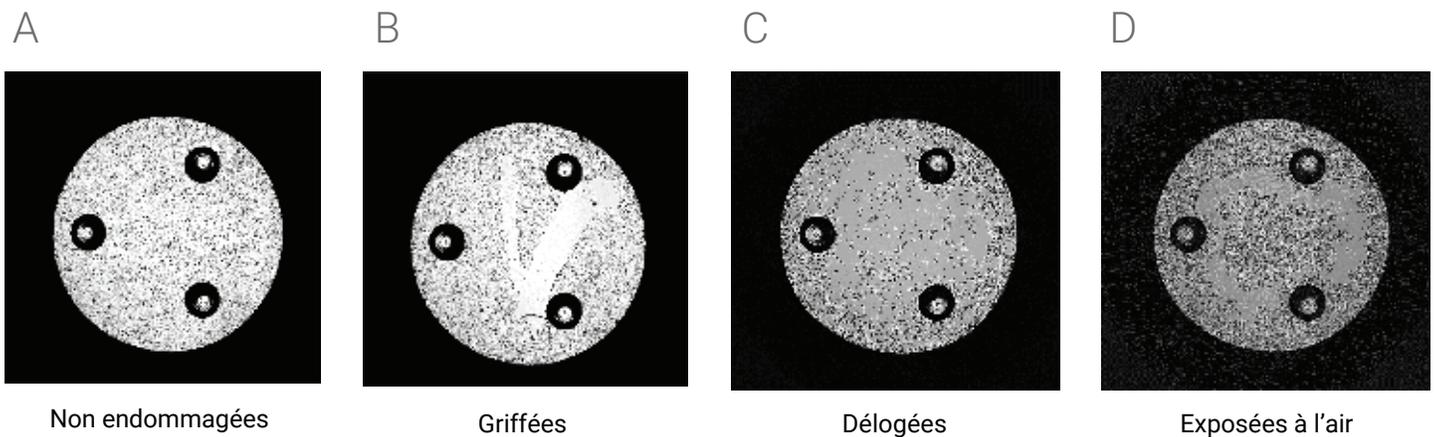


Figure 1. Images en fond clair de puits simples dans une microplaque XF96 illustrant des dommages causés à la monocouche cellulaire. A) Cellules non endommagées. B) Griffées avec l'extrémité de la pipette. C) Délogées pendant l'aspiration ou la distribution. D) Détachées à cause de l'exposition à l'air.

Équipements et méthodes

Culture cellulaire

Des cellules HEK293 ou HepG2 ont été ensemencées dans des microplaques de culture cellulaire XF96 avec une densité de $3,0 \times 10^4$ ou $1,5-2,0 \times 10^4$ cellules par puits, respectivement, et ont été cultivées la nuit à 37 °C avec 5 % de CO₂. Des cellules HEK293 ont été cultivées dans du DMEM (Gibco 11885084) enrichi avec 10 % de FBS et 2 mM de GlutaMAX (Gibco 35050061) et des cellules HepG2 ont été cultivées dans du EMEM (ATTC 30-2003) enrichi avec 10 % de FBS. Après 24 heures, les cellules ont été préparées pour l'analyse XF.

Normalisation

Le colorant nucléaire Hoescht (Thermo Scientific, PI62249) a été inclus dans l'injection finale pour toutes les analyses avec une concentration de 20 µg/mL (2 µg/ml dans le puits) et les microplaques ont été examinées avec un BioTek Cytation 1. Les cellules ont été comptées dans chaque puits et le taux de consommation d'oxygène (OCR) et le taux d'acidification extracellulaire (ECAR) ont été normalisés au nombre de cellules. Pour avoir une description détaillée du système d'imagerie chimique et de normalisation Seahorse XF, veuillez vous reporter à la normalisation des données Agilent Seahorse XF par un comptage de cellules *in situ* à l'aide d'un BioTek Cytation 5 <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-7908EN.pdf>.

Configuration de la station Bravo et test des performances

Toutes les analyses ont été effectuées avec une station Bravo configurée pour être utilisée avec des consommables associés à l'analyseur XFe96. Cette configuration présente des chauffages statiques en positions quatre et six sur le plateau Bravo. Les protocoles Bravo pour chaque élément du flux de tâches, notamment le pré-réglage des vitesses et des hauteurs d'aspiration et de distribution (voir Tableau S1, Informations supplémentaires pour plus de détails) ont été mis en oeuvre via le logiciel Bravo Seahorse Assay Workbench. Le matériel de laboratoire Agilent (réservoirs et plaques de réactif) pour le Bravo et les consommables XFe96 ont été utilisés comme indiqué dans le Tableau 1. Toutes les analyses XF ont été réalisées en utilisant un milieu d'analyse XF composé du milieu DMEM pH 7,4 Agilent Seahorse XF + 10 mM de glucose, 1 mM de pyruvate, et 2 mM de glutamine. Toutes les étapes du pipetage manuel ont été effectuées conformément aux méthodes et pratiques d'analyse XF recommandées.

Matériel de laboratoire et consommables Agilent	Référence	Quantité requise par essai XFe96		
		Lavage de cellules	Dilution de composés	Chargement de cartouche
Réservoir 24 colonnes Agilent (polypropylène, 3,25 mL/colonne, géométrie à base pyramidale)	201296-100	–	–	1
Agilent 96-well storage/reaction microplate (polypropylène de très grande pureté, 1 mL/puits carré, fonds coniques)	201276-100	–	2	–
Réservoir Agilent (polypropylène, 86 mL, 96 puits avec géométrie à base pyramidale)	201254-100	2	1	–
Boîte à embouts Agilent, 250 µL, 96 embouts par portoir, compatibles avec la tête Bravo 96LT (Pleine)	19477-002	1	2	1
Boîte à embouts Agilent, 250 µL, 96 embouts par portoir, compatibles avec la tête Bravo 96LT (Vide)		–	1	1
Agilent Seahorse XFe96 FluxPak	102416-100	1 plateau cellulaire (Plateau cellulaire 96 Seahorse XF96)	1 cartouche XFe96 avec plateau utilitaire (Cartouche 96 Seahorse XF96 avec plateau utilitaire, 384 ports)	
Milieu DMEM pH 7,4 Seahorse XF	103575-100	90 mL	40 mL	20 mL
Glucose Seahorse XF (solution 1,0 M)	103577-100	0,9 mL	0,4 mL	0,2 mL
Pyruvate Seahorse XF (solution 100 mM)	103578-100	0,9 mL	0,4 mL	0,2 mL
L-Glutamine Seahorse XF (solution 200 mM)	103579-100	0,9 mL	0,4 mL	0,2 mL
Test XF Cell Mito Stress (source d'oligomycine, de FCCP, et de roténone/antimycine-A)	103015-100	–	1	1
Kit d'analyse du taux glycolytique (source de 2-DG)	103344-100	–	1	1

Tableau 1. Matériel de laboratoire et consommables Agilent nécessaires pour chaque étape d'automatisation.

Lavage de cellules

Des cellules HEK93 ont été utilisées comme modèle d'une lignée cellulaire faiblement adhérente pour démontrer la capacité du Bravo à laver des cellules sans endommager la monocouche ni perdre des cellules (décrit sur la Figure 1). La configuration du plateau Bravo et le matériel de laboratoire utilisé pour le lavage des cellules sont illustrés sur la Figure 2. En résumé, les cellules ont été lavées en aspirant le milieu de croissance et en le remplaçant deux fois par un milieu d'analyse, afin d'obtenir un volume de puits final de 180 μL . Trois mesures de base ont été réalisées et ont été évaluées à l'aide d'un analyseur Seahorse XFe96.

Chargement du port d'injection

Des solutions mères d'oligomycine, de FCCP et d'antimycine-A/roténone du test XF Cell Mito Stress ont été préparées et distribuées manuellement dans un réservoir à 24 colonnes (Agilent, 201296-100). Le Bravo a ensuite été utilisé pour transférer 20, 22 ou 25 μL de ces solutions dans les ports A, B, et C, respectivement, d'une cartouche de capteur XFe96. La configuration du plateau Bravo pour le chargement de la cartouche du capteur XFe96 est illustrée sur la Figure 3. Toutes les étapes de lavage des cellules pour cette série d'analyses ont été réalisées par le Bravo comme décrit précédemment.

Préparation de la solution d'injection - Dilution sur mesure de FCCP

Les dilutions ont été effectuées sur des plateaux de stockage en polypropylène à 96 puits (Agilent, 201276-100). La configuration du plateau Bravo pour la dilution des composés et le chargement de la cartouche du capteur XFe96 sont illustrés sur la Figure 4. Une série de dilutions en 10 étapes sur mesure de FCCP, de 2 μM à 20 μM , par incréments de 2 μM a été réalisée. Une solution mère de 100 μM de FCCP a été préparée manuellement dans un milieu d'analyse XF dans la plaque source de la bibliothèque. Des dilutions de FCCP ont été effectuées par le Bravo sur une plaque de dilution directement à partir de la solution mère à 100 μM , puis par un chargement automatisé dans les ports « B » d'une cartouche XFe96. Tous les traitements FCCP ont été effectués en présence de 1 μM d'oligomycine. Le Bravo a été utilisé pour charger 20 μL d'une solution d'injection de 10 μM d'oligomycine dans tous les ports A et 25 μL d'une solution de roténone/antimycine A (5,0 μM chacune) dans tous les ports C pour effectuer le test standard XF Mito Stress (MST). Cette analyse dose-réponse du FCCP a été répétée un autre jour (deux réplicats).

Préparation de la solution d'injection - Dilution en série d'antimycine A

Une solution mère de 100 μM d'antimycine A (AA, Sigma A8674-25) a été préparée à partir d'une solution d'AA de 50 mM dans du diméthyl sulfoxyde diluée avec le milieu d'analyse XF. Les dilutions suivantes ont été effectuées par la station automatique de pipetage Agilent Bravo sur un plateau de stockage à 96 puits Agilent (#201276-100). Huit séries de dilution indépendantes et identiques d'AA ont été préparées en parallèle sur la même microplaque. Chaque série de dilution est constituée d'une double dilution en série de 10 étapes, de gauche à droite, qui se traduit par des concentrations dans les ports d'injection allant de 10 μM à 0,02 μM . Les dilutions d'AA ont été chargées dans les ports « A » de la cartouche XFe96 en utilisant le Bravo. Trois analyses indépendantes ont été réalisées.

Agencement du plateau

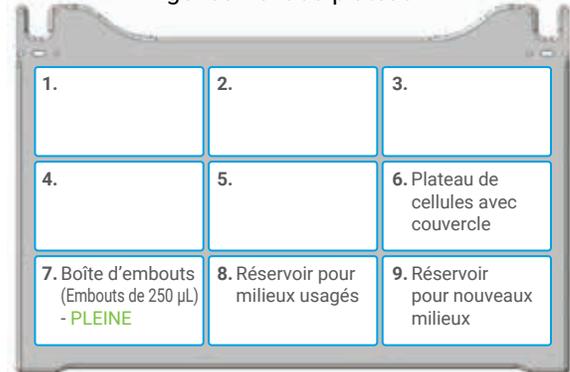


Figure 2. Configuration du plateau Bravo et du matériel de laboratoire utilisés pour le lavage des cellules.

Agencement du plateau

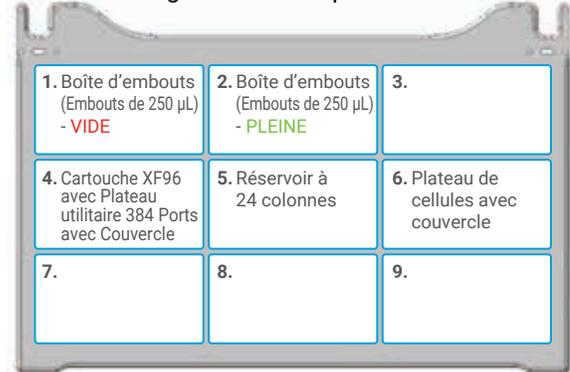


Figure 3. Configuration du plateau Bravo et du matériel de laboratoire utilisés pour le chargement des ports d'injection.

Agencement du plateau

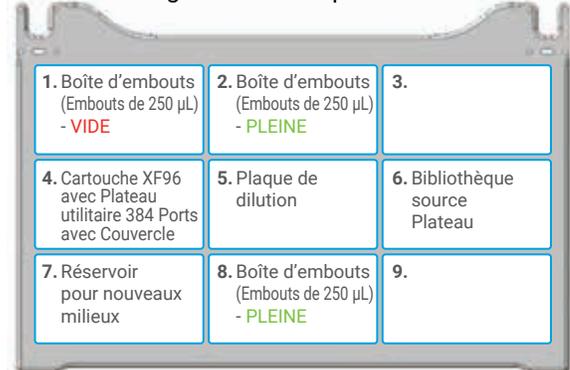


Figure 4. Configuration du plateau Bravo et du matériel de laboratoire utilisés pour les séries de dilutions.

Sélection d'inhibiteurs mitochondriaux et glycolytiques dans la bibliothèque de composés

Un total de 72 composés provenant de la bibliothèque Selleck-Pfizer (Selleckchem.com, référence L2400, bibliothèque de composés sous licence Pfizer) ont été sélectionnés pour l'inhibition mitochondriale et glycolytique. Pour cette petite sélection, le Bravo a été utilisée pour 1) laver les cellules, 2) effectuer 100 dilutions de la bibliothèque de composés à partir d'une plaque source à 96 puits, et 3) distribuer 20 µL des solutions de composés dilués dans les ports A de la cartouche du capteur XF96. L'analyse Seahorse XFe96 consistait en trois mesures de taux (OCR et ECAR de base), suivies par une injection des composés du test (10 µM final) et neuf autres mesures de taux. Les valeurs OCR et ECAR provenant de la mesure finale (numéro 12) ont été utilisées pour déterminer l'activité inhibitrice.

Trois analyses XF ont été réalisées en parallèle, générant des microplaques de réplicats techniques. Cette méthode a été répétée trois fois, générant un nombre total de neuf réplicats techniques (c'est-à-dire neuf microplaques individuelles). Z' pour la qualité des données a été généré en utilisant 0,5 µM d'un cocktail d'antimycine A /roténone (AA/Rtn) pour le contrôle positif de l'inhibition OCR, 50 mM de 2-désoxyglucose (2-DG) pour le contrôle positif de l'inhibition ECAR, et 0,1 % de diméthyl sulfoxyde (final) comme contrôle du véhicule.

Résultats et discussion

Les analyses Seahorse XF du colorant nucléaire Hoescht (Thermo Scientific, PI62249) présentent des éléments communs pour la préparation des échantillons, quel que soit l'application ou le kit spécifique utilisé :

- Ensemencement de cellules sur la microplaque de culture cellulaire XF96
- Lavage de cellules (échange du milieu de croissance pour un milieu d'analyse)
- Préparation des composés (dilutions)
- Chargement du port avec le composé dans la cartouche du capteur XF96

Ces étapes du flux de tâches sont routinières, impliquent un pipetage important, et risquent d'ajouter des erreurs aux analyses ; c'est pourquoi elles méritent d'être automatisées.

Ce projet portait sur les étapes b - d pour évaluer l'utilité de l'automatisation Bravo pour effectuer la préparation d'échantillons de cellules vivantes post-culture pour les analyses Seahorse XFe96. Il a déjà été démontré que l'automatisation de l'ensemencement de cellules avec le Bravo améliore la robustesse des analyses ([Gestin et al.](#)). Bien que le Bravo puisse s'intégrer dans une hotte de culture de tissus, un tel agencement n'a pas été mis en oeuvre dans ce laboratoire, les performances de l'ensemencement automatisé des cellules n'ont donc pas pu être évaluées.

Un flux de tâches de haut niveau pour une analyse Seahorse XF est décrit dans la Figure 5.



Figure 5. Flux de tâches général de l'analyse Seahorse XF. Les étapes de la préparation automatisée d'échantillons avec le Bravo sont illustrées en vert : lavage des cellules, préparation des solutions d'injection, et chargement des cartouches de capteurs Seahorse XFe96. Gain de temps total de 20 à 60 minutes par plateau.

Lavage des cellules

Dans les analyses XF utilisant des cellules adhérentes, les cellules sont lavées avant l'analyse XF pour éliminer les composants du milieu de croissance et pour fournir le milieu de l'analyse XF aux cellules. Pour valider le lavage des cellules par un système automatisé de manière uniforme et sans endommager ou perdre des cellules, des cellules faiblement adhérentes HEK293 ont été testées. Lors du lavage des cellules, il est possible de déloger des cellules faiblement adhérentes en distribuant le milieu trop rapidement et/ou en touchant accidentellement les monocouches de cellules avec l'embout de la pipette. La Bravo a été programmée avec une hauteur spécifique au-dessus du fond du puits afin d'éviter de toucher la couche de cellules. De plus, la vitesse d'aspiration et de distribution du milieu de l'analyse a été programmée pour minimiser le risque de délogement des cellules des microplaques de culture cellulaire XF96.

Afin d'évaluer le lavage des cellules automatisé, une analyse XF mesurant la respiration de base (taux de consommation d'oxygène ou OCR) et la production d'acide (H^+) (taux d'acidification extracellulaire ou ECAR) a été effectuée en utilisant des cellules HEK293 (Figure 6). Les données présentées montrent que le Bravo a effectué l'étape de lavage des cellules de manière uniforme. Dans l'exemple présenté, les taux normalisés utilisant le Bravo pour le lavage n'étaient pas très différents d'un puits à l'autre (Figure 6B). En outre, lorsque l'analyse a été répétée pendant trois jours, les données montrent des valeurs ECAR cohérentes avec une faible erreur pour chaque jour. Ces données indiquent que l'intégrité de la monocouche de cellules a bien été conservée lorsque la Bravo a été utilisé pour laver les cellules (Figure 6C). En outre, le Bravo a lavé avec succès des cellules en suspension qui avaient adhéré à des microplaques de culture cellulaire XF96 avec Cel-Tak immédiatement avant le processus de lavage des cellules (données non présentées).

Le Bravo réduit au minimum les risques d'endommager la monocouche de cellules (comme illustré sur la Figure 1) en contrôlant à la fois la hauteur des embouts dans le puits et la vitesse d'aspiration ou de distribution du liquide. Cela se traduit par une meilleure uniformité du volume résiduel dans le puits, cela évite de racler ou de déloger des cellules de la surface du puits et évite la formation de bulles d'air. En outre, le milieu et le plateau de cellules sont maintenus à 37 °C sur le plateau Bravo tout au long du lavage des cellules. Cela minimise les variations de température des cellules et du milieu de l'analyse, réduisant ainsi le risque de variations supplémentaires des résultats des analyses.

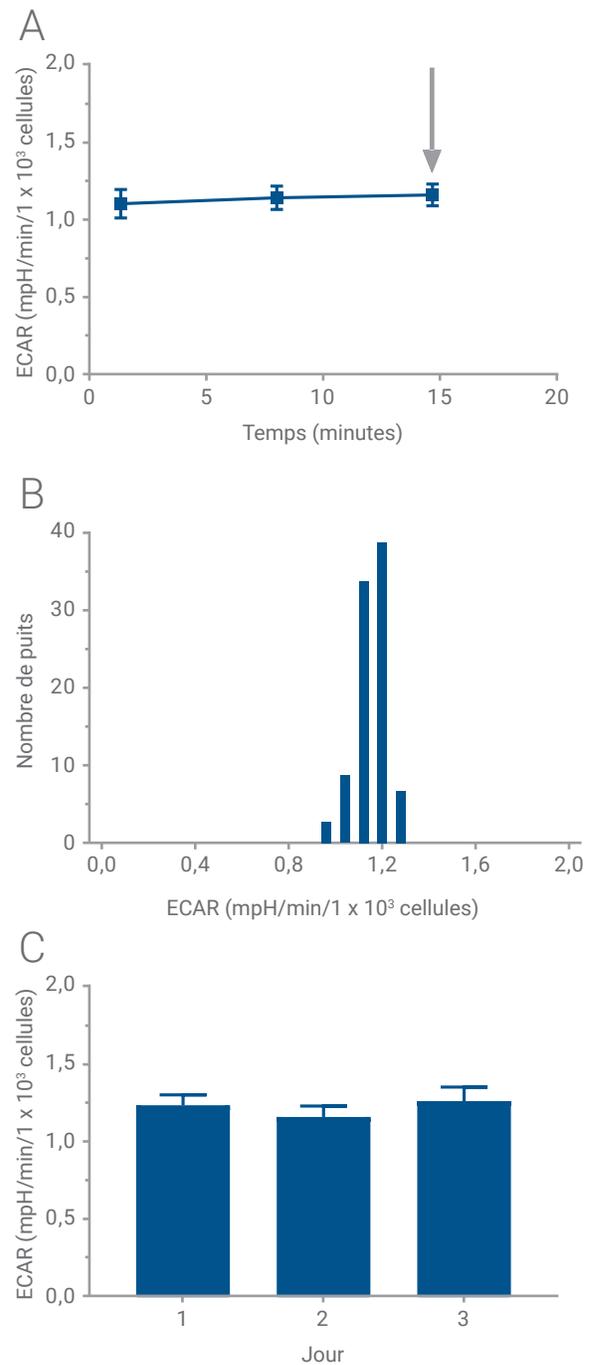


Figure 6. Test du protocole de lavage automatisé des cellules. Des microplaques ont étéensemencées avec des cellules HEK293 et un lavage automatisé des cellules a été effectué en utilisant le Bravo, suivi d'une analyse Seahorse XF. La troisième mesure de taux a été utilisée pour comparer les données. A) Analyse XF ECAR de base (aucune injection) avec normalisation. La flèche indique les données utilisées dans les panneaux B et C. B) Histogramme des valeurs ECAR (mesure 3) pour une seule microplaques XF96 (n = 92 puits). C) Valeurs ECAR (mesure 3) pour trois analyses de réplicats effectuées sur trois jours. Les données sont présentées sous forme de moyenne +/- STDEV (n = 92).

Chargement du port d'injection

Les analyses Seahorse XF nécessitent généralement le chargement d'un ou de plusieurs ports d'injection de la cartouche de capteurs avant l'analyse. Le volume de la solution d'injection chargée doit être identique pour toute une série donnée de ports d'injection (par ex. tous les ports d'injection « A », etc.) afin d'assurer une injection exacte et précise de la solution, et donc d'obtenir la même concentration de médicament dans chaque puits. De plus, il faut prendre soin de charger les ports délicatement afin de ne pas forcer le passage du liquide au fond des ports d'injection.

Un test XF Cell Mito Stress (MST), composé de trois injections séquentielles, a été réalisé pour valider le chargement précis et uniforme des solutions d'injection avec une station Bravo. La respiration maximale a été analysée (Figure 7A, flèche), car ce paramètre est sensible à de faibles variations de la concentration de FCCP.

La Figure 7 montre que le Bravo a fonctionné de manière précise et uniforme lors du chargement des solutions d'injection dans les ports de la cartouche. La réponse maximale, une mesure sensible pour les faibles variations de concentration de FCCP, a montré des taux de respiration et des réponses aux injections MST (Figure 7B) presque identiques pour chaque puits. Enfin, lorsque l'analyse a été répétée un jour de plus, les données montrent des valeurs OCR cohérentes avec de faibles erreurs pour chaque jour (Figure 7C). Globalement, cela montre que le Bravo transfère de manière uniforme la solution d'injection vers le port souhaité afin de favoriser l'ensemble de l'injection de la solution à partir du port.

Il est essentiel que le chargement du port soit précis et uniforme afin d'obtenir des données de grande qualité. Bien qu'un opérateur manuel qualifié puisse charger des ports de manière précise et uniforme, il existe toujours un risque d'erreur et les compétences pratiques varient considérablement d'une personne à l'autre. Un mauvais chargement des ports peut entraîner une mauvaise injection (échec d'injection) ou une fuite des composés dans le port avant leur injection. Une injection partielle ou un volume incorrect entraîne une concentration inférieure à celle souhaitée dans le puits. Une fuite entraîne une réponse inattendue plus tôt que prévu dans l'analyse, ce qui empêche généralement d'utiliser ces points de données pour une analyse. Le Bravo effectue systématiquement cette étape pour toutes les analyses XF en distribuant le volume exact sans créer de bulles d'air ou sans utiliser de pression excessive. Elle réduit également le risque d'erreurs humaines, comme une contamination croisée des embouts de pipettes et/ou des ports.

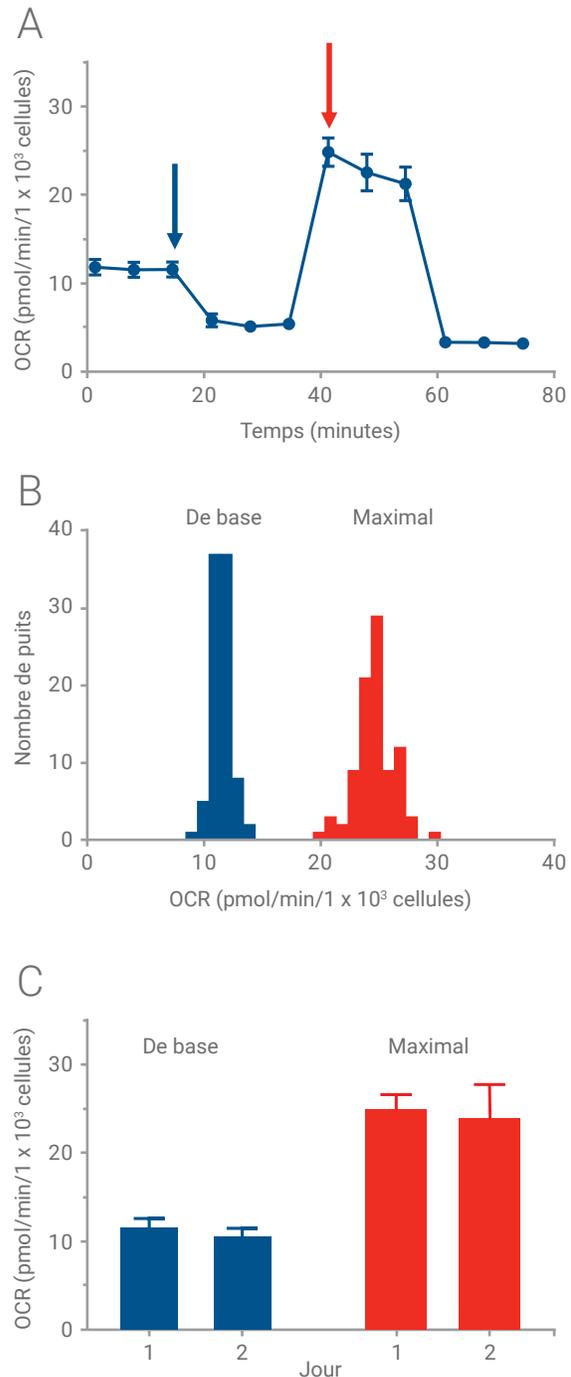


Figure 7. Évaluation du chargement du port d'injection automatisé. Les cellules HepG2 ont été ensemencées sur des microplaques de culture cellulaire XF96 et analysées après 24 heures de croissance. Des solutions d'injection MST d'oligomycine, de FCCP, et de roténone/antimycine A ont été préparées et chargées dans la cartouche XF. A) Résultats du test Cell Mito Stress, les flèches désignent les données de respiration de base (bleu) et maximale (rouge) utilisées dans les panneaux B et C. B) Histogramme des valeurs OCR de base et maximales normalisées (mesures 3 et 7) pour une seule microplaques XF96 (n = 92 puits). C) Valeurs moyennes d'OCR de base et maximales normalisées (mesures 3 et 7) pour deux analyses indépendantes. Les données sont présentées sous forme de moyenne +/- STDEV (n = 92).

Dilutions en série et analyses dose-réponse

Lors de la caractérisation d'une série de composés ou de composé synthétique potentiellement actif, une analyse dose-réponse est généralement effectuée pour évaluer l'activité (par ex. IC_{50} ou EC_{50}). La station Bravo peut faciliter ce processus en minimisant les exigences pratiques (et les risques associés) de préparation et d'exécution d'une analyse de matrice complexe de dilution.

Deux conceptions d'analyse ont été utilisées pour tester la capacité de la station Bravo à générer des matrices dose-réponse qui sont constituées 1) de réplicats techniques au sein d'une seule microplaque (Figures 8 et 9) et 2) de réplicats techniques sur plusieurs microplaques (Figures 10 et 11).

Comme indiqué précédemment, les taux de respiration cellulaire sont sensibles à de faibles variations de la concentration de FCCP, en particulier aux concentrations sous-maximales. Ainsi, une analyse dose-réponse dans une plage étroite de concentrations de FCCP est un test robuste de la précision de la station Bravo pour la préparation d'analyses dose-réponse.

Afin de tester des réplicats techniques au sein d'une seule plaque (Figure 8), la respiration des cellules HepG2 a été mesurée, via une analyse MST, en réponse à une concentration de FCCP augmentant de 0,0 à 2,0 μM par incréments de 0,2 μM . La respiration maximale (Figure 9A, flèche) augmente de manière linéaire au sein de cette plage étroite, atteignant un OCR maximum à 1 μM de FCCP, puis diminuant légèrement à 2 μM de FCCP (Figure 9B). Chaque concentration induit une réponse distincte avec de faibles CV, démontrant la précision de Bravo lors de la préparation de cette série de dilutions sur mesure. Lorsque les analyses sont effectuées sur plusieurs jours (N=2), les résultats montrent des réponses cohérentes pour le FCCP et les CV obtenus à partir de toutes les doses sont < à 10 % (Figure 9B, C).

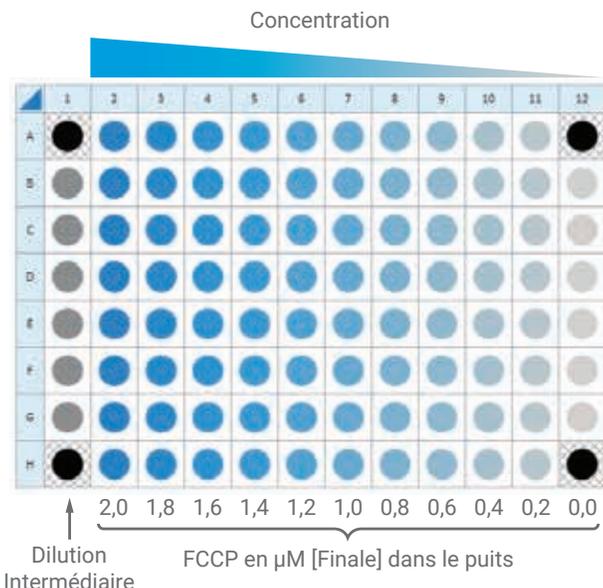
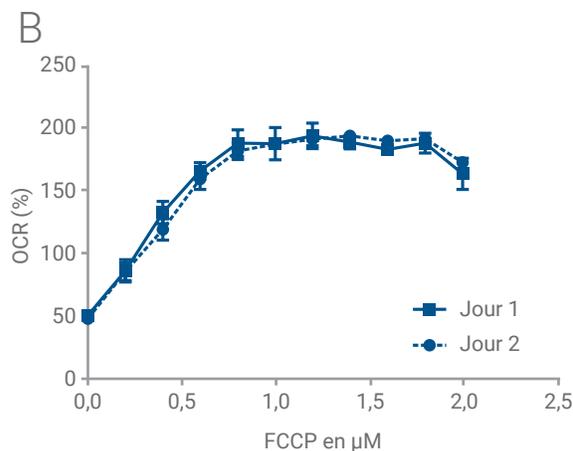
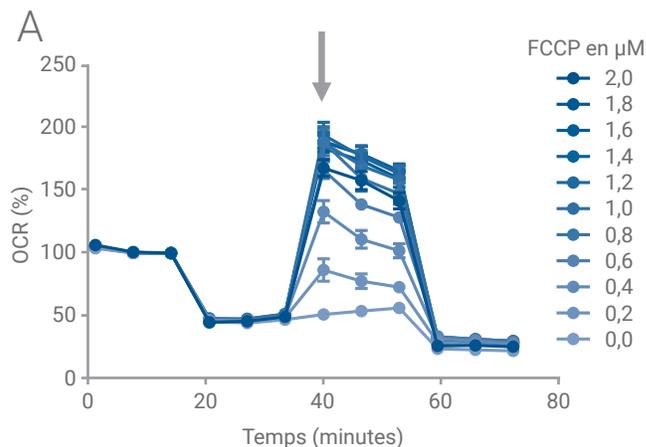


Figure 8. Agencement du plateau pour réplicats techniques de tests au sein d'une seule microplaque. Conception d'analyse XF dose-réponse utilisant un seul composé (FCCP). L'analyse consiste en une dilution en 10 étapes afin d'obtenir des concentrations finales en FCCP comprises entre 0,0 et 2,0 μM , avec huit réplicats techniques par concentration.



C

Jour 1			μM FCCP	Jour 2		
% OCR	STDEV	% CV		% OCR	STDEV	% CV
51,0	2,1	4,2	0,0	48,2	1,8	3,8
86,7	9,1	10,5	0,2	86,0	7,1	8,2
133,3	9,1	6,8	0,4	119,7	8,6	7,2
166,5	6,7	4,0	0,6	160,0	8,4	5,3
188,9	10,6	5,6	0,8	182,5	7,0	3,9
188,4	13,0	6,9	1,0	187,9	3,8	2,0
194,7	10,3	5,3	1,2	192,0	5,3	2,7
189,8	5,4	2,9	1,4	194,7	1,9	1,0
183,9	4,6	2,5	1,6	190,6	3,2	1,7
188,9	7,9	4,2	1,8	192,5	4,2	2,2
164,3	12,6	7,6	2,0	173,5	5,0	2,9

Figure 9. Réplicats techniques au sein d'une microplaque. Un titrage de FCCP a été effectué sur des cellules HepG2 sur une plage de concentrations étroite (de 0 à 2 μM par incréments de 0,2 μM). Des solutions d'injection de FCCP ont été préparées et chargées dans la cartouche à l'aide de la Bravo. A. Graphique cinétique du titrage de FCCP et de la réponse relative de l'OCR. B. Courbe dose-réponse des titrages de FCCP montrant deux expériences effectuées indépendamment, N = 8 (8 lignes x 1 plateau par trace de données). C. Valeurs d'OCR en %, du STDEV, et du CV en % pour toutes les concentrations testées comparées par jour.

La cohérence des déterminations de l'activité lorsque des réplicats sont générés sur plusieurs microplaques a également été évaluée. Le Bravo a été utilisé pour effectuer une double dilution en série de l'AA en 10 étapes (Figure 10A) et pour charger les solutions obtenues dans les ports « A » de la cartouche du capteur XF96. Chaque dilution en série a été effectuée de manière indépendante, c'est-à-dire que huit puits de réserve d'AA contenus dans une plaque source ont été dilués en parallèle en utilisant huit embouts différents du Bravo, ce qui a permis d'obtenir la série de dilutions indépendantes AA1–AA8.

Une analyse XF a été effectuée : trois mesures de base ont été enregistrées, l'AA a été injectée, puis trois autres mesures de taux ont été enregistrées (Figure 10B). La réponse a été calculée comme étant le rapport du taux de la septième mesure sur le taux de la troisième mesure (défini comme 100 %) et a été tracée comme étant l'OCR en % en fonction de l'AA en μM pour générer des valeurs IC_{50} pour chaque série de dilutions (Figure 10C). Les résultats indiquent que les réponses des différentes séries AA sont cohérentes pour les échantillons préparés par le Bravo, les

valeurs moyennes de IC_{50} étant très similaires, à la fois au sein d'un même plateau/jour et d'un plateau/jour à l'autre.

Dans l'ensemble, ces données provenant d'analyses dose-réponse modèles montrent que la station automatique de pipetage Agilent Bravo peut préparer des séries de dilutions complexes de composés de manière reproductible. Cette reproductibilité augmente la probabilité qu'un seul plateau de réplicats fournisse une réponse fiable, permettant ainsi aux données provenant des analyses dose-réponse d'être combinées à travers plusieurs microplaques de réplicats. Comme indiqué précédemment, une dilution manuelle peut augmenter les risques d'avoir des petites différences lors du transfert de volume (qui peuvent se propager au cours des étapes de dilution), ainsi que le risque de contamination croisée des composés. La station Bravo garantit que les faibles volumes sont transférés avec précision, sans contamination croisée des échantillons. Enfin, le Bravo peut charger les ports de la cartouche XF en une seule étape automatisée, plutôt qu'en plusieurs étapes comme le ferait un opérateur manuel, ce qui diminue la variation ou l'erreur associée à ces étapes manuelles.

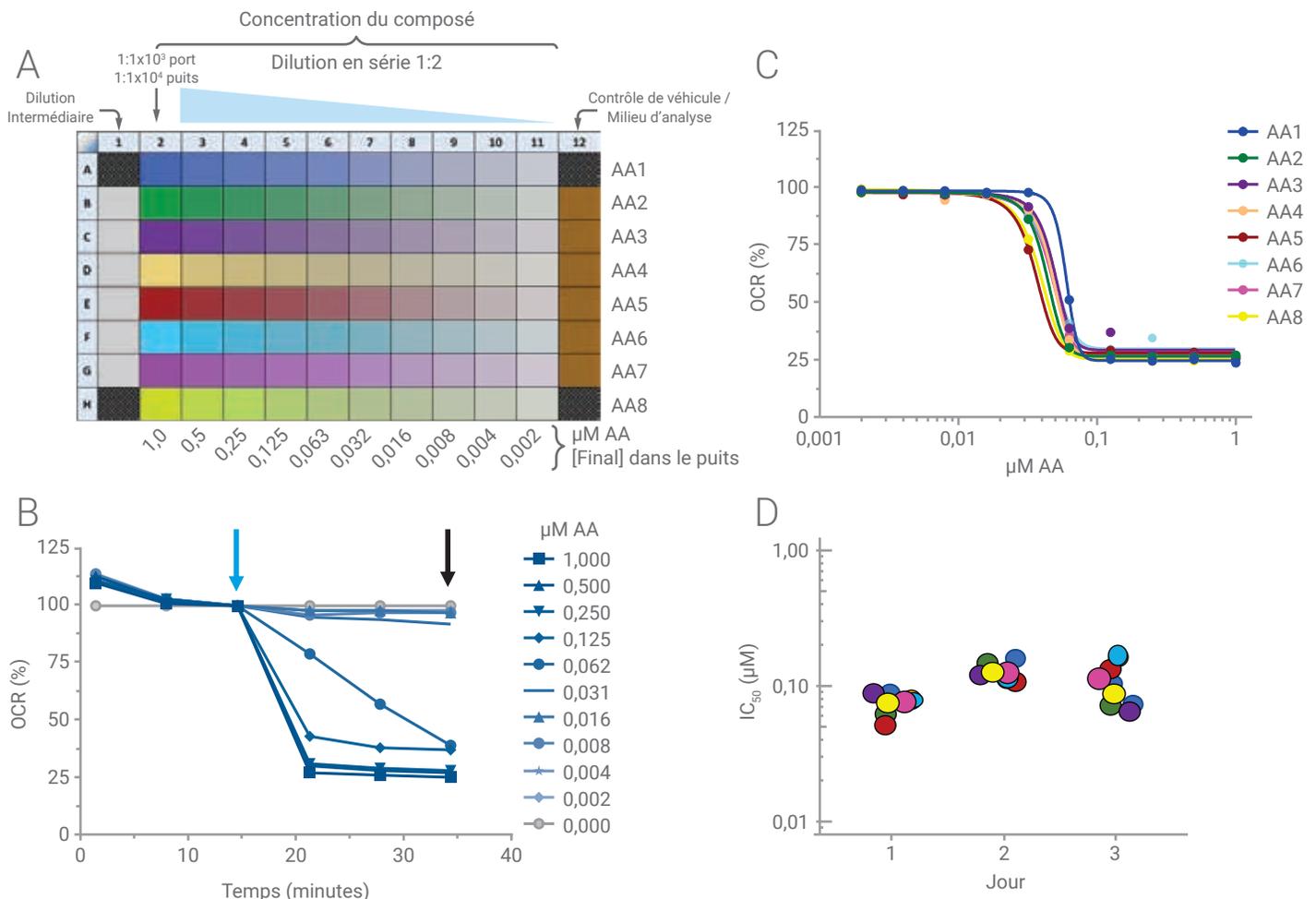


Figure 10. Analyse dose-réponse de composés A. Huit séries de dilutions préparées individuellement d'AA ont été étiquetées AA1, AA2...AA8. Chaque série de dilution consiste en une double dilution en série en 10 étapes pour obtenir des concentrations de AA allant de 0,002 à 1,0 μM . La concentration finale est indiquée en bas du plateau. B. Données cinétiques XF obtenues pour une seule série de dilutions (AA1). C. Courbes dose-réponse obtenues (AA1- AA8) à partir d'un seul plateau. D. Performances du titrage de l'antimycine-A. Les valeurs de l' IC_{50} ont été calculées pour chaque ligne, conformément à l'agencement de l'analyse illustré dans le panneau A. Chaque point représente une valeur d' IC_{50} calculée à partir d'une seule série de dilution (ligne du plateau). Les valeurs sont cohérentes d'une ligne à l'autre et d'un jour à l'autre.

Sélection dans la bibliothèque de composés – Analyse d'inhibition aiguë

Une petite sélection dans la bibliothèque de composés pour connaître l'inhibition mitochondriale et glycolytique a été effectuée afin d'illustrer le flux complet de tâches automatisé. Soixante-douze composés de la bibliothèque Selleck-Pfizer L2400 (Figure 11, en haut) ont été sélectionnés pour rechercher une activité inhibitrice mitochondriale et glycolytique. Bravo a dilué les composés du test de sorte que la concentration finale du puits soit égale à 10 μM et a chargé les composés et contrôles à tester dans les ports d'injection.

Dans l'analyseur Seahorse XFe96, les taux de base ont été définis dans des cellules HepG2 comme auparavant, puis les composés de la bibliothèque ont été injectés, et les réponses OCR et ECAR aigus ont été enregistrées pendant une heure (Figure 11, en bas). Les réponses ont été calculées comme étant le rapport du taux à 80 minutes (flèche bleue) sur le taux juste avant l'injection des composés (flèche orange) et sont exprimées en % du taux avant l'injection des composés. Cette analyse a été répétée trois fois chaque jour pendant trois jours pour générer neuf plateaux de sélection de réplicats.

Z' est une mesure standard des performances de l'analyse et a donc été calculé pour les deux données principales sur chacun des plateaux de réplicats (Figure 12). Concernant l'inhibition mitochondriale, le mélange de composés AA/Rtn est utilisé comme contrôle positif. Concernant l'inhibition de la glycolyse, du 2-désoxyglucose (2-DG) a été utilisé comme contrôle positif. Les valeurs moyennes de Z' pour l'analyse de l'inhibition mitochondriale étaient de 0,88 et de 0,77 pour l'analyse de l'inhibition de la glycolyse, ce qui indique que la conception et l'exécution de l'analyse sont robustes.

Concernant la bibliothèque de composés, les réponses ont été tracées sous forme d'OCR ou d'ECAR relatif (%) (Figure 13). Comme en témoignent les faibles barres d'erreur représentant l'écart-type de la réponse pour chaque composé, les analyses de l'inhibition sont hautement reproductibles d'un plateau à l'autre et d'un jour à l'autre. Cette reproductibilité et les données Z' indiquent que la station automatique de pipetage Bravo et la station Seahorse XFe96 constituent une méthode robuste pour la détection des inhibiteurs mitochondriaux et glycolytiques.

Dans le plan de test illustré sur la Figure 11, des cellules ont été évaluées avant et une heure après l'injection du composé dans le même puits. Cette station prend également en charge la conception et les performances des analyses dans lesquelles des cellules sont traitées avec des composés avant l'analyse XF (exposition chronique), afin d'étudier les effets cinétiques à plus long terme des traitements avec ces composés. Dans ce cas, la station Bravo sera utilisée pour la distribution des composés directement dans la microplaque de culture cellulaire XF contenant les cellules à étudier à des moments prédéterminés avant l'analyse XF (par ex. 24 heures).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	33	41	49	57	65	AM	2-DG	BKG
B	2	10	18	26	34	42	50	58	66	AM	2-DG	BKG
C	3	11	19	27	35	43	51	59	67	AM	2-DG	Aucune cellule
D	4	12	20	28	36	44	52	60	68	AM	2-DG	Aucune cellule
E	5	13	21	29	37	45	53	61	69	VEH	AA/Rtn	Aucune cellule
F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	VEH	AA/Rtn	Aucune cellule
G	7	15	23	31	39	47	55	63	71	VEH	AA/Rtn	BKG
H	8	16	24	32	40	48	56	64	72	VEH	AA/Rtn	BKG

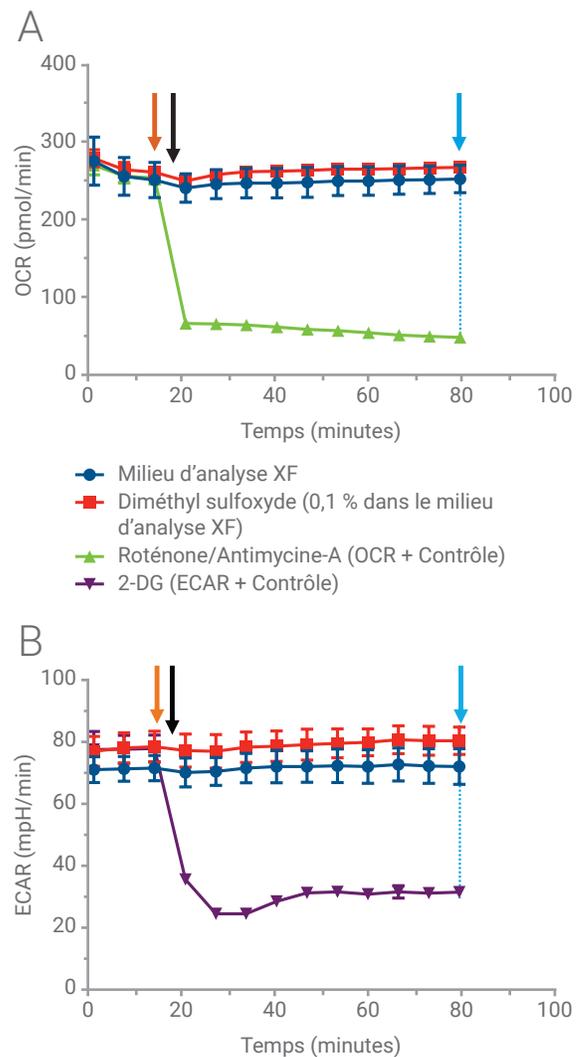


Figure 11. Sélection dans la bibliothèque de composés. En haut. Plan de plaque XFe96. Les composés sont étiquetés avec un numéro (1–72), AM : assay media [Milieu de l'analyse]; VEH : Contrôle de diméthyl sulfoxyde; 2-DG : Contrôle positif ECAR; Rtn/AA : Contrôle positif OCR. En bas. Représentation de l'analyse XF pour l'OCR (A) et l'ECAR (B), indiquant le moment de l'injection (flèches noires). Les points de données utilisés pour le calcul des réponses en % sont indiqués à l'aide de flèches respectivement orange (100 %) et bleues.

Jour-plateau	OCR Z'	ECAR Z'
1-A	0,92	0,84
2-A	0,87	0,72
3-A	0,83	0,29
1-B	0,89	0,87
2-B	0,88	0,86
3-B	0,88	0,84
1-C	0,88	0,84
2-C	0,86	0,77
3-C	0,90	0,88
MOYENNE Z'	0,88	0,77

Figure 12. Valeurs de Z' pour les réplicats d'inhibition aiguë. Valeurs de Z' du contrôle d'inhibition de l'OCR (roténone/AA) et du contrôle d'inhibition de l'ECAR (2-DG) pour trois réplicats analysés sur trois jours (n = 9 par composé).

Résumé

Cette note d'application illustre les méthodes et performances de la manipulation automatisée de liquides pour la préparation d'échantillons lors d'analyses XF. L'utilisation de la station automatique de pipetage Agilent Bravo pour automatiser les étapes de lavage des cellules, de préparation des solutions d'injection, et de chargement des ports de cartouche de capteur a obtenu des résultats précis et cohérents. La station automatique de pipetage Agilent Bravo fournit également d'autres avantages : 1) une réduction des erreurs manuelles associées aux étapes de pipetage manuel répétées, 2) une amélioration de la cohérence et de la fiabilité de la qualité des données dans et entre les microplaques, et 3) une réduction du temps de manipulation pour la préparation des analyses XF. L'automatisation des étapes clés de manipulation manuelle des liquides d'une analyse XF se traduit ainsi par une plus grande efficacité du flux de tâches des analyses XF, ainsi qu'une amélioration de la qualité des données obtenues.

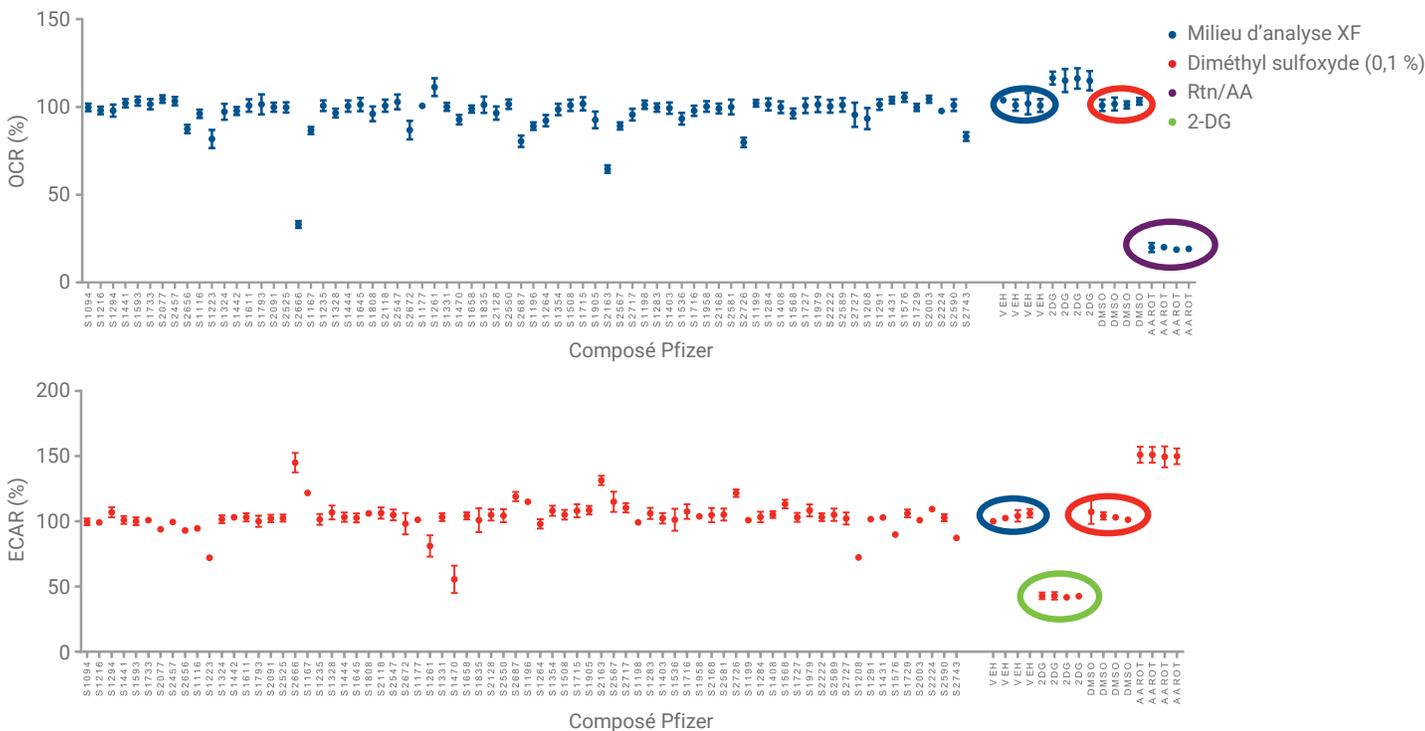


Figure 13. Exemple de résultats d'une analyse d'inhibition aiguë utilisant la bibliothèque de composés Selleck-Pfizer L2400. Les réponses sont illustrées en haut pour l'activité mitochondriale (% d'OCR) et en bas pour la glycolyse (% ECAR). Les réponses des composés de contrôle positif roténone/entimycine-A (inhibiteur OCR, violet) et 2-DG (inhibiteur ECAR, vert) sont également indiquées. Les réponses OCR et ECAR pour le contrôle de véhicule (0,1 % diméthyl sulfoxyde) sont entourées en rouge.

Matériel supplémentaire

Spécifications de la station automatique de pipetage Agilent Bravo à utiliser avec les analyseurs XFe96 et XF96 (toutes les hauteurs sont mesurées par rapport au fond du plateau ou de la surface spécifié)

Hauteur d'aspiration dans le plateau cellulaire	3 mm
Vitesse d'aspiration pour :	
Plateau cellulaire XF96	« embout fixe 51-200 µL »
Réservoir (86 mL)	Par défaut
Plateau de stockage (96)	Par défaut
Réservoir 24 colonnes	Par défaut
Hauteur de distribution pour :	
Réservoir (86 mL)	2 mm
Cartouche XF96	0,5 mm
Vitesse de distribution pour :	
Plateau cellulaire XF96	« embout fixe lavage lent »
Réservoir (86 mL)	Par défaut
Cartouche XF96	« 384 embouts jetables 10–50 µL »

Tableau S1. Spécifications de la station automatique de pipetage Agilent Bravo à utiliser avec les analyseurs Agilent Seahorse XFe96.

www.agilent.com/chem/discoverxf

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 4 mars 2019
5994-0717FR