

## Cytométrie en flux

### Cycle cellulaire : coloration de l'ADN avec l'Iodure de Propidium



#### Réactifs

- Iodure de Propidium (IP) : Sigma référence P4170
- RNase A : Sigma référence R4875
- Ethanol
- Phosphate Buffer Saline (PBS)



#### Solutions stock

- IP : Préparer une solution en PBS à 40 mg/ml puis plusieurs dilutions à 0,4 mg/ml. Conserver à -20°C.
- RNase : Préparer une solution en PBS à 10 mg/ml et plusieurs solution à 1 mg/ml. Chauffer 30 minutes à 75°C et conserver à -20°C.
- Ethanol : Préparer une solution à 70% en PBS et conserver à -20°C.



#### Suspension cellulaire

- Préparer une suspension cellulaire à  $0,5 \cdot 10^5 - 10^6$  cellules/ml.
- Cellules adhérentes : trypsiner et arrêter l'action de la trypsine avec du milieu de culture contenant du sérum. Centrifuger à 1200-1500 rpms, 5 minutes. Laver les cellules 1 x en PBS.
- Remettre le culot cellulaire en suspension avec un cône de pipette dans 100  $\mu$ l de PBS.



Les cellules doivent être très bien dissociées.



#### Fixation

- Ajouter goutte à goutte 2 ml d'éthanol 70% froid tout en agitant lentement la suspension cellulaire (vortex).
- Incuber minimum 1 heure à 4°C ou 30 minutes à -20°C.
- Centrifuger et reprendre le culot avec une solution contenant : 800  $\mu$ l de PBS, 100  $\mu$ l de RNase à 1 mg/ml et 100  $\mu$ l d'IP à 0,4 mg/ml.



Pour plusieurs échantillons préparer une seule solution afin de ne pas introduire de biais.

- Incuber 30 minutes à 37°C.

Fiche Analyse des phases du cycle cellulaire : IP

# Cytométrie en flux

## Cycle cellulaire : coloration de l'ADN avec l'Iodure de Propidium

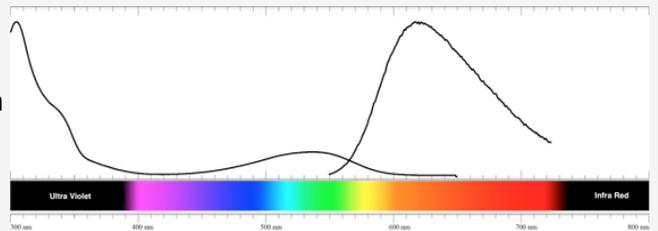


### Caractéristique de l'IP

- Masse molaire (M) : 668,4 g/mol
- Formulaire moléculaire :  $C_{27}H_{34}I_2N_4$
- Molécule cationique : pas de diffusion à travers la membrane cytoplasmique des cellules. Colorant d'exclusion.
- Fixation sélective et quantitative sur les polynucléotides en doubles hélices en s'intercalant entre les paires de bases des acides nucléiques (ADN, ARN, ADN/ARN). Augmentation du rendement de fluorescence lors de la fixation (>20 x).
- Spectre :

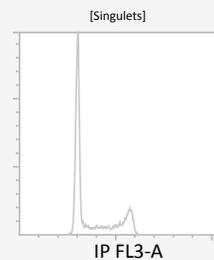
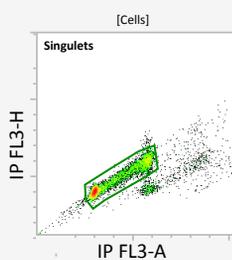
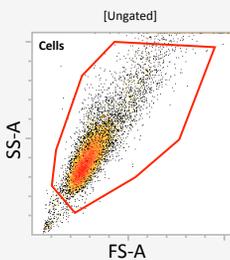
Excitation maximale après liaison : 305 ou 536 nm

Emission maximale après liaison : 617 nm



### Acquisition

- Dot plot morphologie : Taille/Structure
- Dot plot d'exclusion des doublets : paramètre de l'IP en aire (A) de l'impulsion électrique / Paramètre de l'IP en hauteur (H) de l'impulsion électrique - Fenêtrage sur les cellules
- Histogramme : paramètre de l'IP en aire de l'impulsion électrique – Fenêtrage sur les singulets



- Vitesse de passage des cellules en mode low (environ 200 C/seconde)



### Toxicité

- Produit nocif
- Porter une blouse
- Manipuler avec des gants
- Evacuation approprié

Fiche Analyse des phases du cycle cellulaire : IP

# Cytométrie en flux

## Cycle cellulaire : coloration de l'ADN avec l'Iodure de Propidium



### Troubleshooting

#### STOECHIOMETRIE :

- Liaisons fluorochromes et acides nucléiques non covalentes et réversibles, si la concentration de colorant est trop faible, pas de saturation des sites de liaison et variation de l'intensité de marquage en fonction du nombre de sites soit de la concentration cellulaire. La concentration cellulaire, pour une même solution de marquage, doit être identique dans chaque échantillon.
- L'accessibilité des acides nucléiques pour les colorant de l'ADN varie en fonction de la structure de la chromatine. Ce facteur est important lorsque l'on souhaite analyser le cycle d'un mélange de populations cellulaires.
- Vérification de la stoechiométrie : le rapport des intensités de fluorescence des populations G2/M et G0/G1 doit être proche de 2. L'utilisation de contrôle interne est conseillé (ex : érythrocyte de poulet).

#### RESOLUTION :

- Le coefficient de variation (CV) est un indicateur de la résolution, plus il est fin (< 8) et plus précise sera l'estimation des différentes phases du cycle.
- Elle est dépendante des réglages du cytomètre, de la propreté de la chambre d'analyse, de la préparation de l'échantillon, de la vitesse de défilement des cellules.

#### LINEARITE :

- Précision de la position d'une cellule dans un canal corrélée à son contenu en ADN. Sur un cytomètre linéaire, le pic G2/M se situe au double du pic G0/G1. Indispensable pour le calcul de ploïdie.
- Le cytomètre doit être parfaitement aligné et stable. Il existe un kit DNA QC (Becton Dickinson référence 349523).



### Références bibliographiques

- Doublet discrimination in DNA cell-cycle analysis  
Wersto RP, Chrest FJ, Leary JF, Morris C, Stetler-Stevenson MA, Gabrielson E  
Cytometry. 2001 Oct 15;46(5):296-306
- Flow cytometry to sort mammalian cells in cytokinesis  
Gasnereau I, Ganier O, Bourgain F, de Gramont A, Gendron MC, Sobczak-Thépot J  
Cytometry A. 2007 Jan;71(1):1-7
- Critical Aspects in Analysis of Cellular DNA Content.  
Darzynkiewicz Z.  
Curr Protoc Cytom.2011 Apr; Unit-7.12.
- Cycle cellulaire et cytométrie en flux  
Grunwald, J.F. Mayol & X. Ronot.  
Tec et Doc. Lavoisier. Paris. 2010.

Fiche Analyse des phases du cycle cellulaire