

1. OBJECTIFS ET PRINCIPE

Étude de la phase S du cycle cellulaire : analyse du cycle cellulaire par double marquage, iodure de propidium et BrdU.

Le principe consiste à incuber des cellules en culture avec de la BrdU qui va s'incorporer dans l'ADN, à la place de la Thymine. Seules les cellules en cours de synthèse d'ADN sont capables de l'incorporer, ce qui permettra d'étudier la phase S du cycle cellulaire.

Les cellules sont ensuite fixées, perméabilisées, puis l'ADN est marqué à l'aide de l'Iodure de Propidium, afin de caractériser le cycle cellulaire complet.

2. REACTIFS

- BrdU (Bromodésoxyuridine) à 3mM : 9,2mg/10ml de milieu de culture sans SVF (PM : 307,1)
- PBS (Phosphate Buffered Saline) : tampon phosphate salin isotonique pH7,0 , utilisé pour rincer les cellules, pour qu'il n'y ait plus de traces de milieu avant de les traiter.
- Éthanol à 95 %
- Pepsine à 0,5% final
- HCl 30mM
- HCl 2N
- PBS-tween 20 à 0,5% final
- Anticorps anti BrdU
- Anticorps anti souris Alexa488
- Iodure de propidium : 1mg/ml

3. COLORATION

- Ensemencer les cellules (au moins 2×10^6 par point de marquage) en changeant le milieu s'il est mis depuis 2 ou 3 jours.
- Ajouter le BrdU 3mM (100ul pour 10ml de milieu) et laisser incuber pendant 30 min.
- Centrifuger à 1700 tr/min pendant 5 min.
- Resuspendre le culot dans 10ml de PBS et centrifuger 10 min à 1700 tr/min.
- Resuspendre le culot dans 0,5ml de PBS froid et ajouter au goutte à goutte 1,5ml d'éthanol froid.
- Laisser fixer 2 ou 3 heures à 4 °C ou même plusieurs jours à 4 °C (sans aucun problème).
- Centrifuger à 2800 tr/min pendant 5 min.
- Resuspendre le culot avec 3 ml de pepsine 0,5 mg/ml dans du HCl 30 mM (préalablement chauffé à 37 °C).
- Agiter doucement la suspension pendant 30 min à T° ambiante.
- Centrifuger à 2800 tr/min pendant 5 min.
- Reprendre le culot avec 1,5ml d'HCl 2N et laisser incuber pendant 15 min sous agitation.
- Ajouter 5ml de PBS et centrifuger fois 10 min à 2800 tr/min (répéter 2x)
- Ajouter 100 ul de PBS-tween-Ac-anti BrdU (1/50 DAKO).
- Agiter les cellules pendant 1 h à T° ambiante.

- Centrifuger à 2800 tr/min pendant 5 min.
- Ajouter 5 ml de PBS et centrifuger 10 min à 2800 tr/min.
- Additionner 100ul de l'anticorps anti souris Alexa (488nm) 1/1000.
- Incuber 40 min à l'abris de la lumière.
- Ajouter 5 ml de PBS et centrifuger 10min à 2800 tr/min.
- Resuspendre le culot avec 1 ml de PBS tween + 10 ul d'iodure de propidium.

4. ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX

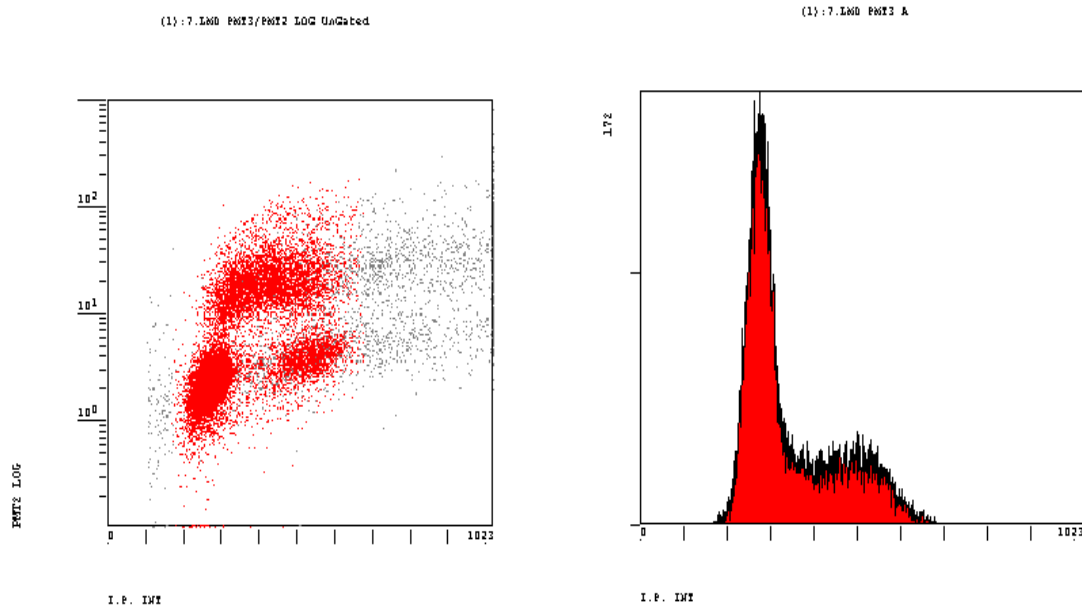
L'excitation de l'iodure de propidium et du BrdU couplé à l'anticorps anti souris Alexa(488nm) est réalisée avec la raie 488 nm d'un laser argon. L'émission de la fluorescence verte (BrdU) à 530 nm et de la fluorescence rouge (IP) à 610 nm est recueillie à l'aide de filtres dichroïques et bandes passes spécifiques.

- Histogramme 1 : X1= fluorescence rouge (IP), mode intégral ou surface
Y1= fluorescence verte (BrdU)

Dans l'histogramme 1, faire une fenêtre d'analyse pour éliminer le bruit de fond, les agrégats et débris cellulaires qui pourraient interférer avec la phase S du cycle cellulaire.

- Histogramme 2 : mono paramétrique : X2=Fluorescence IP, mode intégral, conditionné sur la fenêtre de l'histogramme1.

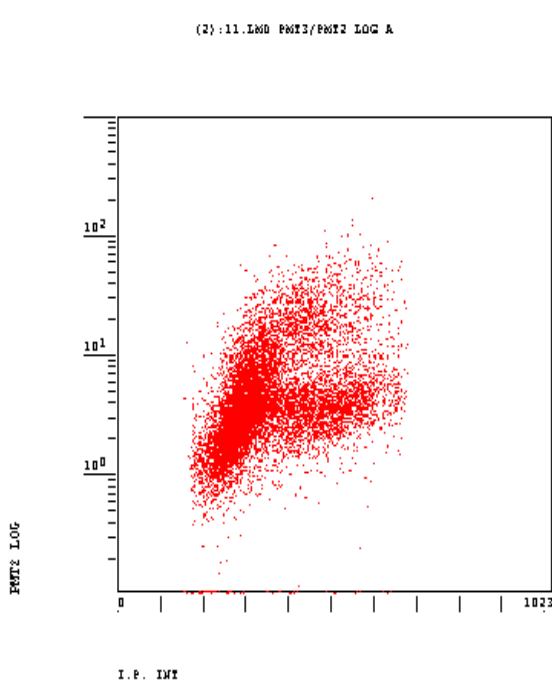
Histogrammes 1 et 2 des cellules sans traitements :



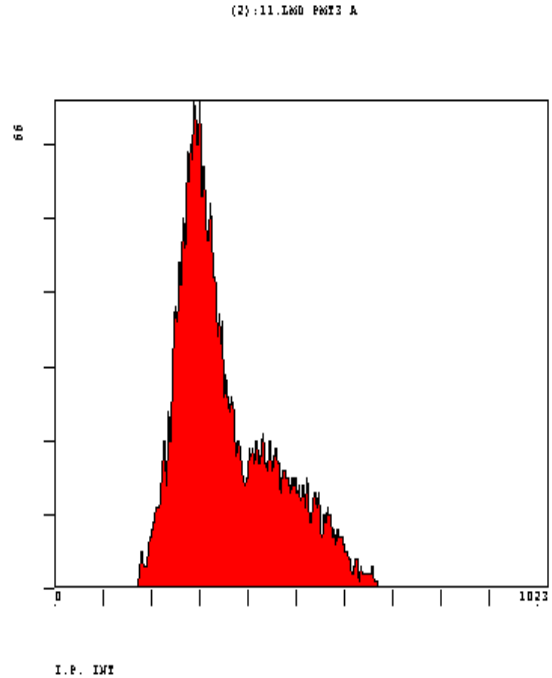
Dot Plot 1 : histogramme témoin, marquage à la BrdU en fonction du cycle cellulaire (IP)

Histogramme 2 : histogramme témoin, nombre de cellules totales en fonction de la concentration d'ADN totale [IP].

Histogrammes 1 et 2 des cellules traitées : inhibiteur de la phase S.



Dot Plot 1 : marquage à la BrdU en fonction du cycle cellulaire (IP)



Histogramme 2 : Nombre de cellules totales en fonction de la concentration d'ADN totale [IP].

5. Expression des résultats :

Cellules :	Cytomètre :	
% G0-G1 :	% S :	% G2-M :
<u>Commentaires :</u>		
<p>Le double marquage du cycle cellulaire nous permet d'analyser le contenu en ADN par l'iodure de propidium et l'étude de la phase S par la détection de la BrdU à l'aide d'un anticorps monoclonal (Ac anti BrdU) couplé à un fluorochrome (Ac anti souris Alexa, 488nm). On peut ainsi distinguer 3 populations : les cellules en phase G0/1, les cellules en cours de réplication (phase S) et les cellules en phase G2+M.</p>		