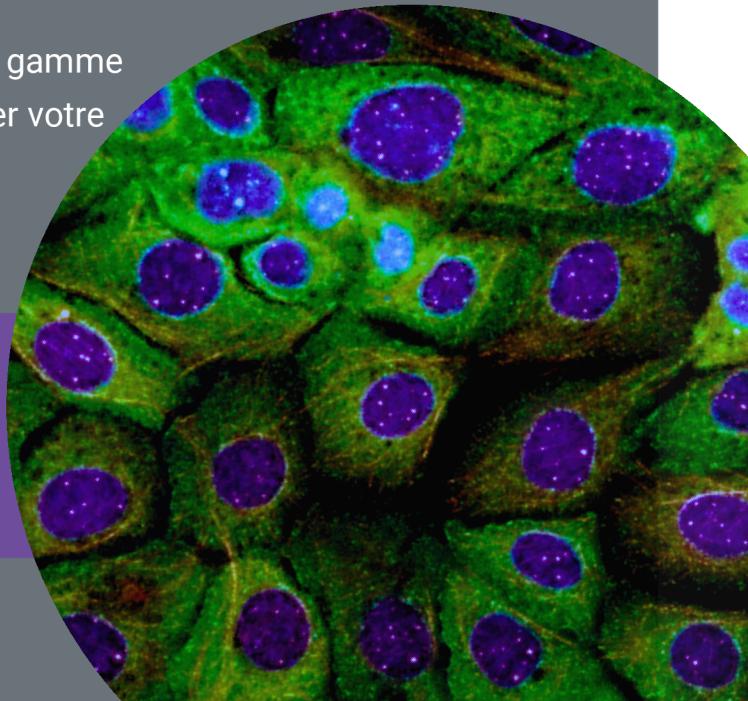


# Essais de devenir et de santé cellulaire pour oncologie

En oncologie, les essais de viabilité à haut débit sont la pierre angulaire dans la cascade de criblage pour guider le SAR du développement de nouvelles drogues. De plus, dans les stades précoces de développement, les essais cellulaires sont indispensables à la compréhension des effets fonctionnels des nouveaux agents thérapeutiques. Notre portfolio englobe des essais à haut débit permettant de déterminer des indicateurs fondamentaux de la santé cellulaire, tels que la prolifération, la viabilité et la cytotoxicité. Nous sommes également en mesure de tester des essais plus complexes qui permettent la quantification des altérations du cycle cellulaire, la sénescence, l'apoptose, et plusieurs autres.

Profitez de l'expérience de notre équipe sur une vaste gamme d'essais de santé cellulaire afin de développer et tester votre modèle de choix.

- Essais de santé cellulaires à haut débit
- Lectures avancées du devenir cellulaire
- Mesures de mort cellulaire



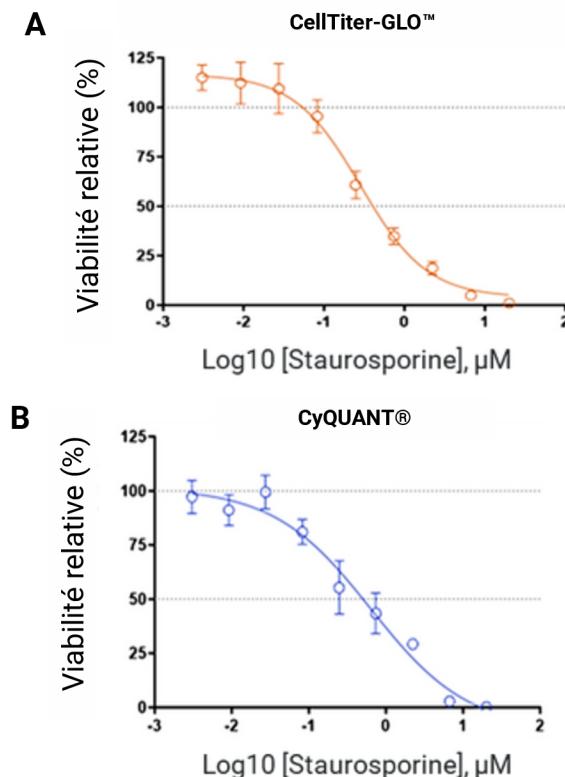
# Essais de santé cellulaire à haut débit

## Essais de viabilité et de prolifération

Des essais de viabilité à haut débit fournissent de l'information rapidement sur la capacité d'un composé à tuer ou à inhiber la croissance cellulaire. Ces informations permettent de mesurer la puissance, l'efficacité et la fenêtre thérapeutique d'un composé. De nombreux types d'essais sont disponibles pour déterminer la viabilité/prolifération cellulaire, ce qui inclus des essais basés sur l'activité mitochondriale (XTT, MTT), le contenu en ATP (CellTiter GLO™), en protéines (SRB) ou en ADN (CyQuant®), ou autre activité enzymatique (Calcein-AM). Afin de fournir des résultats robustes, les essais de viabilité doivent être finement optimisés quant à la durée de l'essai, la densité cellulaire à l'ensemencement, le besoin de traiter à nouveau les cellules, et le type de lecture finale. Nos scientifiques peuvent vous guider à identifier les meilleurs essais pour votre programme de recherche et ainsi livrer des résultats justes et reproductibles.

## Fig 1. Comparaison de la réponse à un composé à l'aide des essais CTG (A) et CyQuant (B).

Un Tecan D300e (Tecan) est utilisé pour distribuer le composé à différentes concentrations. Les plaques sont lues en luminescence ou fluorescence avec un lecteur de type SpectraMax I3X (Molecular Devices).

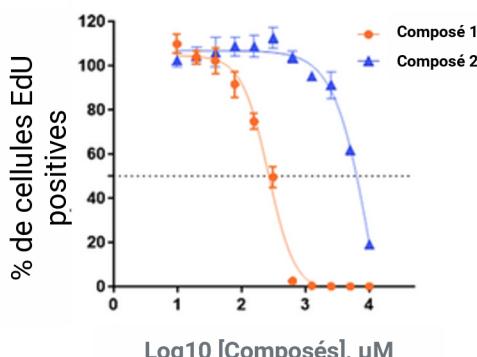
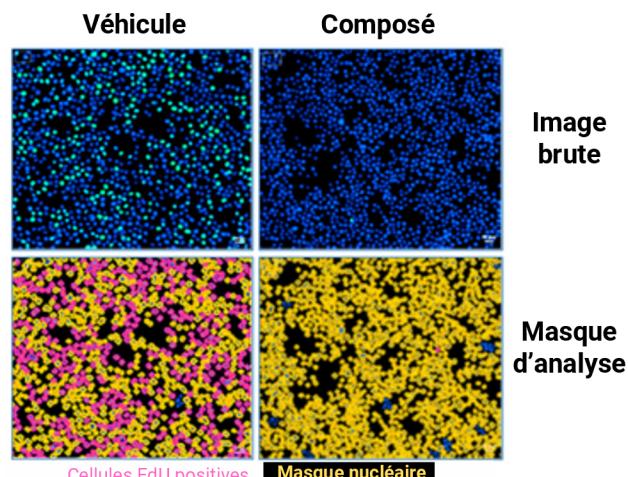


## Essais d'incorporation d'EdU

L'incorporation d'EdU (5-ethynyl-2'-désoxyuridine), optimisée avec lecture par un imageur de plaque, permet d'avoir une solution à haut débit pour les composés ayant des mécanismes d'action impactant la réPLICATION d'ADN. L'intégration de l'EdU en phase S du cycle cellulaire permet de quantifier avec précision les cellules prolifératives (% de cellules positives). De plus, l'intensité de la fluorescence corrèle avec la vitesse de synthèse d'ADN [1]. Dans les programmes de recherche en oncologie, l'incorporation d'EdU en plaque peut être utilisée pour générer des courbes de doses-réponses d'inhibiteurs du cycle cellulaire en G1/S, des agents qui endommagent l'ADN, et des inhibiteurs de réparation d'ADN.

## Fig 2. Essai d'incorporation d'EdU et acquisition d'image à haut contenu.

Acquisition et analyse réalisées avec un BioTel CytaION5 (Agilent). Le nombre total de cellules est obtenu par décompte de masque nucléaire (marquage au DAPI). Les cellules positives pour l'EdU sont comptées en fonction du signal GFP émis par une réaction Click-iT, à l'aide d'un seuil de détection défini par un masque primaire.



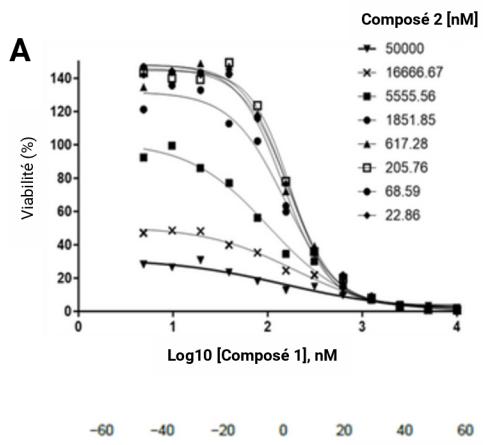
# Lecture avancée du devenir cellulaire

## Essais de synergie matricielle

La combinaison de drogues peut permettre d'identifier des vulnérabilités et des voies complémentaires qui, lorsqu'elles sont ciblées simultanément, maximisent l'efficacité thérapeutique, surmontent la résistance à une drogue ou réduisent la toxicité en diminuant les doses utilisées [2]. Cette approche favorise le développement de traitements plus efficaces et personnalisés, et ultimement améliore le sort des patients. Des essais matriciels en plaque permettent une identification robuste et efficace d'interactions synergiques entre deux drogues, ce qui accentue la léthalité des cellules cancéreuses au-delà de l'effet des drogues individuelles. Les études de combinaison sont également au centre du concept de léthalité synthétique, une stratégie particulièrement importante dans le domaine de l'oncologie.

**Fig 3. Essai matriciel pour mesurer l'interaction synergique de deux composés dans un essai de viabilité.**

Les matrices des composés ont été générées à l'aide d'un Tecan D300e (Tecan). Image générée par l'application en ligne SynergyFinder 3.8 [3]. Dose-réponse du composé 1 en présence de dose croissante de composé 2 (A). Graphique matriciel du score de synergie Bliss (B).

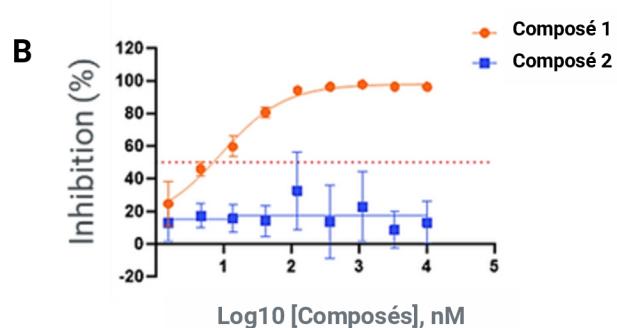
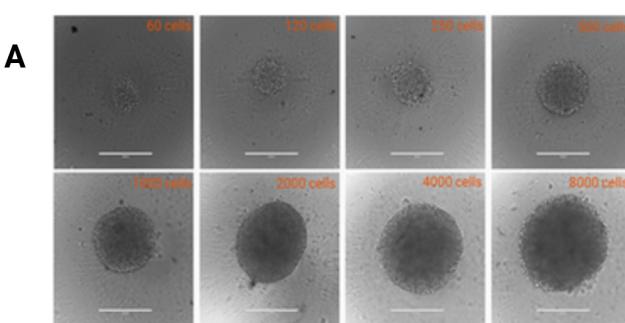


## Viabilité sur sphéroïdes (3D)

Visant à développer des essais cellulaires prédisant mieux l'efficacité *in vivo* de composés, un intérêt grandissant se fait sentir pour la culture de sphéroïdes. Comparativement à la culture cellulaire traditionnelle en monocouche, les sphéroïdes permettent de mieux mimer des tumeurs, en recréant notamment des gradients de nutriments et d'oxygène, mais aussi en formant une architecture tumorale ayant un noyau nécrotique. Grâce à leur morphologie semblable à celle d'un tissu, les modèles de sphéroïdes peuvent se montrer plus ou moins sensibles à certaines drogues, en comparaison à la culture en 2D [4]. La culture de sphéroïdes est maintenant adaptée au criblage à haut débit grâce aux récents progrès relatifs aux matériels, consommables et réactifs, qui rendent leur croissance et analyse plus fiables et plus rentables. Nos scientifiques ont optimisé des essais de croissance de sphéroïdes pour plusieurs lignées cellulaires cancéreuses, et notre expertise peut être mise à profit pour développer les nouveaux modèles de votre choix.

**Fig 4. Effet de deux composés sur la viabilité de sphéroïdes.**

Des sphéroïdes sont ensemencés en plaque 384-puits à très faible adhésion, et observés à l'aide d'un microscope optique (A). Exemples de doses-réponse obtenues avec le Cell TiterGLO-3D™ (Promega) (B).



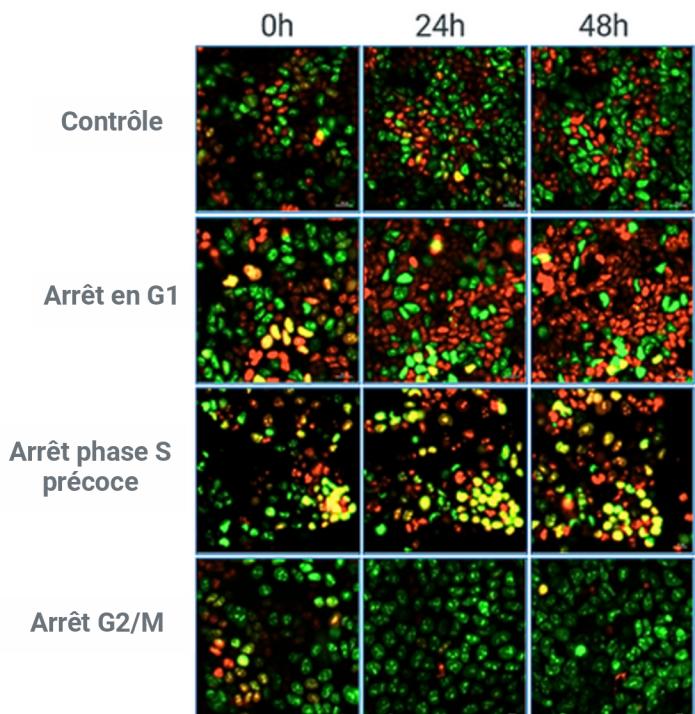
# Lecture avancée du devenir cellulaire (suite)

## Rapporteur du cycle cellulaire FUCCI

Le système FUCCI (*Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator*) est un outil développé pour visualiser dynamiquement le cycle cellulaire de cellules vivantes. Il utilise l'expression périodique des protéines Geminin et Cdt1, régulées selon le cycle cellulaire. Ces protéines sont fusionnées à des protéines fluorescentes, marquant ainsi chacune des phases du cycle cellulaire. Ce système offre la souplesse d'ajouter des marqueurs fluorescents supplémentaires (ex. pour visualiser l'apoptose), ce qui permet d'obtenir plusieurs niveaux d'information simultanément [5]. Nos scientifiques ont implémenté différents modèles FUCCI pour étudier l'effet de drogues anticancéreuses sur la régulation du cycle cellulaire, que ce soit en quantifiant l'arrêt du cycle cellulaire, en décrivant l'hétérogénéité d'une population de cellules tumorales, en identifiant les sous-populations qui contribuent à la résistance au traitements, ou en suivant une cinétique de résistance émergente.

**Fig 5. Perturbations du cycle cellulaire visualisées par rapporteur FUCCI.**

Acquisition automatique et analyse réalisées par BioTek Cytation 5 (Agilent).

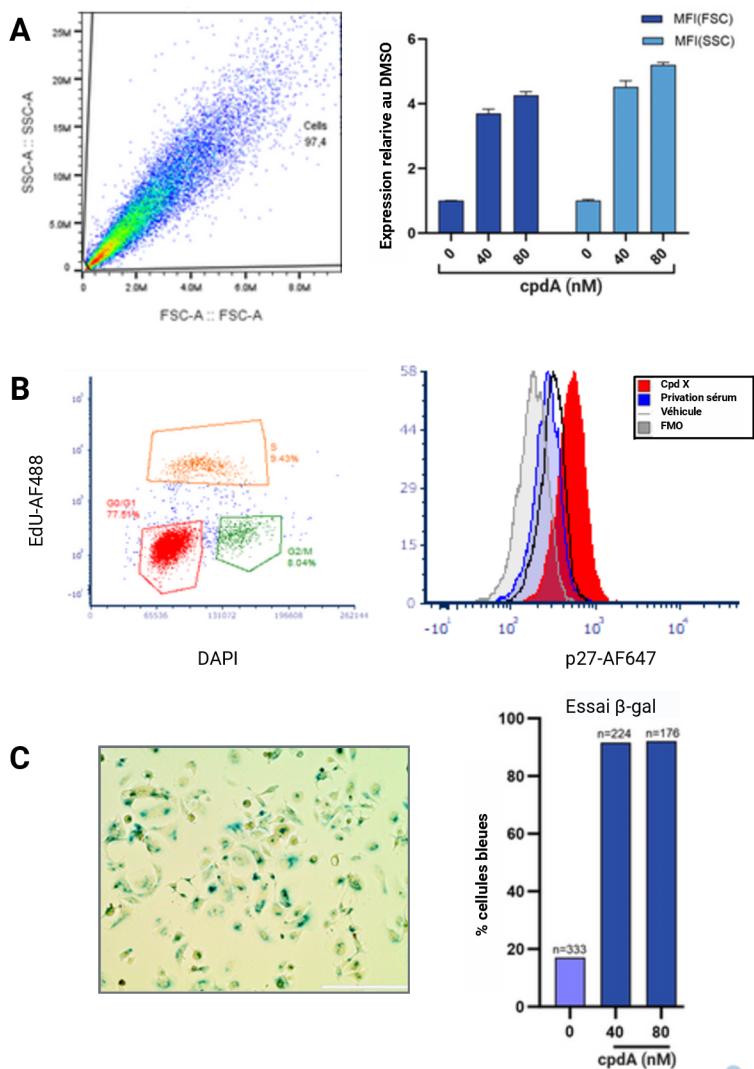


## Essai de sénescence

La sénescence cellulaire est un processus par lequel les cellules quittent le cycle cellulaire et changent de phénotype et de métabolisme. Certaines thérapies anticancéreuses peuvent induire la sénescence, ce qui peut retarder la croissance tumorale, mais constitue également un des mécanismes de résistance. Il n'y a aucun essai qui peut hors de tout doute identifier des cellules comme étant sénescantes, alors une combinaison d'essais est requise pour étudier ce devenir cellulaire complexe [6].

**Fig 6. Analyse de la sénescence.**

Phénotype sénescent analysé par cytométrie de flux par quantification des changements de taille cellulaire (A), par l'arrêt du cycle cellulaire et par l'expression de p27 (B). L'apparence sénescente associée à l'activité de la  $\beta$ -galactosidase est observée par microscopie optique en utilisant un substrat colorimétrique (C).



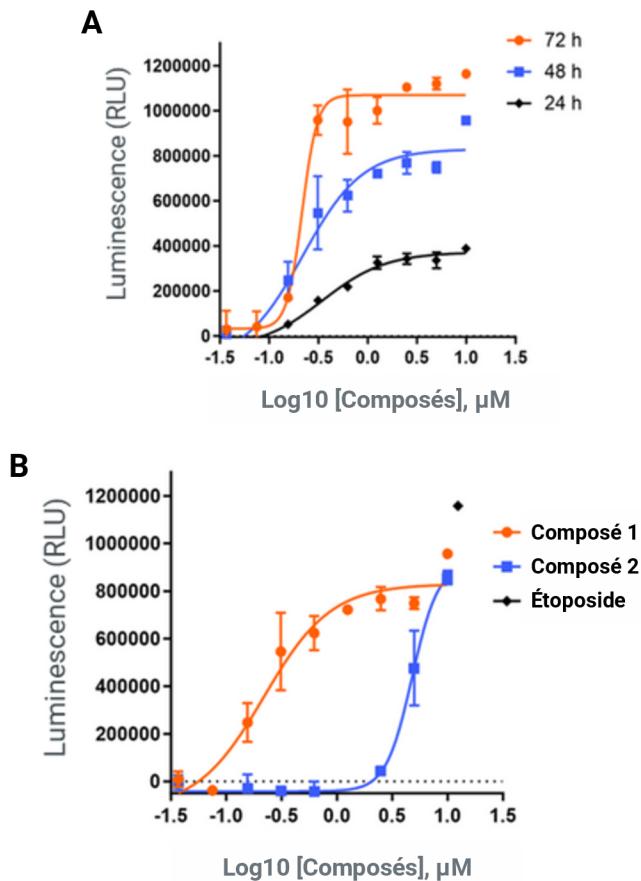
# Mesures de mort cellulaire

## Essais de mort cellulaire à haut débit

La toxicité cellulaire peut être mesurée par des essais basés sur le relâchement de facteurs intracellulaires, tel que la LDH, ou par pénétration de colorants à la suite d'une perte d'intégrité de la membrane. Ces essais ne discriminent pas la nécrose des autres mécanismes de mort cellulaire, mais ils offrent une mesure rapide et efficace des effets cytotoxiques d'une drogue. Il arrive toutefois de vouloir mesurer spécifiquement l'induction de l'apoptose, un mécanisme clé que plusieurs drogues anticancéreuses utilisent pour atteindre leur effet thérapeutique [7]. L'essai d'activité Caspase-3/7, avec une lecture de luminescence ou de fluorescence, est bien adapté à un essai en plaque, permettant une automation efficace et une adaptation pour un criblage à haut débit.

**Fig 7. Activation de Caspase-3/7 en cinétique pour le composé 1 (A) et en dose-réponse à deux composés (B).**

L'activation de Caspase3-7 est déterminée par un essai Caspase-Glo (Promega). En (A), cinétique pour déterminer le signal apoptotique optimal. En (B), doses-réponse de deux composés au temps optimal.

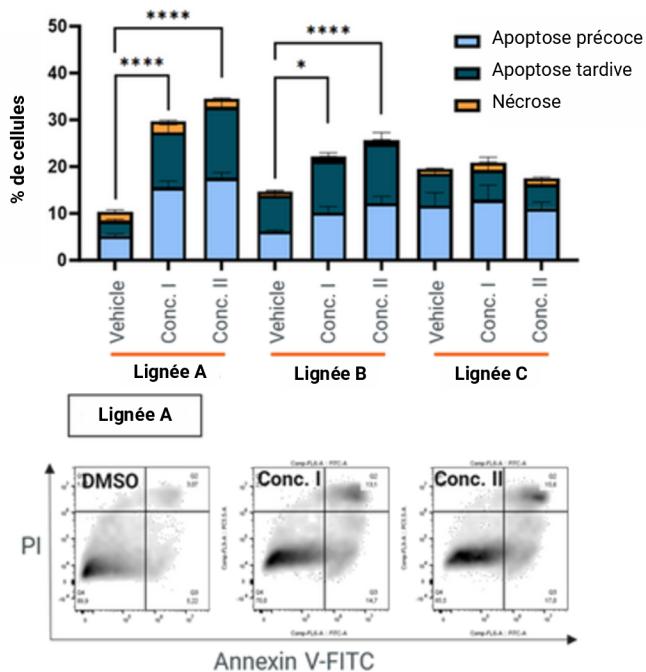


## Annexine V /PI

Les marquages de l'Annexine V (AnnV) et de l'Iodure de Propidium (PI) en cytométrie de flux sont des méthodes classiques pour quantifier les cellules apoptotiques [8]. Tôt dans le processus apoptotique, les phosphatidylsérines sont retournées vers la couche externe de la membrane cellulaire, où elles peuvent être liée par l'AnnV. Avec l'apoptose qui progresse, l'intégrité membranaire est perdue, ce qui permet à des marqueurs tels que le PI d'entrer dans les cellules et de lier l'ADN. L'analyse en cytométrie de flux de l'AnnV est particulièrement adaptée aux cellules immunitaires, ce qui en fait une méthode de choix pour évaluer les traitements des leucémies/lymphomes. L'adaptation à des tumeurs solides se fait par l'utilisation de techniques de dissociation des cellules.

**Fig 8. Analyse d'Annexine V-PI par cytométrie de flux.**

Acquisition et analyse faite par CytoFLEX Flow Cytometer (Beckman Coulter) ou avec ViaStain Cell Fitness Panel du Cellaca MX (Sartorius).



## Références

- [1] Stengl A. et al., SLAS Discov. 2017.
- [2] Chen Y. et al., Clin Transl Med. 2023.
- [3] <https://synergyfinder.aittakallio.group/20250825211146597114/>
- [4] Selby M. et al., SLAS Discov. 2017.
- [5] Fischer L. et al., Methods Mol Biol, vol 2644. 2023.
- [6] Rodier F. et Campisi, J., J. Cell Biol. (2011) 192 (4): 547.
- [7] Méry B. et al., J Cell Death. 2017.
- [8] Crowley L. et al., Cold Spring Harb Protoc; 2016.