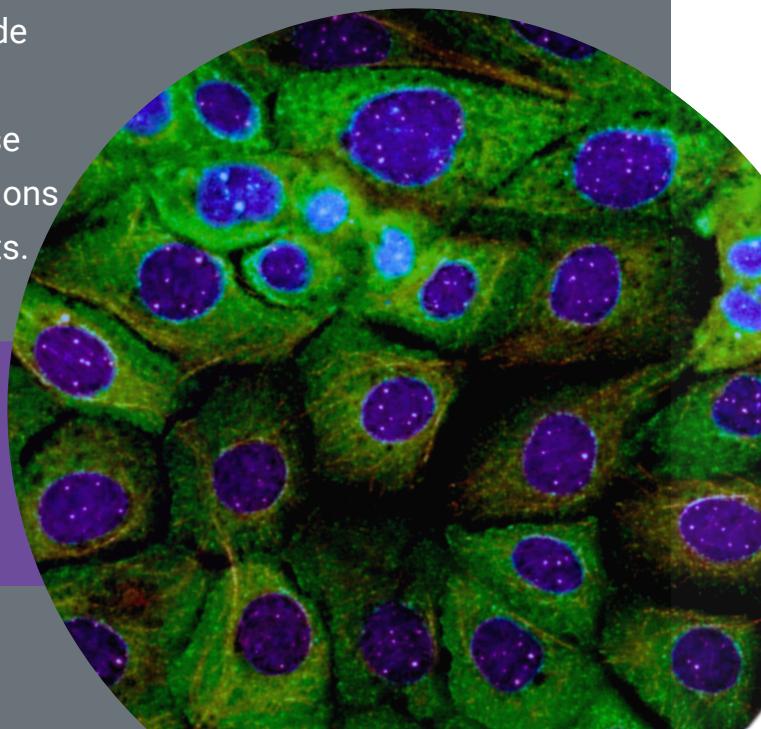


# Mécanismes d'action: Dommages à l'ADN

Les dommages à l'ADN sont parmi les mécanismes d'action les plus couramment utilisés en thérapies anticancéreuses. La prolifération rapide et la présence de mutations dans des gènes liés à la réparation de l'ADN rendent les cellules cancéreuses très sensibles aux insultes faites à leur matériel génétique. C'est cette faiblesse que les traitements classiques de radiation et de chimiothérapie exploitent. De plus, des approches pour induire des dommages, ou prévenir la réparation, cherchent à surmonter les problèmes de résistance en trouvant de nouvelles cibles. D'autre part, la quantification des dommages à l'ADN est cruciale pour déterminer le potentiel génotoxique de nouveaux composés, ce qui constitue une préoccupation importante dans la détermination de leur profile de sécurité.

Notre équipe peut déployer des techniques cellulaires de pointe pour déterminer les mécanismes d'action de médicaments candidats qui ciblent les voies de réponse aux dommages à l'ADN, fournissant ainsi des informations exploitables sur les réponses cellulaires aux traitements.

- Dommages à l'ADN et stress répliquatif
- Perturbations mitotiques
- Résultats du cycle et de la division cellulaire



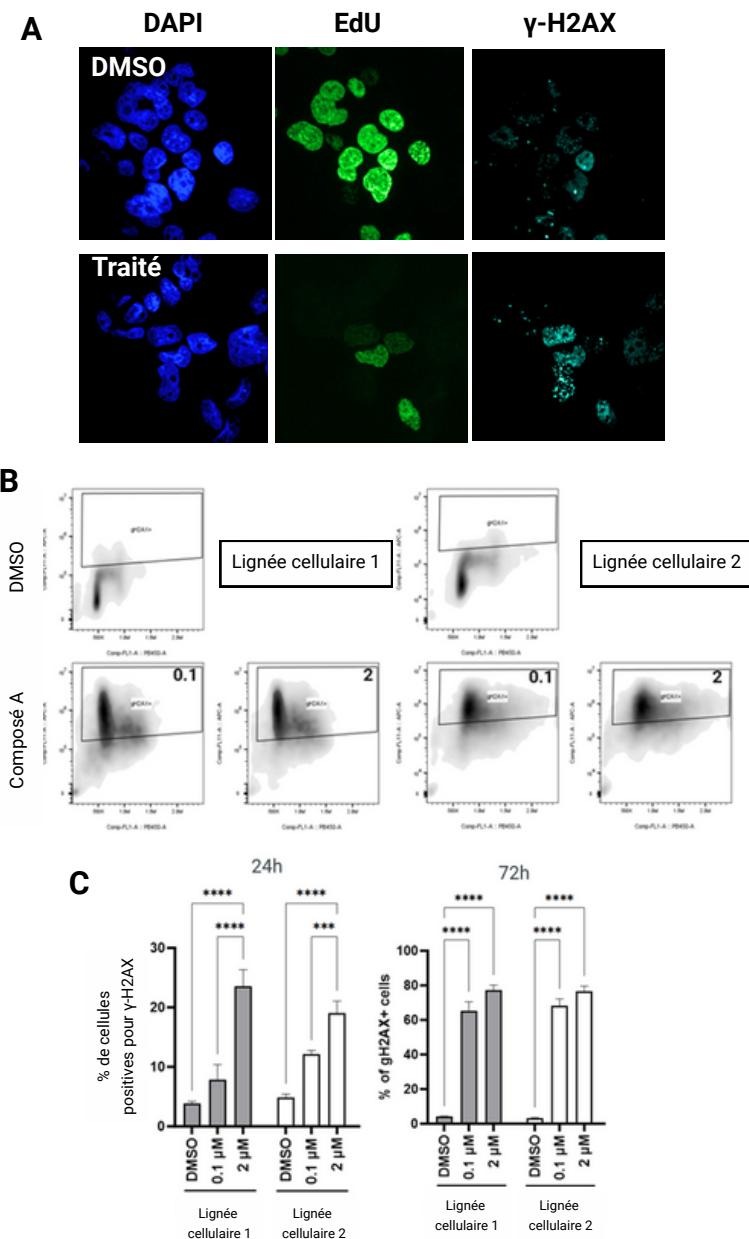
# Dommages à l'ADN et stress répliquatif

## Analyse γ-H2AX

La détection de γ-H2AX est une technique très sensible et spécifique pour suivre les cassures double-brin de l'ADN (CDB) [1]. La quantification de foyers γ-H2AX est un outil puissant permettant d'évaluer l'efficacité d'un composé qui agit directement sur les voies de réponse aux dommages à l'ADN. Les niveaux d'expression de γ-H2AX sont indicateurs des CDB provenant autant des dommages à l'ADN que de sa fragmentation durant l'apoptose.

**Fig 1. Augmentation du nombre de cellules positives pour γ-H2AX mesurée par microscopie et cytométrie de flux.**

Image de microscopie à fluorescence obtenue avec un Nikon Ti2 (A). Cytométrie de flux réalisée avec un CytoFLEX S (Beckman Coulter) (B). Quantification du signal γ-H2AX détecté en cytométrie de flux (C).

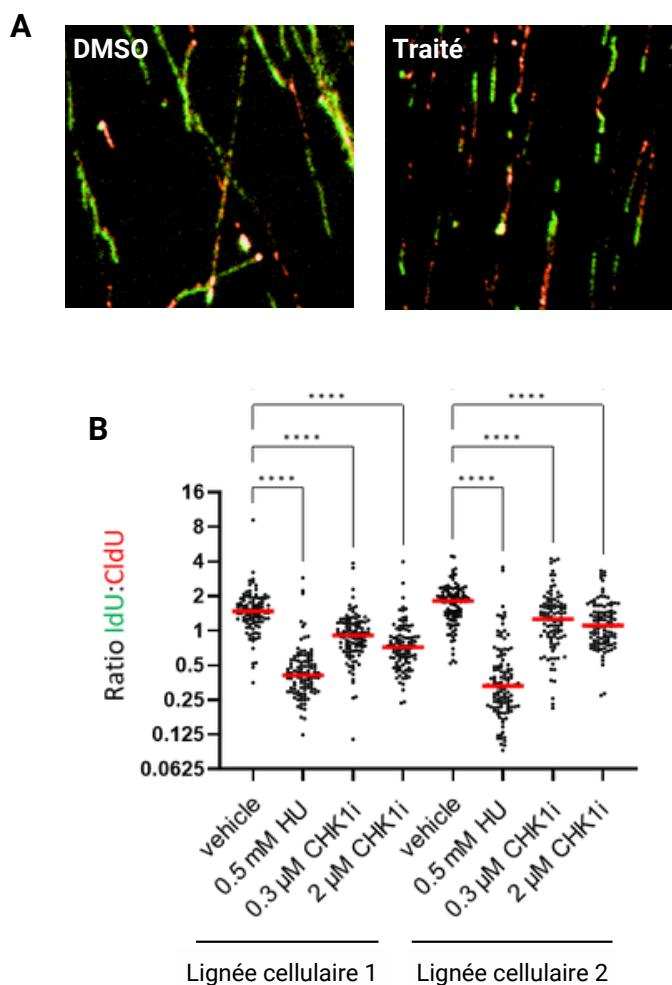


## Essais de fibres d'ADN

L'essai de fibres d'ADN est un outil puissant pour étudier le dynamisme des fourches de réPLICATION de l'ADN. Il permet de visualiser et quantifier la vitesse, fréquence et stabilité de la réPLICATION de l'ADN, donnant ainsi des indications sur les mécanismes d'action de composés induisant du stress répliquatif. En analysant la progression, les arrêts et la reprise des fourches de réPLICATION, cet essai aide à comprendre comment les cellules cancéreuses maintiennent la stabilité génomique et développent de la résistance aux thérapies qui ciblent la machinerie répliquative [2].

**Fig 2. Les traitements par l'hydroxyuridine ou un inhibiteur de CHK1 réduisent la progression de la fourche suivant un arrêt puis la reprise de la réPLICATION.**

Acquisition d'images avec un microscope Olympus BX41 (A). Quantification du ratio IdU/CldU (B).



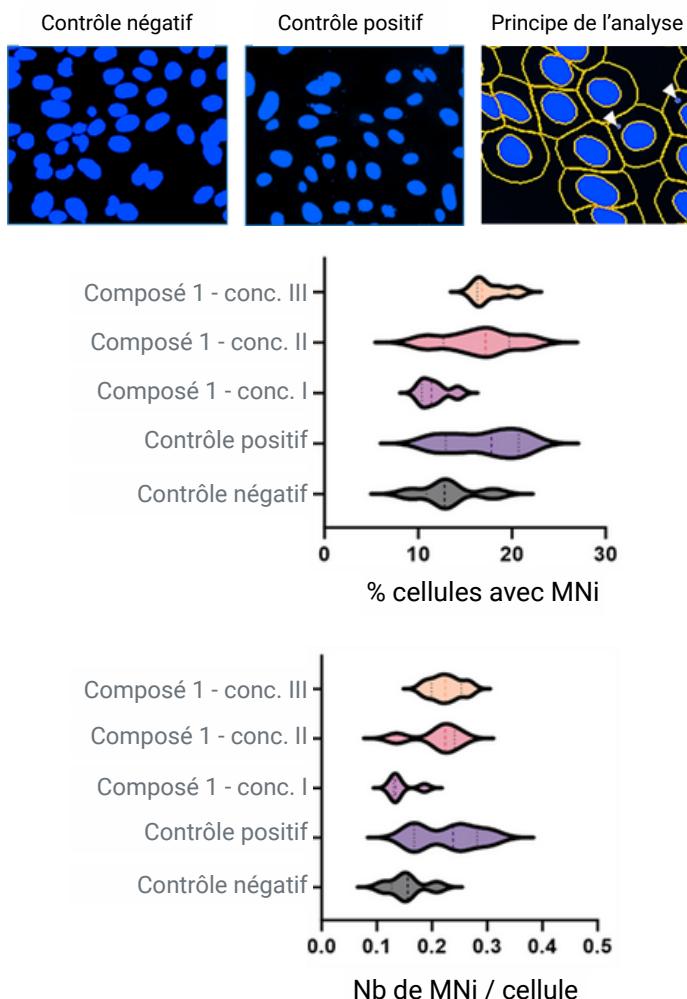
# Perturbations mitotiques

## Quantification des micronoyaux

L'analyse des micronoyaux (MNi) est un outil important dans la recherche génotoxique, puisqu'il fournit une mesure fiable de l'aneugénicité. De plus, il sert de marqueur de stabilité génomique et de dommages à l'ADN, phénomènes souvent ciblés par des thérapies anticancéreuses. En oncologie, l'analyse des MNi peut offrir des indices sur les mécanismes de régulation des chromosomes, ex. sur la régulation des centrosomes ou des points de contrôle d'assemblage du fuseau mitotique [3]. Pour augmenter le débit, nous avons automatisé la quantification des MNi, permettant de cibler des librairies de composés afin de détecter des effets génotoxiques ou mitotiques.

**Fig 3. Quantification des MNi à l'aide d'un imageur à haut contenu.**

Méthode d'analyse développée avec un Cyvation5 (Agilent). Les comptes de noyaux sont obtenus à l'aide d'un masque nucléaire. Le décompte des MNi est quant à lui obtenu en détectant des points à l'intérieur d'un masque secondaire, défini comme un anneau encerclant un noyau.

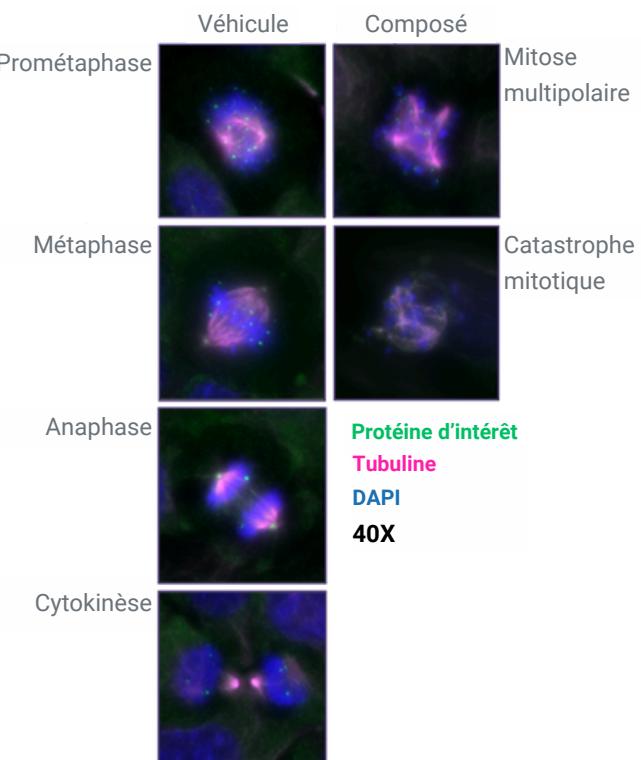


## Aberrations mitotiques

L'analyse des aberrations mitotiques peut fournir des informations importantes sur les processus cellulaires contrôlant l'intégrité génomique. Les erreurs durant la mitose – incluant des problèmes dans la ségrégation des chromosomes, la formation du fuseau et la cytokinèse – peuvent engendrer l'aneuploïdie et autres anomalies chromosomiques [4]. Étudier les aberrations mitotiques aide à valider de potentielles cibles thérapeutiques en explorant leur rôle dans des voies régulant la mitose, en élucidant des mécanismes d'action de maladies, en déterminant la génotoxicité, et plus encore.

**Fig 4. Imagerie de division cellulaires en microscopie à fluorescence à fort grossissement.**

Images prises avec un microscope Nikon Eclipse Ti2-E. Les aberrations mitotiques sont notées après une analyse visuelle des structures mitotiques.



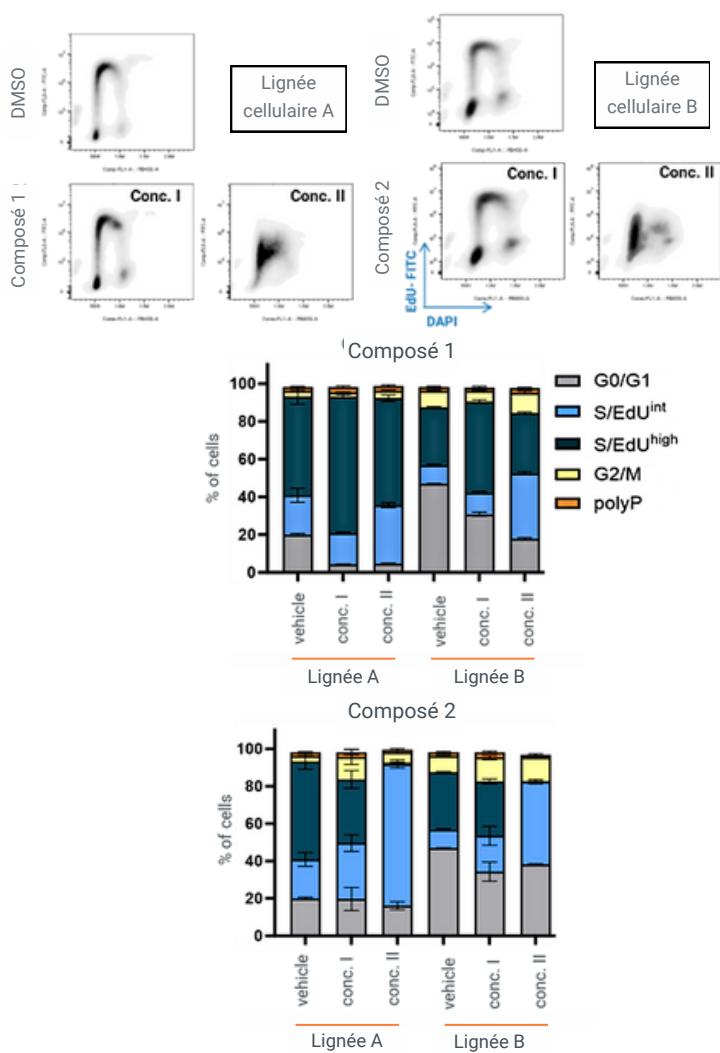
# Résultats du cycle et de la division cellulaire

## Cycle cellulaire EdU/DAPI en cytométrie de flux

La combinaison de l'incorporation d'EdU et de la coloration au DAPI pour analyser le cycle cellulaire en cytométrie de flux fournit une capture à la fois de la synthèse d'ADN et de la distribution du cycle cellulaire. Cette approche est particulièrement utile pour les études mécanistiques de médicaments perturbant les points de contrôle du cycle cellulaire, les dommages et la réparation de l'ADN, ainsi que pour la découverte des mécanismes de résistance associés. Cet essai peut être multiplexé avec des colorations intracellulaires de marqueurs clés. La résolution détaillée de cette méthode en fait une technique idéale pour étudier les médicaments ciblant la progression du cycle cellulaire.

**Fig 5. Analyse du cycle cellulaire par EdU/DAPI.**

L'analyse réalisée avec un cytomètre de flux CytoFLEX (Beckman Coulter) montre l'accumulation de cellules en phase S comme effet du Composé 1, et une accumulation de cellules en phase S précoce et une réduction dans l'intensité de la fluorescence comme effet du Composé 2.

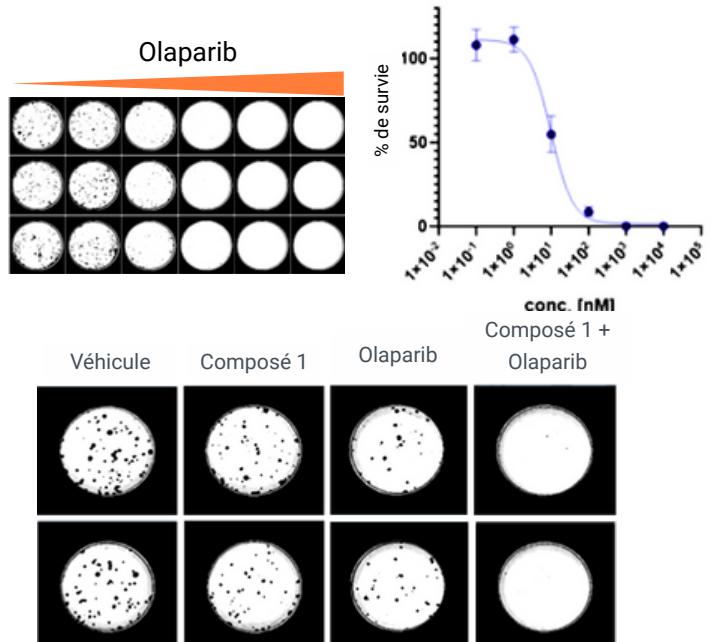


## Essais automatisés de formation de colonies

La formation de colonies, ou essai clonogénique, mesure la capacité d'une seule cellule à croître jusqu'à former une colonie, reflétant sa capacité de survie à long terme et sa viabilité reproductive. Cet essai est considéré comme une référence pour évaluer les effets des agents pouvant endommager l'ADN puisqu'il est plus sensible pour détecter les effets sublétaux affectant la capacité d'une cellule à proliférer au fil du temps. Ceci permet donc de voir des effets qui ne seraient pas apparents dans un essai de viabilité de courte durée [5]. Dans le contexte de réparation d'ADN, l'essai clonogénique est un excellent outil pour identifier des interactions léthales synthétiques. Tous ces arguments rassemblés font que cet essai est particulièrement utile pour évaluer l'efficacité de thérapies anticancéreuses et leurs combinaisons.

**Fig 6. Étude de la dose-réponse de l'Olaparib et de son effet synergique avec un composé dans un essai de formation de colonies.**

Acquisition automatisée à l'aide d'un BioTek Cytation 5 (Agilent) de colonies colorées au Vert Janus B).



## Références

- [1] Mah L.J. et al., Leukemia, 2010.
- [2] Quinet A. et al., Methods in Enzymology, Vol. 591, 2017.
- [3] Luzhna L. et al., Front. Genet., 2013.
- [4] Bayani J. et al., Current Protocols in Cell Biology, 2004.
- [5] Franken N. et al., Nat Protoc, 2006.