

UNIVERSITE DE LIMOGES  
FACULTE DE PHARMACIE

Année 1995



Thèse n° 30

**ADAPTATION DE LA METHODE  
COLORIMETRIQUE AU SEL  
DE TETRAZOLIUM A L'EVALUATION  
DE LA VIABILITE DE CELLULES  
INFECTEES PAR LE VIRUS VISNA**

**THESE**

POUR LE DIPLOME D'ETAT

DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le *26 Juin 1995*

par

***Delphine CHEVALERIAS***

née le 30 Août 1968 à La Rochefoucauld (Charente)

EXAMINATEURS DE LA THESE

Madame le Professeur Claudine BOSGIRAUD  
Madame Sylvie DELEBASSEE, Maître de Conférences  
Monsieur Antoine ORABONA, Pharmacien

Président  
Juge  
Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES  
FACULTE DE LIMOGES

---

DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur RABY

ASSESSEURS : Monsieur le Professeur GHESTEM  
Monsieur DREYFUSS,  
Maître de Conférences

PERSONNEL ENSEIGNANT

\* PROFESSEUR DES UNIVERSITES

BENEYTOUT Jean-Louis	BIOCHIMIE
BERNARD Michel	PHYSIQUE BIOPHYSIQUE
BOSGIRAUD Claudine	MICROBIOLOGIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE, CHIMIE THERAPEUTIQUE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACOTECHNIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
GHESTEM Axel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
HABRIOUX Gérard	BIOCHIMIE FONDAMENTALE
LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
LEFORT DES YLOUSES Daniel	PHARMACIE GALENIQUE
MOESCH Christian	HYGIENE
LOUDART Nicole	PHARMACODYNAMIE
PENICAUT Bernard	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
RABY Claude	PHARMACIE CHIMIQUE ET CHIMIE ORGANIQUE

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE -  
CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS  
POMMARET Maryse

*Pour en venir à tout savoir,  
ne veuille en rien savoir aucune chose...*

*Pour en venir à ce que tu ne sais,  
tu dois aller par où tu ne sais point...*

(St Jean de la Croix)

*Des remerciements éternels  
Pour des mots qui à leurs homonymes  
S'accordent, pour des regards gris ciel,  
Pour du temps qui se voile, anonyme,*

*Pour des beata que le latin  
Ignore, pour les lueurs de Sion  
Données sur un Mont et pour trois points  
Que je laisserai en suspension.*

*Une gratitude sans limite,  
Justement, s'attache à des visages  
Que le coeur reconnaît, sans mérite,  
Les dépasse et atteint une Sage*

*Nuée, la Source de l'Arc-en-ciel.*

*Delphine*

Avec une pensée pour Philippe MAUPAS

**A Madame Claudine BOSGIRAUD**

Professeur des Universités de Microbiologie  
(Faculté de Pharmacie de Limoges)

Je vous remercie d'avoir bien voulu me faire l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse.

Je vous remercie de m'avoir accueillie dans votre Laboratoire et de m'en avoir accordé avec confiance le libre accès.

Je vous remercie de m'avoir proposé un sujet de thèse qui m'a vivement intéressée.

Les Travaux Pratiques de Microbiologie que vous nous avez dispensés font partie de ceux dont je garde le meilleur souvenir.

Soyez assurée, Madame, de ma gratitude et de mon profond respect.

**A Madame Sylvie DELEBASSEE**

Maitre de Conférences des Universités de  
Microbiologie  
(Faculté de Pharmacie de Limoges)

Je vous remercie d'avoir accepté de faire  
partie du jury de cette thèse.

Je vous adresse de sincères remerciements  
pour votre aide et votre soutien efficace et attentionné  
durant mon travail expérimental.

Je vous remercie de m'avoir permis d'utiliser  
votre matériel de laboratoire.

Je vous remercie de vos conseils pour la  
rédaction de cette thèse.

Veillez trouver ici le témoignage de ma très  
grande gratitude.

**A Monsieur Antoine ORABONA**

Pharmacien à Limoges

Je vous remercie d'avoir bien voulu siéger à  
ce jury et prendre le temps d'examiner ce travail.

Je vous suis très reconnaissante de m'avoir  
accueillie chaleureusement dans votre officine en tant que  
stagiaire et vous prie de croire à l'expression de mon  
profond respect.

*J'adresse également mes remerciements :*

**A Monsieur Jean-François LAGORCE**

Maître de Conférences des Universités de  
Chimie Thérapeutique et de Chimie Organique  
(Faculté de Pharmacie de Limoges)

qui m'a laissé accéder, en confiance, à son  
Lecteur ELISA.

**Au Laboratoire Départemental d'Analyses  
et de Recherche de la Haute-Vienne**

qui m'a accueillie au début de mon travail  
expérimental. Je remercie plus particulièrement Mademoiselle  
Geneviève Dubost et Mesdames Anne-Marie Demars et Christine  
Dufaure.

**A Madame Roseline MOUZET**

Technicienne au Laboratoire de  
Microbiologie  
(Faculté de Pharmacie de Limoges)

qui m'a apporté volontiers son concours dans  
la manipulation d'appareils et l'entretien du matériel.

**PLAN****INTRODUCTION****Première partie : MATERIELS ET METHODES***1 - CULTURES CELLULAIRES*

1-1 Les cellules MDBK

1-2 Les cellules de plexus choroïde de mouton

1-2-1 Intérêts et description

1-2-2 Obtention des cellules à partir  
d'explants

1-2-3 Entretien des cultures

*2 - INFECTION VIRALE*

2-1 Souche virale

2-2 Effet cytopathique du virus Visna-Maedi

2-3 Constitution d'un pool viral

2-4 Titrage du virus Visna-Maedi

2-5 Infection de cellules de plexus-choroïde en  
microplaque

*3 - LES REACTIFS**4 - EPREUVE D'EXCLUSION AU BLEU TRYPAN*

## 5 - METHODE AU MAY-GRÜNWARD / GIEMSA

5-1 Technique de la coloration au

May Grünwald / Giemsa

5-2 Applications de la coloration au

May Grünwald/ Giemsa

5-2-1 Détermination de la cytotoxicité

5-2-2 Détermination de l'activité antivirale

## 6 - METHODE AU MTT

6-1 Principe

6-2 Protocole de la méthode de Pauwels

et coll. (36)

6-3 Mesure de l'altération de la viabilité

cellulaire

6-4 Applications de la méthode colorimétrique

au MTT

6-4-1 Détermination de la cytotoxicité

6-4-2 Détermination de l'activité antivirale

## **Deuxième partie : RESULTATS**

### 1 - UTILISATION DU MELANGE ISOPROPANOL ACIDIFIE / TRITON X-100 COMME SOLVANT D'EXTRACTION DU FORMAZAN

1-1 Optimisation de la méthode colorimétrique de

Pauwels et Coll. (36)

- 1-1-1 Vérification du principe de la méthode  
au MTT
  - 1-1-2 Concentration en MTT
  - 1-1-3 Temps d'incubation des cellules de  
plexus choroïde avec le MTT
  - 1-1-4 Volume du solvant d'extraction
  - 1-1-5 Volume du surnageant à enlever avant  
l'addition du solvant d'extraction
  - 1-1-6 Stabilité de la coloration du Formazan
  - 1-1-7 Etude de la relation de  
proportionnalité au cours du temps
  - 1-1-8 Effet du nombre de passages des  
cellules
  - 1-1-9 Protocole final
- 
- 1-2 Application de la méthode au MTT au système  
cellules/virus
    - 1-2-1 Premiers essais : premiers problèmes
    - 1-2-2 Etude des différents paramètres
      - 1-2-2-1 La concentration cellulaire  
initiale
      - 1-2-2-2 Le virus
      - 1-2-2-3 Le pourcentage de sérum de veau  
foetal
      - 1-2-2-4 Le temps d'incubation du tapis  
cellulaire

2 - UTILISATION DU DIMETHYL SULFOXYDE COMME  
SOLVANT D'EXTRACTION DU FORMAZAN

2-1 Essai de différents solvants

2-1-1 Comparaison de six solvants  
d'extraction

2-1-2 Influence du pH

2-1-3 Choix d'un solvant

2-2 Vérification de certains paramètres de l'essai  
au MTT

2-2-1 Spectre d'absorption du Formazan dans  
le DMSO

2-2-2 Concentration en MTT

2-2-3 Volume du solvant d'extraction

2-2-4 Agitation du solvant d'extraction

2-2-5 Stabilité de la coloration du Formazan  
dans le DMSO

2-2-6 Vérification de la relation de  
proportionnalité

2-3 Application de la méthode au MTT au système  
cellules/virus

2-3-1 Effet du temps d'incubation du tapis  
cellulaire

2-3-2 Effet de la concentration cellulaire

2-3-3 Effet de la quantité de virus

2-3-4 Effet du pourcentage de sérum de veau  
foetal

2-3-5 Conditions d'un dosage antiviral

2-4 Application de la méthode au MTT à l'étude de  
deux molécules antivirales

2-4-1 Détermination de la cytotoxicité

2-4-2 Mesure de l'activité antivirale vis-à-  
vis du virus Visna

### **Troisième partie : DISCUSSION**

### **CONCLUSION**

# ***INTRODUCTION***

Le virus Visna-Maedi appartient à la sous-famille des *Lentivirinae* de la famille des *Rétroviridae*. Les *Lentivirinae* tirent leur nom de leur caractéristique à entraîner des infections virales lentes (43). Ils sont associés à des maladies non néoplasiques. Ils provoquent des pathologies chroniques qui peuvent toucher les poumons, les articulations, le système nerveux central, l'immunité ou l'hématopoïèse.

L'intérêt pour cette sous-famille s'est accrue, au cours des années 80, avec la découverte du premier lentivirus humain : le virus de l'immunodéficience humaine (V.I.H.) responsable du syndrome de l'immunodéficience acquise (S.I.D.A.).

Sigurdsson (48), en 1954, a introduit le concept de maladies à virus lent par ses études sur le virus Visna-Maedi. Il a défini les critères des maladies lentes :

- une très longue période de latence pendant laquelle ont lieu asymptomatiquement un essaimage et une prolifération du virus. Cette période de latence s'étale sur plusieurs mois ou plusieurs années,
- l'évolution, après déclaration des symptômes, se poursuit inexorablement jusqu'à la mort du sujet,
- une localisation des lésions à un seul organe ou à un seul système tissulaire,

- une atteinte de quelques sujets seulement au sein de la communauté.

Le virus Visna-Maedi est le virus prototype animal des lentivirus (43). Il tire ses noms islandais des principaux symptômes qu'il induit chez le mouton : cachexie et dyspnée. Il peut provoquer soit une maladie démyélinisante proche de la sclérose en plaques, soit une pneumopathie interstitielle. Les deux pathologies dégénératives observées dans la maladie correspondent aux deux souches du virus Visna-Maedi ; l'atteinte pulmonaire due au type Maedi est aussi appelée pneumonie progressive ovine ou OPP (ovine progressive pneumonia). Le virus Visna-Maedi affecte uniquement les ovins et les caprins.

Le virus Visna-Maedi et le VIH-1 ont en commun de nombreuses caractéristiques répliquatives, génétiques et pathogénétiques bien que le premier ne soit pas immuno-suppresseur (26). Comme tous les lentivirus, ils provoquent tous les deux des maladies chroniques, progressives, dégénératives. Ils ont un tropisme nerveux. Les signes cliniques du virus Visna-Maedi sont proches de ceux du V.I.H. mais moins graves. Les lésions de pneumonie interstitielle lymphoïde, associées au S.I.D.A., sont semblables à celles de la maladie maedi. L'infection en

culture cellulaire est typique et les deux virus entraînent un effet cytopathogène avec induction de syncytia.

Au niveau moléculaire, ils ont en commun un cycle répliatif particulier dont le mécanisme est identique. Ils ont de nombreuses relations génétiques. Ils entraînent la production d'anticorps neutralisants, alors que les lentivirus sont, en règle générale, de pauvres inducteurs d'anticorps neutralisants. Enfin, ils présentent des sensibilités communes à l'inhibition *in vitro*. Bien qu'ils diffèrent du point de vue de leurs cellules cibles, de leurs récepteurs cellulaires et de leurs pathologies, le virus Visna-Maedi pourrait servir comme support pour évaluer *in vitro* de nouvelles molécules antivirales susceptibles d'être actives sur le VIH-1.

Il existe de nombreuses méthodes pour déterminer l'activité virucide ou virustatique d'agents antiviraux :

- mesure de l'inhibition de l'effet cytopathogène (formation de syncytia),

- détection d'une protéine spécifique :

- \* soit on mesure la variation de la production d'une protéine lentivirale spécifique (ex : p 24 pour le VIH)

\* soit on mesure la réduction de l'activité biologique de la protéine, si c'est une enzyme, par rapport à un témoin non traité (ex : transcriptase inverse),

- mesure de la viabilité cellulaire par :

\* le dénombrement de cellules excluant un colorant (ex : le bleu Trypan)

\* l'évaluation de la capacité des cellules à incorporer une molécule radiomarquée (ex : thymidine tritiée)

\* des techniques colorimétriques utilisant un sel de tétrazolium (MTT ou XTT),

- mesure de la réduction du pouvoir infectieux qui est quantifié soit par le nombre de plages de lyse , soit par la dilution du point limite 50 %.

La recherche de molécules anti-VLH. efficaces et peu toxiques à long terme est urgente. Un nombre très élevé de molécules sont synthétisées chaque année. Il faut donc un test rapide et adapté à l'évaluation d'un grand nombre de substances. La technique colorimétrique basée sur le MTT répond à ces critères et est déjà utilisée par certains auteurs. Le virus Visna-Maedi pouvant servir comme support *in vitro* pour une présélection de composés, nous

avons choisi d'appliquer la méthode au MTT à la mesure de la viabilité de cellules infectées par le virus Visna-Maedi.

Cette étude comporte trois parties distinctes. Dans la première, nous exposons le matériel et les méthodes employées au cours de notre expérimentation personnelle. La deuxième partie présente les résultats de notre travail expérimental qui avait pour objectif de mettre au point le protocole de la méthode au MTT pour tester des inhibiteurs possibles du lentivirus ovin. Ces résultats seront interprétés et discutés dans la dernière partie.

*Première partie :*  
**MATERIELS ET METHODES**

## 1 - CULTURES CELLULAIRES

### 1-2 Les cellules MDBK

Les cellules MDBK sont des cellules en lignées continues, issues de rein de veau. Nous avons débuté les expérimentations avec ce type de cellules car leur entretien est relativement facile. Elles nous ont été fournies par le Laboratoire Départemental d'Analyses et de Recherches de la Haute-Vienne.

Les cellules MDBK sont cultivées en monocouche à 37°C en atmosphère saturée en vapeur d'eau et en présence d'un mélange d'air - CO<sub>2</sub> (95 % - 5 %). Le milieu d'entretien est le milieu essentiel minimum avec sels de Earle (M.E.M.E.) sans L-glutamine et contenant 2,2 g/l de bicarbonate de sodium (Seromed, Biochrom KG, Berlin, Allemagne). Nous l'avons supplémenté avec 100 UI/ml de pénicilline G (Pénicilline G 1 000 000 UI, Seromed), 0,2 mg/ml de polymyxine (Seromed) et 3 % de sérum de veau foetal (S.V.F.) (Seromed).

Ce type de cellules en lignées continues a un taux de multiplication très élevé et, contrairement aux cellules en culture primaire, il peut être sous-cultivé des centaines de fois (40).

Le repiquage des cellules est une étape primordiale dans l'entretien des cultures de cellules. Le support des cultures étant délimité, les cellules arrivent à confluence. Elles subissent alors l'inhibition de contact et ne se multiplient plus.

Les passages se font par trypsination du feuillet cellulaire, puis par dilution dans le milieu de croissance, ceci environ tous les trois jours et selon le protocole suivant :

==> détachement des cellules de leur support :

\* vidanger le milieu de culture du flacon (Corning, USA)

\* rincer le feuillet cellulaire avec 5 à 10ml (selon la taille du flacon) de solution dispersante préchauffée à 37°C. La solution dispersante est une solution saline de trypsine à 0,05 % (p/v) et d'EDTA-disodique à 0,02 %, isotonique et tamponnée, de pH 7,4, sans calcium, ni magnésium (Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Ecosse)

\* remettre 2 à 5 ml (selon la taille du récipient) de la solution de trypsine / EDTA ; en rejeter 90 % ; répartir soigneusement le restant sur le tapis cellulaire ; incubé à 37°C pendant quelques minutes (sans dépasser 10 minutes) et surveiller le détachement des cellules au microscope optique inversé

\* lorsque le feuillet est détaché, ajouter 5 à 10 ml de milieu de croissance contenant 10 % de S.V.F. et disperser les cellules à l'aide d'une pipette munie d'une poire. Le S.V.F. arrête l'action enzymatique de la trypsine.

==> Remise en culture :

- \* faire un comptage des cellules à l'hématimètre
- \* dédoubler ou détripler la suspension cellulaire en la répartissant dans les récipients de culture de dimensions appropriées
- \* ajouter du milieu de croissance afin d'obtenir un volume final suffisant de milieu
- \* incuber à 37°C
- \* 24 heures après changer le milieu de culture pour le milieu d'entretien (3 % de S.V.F.).

### **1-2 Les cellules de plexus choroïde de mouton**

Les cellules fibroblastiques, issues de la membrane de plexus choroïde de mouton, sont utilisées comme support pour la culture du virus Visna-Maedi.

### 1-2-1 Intérêts et description

Ces cellules en culture primaire constituent un système cellulaire permissif issu d'un organe lui-même cible de l'infectiosité par le virus Visna-Maedi *in vivo* (13). Depuis la première mise en culture du virus sur ces cellules par Sigurdsson en 1960 (49), ce sont celles-ci qu'on utilise le plus souvent. Le virus Visna ayant un tropisme pour le système nerveux central, les cellules de plexus choroïde (P.C.) nous permettent de reconstituer un environnement cellulaire proche des conditions naturelles. De plus, elles sont obtenues relativement facilement, elles peuvent être maintenues jusqu'au 10-15<sup>ième</sup> passage et elles produisent un titre viral élevé (13).

Du point de vue anatomique, les P.C. sont un ensemble de anses vasculaires développées au sein des replis de la pie-mère, au niveau des ventricules cérébraux, et terminant la toile choroïdienne. Ils élaborent le liquide ventriculaire qui deviendra le liquide céphalo-rachidien une fois dans les espaces arachnoïdiens.

### 1-2-2 Obtention des cellules à partir d'explants

Les cellules primaires fibroblastiques sont obtenues à partir d'explants de P.C. de mouton, en

appliquant la méthode des explants (fondée sur la dissection) de Sigurdsson, modifiée par Bosgiraud en 1987 (13). Seuls les P.C. des ventricules latéraux sont récoltés. Ce prélèvement se fait uniquement sur des encéphales d'agneaux jeunes fraîchement abattus. Ils nous ont été gracieusement fournis par les Abattoirs de Limoges.

La calotte crânienne écorchée est découpée à la scie oscillante et retirée, afin de dégager minutieusement et d'extraire l'encéphale, le plus aseptiquement possible. Les étapes qui suivent sont réalisées stérilement sous une hotte à flux laminaire vertical (ADS, Le Pré St Germain, France). A chaque manipulation, les instruments sont passés dans la flamme d'un bec Bunsen. Les deux hémisphères cérébraux sont incisés sur une profondeur d'environ 1 à 2 cm. Les P.C. apparaissent comme une membrane richement vascularisée. Une fois retirées, ces membranes (deux par tête) sont recueillies dans une boîte de Petri en verre contenant une solution saline [M.E.M.E. sans L-glutamine, avec 2,2 g/l de bicarbonate de sodium et additionné de pénicilline G (100 UI/ml) et de polymyxine (0,2 mg/ml) ].

Elles sont rincées à trois reprises dans le milieu de base, pour éliminer les hématies. Puis elles sont découpées en petits fragments qui sont déposés, à raison

d'une dizaine par récipient, dans des flacons de culture de 25 cm<sup>2</sup>. Chaque flacon a été préalablement imprégné avec 200 µl de plasma de poulet (P 3266, Sigma chimie, St Quentin Fallavier, France) reconstitué avec de l'eau distillée stérile. Ce très faible volume, juste nécessaire pour affleurer les explants, évite la "flottaison" qui conduit inéluctablement à leur incapacité à permettre l'adhésion cellulaire (1). Une bonne adhérence au support, améliorée par le plasma, est obtenue en laissant les flacons une heure à 37°C.

Au bout de quatre ou cinq jours, les fibroblastes commencent à proliférer autour des explants et adhèrent à la surface du récipient de culture en formant une couche monocellulaire. Contrairement à beaucoup de types cellulaires, le fibroblaste a la particularité de garder sa morphologie en culture (1). Au microscope optique inversé (Nikon, CLV Fressinet, Limoges), les cellules apparaissent mononucléées, fusiformes ou étalées, avec des prolongements cellulaires caractéristiques. Leur richesse en organites cytoplasmiques témoigne de leur grande activité métabolique.

Après une semaine d'incubation à 37°C, les explants sont éliminés avec précaution, sans insister sur les plus réticents ; le milieu est changé (la concentration en S.V.F. est diminuée à 10 %) et les flacons sont remis à l'étuve pour une durée supplémentaire d'environ huit jours.

Dix à quinze jours après l'explantation, les cellules recouvrent la quasi totalité de la surface de base des flacons. Elles atteignent la confluence ; c'est-à-dire que l'inhibition de contact les empêche de proliférer davantage. Le premier repiquage est alors réalisé en utilisant une solution de trypsine-EDTA identique à celle employée pour la lignée MDBK. La trypsine est une enzyme qui permet d'hydrolyser les éléments d'adhésion des cellules au support et des cellules entre elles (1). Lorsque la couche cellulaire se détache du support, l'action de la trypsine est neutralisée par le S.V.F. et la suspension cellulaire est dédoublée.

#### *1-2-3 Entretien des cultures*

Les cellules de P.C. sont des cellules fragiles, à durée de vie limitée, qu'il faut entretenir soigneusement. Le milieu nutritif est constitué du M.E.M.E., comme milieu de base, auquel est ajouté 1 % de L-glutamine et 10 % de S.V.F. afin de réunir les conditions d'une prolifération satisfaisante. La glutamine est un composant essentiel. La concentration assez élevée de S.V.F. s'explique par le fait que les fibroblastes sont très gourmands en facteurs mitogènes, leur activité mitotique étant très importante (1).

Nous avons abandonné l'addition d'antibiotiques au milieu, évitant ainsi de masquer une infection éventuelle et supprimant, par ailleurs, un facteur potentiellement toxique pour les cellules. Le milieu doit être changé tous les deux ou trois jours.

La méthode de repiquage est identique à celle décrite précédemment pour les cellules MDBK. L'intervalle entre deux trypsinations est en moyenne de quatre jours. Pour un flacon de 25 cm<sup>2</sup>, lorsque la confluence est atteinte, on obtient environ deux millions de cellules fibroblastiques lors des premiers passages, pour finir à un million dans les derniers. Il faut éviter de laisser les cultures atteindre le dernier stade de confluence car les cellules ont du mal à maintenir le taux intra-cellulaire en acides aminés, la surface d'échange avec le milieu étant réduite (1).

A la troisième subculture, les cellules peuvent être congelées à -70°C. Elles constituent ainsi une réserve de cellules. Théoriquement, elles peuvent subir une quinzaine de passages, néanmoins, ce nombre varie avec l'explant. Au laboratoire, nous nous limitons à huit générations de subcultures. En effet, au-delà, on observe tous les signes du vieillissement cellulaire *in vitro* : une diminution progressive de l'activité mitotique, de la

motilité cellulaire, de la capacité d'étalement, de la densité maximale de la culture, une accumulation de débris cellulaires, un accroissement de la taille cellulaire et une augmentation du temps de génération (1). Le ralentissement du rythme prolifératif apparaît déjà au cours de la progression des fibroblastes dans leur vie en culture.

## **2 - INFECTION VIRALE**

### **2-1 Souche virale**

Le Laboratoire possède deux souches virales : la souche Visna K 796 et la souche Maedi W L C 1. Afin de ne pas multiplier les facteurs de variation des résultats, lors de la mise au point de la méthode de dosage antiviral basé sur le MTT, nous n'avons utilisé que la souche K 796 du lentivirus Visna. Les deux souches de ce virus sont responsables de deux pathologies différentes. Cependant, elles répondent de manière identique à l'inhibition antivirale (26). En outre, bien que l'effet cytopathique induit par la souche Maedi se développe moins rapidement que pour la souche Visna, et que la souche Maedi détermine, *in vitro*, une infection persistante, leur réplication est analogue. On peut donc supposer que la technique mise au

point avec la souche Visna pourra être applicable à la souche Maedi.

La souche Visna K 796, souche de référence, nous a été fournie par le Laboratoire Central Vétérinaire de Maisons-Alfort. En 1960, Sigurdsson l'a isolée, en Islande, d'un mouton atteint d'encéphalite. Elle est conservée au congélateur à  $-70^{\circ}\text{C}$  sous forme d'aliquotes de surnageants de cultures cellulaires infectées. Ceux-ci sont utilisés comme inoculum pour le titrage de la souche virale et pour infecter de nouvelles cultures cellulaires.

## 2-2 L'effet cytopathique du virus Visna-Maedi

L'effet cytopathique ou cytopathogène (E.C.P.) est une des caractéristiques des virus lents qui détruisent les cellules qu'ils infectent.

Lorsque le virus se développe dans les cellules de P.C. ovins, il provoque des changements morphologiques typiques dus au phénomène de la fusion cellulaire viro-induite. Ceux-ci sont visibles au microscope optique inversé dès la 72<sup>ème</sup> heure après la contamination des cellules *in vitro*. Il apparaît d'abord des cellules réfringentes, volumineuses, multinucléées qui prennent ensuite une forme étalée avec de nombreuses digitations filiformes : les syncytia. En fin de cycle lytique, les

syncytia comptent jusqu'à vingt noyaux, disposés en couronne et que la coloration au May-Grünwald/Giemsa permet de mettre très nettement en évidence.

### 2-3 Constitution d'un pool viral

Pour renouveler notre pool de virus Visna-Maedi, nous avons mis en culture les deux souches du virus. A partir d'un tapis de cellules de P.C. à peine à confluence (80 %), nous opérions de la façon suivante :

- vider le milieu de culture du flacon ; rincer le tapis cellulaire avec du milieu de base pour éliminer le S.V.F. qui inhibe le développement du virus,

- mettre un volume de 2 ml de surnageant de culture infectée, contenant le virus, pour un tapis cellulaire de 75 cm<sup>2</sup> (0,5 à 1 ml pour un tapis de 25 cm<sup>2</sup>) et laisser une heure à 37°C,

- rejeter l'inoculum viral et ajouter 10 ml de milieu de survie, pour un flacon de 75 cm<sup>2</sup> (5 ml pour un flacon de 25 cm<sup>2</sup>), composé du M.E.M.E. et de 2 % de S.V.F.,

- 48 heures après, renouveler le milieu de survie,

- dès l'apparition de l'E.C.P., recueillir le surnageant, le clarifier par centrifugation 5 min. à 2000 tours/min (Jouan CR 312), à + 4°C, pour éliminer les débris cellulaires en suspension et le congeler à -70°C ; remettre 10 ml (ou 5 ml) de milieu de survie,

- répéter cette dernière opération toutes les 24 heures, jusqu'à destruction du tapis cellulaire qui se produit en une dizaine de jours.

#### **2-4 Titrage du virus Visna-Maedi**

Le virus est titré selon une micro-méthode mise au point par Larrouturou (26) et basée sur l'E.C.P. caractéristique du virus Visna-Maedi.

Une suspension de cellules de P.C. trypsinées est réalisée dans du M.E.M.E. additionné de 5 % de S.V.F. Elle est dénombrée sur cellule de Malassez, puis ajustée à  $2.10^5$  cellules/ml. 50  $\mu$ l de la suspension finale sont disposés dans chacune des cupules d'une plaque de 96 puits à fond plat (Falcon, Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, USA).

Des dilutions décimales du virus à titrer sont préparées dans du milieu de base en suivant une progression géométrique de raison 10 et en changeant de pipette à chaque dilution. 50  $\mu$ l de chacune d'elles sontensemencés dans les cupules de la microplaque contenant déjà les cellules, à raison de 8 cupules par dilution. Plus on utilise de cupules par dilution, plus la précision du titre obtenu est grande. Deux colonnes de 8 puits sont

réservées, l'une, au témoin cellules (cellules non infectées), l'autre, au virus non dilué.

On obtient une concentration cellulaire finale de  $10^4$  cellules/puits et un pourcentage en S.V.F. de 2,5 %. Ce pourcentage est suffisant pour permettre l'adhérence des cellules, leur croissance dans la plaque et le développement du lentivirus (26). Les microplaques sont incubées à l'étuve à 37°C sous 5 % de CO<sub>2</sub> pendant six jours, temps nécessaire pour obtenir un titre viral maximal.

Au bout de ces six jours d'incubation, le titre du virus est évalué par une formule statistique en fonction du nombre de cupules inoculées, selon la méthode de Reed et Muench (40). Pour mieux apprécier l'E.C.P. une coloration au May-Grünwald/ Giemsa est effectuée (technique décrite au paragraphe 5-1). Les cupules positives, c'est-à-dire présentant au moins un syncytium, sont relevées. Le titre de la suspension virale est exprimé en dose infectante à 50 % en culture tissulaire (D.I.C.T. 50 ou T.C.I.D. 50 en anglais) par millilitre. Après détermination des dilutions chevauchant le point 50 %, la T.C.I.D. 50 est calculée selon la formule suivante (1) :

$$1 \text{ TCID } 50 = 10 - \left[ \text{dil. sup.} + \frac{\% \text{ dil. sup. à } 50\% - 50\%}{\% \text{ dil. sup. à } 50\% - \% \text{ dil. inf. à } 50\%} \right]$$

où % dil. sup. à 50 % est le pourcentage de réponses positives obtenu pour la dilution supérieure au point 50 %

% dil. inf. à 50 % est le pourcentage de réponses positives obtenu pour la dilution inférieure au point 50 %

dil. sup. correspond à la dilution supérieure au point 50 %

Par cette méthode de calcul, nous avons trouvé :

- pour le pool de virus Visna, une TCID 50 de  $10^{-5,39}$  soit un titre de  $5.10^6$  TCID 50/ml

- pour le pool de virus Maedi, une TCID 50 de  $10^{-4,12}$  soit un titre de  $2,6.10^5$  TCID 50/ml.

L'observation des plaques au microscope optique inversé, révèle que le tapis cellulaire est totalement détruit au niveau du virus pur. Aux plus hautes dilutions virales, on note un nombre très élevé de syncytia.

## **2-5 Infection de cellules de plexus choroïde en microplaque**

L'infection des cellules de P.C. de mouton avec la souche Visna nécessite de constituer au préalable un tapis cellulaire. Dans les cupules d'une plaque de 96 puits à fond plat (Falcon), 100 µl d'une suspension cellulaire à 10 % de S.V.F. sont distribués. La microplaque est laissée à

l'étuve pendant 24 heures pour permettre aux cellules d'adhérer au fond des puits.

Après 24 heures, on réalise l'infection proprement dite. Chaque cupule est vidée de son milieu nutritif et rincée avec un égal volume de milieu de base de façon à éliminer toute trace de S.V.F. Le tapis est inoculé à une certaine multiplicité d'infection par contact avec 50 µl d'une dilution du virus (dans du M.E.M.E. sans S.V.F.) pendant 45 minutes à 37°C. L'inoculum viral contenant l'excès de virus qui n'a pas pénétré dans les cellules est rejeté. Il est remplacé par 100 µl de milieu nutritif contenant de 2 à 5 % de S.V.F. La plaque est ensuite mise à incubation. Suivant le temps d'incubation choisi, nous la recouvrons d'un film plastique autocollant qui évite la déshydratation des puits et limite les phénomènes de contamination.

### **3 - LES REACTIFS**

La solution de bleu Trypan est préparée à 1 % (p/v) par dissolution du bleu Trypan (Merck, Darmstadt, Allemagne) dans du tampon phosphate (P.B.S.) (Biomérieux, Charbonnières Les Bains, France).

La solution alcoolique de May-Grünwald provient du Laboratoire Merck, celle de Giemsa de la Société Chimique Pointet Girard (Villeneuve la Garonne, France).

Les solutions de MTT sont préparées dans du P.B.S. dans lequel le MTT (Sigma chimie) se dissout bien jusqu'à la concentration de 10 mg/ml. Elles sont stérilisées par filtration sur membrane stérile de porosité 0,22  $\mu\text{m}$  (Sartorius AG, Göttingen, Allemagne), ce qui élimine les cristaux de MTT non solubilisés ou le formazan précipité. Elles sont stockées à 4°C dans l'obscurité. Dans ces conditions, nous pouvons les conserver pendant un mois.

L'isopropanol et le Triton X-100 ont été fournis par le Laboratoire Sigma chimie. Le Triton X-100 est mélangé, à une concentration de 10% (v/v), dans l'isopropanol acidifié, c'est-à-dire contenant 2 ml d'HCl concentré (Prolabo, Paris, France) pour 500 ml de solvant.

Le laurylsulfate de sodium (en anglais SDS, sodium dodecyl sulfate), provenant de Prolabo, est dissous à un taux de 10 % (p/v) dans de l'eau désionisée additionnée de 0,4 % d'HCl concentré. L'alcool éthylique nous a été fourni par Docks des Alcools (Neuilly sur Seine, France) et le diméthyl sulfoxyde (DMSO) par S.D.S. (Peypin, France).

L'azidothymidine (AZT) provient de chez Sigma Chimie.

Le MR 13095 a été synthétisé dans le Laboratoire de Chimie Thérapeutique de la Faculté de Pharmacie de Caen.

Pour chacun, nous avons préparé des solutions mères dans de l'eau distillée, l'eau étant le meilleur solvant non toxique pour les cellules. La concentration mère est de 2 mM pour l'AZT et de 5 mM pour le MR 13095. Les solutions sont filtrées sur membrane de porosité 0,22  $\mu\text{m}$  et conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation. Des dilutions successives de raison géométrique 1,2 sont réalisées extemporanément dans du milieu nutritif additionné de 4 % de S.V.F.

#### **4 - EPREUVE D'EXCLUSION AU BLEU TRYPAN**

Le bleu Trypan est un colorant qui ne pénètre que dans les cellules mortes ou mourantes dont la membrane ne peut alors plus l'exclure. Le noyau et le cytoplasme prennent une couleur bleue, les cellules vivantes restent incolores. Ce colorant est donc utilisé comme test lorsque l'on veut savoir si les cellules sont vivantes ou mortes. Il est possible de déterminer un indice ou pourcentage de viabilité cellulaire correspondant au pourcentage de cellules non colorées.

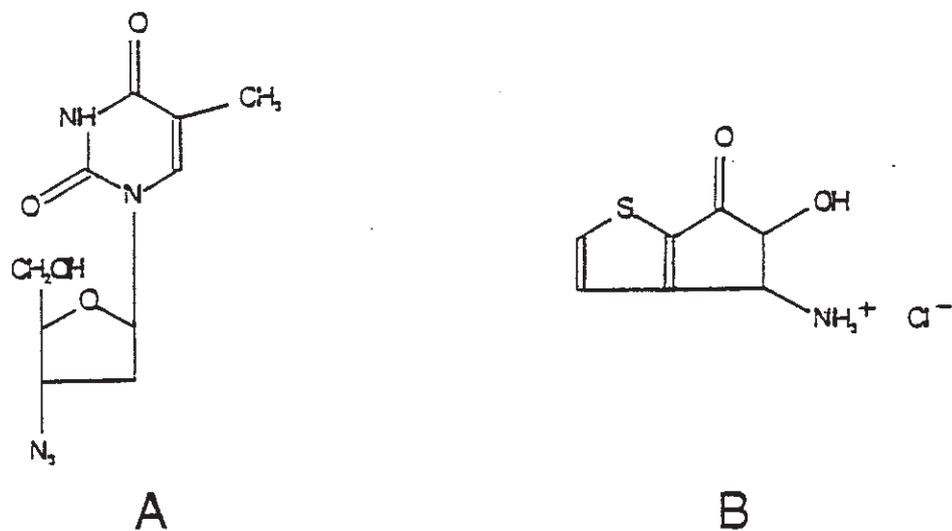


Figure 1 :

Structure chimique de l'AZT (A) et du MR 13095 (B).

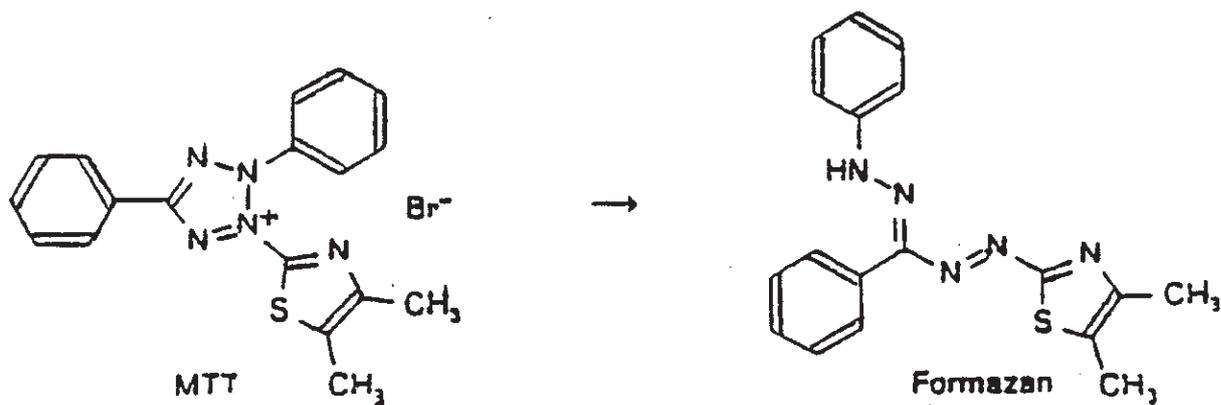


Figure 2 :

Structure chimique du MTT et de son formazan.

La méthode de la coloration au bleu Trypan est simple (40). A 0,4 ml d'une suspension cellulaire, on ajoute 0,1 ml de la solution de bleu Trypan. Après un mélange soigneux, une goutte de la suspension est déposée sur une cellule de Malassez.

Le nombre de cellules vivantes par millilitre est évalué par la formule suivante (2) :

Cellules incolores dans 10 carrés  $\times 10 \times 1000 \times 5/4$

On multiplie par 10 pour avoir le nombre de cellules sur l'ensemble de l'hématimètre, puis par 1000 pour obtenir la valeur par millilitre, le volume étant de 1  $\mu$ l. Enfin, on multiplie par 5/4 pour compenser la dilution provoquée par l'addition du colorant dans la première étape.

Pour déterminer la viabilité des cellules de P.C. cultivées en microplaque, la suspension cellulaire est obtenue par trypsination avec 50  $\mu$ l de trypsine / EDTA par puits. Les cellules détachées sont reprises par 150  $\mu$ l de M.E.M.E. à 20 % de S.V.F. Puis la coloration est effectuée. Quatre puits par essai sont suffisants. Des témoins cellules sont toujours ménagés.

Les pourcentages de viabilité sont obtenus en appliquant la formule (3) :

$$\frac{\text{Nombre de cellules vivantes dans l'essai} \times 100}{\text{Nombre de cellules vivantes dans le témoin cellules}}$$

## V - METHODE AU MAY-GRÜNWALD/GIEMSA

La coloration au May-Grünwald/Giemsa (M.G.G.) permet de mettre en évidence la morphologie cellulaire et l'E.C.P. induit par les virus.

### 5-1 Technique de la coloration au May-Grünwald/Giemsa

Le surnageant contenu dans les puits de la microplaque est rejeté par aspiration minutieuse avec une pipette multicanaux (Labsystems, Finlande). Les cellules sont fixées et colorées par la solution alcoolique de May-Grünwald, à raison de 100 µl/puits, pendant trois minutes à température ambiante. On rince à l'eau du robinet. Les cellules sont ensuite colorées avec 100 µl/puits d'une solution de Giemsa, extemporanément diluée au 1/20<sup>ème</sup> dans de l'eau distillée, pendant au minimum 30 minutes et au maximum 2 h 30. La microplaque est de nouveau rincée à l'eau du robinet.

Le cytoplasme des cellules se colore en rose et les noyaux en violet. Au microscope optique inversé, les cellules sont nettement observées et les syncytia sont facilement visualisés.

## **5-2 Applications de la coloration au May-Grünwald/Giemsa**

### *5-2-1 Détermination de la cytotoxicité*

La concentration maximale non cytotoxique (C.M.C.) "est la concentration de substance la plus élevée pour laquelle on observe une absence de modification structurale des cellules, c'est-à-dire aucune lyse cellulaire et aucune augmentation de la fusion cellulaire" (26).

Pour chaque molécule testée, une série de dilutions est préparée. L'essai est réalisé en plaque de 96 puits sur une culture cellulaire de P.C., obtenue à partir de  $2 \cdot 10^4$  cellules/cupule. Au bout de 24 heures, 100  $\mu$ l de chaque dilution sont répartis dans quatre cupules. Quatre puits sont gardés pour le témoin cellules sans produit. La plaque est incubée 6 jours à 37°C dans une étuve à CO<sub>2</sub>. Au bout de ce temps, la plaque est observée au microscope optique inversé, après coloration au M.G.G. La première

concentration en substance qui ne s'accompagne pas de changement dans la morphologie des cellules représente la C.M.C.

#### *5-2-2 Détermination de l'activité antivirale*

L'activité antivirale est évaluée par la mesure de l'inhibition de l'E.C.P. induit par le virus. L'inhibition de l'E.C.P. se manifeste par la réduction du nombre de syncytia dans les cupules tests par rapport aux cupules du témoin virus (cellules infectées non traitées). Pour la numération des syncytia, on se base sur l'aspect des témoins cellules (cellules non infectées non traitées) pouvant présenter de faux syncytia. Ceux-ci résultent de la fusion cellulaire spontanée et sont un signe de vieillesse cellulaire.

La mesure de l'activité antivirale est effectuée en microplaques. Le tapis à  $2 \cdot 10^4$  cellules/puits est infecté comme décrit dans le paragraphe 2-5. La suspension virale rejetée est remplacée par 100  $\mu$ l d'une dilution de la solution mère de la molécule traitée. Chaque dilution est répétée quatre fois par plaque. La plaque est incubée 6 jours à 37°C. Chaque essai compte des contrôles : un témoin cellules et un témoin virus.

Au bout des 6 jours d'incubation, les syncytia sont dénombrés au microscope optique inversé après



coloration au M.G.G. Les résultats sont exprimés en pourcentages de protection ou pourcentages d'inhibition par rapport aux contrôles. Ils sont calculés à partir de la formule (4) :

$$\frac{\text{Nb dans le témoin virus} - \text{Nb dans l'essai}}{\text{Nb dans le témoin virus}} \times 100$$

où Nb est le nombre de syncytia

## 6 - METHODE AU MTT

### 6-1 - Principe (50)

Le bromure de 3 - (4,5 - diméthylthiazol - 2 - yl) - 2,5 - diphényltétrazolium (MTT) est un composé organique coloré en jaune. Il est réduit uniquement dans les cellules métaboliquement actives (donc vivantes) par des déshydrogénases mitochondriales, en un composé bleu, insoluble : le formazan (figure 2). Cette modification chimique s'accompagne d'un changement du spectre d'absorption. Ceci permet une mesure spectrophotométrique du formazan et donc sa quantification. La quantité de formazan générée étant proportionnelle à la densité cellulaire, il est possible de déterminer le nombre de cellules viables.

## 6-2 Protocole de la méthode Pauwels et coll. (36)

Cette microméthode comprend cinq étapes distinctes :

- incubation pendant 2 heures à 37°C des cellules (200 µl /puits) avec 20 µl d'une solution de MTT à 7,5 mg/ml dans du P.B.S.,

- aspiration de 150 µl de milieu de culture dans chaque cupule,

- addition de 100 µl du mélange isopropanol acidifié / Triton X-100 pour solubiliser les cristaux de formazan,

- agitation des plaques pendant 10 minutes sur un agitateur de plaques pour assurer une dissolution complète du formazan,

- lecture des densités optiques (D.O.) sur un photomètre lecteur de plaques, à deux longueurs d'onde : une longueur d'onde test de 540 nm et une longueur d'onde de référence de 690 nm. Le blanc est composé d'un mélange de l'ensemble des réactifs utilisés, ayant subi toutes les phases de l'essai, mais ne contenant pas les cellules.

La D.O. lue à 690 nm est soustraite de celle obtenue à 540 nm. La longueur d'onde de 690 nm, qui permet d'évaluer le bruit de fond, élimine les effets d'une absorption non spécifique, telle que celle due à des rayures sur le fond des puits (19).

Pauwels et Coll. (36) réalisent des triplicate. Nous avons choisi de répliquer les essais quatre fois par microplaque (sauf mention contraire). Les valeurs retenues représentent donc les moyennes des différences des D.O. de quatre puits (D.O. moyennes).

### 6-3 Mesure de l'altération de la viabilité cellulaire

La mesure de l'altération de la viabilité cellulaire se fait toujours par rapport à un témoin de cellules saines. Les résultats sont exprimés en terme de pourcentages de viabilité par rapport au témoin cellules selon la formule (5) :

$$\frac{\text{D.O. moyenne de l'essai} \times 100}{\text{D.O. moyenne du témoin cellules}}$$

En ce qui concerne la mesure de l'altération de la viabilité des cellules infectées, elle est réalisée par rapport à un témoin cellules non infectées. Les résultats apparaissent sous la forme suivante :

$$\frac{\text{D.O. cell. infectées} \times 100}{\text{D.O. cell. non infectées}}$$

D.O. cell. infectées correspond à la D.O. moyenne calculée pour les cellules infectées et D.O. cell. non infectées à celle calculée pour le témoin cellules.

#### **6-4 Applications de la méthode colorimétrique au MTT**

##### *6-4-1 Détermination de la cytotoxicité*

La concentration cytotoxique à 50 % (C.C.50) est définie comme la concentration de la molécule testée qui réduit de 50 % le nombre de cellules viables par rapport au témoin cellules.

L'essai est le même que celui décrit pour la C.M.C. (paragraphe 5-2-1). Au bout des six jours d'incubation, la viabilité des cellules est mesurée spectrophotométriquement par la méthode au MTT.

Pour chaque dilution de la substance, nous obtenons une valeur de D.O. qui nous permet de calculer le pourcentage de viabilité en appliquant la formule (5). Ces pourcentages de viabilité sont représentés graphiquement en fonction de la concentration en produit. La valeur de la C.C.50 est déterminée à partir de l'équation de la droite de régression linéaire.

## 6-4-2 Détermination de l'activité antivirale

L'activité antivirale d'une molécule est exprimée par la concentration efficace à 50 % (C.E. 50). Elle correspond à la zone d'inflexion de la sigmoïde effet-dose en échelle non logarithmique.

Chaque essai comporte un témoin cellules et un témoin virus, auxquels on peut rajouter un témoin produit (cellules non infectées traitées).

Les pourcentages de protection cellulaire sont calculés par rapport aux contrôles en suivant la formule de Pauwels et Coll. (36) (6) :

$$\frac{\text{D.O. moyenne de l'essai} - \text{D.O. moyenne du témoin virus}}{\text{D.O. moyenne du témoin cellules} - \text{D.O. moyenne du témoin virus}} \times 100$$

Si des témoins produits ont été préparés, on peut alors appliquer la formule de Ayisi et Coll. (6) (8) :

$$\left[ 1 + \frac{\text{D.O. moyenne de l'essai} - \text{D.O. moyenne du témoin produit}}{\text{D.O. moyenne du témoin cellules} - \text{D.O. moyenne du témoin virus}} \right] \times 100$$

Par cette formule, il est tenu compte de l'effet indépendant de la molécule à tester sur la capacité des cellules à métaboliser le MTT en formazan, cet effet étant soit inhibiteur, soit stimulateur, soit nul.

**Deuxième Partie :**

**RESULTATS**

Les résultats de notre travail expérimental sont exposés en deux parties. La première présente la mise au point du protocole de la microméthode colorimétrique au MTT, à partir de la technique employée par Pauwels et Coll. (36). Nous avons ensuite appliqué ce protocole au système cellules/virus. Le but est de rechercher une méthodologie pour étudier l'effet antiviral de molécules par mesure de l'inhibition de l'altération de la viabilité cellulaire. La seconde partie consiste en une amélioration de la sensibilité de la coloration au MTT. Les conditions d'un dosage antiviral sont définies et appliquées à l'étude de deux molécules antivirales.

## **1 - UTILISATION DU MELANGE ISOPROPANOL ACIDIFIE / TRITON X-100 COMME SOLVANT D'EXTRACTION DU FORMAZAN**

### **1-1 Optimisation de la méthode colorimétrique de Pauwels et Coll. (36)**

Le procédé de l'essai au MTT établi par Pauwels et Coll. (36) comprend l'utilisation d'un solvant alcoolique : le mélange isopropanol acidifié / Triton X-100.

Pour chaque expérience, les essais sont réalisés sur des tapis cellulaires de 24 heures.

Les résultats obtenus avec les cellules MDBK puis avec les cellules fibroblastiques sont exposés simultanément. Les écarts-types sont inférieurs ou égaux à 10 %. Les valeurs exprimées en pourcentages sont calculées par rapport aux conditions expérimentales choisies par Pauwels et Coll. (36).

*1-1-1 Vérification du principe de la méthode  
au MTT*

Par cette première expérience, nous avons mis en évidence le fait que seules les cellules vivantes métabolisent le MTT et que la quantité de MTT réduite est proportionnelle au nombre de cellules vivantes. Cette étape est indispensable pour confirmer l'intérêt de la méthode et donc pour poursuivre les recherches.

Deux séries de concentrations en cellules MDBK, allant de  $5 \cdot 10^4$  cellules/ml à  $4 \cdot 10^5$  cellules/ml, ont été sélectionnées. Le volume final de la suspension cellulaire est de 200  $\mu$ l/puits. Une série est incubée 24 heures à 37°C en présence de 5 % de CO<sub>2</sub> et l'autre cinq jours dans les mêmes conditions. A la fin de chaque temps d'incubation, nous effectuons la méthode de coloration au MTT selon le protocole de Pauwels et Coll. (36). Les résultats sont représentés figure 3.

Après 24 heures d'incubation, les D.O. sont directement proportionnelles au nombre théorique de cellules par cupule (coefficient de corrélation de 1,00). En revanche, après cinq jours d'incubation, les D.O. diminuent en fonction du nombre croissant de cellules par cupule, pour atteindre un seuil à  $4 \cdot 10^4$  cellules/puits. Ceci est en corrélation avec l'observation de la microplaque au microscope optique inversé :

- les cellules après cinq jours n'ont plus le même aspect qu'au début de l'incubation : elles ne sont plus réfringentes et présentent des granulations atypiques,

- il y a une mortalité importante qui augmente avec la concentration cellulaire par puits.

Par conséquent, seules les cellules vivantes sont capables de réduire le MTT en formazan. De plus, il existe une relation linéaire entre la quantité de formazan générée, mesurée par l'absorbance, et le nombre de cellules vivantes.

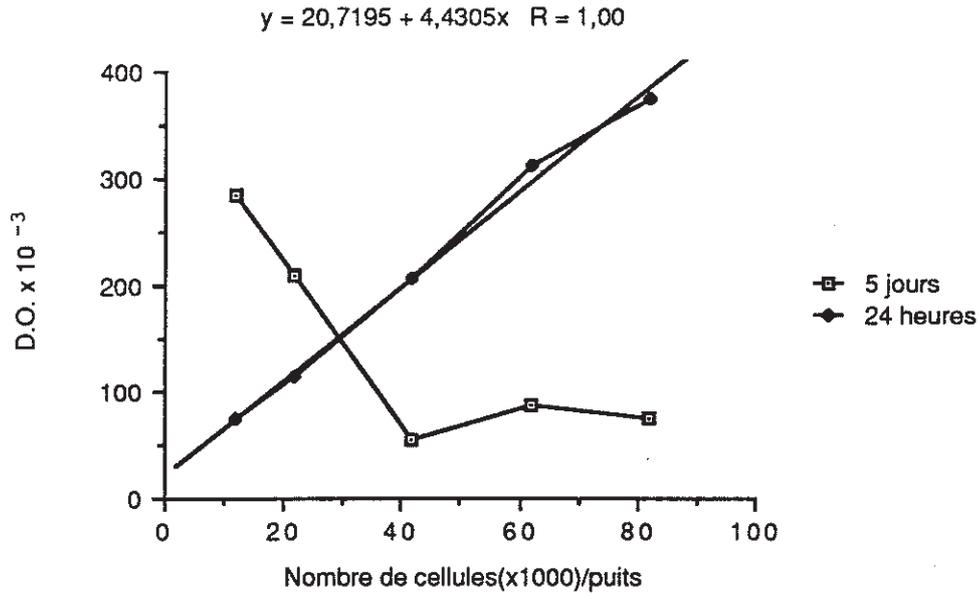


Figure 3 :

Réduction du MTT par les cellules MDBK en fonction du nombre de cellules par puits et pour deux temps d'incubation des cellules. Les valeurs sont les moyennes des résultats de 8 puits.

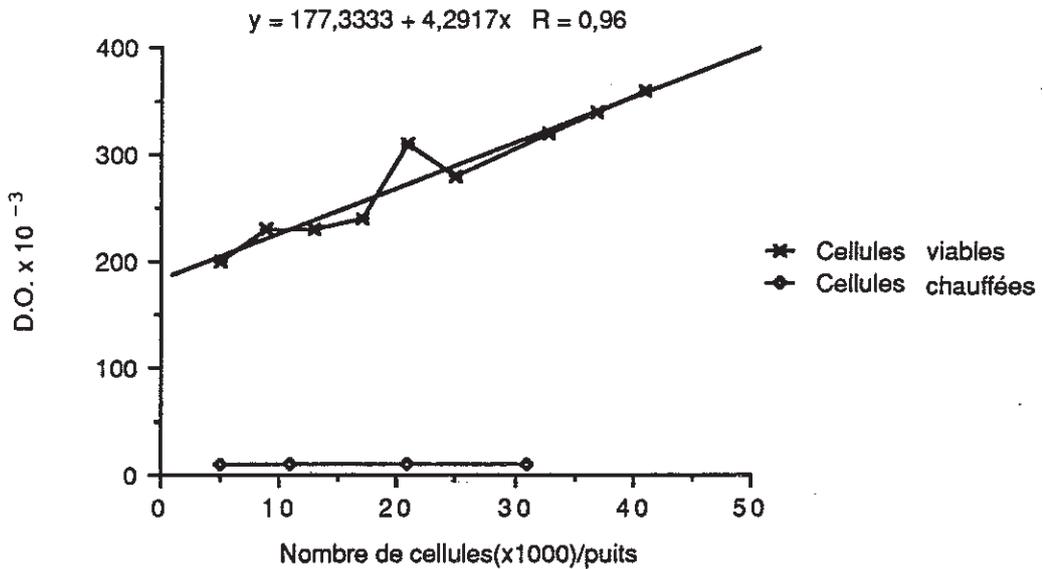


Figure 4 :

Réduction du MTT par les cellules de P.C. en fonction du nombre de cellules par puits, après 24 heures d'incubation précédées ou non d'un traitement des cellules par la chaleur.

Une expérience similaire a été réalisée avec les cellules P.C. La gamme des concentrations cellulaires varie de  $2 \cdot 10^4$  cellules/ml à  $2 \cdot 10^5$  cellules/ml pour un volume de 200  $\mu$ l/puits. Le temps d'incubation testé est de 24 heures.

La représentation graphique des valeurs de D.O. en fonction de la densité cellulaire (figure 4) montre une corrélation entre la quantité de MTT réduite et le nombre de cellules par puits (coefficient de corrélation de 0,96).

Des cellules de P.C. ont été chauffées pendant 30 minutes à 60°C puis mises à incuber à différentes concentrations pendant 24 heures. Après la réaction avec le MTT, la microplaque a été centrifugée pendant 5 minutes afin de pouvoir éliminer 150  $\mu$ l de surnageant sans aspirer les cellules.

Les résultats apparaissent sur la figure 4 et confirment que les cellules mortes sont incapables de métaboliser le MTT.

#### *1-1-2 Concentration en MTT*

Le volume de la solution de MTT ajouté dans chaque cupule, contenant 100  $\mu$ l de milieu de culture, est de 20  $\mu$ l. Cinq concentrations finales en MTT ont été essayées

sur un tapis de  $2.10^4$  cellules de P.C. par puits : 0,7 mg/ml ; 1 mg/ml ; 1,25 mg/ml ; 1,5 mg/ml et 1,7 mg/ml.

La concentration finale adoptée par Pauwels et Coll. (36) est de 0,7 mg de MTT par ml. Dans notre cas, le meilleur résultat est réalisé avec 1 mg de MTT par ml (tableau I).

Nous avons alors étudié la réduction du MTT en fonction du nombre de cellules par puits et de la concentration finale en MTT. Quatre densités de cellules de P.C. ont été choisies :  $0,5.10^4$ ,  $1.10^4$ ,  $2.10^4$  et  $5.10^4$  cellules/puits. Parallèlement, les deux concentrations finales en MTT sélectionnées sont celles ayant donné les meilleurs pourcentages : 1 mg/ml et 1,25 mg/ml. Les valeurs de D.O. sont regroupées dans la figure 5.

Quelle que soit la concentration en MTT, la quantité de formazan produite est bien proportionnelle au nombre de cellules mises en culture (coefficient de corrélation de 1,00 pour 1 mg/ml et de 0,99 pour 1,25 mg/ml). Les résultats pour les deux concentrations finales en MTT sont similaires.

En conséquence, nous optons pour la plus faible concentration finale, soit 1 mg de MTT par ml. Nous préparons des solutions de MTT à 6 mg/ml dans du P.B.S et nous en distribuons 20  $\mu$ l/puits.

Concentrations finales en MTT (mg/ml)	$\frac{\text{D.O. essai} \times 100}{\text{D.O. } 0,7 \text{ mg/ml}}$
0,7	100
1,0	130
1,25	103
1,5	100
1,7	89

Tableau I :

Variation de la production de formazan par les cellules de P.C. en fonction de la concentration en MTT dans le milieu. Le tapis cellulaire est incubé 3 heures avec le MTT.

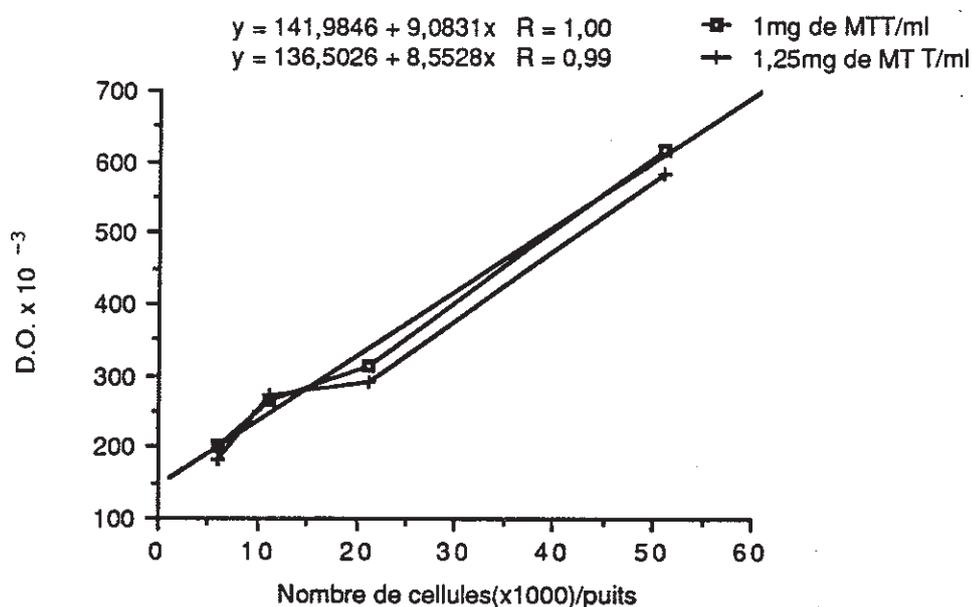


Figure 5 :

Réduction du MTT par les cellules de P.C. en fonction du nombre de cellules par puits et avec deux concentrations finales en MTT. Les cellules sont incubées 3 heures avec le MTT.

*1-1-3 Temps d'incubation des cellules de P.C.*

*avec le MTT*

Une fois que la solution de MTT est ajoutée dans chaque puits, la microplaque est mise à incuber à l'étuve afin de permettre la réduction du MTT par les cellules. Nous avons évalué la cinétique de production du formazan.

Comme le montre le tableau II, la quantité de formazan générée par les cellules est fonction du temps d'incubation de celles-ci avec le MTT. Elle atteint son maximum à 3 heures puis reste stable.

C'est pourquoi, nous avons allongé le temps d'incubation entre les cellules et le MTT, qui était au départ de 2 heures suivant Pauwels et Coll. (36), pour le passer à 3 heures.

Des cellules de P.C. ont été laissées en contact avec le MTT à température ambiante durant 3 heures. Parallèlement, des cellules ont été placées à 37°C.

A 20°C les D.O. sont le tiers de celles obtenues à 37°C (résultats non publiés).

Temps d'incubation des cellules avec le MTT, en h.	$\frac{\text{D.O. essai} \times 100}{\text{D.O. 2 h.}}$
15 min	46
1 h	97
2 h	100
2 h 30	117
3 h	142
4 h	129
6 h	130
24 h	149

Tableau II :

Production du formazan par les cellules de P.C. en fonction du temps d'incubation des cellules avec le MTT. Le tapis est constitué de  $2 \cdot 10^4$  cellules/puits.

Volumes du solvant d'extraction ( $\mu\text{l}$ /puits)	$\frac{\text{D.O. essai} \times 100}{\text{D.O. 100 } \mu\text{l}}$
100	100
150	97
200	82

Tableau III :

Influence du volume du solvant d'extraction sur les valeurs de D.O.. Le tapis compte  $2 \cdot 10^4$  cellules de P.C./puits.

#### *1-1-4 Volume du solvant d'extraction*

La concentration finale en MTT ayant été majorée par rapport à celle de Pauwels et Coll. (36), il nous a semblé important de vérifier si le volume du solvant d'extraction indiqué par Pauwels et Coll. (36) restait inchangé. Sur un tapis de  $2 \cdot 10^4$  cellules de P.C./puits, trois volumes successifs du solvant ont été testés pour dissoudre les cristaux de formazan : 100  $\mu$ l, 150  $\mu$ l et 200  $\mu$ l/cupule.

Pauwels et Coll. (36) utilisent 100  $\mu$ l du mélange isopropanol / Triton X-100 / HCl. D'après les résultats figurant dans le tableau III, il est inutile d'augmenter ce volume de solvant.

#### *1-1-5 Volume de surnageant à enlever avant l'addition du solvant d'extraction*

L'inconvénient de laisser le surnageant avant l'addition du solvant d'extraction est qu'il peut se produire une précipitation des protéines du S.V.F. avec le mélange alcool-acide. Nous avons donc recherché l'effet de la présence du milieu de culture sur les valeurs de D.O.

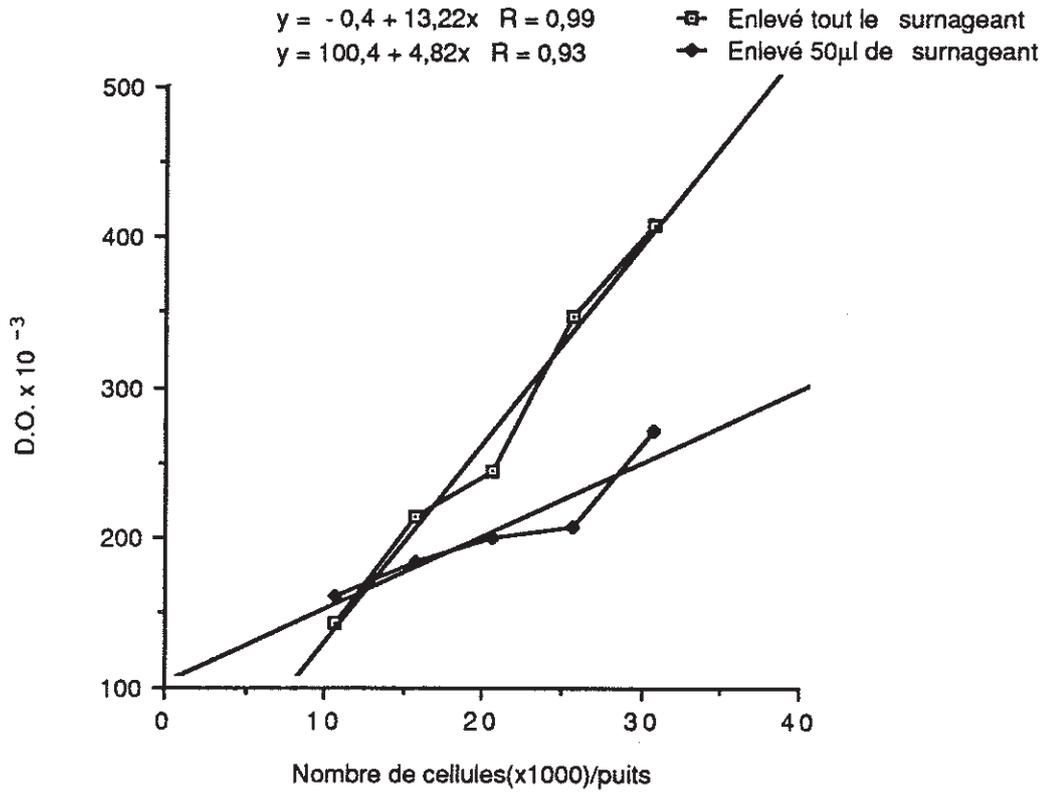


Figure 6 :

Effet sur les D.O. de l'aspiration de 50 µl ou de la totalité du surnageant, avant l'addition du solvant d'extraction du formazan sur un tapis de cellules de P.C.

Des tapis de cellules de P.C. ont été constituées avec cinq concentrations s'échelonnant de  $1.10^4$  à  $3.10^4$  cellules/puits. Deux essais ont été réalisés :

- aspirer 50  $\mu$ l de surnageant, suivant la technique de Pauwels (36),

- aspirer la totalité du surnageant.

Pour chacun, nous avons préparé des blancs sans cellules correspondant à la composition en réactifs du surnageant. Les résultats sont représentés figure 6.

Les valeurs d'absorbance sont plus élevées lorsque tout le surnageant est aspiré, quel que soit le nombre de cellules par cupule.

Nous décidons d'enlever systématiquement le surnageant après l'incubation avec le MTT. Le blanc est dès lors composé de 100  $\mu$ l d'isopropanol acidifié avec 10 % de Triton X-100.

#### *1-1-6 Stabilité de la coloration du formazan*

La stabilité de la coloration du formazan dans le solvant d'extraction a été étudiée au cours du temps afin de déterminer le délai qui nous est imparti pour effectuer les mesures de D.O. Le temps 0 min. correspond à la première lecture faite immédiatement après les 20 minutes d'agitation des microplaques.

Par la suite, les lectures sont réalisées à des temps déterminés indiqués dans le tableau IV. Entre chaque lecture, les plaques sont remises à l'étuve. Les résultats sont exprimés par rapport au taux obtenu au temps 0 min.

Au cours des dix premières minutes d'attente, on a une baisse très légère des D.O. Au bout d'une heure, les D.O. ne sont pas reproductibles. Après encore une heure supplémentaire, on a une baisse d'environ 10 % des valeurs d'absorbance. Enfin, des lectures effectuées après avoir laissé les microplaques 24 heures à l'étuve, indiquent une perte moyenne de D.O. de 20 % avec une très mauvaise reproductibilité. On note qu'une partie du solvant d'extraction s'est évaporée. Ceci est vrai quelle que soit l'échelle des valeurs de D.O.

En laissant les plaques à température ambiante entre chaque lecture, les résultats sont identiques.

Nous nous accordons au maximum un délai d'une heure pour lire les D.O.

Lectures faites après	$\frac{\text{D.O. tx} \times 100}{\text{D.O.to}}$
0 min	100
1 min	99 $\pm$ 2
3 min	98 $\pm$ 3
5 min	98 $\pm$ 3
7 min	97 $\pm$ 2
10 min	97 $\pm$ 1
25 min	97 $\pm$ 1
60 min	100 $\pm$ 12
2 h	88 + 3
18 h	82 $\pm$ 3
24 h	76 $\pm$ 18

Tableau IV :

Stabilité de la coloration du formazan, dans l'isopropanol acidifié / Triton X-100, au cours du temps. Les données sont les moyennes des résultats de cinq essais.

*1-1-7 Etude de la relation de proportionnalité au cours du temps*

La figure 7 donne la production de formazan par les cellules de P.C. après différents temps d'incubation des cellules. 24 heures après la mise en culture des cellules, le milieu de culture est remplacé par un milieu contenant 3 % de S.V.F. Ensuite, aucun renouvellement du milieu n'est opéré. La gamme des concentrations cellulaires va de  $0,5 \cdot 10^4$  à  $4 \cdot 10^4$  cellules/puits.

En dessous de  $1 \cdot 10^4$  cellules/puits et au-dessus de  $3 \cdot 10^4$  cellules/puits, nous perdons la relation de proportionnalité entre la densité cellulaire initiale et les D.O., au cours du temps d'incubation.

*1-1-8 Effet du nombre de passages des cellules*

Nous avons suivi la multiplication, au cours du temps, de cellules de P.C. ayant subi huit passages (=P.C.8). Deux concentrations cellulaires ont été choisies :  $2 \cdot 10^4$  et  $3 \cdot 10^4$  cellules/cupule. Aucun renouvellement de milieu n'a été effectué pendant l'expérience, excepté 24 heures après la distribution des cellules dans les microplaques. La figure 8 compare la courbe de croissance des P.C.8 à celle établie avec des P.C.5.

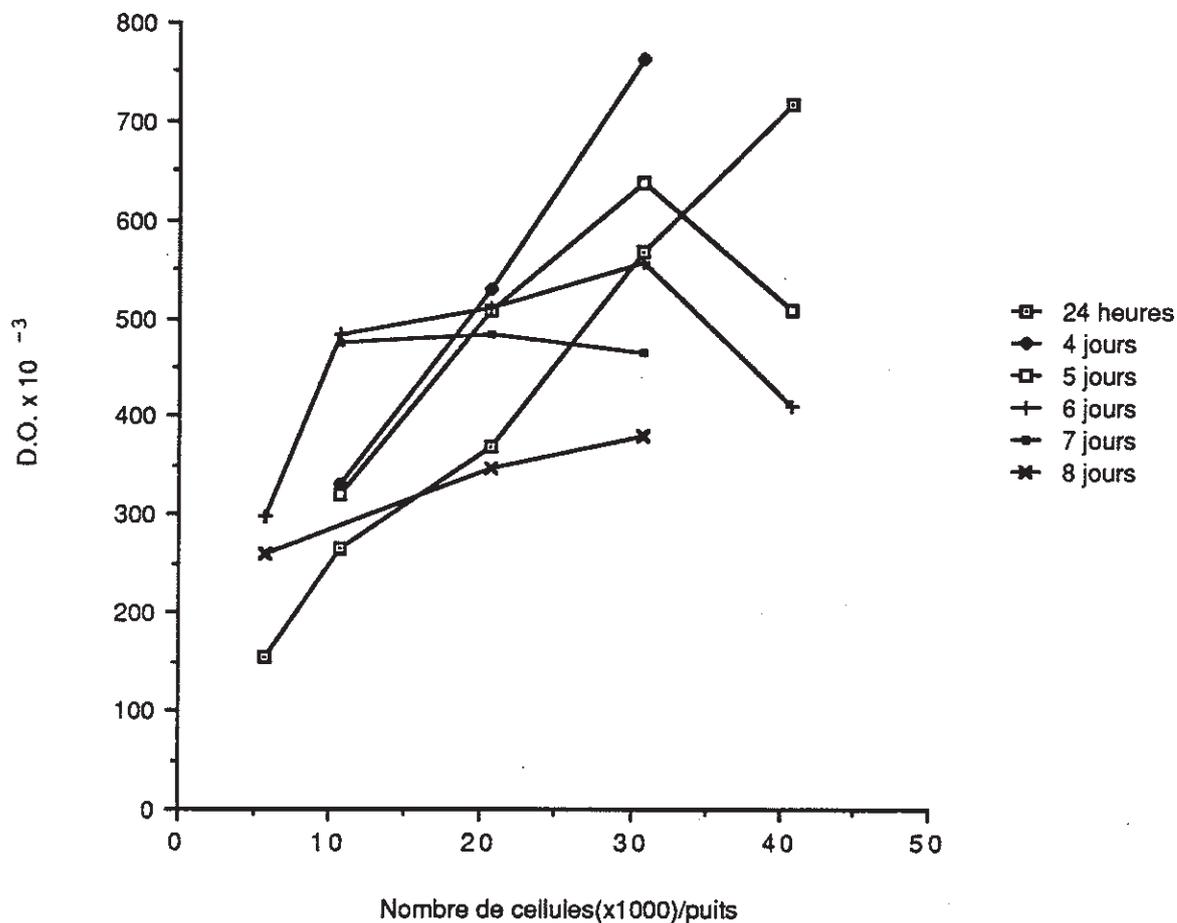


Figure 7 :

Réduction du MTT par les cellules de P.C. en fonction de la concentration cellulaire initiale et après différents temps d'incubation des tapis cellulaires.

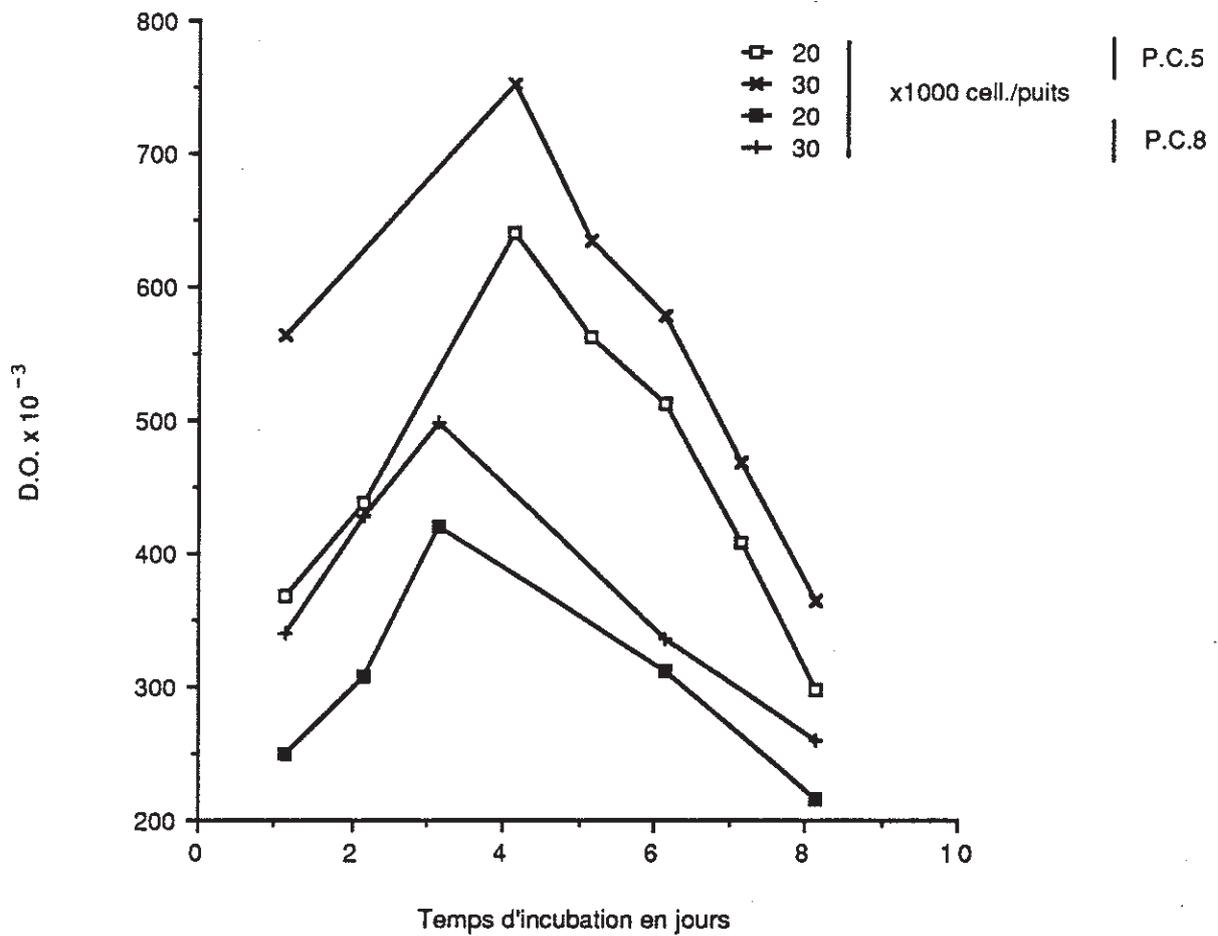


Figure 8 :

Réduction du MTT par des cellules de P.C. ayant subi un nombre de passages différent, en fonction du temps d'incubation et pour deux concentrations cellulaires initiales.

Les deux courbes de P.C.8 ont une forme analogue à celle des courbes des P.C.5. Cependant, les valeurs d'absorbance sont beaucoup plus basses et les P.C.8 atteignent leur pic de croissance dès le 3ème jour d'incubation.

Pour que les conditions de viabilité soient maximales lors d'essais à long terme, il est donc préférable de ne pas utiliser de cellules qui ont été trypsinées un trop grand nombre de fois.

#### *1-1-9 Protocole final*

Le protocole de la méthode colorimétrique se décompose ainsi (figure 9) :

- préparer une solution de MTT à 6 mg par ml dans du P.B.S.,

- répartir 20  $\mu$ l de cette solution dans les puits d'une plaque de 96 puits, contenant un tapis cellulaire de P.C. et 100  $\mu$ l de milieu de culture ; laisser incuber à l'étuve pendant 3 heures à l'abri de la lumière,

- aspirer la totalité du surnageant, en prenant garde de ne pas décoller les cellules, et le remplacer par 100  $\mu$ l de Triton X-100 à 10 % (v/v) dans de l'isopropanol acidifié (0,4 % d'HCl concentré),

200 µl d'une suspension de cellules de P.C. par puits	100 µl d'une suspension de cellules de P.C. par puits
⇓	⇓
Addition de 20 µl d'une solution de MTT à 7,5 mg/ml dans du P.B.S.	Addition de 20 µl d'une solution de MTT à 6 mg/ml dans du P.B.S.
Incubation 2 heures à 37°C	Incubation 3 heures à 37°C
⇓	⇓
Aspiration de 150 µl de surnageant	Aspiration de la totalité du surnageant
⇓	⇓
Addition de 100 µl du mélange isopropanol acidifié / Triton X-100	
⇓	⇓
Agitation mécanique de la plaque pendant 10 minutes	Agitation mécanique de la plaque pendant 20 minutes
⇓	⇓
Mesure des D.O. (540-690 nm)	
<b>Protocole original de Pauwels et Coll. (36)</b>	<b>Protocole final</b>

**Figure 9 :** Protocole original de Pauwels et Coll. (36) et final de l'essai colorimétrique au MTT

- agiter mécaniquement la plaque pendant 20 minutes sur un agitateur de plaques (Fressinet, Cournon d'Auvergne, France) et à l'abri de la lumière ; s'assurer au besoin de la complète dissolution des cristaux de formazan par une observation microscopique,

- lire rapidement les D.O. sur un lecteur ELISA (EL 311, Biotek Instruments OSI, Paris, France) avec :

. comme longueur d'onde test 540 nm

. comme longueur d'onde de référence 690 nm et contre un blanc constitué de 100 µl de solvant d'extraction du formazan.

La D.O. lue à 690 nm est ensuite déduite de celle obtenue à 540 nm.

### **1-2 Application de la méthode au MTT au système cellules/virus**

Nous avons appliqué la méthode de coloration au MTT à l'évaluation de la viabilité des cellules de P.C. infectées par le virus Visna, avec pour dessein l'étude de l'effet de molécules antivirales. Pour développer un tel système colorimétrique, la différence entre les valeurs de D.O. des cellules non infectées et des cellules infectées, correspondant à la différence de production de formazan, doit être suffisamment importante. Il faut au minimum une

diminution des D.O. de 50 % pour pouvoir apprécier l'effet d'un agent antiviral.

Les manipulations sont répétées en moyenne trois fois. Le 100 % de D.O. est défini par l'essai au MTT réalisé sur les cellules non infectées.

#### *1-2-1 Premiers essais : premiers problèmes*

Pour nos premiers essais avec des cellules infectées, nous nous sommes basés sur les conditions expérimentales des méthodes utilisées par Larrouturou (26) pour l'évaluation de l'activité inhibitrice de molécules sur le virus Visna-Maedi (inhibition de l'effet cytopathique, réduction du pouvoir infectieux, dosage de l'activité transcriptase inverse). Les conditions sont les suivantes :

- une densité cellulaire de  $2.10^4$  cellules/puits,
- une multiplicité d'infection à 0,15 TCID 50 par cellule,
- une concentration en S.V.F. de 2 %,
- un temps d'incubation des cellules avec le virus de six jours à 37°C.

Au bout de ces six jours d'incubation, la méthode au MTT est réalisée et les D.O. sont mesurées au lecteur de plaque.

ESSAIS	$\frac{\text{D.O. cell. infectées} \times 100}{\text{D.O. cell. non infectées}}$
1	125
2	104
3	132
4	104
5	88
6	100

Tableau V :

Pourcentages de D.O. des cellules infectées par rapport au témoin cellules pour six manipulations différentes.

Aucune diminution des valeurs de D.O. n'est observée pour les cellules infectées comparativement aux cellules non infectées (ou témoin cellules) et ceci pour tous les essais (tableau V). Parallèlement, au microscope optique inversé, nous avons noté la présence de syncytia et une altération cellulaire.

Ces résultats contradictoires nous ont conduits à étudier point par point les divers paramètres intervenant dans la technique d'infection des cellules et susceptibles de modifier la mesure de la viabilité des cellules infectées. L'objectif est de déterminer les conditions opératoires pour un dosage d'activité antivirale par la méthode colorimétrique au MTT.

Les paramètres sont au nombre de quatre :

- la concentration cellulaire par puits,
- le virus : le nombre de TCID 50 par cellule et le temps de contact des cellules avec l'inoculum viral,
- le pourcentage de S.V.F.,
- le temps d'incubation du tapis cellulaire.

#### *1-2-2 Etude des différents paramètres*

Entre ces différents paramètres existe une relation étroite. Ainsi, la densité cellulaire influence le

taux de fusion des cellules infectées (14) : la quantité de virus est donc susceptible de varier suivant la concentration en cellules. Le S.V.F. est indispensable à la croissance des cellules, mais il inhibe le virus Visna (13, 26). Le temps est un inconvénient pour des cellules saines (figure 8), néanmoins il est un atout pour des cellules contaminées. En effet, il faut six à huit jours, suivant la quantité de virus, pour que le tapis cellulaire soit détruit (26).

En raison de cette interdépendance des paramètres, nous avons accompli un grand nombre de manipulations. Les diverses représentations graphiques qui en découlent permettent l'interprétation des résultats.

Cinq concentrations cellulaires initiales ont été testées :  $0,5 \cdot 10^4$ ,  $1 \cdot 10^4$ ,  $2 \cdot 10^4$ ,  $3 \cdot 10^4$  et  $4 \cdot 10^4$  cellules/puits. Simultanément, nous avons fait varier :

- la multiplicité d'infection de 0,1 à 9 TCID<sub>50</sub> par cellule,

- la quantité de S.V.F. de 2 à 5 %,

- le temps d'incubation de 3 à 10 jours.

Le jour 0 (J0) correspond au jour de l'infection, c'est-à-dire 24 heures après la mise en culture, temps nécessaire pour que les cellules adhèrent au fond des cupules des microplaques.

## 1-2-2-1 La concentration cellulaire initiale

Quels que soient les concentrations cellulaires et le temps d'incubation, nous n'obtenons pas de faibles valeurs de D.O. des cellules infectées par rapport aux témoins cellules (figure 10). Seuls sept jours d'incubation conduisent à diminuer les pourcentages de D.O. Nous constatons alors que plus il y a de cellules par cupule, plus les pourcentages sont bas. Avec  $0,5 \cdot 10^4$  cellules/puits, les pourcentages sont exactement identiques en passant de J5 à J7. Cette concentration est insuffisante pour que l'effet lytique du virus se manifeste.

Nous poursuivons notre étude uniquement autour de trois concentrations cellulaires initiales :  $1 \cdot 10^4$ ,  $2 \cdot 10^4$  et  $3 \cdot 10^4$  cellules/puits.

## 1-2-2-2 Le virus

## a) Influence de la quantité de virus

D'après la figures 11, il n'y a pas de relation entre la quantité de virus infectant et la baisse des pourcentages de D.O. Cette observation est valable pour tous les temps d'incubation inférieurs ou égaux à six jours et pour les trois concentrations cellulaires.

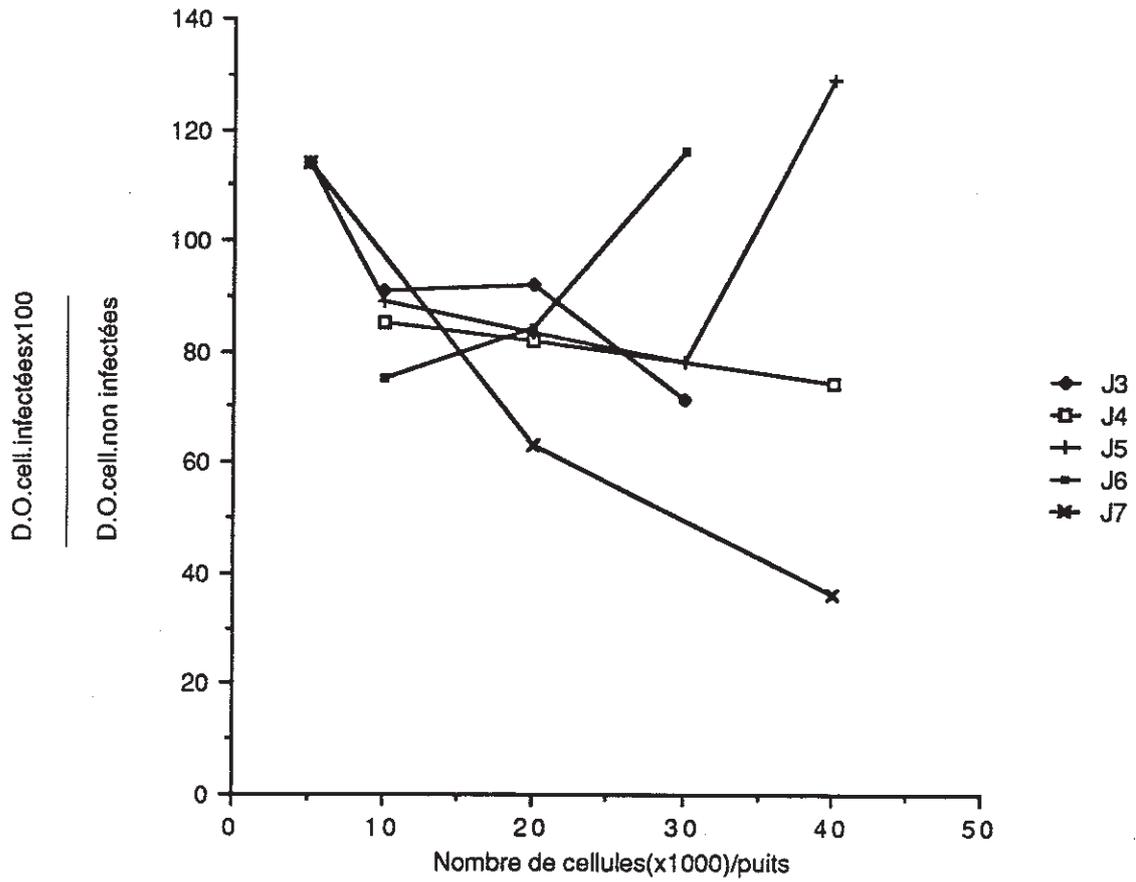


Figure 10 :

Relation entre la concentration cellulaire initiale et les pourcentages de D.O. cellules infectées sur cellules non infectées, à divers temps d'incubation.

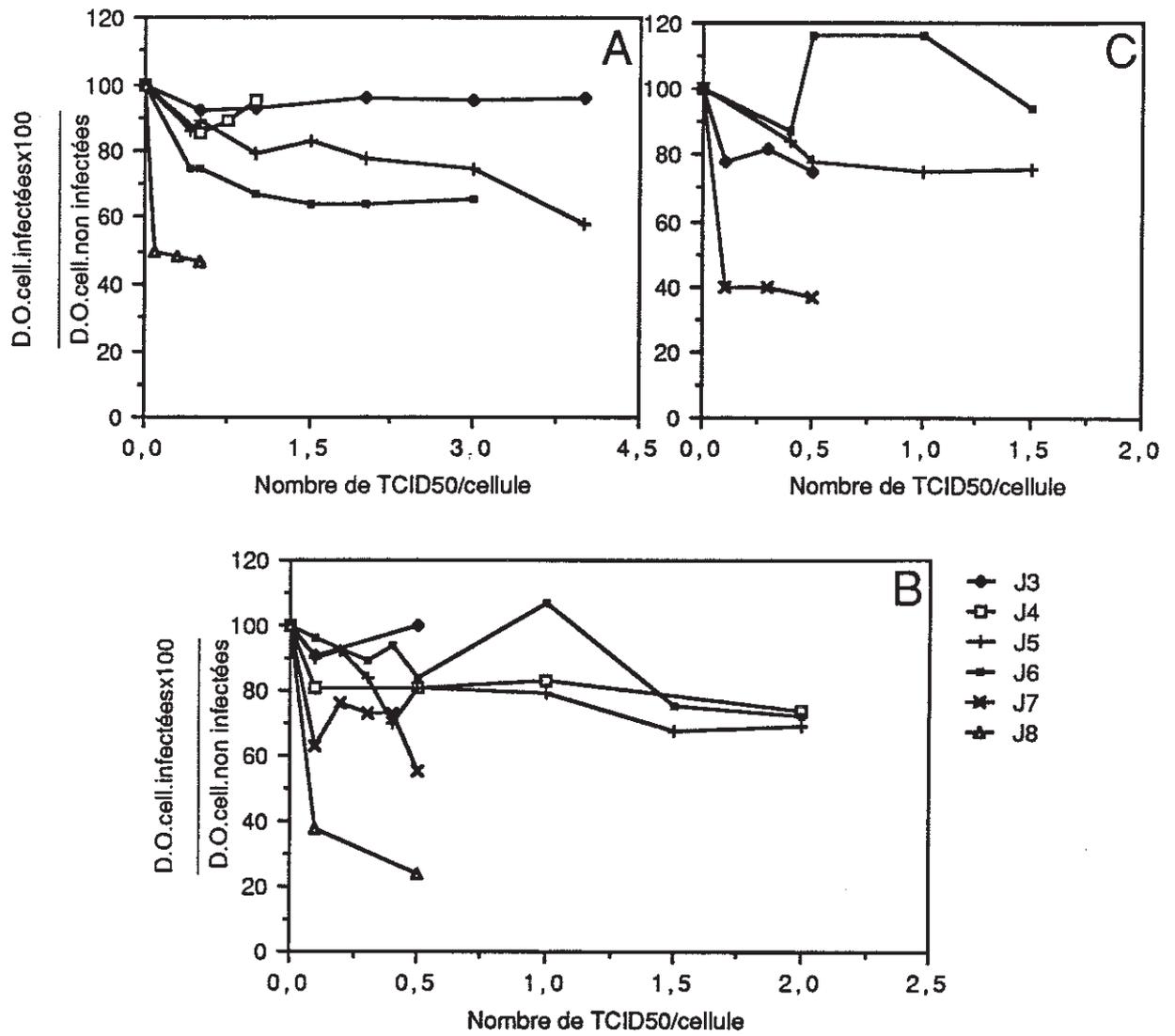


Figure 11 :

Effet de la quantité croissante de virus sur des tapis de  $1.10^4$  (A),  $2.10^4$  (B) et  $3.10^4$  (C) cellules par puits, à divers temps d'incubation.

Au bout de 7 (figure 11 : C) à 8 jours (figure 11 : A et B) d'incubation, il y a une nette diminution des D.O. par rapport aux témoins cellules et ceci pour de faibles quantités virales.

Pour les concentrations cellulaires de  $1.10^4$  et  $2.10^4$  cellules/cupule ont été essayés respectivement jusqu'à 9 et 4,5 TCID 50 par cellule ; des temps courts d'incubation ont été choisis.

Les résultats (tableaux VI et VII) montrent que même de fortes multiplicités d'infection n'augmentent pas l'écart de D.O. entre les cellules infectées et les cellules non infectées.

Par conséquent, quelle que soit la densité cellulaire considérée, il n'est pas utile de dépasser une multiplicité d'infection de 0,5 TCID 50 par cellule.

b) Effet du temps de contact de l'inoculum  
viral avec le tapis cellulaire

Nous avons cherché à déterminer si une modification du temps de contact entre la suspension virale et les cellules permettrait d'avoir une baisse plus élevée et plus rapide des pourcentages de D.O.

Nombres de TCID 50 par cellule	$\frac{\text{D.O. cell. infectées} \times 100}{\text{D.O. cell. non infectées}}$	
	Trois jours d'incubation	Cinq jours d'incubation
4	96 ± 5	58 ± 4
5	101 ± 10	58 ± 4
6	93 ± 8	60 ± 3
7	98 ± 10	58 ± 7
8	94 ± 20	58 ± 4
9	100 ± 11	72 ± 8

Tableau VI :

Influence de fortes multiplicités d'infection sur un tapis de  $1.10^4$  cellules/puits. L'expérience a été réalisée parallèlement avec deux temps d'incubation (3 et 5 jours). Les valeurs représentent les moyennes de deux essais.

Nombres de TCID 50 par cellule	$\frac{\text{D.O. cell. infectées} \times 100}{\text{D.O. cell. non infectées}}$
2	74 ± 14
3	72 ± 9
3,7	73 ± 6
4,5	72 ± 11

Tableau VII :

Influence de fortes multiplicités d'infection sur un tapis cellulaire de  $2 \cdot 10^4$  cellules/puits, ayant incubé quatre jours avec le virus. Les valeurs représentent les moyennes de trois essais.

Temps de contact virus/cellule	$\frac{\text{D.O. cell. infectées} \times 100}{\text{D.O. cell. non infectées}}$
30 min	64 ± 14
45 min	64 ± 17
60 min	66 ± 13
2 h	61 ± 4
4 h	63 ± 11

Tableau VIII :

Influence du temps de contact de l'inoculum viral avec un tapis constitué de  $2 \cdot 10^4$  cellules/puits et ayant incubé six jours. Les valeurs représentent les moyennes de trois essais.

Sur un tapis de  $2.10^4$  cellules par cupule, cinq temps ont été testés : 30 minutes, 60 minutes, 2 heures et 4 heures. Nous avons sélectionné six jours comme temps d'incubation du tapis cellulaire infecté, de façon à apprécier plus distinctement l'éventuelle chute de viabilité.

Les moyennes des pourcentages de D.O. sont à peu près toutes identiques (tableau VIII). L'allongement du temps de contact entre l'inoculum viral et les cellules n'entraîne pas de lyse plus rapide du tapis cellulaire.

Nous continuons donc les expériences avec un temps de contact entre le virus et les cellules de 45 minutes.

#### 1-2-2-3 Le pourcentage de sérum de veau foetal

Le S.V.F. ralentit l'effet lytique du virus Visna, c'est pourquoi Larrouturou (26) en utilise seulement 2 %. Cependant, cette quantité est un minimum pour maintenir les cellules de P.C. en vie. L'objet de ce paragraphe est de trouver la concentration maximale en S.V.F. qui n'inhibe pas le développement du virus, tout en assurant de bonnes conditions de survie pour les cellules. Nous avons dans cette optique essayé quatre pourcentages en S.V.F. : 2 %, 3 %, 4 % et 5 % (figure 12).

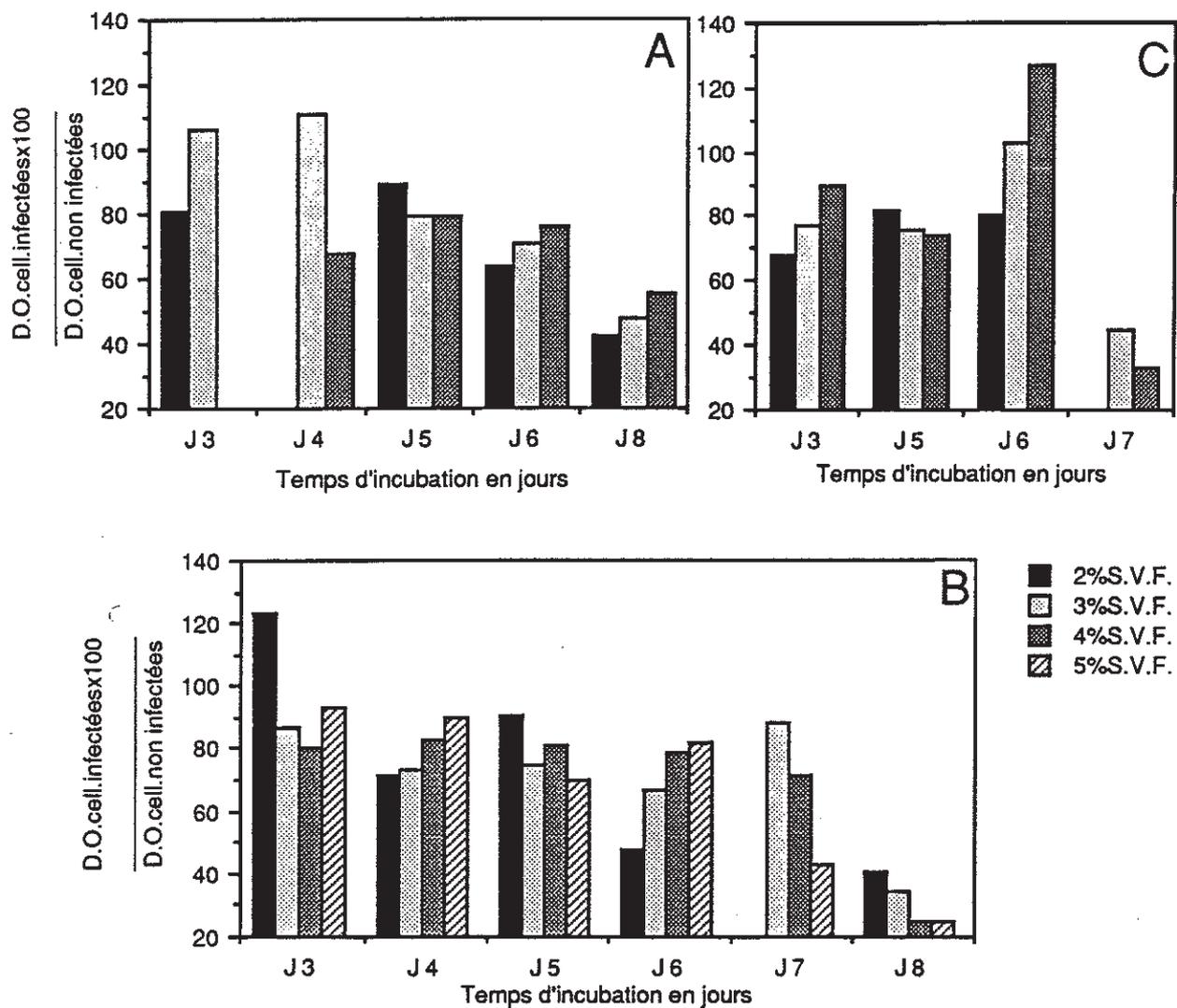


Figure 12 :

Variation des pourcentages de D.O. cellules infectées sur cellules non infectées en fonction de la quantité de S.V.F., à divers temps d'incubation et avec trois concentrations cellulaires initiales :  $1.10^4$  cellules/puits (A),  $2.10^4$  cellules/puits (B) et  $3.10^4$  cellules/puits (C).

Au cours du temps d'incubation des trois tapis cellulaires, les pourcentages de D.O. fluctuent autour d'une même valeur, sans liaison avec la quantité de S.V.F. Les seuls résultats intéressants apparaissent à J7 pour  $3.10^4$  cellules/puits et J8 pour  $1.10^4$  et  $2.10^4$  cellules/puits, temps pour lesquels on a un rapport de D.O. correct.

En conséquence, aux différents taux utilisés, le S.V.F. ne manifeste pas d'effet inhibiteur sur le développement du virus. 5 % est la concentration maximale en S.V.F. pour le système cellules/virus.

#### 1-2-2-4 Le temps d'incubation du tapis cellulaire

De l'interprétation des diverses figures ressort que le facteur essentiel, pour avoir une différence de D.O. importante entre les cellules non infectées et les cellules infectées, est le temps d'incubation. Il doit être au minimum de sept jours.

En effet, nous notons pour  $3.10^4$  cellules/puits un pic des pourcentages de D.O. à six jours d'incubation (figure 12:C). La valeur maximale atteinte est de 148 %. Cette observation nous ramène à nos premiers problèmes. Nous avons alors songé à une responsabilité des syncytia. L'observation au microscope optique inversé des microplaques révèle la

présence effective de syncytia, mais ne permet pas de les dénombrer. Nous avons donc entrepris une coloration au bleu Trypan. Les syncytia ne prennent pas la coloration, indiquant l'existence d'une viabilité.

Nous sommes montés jusqu'à neuf et dix jours d'incubation. La chute des pourcentages de D.O. se ralentit, du fait de la baisse simultanée et plus importante des D.O. des témoins cellules. Huit jours est donc un seuil à ne pas dépasser.

La figure 13 compare l'évolution des tapis cellulaires, infectés ou non, en fonction de la concentration cellulaire initiale et par rapport à la moyenne des D.O. obtenues à J0.

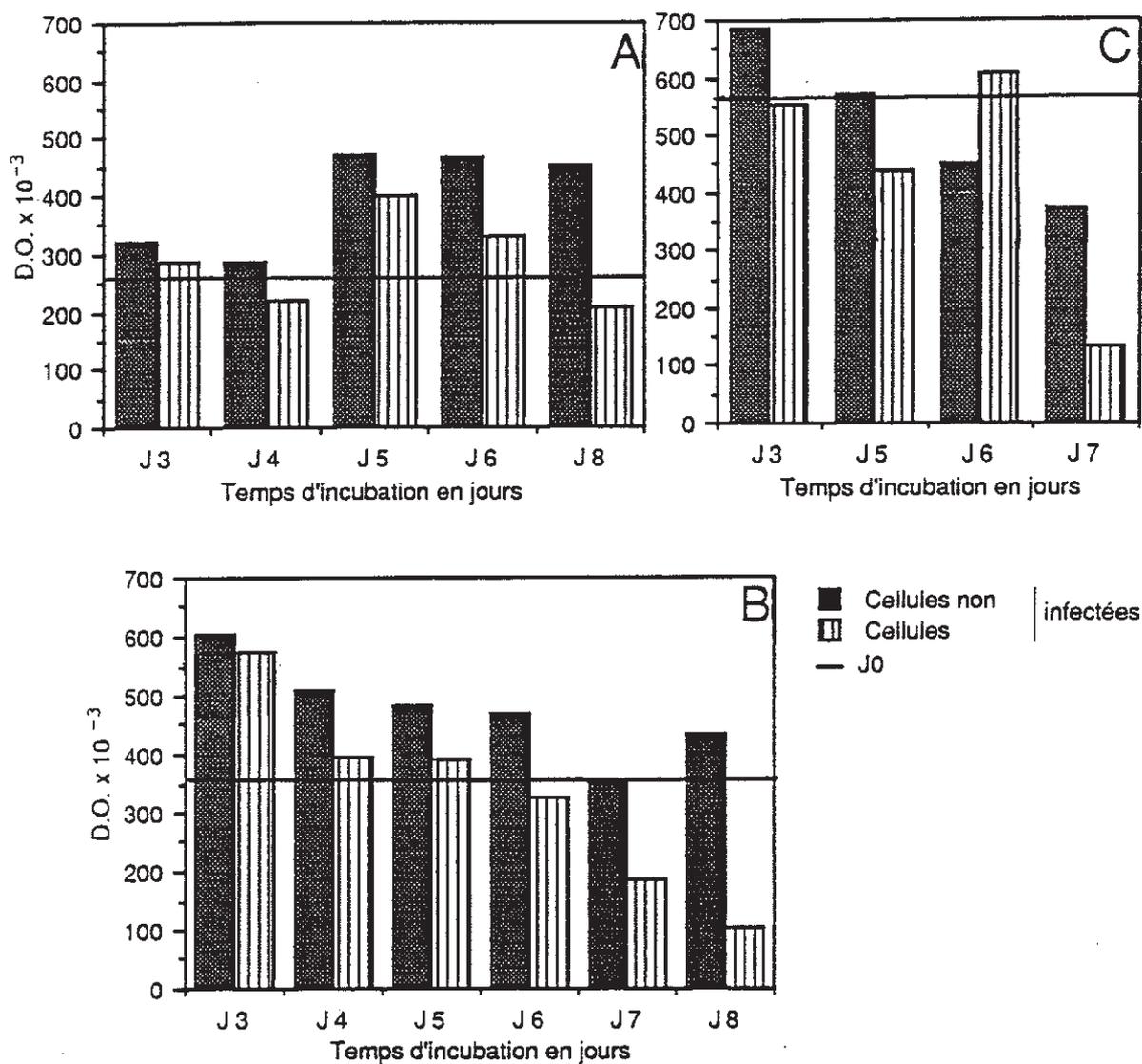


Figure 13 :

Réduction du MTT par les cellules de P.C., infectées ou non, à divers temps d'incubation et avec trois concentrations cellulaires initiales :

1.10<sup>4</sup> cellules/puits (A), 2.10<sup>4</sup> cellules/puits (B) et 3.10<sup>4</sup> cellules/puits (C). Comparaison avec les valeurs des D.O. moyennes obtenues à J0.

Aux différents temps d'incubation considérés, les D.O. des témoins cellules sont au-dessus de leurs valeurs initiales pour  $1.10^4$  et  $2.10^4$  cellules/cupule. En revanche, elles passent au-dessous de la barre J0 dès le sixième jour d'incubation pour  $3.10^4$  cellules/puits. Nous avons donc à cette densité cellulaire une perte non négligeable de cellules par rapport à J0.

La concentration cellulaire de  $3.10^4$  cellules/puits n'offre aucun intérêt pour de longues périodes d'incubation.

## **2 - UTILISATION DU DIMETHYL SULFOXYDE COMME SOLVANT D'EXTRACTION DU FORMAZAN**

### **2-1 Essai de différents solvants**

Comme le révèle la figure 13, le solvant isopropanol/HCl/Triton X-100 ne permet pas d'avoir un écart suffisant de D.O. entre les cellules infectées et non infectées, même avec des temps longs d'incubation, pour pouvoir faire des recherches antivirales. Aussi avons-nous décidé d'étudier la capacité de solvants et mélanges de solvants à solubiliser les cristaux de formazan générés par des cellules de P.C. non infectées.

Les conditions expérimentales de la technique de coloration au MTT sont celles utilisées dans les

paragraphes précédents et décrites dans la section 1-1-9 de la deuxième partie.

#### *2-1-1 Comparaison de six solvants d'extraction*

Sur des tapis de cinq jours à  $1.10^4$  et  $3.10^4$  cellules/puits, nous avons testé :

- le diméthyl sulfoxyde (DMSO),
- l'isopropanol (52),
- le Triton X-100 à 10 % dans de l'isopropanol,
- le Triton X-100 à 10 % dans de l'isopropanol acidifié avec 0,4 % d'HCl concentré,
- l'éthanol (19),
- le laurylsulfate de sodium (SDS) en milieu acide (0,4 ml d'HCl concentré pour 100 ml de solvant).

Les D.O. les plus élevées sont obtenues avec le DMSO (figure 14). Les solvants isopropanol, isopropanol / Triton X-100 et éthanol donnent des niveaux de D.O. similaires. L'isopropanol acidifié / Triton X-100 conduit aux plus faibles D.O. Enfin, des valeurs nulles de D.O. sont lues avec le SDS acidifié, avec lequel les cupules ne développent aucune couleur.

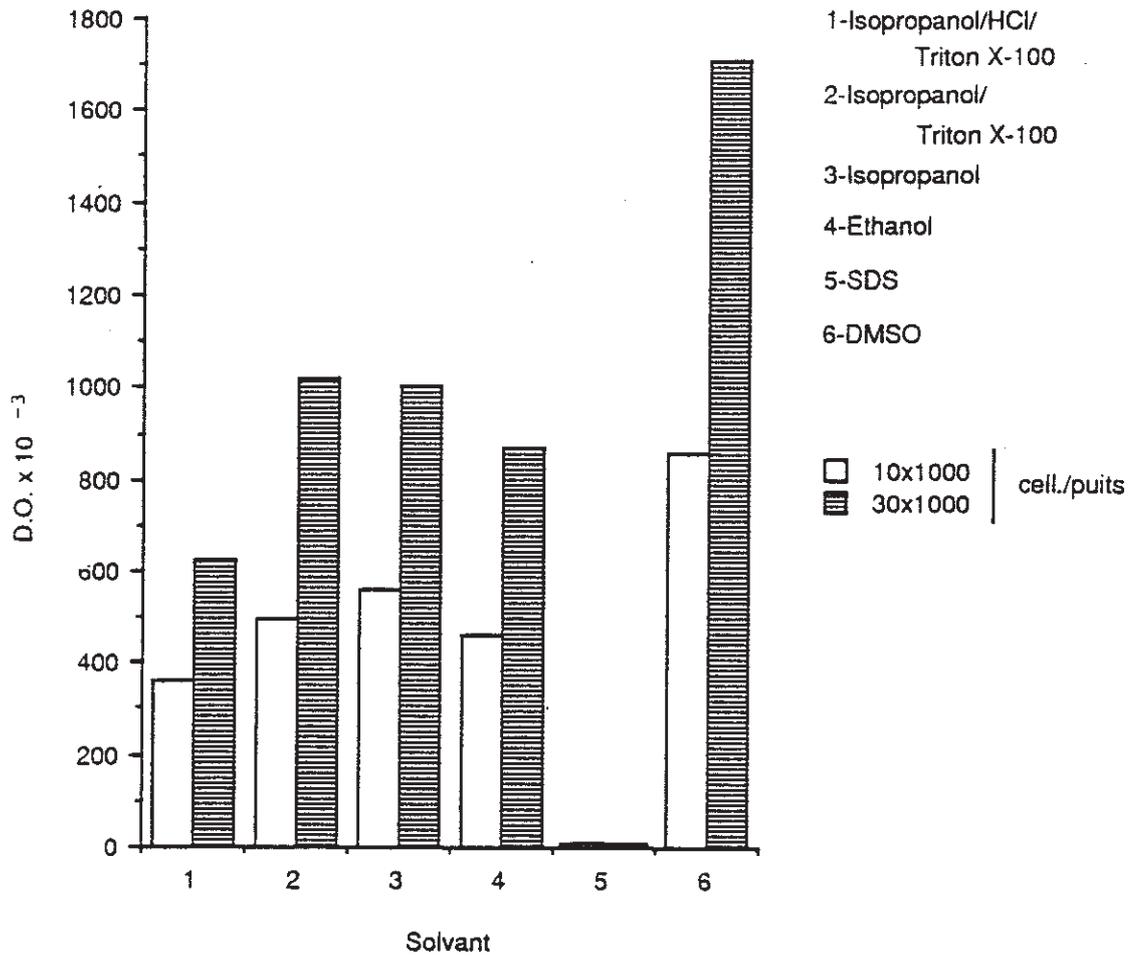


Figure 14 :

Capacité de différents solvants à extraire le formazan de cellules de P.C. non infectées, pour deux concentrations cellulaires initiales. Pour chaque essai, un blanc correspondant à la composition du solvant d'extraction est préparé. Les écarts-types des D.O. sont inférieurs ou égaux à 10 %.

### 2-1-2 Influence du pH

Pour évaluer l'influence du pH, nous avons repris cette expérience avec un tapis de 24 heures comportant  $1.10^4$  cellules/cupule. Le SDS en milieu acide ne donnant aucune valeur d'absorbance, nous avons alcalinisé le mélange par addition de NaOH 0,2 N. Pour chaque solvant, nous avons déterminé la valeur du pH (Check-mate 90, Corning, New-York, U.S.A.). Les résultats figurent dans le tableau I.

En passant d'un milieu acide à un milieu alcalin, les D.O. augmentent pour tous les solvants. Parallèlement, nous avons noté que les valeurs d'absorbance lues à 405 nm diminuent.

Le DMSO avec un pH de 9 produit une D.O. de 0,66. Le SDS en milieu alcalin avec un pH de 11,1 ne permet d'atteindre que 0,22 de D.O. Si un pH supérieur à 7 améliore les résultats, la nature du solvant intervient aussi d'une manière importante dans la solubilisation du formazan.

Après agitation et lecture, nous avons observé la microplaque en contraste de phase. Le DMSO dissout totalement les cristaux de formazan. Au niveau des puits contenant du SDS en milieu acide, il reste des petits grains de formazan.

Solvants d'extraction (100 µl/puits)	pH	D.O.
Isopropanol acidifié/ Triton X-100	1	0,24 ± 0,02
Isopropanol / Triton X-100	9,7	0,4 ± 0,01
Isopropanol	4,9	0,4 ± 0,01
Ethanol	4,7	0,3 ± 0,03
SDS en milieu acide	2,6	0
SDS en milieu alcalin	11,1	0,22 ± 0,02
DMSO	9	0,66 ± 0,07

Tableau IX :

Influence du pH des solvants sur la solubilisation du formazan produit par un tapis de cellules de P.C. non infectées.

Des cristaux de formazan en forme d'aiguilles sont présents dans les puits contenant le SDS alcalinisé et sont même visibles à l'oeil nu. Dans les cupules ayant reçu les différents solvants de type alcoolique, nous observons des agrégats de couleur jaune, en quantités plus importantes avec l'isopropanol seul.

### *2-1-3 Choix d'un solvant*

Le DMSO se distingue nettement des autres solvants. Il augmente les D.O. d'environ 150 % par rapport aux valeurs obtenues avec notre premier solvant d'extraction, l'isopropanol acidifié / Triton X-100. Nous avons donc choisi d'employer le DMSO pour solubiliser les cristaux de formazan produits par les cellules de P.C.

### **2-2 Vérification de certains paramètres de l'essai au MTT**

Changeant de solvant d'extraction, il nous a semblé nécessaire de vérifier le protocole que nous avons établi pour la coloration au MTT, en n'analysant que les points dépendant de la nature du solvant, à savoir :

- le spectre d'absorption du formazan,
- la concentration optimale en MTT,
- le volume du solvant d'extraction,

- le temps d'agitation du solvant,
- la stabilité de la coloration du formazan,
- la relation de proportionnalité entre la quantité de MTT réduite et le nombre de cellules viables.

Les expériences ont été réalisées avec des cellules de P.C. non infectées.

*2-2-1 Spectre d'absorption du formazan dans le  
DMSO*

Le formazan qui a servi à établir le spectre d'absorption a été produit par un tapis de  $2.10^4$  cellules/puits et ayant incubé sept jours. Le formazan a été extrait avec un volume de DMSO de 100  $\mu$ l/puits. Le surnageant a alors été récolté et centrifugé. Les D.O. ont été lues sur un spectrophotomètre (Perkin-Elmer Lamda 5UV/VIS) contre un blanc de DMSO.

La figure 15 superpose les spectres du formazan dans le DMSO et du MTT. Ce dernier a été obtenu à partir d'une solution non filtrée de MTT à 6 mg/ml dans du P.B.S., contre un blanc de P.B.S.

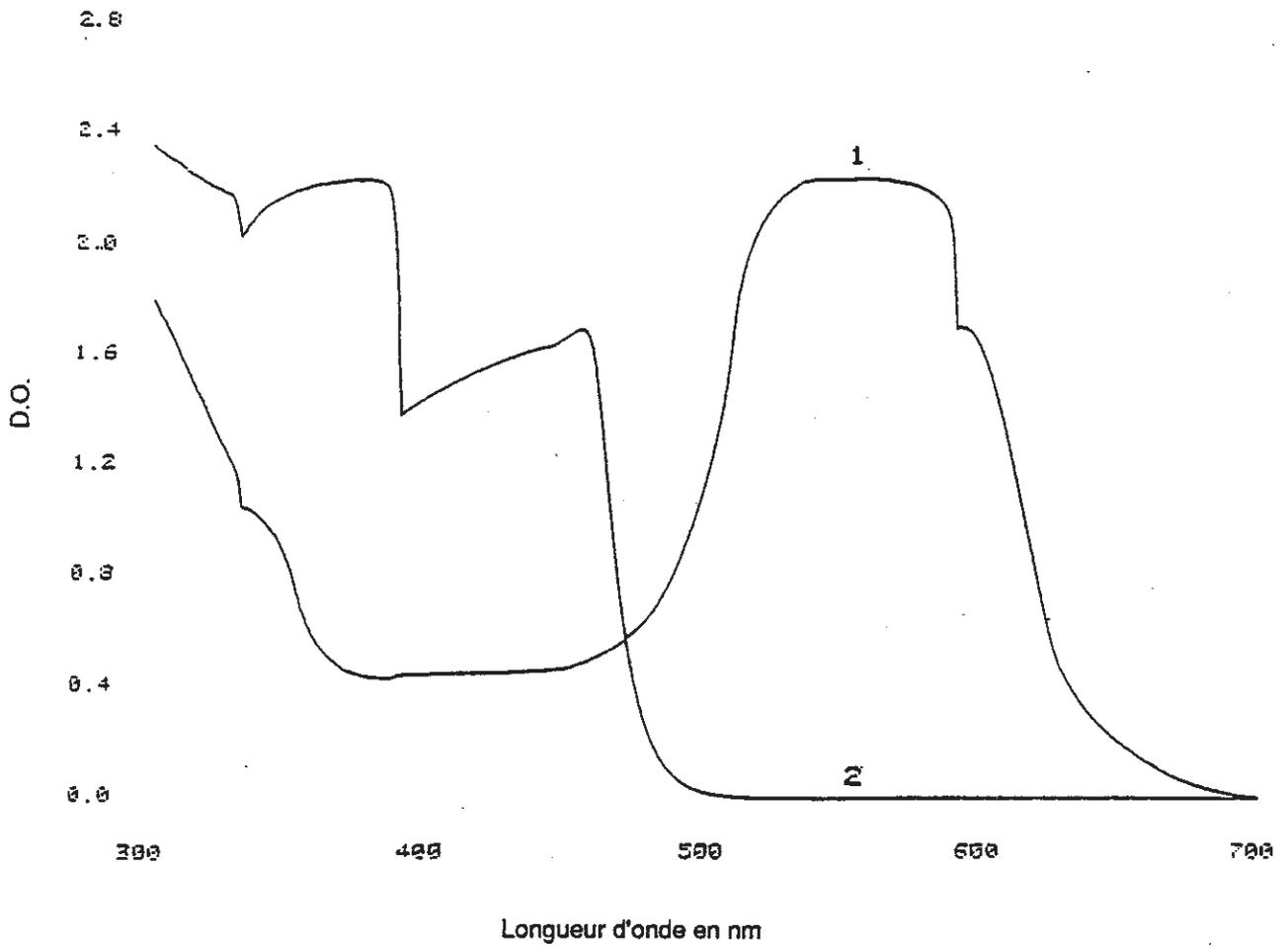


Figure 15 :

Spectre d'absorption du formazan dans le DMSO (1) et du MTT dans le P.B.S. (2)

Dans le DMSO, le formazan a un maximum d'absorption autour de 550 nm. A cette longueur d'onde, le MTT n'interfère pas dans la mesure des D.O. A 690 nm, l'absorption du formazan est négligeable, de même que celle du MTT.

Nous continuons donc nos expériences en effectuant les mesures à 540 nm et 690 nm ; les D.O. retenues résultent de la différence : D.O. à 540 nm - D.O. à 690 nm.

#### *2-2-2 Concentration en MTT*

Nous avons fait varier parallèlement la densité cellulaire par puits et la concentration finale en MTT, afin de rechercher la concentration en MTT la mieux appropriée. Les résultats sont exprimés en pourcentages par rapport à la concentration finale en MTT de 1 mg/ml (figure 16).

La quantité de MTT qui donne les meilleurs pourcentages est différente suivant le nombre de cellules par puits. Elle correspond à : 0,8 mg/ml pour  $0,5 \cdot 10^4$  cellules/puits ; 1,4 mg/ml pour  $1 \cdot 10^4$  cellules/puits et 1,7 mg/ml pour  $3 \cdot 10^4$  cellules/puits.

Nous avons donc choisi de nous en tenir à la concentration en MTT de 1 mg/ml.

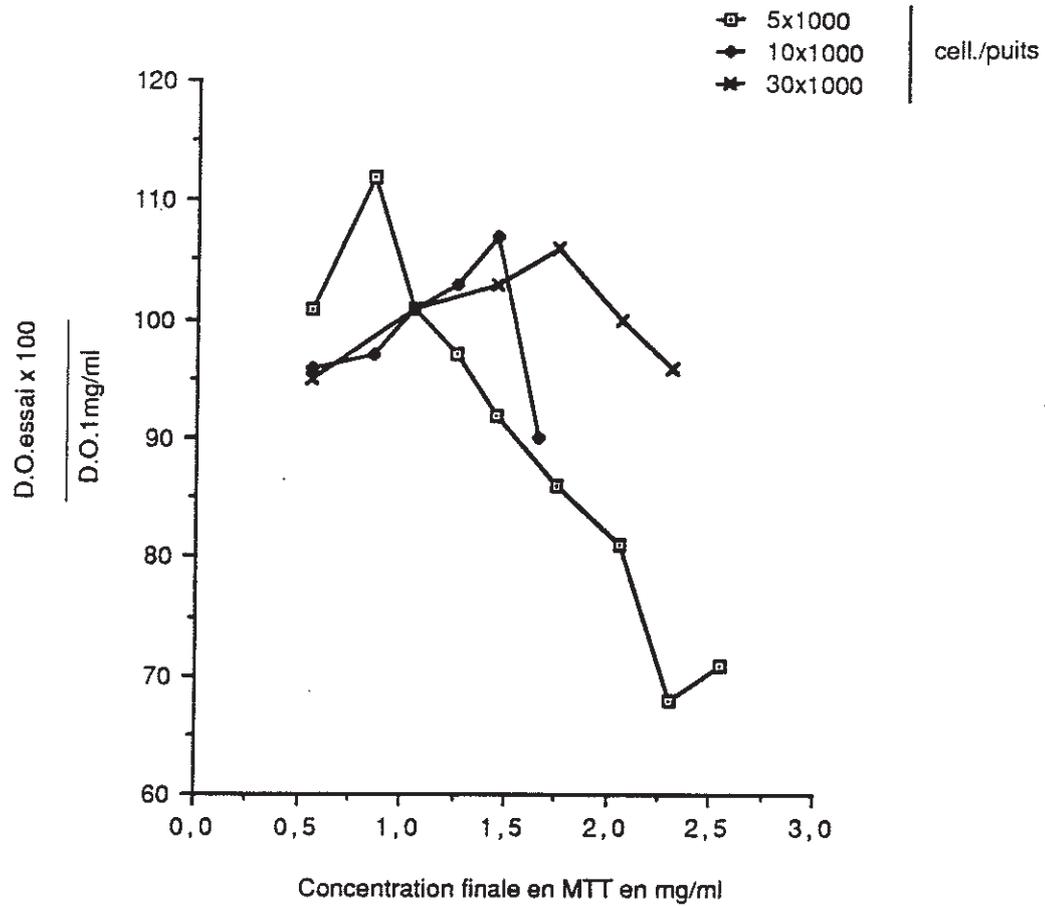


Figure 16 :

Réduction du MTT par un tapis cellulaire de 24 heures en fonction de la concentration finale en MTT dans le milieu et de la concentration cellulaire initiale.

### *2-2-3 Volume du solvant d'extraction*

Nous avons examiné l'intérêt de l'utilisation de volumes de DMSO supérieurs ou inférieurs à 100 µl/puits, volume initialement adopté. L'expérience s'est déroulée avec différentes concentrations en cellules. Les pourcentages figurant au tableau X sont calculés par rapport aux taux obtenus avec 100 µl de DMSO par puits.

Quelle que soit l'échelle de valeur des D.O., celles-ci subissent toutes la même évolution (faibles écarts-types). De 80 µl à 100 µl de DMSO par puits, la sensibilité de la méthode de coloration au MTT est accrue de 10 %. Pour gagner à nouveau 10 % de D.O., il faut au moins un volume de 170 µl/puits.

Considérant le coût du réactif et les valeurs d'absorbance obtenues, nous gardons le volume de 100 µl/puits.

### *2-2-4 Agitation du solvant d'extraction*

A partir d'un tapis de cinq jours comptant  $1.10^4$  cellules/puits, nous avons évalué l'influence de la durée d'une agitation mécanique sur les valeurs de D.O. (tableau XI).

Volumés du DMSO ( $\mu$ l/puits)	$\frac{\text{D.O. essai} \times 100}{\text{D.O. } 100 \mu\text{l}}$
80	90 $\pm$ 4
90	97 $\pm$ 1
100	100
110	101 $\pm$ 1
120	103 $\pm$ 2
130	104 $\pm$ 2
140	106 $\pm$ 2
150	108 $\pm$ 2
170	110 $\pm$ 2
190	111 $\pm$ 2
200	111 $\pm$ 3

Tableau X :

Influence du volume du DMSO sur les valeurs des D.O. .  
Les données sont les moyennes des résultats de huit essais.

Les meilleurs résultats sont obtenus au bout de 10 minutes d'agitation et restent stables pour 15 et 20 minutes d'agitation. Ensuite, l'allongement du temps d'agitation s'accompagne d'une diminution proportionnelle des D.O. Après environ 1 heure, on atteint un seuil.

Dans le tableau XII sont regroupées les D.O. réalisées avec trois techniques d'agitation :

- l'agitation mécanique : avec un agitateur de plaques,
- l'agitation manuelle : par pipetage répété (3 à 5 fois) du DMSO à l'aide d'une pipette multicanaux,
- la technique de la trypsination : le tapis cellulaire est lavé avec du P.B.S. puis trypsiné pendant 5 minutes à température ambiante avec 20  $\mu$ l de trypsine/EDTA ; le DMSO est ajouté et une agitation manuelle est pratiquée.

Avec les deux premiers procédés, les absorbances sont proches. En revanche, après le traitement par la trypsine, on perd environ 40 % de D.O. par rapport aux deux autres méthodes. Deux tentatives subséquentes ont donné le même résultat.

Nous avons donc décidé d'agiter mécaniquement les microplaques pendant 15 minutes, l'agitation manuelle étant trop contraignante pour des manipulations à grande échelle.

Temps d'agitation en minutes	D.O.
0	0,6 ± 0,07
10	0,9 ± 0,03
15	0,88 ± 0,04
20	0,86 ± 0,04
30	0,78 ± 0,03
40	0,73 ± 0,02
50	0,7 ± 0,03
70	0,69 ± 0,02

Tableau XI :

Variation des valeurs des D.O. en fonction du temps d'agitation de la plaque sur un agitateur mécanique de plaques.

Techniques d'agitation	D.O.
Agitation mécanique pendant 15 min.	0,67 ± 0,08
Pipetage répété	0,71 ± 0,04
Trypsination + pipetage répété	0,42 ± 0,01

Tableau XII :

Comparaison de différentes techniques d'agitation pour solubiliser les cristaux de formazan.

*2-2-5 Stabilité de la coloration du formazan  
dans le DMSO*

Nous avons recherché si le DMSO allongait la phase de stabilité de la coloration du formazan. Des lectures ont été faites au cours du temps, les plaques étant laissées à la température de la pièce. Le temps 0 min. coïncide avec la première lecture effectuée après les 15 minutes d'agitation des plaques. Les résultats sont exprimés en pourcentages par rapport aux valeurs de D.O. lues au temps 0 min. (tableau XIII).

Nous observons des résultats identiques à ceux réalisés avec l'isopropanol acidifié / Triton X-100, à savoir des valeurs optimales obtenues dans l'heure qui suit l'agitation.

*2-2-6 Vérification de la relation de  
proportionnalité*

*2-2-6-1 Après 24 heures d'incubation*

Une suite de concentrations cellulaires variant de  $0,125 \cdot 10^4$  à  $5 \cdot 10^4$  cellules/puits a été sélectionnée. Après 24 heures d'incubation des tapis cellulaires, le test colorimétrique a été effectué en utilisant parallèlement le DMSO et l'isopropanol acidifié / Triton X-100.

Lectures faites après :	$\frac{\text{D.O. } t_x \times 100}{\text{D.O. } t_0}$
0 min	100
5 min	102 ± 2
10 min	101 ± 2
15 min	101 ± 3
20 min	100 ± 2
25 min	100 ± 1
30 min	99 ± 2
45 min	97 ± 1
60 min	95 ± 3
100 min	91 ± 3
24 h	49 ± 2

Tableau XIII :

Stabilité de la coloration du formazan dans le DMSO à la température ambiante, au cours du temps. Les données sont les moyennes des résultats d'un nombre élevé d'essais.

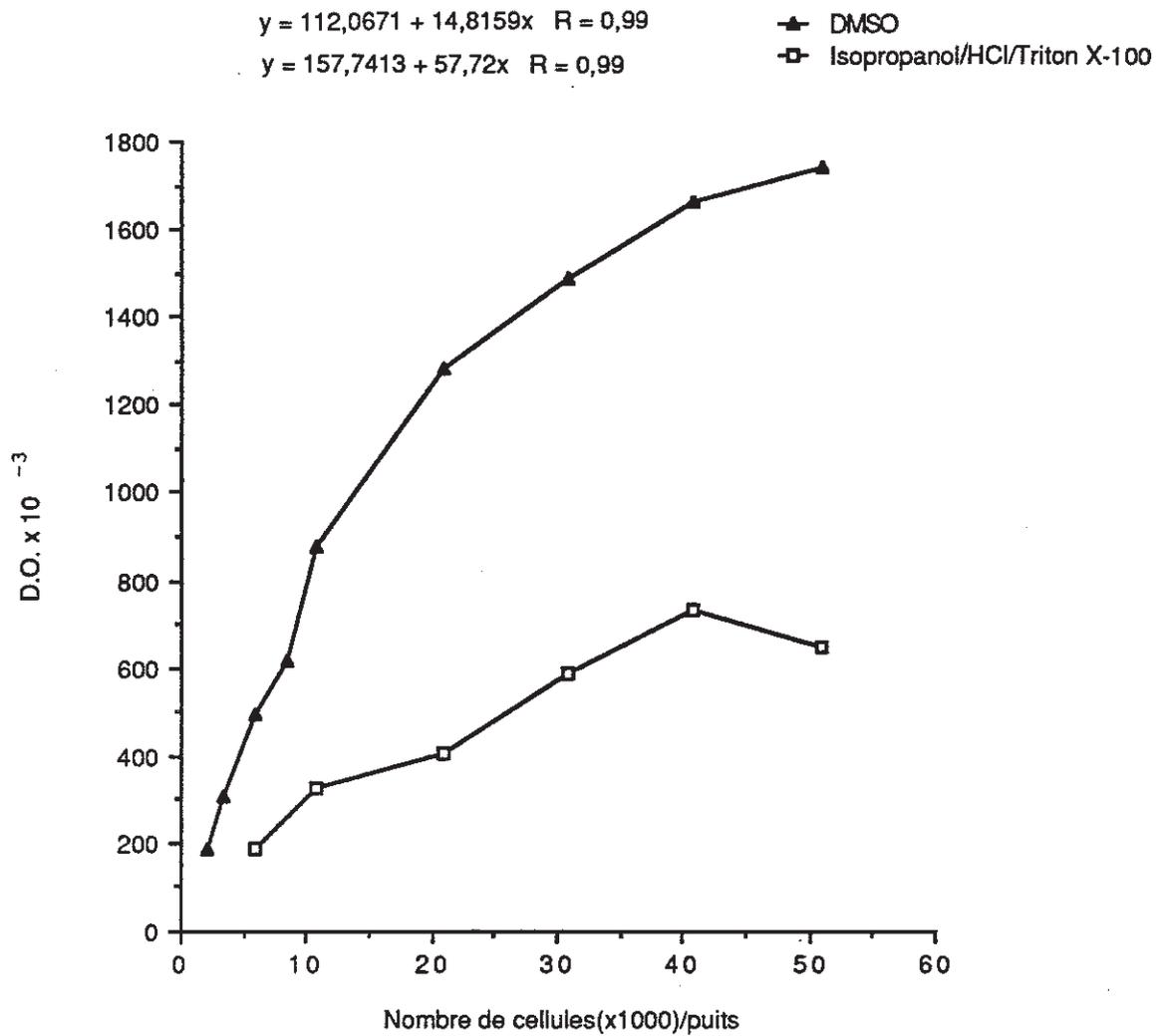


Figure 17 :

Relation entre le nombre de cellules par puits et la quantité de MTT réduite, en fonction du solvant d'extraction du formazan. Avec le DMSO, l'équation de la droite de régression linéaire est calculée pour les concentrations cellulaires inférieures à  $3 \cdot 10^4$  cellules/puits et avec le mélange isopropanol/ HCl / Triton X-100 pour celles inférieures à  $5 \cdot 10^4$  cellules/puits.

Avec le DMSO, il existe une relation linéaire entre les D.O. moyennes et le nombre de cellules par puits jusqu'à  $2 \cdot 10^4$  cellules/puits (coefficient de corrélation de 0,99) (figure 17). Avec le mélange alcoolique, les D.O. sont proportionnelles à la densité cellulaire par cupule jusqu'à  $4 \cdot 10^4$  cellules/puits (coefficient de corrélation de 0,99). Les pentes des deux courbes sont bien différentes.

#### 2-2-6-2 Au cours du temps

La figure 18 s'intéresse à la production de formazan au cours du temps d'incubation de cellules de P.C. en fonction de la concentration cellulaire initiale.

Les D.O. moyennes restent proportionnelles au nombre de cellules mises en culture au départ, pour un intervalle de concentrations allant de  $1 \cdot 10^4$  à  $3 \cdot 10^4$  cellules/puits.

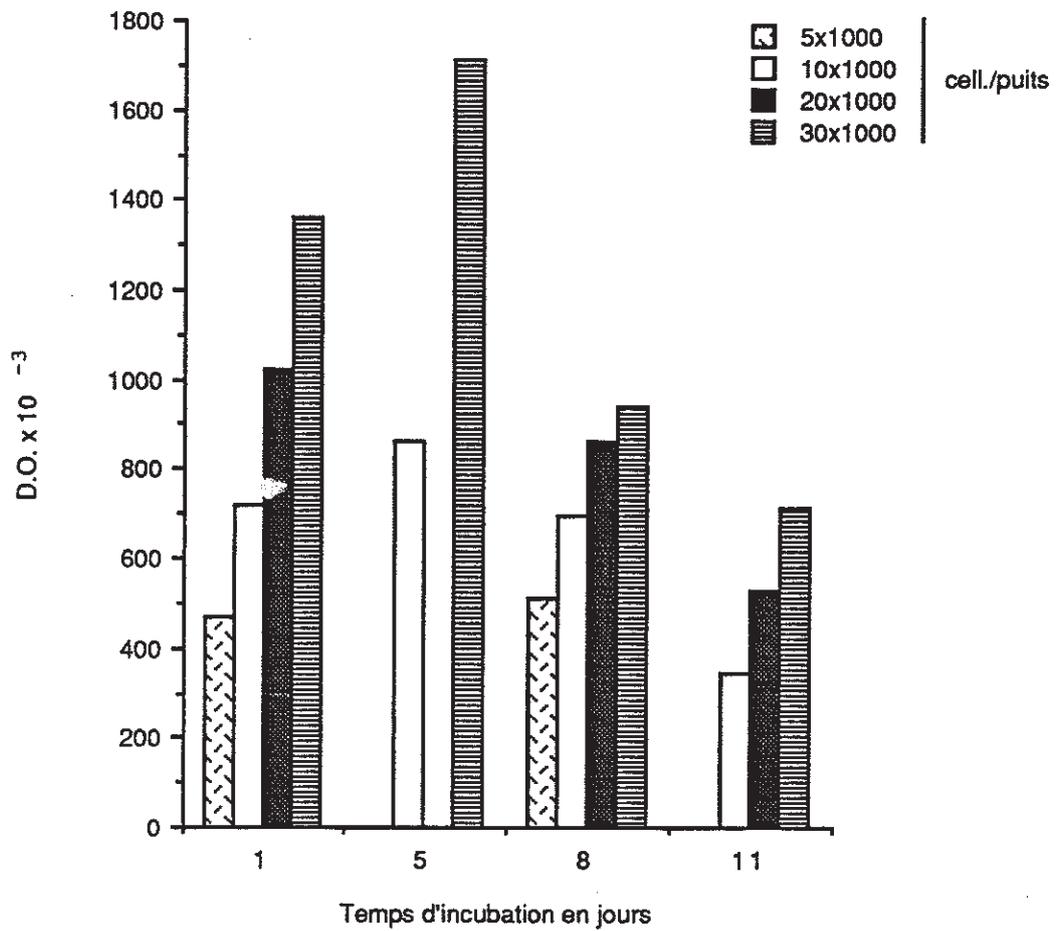


Figure 18 :

Réduction du MTT par les cellules de P.C. en fonction de la concentration cellulaire initiale par puits et après différents temps d'incubation des tapis cellulaires. Un jour d'incubation correspond à un tapis de 24 heures.

## 2-3 Application de la méthode au MTT au système cellules/virus

### 2-3-1 Effet du temps d'incubation du tapis cellulaire

Des cellules en quantités croissantes sont incubées avec le virus Visna à raison de 0,5 TCID 50 par cellule. Au bout de 6 à 7 jours d'incubation, le MTT est rajouté et la quantité de formazan produite déterminée par la lecture de l'absorbance.

La figure 19 montre pour  $2.10^4$  cellules/puits un saut important des pourcentages de D.O. en passant de 6 à 7 jours. Il faut donc privilégier des temps d'incubation supérieurs à 6 jours.

### 2-3-2 Effet de la concentration cellulaire

D'après la figure 19, avec 7 jours d'incubation plus la concentration cellulaire initiale est élevée, plus le taux de destruction des cellules infectées est grand (faibles pourcentages de D.O. entre les cellules infectées et les cellules non infectées). Cependant, la figure 18 indique que pour une densité de  $3.10^4$  cellules/puits, il y a une perte de 30 % de D.O. entre J0 et J7. Ce taux de mortalité est trop élevé.

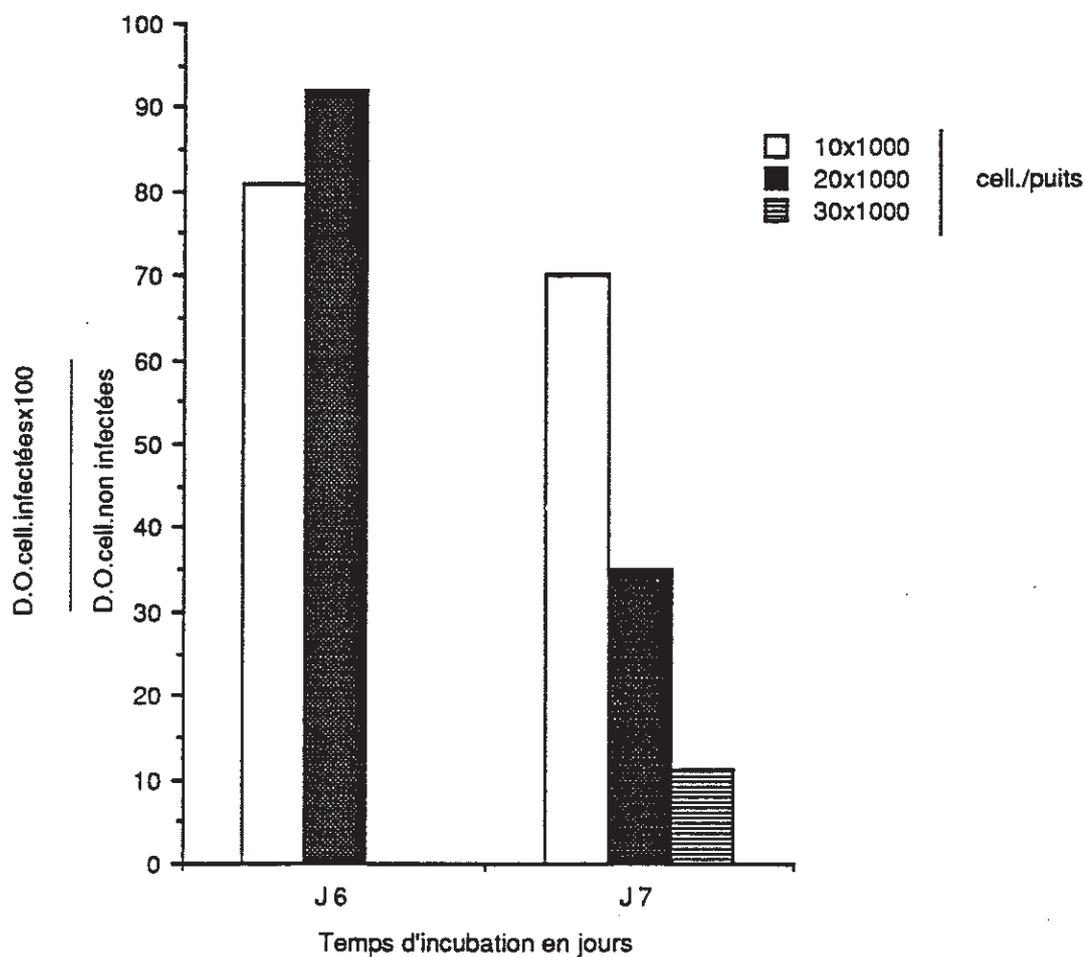


Figure 19 :

Relation entre la concentration cellulaire initiale et les pourcentages de D.O. cellules infectées sur cellules non infectées, après 6 et 7 jours d'incubation. Les valeurs sont les moyennes de deux essais.

Par conséquent, nous ne pouvons dépasser une concentration cellulaire de  $2.10^4$  cellules/puits pour des expériences de recherches antivirales.

#### *2-3-3 Effet de la quantité de virus*

Nous avons fait varier la multiplicité d'infection de 0,5 à 4 TCID 50 par cellule, pour un temps de contact virus/cellules de 45 minutes. L'expérience a été réalisée après 7 jours d'incubation et avec différentes concentrations cellulaires (figure 20).

Pour de faibles densités cellulaires, il est nécessaire d'augmenter la quantité de virus pour obtenir une baisse importante de la production de formazan. En revanche, pour de fortes concentrations cellulaires et pour 7 jours d'incubation, on a une diminution très élevée de la production du formazan dès une multiplicité d'infection de 0,5 TCID 50 par cellule.

Il n'est donc pas utile d'augmenter la quantité de virus au-delà de 0,5 TCID 50 par cellule.

#### *2-3-4 Effet du pourcentage de sérum de veau foetal*

Trois pourcentages en S.V.F. (3 %, 4 % et 5 %) ont été essayés pour un temps d'incubation de 7 jours.

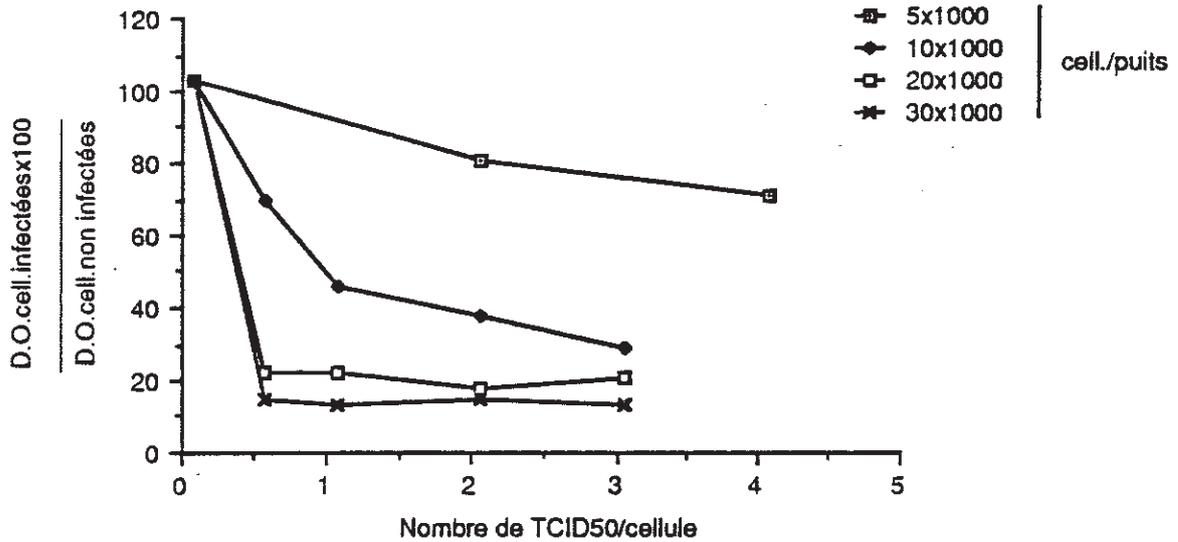


Figure 20 :

Effet de la quantité croissante de virus sur la viabilité de tapis constitués de différentes concentrations de cellules, après 7 jours d'incubation. Les valeurs sont les moyennes de trois essais.

Pourcentages de S.V.F.	D.O. cell. infectées x 100		
	D.O. cell. non infectées		
	1.10 <sup>4</sup> cellules/puits	2.10 <sup>4</sup> cellules/puits	3.10 <sup>4</sup> cellules/puits
3	70 ± 13	35 ± 1	11 ± 3
4	43 ± 2	11 ± 1	11 ± 1
5	51 ± 23	11 ± 1	11 ± 0

Tableau XIV :

Effet de la quantité de S.V.F. sur le développement du virus Visna, en fonction de la concentration cellulaire initiale et après 7 jours d'incubation. Les valeurs représentent les moyennes de deux essais.

Pour chacun, nous avons calculé des moyennes de pourcentages de D.O. entre les cellules infectées et les cellules non infectées en fonction de la concentration cellulaire initiale (tableau XIV).

C'est avec 4 et 5 % de S.V.F. que les D.O. pour les cellules non infectées sont les meilleures. Dans le même temps, on a une bonne baisse des D.O. des cellules infectées par rapport aux cellules non infectées. Des quantités de 4 et 5 % de S.V.F. n'altèrent pas l'infection virale.

#### *2-3-5 Conditions d'un dosage antiviral*

Ces différents résultats nous permettent de définir les conditions opératoires pour réaliser un dosage d'activité antivirale par la méthode au MTT :

- une concentration cellulaire de  $2.10^4$  cellules/puits,
- une multiplicité d'infection de 0,5 TCID<sub>50</sub> par cellule avec un temps de contact des cellules avec le virus Visna de 45 minutes,
- une quantité en S.V.F. de 5 %,
- un temps d'incubation du tapis cellulaire de 7 jours.

## 2-4 Application de la méthode au MTT à l'étude de deux molécules antivirales

Deux molécules ont été testées :

- l'AZT, dont l'activité sur le V.I.H est déjà connue et qui a déjà fait l'objet d'essais sur le virus Visna-Maedi,
- le MR 13095, molécule originale dont l'action inhibitrice n'a jamais été recherchée.

### 2-4-1 Détermination de la cytotoxicité

Pour mesurer la cytotoxicité d'une substance, 6 jours d'incubation des cellules avec le produit suffisent. Nous avons évalué la toxicité du MR 13095 sur les cellules de P.C. par la C.C.50 et la C.M.C. et celle de l'AZT uniquement par la C.C.50. La méthode au M.G.G. a été réalisée en premier afin de pouvoir encadrer et limiter le nombre de concentrations lors de la détermination de la C.C.50 avec la méthode au MTT.

La C.M.C. obtenue pour le MR 13095 est de 200  $\mu\text{M}$ , celle de l'AZT est de 100  $\mu\text{M}$  selon les travaux de Larrouturou (26). A partir des tracés des pourcentages de viabilité en fonction des concentrations de chaque molécule, nous avons trouvé une C.C.50 de 334  $\mu\text{M}$  pour le MR 13095 (figure 21) et une C.C.50 supérieure à 400  $\mu\text{M}$  pour l'AZT (figure 22).

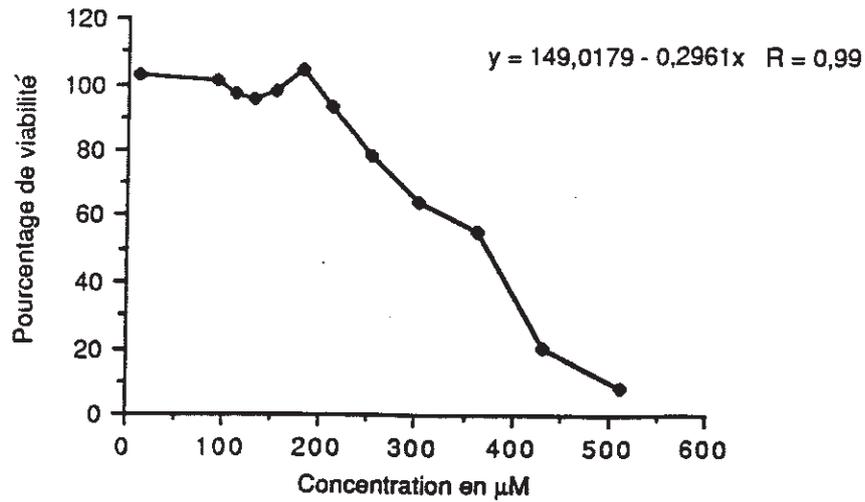


Figure 21 :

Toxicité du MR 13095 sur la croissance des cellules de P.C. après 6 jours d'incubation.

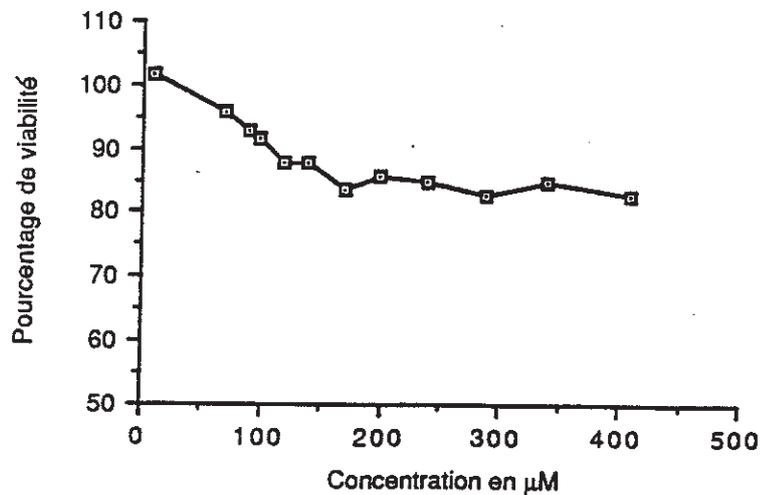


Figure 22 :

Toxicité de l'AZT sur la croissance des cellules de P.C. après 6 jours d'incubation. Les pourcentages de viabilité représentent les moyennes des résultats de deux essais. Les écarts-types sont inférieurs ou égaux à 5 %.

Au cours de la même manipulation, une épreuve d'exclusion au bleu Trypan a été effectuée pour la première et la dernière concentration testée de chaque substance, ainsi que pour les témoins cellules. Des pourcentages de viabilité ont été calculés à partir du dénombrement des cellules vivantes. Ils sont regroupés dans le tableau XV.

En comparant ces résultats avec ceux réalisés avec la méthode au MTT (figures 21 et 22), nous constatons qu'il y a une bonne corrélation.

#### *2-4-2 Mesure de l'activité antivirale vis-à-vis de la souche Visna*

Pour l'AZT, la C.E.50 obtenue par Larrouturou (26) vis-à-vis de la souche Visna est de l'ordre de 0,3  $\mu$ moles/ml. Nous avons donc choisi de tester deux concentrations en AZT : 0,5 et 10  $\mu$ M. L'activité antivirale a été évaluée simultanément par la méthode au M.G.G., selon le protocole décrit dans la première partie, et par la méthode au MTT, en suivant les conditions définies précédemment.

	SUBSTANCES			
	MR 13095		AZT	
	80 $\mu$ M	500 $\mu$ M	65 $\mu$ M	400 $\mu$ M
Pourcentages de viabilité	103 $\pm$ 8	7 $\pm$ 2	101 $\pm$ 9	78 $\pm$ 1

Tableau XV :

Pourcentages de viabilité des cellules de P.C. non infectées, traitées par une molécule, mesurés par l'épreuve d'exclusion au bleu Trypan. Les valeurs sont les moyennes de pourcentages calculés selon la formule (3) à partir de deux comptages successifs des cellules.

Concentrations en AZT ( $\mu$ M)	Nombre de TCID 50 par cell.	Pourcentages de protection			
		Méthode au MTT		Méthode au M.G.G.	
		Formule (6)	Formule (7)	Formule (4)	Résultats de Larrouturou (26)
0,5	0,15	13	42	5	55
	0,5	19	43	-	
10	0,15	3	32	37	100
	0,5	16	41	-	

Tableau XVI :

Activité antivirale de l'AZT sur la souche Visna. Les pourcentages de protection sont mesurés par l'inhibition de l'altération de la viabilité des cellules infectées selon deux formules (6) et (7), par l'inhibition de l'E.C.P. suivant la formule (4). Ils sont comparés aux résultats obtenus par Larrouturou (26).

Deux multiplicités d'infection ont été sélectionnées : 0,15 [dose infectante adoptée par Larrouturou (26)] et 0,5 TCID 50 par cellule. Deux témoins produits ont été ménagés dans chaque microplaque. Les résultats apparaissent dans le tableau XVI en parallèle avec ceux déterminés à partir de la droite de régression linéaire du pourcentage d'inhibition en fonction du logarithme de la concentration en AZT, établie par Larrouturou (26).

Les pourcentages de protection dérivant de la méthode au MTT ne concordent pas avec ceux déduits de la méthode de référence au M.G.G. Mais ces derniers divergent totalement de ceux trouvés à partir des expériences de Larrouturou (26). En présence de 0,5 TCID 50 par cellule, le nombre de syncytia par cupule est très élevé (supérieur à 100). Il est en conséquence impossible de les chiffrer correctement et de calculer un pourcentage de protection.

Nous avons testé le MR 13095 quant à son action antivirale sur la souche Visna. La gamme des concentrations variait de 40  $\mu$ M à 200  $\mu$ M avec pour raison géométrique 1,2.

Les pourcentages de protection obtenus ont été tous nuls. Le MR 13095 est donc inefficace à bloquer la réplication de la souche Visna.

**Troisième partie**

***DISCUSSION***

Dans le cadre de notre travail, nous avons mis au point une micro-méthode colorimétrique de mesure de la viabilité cellulaire. Pour cela, nous nous sommes basés sur la technique utilisée par Pauwels et Coll. (36). Depuis la première utilisation du MTT par Mosmann en 1983 (32), pour quantifier la survie et la prolifération cellulaire, de nombreuses modifications ont été apportées à cette méthode. Notre objectif étant une recherche antivirale, nous avons orienté notre choix vers des méthodologies utilisant le MTT pour l'évaluation *in vitro* de l'action inhibitrice sur le V.I.H.. Pauwels et Coll. (36) ont démontré que la mesure *in situ* de la réduction du MTT représentait par sa rapidité et sa sensibilité une nouvelle méthode très intéressante pour la quantification de l'activité de composés anti-V.I.H. Ils ont déterminé les conditions optimales de l'essai au MTT pour obtenir les plus grandes différences d'absorbance entre les cellules non infectées et les cellules infectées. Nous avons donc appliqué la méthode établie par Pauwels et Coll. (36) et reprise par plusieurs équipes de virologie (8, 9, 54). Cependant, les travaux de ces équipes portent sur des cellules en suspension, qui sont rencontrées le plus souvent en virologie, et les cellules de P.C. que nous utilisons sont des cellules adhérentes. Nous avons alors été conduits à revoir la technique de Pauwels et Coll. (36) afin de l'adapter à notre propre système cellules/virus.

**L'originalité de la méthode** réside dans le fait que seules les cellules vivantes et métaboliquement actives réduisent le MTT en formazan et que la quantité de formazan produite est directement proportionnelle au nombre de cellules. Nous avons prouvé pour les cellules MDBK comme pour les cellules fibroblastiques, que les cellules mortes sont incapables de métaboliser le MTT et qu'il existe une relation linéaire entre la quantité de MTT réduite et le nombre de cellules vivantes mises en culture. Mosmann (32) a démontré que les cellules métaboliquement inactives, comme les érythrocytes, ne peuvent cliver le MTT.

Afin **d'améliorer les valeurs de D.O.**, nous avons modifié un certain nombre de paramètres du protocole initial de Pauwels et Coll. (36). Le premier changement a porté sur la concentration finale en MTT que nous avons majorée : nous sommes passés de 0,7 mg/ml à 1 mg/ml. En virologie, les concentrations varient de 0,2 mg/ml (44) à 1,4 mg/ml (12) avec le plus souvent une quantité de 0,7 mg/ml.

Nous avons ensuite augmenté le temps d'incubation des cellules avec le MTT. Pauwels et Coll. (36) constatent que la sensibilité de l'essai est bonne avec 2 heures (détection d'une quantité minimale de 3000 cellules/puits) et qu'au-delà de 2 heures d'incubation le rapport des D.O. cellules non infectées sur cellules

infectées passe de 20 à 10. Avec les cellules de P.C., une durée de 3 heures améliore très nettement la sensibilité de l'essai. La production de formazan augmente linéairement avec le temps d'incubation jusqu'à 3 heures et après on atteint un plateau. En fait, la période de linéarité est plus ou moins longue selon les cellules : elle peut s'arrêter à 30 minutes (60) comme elle peut s'étendre à 6 heures (56). Sudo et Coll. (53) remarquent qu'avec les cellules MRC5, les D.O. augmentent graduellement jusqu'à la 24<sup>ième</sup> heure d'incubation avec le MTT. Les cellules MRC5 sont des cellules diploïdes fibroblastiques de poumon embryonnaire humain. Selon les auteurs, le temps optimal varie donc de 2 heures à 4 heures (17) avec une prédilection pour 4 heures. Quelques-uns vont jusqu'à 24 heures (4, 53). Pour Gerlier et Thomasset (21), l'absence de linéarité notée après une certaine durée d'incubation est en rapport avec la mort progressive des cellules pendant l'essai au MTT. Par un test d'exclusion au bleu Trypan, ils montrent que la viabilité des cellules en présence de MTT décroît avec le temps de façon linéaire.

Comme Hansen et Coll. (23), nous avons constaté que les D.O. obtenues après incubation avec le MTT à température ambiante sont bien inférieures à celles réalisées à 37°C. Il est donc indispensable de placer les cellules à 37°C pendant le temps de réaction avec le MTT.

Ceci confirme le rôle de l'activité métabolique des cellules dans la réduction du MTT.

L'inconvénient du formazan produit à partir du MTT est que sa solubilisation dans l'eau, donc dans le milieu de culture, est très lente contrairement à d'autres sels de tétrazolium comme le XTT (28, 62). Cette caractéristique impose une opération de remise en solution des cristaux de formazan par un solvant. Pauwels et Coll. (36) ont étudié la capacité de divers solvants à dissoudre les cristaux de formazan en présence de petites quantités de milieu de culture. Sur dix solvants testés, ils obtiennent les plus hautes D.O. pour les cellules non infectées avec l'isopropanol et le meilleur rapport de D.O. entre les cellules non infectées et les cellules infectées avec l'isopropanol acidifié. En revanche, le DMSO, très utilisé en cancérologie, donne les plus faibles rapports. Mosmann (32) préconise d'acidifier l'isopropanol pour faire virer le rouge de phénol, présent dans le milieu de culture, en sa forme jaune acide. La forme rouge absorbe à 570 nm et donc interfère dans la mesure d'absorbance du formazan. Selon Pauwels et Coll. (36), l'ajout de 10 % (v/v) de Triton X-100 à l'isopropanol acidifié prévient la précipitation des protéines du sérum dans le milieu et améliore la stabilité de la couleur du formazan dans le temps. L'isopropanol a l'avantage d'inactiver le V.I.H. (28, 36) d'où une meilleure

sécurité pour les manipulateurs. C'est pourquoi, en virologie, ce sont les solvants à base d'isopropanol qui sont les plus utilisés (9 fois sur 10) avec une plus grande fréquence du mélange isopropanol/ HCl / Triton X-100 (à 10 % v/v). Le volume de solvant employé est pratiquement toujours de 100 µl/puits. Nous avons effectivement montré que c'est un volume suffisant.

Les équipes ayant adopté comme nous le mélange à base d'isopropanol laissent dans les puits environ 70 µl de milieu contenant le MTT non réduit, avant l'addition du solvant d'extraction. Pauwels et Coll. (36) remarquent que le rapport D.O. cellules non infectées sur cellules infectées est optimal lorsque 150 µl de milieu sont enlevés (les puits contenant 200 µl de milieu de culture). En retirant tout le surnageant, ils perdent 25 % de D.O. pour les cellules non infectées, par rapport à la valeur obtenue en aspirant 150 µl. Nos résultats sont en contradiction avec cette observation et le gain d'absorbance que nous notons est proportionnel à la quantité de cellules par puits. A cette différence nous voyons trois raisons. La première est que, contrairement à Pauwels et Coll. (36), nous utilisons des cellules adhérentes. Avec des cellules en suspension, si on aspire la totalité du surnageant, on a le risque de perdre des cellules, même après une centrifugation. La seconde raison est que le Triton X-100

n'éviterait pas entièrement une précipitation occasionnelle des protéines du sérum avec le mélange alcool-acide. Ce phénomène, dû à la protonisation des protéines, est d'autant plus prononcé que le pH est bas (inférieur à 4) (45). Il est à l'origine d'un bruit de fond variable et élevé (19). Nous avons effectivement constaté que les valeurs de D.O. lues à 690 nm sont plus importantes lorsque le surnageant n'est pas complètement retiré. Par ailleurs, en immunologie, l'isopropanol acidifié, qui est le solvant le plus fréquemment rencontré (1 fois sur 2), n'est jamais associé avec le Triton X-100 (17). Que les cellules soient ou non adhérentes, les auteurs enlèvent le plus souvent la totalité du surnageant. Enfin, la troisième raison est que la solubilité du formazan est très lente dans un mélange final milieu de culture : isopropanol acidifié de 1:1, surtout pour de grandes quantités de formazan (19). Même une quantité résiduelle de milieu (10 à 20 µl) empêche fortement la solubilisation du formazan dans l'isopropanol acidifié (56). L'enlèvement du milieu améliore donc la solubilité des cristaux de formazan (51) et évite les interférences avec le rouge de phénol et le sérum (19). Cette opération ne présente pas d'inconvénient pour nous : puisque nous travaillons sur des cellules adhérentes, nous n'avons pas besoin de la faire précéder d'une centrifugation. Cette aspiration du surnageant doit tout de même se faire avec précaution afin de ne pas léser le tapis cellulaire et donc

de ne pas refouler les cellules avec le surnageant. Hansen et Coll. (23) notent qu'une perte de 1000 cellules conduit rapidement à une chute marquée de la D.O.

Pour obtenir une dissolution complète des cristaux de formazan, nous avons été conduits à doubler le temps d'agitation choisi par Pauwels et Coll. (36). Pour solubiliser les cristaux entièrement, l'addition du solvant est pratiquement toujours suivie d'une agitation des microplaques, le plus souvent sur un agitateur de plaques. Ayisi et Coll. (8), qui utilisent la technique de Pauwels et Coll. (36), n'effectuent aucune agitation, mais laissent les microplaques 24 heures à la température de la pièce avant de lire les D.O. Notre étude a révélé qu'après 24 heures à l'étuve, nous perdons en moyenne 20 % de D.O. Nous avons obtenu des résultats identiques après 24 heures à 20°C. En revanche, nous avons noté qu'après un jour à 4°C les D.O. ne baissent que de 5 %.

Que la microplaque soit laissée à température ambiante ou soit remise à l'étuve, la lecture doit être faite dans l'heure qui suit l'agitation. Mosmann (32) qui utilise l'isopropanol acidifié s'accorde le même délai, tandis que Wemme et Coll. (63) effectuent la lecture dans la demi-heure qui suit l'addition de ce même solvant.

Pour des temps d'incubation du tapis cellulaire supérieurs à 24 heures, la relation de proportionnalité entre le nombre initial de cellules mises en culture et les D.O. n'est observée que dans l'intervalle allant de  $1.10^4$  à  $3.10^4$  cellules/puits, ce qui explique que des densités de  $0,5.10^4$  et  $4.10^4$  cellules/puits ne conviennent pas en présence de virus. Arnould et Coll. (7) perdent la linéarité à partir de 48 heures d'incubation pour les concentrations les plus élevées. Leurs travaux portent sur des lignées cellulaires malignes de souris. Théoriquement, les cultures cellulaires se multiplient suivant une loi exponentielle. Ils justifient donc cette observation par le fait qu'après la période de croissance exponentielle, la confluence et la déplétion du milieu ralentissent et les divisions cellulaires s'arrêtent. Selon Gerlier et Thomasset (21), la variabilité des courbes de linéarité pourrait être expliquée par la modulation de l'activité enzymatique de la chaîne respiratoire tout au long de la croissance exponentielle. L'intensité de la respiration cellulaire est maximale pendant la croissance exponentielle et diminue quand la culture devient confluyente. Enfin, si l'inoculum cellulaire est trop petit, une longue période de temps s'écoule avant que la culture commence à croître (7). Ce phénomène est lié à la nature des cellules puisque Twentyman et Coll. (57) conservent une relation linéaire après 4 jours d'incubation de cellules

leucémiques en lignées continues. Ils constatent que cette relation montre une petite dépendance avec le temps.

Nous avons remarqué que quel que soit le nombre de repiquages subis par les cellules, les courbes de croissance chutent rapidement après quelques jours d'incubation des cellules non infectées. Selon Hansen et Coll. (24), cette décroissance indique, soit une mort cellulaire, soit une régulation de base du métabolisme cellulaire. Elle peut être évitée si le milieu est renouvelé au troisième jour. Une linéarité continue est alors obtenue entre les D.O. et le temps d'incubation du tapis.

L'objet de notre travail est d'appliquer la méthode colorimétrique au MTT à la recherche de l'action inhibitrice *in vitro* de molécules sur la réplication du virus Visna. Nos premiers essais réalisés en présence de virus ont été décevants : la diminution de la production de formazan n'a pas été observée dans les cellules infectées par le virus. Nous avons alors fait varier les divers **paramètres liés à la phase d'infection des cellules** et susceptibles d'influer sur l'essai.

*In vitro*, la densité et la nature des cellules cibles influencent la fusion cellulaire viro-induite. La fusion croît avec la densité cellulaire, ceci

jusqu'à un certain seuil et le temps d'apparition de la fusion cellulaire (ou temps de latence) est d'autant plus faible que le tapis cellulaire est dense (14). Au niveau des pourcentages de D.O. entre les cellules infectées et les cellules non infectées, l'effet de la concentration cellulaire ne se manifeste qu'après un temps d'incubation supérieur à 6 jours. On constate alors qu'avec  $3.10^4$  cellules/puits, les valeurs de D.O. obtenues à J7 sont semblables à celles réalisées à J8 avec  $2.10^4$  cellules/puits. Cependant, la mort cellulaire dans les témoins cellules est plus importante avec  $3.10^4$  cellules/puits. Le gain de temps est négativé par le gaspillage de cellules. La concentration de  $2.10^4$  cellules/puits est donc la mieux appropriée pour des dosages antiviraux.

Le virus, par sa quantité et son pouvoir infectieux, est un élément fondamental de la fusion cellulaire *in vitro*. Le temps de latence est inversement proportionnel à la quantité de virus, c'est pourquoi cette quantité ne peut être inférieure à un certain seuil (14). Toutefois, l'effet du virus sur les rapports de D.O. entre les cellules infectées et les cellules non infectées n'apparaît qu'avec des temps longs d'incubation : 7 jours pour  $3.10^4$  cellules/puits et 8 jours pour  $1.10^4$  et  $2.10^4$  cellules/puits. Quel que soit le temps d'incubation,

cet effet est indépendant de la concentration virale. Le microscope optique a permis de constater que, sous l'action de fortes multiplicités d'infection (10 unités formant plaque (U.F.P.) par cellule), la fusion cellulaire est précoce et atteint son plein développement en 24 heures (38). Néanmoins, nous avons montré, qu'avec des temps courts d'incubation et des doses élevées de virus, les D.O. des cellules infectées restent constantes. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait qu'en présence de hautes concentrations en virus, la fusion cellulaire observée est une fusion exogène (38). Celle-ci n'implique pas forcément une répllication intra-cellulaire du virus (14). Les cellules ne sont donc pas détruites et les D.O. ne chutent pas par rapport au témoin cellules. Seule la fusion endogène nécessite une répllication intra-cellulaire avec expression à la surface des cellules de spécificités viro-induites et viro-codées(30). Elle est induite par de faibles quantités de virus (0,1 U.F.P. par cellule), se produit après un temps de latence long et atteint son maximum vers le 4<sup>ième</sup> jour. Entre 0,1 et 2 U.F.P. par cellule - soit entre 0,15 et 3 TCID 50 par cellule - la fusion se constitue rapidement durant les 5-6 premières heures, puis se développe plus lentement les 3 jours suivants (38). Un inoculum viral contenant 0,5 TCID 50 par cellule est convenable pour nos expériences.

L'inoculation d'un tapis cellulaire de P.C. se fait par incubation avec un inoculum viral pendant un temps déterminé, à 37°C. Ce temps de contact est pour certains de 30 minutes (11, 26), pour d'autres de 60 minutes (20) ou peut même s'étendre à 3 heures (13). Nous avons démontré que la durée d'incubation avec l'inoculum viral n'a aucune influence sur les valeurs d'absorbance. Nous avons donc fixé un temps de contact de 45 minutes.

Parmi les conditions physico-chimiques jouant un rôle dans la fusion cellulaire *in vitro*, il y a la teneur en sérum du milieu de culture (14). Les milieux de base ne permettent que la survie des cellules pendant un temps limité. Pour que les cellules puissent proliférer et exprimer leur activité spécifique, il faut y ajouter du sérum, milieu très riche contenant beaucoup de substances nutritives. Une quantité importante en S.V.F. (20 %) limite l'effet lytique du virus Visna sur les cellules de P.C., ce qui produit un taux élevé de fusion (29, 30, 31, 38). Lors du titrage du virus Visna-Maedi, Larrouturou (26) a noté, qu'avec des pourcentages supérieurs à 5 %, le développement du virus est freiné. L'origine de cette inhibition n'est pas définie : la composition des sérums est inconnue, très complexe et peut varier d'un lot à l'autre. Pour des concentrations en S.V.F. allant de 2 à 5 %, nous ne constatons aucun ralentissement de l'effet lytique du

lentivirus. Les fibroblastes étant des cellules très gourmandes en facteurs de croissance apportés uniquement par le sérum (1), 5 % de S.V.F. est un taux optimal pour des essais antiviraux au MTT.

Quels que soient le nombre de cellules par puits, la quantité de virus et le pourcentage de S.V.F., c'est avec des temps longs d'incubation que la différence de D.O. entre les cellules infectées et les cellules non infectées est la plus élevée. Sudo et Coll. (53) et Watanabe et Coll. (61) ont montré que les D.O. chutent à mesure que la production de virus augmente. L'inhibition de la formation du formazan reflète donc la croissance du virus dans les cellules. Le virus Visna en tant que lentivirus détruit les cellules qu'il infecte. Cependant, la lyse du tapis cellulaire, qui entraîne une chute de D.O. par rapport à des cellules témoins, est l'ultime phase du cycle infectieux du virus. Entre le moment où le virus pénètre dans la cellule et celui où il en sort des virions fils par bourgeonnement de la membrane plasmique, il s'écoule 72 heures (13). La synthèse d'un grand nombre de particules virales aboutit à la destruction de la cellule cible et à sa mort. Dans les microplaques, le tapis cellulaire est détruit presque totalement en 6 à 8 jours (26). A J8, avec  $2.10^4$  cellules/puits, nous n'avons plus que 0,1 de D.O. En flacon, 10-14 jours après l'infection, il reste quelques syncytia

sur la paroi (13). Il est essentiel que le temps soit suffisamment long pour que les cellules meurent et qu'elles perdent l'activité deshydrogénase, car il est possible que cette activité se maintienne pendant un certain temps après la mort cellulaire (15, 16). Nous avons choisi 8 jours comme seuil supérieur.

S'il y a un maximum pour le temps d'incubation du tapis cellulaire infecté, il y a aussi un minimum : le temps ne peut être inférieur à 7 jours. En effet, à J6 les pourcentages de D.O. entre les cellules infectées et les cellules non infectées fluctuent beaucoup. Ainsi, avec  $3.10^4$  cellules/puits, ils varient de 78 % à 148 %. Or, la quantité de cellules vivantes dans les cupules infectées ne peut être supérieure à celle présente dans les cupules témoins. La viabilité des cellules saines diminuant dans le temps, celle des cellules infectées doit subir la même évolution, et d'autant plus qu'elles sont en présence d'un facteur de lyse : le virus. Nous avons alors émis l'hypothèse suivante : les syncytia seraient au départ métaboliquement actifs et réduiraient le MTT. Les syncytia résultent de la fusion de cellules infectées et accolées. A l'intérieur des cellules fusionnantes, il existe d'importantes modifications cyto-chimiques (29, 37), ainsi que de profonds changements de la membrane plasmique et des organites cellulaires du cytoplasme (13). On note, entre

autre, une forte augmentation du nombre des mitochondries. De formes atypiques et très longues, elles renferment une grande quantité de crêtes. Ces crêtes ont une intense activité cytochrome oxydase (39). L'hyperactivité des organites - réponse des cellules à l'infection - révèle que la fusion cellulaire est le siège d'une importante activité enzymatique. Celle-ci fournit l'énergie nécessaire aux contacts entre les cellules (38) établis par l'intermédiaire de longues digitations de la membrane plasmique. La réduction du MTT ayant lieu dans les mitochondries, les syncytia pourraient donc cliver le MTT. Pagliacci et Coll. (35) ont démontré que des cellules tumorales arrêtées à la phase G2/M du cycle cellulaire par l'isoflavine génistein, mais encore viables, produisent plus de formazan. A l'observation microscopique, les cellules traitées sont plus volumineuses, riches en mitochondries et contiennent une quantité accrue de cristaux de formazan après incubation avec le MTT. Le génistein rehausserait le nombre de mitochondries et/ou leur fonction. L'augmentation du volume cellulaire et de la masse mitochondriale serait donc responsable d'une réduction plus importante du MTT. Cependant, les syncytia ne se multiplient pas (30). De plus, certains auteurs (60) suggèrent que la réduction du MTT peut avoir lieu dans des sites cellulaires multiples, autres que les mitochondries, puisque les sels de tétrazolium sont largement utilisés en histochimie pour prouver l'existence

d'enzymes spécifiques non mitochondriales. Nous avons confronté, puits par puits, les observations microscopiques que nous avons relevées avant l'introduction du MTT, avec les valeurs d'absorbance correspondantes. Lorsque les D.O. sont supérieures à celles des témoins cellules, on note souvent la présence de nombreux syncytia.

Le seul paramètre que l'on puisse faire jouer, pour diminuer les D.O. des cellules infectées par rapport à celles des cellules non infectées, est le temps. Pour accroître encore l'écart des D.O. entre les cellules infectées et non infectées, nous avons décidé d'augmenter les valeurs d'absorbance obtenues avec les témoins cellules. Le facteur qui intervient à ce niveau est la **sensibilité de l'essai colorimétrique au MTT**. Pour améliorer cette sensibilité, nous avons évalué divers solvants d'extraction quant à leur capacité à solubiliser le formazan produit par des cellules de P.C. non infectées.

Avec notre système cellulaire, le DMSO a le plus haut pouvoir d'extraction du formazan, alors que l'isopropanol acidifié / Triton X-100 fait partie des solvants les moins performants. Alley et Coll. (3), qui obtiennent les mêmes résultats, rapportent que l'isopropanol acidifié solubilise insuffisamment le formazan à l'intérieur de certaines lignées cellulaires. Plusieurs études ont

confirmé la supériorité du DMSO sur les autres solvants (4, 15, 56, 59). Selon Alley et Coll. (4), l'absorbance du réactif formazan dans le DMSO (25  $\mu$ l/ml) est à peu près 1,3 fois celle du formazan dans l'isopropanol pur, et plus de 6,2 fois celle du formazan dans l'isopropanol acidifié. Nous avons trouvé un coefficient de 2,5 entre le DMSO et l'isopropanol acidifié / Triton X-100.

Le SDS en milieu acide, qui est le deuxième solvant le plus souvent retrouvé en immunologie (17), ne peut être utilisé dans nos conditions expérimentales (D.O. obtenues nulles). Pourtant, le SDS dissolverait les couches lipidiques et les protéines des cellules, permettant la libération des grains de formazan intra-cellulaires, et donc leur solubilisation (23). Nous avons montré que l'alcalinisation de ce solvant s'accompagne d'une hausse de l'absorbance. Le même phénomène s'observe avec les autres solvants. Différents auteurs ont remarqué l'influence du pH sur les propriétés spectrales du formazan et sur sa stabilité (4, 19). Hansen et Coll. (23) ont étudié le rôle du pH sur la solubilisation du formazan dans un solvant composé de SDS et de diméthylformamide (DMF) (20 %, 50 %). Au fur et à mesure que le pH est abaissé, les D.O. chutent. Parallèlement à cette réduction des D.O., survient une augmentation des D.O. à la longueur d'onde où le MTT a un pic d'absorption (5), ainsi que nous l'avons noté. Le formazan est converti en MTT de façon rapide et

irréversible, pour des valeurs de pH inférieures à 4 (23). Les granulations jaunes observées dans certaines cupules correspondraient donc à du MTT.

Le choix d'un nouveau solvant nous a conduits à vérifier les paramètres du protocole de l'essai au MTT sur lesquels les solvants d'extraction ont une influence. Les caractéristiques du spectre du formazan varient parfois considérablement : suivant le solvant utilisé et d'autres facteurs tels que la concentration en ions métalliques dans la solution (6), la présence ou l'absence de sérum (4), le nombre de cellules par puits (41), le pH du solvant. En l'absence de milieu de culture, le formazan dans le DMSO a un pic d'absorption à 503 nm pour Carmichael et Coll. (15), à 550 nm pour Twentyman et Luscombe (56), à 560 nm pour Plumb et Coll. (41) et Scudiero et Coll. (47) et 570 nm pour Wilson et Coll. (63). Nous avons obtenu un maximum d'absorbance à 556 nm. Lorsque le DMSO est utilisé comme solvant, les mesures se font le plus souvent à 540 nm (60 % des cas) (17). Certaines équipes évaluent le bruit de fond à 620 nm, d'autres à 630 nm. Mais, sous ces conditions, la contribution du formazan à la valeur de la D.O. est loin d'être négligeable. Nous avons donc décidé de continuer les lectures à la longueur d'onde test de 540 nm et à la longueur d'onde de référence de 690 nm.

Avec l'isopropanol acidifié / Triton X-100 comme solvant, nous avons démontré que les valeurs de D.O. chutent à partir d'une certaine concentration finale en MTT. Avec le DMSO nous confirmons ce résultat. Une quantité de MTT trop élevée, par rapport à celle des cellules de P.C., devient toxique pour celles-ci. Inversement, de faibles quantités de MTT diminuent à la fois la sensibilité et la reproductibilité de l'essai et, par là-même, sa fiabilité. Généralement, les auteurs notent que la production de formazan augmente avec la concentration en MTT jusqu'à une certaine valeur (concentration optimale) au-delà de laquelle on a un plateau (19, 24, 32, 41, 60, 64). Néanmoins, pour certaines lignées cellulaires, un excès de MTT peut aboutir à une réduction de la production de formazan (41) qui traduit une action toxique du MTT (10). Avec le DMSO pour solvant, la concentration finale en MTT varie de 0,2 mg/ml à 1 mg/ml (17), avec un maximum de 2 mg/ml pour Wilson et Coll. (64) et une moyenne se situant à 0,45 mg/ml. Nous avons choisi de garder la concentration initialement adoptée, à savoir 1 mg/ml.

Le volume de DMSO ajouté dans chaque puits pour mettre en évidence le formazan produit par les cellules est, soit de 100  $\mu$ l, soit de 150  $\mu$ l, soit de 200  $\mu$ l (17). Par plusieurs essais, nous avons prouvé qu'il n'est pas

justifié d'utiliser des volumes supérieurs à 100 µl/puits. 100 µl de DMSO suffisent donc.

Après l'addition du solvant d'extraction, une agitation du solvant est indispensable. Certains réalisent cette opération par un pipetage répété avec une pipette multicanaux (4, 18, 22, 58, 63). Même si ce procédé offre de bons résultats, il est trop laborieux. Il ne peut être employé qu'en appoint. D'autres font précéder ce pipetage d'une trypsination du tapis cellulaire, afin de détacher les cristaux de formazan qui se sont formés dans les cellules et qui sont attachés au fond des puits de la plaque (34). Ce traitement par la trypsine donne des résultats décevants et complique la technique. Le plus souvent, l'agitation se fait par vibration sur un agitateur de plaques, pendant un temps plus ou moins long suivant les performances de l'appareil utilisé (17). Ce procédé est de loin le plus adapté à des tests de criblage : c'est celui que nous avons adopté.

Avec le DMSO comme solvant, Carmichael et Coll. (15) lisent les absorbances immédiatement après l'agitation. Nous avons montré que les D.O. diminuent de façon très progressive à température ambiante, nous laissant un délai d'une heure pour accomplir les lectures. Sobottka et Berger (51) s'accordent le même délai. Nous avons remarqué que ce laps de temps peut être allongé en plaçant

les microplaques à 4°C. En gardant les plaques à la température de la pièce, Twentyman et Luscombe (56) obtiennent des D.O. stables pendant plusieurs heures. Alley et Coll. (4) soulignent que, dans le DMSO, si le réactif formazan présente des caractéristiques spectrophotométriques constantes pendant plusieurs jours, l'absorbance du formazan produit par des cellules change au bout de quelques heures et est influencée par la qualité du DMSO et les conditions de stockage de celui-ci. L'utilisation d'un DMSO de qualités spectrophotométriques donne des valeurs d'absorbance du bruit de fond constantes, 2 heures après l'addition du solvant. En revanche, l'emploi de préparations de DMSO non spectrophotométrique ou de DMSO pré-exposé à l'air s'accompagne de valeurs d'absorbance du bruit de fond sans cesse croissante durant les 15 minutes suivant l'introduction du solvant.

Nous avons constaté que la période de linéarité, entre le nombre de cellules par puits et la quantité de formazan produite, est plus courte avec le DMSO qu'avec le solvant alcoolique. Avec le DMSO, Sobottka et Berger (51) atteignent un plateau aux plus hautes concentrations cellulaires, tandis qu'avec l'isopropanol acidifié, ils conservent la linéarité. Van de Loosdrecht et Coll. (59) obtiennent une relation parfaitement linéaire avec les deux solvants. Cette relation de proportionnalité

dépend donc du type de cellules. En effet, ce phénomène se produit avec n'importe quel solvant : avec l'isopropanol acidifié (22), avec l'isopropanol acidifié / Triton X-100 (12), avec le DMSO (25, 42, 58) et avec le mélange SDS / DMF (23). Certains l'expliquent par une inhibition de la fonction mitochondriale aux plus hautes densités cellulaires (42), d'autres par une mortalité cellulaire due à l'excès de cellules par puits (12). Pour Green et Coll. (22), cette perte de linéarité est liée à une consommation complète du MTT, car l'augmentation des concentrations de M.T allonge la linéarité.

Pour des temps d'incubation des cellules de P.C. non infectées supérieurs à 24 heures, le DMSO donne des résultats identiques à ceux obtenus avec le solvant alcoolique.

Le DMSO présente quelques inconvénients :

- communs à tous les solvants organiques :

. il doit être mélangé et manipulé avec précaution,

. il doit être stocké et rejeté dans des conditions particulières.

- spécifiques :

. il dissout divers types de plastique, ce qui nécessite un choix précis des appareils de distribution (56),

. c'est un irritant olfactif (51) à odeur très désagréable.

A côté de ces imperfections, le DMSO offre de nombreux avantages par rapport au mélange isopropanol acidifié / Triton X-100 :

- pas de préparation : donc un gain de temps,
- pas de problème d'évaporation,
- solubilisation rapide et complète des cristaux de formazan,
- valeurs de D.O. nettement plus élevées,
- absorbance du bruit de fond plus faible,
- pas de problème d'incompatibilité avec l'évaluation de certains agents synthétiques (2).

Pour Twentyman et Luscombe (56), le DMSO est un solvant "universellement applicable".

Les **paramètres** des méthodes habituellement utilisées **pour des recherches d'actions inhibitrices sur le virus Visna- Maedi** (inhibition de l'E.C.P., réduction du

pouvoir infectieux, dosage de l'activité transcriptase inverse) sont variés. La durée d'incubation s'étend de 4 jours à 10 jours (20). Le pourcentage en S.V.F. généralement rencontré est de 2 % (11, 26, 55). Les doses infectantes de virus diffèrent, selon les auteurs, de 0,015 à 2 TCID 50 par cellule en fonction du support cellulaire et des conditions d'infection (26). La concentration cellulaire dépend du type de plaques utilisées pour la culture des cellules : plaques 6 puits, 24 puits, 96 puits.

Les méthodes d'étude courantes de l'inhibition du virus Visna-Maedi dérivent de celles employées pour le V.I.H.-1 (26). Pour les méthodologies au MTT appliquées au V.I.H., le temps d'incubation des tapis cellulaires s'étale de 5 jours (8, 9, 36) à 21 jours (12). L'intervalle des densités cellulaires va de  $3 \cdot 10^3$  cellules/puits (46) à  $5 \cdot 10^4$  cellules/puits (12) suivant le support cellulaire. La quantité de S.V.F. est en général de 10 %, certains montent jusqu'à 20 % (12). Les multiplicités d'infection varient de 50 TCID 50 par cellule (8) à 200 TCID 50 par cellule (27).

De notre expérimentation, il ressort que, pour des dosages d'activités antivirales sur la souche Visna K 796 fondés sur l'utilisation du MTT, le délai d'incubation idéal des cellules infectées est de 7 jours. En ce qui

concerne la concentration cellulaire, une densité de  $2.10^4$  cellules/puits est à la fois nécessaire et suffisante pourvu que le pourcentage en S.V.F. soit au minimum de 4 %. La quantité optimale de virus est alors de 0,5 TCID 50 par cellule. Dans ces conditions, nous satisfaisons pleinement à notre exigence de départ : réduire autant que possible le rapport des D.O. cellules infectées sur cellules non infectées. En effet, nous avons atteint une inhibition de 90 % de la production de formazan dans les cellules de P.C., par l'infection virale. Pour avoir un profil colorimétrique acceptable, les absorbances des témoins cellules doivent être supérieures à 0,5 unités (4). Nous dépassons 0,9 de D.O..

Nous avons appliqué le protocole final à **l'évaluation de l'activité inhibitrice in vitro de deux molécules sur la réplication de la souche Visna K 796**. Nous avons choisi l'AZT car c'est la molécule anti-rétrovirale la plus connue. Premier commercialisé, il constitue encore aujourd'hui le meilleur traitement contre le S.I.D.A.. L'action antivirale d'une molécule originale le MR 13095 a également été recherchée.

Nous avons mesuré la cytotoxicité de ces deux substances, après 6 jours d'incubation avec les cellules, par la méthode au M.G.G. et l'essai au MTT. Les valeurs des

C.C.50 sont largement supérieures à celles des C.M.C. pour les deux molécules. Ceci s'explique par le fait que la C.C.50 correspond à la concentration qui détruit 50 % des cellules, alors que la C.M.C. correspond à la première concentration pour laquelle on ne note ni dégénérescence ni lyse cellulaire. La C.C.50 permet d'estimer l'influence de l'environnement cellulaire sur la réponse à l'inhibition du virus (26). La C.M.C. détermine les limites de l'activité inhibitrice *in vitro*. Thormar et Coll. (55) ont évalué la cytotoxicité de l'AZT sur des cellules de P.C. de mouton par comptage avec un compteur Coulter. Ils l'ont trouvée supérieure ou égale à 100  $\mu$ M. Avec le V.I.H., la C.C.50 de l'AZT obtenue par l'intermédiaire de l'essai au MTT est, pour certains, de 35  $\mu$ M (36), pour d'autres, de 138  $\mu$ M (8). Cet écart est dû au système cellulaire qui est différent.

Au niveau des pourcentages de viabilité, la méthode au MTT nous a donné des valeurs comparables à celles obtenues avec l'épreuve d'exclusion au bleu Trypan.

En ce qui concerne l'activité antivirale de l'AZT, nos pourcentages de protection ne coïncident ni avec ceux donnés par la méthode au M.G.G., réalisée en parallèle, ni avec ceux de Larrouturou (26). Ceci peut s'expliquer par le fait que la méthode au M.G.G. est une technique très laborieuse, basée sur l'observation microscopique de la formation de syncytia. Elle est donc assez subjective et

sujette à des erreurs. L'inhibition *in vitro* du virus Visna a fait l'objet d'un nombre restreint d'études dans la littérature. Selon Thormar et Coll. (55), l'AZT est faiblement actif contre la réplication du virus Visna et contre l'E.C.P. dans des cultures de cellules de P.C. de mouton. Ils obtiennent une C.E. 50 de 19  $\mu\text{M}$ . De plus, l'AZT n'inhibe pas complètement la formation de syncytia à une concentration aussi élevée que 700  $\mu\text{M}$ , bien qu'aux basses concentrations on ait une réduction de 50 % ou plus du nombre de syncytia. Le faible niveau d'activité de l'AZT contre le virus Visna est dû à l'incapacité des cellules à phosphoryler efficacement ce composé. La C.E. 50 de l'AZT mesurée pour le V.I.H.-1 par la méthode colorimétrique au MTT tourne autour de 0,002  $\mu\text{M}$  (8, 36). Cependant, les conditions cellulaires utilisées avec le V.I.H. sont tout à fait différentes des nôtres. L'influence des facteurs cellulaires rend donc difficile la comparaison des puissances inhibitrices d'un même produit sur le V.I.H.-1 et le virus Visna. L'activité antivirale *in vitro* des analogues de nucléosides, dont fait partie l'AZT, est fonction du support cellulaire, des conditions expérimentales (souche virale, multiplicité d'infection, temps d'incubation) et du taux de croissance cellulaire choisi pour l'essai (26).

Le MR 13095, bien que moyennement toxique pour les cellules de P.C. (C.C.50 de 334  $\mu$ M) ne les protège pas contre le développement de l'E.C.P..

**CONCLUSION**

L'utilisation du MTT dans des microméthodes pour mesurer la viabilité cellulaire est relativement récente (1983) et nouvelle, comparée aux applications chimiques, biochimiques et histochimiques des sels de tétrazolium, amplement décrites depuis de nombreuses années dans la littérature. La méthode au MTT a connu un essor important depuis Mosmann (32) à cause de sa très grande polyvalence. Elle est très souvent rencontrée en cancérologie et en immunologie aussi bien dans des tests de prolifération, que d'activation ou de cytotoxicité cellulaire. En virologie, les méthodes traditionnelles d'évaluation d'actions antivirales lui sont toujours préférées. Des études ont pourtant été faites en parallèle avec l'essai au MTT, notamment sur le V.I.H. Elles ont prouvé que la coloration au MTT donne des résultats comparables à ceux obtenus par la mesure d'antigène p 24 (12), par l'épreuve d'exclusion au bleu Trypan (36), par la mesure de la capacité des cellules à incorporer la thymidine tritiée (46), par le dosage de la transcriptase inverse (28). Le MTT est même retrouvé dans des essais formant plaque (33). La réticence à employer le MTT peut s'expliquer par le fait que la mise au point du protocole de la méthode peut être longue et difficile. Ainsi, lors de notre expérimentation, si l'application aux cellules de P.C. de mouton non infectées n'a pas posé de problèmes majeurs, l'application au système cellules/virus a été beaucoup plus

complexe. Certains auteurs en ont conclu que les cellules adhérentes ne convenaient pas pour des essais antiviraux utilisant le MTT (54, 61). En virologie, avec la méthode au MTT, les cellules poussant en monocouche sont effectivement moins souvent rencontrées que les autres (12, 44, 53), mais elles fournissent des résultats tout aussi satisfaisants. En revanche, en cancérologie, nombreuses sont les équipes à utiliser les deux types cellulaires sans aucune difficulté. Price et Mc Millan (42) et, à sa suite, Arnould et Coll. (7) affirment que l'essai au MTT est applicable aussi bien aux cellules en suspension qu'aux cellules adhérentes. Pour Carmichael et Coll. (15), la reproductibilité est meilleure avec les lignées cellulaires adhérentes. C'est pourquoi nous avons opté plutôt pour une responsabilité des syncytia, qui seraient capables de réduire le MTT. Cependant, nous n'avons pu le démontrer avec certitude. Dans la bibliographie, ce problème des syncytia et du MTT n'a pas été bien étudié. Pour le contourner, nous avons choisi d'augmenter le temps d'incubation du tapis cellulaire infecté. Avec le temps, l'E.C.P. conduit à une destruction des cellules et donc à une diminution de la production de formazan.

Nous avons montré que la durée de l'incubation des cellules est un des facteurs-clés pour avoir une grande différence de D.O. entre les cellules infectées et les cellules non infectées. Cette différence

est une condition indispensable pour réaliser correctement des mesures de l'activité antivirale. L'autre paramètre important est la nature du solvant. Le DMSO nous a permis d'améliorer la sensibilité de la méthode colorimétrique. Avec ou sans virus, le DMSO a confirmé les résultats initialement établis avec l'isopropanol acidifié / Triton X-100. Nous avons donc défini les conditions opératoires pour un dosage *in vitro* d'actions inhibitrices sur la répllication de la souche Visna K 796. Elles sont les suivantes : un tapis de cellules de P.C. de mouton constitué de  $2.10^4$  cellules/puits, inoculé à une multiplicité d'infection de 0,5 TCID 50 par cellule et incubé pendant 7 jours en présence de 5 % de S.V.F.

La technique au M.G.G., utilisée au laboratoire, est une méthode lourde, de lecture longue, fastidieuse, difficile et à l'origine de variations importantes. De plus, elle détermine seulement la capacité d'une infection par le virus Visna-Maedi à induire la fusion des cellules. Or, ce critère n'est pas totalement spécifique du virus infectieux. En comparaison avec ce procédé, la coloration au MTT a de nombreuses qualités :

- Elle est souple, précise : entre les différentes mesures , la variabilité est faible, permettant d'effectuer un nombre réduit de mesures par plaque.

Elle permet d'évaluer en même temps la cytotoxicité de la drogue et son activité antivirale.

- Elle est rapide : les étapes finales de l'essai prennent moins de temps que la mise en place du dosage (préparation du tapis cellulaire, infection des cellules, préparation des dilutions des molécules à tester).

Cette méthode au MTT est adaptée au criblage d'un grand nombre de substances et peut être automatisée.

Nos perspectives s'orientent maintenant vers l'application du protocole final, d'une part, à l'étude d'autres molécules déjà connues pour leur activité anti-rétrovirale et, d'autre part, à la souche Maedi du lentivirus, afin de pouvoir passer cette technique à l'étape de routine.

***ABBREVIATIONS***

AZT	2',3' - didésoxythymidine = azido-thymidine
C.C.50	Concentration cytotoxique à 50 %
C.E.50	Concentration efficace à 50 %
Cell.	Cellule
C.M.C.	Concentration minimale non cytotoxique
DICT 50	Dose infectante à 50 % en culture tissulaire
DMF	N,N-diméthylformamide
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
D.O.	Densité optique
E.C.P.	Effet cytopathique = effet cytopathogène
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme - linked - immuno - sorbent - assay
HCl	Acide chlorhydrique
M.E.M.E.	Milieu essentiel minimum avec sels de Earle
µM	Micromolaire = micromoles/ml
MTT	Bromure de 3-(4,5 - diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
NaOH	Hydroxyde de sodium = soude
nm	Nanomètre
P.B.S.	Phosphate buffered saline (tampon phosphate)
P.C.	Plexus choroïde
SDS	Sodium dodecyl sulfate (laurylsulfate de sodium)
S.I.D.A.	Syndrome de l'immunodéficience humaine acquise
S.V.F.	Serum de veau foetal
TCID 50	50 % tissue culture infectious dose
U.F.P.	Unité formant plaque
U.I.	Unité internationale
V.I.H.	Virus de l'immunodéficience humaine
XTT	Hydroxyde de 2,3 bis - [2-méthoxy-4-nitro-5-sulfophényl]-5-[(phénylamino) carbonyl]-2H-tétrazolium

***BIBLIOGRAPHIE***

- 1 - ADOLPHE (Monique), BARLOVATZ - MEIMON (Georgia)  
Culture de cellules animales : Méthologies -  
Applications.  
Paris : Inserm, 1988, 436 p. 24 cm.
- 2 - AD HOC review committee proceedings for National Cancer  
Institute *In Vitro / In Vivo* Disease Oriented Screening  
Project. Sponsored by Developmental Therapeutics  
Program, Division of Cancer Treatment, National Cancer  
Institute.  
NIH, Bethesda, MD, 1985, Sept., p. 23-24.
- 3 - ALLEY M.C., SCUDIERO D.A., MONKS A., CZERWINSKI M.J.,  
SHOEMAKER R.H. et BOYD M.R.  
Validation of an automated microculture tetrazolium  
assay (MTA) to assess growth and drug sensitivity of  
human tumor cell lines.  
Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 1986, 27, p. 389.
- 4 - ALLEY M.C., SCUDIERO D.A., MONKS A., HURSEY M.L.,  
CZERWINSKI M.J., FINE D.L., ABBOTT B.J., MAYO J.G.,  
SHOEMAKER R.H. et BOYD M.R.  
Feasibility of drug screening with panels of human  
tumor cell lines using a microculture tetrazolium  
assay.  
Cancer Res., 1988, 48, p. 584-601.
- 5 - ALTMAN F.P.  
Studies on the reduction of tetrazolium salts.III.  
The products of chemical and enzymic reduction.  
Histochemie, 1974, 38, p. 155-171.

- 6 - ALTMAN F.P.  
Tetrazolium salts and formazans, in : PROGRESS IN HISTOCHEMISTRY AND CYTOCHEMISTRY.  
Stuttgart, Allemagne : Gustav Fischer Verlag,  
1976, p.29.
- 7 - ARNOULD R., DUBOIS J., ABIKHALIL F., LIBERT A., GHANEM G., ATASSI G., HANOCQ M. et LEJEUNE F.J.  
Comparison of tow cytotoxicity assays - tetrazolium derivative reduction (MTT) and tritiated thymidine uptake-on three malignant mouse cell lines using chemotherapeutic agents and investigational drugs.  
Anticancer Res., 1990, 10, p. 145-154.
- 8 - AYISI N.K., GUPTA S.V. et QUALTIERE L.F.  
Modified tetrazolium-based colorimetric method for determining the activities of anti-HIV compounds.  
J. Virol. Methods, 1991, 33, p. 335-344.
- 9 - BABA M., NAKAJIMA M., SCHOLS D., PAUWELS R., BALZARINI J. et DE CLERCQ E.  
Pentosan polysulfate, a sulfated oligosaccharide, is a potent and selective anti-HIV agent *in vitro*.  
Antiv. Res., 1988, 9, p. 335-343.
- 10 - BANK U., REINHOLD D. et ANSORGE S.  
Measurement of cellular activity by means of the MTT-test. Optimization of the method.  
Allerg. Immunol., 1991, 37, p. 119-123.
- 11 - BEAUSSOLEIL S., BOSGIRAUD C. et NICOLAS J.A.  
Inhibition *in vitro* du virus Visna par l'AZT, la 2',3' - didésoxycytidine et la suramine.  
Revue Méd. Vét., 1991, 142, p.557-560.

- 12 - BERGAMINI A., PERNO C.F., CAPOZZI M.,  
MANNELLA E., SALANITRO A., CALIO R. et ROCCHI G.  
A tetrazolium-based colorimetric assay for  
quantification of HIV-1-induced cytopathogenicity  
in monocyte-macrophages exposed to macrophage-  
colony-stimulating factor.  
J. Virol. Methods, 1992, 40, p. 275-286.
- 13 - BOSGIRAUD (Claudine)  
Le virus Visna-Maedi : Etude ultrastructurale et mise au  
point des réactions ELISA et Immunoblot. 278 p., 30 cm.  
(Thèse Docteur-ès-Sci. Pharm., Limoges, 1987, n°302 B).
- 14 - BRATT M.A. et GALLAHER W.R.  
Biological parameters of fusion from within and fusion  
from without, in membran research.  
First ICN-UCLA symposium on molecular biology,  
Fox C.F. ed., 1972, p. 383-406.
- 15 - CARMICHAEL J., DE GRAFF W.G., GAZDAR A.F., MINNA J.D.  
et MITCHELL J.B.  
Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated  
colorimetric assay : Assessment of chemosensitivity  
testing.  
Cancer Res., 1987, 47, p. 936-942.
- 16 - CARMICHAEL J., DE GRAFF W.G., GAZDAR A.F.,  
MINNA J.D. et MITCHELL J. B.  
Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated  
colorimetric assay : Assessment of radiosensitivity.  
Cancer Res., 1987, 47, p. 943-946.

- 17 - CHEVALERIAS (Béatrice)  
Méthode colorimétrique basée sur le bromure de 3 - (4,5 -diméthylthiazol - 2 - yl) - 2,5 - diphényltétrazolium.  
204 p., 30 cm.  
(Thèse Pharm., Limoges, 1995).
- 18 - CORY A.H., OWEN T.C., BARLTROP J.A. et CORY J.G.  
Use of an aqueous soluble tetrazolium /formazan assay for cell growth assays in culture.  
Cancer Commun., 1991, 3, p. 207-212.
- 19 - DENIZOT F. et LANG R.  
Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability.  
J. Immunol. Methods, 1986, 89, p. 271-277.
- 20 - FRANK K.B., Mc KERNAN P.A., SMITH R.A. et SMEE D.F.  
Visna virus as an *in vitro* model for human immunodeficiency virus and inhibition by ribavirin, phosphonoformate, and 2',3'-dideoxynucleosides.  
Antimicrob. Agent. Chemother., 1987, 31, p. 1369-1374.
- 21 - GERLIER D. et THOMASSET N.  
Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation.  
J. Immunol. Methods, 1986, 94, p. 57-63.
- 22 - GREEN L.M., READE J.L. et WARE C.F.  
Rapid colorimetric assay for cell viability : Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines.  
J. Immunol. Methods, 1984, 70, p. 257-268.

- 23 - HANSEN M.B., NIELSEN S.E. et BERG K.  
Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/ cell kill.  
J. Immunol. Methods, 1989, 119, p. 203-210.
- 24 - HUSSAIN R.F., NOURI A.M.E. et OLIVER R.T.D.  
A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay.  
J. Immunol. Methods, 1993, 160, p. 89-96.
- 25 - JABBAR S.A.B., TWENTYMAN P.R. et WATSON J.V.  
The MTT assay underestimates the growth inhibitory effects of interferons.  
Br. J. Cancer, 1989, 60, p. 523-528.
- 26 - LARROUTUROU (Sylvie)  
Activité *in vitro* de substances antirétrovirales contre le virus Visna-Maedi. Evaluation de plusieurs méthodes - 216 p., 30 cm.  
(Thèse Doct. Pharm., Limoges, 1993, n° 302B).
- 27 - LEMAITRE M., GUETARD D., HENIN Y., MONTAGNIER L. et ZERIAL A.  
Protective activity of tetracycline analogs against the cytopathic effect of the human immunodeficiency viruses in CEM cells.  
Res. Virol., 1990, 141, p. 5-16.
- 28 - LEMAITRE M. et ZERIAL A.  
Méthodes permettant le criblage et l'évaluation *in vitro* d'activités inhibitrices de la réplication du VIH.  
Revue Française des Laboratoires, 1990, 216, p.43-50.

- 29 - MICCO (de) Ph., PAUTRAT G., BENKOEL L., POUGET M.M.  
et TAMALET J.  
Etude cinétique et ultrastructurale de la fusion de  
fibroblastes de mouton induite par le polyéthylène-  
glycol. Comparaison avec la fusion endogène induite par  
le virus Visna.  
C.R. Soc. Biol., 1978, 172, p. 122-129.
- 30 - MICCO (de) (Philippe)  
Etude du pouvoir fusionnant *in vitro* d'agents  
responsables de maladies lentes du système nerveux  
central.  
Mémoire D.E.R.B.H., Marseille, 1977.
- 31 - MICCO (de) Ph. et TAMALET J.  
Mise au point d'une méthode d'étude de la fusion  
cellulaire induite *in vitro* par les virus.  
C.R. Soc. Biol., 1979, 173, p. 110-116.
- 32 - MOSMANN T.  
Rapid colorimetric assay for cellular growth and  
survival : Application to proliferation and cytotoxicity  
assays.  
J. Immunol. Methods, 1983, 65, p. 55-63.
- 33 - NAKASHIMA H., PAUWELS R., BABA M., SCHOLS D.,  
DESMYTER J. et DE CLERQ E.  
Tetrazolium-based plaque assay for HIV-1 and HIV-2  
and its use in the evaluation of antiviral compounds.  
J. Virol. Methods, 1989, 26, p. 319-329.

- 34 - OKA M., MAEDA S., KOGA N. KATO K. et SAITO T.  
A modified colorimetric MTT assay adapted for primary cultured hepatocytes : Application to proliferation and cytotoxicity assays.  
Biosci. Biotech. Biochem., 1992, 56, p.1472-1473.
- 35 - PAGLIACCI M.C., SPINOZZI F., MIGLIORATI G., FUMI G., SMACCHIA A., GRIGNANI F., RICCARDI C. et NICOLETTI I.  
Genistein inhibits tumour cell growth *in vitro* but enhances mitochondrial reduction of tetrazolium salts : A further pitfall in the use of the MTT assay for evaluating cell growth and survival.  
Eur. J. Cancer, 1993, 29 A, p. 1573-1577.
- 36 - PAUWELS R., BALZARINI J., BABA M., SNOECK R., SCHOLS D., HERDEWIJN P., DESMYTER J. et DE CLERQ E.  
Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds.  
J. Virol. Methods, 1988, 20, p. 309-321.
- 37 - PAUTRAT G., BENKOEL L., DE MICCO Ph. et TAMALET J.  
Aspects ultrastructuraux de la fusion cellulaire induite par le virus Visna sur cultures cellulaires de plexus choroïdes de mouton.  
C.R. Acad. Sci. Paris, série D, 1977, 285, p. 733-736.
- 38 - PAUTRAT (Gérard)  
Le virus Visna : Aspects ultrastructuraux et recherches *in vitro* sur le cycle infectieux et sur la fusion cellulaire viro-induite, 109 p. , 30 cm.  
(Thèse Docteur-ès-Sciences, Aix-Marseille III, 1978).

- 39 - PAUTRAT G. et BENKOEL L.  
Adenosine triphosphatase activity during fusion of cultured sheep choroid plexus cells induced by either Visna virus or polyethylene-glycol.  
Cell. Mol. Biol., 1978, 23, p. 349-354.
- 40 - PAYMENT (Pierre), TRUDEL (Michel)  
Manuel de techniques virologiques.  
Paris : Ellipses, 1989, 350 p., 26 cm.
- 41 - PLUMB J.A., MILROY R. et KAYE S.B.  
Effects of the pH dependence of 3-(4,5-diméthylthiazol-2 yl)-2,5-diphényltetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay.  
Cancer Res., 1989, 49, p. 4435-4440.
- 42 - PRICE P. et Mc MILLAN T.J.  
Use of the tetrazolium assay in measuring the response of human tumor cells to ionizing radiation.  
Cancer Res., 1990, 50, p. 1392-1396.
- 43 - PROFESSEURS (les) et MAITRES DE CONFERENCES DE BACTERIOLOGIE et VIROLOGIE MEDICALES; MAMMETTE A.  
Virologie Médicale : à l'usage des étudiants et des praticiens.  
La Madeleine : Crouan et Roques, 1992 (14<sup>ième</sup> Edition), 469 p., 24 cm.
- 44 - RUBINO K.L. et NICHOLAS J.A.  
A novel, spectrophotometric microneutralization assay for respiratory syncytial virus.  
J. Virol. Methods, 1992, 39, p. 55-67.

- 45 - SANDBERG H.E.  
Proceedings of the international workshop on  
technology for protein separation and improvement of  
blood plasma fractionations.  
U.S. Dept. Health, Education, Welfare, Publ.  
n° (NIH) 78-1422, USA, 1977.
- 46 - SCHWARTZ O., HENIN Y., MARECHAL V. et MONTAGNIER L.  
A rapid and simple colorimetric test for the study  
of anti-HIV agents.  
AIDS Res. Hum. Retrov., 1988, 4, p. 441-448.
- 47 - SCUDIERO D.A., SCHOEMAKER R.H., PAULL K.D., MONKS A.,  
TIERNEY S., NOFZIGER T.H., CURRENS M.J., SENIEFF D. et  
BOYD M.R.  
Evaluation of a soluble tetrazolium / formazan assay  
for cell growth and drug sensitivity in culture using  
human and other tumor cell lines.  
Cancer Res., 1988, 48, p. 4827-4833.
- 48 - SIGURDSSON B.  
Rida : a chronic encephalitis of sheep with general  
remarks on infections which develop slowly and some  
of their special characteristics.  
Brit. Vet. J., 1954, 110, p. 341-354.
- 49 - SIGURDSSON B., THORMAR H. et PALSSON P.A.  
Cultivation of Visna virus in tissue culture.  
Arch. Ges. Virus., 1960, 10, p. 368-381.

- 50 - SLATER T.F., SAWYER B. et STRAULI U.  
Studies on succinate-tetrazolium reductase systems.  
III. Points of coupling of four different tetrazolium salts.  
Biochim. Biophys. Acta., 1963, 77, p. 383-393.
- 51 - SOBOTKA S.B. et BERGER M.R.  
Assessment of antineoplastic agents by MTT assay :  
partial underestimation of antiproliferative properties.  
Cancer Chemother. Pharmacol., 1992, 30, p. 385-393.
- 52 - STEVENS M.G., KEHRLI Jr. M.E. et CANNING P.C.  
A colorimetric assay for quantitating bovine neutrophil  
bactericidal activity.  
Vet. Immunol. Immunopathol., 1991, 28, p. 45-56.
- 53 - SUDO K., KONNO K., YOKOTA T. et SHIGETA S.  
A sensitive assay system screening antiviral compounds  
against herpes simplex virus type 1 and type 2.  
J. Virol. Methods, 1994, 49, p. 169-178.
- 54 - TAKEUCHI H., BABA M. et SHIGETA S.  
An application of tetrazolium (MTT) colorimetric  
assay for the screening of anti-herpes simplex virus  
compounds.  
J. Virol. Methods, 1991, 33, p. 61-71.
- 55 - THORMAR H., BALZARINI J., HOLY A., JINDRICH J.,  
ROSENBERG I., DEBYSTER Z., DESMYTER J. et DE CLERCQ E.  
Inhibition of Visna virus replication by 2', 3'-  
dideoxynucleosides and acyclic nucleoside phosphonate  
analogs.  
Antimicrob. Agent. Chemother., 1993, 37, p. 2540-2544.

- 56 - TWENTYMAN P.R. et LUSCOMBE M.  
A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity.  
Br. J. Cancer, 1987, 56, p. 279-285.
- 57 - TWENTYMAN P.R., FOX N.E. et REES J.K.H.  
Chemosensitivity testing of fresh leukaemia cells using the MTT colorimetric assay.  
Br. J. Haematol., 1989, 71, p. 19-24.
- 58 - ULUDAG H. et SEFTON M.V.  
Colorimetric assay for cellular activity in microcapsules.  
Biomaterials, 1990, 11, p. 708-712.
- 59 - VAN DE LOOSDRECHT A.A., NENNIE E., OSSENKOPPELE G.J.,  
BEELEN R.H.J. et LANGENHUIJSEN M.M.A.C.  
Cell mediated cytotoxicity against U937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay.  
J. Immunol. Methods, 1991, 141, p. 15-22.
- 60 - VISTICA D.T., SKEHAN P., SCUDIERO D., MONKS A.,  
PITTMAN A. et BOYD M.R.  
Tetrazolium-based assays for cellular viability : A critical examination of selected parameters affecting formazan production.  
Cancer Res., 1991, 51, p. 2515-2520.
- 61 - WATANABE W., KONNO K. IJICHI K., INOUE H.,  
YOKOTA T. et SHIGETA S.  
MTT colorimetric assay system for the screening of anti-orthomyxo- and anti-paramyxoviral agents.  
J. Virol. Methods, 1994, 48, p. 257-265.

- 62 - WEISLOW O.S., KISER R., FINE D.L., BADER J.,  
SHOEMAKER R.H. et BOYD M.R.  
New soluble-formazan assay for HIV-1 cytopathic effects:  
Application to high-flux screening of synthetic and  
natural products for AIDS-antiviral activity.  
J. Natl. Cancer Inst., 1989, 81, p. 577-586.
- 63 - WEMME H., PFEIFER S., HECK R. et MULLER-QUERNHEIM J.  
Measurement of lymphocyte proliferation : Critical  
analysis of radioactive photometric methods.  
Immunobiol., 1992, 185, p. 78-89.
- 64 - WILSON J.K., SARGENT J.M., ELGIE A.W., HILL J.G. et  
TAYLOR C.G.  
A feasibility study of the MTT assay for  
chemosensitivity testing in ovarian malignancy.  
Br. J. Cancer, 1990, 62, p. 189-194.

**TABLE DES TABLEAUX**

**ET DES FIGURES**

**TABLEAUX**

	Pages
<u>Tableau I</u> : Variation de la production de formazan par les cellules P.C. en fonction de la concentration en MTT dans le milieu.	54
<u>Tableau II</u> : Production du formazan par des cellules de P.C. en fonction du temps d'incubation des cellules avec le MTT.	56
<u>Tableau III</u> : Influence du volume du solvant d'extraction sur les valeurs de D.O..	56
<u>Tableau IV</u> : Stabilité de la coloration du formazan, dans l'isopropanol acidifié / Triton X-100, au cours du temps.	61
<u>Tableau V</u> : Pourcentages de D.O. des cellules infectées par rapport au témoin cellules pour six manipulations différentes.	69
<u>Tableau VI</u> : Influence de fortes multiplicités d'infection sur un tapis de $1.10^4$ cellules/puits.	76
<u>Tableau VII</u> : Influence de fortes multiplicités d'infection sur un tapis de $2.10^4$ cellules/puits.	77
<u>Tableau VIII</u> : Influence du temps de contact de l'inoculum viral avec un tapis constitué de $2.10^4$ cellules/puits.	77
<u>Tableau IX</u> : Influence du pH des solvants sur la solubilisation du formazan produit par un tapis de cellules de P.C. non infectées.	87

<u>Tableau X</u> : Influence du volume du DMSO sur les valeurs de D.O..	94
<u>Tableau XI</u> : Variation des valeurs des D.O. en fonction du temps d'agitation de la plaque sur un agitateur mécanique de plaques.	96
<u>Tableau XII</u> : Comparaison de différentes techniques d'agitation pour solubiliser les cristaux de formazan.	96
<u>Tableau XIII</u> : Stabilité de la coloration du formazan dans le DMSO à la température ambiante, au cours du temps.	98
<u>Tableau XIV</u> : Effet de la quantité de S.V.F. sur le développement du virus Visna, en fonction de la concentration cellulaire initiale et après 7 jours d'incubation.	105
<u>Tableau XV</u> : Pourcentages de viabilité des cellules de P.C. non infectées, traitées par une molécule, mesurés par l'épreuve d'exclusion au bleu Trypan.	110
<u>Tableau XVI</u> : Activité antivirale de l'AZT sur la souche Visna. Les pourcentages de protection sont mesurés par l'inhibition de l'altération de la viabilité des cellules infectées et par l'inhibition de l'E.C.P..	110

**FIGURES**

	Pages
<u>Figure 1</u> : Structure chimique de l'AZT et du MR 13095.	37
<u>Figure 2</u> : Structure chimique du MTT et de son formazan.	37
<u>Figure 3</u> : Réduction du MTT par les cellules MDBK en fonction du nombre de cellules par puits et pour deux temps d'incubation des cellules.	51
<u>Figure 4</u> : Réduction du MTT par les cellules de P.C. en fonction du nombre de cellules par puits, après 24 heures d'incubation précédées ou non d'un traitement des cellules par la chaleur.	51
<u>Figure 5</u> : Réduction du MTT par les cellules de P.C. en fonction du nombre de cellules par puits et avec deux concentrations finales en MTT.	54
<u>Figure 6</u> : Effet sur les D.O. de l'aspiration de 50 µl ou de la totalité du surnageant, avant l'addition du solvant d'extraction du formazan sur un tapis de cellules de P.C.	58
<u>Figure 7</u> : Réduction du MTT par les cellules de P.C. en fonction de la concentration cellulaire initiale et après différents temps d'incubation des tapis cellulaires.	63

- Figure 8 : Réduction du MTT par des cellules de P.C. ayant subi un nombre de passages différent, en fonction du temps d'incubation et pour deux concentrations cellulaires initiales. 64
- Figure 9 : Protocole original de Pauwels et Coll. (36) et final de l'essai colorimétrique au MTT. 66
- Figure 10 : Relation entre la concentration cellulaire initiale et les pourcentages de D.O. cellules infectées sur cellules non infectées, à divers temps d'incubation. 73
- Figure 11 : Effet de la quantité croissante de virus sur des tapis de  $1.10^4$ ,  $2.10^4$  et  $3.10^4$  cellules/puits, à divers temps d'incubation. 74
- Figure 12 : Variation des pourcentages de D.O. cellules infectées sur cellules non infectées en fonction de la quantité de S.V.F., à divers temps d'incubation et avec trois concentrations cellulaires initiales de :  $1.10^4$  cellules/puits,  $2.10^4$  cellules/puits et  $3.10^4$  cellules/puits. 79
- Figure 13 : Réduction du MTT par les cellules de P.C., infectées ou non, à divers temps d'incubation et avec trois concentrations cellulaires initiales :  $1.10^4$  cellules/puits,  $2.10^4$  cellules/puits et  $3.10^4$  cellules/puits. Comparaison avec les valeurs des D.O. moyennes obtenues à J0. 82
- Figure 14 : Capacité de différents solvants à extraire le formazan de cellules de P.C. non infectées, pour deux concentrations cellulaires initiales. 85

- Figure 15 : Spectre d'absorption du formazan dans le DMSO et du MTT dans le P.B.S.. 90
- Figure 16 : Réduction du MTT par un tapis cellulaire de 24 heures en fonction de la concentration finale en MTT dans le milieu et de la concentration cellulaire initiale. 92
- Figure 17 : Relation entre le nombre de cellules par puits et la quantité de MTT réduite, en fonction du solvant d'extraction du formazan. 99
- Figure 18 : Réduction du MTT par les cellules de P.C. en fonction de la concentration cellulaire initiale par puits et après différents temps d'incubation des tapis cellulaires. 101
- Figure 19 : Relation entre la concentration cellulaire initiale et les pourcentages de D.O. cellules infectées sur cellules non infectées, après 6 et 7 jours d'incubation. 103
- Figure 20 : Effet de la quantité croissante de virus sur la viabilité de tapis constitués de différentes concentrations de cellules, après 7 jours d'incubation. 105
- Figure 21 : Toxicité du MR 13095 sur la croissance des cellules de P.C.. 108
- Figure 22 : Toxicité de l'AZT sur la croissance des cellules de P.C.. 108

**TABLE DES MATIERES**

	Pages
<b>PLAN</b>	8
<b>INTRODUCTION</b>	13
<b>Première partie : MATERIELS ET METHODES</b>	19
1 - <i>CULTURES CELLULAIRES</i>	20
1-1 Les cellules MDBK	20
1-2 Les cellules de plexus choroïde de mouton	22
1-2-1 Intérêts et description	23
1-2-2 Obtention des cellules à partir d'explants	23
1-2-3 Entretien des cultures	26
2 - <i>INFECTION VIRALE</i>	28
2-1 Souche virale	28
2-2 Effet cytopathique du virus Visna-Maedi	29
2-3 Constitution d'un pool viral	30
2-4 Titrage du virus Visna-Maedi	31
2-5 Infection de cellules de plexus-choroïde en microplaque	33
3 - <i>LES REACTIFS</i>	34
4 - <i>EPREUVE D'EXCLUSION AU BLEU TRY PAN</i>	36
5 - <i>METHODE AU MAY-GRÜN WALD / GIEMSA</i>	39
5-1 Technique de la coloration au May Grünwald / Giemsa	39
5-2 Applications de la coloration au May Grünwald/ Giemsa	40
5-2-1 Détermination de la cytotoxicité	40

5-2-2 Détermination de l'activité antivirale	41
<b>6 - METHODE AU MTT</b>	<b>42</b>
6-1 Principe	42
6-2 Protocole de la méthode de Pauwels et coll. (36)	43
6-3 Mesure de l'altération de la viabilité cellulaire	44
6-4 Applications de la méthode colorimétrique au MTT	45
6-4-1 Détermination de la cytotoxicité	45
6-4-2 Détermination de l'activité antivirale	46
 <b>Deuxième partie : RESULTATS</b>	 <b>47</b>
 <i>1 - UTILISATION DU MELANGE ISOPROPANOL ACIDIFIE / TRITON X-100 COMME SOLVANT D'EXTRACTION DU FORMAZAN</i>	 <b>48</b>
1-1 Optimisation de la méthode colorimétrique de Pauwels et Coll. (36)	48
1-1-1 Vérification du principe de la méthode au MTT	49
1-1-2 Concentration en MTT	52
1-1-3 Temps d'incubation des cellules de plexus choroïde avec le MTT	55
1-1-4 Volume du solvant d'extraction	57
1-1-5 Volume du surnageant à enlever avant l'addition du solvant d'extraction	57
1-1-6 Stabilité de la coloration du formazan	59

1-1-7 Etude de la relation de proportionnalité au cours du temps	62
1-1-8 Effet du nombre de passage des cellules	62
1-1-9 Protocole final	65
1-2 Application de la méthode au MTT au système cellules/virus	67
1-2-1 Premiers essais : premiers problèmes	68
1-2-2 Etude des différents paramètres	70
1-2-2-1 La concentration cellulaire initiale	72
1-2-2-2 Le virus	72
a) Influence de la quantité de virus	72
b) Effet du temps de contact de l'inoculum viral avec le tapis cellulaire	75
1-2-2-3 Le pourcentage de sérum de veau foetal	78
1-2-2-4 Le temps d'incubation du tapis cellulaire	80
2 - UTILISATION DU DIMETHYL SULFOXYDE COMME SOLVANT D'EXTRACTION DU FORMAZAN	83
2-1 Essai de différents solvants	83
2-1-1 Comparaison de six solvants d'extraction	84
2-1-2 Influence du pH	86
2-1-3 Choix d'un solvant	88
2-2 Vérification de certains paramètres de l'essai au MTT	88
2-2-1 Spectre d'absorption du formazan dans le DMSO	89

2-2-2	Concentration en MTT	91
2-2-3	Volume du solvant d'extraction	93
2-2-4	Agitation du solvant d'extraction	93
2-2-5	Stabilité de la coloration du formazan dans le DMSO	97
2-2-6	Vérification de la relation de proportionnalité	97
2-2-6-1	Après 24 heures d'incubation	97
2-2-6-2	Au cours du temps	100
2-3	Application de la méthode au MTT au système cellules/virus	102
2-3-1	Effet du temps d'incubation du tapis cellulaire	102
2-3-2	Effet de la concentration cellulaire	102
2-3-3	Effet de la quantité de virus	104
2-3-4	Effet du pourcentage de sérum de veau foetal	104
2-3-5	Conditions d'un dosage antiviral	106
2-4	Application de la méthode au MTT à l'étude de deux molécules antivirales	107
2-4-1	Détermination de la cytotoxicité	108
2-4-2	Mesure de l'activité antivirale vis-à-vis du virus Visna	109
<b>Troisième partie : DISCUSSION</b>		112
<b>CONCLUSION</b>		141
<b>ABREVIATIONS</b>		146
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>		148
<b>TABLE DES TABLEAUX ET DES FIGURES</b>		161
<b>TABLE DES MATIERES</b>		167



CHEVALERIAS (Delphine) - Adaptation de la méthode colorimétrique au sel de tétrazolium à l'évaluation de la viabilité de cellules infectées par le virus Visna. - 171 f. ; 22 ill. ; 16 tabl. ; 30 cm (Thèse Pharm., Limoges, 1995)

Résumé :

L'essai colorimétrique basé sur l'utilisation du bromure de 3 - (4,5 - diméthylthiazol-2-yl) - 2,5 - diphényltétrazolium (MTT) est une méthode de mesure de la viabilité cellulaire. Elle est adaptée à l'évaluation *in vitro* de l'effet antiviral de substances, sur culture de cellules en microplaques.

Notre système cellulaire est constitué de cellules fibroblastiques primaires de plexus choroïde de mouton qui sont permissives au lentivirus Visna-Maedi. Le virus Visna-Maedi présentent des analogies avec le V.I.H.-1.

A partir du protocole de la technique au MTT choisi par Pauwels et coll. (1988) pour l'étude d'agents anti-V.I.H., nous avons établi notre propre mode opératoire. La mise au point de la méthode, sur cellules non infectées puis sur cellules infectées par la souche Visna K 796 du lentivirus, s'est déroulée en deux étapes correspondant à l'utilisation successive de deux solvants : l'isopropanol acidifié/ Triton X-100 et le diméthyl sulfoxyde (DMSO).

Lors de notre travail expérimental, nous avons rencontré deux problèmes : une sensibilité réduite de l'essai au MTT et une surestimation de la viabilité des cellules infectées. La modification du système de solvants et l'allongement de la durée d'incubation des cellules ont nettement amélioré la méthodologie.

Mots-clés :

- bromure de 3 - (4,5 - diméthylthiazol - 2 - yl)-2,5 - diphényltétrazolium
- sel de tétrazolium
- cultures cellulaires
- plexus choroïde
- virus Visna
- isopropanol acidifié/ Triton X-100
- diméthyl sulfoxyde



Jury :

Président : Madame C. BOSGIRAUD, Professeur

Juges : Madame S. DELEBASSEE, Maître de Conférences

Monsieur A. ORABONA, Pharmacien