

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE

Année 1995



Thèse n° 31

**METHODE COLORIMETRIQUE BASEE SUR
LE BROMURE 3-(4,5-DIMETHYLTHIAZOL-2-YL)
-2,5-DIPHENYLTETRAZOLIUM**

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT

DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le *26 Juin 1995*

par

Béatrice CHEVALERIAS

née le 3 Septembre 1969 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

ASSESEURS : 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

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

*Je peux avoir
... toute la connaissance,
... si je n'ai pas l'Amour
je ne suis rien.*

Saint Paul (1 Cor. 13.2)

A mes parents

A Dominique

A Delphine

En souvenir de Philippe MAUPAS

A Madame Claudine BOSGIRAUD

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

Je vous remercie de l'honneur que vous me faites en acceptant de présider le jury de cette thèse.

Je vous remercie sincèrement de m'avoir accueillie avec une grande gentillesse dans votre Laboratoire afin de me permettre de collaborer aux expériences de ma soeur Delphine. Cette participation m'a été d'un grand secours dans le travail de recherche, de compréhension et de synthèse, indispensables pour la rédaction de cette thèse.

Je vous prie de croire, Madame, à ma vive reconnaissance et à mon profond respect.

A Madame Sylvie DELEBASSEE

Maître 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.

Votre assistance au cours de nos expériences
nous a été précieuse, je vous en suis reconnaissante.

Je vous remercie de votre aide et de vos
conseils prodigués lors de la rédaction de cette thèse.

Veillez trouver ici l'expression de ma très
grande gratitude.

A Monsieur Antoine ORABONA

Pharmacien à Limoges

Je vous remercie de l'honneur que vous me
faites en acceptant de siéger à ce jury et de juger ce
travail.

Soyez assuré de ma reconnaissance pour
m'avoir accueillie chaleureusement dans votre officine en
tant que stagiaire, et de mon profond respect.

J'adresse également mes remerciements à :

Monsieur Jean-François LAGORCE

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

qui nous a permis d'utiliser son Lecteur
ELISA.

Madame Roseline MOUZET

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

qui nous a aidées dans la manipulation
d'appareils et l'entretien du matériel.

PLAN

INTRODUCTION

Chapitre premier : GENERALITES

1.1 Structure et propriétés chimiques du MTT
et de son formazan

1.2 Réduction du sel de tétrazolium MTT

1.2.1 Principe général et remarques

1.2.2 Mécanisme de la réduction

1.2.3 Localisation subcellulaire de la
réduction du MTT

1.3 Propriétés optiques du MTT et de son formazan

Chapitre deuxième : METHODOLOGIES

2.1 Principe de la méthode colorimétrique au MTT

2.2 La méthode de référence

2.3 Les divers modes opératoires

2.3.1 Les cellules et le milieu de culture

2.3.2 Le MTT

- 1) Préparation de la solution-stock de MTT
- 2) Utilisation de la solution

2.3.3 L'étape de solubilisation du formazan

- 1) L'étape post-incubation
- 2) Les solvants
- 3) L'étape d'agitation

2.3.4 La lecture des D.O.

2.3.5 Tableaux récapitulatifs

Chapitre troisième : ETUDE DE LA METHODE COLORIMETRIQUE AU MTT

3.1 Caractéristiques de la méthode

3.1.1 Spécificité vis-à-vis des cellules vivantes et viables

3.1.2 Relation entre la densité optique et la concentration cellulaire

3.1.3 Seuil de sensibilité

3.2 Paramètres influençant la méthode

3.2.1 Les cellules

- 1) Cultures cellulaires en monocouche
ou en suspension
- 2) Les différentes lignées cellulaires

- 3) Contamination de la culture par d'autres cellules ou par des bactéries
- 4) Les conditions de culture avant l'essai colorimétrique
- 5) L'état métabolique des cellules

3.2.2 Le milieu de culture

- 1) Le contenu en glucose
- 2) La qualité du milieu
- 3) La quantité de sérum de veau

3.2.3 Le MTT

- 1) La concentration finale en MTT
- 2) Le temps d'incubation des cellules avec le MTT

3.2.4 Le solvant

- 1) Le solvant et le milieu de culture
- 2) La composition chimique du solvant
- 3) L'agitation du solvant

3.2.5 Facteurs externes

Chapitre quatrième : COMPARAISON DE LA METHODE COLORIMETRIQUE AU MTT AVEC D'AUTRES METHODES DE MESURE DE LA VIABILITE CELLULAIRE

4.1 Comparaison avec la méthode au bleu Trypan

4.2 Comparaison avec le comptage de colonies

4.3 Comparaison avec les méthodes radioactives

4.4 Comparaison avec la méthode au rouge neutre

4.5 Comparaison avec la méthode à la sulforhodamine B

4.6 Comparaison avec un autre sel de tétrazolium :
le XTT

4.7 Comparaison avec la méthode au May-Grünwald/
Giemsa

Chapitre cinquième : APPLICATIONS DE LA METHODE COLORIMETRIQUE AU MTT

5.1 En immunologie

5.2 En cancérologie

5.3 En virologie

5.4 En bactériologie

5.5 Applications diverses

CONCLUSION

INTRODUCTION

Parmi les méthodes permettant le criblage de molécules antivirales, il existe des techniques de mesure de la viabilité cellulaire.

Elles comprennent :

* des essais traditionnels :

- le comptage direct des cellules viables
==> soit à l'aide d'un hématimètre après coloration au bleu Trypan,
==> soit à l'aide d'un compteur électronique type compteur Coulter,

- le comptage de colonies,

- des méthodes radioactives :

- ==> soit par incorporation d'un nucléotide radiomarqué tel que la thymidine tritiée,
==> soit par relargage d'un radionucléotide tel que le chrome 51.

* des essais plus récents et essentiellement colorimétriques :

- la coloration directe des cellules, par exemple, avec le rouge neutre,

- la métabolisation d'un agent en produit fluorescent ou fortement coloré :
 - ==> mesure de l'A.D.N. (acide désoxyribonucléique) cellulaire par un composé intercalant fluorescent tel que l'iodure de propidium,
 - ==> mesure de la réduction cellulaire d'un sel de tétrazolium tel que le MTT (méthylthiazolyldiphényltétrazolium).

De toutes ces nouvelles méthodes, c'est celle au MTT qui a été la plus étudiée, faisant l'objet d'un très grand nombre de publications. En effet, au cours de ces dernières années, l'essai colorimétrique au MTT a été adopté par de nombreux laboratoires de recherche.

L'utilisation des sels de tétrazolium en tant que colorants n'est pas récente. En 1947, Mattsen et coll. (67) colorent des tissus vivants avec le TTC (triphényltétrazolium). Puis, ce sel prototype est employé pour évaluer les activités oxydoréductrices de tissus normaux et cancéreux de mammifères (114) ainsi que l'impact d'agents chimiothérapeutiques sur le métabolisme cellulaire (15). Les inconvénients du TTC (réduction lente, réoxydation possible ...) ont conduit à le remplacer par d'autres sels de tétrazolium. Le MTT apparaît en science, en 1954 (14). Il est appliqué à la détection de la cytopathologie virale *in*

vitro (46). En 1959, Cooper (26) utilise l'INT (iodonitrotétrazolium) afin de mettre en évidence les plages de lyse induites par des virus, en boîte de Petri. En 1968, Le NBT (nitrobleutétrazolium) sert d'indicateur de viabilité procaryotique, en bactériologie (9, 80). Les sels de tétrazolium sont ensuite largement étudiés par Altman (4, 5) dans les années 70, pour la localisation intracellulaire d'enzymes spécifiques. En 1983, Mosmann (72) décrit la première utilisation du MTT sur culture cellulaire en microplaque, dans un essai de viabilité cellulaire afin d'évaluer la prolifération et la cytotoxicité. Cette méthode originale au MTT est alors largement reprise, modifiée et complétée, éclipsant plus ou moins les autres sels de tétrazolium.

Elle apparaît en cancérologie, en 1986 avec Cole (24) ; elle est appliquée à la virologie en 1988, par Pauwels et coll. (83), sur le V.I.H. (virus de l'immunodéficience humaine).

La nécessité pour la recherche antivirale, face au vaste fléau que représente le S.I.D.A. ou syndrome de l'immunodéficience acquise, et pour le laboratoire de virologie en particulier, de posséder une méthodologie applicable à des programmes de criblage à grande échelle, nous a incités à nous intéresser à cet essai au MTT paraissant très prometteur.

Notre travail a donc pour objet l'étude complète, mais non exhaustive dans le temps, des connaissances relatives à la microméthode colorimétrique au MTT. Nous abordons en premier des généralités sur le MTT concernant sa structure, sa réduction en formazan et son spectre. Ensuite, nous faisons une mise au point sur les différentes méthodologies publiées dans la littérature. Nous poursuivons par une étude approfondie de la méthode touchant ses caractéristiques et les paramètres qui l'influencent. Un quatrième chapitre présente une comparaison du MTT avec diverses techniques. Nous terminons cette revue bibliographique par les nombreuses applications de cet essai.

Chapitre premier :

GENERALITES

1.1 Structure et propriétés chimiques du MTT et de son formazan

Le sel de tétrazolium **MTT** ou bromure de 3 - (4,5 - diméthylthiazol- 2 - yl) - 2,5 - diphényltétrazolium est un composé organique dont la structure dérive de celle des tétrazoles (102).

Sa formule développée est représentée figure 1 :

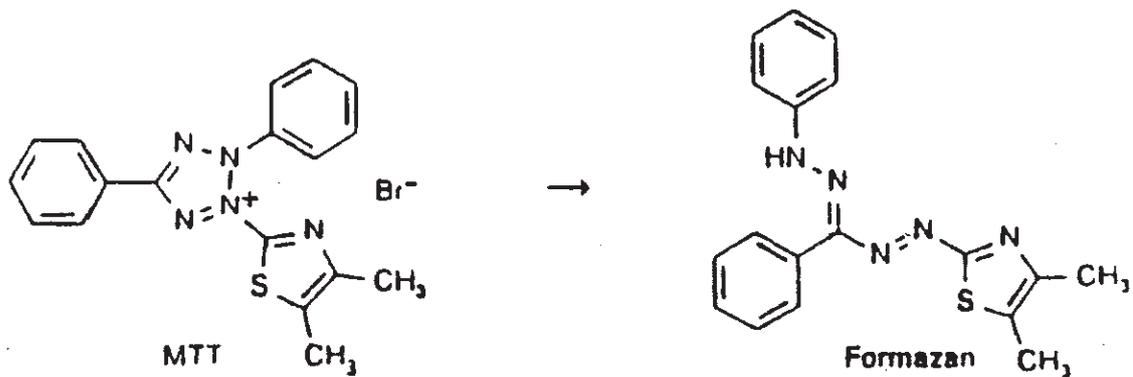


Figure 1 : Structures du tétrazolium MTT et du formazan

Le noyau insaturé à cinq sommets contient deux doubles liaisons, un carbone et quatre atomes d'azote dont un quaternaire, c'est-à-dire chargé positivement (102). Son poids moléculaire est de 414,3.

Le MTT se présente sous la forme d'une poudre jaune, soluble dans l'eau. Il est sensible aux acides, à la lumière et à l'humidité ; il doit être conservé en récipient hermétique à une température comprise entre 0 et 5°C. C'est une substance

toxique : nocive par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion.

La réduction du MTT provoque une ouverture du cycle, le produit de la réaction étant un composé neutre, coloré en bleu violet, appelé formazan (figure 1) (102).

Le **formazan** est une substance organique hautement colorée, constituée du groupe caractéristique suivant :

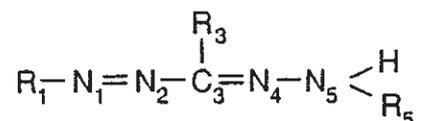


Figure 2 : Formule plane simplifiée du formazan, d'après Seidler (102).

Sa structure est caractérisée par la présence d'une forte liaison hydrogène intramoléculaire entre N₁ et N₅ formant un chélate à six sommets avec un arrangement plan (figure 3) (102).

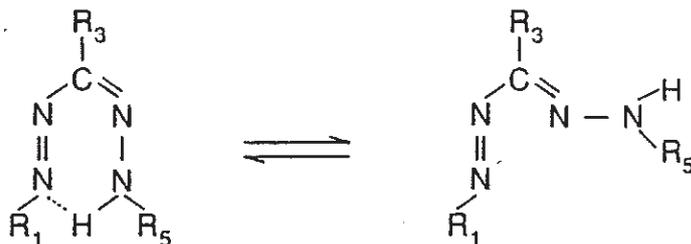


Figure 3 : Forme-cycle et forme-chaîne du formazan, d'après Seidler (102).

La stabilité de la liaison hydrogène est responsable d'une partie des propriétés chimiques du formazan, par exemple: son acidité. L'hydrogène lié peut être remplacé par des ions métalliques lourds (Cobalt, cuivre, Nickel) pour donner des chélates du métal. Comme tous les formazans, le formazan du MTT peut former un sel par exposition aux acides minéraux ou aux hydroxydes alcalins et subir un changement dans ses propriétés spectrales. Il est facilement soluble dans les solvants organiques et les lipides. Il s'agit d'un composé "photochromique", c'est-à-dire que sa solution exposée à la lumière peut changer de couleur (102).

1.2 Réduction du sel de tétrazolium MTT

1.2.1 Principe général et remarques

La réduction d'une partie de la molécule de tétrazolium nécessite la captation de deux électrons et d'un proton (H^+) par l'hétérocycle chargé positivement. Ce processus se déroule par étapes. En captant seulement un électron, l'espèce neutre "tétrazolinyle" (un radical libre) se forme (figure 4).

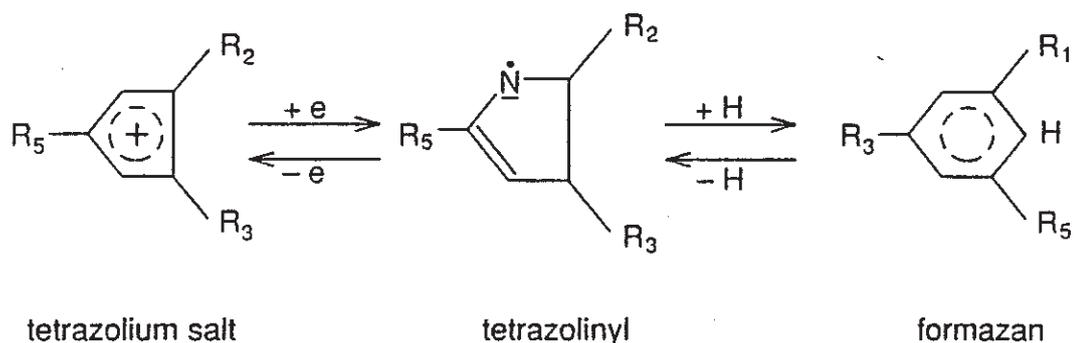
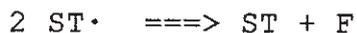


Figure 4 : Les différentes étapes de la réduction d'un sel de tétrazolium, d'après Seidler (102).

Les tétrazolinyles sont insensibles à l'oxygène mais très instables en milieu faiblement acide (eau, méthanol, etc...) où ils se transforment en formazans et en tétrazoles. Les tétrazolinyles constituent les principaux intermédiaires entre les sels de tétrazolium et les formazans : l'oxydation de ces intermédiaires donne les sels et leur réduction donne les formazans. Ils peuvent également réagir avec eux-mêmes et subir une réaction de dismutation : une molécule est oxydée tandis que l'autre est réduite :



ST : sel de tétrazolium

ST· : radical tétrazolinyle

F : formazan

L'insolubilité du formazan en milieu aqueux est telle que la réaction de déshydrogénation du sel est irréversible.

Les sels de tétrazolium sont convertis en formazans par tous les systèmes réducteurs possédant des potentiels rédox plus négatifs que celui du système tétrazolium/formazan. De nombreux systèmes réducteurs non-enzymatiques conviennent pour la réduction chimique des sels de tétrazolium de différentes réductibilités, par exemples l'ascorbate

alcalin, les sulfites, les ions ferreux, la cystéine, etc... Ces systèmes réducteurs ont permis de savoir que le MTT est un sel hautement réductible (102).

Plusieurs facteurs affectent la réduction des sels de tétrazolium. Nous ne citons ici que les plus importants :

* La sensibilité à l'oxygène :

Les études histochimiques ont permis de classer les sels de tétrazolium en deux groupes selon leur sensibilité à l'oxygène : un groupe oxygène-sensible et un groupe oxygène-insensible (4). Le MTT appartient au groupe oxygène-insensible, c'est-à-dire que sa réduction a lieu quelles que soient les conditions, aérobies ou anaérobies.

* Les transporteurs d'électrons :

La réduction d'un sel de tétrazolium peut faire intervenir des intermédiaires d'oxydoréduction comme le PMS (phénazine méthosulfate). Il s'agit de molécules exogènes de transfert d'électrons, de faibles poids moléculaires et de forte hydrosolubilité, qui remplacent les activités de la "réductase du tétrazolium" (102). Ils catalysent le transfert direct de l'hydrogène et/ou des électrons à partir des coenzymes : NADH, NADPH (Nicotinamide-adénine-dinucléotide, Nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate)

vers les sels de tétrazolium (92). Ces intermédiaires augmentent aussi la vitesse de réaction des enzymes flaviniques naturelles, par exemple la succinodeshydrogénase.

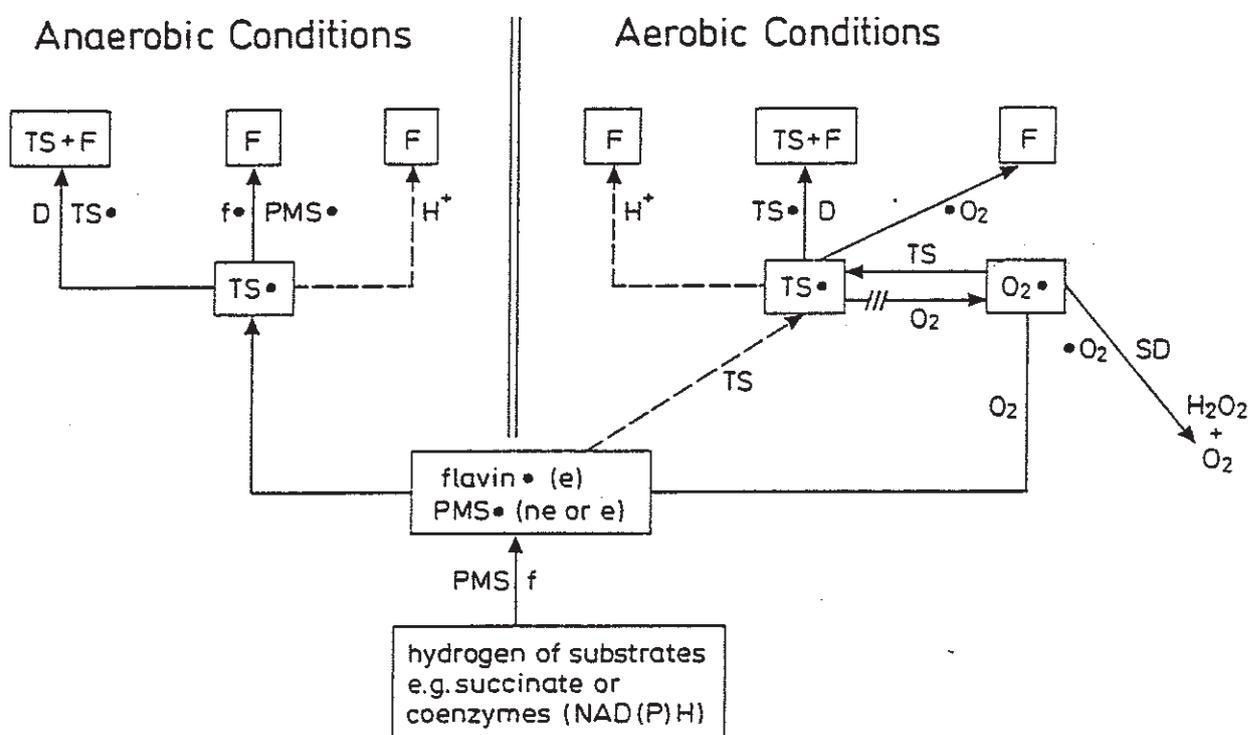
* L'action de la superoxyde dismutase (S.O.D.) :

La réduction aérobie des sels de tétrazolium par des procédés non-enzymatiques et/ou enzymatiques peut être supprimée à 95 % par l'enzyme superoxyde dismutase (35, 86, 91). Cette inhibition prouve la participation directe du radical superoxyde dans la réduction du tétrazolium.

* Certains détergents (Tween 80, Triton X-100, phospholipides, etc...) stimulent la production de formazan, par un mécanisme encore inconnu (102).

1.2.2 Mécanisme de la réduction

Le schéma de Seidler (figure 5) exposant le mécanisme de la réduction d'un sel de tétrazolium tient compte du rôle des enzymes flaviniques, du PMS, du radical superoxyde et des superoxydes dismutases.



TS tetrazolium salt
 F formazan
 H⁺ 'acidic' medium
 /// see text
 f flavin
 • radical stage
 f• flavin radical
 —→ pathway

TS• tetrazolanyl
 O₂• superoxide radical
 e enzymatically formed
 ne nonenzymatically formed
 D dismutation
 SD superoxide dismutase
 —→ possible or insignificant reaction

Figure 5 : Le mécanisme de la réduction du tétrazolium, d'après Seidler (102).

Les caractéristiques fondamentales de ce schéma sont les suivantes (102) :

- la réduction de la moitié du tétrazolium (transfert de deux électrons) a lieu par étapes, les intermédiaires étant des radicaux appelés "tétrazolinyles",

- seuls les flavines ou les systèmes flavine-like (PMS) sont capables de réduire histochimiquement et/ou biochimiquement le tétrazolium,

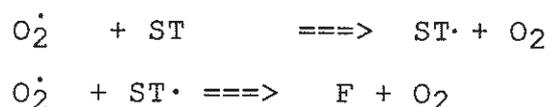
- il existe en principe une correspondance entre le potentiel rédox du sel de tétrazolium et celui des systèmes réducteurs (enzymes flaviniques, intermédiaires flavine-like et radicaux superoxydes) ainsi que celui de la S.O.D. inhibitrice. Les valeurs de ces potentiels sont proches de zéro ou dans la gamme négative la plus basse,

- les substrats et les coenzymes réduits ne réduisent pas directement les sels de tétrazolium, sous des conditions histochimiques normales,

- la réduction anaérobie s'effectue directement grâce aux radicaux flavines formés enzymatiquement. Sous des conditions aérobies, les radicaux flavines ou flavine-like réagissent préférentiellement avec l'oxygène moléculaire pour former l'espèce réactive : le radical superoxyde (O_2^{\cdot}) (77, 91).

Dans une seconde réaction, ce radical réduira non enzymatiquement le sel de tétrazolium en tétrazolinyle et/ou

en formazan si le potentiel redox du couple $O_2/O_2\dot{-}$ est plus négatif que celui du système tétrazolium/formazan :



ST : sel de tétrazolium

ST· : radical tétrazolinyle

F : formazan

Par conséquent, en présence d'oxygène, le radical superoxyde est le réducteur réel des sels de tétrazolium, par une action directe et non-enzymatique.

- Les S.O.D. catalysent fortement la dismutation des radicaux superoxydes et l'agent réduisant le tétrazolium disparaît dans le milieu, ce qui entraîne une inhibition de la production de formazan. Ainsi, les S.O.D. affectent-elles les techniques histochimiques et biochimiques aux sels de tétrazolium, en présence d'oxygène.

Donc, les sels de tétrazolium sont réduits directement par les radicaux superoxydes en présence d'oxygène, et par les flavoprotéines réduites ou les transporteurs d'électrons sous des conditions anaérobies.

Le schéma proposé est valable pour tous les sels de tétrazolium, mais il demeure provisoire. En effet, les formazans pourraient être formés non seulement par la réduction ou la dismutation des tétrazolinyles, mais aussi par leur décomposition en formazans et tétrazoles (figure 6) (102). En fait, l'analyse des produits de la réaction, en chromatographie sur couche mince montre que cette troisième réaction a lieu uniquement dans des conditions non physiologiques (non aqueuses) via une réaction du radical en milieu faiblement acide. Par conséquent, le formazan est le seul produit final de la réduction des sels de tétrazolium en solution aqueuse (103).

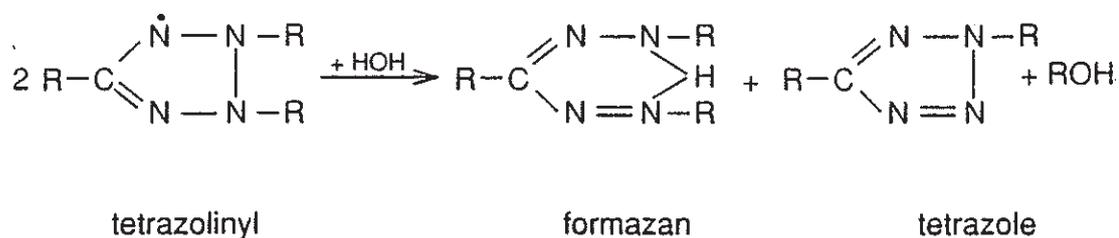


Figure 6 : Stabilisation des radicaux tétrazolinyles par décomposition en formazan et tétrazole, d'après Seidler (102).

1.2.3 Localisation subcellulaire de la réduction du MTT

En 1963, Slater et coll. (109) montrent, grâce à des inhibiteurs de la chaîne respiratoire et en présence de succinate comme donneur d'électrons, que des suspensions tissulaires de foie de rat réduisent le MTT en deux sites de la chaîne mitochondriale. Le premier se trouve au niveau de l'ubiquinone et le second implique le cytochrome C. Leurs observations sont vérifiées et confirmées trente ans plus tard, sur des plaquettes sanguines (123). D'après le mécanisme de la réduction du MTT, celui-ci a lieu en principe au niveau des flavoprotéines (102). Or, la succinate-deshydrogénase est bien une enzyme à FAD (Flavine-adénine-dinucléotide) de la membrane interne mitochondriale (128).

Cependant, des cellules de lignée lymphoblastoïde humaine (cellules Namalwa), cultivées en présence d'un toxique de l'acide nucléique mitochondrial (le bromure d'éthidium) produisent du formazan proportionnellement au nombre de cellules, comme le font les cellules non traitées (64). Les cellules n'ont donc pas besoin de mitochondries fonctionnelles pour réduire le MTT : soit la succinate-deshydrogénase est synthétisée et

fonctionne dans les membranes des mitochondries anormales, soit le MTT détecte d'autres enzymes deshydrogénases à localisation non mitochondriale.

En utilisant trois donneurs potentiels d'électrons : le succinate, le NADH et le NADPH, Berridge et Tan (13) ont recherché plus précisément la localisation subcellulaire de la réduction du MTT. Leurs résultats indiquent que la succinate deshydrogénase intervient pour moins de 10 % dans la réduction alors que le NADH y contribue à 56 %. Contrairement au succinate, la réduction mitochondriale par les cofacteurs pyridiniques est insensible aux inhibiteurs respiratoires. Par conséquent, le transport mitochondrial d'électrons joue un rôle mineur dans la réduction cellulaire du MTT et le succinate est un substrat réducteur relativement pauvre. La plus grande partie de la réduction cellulaire du MTT se déroule à l'extérieur de la membrane interne mitochondriale et implique des mécanismes NADH- et NADPH - dépendants. Il existe donc une réduction extra mitochondriale du MTT puisque les nucléotides de type NAD(P) ne traversent pas la membrane interne mitochondriale (128).

En conclusion, les travaux de Berridge et Tan (13) vont à l'encontre de l'opinion généralement admise qui

veut que la réduction du MTT ait lieu au niveau des deshydrogénases mitochondriales.

1.3 Propriétés optiques du MTT et de son formazan

* L'ion tétrazolium MTT, dissous dans du DMSO (diméthyl sulfoxyde), présente une absorption maximale unique à la longueur d'onde de 410 nm (88). De par sa structure chimique à doubles liaisons conjuguées, il absorbe fortement dans l'ultraviolet (U.V.) avec un maximum à 242 nm en solution dans l'eau ou dans un mélange eau-méthanol (102). Jusqu'à présent, l'absorption dans l'U.V. du MTT (et des autres sels de tétrazolium) n'a trouvé aucune application.

* En revanche, les caractéristiques spectrales du **formazan** dans le visible sont d'une grande importance.

Le spectre du formazan possède trois bandes d'absorption : une dans le visible et deux dans l'U.V. (102). Vu la structure chimique générale des formazans, l'absorption très intense dans le visible se situe dans le rouge. La couleur bleue du formazan du MTT dans la plupart des solvants est considérée comme une exception. En effet, les caractéristiques d'absorption de ce formazan dépendent fortement de la nature des solvants utilisés (figure 7).

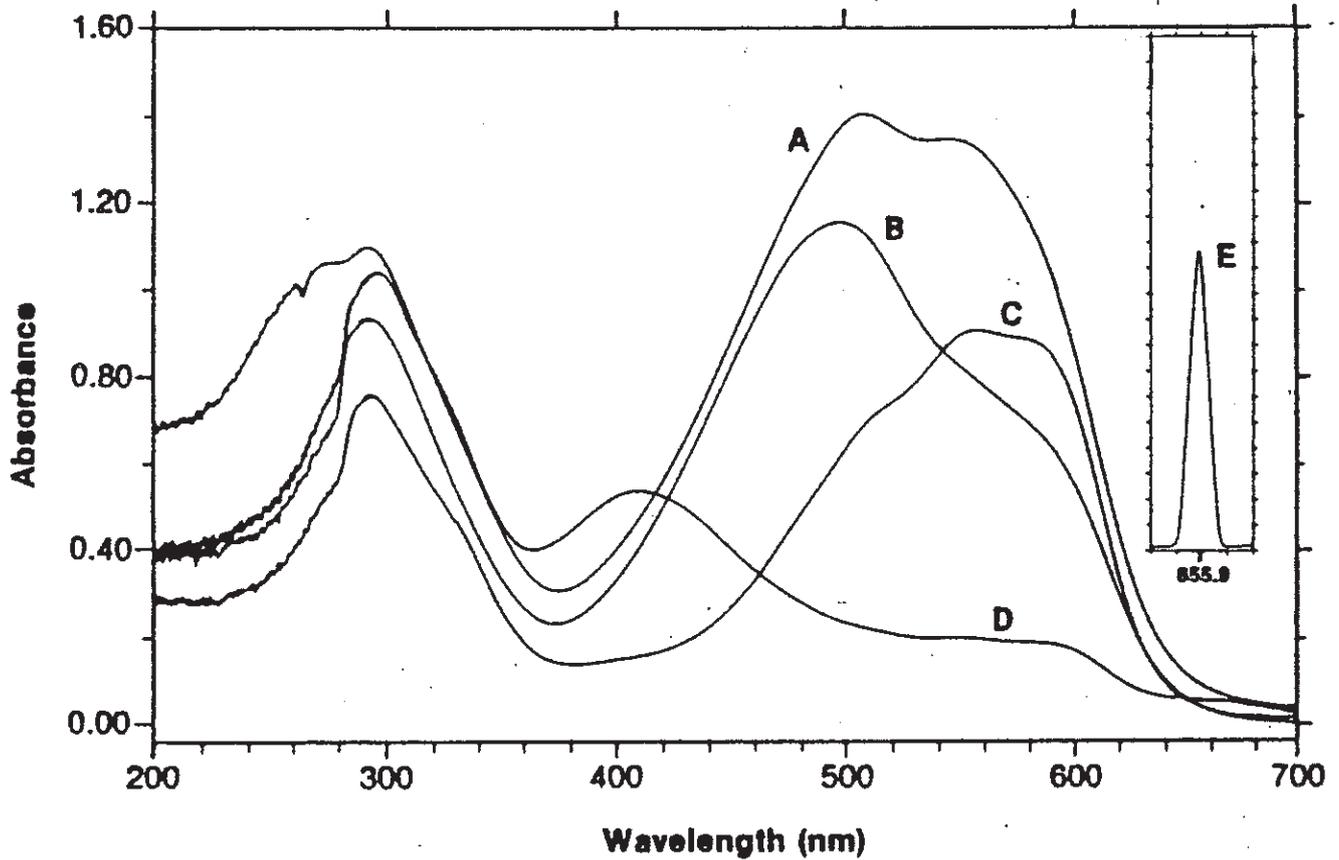


Figure 7 : Spectre d'absorption du réactif formazan (25 $\mu\text{g/ml}$) dans différents solvants. Diméthylformamide (A), DMSO (B), isopropanol (C) et isopropanol/HCl 0,04 N (D), spectre d'émission du deutérium (E). D'après Alley et coll. (3).

D'après Alley et coll. (3), le formazan du MTT obtenu par synthèse chimique présente un pic d'absorbance à :

- 506 nm dans le DMSO, avec un plus petit pic à 570 nm,
- 513 nm dans le DMF (diméthylformamide),
- 563 nm dans l'isopropanol,
- 411 nm dans l'isopropanol acidifié, avec un plus petit pic à 563 nm.

Quant au formazan provenant de la métabolisation du MTT par des cellules et dissous dans du DMSO, il absorbe au maximum entre 550 et 560 nm (3, 88).

En utilisant du DMSO contenant 1 % de sérum de veau foetal (S.V.F.), Alley et coll. (3) remarquent que la longueur d'onde du maximum d'absorbance du formazan, se déplace de 506 à 553 nm. La différence de couleur entre le réactif formazan et le formazan produit par incubation du MTT avec les cellules peut donc être attribuée à la présence ou à l'absence de S.V.F. lors de la dissolution dans le DMSO.

Selon Plumb et coll. (88), pour des concentrations cellulaires basses (4×10^3 cellules/puits), le spectre montre un pic d'absorption à 570 nm environ, alors que pour des concentrations cellulaires élevées (1×10^4 cellules/puits) le pic est beaucoup plus large et l'absorption maximale est à 510 nm (figure 8). D'autre part, si on alcalinise progressivement la solution réactif formazan/DMSO, alors le spectre glisse vers la droite sur l'échelle des longueurs d'onde et 560 nm correspond au

maximum d'absorption, au-dessus de pH 8,5 (figure 9). A pH acide (3,5), le spectre ressemble à celui du formazan obtenu chimiquement et dissous dans le DMSO, et la D.O. mesurée à 570 nm est basse.

Par conséquent, le spectre d'absorption du formazan du MTT dépend du nombre de cellules et du pH du solvant.

Ces changements de propriétés optiques sous différentes conditions, s'expliquent toujours par une modification typique dans la structure chimique du formazan, c'est-à-dire la destruction totale ou partielle de la forme chélate avec le pont-hydrogène (102).

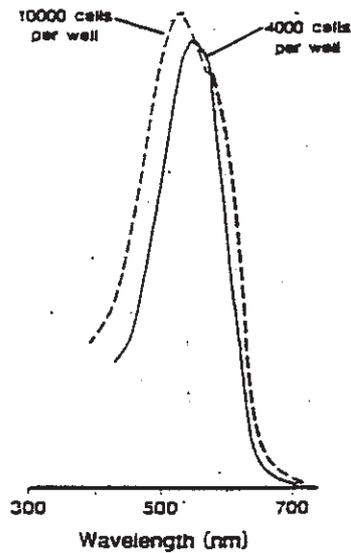


Figure 8 : Spectre d'absorption du formazan produit par incubation des cellules A 549 avec du MTT (5 mg/ml) pendant 4 h avec 4×10^3 cellules/puits et 1×10^4 cellules/puits. Les cristaux de formazan sont dissous dans du DMSO. D'après Plumb et coll. (88).

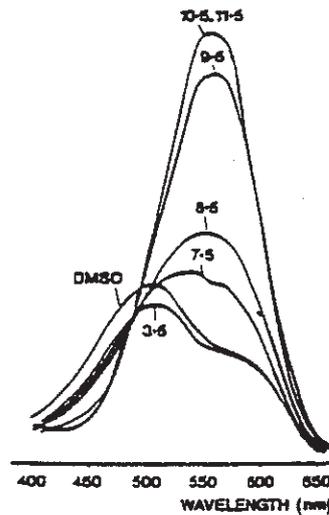


Figure 9 : Spectre d'absorption d'une solution de formazan obtenu chimiquement dans du DMSO ou dans du DMSO/glycine (200 µl/25 µl) à différents pH. D'après Plumb et coll. (88).

Chapitre deuxième :

METHODOLOGIES

2.1 Principe de la méthode colorimétrique au MTT

L'essai colorimétrique au MTT est basé sur le clivage du MTT, sel de tétrazolium jaune, en cristaux de formazan violets par diverses enzymes présentes dans les cellules métaboliquement viables (125).

Les cellules cultivées dans une plaque de 96 puits sont incubées avec la solution jaune du MTT pendant plusieurs heures (132). Les cristaux violets de formazan se forment durant cette période d'incubation. Insolubles en solution aqueuse, ils sont solubilisés dans un solvant approprié. Cette étape de solubilisation stoppe la réaction colorimétrique (109). La solution colorée résultante est quantifiée spectrophotométriquement en utilisant un lecteur de plaque ELISA, avec un filtre adéquat.

L'absorbance lue est proportionnelle à la quantité de formazan produite, elle-même proportionnelle au nombre de cellules vivantes (27) ce qui permet de les quantifier.

Cet essai peut être automatisé à l'aide de :

- pipettes multicanaux,
- diluteurs,
- distributeurs contrôlés par microprocesseur (83),

- lecteurs de densité optique (D.O.) reliés à un ordinateur possédant un programme approprié afin d'obtenir directement les courbes-résultats (63).

Il permet de traiter un grand nombre d'échantillons et fournit une mesure rapide et objective du nombre de cellules en culture (89).

2.2 La méthode de référence

C'est Mosmann (72) qui, en 1983, décrit le premier essai colorimétrique au MTT, en microculture.

Son test est réalisé sur une lignée continue de cellules T de souris, cultivées dans du milieu de culture supplémenté avec 5 à 10 % de sérum de veau foetal (S.V.F.). Les cellules sont réparties dans les 96 cupules d'une microplaque à raison de 2000 cellules/puits, dans 100 µl de milieu de culture.

Le MTT est dissous dans du tampon phosphate (P.B.S.) à 5 mg/ml, puis filtré stérilement afin d'ôter la petite quantité de résidu insoluble présent dans certains lots de MTT. La solution-stock de MTT est ajoutée aux cellules (10 µl pour 100 µl de milieu) et les plaques sont incubées à 37°C pendant 4 heures. Au cours de ce temps, les cellules vivantes réduisent le sel de tétrazolium en formazan insoluble dans le milieu de culture. Le solvant utilisé pour

dissoudre les cristaux de formazan est l'isopropanol acidifié. Son addition est suivie d'une étape d'agitation pour parfaire la dissolution du formazan. Après quelques minutes à température ambiante pour que tous les cristaux soient dissous, les microplaques sont lues sur un lecteur ELISA. La longueur d'onde test choisie est 570 nm et la longueur d'onde de référence 630 nm. La D.O. lue à 630 nm est soustraite de celle lue à 570 nm. La lecture se déroule dans l'heure qui suit la solubilisation du formazan. L'intensité de la coloration est stable pendant quelques heures à température ordinaire.

Cette méthode présente cependant plusieurs limites techniques.

Le mode opératoire décrit par Mosmann implique l'incubation des cellules avec le MTT dans le milieu de culture contenant le sérum et l'indicateur de pH : le rouge de phénol. Le formazan est ensuite solubilisé en ajoutant un volume égal d'isopropanol. Comme le rouge de phénol interfère dans les lectures d'absorbance, de l'acide chlorhydrique (HCl) est additionné afin de convertir l'indicateur coloré en sa forme acide jaune.

L'application directe de ce procédé conduit à :

- un bruit de fond élevé et variable dû à la précipitation des protéines du sérum du milieu lors de l'addition du solvant organique (27),

- une solubilisation incomplète du formazan dans le mélange final isopropanol acidifié/milieu, même après un mélange parfait (3, 27, 44, 78, 130).

Ces complications réduisent la sensibilité de l'essai et ont incité nombre d'auteurs à modifier la méthode d'origine.

2.3 Les divers modes opératoires

2.3.1 Les cellules et le milieu de culture

Les microméthodes sont effectuées dans des microplaques de 96 puits : à fond plat pour les cellules adhérentes, à fond rond pour les cellules non adhérentes. Pour les cellules en suspension, il existe également des nouvelles plaques appelées plaques de filtration Multi Screen HV à 96 puits (Millipore) (107, 108). Il s'agit de microplaques modifiées, comportant une membrane microporeuse Millipore dans chaque puits. L'ensemble est relié à un évacuateur flexible, en plastique, positionné sur un plateau stérile. Leur intérêt sera précisé plus loin.

Les macrométhodes font intervenir des plaques de 24 puits. Celles-ci permettent non seulement d'utiliser des quantités de milieu et des densités cellulaires élevées,

mais aussi de cultiver les cellules au sein d'un gel de collagène (37) ou de photographier les cultures (71). Sobottka et Berger (110) travaillent sur des puits de tailles différentes afin d'étudier de manière comparative la croissance des cellules.

Les milieux de culture sont supplémentés avec du S.V.F. en quantité variable : 10 % le plus souvent avec un minimum à 5 % (44, 56, 112) et un maximum à 30 % (59). Wemme et coll. (130) emploient un succédané de sérum : le sérum NU-IV "composé de 20 % de S.V.F et de suppléments définis".

Dans la technique de Pruett et Loftis (90), tous les tampons et milieux sont ajustés à pH 6,9-7 immédiatement avant utilisation.

2.3.2 Le MTT

1) Préparation de la solution-stock de MTT

La solution-stock de MTT est préparée par dissolution du colorant dans du P.B.S. ou parfois dans du milieu de culture (10, 107). Certains auteurs utilisent les deux puisqu'ils diluent leur solution de départ (MTT/PBS) dans du milieu, juste avant l'essai (3, 27, 89, 101). Wilson et coll. (131) remplacent le P.B.S. par du H.B.S.S. (solution saline de Hanks) sans rouge de phénol.



La plupart filtrent la solution afin de la stériliser et d'éliminer d'éventuels cristaux de formazan. La solution obtenue est stockée à l'abri de la lumière et à 4°C en flacon hermétiquement fermé. Elle se conserve ainsi pendant 1 semaine (10), 2 semaines (27), 3 semaines (34, 89), 1 mois (3, 44, 94, 116) voire 1 mois et demie (59).

Iselt et coll. (50) et Van de Loosdrecht et coll. (122) gardent leur solution à - 20°C tandis que Sladowski et coll. (107) et Hussain et coll. (49) la préparent extemporanément.

2) Utilisation de la solution

Dans de nombreux protocoles de cancérologie, le milieu de culture est aspiré avant l'addition du MTT, soit en partie (24, 95) soit en totalité (6, 29, 31, 34, 45, 89, 131). Cette pratique oblige à fournir aux cellules un volume de solution-stock de MTT très élevé.

En immunologie, Denizot et Lang (27) retirent les surnageants des puits "en renversant les plaques, en les secouant et en les séchant". Cette étape est précédée d'une centrifugation pour les cellules en suspension.

* **La concentration finale en MTT** est en moyenne de :

- 0,45 mg/ml ou 1 mg/ml en immunologie,
- $0,45 \pm 0,05$ mg/ml en cancérologie,
- $0,7 \pm 0,1$ mg/ml en microbiologie.

Garn et coll. (39) incorporent à la solution de MTT 20 μM de ménadione ou vitamine K_3 , dissoute dans du milieu de culture sans sérum. Il s'agit d'un transporteur d'électrons qui augmente l'intensité de la réaction. Cet effet est dose-dépendant, mais au-dessus de 100 μM on observe une conversion du tétrazolium non due aux cellules.

Avant de remettre les plaques à l'étuve, certains les agitent légèrement (27, 87), d'autres les enveloppent d'une feuille de papier aluminium afin de protéger le MTT et son formazan de la lumière (88, 122).

* **Le temps d'incubation des cellules avec le MTT** est en général de 4 heures en immunologie et en cancérologie, et de 2 ou 4 heures en microbiologie. Stevens et coll. (112) le restreignent à 10 minutes tandis que Kirkpatrick et coll. (58) ainsi que Sudo et coll. (115) le prolongent jusqu'à 24 heures.

Gerlier et Thomasset (40) étudient différents temps d'incubation allant de 15 min à 4 h, mais ils ne donnent pas leur choix définitif.

2.3.3 L'étape de solubilisation du formazan

1) L'étape post-incubation

Pour l'étape post-incubation, les auteurs se partagent en deux groupes :

- certains enlèvent le milieu des puits, par aspiration avec une micropipette ou par inversion des plaques,
- d'autres gardent le milieu.

Dans le premier cas, si les cellules sont en suspension, une centrifugation préalable s'impose, sauf avec les plaques de type Multi Screen. Avec ces dernières, le milieu est aspiré à travers les filtres grâce à un collecteur sous-vide Millipore, conçu pour fonctionner avec le système Multi Screen (107).

Toute aspiration totale ou partielle du milieu de culture et du MTT résiduel doit se pratiquer avec précaution afin de ne pas disperser ni entraîner les cristaux de formazan ou les cellules.

2) Les solvants

Il existe **trois grands types de solvants** : ceux à base d'isopropanol, ceux à base de DMSO et ceux à base de S.D.S. (sodium dodecylsulfate). Les références retenues sont celles des premiers auteurs ayant utilisé le type de solvant.

* Solvants à base d'isopropanol :

==> isopropanol acidifié à l'HCl 0,04 N (72)

==> isopropanol acidifié à l'HCl 1 N (24) : 40 ml
d'HCl 1 N ans 1000 ml d'isopropanol

==> isopropanol acidifié - Triton X-100 (83) : 2 ml d'HCl concentré pour 500 ml de solvant et 10 % de Triton X-100 (substance détergente)

==> isopropanol + 5 % d'acide formique (57)

==> isopropanol + DMF (10) : à préparer extemporanément à parties égales et en acidifiant à pH 5,5 avec de l'HCl 0,02 N.

==> isopropanol pur (112).

*** Solvants à base de DMSO :**

==> DMSO pur (18)

==> DMSO + tampon glycine (88) : le tampon glycine de Sørensen est composé de glycine 0,1 M et de NaCl (chlorure de sodium) 0,1 M, équilibré à pH 10,5 par du NaOH (hydroxyde de sodium) 0,1 N.

==> DMSO + S.V.F. (56)

==> DMSO + éthanol (à parties égales) (107)

====> DMSO + S.D.S. (29).

*** Solvants à base de S.D.S. :**

====> S.D.S. acidifié (116) : solution à 10 % de S.D.S., acidifiée par de l'HCl 0,01 N

====> S.D.S. en solution à 25 % (70)

====> S.D.S. + DMF (44) : 20 % de S.D.S. dans une solution contenant 50 % de DMF et 50 % d'eau déminéralisée, ajustée à pH 4,7 par 2,5 % d'acide acétique à 80 % et 2,5 % d'HCl 1 N.

*** Autres solvants :**

====> propanol ou éthanol (27)

====> huile minérale (18) : l'huile minérale est un solvant efficace uniquement si on peut enlever tout le milieu de culture des puits (donc avec les cellules adhérentes).

L'isopropanol acidifié, conseillé par Mosmann (72) est le solvant le plus utilisé dans les essais au MTT en immunologie. L'isopropanol acidifié - Triton X-100 est

principalement retrouvé en virologie. Le DMSO (pur ou associé) est très largement employé par les équipes de cancérologie. Enfin, les solvants à base de S.D.S. sont beaucoup plus fréquents en immunologie que dans les autres disciplines.

Le volume de 100 µl/puits d'une microplaque est la quantité de solvant choisie par la grande majorité des auteurs. Les volumes de 200 µl/puits concernent surtout le DMSO. Denizot et Lang (27) se contentent de 50 µl de solvant par puits. Miki et coll. (71), qui travaillent sur plaques de 24 puits, prennent 2 ml/puits.

3) L'étape d'agitation

L'addition du tampon d'extraction du formazan est suivie d'une agitation dans le but d'accélérer la dissolution des cristaux bleu foncé, accumulés au fond des cupules. Il existe plusieurs techniques d'agitation :

- sur un agitateur de microplaques, pendant 5 à 30 minutes : c'est la technique la plus utilisée,

- avec une pipette multicanaux, par aspiration et refoulement : ce mélange énergique se pratique avec les trois types de solvant (3, 24, 42, 57, 70, 121, 130),

- à l'aide des ultrasons : il s'agit d'une technique de vibration très rapide (quelques secondes à 2 minutes) (50, 57, 105).

Avec les solvants à base de S.D.S., l'agitation est remplacée par une incubation d'une nuit entière à l'étuve. Tada et coll. (116) expliquent que le formazan se dissout plus facilement à 37°C et que l'atmosphère humide empêche un changement de volume par évaporation. Kotnik et Fleischmann (59) protègent en plus leurs plaques de la lumière. Avec les autres solvants, quelques auteurs se contentent d'un délai d'attente de : 30 minutes à température ordinaire (49), une nuit à 40°C (19) ou 24 heures à température ambiante (7).

2.3.4 La lecture des D.O.

La lecture des D.O. est réalisée sur un lecteur de plaque de type ELISA, immédiatement après l'agitation (19, 45, 81), dans les 30 minutes qui suivent la dissolution (130) ou dans l'heure qui suit (95, 110).

La longueur d'onde test la plus fréquente est, soit 570 nm, soit 540 nm. Arnould et coll.(6) lisent à 492 nm en sachant que les valeurs de D.O. chutent de 10 % par rapport à celles obtenues à 515 nm. La D.O. du bruit de

fond, lue à la longueur d'onde de référence (690 ou 630 nm), élimine les effets d'une absorption non spécifique (83). Cette D.O. est déduite de celle lue à la longueur d'onde test.

En ce qui concerne les plaques Multi Screen, comme le matériel des filtres possède le même indice de réfraction optique que le solvant, les filtres n'interfèrent pas avec les mesures d'absorbance (107).

2.3.5 Tableaux récapitulatifs

Nous avons regroupé dans trois séries de tableaux, les modes opératoires de l'essai au MTT qui sont pratiqués en immunologie, en cancérologie et en microbiologie. Nous n'avons retenu que les techniques réalisées en microplaques. Les méthodes sont classées par ordre chronologique des auteurs et reprennent les différentes étapes citées précédemment. Chaque série de tableaux est suivie de la liste des cellules utilisées, avec leur origine tumorale et/ou histologique.

Auteurs	Cellules		Solution Stock	MTT		Etape de solubilisation		Lecture des D.O. Longueurs d'onde: (λ) test et de référence ; blanc
	Type cellulaire	Milieu de culture		Quantité µl/puits	Temps d'incubation	Après l'incubation	Solvant et agitation	
Mosmann 1983 (72)	Cellules non adhérentes A 70 13/13 2 x 10 ³ cellules/puits	RPMI - 1640 + 5 à 10 % de S.V.F.	5 mg/ml dans du P.B.S.	10 µl pour 100 µl de suspension soit 0,45 mg de M.T.T par ml de sur- nageant	4 h		100 µl/puits d'isopropanol acidifié	λ test = 570 nm λ réf. = 630 nm
Green et coll. 1984 (42)	Cellules non adhérentes : MOLT-4, YAC-1 2 x 10 ⁴ cellules/puits Cellules adhérentes L 929, ESH-5L 130 SA 2x 10 ⁴ cellules/puits	RPMI - 1640 + 10 % de S.V.F.	5 mg/ml dans du P.B.S.	20 soit 0,45 mg de MTT par ml de sur- nageant	4 h	Pour les cellules non adhérentes: centrifuger 2 min à 800xg et aspirer les sur-nageants. Pour les cellules adhérentes : enlever les sur-nageants en renversant les microplaques.	100 µl/puits d'isopropanol acidifié Légère agitation au vortex ou pipetage répété (3 à 4 fois) de la solution	λ test = 570 nm blanc : milieu + MTT
Vaickus et Levy 1985 (121)	Cellules non adhérentes 8866 2 x 10 ³ cellules/puits	RPMI - 1640 + 15 % de S.V.F.	5 mg/ml dans du P.B.S.	10 soit 0,35 mg de MTT par ml de sur- nageant	4 h		150 µl/puits d'isopropanol acidifié- Mélanger avec une pipette à 12 canaux	λ test = 570 nm λ réf. = 630 nm

IMMUNOLOGIE

Auteurs	Cellules		Solution Stock	MTT		Etape de solubilisation		Lecture des D.O. Longueurs d'onde (λ) test et de référence ; blanc
	Type cellulaire	Milieu de culture		Quantité μ l/puits	Temps d'incubation	Après l'incubation	Solvant et agitation	
Denizot et Lang 1986 (27)	Cellules non adhérentes LB 3 - FI - 2, LB 3 - FI - 3 4 x 10 ³ et 8 x 10 ³ cellules/puits	MEMD + 10 % de S.V.F. Milieu pour l'essai au MTT : RPMI - RP ⁻ = RPMI - 1640 sans rouge de phénol, sans sérum et sans 2- mercapto-éthanol	5 mg/ml dans du P.B.S. Filtrer et diluer dans le RPMI- RP ⁻ à 1 mg/ml	50 soit 1 mg de MTT par ml de sur- nageant Agiter légère- ment	3 h	Centrifuger 5 min à 800xg et retirer les sur- nageants en renversant les plaques avec précaution et en les secouant	50 μ l /puits de propanol (ou éthanol) Agiter vigou- reusement	λ test = 560 nm λ réf. = 690 nm
Tada et coll. 1986 (116)	Cellules non adhérentes : NKC 3 4 x 10 ⁴ cellules/puits	RPMI - 1640 + 10 ou 20 % de S.V.F.	5 mg/ml dans du P.B.S. Filtrer	20 soit 0,80 mg de MTT par ml de sur- nageant	4 h 30		100 μ l/puits de S.D.S. acidifié Laisser les plaques à l'incubateur une nuit	λ test = 590 nm
Gerlier et Thomasset 1986 (40)	Cellules non adhérentes EL 4 C 116 Cellules spléniques de Rat : 10 ⁶ cellules/puits	RPMI - 1640 RPMI - 1640 + 10 % de S.V.F.	7,5 mg/ml dans du P.B.S. à pH 7,5 Filtrer	20 μ l pour 100 μ l de sus- pension cellulaire soit : 1,25 mg de MTT par ml de sur- nageant		Centrifuger 2 min à 1500 tr/min et aspirer les surnageants	100 μ l/puits d'isopropanol acidifié	λ test = 570 nm λ réf. = 630 nm

IMMUNOLOGIE

Auteurs	Cellules		Solution Stock	MTT		Etape de solubilisation		Lecture des D.O. Longueurs d'onde (λ) test et de référence; blanc
	Type cellulaire	Milieu de culture		Quantité μ l/puits	Temps d'incubation	Après l'incubation	Solvant et agitation	
Mosmann et Fong 1989 (73)	Cellules non adhérentes HT - 2 2×10^3 cellules/puits	RPMI - 1640 + 10 % de S.V.F.	5 mg/ml dans du P.B.S.	10 Soit 0,45 mg de MTT par ml de sur-nageant	4 h		150 μ l/puits d'isopropanol acidifié	λ test = 570 nm λ réf. = 650 nm
Hansen et coll. 1989 (44)	Cellules adhérentes Wehi 164 3×10^3 cellules/puits MDBK ; Vero : 4×10^3 cellules/puits	RPMI - 1640 + 15 % de S.V.F. MEME + 5 % de S.V.F.	5 mg/ml dans du P.B.S. Filtrer	25 soit 1 mg de MTT par ml de sur-nageant	2 h		100 μ l/puits de D.M.F. -S.D.S. Laisser les plaques à l'incubateur une nuit	λ test = 570 nm Blanc : D.M.F. -S.D.S.
Kotnik et Fleischmann 1990 (59)	Cellules adhérentes cellules de moelle osseuse de souris $7,5 \times 10^4$ cellules/puits	MEM -alpha + 30 % de S.V.F.	5 mg/ml dans du P.B.S.	20 soit : 0,6 mg de MTT par ml de sur-nageant	4 à 5 h		100 μ l/puits de S.D.S. acidifié. Laisser les plaques à l'incubateur et à l'abri de la lumière pendant 4 à 20 h.	λ test = 590 nm Blanc : cellules + milieu de culture

IMMUNOLOGIE

Auteurs	Cellules		MTT			Etape de solubilisation		Lecture des D.O. Longueurs d'onde (λ) test et de référence; blanc
	Type cellulaire	Milieu de culture	Solution Stock	Quantité μ l/puits	Temps d'incubation	Après l'incubation	Solvant et agitation	
Ferrari et coll. 1990 (33)	Cellules adhérentes TU 5, L 929 1×10^4 cellules/puits	RPMI - 1640 + 10 % de S.V.F.	5 mg/ml dans du P.B.S.	20 soit 0,45 mg de MTT par ml de sur- nageant	4 h	Enlever les surnageants	200 μ l/puits d'isopropanol acidifié	λ test = 570 nm λ réf. = 690 nm
Pruett et Loftis 1990 (90)	Cellules non adhérentes Polynucléaires neutrophiles humains : 2×10^5 cellules/puits	RPMI - 1640 + 10 de S.V.F.		10 μ l pour 100 μ l de sus- pension cellulaire	2 h	Garder les surnageants	200 μ l/puits d'isopropanol acidifié	λ test = 610 nm
Bank et coll. 1991 (10)	Cellules non adhérentes K 562, U 937 EL4, 7 TD1	RPMI - 1640	5 mg/ml dans du RPMI 1640 Filtrer	30 soit 1 mg de MTT par ml de sur- nageant	4 h	Centrifuger 20 min à 600xg, rejeter les surnageants	100 μ l/puits de DMF - isopropanol acidifié Agitateur de plaques : 2 à 3 minutes	λ test = 566 nm

IMMUNOLOGIE

Auteurs	Cellules		MTT		Etape de solubilisation		Lecture des D.O. Longueurs d'onde (λ) test et de référence; blanc	
	Type cellulaire	Milieu de culture	Solution Stock	Quantité μ l/puits	Temps d'incu- bation	Après l'incubation		Solvant et agitation
Van de Loosdrecht et coll. 1991 (122)	Cellules non adhérentes U 937 $2,5 \times 10^3$ à $2,5 \times 10^4$ cellules/puits	RPMI - 1640 + 10 % de S.V.F.	5 mg/ml dans une solution saline stérile Filtrer	10 soit 0,45 mg de MTT par ml de sur- nageant	4 h à l'abri de la lumière	Centrifuger 5 min à 275xg ; aspirer les sur- nageants	150 μ l/puits de DMSO + 25 μ l de tampon glycine Agitateur de plaques : 5 à 15 minutes	λ test = 540 nm
Weichert et coll. 1991 (127)	Cellules non adhérentes Lymphocytes de sang périphérique : 2×10^4 cellules/puits	RPMI - 1640	5 mg/ml dans du P.B.S. Filtrer	10 soit 0,45 mg de MTT par ml de sur- nageant	4 h		100 μ l/puits de D.M.F.-S.D.S. acidifié Laisser les plaques à l'incubateur une nuit ou mélanger quelques minutes	λ test = 570 nm
Roehm et coll. 1991 (94)	Cellules non adhérentes HT-2, MC/9 NFS-60, 11-6 4×10^3 ou 4×10^5 cellules/puits	MEMD + 10 % de S.V.F.	5 mg/ml dans du P.B.S. Filtrer	20 soit 0,8 mg de MTT par ml de sur- nageant	7 à 8 h		100 μ l/puits de S.D.S. acidifié Laisser les plaques à l'incubateur une nuit	λ test = 570 nm λ réf. = 690 nm Blanc : milieu + MTT + solvant

IMMUNOLOGIE

Auteurs	Cellules		Solution Stock	MTT		Etape de solubilisation		Lecture des D.O. Longueurs d'onde (λ) test et de référence ; blanc
	Type cellulaire	Milieu de culture		Quantité μ l/puits	Temps d'incubation	Après l'incubation	Solvant et agitation	
Wemme et coll. 1992 (130)	Cellules non adhérentes Lymphocytes humains 3×10^4 à 3×10^5 cellules/puits	RPMI - 1640 + 10 % de sérum - NU-IV	10 mg/ml dans du P.B.S.	10 soit 0,6 mg de MTT par ml de sur- nageant	4 h	Centrifuger 7 min à 500xg ; rejeter les sur- nageants	100 μ l/puits d'isopropanol acidifié. Mélanger vigoureuse- ment à l'aide d'une pipette multicanaux	λ test = 570 nm
Sladowski et coll. 1993 (107)	Cellules non adhérentes : CTLL-2, Jurkat E.6.1. 1×10^4 cellules/puits	RPMI - 1640 + 10 % de S.V.F.	5 mg/ml dans du RPMI 1640	50 soit 1 mg de MTT par ml de sur- nageant	4 h	Enlever le milieu des puits Laver les cellules avec 200 μ l d'eau bi-distillée, aspirer. Laisser sécher à l'air, quelques min.	100 μ l/puits de DMSO - éthanol Agiter 5 min.	λ test = 540 nm λ réf. = 620 nm
Vanhée et coll. 1993 (123)	Cellules non adhérentes Plaquettes sanguines humaines 1×10^7 cellules/puits	Tampon Wallace de Hanks	4 mg/ml dans du P.B.S. Filtrer	20 soit 0,7 mg de MTT par ml de sur- nageant	4 h	Centrifuger 5 min à 150xg Rejeter les surnageants	100 μ l/puits d'isopropanol acidifié	λ test = 570 nm λ réf. = 650 nm

IMMUNOLOGIE

Auteurs	Cellules		Solution Stock	MTT		Etape de solubilisation		Lecture des D.O. Longueurs d'onde (λ) test et de référence; blanc
	Type cellulaire	Milieu de culture		Quantité μ l/puits	Temps d'incubation	Après l'incubation	Solvant et agitation	
Hussain et coll. 1993 (49)	Cellules adhérentes A 431, Ha, Fen : 1×10^4 cellules/puits Cellules non adhérentes : K 562, Daudi, Jar 1×10^4 cellules/puits	RPMI - 1640 + 10 % de S.V.F.	5 mg/ml dans du P.B.S. Filtrer	10 soit 0,45 mg de MTT par ml de sur-nageant	4 h	Enlever les milieux des puits	100 μ l /puits d'isopropanol acidifié Laisser agir 30 min. à température ambiante	λ test = 570 nm
Miki et coll. 1993 (71)	Cellules non adhérentes : HL - 60 2×10^5 ou 1×10^6 cellules/puits	RPMI - 1640 + 10 % de S.V.F.	5 mg/ml dans du P.B.S. Filtrer	1/5ème de la solution soit 1 mg de MTT par ml de sur-nageant	20 min	Centrifuger 5 min à 80xg, laver avec du milieu, remettre les cellules en suspension	100 μ l ou 2 ml de DMSO/puits	λ test = 540 nm
Garn et coll. 1994 (39)	Cellules non adhérentes - Splénocytes de Rat: 1×10^6 cellules/puits - P 815 : 1×10^5 cellules/puits Cellules adhérentes PE-MO : 1×10^5 cellules/puits	RPMI - 1640 + 10 % de S.V.F.	5 mg/ml dans du P.B.S.	10 + 20 μ M de ménadi-one soit 0,45 mg de MTT par ml de sur-nageant	4 h		100 μ l/puits de D.M.F.-S.D.S. Laisser les plaques à l'incubateur, une nuit	λ test = 570 nm

Origine histologique et tumorale des cellules utilisées en immunologie, dans l'essai au MTT :

Les cellules sont classées selon leur ordre d'apparition dans les tableaux récapitulatifs. Il s'agit de cellules humaines sauf mention contraire.

A 70 13/13 : cellules T interleukine - 2 - dépendantes,
de Souris

L 929 : fibroblastes murins, lymphotoxines-sensibles

ESH-SL-130 SA : cellules hybrides de HeLa D-98 et de
fibroblastes humains

MOLT-4 : leucémie lymphoïde aiguë (à cellules T)

YAC-1 : cellules murines, Natural Killer-sensibles

8866 : cellules B transformées par le virus d'Epstein Barr
(V.E.B.)

LB3 : lymphocytes T, IL-2 dépendants

LB3-FI-2 et LB3-FI-3 : sous-clones de LB3

NKC3 : cellules naturelles tueuses, murines, IL-2
dépendantes

EL4C116 : lymphome murin

HT-2 : cellules T, IL-2 dépendantes de Souris

Wehi 164 : fibrosarcome de Souris

MDBK : cellules de rein de Veau

Vero : cellules de rein de Singe

A 549 : cancer pulmo-alvéolaire

TU-5 ou mK SA-TU-5 : cellules tumorales dérivées d'une culture cellulaire de rein

K 562 : leucémie érythrocytaire

U 937 : macrophages-histiocytes de lymphome

EL-4 : lymphome-T, murin

7TD1 : cellules d'hybridome souris-souris

MC/9 : basophiles IL-3 dépendants

NFS - 60 : leucémie myéloïde, IL-3 dépendante

11-6 : cellules T, IL-4 dépendantes

CTLL-2 : cellules T cytotoxiques, murines, IL-2 dépendantes

Jurkat E..1 : cellules de lymphome produisant de l'IL-2

A-431 : cancer épidermoïde du sein

Ha : cancer du testicule

Fen : cancer de la vessie

Daudi : cellules de lymphome de Burkitt, transformées par le V.E.B.

Jar : cellules trophoblastiques

HL-60 : leucémie promyélocytaire

P 815 : mastocytome murin

PE-MO : macrophages d'exsudat de péritoine murin.

CANCEROLOGIE

Auteurs	Cellules		Solution Stock	MTT		Etape de solubilisation		Lecture des D.O. Longueurs d'onde (λ) test et de référence; blanc
	Type cellulaire	Milieu de culture		Quantité μ l/puits	Temps d'incu- bation	Après l'incubation	Solvant et agitation	
Cole 1986 (24)	Cellules non adhérentes H 69 et cellules adhérentes A 549, CHR C5, CHO-AUX-BI 5×10^4 cellules/puits	RPMI - 1640 + 10 % de S.V.F. MEMD + 10 % de S.V.F.	2 mg/ml dans du P.B.S.	25 soit 0,4 mg de MTT par ml de sur- nageant	3 h		100 μ l/puits d'isopropanol acidifié. Mélanger avec une pipette multicanaux	λ test = 540 nm
Carmichael et coll. 1987 (19)	Cellules non adhérentes H 249 2×10^3 cellules/puits Cellules adhérentes V 79 : 100 cellules/puits H 460 : 250 cellules/puits	RPMI - 1640 + 10 % de S.V.F. Milieu de Ham F 12 + 10 % de S.V.F.	2 mg/ml	50	4 h	Centrifuger à 450xg pendant 5 min et enlever le milieu en laissant 30 μ l/puits Aspirer tout le milieu	DMSO Agitateur de plaque : 5 min Huile minérale Laisser les plaques une nuit à 40°C	λ test = 540 nm λ test = 570 nm

Auteurs	Cellules		MTT		Etape de solubilisation		Lecture des D.O. Longueurs d'onde (λ) test et de référence; blanc	
	Type cellulaire	Milieu de culture	Solution Stock	Quantité µl/puits	Temps d'incu- bation	Après l'incubation		Solvant et agitation
Park et coll. 1987 (81)	Cellules non adhérentes et adhérentes : cellules humaines de carcinome colorectal	RPMI - 1640 + 10 % de S.V.F.	2 mg/ml	50 soit 0,4 mg de MTT par ml de surna- geant	4 h	Centrifuger les plaques à 450xg pendant 5 min. et aspirer le milieu en laissant environ 30 µl/puits	150 µl /puits de DMSO Agitateur de plaques : 10 min	λ test = 540 nm
Twentyman et Luscombe 1987 (118)	Cellules adhérentes EMT 6 2 x 10 ⁴ cellules/puits	MEME + 20 % de S.V.N.	5 mg/ml dans du P.B.S. Filtrer	20 soit 0,45 mg de MTT par ml de sur- nageant	4 h	Aspirer le milieu des puits	200 µl/puits de DMSO Agitateur de plaques : 5 min	λ test = 600 nm puis 550 nm

CANCEROLOGIE

Auteurs	Cellules		MTT		Etape de solubilisation		Lecture des D.O. Longueurs d'onde (λ) test et de référence; blanc	
	Type cellulaire	Milieu de culture	Solution Stock	Quantité μ l/puits	Temps d'incubation	Après l'incubation		Solvant et agitation
Ruben et Neubauer 1987 (95)	Cellules non adhérentes : K 562 et L 1210 2×10^3 cellules/puits Cellules adhérentes B16 F10 : 10^3 cellules/puits B16, L 929 et DLD-1 Clone A : 2×10^3 cellules/puits COLO 205 et MCF.7.4 x 10^3 cellules/puits RPMI 7272 : 5×10^3 cellules/puits COLO 201 et LoVo 8×10^3 cellules/puits	RPMI - 1640 + 10 % de S.V.F. (20 % pour les cellules LoVo)	1 mg/ml dans du P.B.S.	50 soit 0,3 mg de MTT par ml de sur- nageant	3 h 30 à 4 h		100 μ l/puits d'isopropanol acidifié	λ test = 570 nm λ réf. = 630 nm Blanc : milieu de culture
Alley et coll. 1988 (3)	Cellules non adhérentes : P 388 : 10^3 cellules/puits Cellules adhérentes A 549, H 23 et MCF.7 10^3 cellules/puits	RPMI - 1640 + 10 % de S.V.F.	5 mg/ml dans du P.B.S. Filtrer Diluer au 1/5 ^{ème} dans du milieu pré- chauffé	50 soit 0,2 mg de MTT par ml de sur- nageant	4 à 24 h selon les cellules	Pour les cellules en suspension: centrifuger à faible vitesse pendant 5 min Dans tous les cas : enlever les surnageants en laissant 10 à 20 μ l/puits	150 μ l/puits de DMSO Mélanger sur un agitateur de plaques ou avec une pipette multicanaux	λ test = 540 nm Blanc : milieu + MTT

CANCEROLOGIE

Auteurs	Cellules		MTT			Etape de solubilisation		Lecture des D.O. Longueurs d'onde (λ) test et de référence; blanc
	Type cellulaire	Milieu de culture	Solution Stock	Quantité μl/puits	Temps d'incubation	Après l'incubation	Solvant et agitation	
Scudiero et coll. 1988 (101)	Cellules adhérentes H 23, H 322 H 460, HT-29 CCD-19 LU 1250 cellules/puits	RPMI - 1640 + 10 % de S.V.F.	5 mg/ml dans du P.B.S. Diluer au 1/5ème dans du milieu sans sérum	50 soit 0,2 mg de MTT par ml de sur-nageant	4 h	Enlever 250 μl/puits de milieu	150 μl/puits de DMSO Mélanger sur un agitateur de plaques	λ test = 540 nm
Twentyman et coll. 1989 (119)	Cellules non adhérentes : cellules leucémiques humaines : 1 x 10 ⁵ à 2 x 10 ⁵ cellules/puits	RPMI - 1640 + 10 % de S.V.F.	5 mg/ml dans du P.B.S.	20 soit 0,4 mg de MTT par ml de sur-nageant	5 h	Centrifuger à 200xg pendant 10 min. Aspirer le milieu en laissant 10 à 20 μl de milieu par puits	200 μl/puits de DMSO Agitateur de plaques : 10 min	λ test = 540 nm λ réf. = 690 nm
Pieters et coll. 1989 (87)	Cellules non adhérentes Lymphoblastes malins humains 8 x 10 ⁴ cellules/puits	RPMI - 1640 + S.V.F.	5 g/ml dans du P.B.S.	10 soit 0,45 mg de MTT par ml de sur-nageant Agiter 1 min	6 h		100 μl/puits d'isopropanol acidifié	λ test = 540 nm Blanc : puits sans cellules

Auteurs	Cellules		MTT		Etape de solubilisation		Lecture des D.O. Longueurs d'onde (λ) test et de référence; blanc	
	Type cellulaire	Milieu de culture	Solution Stock	Quantité µl/puits	Temps d'incu- bation	Après l'incubation		Solvant et agitation
Shimoyama et coll. 1989 (105)	Cellules non adhérentes KATO III 6 x 10 ³ cellules/puits Cellules adhérentes C-1 1,2 x 10 ⁴ cellules/puits	RPMI - 1640 + 20 % de S.V.F.	5 mg/ml dans du P.B.S. Filtrer	10 soit 0,45 mg de MTT par ml de sur- nageant	4 h		150 µl/puits d'isopropanol acidifié Mélange par ultrasons : quelques secondes	λ test = 600 nm Blanc : RPMI + 10 % de S.V.F.
Ford et coll. 1989 (34)	Cellules adhérentes SKCO1, LS 174 T CALU -6 COLO 320 DM, COLO 201 1 x 10 ⁴ cellules/puits	MEME MEMD RPMI- 1640 + 10 à 16 % de S.V.F.	5 mg/ml dans du P.B.S. Filtrer Diluer au 1/10ème	100 soit 0,5 mg de MTT par ml de sur- nageant	4 h	Aspirer le milieu des puits	100 µl/puits de DMSO Agitateur de plaques : 20 min	λ test = 570 nm λ réf. = 630 nm Blanc : milieu + MTT
Jabbar et coll. 1989 (52)	Cellules non adhérentes H 69, POC et COR- L47 : 1 x 10 ⁴ cellules/puits Cellules adhérentes CORL 23 1 x 10 ³ cellules/puits MOR : 2 x 10 ³ cellules/puits	RPMI - 1640 + 10 % de S.V.F.	5 mg/ml dans du P.B.S. Filtrer	20 soit : 0,4mg de MTT par ml de sur- nageant	4 à 5 h	Pour les cellules en suspension : centrifuger 5 min à 1000tr /min et enlever le milieu en laissant 10 à 20 µl/puits Pour les cellu- les adhérentes: aspirer la plus grande partie du milieu	200 µl/puits de DMSO Agitateur de plaques : 10 min	λ test = 540 nm

Auteurs	Cellules		MTT		Etape de solubilisation		Lecture des D.O. Longueurs d'onde (λ) test et de référence; blanc	
	Type cellulaire	Milieu de culture	Solution Stock	Quantité µl/puits	Temps d'incu- bation	Après l'incubation		Solvant et agitation
Iselt et coll. 1989 (50)	Cellules non adhérentes P 388, MOP-C315 L5 222-S1, CO115 2 x 10 ⁴ à 4 x 10 ⁴ cellules/puits	Non précisé	5 mg/ml dans du P.B.S. Filtrer	10 soit 0,45 mg de MTT par ml de sur- nageant	4 h		100 µl/puits d'isopropanol acidifié Mélange par ultrasons : 1 à 2 min	λ test = 540 nm λ réf. = 630 nm
Plumb et coll. 1989 (88)	Cellules non adhérentes : GLC4, H 187 5 x 10 ³ cellules/puits Cellules adhérentes A 549, L- DAN 1 x 10 ³ cellules/puits	RPMI - 1640 + 10 % de S.V.F.	2mg/ml dans du P.B.S.	50 soit 0,4 mg/ ml 50 soit 1 mg de MTT par ml de sur- nageant	4 h A l'abri de la lumière 4 h A l'abri de la lumière	Centrifuger 5 min à 200xg - enlever le milieu des puits Enlever le milieu des puits	200 µl/puits de DMSO + 25 µl/puits de tampon glycine 200 µl/puits de DMSO + 25 µl/puits de tampon glycine	λ test = 570 nm Blanc : milieu + P.B.S.

Auteurs	Cellules		Solution Stock	MTT		Etape de solubilisation		Lecture des D.O. Longueurs d'onde (λ) test et de référence; blanc
	Type cellulaire	Milieu de culture		Quantité µl/puits	Temps d'incu- bation	Après l'incubation	Solvant et agitation	
Arnould et coll. 1990 (6)	Cellules non adhérentes P 388 D1 et RC 6 x 10 ⁴ cellules/puits	RPMI - 1640 + 10 % de S.V.F.	0,5 mg/ml dans du P.B.S.	100 Agita- teur de plaques; 1 min soit 0,5 mg de MTT/ml de sur- nageant	4 h	Centrifuger 10 min à 400xg et aspirer le milieu	100 µl/puits de DMSO Agitateur de plaques : 15 min	λ test = 492 nm
	Cellules adhérentes B 16 2,5 x 10 ⁴ cellules/puits	HAM-F10 + 10 % de S.V.F.			2 h			
Price et McMillan 1990 (89)	Cellules adhérentes	Milieu de Ham F12	5 mg/ml dans du P.B.S. Diluer à 0,25 0,5 1 mg/ml dans du milieu stérile et préchauf- fé- Filtrer	100 soit		Enlever le milieu des puits	150 µl/puits de DMSO Agitateur de plaques : 5 min.	λ test = 540 nm
	HX 142	+ 10 % de S.V.F.		0,25 mg	2 h 30			
	RT 112	+ 10 % de S.V.F.		0,5 mg	3 h			
	MGHU 1 1250 cellules/puits	+ 20 % de S.V.F.		1 mg de MTT par ml de sur- nageant	5 h			

CANCEROLOGIE

Auteurs	Cellules		MTT		Etape de solubilisation		Lecture des D.O. Longueurs d'onde (λ) test et de référence; blanc	
	Type cellulaire	Milieu de culture	Solution Stock	Quantité μ l/puits	Temps d'incu- bation	Après l'incubation		Solvant et agitation
Kirkpatrick et coll. 1990 (58)	Cellules non adhérentes cellules leucémiques humaines 5×10^5 cellules/puits	RPMI - 1640	5 mg/ml dans du P.B.S.	20 soit 0,45 mg de MTT par ml de sur- nageant	24 h	Centrifuger 10 min à 2000tr/ min Enlever les surnageants	150 μ l/puits de DMSO Agitateur de plaques : 5 min	λ test = 550 nm λ réf. = 620 nm Blanc: milieu
Heo et coll. 1990 (45)	Cellules adhérentes SNU- C5, A -375 SK-HEP-1, PCI-1 PCI-24 1×10^4 cellules/puits	RPMI-1640 + 10 % de S.V.F.	2 mg/ml	50 soit 0,5 mg de MTT par ml de sur- nageant	4 h	Aspirer le milieu des puits	150 μ l/ puits de DMSO Agitateur de plaques: 30 min	λ test = 540 nm
Wilson et coll. 1990 (131)	Cellules adhérentes cellules humaines cancéreuses d'ovaires 1×10^5 cellules/puits	RPMI - 1640 + 10 % de S.V.F.	2 mg/ml dans du B.S.S. de Hanks sans rouge de phénol	50 soit 2 mg de MTT par ml de sur- nageant	4 h	Centrifuger 5 min à 200xg, renverser les plaques pour enlever les surnageants	100 μ l/puits de DMSO Agitateur de plaques : 10 min	λ test = 570 nm Blanc : milieu

Auteurs	Cellules		MTT			Etape de solubilisation		Lecture des D.O. Longueurs d'onde (λ) test et de référence; blanc
	Type cellulaire	Milieu de culture	Solution Stock	Quantité µl/puits	Temps d'incu- bation	Après l'incubation	Solvant et agitation	
Etievant et coll. 1991 (31)	Cellules adhérentes MCF-7 MXT	MEME + 10 % de S.V.F.	1 mg/ml dans du P.B.S.	100 soit 1 mg de MTT/ml de sur- nageant	3 h	Centrifuger 7 min à 400xg et aspirer le milieu	100 µl/puits de DMSO Agitateur de plaques : 10 min	λ test = 570 nm λ réf. = 630 nm
Furukawa et coll. 1991 (36)	Cellules humaines de divers types tumoraux 1 à 5 x 10 ⁴ cellules/puits	RPMI - 1640 + 20 % de S.V.F.	5 mg/ml dans du P.B.S. Filtrer	10 soit 0,45 mg de MTT par ml de sur- nageant	4 h		150 µl/puits d'isopropanol acidifié. Mélanger sur agitateur de plaques. Centrifuger 5 min à 3000 tr/ min, prélever 150 µl de sur- nageant/puits et les transférer dans une autre microplaque	λ test = 600 nm Blanc : RPMI 1640 + 10 % de S.V.F.

Auteurs	Cellules		Solution Stock	MTT		Etape de solubilisation		Lecture des D.O. Longueurs d'onde (λ) test et de référence; blanc
	Type cellulaire	Milieu de culture		Quantité µl/puits	Temps d'incubation	Après l'incubation	Solvant et agitation	
Keepers et coll. 1991 (56)	Cellules adhérentes HT-29: 6 x 10 ³ cellules/puits 11B : 1,2 x 10 ⁴ cellules/puits	MEMD + 5 % de S.V.F.	5 mg/ml	20 soit 0,5 mg de MTT par ml de sur-nageant	2 h	Enlever le milieu des puits	150 µl/puits de DMSO contenant 0,5 % de S.V.F.	λ test = 540 nm
Furukawa et coll. 1992 (37)	Cellules adhérentes MKN-28, MKN-45 COLO-205, C-1 7,5 x 10 ⁴ cellules/puits	RPMI - 1640 + 10 % de S.V.F avec ou sans gel de collagène	5 mg/ml dans du P.B.S. Filtrer	100	4 h	Centrifuger 5 min à 3000 tr/min et aspirer complètement le milieu des puits	1 ml/puits de DMSO Mélanger sur un agitateur de plaques Transférer 100 µl de solution/puits dans une autre microplaque	λ test = 540 nm
Merlin et coll. 1992 (70)	Cellules adhérentes MCF-7 HT-29: 2 x 10 ⁴ cellules/puits	MEMD + 10 % de S.V.F.	5 mg/ml dans du P.B.S. Filtrer	50	3 h		100 µl/puits d'une solution de S.D.S. Laisser agir 15 à 30 min Mélanger avec une pipette multicanaux	λ test = 540 nm

CANCEROLOGIE

Auteurs	Cellules		MTT		Etape de solubilisation		Lecture des D.O. Longueurs d'onde (λ) test et de référence; blanc	
	Type cellulaire	Milieu de culture	Solution Stock	Quantité µl/puits	Temps d'incubation	Après l'incubation		Solvant et agitation
Sobottka et Berger 1992 (110)	Cellules adhérentes I/C2, I/C32 MDA-MB 231, MCF-7 HT-29, KB 2 x 10 ³ à 1 x 10 ⁵ cellules/puits	RPMI - 1640 + 10 % de S.V.F.	2 mg/ml dans du P.B.S. Filtrer	50	2 h	Enlever le milieu	100 µl/puits d'isopropanol acidifié Mélanger sur un agitateur de plaques	λ test = 540 nm
Marks et coll. 1992 (66)	Cellules non adhérentes : CCRF - CEM 5 x 10 ⁴ cellules/puits K 562 3 x 10 ⁴ cellules/puits	MEM-alpha + 10 % de S.V.F. RPMI - 1640 + 10 % de S.V.F.	2,5 mg/ml dans du P.B.S.	20 soit 0,2 mg de MTT par ml de sur- nageant	2 h	Centrifuger 5 min à 800g et aspirer le milieu	100 µl/puits de DMS	λ test = 540 nm
Jiao et coll. 1992 (53)	Cellules non adhérentes P 388 1 x 10 ⁴ cellules/puits Cellules adhérentes macrophages : 0,2-0,5 - 1 x 10 ⁵ cellules/puits	RPMI - 1640	5 mg/ml dans du P.B.S.	20 soit 0,45 mg de MTT par ml de sur- nageant	4 h	Centrifuger 5 min à 1500 tr/min et rejeter les surnageants	200 µl/puits de DMSO Agitateur de plaques : 5 min	λ test = 560 nm λ réf. = 690 nm Blanc : RPMI

CANCEROLOGIE

Auteurs	Cellules		MTT		Etape de solubilisation		Lecture des D.O. Longueurs d'onde (λ) test et de référence; blanc	
	Type cellulaire	Milieu de culture	Solution Stock	Quantité μ l/puits	Temps d'incu- bation	Après l'incubation		Solvant et agitation
Perez et coll. 1993 (85)	Cellules adhérentes A 2780, 1847 OVCAR 5 OVCAR 7 1×10^3 à $3,2 \times 10^4$ cellules/puits	RPMI - 1640 + 10 % de S.V.F.	5 mg/ml	40	2 h		100 μ l/puits de D.M.F.-S.D.S. Laisser agir une nuit	λ test = 570 nm Blanc : puits sans cellules
Eble et coll. 1994 (29)	Cellules adhérentes V79, WiDr, HeLa, Ca Ski 1×10^2 à $1,4 \times 10^4$ cellules/puits	MEMD + 10 ou 15 % de S.V.F.	2 mg/ml	500 μ l soit 0,1 mg de MTT par ml de sur- nageant	2 h		150 μ l de DMSO + 30 μ l de S.D.S. par puits Agiter 10 min	λ test = 570 nm λ réf. = 690 nm

Origine histologique et tumorale des cellules utilisées en cancérologie dans l'essai au MTT:

Les cellules sont classées selon leur ordre d'apparition dans les tableaux récapitulatifs. Il s'agit de cellules humaines, sauf mention contraire.

H-69 : cancer pulmonaire à petites cellules

A 549 : cancer pulmo-alvéolaire à cellules non petites

CHO-AUX-B1 : cellules ovariennes drogue-sensibles,
d'Hamster chinois

CH^R C5 : cellules ovariennes drogues-résistantes,
D'Hamster chinois

H-249 : cancer pulmonaire à petites cellules

V 79 : fibroblastes de poumon d'Hamster chinois

H 460 : cancer pulmonaire à grandes cellules

EMT 6 : cancer mammaire de Souris

K-562 : leucémie érythrocytaire

L-1210 : leucémie lymphocytaire de Souris

B 16 : mélanome de Souris

B16 F10 : variant de B16 à degré métastatique élevé

L 929 : fibroblastes murins transformés

DLD-1 Clone A : cancer du côlon

COLO 205 : cancer du côlon

MCF-7 : cancer du sein

RPMI - 7272 : mélanome amélanotique

COLO 201 : cancer du côlon

LoVo : cancer du côlon
P 388 : leucémie de Souris
H 23 : cancer pulmonaire à cellules non petites
H 322 : cancer bronchiolo-alvéolaire
HT-29 : cancer du côlon
CCD-19 LU : fibroblastes pulmonaires
KATO III : cancer gastrique
C-1 : cancer du côlon descendant
SKCO1 : cancer du côlon
LS 174 T : cancer du côlon
CALU-6 : cancer pulmonaire à cellules non petites
COLO 320 DM : cancer du côlon
COLO 201 : cancer du côlon
POC : cancer pulmonaire à petites cellules
COR-L47 : cancer pulmonaire à petites cellules
COR-L23 : cancer pulmonaire à grandes cellules
MOR : cancer pulmonaire
MOP-C315 : plasmocytome
L 5222-S1 : leucémie de Rat
CO 115 : cancer du côlon
GLC4 : cancer pulmonaire à petites cellules
H 187 : cancer pulmonaire à petites cellules
LDAN : cancer pulmonaire squameux
P388 D1 : cellules macrophage-like de Souris
RC : cancer rénal de Souris
HX 142 : neuroblastome

RT 112 : cancer de la vessie
MGHU1 : cancer de la vessie
SNU-C5 : cancer du caecum
A-375 : mélanome
SK-HEP-1 : cancer du foie
PCI-1 : cancer squameux du larynx
PCI-24 : cancer squameux de la langue
MXT : cancer mammaire de Souris
11B : cancer squameux de la tête et du nez
MKN-28 : cancer gastrique bien différencié
MKN-45 : cancer gastrique peu différencié
1/C2 : cancer mammaire de Rate
1/C32 : cancer mammaire de Rate
MDA-MB231 : cancer du sein
KB : cancer de l'oro-pharynx
CCRF-CEM : leucémie
A 2780 : cancer de l'ovaire
1847 : cancer de l'ovaire
OVCAR 5 : cancer de l'ovaire
OVCAR 7 : cancer de l'ovaire
WiDr : cancer du côlon
HeLa : carcinome de col utérin
CaSki : carcinome squameux du col du fémur.

Auteurs	Cellules		MTT		Etape de solubilisation		Lecture des D.O. Longueurs d'onde (λ) test et de référence; blanc
	Type cellulaire	Milieu de culture	Solution Stock	Quantité μ l/puits	Temps d'incubation	Après l'incubation	
Pauwels et coll. 1988 (83)	Cellules non adhérentes MT-4 4×10^4 cellules/puits	RPMI - 1640 DM (= modification hollandaise) + 10 % de S.V.F..	7,5 mg/ml dans du P.B.S.	20 soit 0,7 mg de MTT par ml de sur-nageant	2 h	Enlever 150 μ l de milieu par puits (si nécessaire, centrifuger : 450xg, 5 min)	100 μ l/puits d'isopropanol acidifié - Triton X-100 Agitateur de plaques : 10 min λ test = 540 nm λ réf. = 690 nm Blanc : tous les réactifs sauf les cellules
Schwartz et coll. 1988 (100)	Cellules non adhérentes CEM-cl 13 : 5×10^4 cellules/puits ou 3×10^3 cellules/puits P.B.L. 5×10^4 cellules/puits	RPMI - 1640 + 10 % de S.V.F.	5 mg/ml dans du P.B.S. Filtrer	10 μ l pour 100 μ l de suspension cellulaire soit 0,45 mg de MTT par ml de sur-nageant	4 h	Retirer doucement les surnageants	150 μ l/puits d'isopropanol acidifié λ test = 540 nm
Lemaître et coll. 1990 (62)	Cellules non adhérentes CEM-cl 13 6250 cellules/puits	RPMI - 1640 + 10 % de S.V.F.	7 mg/ml dans du P.B.S.	10 μ l pour 100 μ l de suspension cellulaires soit 0,6 mg de MTT par ml de sur-nageant	3 h	Enlever la plus grande partie du surnageant	100 μ l/puits d'isopropanol acidifié λ test = 540 nm

Auteurs	Cellules		MTT			Etape de solubilisation		Lecture des D.O. Longueurs d'onde; (λ) test et de référence; blanc
	Type cellulaire	Milieu de culture	Solution Stock	Quantité µl/puits	Temps d'incubation	Après l'incubation	Solvant et agitation	
Stevens et coll. 1991 (112)	Bactéries <i>Staphylococcus aureus</i> 5 x 10 ⁶ bactéries/puits	RPMI - 1640 + 5 % de S.V.F.	2 mg/ml dans du P.B.S. Viltrer	50 soit 0,4 mg de M.T.T par ml de sur-nageant	10 min à température ambiante	Centrifuger 5 min à 1600xg ; rejeter les surnageants par inversion des plaques ; sécher sur papier absorbant	150 µl /puits d'isopropanol acidifié Laisser agir 10 min - Agiter vigoureusement sur un agitateur de plaques : 5 min Ajouter 50 µl de P.B.S./puits	λ test = 560 nm
Takeuchi et coll. 1991 (117)	Cellules non adhérentes : KG-1, K-562 MOLT-4, CEM HUT-78, Daudi NC-37 et U.937 5 x 10 ³ cellules/puits	RPMI - 1640 + 10 % de S.V.F.	7,5 mg/ml dans du P.B.S.	20 soit 0,6 mg de MTT par ml de sur-nageant	2 h	Enlever 170 µl de surnageant par puits	100 µl/puits d'isopropanol acidifié - Triton X-100 Agitateur de plaques: au moins 10 min	λ test = 540 nm λ réf. = 690 nm

Auteurs	Cellules		MTT		Etape de solubilisation		Lecture des D.O. Longueurs d'onde (λ) test et de référence; blanc	
	Type cellulaire	Milieu de culture	Solution Stock	Quantité μ l/puits	Temps d'incu- bation	Après l'incubation		Solvant et agitation
Ayisi et coll. 1991 (7)	Cellules non adhérentes MT - 2 $3,2 \times 10^4$ cellules/puits	RPMI - 1640 + 10 % de S.V.F.	7,5 mg/ml dans du P.B.S.	20 soit 0,7 mg de M.T.T par ml de sur- nageant	1 h	Retirer 150 μ l de milieu par puits	100 μ l/puits d'isopropanol acidifié - Triton X-100 Laisser les microplaques à température ambiante pendant 24 heures	λ test = 565 nm λ réf. = 690 nm Blanc : P.B.S.
Rubino et Nicholas 1992 (96)	Cellules adhérentes CV-1 2×10^4 cellules/puits	MEM + 10 % de S.V.F.	2 mg/ml dans du P.B.S.	10 soit 0,2 mg de MTT par ml de sur- nageant	4 h	Retirer les surnageants	100 μ l/puits d'isopropanol acidifié Agiter pendant 2 min	λ test = 570 nm
Bergamini et coll. 1992 (12)	Cellules adhérentes M/M 5×10^4 cellules/puits	RPMI - 1640 + 10 % de S.V.F.	15 mg/ml dans du P.B.S.	20 soit 1,4 mg de MTT par ml de sur- nageant	75 min	Enlever 100 μ l de surnageant par puits	100 μ l/puits d'isopropanol acidifié- Triton X-100	λ test = 490 nm λ réf. = 650 nm

Auteurs	Cellules		MTT		Etape de solubilisation		Lecture des D.O. Longueurs d'onde: (λ) test et de référence; blanc	
	Type cellulaire	Milieu de culture	Solution Stock	Quantité μ l/puits	Temps d'incubation	Après l'incubation		Solvant et agitation
Kirchhoff et coll. 1992 (57)	<i>Mycoplasma</i> 10^7 à 10^8 CFU/puits	Milieu de Friis modifié	5 mg/ml dans du P.B.S.	10 soit 0,2 mg de M.T.T par ml de sur-nageant	4 h		100 μ l/puits de D.M.F./S.D.S. Laisser les plaques à l'incubateur pendant 15 h	λ test = 540 nm
	<i>Mycoplasma fermentes</i> D 1586 100 μ l/puits	Milieu GBF-1 constitué de RPMI-1640 + 10 % de S.V.F. et 10 % de cellules murines P 815	5 mg/ml dans du P.B.S.	10 soit 0,5 mg par ml de sur-nageant	4 h		120 μ l/puits d'isopropanol avec 5 % d'acide formique Mélanger avec une pipette multicanaux puis soumettre la plaque à des ultrasons pendant 20 s	λ test = 577 nm

Auteurs	Cellules		MTT			Etape de solubilisation		Lecture des D.O. Longueurs d'onde (λ) test et de référence; blanc
	Type cellulaire	Milieu de culture	Solution Stock	Quantité µl/puits	Temps d'incubation	Après l'incubation	Solvant et agitation	
Watanabe et coll. 1994 (126)	Cellules adhérentes MDCK, VERO HeLa et cellules non adhérentes MT-4	MEM + 8 % de S.V.N. RPMI-1640 + 8 % de S.V.N.	7,5 mg/ml dans du P.B.S.	10 soit 0,7 mg de M.T.T par ml de sur-nageant	4 h		100 µl /puits de D.M.F.-S.D.S.	λ test = 540 nm λ réf. = 690 nm
	25. µl/puits de suspension cellulaire trypsinée							
Sudo et coll. 1994 (115)	Cellules adhérentes MCR-5 1,5 x 10 ⁴ cellules/puits	MEM + 10 % de S.V.F.	7,5 mg/ml dans du P.B.S.	20 soit 0,7 mg de MTT par ml de sur-nageant	24 h	Enlever environ 150 µl/puits de milieu	100 µl/puits d'isopropanol acidifié - Triton X-100 Agiter pendant 10 min	λ test = 540 nm λ réf. = 690 nm

Origine histologique et tumorale des cellules utilisées en microbiologie, dans l'essai au MTT:

Les cellules sont classées suivant leur ordre d'apparition dans les tableaux récapitulatifs. Il s'agit de cellules humaines, sauf mention contraire.

MT-4 : cellules T4 transformées par le HTLV-1 (Human T cell leukemia virus)

CEM-cl 13 : sous-clone enrichi en molécules CD4, qui dérive de la lignée CEM

P.B.L. : (peripheral blood lymphocytes) lymphocytes de sang périphérique

KG-1 : leucémie aiguë myéloïde

K-562 : leucémie chronique myéloïde

MOLT-4 : leucémie lymphoïde aiguë

CEM : cellules T de tumeur lymphoblastoïde

HUT-78 : cellules T4 ne produisant pas de HTLV-1

Daudi : cellules de lymphome de Burkitt

NC-37 : lymphocytes B

U-937 : macrophages / histiocytes

MT-2 : lymphocytes T

M/M : monocytes / macrophages

MDCK : cellules de rein de Chien

Vero : cellules de rein de Singe

HeLa : carcinome de col utérin

MRC-5 : souche diploïde de fibroblastes humains embryonnaires

Chapitre troisième

ETUDE DE LA METHODE COLORIMETRIQUE AU MTT

Nous avons vu que le mode opératoire du test au MTT varie beaucoup entre les auteurs, et ce à tous les niveaux : concentration finale en MTT, temps d'incubation des cellules avec le MTT, nature et volume du solvant, longueur d'onde de lecture. Une étude approfondie de la technique s'impose donc.

Dans une première partie, nous reprenons les caractéristiques de la méthode qui en font à la fois tout son intérêt et toute son originalité. Une seconde partie a pour objet les différents paramètres reconnus comme influençant l'essai au MTT et expliquant, par là-même, les variations du mode opératoire.

3.1 Caractéristiques de la méthode

3.1.1 Spécificité vis-à-vis des cellules vivantes et viables :

La conversion du MTT en formazan prend place uniquement dans les cellules vivantes. Mosmann (72) a ainsi montré que des cellules mortes sont incapables de cliver le colorant, trente minutes après leur lyse. Green et coll. (42) l'ont prouvé par une autre expérience : des cellules lymphotoxine-sensibles, traitées par lymphotoxine présentent une relation inversement proportionnelle entre la concentration en lymphotoxine et la quantité de MTT réduite.

D'après l'observation visuelle, seules les cellules viables contiennent des cristaux de formazan. Les cellules non viables et les débris, identifiés par leur morphologie et par la coloration au bleu Trypan, ne réduisent pas le MTT.

Les cellules procaryotes métabolisent aussi le MTT en formazan. Ainsi, des cultures composées de neutrophiles et de *Staphylococcus aureus* et traitées par de la saponine (toxique pour les neutrophiles), produisent du formazan (112). Les neutrophiles lysés par la saponine ne réagissent pas avec le MTT et la saponine ne modifie pas la transformation du colorant en formazan par les Staphylocoques dorés. Le formazan résulte donc uniquement des bactéries vivantes.

3.1.2 Relation entre la densité optique et la concentration cellulaire.

L'intérêt du MTT a été évalué en déterminant la relation entre le nombre de cellules et la quantité de formazan produit.

Mosmann (72) le premier, a noté que l'absorbance à 570 nm est directement proportionnelle au nombre de cellules, en utilisant une population cellulaire homogène (figure 10).

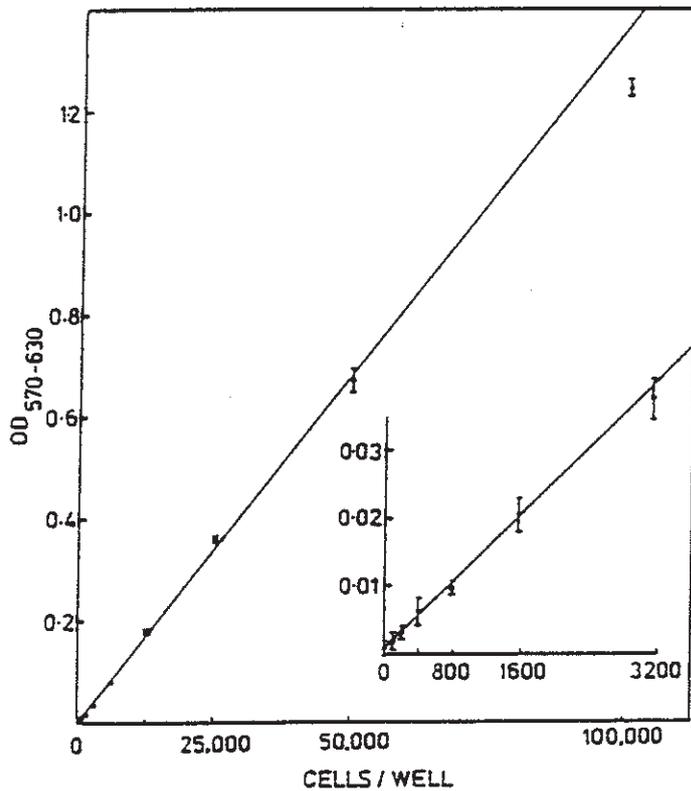


Figure 10 : Linéarité de l'essai au MTT. Des cellules EL-4 sont réparties dans des microplaques à 96 puits (100 μ l de milieu /puits). Le MTT (10 μ l à 5 mg/ml) est ajouté immédiatement à tous les puits et les plaques sont incubées à 37°C pendant 3 heures. Chaque point correspond à la moyenne et à l'écart-type de 4 puits. D'après Mosmann (72)

Cette relation linéaire est particulière pour chaque type cellulaire si bien que la D.O. pour un nombre donné de cellules varie entre les lignées (18, 33, 64).

En général, cette linéarité s'étend sur un large intervalle de concentrations cellulaires : de quelques milliers [ou quelques centaines (42, 44, 72)] à plusieurs dizaines de mille (33, 87, 105, 116) voire centaines de mille de cellules par puits (64, 66, 100, 110) sans pour autant que l'épaisseur du tapis cellulaire affecte les D.O. En effet, à 570 nm, les cellules n'absorbent pas la lumière de façon significative, même à une concentration de 8×10^5 cellules par cupule (127).

Price et McMillan (89) ont étudié la relation entre l'absorbance et le nombre de cellules, pour trois types de cellules cancéreuses (figure 11). Les trois relations ne sont linéaires que pour de faibles concentrations cellulaires (moins de 5×10^4 cellules/puits). Cette constatation restreint donc les affirmations précédentes. De telles courbes sont utilisées pour convertir les mesures d'absorbance en nombres cellulaires équivalents pour chaque souche de cellules.

De même, Iselt et coll. (50) obtiennent des relations linéaires reproductibles, seulement entre 2×10^4 et 4×10^4 cellules/puits avec six lignées continues tumorales.

Avec les fibroblastes ovariens d'Hamster chinois (C.H.O.), la D.O. varie également linéairement pour les basses densités cellulaires, c'est-à-dire jusqu'à 1×10^4 cellules/cupule (figure 12) (120).

Après une certaine limite supérieure, on observe donc une déviation de linéarité, spécifique de chaque type cellulaire (50, 120) et une décroissance progressive des valeurs de D.O. (12). Heo et coll. (45) décrivent une courbe de nature hyperbolique ; d'autres auteurs parlent de "plateau" aux hautes concentrations cellulaires (41, 42, 44, 95).

Ce phénomène s'explique :

- soit par une activité métabolique diminuée ou par une mortalité cellulaire, dues à l'excès de cellules dans les puits (12, 45, 95),

- soit par une consommation complète du substrat MTT, par la culture (42).

Dans ce dernier cas, la linéarité de la courbe peut être rétablie par une addition supplémentaire de colorant.

Cependant, Jabbar et coll. (52) qui ont une déviation de linéarité, même aux valeurs de D.O. relativement basses (dès 0,5) pour des cellules cancéreuses pulmonaires, constatent que la courbe n'est pas affectée par une augmentation de la concentration en MTT.

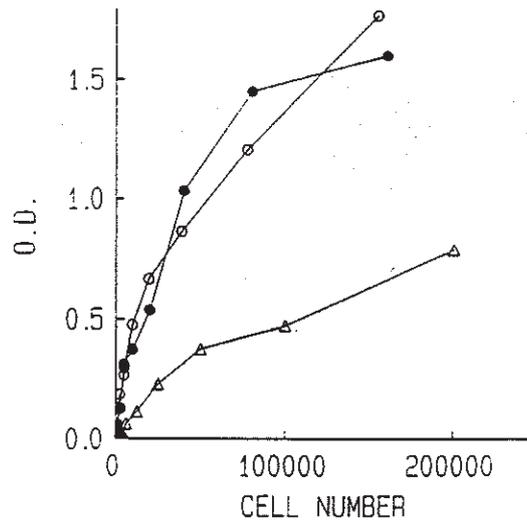


Figure 11 : Relation entre le nombre de cellules et la densité optique pour les cellules HX 142 (Δ), RT 112 (\bullet) et MGHU1 (\circ). D'après Price et McMillan (89).

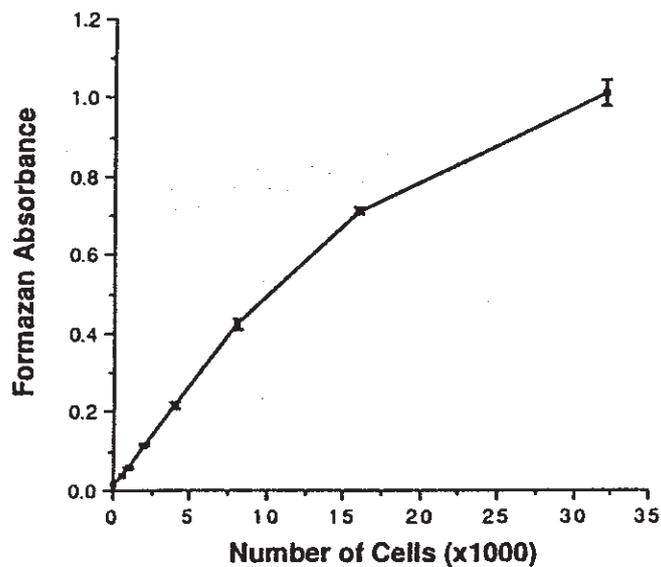


Figure 12 : Relation entre le nombre de cellules et la densité optique. Des cellules C.H.O. à différentes concentrations sont réparties dans les puits d'une microplaque et incubées une nuit. La solution de MTT (25 μ l/puits) est ensuite ajoutée et les cellules sont incubées pendant 4 heures. Les cristaux de formazan sont dissous dans 100 μ l de DMSO/puits. D'après Uludag et Sefton (120).

Quant à Givens et coll. (41) ils suggèrent d'éviter entièrement l'effet plateau, en utilisant des petits nombres de cellules.

Selon Ford et coll. (34), il existe bien une relation entre l'absorbance et le nombre de cellules, mais elle n'est pas linéaire (figure 13). Les cellules testées sont d'origine tumorale.

L'absorbance est donc généralement proportionnelle à la densité cellulaire, mais sur un intervalle très variable selon les souches cellulaires. Il est nécessaire d'ajuster le nombre de cellules utilisé dans l'essai afin d'assurer des mesures quantitatives fiables (45, 50).

D'après Hansen et coll. (44), de hautes concentrations cellulaires rendent les mesures impossibles, soit parce que les valeurs de D.O. sont trop élevées, soit parce que les courbes atteignent un plateau. A noter, le fait que des bactéries puissent métaboliser le MTT signifie que de hautes valeurs de D.O. peuvent également résulter d'une contamination.

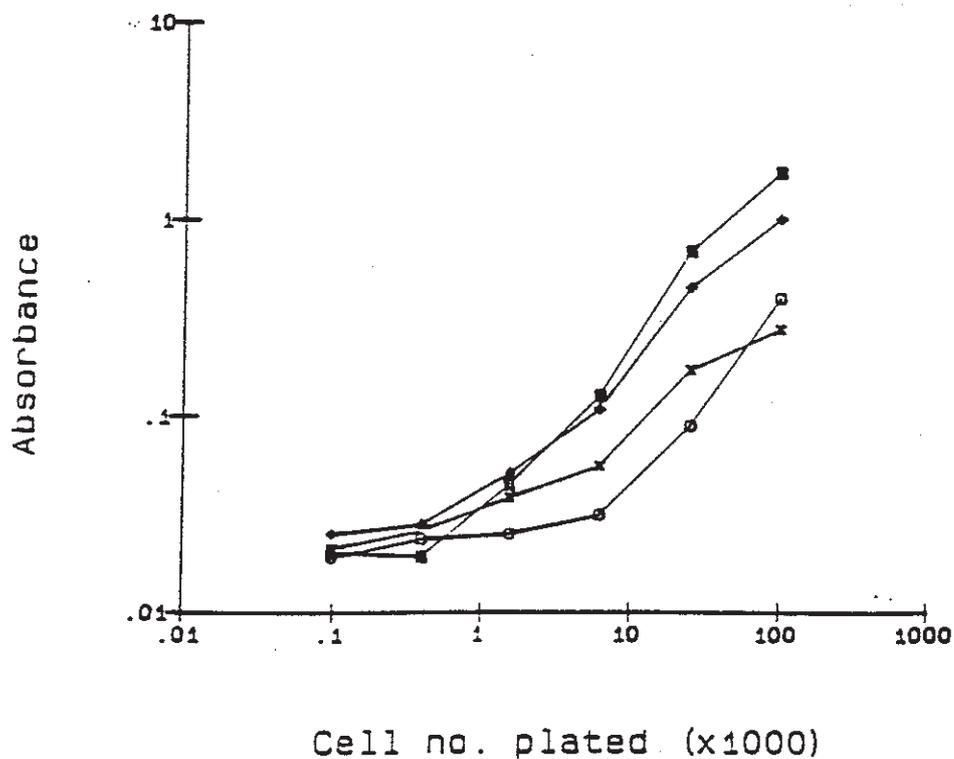


Figure 13 : Relation entre le nombre de cellules et la densité optique pour quatre lignées cellulaires : LSI 74T (■), SKCO1 (◆), C33A (○), CALU3 (x). Les densités cellulaires initiales sont respectivement de : 98 ; 391 ; $1,56 \times 10^3$; $6,25 \times 10^3$; $2,5 \times 10^4$; et 1×10^5 cellules/puits. D'après Ford et coll. (34)

3.1.3 Seuil de sensibilité

Le nombre minimal de cellules, détecté par la méthode au MTT, varie considérablement entre les différents types cellulaires.

Par exemple, selon Ruben et Neubauer (95), l'essai de réduction du colorant est assez sensible pour détecter aussi peu que 32 cellules tumorales viables par puits. En revanche, il est incapable de quantifier de façon fiable, moins de 1×10^4 fibroblastes oculaires en culture primaire, par puits (41). Avec la plupart des lignées cellulaires continues, soit le nombre minimal de cellules se situe entre 200 et 500 cellules/puits (42, 44, 45, 72), soit il est fixé à 1000 cellules/puits (27, 100, 116).

Les lignées continues ont normalement un taux de duplication élevé, associé à une activité enzymatique importante, par rapport aux cellules à durée de vie limitée telles que les lymphocytes de sang périphérique (127). Ceci conduit à une sensibilité plus grande de l'essai au MTT, pour les lignées continues.

En dessous du seuil de sensibilité, les nombres de cellules affichent un signal non reproductible (44). Les observations de Plumb et coll. (88) montrent qu'aucune ligne de régression ne passe par l'origine, si bien que le formazan semble produit en l'absence de

cellules. Cette petite valeur de D.O. est probablement due à l'interférence du milieu résiduel avec les lectures d'absorbance (120).

Les résultats cités, quoique différents, indiquent que l'essai au MTT est capable de détecter de très faibles nombres de cellules vivantes, adaptées en culture ou fraîchement isolées (64).

3.2 Paramètres influençant la méthode

Nous avons essayé d'étudier tous les paramètres capables d'affecter la méthode au MTT, au niveau de la sensibilité et des résultats. Pour cela, nous avons repris en détail chaque étape du mode opératoire. Il est alors possible de distinguer, de façon schématique :

- les facteurs influençant la production de formazan : les cellules, le milieu de culture, la concentration en MTT et le temps d'incubation des cellules avec le colorant,

- les facteurs agissant spécifiquement sur les lectures de D.O. (ils interviennent donc après la réduction du MTT) : les solvants et les longueurs d'onde. L'influence des longueurs d'onde est liée aux propriétés spectrales du

formazan que nous avons développées au paragraphe 1.3 du chapitre I.

Il existe enfin des paramètres extérieurs à la technique, mais susceptibles d'altérer la fiabilité de l'essai au MTT.

3.2.1 Les cellules

1) Cultures cellulaires en monocouche ou en suspension

Dans la littérature, les cellules adhérentes sont rencontrées aussi souvent que les cellules non adhérentes.

Selon Carmichaël et coll. (18), les cellules adhérentes sont particulièrement bien adaptées à l'essai au MTT. Elles donnent une bonne reproductibilité et l'écart-type des D.O. est d'environ ± 5 %. La technique est moins optimale pour les cellules en suspension (écart-type de ± 15 %), peut-être à cause de la variation de volume résiduel après aspiration du milieu, avant l'étape de solubilisation. Leurs études portent essentiellement sur des cellules cancéreuses.

Inversement, d'après Takeuchi et coll. (117), les cellules en monocouche ne conviennent pas pour le test au MTT appliqué au virus Herpès simplex-1 (H.S.V.-1). En

effet, après infection des cellules par le virus, l'examen microscopique ne révèle pas la présence de cellules viables alors que l'essai au MTT indique une viabilité de 70 % par rapport aux témoins! Avec les cellules en suspension, les auteurs obtiennent une baisse de viabilité, de plus de 90 %. Ces observations sont confirmées par Watanabe et coll. (126) avec d'autres familles de virus et sur d'autres cellules, mais infirmées par les expérimentations de Sudo et coll. (115) sur les H.S.V.-1 et 2.

Ayisi et coll. (7), qui emploient des cellules non adhérentes, préfèrent traiter les microplaques par de la poly-L-lysine, afin de permettre l'attachement de la culture au fond des puits. Ils y voient plusieurs avantages :

- la suppression plus facile et reproductible du milieu nutritif, sans disperser ou enlever des cellules,

- la meilleure visualisation de l'effet cytopathogène induit par les virus.

Ils aboutissent ainsi à de meilleurs résultats.

2) Les différentes lignées cellulaires

Les lignées cellulaires individuelles diffèrent dans leur aptitude à réduire le MTT.

Par exemple, la lignée continue de cellules leucémiques CEM convertit le sel de tétrazolium à un taux égal à deux fois celui de la lignée continue myélolœucémique K 562 (66).

Les fibroblastes oculaires humains, cellules à durée de vie limitée, possèdent une activité enzymatique relativement faible, malgré leur capacité à proliférer rapidement si bien que l'essai au MTT y est peu sensible (41). Les lymphocytes de sang périphérique ont aussi une activité métabolique basse (127). Ils doivent être utilisés en nombre élevé, pour donner une réduction mesurable du MTT.

3) Contamination de la culture par d'autres cellules ou par des bactéries

D'après Wilson et coll. (131), l'analyse colorimétrique par le MTT de cellules provenant de spécimens de tumeur primaire présente quelques difficultés. Celles-ci sont dues à la contamination par des cellules non malignes et métaboliquement actives, capables de transformer le colorant. Les lymphocytes constituent les principaux contaminants des échantillons de biopsie. Mais, ils sont peu nombreux et peu actifs.

Nous savons que certaines bactéries réduisent le MTT (112). Cependant, la contamination par des micro-organismes est facile à détecter, en examinant les plaques au microscope inversé, avant chaque étape de l'essai (131).

Des contaminations potentielles peuvent donc falsifier les résultats.

4) Les conditions de culture avant l'essai colorimétrique

La méthode au MTT mesure l'activité enzymatique mitochondriale des cellules viables (109). Or, cette activité n'est pas constante et dépend grandement de la densité cellulaire de la culture juste avant la récolte des cellules (6). Théoriquement, les cellules en culture se multiplient selon une loi exponentielle. Si l'inoculum est trop faible, une longue période de temps s'écoule avant que la culture démarre. Après la période de croissance exponentielle, la confluence et la déplétion du milieu ralentissent et les divisions cellulaires cessent.

La modulation de l'activité enzymatique dans la chaîne respiratoire, tout au long de la croissance, explique la variabilité des courbes de linéarité (40). L'intensité de la respiration cellulaire reflète "la santé des cellules" et devient maximale pendant la phase exponentielle (et diminue quand la culture arrive à confluence).

Puisque les conditions de culture (densité cellulaire 24 heures avant l'essai) influencent les courbes de D.O., elles doivent être standardisées (6).

5) L'état métabolique des cellules

Mosmann (72) a étudié l'influence du niveau énergétique de la cellule sur la quantité de formazan générée. Pour cela, il a mesuré la production de formazan par: des cellules métaboliquement inactives (globules rouges), des cellules quiescentes (cellules spléniques) et des cellules activées (lymphocytes stimulés par de la concanavaline A). Les résultats montrent que :

- les érythrocytes sont incapables de cliver le MTT,
- les lymphocytes activés fournissent environ dix fois plus de formazan que les cellules au repos.

L'activation des cellules provoque donc une transformation accrue du MTT en formazan. Dix ans plus tard, Vanhée et coll. (123) l'ont confirmé sur des plaquettes sanguines.

Dans le but d'évaluer aussi le rôle du métabolisme cellulaire sur la conversion du MTT, Hansen et coll. (44) ont fait varier la température d'incubation des cellules avec le colorant. A température ambiante, la D.O. est égale au tiers de celle obtenue à 37°C. A 40°C, on note seulement une faible augmentation de l'absorbance.

Ferrari et coll. (33) ont comparé la production de formazan entre une culture cellulaire de 48 heures et des cellules ayant adhéré pendant 2 heures dans

les puits d'une microplaque. La production est nettement plus élevée après 48 heures qu'après 2 heures. Ce résultat reflète l'état métabolique des cellules qui est très ralenti dans les heures qui suivent la trypsination.

En conséquence, la quantité de formazan dépend du métabolisme cellulaire.

3.2.2 Le milieu de culture

Les besoins des cellules en culture sont couverts par les milieux de culture, qui ont pour but de reproduire aussi fidèlement que possible *in vitro* les conditions d'environnement que la cellule trouvait *in vivo* (1). Ils doivent donc :

- apporter des éléments nutritifs : la substance énergétique fondamentale étant le glucose,

- contribuer au maintien des constantes physico-chimiques : le pH devant se situer entre 7,2 et 7,4. Nous verrons plus loin l'influence du système tampon bicarbonate HCO_3^- sur l'essai.

Cependant, ces milieux assurent seulement la survie des cellules *in vitro*. La prolifération et l'expression des différentes fonctions cellulaires en culture nécessitent l'addition d'une certaine concentration de sérum au milieu synthétique de base (1). En effet, le déclenchement de la

division cellulaire n'est possible qu'en présence d'un certain nombre de facteurs mitogènes, fournis par le sérum.

1) Le contenu en glucose

Vistica et coll. (125) ont étudié l'effet d'une déplétion en glucose dans le milieu de culture, sur la réduction du MTT par diverses cellules tumorales. Une baisse de la concentration en glucose s'accompagne d'une diminution de la quantité de formazan produite. Le transfert des cellules dans un milieu sans glucose est suivi d'une chute dans la réduction du MTT.

Le glucose influence les concentrations cellulaires en nucléotides pyridiniques réduits : NADH et NADPH (124) qui jouent un rôle dans la métabolisation du sel de tétrazolium (voir chapitre I, paragraphe 1.2).

Par conséquent, un transport cellulaire et un métabolisme constant du glucose sont requis pour une réduction maximale du MTT.

2) La qualité du milieu

Les expériences de Jabbar et coll. (52) montrent que la transformation du MTT par les cellules est moins efficace quand elle s'effectue dans un milieu ayant

déjà servi à une culture cellulaire de plusieurs jours. Un milieu ayant supporté une culture pendant 6 jours donne une D.O. significativement plus basse que celle obtenue avec un milieu frais : 0,260 contre 0,467.

D'autre part, des modifications du pH du milieu provoquent des différences importantes dans la production de formazan (52). D'après la figure 14, la quantité de formazan augmente avec l'élévation du pH.

3) La quantité de sérum de veau

Denizot et Lang (27) qui utilisent un milieu dépourvu de sérum, uniquement lors de l'incubation des cellules avec le MTT, notent que l'absence de sérum ne diminue pas la quantité de formazan générée.

Twentyman et Luscombe (118) ont incubé des cellules avec le MTT, dans du milieu contenant 0 à 20 % de sérum de veau : plus la concentration est faible, plus la D.O. est grande.

Finalement, pour avoir une production de formazan optimale, il faut surtout un milieu de culture équilibré.

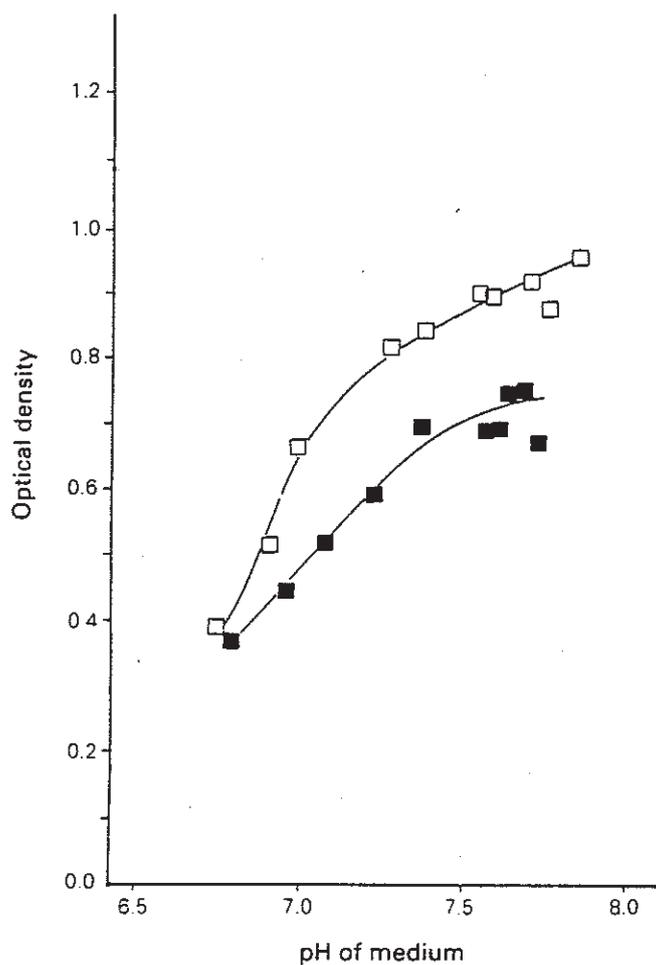


Figure 14 : Effet du pH sur la production de formazan. Les cellules COR-L23 sont réparties dans une microplaque à raison de 6×10^4 cellules/puits et incubées pendant 24 h. Après quoi, le milieu est retiré des puits et remplacé par du milieu provenant d'une culture cellulaire de 6 jours (■) ou par du milieu frais (□) après ajustement du pH avec du bicarbonate de sodium. D'après Jabbar et coll. (52)

3.2.3 Le MTT

1) La concentration finale en MTT

Selon Mosmann (72), la formation du formazan est approximativement proportionnelle à la quantité de MTT pour les basses concentrations, alors que Vistica et coll. (125) observent une phase retard (figure 15).

Denizot et Lang (27) trouvent que la quantité de formazan produite augmente très rapidement de 0 à 1 mg de MTT par ml de milieu de culture, ralentit entre 1 et 2 mg/ml et atteint un plateau aux plus hautes concentrations.

Malgré des différences de métabolisation entre les types de cellules, l'augmentation de la quantité de MTT s'accompagne toujours d'une production accrue de formazan, jusqu'à une certaine concentration en MTT pour laquelle la production est maximale (88). Le plateau de D.O. est obtenu pour des concentrations très variables suivant les lignées cellulaires :

- 0,4 mg/ml pour les cellules cancéreuses pulmonaires GLC4,
- 0,9 mg/ml pour les cellules cancéreuses de sein MCF-7.

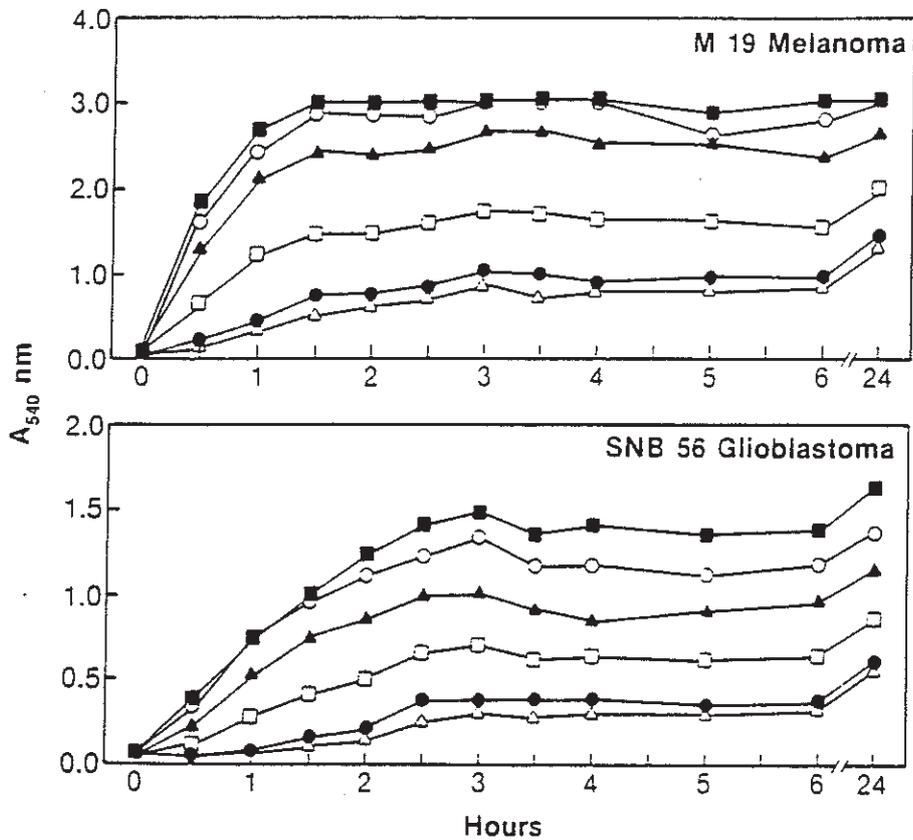


Figure 15 : Effet de la concentration en MTT et du temps d'incubation sur la réduction du MTT par des cellules M19 de mélanome et des cellules SNB56 de gliosarcome. Après 48 heures de culture, le MTT est ajouté et l'incubation est poursuivie pendant un temps approprié. Le formazan est quantifié après extraction par du DMSO. Concentrations en MTT (mM) : 0,075 (Δ) ; 0,1 (\bullet), 0,25 (\square) ; 0,5 (\blacktriangle) ; 0,75 (\circ) ; 1,0 (\blacksquare). D'après Vistica et coll. (125).

Pour la plupart des cellules, une concentration finale de 1 mg/ml est plus que suffisante (88). Mais, il est impossible de conseiller cet optimum pour l'essai au MTT puisque pour certaines souches cellulaires, un excès de MTT résulte en une réduction dans la production de formazan. C'est le cas des plaquettes sanguines humaines pour lesquelles l'absorbance diminue quand la concentration finale en colorant dépasse 0,8 mg/ml (figure 16) (123). Cette baisse de D.O. traduit une action toxique du sel de tétrazolium aux hautes concentrations (10).

Si la concentration optimale en MTT est déterminée, alors il existe une relation proportionnelle entre les nombres de cellules et les valeurs de D.O. (88).

2) Le temps d'incubation des cellules avec le MTT

Pour Mosmann (72) et Denizot et Lang (27), le signal d'absorbance augmente presque linéairement de 30 minutes à 2 heures et devient non linéaire de 2 à 4 heures (figure 17). En revanche, Green et coll. (42) rapportent que la production de formazan reste linéaire pendant les 4 heures d'incubation.

Les cinétiques de réduction du MTT diffèrent donc entre les lignées cellulaires.

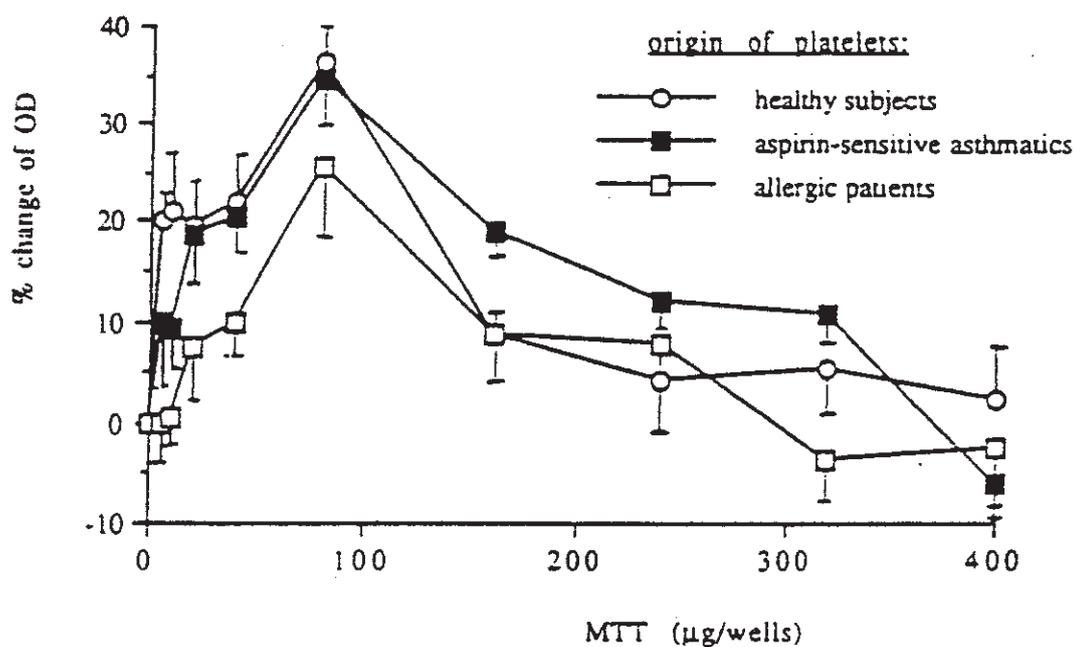


Figure 16 : Effet de la concentration en MTT. Des plaquettes sanguines sont mises en présence de différentes quantités de MTT pour l'essai colorimétrique. Les points représentent la moyenne \pm l'écart-type de trois expériences. D'après Vanhée et coll. (123).

En général, le formazan est produit graduellement, puis les courbes de D.O. atteignent un plateau qui correspond au temps d'incubation optimal. Par exemple, celui-ci est de :

- 1 heure pour les cellules de rein de singe, Vero (44)
- 2 heures pour les polynucléaires neutrophiles (90)
- 3 à 4 heures pour des cellules T de lymphome murin EL 4 (40)
- 5 heures pour des cellules leucémiques fraîches (119).

Le test d'exclusion du bleu Trypan montre que la viabilité cellulaire diminue linéairement avec la durée d'exposition au MTT (figure 18) (40). La relation non linéaire entre le niveau de clivage du MTT et la longueur d'incubation est liée à la mort progressive des cellules. Si le MTT est létal pour les cellules, alors l'allongement du temps d'incubation ne peut pas optimiser les résultats (41). Cependant, Sudo et coll. (115) prolongent sans problème le temps de contact de fibroblastes humains embryonnaires MRC-5 avec le MTT, jusqu'à 24 heures ! Cela leur permet d'améliorer la sensibilité de l'essai puisque les MRC-5 présentent une activité métabolique très faible.

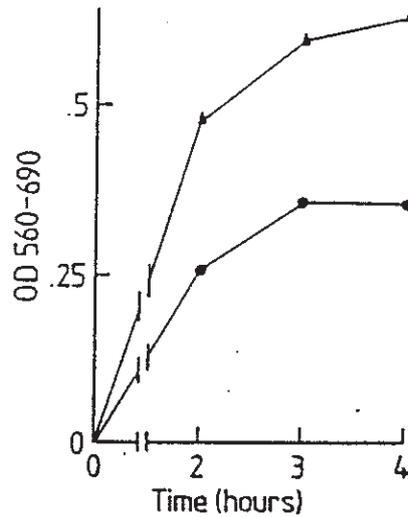


Figure 17 : Cinétiques de réduction du MTT par des cellules tumorales EL-4. Différents nombres de cellules [12500 (●) et 25000 (▲)] sont incubés avec le MTT dans une microplaque. Aux temps indiqués, le milieu est enlevé et le formazan est dissous dans de l'éthanol. La densité optique est lue à 560 nm avec une longueur d'onde de référence de 690 nm . Chaque point est la moyenne de 4 puits. D'après Denizot et Lang (27).

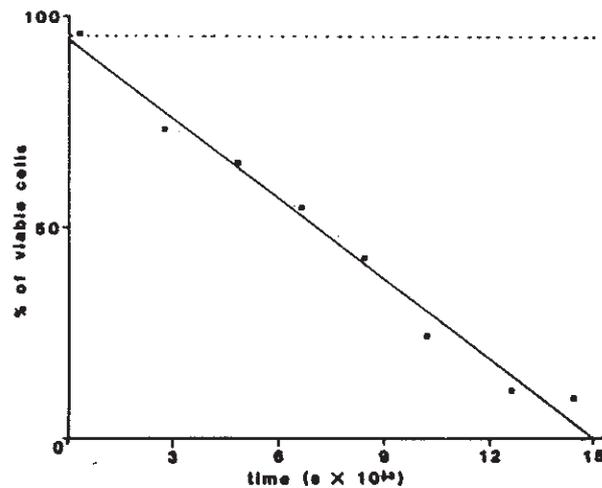


Figure 18: Cinétique de survie de cellules spléniques stimulées, pendant l'incubation avec du MTT (solution à 3 μ M). Les résultats sont exprimés en % de cellules viables déterminés par le test d'exclusion du bleu Trypan. D'après Gerlier et Thomasset (40).

Le fait que le temps de développement du formazan dépende à la fois de la densité cellulaire, de l'activité enzymatique des cellules et de la quantité de MTT ajoutée, explique l'absence d'un temps d'incubation optimal fixe pour la méthode au MTT.

3.2.4 Le solvant

Le formazan dérivant du MTT n'est pas soluble dans l'eau. Afin de mettre en évidence sa coloration, il est indispensable de le solubiliser avec un solvant organique, après la phase d'incubation des cellules avec le MTT. L'influence du solvant sur l'essai au MTT, est liée en grande partie à la présence du milieu de culture (contenant le sérum de veau et le rouge de phénol) dans les puits et à sa composition chimique.

1) Le solvant et le milieu de culture

a) Le sérum

En présence d'un mélange alcool-acide, il se produit une précipitation occasionnelle des protéines sériques dans le milieu de culture (72, 100, 116). Ceci provoque une dispersion importante de la lumière qui interfère avec les mesures d'absorbance du formazan (42, 44, 116, 122) et qui conduit à une D.O. variable et élevée du

bruit de fond (27, 118, 122). Ce phénomène est d'autant plus prononcé que le milieu renferme de hautes concentrations en sérum (> 15 %) (42) et que le solvant est acidifié. Aux valeurs de pH inférieures à 4, la plupart des protéines portent une charge basique ce qui accentue la possibilité de précipitation (44).

Afin d'éviter ce problème, Denizot et Lang (27) utilisent un milieu sans sérum pendant l'incubation des cellules avec le MTT. D'autres auteurs rejettent la totalité du surnageant, ce qui a en plus l'avantage de concentrer le solvant et d'accroître la sensibilité de l'essai (40, 130). Néanmoins, l'aspiration du milieu n'est pas considérée comme une solution pratique, à cause des pertes imprévisibles en formazan et en cellules (44), même après une centrifugation (118). C'est pourquoi, certains préfèrent laisser :

- soit une petite quantité de milieu (62, 118),
- soit la totalité du milieu en maintenant le pH du solvant supérieur à 4 (44).

Dans ces deux cas, l'addition d'une solution de détergent tel que le S.D.S. ou le Triton X-100 atténue la précipitation protéique (pour le S.D.S.) selon Green et coll. (42) et Tada et coll. (116) ou prévient ce phénomène (avec le Triton X-100) d'après Pauwels et coll. (83). Enfin, Alley et coll. (3) suggèrent de remplacer l'isopropanol acidifié par le DMSO qui, en présence d'un reste de milieu,

est capable de solubiliser en même temps le sérum et le formazan.

b) Le rouge de phénol

Le pH du milieu de culture est contrôlé par la présence d'un indicateur coloré qui est généralement du rouge de phénol (1). Celui-ci interfère avec les lectures d'absorbance du formazan à 570 nm (72). Nous avons vu que Mosmann (72) contourne cette interférence grâce à l'addition d'HCl au solvant. Cependant, ce procédé présente plusieurs inconvénients :

- il ajoute une étape supplémentaire,
- l'acidification modifie les propriétés spectrales du formazan, avec une diminution de l'absorbance à 560 nm (3, 27) et une augmentation autour de 400 nm, longueur d'onde d'absorption du MTT (3, 4, 27). Selon Hansen et coll. (44), à pH inférieur à 4, le formazan est reconverti en MTT.

Afin de remédier au problème du rouge de phénol, nombreux sont ceux qui retirent le milieu avant l'addition du solvant. Cependant, si le pH du solvant est maintenu inférieur à 5,5, le rouge de phénol ne contribue pas à la D.O. totale (figure 19) (44). Il est donc possible d'après Hansen et coll. (44) de garder la totalité du milieu si on emploie un pH de 4,7 pour le solvant.

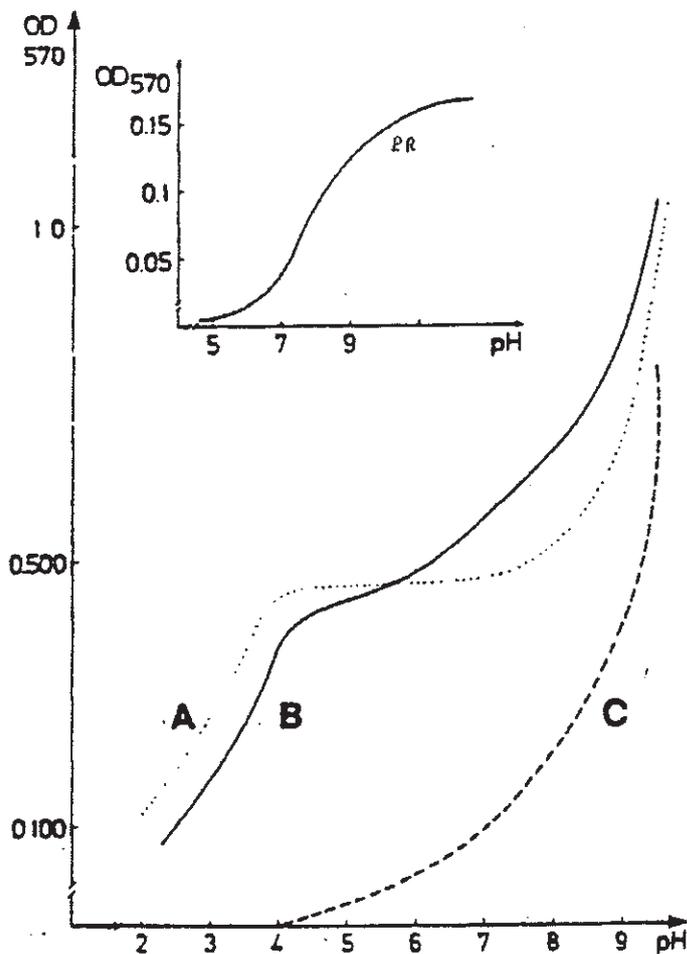


Figure 19 : Influence du pH sur la solubilisation du formazan. Des cellules Wehi (2×10^4 /puits) sont réparties dans une microplaque et incubées une nuit à 37°C. Le lendemain matin, les cultures reçoivent 25 μ l de MTT (5mg/ml) et sont incubées pendant 2 heures. Le pH du solvant DMF/S.D.S. varie de 2 à 10 (par addition de HCl 1M / NaOH 1M) et les D.O. sont lues à 570 nm. (A) agitation immédiatement suivie des lectures des D.O. ; (B) incubation d'une nuit à 37°C suivie des mesures des D.O. ; (C) milieu + MTT + solvant avec lecture des D.O. après une nuit d'incubation. D'après Hansen et coll. (44).

c) Le volume du milieu résiduel

L'influence d'un volume résiduel de milieu sur les valeurs de D.O. a été principalement étudiée en présence de DMSO (88, 118) qui est le solvant le plus apte à dissoudre les cristaux de formazan dans ces conditions (18, 118). L'absorption du formazan augmente fortement de 0 à 10 μ l de milieu par puits. De 10 à 40 μ l/puits, elle diminue progressivement pour s'élever à nouveau au-delà de 40 μ l. Selon Twentyman et Luscombe (118), la première augmentation de D.O. est due à une modification du spectre d'absorption du formazan dans le DMSO. Le principal facteur responsable est le contenu du milieu en bicarbonate de sodium. L'élévation des D.O. observée après 40 μ l est due à la turbidité provoquée par la précipitation protéique.

L'addition d'un tampon glycine de pH 10,5 au DMSO évite ces variations d'absorbance (88). De plus, elle accroît de façon importante les valeurs des D.O. par rapport au DMSO pur.

2) La composition chimique du solvant

De par sa composition, le solvant d'extraction du formazan influence le **niveau des D.O.** La capacité de solubilisation des cristaux varie suivant le type cellulaire ce qui explique le grand nombre de solvants

employés. Ainsi, pour les lignées cancéreuses H322 (cellules pulmonaires) et P388 (cellules leucémiques), l'isopropanol acidifié extrait insuffisamment le formazan généré alors que l'examen microscopique des cellules révèle des quantités importantes de cristaux (2, 3). En revanche, avec le DMSO, la solubilisation est totale.

Avec les cellules MT-4 (lymphocytes T), l'isopropanol acidifié est largement plus performant que le DMSO (83).

Hansen et coll. (44) ont testé trois solvants sur les cellules MDBK. Le mélange S.D.S./DMF conduit à des valeurs de D.O. supérieures à celles obtenues avec l'isopropanol acidifié et avec le S.D.S. acidifié. Avec ces deux derniers, des cristaux de formazan sont encore présents.

L'absorbance du bruit de fond varie considérablement en fonction des solvants. Avec le DMSO/glycine, la D.O. du bruit de fond est plus faible qu'avec l'isopropanol acidifié (122).

La nature et la qualité du solvant jouent aussi un rôle sur la **stabilité des D.O.** C'est le cas du DMSO qui donne des D.O. plus stables que l'isopropanol (2, 3, 118). D'autre part, l'utilisation de DMSO de qualités spectrophotométriques fournit des niveaux constants d'absorbance du bruit de fond pendant les 2 heures qui suivent l'addition du solvant (3). En revanche, du DMSO non

spectrophotométrique ou pré-exposé à l'air provoque une élévation de la D.O. du bruit de fond dans les 15 minutes suivantes.

3) L'agitation du solvant

L'agitation est indispensable pour obtenir une solubilisation complète des cristaux de formazan et donc des valeurs de D.O. maximales. La technique sur agitateur de plaque est préférée au pipetage répété pour des raisons de gain de temps et de commodité. Cependant, même après plusieurs heures, la solubilisation peut être incomplète, selon Carmichaël et coll. (18). En effet, l'obstacle majeur est la difficulté à réaliser un mélange vigoureux à l'intérieur de chaque puits de la microplaque. Or, une accélération mécanique de la dissolution, particulièrement si les cellules sont très agrégées, est un facteur décisif même pour des tampons d'extraction d'une haute efficacité (76). Iselt et coll. (50) ont proposé une brève sonication, afin de résoudre ce problème. Malheureusement, cette technique très performante présente un risque pour la sécurité des manipulateurs (107). Il y a formation possible d'un aérosol contenant du MTT qui possède un potentiel carcinogène.

Avec le solvant DMF/S.D.S., Hansen et coll. (44) ont montré que la différence est négligeable entre une agitation et une incubation d'une nuit.

3.2.5 Facteurs externes

Nous verrons dans le chapitre V que la méthode au MTT est appliquée en particulier à l'étude de la cytotoxicité de molécules. Ces molécules peuvent interférer de trois façons :

- soit les composés (3, 18) ou leurs métabolites (41) ont un spectre d'absorption semblable à celui du formazan,

- soit les composés réduisent le MTT par une action chimique directe (3, 97),

- soit les composés affectent le métabolisme mitochondrial indépendamment de la croissance cellulaire (79, 85).

Ces facteurs peuvent contribuer à surestimer ou sous-estimer l'activité de ces molécules.

Afin d'éviter des résultats erronés et de déterminer la participation de la drogue dans la D.O. finale, chaque essai doit comporter des témoins produits sans cellule.

Chapitre quatrième

COMPARAISON DE LA METHODE

COLORIMETRIQUE AU MTT

AVEC D'AUTRES METHODES

DE MESURE DE LA

VIABILITE CELLULAIRE

L'analyse comparative de la méthode colorimétrique au MTT avec des techniques mieux connues (telles que l'exclusion du bleu Trypan, l'incorporation de thymidine tritiée...) est indispensable pour s'assurer de son utilité et de sa validité. La comparaison avec des méthodes plus récentes (telles que celles à la sulforhodamine B, au XTT...) permettra de savoir si l'essai au MTT est une technique déjà dépassée. Nous terminerons cette étude par la méthode colorimétrique au May-Grünwald/Giemsa qui n'est pas une méthode de mesure de viabilité proprement dite, mais qui est utilisée au laboratoire de virologie.

Pour chaque type d'essai, nous distinguons les études comparatives réalisées en immunologie, en cancérologie et en virologie puisque c'est ce dernier domaine d'application qui nous intéresse plus particulièrement. Pour chacune des méthodes, nous faisons un bref rappel du principe avant d'entrer dans la comparaison proprement dite.

4.1 Comparaison avec la méthode au bleu Trypan

4.1.1 Principe de la méthode au bleu Trypan

Le test d'exclusion du bleu Trypan (B.T.) est basé sur la perte d'intégrité de la membrane cellulaire et la pénétration postérieure du colorant dans la cellule (83). Les cellules vivantes et en bon état sont imperméables au B.T. (1). Le pourcentage de cellules non colorées représente donc le pourcentage de viabilité cellulaire.

L'essai consiste à mélanger la solution de B.T. avec une suspension cellulaire. La numération des cellules excluant le colorant s'effectue sur cellule de Malassez, en utilisant un microscope.

4.1.2 En immunologie

Weichert et coll. (127) ont comparé les méthodes au MTT et au B.T. pour des mesures de cytotoxicité: ils ont obtenu des résultats semblables.

Les nombreux inconvénients du B.T. proviennent du comptage microscopique des cellules viables, qui est laborieux, long et subjectif (32). L'analyse en parallèle de multiples cultures cellulaires est difficile à

réaliser par une seule personne. D'un autre côté, l'implication de plusieurs personnes peut donner lieu à des résultats variés, à cause des décisions individuelles. De plus, durant les procédés de coloration et de dénombrement, il devient pratiquement impossible de maintenir des conditions identiques pour chaque culture, si le nombre de groupes expérimentaux est élevé.

Les avantages de l'essai au MTT sont :

- la rapidité avec laquelle les échantillons sont traités,
- le grand nombre de plaques qui peut être testé,
- les manipulations simples,
- la méthode facile de mesure grâce au lecteur ELISA.

4.1.3 En cancérologie

Il existe une bonne corrélation entre les deux méthodes, lors des épreuves de criblage (87, 95). Le test au B.T. se caractérise par sa capacité à détecter la cytotoxicité au sein d'une culture hétérogène (c'est-à-dire constituée de cellules normales et de cellules cancéreuses) (58). Comme l'essai au MTT ne distingue pas les cellules tumorales des cellules saines dans un même échantillon, il doit être employé avec des spécimens de sang ou de biopsies

qui apportent une fraction importante de cellules malignes (plus de 80 %).

Cependant, la méthode d'exclusion du B.T. est limitée par le dénombrement laborieux, long et sujet à erreur, des nombreuses lames d'échantillons de cellules tumorales (58, 66, 87). Elle exige plusieurs heures de travail alors que l'essai au MTT prend seulement 15 minutes de manipulation (87).

4.1.4 En virologie

Les deux méthodes donnent des résultats comparables lors des mesures d'activités anti-V.I.H. (83).

Mais, la coloration au B.T. présente quelques inconvénients pratiques (83) :

- le mélange d'une suspension cellulaire avec le colorant,
- la préparation et la désinfection de l'hématimètre et de la lamelle, qui sont en verre et qui représentent donc un risque de coupure,
- le comptage laborieux sous un microscope qui doit être installé à l'extérieur de l'unité de sécurité.

C'est pourquoi, les données pour chaque concentration en composé sont le plus souvent obtenues à partir d'un seul

puits. Ceci entraîne une variation assez grande dans les résultats.

Comme le procédé au B.T. est plutôt "encombrant" quand on étudie de nombreuses molécules, l'essai au MTT réalisé en microplaque est beaucoup plus pratique. Ce dernier a en plus l'avantage d'évaluer simultanément la cytotoxicité de la drogue et son activité antivirale (63, 83).

4.1.5 Conclusion

Compte tenu du temps nécessaire pour la méthode au B.T., cette technique est surtout utile pour tester l'activité d'un petit nombre de molécules ou pour confirmer une activité apparue lors du criblage (63).

Bien que les deux essais conduisent à des résultats quasiment identiques, celui au MTT se montre supérieur au B.T. par sa simplicité, sa rapidité et sa reproductibilité.

4.2 Comparaison avec le comptage de colonies

4.2.1 Principe du comptage de colonies

L'épreuve de formation de colonies est basée sur la capacité de diverses cellules-mères à se diviser et à former des colonies de cellules-filles (59).

Les cellules sont comptées et mises en boîte de Petri, dans du milieu de culture approprié. Pour les cellules non adhérentes, on ajoute de la gélose. Après une incubation de plusieurs jours, les colonies sont fixées, colorées et dénombrées en utilisant un microscope (19). On ne compte que les colonies de 50 cellules ou plus.

4.2.2 En immunologie

Kotnik et Fleischmann (59) ont comparé la méthode au MTT en microplaque au comptage de colonies sur gélose molle, pour déterminer l'activité de facteurs de croissance hématopoïétiques. Malgré des résultats similaires, l'essai au MTT ne différencie pas les types cellulaires (macrophages, granulocytes) puisqu'il n'examine pas les cellules au microscope. Il a cependant un certain nombre d'avantages sur l'épreuve de formation de colonies (59) :

- il utilise de plus petites quantités de réactifs à tester, qui sont souvent difficiles à obtenir : 0,1 ml au lieu des 2,5 ml nécessités par la taille des boîtes de Petri,

- il est plus rapide : 3 jours contre 7 à 14 jours d'incubation, indispensables pour le développement des colonies,

- l'évaluation des résultats prend très peu de temps : quelques minutes et non plusieurs heures. En effet, le comptage des colonies repose sur l'examen microscopique des boîtes de culture, pour identifier les colonies et les compter. Cette étape est longue, laborieuse et quelque peu subjective,

- il est capable d'analyser de nombreux échantillons dans une même expérience.

4.2.3 En cancérologie

Dans les tests de chimiosensibilité et de radiosensibilité, il existe une bonne corrélation entre les résultats des deux techniques (18, 19, 29). Dans le premier cas, l'essai au MTT est moins sensible que le comptage des colonies, mais il est plus quantitatif (18). Considérée comme la méthode de choix dans le deuxième cas, l'épreuve de formation de colonies est limitée par la durée de développement des colonies et par l'incapacité de certaines cellules à former des colonies (89).

Pour Iselt et coll. (50), cette technique ne convient pas pour la recherche anti-cancéreuse parce que, à la différence de celle au MTT, elle est trop longue, fastidieuse et impossible à automatiser.

4.2.4 Conclusion

La méthode colorimétrique au MTT est supérieure à l'essai de comptage des colonies, pour les raisons suivantes :

- utilisation d'un faible nombre de cellules (10⁵),
- facilité pour quantifier les cellules en suspension de même qu'en monocouche (89),
- lecture rapide et automatisée,
- évaluation objective,
- haute reproductibilité,
- faible coût.

4.3 Comparaison avec les méthodes radioactives

4.3.1 Principe des méthodes radioactives

Les essais radioactifs sont basés :

- soit sur la capacité des cellules à incorporer un substrat radioactif (thymidine tritiée, uridine tritiée...),
- soit sur leur capacité à libérer un marqueur radioactif (chrome 51, thymidine tritiée...) (40).

Le test d'incorporation de la thymidine tritiée (nucléotide radioactif le plus utilisé) dans l'ADN (acide desoxyribonucléique) cellulaire évalue le nombre de cellules

synthétisant de l'ADN (72) : il mesure donc la prolifération cellulaire.

Le degré de mort cellulaire est estimé par le relargage du chrome 51 (49) qui mesure par conséquent la cytotoxicité.

La technique consiste à incuber les cellules avec l'isotope radiomarqué pendant :

- 4 heures pour la thymidine tritiée, parfois 18 heures ou plus (6, 64, 127),
- 3 heures avec l'uridine tritiée (34),
- 1 à 2 heures avec le chrome 51 (45).

Dans le cas d'un test de prolifération, les cellules sont récoltées à l'aide d'un collecteur de cellules sur un filtre. La captation du radioisotope est évaluée avec un compteur à scintillation liquide (33).

Dans le cas d'un test de cytotoxicité, le milieu des puits est récolté et la radioactivité est mesurée sur un compteur gamma (45).

4.3.2 En immunologie

* Thymidine tritiée

Bien que l'essai colorimétrique au MTT mesure le métabolisme énergétique des cellules vivantes plutôt que la division cellulaire, les deux techniques donnent des résultats semblables dans les schémas de prolifération (33,

49, 64, 72, 73, 116, 127). Avec les cellules à faible activité métabolique, l'essai au MTT n'est pas assez sensible pour se substituer à celui de la thymidine tritiée (130).

* Chrome 51

La corrélation entre les deux méthodes est bonne lors des tests de cytotoxicité cellulaire (49). Cependant, l'essai de relargage du radioisotope peut sous-estimer la lyse cellulaire à cause de la rétention intracellulaire du marqueur après phagocytose par des monocytes (122). Dans les études à long terme, la libération spontanée de l'isotope par les cellules cibles excède parfois 30% (42). Ceci diminue de façon importante la validité et la sensibilité de ce test.

Le chrome 51 est un isotope radioactif coûteux, de durée de vie brève obligeant à une utilisation rapide et dont la manipulation nécessite une attention particulière (71).

4.3.3 En cancérologie

* Thymidine tritiée

Les deux méthodes possèdent une reproductibilité et une sensibilité excellentes dans les études de criblage (6). Malgré des valeurs de cytotoxicité différentes, elles classent les mêmes molécules en drogues

actives ou inactives. Elles sont également capables de détecter de faibles niveaux de résistance cellulaire.

Néanmoins, l'essai à la thymidine tritiée quantifie la réplication de l'ADN, sur un intervalle de temps déterminé, plutôt que le nombre de cellules en lui-même (41).

* Uridine tritiée

Selon Ford et coll. (34), l'essai au MTT peut remplacer celui à l'uridine tritiée pour évaluer la chimiosensibilité in vitro de cellules tumorales, avec des avantages en terme de sécurité, de simplicité et de coût.

* Chrome 51

La méthode au MTT est plus sensible que celle au chrome 51 pour détecter la lyse de cellules cibles adhérentes, dans l'évaluation de la cytotoxicité de cellules effectrices vis-à-vis de cellules cibles tumorales (45). Ceci reflète le fait que les deux tests reposent sur des principes différents. Le premier dépend de la capacité des cellules viables à rester attachées à la surface plastique et à réduire le MTT, tandis que le second traduit une perte de l'intégrité de la membrane cellulaire et une fuite du contenu cellulaire dans le milieu. Dans cette étude, l'essai au MTT est réalisé sur des monocouches de cellules tumorales. Il fournit une mesure plus réaliste des interactions avec les cellules effectrices que le test au

chrome 51, effectué sur cellules trypsinées. Si cette étude implique des cellules non adhérentes, alors la méthode au MTT ne convient pas.

* Les méthodologies radioactives ne sont pas adaptées aux vastes programmes de criblage parce qu'elles sont longues, laborieuses et onéreuses.

4.3.4 En virologie

On peut mesurer la viabilité de cellules infectées par un virus, en évaluant la capacité de celles-ci à incorporer la thymidine tritiée.

Schwartz et coll. (100) ont trouvé que l'essai au MTT donne les mêmes réponses que l'essai à la thymidine tritiée. Toutefois, la captation du nucléotide radiomarqué exige un investissement substantiel en temps et en ressources, si l'on souhaite cribler un grand nombre de composés potentiellement antiviraux (12, 63).

4.3.5 Conclusion

L'essai colorimétrique au MTT a des avantages communs avec les méthodes radioactives :

- une quantification précise (72),

- une sensibilité et une reproductibilité satisfaisantes (33, 64),

- une compatibilité avec les programmes d'analyse sur ordinateur (72).

Il présente des avantages propres qui le rendent supérieur aux techniques des isotopes radioactifs, en étant :

- plus sûr : il évite les problèmes de sécurité et d'élimination des déchets, liés à l'utilisation des radioisotopes (94). De ce fait, on supprime aussi l'exposition du manipulateur au liquide de scintillation très cancérigène (130),

- moins coûteux sur le plan des réactifs et de l'équipement (6, 94) : le test au MTT requiert seulement un investissement modeste, dans un spectrophotomètre pour microplaques (42),

- plus rapide : les lecteurs ELISA permettent de traiter un grand nombre d'échantillons, le temps de lecture étant de 1 minute 30 environ pour 96 puits (72),

- plus facile : les multiples lavages et les transferts de cellules et de surnageants des plaques aux tubes (pour mesurer la radioactivité) sont éliminés (45).

4.4 Comparaison avec la méthode au rouge neutre

4.4.1 Principe de la méthode au rouge neutre

Le rouge neutre (R.N.) fait partie de ce que l'on appelle les colorants vitaux qui se fixent électivement sur certains constituants sans tuer les cellules. Le R.N. est stocké dans les lysosomes des cellules vivantes (134). L'essai au R.N. est donc basé sur la concentration active du colorant par les cellules viables.

Les cellules sont mises à incuber avec le R.N. pendant 30 minutes (68), 1 heure 30 (65) ou 3 heures (16). Puis, on enlève le colorant non incorporé, on lave et on fixe les cellules avec une solution adéquate. Cette solution est éliminée et le colorant est extrait par un solvant (par exemple un mélange d'éthanol et d'acide acétique). Après un délai de quelques minutes, suivi d'une agitation, la couleur développée est quantifiée sur un spectrophotomètre ou un lecteur de plaque, à 540 nm. Le nombre de cellules viables est proportionnel à la D.O. obtenue.

4.4.2 En immunologie

Hansen et coll. (44) ont appliqué la technique au MTT à des cultures cellulaires à long terme (sans changer le milieu) et l'ont comparée à la méthode au R.N. Les deux méthodes donnent des résultats comparables pendant les 4 premiers jours de culture (avec cependant des valeurs de D.O. plus élevées dans le cas du R.N.). A partir du 5ème jour, les courbes de D.O. diminuent rapidement, atteignant un minimum le 7ème jour, quelle que soit la technique utilisée. Avec le R.N., cette chute de D.O. n'est pas enrayée par un renouvellement du milieu lors du 3ème jour, comme on l'observe pour le MTT. Hansen et coll. (44), expliquent cette différence par le fait que la méthode au R.N. implique la liaison non spécifique du colorant aux protéines cellulaires alors que la méthode au MTT est spécifiquement enzymatique.

4.4.3 En toxicologie

Dans des études de cytotoxicité, les deux essais sont capables de mesurer les effets cytostatiques et cytocides de divers médicaments et fournissent des résultats similaires pour la plupart des molécules (16). Il existe cependant quelques différences de sensibilité et les valeurs

de D.O. obtenues avec le R.N. sont le double de celles du MTT.

Selon Borenfreund et coll. (16), la plus faible sensibilité de l'essai au MTT peut être due à la mauvaise solubilisation du formazan et au fait que la quantité de MTT réduite est inférieure à la quantité de R.N. captée par les cellules.

D'après Duffy et coll. (28), l'essai au MTT ne convient pas pour évaluer le phénomène de phototoxicité. Les résultats publiés pour diverses phototoxines sont en désaccord avec les expériences cliniques. En revanche, la méthode au R.N. représente une meilleure méthode pour mesurer la phototoxicité de certains médicaments (61). En effet, les membranes lysosomiales sont le site d'action de nombreux composés phototoxiques et nous avons vu que l'essai au R.N. est basé sur la captation active du colorant dans les lysosomes.

4.4.4 En virologie

La technique au R.N. fondée sur la différence de quantité de colorant captée par des cellules infectées par un virus et des cellules non infectées a été proposée comme test de criblage de composés anti-Herpès (68). Mais à cause de la faible sensibilité et de la mauvaise

reproductibilité des résultats, elle a été très peu reprise, contrairement à l'essai au MTT (127).

La méthode au R.N. est traditionnellement utilisée pour le comptage des plages virales en boîte de Petri, afin d'amplifier l'apparition des plages de lyse (26). Cependant, elle présente plusieurs inconvénients. D'une part, le R.N. s'incorpore mal dans la gélose (26) et d'autre part, il n'augmente pas assez le contraste de coloration entre les plages de lyse et les cellules (26, 104). En effet, le R.N. est déjà coloré au départ et il ne se produit pas de changement de couleur comme dans la méthode au MTT. Ceci conduit à un comptage pénible et imprécis.

Le MTT accentue énormément la différence entre les plages de lyse (jaunes) et le fond des cellules (violet foncé), si bien que les plages sont facilement dénombrées, même à l'oeil nu (104).

4.4.5 Conclusion

Pour certains auteurs, l'essai au MTT donne de moins bons résultats que celui au R.N. Il requiert des concentrations cellulaires plus élevées, en particulier avec les cellules à faible activité mitochondriale (65).

Cependant, les deux colorants présentent la même cytotoxicité lors d'incubation prolongée avec les cellules (51). De part la transformation du MTT en formazan, l'essai au MTT ne nécessite pas d'étapes de lavage supplémentaires comme celles requises pour le R.N. Il est donc plus facile à utiliser avec des cellules non adhérentes (65).

4.5 Comparaison avec la méthode à la sulforhodamine B

En 1990, le National Cancer Institute (N.C.I.) a décrit l'utilisation de la sulforhodamine B, dans des tests de chimiosensibilité (106).

4.5.1 Principe de la méthode à la sulforhodamine B

La sulforhodamine B (SRB) est un colorant dit protéique, de couleur rose vif (106). Sous des conditions faiblement acides, la SRB se lie aux résidus amino-acides des protéines cellulaires et fournit un indice sensible du contenu en protéines cellulaires. L'essai à la SRB évalue donc directement la synthèse protéique qui est un des paramètres les plus importants de la multiplication cellulaire (60).

Après avoir fixé les cellules par de l'acide trichloracétique, on ajoute la solution de colorant et on attend 10 minutes (60) à 30 minutes (106). On retire ensuite la SRB non liée, on lave plusieurs fois, on laisse sécher et on extrait le colorant par un solvant. Les D.O. sont déterminées sur un lecteur de microplaque, à 515 ou 564 nm. Elles sont proportionnelles aux nombres de cellules.

4.5.2 En immunologie

Les méthodes au MTT et à la SRB donnent des résultats semblables dans des essais de cytotoxicité cellulaire (38). Celle au MTT est plus reproductible car elle ne comporte pas d'étape de lavage.

5.5.3 En cancérologie

Les comparaisons des deux tests, lors de criblages de molécules à visée anti-cancéreuse, ont toutes conclu à une bonne corrélation des résultats entre le MTT et la SRB (56, 85, 97).

Cependant, l'essai au MTT présente plusieurs inconvénients par rapport à l'essai à la SRB :

* Au niveau de la sensibilité et de la reproductibilité :

Selon Keepers et coll. (56), l'étude des cinétiques de croissance cellulaire montre que la méthode à la SRB est plus sensible et plus reproductible que celle au MTT. Elle offre une meilleure relation de linéarité entre les D.O. et les nombres de cellules, ainsi qu'une plus faible variation entre les lignées cellulaires. En effet, son pouvoir de coloration ne dépend pas du type de cellules.

* Au niveau du mode opératoire :

Le test au tétrazolium implique l'incubation des cellules avec le colorant pendant une durée déterminée. Selon Rubinstein et coll. (97), quand on manipule plusieurs centaines de microplaques par jour, il devient difficile de rester dans les temps pour l'étape d'incubation et pour la lecture des D.O. Dans le test à la SRB, les cellules sont fixées chimiquement à la fin du criblage, ce qui permet de colorer simultanément de nombreux lots de plaques sans être limité par le temps. De plus, à la différence du MTT, la coloration à la SRB est stable et les microplaques peuvent être stockées pendant plusieurs semaines voire plusieurs mois (56). L'essai peut être également interrompu à différentes étapes du protocole.

Cependant, l'argument selon lequel la méthode à la SRB est plus simple et plus rapide que celle au MTT n'est pas valable. Il suffit d'examiner le mode opératoire proposé par Rubinstein et coll. (97) pour s'en rendre compte:

- fixer les cellules et attendre 1 à 2 heures,
- enlever les surnageants,
- laver 5 fois et laisser sécher les plaques,
- ajouter la SRB : 10 à 20 minutes de contact,
- retirer les surnageants,
- laver 5 fois et laisser sécher,
- solubiliser le colorant lié aux protéines,
- lire les D.O.

Après l'incubation, il faut laver les puits afin d'ôter tout le colorant non incorporé, jusqu'à ce que la solution ajoutée devienne claire (60). Les plaques sont considérées comme sèches quand on ne décèle aucune trace d'humidité dans les puits (106). Même si on ne laisse pas sécher les plaques toute une nuit comme le font Kubota et coll. (60), toutes ces étapes supplémentaires (fixation, lavages, séchages) prennent du temps et compliquent le protocole. Sur ce plan, l'essai au MTT est nettement plus séduisant : il se déroule en 5 phases et ne comporte pas d'étape de lavage.

* Au niveau de la réduction du MTT

- Le MTT dépend de l'activité succinate deshydrogénase. Bien que ceci représente une des fonctions métaboliques les plus importantes des cellules, la perte de cette activité ne correspond pas obligatoirement à une mort cellulaire (60). En revanche, la synthèse protéique évaluée par la SRB constitue un marqueur direct de la viabilité cellulaire.

- La réaction de métabolisation du MTT est sensible aux concentrations en glucose, en NADH et NADPH et aux variations de pH (124, 125) alors que le test à la SRB n'est influencé par aucune considération métabolique (106).

- Lorsque le MTT est appliqué à des essais de criblage, les molécules évaluées peuvent interférer avec les lectures de D.O. (chapitre III, paragraphe 3.2.5). Ceci donne lieu à des valeurs de D.O. faussement élevées (97) obligeant à prévoir des témoins appropriés (85). Ce phénomène ne peut pas se produire avec la méthode à la SRB.

4.5.4 Conclusion

Selon Keepers et coll. (56), la SRB colore même les cellules récemment lysées. Cet essai pourrait donc conduire à de faux positifs. En revanche, puisque le MTT est réduit uniquement par les cellules métaboliquement actives

(72), les cellules mortes n'interfèrent pas avec les niveaux d'absorbance du formazan.

4.6 Comparaison avec un autre sel de tétrazolium : le XTT

Le sel de tétrazolium XTT (hydroxyde de 2,3-bis (2-méthoxy-4-nitro-5-sulfophényl)-5-[(phénylamino)carbonyl]-2H-tétrazolium) a été synthétisé par Paull et coll. (82) en 1988, dans le but de remplacer le MTT.

4.6.1 Principe de la méthode colorimétrique au XTT

Le principe de la méthode au XTT est identique à celui du MTT. Il repose sur l'activité mitochondriale des cellules vivantes (134) qui réduisent le XTT incolore en un formazan rouge orangé. Le formazan est hydrosoluble : il est donc directement quantifié sur un spectrophotomètre (133).

Les cellules cultivées dans des microplaques à 96 puits sont incubées pendant 4 à 8 heures avec la solution de XTT additionnée d'un transporteur d'électrons (94). Les D.O. sont déterminées sur un lecteur de microplaque ELISA à

une longueur d'onde test de 450 nm et une longueur d'onde de référence de 650 nm. Il existe plusieurs agents couplant les électrons : le PMS, la ménadione (vitamine K₃) et le coenzyme Q, dont les rôles ont été décrits dans le paragraphe 1.2.1 du chapitre I. Le plus utilisé est le PMS.

La caractéristique du XTT qui le distingue du MTT est sa réduction en un formazan hautement soluble dans l'eau, supprimant ainsi l'étape de solubilisation.

4.6.2 En immunologie

L'essai au MTT évalue la cytotoxicité de cellules activées vis-à-vis de lignées cancéreuses, de la même manière que celui au XTT (54). Roehm et coll. (94) ont testé le XTT et le MTT dans des essais de prolifération : les D.O. obtenues avec le XTT sont plus élevées qu'avec le MTT. Ils ont comparé les cinétiques de bio-réduction du XTT/PMS avec celles du MTT. La réduction du MTT est extrêmement rapide : 90 % en 2 heures, 100 % au bout de 3 heures. Les cellules continuent de métaboliser le XTT/PMS pendant plus de 8 heures. Il faut au moins 4 heures pour atteindre des valeurs de D.O. comparables à celles du MTT, et des temps plus longs pour des valeurs supérieures.

4.6.3 En cancérologie

Les deux sels de tétrazolium aboutissent à des résultats similaires dans les études de chimiosensibilité (101).

L'essai au XTT comporte plusieurs avantages par rapport à celui au MTT (101). L'association XTT/PMS permet de travailler sur des cellules difficilement adaptables au MTT à cause des D.O. trop faibles. Le PMS augmente la réduction du XTT conduisant à des lectures d'absorbance égales ou même supérieures à celles obtenues avec le MTT. Le XTT est dénué de toxicité puisque des cellules tumorales continuent à le métaboliser pendant 96 heures.

Cependant, l'addition indispensable d'un réactif de transfert d'électrons complique "l'environnement cellulaire" (101). Il s'ensuit un risque de variabilité plus grande et un manque de reproductibilité. Le PMS entraîne parfois l'apparition d'un dépôt de formazan dans les puits, surtout à pH alcalin (125). Ce phénomène de cristallisation interfère avec les mesures d'absorbance et compromet la validité des résultats. Il nécessite alors un contrôle microscopique de chaque puits (101). Enfin, on observe une augmentation de l'absorbance du bruit de fond.

4.6.4 En parasitologie

Comley et Turner (25) ont comparé les méthodes au XTT et au MTT dans un test de viabilité sur des Filaires. Les résultats sont proches, les sensibilités comparables, mais la reproductibilité est moins bonne pour le MTT. Le formazan hydrosoluble du XTT diffuse facilement à l'extérieur des vers, permettant de lire directement l'absorbance dans le milieu de culture. Les parasites tolèrent des incubations répétées de 4 heures par jour, pendant 5 jours consécutifs. Cet essai semi-continu prouve la faible toxicité du formazan du XTT. Il constitue une application spécifique du XTT pour laquelle le MTT ne convient pas. En effet, l'essai au MTT implique obligatoirement le dépôt du formazan insoluble dans les tissus du ver. La mort des Filaires est alors inéluctable. Toutefois, le XTT seul est faiblement réduit par les Filaires. La supplémentation en PMS améliore les valeurs de D.O., mais de fortes quantités ont un effet préjudiciable sur la motilité des vers (25). Le MTT est plus efficacement métabolisé : 30 minutes d'incubation suffisent alors que 4 heures sont nécessaires avec le XTT. La solubilisation du formazan du MTT par le DMSO est laborieuse lorsqu'il faut traiter de nombreux vers. Elle est de surcroît dangereuse puisque ce solvant contient des substances potentiellement toxiques. Cependant, les étapes

d'aspiration/solubilisation atténuent le bruit de fond qui est donc plus bas qu'avec l'essai au XTT/PMS.

4.6.5 En microbiologie

L'essai au XTT est actuellement utilisé pour le criblage de molécules anti-V.I.H. (55) par le N.C.I. en particulier (43). Bien que la méthode au MTT soit rapide, celle au XTT offre des avantages concernant la sécurité des équipes de recherche. En effet, les étapes supplémentaires de centrifugation, de pipetage ou d'aspiration du test au MTT potentialisent le risque de contact des manipulateurs avec les virus (43, 129). Cependant, l'ajout d'isopropanol permet d'inactiver le V.I.H. éventuellement présent (63).

Ce nouveau sel de tétrazolium a été appliqué à la quantification de l'activité bactéricide de neutrophiles, en comparaison avec le MTT (113). Bien que les valeurs de D.O. soient inférieures dans le cas du XTT, les pourcentages de bactéries vivantes mesurés par les deux essais ne sont pas significativement différents. Comme Stevens et coll. (113) ont choisi un temps d'incubation identique entre les deux techniques et que le formazan du XTT est hydrosoluble, l'essai au XTT est plus rapide que celui au MTT. De plus, les étapes de centrifugation des plaques et de soustraction des surnageants dans le test au

MTT augmentent le risque d'exposition du personnel aux aérosols bactériens formés. La méthode au XTT offre donc plus de sécurité que celle au MTT dans le cas de germes très pathogènes.

Elle présente cependant trois limites :

- les bactéries ne convertissent le XTT en formazan qu'en présence d'un transporteur d'électrons,
- les espèces bactériennes étudiées par Stevens et coll. (113) réagissent plus lentement avec le XTT/ Coenzyme Q qu'avec le MTT,
- les valeurs de D.O. obtenues avec le XTT sont inférieures à celles du MTT.

4.6.6 Conclusion

L'intérêt de l'essai au XTT réside dans (101):

- la réduction du mode opératoire : trois étapes au lieu de cinq,
- la suppression de l'étape de solubilisation : dans le cas du DMSO, on élimine le risque d'exposition du personnel à de grandes quantités de ce solvant, ainsi que ses effets délétères sur les appareils de laboratoire.

La technique au XTT présente un certain nombre d'inconvénients (94) ;

- la plupart des cellules ne réduisent pas efficacement le XTT, en l'absence d'un transporteur d'électrons,

- la couleur orange du formazan contraste avec le bleu-violet du formazan du MTT,

- le développement de la couleur est beaucoup plus lent qu'avec le MTT,

- les réactifs (XTT et ménadione) doivent être préparés quotidiennement,

- la difficulté de tester des molécules colorées implique la préparation de blancs contenant les molécules (ceci est vrai pour tout essai colorimétrique) (43),

- le XTT n'est pas suffisamment métabolisé par certaines cellules, ce qui rend l'essai au XTT inutilisable dans ces cas (54).

Par conséquent, même si l'essai au XTT offre l'avantage d'éliminer la solubilisation des cristaux de formazan, il est faux de dire qu'"il réduit à la fois le temps de travail et la durée de l'essai" (94), exception faite des cas où on laisse agir du S.D.S. pendant une nuit pour solubiliser le formazan du MTT.

4.7 Comparaison avec la méthode au May-Grünwald/Giemsa

4.7.1 Principe de la méthode de coloration au May Grünwald/Giemsa (M.G.G.)

Le M.G.G. est une technique classiquement utilisée pour colorer les cellules sur lames et lamelles (84). Il permet de mettre en évidence la morphologie cellulaire.

La coloration se décompose en deux étapes. Les cellules sont d'abord fixées et colorées par la solution au May-Grünwald, avec laquelle elles restent en contact 3 minutes. Puis, une seconde coloration d'environ 1 heure est effectuée avec le Giemsa dilué au 1/20ème. Les cellules observées au microscope ont leur noyau coloré en violet et leur cytoplasme en rose.

4.7.2 En virologie

Dans les tests en microplaques, la coloration au M.G.G. est essentiellement rencontrée en virologie où elle tire son intérêt du fait qu'elle met en évidence :

- soit la fusion cellulaire viro-induite : certains virus ont la capacité de former des cellules géantes multinucléées appelées syncytia (75),

- soit la présence d'inclusions dans les cellules infectées par certains virus (84).

Dans le premier cas, les syncytia sont nettement visualisés au microscope inversé et peuvent être dénombrés.

Différents auteurs s'accordent pour dire que cette méthode présente de nombreux inconvénients (11, 20, 63, 116) :

- elle dépend des facteurs liés aux cellules comme aux virus et difficilement maîtrisables, par exemple la fusion spontanée des cellules (11), ce qui altère la reproductibilité (63),

- le critère de la fusion des cellules sur lequel repose cet essai, n'est pas entièrement spécifique de la production de virus infectieux. Ainsi, la transfection dans des cellules T, d'un plasmide exprimant la protéine d'enveloppe du virus V.I.H.-1, induit des syncytia sans produire du virus infectieux (111),

- le mode de lecture fastidieux est un facteur d'erreur important par sa durée et sa difficulté d'appréciation (11, 20),

- au niveau du protocole, les étapes de lavage des cellules cultivées allongent le mode opératoire (116),

- la technique est difficile à automatiser (63).

En revanche, la méthode au MTT possède plusieurs avantages sur le M.G.G. :

- la lecture est rapide et facile puisqu'elle est effectuée automatiquement sur un lecteur pour microplaque (116),

- la variation moyenne entre les différents réplicats n'excède pas 5 % (63). Ceci permet de diminuer le nombre de mesures réalisées par microplaque (11),

- il n'est pas nécessaire de laver les cellules (116),

- la technique est plus souple, moins lourde et peut être automatisée,

- elle peut être adaptée en routine pour de grandes séries de produits (63).

En conclusion, l'essai colorimétrique au MTT est largement préférable à celui au M.G.G.

Chapitre cinquième :

APPLICATIONS DE LA

METHODE COLORIMETRIQUE

AU MTT

Nous avons tenté de répertorier toutes les utilisations de l'essai au MTT, en tant que méthode de mesure de la viabilité cellulaire, en immunologie, cancérologie, virologie et bactériologie. L'étendue de ces applications étant très vaste, la liste n'est pas exhaustive.

Il nous a semblé intéressant de parler également de quelques applications particulières, à l'intérieur de chaque discipline. Ces systèmes d'essais sont particuliers soit parce qu'ils introduisent des modifications dans le mode opératoire établi, soit parce qu'ils combinent la méthode au MTT avec d'autres techniques.

Enfin, sous le terme "applications diverses", nous avons regroupé les publications ayant trait à d'autres domaines scientifiques.

5.1 En immunologie

5.1.1 Détermination du titre d'échantillons de facteurs de croissance

Des échantillons de titre inconnu en facteur de croissance et des échantillons-étalons sont dilués en série et ajoutés à des cellules. La croissance des cellules est proportionnelle à la concentration en facteur de croissance. L'essai colorimétrique au MTT quantifie la

prolifération cellulaire. L'absorbance lue est directement reliée à la concentration en facteur de croissance. Le titre des échantillons est déterminé par rapport à la courbe obtenue avec les échantillons-étalons.

Exemples :

- facteurs de croissance des cellules T tels que l'interleukine 2 (IL-2) (73, 116), l'IL-4 (73),
- facteurs de croissance hématopoïétiques de cellules de moelle osseuse (59) tels que le GM-CSF (granulocyte/macrophage colony stimulating factor), le M-CSF-1 naturel murin (macrophage colony stimulating factor).

5.1.2 Détermination du titre d'échantillons de lymphotoxines (42)

Les lymphotoxines possèdent des activités lytiques et/ou inhibitrices sur la croissance des cellules. Des dilutions successives d'échantillons à titrer sont mises en présence de cellules. L'effet cytotoxique se traduit pas une chute des D.O. inversement proportionnelle à la concentration en lymphokines cytotoxiques. Le titre en lymphotoxine correspond à l'inverse de la dilution entraînant une réduction de 50 % du nombre de cellules cibles.

5.1.3 Détection d'anticorps monoclonaux inhibant la prolifération cellulaire *in vitro* (121)

La diminution de la quantité de formazan produite par les cellules cibles par rapport aux cellules témoins correspond à l'effet inhibiteur des anticorps monoclonaux.

5.1.4 Mesure de l'activité cytotoxique de cellules

L'activité cytotoxique de cellules effectrices est évaluée en mesurant la viabilité des cellules cibles tumorales résiduelles, après exposition aux cellules effectrices. Elle est exprimée en pourcentage de cytotoxicité par rapport à un témoin de cellules cibles.

Exemples :

- macrophages activés de souris (33),
- monocytes et macrophages humains, activés par l'interféron-gamma (IFN- γ) (122).

5.1.5 Mesure de l'activation cellulaire

Les cellules activées produisent plus de formazan que les cellules au repos, ce qui permet de quantifier l'activation cellulaire, même en l'absence de

prolifération cellulaire (72). L'activité mitochondriale évaluée par l'essai au MTT est un critère d'activation cellulaire (40).

Exemple :

- Evaluation de la réactivité immunitaire de plaquettes sanguines provenant de patients atteints de réaction d'hypersensibilité immédiate, d'asthme allergique et d'asthme sensible à l'aspirine (123). Ces plaquettes réduisent le MTT proportionnellement au niveau de stimulation (induite par des immunoglobulines E ou par l'aspirine).

5.1.6 Applications particulières

* Quantification de l'adhésion de cellules leucémiques à des cellules endothéliales activées par le facteur-alpha de nécrose tumorale (71) :

Les cellules leucémiques sont "marquées par le MTT" par une incubation de 20 minutes. Elles sont ajoutées aux cellules endothéliales activées mises en culture dans les puits d'une microplaque. Après une incubation de 30 minutes, les cellules non fixées sont retirées par lavage. Les cellules adhérentes (contenant le formazan) sont lysées par du DMSO. Il suffit de lire l'absorbance pour les dénombrer.

* Détection de lymphocytes activés, par une technique de double coloration, en boîte de Petri :
Schauer et coll. (99) associe la coloration au MTT à un essai en immunofluorescence, afin de déterminer simultanément le degré d'activation des cellules et le phénotype cellulaire de surface. Le marqueur d'activation est le MTT. Les cellules T sont incubées pendant 30 minutes avec le MTT. Il n'y a pas d'étape de solubilisation. Le pourcentage de cellules colorées, à la fois par les grains de formazan et en fluorescence, est évalué sous un microscope à fluorescence.

5.2 En cancérologie

5.2.1 Tests de chimiosensibilité *in vitro*

Ces tests consistent à étudier la réponse de cellules tumorales à divers médicaments anticancéreux. Les cellules sont mises en présence de dilutions successives d'une molécule. La sensibilité cellulaire se traduit par une baisse des valeurs de D.O. mesurées par la méthode au MTT. Elle est exprimée par la C.I. 50 (concentration inhibitrice à 50 %) qui correspond à la concentration en drogue capable de réduire de 50 % les D.O. par rapport aux témoins-cellules.

Comme l'essai au MTT est entièrement effectué dans des microplaques à 96 puits, il est facile d'étudier plusieurs paramètres tels que : la concentration en molécule, le temps de contact avec la drogue, la densité cellulaire (24). Par sa rapidité et sa simplicité, il permet de réaliser des tests de criblage (analyse simultanée de plusieurs médicaments anticancéreux sur de multiples lignées cellulaires).

Exemples :

- Essai sur des lignées cellulaires tumorales établies représentant les différentes catégories cliniques de cancers humains (3, 18, 24, 31, 34, 56, 81, 88, 95, 97, 101),

- Essai sur des cellules tumorales humaines fraîches (36, 58, 87, 98, 105, 131),

- Essai particulier de chimiosensibilité sur gélose (47) : les cellules exposées aux drogues sont cultivées dans un mélange de milieu de culture et de gélose en microplaque. La présence de gélose limite la prolifération des cellules non malignes capables de réduire le MTT et de fausser les résultats de chimiosensibilité,

- Essai particulier de chimiosensibilité en histoculture, basé sur la réduction du MTT suivie d'une analyse d'image (22, 23) : des échantillons de tissus cancéreux sont placés sur un gel de collagène, afin de maintenir le contact intercellulaire dans une architecture

en trois dimensions dans des plaques à 6 puits. L'activité des cellules vivantes, dans et sur le gel, est évaluée par la méthode au MTT. Après incubation des cellules avec le colorant, on réalise des coupes et les lames sont plongées dans du iodure de propidium (I.P.). Les cristaux de formazan contenus dans les cellules reflètent la lumière polarisée (produite par une lampe à mercure) et peuvent être mesurés par analyse d'image sur ordinateur. Grâce à la fluorescence du I.P., on observe la morphologie cellulaire et on peut distinguer les cellules tumorales des cellules stromatiques. Le ratio formazan/I.P. est calculé pour chaque concentration moléculaire et comparé au témoin ; il donne le degré d'inhibition induit par la drogue.

5.2.2 Tests de chimiorésistance *in vitro*

La résistance cellulaire à une molécule se traduit par des valeurs de D.O. élevées et constantes aux concentrations moléculaires habituellement utilisées. La chute des D.O. n'est observée qu'avec de très fortes quantités d'anticancéreux. Les CI 50 sont alors très élevées.

Exemples :

- Essai sur des lignées cellulaires établies (66),

- Essai sur des cellules tumorales humaines fraîches (98)

- Essai particulier de chimiorésistance sur gel de collagène (37) : cette modification a pour but de révéler la résistance réelle de cellules tumorales vis-à-vis d'agents anti-néoplasiques. Selon Furukawa et coll. (37) :

. l'utilisation de suspensions cellulaires ne correspond pas à l'organisation des cellules *in vivo*,

. l'essai au MTT sur cellules en monocouche évalue mal la chimiorésistance.

En revanche, l'essai au MTT sur gel de collagène en plaque de 24 puits, est capable de détecter ce phénomène grâce à la culture cellulaire en trois dimensions. De plus, les cellules saines contaminantes, telles que les fibroblastes, influencent peu la chimiosensibilité des cellules malignes parce qu'elles se multiplient beaucoup moins vite dans la matrice de collagène que dans une culture en monocouche.

5.2.3 Tests de radiosensibilité

Les cellules tumorales irradiées sont mises à incuber pendant un temps très long : 7 à 14 jours sont nécessaires pour obtenir la destruction totale des cellules. On réalise ensuite l'essai au MTT pour déterminer la dose de rayonnement efficace (19, 29, 47, 89).

Il est également possible de cribler des composés radioprotecteurs ou radiosensibilisateurs (19). Les cellules sont mises en contact avec les molécules avant irradiation. L'activité des molécules est évaluée par le test au MTT.

5.2.4 Evaluation de la sensibilité de cellules tumorales à la photothérapie (70)

Les cellules préincubées avec un composé sensibilisateur sont soumises à un rayonnement laser. Le sensibilisateur est alors activé, entraînant la destruction des cellules malignes. La méthode colorimétrique au MTT permet d'évaluer le taux de mort cellulaire par rapport à un témoin-cellules, en fonction de la concentration en sensibilisateur.

5.2.5 Essais de cytotoxicité antitumorale due à des cellules

* Quantification des effets anticancéreux de cellules tueuses lymphokine-activées, sur des cellules cibles malignes humaines (45). L'effet anticancéreux est relié à la proportion de cellules tumorales viables, présentes dans la culture cellulaire incubée avec les

cellules effectrices, par rapport au témoin de cellules tumorales.

* Quantification des effets cytotoxiques de macrophages activés, sur des cellules leucémiques. Jiao et coll. (53) ont repris et modifié le premier essai de cytotoxicité due à des cellules, introduit par Ferrari et coll. (33). Avant d'appliquer le test au MTT, ils séparent les cellules effectrices des cellules cibles, grâce à la propriété d'adhérence des macrophages au récipient de culture, propriété que ne possèdent pas les cellules leucémiques. Cette méthode dite indirecte a pour but de supprimer l'interférence possible des macrophages dans la réduction du MTT.

5.3 En virologie

5.3.1 Tests de criblage de molécules antivirales

L'essai au MTT mesure à la fois l'activité et la cytotoxicité d'un grand nombre de composés potentiellement antiviraux. Les résultats permettent de déterminer la concentration efficace à 50 % ou C.E.50 (concentration en molécule nécessaire pour atteindre 50 % de protection des cellules infectées) et la

concentration cytotoxique à 50 % ou C.C.50 (concentration en molécule qui réduit de 50 % le nombre de cellules viables dans une culture non infectée par rapport au témoin de cellules non infectées et non traitées) (8).

Exemples :

- Contre les virus de l'immunodéficience humaine (7, 8, 12, 62, 63, 83, 100). Pour valider le criblage, certains auteurs associent à l'essai au MTT des tests de mesure de la réplication du virus, tels que l'activité réverse transcriptase ou le dosage de l'antigène, p 24 (62, 63),
- Contre les virus de l'Herpès :
 - . H.S.V.-1 (115,117),
 - . H.S.V.-2 (115),
- Contre les orthomyxovirus et les paramyxovirus (126),
- Contre le virus Visna, un rétrovirus animal (20).

5.3.2 Mesure de l'activité neutralisante de plasmas humains vis-à-vis du virus respiratoire syncytial (V.R.S.) (96)

Des dilutions en série de divers plasmas sont préincubées avec le V.R.S. Puis, les cellules cibles sont infectées avec le mélange de préincubation. La neutralisation de l'infectivité du virus repose sur

l'augmentation des D.O. par rapport au témoin d'infectivité (cellules infectées sans plasma).

5.3.3 Application particulière : essai de formation de plages

L'essai de formation de plages est une technique fondamentale en recherche virologique, appliquée à tous les virus induisant facilement des plages de lyse (74). Les cellules cultivées en boîte de Petri sont mises à incuber avec le virus. Au bout d'un temps d'incubation déterminé, on réalise l'essai au MTT sans étape de solubilisation. Les cellules vivantes réduisent le MTT en formazan : on observe des tâches claires sur fond marron. Ces tâches correspondent aux plages de lyse constituées de syncytia (cellules géantes multinucléées) et de cellules en train de mourir. Il est alors possible de compter les plages de lyse :

- soit pour titrer le virus (74, 104),
- soit pour évaluer des composés quant à leur activité cytotoxique et antivirale (104).

5.4 En bactériologie

* Quantification de l'activité bactéricide de neutrophiles bovins vis-à-vis du *Staphylococcus aureus* (112)

L'essai est conduit en incubant les bactéries opsonisées avec des neutrophiles dans les puits d'une microplaque. Les neutrophiles sont ensuite lysés par de la saponine, si bien que seules les bactéries survivantes réduisent le MTT en formazan. Le pourcentage de bactéries tuées est déterminé par extrapolation à partir d'une courbe d'étalonnage.

* Essai de caractérisation de Mycoplasmes
Kirchhoff et coll. (57) ont étudié 22 espèces de *Mycoplasma* et d'*Acholeoplasma*, quant à leur capacité à réduire le MTT. Cette capacité varie entre les espèces de *Mycoplasma* et permet de les différencier.

* Evaluation quantitative de l'activité d'une toxine (sécrétée par des levures) sur des souches de levures sensibles (48).

5.5 Applications diverses

5.5.1 Parasitologie

* Evaluation de la viabilité de Filaires, en vue d'une recherche de sensibilité à des drogues anthelminthiques (25).

5.5.2 Toxicologie

* Mesure de la cytotoxicité *in vitro*, de composés chimiques, tels que :

- des drogues médicamenteuses, des pesticides, des molécules organiques (16),
- des molécules hépatotoxiques (78),
- des colorants (108).

5.5.3 Biochimie

* Mesure de la prolifération cellulaire, en réponse à des cellules stimulatrices irradiées (64).

5.5.4 Science des biomatériaux

* Evaluation de la prolifération et de l'activité de cellules microencapsulées dans une membrane polymérique (120).

* Evaluation de la biocompatibilité :
Ciapetti et coll. (21) ont adapté l'essai au MTT pour mesurer in vitro la cytotoxicité induite par un biomatériau (systèmes médicaux, implants). Il est possible de révéler la "subtile" toxicité de certains matériaux qui ne tuent pas les cellules en 24 ou 72 heures (durée habituelle d'un test de cytotoxicité), mais qui altèrent le métabolisme cellulaire.

5.5.5 Anatomopathologie

* Détection de cellules viables dans des coupes de tissus et application à l'évaluation du dommage tissulaire provoqué par des instruments chirurgicaux (93).
La détérioration est visualisée au microscope sans passer par une étape de solubilisation des cristaux de formazan.

CONCLUSION

Le très grand nombre d'applications de la méthode au MTT révèle tout son intérêt. Certains auteurs l'ont pourtant trouvée décevante (41, 69).

Cet essai présente des inconvénients :

- le premier est l'insolubilité aqueuse du produit final formazan. Diverses modifications ont été introduites afin de surmonter ce problème, mais aucune ne s'est révélée sans limite,

- d'autre part, l'essai au MTT ne correspond pas toujours bien aux autres méthodes de mesure de viabilité et de croissance cellulaires. C'est pourquoi, il doit être validé par des techniques différentes (surtout pour les études de criblage).

Cependant, il est généralement admis que l'essai colorimétrique au MTT fournit des indices reproductibles de viabilité cellulaire et de sensibilité à une drogue. Il convient pour une première étape de criblage de molécules (anticancéreuses ou antivirales) sur de multiples catégories cellulaires, pourvu qu'il soit accompagné de mesures de contrôle. En effet, la réduction du MTT est affectée par des facteurs métaboliques et expérimentaux, agissant de façon plus ou moins importante sur la quantification de la viabilité cellulaire.

Il est donc indispensable :

1) d'individualiser la relation entre les D.O. et les nombres de cellules pour chaque type cellulaire, puisqu'il existe des différences quantitatives appréciables dans les cinétiques de réduction du MTT,

2) d'établir les conditions optimales du test : la densité cellulaire initiale, la longueur de l'essai, la concentration en MTT et la durée d'exposition des cellules avec le colorant,

3) de connaître l'action directe des drogues sur la production du formazan car leur interférence possible avec les résultats de cytotoxicité pourrait conduire à rejeter des composés potentiellement intéressants.

Les principaux avantages de la méthode au MTT sont :

- la vitesse avec laquelle les échantillons sont traités, d'autant plus si on n'a pas besoin d'enlever le milieu ou de laver les plaques. Les étapes finales (ajouter le MTT, lire la plaque, imprimer les résultats) sont moins longues que la mise en place du test en lui-même (répartir les cellules, effectuer les dilutions des facteurs de croissance ou des drogues ou des virus, et les mélanger avec les cellules). Les résultats apparaissent également de

manière visuelle ce qui est très utile, si des résultats qualitatifs rapides sont demandés,

- sa simplicité : la technique est relativement facile à mettre en oeuvre et ne nécessite pas beaucoup d'apprentissage,

- sa sécurité puisqu'elle ne fait intervenir aucun isotope radioactif,

- son aptitude à l'automatisation,

- son adaptabilité.

Sous des conditions de croissance bien définies, avec un type particulier de cellules, l'essai colorimétrique au MTT restera un indicateur utile de la prolifération cellulaire. Cependant, son utilisation comme "essai spécifique de la fonction mitochondriale" (13) doit être remise en question.

C'est seulement en atteignant une plus grande compréhension de la nature de la réduction cellulaire du MTT que les avantages et les limites de cette méthode pourront être pleinement appréciés.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ADOLPHE (Monique), BARLOVATZ-MEIMON (Georgia)
Culture de cellules animales : Méthodologies -
Applications.
Paris : Inserm, 1988, 436 p., 24 cm.
- 2 - 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.
- 3 - 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.
- 4 - ALTMAN F.P.
Studies on the reduction of tetrazolium salts. III. The
products of chemical and enzymic reduction.
Hisotchemie, 1974, 38, p. 155-171.
- 5 - ALTMAN F.P.
Tetrazolium salts and formazans, in : PROGRESS IN HISTO-
-CHEMISTRY AND CYTOCHEMISTRY .
Stuttgart, Allemagne : Gustav Fischer Verlag, 1976,p.29.

- 6 - ARNOULD R., DUBOIS J., ABIKHALIL F., LIBERT A., GHANEM G., ATASSI G., HANOCQ M. et LEJEUNE F.J.
Comparison of two 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.
- 7 - 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.
- 8 - 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 agents *in vitro*.
Antiv. Res., 1988, 9, p. 335-343.
- 9 - BAEHNER R.L. et NATHAN D.G.
Quantitative nitroblue tetrazolium test in chronic granulomatous disease.
New. Engl. J. Med., 1968, 278, p. 971-976.
- 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-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° 302 B).

- 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 - BERRIDGE M.V. et TAN A.S.
Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-
dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
(MTT) : subcellular localization, substrate dependence,
and involvement of mitochondrial electron transport in
MTT reduction.
Arch. Biochem. Biophys., 1993, 303, p. 474-482.
- 14 - BEYER H. et PYL T.
Über thiazole - XXIV - Mitteil : über C,N-diphényl-
N'-thiazolyl-(2)-formazane und deren tetrazoliumsälze.
Chem. Ber., 1954, 87, p. 1505-1511.
- 15 - BLACK M.M. et SPEER F.D.
Further observations on the effects of cancer chemo-
-therapeutic agents on the in vitro dehydrogenase
activity of cancer tissue.
J. Natl. Cancer Inst., 1954, 14, p. 1147-1158.
- 16 - BORENFREUND E., BABICH H. et MARTIN-ALGUACIL N.
Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays :
the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests.
Toxic. In Vitro, 1988, 2, p. 1-6.

- 17 - BUTTKE T.M., McCUBREY J.A. et OWEN T.C.
Use of an aqueous soluble tetrazolium / formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines.
J. Immunol. Methods, 1993, 157, p. 233-240.
- 18 - 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.
- 19 - 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.
- 20 - 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 p., 30 cm.
(Thèse Pharm. Limoges, 1995).
- 21 - CIAPETTI G., CENNI E., PRATELLI L. et PIZZOFRERATO A.
In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay.
Biomaterials, 1993, 14, p. 359-364.

- 22 - COLANGELO D., GUO H.-Y., CONNORS K.M., SILVESTRO L.
et HOFFMAN R.M.
Non colorimetric measurement of cell activity in
three dimensional histoculture using the tetrazolium
dye 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetra-
-zolium bromide : the pixel image analysis of formazan
crystals.
Ana. Biochem., 1992, 205, p. 8-13.
- 23 - COLANGELO D., GUO H.-Y., CONNORS K.M., KUBOTA T.,
SILVESTRO L., HOFFMAN R.M.
Correlation of drug response in human tumors histo-
-cultured *in vitro* with an image-analysis MTT endpoint
and *in vivo* xenografted in nude mice.
Anticancer Res., 1992, 12, p. 1373-1376.
- 24 - COLE S.P.C.
Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor
cells using the MTT assay.
Cancer Chemother. Pharmacol., 1986, 17, p. 259-263.
- 25 - COMLEY J.C. et TURNER C.H.
Potential of a soluble tetrazolium/formazan assay for
the evaluation of filarial viability.
Int. J. Parasitol., 1990, 20, p. 251-255.
- 26 - COOPER P.D.
Tetrazolium salts as stains for animal virus plaque
assays.
Virol., 1959, 7, p. 469-470.

- 27 - 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.
- 28 - DUFFY P.A., BENNETT A., ROBERTS M. et FLINT O.P.
Prediction of phototoxic potential using human A 431
cells and mouse 3T3 cells.
Molecular Toxicol., 1987, 1, p. 579-587.
- 29 - EBLE M.J., HENSLEY F.W., FLENTJE M., SCHLOTZ A. et
WANNENMACHER M.
A modified computer-assisted colorimetric microtitre
assay (MTT) to assess *in vitro* radiosensitivity of
V 79, CaSki, HeLa and WiDr cells.
Int. J. Radiat. Biol., 1994, 65, p. 193-201.
- 30 - ELLIOTT W.M. et AUERSPERG N.
Comparison of the neutral red and methylene blue
assays to study cell growth in culture.
Biotech. Histochem., 1993, 68, p. 29-35.
- 31 - ETIEVANT C., KRUCZYNSKI A., PAUWELS O. et KISS R.
The combination of the tetrazolium derivative reduction
(MTT) and digital cell image analysis to monitor *in
vitro* the cytotoxicity of anti-neoplastic drugs.
Anticancer Res., 1991, 11, p. 305-311.

- 32 - FAUTZ R., HUSEIN B. et HECHENBERGER C.
Application of the neutral red assay (NR assay) to monolayer cultures of primary hepatocytes : rapid colorimetric viability determination for the unscheduled DNA synthesis test (UDS).
Mutat. Res., 1991, 253, p. 173-179.
- 33 - FERRARI M., FORNASIERO M.C. et ISETTA A.M.
MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity *in vitro*.
J. Immunol. Methods, 1990, 131, p. 165-172.
- 34 - FORD C.H.J., RICHARDSON V.J. et TSALTAS G.
Comparison of tetrazolium colorimetric and [³H]-uridine assays for *in vitro* chemosensitivity testing.
Cancer Chemother. Pharmacol., 1989, 24, p. 295-301.
- 35 - FRIDOVICH I.
Superoxide dismutases.
Ann. Rev. Biochem., 1975, 44, p. 147-160.
- 36 - FURUKAWA T., KUBOTA T., SUTO A., TAKAHARA T., YAMAGUCHI H., TAKEUCHI T., KASE S., KODAIRA S., ISHIBIKI K. et KITAJIMA M.
Clinical usefulness of chemosensitivity testing using the MTT assay.
J. Surg. Oncol., 1991, 48, p. 188-193.
- 37 - FURUKAWA T., KUBOTA T., WATANABE M., KASE S., SAIKAWA Y., NISHIBORI H., KUO T.-H., KODAIRA S., ISHIBIKI K. et KITAJIMA M.
Increased drug resistance of cultured human cancer cell lines in three-dimensional cellular growth assay using collagen gel matrix.
J. Surg. Oncol., 1992, 49, p. 86-92.

- 38 - GARBIN F., ECKERT K. et MAURER H.R.
Evaluation of the MTT and SRB assays for testing LAK cell-mediated growth inhibition of various adherent and non-adherent tumor target cells.
J. Immunol. Methods, 1994, 170, p. 269-271.
- 39 - GARN H., KRAUSE H., ENZMANN V. et DRÖBLER K.
An improved MTT assay using the electron-coupling agent menadione.
J. Immunol. Methods, 1994, 168, p. 253-256.
- 40 - GERLIER D. et THOMASSET N.
Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation.
J. Immunol. Methods, 1986, 94, p. 57-63.
- 41 - GIVENS K.T., KITADA S., CHEN A.K., ROTHSCILLER J. et LEE D.A.
Proliferation of human ocular fibroblasts : an assessment of *in vitro* colorimetric assay.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1990, 31, p. 1856-1862.
- 42 - 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.
- 43 - GULAKOWSKI R.J., McMAHON J.B., STALEY P.G., MORAN R.A. et BOYD M.R.
A semiautomated multiparameter approach for anti-HIV drug screening.
J. Virol. Methods, 1991, 33, p. 87-100.

- 44 - 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.
- 45 - HEO D.S., PARK J.G., HATA K., DAY R.,
HERBERMAN R.B. et WHITESIDE T.L.
Evaluation of tetrazolium-based semiautomatic colorimetric assay for measurement of human antitumor cytotoxicity.
Cancer Res., 1990, 50, p. 3681-3690.
- 46 - HERRMANN E.C., GABLICKS J., ENGLE C. et PERLMAN P.L.
Agar diffusion method for detection and bioassay of antiviral antibiotics.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1960, 103, p. 625-628.
- 47 - HIDA T., UEDA R., TAKAHASHI T., WATANABE H., KATO T.,
SUYAMA M., SUGIURA T., ARIYOSHI Y. et TAKAHASHI T.
Chemosensitivity and radiosensitivity of small cell lung cancer cell lines studied by a newly developed 3-(4,5 - dimethylthiazol - 2 - yl) - 2,5 - diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) hybrid assay.
Cancer Res., 1989, 49, p. 4785-4790.
- 48 - HODGSON V.J., WALKER G.M. et BUTTON D.
A rapid colorimetric assay of killer toxin activity in yeast.
FEMS microbiol. Lett., 1994, 120, p. 201-206.
- 49 - 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.

- 50 - ISELT M., HOLTEI W. et HILGARD P.
The tetrazolium dye assay for rapid *in vitro* assessment of cytotoxicity.
Arzneim.-Forsch./ Drug Res., 1989, 39, p. 747-749.
- 51 - ISOMURA J., YOSHIMATSU K., IKEDA T., TAKIMOTO G. et MORIMOTO T.
A dye uptake method using cultured human cancer cells and its application to a sensitivity test for anti-cancer drugs.
Yakugaku Zasshi, 1981, 101, p. 227-231.
- 52 - 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.
- 53 - JIAO H., SOEJIMA Y., OHE Y., MIURA K., TAMURA T. et SAIJO N.
Differential macrophage-mediated cytotoxicity to P388 leukemia cells and its drug-resistant cells examined by a new MTT assay.
Leuk. Res., 1992, 16, p. 1175-1180.
- 54 - JOST L.M., KIRKWOOD J.M., WHITESIDE T.L.
Improved short- and long-term XTT-based colorimetric cellular cytotoxicity assay for melanoma and other tumor cells.
J. Immunol. Methods, 1992, 147, p. 153-165.
- 55 - KANG I. et WANG J.H.
Design of structure-based reverse transcriptase inhibitors.
J. Biol. Chem., 1994, 269, p. 12024-12031.

- 56 - KEEPERS Y.P., PIZAO P.E., PETERS G.J., VAN ARK-OTTE J., WINOGRAD B. et PINEDO H.M.
Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for *in vitro* chemosensitivity testing.
Eur. J. Cancer, 1991, 27, p. 897-900.
- 57 - KIRCHHOFF H., MAASS C., RUNGE M., FRANZ B., SCHMIDT R., QUENTMEIER H. et MUHLRADT P.F.
Tetrazolium [3 - (4,5 - dimethylthiazol - 2 - yl) - 2,5 - diphenyltetrazolium bromide] reduction by mycoplasmas.
Int. J. Syst. Bacteriol., 1992, 42, p. 506-508.
- 58 - KIRKPATRICK D.L., DUKE M. et GOH T.S.
Chemosensitivity testing of fresh human leukemia cells using both a dye exclusion assay and a tetrazolium dye (MTT) assay.
Leuk. Res., 1990, 14, p. 459-466.
- 59 - KOTNIK V. et FLEISCHMANN Jr. W.R.
A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity.
J. Immunol. Methods, 1990, 129, p. 23-30.
- 60 - KUBOTA T., TAKAHARA T., NAGATA M., FURUKAWA T., KASE S., TANINO H., ISHIBIKI K. et KITAJIMA M.
Colorimetric chemosensitivity testing using sulforhodamine B.
J. Surg. Oncol., 1993, 52, p. 83-88.
- 61 - LASAROW R.M., ISSEROFF R.R. et GOMEZ E.C.
Quantitative *in vitro* assessment of phototoxicity by a fibroblast-neutral red assay.
J. Invest. Dermatol., 1992, 98, p. 725-729.

- 62 - 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.
- 63 - LEMAITRE M. et ZERIAL A.
Méthodes permettant le criblage et l'évaluation *in vitro* d'activités inhibitrices de la réplication du V.I.H.
Revue française des laboratoires, 1990, 216, p. 43-50.
- 64 - LOVELAND B.E., JOHNS T.G., MACKAY I.R., VAILLANT F., WANG Z.X. et HERTZOG P.J.
Validation of the MTT dye assay for enumeration of cells in proliferative and antiproliferative assays.
Biochem. Int., 1992, 27, p. 501-510.
- 65 - LÖWIK C.W.G.M., ALBLAS M.J., VAN DE RUIT M., PAPAPOULOS S.E. et VAN DER PLUIJM G.
Quantification of adherent and nonadherent cells cultured in 96-well plates using the supravital stain neutral red.
Anal. Biochem., 1993, 213, p. 426-433.
- 66 - MARKS D.C., BELOV L., DAVEY M.W., DAVEY R.A. et KIDMAN A.D.
The MTT cell viability assay for cytotoxicity testing in multidrug-resistant human leukemic cells.
Leuk. Res., 1992, 16, p. 1165-1173.

- 67 - MATTSSEN A.M., JENSEN C.O. et DUTCHER R.A.
Triphenyltetrazolium chloride as a dye for vital
tissues.
Science, 1947, 106, p. 294-295.
- 68 - McLAREN C., ELLIS M.N. et HUNTER G.A.
A colorimetric assay for the measurement of the
sensitivity of herpes simplex viruses to antiviral
agents.
Antiviral Res., 1983, 3, p. 223-234.
- 69 - MELZIG M. et DIENWIEBEL U.
Is the estimation of the activity of MTT-reduction
suitable for determination of the basal cytotoxicity ?
Pharmazie, 1990, 45, p. 515-517.
- 70 - MERLIN J.L., AZZI S., LIGNON D., RAMACCI C., ZEGHARI N.
et GUILLEMIN F.
MTT assays allow quick and reliable measurement of the
response of human tumour cells to photodynamic therapy.
Eur. J. Cancer, 1992, 28A, p. 1452-1458.
- 71 - MIKI I., ISHIHARA N., OTOSHI M. et KASE H.
Simple colorimetric cell-cell adhesion assay using
MTT-stained leukemia cells.
J. Immunol. Methods, 1993, 164, p. 255-261.
- 72 - MOSMANN T.
Rapid colorimetric assay for cellular growth and
survival : application to proliferation and
cytotoxicity assays.
J. Immunol. Methods, 1983, 65, p. 55-63.

- 73 - MOSMANN T.R. et FONG T.A.T.
Specific assays for cytokine production by T cells.
J. Immunol. Methods, 1989, 116, p. 151-158.
- 74 - 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.
- 75 - NARA P.L., HATCH W.C., DUNLOP N.M., ROBEY W.G.,
ARTHUR L.O., GONDA M.A. et FISHINGER P.J.
Simple, rapid, quantitative, syncytium-forming
microassay for the detection of human immuno-
-deficiency virus neutralizing antibody.
A.I.D.S. Res. Hum. Retrov., 1987, 3, p. 283-302.
- 76 - NIKS M. et OTTO M.
Towards an optimized MTT assay.
J. Immunol. Methods, 1990, 130, p. 149-151.
- 77 - NISHIKIMI M., RAO N. et YAGI K.
The occurrence of superoxide anion in the reaction of
reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1972, 46, p. 849-853.
- 78 - 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.

- 79 - PAGLIACCI M.C., SPINOZZI F., MIGLIORATI G., FUMI G., SMACCHIA M., 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, 29A, p. 1573-1577.
- 80 - PARK B.H., FIKRIG S.M. et SMITHWICK E.M.
Infection and nitroblue tetrazolium reduction by neutrophils. A diagnostic aid.
Lancet, 1968, 2, p. 532.
- 81 - PARK J.G., KRAMER B.S., STEINBERG S.M., CARMICHAEL J., COLLINS J.M., MINNA J.D. et GAZDAR A.F.
Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay.
Cancer Res., 1987, 47, p. 5875-5879.
- 82 - PAULL K.D., SHOEMAKER R.H., BOYD M.R., PARSONS J.L., RISBOOD P.A., BARBERA W.A., SHARMA M.N., BAKER D.C., HAND E., SCUDIERO D.A., MONKS A., ALLEY M.C. et GROTE M.
The synthesis of XTT : a new tetrazolium reagent that is bio-reducible to a water-soluble formazan.
J. Heterocyclic chem., 1988, 25, p. 911-914.
- 83 - 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.

- 84 - PAYMENT (Pierre), TRUDEL (Michel)
Manuel de techniques virologiques.
Paris : Ellipses, 1989, 350 p., 26 cm.
- 85 - PEREZ R.P., GODWIN A.K., HANDEL L.M. et HAMILTON T.C.
A comparison of clonogenic, microtetrazolium and
sulforhodamine B assays for determination of cisplatin
cytotoxicity in human ovarian carcinoma cell lines.
Eur. J. Cancer, 1993, 29A, p. 395-399.
- 86 - PICKER S.D. et FRIDOVICH I.
On the mechanism of production of superoxide radical
by reaction mixtures containing NADH, phenazine metho-
sulphate, and nitroblue tetrazolium.
Arch. Biochem. Biophys., 1984, 228, p. 155-158.
- 87 - PIETERS R., HUISMANS D.R., LEYVA A. et VEERMAN A.J.P.
Comparison of the rapid automated MTT-assay with a dye
exclusion assay for the chemosensitivity testing in
childhood leukemia.
Br. J. Cancer, 1989, 59, p. 217-220.
- 88 - PLUMB J.A., MILROY R. et KAYE S.B.
Effects of the pH dependence of 3 - (4,5 - dimethyl-
-thiazol - 2 - yl) - 2,5 - diphenyltetrazolium bromide
- formazan absorption on chemosensitivity determined
by a novel tetrazolium-based assay.
Cancer Res., 1989, 49, p. 4435-4440.
- 89 - PRICE P. et McMILLAN 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.

- 90 - PRUETT S.B. et LOFTIS A.Y.
Characteristics of MTT as an indicator of viability and respiratory burst activity of human neutrophils. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 1990, 92, p. 189-192.
- 91 - RAAP A.K.
Studies on the phenazine methosulphate - tetrazolium salt capture reaction in NAD (P)⁺ - dependent dehydrogenase cytochemistry - III. The role of superoxide in tetrazolium reduction. Histochem. J., 1983, 15, p. 977-986.
- 92 - RAAP A.K., VAN HOOFF G.R.M. et VAN DUIJN P.
Studies on the phenazine methosulphate - tetrazolium salt capture reaction in NAD (P)⁺ - dependent dehydrogenase cytochemistry. I localisation artefacts caused by the escape of reduced co-enzyme during cytochemical reactions for NAD (P)⁺ - dependent dehydrogenases. Histochem. J., 1983, 15, p. 861-879.
- 93 - RADOSEVICH J.A., HAINES G.K., ELSETH K.M., SHAMBAUGH III G.E. et MAKER V.K.
A new method for the detection of viable cells in tissue sections using 3 - (4,5 - dimethyl-thiazol - 2 - yl) - 2,5 - diphenyltetrazolium bromide (MTT) : an application in the assessment of tissue damage by surgical instruments. Virchows Arch. B cell pathol., 1993, 63, p. 345-350.

- 94 - ROEHM N.W., RODGERS G.H., HATTFIELD S.M. et
GLASEBROOK A.L.
An improved colorimetric assay for cell proliferation
and viability utilizing the tetrazolium salt XTT.
J. Immunol. Methods, 1991, 142, p. 257-265.
- 95 - RUBEN R.L. et NEUBAUER R.H.
Semiautomated colorimetric assay for *in vitro* screening
of anticancer compounds.
Cancer Treat. Rep., 1987, 71, p. 1141-1149.
- 96 - RUBINO K.L. et NICHOLAS J.A.
A novel, spectrophotometric microneutralization assay
for respiratory syncytial virus.
J. Virol. Methods, 1992, 39, p. 55-67.
- 97 - RUBINSTEIN L.V., SHOEMAKER R.H., PAULL K.D.,
SIMON R.M., TOSINI S., SKEHAN P., SCUDIERO D.A.,
MONKS A. et BOYD M.R.
Comparison of *in vitro* anticancer-drug-screening data
generated with a tetrazolium assay versus a protein
assay against a diverse panel of human tumor cell
lines.
J. Natl. Cancer Inst., 1990, 82, p. 1113-1118.
- 98 - SARGENT J., ELGIE A., TAYLOR C.G., WILSON J.,
ALTON P. et HILL J.G.
The identification of drug resistance in ovarian
cancer and breast cancer : application of the MTT
assay.
Contrib. Gynecol. Obstet., 1994, 19, p. 64-75.

- 99 - SCHAUER U., KROLIKOWSKI I. et RIEGER C.H.L.
Detection of activated lymphocyte subsets by
fluorescence and MTT staining.
J. Immunol. Methods, 1989, 116, p. 221-227.
- 100 - 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.
- 101 - SCUDIERO D.A., SHOEMAKER R.H., PAULL K.D.,
MONKS A., TIERNEY S., NOFZIGER T.H., CURRENS M.J.,
SENIFF 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.
- 102 - SEIDLER E.
The tetrazolium-formazan system : design and
histochemistry.
Prog. Histochem. Cytochem., 1991, 24, p. 1-86.
- 103 - SEIDLER E. et VAN NOORDEN C.J.F.
On the mechanisms of the multistep reduction of
tetrazolium salts with special reference to the
involvement of tetrazolium radicals.
Acta histochem., 1994, 96, p. 43-49.
- 104 - SHANAFELT A.B.
An improved method for visualizing Baculovirus
plaques in cell agarose overlays.
Biotechniques, 1991, 3, p. 330.

- 105 - SHIMOYAMA Y., KUBOTA T., WATANABE M., ISHIBIKI K.
et ABE O.
Predictability of *in vivo* chemosensitivity by *in vitro*
MTT assay with reference to the clonogenic assay.
J. Surg. Oncology, 1989, 41, p. 12-18.
- 106 - SKEHAN P., STORENG R., SCUDIERO D., MONKS A.,
McMAHON J., VISTICA D., WARREN J.T., BOKESCH H.,
KENNEY S. et BOYD M.R.
New colorimetric cytotoxicity assay for anti-cancer
-drug screening.
J. Natl. Cancer Inst., 1990, 82, p. 1107-1112.
- 107 - SLADOWSKI D., STEER S.J., CLOTHIER R.H. et BALLS M.
An improved MTT assay.
J. Immunol. Methods, 1993, 157, p. 203-207.
- 108 - SLADOWSKI D., STEER S.J., CLOTHIER R.H. et BALLS M.
Use of a filtration plate in the MTT assay.
Toxic. in vitro, 1994, 8, p. 739-741.
- 109 - 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.
- 110 - SOBOTTKA 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.

- 111 - SODROSKI J., GOH W.C., ROSEN C., CAMPBELL K. et
HASELTINE W.A.
Role of the HTLV III/ LAV envelope in syncytium
formation and cytopathicity.
Nature, 1986, 322, p. 470-474.
- 112 - 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.
- 113 - STEVENS M.G. et OLSEN S.C.
Comparative analysis of using MTT and XTT in
colorimetric assays for quantitating bovine neutrophil
bactericidal activity.
J. Immunol. Methods, 1993, 157, p. 225-231.
- 114 - STRAUS F.H., CHERONIS N.D. et STRAUS E.
Demonstration of reducing enzyme systems in
neoplasms and living mammalian tissues by
triphenyltetrazolium chloride.
Science (Wash. DC), 1948, 108, p. 113-115.
- 115 - 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.
- 116 - TADA H., SHIHO O., KUROSHIMA K., KOYAMA M. et
TSUKAMOTO K.
An improved colorimetric assay for interleukin 2.
J. Immunol. Methods, 1986, 93, p. 157-165.

- 117 - 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.
- 118 - 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.
- 119 - 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.
- 120 - ULUDAG H. et SEFTON M.V.
Colorimetric assay for cellular activity in micro-capsules.
Biomaterials, 1990, 11, p. 708-712.
- 121 - VAICKUS L. et LEVY R.
Antiproliferative monoclonal antibodies : detection and initial characterization.
J. Immunol., 1985, 135, p. 1987-1997.
- 122 - VAN DE LOOSDRECHT A.A., NENNIE E., OSSENKOPPELE G.J., BEELEN R.H.J. et LANGENHUIJSEN M.M.A.C.
Cell mediated cytotoxicity against U936 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay.
J. Immunol. Methods, 1991, 141, p. 15-22.

- 123 - VANHEE D., JOSEPH M., VORNG H. et TONNEL A.B.
A colorimetric assay to evaluate the immune reactivity
of blood platelets based on the reduction of a
tetrazolium salt.
J. Immunol. Methods, 1993, 159, p. 253-259.
- 124 - VISTICA D.T., SKEHAN P., SCUDIERO D.A., MONKS A.
et BOYD M.R.
Tetrazolium-based assays for cellular viability :
a critical examination of parameters which affect
formazan production.
Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 1989, 30, p. 24-37.
- 125 - 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.
- 126 - 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.
- 127 - WEICHERT H., BLECHSHMIDT I., SCHRÖDER S. et
AMBROSIUS H.
The MTT-assay as a rapid test for cell proliferation
and cell killing : application to human peripheral
blood lymphocytes (PBL).
Allerg. Immunol. (Leipz), 1991, 37, p. 139-144.

- 128 - WEIL (Jacques-Henry)
Biochimie générale.
Paris : Masson, 1989 (5ème Edition), 508 p., 21 cm.
- 129 - 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.
- 130 - WEMME H., PFEIFFER S., HECK R. et MULLER-QUERNHEIM J.
Measurement of lymphocyte proliferation : critical analysis of radioactive photometric methods.
Immunobiol., 1992, 185, p. 78-79.
- 131 - 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.
- 132 - LABORATOIRE BOEHRINGER MANNHEIM BIOCHEMICA
Cell proliferation kit I (MTT) : colorimetric assay (MTT based) for the non-radioactive quantification of cell proliferation and viability.
1993, 4 p.
- 133 - LABORATOIRE BOEHRINGER MANNHEIM BIOCHEMICA
Cell proliferation kit II (XTT) : colorimetric assay (XTT based) for the non-radioactive quantification of cell proliferation and viability.
1993, 4 p.
- 134 - LABORATOIRE SIGMA CELL CULTURE REAGENTS
In vitro toxicology assay kits.
Source, 1993, 9, p. 1-3.

ABBREVIATIONS

ADN	Acide desoxyribonucléique
B.T.	Bleu Trypan
C.F.U.	Colony-forming unit
DMF	N,N-diméthylformamide
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
D.O.	Densité optique
ELISA	Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay
FAD	Flavine-adénine-dinucléotide
h	heure
H.B.S.S.	Hanks balanced salt solution (solution saline de Hanks)
H.S.V-1	Herpès simplex virus-1
H.S.V-2	Herpès simplex virus-2
IL	Interleukine
M.E.M.D.	Milieu de Eagle modifié par Dulbecco
M.E.M.E.	Milieu essentiel minimum de Eagle
M.G.G.	May-Grünwald/Giemsa
mg	milligramme
min	minute
ml	millilitre
mM	millimolaire
µg	microgramme
µM	micromolaire
MTT	Bromure de 3 - (4,5-diméthylthiazol - 2 - yl) - 2,5 - diphényltétrazolium
NAD	Nicotinamide-adénine-dinucléotide
NADP	Nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate
N.C.I.	National Cancer Institute
nm	Nanomètre
P.B.S.	Phosphate buffered saline (tampon phosphate)
PMS	Phenazine méthosulfate
R.N.	Rouge neutre
s	seconde
S.D.S.	Sodium dodecyl sulfate (laurylsulfate de sodium)

S.O.D.	Superoxyde dismutase
SRB	Sulforhodamine B
S.V.F.	Sérum de veau foetal
S.V.N.	Sérum de veau nouveau-né
tr/min	tours par minute
U.I.	Unité internationale
V.I.H.	Virus de l'immunodéficience humaine
V.R.S.	Virus respiratoire syncytial
XTT	Hydroxyde de 2,3 bis -[2 - méthoxy - 4 - nitro- 5 - sulfophényl] - 5 -[(phénylamino) carbonyl] - 2H - tétrazolium.

**TABLE DES TABLEAUX
ET DES FIGURES**

TABLEAUX

	Pages
Tableaux récapitulatifs des méthodologies utilisées en immunologie	50-56
Tableaux récapitulatifs des méthodologies utilisées en cancérologie	59-70
Tableaux récapitulatifs des méthodologies utilisées en microbiologie	74-78

FIGURES

<u>Figure 1</u> : Structures du tétrazolium MTT et du formazan	18
<u>Figure 2</u> : Formule plane simplifiée du formazan, d'après Seidler (102)	19
<u>Figure 3</u> : Forme-cycle et forme-chaîne du formazan, d'après Seidler (102)	20
<u>Figure 4</u> : Les différentes étapes de la réduction d'un sel de tétrazolium, d'après Seidler (102)	21
<u>Figure 5</u> : Le mécanisme de la réduction du tétrazolium, d'après Seidler (102)	25
<u>Figure 6</u> : Stabilisation des radicaux tétrazolinyles par décomposition en formazan et tétrazole, d'après Seidler (102)	28

- Figure 7 : Spectre d'absorption du réactif formazan dans différents solvants. D'après Alley et coll. (3) 32
- Figure 8 : Spectre d'absorption du formazan produit par incubation des cellules A 549 avec du MTT, pour 4×10^3 cellules/puits et 1×10^4 cellules/puits. D'après Plumb et coll. (88) 35
- Figure 9 : Spectre d'absorption d'une solution de formazan obtenu chimiquement dans du DMSO ou dans du DMSO/glycine à différents pH. D'après Plumb et coll. (88) 35
- Figure 10 : Linéarité de l'essai au MTT. D'après Mosmann (72). 83
- Figure 11 : Relation entre le nombre de cellules et la densité optique. D'après Price et McMillan (89) 86
- Figure 12 : Relation entre le nombre de cellules et la densité optique. D'après Uludag et Sefton (120) 86
- Figure 13 : Relation entre le nombre de cellules et la densité optique. D'après Ford et coll. (34) 88
- Figure 14 : Effet du pH sur la production de formazan. D'après Jabbar et coll. (52) 99
- Figure 15 : Effet de la concentration en MTT et du temps d'incubation sur la réduction du MTT. D'après Vistica et coll. (125) 101

- Figure 16 : Effet de la concentration en MTT.
D'après Vanhée et coll. (123). 103
- Figure 17 : Cinétiques de réduction du MTT par
des cellules tumorales EL 4. D'après Denizot
et Lang (27). 105
- Figure 18 : Cinétique de survie de cellules
spléniques stimulées, pendant l'incubation avec
du MTT. D'après Gerlier et Thomasset (40) 105
- Figure 19 : Influence du pH sur la solubilisation du
formazan. D'après Hansen et coll. (44). 109



TABLE DES MATIERES

	Pages
PLAN	8
INTRODUCTION	12
Chapitre premier : GENERALITES	17
1.1 Structure et propriétés chimiques du MTT et de son formazan	18
1.2 Réduction du sel de tétrazolium MTT	21
1.2.1 Principe général et remarques	21
1.2.2 Mécanisme de la réduction	24
1.2.3 Localisation subcellulaire de la réduction du MTT	29
1.3 Propriétés optiques du MTT et de son formazan	31
Chapitre deuxième : METHODOLOGIES	36
2.1 Principe de la méthode colorimétrique au MTT	37
2.2 La méthode de référence	38
2.3 Les divers modes opératoires	40
2.3.1 Les cellules et le milieu de culture	40
2.3.2 Le MTT	41
1) Préparation de la solution-stock de MTT	41
2) Utilisation de la solution	42
2.3.3 L'étape de solubilisation du formazan	43
1) L'étape post-incubation	43
2) Les solvants	44
3) L'étape d'agitation	47
2.3.4 La lecture des densités optiques	48
2.3.5 Tableaux récapitulatifs	49

Chapitre troisième : ETUDE DE LA METHODE	
 COLORIMETRIQUE AU MTT	80
3.1 Caractéristiques de la méthode	81
3.1.1 Spécificité vis-à-vis des cellules vivantes et viables	81
3.1.2 Relation entre la densité optique et la concentration cellulaire	82
3.1.3 Seuil de sensibilité	89
3.2 Paramètres influençant la méthode	90
3.2.1 Les cellules	91
1) Cultures cellulaires en monocouche ou en suspension	91
2) Les différentes lignées cellulaires	92
3) Contamination de la culture par d'autres cellules ou par des bactéries	93
4) Les conditions de culture avant l'essai colorimétrique	94
5) L'état métabolique des cellules	95
3.2.2 Le milieu de culture	96
1) Le contenu en glucose	97
2) La qualité du milieu	97
3) La quantité de sérum de veau	98
3.2.3 Le MTT	100
1) La concentration finale en MTT	101
2) Le temps d'incubation des cellules avec le MTT	102
3.2.4 Le solvant	106
1) Le solvant et le milieu de culture	106
a) Le sérum	106
b) Le rouge de phénol	108
c) Le volume du milieu résiduel	110

2) La composition chimique du solvant	110
3) L'agitation du solvant	112
3.2.5 Facteurs externes	113

**Chapitre quatrième : COMPARAISON DE LA METHODE
COLORIMETRIQUE AU MTT AVEC D'AUTRES
METHODES DE MESURE DE LA VIABILITE
CELLULAIRE**

	114
4.1 Comparaison avec la méthode au bleu Trypan	116
4.1.1 Principe de la méthode au bleu Trypan	116
4.1.2 En immunologie	116
4.1.3 En cancérologie	117
4.1.4 En virologie	118
4.1.5 Conclusion	119
4.2 Comparaison avec le comptage de colonies	119
4.2.1 Principe du comptage de colonies	119
4.2.2 En immunologie	120
4.2.3 En cancérologie	121
4.2.4 Conclusion	122
4.3 Comparaison avec les méthodes radioactives	122
4.3.1 Principe des méthodes radioactives	122
4.3.2 En immunologie	123
4.3.3 En cancérologie	124
4.3.4 En virologie	126
4.3.5 Conclusion	126
4.4 Comparaison avec la méthode au rouge neutre	128
4.4.1 Principe de la méthode au rouge neutre	128
4.4.2 En immunologie	129
4.4.3 En toxicologie	129
4.4.4 En virologie	130
4.4.5 Conclusion	131

4.5 Comparaison avec la méthode à la sulforhodamine B	132
4.5.1 Principe de la méthode à la sulforhodamine B	132
4.5.2 En immunologie	133
4.5.3 En cancérologie	133
4.5.4 Conclusion	136
4.6 Comparaison avec un autre sel de tétrazolium : le XTT	137
4.6.1 Principe de la méthode colorimétrique au XTT	137
4.6.2 En immunologie	138
4.6.3 En cancérologie	139
4.6.4 En parasitologie	140
4.6.5 En microbiologie	141
4.6.6 Conclusion	142
4.7 Comparaison avec la méthode au May-Grünwald/ Giemsa	144
4.7.1 Principe de la méthode de coloration au May-Grünwald/Giemsa	144
4.7.2 En virologie	144

Chapitre cinquième : APPLICATIONS DE LA METHODE COLORIMETRIQUE AU MTT

5.1 En immunologie	148
5.1.1 Détermination du titre d'échantillons de facteurs de croissance	148
5.1.2 Détermination du titre d'échantillons de lymphotoxines	149
5.1.3 Détection d'anticorps monoclonaux inhibant la prolifération cellulaire <i>in vitro</i>	150

5.1.4	Mesure de l'activité cytotoxique de cellules	150
5.1.5	Mesure de l'activation cellulaire	150
5.1.6	Applications particulières	151
5.2	En cancérologie	152
5.2.1	Tests de chimiosensibilité <i>in vitro</i>	152
5.2.2	Tests de chimiorésistance <i>in vitro</i>	154
5.2.3	Tests de radiosensibilité	155
5.2.4	Evaluation de la sensibilité de cellules tumorales à la photothérapie	156
5.2.5	Essais de cytotoxicité antitumorale due à des cellules	156
5.3	En virologie	157
5.3.1	Test de criblage de molécules antivirales	157
5.3.2	Mesure de l'activité neutralisante de plasmas humains vis-à-vis du virus respiratoire syncytial	158
5.3.3	Application particulière : essai de formation de plages	159
5.4	En bactériologie	160
5.5	Applications diverses	161
5.5.1	Parasitologie	161
5.5.2	Toxicologie	161
5.5.3	Biochimie	161
5.5.4	Science des biomatériaux	162
5.5.5	Anatomopathologie	162
	CONCLUSION	163
	BIBLIOGRAPHIE	167
	ABREVIATIONS	192
	TABLE DES TABLEAUX ET DES FIGURES	195
	TABLE DES MATIERES	199



CHEVALERIAS (Béatrice) - Méthode colorimétrique basée sur le bromure de 3-(4,5 -diméthylthiazol-2 -yl) -2,5 - diphényltétrazolium - 204 f ; 19 ill. ; 24 tabl. ; 30 cm (Thèse Pharm., Limoges, 1995)

Résumé :

Le bromure de 3-(4,5 -diméthylthiazol-2 -yl) -2,5 - diphényltétrazolium (MTT) est un sel de tétrazolium. Il a la propriété d'être réduit uniquement par les cellules vivantes en un composé violet-bleu appelé formazan. Il constitue donc un indicateur de viabilité cellulaire. Cette réduction est proportionnelle au nombre de cellules viables. Ceci a conduit Mosmann, en 1983, à mettre au point une microméthode colorimétrique basée sur le MTT pour des essais de prolifération cellulaire. La coloration du formazan mesurée spectrophotométriquement permet d'évaluer le nombre de cellules vivantes.

La méthode de Mosmann a subi de nombreuses modifications et améliorations. Son application en virologie, en particulier sur le virus de l'immunodéficiéce humaine, nous a incités à étudier ses différentes méthodologies, ses caractéristiques, ses paramètres, à évaluer son intérêt par rapport à d'autres techniques et à nous intéresser à ses nombreuses applications.

Mots-clés :

- bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
- sel de tétrazolium
- colorimétrique (méthode)
- viabilité cellulaire (méthode de)
- prolifération cellulaire (mesure de la)
- cytotoxicité (mesure de la)
- criblage (test de)

Jury :

- Président : Madame C. BOSGIRAUD, Professeur
Juges : Madame S. DELEBASSEE, Maître de Conférences
Monsieur A. ORABONA, Pharmacien