

Quelques notions fondamentales à propos des tests in vitro de cytotoxicité

Les tests de cytotoxicité in vitro ont été mis au point comme méthode alternative à la manipulation sur les animaux (rongeurs, lapin, cochon,...).

De nos jours de nombreuses firmes de biotechnologie et dans nombreuses publications, les scientifiques ont recours à ces tests afin de valider de nouvelles molécules.

Les droits des animaux commencent à être sérieusement pris en compte de part le monde. Il est bon néanmoins de signaler que l'animal sera pour le moment toujours nécessaire lors des tests ultimes avant le passage à l'homme.

1. Considération technique et déroulement d'un test de cytotoxicité

1.1. Quelques précautions d'usage

Toute évaluation de la toxicité d'une molécule doit suivre un plan bien établi. Il faut définir :

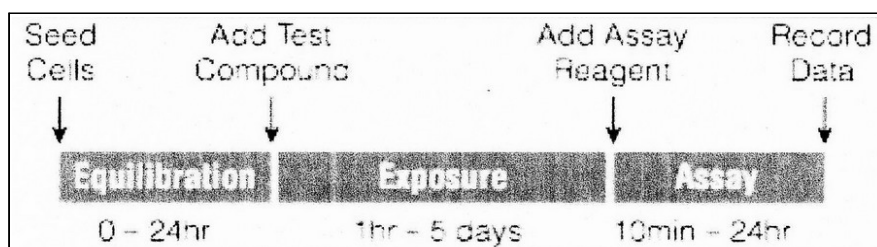
- le type cellulaire utilisé pour l'expérimentation. Généralement, les cellules test doivent être les plus proches des cellules ou tissus ciblés in vivo par la drogue à évaluer.

- le nombre de cellules à tester afin d'obtenir une réponse physiologiquement recevable et reproductible. On note que de nombreux facteurs peuvent influencer la réponse cellulaire : densité de cellule par rapport à la surface de culture, échange gazeux dans le milieu de culture (on manipule généralement des cultures en plaque 96 puits), phénomène d'évaporation,...etc.

- la durée de l'exposition à la drogue et les doses à tester.

- le système de mesure qui permettra de quantifier l'effet sur la culture.

1.2. Déroulement d'un test de cytotoxicité



Un test se déroule classiquement en 3 phases :

1) Après inoculation des cellules, on laisse une phase d'équilibre de manière à stabiliser la population avant l'introduction de la drogue.

2) On ajoute la drogue à tester. Souvent les premières expérimentations sont réalisées avec une gamme de cette substance de manière à établir une courbe - dose - réponse - afin de vérifier le comportement des cellules.

La durée de l'exposition est variable en fonction de la drogue et/ou de ce que l'on souhaite mesurer :

→ contact bref pour mettre en évidence un effet nécrotique immédiat,

→ contact long (jusqu'à plusieurs jours) pour mettre en évidence une inhibition de la prolifération.

3) Des mesures de viabilité ou de cytotoxicité de cellules habituellement sont déterminées à la fin de la période d'exposition. Selon la procédure utilisée, les données peuvent être obtenues rapidement (mesure LDH ou d'ATP en quelques minutes) ou après plusieurs heures (MTS ou resazurine). On établit ainsi in vitro la DL50 de la drogue testée.

2. Principales méthodes utilisées

Historiquement, la viabilité des cellules au cours d'un test de cytotoxicité se mesurait par incorporation de nucléotides marqués dans l'ADN (Thymidine tritiée ou BrdU).

Cependant, l'évolution des techniques s'accompagnant de plus en plus de contraintes sécuritaires pour les manipulateurs et l'environnement, des méthodes de substitution utilisant des réactifs non radioactifs ont été mises au point.

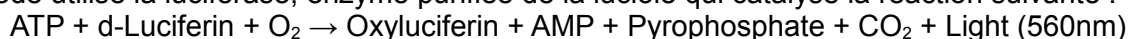
Le tableau suivant rassemble les principaux kits commercialisés par Promega :

Comparison of Promega Cell Viability, Cytotoxicity					
Characteristic	CellTiter-Glo [®] Luminescent Cell Viability Assay	BacTiter-Glo [™] Microbial Cell Viability Assay	CellTiter-Blue [®] Cell Viability Assay	CellTiter 96 [®] AQueous One Solution Assay	CytoTox-ONE [™] Membrane Integrity Assay
Incubation	10 minutes	5 minutes	1–4 hours	1–4 hours	10 minutes
Parameter	ATP	ATP	Resazurin	MTS reduction	LDH release
Sensitivity: 96-	50 cells/15 cells	~40 cells/N.D.	390 cells/50	800 cells/200	800 cells/200
Sample Type	eukaryotic cells	bacteria, yeast	eukaryotic cells	eukaryotic cells	eukaryotic cells
Detection	luminescent	luminescent	fluorometric or	colorimetric	fluorometric

2.1. Tests à révélation rapide

2.1.1. Mesure de l'ATP cellulaire

La méthode utilise la luciférase, enzyme purifiée de la luciole qui catalyse la réaction suivante :



On évalue la viabilité cellulaire par la mesure de l'ATP présent à un instant donnée dans la culture cellulaire.

Quelques minutes après avoir perdu l'intégrité de leurs membranes, les cellules perdent leur faculté de synthétiser de l'ATP, les ATPases endogènes hydrolysant alors les restes d'ATP encore présents : la concentration en ATP s'effondre précipitamment.

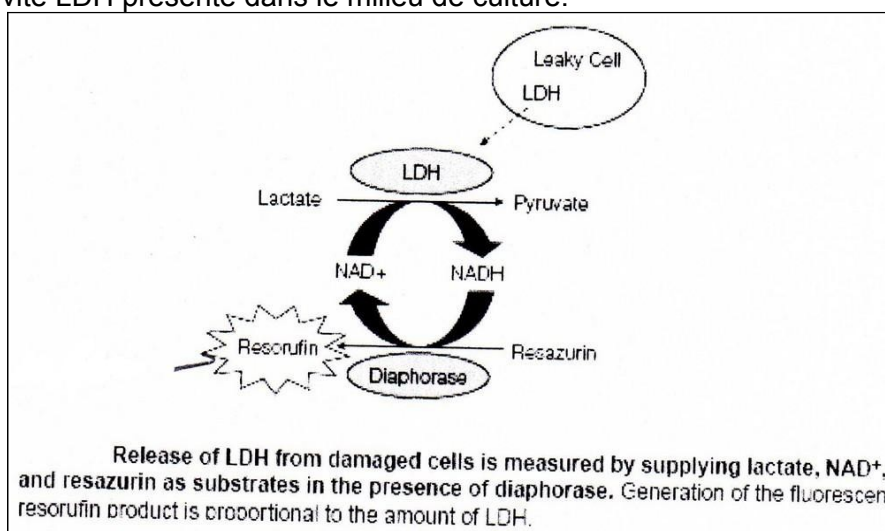
Cette méthode est extrêmement sensible et rapide. Elle nécessite :

- une extraction de l'ATP cellulaire préalable à la mesure par un tampon de lyse,
- l'utilisation d'un luminomètre afin de quantifier le signal lumineux produit lors de la réaction enzymatique.

2.1.2. Mesure de l'intégrité membranaire

Cette méthode est basée sur le fait que lors de la mort cellulaire, la perte de l'intégrité de la membrane plasmique conduit au relargage dans le milieu, d'enzymes cytoplasmique comme la LDH. Cette enzyme est un bon marqueur de cellules mortes.

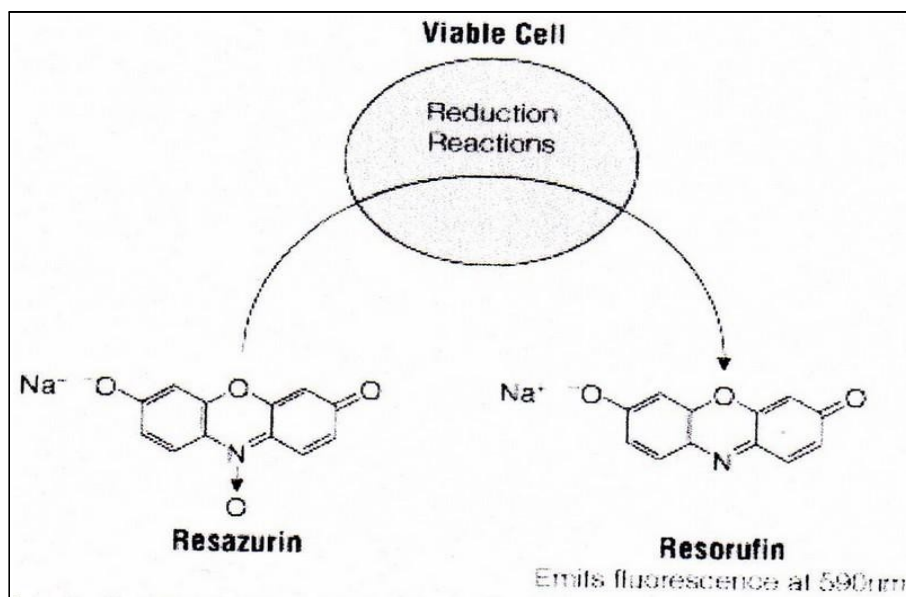
On évalue donc dans cette méthode le nombre de cellules mortes dans la culture exposée à la drogue en mesurant l'activité LDH présente dans le milieu de culture.



2.2. Tests à révélation retardée

Ces méthodes évaluent la capacité métabolique de la population cellulaire utilisée pour le test de cytotoxicité.

2.2.1. Utilisation d'un colorant, la résazurine



On incube directement la résazurine dans la culture cellulaire après la période d'exposition à la drogue. Les cellules vivantes convertissent alors au bout de 1 à 4 heures cette molécule en un produit fluorescent (Resorufine) dont la quantité est proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

Il suffit de mesurer le signal fluorescent par un fluorimètre et de calibrer la mesure par une gamme.

D'autres colorants peuvent être utilisés de la même façon, par exemple le Rouge Neutre (incorporation dans les lysosomes des cellules)

2.2.2. Détection de la production de Formazan

Le métabolisme des cellules génère des «équivalents réducteurs» sous forme de NADH, H⁺ ou NADPH, H⁺. Les composants peuvent alors transférer leurs électrons à un intermédiaire qui a la capacité de réduire les sels de Tétrazolium, comme le MIT ou le XTT en formazan facilement détectable par spectrophotométrie.

On évalue ici la viabilité de la culture grâce à l'activité deshydrogénase des mitochondries des cellules vivantes. A la mort cellulaire l'activité des mitochondries disparaît et donc, avec elle, la potentialité de réduction des sels de tétrazolium. (cf. TD de BCM BTS Biochimiste).

source : thé source of discovery Promega Corporation