

OPTIMISATION D'UNE TECHNIQUE DE PROLIFÉRATION CELLULAIRE POUR L'ÉVALUATION DE LA CYTOTOXICITÉ EN CULTURE

VINCENT YAPO^(1,2), FAÏZA ALASSANI⁽¹⁾, ISSOUF BAMBA⁽²⁾,
MAHI GNEMAGNON⁽³⁾, DUNI SAWADOGO^(1,4)

RÉSUMÉ

La culture cellulaire permet l'évaluation de la cytotoxicité *in vitro*. La présente étude vise à définir les conditions optimales de mise en œuvre d'une technique de prolifération cellulaire pour évaluer la cytotoxicité des manipulations génétiques et autres traitements chimiques appliquées aux cellules humaines. Les cellules utérines humaines de lignée continue ont été cultivées pendant 7 jours dans des plaques de 96 puits à partir de différentes densités cellulaires. Le test de prolifération cellulaire au 2,3-bis-(2-méthoxy-4-nitro-5-sulphophenyl) -2H-tétrazolium-5-carboxanile ou test XTT a été utilisé et des mesures cinétiques de l'absorbance à 450 nm ont été réalisées. Les densités cellulaires compatibles avec une absorbance comprise entre 0 et 1 étaient de 500 et 1000 cellules par puits au moment de la mise en culture. De sorte

que le domaine de linéarité du test a été estimé entre 20000 et 64000 cellules par puits au moment de la lecture de l'absorbance. Le temps d'incubation après ajout du substrat était idéalement de 6 heures. Et la réduction du volume de la solution de travail de 50 à 25 µl par puits éliminait les problèmes de saturation du signal. Le test de prolifération évalué était compatible avec l'analyse de la cytotoxicité. Il peut être utile à l'évaluation des effets indésirables de manipulations génétiques pratiquées sur des cellules humaines, de même que ceux qui pourraient être observés avec des composés chimiques issus de la pharmacopée ou de la synthèse chimique.

MOTS-CLÉS : XTT, CYTOTOXICITÉ, PROLIFÉRATION, CULTURE CELLULAIRE

ABSTRACT

Cell culture allows for the assessment of cell toxicity *in vitro*. The current study aimed at defining the optimized conditions for the performance of a cell proliferation technique used in the assessment of cell toxicity of knockdown and/or knockout strategies as well as candidate compounds and drugs. The human uterine cell line HeLa was cultured for 7 days in 96-well plates using various seeding numbers. The cell proliferation using the 2,3-bis-(2-méthoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tétrazolium-5-carboxanile also called XTT assay was performed and kinetic collections of data at 450 nm was made. Seeding cell numbers that were compatible with absorbance values ranging from 0 to 1 were 500 and 1.000 cells per well at day

0. Accordingly, the dynamic range of the assay was approximately 20.000 to 64.000 cells per well. The optimized incubation time after adding the XTT reagents to the cells was 6 hours. And the volume of the XTT reagents mixture added to the cells was brought down to 25 µl instead of 50 µl as recommended by the manufacturer in order to reduce the background noise. Overall, the XTT assay was suitable to properly assess cell toxicity under the right conditions. Hence, this assay can be used to evaluate undesirable cell toxicity effects of knockdown/knockout runs as well as those of compounds and drugs on human cells.

KEY WORDS: XTT, CELL TOXICITY, PROLIFERATION, CELL CULTURE

-
1. Département d'Hématologie – Immunologie – Biologie générale, UFR des Sciences Pharmaceutiques et biologiques, Université Félix Houphouët – Boigny de Cocody, Abidjan – Côte d'Ivoire
 2. Unité de biologie moléculaire, Centre de Diagnostic et de Recherche sur le Sida (CeDReS), Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Treichville, Abidjan
 3. CHU de Bouaké / UFR des Sciences Médicales de Bouaké - Côte d'Ivoire
 4. Unité d'hématologie biologie, laboratoire central, CHU de Yopougon, Abidjan
- Auteur correspondant : Vincent Yapo,
+2250506412799, yavdp2020@gmail.com, 22 BP 698 Abidjan 22

INTRODUCTION

Le fonctionnement biologique normale des cellules humaines peut être modulé grâce à des manipulations génétiques de type knockout ou knockdown mais aussi grâce à des substances actives provenant de la pharmacopée ou de la synthèse chimique (Alliet et *al.*, Maillet, Cooper, Alberts et *al.*). Les altérations de la cytobiologie peuvent être réalisées dans le cadre de la recherche fondamentale, de l'exploration fonctionnelle avec des substances ayant une affinité pour un tissu ou organe spécifique et de la thérapie cellulaire (Cooper, McDonald). Dès lors, une analyse rigoureuse du rapport bénéfice/risque est nécessaire car l'élimination des procédés et des substances les plus toxiques doit être une priorité absolue (Hughes et *al.*, Xu et *al.*). L'évaluation du risque implique la mise au point d'outils d'analyse de la toxicité cellulaire liée auxdites interventions (Mohs et *al.*).

Dans notre contexte, l'évaluation du risque toxique se heurte à la non disponibilité de la culture cellulaire et de tests appropriés. Par ailleurs, les cellules humaines ou animales primaires ont une survie courte hors de l'organisme (Alliet et *al.*, Maillet, Cooper). Et même lorsque

la culture cellulaire est disponible, les cellules primaires recueillies chez des individus présumés sains ont une durée de vie naturelle parfois incompatible avec une conservation à long terme qui permette de travailler dans les mêmes conditions pour chaque manipulation ou substance testée (Alliet et *al.*, Maillet, Cooper). Une des solutions est le recours à des cellules de lignées continues beaucoup plus stables au long terme (Rahbari et *al.*). Toutefois, toutes les lignées cellulaires ne sont pas équivalentes en termes de métabolisme et de taux de croissance (Lucey et *al.*), d'où la nécessité d'optimiser les conditions de leur utilisation pour l'évaluation de la cytotoxicité *in vitro*.

La présente étude a pour objectif général de définir les conditions optimales de mise en œuvre de la technique de prolifération cellulaire XTT pour l'étude de cytotoxicité dans les cellules humaines de lignée continue provenant d'un tissu utérin (Masters, Kuhn et *al.*, Paull et *al.*). L'utilisation de cette lignée cellulaire permettra l'évaluation de la toxicité sur l'appareil génital de la femme de manipulations génétiques et celles de substances à visée thérapeutique.

MÉTHODOLOGIE

Il s'agit d'une étude expérimentale menée au Bond Life Sciences Center de l'université du Missouri-Columbia, état du Missouri, aux Etats-Unis. Elle s'est déroulée entre janvier et février 2019 et a porté sur des cellules eucaryotes de lignée continue HeLa (Henrietta Lacks, 1951) sélectionnées pour la présente étude (Rahbari et *al.*, Lucey et *al.*, Roehm et *al.*). Elles se divisent en moyenne une fois toutes les 20 à 24 heures. La cytotoxicité a été évaluée grâce au test de prolifération cellulaire au 2,3-bis-(2-méthoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-

tétrazolium-5-carboxanile (XTT) de Roche. Ce test évalue le niveau de métabolisme à l'échelle de la population des cellules présentes dans un puits au moment de la mesure de l'absorbance à 450 nm. Étant donné que l'absorbance obéit à la loi de Beer – Lambert qui n'est valide que pour des valeurs d'absorbance comprises entre 0 et 1, différentes densités cellulaires ont été testées afin d'en évaluer l'impact sur les résultats du test XTT. Les données recueillies ont été analysées avec le logiciel GraphPad version 6.1.

RÉSULTATS

La densité cellulaire idéale de mise en culture des cellules HeLa était d'environ 500 à 1000 cellules/puits à J0 pour une incubation de 7 jours (figure 1). Ces valeurs étaient compatibles avec

le domaine de linéarité de la loi de Beer-Lambert à condition que la mesure de l'absorbance soit réalisée à une heure de contact entre les cellules et la solution de travail.

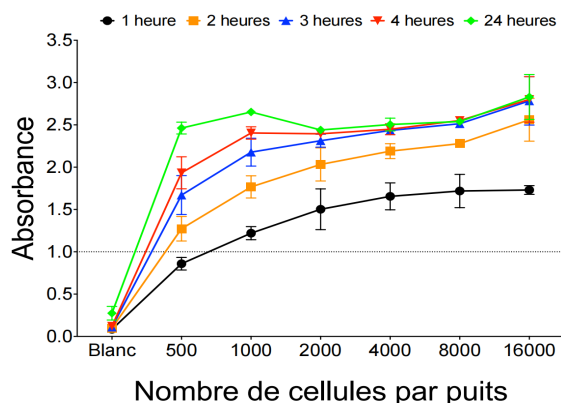


Figure 1 : Evaluation de différentes densités cellulaires de mise en culture pour une incubation de 7 jours

Dans une microplaque de 96 puits, la mise en culture de moins de 500 cellules HeLa aboutissait à un défaut de croissance de ces cellules même après 7 jours d'incubation. Ainsi, les densités cellulaires de mise en culture des cellules HeLa pour une incubation de 7 jours, qui soient compatibles avec la zone de linéarité ont été identifiées. Les cellules HeLa se divisent toutes les 20 à 24 heures. Le calcul du nombre de cellules présentes par puits après 6 jours d'incubation (J7) indique que lorsque 500 à 1 000 cellules HeLa sont mises en culture à J0, il y a approximativement 32 000 à 64 000 cellules dans les puits correspondants à J7. Ces valeurs ont été vérifiées en microplaque avec des séries de densités cellulaires allant de 10 000 à 70 000 cellules. La culture a duré 12 à 13 heures avant l'ajout de 25 μ l de la solution de travail par puits et la mesure de l'absorbance. La modification apportée au protocole visait à atténuer le bruit de fonds. Le nombre de cellules HeLa métaboliquement actives par puits permettant d'obtenir des valeurs d'absorbance comprises entre 0 et 1 était de 20 000 à 64 000 cellules après un temps total d'incubation de 18 à 19 heures (temps de culture + temps de contact de la solution de travail) (figure 2).

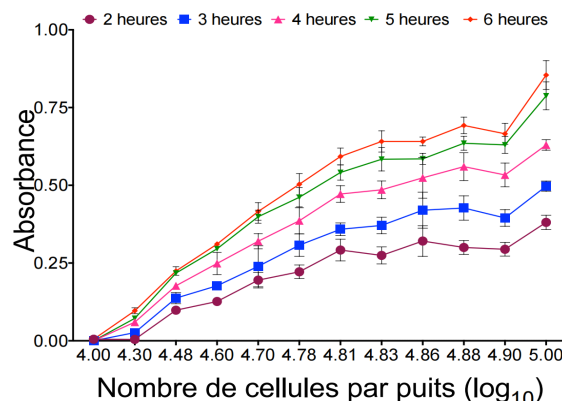


Figure 2 : Nombre de cellules HeLa présents dans chaque puits au moment de la mesure de l'absorbance

En dessous de 20 000 cellules/puits, les valeurs d'absorbance équivalaient au bruit de fond. En conséquence, la densité cellulaire de mise en culture peut être augmentée à 4 000 voire 10 000 cellules/puits pour une incubation plus courte de 3 à 4 jours au lieu de 7 jours. Le temps d'incubation du test XTT après ajout de la solution de travail aux cellules avait également une influence sur les données collectées. De sorte que l'absorbance a été idéalement mesurée à la 6^{ème} heure après l'ajout des 25 μ l de la solution de travail. Au delà de la 6^{ème} heure, la saturation du signal rendait difficile l'interprétation des données. Une droite standard correspondant à la zone de linéarité du test XTT pour les cellules HeLa a été générée (figure 3).

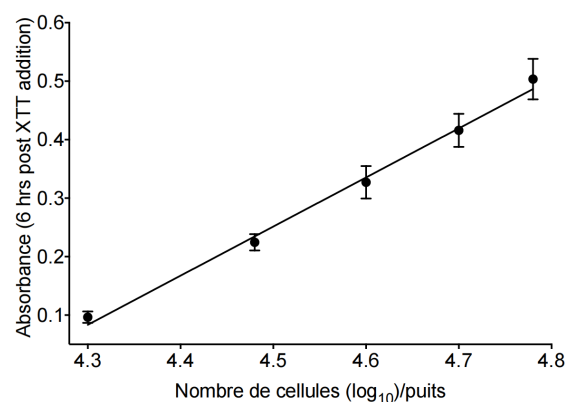


Figure 3 : Droite standard de l'absorbance en fonction du nombre de cellules HeLa

Cette droite avait une pente de 0,84 et un Y-intercept de -3,53. Le minimum de cellules nécessaire au moment de la mesure de l'absorbance était de 20 000 cellules HeLa et le maximum était de 64 000 cellules. Cette droite a permis d'extrapoler le nombre de cellules HeLa métaboliquement actives à partir des valeurs

d'absorbance mesurée. Cette extrapolation n'est possible qu'à certaines conditions. Ces conditions sont que l'absorbance soit comprise entre 0 et 1, que le volume de la solution de travail soit de 25 μ l et que le temps de contact de la solution avec les cellules HeLa soit de 6 heures à 37°C sous une atmosphère de 5% de CO₂.

DISCUSSION

Les densités cellulaires optimales de mise en culture des cellules HeLa étaient comprises entre 500 et 1 000 cellules pour le test XTT. Ces densités contrastent avec le nombre de cellules généralement mises en culture lors des essais qui sont généralement de 5 000 à 10 000 cellules (Masters, Altman, Cory et *al.*). Ces nombres peuvent conduire à une prolifération en plusieurs couches cellulaires empilées les unes sur les autres dans une microplaque de 96 lorsque l'incubation dépasse 3 jours. La présence dans les puits de plusieurs couches cellulaires peut occasionner des valeurs d'absorbance saturée (Cory et *al.*) qui elles peuvent masquer la détection des effets cytotoxiques. Il est donc nécessaire que l'évaluation de la cytotoxicité et l'exécution des manipulations génétiques et/ou des traitements soient réalisées dans les mêmes conditions pour permettre une bonne analyse du rapport bénéfice (effet recherché)/risque (toxicité).

Il est possible d'estimer à partir de la densité cellulaire et du nombre de jours d'incubation, le nombre probable de cellules présentes dans chaque puits au moment de la mesure de l'absorbance. Toutefois, cette estimation est rendue imprécise par les erreurs du comptage manuel à l'hématimètre (Cory et *al.*), les problèmes de viabilité des cellules, de capacité de division et d'asynchronisme de phases. En effet, il est commun de constater que certaines cellules HeLa n'adhèrent pas au support de culture (cellules mortes). D'autres se divisent plus lentement du fait de leur état de conservation et des conditions de décongélation. Enfin, certaines cellules vivantes et métaboliquement actives peuvent être en phase de mitose (division cellulaire) tandis que d'autres sont à l'une ou l'autre des phases constitutives de l'interphase (G1, S, G2) (Alliet et *al.*, Maillet, Cooper). En tenant compte que de ces paramètres, le domaine de linéarité du test

XTT pour les cellules HeLa a été estimé entre 20 000 et 64 000 cellules métaboliquement actives.

Le test XTT peut être mise en oeuvre pour l'analyse de la cytotoxicité en s'en tenant aux recommandations du fabricant. Toutefois, la présente étude a montré que le volume de 50 μ l de solution de travail génère un bruit de fonds non négligeable pouvant atteindre 0,3 d'absorbance. Ce qui représente près d'un tiers du signal maximal. Certains auteurs ont rapporté des valeurs similaires de bruits de fonds (Masters, Cory et *al.*). Une solution à ce problème est la réduction du volume à 25 μ l qui ramène le bruit de fond autour de 0,1 correspondant à un dixième du signal maximal. La baisse du volume de la solution de travail entraîne une baisse globale du signal pour lequel un ajustement du temps de contact a été nécessaire. Le moment pour la lecture de l'absorbance a été idéalement placée à 6 heures post-ajout juste avant que les cellules ne complètent leur première mitose.

La mise en place d'une droite standard est utile dans de nombreux processus et dosages en biologie. Elle permet à partir de mesure d'un signal d'extrapoler les quantités correspondantes de la ou des cibles à condition que l'on soit dans le domaine de linéarité de la méthode. Pour l'analyse de la cytotoxicité par le test XTT, la droite standard a été définie avec succès. Cette droite couvre des valeurs d'absorbance comprises entre 0 et 0,5 après soustraction du bruit de fond. La faible étendue des valeurs possibles peut être liés à la méthode elle-même qui quoique aisée à réaliser, génère un bruit de fonds non négligeable. Cette observation a été faite par d'autres auteurs qui ont même proposé des astuces afin d'améliorer la collecte de données lors de l'analyse de substances provenant de la pharmacopée traditionnelle (Paull et *al.*, Altman, Cory et *al.*).

CONCLUSION

Le test de prolifération cellulaire au XTT de Roche est un test d'évaluation de la cytotoxicité qui peut être très utile dans l'évaluation de nouveaux médicaments et dans les manipulations génétiques de cellules humaines. Il s'agit d'un test aisé à mettre en place et à réaliser dans un laboratoire de cytologie ayant des équipements de culture cellulaire et un lecteur classique de microplaque de 96 puits. Ce test peut être d'un

apport considérable dans la poursuite des efforts de développement de nouveaux traitements en Côte d'Ivoire.

Remerciements

Nos sincères remerciements aux Professeurs Stefan Sarafianos et Marc Johnson de l'université du Missouri-Columbia (Etats-Unis) pour leur accueil et soutien sans lesquels ce travail n'aurait pas été possible.

RÉFÉRENCES

1. Alliet J, Lalégerie P (1998). *Cytobiologie*. Éditions Ellipses Paris France 864p
2. Maillet M (2006). *Abrégé de biologie cellulaire*. Éditions Elsevier Masson Paris France, 640p
3. Cooper GM (2000). *Tools of cell biology. The Cell: A Molecular Approach. 2nd Edition*
4. Alberts B, Johnson AD, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P (2015). Cells and genomes. *Molecular Biology of the Cell* (6th ed.). New York, NY: Garland Science. pp. 1–42. [ISBN 978-0815344322](#)
5. McDonald A (2018). 5 contributions HeLa cells have made to science. <https://www.technology-networks.com/cell-science/lists/5-contributions-hela-cells-have-made-to-science-305036>. Consulté le 15 juillet 2022
6. Hughes JP, Rees S, Kalindjian, and Philpott KL (2011). Principles of early drug discovery. *British Journal of Pharmacology*; 162: 1239-1249. [doi:1111/j.1476-5381.2010.01127.x](#)
7. Xu JJ, Dunn MC, Smith AR (2006). Applications of cell-based imaging technologies in toxicity screening in drug discovery and development. *American Drug Discovery*; 11: 20–26
8. Mohs RC, and Greig NH (2017). Drug discovery and development: Role of basic biological research. *Alzheimer's & dementia: Translational Research & Clinical Interventions*; 3: 651-657. [doi.org/10.1016/j.trci.2017.10005](#)
9. Rahbari R, Sheahan T, Modes V, Collier P, Macfarlane C, Badge RM (2009). A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification. *BioTechniques*; 46(4): 277-284. [doi:10.2144/000113089](#). [PMC 2696096](#). [PMID 19450234](#)
10. Lucey BP, Nelson-Rees WA, Hutchins GM (2009). Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*; 133(9): 1463–7. [doi:10.5858/133.9.1463](#). [PMID 19722756](#)
11. Masters JR (2002). HeLa cells 50 years on : the good, the bad and the ugly. *Nature Reviews Cancer*; 2(4): 315-319
12. Kuhn DM, Balkis M, Chandra J, Mukherjee PK, and Ghannoum MA (2003). Uses and Limitations of the XTT Assay in Studies of Candida Growth and Metabolism. *Clinical Microbiology*; 41(1): 506-508. [doi: 10.1128/JCM.41.1.506-508.2003](#)
13. Paull KD, Shoemaker RH, Boyd MR, Parsons JL, Risbood PA, Barbera WA, Sharma MN, Baker DC, Hand E, Scudiero DA, Monks A, Alley MC, and Grote M (1988). The synthesis of XTT: a new tetrazolium reagent that is bioeducable to a water-soluble formazan. *Journal of Heterocyclic Chemistry*; 25:911
14. Roehm, NW, Rodgers GH, Hatfield SM, and Glasebrook AL (1991). An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *Journal Immunological Methods*; 142:257–265
15. Altman FP (1976). Tetrazolium salts and formazans. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*; 9:1–56
16. Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG (1991). Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Communications*; 3:207–12
17. Atmaca H, Bozkurt E, Kısım A, and Uslu R (2016). Comparative analysis of XTT assay and xCELLigence system by measuring cytotoxicity of resveratrol in human cancer cell lines. *Turkish Journal of Biochemistry*; 41(6): 413–421