

Étude de la toxicité du conservateur (19 points)

Afin d'étudier la toxicité du conservateur, mélange de parahydroxybenzoate de méthyle et de parahydroxybenzoate de propyle, on effectue un test *in vitro* de cytotoxicité. On choisit d'utiliser le **kit Cell Titer 96 Aqueous** commercialisé par PROMEGA (cf. **document n°6**).

3-1) Analyse du protocole expérimental (12 points)

3-1-1) Donner le principe de lecture à la base de cet essai.

3-1-2) Bâtir un organigramme simplifié des manipulations à réaliser.

3-1-3) Quel témoin doit-on réaliser pour valider le test ?

3-1-4) Les cellules MS sont mises en culture sur le milieu DMEM + 10 % FCS. A partir du **document 7**, préciser les rôles des différents éléments **ajoutés** au milieu de culture.

3-1-5) Pourquoi doit-on laver le tapis cellulaire (étape 3 **document n°6**) avant d'envisager sa trypsination ?

3-2) Détermination de l'effet cytotoxique du conservateur (7 points)

Le tableau du **document n°8** présente les essais réalisés pour différentes quantités de conservateur. On détermine l'effet cytotoxique en calculant le pourcentage de viabilité V du test par la relation suivante :

pour chaque quantité de conservateur,

$$V = \frac{\text{Nombre de cellules vivantes après incubation avec le conservateur}}{\text{Nombre de cellules vivantes après incubation sans conservateur}} \times 100$$

3-2-1) Justifier la relation, pour chaque quantité de conservateur :

$$V = \frac{A(490 \text{ nm}) \text{ cupules avec conservateur}}{A(490 \text{ nm}) \text{ cupules sans conservateur}} \times 100$$

avec A = absorbance.

3-2-2) Tracer, sur papier millimétré, l'évolution de V en fonction de la quantité de conservateur par puits.

3-2-3) En déduire l'effet cytotoxique du conservateur dans ce médicament sachant qu'il est ajouté à raison de 1000 mg par litre de solution buvable.

3-2-4) Les tests *in vitro* réalisés suffisent-ils à l'homologation du conservateur utilisé ?

DOCUMENT N°6 :

CELL TITER 96 AQUEOUS CELL PROLIFERATION ASSAY (PROMEGA)

1) Description :

The Cell Titer 96 Aqueous Cell proliferation assay is a colorimetric method for determining the number of viable cells in proliferation or chemosensitivity assay.

The Cell Titer 96 Aqueous assay is composed of solutions of a novel tetrazolium compound :

(3 (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -5- (3-carboxymethoxyphenyl) 2- (4-sulfophenyl) -2H-tetrazolium, inner salt , **MTS**) and an electron coupling reagent (phenazine methosulfate ; **PMS**).

MTS is bioreduced by cells into a formazan that is soluble in tissue culture medium. The absorbance of the formazan at 490 nm can be measured directly from 96 well assay plates without additional processing. The conversion of **MTS** into the aqueous soluble formazan is accomplished by dehydrogenase enzymes found in metabolically active cells. The quantity of formazan product as measured by the amount of 490 nm absorbance is directly proportional to the number of living cells in culture.

2) Products :

One 96 wells assay plate,
PBS,

20 mL MTS solution (caution classified as irritants),

1 mL PMS solution (caution classified as a carcinogen),

Methyl hydroxybenzoate, propyl hydroxybenzoate solution 100 mg/mL

DMEM + 10 % FCS (foetal calf serum) medium,

Trypan blue 0,5 %,

Trypsin 0,25 % + EDTA solution,

and ELISA plate reader at 490 nm.

3) Protocol :

1) Maintain stock cultures of epithelial monolayer MS cells in DMEM medium containing 10 % of Foetal Calf Serum (FCS) in a 25 cm² flask.

2) Add 50 µL per well of hydroxybenzoate diluted in DMEM + 10 % FCS medium as described :

Quantity of hydroxybenzoate per well (µg)	Well
0	A1 → A4
20	B1 → B4
40	C1 → C4
60	D1 → D4
80	E1 → E4
100	F1 → F4
150	G1 → G4

3) Wash the MS cells with PBS. Add 1,5 mL Trypsin 0,25 % + EDTA solution. Incubated 1 min at 37°C to resuspend cells. Stop the enzyme action by adding 5 mL DMEM + 10 % FCS medium.

DOCUMENT N°6 : (suite)

- 4) Determine cells number and trypan blue viability and resuspend the cells to a final concentration of $1 \cdot 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ in DMEM + 10 % FCS medium.
- 5) Dispense 50 μL of the cell suspension (5000 cells) into all wells of the plate prepared in step 2. The total volume in each well should now be 100 μL .
- 6) Incubate the plate for 48-72 hours at 37°C in humidified 5 % CO_2 atmosphere.
- 7) Add 20 μL per well of freshly prepared combined MTS/PMS solution (add 100 μL PMS solution to 2,0 mL MTS solution : gently swirl the tube to ensure complete mixing of combined MTS/PMS solution).
- 8) Incubate the plate for 1-4 hours at 37°C in a humidified 5 % CO_2 atmosphere.
- 9) Record the absorbance at 490 nm using an ELISA plate reader.

Ces dernières années, des travaux ont été réalisés pour produire des anticorps spécifiques en vue de développer des techniques immunologiques. Les plus répandues sont les dosages immunoenzymatiques ainsi que, plus récemment, la purification sur colonne d'immunoaffinité (I.A.C.) suivie d'un dosage par chromatographie liquide haute performance (H.P.L.C.). On se propose d'étudier ces deux méthodes.

2 - Méthode immunoenzymatique : Kit Transia (20 points)

Le dosage envisagé est celui de l'aflatoxine B1.

- 2.1. A partir du document 3, expliquer les différentes étapes en précisant le rôle des réactifs utilisés.
- 2.2. Justifier la réalisation du contrôle témoin négatif.
- 2.3. Indiquer le sens de variation de l'absorbance (A) mesurée en fonction de la concentration en aflatoxine de l'échantillon. Justifier la réponse.
- 2.4. Résultats :

- 2.4.1. Courbe d'étalonnage :
Pour chacun des étalons, on détermine le pourcentage d'inhibition (% I) :

$$\% I = \frac{A (\text{témoin négatif}) - A (\text{étalon})}{A (\text{témoin négatif})}$$

Concentration des étalons $\mu\text{g}/\text{kg}$	0	0,5	1	2	5
Absorbance puits impairs	0,80	0,66	0,56	0,46	0,32
Absorbance puits pairs	0,80	0,65	0,55	0,44	0,32

- 2.4.1.1. Justifier le terme inhibition.

- 2.4.1.2. Les absorbances mesurées sont regroupées dans le tableau suivant :

Construire sur papier millimétré la courbe d'étalonnage :
pourcentage d'inhibition = f (concentration en aflatoxine B1)

Echelles : $0,25 \mu\text{g}/\text{kg} = 1 \text{ cm.}$
 $5 \% = 1 \text{ cm.}$

- 2.4.2. Extrait à doser :

L'absorbance moyenne lue pour l'extrait testé est $A = 0,60$. En déduire la teneur en aflatoxine B1 de cet extrait.

- 2.5. Pourquoi n'est-il pas envisageable d'utiliser, pour le dosage d'aflatoxines, une méthode immunoenzymatique faisant appel à une plaque de microtitration sensibilisée par un anticorps ?

Donnée : document 1.

Dosage de l'aflatoxine B 1. Méthode opératoire.

Réactifs :

- Solutions étalons d'aflatoxine B1 prêtes à l'emploi :
 - solution à 0,5 µg/kg
 - solution à 1 µg/kg
 - solution à 2 µg/kg
 - solution à 5 µg/kg
- Témoin négatif
- Conjugué : anticorps monoclonal couplé à la peroxydase : prêt à l'emploi
- Tampon de lavage
- Substrat
- Chromogène
- Solution d'acide sulfurique
- Plaque de microtitration sensibilisée par l'aflatoxine B1 : 8 barettes de 12 puits

Mode opératoire :

Afin de réaliser le test dans les conditions optimales, il faut ramener les réactifs à température ambiante.

1 : Distribution des solutions étalons de l'extrait à doser

Contrôle témoin négatif :

- déposer 50 µl de témoin négatif dans les puits A1, A2.

Étalons :

- déposer :
 - 50 µl de la solution étalon à 0,5 µg/kg dans les puits A3, A4,
 - 50 µl de la solution étalon à 1 µg/kg dans les puits A5, A6,
 - 50 µl de la solution étalon à 2 µg/kg dans les puits A7, A8,
 - 50 µl de la solution étalon à 5 µg/kg dans les puits A9, A10.

Extrait :

- déposer 50 µl de l'extrait à doser dans les puits A11, A12.

2 : Distribution du conjugué :

Déposer dans chaque puits 50 µl de la solution de conjugué.

Laisser incuber 20 minutes à température ambiante.

3 : Lavage :

Laver chaque puits 4 fois avec 300 µl de solution de lavage.

Retourner la plaque et la secouer sur un papier filtre.

4 : Révélation :

Distribuer : 50 µl de substrat puis
50 µl de chromogène dans chaque puits.

Laisser incuber 20 minutes à température ambiante, puis ajouter 50 µl de solution d'acide sulfurique. Homogénéiser en tapotant légèrement la microplaque.

5 : Lecture :

Lire l'absorbance obtenue dans chaque puits à la longueur d'onde 450 nm à l'aide d'un lecteur de plaque de microtitration.