Ce document a été mis en ligne par l'organisme FormaV©

Toute reproduction, représentation ou diffusion, même partielle, sans autorisation préalable, est strictement interdite.

Pour en savoir plus sur nos formations disponibles, veuillez visiter :
www.formav.co/explorer

ÉPREUVE E3. UNITÉ U33

Biologie cellulaire et moléculaire et technologies d'analyse

Calculatrice autorisée

L'ATRAZINE

L'atrazine ($C_8H_{14}ClN_5$) est un herbicide utilisé pour détruire les mauvaises herbes dans les champs et toute la végétation dans les secteurs non cultivés. L'atrazine contamine le milieu aquatique par l'intermédiaire des eaux de ruissellement. C'est pourquoi il est nécessaire :

- d'évaluer les éventuels effets toxiques de cet herbicide sur l'Homme et la faune,
- de mesurer régulièrement son taux dans les eaux de surface et souterraines.

1 - Étude de l'action cytotoxique de l'atrazine. (22 points)

Afin d'étudier la cytotoxicité de l'atrazine, on se propose de mesurer les effets de l'exposition de faibles concentrations de l'herbicide sur la prolifération en culture *in vitro* d'une lignée cellulaire de cellules adhérentes (cellules d'ovaire d'hamster chinois : CHO K1) par le test au MTT présenté dans le **document 1**.

1.1 - Donner le principe du test MTT.

La lignée cellulaire utilisée est une lignée continue. Parmi les lignées continues, on distingue les lignées tumorale et transformée.

1.2 - Définir le terme « lignée cellulaire ». Présenter les propriétés des cellules d'une lignée continue.

Le protocole d'étude de la cytotoxicité de l'atrazine est présenté dans le **document 2**.

1.3 - A partir des données du **document 2** :

- déterminer la dilution de la suspension cellulaire « S » en justifiant les calculs ;
- donner la composition du témoin négatif à réaliser et préciser son rôle.

1.4 - Quelle est l'action de la trypsine ? Pourquoi cette solution de trypsine contient-elle de l'EDTA ? Justifier vos réponses.

Les résultats du test figurent dans le **document 3**.

1.5 - Interpréter ces résultats.

1.6 - Présenter les devenirs de l'atrazine dans l'organisme humain sachant que cet herbicide est un xénobiotique soluble en milieu aqueux.

2 - Étude de l'action de l'atrazine sur le cycle cellulaire. (9 points)

Un certain nombre de données permettent d'envisager que l'atrazine a une action sur le cycle cellulaire. Le cycle cellulaire est composé de quatre phases : G1, S, G2 et M. Le fonctionnement des cellules en prolifération est basé sur l'existence de protéines appelées cyclines.

2.1 - Préciser le mécanisme d'action des cyclines dans la régulation du cycle cellulaire.

Il est possible que l'atrazine agisse sur le complexe cdk1/cycline B appelé MPF. Le MPF provoque, entre autres, la condensation de la chromatine et la réorganisation des protéines du cytosquelette.

2.2 - À partir de ces données, déterminer la phase du cycle cellulaire initiée par le MPF.

Les expériences de mesure d'apoptose de cellules exposées à de faibles quantités d'atrazine ne montrent ni de fragmentation d'ADN ni d'augmentation de l'activité des caspases.

2.3 - Expliquer le mécanisme de l'apoptose. Comment différencie-t-on les phénomènes d'apoptose et de nécrose ?

3 - Étude de l'action de l'atrazine sur le métabolisme des stéroïdes. (13 points)

Des études menées chez les animaux ont montré que l'administration d'atrazine entraînait des déséquilibres hormonaux en exerçant ses effets sur le métabolisme des œstrogènes. Les oestrogènes sont des hormones stéroïdes. Les récepteurs des œstrogènes font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires.

3.1 - Définir une hormone.

3.2 - Expliquer le mode d'action général d'une hormone stéroïde sur une cellule cible.

Une enzyme clé dans la synthèse des œstrogènes est la cytochrome P450 aromatase (CYP19). L'activité de l'aromatase est influencée par l'atrazine chez certaines cellules cultivées *in vitro*. Le **document 4** représente les résultats obtenus pour la lignée cellulaire surrénalienne humaine H295R.

3.3 - Commenter les résultats.

Des études récentes montrent que l'atrazine module *in vitro* la transcription du gène de l'aromatase.

3.4 - D'après cette donnée et l'analyse du **document 4**, préciser si cette modulation correspond à une activation ou à une inhibition de la transcription.

3.5 - Proposer un mécanisme possible permettant d'expliquer l'influence de l'atrazine sur la transcription du gène de l'aromatase.

4 - Dosage de l'atrazine dans une eau potable. (16 points)

On se propose de doser l'atrazine dans un échantillon d'eau potable.

La fiche technique du dosage de l'atrazine est reproduite dans le **document 5**.

4.1 - Expliquer l'intérêt des quatre étapes de ce test à l'aide de schémas légendés.

4.2 - En déduire le nom de la méthode utilisée.

4.3 - Préciser la composition et les rôles du témoin conjugué.

Le **document 6** fournit les résultats obtenus pour la gamme d'étalonnage et l'essai testé en double. Les deux essais ont été réalisés sur l'échantillon d'eau potable non dilué.

4.4 - Déterminer le cœfficient de corrélation et l'équation de la droite de régression linéaire

$$\% B / B_0 = f(\log([\text{atrazine}] \text{ en } \mu g.L^{-1}))$$

En déduire la concentration en atrazine dans l'échantillon d'eau.

4.5 - Interpréter le résultat obtenu pour cette eau potable sachant que la concentration maximale acceptable pour l'atrazine dans l'eau potable est de 0,1 $\mu g.L^{-1}$.

DOCUMENT 1 : ÉVALUATION DE LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE. MÉTHODE AU MTT.

Présentation :

Méthode	Colorimétrie en microplaques.
Utilisation	Évaluation de la viabilité cellulaire, de la prolifération et de la cytotoxicité.
Échantillons	Cellules en culture adhérentes ou en suspension.
Principe	Incubation des cellules avec MTT (bromure de (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltetrazolium) suivie d'une solubilisation de produit coloré et de sa mesure spectrophotométrique.
Durée	5 à 28 h.

Contenu du coffret : MTT et solution de solubilisation.

Principe et technique

Le coffret permet de mesurer l'activité métabolique des cellules viables. Le test basé sur l'utilisation de substances non radioactives, peut être entièrement réalisé sur microplaques.

Le principe du test repose sur la réduction du sel de tétrazolium MTT par les cellules viables. La réaction produit un sel de formazan bleu insoluble dans l'eau qui doit être solubilisé avant mesure.

La technique nécessite de cultiver les cellules en microplaques (96 puits) puis de les incuber en présence d'une solution de MTT pendant environ 4 heures.

Pendant la période d'incubation, les cellules viables transforment le MTT en un colorant insoluble : le formazan. Le formazan doit être solubilisé dans la microplaque avant d'être mesuré à l'aide d'un lecteur de microplaques.

L'absorbance mesurée est directement proportionnelle au nombre de cellules.

D'après Roche Applied science.

DOCUMENT 2 : PROTOCOLE DE CYTOTOXICITÉ

- Éliminer par retournement le milieu de culture usagé.

- Rincer la surface du tapis cellulaire avec 5 mL de PBS. Éliminer par retournement.

- Inonder la surface du tapis cellulaire avec 1 mL de trypsine-EDTA. Incuber à 37°C pendant 2 minutes environ.

- Arrêter l'action de la trypsine-EDTA avec 3 mL de milieu DMEM complet. On obtient la suspension « S ».

- Une numération en hématimètre permet de déterminer la concentration cellulaire de la suspension « S » : $1,5.10^6$ cellules.mL^{-1}.

- Prévoir la dilution de la suspension « S » à réaliser sachant qu'il faut ensemencer chaque puits avec 50 µL de suspension diluée, que chaque puits doit contenir 45 000 cellules par cm^2 et qu'un puits a une surface de 0,33 cm^2.

- Ensemencer chacun des 10 puits de la microplaque 96 puits à fonds plats avec 50 µL de suspension « S » diluée.

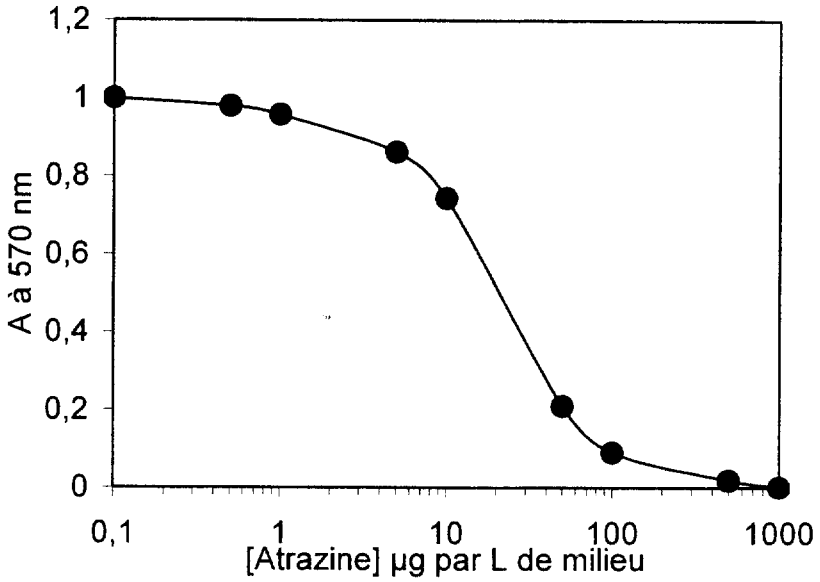
- Préparer une gamme de 9 solutions d'atrazine en milieu DMEM complet à partir de la solution mère à 2 $mg.L^{-1}$. Ajouter 50 µL de chaque solution étalon d'atrazine (0,2 à 2000 $\mu g.L^{-1}$) dans les puits 2 à 10.

- Réaliser un témoin négatif dans le puits n°1.

- Incuber 72 h à 37°C en atmosphère saturée en eau et à 5 % de CO_2.

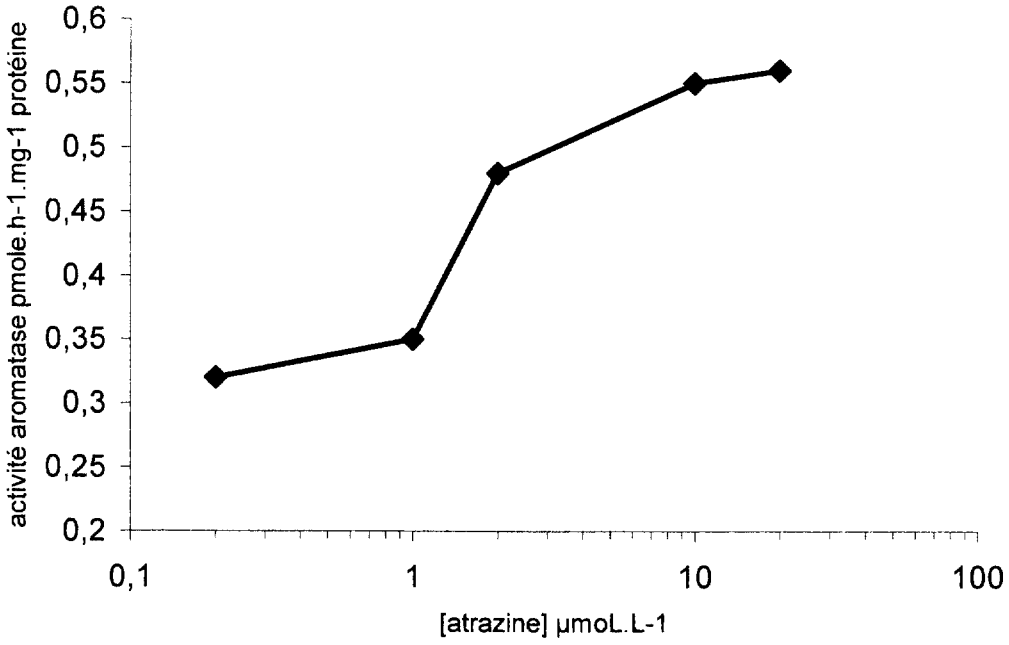
- Évaluer le taux de prolifération cellulaire dans chacun des 10 puits par la méthode au MTT :
  - ajouter 50 µL de solution de MTT dans chacun des 10 puits ;
  - incuber 4 h à 37°C ;
  - ajouter 50 µL de tampon de solubilisation ;
  - laisser reposer 18 h à température ambiante (dissolution des cristaux) ;
  - lire l'absorbance au lecteur de microplaque à 570 nm.

DOCUMENT 3 : ÉTUDE DE L'ACTION CYTOTOXIQUE DE L'ATRAZINE



($A_{\text{du témoin négatif à 570 nm}} = 1,005$)

DOCUMENT 4 : ÉTUDE DE L'INFLUENCE DE L'ATRAZINE SUR L'EXPRESSION DE L'AROMATASE



D'après J. Thomas Sanderson et coll. (2000). 2-chloro-s-triazine herbicides induce aromatase (CYP19) activity in H295R human adrenocortical carcinoma cells : a novel mechanism for estrogenicity. 54:121-127

DOCUMENT 5 : PROTOCOLE DU DOSAGE DE L'ATRAZINE

1. Microtiter plates are coated with 100 µL/well of sheep anti-atrazine antibody polyclonal diluted in coating buffer (40 mmol/L sodium carbonate, pH 9.6). When stored at 4°C, these plates are stable for at least two weeks.

2. Prior to use, plates are washed five times with washing solution (7 mmol/L phosphate buffered saline, pH 7.6, containing 0.85 g/L sodium chloride and 0.05% v/v Tween 20). Then the plates are incubated for 25 min with 200 µL/well of 3% w/v bovine serum albumin supplemented phosphate-buffered saline (PBS, 80 mmol/L sodium phosphate, pH 7.6).

3. After washing the plates with washing solution, 100 µL of standard or sample (diluted in PBS) are added to the wells. 50 µL of the tracer (atrazine-HRP conjugate) are added to each well and incubated for 10 min. (HRP is the enzyme : horseradish peroxidase).

4. The plates are washed five times with washing solution, and 100 µL of ready-to-use enzyme substrate solution (TMB : 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) are added. The enzyme reaction is stopped by adding 100 µL of 5% v/v H_2SO_4, and the absorbance at 450 nm is measured on a microtiter plate reader.

D'après : Winklmair, M. *et coll.* (1997). Development of a highly sensitive enzyme-immunoassay for the determination of triazine herbicides. *Frenesius J Anal Chem* 358:614-622

DOCUMENT 6 : RÉSULTATS DU DOSAGE DE L'ATRAZINE DANS UNE EAU POTABLE

	Et 1	Et 2	Et 3	Et 4	Et 5	Et 6	Essai 1	Essai 2
[Atrazine] $\mu g.L^{-1}$	100	10	1	0,1	0,01	0		
$A_{450\ nm}$	0,090	0,222	0,345	0,448	0,572	0,610	0,370	0,369
log ([atrazine] en $\mu g.L^{-1}$)	2	1	0	- 1	- 2			
% B / B_0	0	25,4	49,0	68,8	92,7	100	53,8	53,7

Les absorbances des solutions des puits étalons (Et 1 à Et 6) et essais 1 et 2 ont été mesurées contre le témoin conjugué.

Les deux essais 1 et 2 ont été réalisés sur l'échantillon d'eau non dilué.

Les valeurs obtenues sont normalisées sur une échelle de 0 à 100 par la conversion des absorbances en % B / B_0 :

$$\% B / B_0 = 100 \times (A - A_{Et\,1}) / (A_{Et\,6} - A_{Et\,1})$$

Avec $A_{Et\,1}$: absorbance de la solution du puits Et 1 ;
$A_{Et\,6}$: absorbance de la solution du puits Et 6.

Copyright © 2026 FormaV. Tous droits réservés.

Ce document a été élaboré par FormaV© avec le plus grand soin afin d'accompagner chaque apprenant vers la réussite de ses examens. Son contenu (textes, graphiques, méthodologies, tableaux, exercices, concepts, mises en forme) constitue une œuvre protégée par le droit d'auteur.

Toute copie, partage, reproduction, diffusion ou mise à disposition, même partielle, gratuite ou payante, est strictement interdite sans accord préalable et écrit de FormaV©, conformément aux articles L.111-1 et suivants du Code de la propriété intellectuelle. Dans une logique anti-plagiat, FormaV© se réserve le droit de vérifier toute utilisation illicite, y compris sur les plateformes en ligne ou sites tiers.

En utilisant ce document, vous vous engagez à respecter ces règles et à préserver l'intégrité du travail fourni. La consultation de ce document est strictement personnelle.

Merci de respecter le travail accompli afin de permettre la création continue de ressources pédagogiques fiables et accessibles.

Copyright © 2026 FormaV. Tous droits réservés.

Ce document a été élaboré par FormaV© avec le plus grand soin afin d'accompagner chaque apprenant vers la réussite de ses examens. Son contenu (textes, graphiques, méthodologies, tableaux, exercices, concepts, mises en forme) constitue une œuvre protégée par le droit d'auteur.

Toute copie, partage, reproduction, diffusion ou mise à disposition, même partielle, gratuite ou payante, est strictement interdite sans accord préalable et écrit de FormaV©, conformément aux articles L.111-1 et suivants du Code de la propriété intellectuelle. Dans une logique anti-plagiat, FormaV© se réserve le droit de vérifier toute utilisation illicite, y compris sur les plateformes en ligne ou sites tiers.

En utilisant ce document, vous vous engagez à respecter ces règles et à préserver l'intégrité du travail fourni. La consultation de ce document est strictement personnelle.

Merci de respecter le travail accompli afin de permettre la création continue de ressources pédagogiques fiables et accessibles.