



SARL TOXEM
UFR ST
25, rue Philippe Lebon
BP540
76058 Le Havre cedex
Tél : 06 19 35 73 11
jerome.couteau@toxem.com

Étude HBN-1

DEMANDEUR:

HBN

Échantillon: **ADN Téloméactives**

Adresse du demandeur: **HBN**
1 rue des Pénitents Blancs
31000 Toulouse
FRANCE

Étude réalisée par: **TOXEM**
UFR ST
25, rue Philippe Lebon
BP540
Le Havre 76058 cedex
FRANCE

Date de réception des Échantillons: 6 octobre 2014

Début d'expérimentation: 6 octobre 2014

Fin d'expérimentation: 13 octobre 2014

TEST D'AMES FLUCTUATION

INTRODUCTION

Le but de cette expérimentation est de déterminer le potentiel mutagène de l'échantillon **ADN Téloméactives**. Ce potentiel mutagène est déterminé à l'aide du **test d'Ames fluctuation** (test d'Ames en milieu liquide). Le test d'Ames fluctuation, au même titre que le test d'Ames standard, s'est révélé être un excellent test pour déterminer le potentiel cancérigène d'une substance chimique en se basant sur ses propriétés mutagènes.

DESCRIPTION DU TEST D'AMES FLUCTUATION

Environ 10^7 cellules bactériennes *His⁻* de la souche **TA98** (souche utilisée pour la détection de mutations « frameshift ») et **TAMIX** (Mix de souches spécifiquement développées pour la détection des mutations par substitution de base) de *Salmonella typhimurium* sont exposées pendant 90 minutes à chacune des 6 concentrations de l'échantillon **ADN Téloméactives**, dont on souhaite évaluer la mutagénicité. Cette exposition est réalisée avec et sans activation métabolique mammalienne. Les cellules sont ensuite mises en culture dans un milieu indicateur de pH sans histidine. Cette culture est alors aliquotée dans 48 puits d'une plaque de 384 puits (chaque concentration étant réalisée en triplicat). Après 48 heures de culture, les cellules ayant retrouvé leur prototrophie histidine (Mutants revertants *His⁺*) se sont multipliées diminuant ainsi le pH du milieu de culture qui change alors de couleur.

Pour chacune des concentrations testées de l'échantillon **ADN Téloméactives**, le nombre de puits contenant des bactéries « révertantes » est alors dénombré puis comparé au témoin négatif après confirmation que les témoins positifs ont induit les réactions appropriées chez les souches correspondantes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.	Échantillon	
	Nom	• <i>ADN Téloméreactives</i>
	Description	• Cachet marron
	Concentrations testées (mg/ml)	0 / 0,01 / 0,1 / 1 / 5 / 10 / 20 (3 réplicats par quantité testée)

2.	Substances témoins		
	Témoin négatif TA98 et TAMIX	DMSO	
	Témoins positifs sans Bioactivation	TA98	2-NF (N° CAS : 607-57-8)
		TAMIX	4NQO (N° CAS : 56-57-5)
	Témoins positifs avec Bioactivation	TA98	2-AA (N° CAS : 613-13-8)
TAMIX		2-AA (N° CAS : 613-13-8)	

3.	Mélange d'activation S9	
	Mix S9 à 30% AROCLOR induced Rat liver S9, lot N°2897 (TRINOVA, Biochem M11-101.5)	

RÉFÉRENCES

- D.M. Maron and B.N. Ames, Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, Mutation Research, **113**, 173-215, 1983
- P. Gee, C.H. Sommers, A.S. Melick, X.M. Gidrol, M.D. Todd, R.B. Burris, M.E. Nelson, R.C., Klemm & E. Zeiger, Comparison of responses of a base-specific Salmonella tester strains with the traditional strains for identifying mutagens : the results of a validation study, Mutation Research, **412**, 115-130, 1998.
- W.W. Piegorsch, S.J. Simmons, B.H. Margolin, E. Zeiger, X.M. Gidrol & P. Gee, Statistical modeling and analyses of a base-specific Salmonella mutagenicity assay, Mutation Research, **467**, 11-19, 2000.

RÉSULTATS

Le nombre de puits « révertants » obtenu pour chaque concentration testée de l'échantillon **ADN Téloméreactives** est collecté dans les tableaux page 6.

Les tableaux 1 et 2 page 7 représentent le pourcentage de viabilité des organismes d'essai en fonction de la concentration de l'échantillon **ADN Téloméreactives**.

CONCLUSION

Le test d'Ames fluctuation, selon le mode opératoire précédemment décrit, ne révèle aucune mutagénicité de l'échantillon **ADN Téloméreactives**, avec et sans activation métabolique sur les souches TA98 et TAMIX et cela quelle que soit la concentration de la gamme testée.

Echantillon ADN Téloméractives

Souche TA98 Sans bioactivation

Quantité de produit	Plaque 1	Plaque 2	Plaque 3	Moyenne	Ecart type
0 mg/ml	1	0	0	0,33	0,6
0,01 mg/ml	1	3	1	1,67	1,2
0,1 mg/ml	3	0	2	1,67	1,5
1 mg/ml	3	1	0	1,33	1,5
5 mg/ml	0	2	3	1,67	1,5
10 mg/ml	2	1	4	2,33	1,5
20 mg/ml	1	1	0	0,67	0,6

Souche TA98 Avec bioactivation

Quantité de produit	Plaque 1	Plaque 2	Plaque 3	Moyenne	Ecart type
0 mg/ml	0	1	0	0,33	0,6
0,01 mg/ml	4	1	1	2,00	1,7
0,1 mg/ml	2	1	2	1,67	0,6
1 mg/ml	4	1	1	2,00	1,7
5 mg/ml	2	4	2	2,67	1,2
10 mg/ml	3	5	2	3,33	1,5
20 mg/ml	4	1	2	2,33	1,5

Souche TAMIX Sans bioactivation

Quantité de produit	Plaque 1	Plaque 2	Plaque 3	Moyenne	Ecart type
0 mg/ml	3	2	1	2,00	1,0
0,01 mg/ml	2	5	2	3,00	1,7
0,1 mg/ml	2	1	3	2,00	1,0
1 mg/ml	5	3	3	3,67	1,2
5 mg/ml	4	3	5	4,00	1,0
10 mg/ml	4	7	7	6,00	1,7
20 mg/ml	3	7	1	3,67	3,1

Souche TAMIX Avec bioactivation

Quantité de produit	Plaque 1	Plaque 2	Plaque 3	Moyenne	Ecart type
0 mg/ml	0	3	2	1,67	1,5
0,01 mg/ml	1	2	3	2,00	1,0
0,1 mg/ml	1	4	2	2,33	1,5
1 mg/ml	2	1	7	3,33	3,2
5 mg/ml	4	0	8	4,00	4,0
10 mg/ml	3	4	4	3,67	0,6
20 mg/ml	2	3	3	2,67	0,6

Tableau 1: Pourcentage de viabilité de la souche TA98 en fonction de la concentration de l'échantillon **ADN Téloméreactives** avec et sans bioactivation. Moyenne (M) et écart type (ET) des résultats obtenus (triplicat) pour l'échantillon testés aux différentes concentrations 5 heures après exposition. Les valeurs en rouge sont statistiquement différentes du contrôle négatif.

% de viabilité	TA98 sans S9		TA98 avec S9	
	M	ET	M	ET
0,01 mg/ml	93,6	5,35	92,0	9,38
0,1 mg/ml	93,9	5,98	102,1	3,29
1 mg/ml	82,2	14,61	108,9	5,04
5 mg/ml	93,5	15,46	105,9	7,23
10 mg/ml	86,8	6,40	104,9	7,08
20 mg/ml	-4,5	15,24	94,6	3,28

Tableau 2: Pourcentage de viabilité de la souche TAMIX en fonction de la concentration de l'échantillon **ADN Téloméreactives** avec et sans bioactivation. Moyenne (M) et écart type (ET) des résultats obtenus (triplicat) pour l'échantillon testé aux différentes concentrations 5 heures après exposition. Les valeurs en rouge sont statistiquement différentes du contrôle négatif.

% de viabilité	TAMIX sans S9		TAMIX avec S9	
	M	ET	M	ET
0,01 mg/ml	99,1	13,10	95,8	2,70
0,1 mg/ml	109,2	11,45	107,7	5,83
1 mg/ml	119,2	0,00	109,0	13,12
5 mg/ml	68,5	7,12	96,6	12,99
10 mg/ml	36,5	5,62	69,7	0,56
20 mg/ml	0,7	11,14	64,7	1,27