Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

L'accumulation de la Mycrocystine-LR dans les hépatocytes isolés du poisson doré, Carassius auratus, L.

Lambert, John

Award date:
2004

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Download date: 02. May. 2026

FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

L'accumulation de la Microcystine-LR dans les hépatocytes isolés du poisson doré, *Carassius auratus,L.*

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques

John Lambert

Août 2004

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18- Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - http://www.fundp.ac.be/fundp.html

L'accumulation de le Microcystine-LR dans les hépatocytes isolés du poisson doré, *Carassius auratus, L.*

Lambert John

Résumé

La microcystine-LR est une hépatotoxine libérée par les cyanobactéries qui cible principalement le foie et les hépatocytes. La microcystine-LR inhibe les protéines phosphatases intracellulaires, induisant une hyperphosphorylation des protéines et notamment l'apoptose.

Nous avons mis en évidence une incorporation de la microcystine-LR dans une suspension hépatocytaire « viable » isolée à partir du poisson doré, *Carassius auratus,L.*
L'inhibition de l'activité de la Protéine Phosphatase (PP-1) confirme cette incorporation intra-hépatocytaire.
Le taurocholate à une concentration de 50µM ne modifie pas l'accumulation intra hépatocytaire de la microcystine-LR et l'activité de la Protéine Phosphatase 1 (PP-1).
La chromatographie en phase gazeuse, dans nos conditions expérimentales n'est pas une méthode suffisamment sensible pour mettre en évidence la présence intra-hépatocytaire de la microcystine-LR et, éventuellement de ses métabolites.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Août 2004

Promoteur: P. Devos

Co-Promoteur : G. Traush

Remerciements

Voilà la seule partie ou je puisse dire ce que je veux. Quelques remerciements importants s'imposent.

Je remercies Monsieur Micha pour m'avoir accueilli dans le labo.

Un grand merci au Père Devos, mon promoteur, pour m'avoir soutenu et poussé au moment où il le fallait.

Un merci particulier à Gérard Traush, mon mentor, pour avoir été mon guide tout au long de ce (long) mémoire. Merci pour toute ses bonne idées, ses indications, ses moments de bonne humeur (lors de ses retours de vacances).

Merci beaucoup à Christelle pour tout ses coup de mains, son optimisme, sa capacité à sortir les autres de pétrin.

Un merci général aux techniciennes, techniciens, chercheurs avec qui j'ai passe ces moments.

Un merci personnel à tout mes proches qui m'ont permis de tenir la coup et d'aller jusqu'au bout.

Pour terminer j'émettrai une pensée pour tout les poissons qui sont morts pour la science et pour me permettre de terminer ce mémoire.
Merci a vous les petit Némos.

Liste d'abréviations

°C	Degré Celsius
µ	Micro
µBeq	MicroBequerell
µg	Microgramme
µl	Microlitre
µM	Micromolaire
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire.
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
BSA	Sérum d'albumine bovine
DL_{50}	Dose létale pour laquelle il y a 50% de mortalité
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétra acétique
EGTA	Acide Tétraacétique éthylène glycol
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbant array
FMole	Fento-Mole
g	Gramme
GSH	Gluthation SH
GST	Glutathion S-transférase
HPLC	Chromatographie liquide en phase gazeuse
kda	Kilodaltons
MC-LR	Microcystine-LR
MC-RR	Microcystine-RR
MC-YR	Microcystine-YR
mEH	Microsom hydroxylase epoxyde
MeOH	Méthanol
mg	Milligramme
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
mOsm	MilliOsmole
MRPs	Multi-Drug-Resistance associated proteins
n	Nano
$NADP^+$	Nicotinamide Adenosine Di-Phosphate
NADPH	Nicotinamide Adenosine Di-Phosphate Hydrogène
nm	Nanomètre
NOAEL	No-adverse-effect-level
NTCP	Principal système de transport dépendant du sodium
OATP	Protéines transportrices d'anions organiques
pg	Picogramme
p-NP	para-nitrophénol
p-NPP	para-nitrophényphosphate
PP-1	Protéine Phosphatase 1
PP2A	Protéine Phosphatase 2 A
RH	Réactif lié à H
rpm	Rotation par minute
SCPs	Stérol Carrier Protéin
TCA	Acide Trichloroacétique
TFA	Acide Trifluoroacétique
TRIS	Tris Hydroxy Méthyl Aminométhane
xg	x fois la gravité

Table des matières.

1. Introduction

1.1. Les Microcystines 1
1.1.1. Origines et composition chimique 1
1.1.2. Les effets biologiques des Microcystines 2
1.1.2.1. l'exposition chronique 2
1.1.2.2. l'exposition à court terme 3
1.1.3. Les facteurs modifiant la production et la concentration de Microcystine-LR dans l'environnement 4
1.1.3.1. Facteurs physico-chimiques modifiant la croissance des cyanobactéries ... 4
1.1.3.2. Dégradation de la Microcystine-LR 4
1.1.4. Les effets de la Microcystine-LR sur la santé humaine 5

1.2. La Microcystine-LR dans les milieux aquatiques 5
1.2.1. Les cyanobactéries 5
1.2.1.1. Description des cyanobactéries 5
1.2.2. Les effets de la microcystine-LR chez les mammifères 7
1.2.3. Les effets de la microcystine-LR chez les poissons 7

1.3.Toxicologie des microcystines 9
1.3.2. Méthodes d'analyse 9
1.3.3. Stabilité de la MC-LR 10
1.3.4. Mécanismes d'action :
1.3.4.1. Transport 10
1.3.4.2. Inhibition des phosphatases 10
1.3.4.3. Autres effets biochimiques 11
1.3.5. Protection contre la toxicité des microcystines 12

1.4. Le foie comme organe de détoxification 13
1.4.1. Description du foie 13
1.4.2. Les systèmes de détoxification chez l'hépatocyte 13
1.4.2.1 Etape d'hydroxylation 13
1.4.2.2. Etape de conjugaison 14
1.4.3. Description du foie chez le poisson 15

1.5. Transport intra-cellulaire des acides biliaires 15
1.5.1. Synthèse des acides biliaires 15
1.5.2. Sécrétion des acides biliaires 16
1.5.3. Prise cellulaire des acides biliaires 17
1.5.4. Transport des xénobiotiques et des sels biliaires dans le foie 18

2. Matériel et méthodes 19

2.1. Matériel biologique 19

2.2. Méthodes 19

2.2.1 Préparation d'une suspension hépatocytaire 19
2.2.1.1. Solution 19
2.2.1.2. Principe 20
2.2.1.3. Mode opératoire 20
2.2.2. Comptage cellulaire et test de viabilité 20
2.2.1.1. Solution 20
2.2.1.2. Mode opératoire 20
2.2.3. Dosage de la Microcystine-LR 21
2.2.3.1. Méthode dite de l'inhibition de la PP-1 21
2.2.3.1.1. Principe 21
2.2.3.1.2. Solution et préparation des échantillons 22
2.2.3.1.3. Mode opératoire 23
2.2.3.2. Méthode dite par HPLC (Chromatographie en phase gazeuse) 24
2.2.3.2.1. Principe 24
2.2.3.2.2. Préparation des échantillons et solutions 24
2.2.3.2.3. Mode opératoire 24
2.2.4. Détermination de l'activité protéine phosphatasique dans les hépatocytes 25
2.2.4.1. Principe 25
2.2.4.2. Solution 25
2.2.4.3. Mode opératoire 25
2.2.4.3.1. Préparation des substrats phosphorylés 25
2.2.4.3.2. Mesure de l'activité de la PP-1 26
2.2.5. Statistique 26

3. Objectifs 27

4. Résultats 28

4.1. Mise au point de la technique d'isolation des hépatocytes 28
4.1.1. Préparation d'une suspension hépatocytaire 28
4.1.2. Comptage et viabilité cellulaire 29
4.2. Accumulation de la microcystine-LR dans les hépatocytes isolés 30
4.2.1. Incubation avec la microcystine-LR 30
4.2.1.1. Dosage de la microcystine-LR 30
4.2.1.2. Viabilité et évolution du nombre des hépatocytes avec et sans MC-LR 31
4.2.1.3. Les effets de différentes concentrations en MC-LR sur l'accumulation de la microcystine-LR dans les hépatocytes isolés 32
4.2.2. L'effet du taurocholate sur l'accumulation de le microcystine-LR intra-hépatocytaire 34

4.2.2.1. Viabilité et mesure du nombre d'hépatocytes incubés avec de la microcystine-LR et du taurocholate..... 34
4.2.2.2. Etude de l'impact du taurocholate sur l'accumulation de Microcystine-LR intra hépatocytaire..... 35
4.2.2.2.1. Etude de l'impact du taurocholate sur l'accumulation de microcystine-LR par la technique de l'HPLC..... 36
4.2.3. Mise en évidence de l'effet de la microcystine-LR sur l'activité des protéines phosphatases d'une solution hépatocytaire..... 39

5. Discussion, résultats et perspectives..... 43

6. Bibliographie..... 47

Introduction

1.1. Les microcystines.

1.1.1. Origines et composition chimique.

Le terme Microcystine provient de l'espèce de cyanobactérie d'où a été isolée une forme: *Microcystis aeruginosa*.
Les microcystines font parties d'un groupe plus important de toxines que sont les cyanotoxines. Les cyanotoxines regroupent l'ensemble des toxines produites par les cyanobactéries. Cette toxicité inclut les neurotoxines, les hépatotoxines, les cytotoxines et les dermatotoxines. Les microcystines font partie de la catégorie des hépatotoxines. Elles s'accumulent principalement dans les hépatocytes.
Les microcystines sont des heptapeptides cycliques avec des acides aminés variables sur 7 positions différentes. Cette molécule est constituée de 5 acides aminés non protéiques et de 2 acides aminés protéiques. Ce sont ces deux acides aminés qui distinguent les différents types de microcystines entre elles. Chaque type de microcystine est désigné par une lettre qui désigne l'acide aminé le caractérisant.
La plus courante des microcystines est la microcystine-LR (ou MC-LR) qui est également la plus toxique. Le terme LR montre que ce sont la leucine (L) et l'arginine (R) qui sont présentes sur les sites variables. Les deux autres types de microcystine que l'on rencontre outre la MC-LR sont la MC-RR et la MC-RY. Il existe 50 types différents de microcystines identifiés à ce jour.

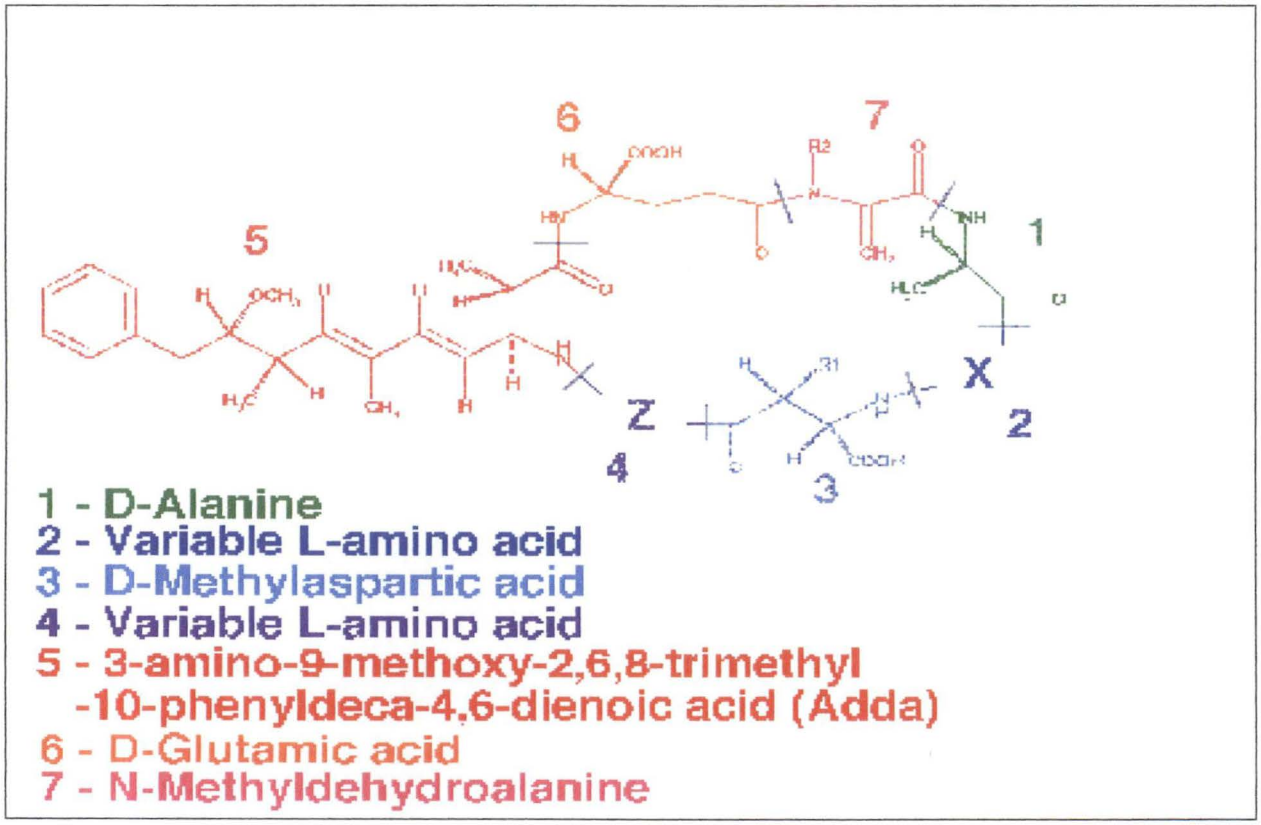


Fig. 1 : Ce schéma montre le squelette commun aux différentes molécules de microcystine. Les molécules X et Z sont les acides aminés protéiques variants selon le type de microcystine.

Les différents types de microcystine ont différents degrés de lipophilicité et différentes polarités qui affectent leur toxicité. Les autres cyanotoxines comme les neurotoxines ne sont pas considérées aussi dangereuses que les hépatotoxines, ceci est dû au fait que leur durée de demi-vie est plus courte mais leur toxicité est de tout de même plus importante. Celles-ci occasionnant la mort endéans quelques minutes à quelques heures.

L'effet toxique de la microcystine est causé essentiellement par une altération du cytosquelette de l'hépatocyte, ce qui occasionne des dissociations intercellulaires, causant des hémorragies hépatiques et la mort par choc hypovolumique. Comme nous le verrons plus loin, des études récentes montrent une implication possible de la microcystine dans les cancers du foie.

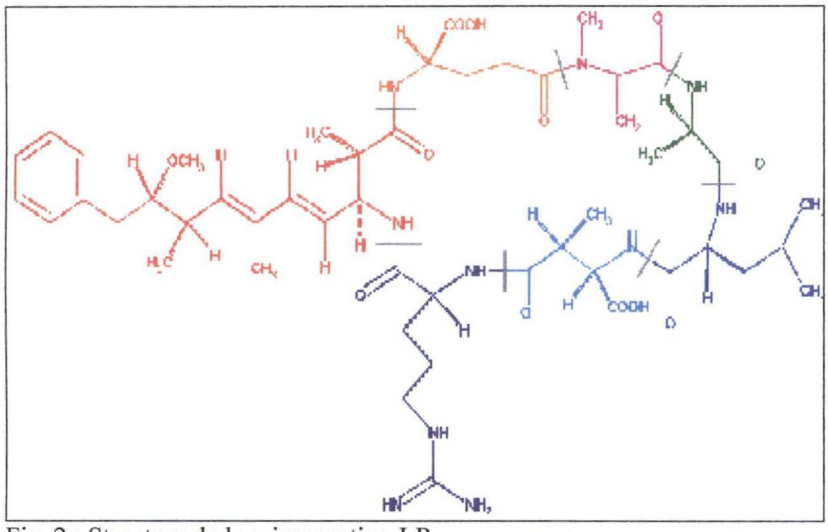


Fig. 2 : Structure de la microcystine-LR.

Certaines espèces de cyanobactéries produisent des toxines qui se classent selon leur mode d'action en hépatotoxines, neurotoxines, dermatotoxines, et d'autres types de toxines moins courantes. Les hépatotoxines, qui nous intéressent spécialement, sont produites par différents genres de cyanobactéries comme *Microcystis, Oscillatoria, Nodularia, Nostoc, Cylindrospemopsis.*

Des toxines alcaloïdes peuvent aussi être produites, la structure moléculaire est une guanidine tricyclique liée à un uracile hydroxyméthylée d'un poids de 415 daltons. (Ohtani et al,. 1992). Ces alcaloïdes ont déjà été observés occasionnant des problèmes sanitaires comme des gastro-entérites et des maladies rénales. (Falconner, 1994)

1.1.2. Les effets biologiques de la microcystine-LR.

1.1.2.1. L'exposition chronique.

La MC-LR est avant tout une hépatotoxine. Après une exposition prolongée (de 25 à 150 µg/kg de poids sec chez la souris) à la MC-LR par voie intraveineuse ou intrapéritonéale, des dommages sévères ont lieu, caractérisés par une détérioration de la structure du foie, une perte de la structure sinusoïdale, une augmentation du poids du foie dû aux hémorragies

intrahépatiques, des chocs hémodynamiques, des crises cardiaques possibles et la mort (Hooser et al. 1990).
La MC-LR est une toxine extrêmement aiguë. Le LD_{50} par la voie intra péritonéale est de 25 à 150µg/kg chez la souris et de 5000µg/kg par la voie orale (gavage).
La manière la plus importante d'être contaminé par la microcystine-LR est l'ingestion orale. Toutefois, suite à des injections intraveineuses ou intra péritonéales de doses sub-létales de microcystines marquées radioactivement, elles semblent être transportées par les transporteurs d'acides biliaires de l'intestin et du foie (Ketak *et al*, 1993).
L'empoisonnement à la microcystine prend 30 minutes à 24H pour apparaître, dépendant de la taille de l'animal, de la quantité de toxine ingérée et du type d'administration (Fawel *et al*, 1994)

1.1.2.2. L'exposition à court terme.

Différentes concentrations de MC-LR ont été administrées par gavage à des groupes de 30 souris (15 males et 15 femelles) pendant 48 heures. En dessous de 200µg/kg de souris, aucun changement notable n'est à signaler. A partir de 200µg/kg, on observe de légers signes de pathologies dans les foies. Pour des concentrations de 1000µg/kg, tous les foies montrent des modifications histologiques. On y décèle des inflammations chroniques, des dégénérations locales d'hépatocytes et des dépôts d'hémosidérine (Fawell *et al*, 1994)
Chez les mâles de souris, pour une concentration de gavage de MC-LR des 200 et 1000 µg/kg, les concentrations de transaminases sont plus élevées, la glutamyl transférase est réduite et il y a une réduction significative des protéines totales et de l'albumine.
Pour les femelles, seules des augmentations de transaminases à des concentrations de 1000µg/kg sont observées.
Il a été remarqué une augmentation des consommations en nourriture de 15% chez les individus soumis aux plus hautes doses de MC-LR (1000µg/kg), malgré cela, on remarque une diminution du poids de 7% par rapport aux souris témoins.
Le NOAEL (no-adverse-effect-level) est de 40µg/kg de poids par jour (Fawell et al.1994).
Une autre étude a été effectuée chez le porc, celle-ci révèle une NOAEL de 280µg/kg. (Falconer et al.1994).
70% de la Microcystine se retrouve dans le foie après 24H chez le rat (Brooks & Codd, 1987 ; Meriluoto et al.1990 ; Lin & Chu, 1994).
Chez l'humain, la MC-LR est excrétée rapidement avec 75% d'excrétion endéans les 12 heures. Les 25% restants sont éliminés après 6 jours de la manière suivante : 9% sous la forme urinaire et 15% de manière plus lente (1% par jour) par la voie faecale.
La MC-LR ne traverse pas à proprement parler les membranes cellulaires, elle passe à travers l'iléon via les systèmes de transport ioniques (Runnegar et al.,1991); ensuite, elle pénètre massivement dans les hépatocytes. Elle s'y lie à une protéine de 40Kda, (la protéine Phosphatase 2A (PP-2A) et la protéine Phosphatase 1(PP-1)) dans le cytosol.
Il a été observé que les embryons de poissons étaient plus touchés que les individus adultes et juvéniles par une intoxication à la MC-LR. (Rodger et al,. 1994) . Ceci peut s'expliquer par le fait que l'épithélium de l'embryon est plus fin que celui de l'individu adulte. En plus de cela, un taux métabolique élevé et une interdépendance étroite entre les différentes voies du développement augmente l'effet de la toxicité.

1.1.3. Les facteurs modifiant la production et la dégradation de la MC-LR dans l'environnement.

1.1.3.1 Facteurs physico-chimiques modifiant la croissance des cyanobactéries

Les deux principaux facteurs qui influencent la production de toxines, sont la lumière et la température. La température optimale pour la libération de MC-LR par les cyanobactéries est comprise entre 20°C et 25°C (Gorham, 1964 ; Van der Westhuizen & Eloff, 1985 ; Watanabe & Oishi, 1985). Les cyanobactéries sont effectivement plus toxiques durant les périodes de haute température et dans les zones au climat chaud.
L'intensité lumineuse, plus que la qualité de la lumière est un facteur important de production de toxines chez *M. aeruginosa*. La toxicité est augmentée lorsque la cyanobactérie est éclairée par une lumière verte ou rouge plutôt que par la lumière blanche.
Toutefois on a observé que des cyanobactéries pouvaient croître malgré une luminosité peu importante grâce au fait qu'elles peuvent alterner leur mode de vie photosynthétique et hétérotrophique.
La concentration en nutriments des cyanobactéries est importante, il est nécessaire d'avoir une quantité importante dans l'eau en phosphore et azote comme on en retrouve dans les zones eutrophiques.
La concentration en MC-LR est 6X plus concentrée pendant la journée que pendant la nuit. (Kotak et al.,). Ceci démontre l'impact direct de la lumière sur la production de MC-LR par *M. aeruginosa.*
Les toxines cyanobactériennes sont soit attachées à la membrane soit libres à l'intérieur de la cellule. Elles sont généralement relâchées lorsque les cellules meurent mais de la MC-LR a déjà été détectée dans des cellules jeunes. Les plus grandes concentrations ont été observées à la fin de la partie exponentielle de la phase de division cellulaire (Wanabe et al.,1993).

1.1.3.2. Dégradation de la Microcystine-LR.

Les microcystines et les autres toxines alcaloïdes sont dégradées naturellement dans l'eau mais elles ont tout de même une phase d'activité avant leur destruction totale. Une étude utilisant la MC-LR à une concentration de 10µg/l suggère une durée de demi-vie de moins d'une semaine dans l'eau non-traitée. (Cousins et al.,1996). La toxine est très stable dans l'eau et résiste aux pH extrêmes et aux températures très élevées, de l'ordre de 300°C.
Les MC-LR sont biodégradées et il a été remarqué que la durée de demi-vie pouvait être allongée jusqu'à 2 jours grâce à l'ajout d'algicide. (Jones & Orr.,1994)

Des mesures ont été réalisées dans différent point d'eau douce dans le monde pour connaître la concentration naturelle de l'eau en MC-LR.
Dans l'Alberta au Canada, des niveaux de 4 à 605 µg/g de biomasse sèche ont été répertoriés. Les niveaux de MC-LR, au Japon, vont de 27 à 622µg/g de biomasse sèche. La concentration en MC-LR dans les réserves d'eau potable varie de 0.15 à 4.3µg/l (Tsuji *et al*, 1995).

1.1.4. Les effets de la Microcystine-LR sur la santé humaine

Les proliférations d'algues bleues et vertes sont connues depuis plus de cent ans pour causer des empoisonnements animaux et humains. Les cas d'intoxication par les eaux contaminées ont été très nombreux et se caractérisent par des crampes d'estomac, des vomissements, diarrhées, fièvre, migraines, douleurs musculaires et affaiblissement. (Dillenberg & Dehnel, 1960). Ces problèmes peuvent subvenir après ingestion d'eau contaminée mais aussi après avoir nagé dans des eaux fortement contaminées. Des cas de ce genre ont été répertoriés partout dans le monde, sur tous les continents.
Récemment, une étude épidémiologique en Chine a montré une relation entre l'augmentation de cancers du foie et l'utilisation pour la boisson d'eaux provenant de mares et de lacs contaminées en microcystine.
Dans les cas extrêmes, des dommages hépatiques ont été observés ainsi que des hausses de la concentration en Glutamyl transferase γ (Ueno et al., 1996).

1.2. La microcystine-LR dans les milieux aquatiques.

1.2.1. Les cyanobactéries

1.2.1.1. Description des Cyanobactéries

Les cyanobactéries, qui sont aussi connues sous le nom d'algues bleues, sont caractérisées par la présence de pigments photosynthétiques. Elles sont relativement simples de par leur forme et ont une structure proche de celles des bactéries (toutes les deux sont procaryotes). Elles sont généralement plus grandes que les bactéries.
En plus des pigments habituels du monde végétal, la chlorophylle et les caroténoïdes, les cyanobactéries contiennent un pigment soluble dans l'eau appelé phytocyanine. C'est ce pigment qui leur donne cette couleur bleu-verte. Lorsque les cellules meurent et relâchent ce pigment, cela donne une couleur caractéristique à l'eau environnante.

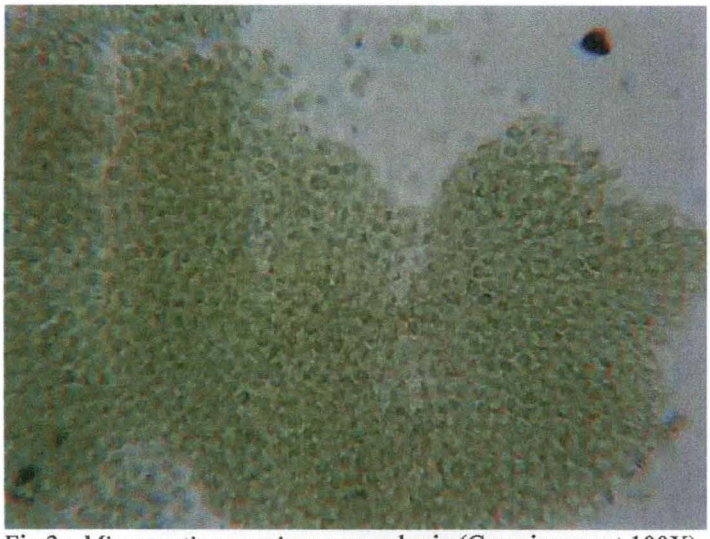


Fig.3 : *Microcystis aeruginosa* en colonie (Grossissement 100X)

Les cyanobactéries peuvent s'organiser en cellules isolées, en filaments, ou en ensemble plus complexes.
Les cyanobactéries se retrouvent dans des habitats terrestres, marins mais également dans les eaux douces. C'est justement dans ce dernier habitat que l'on trouvera des « blooms ».
Les « blooms » sont des développements massifs d'algues et cyanobactéries flottant à la surface des eaux. Les « blooms » ont lieu dans des lacs eutrophisés, des réserves d'eau proches des milieux agricoles,...Ce sont des niches, riches en nutriments qui permettent une prolifération rapide des bactéries. Ces proliférations peuvent se produire en quelques jours et prennent la forme d'une pellicule huileuse à la surface de l'eau qui peut subsister jusqu'à 15 jours. Les « blooms » se produisent généralement à la fin de l'été, quand les températures des eaux sont les plus élevés (de 21 à 27°C). Malgré cela, des « blooms » ont déjà été observés à d'autres époques de l'année.



Fig.4 : Bloom of *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena circinalis* on the St. Johns River, FL

Si les conditions restent favorables, un second « bloom » peut succéder rapidement au premier.
Il existe trois genres de cyanobactéries qui peuvent produire de « blooms » : *Microcystis, Anabaena, Aphanizomenon.*
C'est la *Microcystis aeruginosa*, qui produit les différents types de microcystine.
Elles forment des colonies représentées par des formes sphériques, lobulées ou d'une masse réticulaire. Les cellules individuelles ont une taille de 3 à 5µm. Elles contiennent des pseudo vacuoles assez importantes, qui permettent à la colonie de flotter à la surface de l'eau.
Les cellules de la colonie sont liées entre elles par une matrice gélatineuse et transparente difficile à discerner au microscope.

1.2.2. Les effets de la Microcystine-LR chez le mammifère.

L'action principale de la microcystine-LR est l'inhibition de l'activité des protéines phosphatases 1 et 2A (Honkanen et al., 1990), occasionnant une hyperphosphorylation des protéines cytosoliques et du cytosquelette (Falconer and Yeung, 1992 ; Ding et al.,2000).
Les PP-1 (PP = Protéine Phosphatase) et PP –2A sont les phosphatases les plus abondantes dans les tissus avec des sous unités catalytiques de respectivement 38kDa et 36kDa (Shenolikar and Nairn, 1991). Ces phosphatases déphosphorylent des résidus sérine/thréonine d'un grand nombre de protéines de régulation et structurelle (Cohen, 1989).
Chez les mammifères, il a été démontré que la toxicité de la MC-LR est plus importante chez les rats à jeun plutôt que chez les rats nourris (Miura et al., 1991).
Toutefois le mécanisme qui augmente la toxicité de la MC-LR chez les individus à jeun n'a pas été élucidé. Une diminution des stocks de glycogène pourrait être un facteur impliqué dans ce processus dégénératif.
Des études récentes suggèrent que la formation de conjugués microcystine-glutathion crées pat la glutathion S-transférase (GST) est la première étape dans la détoxification de cette toxine chez un grand nombre d'organismes aquatiques (Pflugmacher et al.,1998).

Des études précédentes ont montré que le mécanisme de détoxification de la MC-LR commence par une conjugaison avec la GSH, réaction catalysée par la GST soluble (Kondo et al.,1992). La première étape de la détoxification a été décrite chez les mammifères aussi bien que chez les organismes aquatiques comme les plantes, les crustacés, les mollusques et les poissons (Pflugmacher et al.,1998). Ces études montrent que la concentration en GST et en GSH semblent être des biomarqueurs très intéressant pour l'analyse de la contamination des hépatocytes par la MC-LR. On a aussi observé une diminution de la GSH dans une étude réalisée chez les mammifères mais sur une autre toxine, un alcaloïde, la cylindrospermopsine (Runnegar et al.,1994).
Cette réduction de la concentration en GSH après une exposition à la MC-LR pourrait être expliquée par une augmentation de son utilisation pour les processus de détoxification, par une réduction de sa synthèse ou par d'autres mécanismes.
Dans des cultures d'hépatocytes de rats primaires, on a observé après une exposition à la MC-LR, un changement en deux phases de la concentration intracellulaire de la GSH. Dans la période qui suit directement le traitement, est observée une augmentation significative suggérant une augmentation des niveaux de GSH pour protéger les cellules de la cytotoxicité et des modifications du cytosquelette.

1.2.3. Les effets de la Microcystine-LR chez le poisson.

Le *Carassius auratus* est utilisé dans le cadre de notre travail car il est très résistant aux conditions d'anoxie et de jeûne que nous voulons tester. De plus, comme nous voulons tester l'accumulation de la microcystine dans un milieu aquatique, nous avons besoin d'un animal aquatique. C'est également ce modèle biologique qui a été utilisé dans les études précédentes ayant analysé l'impact de la microcystine sur l'animal "in toto" ou directement sur l'hépatocyte.

Une étude (Pflugmacher *et al*,1998) a été réalisée pour comparer l'activité des protéines phosphatases, la concentration en glycogène ainsi que celle de GSH et de GST en parallèle avec l'accumulation de MC-LR. Le matériel biologique est composé de *Danio rerio* à jeun et d'autres nourris *ad libitum*.
Le résultat de cette étude montre que la MC-LR s'accumule rapidement mais temporairement dans le foie des carassins juvéniles.
Malgré cette accumulation, il n'y a pas de modification de l'activité de la GST (Gluthation S-H) et on n'observe qu'une diminution non significative de la concentration en GSH chez les individus à jeun. Des études précédentes ont montré que le mécanisme de détoxification de la MC-LR commence par une conjugaison avec la GSH, réaction catalysée par la GST soluble (Kondo et al.,1992).
Dans le cas de ce travail, on n'observe qu'une diminution faible de la GSH chez les individus à jeun (Malbrouck et al ,.2004). D'autres travaux montrent des résultats semblables comme chez le *Ctenopharyngodon idelus* (Xu et al.,2000) qui a subi une injection intra-péritonéale de 10µg de MC-LR/kg. Une diminution de la concentration en GSH a aussi été observée dans une étude réalisée chez les mammifères mais sur une autre toxine, un alcaloïde, la cylindrospermopsine (Runnegar et al.,1994).

La conjugaison de la GSH aux microcystines-LR est aussi impliquée dans une augmentation de l'excrétion biliaire dans les canalicules via les MRPs (Multi-Drug-Resitance associated Proteins) (Siager and Meier.,1998). Cela pourrait être d'une importance primordiale dans la détoxification. L'excrétion biliaire de MC-LR chez le poisson a déjà été décrite (Sahin et al., 1996). Ils observent que les toxines cyanobactériennes excrétées conservent leur activité d'inhibition des protéines phosphatases. Ils suggèrent par cela que les MC-LR pouvaient être secrétées directement dans la bile avec ou sans réactions de biotransformations préliminaires.
Le glutathion modère l'effet toxique de la microcystine de part sa liaison à celle-ci et l'excrétion qu'il occasionne. Cet effet toxique résulte de la liaison covalente de cette toxine avec la sous-unité catalytique des PP. Cette liaison résulte d'un mécanisme en deux étapes impliquant une liaison rapide et une inactivation de la sous-unité catalytique suivie par une interaction covalente faible (MacKintosh et al.,1995).
Dans l'expérience de Malbrouck (2004), on observe une diminution suivie d'une augmentation progressive de l'activité de la PP-1. Ceci est également observé chez la truite (Fischer et al.,2000). Ces auteurs suggèrent deux facteurs susceptibles de contribuer à la diminution de la microcystine extractible : l'excrétion biliaire de la MC-LR et de ses métabolites (Sahin et al.,1996) et la liaison covalente de la MC-LR à la sous-unité de la PP-1 (Hitzfeld et al.,1999) ou au glutathion (Kondo et al., 1996).
L'excrétion biliaire réduit la microcystine libre dans le foie mais la liaison covalente de la MC-LR avec la PP1 réduit l'extractabilité de la MC-LR (Craig et al.,1996), ce qui peut entraîner une sous estimation de la MC-LR présente dans le foie.

1.3.Toxicologie des Microcystines.

1.3.1. Analyse des méthodes.

Il existe généralement 5 méthodes sensibles de dosages et d'analyse de la microcystine basées respectivement sur une réaction avec des marqueurs fluorescents, sur des tests ELISAs, sur l'inhibition des protéines phosphatases et sur la spectrométrie de masse.

Shimizu *et al* (1995) ont synthétisé un agent fluorescent qui s'associe aux conjugués dièns, il est appelé DMEQ-TAD. Cet agent réagit quantitativement avec les métabolites de la vitamine D et ses analogues synthétiques. Le produit fluorescent peut être quantifié linéairement jusqu' à 10 fento-Mole par HPLC. Ce réactif réagit également avec lorsque celui ci est mis en contact avec les Microcystines-LR, -YR, et –RR ainsi qu'avec leurs conjugués dièns. Toutefois, cette méthode ne peut être appliquée pour les échantillons bruts contenant des substances pouvant s'associer avec des conjugués dièns.

An et Carmichael (1994) utilisent une méthode ELISA développée pour examiner la spécificité des anticorps polyclonaux anti-microcystine de lapin. La réactivité croisée (Cross-Reactivity) avec certaines variantes de microcystines étudiées furent observées et il fut conclu que la molécule Adda et l'arginine sont essentielles pour l'expression de la spécificité de l'anticorps.
McDermott *et al* (1995) décrivent le potentiel de la méthode ELISA pour détecter les concentrations de Microcystine à 100pg/ml d'H_2O. La procédure de McDermott utilise des anticorps extraits d'œufs de poulets immunisés. Ils sont capables de reconnaître les microcystines-LR et –RR.

Les microcystines sont des inhibiteurs des protéines phosphatases. Honkanen *et al*,(1998) déclarent que les phosphatases peuvent être utilisées pour détecter l'acide okadaïque (un autre inhibiteur de la phosphatase) à des quantités équivalentes au pg. Ce qui démontre un niveau de sensibilité équivalente ou même supérieure aux tests ELISA. Il a été mesuré un niveau de détection pour la microcystine-LR de 6 ng/ml. Cette valeur est comparable a cette de 3 ng/ml correspondante pour le test ELISA.

Harada *et al* (1996) ont développés une méthode de détection de la microcystine dans les cyanobactéries basés sur la formation de l'acide 3-méthoxy-2-methyl-4-phenylbutyrique par ozonolyse. Cet acide est détecté par les techniques de chromatographie ionique couplées au spectromètre de masse ou de la chromatographie à thermospray liquide couplée à un spectromètre de masse utilisant la sélection des ions. Des niveaux de l'ordre du ng de microcystine ont pu être détectés.

La méthode de détection par HPLC permet de mesurer la pureté et la concentration d'échantillons de MC-LR en mesurant leurs temps d'élution sur une colonne. La MC-LR est éluée de la colonne après un temps d'élution de 17.8 minutes à 238 nm. La mesure de l'aire du pic permet de connaître la quantité de MC-LR injectée sur la colonne. La sensibilité est de quelques dizaines de ng.

Les différentes sensibilités des techniques vues ci-dessus sont à mettre en comparaison avec les limites maximum de microcystine dans l'eau potable qui est de 1µg/l (Bell and Codd ; 1994).
Nous choisirons pour notre étude la technique utilisant l'inhibition de la Protéine Phosphatase-1 (PP-1) car cette méthode permet de conjuguer un bon niveau de sensibilité, de l'ordre de quelques ng/ml avec une technique qui n'est pas trop difficile à mettre en œuvre, qui n'est pas trop onéreuse, et qui est déjà utilisée de manière routinière au laboratoire.

1.3.2. Stabilité de la MC-LR.

Des expériences (Cousins *et al* ; 1996) ont été menées utilisant des concentrations basses (10µg/l) en MC-LR. Il a remarqué que la dégradation en des MC-LR se déroule en moins d'une semaine dans un réservoir d'eau. mais la toxine est stable pendant plus de 27 jours dans un réservoir d'H_2O désionisée et jusqu'à 12 jours dans un réservoir d' H_2O distillée. Ceci indique que l'instabilité dans un réservoir d' H_2O normale est dû à la biodégradation. Le mécanisme d'inactivation est probablement dû aux modifications de la chaîne Adda (Cousins *et al* ; 1996).
Les MC-LR isolées sont aussi stables sous le rayonnement par la lumière solaire, mais le rayonnement solaire additionné avec les pigments contenus dans la cyanobactérie décompose de manière significative les toxines par isomérisation des doubles liens dans la chaîne Adda. La demi-vie de ce processus correspond à 10 jours. La dégradation la plus rapide que l'on puisse observer chez les MC-LR et les MC-RR est due aux mécanismes d'isomérisation causés avec des toxines soumises à un rayonnement Ultra-Violet et à des longueurs d'ondes qui avoisinent leurs longueurs d'ondes d'absorption (238 – 254 nm). Cette dégradation se produit en quelques minutes.

1.3.3. Mécanismes d'action de la MC-LR:

1.3.3.1. Transport

Le fait que le foie est la cible principale des microcystines a été illustré par Robinson *et al* (1989) et Robinson *et al* (1991) qui ont administré de la microcystine-LR tritiée à des souris et des rats. Ils ont détecté que 50% de la radioactivité se trouvait dans le foie. Des examens histologiques sur des souris tuées montrent que les effets toxiques ont été presque exclusivement limités au foie. Une destruction complète des lobules basiques et de la structure sinusoïdale a été observée (Meriluoto *et al* ; 1989). L'accumulation de la microcystine fait intervenir un transporteur (Eriksson *et al* ; 1990, Runnegar *et al* 1991). Les propriétés de ce transport, toutefois, indiquent que celui-ci se serait couplé à des transports protéiques de sels biliaires (Runnegar *et al ; 1995).* Le temps de demi-vie de la microcystine-LR dans le plasma de souris est à peu près d'une demi-heure (Robinson *et al* ; 1989).

1.3.3.2. Inhibition des protéines phosphatases

La découverte que la microcystine-LR est un inhibiteur des protéines phosphatases de type 1 et 2A a été mise à jour à l'institut national de recherches contre le cancer de Tokyo (Yoshizawa *et al* 1990 ; Matsushima *et al* 1990) et confirmée par MacKintosh *et al* (1990) et par Honkanen *et al* (1990). Les interactions toxine-phosphatase covalentes sont extrêmement solides, et la liaison est essentiellement stœchiométrique. L'affinité de la microcystine-LR pour la phosphatase de type 2A est de 40 fois supérieure à celle pour la phosphatase de type 1.

L'affinité de la microcystine-LR pour la phosphatase de type 2B est de 1000 fois inférieure que celle pour la phosphatase de type 1 (MacKintosh *et al* 1990, Honkanen *et al* 1990). La nature des interactions entre les microcystines et les protéines phosphatases a récemment été élucidée. L'inhibition de l'activité enzymatique résulte d'une interaction non-covalente, celle-ci est provoquée par la chaîne ADDA hydrophobe de la microcystine et du glutamyl carboxylique. Une interaction covalente est réalisée entre le carbonyl insaturé du résidu méthyldéhydroxyalanine de la microcystine et le groupement thiol de la cystéine-273 de la phosphatase de type 1 (cystéine-266 pour la phosphatase de type 2A). La formation du lien covalent n'est pas essentielle à l'inhibition de l'activité enzymatique, toutefois on observe une réduction de 10 fois de l'affinité de la microcystine pour la phosphatase si la cystéine-273 est remplacée pour une leucine, une alanine ou une serine (MacKintosh *et al* 1995).
La corrélation entre l'inhibition de l'activité phosphatase et la toxicité est démontrée par les résultats de Runnegar *et al* 1993. Après administration de la microcystine -LR et – YM à des souris, ils ont observé que les inhibitions de l'activité des phosphatases de type 1 et 2A sont accompagnées dans tous les cas de modifications cliniques dues à une intoxication à la microcystine.
L'inhibition des protéines phosphatases mène à une phosphorylation des protéines du cytosquelette et des protéines associées à celui-ci.
L'effondrement des microfilaments d'actine du cytosquelette dans les hépatocytes de rats se déroule préalablement à la dislocation des protéines associées, l'actinine et la taline (Ghosh *et al* 1995). Macias-Silva et Garcia-Sainz (1994) démontrent que la perturbation du cytosquelette résultant de l'inhibition des protéines phosphatases peut causer des altérations aux liaisons entre les protéines G et les phospholipases C. Ils ont observé une inhibition des récepteurs mais également une diminution du turnover des phosphoinositides des protéines G des hépatocytes de rats exposés à la microcystine.

1.3.3.3. Autres effets biochimiques

La microcystine-LR agit également sur la phosphorylase a (Runnegar *et al* 1987) qui pourrait provoquer la diminution du glygogène intra-hépatocytaire observée après administration de microcystine (Meriluoto *et al* 1989, Miura *et al* 1991). Ces derniers ont observé une diminution des réserves en glutathion et une augmentation du taux plasmatique des hydrogènases sorbitol (une enzyme mitochondriale spécifique au foie) et de glucose chez le rat.
La lactate déshydrogènase est un autre enzyme qui augmente en réponse à la microcystine-LR (Hermansky *et al* 1991). L'augmentation des niveaux de calcium cytoplasmique a également été observée dans des hépatocytes traités à la microcystine (Runnegar *et al* 1991).
Hermansky et Stohs (1991) ont administré de la microcystine-LR à des souris et observé une diminution dans le temps de la fluidité des membranes microsomiales hépatiques. Ces modifications accréditent le fait qu'il y a un effet secondaire et indirect de la toxine.
LeClaire *et al* (1995) observent un déclin rapide du volume cardiaque chez les rats intoxiqués à la microcystine-LR. L'hypotension est responsable de l'augmentation du volume cardiaque. Une vasoconstriction périphérique se déroule en réponse au phénomène d'hypotension.

1.3.4. Protection contre la toxicité de la microcystine-LR.

Suite aux dommages sévères, rapides et irréversibles causés au foie par la microcystine, il est critique pour la cellule d'avoir une activité prophylactique.
Avant de connaître les effets principaux de la toxicité de la microcystine (inhibition des protéines phosphatases), Adams *et al* (1989) ont étudié l'impact de la microcystine sur les macrophages du foie.
Cette étude était basée sur les effets protecteurs connus de l'hydrocortisone, qui a avait déjà été étudié sur le réticulo-endothélium. Des agents furent inoculés à des souris une heure, un jour ou une semaine avant d'administrer aux souris une dose létale pour les animaux non protégés (100 µg/kg). Sept composés furent trouvés comme ayant le même effet que l'hydrocortisone : shellac, le bleu de Trypan, le rouge de Trypan et le bleu d'Evans, la Triazine rouge, la cyclosporine A, et le tétrachloride de carbone. La majorité de ces composés fut capable d'empêcher la pénétration hépatique d'érythrocytes marqués au Cr^{51}, une fonction que possède les macrophages hépatiques (Adams *et al*, 1989).
Toutefois, le seul agent qui ne possède pas ces propriétés, le rouge de Trypan, possédait l'effet prophylactique le plus important car il fournissait une protection non-immunologique envers une dose létale de microcystine-LR pour une durée maximum de 3 mois.
Hermansky *et al* (1991) ont publié une étude précédant la découverte des propriétés d'inhibition de la phosphatase par la microcystine-LR. Ils ont examiné une variété de composants administrés avant ou avec une concentration de 100µg/kg chez la souris. Ces composés étaient des inducteurs d'enzymes, des bloqueurs de canaux permettant le passage du calcium, des radicaux libres, des antioxydants, des composés activant le gluthation. Les meilleurs résultats furent obtenus avec par le gluthation, la vitamine E, la rifampine et la cyclosporine A.
Il suffisait de 10 mg/kg de cyclosporine A pour fournir une protection complète à la souris contre des doses de microcystine-LR allant jusqu'à 100 µg/kg si celle-ci est administrée de 30 minutes à 3 heures avant la toxine, mais pas si elle est co-administrée ou injectée après la toxine. Cette protection est sûrement liée à une immunosuppression.
La rifampine est un antibiotique utilisé chez les humains contre la tuberculose et d'autres infections bactériennes. La dose est de 8mg/kg par jour (Mandell et Sande, 1990). Une dose similaire injectée de manière intragastrique chez la souris, une heure avant le double d'une dose mortelle de microcystine-LR protège contre tous les effets létaux de cette toxine. Quand la rifampine est administrée oralement une heure avant la toxine, la protection s'accroît jusqu'à 4 fois la dose létale (Wannemacher *et al* 1990). En plus de protéger contre la mortalité, la rifampine prévient aussi les modifications biochimiques et pathologiques (Thompson et Pace, 1992).
Les cytochalasines, les acides biliaires, les acides choliques, le déoxycholate, le bleu et le rouge de Trypan fournissent également une protection à une concentration variant entre 10 µM et 0,1 mM. Toutefois, la plupart de ces composés peuvent endommager les hépatocytes lorsqu'ils sont administrés seuls. La rifampine ne possède pas ces inconvénients et conserve son action protectrice jusqu'à une concentration minimum de 2 µM.
Miura *et al*, 1991 ont découvert que la LD_{50} de microcystine-LR chez des rats nourris et à jeun est de respectivement 122 et 72 µg/kg. Une dose subléthale de microcystine-LR (50 µg/kg) protège les individus à jeun mais pas les individus nourris contre une dose létale (200 µg/kg) 72 heures plus tard.
Ces auteurs émettent l'hypothèse que le jeûne précédant une faible dose de microcystine-LR provoque de graves dommages hépatocellulaires entraînant une hépatectomie partielle

(Adams et al, 1989). En réponse à cela, on observe une régénération du foie et donc une plus grande population d'hépatocytes immatures, lesquels sont résistants à une haute dose de toxine. Cela peut être dû au fait que les hépatocytes immatures ont un système enzymatique insuffisant pour transformer les microcystines en métabolites toxiques.
A l'opposé, les rats nourris souffrent moins des dommages causés par une faible dose de microcystine et possèdent donc une plus grande population d'hépatocytes matures au moment de l'injection de la forte dose de Microcystine-LR.
Remarquons que dans cette expérience, la dose subléthale fût de 70 % de la LD_{50} pour les individus à jeun mais seulement de 40 % de la LD_{50} pour les individus nourris.

1.4. Le foie comme organe de détoxification.

1.4.1. Description du foie.

Le foie étant une glande exocrine qui produit plusieurs substances dont la principale est la bile. Celle-ci quitte le foie par l'intermédiaire des conduits hépatiques droit et gauche ; ces derniers convergent pour former le volumineux conduit hépatique commun qui se dirige vers le bas afin de s'unir au conduit cystique, lequel draine la vésicule biliaire. L'union de ces deux conduits donne le conduit cholédoque qui s'abouche au duodénum par l'ampoule hépato-pancréatique.
Les cellules composant la majorité du foie (70%) sont les hépatocytes. Les autres cellules sont essentiellement des cellules endothéliales et des celles de Küpfer.

1.4.2. Les systèmes de détoxification chez l'hépatocyte

Le foie possède un grand nombre de fonctions et est impliqué dans: Le métabolisme des glucides, des lipides, des protéines, dans des fonctions de stockage des certains composés et d'équilibre sanguin, dans la formation et l'excrétion de la bile et enfin la capacité de détoxication. C'est cette capacité du foie qui va nous intéresser ici.
Le corps humain est confronté à un grand nombre de molécules étrangères notamment les médicaments, les carcinogènes chimiques, et divers composés que l'on retrouve dans l'environnement. Ces molécules sont appelées des xénobiotiques. On retrouve jusqu'à 20000 composés chimiques crées par l'homme dans notre environnement. On dénombre au moins 30 enzymes différents intervenant dans le métabolisme des xénobiotiques (Murray et al, 2002). On dénombre deux phases principales dans le métabolisme hépatiques des xénobiotiques.

1.4.2.1. Phase d'hydroxylation

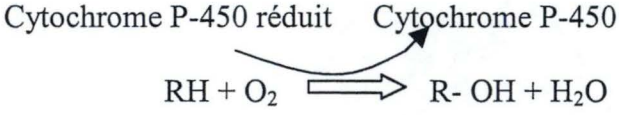
La phase 1 ou hydroxylation : Deux enzymes principaux interviennent dans cette étape, les monooxygénases et les cytochromes P_{450}. L'hydroxylation peut inactiver une drogue mais ce n'est pas toujours le cas. Ces enzymes catalysent de plus nombre d'autres réactions telles que la désamination, la déhalogénation, la désulfuration, l'époxydation et la réduction.

La réaction d'hydroxylation catalysée par la monooxygénase s'écrit de la manière suivante :

$$RH + 0_2 + NADPH + H^+ \Longrightarrow R\text{-}OH + H_2O + NADP^+$$

RH peut présenter un très grand nombre de xénobiotiques, y compris les médicaments, les carcinogènes, les pesticides ainsi que les composés endogènes comme certains stéroïdes ou acides gras. Ces substrats sont lipophyles et deviennent plus hydrophiles par hydroxylation.

Le cytochrome P_{450} est considéré comme le biocatalyseur le plus polyvalent connu. La réaction catalysée par celui-ci peut être représentée comme suit :



Les principales monooxygénases du réticulum endoplasmique sont les cytochromes P-450. 50% des médicaments administrés sont métabolisés par des isoformes du cytochrome P-450 (Gurngerich *et al*, 1992).

1.4.2.2. Phase de conjugaison.

Les composés hydroxylés ou d'autres produits de la phase d'hydroxylation sont transformés grâce à des enzymes spécifiques en divers métabolites polaires par conjugaison avec l'acide glucuronique, le sulfate, l'acétate, le gluthation ou par méthylation. Ceci a pour but de rendre encore plus solubles les xénobiotiques et de permettre de les excréter par la bile ou les urines. Un exemple de la multitude de réactions diverses sera présenté ici, la conjugaison avec le glutathion :
Le gluthation (GSH) est un tri-peptide constitué d'acide glutamique, de cystéine et de glycine.
La réaction de conjugaison au gluthation :

R représente un xénobiotique électrophile. Les enzymes catalysant cette réaction sont les gluthation-S- transférases présentes en grandes quantités dans le cytoplasme hépatique. Dans le cas ou le xénobiotique ne se lie pas au gluthation, il pourrait se lier à l'ADN, l'ARN ou aux protéines et provoquer de graves lésions cellulaires. Le GSH constitue un système important de défense contre les composés toxiques. Les conjugués de gluthation continuent d'être métabolisés avant leur excrétion. Les groupements glutamyl et glycyl du gluthation sont enlevés par des enzymes spécifiques et un groupement acétyle est ajouté au groupement aminé de la cystéine résiduelle. Le composé formé est un acide mercapturique qui est excrété dans l'urine (Guengerich *et al*, 1992)

L'objectif principal des deux phases de ce métabolisme est d'augmenter le solubilité aqueuse (polarité) et de faciliter l'excrétion des xénobiotiques. S'ils sont très hydrophobes, ils resteraient presque toujours dans les tissus adipeux. Dans de rares cas, la conjugaison peut accroître la toxicité des xénobiotiques (Murray et al, 2002) .

1.4.3. Description du foie chez les poissons

Le foie est toujours composé d'hépatocytes de grande taille mais il n'y a plus d'organisation en lobules. Ces cellules se structurent en travées anastomosées. On retrouve à l'intérieur du foie du pancréas endocrine ou exocrine. Les cellules pancréatiques exocrines sont organisées en acini alors que les endocrines le sont en îlots. La vascularisation du foie est particulière : les capillaires sont différents des sinusoïdes. On a donc un "hépato-pancréas".
Chez le *Carassius auratus*, on observe que le foie joue un rôle très important dans la création de réserves énergétiques. Celles-ci se retrouvent sous la forme de glycogène, le poisson, lorsqu'il se trouve en pénurie alimentaire, peut puiser dans ces réserves pour transformer le glycogène en glucose. Un individu d'une centaine de grammes peut survivre jusqu'à 8 semaines à jeun en ne subsistant qu'avec le glycogène présent dans son foie (issus du cours de BioDeug, 2004)

1.5. Transport intra-cellulaire des acides biliaires.

1.5.1. Synthèse des acides biliaires.

Chez l'humain, les cellules hépatiques secrètent quotidiennement de 800 à 1000ml de bile jaune, brunâtre ou vert-olive. Son pH est compris entre 7.6 et 8.6. La bile est principalement formée d'eau et d'acides biliaires, de sels biliaires, de cholesterol, de phospholipides appelés lécithines, de pigments biliaires et de plusieurs ions.
Les acides biliaires sont des molécules amphipathiques permettant les interactions entre les lipides et l'environnement aqueux. La synthèse des acides biliaires à partir du cholestérol implique une hydroxylation et une saturation des groupements stérols, l'épimérisation des groupements hydroxyles-3ß, l'agencement des chaînes de cholestérol et la conjugaison de la taurine ou de la glycine. Les acides biliaires produits par le foie sont pour la plupart la taurine et la glycine conjuguées à l'acide cholique et à l'acide chénodéoxycholique (Russel *et al.*1992).
Ces acides primaires subissent des modifications structurelles caractérisées par des déconjugaisons, déhydroxylations, sulfatisations et glucuronidations. Ces métabolites d'acides biliaires (connus sous le nom d'acides biliaires secondaires ou tertiaires) peuvent être excrétés en dehors de l'organisme.
Les modifications apportées aux acides biliaires se déroulent entièrement dans le foie. Le cytochrome P450 monooxygenase catalyse la première étape dans ce que l'on appelle la voie classique. Au moins 13 enzymes résident dans des compartiments sub-cellulaires différents. Ceux-ci participent tous à la biosynthèse des acides biliaires chénodéoxycholique (Russel *et al.*1992)
Un second type de transformation appelé voie alternative permet la conversion des oxystéroles en acides biliaires.
L'hydroxycholestérol peut aussi être métabolisé en acides choliques et en acides chénodéoxycholiques (Wachtel *et al.*1968) Il est connu que cette activité est catalysée par l'oxystérol 7α-hydroxylase. Cependant, le cholestérol peut aussi entrer dans la voie de biosynthèse des acides biliaires via le cyp27. Le cyp27 est trouvé dans une grande variété de cellules dans le corps, le foie reste toutefois le seul site de synthèse des acides biliaires.
L'ADNc encodant la plupart des enzymes impliqués dans la synthèse des acides biliaires ont été clonés et la plupart de ceux-ci ont été analysées comme des protéines recombinantes. Des

protéines transporteuses de stérols (SCPs) sont aussi impliquées dans la synthèse d'acides biliaires (Antonenkov *et al.*1997).
L'importance de la plupart des enzymes impliquées dans les voies classiques et alternatives a été étudiée par le système de disruption de gènes. La création de cyp7a déficient chez la souris a permis d'illustrer sans équivoque l'existence de la voie de synthèse alternative. Le cyp27 est connu pour être impliqué dans le clivage de la chaîne de cholestérol et dans les états postérieurs de la synthèse d'acides biliaires. Chez les souris, la déficience en cyp27 diminue grandement la production d'acides biliaires (Schwartz *et al*,1997). Toutefois, on observe des acides biliaires d'apparence normale chez les souris déficientes en cyp27, ce qui indique que celui-ci n'est pas essentiel pour le clivage de la chaîne de cholestérol.
Malgré les progrès dans la compréhension des étapes de la voie de synthèse des acides biliaires, très peu d'intermédiaires de cette voie sont connus car ceux-ci voyagent d'un compartiment sub-cellulaire à un autre. La protéine de régulation stéroïdogénique stimule l'activité du cyp27. Cette protéine n'est pas détectable dans le foie mais une protéine analogue a des fonctions similaires dans les hépatocytes. Les cellules créées pour surexprimer les enzymes impliquées dans la synthèse d'acides biliaires peuvent être utilisées pour analyser la nature de leur substrat, de leurs réserves de production et pour suivre le transport intracellulaire des métabolites d'acides biliaires (Sugawara *et al*, 1995).

1.5.2. Sécrétion des acides biliaires.

Dans des conditions physiologiques normales, les acides biliaires ne s'accumulent pas dans le foie. Ceci indique l'existence de mécanismes secrétoires efficients. Des études indiquent que la sécrétion d'acide biliaire est un processus nécessitant de l'énergie (Nathanson *et al*, 1991). Des ADNc de plusieurs protéines impliquées dans ce processus ont été clonées. Une glycoprotéine de 110KDa a été isolée à partir de membranes canaliculaires de rats. Les anticorps contre cette protéine peuvent inhiber les transports d'acides biliaires via les vésicules membranaires canaliculaires (Sippel *et al*, 1990).
La caractérisation de cette protéine révèle son activité ecto-ATPase dans le foie. Dans des cellules modifiées qui sont capables d'internaliser les acides biliaires, l'expression de l'activité ecto-ATPase promeut l'afflux d'acides biliaires. Toutefois, des préparations hautement purifiées de membranes canaliculaires sans activité ecto-ATPase montrent une activité de transport d'acide taurocholique ATP-dépendant suggérant l'existence de systèmes de transport alternatifs (Kast *et al*, 1994).
Le transport d'acides biliaires à travers la membrane baso-latérale des entérocytes est moins compris. La MRP3 humaine (un transporteur de type ABC) est présente dans les intestins mais elle est plus abondante dans le colon. Précédemment, il fut suggéré que le transport d'acides biliaires à travers la membrane baso-latérale de l'intestin impliquait un échangeur d'anions. L'existence de deux protéines se liant aux acides biliaires dans les membranes baso-latérales d'iléons de rats a été démontrée. Des sites de liaisons aux acides taurocholiques ont aussi été découverts dans des préparations de membranes d'iléon (Simon *et al*, 1990).

1.5.3. Prise cellulaire des acides biliaires.

L'extraction hépatique d'acides biliaires primaires à partir de veines portes est un processus très efficace. Dans des conditions physiologiques, les concentrations en acides biliaires dans les vaisseaux sanguins périphériques sont très basses comparées à celles des veines portes. Les acides biliaires pénètrent dans les hépatocytes via, au moins, deux systèmes de transport distincts. Le polypeptide co-transporteur sodium-taurocholate (50kDa) est responsable de la dépendance au sodium et de la prise cellulaire préférentielle d'acides biliaires conjugués (Oude Elferink *et al*,1995)

Une étude récente sur le rat confirme que les acides biliaires conjugués sont le meilleur substrat quoique d'autres stéroïdes anioniques peuvent être transportés à une concentration moindre. Précédemment, une autre protéine de taille similaire issue des membranes sinusoïdales a été découverte (Schroeder *et al*, 1998). Celle-ci a une activité de transport d'acides biliaires dépendante du sodium. La caractérisation de cette protéine révèle son identité comme étant une époxide hydrolase de microsomes (mEH). L'expression de cette protéine recombinante dans des cellules de reins montre une dépendance plus importante au sodium pour ce qui est de l'activité de la prise d'acides biliaires (Von Dippe *et al*, 1990). Il fut aussi démontré que mEH existe en deux orientations précises dans le réticulum endoplasmique lisse. Ceci montre que le mEH peut avoir des fonctions différentes selon son orientation topologique et sa localisation cellulaire. Il est généralement accepté que le Ntcp soit le transporteur responsable des acides biliaires à partir des veines portes (Liang *et al*, 1993).

Quand les cellules possédant des récepteurs Ntcp sont incubées dans un milieu contenant des acides biliaires, la quantité d'acides biliaires associée aux cellules augmente mais atteint un palier. Quand les acides biliaires sont retirés du milieu de culture, le niveau de ceux-ci, associé aux cellules diminue rapidement. Ces observations suggèrent qu'une voie pour la sécrétion des acides biliaires opère dans ces cellules. Les cellules Ntcp accumulent de plus hauts taux d'acides taurocholiques que d'acides choliques. Ceci montre la plus grande affinité des Ntcp de rats pour les acides biliaires conjugués (Schroeder *et al*, 1998).
Les acides biliaires non-conjugués (la plupart des acides biliaires secondaires et tertiaires) sont absorbés passivement le long de l'entièreté des intestins et les acides biliaires conjugués (acides biliaires primaires) sont le plus souvent absorbés par des mécanismes de transport dans le petit intestin. Ces informations suggèrent que l'absorption d'acides biliaires conjugués est importante dans le jéjunum mais le processus est peu connu (Amelsberg *et al*, 1996).

L'absorption d'acides biliaires dans l'iléon est un processus actif impliquant un transporteur d'acides biliaires dépendant du sodium au pôle apical (Wong *et al*, 1994) L'ADNc de asbt a été initialement clonée à partir d'ARN d'iléon de hamsters. On introduit des ADNc de asbt dans des cultures cellulaires ayant une prise d'acides biliaires dépendant du sodium. Un anticorps contre un peptide montre que la protéine est localisée au pôle apical des entérocytes de l'iléon. Des études utilisant des marqueurs photoréactifs ont identifié une protéine se liant aux acides biliaires (~ 100kDa) dans les membranes intestinales (Lin *et al*, 1990). Cette protéine est composée de deux molécules asbt (Kramer *et al*, 1997). Les mutations dans la structure de cette molécule sont associées à des problèmes de mauvaise absorption des acides biliaires chez les humains, cela démontre le concept que l'asbt joue un rôle majeur dans la récupération des acides biliaires dans l'iléon (Oelkers *et al*, 1997).

1.5.4. Les acides biliaires et les transporteurs xénobiotiques dans le foie

La prise des acides biliaires se passe à l'encontre d'un gradient de concentration à travers la membrane basolatérale des hépatocytes. Le principal système de transport dépendant du sodium a été cloné chez le rat et chez l'humain (NTCP) (Meier *et al*, 1995). En général, on observe une diminution de la régulation des NTCP lors des maladies du foie chez les rats et les humains (Trauner *et al*, 1998). Cela peut être expliqué comme une manière de protéger les hépatocytes d'une surcharge d'acides biliaires qui deviendrait toxique à haute concentration.
On a montré une diminution de l'expression de NTCP chez les patients ayant une atrésie biliaire extrahépatique. Chez ces patients, une restauration du flux biliaire par portoentérotomie augmente le niveau d'ARNm de NTCP dans les hépatocytes, cela accrédite le concept que les niveaux d'acides biliaires intracellulaires régulent l'expression du NTCP (Ganguly *et al*, 1997).
Des protéines transportrices, indépendantes du sodium, d'anions organiques (OATP) ont également été clonées chez le rat et chez l'humain (Meier *et al*, 1997). Ces transporteurs sont hautement polyspécifiques et acceptent une grande variété de composants amphiphyliques. A part les acides biliaires et les anions organiques, les membres de la famille de gènes oatp permettent le mouvement transmembranaire de nombreux xénobiotiques (substances exogènes non formées par le métabolisme intermédiaire) et métabolites destinées à l'excrétion biliaire comme le sulfate-3-estrone (Meier *et al*, 1997) (Kullak-Ublick *et al*, 1998). Les forces conductrices pour ces transporteurs ne sont pas clairement établies mais il pourrait s'agir d'échangeurs anions organiques/HCO_3^-. Les oatp1, oatp2 et OATP sont toutes exprimées dans le cerveau, le foie et les reins. Le rôle le plus probable qu'ils aient à jouer est la répartition des xénobiotiques et leurs métabolites (Noe *et al*, 1997).
Un membre d'une autre famille de protéines conférant des résistances aux drogues a été isolé à partir de lignées cellulaires cancéreuses résistantes aux drogues, celles-ci sont appelées protéines associées aux résistances multidrogues (mrp). Mrp1 médie le transport des conjugués du glutathion (Muller *et al*, 1997)
La sécrétion des acides biliaires via les canalicules est un processus dépendant de l'ATP chez *Xenopus laevis*. Des transporteurs de taurocholate également dépendant à l'ATP ont aussi été identifiés chez les plantes et les levures (Madon *et al*, 1997).

Matériel et Méthodes

2.Matériel et méthodes.

2.1. Matériel biologique.

Le modèle expérimental choisi est le carassin doré, un poisson de la classe des Actinoptérigiens de l'ordre des Cypriniformes et de la famille des Cyprinidés. Ces poissons sont des *Carassius auratus*. Les individus d'une cinquantaine de grammes sont élevés dans des bacs par groupe de plusieurs dizaines d'individus (30 à 50). Les bacs sont alimentés par de l'eau de ville à température ambiante (15°C à 20°C) et le trop-plein est filtré par des filtres physiques (le premier composé de brosses verticales, le second de sections de tubes de plastique et le troisième de mousse synthétique).
Un système d'oxygénation de l'eau est également présent sous forme d'un tuyau amenant de l'air directement au fond du bac.
Les poissons sont nourris 1X par jour, le matin avec une quantité de 15 g de nourriture pour truite (SKRETTINAL T-2P Classic) par bac.

2.2. Méthodes

2.2.1 Préparation d'une suspension d'hépatocytes.

2.2.1.1. Solutions

Tampon de suspension hépatocytaire. (Tampon A)

- NaCl (120mM)
- KCl (4.8mM)
- KH_2PO_4 (1.2mM)
- $MgSO_4$ (1.2mM)
- $NaHCO_3$ (24mM)
- Sérum d'albumine bovine (3.5%) (Sigma A3294-50G)

Ce tampon est à pH 7.6 et son osmolarité est de 280 mOsm

2.2.1.2. Principe

Pour obtenir des hépatocytes isolés, la technique de l'incubation à la collagénase (Sigma C-5138 de Clostridium hystolycum type IV) adaptée à celle décrite par Schwartzbaum *et al*, 1994. Cette technique sera préférée à celle de la perfusion a cause du fait que le foie de carassin n'est pas assez dense pour permettre cette étape de perfusion.

2.2.1.3 Mode opératoire.

Isolation des hépatocytes.

- Le poisson est tué en lui donnant un coup à l'arrière de la tête
- Plusieurs foies qui sont placés dans le tampon A directement après la dissection.
- Après passage des morceaux de foie sur un filtre stérile (Falcon, Cell Strain NYL STER), ceux-ci sont séchés sur papier filtre (Schleicher & Schuell)
- 1 g de foie est placé dans 9 ml de Tampon A auquel on ajoute la collagénase (0.5mg/ml de solution) (Sigma C-5138 de Clostridium hystolycum type IV)
- L'ensemble est incubé pendant 30' à température ambiante dans un bain oxygéné. (mélange O_2/CO_2 95 : 5).
- La solution est alors placée sur un filtre FALCON (Falcon, Cell Strain NYL STER)
- On centrifuge 5' à 500xg. (MSE MISTRAL 2000R) à température ambiante.
- Le culot d'hépatocytes est resuspendu dans du tampon A pour obtenir une dilution d'1g de foie dans 9 ml de tampon A pour former la suspension hépatocytaire.

Un comptage cellulaire et un test de discrimination au bleu de Trypan sont pratiqués avant l'incubation à la MC-LR, après celle-ci et après les deux centrifugations.

2.2.2.Comptage cellulaire et test de viabilité.

2.2.1.1. Solution.

Bleu de Trypan 0.4% à partir de bleu de Trypan 0.8% (Sigma T8154) dilué 2X avec de l'H_2O.

2.2.2.2. Mode opératoire

- On mélange de 50 µl de solution d'hépatocytes isolés avec 150 µl de bleu de Trypan
- Agitation manuelle légère.
- Après 3 à 5 minutes mais pas plus de 10 minutes, on pose le mélange grâce à une pipette Pasteur sur la cellule de Bürker (1/400 & 1/25 mm pour une épaisseur de 100µm).

- Mise au point pour à un grossissement de 400X sur un microscope optique. (Axioscope, optique Zeiss, oculaire 10X, objectif 40X).
- On compte les cellules comprises dans un carré de 250 µm de côté.
- Nous observons au moins 10 carrés, 5 carrés présents dans la partie supérieure de la cellule de Bürker et 5 carrés présents dans la partie inférieure de la cellule de Bürker.
- Pour chacun des carrés, on compte le nombre de cellules bleues, (celles ci sont des cellules qui ont incorporés le colorant bleu du bleu de Trypan), ce qui démontre que leur membrane n'est plus intègre. On détermine la viabilité en faisant le rapport (nombre de cellules bleues/ nombre de cellules blanches) *100.
- Les résultats sont exprimés en nombres moyen de cellules par carré.
- On multiplie par une variable pour obtenir le nombre de cellules/ g de foie frais.
- Calcul de la variable : Nombre moyen de cellules par carrés (Nombre total de cellules/par le nombre de carrés comptés)* 4 (dilution due au test au bleu de Trypan) * $10^7/6.25$ (Chaque volume de comptage faisant 250 µm de côté et 100 µm de hauteur, on arrive a $6.25*10^{-3}$ mm^3. En sachant que résultat final se calcule en cellules/ g de foie frais et que l'on dilue 10X chaque gramme de foie frais, on peut transformer la résultat final en cellules/10ml ou bien en cellules/10000 mm^3. Si on a X cellules dans un volume de $6.25*10^{-3}$ mm^3 et que l'on désire arriver à volume final de 10000 mm^3, il faut multiplier par 1000/ $(6.25*10^{-3})$ ou bien $10^7/6.25$. $4*(10^7/6.25) = 6.4\ 10^6$. Si on a X cellules de moyenne par carré, on obtiendra $6.4\ 10^6$X cellules par g de foie frais.

2.2.3. Dosage de la Microcystine-LR.

2.2.3.1. Méthode dite de l'inhibition de la PP-1.

2.2.3.1.1 Principe.

Le principe de cette méthode dite colorimétrique se base sur la spécificité de l'effet inhibiteur de la MC-LR sur les protéines phosphatases de type PP-1 et PP-2 (Eriksson *et al.*, 1990 ; Honkanen *et al.*, 1990 ; Yoshiwaza *et al.*, 1990). Cette méthode de dosage est généralement appliquée à des échantillons d'eau contaminée (Heresztyn & Nicholson, 2001 ; Rivasseau *et al.*,1999).

L'inhibition de l'activité enzymatique de la protéine phosphatase 1 (PP-1) est déterminée en mesurant la production de para-nitrophénol (p-NP) à partir de para-nitrophénylphosphate (p-NPP). Sur cette base, une unité de protéine phosphatase peut être définie comme la quantité de d'enzyme nécessaire pour hydrolyser 1 nmole de p-NPP par minute à température ordinaire et à pH de 8.1.

2.2.3.1.2. Solution et préparation des échantillons.

Tampon de réaction :

- Tris HCl 0.125 M (pH : 8.1)
- $MnCl_2$ 0.4mM
- $MgCl_2$ 8mM
- BSA 1mg/ml (Sigma A-3294)

Tampon d'enzyme :

- EGTA 124mM (dans Tris HCl 80mM pH : 7.0)
- Dithiothréitol (DTT) 10mM (dans NaAc 10mM)
- $MnCl_2$ 4mM
- BSA 0.5mg/ml (Sigma A-3294)

Le tampon d'enzyme est utilisé pour la dilution de la PP-1

- Dithiotréithol : 20mM (DTT, Sigma D-0632)

- Protéine Phosphatase-1 (PP-1) : (Sigma, P-7930)

On dilue les 25 µg de PP-1 avec 0.5 ml d'eau froide et on conserve à -80°C. On décongèle 25 µl auquel on ajoute 975 µl de tampon d'enzyme soit 5 unités par test.

- Microcystine-LR (MC-LR) (Alexis, Biochemicals 350-012) :

On ajoute 200 µl de MeOH à 500 µg de MC-LR. Conservation à - 80°C
On ajoute 1,245 ml d'eau bi distillée à 5 µl de la solution méthanolique.
On prélève 10 µl des 1250 µl de la solution obtenue, on introduit ceux-ci dans 10 ml d'eau bi distillée.

- **Para-nitrophénylphosphate (P-NPP) 120 mM (Sigma N-1620)**

La mesure qui permet de mesurer l'inhibition de production de NitroPhénol se fait à une longueur d'onde de 405 nm dans un spectrophotomètre Packard modèle SpectraCount.
Les mesures se réalisent dans des plaques de 96 puits (Delta, Nunclum).

Quantité de MC-LR par puit en pg	0	20	50	100	150	200
Solution de MC-LR 10µg/µl (en µl)	0	2	5	10	15	20
H_2O distillée en (µl)	20	18	15	10	5	0
Solution de PP-1 en µl	20	20	20	20	20	20
Solution de Tampon de réaction (µl)	100	100	100	100	100	100
Solution de DTT (µl)	20	20	20	20	20	20
Solution de p-NPP (µl)	80	80	80	80	80	80

Remarques: Pour les échantillons, les 80µl de p-NPP 120mM sont remplacés par 20 µl de p-NPP 480mM et un volume variable d'échantillons.

Les mesures d'absorbance à 405 nm seront effectuées après 30', 60', 90', 120'.
Tous les tests seront pratiqués en duplicat ou en triplicat.

Préparation des échantillons

- On ajoute la MC-LR selon la concentration désirée à la solution d'hépatocytes isolés vues au point 3.2.1.
- On mélange manuellement. Le temps d'incubation est variable selon l'expérience. La manipulation se déroule toujours à température ambiante. La solution est oxygénée par de l'oxygène pure.
- On prélève 1 ml de la suspension cellulaire d'hépatocytes successivement dans le temps que l'on centrifuge 5' à 500xg. (ALC Micro Centrifugette 4214) à température ambiante.
- Le culot d'hépatocytes est resuspendu dans du tampon A.-
- On centrifuge 5' à 500xg.
- On ajoute 1 ml dans le MeOH au culot..
- Le tout est placé au congélateur à -80°C

2.2.3.1.3 Mode opératoire

- Après décongélation, les échantillons sont placés 4 heures sur un agitateur (à 4°C)
- On centrifuge à 20000xg à froid pendant 30' (Sorvall RC-5)
- On ajoute 500µl de MeOH au culot, on resuspend.
- On agite une nuit à froid.
- On centrifuge à 20000xg pendant 5'.
- On récupère le surnageant (S2) qui est ajouté au premier surnageant.

- L'ensemble formé par les deux surnageants est placé dans un lyophilisateur (Heto Drywinner Modèle FD 8) jusqu'à évaporation complète du MeOH.
- On resuspend les résidus secs dans de l'H_2O bi distillée.

2.2.3.2. Méthode dite par HPLC (Chromatographie en phase gazeuse)

2.2.3.2.1. Principe.

Le principe de la chromatographie en phase gazeuse repose sur la polarité ou l'affinité du soluté vis à vis de la colonne utilisée. L'échantillon (le soluté) se trouve dans un solvant. Il est injecté sur une colonne spécifique qui retiendra plus ou moins les solutés présents en fonction de leur affinité pour cette colonne et donc de leur polarité. S'ils ont une affinité très faible, ils sortiront en premiers de le colonne et seront détectés par un spectromètre. Plus leur affinité pour la colonne est importante, plus les solutés sortiront tard. Il est nécessaire lorsque l'on recherche une molécule précise de calibrer le chromatographe avec une solution pure pour connaître le moment exact de la sortie de la molécule.
La polarité de la colonne se crée à partir de deux solvants.
Le résultat final donnera un graphique dont l'abscisse varie dans le temps et l'ordonnée donnera l'absorbance à 238 nm.

2.2.3.2.2. Préparation des échantillons et solutions.

Méthanol pour HPLC.
Acétonitrile + TFA 0.05% (0.5 ml de TFA dans 1l d'Acétonitrile)
H_2O + TFA 0.05% (0.5 ml de TFA dans 1l d'H_2O)

Les échantillons sont préparés comme vus dans le dosage de la MC-LR par la technique dite de l'inhibition de la PP-1.

2.2.3.2.3. Mode opératoire.

Des fioles contenant entre 50 et 150 µl d'échantillons sont placées sur un portoir rotatif permettant une automatisation du système. 50µl de chaque échantillon est injecté sur la colonne. Le reste du volume est compris dans le volume mort et permet de ne pas avoir de bulles d'air.
L'échantillon passe sur la colonne (Colonne symetrix Shield RP_{18} 60A 4µm; 4.6 X 250mm). La pompe utilisée est une Waters 600 Controller Pump. L'absorbance est lue par un spectromètre Waters 996 Photodiode Array Detection.

2.2.4.Détermination de l'activité protéine phosphatasique dans les hépatocytes.

2.2.4.1 Principe.

L'inhibition de la Protéine Phosphatase 1 est mesurée à partir de la libération de P^{33} fixé préalablement sur la Phosphorylase b. La libération du P^{33} est inversement proportionnelle à l'inhibition de la PP-1.

2.2.4.2 Solutions.

- Phosphorylase b de muscle de lapin: (Sigma P-6636)
- Phosphorylase Kinase de muscle de lapin: (Sigma P-2014)
- **Tampon A** (100mM Tris-HCl pH 8.2 ;100mM de sodium glycerol-1-phosphate ; 0.1 mM $CaCl_2$, 10 mM d'acétate de magnésium)
- ATP^{33}: Amersham Bioscience 371mBq/ml (AH-9968)
- Sulfate d'ammonium saturé à 90% avec de l'eau bi-distillée (ajusté à pH 6,0).
- Sulfate d'ammonium saturé à 45% avec de l'eau bi-distillée (ajusté à pH 6.0).
- **Tampon B** (50 mM Tris-HCl, pH 7.0 ; EGTA 0.1 mM ; 0.1% de Mercapto-éthanol)
- Acide Trichloroacétique 20% (Riedel de Hoer, 27242)
- Caféine 15 mM (Sigma, C-0750)
- Liquide de scintillation (Lumac, Aqualuma)
- Compteur à scintillations β (Beckman, Modèle 6000 LS)
- Centrifugeuse (Sorvall RC-5)
- ATP (Sigma, A-3377) 5 mM

2.2.4.3. Mode opératoire

2.2.4.3.1 Préparation des substrats phosphorylés.

On incube la phosphorylase b (20 mg) et la phosphorylase kinase (2 mg) 2h à température ambiante dans 500µl de tampon A auquel on ajoute 5 µl de ATPi 0.2 mM (γ-^{33}P).
La réaction est stoppée par ajout de 500µl de sulfate d'ammonium 90%.
Après une incubation de 60' sur glace, on centrifuge la suspension 10' à 17500xg à 4°C.
Le culot est récupéré dans 0.125ml de Tampon B et 0.125 ml de sulfate d'ammonium à 90%.
On centrifuge de nouveau à 17500xg, 10' à 4°C.
Le culot est de nouveau resuspendu dans 0.125 ml de tampon B avec et 0.125 ml de sulfate d'ammonium saturé à 90% contenant 15mM de caféine.
Le substrat (Phosphorylase b-P^{33}) ainsi obtenu est conservé à 4°C.

2.2.4.3.2. Mesure de l'activité de l'activité de la PP-1

On mélange 20 µl du substrat avec 200 µl de sulfate d'ammonium saturé à 45%.
On centrifuge 10' à 15000xg à 4°C.
Le culot est lavé dans 100µl de tampon B contenant 15mM de caféine.
On laisse incuber 50µl d'échantillon avec 100µl de tampon A et 50 µl de solution de substrat.
On récupère 40 µl de cette solution après 0', 30', 60'.que l'on mélange avec 150 µl de TCA (acide Trichloroacétique). On place 10' sur glace puis on centrifuge 10' à 13500Xg à 4°C.
On prélève 10 µl de surnageant que l'on dépose dans 5 ml de liquide scintillation.

L'activité de la PP-1 s'exprime en U/minutes/million de cellules avec 1U= 1 fmole de P^{33} libérée.

2.2.4.Statistiques.

Pour le comptage cellulaire, le nombres de cellules moyennes/g de foie frais est déterminée en faisant la moyenne du comptage d'au moins 10 carrés. Une constante multiplie cette variable pour obtenir le nombre moyens de cellules/g de foie frais. Ces moyennes comptent au moins 10 comptages comme il sera vu dans les résultats, une amélioration de cette technique en ferra compter 15.
La mesure des écarts types effectués dans les différents résultats résulte de l'équation suivante:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}(x_i - \overline{x})^2}$$

Objectif

Objectifs du mémoire

La microcystine-LR est une hépatotoxine libérée par les cyanobactéries ciblant principalement les hépatocytes. La microcystine-LR inhibe les protéines phosphatases intra cellulaires, ce qui occasionne une hyperphosphorylation des protéines du cytosquelette et des protéines associées.
La plupart des études réalisées se sont basées sur des mammifères. Peu d'information existe sur l'impact des hépatotoxines sur les poissons. Il semble intéressant de pouvoir travailler sur un organisme aquatique.
Nous utiliserons comme modèle expérimental le poisson doré, *Carassius auratus*.
C'est à partir du foie de ce cyprinidé que nous établirons une suspension hépatocytaire. La technique d'isolation des hépatocytes a été adaptée à partir de celle de Schwartzbaum (1992).

Nous étudierons dans ce travail l'action de la microcystine-LR sur des hépatocytes isolés et quels sont les dommages que la toxine peut causer sur la cellule.
Nous désirerons observer quels seront les types de dommages causés.
Nous travaillerons directement sur une suspension hépatocytaire et effectuerons nos tests sur des hépatocytes isolés.
Le transport de la microcystine-LR et son action intra-hépatocytaire nous renseigneront sur son action et permettront de mieux connaître les dégâts possibles infligé à la cellule.
La mesure de l'inhibition des protéines phosphatases intra cellulaires sera réalisée pour confirmer l'action moléculaire de la microcystine-LR.
La littérature nous dit que la pénétration de la microcystine-LR dans l'hépatocyte peut se réaliser via des transporteurs transmenbranaires d'acide biliaires (Chong et al, 2001).

Nous analyserons l'impact possible de molécules censées protéger l'hépatocyte vis à vis de l'action de la microcystine-LR dans des suspensions hépatocytaires (Thompson and Pace, 1992). Le taurocholate, un sel biliaire, sera utilisé comme une molécule censée protéger l'hépatocyte de la toxicité de la microcystine-LR

Résultats

4. Résultats

4.1. Mise au point de la technique d'isolation d'hépatocytes

4.1.1 Préparation d'une suspension d'hépatocytes

Une technique d'isolation des hépatocytes de poisson doré, *Carassius auratus* a été décrite par Schwartzbaum (1992) : Il a justifié sa technique par le fait que le foie de carassin ne permet pas de par sa structure diffuse de subir une perfusion. Notre objectif est d'obtenir des hépatocytes dont la viabilité cellulaire est la plus importante possible.
La méthode utilisée pour la dissociation cellulaire est la digestion par la collagénase. Contrairement à la méthode de perfusion qui est souvent utilisée dans la littérature, notamment chez la perche, le foie de Carassin n'est pas assez dense pour subir ce genre de manipulation.
La technique d'isolation des hépatocytes décrite par Schwartzbaum a subi quelques modifications.

- Nous avons pu remarquer que la présence de $CaCl_2$ dans un des tampons d'incubation, ne se justifiait pas. En effet, l'absence de calcium ne modifie pas le nombre de cellules ou la viabilité cellulaire. L'incubation cellulaire se fera donc avec un seul tampon sans $CaCl_2$.

- La présence de BSA (Sérum d'albumine bovine) ne modifie pas l'osmolarité et le pH qui sont respectivement de 280 mOsmoles/l et 7.6. La viabilité cellulaire n'a pas été influencée par la présence de BSA.

- Nous avons testé plusieurs concentrations de collagénase (Sigma C-5138 de Clostridium hystolycum type IV) pour la phase de dissociation cellulaire. La concentration optimale de collagénase (Sigma C-5138 de Clostridium hystolycum type IV) est de 0.5 mg/ml de tampon. Cette dissociation cellulaire se déroule pendant 30' à température ambiante avec une agitation (sous forme de bulles) d'un mélange O_2/ CO_2 (95% / 5%)

- La solution de dissociation est filtrée après 30'. La largeur des mailles du filtre est de 100µm.Cette largeur de maille permet le passage d'hépatocytes dont la taille moyenne est de 20µm (Schwartzbaum, 1994). Le filtrat est ensuite centrifugé

- Cette centrifugation permet de laver les hépatocytes et de retirer la collagénase de leur milieu d'incubation. Plusieurs vitesses et temps de centrifugation ont été testés.

Si la vitesse est trop faible, on retrouve trop de cellules dans le surnageant et on perd des cellules.
Si la vitesse est trop importante, les hépatocytes meurent et c'est le taux de viabilité qui chute.
Les résultats obtenus nous permettent de penser qu'une vitesse de 500xg et un temps de centrifugation de 5' semble adapté à nos conditions expérimentales.

4.1.2 Comptage et viabilité cellulaire.

Le comptage cellulaire et le test de viabilité (voir Matériel et méthode 3.2.2.) nous permettent d'évaluer l'évolution du nombre de cellules et la mortalité cellulaire en fonction de la durée de l'incubation.
Un test à été réalisé pour mesurer l'évolution du nombre de cellules durant une incubation de 240 minutes.

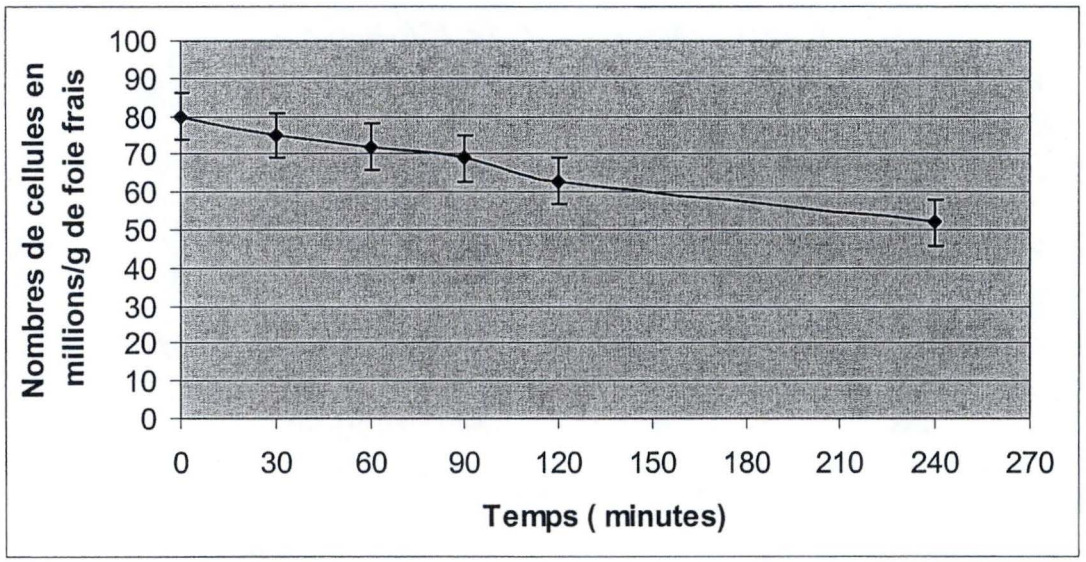


Fig. 1: Evolution du nombre de cellules en fonction du temps d'incubation. Viabilité ≥ 95%.
(n= nombre de poissons = 7)

Nos conditions expérimentales permettent d'affirmer que le nombre d'hépatocytes est de 80.10^6 cellules ± 6.10^6/g de foie frais. Ce chiffre correspond à ceux que l'on peut retrouver dans la littérature dans le cas d'hépatocytes de Carassins Schwartzbaum (1992).

On incube 50µl de solution hépatocytaire avec 150µl de Bleu de Trypan 0.4%. Ce mélange est déposé sur la cellules de Bürker.
La viabilité cellulaire pendant le test a toujours été supérieure à 95%.

Remarque: Nous avons déterminé le nombre optimal de carrés à compter sur la cellule de Bürker. Le comptage des cellules dans 15 carrés différents sur la cellules de Bürker correspond à un nombre optimal de carrés.

Le comptage sera réalisé entre 3 et 15' après le mélange entre le bleu de Trypan et la solution hépatocytaire.

4.2. Accumulation de la microcystine-LR dans les hépatocytes isolés.

4.2.1. Incubations avec la microcystine-LR.

4.2.1.1. Dosage de la MC-LR.

Le principes de la mesure de la concentration en MC-LR par la méthode de l'inhibition de la PP-1 est une méthode colorimétrique indirecte. La MC-LR inhibe la Protéine Phosphatase-1. On détermine l'inhibition de l'activité phosphatasique en mesurant la production de para-Nitrophénol (p-NP) à partir de para-nitrophénylphosphate (p-NPP). La production de p-NP se mesure à une longueur d'onde de 405 nm.

Le test se déroule à température ordinaire. Différents temps de réaction sont étudiés. Des mesures d'absorbance sont effectuées à 0', 30', 60', 90', 120'.
Le test a été modifié pour pouvoir se réaliser dans des microplaques de 96 puits. En effet, de cette manière, on peut multiplier le nombre de tests en parallèle et augmenter les paramètres que l'on peut traiter simultanément.
Différents paramètres ont été modifiés pour adapter cette technique à nos conditions expérimentales.
Différentes concentrations en para-nitrophénylphosphate (p-NPP) et en Protéine Phosphatase ont été testées et nous avons retenus une concentration en p-NPP de 120 mM et de PP-1 de 25U/ml dans le test de réaction.
La droite dite de « calibration » est effectuée lors de chaque dosage par mesure de précaution.
L'évolution de l'absorbance en fonction de la quantité de microcystine-LR permet d'observer une phase de décroissance de type logarithmique (voir figure.2).

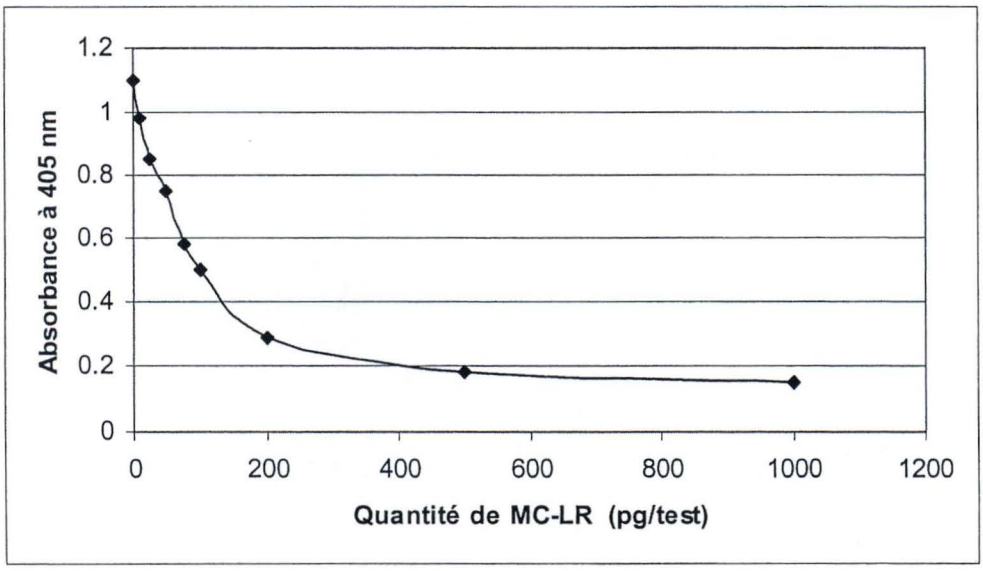


Fig. 2 : Courbe de calibration du dosage en MC-LR

L'utilisation d'une solution diluée de microcystine-LR nous permet d'affiner cette droite de calibration pour obtenir une échelle allant de 0 à 120 pg de microcystine-LR (voir figure.3).

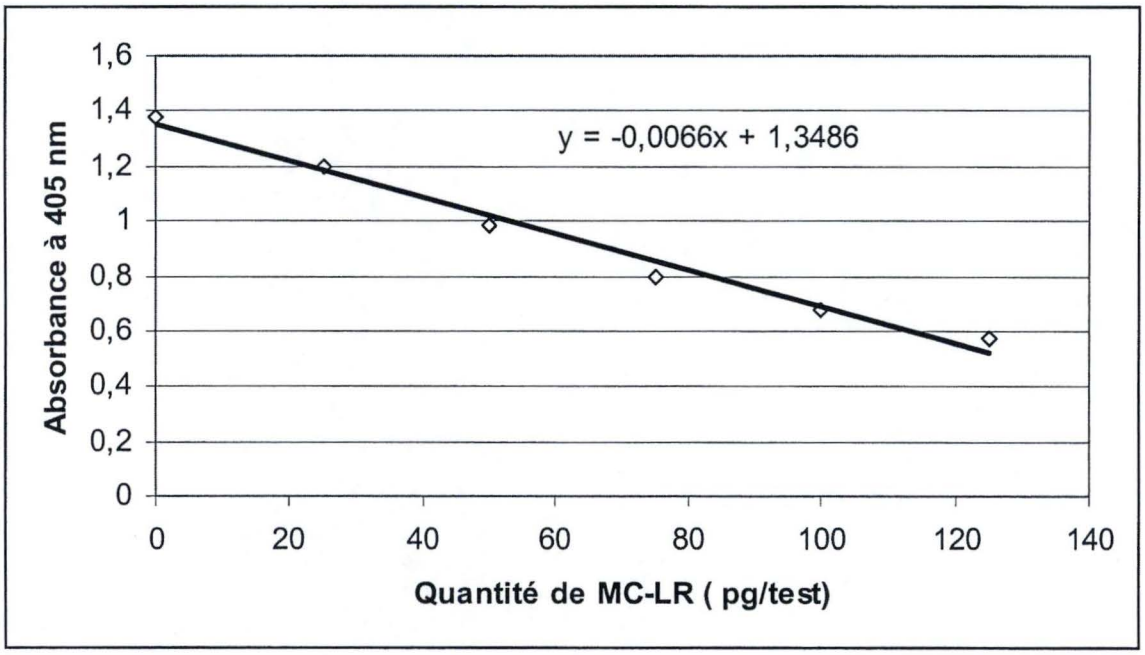


Fig. 3 : Droite de calibration du dosage en MC-LR

4.2.1.2. Viabilité et évolution du nombre des hépatocytes avec et sans MC-LR.

Dans un premier temps, nous avons testé une incubation cellulaire dans un tampon d'incubation (voir Matériel et Méthodes) et observé la diminution du nombre de cellules dans le temps ainsi que la viabilité cellulaire.
On ajoute une quantité de 10µg/l de MC-LR dans le tampon d'incubation.

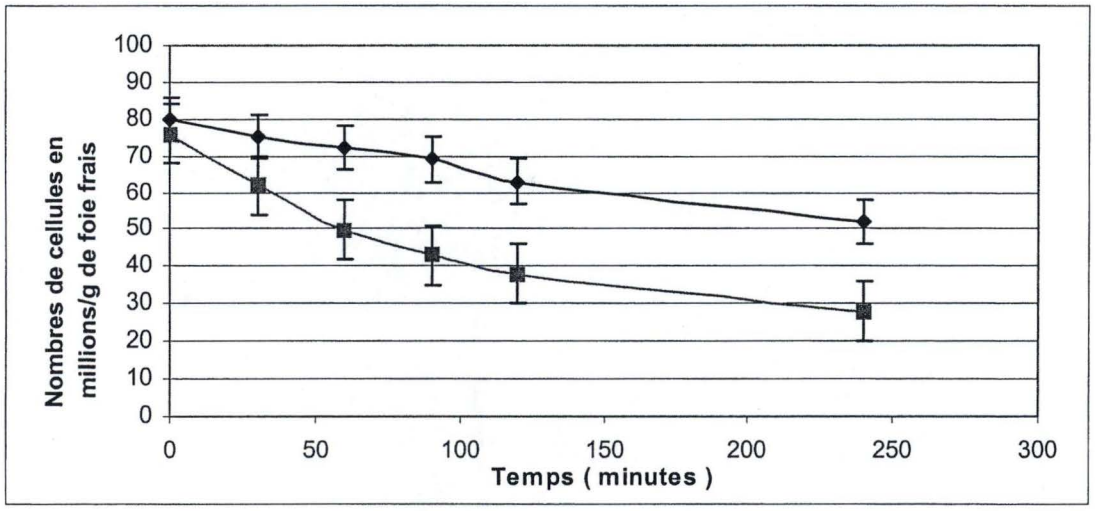


Fig. 4 : Effet de l'incubation d'une suspension d'hépatocytes isolés en présence de (■) MC-LR 10µg/l (n=7= Nombre de poissons) ou (◆) sans MC-LR 10µg/l (n=8=Nombre de poissons)

La viabilité cellulaire reste toujours supérieure à 95% quel que soit le traitement.
Nous constatons que l'incubation avec la microcystine-LR provoque une diminution importante du nombre de cellules.

4.2.1.3. Les effets de différentes concentration en MC-LR sur l'accumulation de la Microcystine-LR dans des hépatocytes isolés

Nous allons maintenant examiner l'accumulation de MC-LR dans les hépatocytes isolés pour plusieurs concentrations en microcystine-LR.
Des concentrations de 10 µg/l, de 5 µg/l est de 2.5 µg/l seront utilisées pour ces tests. Des mesures seront effectuées tout les 15' jusqu' à 30' ensuite toutes les demi-heures jusqu'à 120'.
Pour rappel, la suspension hepatocytaire utilisée est celle qui a été adaptée au chapitre 4.1.1.

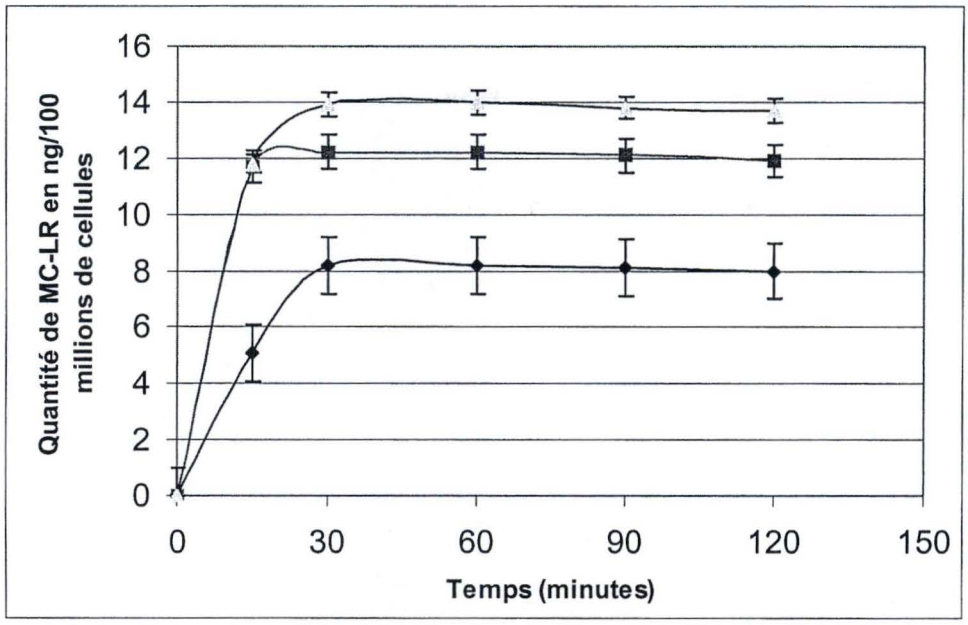


Fig. 5 : Effet de différentes concentrations de MC-LR sur l'accumulation de MC-LR dans des hépatocytes isolés. 10µg/l de MC-LR (Δ) (n= 7=Nombre de poissons), 5 µg/l de MC-LR (■) (n=5=Nombre de poissons), 2.5µg/l de MC-LR (◆) (n=3=Nombre de poissons)

Si on observe les 3 tracés, on remarque le même type de progression, une augmentation de la concentration intra-hépatocytaire en MC-LR qui atteint son maximum un peu avant 30 minutes. Ensuite après 30 minutes, un plateau indique un phénomène de saturation.

Si nous envisageons qu'un hépatocyte mature de taille moyenne a un diamètre de 20 µm. On peut mesurer la concentration intra-hépatocytaire en MC-LR.
Une incubation avec une concentration de 2.5µg/l de microcystine-LR devrait à l'équilibre donner 3,125 ng de MC-LR/10^8 cellules. On en observe 8ng/10^8 cellules grâce aux mesures effectuées.
Une incubation avec une concentration de 5.0µg/l de microcystine-LR devrait à l'équilibre donner 6.25 ng de MC-LR/10^8 cellules. On en observe 12ng/10^8 cellules grâce aux mesures effectuées.
Une incubation avec une concentration de 10.0µg/l de microcystine-LR devrait à l'équilibre donner 12,5 ng de MC-LR/10^8 cellules. On en observe 14ng/10^8 cellules grâce aux mesures effectuées.

Considérant une taille dite moyenne, la concentration mesurée marque assez bien un phénomène de saturation
L'incorporation semble être un phénomène "rapide" dépendant de la concentration en MC-LR dans nos conditions expérimentales.
Etant donné que taux de microcystine intracellulaire atteint son maximum aux environs de 30' de temps d'incubation, les prochaines tests mesurant la concentration interne des hépatocytes ne s'étendront pas au delà de 60'.

4.2.2.L'effet du taurocholate sur l'accumulation de la microcystine-LR intra-hépatocytaire.

Le taurocholate ($C_{26}H_{44}NNAO_7S$) est un sel biliaire. Les sels biliaires primaires sont produits par le foie. Il résulte de la liaison entre la choline, le sel biliaire le plus important et la taurine. Le taurocholate forme donc un sel biliaire secondaire. La littérature montre que le taurocholate peut protéger l'hépatocyte contre les toxines (Thompson and Pace, 1992). Nous pensons que le taurocholate pourrait modifier l'accumulation de la microcystine-LR dans les hépatocytes.

4.2.2.1. Viabilité et mesure du nombre d'hépatocytes incubés avec de la microcystine et du taurocholate.

De premiers tests ont été effectués pour observer l'évolution du nombre cellulaire sans taurocholate et avec deux concentrations différentes du sel biliaire ; 50µM et 500µM.
La première concentration pourrait être considérée comme une concentration physiologique tandis que la seconde comme une concentration aiguë (Thompson *et al*, 1994).

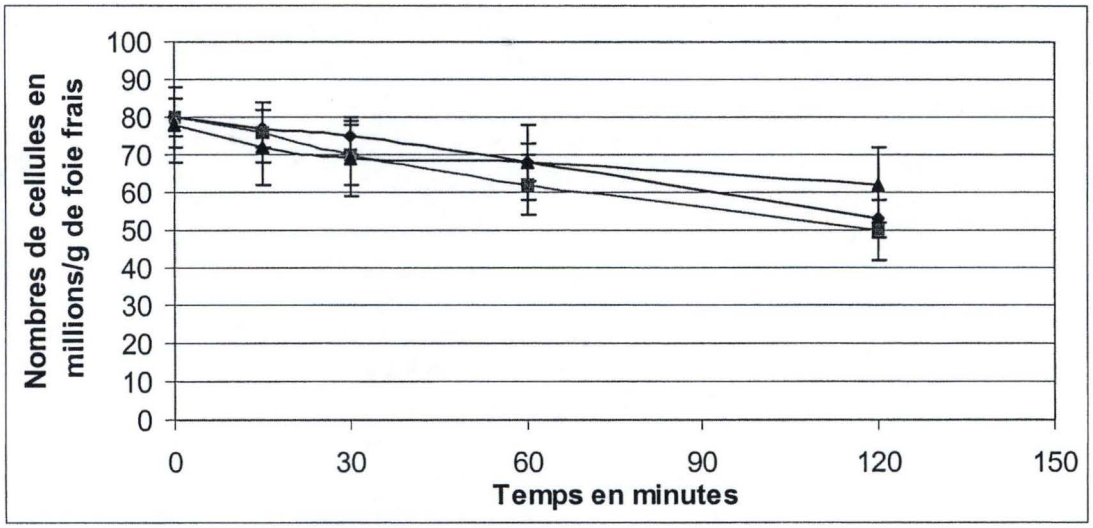


Fig. 6 : Effet de l'incubation d'une suspension d'hépatocytes isolés (■)avec du taurocholate 50µM (n=5= Nombre de poissons), (▲)taurocholate 500µM (n = 3=Nombre de poissons) ou (◆) ou sans taurocholate (n=7=Nombre de poissons)

On peut observer à partir de ce graphique qu'il n'y a pas différences statistiques entre les trois évolutions de population cellulaire. Les écarts types se chevauchent. On peut conclure de ce graphique qu'une incubation avec du taurocholate ne modifie pas l'évolution du nombre cellulaire dans le temps quel que soit la concentration (50 µM ou 500µM).
La viabilité cellulaire est toujours à 95%.

Nous incubons maintenant à une concentration de 50µM de taurocholate, donc une concentration physiologique.

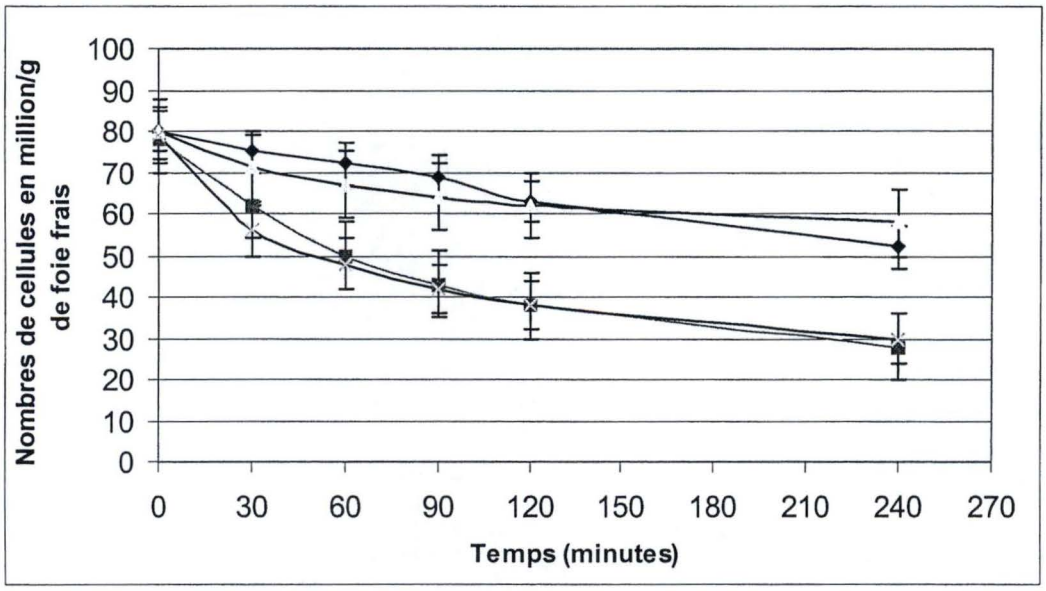


Fig. 7 : Effet de l'incubation d'une suspension d'hépatocytes isolés en (◆) présence uniquement de tampon, n= 7,(△) de taurocholate 50µM n = 5, (■) de microcystine-LR 10µg/l n=3, (✕) de microcystine-LR et de taurocholate 50µM n =6. (n= Nombre de poissons).

Nous confirmons l'effet de la microcystine-LR mais la présence de taurocholate 50µM ne modifie pas l'effet de la Microcystine-LR sur l'évolution du nombre de cellules. Le taurocholate ne protège pas l'hépatocyte contre la mort cellulaire provoquée par la MC-LR.. Les différentes mesures de viabilité cellulaires sont encore toutes supérieures à 95%.

4.2.2.2. Étude de l'impact du taurocholate sur l'accumulation de microcystine-LR intra-hépatocytaire.

Si nous incubons une solution hépatocytaire en présence de microcystine-LR (10µg/l) et de taurocholate 50µM. La figure.8 nous montre l'évolution de la concentration intra-hépatocytaire en microcystine-LR et nous mesurons une quantité de microcystine-LR intracellulaire très proche que l'incubation se déroule avec ou sans taurocholate.

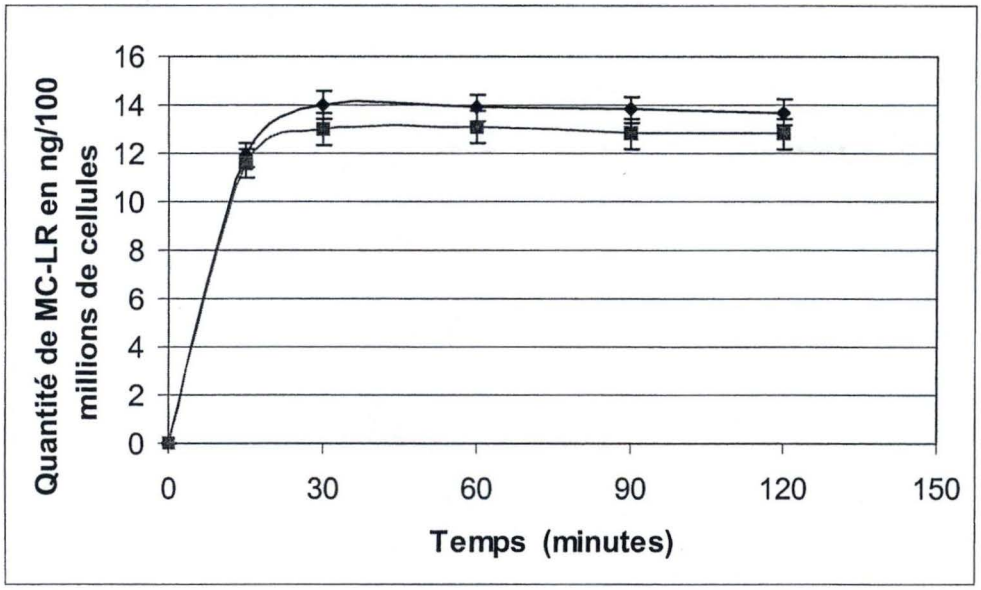


Fig. 8 : Effet de la présence de taurocholate 50µM, dans des solutions hépatocytaires sur l'accumulation de MC-LR dans des hépatocytes isolés. (◆)10µg/l de MC-LR (n= 7), (■) 10 µg/l de MC-LR + 50µM de taurocholate 50µM (n= 5). (n= Nombre de poissons)

La figure.8 nous montre que le taurocholate 50µM ne modifie pas l'accumulation de la microcystine-LR qui reste comparable à une incubation sans taurocholate (voir figure. 5).

4.2.2.2.1. Étude de l'impact du taurocholate sur l'accumulation de microcystine-LR par la technique de l'HPLC.

L'HPLC (chromatographie en phase gazeuse) est une technique permettant de mesurer la concentration d'une substance donnée dans un échantillon.

Dans un premier temps, nous déposons sur une colonne Symetrix RP_{18} successivement différentes quantités de microcystine-LR (Sigma C-5138 de Clostridium hystolycum type IV) diluée dans la MeOH, ce qui permet (figure.9) d'associer "une surface de pic" avec une quantité de microcystine-LR.

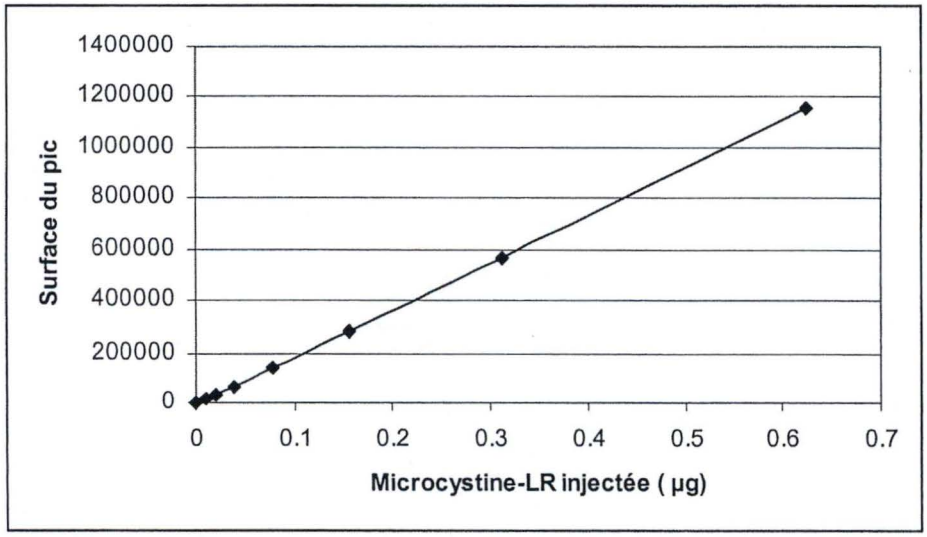


Fig.9: Droite permettant d'associer une surface de pic et une quantité de Microcystine-LR dans 50µl de solution. Les unités de surface sont des unités arbitraires.

La figure. 10 donne un exemple du spectre observé pour une quantité déposée de 500ng/120µl.

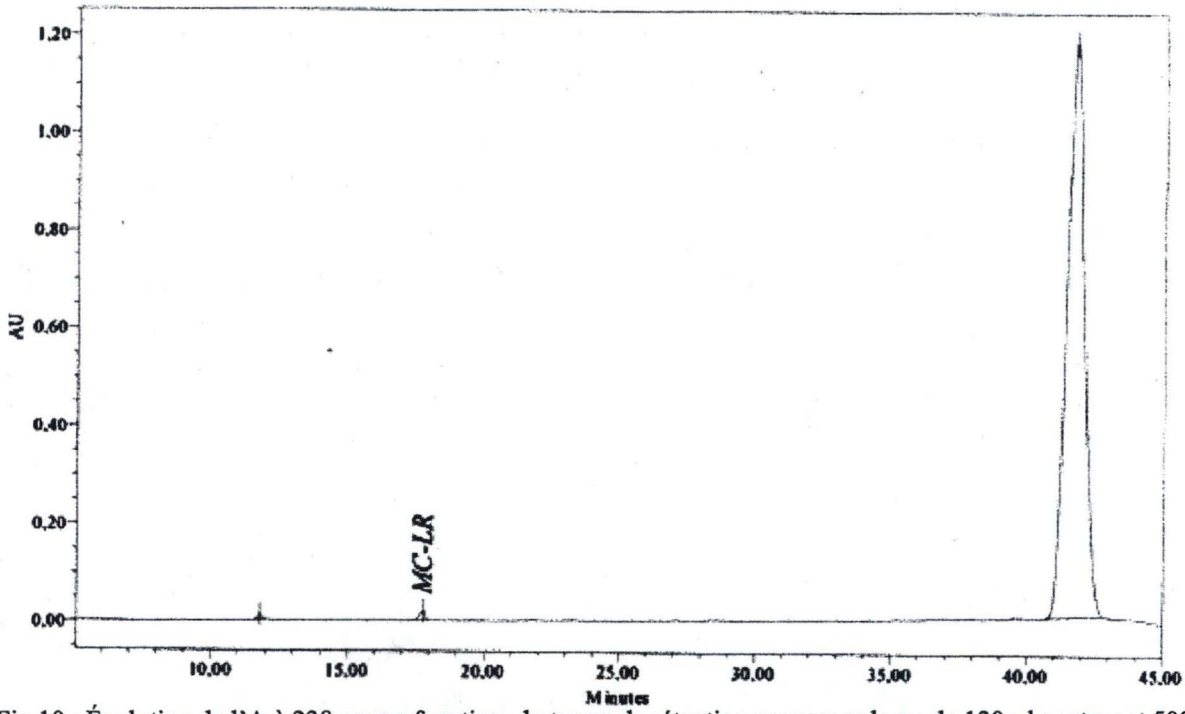


Fig.10 : Évolution de l'A à 238 nm en fonction du temps de rétention pour un volume de 120 µl contenant 500 ng de MC-LR. L'ordonnée représente les unités d'abosrbance

La microcystine-LR (Sigma C-5138 de Clostridium hystolycum type IV), est éluée après un temps de 17.8 minutes.
Si nous ajoutons maintenant à une quantité de MC-LR (1000ng/120µl), une suspension hépatocytaire ($1,2.10^8$ cellules), la figure.11 montre que l'ajout de solution hépatocytaire ne modifie pas l'élution de la MC-LR.

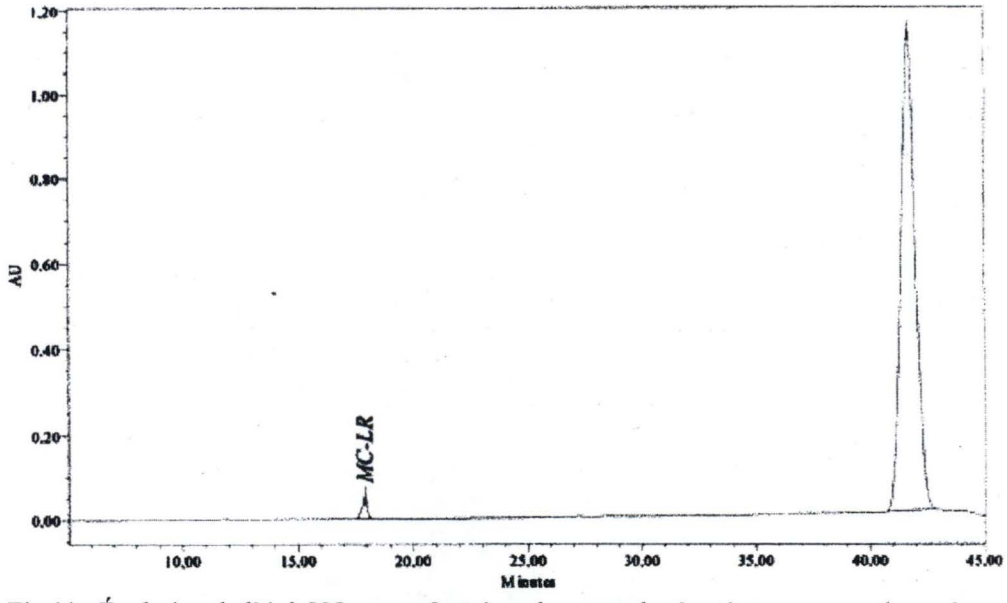


Fig.11 : Évolution de l'A à 238 nm en fonction du temps de rétention pour un volume de 120 µl contenant 500 ng de MC-LR et $1,2.10^8$ cellules. L'ordonnée représente les unités d'abosrbance

Conscients que la détermination de la concentration en microcystine-LR par la méthode dite de l'inhibition de la protéine phosphatase 1 est plus sensible que la méthode dite par HPLC, nous avons néanmoins tenté de mettre en évidence la MC-LR par la technique de chromatographie en phase gazeuse. Dans nos conditions expérimentales, soit 120 ng de microcystine-LR pour un volume final posé sur colonne de 120µl de solution de MeOH avec hépatocytes ($1,2.10^8$ cellules)

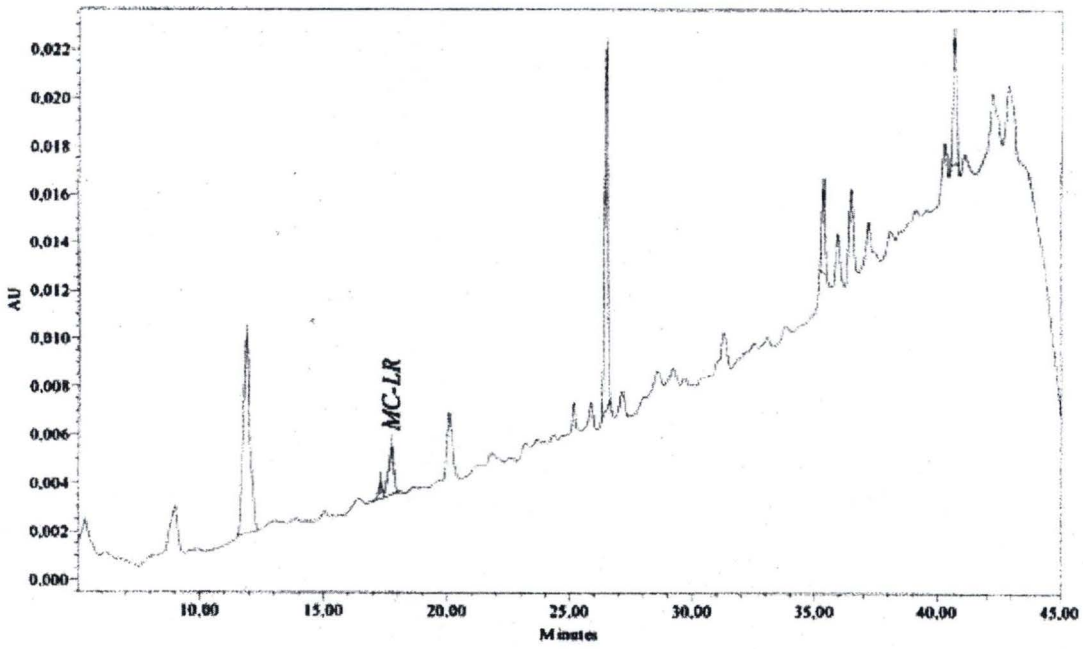


Fig.12 : Évolution de l'A à 238 nm en fonction du temps de rétention pour un volume de 120 µl contenant 50 ng de MC-LR et $1,2.10^8$ cellules. L'ordonnée représente les unités d'abosrbance

Si une concentration de taurocholate 50µM est ajoutée à la solution hépatocytaire,($1,2.10^8$ de cellules) contenant une quantité de 10µg/l de MC-LR, la figure. 13 montre qu'il n'y a pas de modifications de l'aire du pic. Celle-ci est de 29690 comparée à celle de l'incubation sans taurocholate qui est de 28400 (voir figure.12).
L'ajout de taurocholate 50µM ne modifie pas la quantité de microcystine-LR mesurée dans les hépatocytes.
Nous confirmons bien les résultats que nous avions obtenus par la méthode dite d'inhibition de la PP-1.

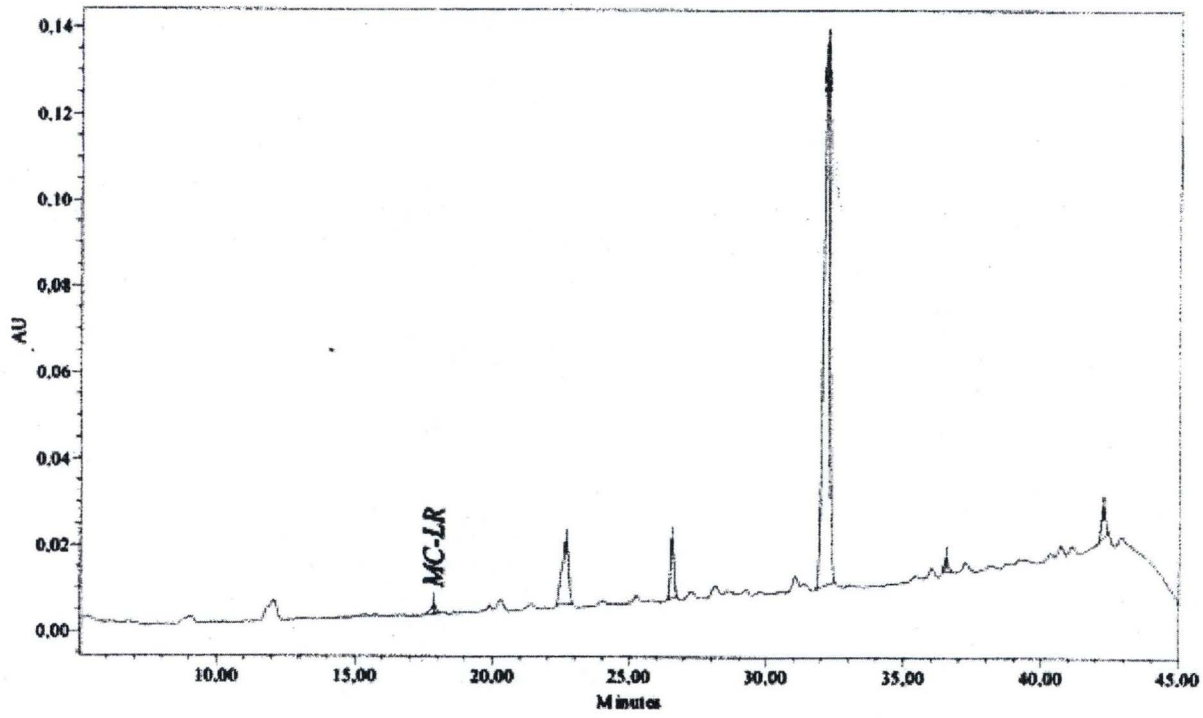


Fig.13 : Évolution de l'A à 238 nm en fonction du temps de rétention pour un volume de 120µl contenant 50 ng de microcystine-LR avec $1,2.10^8$ cellules ayant incubé avec du taurocholate 50µM. L'ordonnée représente les unités d'abosrbance

Des quantités inférieures de microcystine-LR ont été testées mais il n'a pas été possible de retrouver celles-ci par la technique de l'HPLC.

4.2.3.Mise en évidence de l'effet de la microcystine-LR sur l'activité des protéines phosphatases d'une solution hépatocytaire.

Chez les mammifères, on sait que la microcystine-LR inhibe les protéines phosphatases (Falconer and Yeung, 1992). Celles-ci sont largement impliquées dans le métabolisme des hépatocytes notamment en phosphorylant les protéines du cytosquelette et des protéines associées à celui-ci.
On observe un effondrement des micro filaments d'actine du cytosquelette dans les hépatocytes qui précède la dislocation des autres protéines comme l'actinine et la taline, (Cohen, 1989) provoquant la déstructuration du cytosquelette qui occasionne la mort cellulaire.
Chez le poisson, Pflugmacher *et al*,(1998), montre une comparaison entre la modification d'activités de protéines phosphatases en fonction des l'accumulation en MC-LR introduite par injection chez *Cyprinus carpio*. Ce genre d'étude a également été réalisé chez la *Oncorhynchus mykiss* (Fischer et al.,2000).

Nous avons mis au point le dosage des protéines phosphatases dans une solution hépatocytaire de *Carassius auratus.*

Rappelons que ce dosage se base sur la libération de P^{33} fixé préalablement sur la phosphorylase b..

Dans un premier temps, un substrat contenant du P^{33} est mis au point après une série d'incubation et de centrifugation. Celles-ci ont pour but de récupérer un culot avec lequel on incubera une solution issue d'échantillons cellulaires.

Ces échantillons cellulaires proviennent de solutions hépatocytaires ayant incubés avec de la microcystine-LR, du taurocholate 50µM ou bien les deux simultanément. Les temps d'incubation sont de 15' et de 30'.

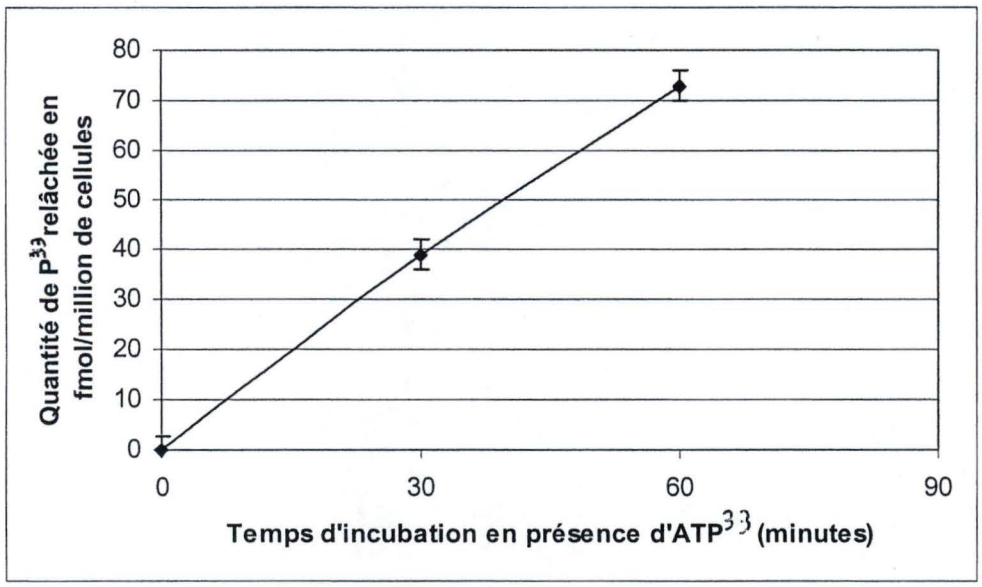


Fig.14 : Évolution de la libération de P^{33} en fonction du temps d'incubation en présence d'ATP^{33}. n = 5 (n = nombres de poissons différents).

Nous allons mesurer l'activité de la protéine phosphatase 1 dans les solutions hépatocytaires ayant subit 15' d'incubation (voir figure. 15) et celles ayant subi 30' d'incubation (voir figure .16) avec de la microcystine-LR et du taurocholate 50µM.

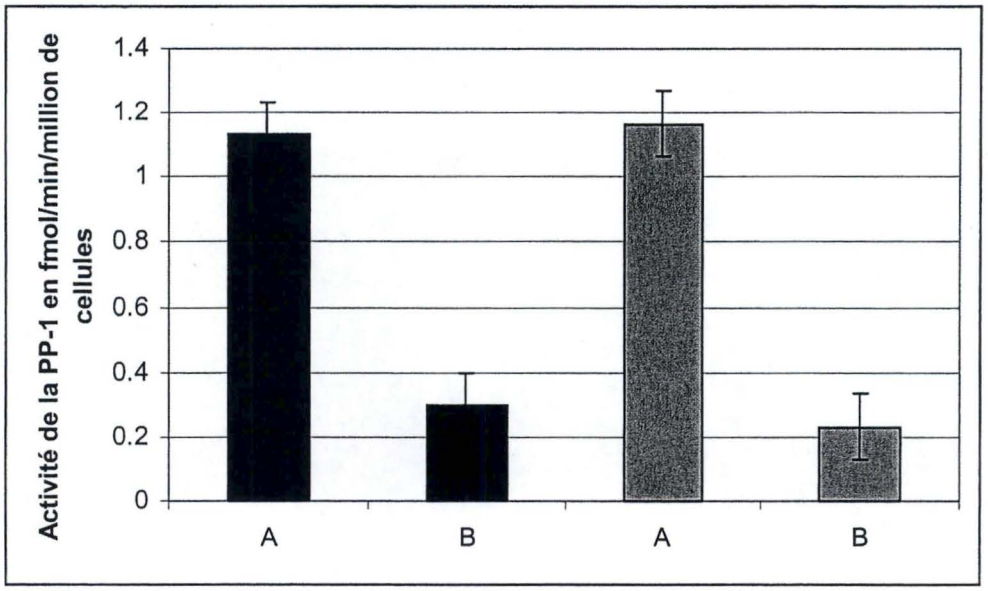


Fig. 15 : Activité Protéine Phosphatasique de cellules ayant incubé (■) sans taurocholate et (■)avec taurocholate 50µM. A représente une incubation sans MC-LR et la B avec MC-LR (10µg/l) après **15 minutes** d'incubation. (n=3= nombres de poissons)

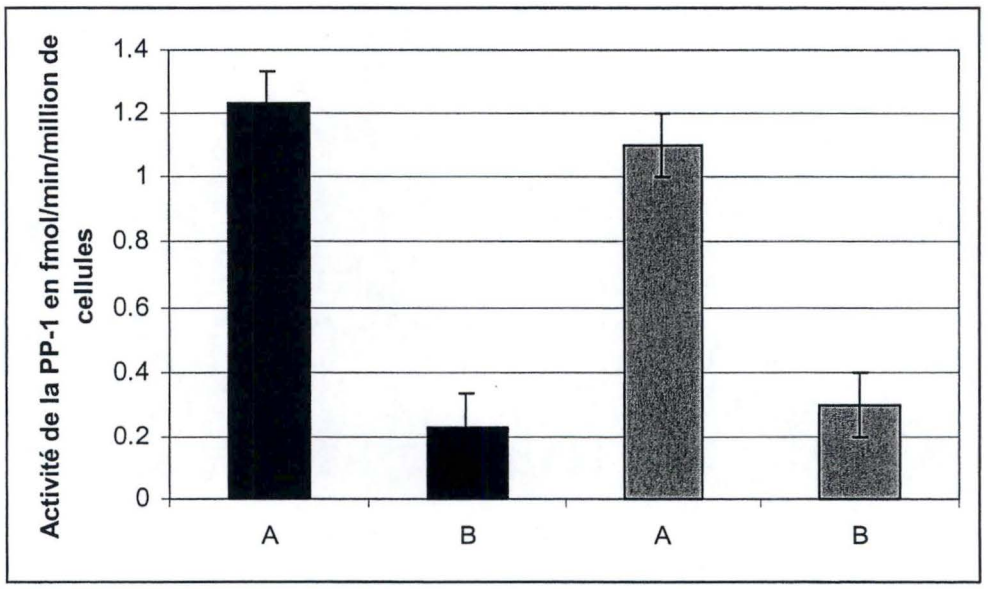


Fig. 16 : : Activité Protéine Phosphatasique de cellules ayant incubé (■) sans taurocholate et (■)avec taurocholate 50µM. A représente une incubation sans MC-LR et la B avec MC-LR (10µg/l) après **30 minutes** d'incubation. (n=3= nombres de poissons)

Nous pouvons remarquer qu'après 15', les protéines phosphatases sont déjà inhibées au maximum, ce qui démontre bien la rapidité du phénomène de pénétration cellulaire mais aussi d'inhibition de l'activité phosphatasique

Nous pouvons faire quelques observations,

- Une incubation de 15' ou de 30' de la solution hépatocytaire avec de la microcystine-LR (10µg/l) diminue l'activité des protéines phosphatases hépatocytaires
- Une incubation de 15' ou de 30' de la solution hépatocytaire avec du taurocholate 50µM ne modifie pas les protéines phosphatases.
- La présence de taurocholate 50µM ne modifie pas cette diminution d'activité de la protéine phosphatase observée en présence de microcystine-LR.

Cette inhibition de la protéine phosphatase dans une solution hépatocytaire incubée en présence de microcystine-LR, confirme nos résultats qui démontrent une accumulation de MC-LR dans cette solution hépatocytaire.
De plus, l'absence d'effet du taurocholate à une concentration de 50µM semble renforcer l'hypothèse selon laquelle que, dans nos conditions expérimentales, le taurocholate ne protège pas l'hépatocyte de l'activité toxique de la MC-LR en inhibant son « transport » dans l'hépatocyte.

Conclusions générales et perspéctives

5. Discussion générale et perspective

La microcystine-LR est une hépatotoxine libérée dans les milieux aquatiques par les cyanobactéries. L'espèce de cyanobactérie la plus courante libérant ces toxines *est Microcystis aeruginosa*. La microcystine-LR cible principalement le foie et ses cellules, les hépatocytes. L'accumulation de microcystine dans le foie est illustrée par des études montrant que 24H après une ingestion de microcystine-LR, 70% de la microcystine-LR se retrouvait dans le foie de rat (Brooks & Codd, 1987 ; Meriluoto et al.1990 ; Lin & Chu, 1994).
Il a pu être montré que les dégâts occasionnés au foie par la microcystine sont causés par une inhibition des protéines phosphatases (PP) notamment la PP-1 et la PP-2A.
Ces inhibitions de protéines phosphatases causent une hyperphosphorylation des protéines du cytosquelette, notamment l'actine et les protéines associées (Falconer et al, 1992 ; Ding et al, 2000). Ces phosphatases déphosphorylent des résidus sérine/thréonine d'un grand nombre de protéines de régulation et structurelle (Cohen, 1989).
La plupart des études portant sur les dégâts occasionnés par la microcystine ont été réalisées sur les mammifères.
Peu d'études ont été réalisées sur les organismes aquatiques. Il semble intéressant de pouvoir travailler sur un poisson.
Notre travail portera sur un organisme aquatique, le poisson doré ou *Carassius auratus*. Ce choix a été réalisé compte tenu du fait que l'on retrouve essentiellement la microcystine-LR dans les eaux mais aussi parce que le poisson peut se trouver dans un milieu contenant de la microcystine-LR.

Dans un premier temps, nous avons adapté la technique d'isolation des hépatocytes décrite par Schwartzbaum (1994).
Nous avons modifié le tampon d'incubation, la vitesse et le temps de centrifugation ainsi que la quantité de collagénase permettant la dissociation cellulaire et le temps nécessaire à cette incubation.
Le nombre de cellules/ g de foie frais a été mesuré, il est de 80.10^6 cellules $\pm$ 6.10^6 (voir figure.1 n=7). Ce nombre correspond à ceux que l'on retrouve dans la littérature en ce qui concerne le *Carassius auratus*.
La viabilité cellulaire est la mesure du nombre de cellules viables sur le nombre de cellules mortes. Ce nombre a toujours été supérieur à 95%. Il est important de garder un nombre important de cellules viables car c'est à partir de matériel vivant que l'on désire observer l'action de la microcystine-LR sur les hépatocytes isolés.

Nous avons choisi la concentration de travail de 10µg/l de microcystine-LR car il était nécessaire de se trouver une concentration qui n'était ni trop faible, ce qui aurait rendu le dosage de la MC-LR trop difficile, ni trop élevée pour éviter la destruction cellulaire.

Nous remarquons sur la figure.4 que la diminution du nombre de cellules dans le temps est plus importante lorsque celles-ci incubent avec la MC-LR.
On pourrait expliquer cette mort cellulaire progressive par une déformation du cytosquelette occasionnée suite à l'hyperphosphorylation des protéines de celui-ci (Falconer and Yeung, 1992).

Plusieurs techniques permettent de mesurer la MC-LR notamment : celle de l'inhibition de la protéine phosphatase, la technique dite de l'HPLC, le test ELISA, la spectrométrie de masse, la technique de mesure par agent fluorescent ou par ozonolyse.
Nous avons choisi la technique dite de l'inhibition de la phosphatase comme technique de mesure car c'est la technique la plus sensible.
Nous avons adapté cette technique de dosage à l'utilisation de microplaques avec multipuits de 300µl puisque nous déterminons la MC-LR dans un système cellulaire.
Il a été nécessaire de modifier des paramètres de cette méthode comme la concentration en réactifs, le temps de réaction.
Les résultats de ces tests montrent que l'on arrive rapidement (entre 30' et 60') à un palier en ce qui concerne la concentration en microcystine-LR (voir figure.5). Ces plateaux se situent à des concentrations différentes selon la quantité de MC-LR injectée dans la solution hépatocytaire.
La MC-LR pénétrerait rapidement dans la cellule avant d'atteindre un niveau d'équilibre avec l'environnement extracellulaire.
D'autre part, on sait que la pénétration de la microcystine-LR dans l'hépatocyte se réalise via les transporteurs transmenbranaires d'acides biliaires (Chong et al, 2001).
Nous allons ajouter un adjuvant à la solution hépatocytaire contenant de la microcystine-LR : le taurocholate, un sel biliaire.
L'ajout de cette molécule permettra de mesurer si celle-ci a un impact sur la toxicité de la microcystine-LR. En effet, le taurocholate pourrait protéger l'hépatocyte lorsque celui-ci est soumis à des toxines (Thompson and Pace, 1992)
Le taurocholate est composé de choline qui est le sel biliaire le plus produit par le foie et de la taurine, un acide aminé. La taurocholate se retrouve dans l'environnement hépatocytaire de par son origine biliaire.
De articles mentionnent qu'une concentration de 50µM (Runnegar et al, 1995) ou de 100µM (Eriksson et al, 1990) de taurocholate puisse protéger l'hépatocyte, chez le rat, de la toxicité de la microcystine-LR.
Avant d'ajouter du taurocholate avec la microcystine-LR dans une solution hépatocytaire, nous avons testé une incubation cellulaire sans MC-LR, uniquement avec du taurocholate. Aucune modification de l'évolution du nombre de cellules ni de la viabilité n'a pu être observée.

Les figures 7 et 8 montrent que l'on ne peut observer aucune modification de la pénétration de la MC-LR dans la cellule lorsque du taurocholate est ajouté à la suspension hépatocytaire.

La technique dite de l'HPLC (chromatographie en phase gazeuse) a été utilisée également (voir figure.9 à 13) et ceci pour permettre d'observer les pics correspondant à des métabolites éventuels de la microcystine-LR.
Il a été démontré que la microcystine-LR, durant la première étape de sa conjugaison se liait au glutathion grâce à la gluthation-S-transférase (Pflugmacher et al. 1998).
Nous étions bien conscient que cette technique ne permettrait pas d'obtenir une mesure de concentration, dans nos conditions expérimentales, adaptée à nos échantillons, nous avons observé néanmoins que cette technique permettait de mesurer avec précision des quantités importantes de microcystine-LR (voir figure.10 et 11).
Toutefois, pour des quantités plus proches de celles que nous utilisons, cette technique n'est pas applicable (voir figure.12 et 13).

Si on rappelle que la microcystine-LR est un inhibiteur spécifique des protéines phosphatases (PP-1 et PP-2A), une mesure de l'activité de la PP-1 dans les conditions où nous mettons en évidence la présence de MC-LR intra hépatocytaire devrait pouvoir confirmer la présence intracellulaire (et non la liaison « membranaire » de MC-LR comme certains le supposent parfois) de microcystine-LR.
Nous avons mis au point le dosage de l'activité de la protéine phosphatase et adapté cette technique à l'utilisation de suspension hépatocytaire. Des paramètres ont dû être modifiés comme l'augmentation de la quantité de cellules pour les tests.

L'inhibition des phosphatases est la cause principale de la mort cellulaire chez les cellules ayant incorporé de la MC-LR. Nous allons donc mesurer cette inhibition à partir d'hépatocytes isolés ayant incubés avec de la microcystine-LR.

Des échantillons cellulaires ayant incubés avec de la microcystine-LR, du taurocholate ou les deux simultanément on été incubé avec un substrat composé entre autres d'ATP^{33}.

Après des temps différents, les échantillons sont lavés et centrifugés pour permettre d'extraire le P^{33} libéré par les phosphatases.
Lorsque nous incubons avec la microcystine-LR, l'activité de base des protéines phosphatases diminue déjà après 15 minutes d'incubation.
Le taurocholate ne change rien à cette inhibition de la PP-1 (voir figures.15 et 16).
Cette inhibition confirme bien le fait que la MC-LR pénètre dans les hépatocytes car seules les protéines phosphatases intra cellulaires peuvent être inhibées.
L'absence d'effet du taurocholate confirme bien les résultats précédents et ceci démontre bien que le taurocholate ne modifie pas l'aspect d'inhibition des phosphatases causés par la microcystine-LR.

En conclusion, ce travail nous a permis d'isoler une suspension hépatocytaire viable à partir du foie du poisson doré, *Carassius auratus* tout en sachant que le nombre de cellules diminue dans le temps.
Il a également permis de mettre au point le dosage de la microcystine-LR dans un « système cellulaire » en utilisant le principe d'inhibition de la phosphatase PP-1 par la microcystine-LR. Cette technique a fait l'objet d'adaptations pour pouvoir être utilisée sur des microplaques.

Une meilleure connaissance du système de pénétration de la microcystine-LR dans les cellules permet de mieux comprendre l'action de la MC-LR et la manière dont celle-ci est régulée par la cellule. Nous avons déjà évoqué l'hypothèse que la microcystine-LR puisse pénétrer dans les hépatocytes notamment via les transporteurs transmenbranaires de sels biliaires. (Bravo et al, 1993). L'utilisation d'inhibiteurs de ces transporteurs de sels biliaires permettrait de confirmer cette hypothèse mais nos résultats montrent que dans nos conditions expérimentales, d'autres mouvements pourraient expliquer le transport de la microcystine-LR.

La microcystine-LR outre son action d'inhibition de protéines phosphatases crée aussi un stress oxydatif (Ding et al, 1998). Il serait intéressant d'observer l'impact de l'ajout de molécules protectrices comme le glutathion ou le Sélénium (Gavin et al, 2001). Ces molécules protectrices pourraient être mises en contact avec les hépatocytes de deux manières différentes. On pourrait l'injecter directement dans une solution hépatocytaire ou bien l'intégrer dans un régime alimentaire avec lequel les poissons seraient nourris.

La protéomique est un outil qui nous permettrait d'affiner une approche qui faciliterait une étude plus moléculaire de l'effet de la microcystine-LR. Ceci pourrait être réalisé au niveau des différents systèmes de phosphorylation.
Il serait nécessaire d'utiliser une suspension cellulaire, la protéomique déterminerait l'état de phosphorylation des protéines intra hépatocytaires.

Cette analyse de l'impact de l'effet de la MC-LR pourrait s'étendre à l'action que pourraient jouer des molécules protectrices comme les flavonoïdes, le zinc, le sélénium et les vitamines A, C , et E (Sun J. et al. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, **67** , 155-163, 1997) et qui ajoutées à une solution hépatocytaire contenant de la microcystine-LR, pourraient limiter l'effet des cyanobactéries sur les organismes aquatiques.

Bibliographie

Bibliographie

Adams, H., Stoner, R.D., Adams, D.G., Read, H., Slatkin, D.N. and Siegelman, H.W. Prophylaxis of cyanobacterial and mushroom cyclic peptide toxins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **249**, 552-556 (1989).

Amelsberg, A., Schteingard, C.D., Ton-nu, H.-T., Hofmann, A.F. Carrier-mediated jejunal absorption of conjugated bile acids in the guinea pig. *Gastroenterology* **110**, 1098-1106 (1996).

An, J. and Carmichael, W.W. Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. *Toxicon* **32**, 1495-1507 (1994).

Anderson, K.E., Kok, E., Javitt, N.B. Bile acid synthesis in man: metabolism of 7α-hydroxycholesterol-^{14}C and 26-hydroxycholesterol-^{3}H. *J. Clin. Invest.* **51**, 112-117 (1972)

Antonenkov, V.D., van Veldhoven, Waelkens, P.P.E, Mannaerts, G.P. Substrate specificities of 3-oxoacyl-CoA thiolase A and sterol carrier protein 2/3-oxoacyl-CoA thiolase purified from normal rat liver peroxisomes. *J. Biol. Chem.* **502**, 26023-26031 (1997)

Bell, S.G. and Codd, G.A. Cyanobacterial toxins and human health. *Rev. Med. Microbiol.* **5**, 256-264 (1994).

Bravo, P. el-Mir M.Y., Serrano M.A., Boyd R, Marin J.J. Interaction between cholephilic anions and bile acid transport across basal membrane of human trophoblast. *Am. J. Physiol.* **265**, G242-249 (1993)

Brooks, W.P., Codd, G.A. Distribution of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin and interactions with hepatic microsomes in mice. *Pharmacology and toxicology.* **60**, 187-191 (1987).

Carmichael, W.W. A review : cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins. *Journal of applied bacteriology.* **72**, 445-459 (1992).

Carmichael, W.W. The toxins of cyanobacteria. *Scientific American.* **270** (1), 78-86 (1994).

Cousins, I.T. Biodegradation of microcystin-LR by indigenous mixed bacterial populations. *Water research.* **30**, 481-485 (1996).

Cousins, I.T., Bealing, D.J., James, H.A., and Sutton, A. Biodegradation of microcystin-LR by indigenous mixed bacterial populations. *Water Res.* **30**, 481-485 (1996).

Craig, M., Luu, H.A., McCready, T.L., Williams, D., Andersen, R.J., Holmes, C.F. Molecular mechanisms underlying the interaction of motuporin and microcystins with type-1 and type-2A protein phophatases. *Biochem. Cell. Biol.* **74**,569-578 (1996).

Dillenberg, H.O., Dehnel M.K. Toxic water bloom in Saskatchewan. *Canadian Medical Association journal.* **83**, 1151-1154 (1960).

Ding, W.D., Shen, H.-M., Ong, C.-N. Microcystic cyanobacteria extract induces cytoskeletal disruption and intracellular glutathione alteration in hepatocytes. *Environ. Health Perspect.* **108**, 605-609 (2000).

Eriksson, J.E., Toivola, D., Meriluoto, J.A.O., Karaki, H., Han, Y. and Hartshorne, K. Hepatocyte deformation induced by cyanobacterial toxins reflects inhibition of protein phosphatases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**, 1347-1353 (1990)

Falconer I.R. et al. Effect of the cyanobacterial (blue-green algal) toxins from *Microcystis aeruginosa* on isolated enterocytes from the chicken small intestine. *Toxicon.* **30**, 790-793. (1992).

Falconer I.R. Health implications of cyanobacterial (blue-green algal) toxins. In : Toxic cyanobacteria – a global perspective, pp. 2-6. *Adelaide, Australian Centre for Water Quality Research.* (1994).

Falconer, I.R., Falconer, D., Watters, M., Lavin, D., Maguire and J., Pearn. Poisoning by blue-green algae. In Toxins and Targets. Effects of Natural and Synthetic Poisons on Living Cells and Fragile Ecosystems, ed. I.R., Chap **6**, pp.49-54 (1992).

Fawell J.K. Blue-green algal and their toxins – analysis, toxicity, treatment and environmental control. *Water supply.* **11**, 109-121 (1993)

Fischer, W.J., Hitzfeld, B.C., Tencalla, F., Eriksson, J.E., Mikhailov, A., Dietrich, D.R.,. Microcystin-LR toxicodynamics, induced pathology, and immunohistochemical localization in livers of blue-green algae-exposed rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Toxicol. Sci.* **54**, 365-373 (2000)

Fisher, M.J., Malcolm G., Paton R.C., Spatio-logical processes in intracellular signalling. *Biosystems* **55**, 83-92 (2000)

Ganguly, T.C., O'Brien, M.L., Karpen, S.J., Hyde, J.F., Suchy, F.J., Vore, M. Regulation of the rat liver sodium-dependent bile acid cotransporter gene by prolactin. Mediation of transcriptional activations by Stat5. *J. Clin. Invest* **99**, 2906-2914 (1997)

Gavin, E,. Arteel., Sies., H. The biochemistry of selenium and the glutathion system. *Environemental Toxicology and Pharmacology* .**10**, 153-158 (2001)

Ghosh, S., Khan, S.A., Wickstrom, M. and Beasley, V. Effects of microcystin-LR on actin and the actin-associated proteins α-actinin and talin in hepatocytes. *Nat. Toxins* **3**, 405-414 (1995)

Gorham P. Toxic algae. In : Jackson D.F., ed. Algae and man. New York, NY, *Plenum Publising Corp*, 307-336 (1964)

Guengerich F.P. Characterization of human cytochrome P450 enzymes. *FASEB J* **6**, 745-752 (1992)

Harada, K.-L., Murata, H., Qiang, Z., Suzuki, M. and Kondo, F. Mass spectrometric screening method for microcystins in cyanobacteria. *Toxicon* **34**, 701-710 (1996)

Hermansky, S.J. and Stohs, S.J. Effect of microcystin-LR (MCLR) on hepatic microsomal membrane fluidity. Res. Commun. *Chem. Pathol. Pharmacol.* **72**, 213-222. (1991)

Hitzfeld, B.C., Hoger, S.J., Dietrich, D.R. Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment. *Environ Health Perspect* **108**, 113-122 (2000)

Honkanen, R.E., Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *Journal of biological chemistry.* **265,** 19401-19404 (1990)

Honkanen, R.E., Zwillers, J., Moore, R.A., Daily, S.L., Khatra, B.S., Dukelow, M. and Boynton, A.L., Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* **265**, 19401-19404 (1990)

Honkanen, R.E., Caplan, F.R., Patterson, G.M.L. and Abercrombie, J. Development of a protein phosphatase-based assay for the detection of phosphatase inhibitors in crude whole cell/animal extracts. *Toxicom* **34**, 307-308 (1996)

Hooser S.B. Microcystin-LR-induced ultrastructural changes in rats. *Veterinary pathology.* **27**, 9-15 (1990)

Iyde elferink, R.P.J., de Haan, J., Lambert, K.J., Hagey, L.R., Hofmann, A.F., Jansen, P.L.Selective hepatobiliary transport of nordeoxycholate side chain conjugates in mutant rats with a canalicular transport defect. *Hepatology* **9,** 861-865 (1989)

Jakoby, W.B., Ziegler, D.M. The enzymes of detoxication. *J. Biol. Chem.* **265**, 20715-20722 (1990)

Jones, G.J., Orr, P.T. Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. *Water research.* **28**, 871-876 (1994)

Kast, C., Stieger B., Winterhalter, Meier K.H P.J., Hepatocellular transport of bile acids. Evidence for distinct subcellular localizations of electrogenic and ATP-dependent taurocholate transport in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem* **269,** 5179-5186 (1994).

Kondo, F., Ikai, Y., Oka, H., Okumura, M., Ishikawa, N., Harada, K., Matsuura, K., Murata, H., Suzuki, M.,. Formation, characterization, and toxicity of the glutathione and cysteine conjugates of toxic heptapeptide microcystins. *Chem. Res. Toxicol.* **5**, 591-596 (1992)

Kondo, F., Matsumoto, H., Yamada, S., Ishikawa, N., Ito, E., Nagata, S., Ueno, Y., Suzuki, M., Harada, K. Detection and identification of metabolites of microcystins formed in vivo in mouse and rat livers. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 1355-1359 (1996)

Kotak, B.G. Occurrence and toxicological evaluation of cyanobacterial toxins in Alberta lakes and farm dugouts. *Water research.* **27**, 495-506 (1993)

Kramer, W.,G., Wess, U., Bewersdorf, D., Corsiero, F., Girbig, C., Weyland, S., Stengelin, A., Enhsen, K., Bock, H., Kleine, M.A., Le Dreau, H.L., Schäfer, Topological photo-affinity labeling of the rabbit ileal Na^+/bile-salt-cotransport system. *Eur. J. Biochem.* **249,** 456-464 (1997)

Kullak-Ublick, G.-A., Fisch, T., Oswald, M., Hagenbuch, B., Meier, P.J., Beuers, U., Paumgartner, G. Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) identification of a carrier protein in human liver and brain. *FEBS Lett.* **424**, 173-176 (1998)

LeClaire, R.D., Parker, G.W. and Franz, D.R. Hemodynamic and calorimetric changes induced by microcystin-LR in the rat. *J. Appl. Toxicol.* **15**, 303-311 (1995)

Liang, D. , Hagenbuch, B., Stieger, B., Meier P.J.,, Parallel decrease of Na^+-taurocholate cotransport and its encoding mRNA in primary cultures of rat hepatocytes. *Hepatology,* **18,** 1162-1166 (1993).

Lin J.-R., Chu F.S. In vitro neutralization of the inhibitory effect of microcystin-LR to protein phosphatase 2A by antibody against the toxin. *Toxicon* **32**, 605-613 (1994)

Lin, M.C, Kramer, W., Wilson, F.A., Identification of cytosolic and microsomal bile acid-binding proteins in rat ileal enterocytes. *J. Biol. Chem.* **265,** 14986-14995 (1990)

Macias-Silva, M. and Garcia-Sainz, J.A., Inhibition of hormone-stimulated inositol phosphate production and disruption of cytoskeletal structure. Effects of okadaic acid, microcystin cholorpromazine, W7 and nystatin. *Toxicon.* **32**, 105-112 (1994)

MacKintosh, C., Beattie, K.A., Klumpp, S., Cohen, P. and Codd, G.A. Cyanobacteril microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett*, **264**, 187-192 (1990)

MacKintosh, R.W., Dalby, K.N., Campbell, D.G., Cohen, P.T.W., Cohen, P. and MacKintosh, C. The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase 1. *FEBS Lett.* **371**, 236-240 (1995)

Madon, J., Eckhardt, U., Gerloff, T., Stieger, B., Meier, P.J. Functional expression of the rat liver canalicular isoform of the multidrug resistance-associated protein. *FEBS Lett.* **406**, 75-78 (1997)

Malbrouck, C., Trausch, G., Devos P., Kestemont P. Effect of microcystin-LR on protein phosphatase activity in fed and fasted juvenile goldfish Carassius auratus L. *Toxicon* **43**, 295-301 (2004)

Mandell, G.L. and Sande, M.A. Antimicrobial agents. In Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics **49**, pp. 1149-1152. *Pergamon Press. New York* (1990)

McDermott, C.M., Feola, R. and Plude, J. Detection of cyanobacterial toxins (microcystins) in waters of northeastern Wisconsin by a new immunoassay technique. *Toxicon* **33**, 1433-1442 (1995)

Meier, P,J,. Sztul, E.S., Reuben, A., Boyer, J.L. Structural and functional polarity of canalicular and basolateral plasma membrane vesicles isolated in high yield from rat liver. *Cell. Biol.* **98(3)**, 991-1000 (1998)

Meier, P.J., Eckhardt, U., Schroeder, A., Hagenbuch, B., Stieger, B. Substrate specificity of sinusoidal bile acid and organic anion uptake systems in rat and human liver. *Hepatology* **26**, 1667-1677 (1997)

Meriluoto, J.A.O., Sandström, A., Eriksson, J.E., Remaud, G., Grey, C.A. and Chattopadhtaya, J. Structure and toxicity of a peptide hepatotoxin from the cyanobacterium Oscillatoria agardhii. *Toxicon* **27**, 1021-1034 (1989)

Miura, G.A., Ronbinson, N.A., Lawrence, W.B. and Pace, J.G. Hepatotoxicity of microcystin-LR in fed and fasted rats. *Toxicon* **29**, 337-346 (1991)

Nathanson, M.H., Boyer, J.L.Mechanisms and regulation of bile secretion, *Hepatology* **14**, 551-556 (1991)

Nelson, D.R. P450 superfamily : update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**, 1-9 (1996)

Noé, B., Hagenbuch, B., Stieger, B., Meier, P.J. Isolation of a multispecific organic anion and cardiac glycoside transporter from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 10346-10350 (1997)

Oelkers, P., Kirby, L.C., Heubi, J.E., Dawson, P.A. Primary bile acid malabsorption caused by mutations in the ileal sodium-dependant bile acid transporter gene (SLC10A2). *J. Clin. Invest.* **99,** 1880-1887 (1997)

Ohtani, I., Moore, R.E., Runnegar, M.T.C. Cylindrospermopsin : a potent hepatotoxin from the blue-green algae, Cylindrospermopsis raciborskii. *Journal of the American Chemical Society* **114**, 7942-7944 (1992)

Pace, D.M., Thompson, J.R., Aftonomos, B.T., Holck, H.G., The effects of NO_2 and salts of NO_2 upon established cell lines. *Can. J. Med. Sci.* **39**, 1247-1255 (1992)

Pflugmacher, J., Ebing, W. Problems in the determination of small ethylenethiourea residue concentrations in plant crops. *Lebensm Unters Forsch.* **178**(2), 90-92 (1990)

Pflugmacher, J., Wiegrand, S., Oberemm, C., Beattie, A., Kruase, K.A., Codd, G.A. Steinberg CEW,. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobactérial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. *Biochimica et Biophysica Acta* **1425**, 527-533 (1998)

Robinson, N.A., Miura, G.A., Matson, C.F., Dinterman, R.E. and Pace, J.G. Characterization of chemically tritiated microcystin-LR and its distribution in mice. *Toxicon* **27**, 1035-1042 (1989)

Robinson, N.A., Pace, J.G., Matson, C.F., Miura, G.A. and Lawrence, W.B. Tissue distribution, excretion and hepatic biotransformation of microcystin-LR in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **256**, 176-182 (1991)

Runnegar, M.T, Kong, S.M, Zhong, Y.Z, Ge, J.L, Lu, S.C. The role of glutathione in the toxicity of a novel cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201(1)**,235-241 (1994)

Runnegar, M.T., Berndt, N. and Kaplowitz, N. Microcystin uptake and inhibition of protein Phosphatases : effects of Chemoprotectants and Self-Inhibition in Relation to Known Hepatic Transporters. *Toxicology and Applied Pharmacology* **134**, 264-272 (1995)

Runnegar, M.T., Berndt, N., Kong, S.-M., Lee, E.Y.C. and Zhang, L. In vivo and in vitro binding of microcystin to protein phosphatases 1 and 2A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**, 162-169 (1995)

Runnegar, M.T., Gerdes, R.G. and Falconer, I.R. The uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by isolated rat hepatocytes. *Toxicon* **29**, 43-51 (1991)

Runnegar, M.T., Gerdes, R.G., Falconer, I.R. The uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by isolated rat hepatocytes. *Toxicon* **29**, 43-51 (1991)

Schroeder A., Eckhardt U., Stieger, B., Tynes, R., Schteingart, C.D., Hofmann, A.F., Meier, P.J., Hagenbuch B. Substrate specificity of the rat liver Na^+-bile salt cotransporter in Xenopus laevis oocytes and in CHO cells. *Am. J. Physiol.* **274**, G370-G375 (1998).

Schwartzbaum, J.A., Setzer, R.W., Kupper, L.L. Limitations of relative sensitivity in detecting differential misclassification in case-control studies. *Epidemiology* **5**, 315-323 (1994).

Schwarz, M., Lund, E.G., Setchell, K.D.R., Kayden H.J., Zerwekj, J.E., Björkhem, I, Herz, J., Russell, J.W. Disruption of cholesterol 7α-hydroxylase gene in mice. II. Bile acid deficiency is overcome by induction of oxysterol 7α-hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **271,** 18024-18031 (1996)

Schwarzbaum, P.J. Niederstätter, H. Wieser, W. Effects of temperature on then ($Na^+ + K^+$)-ATP-ase and oxygen consumption in hepatocytes of two species of freswater fish, roach (*Rutilus rutilus*) and brook trout (*Salvenilus frontalis*). *Physiol. Zool.* **65**, 699-711 (1992)

Shimizu, M., Iwasaki, Y. and Yamada, S. New fluorogenic dienophile : Synthesis, reaction with vitamin D, vitamin A and microcystins, and application to fluorometric assays. *J. Pharmaceut. Soc. Jpn.* **115**, 584-602 (1995)

Simon, F.R., Sutherland, J., Sutherland E. Identification of taurocholate binding sites in ileal plasma membrane. *Am. J. Physiol.* **259,** G394-G401 (1990).

Sippel C.J., Ananthanarayanan M., Suchy F.J. Isolation and characterization of the canalicular membrane bile acid transport protein of rat liver. *Am. J. Physiol.* **258**, G728-737 (1990).

Sugawara, T., Holt, J.A., Driscoll, D., Strauss III, J.F., Lin, D., Miller, W.L., Patterson, D., Clancy, K.P., Hart, I.M., Clark, B.J., Stocco, D.M. Human steroidogenic acute regulatory protein: Functional activity in COS-1 cells, tissue-specific expression, and mapping of the structural gene to 8p11.2 and a pseudogene to chromosome 13. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92,** 4778-4782 (1995)

Thompson, W.L. and Pace, J.G, Substances that protect cultured hepatocytes from the toxic effects of microcystin-LR. *Toxicology in vitro* **6**, 579-587 (1992)

Thompson, W.L., Perera K, Fisher, R,. Brendel, K. Cresol isomers: comparison of toxic potency in rat liver slices. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **125**, 51-58 (1994).

Trauner, M., Meier, P.J., Boyer, J.L. Molecular pathogenesis of cholestasis. *N. Engl J. Med.* (1998)

Tsuji, K. Stability of microcystins from cyanobacteria : effect of light on decomposition and isomerization. *Environmental science and technology* **28**, 173-177 (1994)

Ueno Y. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis* **17** (6), 1317-1321 (1996)

van der Westhuizen, A.J., Eloff J.N. Effect of temperature and light on the toxicity and growth of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **110**, 157-163 (1985)

Wachtel, N., Emerman, S., Javitt, N.B. Metabolism of cholest-5-ene-3ß, 26-diol in the rat and hamster. *J. Biol. Chem.* **243**, 5207-5212 (1968)

Wannemacher, R.W., Dinterman, K.A., Mereish, K.A. and Creasia, D.A. Use of rifampin for prophylaxis and treatment of microcystin-LR intoxication. *FASEB J.* **4,** 740-752 (1990)

Watanabe M.F. Heptapeptide toxin production during the batch culture of two *Microcystis* species (cyanobacteria). *Journal of applied phycology* **1**, 161-165 (1989)

Weinman, E.J., Steplock, D., Corry, D., Shenolikar, S.. Identification of the human NHE-1 form of Na(+)-H+ exchanger in rabbit renal brush border membranes. *Clin Invest.* **102**, 2097-2108 (1991)

Wong, M.H., Oelkers, P., Craddock, A.L., Dawson, P.A.Expression cloning and characterization of the hamster ileal sodium-dependant bile acid transporter. *J. Biol Chem.* **269**, 1340-1347 (1994)

Xu, L.H., Lam, P.K., Chen, J.P., Xu, J.M., Wong, B.S., Zhang, Y.Y., Wu, R.S., Harada, K.I. Use of protein phosphatase inhibition assay to detect microcystins in Donghu Lake and a fish pond in China. *Chemosphere* **41**, 53-58 (2000)

Yoshizawa, S., Matsushima, R., Watanabe, M.F., Harada, K.I., Ichihara, A., Carmichael, W.W. and Fujiki, H. Inhibition of protein phosphatases by microcystins and nodularin associated with hepatoxicity. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **116**, 609-614 (1990)