

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة 8 ماي 1945 قالمة

Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de La Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers



Mémoire en vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Science Biologique

Spécialité/ Option : Biologie moléculaire et cellulaire/biologie moléculaire des procaryote

Département : Biologie

Thème :

**Etude de l'effet génotoxique d'une cyanotoxine aquatique, la
microcystine-LR :
Application du test d'Ames**

Présenté par :

- Berrehail Fatiha
- Chouieb Zineb
- Rouabhia Meriem

Devant le jury composé de :

Président : M^F Benouareth Djamel Eddine Prof. Université de Guelma
Examineur: Mme Boumaaza Awatif M.A.A. Université de Guelma
Encadreurs: Mme Merabet Rym M.A.A. Université de Guelma

Juin 2016

Remerciements

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer nos remerciements et notre profonde gratitude, avant tout à Dieu le tout puissant et miséricordieux qui nous a donné le courage et la force pour mener à bout ce modeste travail.

*Nous remercions chaleureusement nos encadreurs, **M^{me}. Merabet Rym, M^{me}. Khallef Messaoud** pour leur judicieux conseils, leur directives précieuses, et de leur soutien scientifique et morale au cours de la réalisation pratique et théorique de ce travail.*

*Nous remercions aussi **M^r. Benouarethe Djamel Eddine**.
De nous avoir honorés de sa présence et d'avoir accepté de présider le jury de notre soutenance de ce mémoire.*

*Nous voudrions également remercier vivement **M^{me}. Boumaaza Awatif**,
Pour avoir acceptée de faire partie de ce jury.*

Nos plus vifs remerciements s'adressent aussi à toutes techniciennes des laboratoires pour leur gentillesse et leur disponibilité tout au long de la période du travail.

Nos remerciements vont enfin à toute personne qui a contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

MERCI

Liste des figures

Figure	Titre	Page
(1)	Structure moléculaire générale des microcystines.	09
(2)	Synthèse de l'état des connaissances sur les principales voies de toxicité cellulaire des microcystines.	17
(3)	Système de phosphorylation/déphosphorylation des protéines au cours de la transduction d'un signal.	24
(4)	La réclamation de l'histidine.	35
(5)	l'effet des UV sur les souches de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 et la souche sauvage.	35
(6)	l'effet de l'Ampicilline et du CV sur la souche <i>Salmonella typhimurium</i> TA98.	36
(7)	l'effet de la MC-LR sur la souche <i>Salmonella typhimurium</i> TA98.	38

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
(1)	Les différents types de la MC.	09
(2)	Génotype spécifique de la souche TA89	30
(3)	L'analyse de la mutagénécité de la MC-LR avec la souche <i>S.typhimurium</i> TA98 avec Activité métabolique	37

Aa Acides aminés

AC Aberrations chromosomiques

ADD Acide (2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-methoxy-2,6,8-triméthyl-10phényldeca-4,6-dienoïque

AN Anomalies nucléaires

ATX Anatoxine

Bax BCL2-associated X protein

BI Barrière intestinale

Caco-2 Human caucasian colon carcinoma cell

CV Cristal violet

CYN Cyindrospermopsine

ERO Espèce réactive de l'oxygène

ERS Stress du réticulum endoplasmique

GMA Glucose Minimal Agar

IM Indice mitotique

ip Intrapéritonéale

LPS Lipopolysaccharide

MC Microcystine

MC-Cys Conjugué microcystine-cystéine

MC-GSH Conjugué microcystine-glutathion

MC-LR Microcystine LR (leucine et arginine)

MC-RR Microcystine LR (arginine et arginine)

Mdha N-méthyldéhydroalanine

NOD Nodularine

OATP Organic anion transporter protein

PP Sprotéines phosphatases à sérine thréonine

RE Réticulum endoplasmique

SAM Significance analysis microarray

SCEs Echange des chromatides sœurs

SVF Sérum de veau foetal (FCS)

TC Taurocholate

TPM Transition de perméabilité

Résumé

Microcystine-LR (MCLR) est une toxine cyanobactérienne connue pour son Hépatotoxicité aiguë. Bien que reconnu comme promoteur de tumeurs, son effet génotoxique sur les procaryotes est loin d'être complètement élucidé.

Un test de mutagénéicité (test d'Ames) sans activation métabolique, a été appliqué en utilisant la souche de *Salmonella typhimurium*TA98 qui détecte des mutations affectant le cadre de lecture (de type Frameshift). Les résultats obtenus ont montré que la microcystin LR est mutagène aux concentrations utilisées.

Mots clés : Cyanobactérie, microcystine-LR, génotoxicité, effet mutagène, Test d'Ames

Abstract

Microcystine-LR (MC-LR) is a cyanobacterial toxin known for its acute hepatotoxicity. Despite being recognized as tumour promoter, its genotoxic effect is far from being completely clarified, particularly against prokaryotes. In this work, we used The Ames test, a bacterial reverse mutation assay, to study the potential mutagenicity of pure microcystin LR at a concentration of 0,155 M on *Salmonella typhimurium* TA98. The cyanotoxin yielded positive results in the Ames/Selmonella mutagenicity assay confirming its potential carcinogenicity.

Keywords: cyanobacteria, microcystin LR, genotoxicity, mutagenicity, Ames test.

ملخص:

Microcystine LR هو سم كبدي حاد ينتمي إلى الطحالب الزرقاء والمعروف بوصفه مسبب للأورام، له آثار سمية وراثية على بدائيات النواة ليست موضحة.

اختبار الطفرات الجينية على بدائيات النواة (اختبار Ames) مع التنشيط الأيضي نفذت باستخدام سلالة

*Salmonella typhimurium*TA98 التي كشفت عن طفرات من نوع انزياح القراءة.

النتائج أظهرت أن Microcystine-LR هو طافر وراثيا في التركيز 0.155 M.

كلمات مفتاحية: Microcystine-LR، طحالب زرقاء، سم وراثي، آثار الطفرات الجينية، اختبار Ames.

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Résumé

Introduction

Partie bibliographique

Chapitre I : cyanobactéries et cyanotoxines

1. Définition.....	2
2. Présence dans l'environnement.....	2
2.1. Facteurs physiques.....	2
2.2. Facteur chimiques.....	3
2.3. Facteurs biologiques.....	3
3. Les toxines cyanobactériennes.....	4
3.1. Neurotoxines.....	4
3.1.1. L'anatoxine.....	4
3.1.1.1. La saxitoxine.....	4
3.1.1.2. L'homologue de l'anatoxine-a.....	4
3.1.1.3. L'anatoxine-a(s).....	4
3.1.2. Lasaxitoxine.....	5
3.1.3. β -N-méthylamino-L-alanine.....	5
3.2. Dermatotoxines.....	5
3.3. Hépatotoxine.....	6
3.3.1. Nodularine.....	6

3.3.2. La cylindrospermopsine.....	6
3.3.3. Microcystine.....	6
II. Microcystine.....	7
1. Définition.....	7
2. Structure.....	7
3. Variantes de la toxine.....	9
4. Comparaison de la toxicité de deux variantes de microcystines.....	9
4.1. La MC-LR et la MC-RR ne produisent pas exactement les mêmes effets	9
4.2. La MC-LR et la MC-RR inhibent les PPs de manière similaire.....	10
4.3. Les autres cibles.....	11

Chapitre II : Les effets toxiques des microcystines

Mécanisme de toxicité des microcystines.....	12
1. Les cellules eucaryotes.....	12
1.1. Les microcystines sont des inhibiteurs de protéines phosphatase sérine/thréonine....	12
1.1.1. Les protéines phosphatases.....	12
1.1.2. Mécanisme d'inhibition des PPs par les microcystines.....	13
1.1.3. Conséquences de l'inhibition des PPs.....	13
1.1.4. Les microcystines génèrent du stress oxydant.....	14
1.1.4.1. Mitochondries.....	14
1.1.4.2. Réticulum endoplasmique.....	15
2. Les organes.....	18
2.1. Le foie, principale cible des MCs.....	18
2.1.1. Hépatotoxicité des microcystines.....	18

2.1.2. Organotropisme des microcystines, une histoire de transporteurs.....	19
2. 2. D'autres organes sont touchés par la toxicité des microcystines.....	20
2.2.1. Neurotoxicité.....	20
2.2.2. Toxicité rénale.....	21
2.2.3. Toxicité pulmonaire.....	21
2.2.4. Reprotoxicité.....	22
2.2.5. Toxicité intestinale.....	22
3. Cancérogénicité des microcystines.....	23

Chapitre III : Les tests de la génotoxicité

1. Généralités.....	25
2. Test de mutation génique sur les procaryotes (Test d'Ames).....	25
2.1. Définition.....	25
2.2. Principes du test Ames.....	25
2.3. La souche bactérienne utilisée.....	26
2.4. Avantages.....	26
2.5. Inconvénients.....	26
3. Test de génotoxicité sur les eucaryotes (plantes supérieures).....	26
3.1. L'importance des plantes supérieures en génotoxicité.....	26
3.2. Les différents tests de génotoxicité associés aux plantes supérieures.....	27
3.2.1. Test d'aberrations chromosomiques.....	27
3.2.1. Test d'aberrations chromosomiques.....	27
3.2.2. Induction des micronoyaux.....	27
3.2.3. Induction des échanges de chromatides sœurs.....	27

3.2.4. Test des comètes.....	27
3.3. Allium cepa.....	28
3.3.1. Les critères de génotoxicité déterminés sur Allium cepa.....	28
3.3.2. Les différents paramètres analysés par le test Allium cepa.....	28
3.3.2.1. Indice mitotique.....	28
3.3.2.2. Les aberrations chromosomiques (ACs).....	29
3.3.2.3. Les anomalies nucléaires.....	29
3.3.2.4. Micronoyaux.....	29

Partie pratique

Matériels et Méthode

I. Préparation de la toxine.....	30
II. Test de mutagénécité (test d'Ames).....	30
1. Matériel biologique.....	30
2. Confirmation des génotypes.....	31
3. Activation de la souche testée.....	31
4. Vérification des caractères génétique.....	32
5. Principe.....	33
6. Technique sans activation métabolique (-S9).....	33

Résultats et discussion

1. Vérification des caractères génétique.....	36
1.2. Test de mutagénèse.....	37

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Les cyanobactéries constituent un groupe de procaryotes photosynthétiques unicellulaires ou multicellulaires ayant une large répartition mondiale. Aussi communément

Appelées algues bleu-vert, ces organismes aquatiques prolifèrent dans les eaux de surface sous l'influence de différents facteurs environnementaux, tels que la lumière, la température et les nutriments.

Ces procaryotes font l'objet d'une surveillance de plus en plus importante de la part des gestionnaires et utilisateurs des plans d'eau car leurs proliférations perturbent les usages de ces plans d'eau, notamment en raison des risques sanitaires associés à ces événements. En effet, les cyanobactéries sont capables de synthétiser de nombreuses toxines dangereuses pour

la santé humaine et animale. Parmi ces toxines, les microcystines, petits peptides cycliques, sont les plus fréquemment observées (Carmichael, 1996).

Ces dernières sont considérées comme des hépatotoxines, puisqu'elles inhibent le fonctionnement des phosphatases 1 et 2A. L'inhibition de ces enzymes entraîne une modification de l'état de phosphorylation de nombreuses protéines. Il en résulte des effets divers et en particulier :

- une perte de l'intégrité du cytosquelette (altération des microfilaments, des filaments intermédiaires et des microtubules), et en conséquence une nécrose.
- une apoptose des hépatocytes mais aussi des cellules glomérulaires et tubulaires proximales.

Cette atteinte des hépatocytes conduit à une hémorragie hépatique importante pouvant entraîner la mort (Chorus et Bartam, 1999).

De nombreuses études montrent que les microcystines induisent aussi un stress oxydatif à l'intérieur des cellules (sur les macromolécules ex : protéines, acides nucléiques, lipides). Ce phénomène a été observé *in vivo* chez les poissons et les rongeurs et son intensité

varie en fonction de la dose mais aussi de la nature de la microcystine.

Ses conséquences sont une diminution du glutathion réduit dans la cellule, une peroxydation des lipides et des cassures de l'ADN.

Le potentiel de promotion tumorale de la microcystine-LR a été démontré chez des souris et des rats après initiation avec la diméthylbenzathracène et du diéthylnitrosamine (Chorus et Bartam, 1999).

C'est dans cette optique que se situe notre étude dont l'objectif principal est d'évaluer l'éventuel effet mutagène de la microcystine-LR chez les procaryotes par le test d'Ames en utilisant comme souche de référence *Salmonella typhimurium* TA98.

Dans le but de répondre à cet objectif de ce travail de recherche le mémoire est structuré en deux parties :

La première partie présente une synthèse bibliographique qui englobe trois chapitres.

Le premier est consacré à la présentation des cyanobactéries et des microcystines.

Le deuxième résume les différents effets toxiques des toxines en question. Le dernier énumère les différents tests utilisés pour étudier la toxicité génique.

La deuxième partie détaille le protocole expérimental global du test d'Ames utilisé dans le but de détecter l'éventuel effet mutagène de la cyanotoxine microcystine-LR qui est détaillé dans la partie pratique, suivi des résultats et leur discussion. Le mémoire est clôturé par une conclusion.

I) Les cyanobactéries

1) Définition

Les cyanophytes ou cyanobactéries sont des micro-organismes photosynthétiques contenant souvent en abondance un pigment, la phycocyanine qui leur confère une couleur bleue (d'où la racine = cyano). Grâce à la chlorophylle a et aux photosystèmes très semblables à ceux des végétaux (champignons exclus), ils synthétisent des sucres et de l'oxygène à partir de l'eau et du dioxyde de carbone. De ce fait, ils se rapprochent des algues.

En raison de l'absence d'une membrane isolant le matériel nucléaire (ADN,...) du contenu de leur cellules (cytoplasme), ils sont assimilables aux bactéries et définis par conséquent comme des procaryotes (absence de noyau). Pour les motifs précédents, ils sont classés par les microbiologistes dans le règne des Eubacteria, d'où l'appellation de cyanobactéries, et par les botanistes, dans le règne végétal, d'où le nom de Cyanophytes (blue-green algae pour les anglo-saxons). Ces micro-organismes sont extrêmement anciens et ont généré des fossiles qui témoignent de leur présence sur le globe terrestre depuis des périodes très reculées.

2) Présence dans l'environnement

2-1) Facteurs physiques

Lorsque la température de l'eau augmente au printemps, une succession naturelle de groupes d'algues allant des diatomées et d'algues vertes aux cyanobactéries survient. Les différentes espèces de cyanobactéries présentent des tolérances aux températures minimales différentes.

La durée de lumière du jour nécessaire pour optimiser la croissance dépend des espèces. Certaines cyanobactéries peuvent tolérer des niveaux faibles de lumière et peuvent donc rivaliser avec les autres algues planctoniques de façon plus efficace pour la lumière disponible, principalement grâce à la présence de pigments photosynthétiques. Ces pigments permettent également la photosynthèse dans les eaux colorées.

En outre, certaines cyanobactéries, telles que *Microcystis aeruginosa*, peuvent optimiser leur position dans la colonne d'eau en fonction de la disponibilité de la lumière en régulant activement leur flottabilité. Cette caractéristique permet également aux

cyanobactéries de migrer dans les gradients thermiques et d'utiliser les éléments nutritifs confinés dans la couche d'eau froide profonde.

Le contrôle principal s'effectue par photosynthèse (par la production de carbohydrates) et diminue lorsque le niveau de dioxyde de carbone est trop faible. La flottabilité ne peut pas être contrôlée pendant la nuit.

Une turbidité accrue avantage les cyanobactéries par rapport aux autres algues. Les cyanobactéries peuvent utiliser un large spectre de lumière pour la photosynthèse et elles sont capables de migrer vers la surface afin de capter le maximum de lumière. Cependant, une très forte turbidité peut réduire la disponibilité du phosphate, ce qui limite leur croissance nutritifs.

2-2) Facteur chimiques

Comme c'est le cas pour d'autres organismes photosynthétiques, la disponibilité des macroéléments, c'est-à-dire le phosphore et, dans une moindre mesure, l'azote, contrôle la croissance des cyanobactéries. En général, les cyanobactéries n'ont pas un besoin de phosphore aussi élevé que les autres phytoplanctons, mais elles le stockent de façon efficace.

Étant donné que le phosphore adhère facilement aux surfaces réactives (organiques et inorganiques), une grande partie du phosphore dans un cours d'eau sera associé aux sédiments. Des niveaux anormalement élevés de phosphore dans les eaux indiquent des perturbations dans le bassin hydrographique. Les sources importantes de phosphore, ponctuelles et diffuses, comptent les eaux usées brutes et traitées, les détergents et les eaux de ruissellement urbaines et agricoles. Le fer et le molybdène sont des microéléments particulièrement importants pour les cyanobactéries en raison de leur rôle direct dans la fixation de l'azote et la photosynthèse (fer) ainsi que la fixation de carbone et l'apport d'azote (molybdène).

Les cyanobactéries préfèrent les eaux à pH élevé qui présentent des concentrations élevées de bicarbonate et de carbonate. Ainsi, la consommation de dioxyde de carbone par les algues lors de la photosynthèse fait augmenter le pH et favorise la croissance des cyanobactéries. Le pH détermine également la spéciation chimique des éléments nutritifs et joue par conséquent un rôle important dans la détermination de leur biodisponibilité.

2-3) Facteurs biologiques

Le rôle des cyanobactéries dans les réseaux alimentaires aquatiques est très complexe. En général, les phytoplanctons sont consommés par les zooplanctons, qui sont à leur tour

consommés par les poissons. Les cyanobactéries ne sont pas facilement digérées par les zooplanctons, leurs populations peuvent donc augmenter par rapport à d'autres algues plus digestes. Les macrophytes entrent en concurrence avec les cyanobactéries et les autres phytoplanctons pour les éléments nutritifs et la lumière et ils peuvent également supprimer les phytoplanctons en libérant des inhibiteurs. D'autres bactéries aquatiques peuvent également être en concurrence avec les cyanobactéries pour les éléments nutritifs et métaboliser leurs toxines (Les canadiens et les Canadiennes., Avril 1998).

3) Les toxines cyanobactériennes

Les toxines cyanobactériennes sont des toxines produites par les cyanobactéries, ou algues bleues. Elles comptent des neurotoxines (p.ex.: anatoxines), des hépatotoxines (p.ex.: microcystines), des irritants de la peau et d'autres toxines. Les hépatotoxines et les neurotoxines sont produites par des cyanobactéries communément retrouvées dans les approvisionnements d'eau potable et semblent donc présenter actuellement la plus grande pertinence pour les approvisionnements d'eau (Carmichael, 1992 ; Fawcett *et al.*, 1994).

3-1) Neurotoxines

3-1-1) L'Anatoxine

Toutes les ATX font partie de la famille des alcaloïdes. L'ATX-a est une amine secondaire bi-cyclique appelée 2-acétyl-9-azabicyclo [4-2-1] non-2-ène et pesant 165 Da (figure 2.4). Cette toxine soluble dans l'eau est un puissant agent de dépolarisation postsynaptique qui agit en mimant l'effet de l'acétylcholine (Sivonen et Jones., 1999).

3-1-1-1) L'ATX-a

Elle est relativement stable à la noirceur et se dégrade rapidement à la lumière du soleil lorsqu'elle est seule en solution (Stevens and Krieger, 1991). Sa dégradation est plus rapide en milieu alcalin. (Devlin *et al.*, 1977).

3-1-1-2) L'homoATX-a

Elle est un homologue de l'ATX-a où un groupement acétyle est substitué par un groupement propionyle. Elle pèse 179 Da (Svrcek and Smith, 2004).

Le mécanisme d'action de cette molécule est le même que son homologue l'ATX-a. L'homoATX-a est légèrement moins toxique (Namikoshi *et al.*, 2003).

3-1-1-3) L'ATX-a(s)

Elle est un ester phosphate d'une N-hydroxyguanine de 252 Da. Elle est un inhibiteur irréversible de l'acétylcholinestérase. Le (s) signifie facteur de salivation, car cette toxine engendre une hyper salivation. L'ATX-a (s) s'avère très toxique, soit environ dix fois plus que l'ATX-a. (Carmichael, 2001). Elle est relativement stable en milieu acide ou neutre et devient instable en milieu alcalin ou à des températures élevées (>40°C).

3-1-2) la saxitoxine

STXses dérivés et la β -N-méthylamino-L-alanine (BMAA). Elles agissent toutes au niveau de la jonction neuro-musculaire mais sont différentes aux niveaux de leur structure, mécanisme d'action et toxicité (Sivonen et Jones, 1999).

3-1-3) β -N-méthylamino-L-alanine

BMAA est un acide aminé qui n'est pas inclus dans la synthèse des protéines. Cette petite molécule hydrosoluble a une masse moléculaire de 118,13 Da.

Elle existe sous deux formes différentes; soit libre ou liée à une protéine (Ince et Codd, 2005). La BMAA est un agoniste du glutamate qui se lie aux récepteurs glutamate et provoque ainsi l'excitation des neurones. Cette neurotoxine peut causer des dommages aux neurones moteurs à des très faibles concentrations (Banack *et al.*, 2007).

3-2) Dermatotoxines

Les dermatotoxines sont des molécules qui ont des effets irritants. Elles sont des lipopolysaccharides (LPS) et des alcaloïdes dermatotoxiques.

Les LPS font partie intégrante de la paroi cellulaire des bactéries Gram négatives et des cyanobactéries. La structure générale des LPS est constituée de quatre régions : une protéine antigénique de type antigène O (région I), un noyau polysaccharidique (régions II et III) et une partie lipidique A (région IV) Ceux-ci provoquent des irritations, des réactions allergiques et même des problèmes gastro intestinaux. Ces effets n'ont jamais été reproduits

expérimentalement et le mécanisme d'action précis des LPS des cyanobactéries n'est pas connu (Funari et Testai, 2008).

Les alcaloïdes dermatotoxiques comprennent trois toxines : l'aplysiatoxine, la débromoaplysiatoxine et la lyngbyatoxine. Jusqu'à présent, ce groupe de toxines n'a été détecté que dans des milieux marins (Funari et Testai, 2008).

3-3) Hépatotoxine

Impliquées dans de nombreux cas d'intoxication, ce groupe de toxines est fréquent dans les proliférations de cyanobactéries (Van Apeldoorn *et al.*, 2007). Les hépatotoxines (HPT) agissent principalement sur le foie, mais d'autres organes peuvent également être atteints tels les intestins et les reins (Sivonen et Jones, 1999).

3-3-1) Nodularine

La nodularine (NOD) est un peptide cyclique de cinq acides aminés pesant 824 Da. Il existe sept variantes structurales à la NOD dont la structure générale est un cycle de [D MeAsp1-L-Arg2-Adda3-D-Glu4-Mdhb5] (Van Apeldoorn *et al.*, 2007). Comme les MCs, la NOD est un promoteur de tumeur au niveau du foie en plus d'être un puissant inhibiteur des protéines phosphatases 1 et 2A de la synthèse des acides aminés sérines et thréonine (Sivonen et Jones, 1999).

La NOD est une molécule très soluble dans l'eau et n'est pas dénaturée après ébullition. Elle n'est pas volatile (Svrcek and Smith, 2004). La NOD s'avère très stable et résistante à l'hydrolyse chimique ou l'oxydation à pH neutre (Sivonen et Jones, 1999).

3-3-2) La cylindrospermopsine

CYN est un alcaloïde hépatotoxique de 415 Da, elle est une guanine tricyclique combinée à un uracile hydroxyméthylé. Sa structure chargée électriquement la rend très polaire et très soluble dans l'eau (Chiswell *et al.*, 1999).

La CYN se dégrade rapidement, elle a une demi-vie de 1,5 h lorsqu'elle est extraite et exposée à la lumière du soleil. Par contre, lorsqu'elle est en solution, la CYN est assez stable tant à la noirceur qu'à différentes intensités de lumière et à divers pH et température. L'organe cible de la CYN est le foie mais d'autres organes tels les reins, les poumons, le thymus, la rate, les glandes surrénales, l'intestin et le cœur peuvent également être affectés.

La toxicité de la CYN exprimée en DL50 IP 24h chez des souris est 2100 µg/kg p.c. et sa DL50, 5 à 6 D est 200 µg/kg p.c (Ohtaniet *al.*, 1992).

Deux analogues structuraux de la CYN ont été identifiés, à savoir la désoxycylindrospermopsine et la 7-épicylindrospermopsine (Bankeret *al.*, 2000).

3-3-3) Microcystine

Les microcystines sont les toxines les plus étudiées et ont été détectées dans le monde entier. Elles ont d'abord été détectées chez le genre unicellulaire *Microcystis*, d'où leur nom, mais sont également synthétisées par des genres filamenteux comme *Anabaena* ou *Oscillatoria/Planktothrix*, *Anabaenopsis* et *Nostoc*. Actuellement plus de 60 microcystines sont répertoriées.

La MC-LR est un puissant inhibiteur des sérine/thréonine phosphatases 1 et 2A *in vitro*. Ces enzymes jouent un rôle important dans l'homéostasie cellulaire. Leur inhibition provoque la prolifération des cellules, la promotion de tumeurs et une perturbation de la structure cellulaire du foie. Les microcystines forment une famille de molécules dont la variabilité porte sur certains (R. Cauchie *et al.*, 2013).

II) Microcystine

1) Définition

La microcystine (MC) est le nom d'une famille de différentes variantes d'une toxine bactérienne. Elle est produite par des bactéries vivant en eau douce, souvent stagnante mais pas toujours (en Australie, une pullulation de cyanophycées toxiques a touché environ 1 000 km de la Darling, empoisonnant mortellement au moins 2000 bovins qui s'y sont abreuvés).

Les pullulations de bactéries produisant de la microcystine semblent en augmentation récente et elles pourraient être sous-estimées. Elles causent la mort d'animaux sauvages et domestiques (bétail, chiens, chats...) et peuvent aussi affecter les humains (ex : 60 personnes mortes en 1996 lors d'une intoxication à l'hôpital de Caruaru au Brésil).

Elles sont produites par plusieurs genres de cyanobactéries qui regroupent de nombreuses espèces présentes sur tous les continents où elles produisent occasionnellement des efflorescences potentiellement hépatotoxiques. Ces bactéries appartiennent principalement aux genres *Oscillatoria*, *Nodularia*, *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena* et

Aphanizomenon. Une même efflorescence peut associer plusieurs espèces appartenant à plusieurs de ces genres de bactérie (Stewart et Shaw, 2008).

2) Structure

Les MCs sont des peptides cycliques de sept acides aminés (heptapeptide), cinq acides aminés non protéiques et deux acides aminés protéiques. Ces deux derniers, situés aux positions 2 et 4, permettent de différencier les MCs, en utilisant la nomenclature qui désigne chaque acide aminé par une lettre unique (Jaiswalet *al.*, 2008).

Par exemple, la MC-LR contient les acides aminés leucines (L) à la position 2 et arginine (R) à la position 4. La formule générale des MCs est un cycle de [D-Ala1-X2-D-Me-Asp3-Z4-Adda5-D-Glu6-Mdha7] où X et Z sont des acides aminés L (figure 2). Jusqu'à présent, 75 variantes structurales ont été caractérisées (Svrcek et Smith, 2004). Les principales modifications sont des substitutions de l'acide aminé-L aux positions 2 et/ou 4 et des déméthylations des acides aminés aux positions 3 et/ou 7 (Sivonen et Jones, 1999).

Les MCs sont des promoteurs de tumeur au niveau du foie en plus d'être de puissants inhibiteurs des protéines phosphatases 1 et 2A (PP1 et PP2) de la synthèse des acides aminés sérine et thréonine (Sivonen et Jones, 1999).

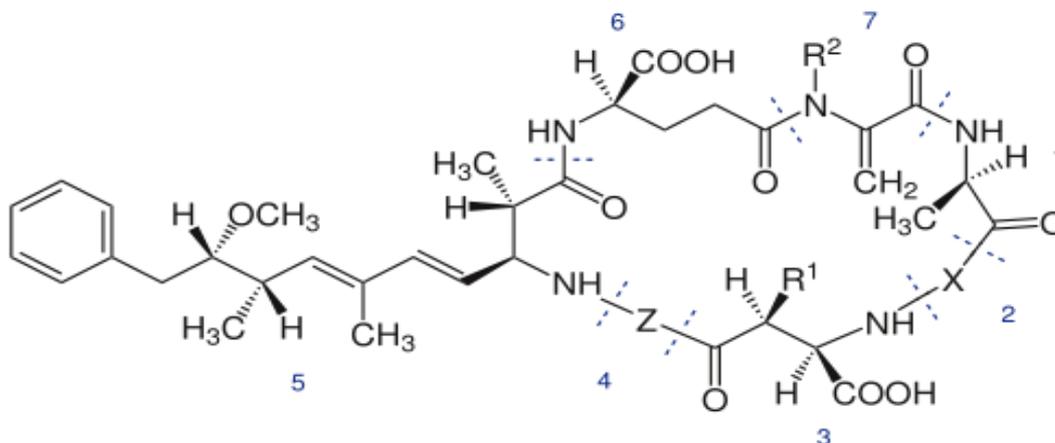
La chaîne Adda est un élément structural important au niveau de l'activité biologique des MCs, elle se fixe aux protéines phosphatases 1 et 2A de la synthèse des acides aminés sérines et thréonine. Une modification des MCs telle une séparation de la chaîne Adda du peptide cyclique les rend non toxiques (Carmichael, 1992).

L'acide D-glutamique a également un rôle au niveau de la toxicité des MCs puisque des modifications de cet acide entraînent une réduction de la toxicité des MCs (Stottset *al.*, 1993).

Toutes les variantes structurales des MCs n'ont pas le même niveau de toxicité; la DL50, 24h intrapéritonéale (ip) chez des souris peut varier de 25 à plus de 1200 µg/kg poids corporel (p.c.) (Hottoet *al.*, 2007).

Les MCs sont solubles dans l'eau, le méthanol et l'éthanol et sont insolubles dans l'éther, l'acétone, le chloroforme et le benzène (Van Apeldoorn *et al.*, 2007). À potentiel hydrogène (pH) neutre, les MCs s'avèrent très stables et très résistantes à des conditions d'oxydation ou d'hydrolyse chimique. Les MCs restent actives après ébullition. En milieux naturels et à la noirceur, les MCs persistent des mois et même des années. Elles se révèlent stables sous des conditions de lumière naturelle mais se dégradent sous d'intenses

rayonnements ultraviolets (UV). L'ozonation et les puissants agents oxydants ont la capacité de dégrader les MCs (Sivonen et Jones, 1999).



Figure(1): Structure moléculaire générale de la microcystine(Kondo, 2005).

3) Variantes de la toxine

Elles proviennent majoritairement de substitution d'acide aminé en position 2 et 4 ou bien du retrait/ajout d'un groupement méthyle sur les fonctionnalités 3 et 7. Les acides aminés les plus communs à la position X sont la leucine (L), l'arginine (R) et la tyrosine (Y), alors qu'à la position Z on retrouve généralement l'arginine (R), l'alanine (A) et la méthionine (M).

Le tableau suivant présente les différents acides aminés retrouvés à chaque position. La combinaison de ces possibilités explique le fait qu'il y ait autant de microcystines. (Mahmoud et Hyde,1990). Selon leur composition, les microcystines présentent une gamme de poids moléculaires située entre 900 - 1 100 Da .Ces molécules sont très solubles dans l'eau et peu volatiles (Van Apeldoorn *et al.*, 2007).

Tableau (3): Les différents types de la MC. (Van Apeldoorn *et al.*, 2007).

Nom	AA de position-X	AA de position-Z	Poids moléculaire
Microcystine LA	Leucine (L)	Alanine (A)	910.06
Microcystine LA	Tyrosine (Y)	Arginine (R)	1045.19
Microcystine LA	Arginine (R)	Arginine (R)	1038.2
Microcystine LA	Leucine (L)	Arginine (R)	995.17

5) Comparaison de la toxicité de deux variantes de microcystines

5-1) La MC-LR et la MC-RR ne produisent pas exactement les mêmes effets

La MC-RR ne diffère de la MC-LR que par un seul acide aminé, une arginine à la place d'une leucine. Cependant, leur toxicité *in vivo* par *ip* sur rongeur diffère d'un facteur 5 à 10 (Chen et al 2006b; Gupta et al 2003). Des différences d'effet entre ces deux variantes ont été également rapportées par d'autres auteurs. Un niveau de cytotoxicité de la MC-RR plus faible comparé à la MC-LR a été observé *in vitro* sur le modèle de cellules intestinales humaines Caco-2 (Prieto *et al.*, 2010).

De plus, la MC-RR induit moins de stress oxydant que la MC-LR dans le foie et les branchies du poisson tilapia après exposition *ip* (Prieto *et al.*, 2006).

Sur la lignée hépatique de poisson PLHC-1, la MC-LR induit des lésions générales (augmentation des vésicules de sécrétion, diminution du nombre de cellules, arrondissement des cellules et réduction de leur taille) de manière plus intense avec la MC-LR que la MC-RR. Sur cette même lignée cellulaire, la MC-RR induit plus particulièrement des signes de stéatose ainsi qu'une baisse significative du contenu protéique à des doses plus faibles que la MC-LR (Pichardo *et al.*, 2005).

Cependant, il semble que, si les dommages hépatiques sont plus sévères avec la MC-LR, le rein est plus touché avec la MC-RR. Ces quelques études suggèrent donc qu'il y a des différences d'effet entre ces deux variantes (Atencio *et al.*, 2008).

5-2) La MC-LR et la MC-RR inhibent les PPs de manière similaire

Comme nous l'avons indiqué, les PPs sont les cibles principales des MCs et ainsi été constaté qu'il existait une bonne corrélation entre le niveau d'inhibition des PP2A pour les différentes variantes de MCs et leur DL50 par *ip*. Cependant, cette règle ne peut s'appliquer à tous les variantes. En effet, après injection intratrachéale, la MC-RR est moins toxique (DL50

~1000µg/kg) que la MC-LR (DL50~75µg/kg) alors que leurs coefficients d'inhibition desPPs intracellulaires sont similaires(Ito *et al.*, 2002).

De plus, la plupart des études portant sur la capacité d'inhibition des PP1 et PP2A par la MC-LR et la MC-RR ne montrent aucune différence statistiquement significative même si la MC-RR apparait systématiquement moins puissante que la MC-LR. Compte tenu de ces éléments, il semblerait que la nette différence de toxicité entre ces deux variantes ne soit pas due à une différence d'inhibition des PPs(Chen *et al.*, 2006).

5-3) Les autres cibles

D'autres cibles de la MC-LR ont été suggérées ces dernières années comme l'ALDH2 ou l'ATP synthase mitochondriale. Cependant, à notre connaissance, l'effet de la MC-RR sur ces cibles potentielles ou sur l'induction du stress du réticulum endoplasmique n'a pas été étudié. Ainsi une meilleure connaissance de la toxicité spécifique de ce variant permettrait peut-être d'identifier d'autres pistes que la simple différence d'inhibition des PPs qui permettraient d'expliquer la différence de toxicité entre les variantes de MCs. Celle-ci pourrait s'expliquer par une différence de mécanisme d'action ou une différence dans leur ADME.

La MC-LR et la MC-RR ont autant de difficultés à traverser les membranes cellulaires.

Au niveau hépatique, certains transporteurs ont une meilleure affinité pour la MC-LR que pour la MC-RR, Les études comparant les effets de la MC-LR et de la MC-RR sont très rares. Respectif (Mikhailov *et al.*, 2003 ;Chen *et al.*, 2006).

Mécanisme de toxicité des microcystines

La toxicité de cette molécule varie fortement d'une part selon l'espèce qui est en contact avec la toxine (certaines espèces y sont naturellement plus résistantes), et d'autre part selon la forme (variant moléculaire) de la molécule de microcystine.

La toxicité des différentes variantes de la microcystine semble dépendre du degré de méthylation de certains acides aminés. Lorsque l'entité ADDA est méthylée, la toxicité de la microcystine diminue considérablement, suggérant que cette partie de la molécule est le site d'interaction majeur avec les phosphatases.

De plus, la forme linéaire des microcystines est reconnue pour être cent fois moins toxique (McConnell et Wadzinski, 2009).

1) Les cellules eucaryotes

1-1) Les microcystines sont des inhibiteurs de protéines phosphatase sérine/thréonine

Au sein des cellules, les MCs ont pour cible principale les protéines phosphatases sérine /thréonine (PPs). Cependant, depuis le début des années 2000, un certain nombre d'études suggère un rôle important du stress oxydant dans la toxicité des MCsetce de manière indépendante à l'inhibition des PPs (Shenolikar*et al.*, 1994).

1-1-1) Les protéines phosphatases

Dans le système cellulaire, l'activité protéique est en grande partie régulée par des modifications post traductionnelles y compris par la phosphorylation de certains résidus d'AAs. Le système de phosphorylation met en jeu deux familles d'enzymes : les protéines kinases qui phosphorylent les protéines et les protéines phosphatases qui le dé phosphorylent, Ainsi, à tout instant près de 30 % des protéines cellulaires sont phosphorylées (Cohen, 2001).

Le statut de phosphorylation des protéines joue un rôle majeur à la fois dans leur niveau d'activité, leur localisation subcellulaire, leur fonction et leur demi-vie. Les protéines kinases et phosphatases régulent ce statut de phosphorylation ce qui en fait des acteurs majeurs de la régulation de l'homéostasie cellulaire (McConnell et Wadzinski, 2009).

Les protéines phosphatases sont classées en fonction de leur substrat en 2 grandes familles: les protéines phosphatases à sérine et thréonine et les protéines phosphatases à tyrosine (McConnell et Wadzinski, 2009).

1-1-2) Mécanisme d'inhibition des PPs par les microcystines

Les protéines phosphatases à Ser/Thr (PPs) sont les cibles des microcystines et sont puissamment inhibées par celles-ci (Eriksson *et al.*, 1990; Nishiwaki-Matsushima *et al.*, 1991; Toivola, 1994). En effet, les concentrations inhibitrices 50 (CI50) constatées sur PP1 et la PP2A sont de l'ordre de 1nM.

Cependant, toutes les isoformes de PPs ne sont pas sensibles aux MCs : ainsi la PP2C n'est pas inhibée alors que la PP1, PP2A, PPP4 et la PPP5 le sont (Hastie *et al.*, 2005; Honkanen *et al.*, 1990). Les deux acides aminés spéciaux des MCs (ADDA et Mdha) participent à l'inhibition des PPs. En effet, la modification de l'ADDA de la MC-LR ou de la MC-RR induit une baisse de 10 à 100 fois du potentiel d'inhibition de la PP1. Le Mdha, quant à lui, forme une liaison forte (liaison thiol) avec le résidu Cys 273 de la PP1 ou le Cys 266 de la PP2A. Si la formation de cette liaison est empêchée, par exemple par une mutation du résidu Cys 273, le pouvoir inhibiteur de la MC-LR diminue alors d'un facteur 5 à 20.

Ce résultat indique que ces liaisons fortes jouent un rôle majeur dans l'inhibition des PPs par les MCs. L'interaction des MCs avec les sous-unités catalytiques des PPs se déroule en deux temps.

Tout d'abord, une liaison faible se forme entre l'ADDA et les PPs dès les premières minutes. Ensuite, après plusieurs heures, une liaison covalente se forme entre le Mdha et les PPs. (N-Matsushima *et al.*, 1991).

1-1-3) Conséquences de l'inhibition des PPs

A l'échelle cellulaire, l'inhibition des PPs par les MCs se traduit par une augmentation du niveau de phosphorylation des protéines et une perturbation du cytosquelette (Yoshizawa *et al.*, 1990 ; Falcone et Yeung, 1992; Ohta *et al.*, 1992). En effet, la structure du cytosquelette est, entre autre, contrôlée par l'action des PPs. Le cytosquelette est composé de 3 éléments: les filaments intermédiaires, les microfilaments et les microtubules. Il a ainsi été constaté que l'hyper phosphorylation des cytokératines provoquée par les MCs induit une désagrégation et un effondrement des filaments intermédiaires. De même, la contraction de

l'actine des microfilaments induite par phosphorylation génère les déformations cellulaires décrites sur les hépatocytes dès les années 1980 (Ding *et al.*, 2000; Eriksson *et al.*, 1989; Falconeret Yeung, 1992; RunnegaretFalcone, 1986). Enfin, une perturbation des microtubules est aussi constatée suite à l'exposition aux MCs (Runnegaretal.,1999 ;Lankoffet *al.*, 2003 ; Alvercaet *al.*, 2009).

Suite à l'entrée de MC-LR dans la cellule, une production d'ERO est très rapidement détectée, suivie par un influx mitochondrial d'ions calcium et d'une hyperpolarisation des membranes mitochondriales. A partir de 20 minutes d'exposition, on peut observer le début de la transition de perméabilité mitochondriale et le déclenchement de l'apoptose. Les premiers dommages à l'ADN induits par le stress oxydant apparaissent après 40 minutes.

Au-delà des effets sur la structure du cytosquelette, il a aussi été observé que la MC-LR induisait une augmentation de la prolifération cellulaire (Lankoffet *al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2005). En effet, les PPs jouent un rôle essentiel dans la régulation du cycle cellulaire (McConnell et Wadzinski, 2009 ; Dias *et al.*, 2010).

Cet effet sur la prolifération cellulaire serait à l'origine du potentiel de promoteur de tumeurs des MCs(Clark *et al.*, 2008).

1-1-4) Les microcystines génèrent du stress oxydant

1-1-4-1) Mitochondries

Au-delà de la capacité d'inhibition des PPs, les MCs induisent du stress oxydant dans les cellules. Les premières études portant sur cet aspect de la toxicité des MCs datent de la fin des années 1990 (Ding *et al.*,1998; Guzman et Solter, 1999).

Cependant, depuis la fin des années 1980, de nombreux auteurs ont rapporté des effets des microcystines sur les mitochondries, organites clés dans la production de stress oxydant. Ainsi, après traitement aigu avec la MC-LR, les mitochondries des hépatocytes s'agrègent, gonflent et leur chaîne respiratoire est perturbée jusqu'au découplage de celle-ci (Hermanskyet *al.*, 1993;Miura *et al.*,1989; Pace *et al.*, 1991; Zhao *et al.*, 2008 La-Saleteet *al.*, 2008).

Les MCs induisent aussi une augmentation de la taille des crêtes mitochondriales aussi bien dans des hépatocytes, des cellules rénales épithéliales ou des fibroblastes. Il a été montré que les mitochondries étaient des cibles précoces de la MC-LR.

En effet, leur fonctionnement est perturbé (perturbation de leur potentiel membranaire et transition de la perméabilité mitochondriale bien avant l'apparition des premiers signes d'apoptose dans des cultures d'hépatocytes de rats). Cette perturbation serait liée à un influx massif d'ions calcium dans les mitochondries.

La transition de perméabilité mitochondriale ainsi induite est source d'une forte production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et donc de stress oxydant menant les cellules à l'apoptose (Khan *et al.*, 1995; Wickstrom *et al.*, 1996)

De plus, deux molécules mitochondriales ont dernièrement été identifiées comme cible potentielle de la MC-LR: l'ATP synthase (synthétase) et l'aldéhyde déshydrogénase.

1-1-4-2) Réticulum endoplasmique

Dans un contexte de stress du réticulum endoplasmique, les protéines Bak et Bax localisées dans la membrane du réticulum endoplasmique subissent une déformation et permettent ainsi un efflux d'ions calcium hors du réticulum endoplasmique. Ce dernier active les CAMKII cytoplasmiques ce qui induit l'activation des procaspases-12 et donc l'activation de la cascade des caspases. Le flux d'ions calcium induit aussi la voie mitochondriale de l'apoptose. CHOP, un des effecteurs de la réponse au stress réticulum endoplasmique, inhibe l'expression de Bcl-2 et favorise ainsi l'apoptose. Enfin, le stress réticulum endoplasmique active IRE1 qui se lie à la kinase inhibitrice c-Jun-N-terminale (JIK). Ce complexe recrute TRAF2 qui active ASK1/JNK et favorise à son tour la libération de procaspase-12 du réticulum endoplasmique.

Il est ainsi envisagé que la perturbation du fonctionnement de ces enzymes pourrait mener à des dysfonctionnements mitochondriaux avec pour conséquence une forte production d'ERO. Cependant, la production d'ERO commence avant la détection de la perturbation mitochondriale (Chen *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010).

La production de stress oxydant suite à une exposition aux MCs a été confirmée *in vivo* dans de nombreux organismes par la mesure de la production d'ERO (Blaha *et al.*, 2004; Bouaicha et Maatouk, 2004) ou de la peroxydation lipidique (Gehring *et al.*, 2004; Moreno *et al.*, 2005; Prieto *et al.*, 2007; Wenget *et al.*, 2007) ou par la perturbation du système antioxydant (Gehring *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 2005; Qiu *et al.*, 2009).

L'importance du stress oxydant dans la toxicité des MCs a été authentifiée par l'emploi d'agents antioxydants comme les vitamines C ou E entraînant une baisse de la sensibilité des organismes aux MCs (Atencio *et al.*, 2008; Gehringer *et al.*, 2003; Weng *et al.*, 2007 ; Prieto *et al.*, 2009).

Le stress oxydant est donc aujourd'hui considéré comme un des mécanismes principaux de la toxicité des MCs au même titre que l'inhibition des protéines phosphatases à sérine/thréonine.

De plus, le stress oxydant généré par les MCs pourrait être la source de lésions de l'ADN et donc être responsable d'un effet génotoxique des MCs (Zegura *et al.*, 2003; Zegura *et al.*, 2008), Les microcystines sont probablement source de stress du réticulum endoplasmique.

Un autre mécanisme de toxicité des MCs semble émerger des études les plus récentes: le stress du réticulum endoplasmique (SRE) (pour revue sur le stress du réticulum endoplasmique voir En effet, les effets des MCs sur la morphologie des organites cellulaires (dilatation du réticulum endoplasmique (RE), vacuolisation et dilatation des mitochondries, augmentation du nombre de vacuoles cytoplasmiques apparemment vides) sont caractéristiques de ceux observés lors d'un SRE. (Credle *et al.*, 2005; Lebiezinska *et al.*, 2009; Rasheva *et al.*, 2009).

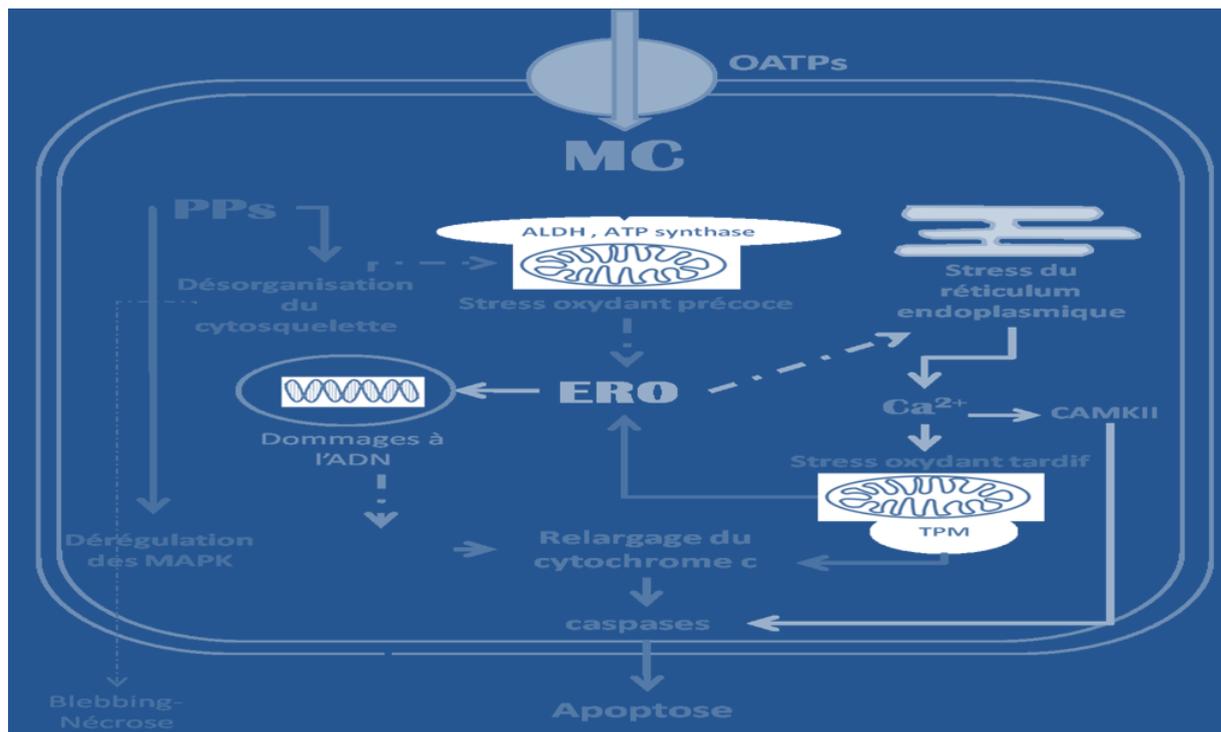


Figure (2): Synthèse de l'état des connaissances sur les principales voies de toxicité cellulaire des microcystines (Lavera *et al.*, 2009; Hermanskyet *al.*, 1993).

Dans un contexte de SRE, le RE libère des ions calcium vers la mitochondrie, mécanisme classiquement impliqué dans l'apoptose (Giorgi *et al.*, 2009) et qui a été observé avec la MC-LR (Ding et Ong, 2003). Dans ce contexte, la mitochondrie serait en réalité un effecteur en aval de la voie SRE (Giorgi *et al.*, 2009).

La protéine CAMKII joue un rôle à la fois dans la voie métabolique Fas (associée à JNK) et dans l'absorption du calcium par la mitochondrie lors d'un SRE (Timmins *et al.*, 2009). Or CAMKII et JNK sont décrites par certains auteurs comme des enzymes clés du mécanisme de toxicité de la MC-LR (Fladmark *et al.*, 2002; Krakstad *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2008).

Enfin, il a été montré qu'en plus de jouer un rôle dans le SRE, Fas participe à l'apoptose induite par les MCs. Ce résultat est un lien supplémentaire entre l'apoptose induite par les microcystines et le stress du réticulum endoplasmique. (Xionget *al.*, 2009; Feng *et al.*, 2011).

Des études récentes ont permis d'identifier des biomarqueurs pour le stress du réticulum endoplasmique (Xionget *al.*, 2009; Feng *et al.*, 2011).

2) Les organes

2-1) Le foie, principale cible des MCs

De nombreux organes sont touchés par les MCs : le foie, les reins, les poumons, le cerveau ou les intestins). Cependant la toxicité hépatique est principalement responsable de la mortalité induite par ces toxines. (Falconer *et al.*, 1994; Ito *et al.*, 2000; Iton *et al.*, 2001).

2-1-1) Hépatotoxicité des microcystines

L'hépatotoxicité aiguë des microcystines a été maintes fois décrite depuis les années 80. Ces descriptions ont été réalisées *in vivo* sur souris après injection intrapéritonéale (ip) (Chen *et al.*, 2006; Hermansky *et al.*, 1993), injection intratrachéale ou après gavage (Fawell *et al.*, 1999; Yoshida *et al.* 1997).

Cette toxicité a aussi été étudiée *ex vivo*, sur foies perfusés de rats (Pace *et al.*, 1991; Wickstrom *et al.*, 1996) et *in vitro* sur cultures primaires d'hépatocytes de mammifères (homme ou rongeurs).

Ainsi, on observe chez les mammifères une augmentation du poids et du volume hépatiques causée par des hémorragies et une infiltration de leucocytes mononucléaires (Khan *et al.*, 1995; Khan *et al.*, 1996 ; Batista *et al.*, 2003).

On observe aussi classiquement une perte de la structure sinusale et une augmentation du diamètre des canalicules biliaires (Hermansky *et al.*, 1993; Miura *et al.*, 1991; Pace *et al.*, 1991a; Wickstrom *et al.*, 1996). Les nécroses ou le développement de fibrose progressive sont aussi des phénomènes associés à une exposition aux MCs (Ito *et al.*, 1997; Jochimsen *et al.*, 1998 Carmichael *et al.*, 2001).

A l'échelle cellulaire, on constate une perte de la structure cellulaire liée à un effondrement du cytosquelette des hépatocytes. On observe aussi la redistribution des organites dans le cytoplasme :

- **les mitochondries**

S'agrègent, se dilatent et présentent des crêtes et des cryptes mitochondriales plus développées que la normale (Hermansky *et al.*, 1993; Khan *et al.*, 1995; Wickstrom *et al.*, 1996).

- **le réticulum endoplasmique**

Se dilate et prend une forme spiralée (Hermansky *et al.*, 1993; Khan *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2001; Miura *et al.*, 1989; Wickstrom *et al.*, 1996). De plus, une déplétion en glycogène est généralement constatée et de nombreux noyaux deviennent apoptotiques. Les hépatocytes meurent fréquemment après la formation de bourgeonnements de leur membrane cytoplasmique (Hermans *et al.*, 1993; Khan *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2001).

2-1-2) Organotropisme des microcystines, une histoire de transporteurs

La MC-LR est décrite comme une hépatotoxine directe potentielle induisant une mort rapide causée par un choc hémorragique découlant d'une nécrose hépatique et d'un collapsus du parenchyme hépatique. Cet organotropisme des MCs a été confirmé par l'emploi de dihydromicrocystine-LR marquée au tritium lors d'études de cinétique. En effet 56 à 84 % de la toxine marquée est retrouvée dans le foie selon les espèces. (Meri Luoto Robinson *et al.*, 1989).

Au début des années 80, Runnegar *et al.* suggèrent que l'absorption des MCs par les hépatocytes de rat en culture primaire dépend du système de transport des sels biliaires par les transporteurs OATPs (« organic anion transport protein »).

Cette hypothèse est renforcée par les travaux d'Ericksson *et al.* en 1990. En effet, l'incubation avec des sels biliaires (cholate et taurocholate) ou des inhibiteurs de ces transporteurs (antamanide, sulfobromophthaleine et rifampicine) induit une inhibition de l'absorption des MCs dans les hépatocytes de rat (Eriksson *et al.*, 1990).

De plus, sur culture primaire d'hépatocytes de souris, cette baisse de l'absorption de MCs en présence d'inhibiteur du transport des sels biliaires induit également une baisse de l'inhibition des protéines phosphatases à sérine/thréonine, ces protéines étant des cibles des MCs. (Runnegar *et al.*, 1995).

L'hypothèse selon laquelle les OATPs jouent un rôle dans le transport des MCs a aussi été confortée *in vivo*. En effet, les souris exposées par injection intrapéritonéale à une dose aiguë de MC-LR, présentent des foies où seuls les hépatocytes, cellules qui expriment des OATPs, semblent touchés par la toxicité, à la différence des cellules endothéliales, qui n'expriment pas d'OATPs (Hermansky *et al.*, 1993).

De plus, la Coincubation avec des compétiteurs des transporteurs de sels biliaires, comme la cyclosporine A ou la rifampicine protège les souris des effets hépatotoxiques de la MC-LR (Hermansky *et al.*, 1990; Hermansky *et al.*, 1990).

Cependant, aucune de ces études ne permet d'identifier les isoformes impliquées dans le transport des MCs. Pour cela, il faut attendre 2005 et l'étude de Fischer *et al.* Avec l'emploi d'oeufs de xénopestransfectés et l'utilisation de dihydromicrocystine-LR traitée un certain nombre d'OATPs ont été spécifiquement testés pour le transport des MCs.

Parmi les 3 OATPs hépatiques humains testés (OATP 1B1, 1B3 et 2B1), seuls les OATP 1B1 et 1B3 ont présenté la capacité de transporter les MCs (Fischer *et al.* 2005). L'importance des OATP 1B1 et 1B3 dans la toxicité hépatique de la MC-LR a été ensuite confirmée *in vivo* : des souris Knock Out (KO) pour le gène *Oatp 1b2*, qui est l'orthologue murin des OATP 1B1 et 1B3, ont été exposées par injection intrapéritonéale à la MC-LR. Le niveau d'inhibition des protéines phosphatases hépatiques chez les souris délitées pour le gène *Oatp 1b2* s'est révélé plus faible que celui des souris contrôle démontrant le rôle majeur de cet OATP dans l'absorption hépatique des MCs (Lu *et al.*, 2008).

2-2) D'autres organes sont touchés par la toxicité des microcystines

Cependant, le foie n'est pas le seul organe à être touché par la toxicité des microcystines. En effet, les toxines ont été détectées dans de nombreux organes tels que le cerveau, les reins, le poumon, les testicules ou les intestins après exposition par différentes voies d'administration (Hooser *et al.*, 1990; Ito *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001; Cazenave *et al.*, 2005).

Cependant la proportion de MCs retrouvées dans ces organes est souvent marginale par rapport à celle retrouvée dans le foie (Robinson *et al.* 1991; Cazenave *et al.*, 2005 ; Wang *et al.*, 2008).

2-2-1) Neurotoxicité

Suite à l'accident de Caruaru au Brésil, les patients décédés présentaient, après

exposition aux MCs par dialyse, non seulement des signes d'hépatotoxicité mais aussi de neurotoxicité aiguë (Jochimsen *et al.*, 1998; Pouria *et al.*, 1998).

Cependant, peu d'études ont été menées sur les mammifères afin de mieux cerner cette toxicité. Parmi celles-ci, Ont montré à l'aide de tests comportementaux un effet amnésiant des MCs après injection dans l'hippocampe des souris (Maidana *et al.*, 2006). Il a aussi été constaté que l'exposition aux MCs par diverses voies génèrait une augmentation des marqueurs du stress oxydant dans le cerveau des mammifères (Gaudin *et al.*, 2007; Maidana *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2009).

De plus, des études *in vitro* ont montré que des cultures de cellules isolées du cerveau de souris étaient sensibles à différents variantes de MCs et capables de les incorporer (Feurstein *et al.*, 2009). Plus précisément, les neurones sont des cibles potentielles des MCs. En effet, les neurones de rats expriment des OATPs et sont sensibles à la toxicité de plusieurs variantes de microcystine (Feurstein *et al.*, 2010; Fischer *et al.*, 2005).

2-2-2) Toxicité rénale

La toxicité rénale des MCs a historiquement été décrite comme une vacuolisation modérée de l'épithélium tubulaire proximal et une dilatation du rein après une exposition aiguë par ip (160 µg/kg). Depuis, les études menées sur rein perfusé de rat ont indiqué que la MC-LR induisait des lésions glomérulaire et vasculaire (Nobreet *et al.*, 2001; Nobre *et al.*, 1999). *In vivo*, les études d'exposition chronique (8 mois) par injection intrapéritonéale avec la MC-LR, indiquent que les reins des rats présentent des effondrements glomérulaires avec des membranes basales épaissies et des tubules dilatés. De plus, les fibres d'actine sont agglomérées et accumulées dans les cellules de L'épithélium (Milutinovic *et al.*, 2002; Milutinovic *et al.*, 2003).

2-2-3) Toxicité pulmonaire

Peu d'études ont été menées sur la toxicité pulmonaire des MCs. Pourtant, L'inhalation de MCs a été incriminée dans le développement de pneumonies sévères en Angleterre observé chez des militaires suite à la pratique de canoë lors d'un bloom de *MicrocystisAeruginosa* (Turner *et al.*, 1990). Des études menées en laboratoire ont aussi montré un impact des MCs sur les poumons. Ainsi des nécroses importantes de l'épithélium des zones respiratoire et olfactive ont été constatées sur des souris ayant subi une exposition intranasale à la MC-LR (Turner *et al.*, 1990). De même des extraits de *M. aeruginosa* contenant des MCs ont généré une inflammation rapide des poumons chez les souris traitées par injection intrapéritonéale (Picancoetal., 2004).

2-2-4)Reprotoxicité

Les effets des MCs sur les organes reproducteurs n'ont été rapportés que récemment, la première étude datant de 2006. Celle-ci indique que les souris mâles exposées par ip pendant 14 jours à des extraits de *M. aeruginosa* contenant des MCs, présentent des lésions des testicules avec une augmentation de l'espace entre les tubes séminifères.

De plus, la qualité du sperme mature est altérée par rapport aux souris du groupe témoin (Ding *et al.*, 2006). La MC-LR induit des effets similaires : elle est cytotoxique pour les cellules de Sertoli et les cellules de Leydig ce qui entraîne une baisse à la fois de la production de testostérone et de la qualité du sperme (Li *et al.*, 2008; Xionget *al.*,2009). Dernièrement, une étude d'exposition chronique de poisson médaka traité par balnéation avec la MC-LR ,a révélé des lésions aussi bien dans les ovaires que dans les testicules ainsi qu'une baisse du nombre d'œufs par ponte (I. Trinchet, 2011). De plus, des études récentes suggèrent que la MC-LR pourrait jouer un rôle de perturbateur endocrinien en tant que « xéno-œstrogène » (Sieroslawska et Rymuszka, 2009 ; Oziol et Bouaïcha, 2010; Rogers *et al.*,2011).

2-2-5 Toxicité intestinale

De nombreuses études ont permis de détecter la présence de MCs, et plus particulièrement de la MC-LR, au sein des cellules intestinales quelle que soit l'exposition par intraveineuse, intrapéritonéale ou orale (Meriluoto *et al.*,Robinson *et al.*, 1989; Robinson *et al.*,1991;Ito *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2002). Au niveau macroscopique, la toxicité intestinale de la MC-LR chez les mammifères se traduit par une perte de la structure des entérocytes avec une érosion des microvillosités (Ito *et al.*,2000; Ito *et al.*,2002). La perte de la cohésion de l'épithélium intestinal a aussi été constatée après une exposition orale aiguë à la MC-LR chez le poisson médaka (Djediati *et al.*, 2010). In vitro, des entérocytes de poulet exposés à des extraits toxiques de *M. aeruginosa* ont présenté des bourgeonnements de la membrane plasmique similaires à ceux observés avec les hépatocytes ().L'exposition à la MC-LR induit aussi une perturbation de la physiologie intestinale(Falconer*al.*,et 1992).

En effet, certaines études rapportent des modifications du taux de peroxydation des lipides et d'activité d'enzymes membranaires dans des entérocytes après injection intrapéritonéale de MC-LR sur des rats (Moreno *et al.*,2003). La MC-LR augmenterait aussi la sécrétion d'eau et d'électrolytes par les cellules intestinales lors de perfusions de boucles

iléales (Nobre *et al.*, 2004). Enfin, elle serait responsable de lésions de l'ADN et d'une augmentation de l'apoptose au niveau intestinal (Botha *et al.*, 2004; Gaudin *et al.*, 2008).

3) Cancérogénicité des microcystines

L'incidence des hépatocarcinomes en Chine est une des plus élevée au monde (Yue *et al.*, 1998). Cette situation est classiquement expliquée par une exposition importante à la mycotoxine aflatoxine B1 via la nourriture et au virus de l'hépatite B très présent dans ces régions. Cependant, une corrélation entre la présence de MCs dans les eaux utilisées pour l'alimentation et l'augmentation de l'incidence des cancers du foie et du colon a également été observée dans ce pays (Yue *et al.*, 1995 ;Ueno *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 2002).

De plus, plusieurs études sur des modèles rongeurs (rats ou souris) ont étudié le rôle carcinogène et principalement de promotion tumorale des MCs (Falcone et Buckley, 1989; Ito *et al.*, 1997; Sekijima *et al.*, 1999).

En Juin 2006, le Centre international de Recherche sur le Cancer (CIRC) a réuni un panel d'experts internationaux pour évaluer la carcinogénicité des extraits de Microcystis et de la MC-LR. Il a été conclu que la MC-LR pouvait être considérée comme un carcinogène potentiel pour l'homme et elle a été inscrite au groupe 2B (IARC, 2006). Par contre, les données restent insuffisantes pour conclure sur les extraits de Microcystis et sur les autres variantes de MCs. Ceux-ci n'ont donc pas été classés (IARC, 2010).

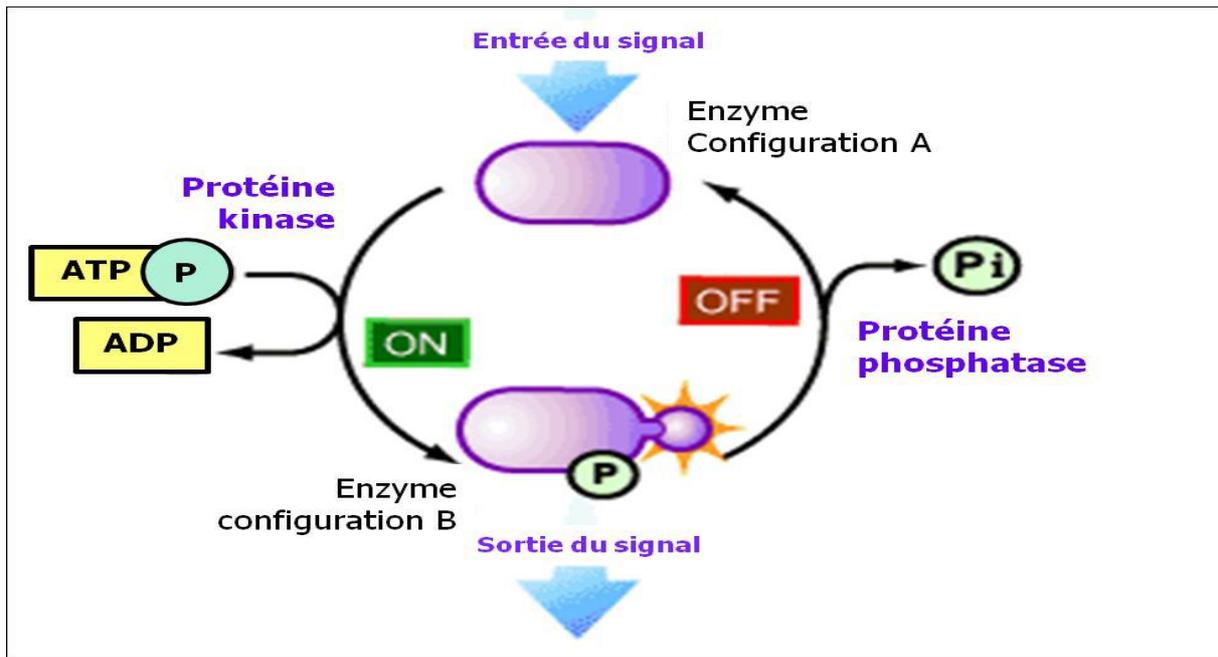


Figure (3): Système de phosphorylation/déphosphorylation des protéines au cours de la transduction d'un signal. (Zeller Perrine, 2001).

1) Généralités

La génotoxicité, appelée également toxicité génétique, représente la capacité de certains agents physiques, chimiques ou biologiques à provoquer l'apparition de dommages à l'ADN qui peuvent conduire à des mutations génétiques si ces lésions ne sont pas réparées.

Ces agents sont qualifiés de mutagènes. On considère deux classes d'agents génotoxiques, les génotoxiques directs qui sont capables de modifier directement la structure de l'ADN, et ceux que l'on appelle des progénotoxiques qui nécessitent une activation métabolique préalable avant de pouvoir exercer leurs effets génotoxiques. On parle dans ce cas de processus de bioactivation.

En raison de la grande variété de structures et de modes d'action des substances génotoxiques, il existe un grand nombre de dommages à l'ADN possibles. Ces altérations structurales de l'ADN appelées lésions primaires concernent principalement des modifications des bases constitutives de l'ADN ou des cassures affectant un seul ou les deux brins de l'ADN.

Il y a tout d'abord les adduits encombrants qui correspondent à l'entité chimique résultant de l'établissement d'une liaison covalente entre une molécule chimique électrophile et un site nucléophile d'une base de l'ADN. Parmi les sites nucléophiles, les azotes aromatiques, les groupements hydroxyles et carbonyles des bases constitutives de l'ADN sont les cibles privilégiées des génotoxiques.

2) Test de mutation génique sur les procaryotes (Test d'Ames)

2-1) Définition

Le test d'Ames, parfois appelé test à *Salmonella* ou *mutatest*, est un test biologique permettant de déterminer le potentiel mutagène d'un composé chimique ou un agent physique. Le test d'Ames peut avoir différentes implications, mais dans les faits, il est surtout employé pour repérer les produits cancérigènes. En effet les cancers étant souvent liés à des dommages causés dans l'ADN, ce test rapide et peu onéreux est donc utilisé afin d'estimer le potentiel cancérigène d'une substance. Le protocole fut décrit dans une série de publications au début des années 70 par Bruce Ames et son équipe de l'Université de Californie, Berkeley.

2-2) principes du test Ames

Le test d'Ames consiste à préparer une série de mélange d'une quantité constante d'une de chacune des souches choisies pour le test et des quantités croissante du produit à tester, à les étaler sur des boîtes de pétri contenant un milieu minimal. Ce milieu autorise la

croissance des révertants His⁺ uniquement .Afin d'augmenter la sensibilité du test , une trace d'histidine est ajoutée qui permet la croissance de 2 à 3 générations de His⁻ et amplifier l'apparition des révertants. Après incubation pendant 48 h, le dénombrement des révertants His⁺ est effectué Ceux –ci apparaissent sous forme de colonies sur un tapis cellulaire translucide (bruit de fond) (Ames, 1983 ; DeMeo*et al.*, 1996).

- **Particularité du milieu de culture**

Certaines substances nécessitent un inducteur pour être mutagène .un extrait de foie de rat appelé S9 Mix (fraction microsomale) obtenu par ultracentrifugation est souvent ajouté à l'agar mou avant étalement. Cet extrait enzymatique convertirait les substances cancérigènes en dérivés électrophiles, plus susceptibles de réagir directement avec l'ADN, système absent chez les bactéries mais présent chez les mammifères. Ainsi de nombreux agents cancérigènes comme les aflatoxines ne deviennent actifs dans ce test qu'en présence de cet extrait de foie.

2-3) La souche bactérienne utilisée

En fonction des souches utilisées pour la réalisation du test, différents types de mutations peuvent être détectées, les souches bactériennes de nature génétique différente utilisées sont porteuses de mutations His⁻ différente qui permettent de tester des agents mutagènes variés.

2-4) Avantages

Méthode simple, sensible et précise. Ce test peut également s'appliquer à l'analyse d'effluents industriels, d'eau à usage alimentaire, de fumées ou de gaz d'échappement, de liquides biologiques humains (urines, fèces) provenant d'individus mis en contact par leur travail avec des produits cancérigènes. Les médicaments et leur principe actif peuvent aussi faire l'objet d'un examen systématique par ce test.

2-5) Inconvénients

Comme *Salmonella* est un organisme procaryote, il ne représente pas un modèle parfait pour l'homme. Un modèle in vitro plus adapté a été créé pour les cellules eucaryotes, sur des cellules de levures par exemple.

3) Test de génotoxicité sur les eucaryotes (plantes supérieures)

3-1) L'importance des plantes supérieures en génotoxicité

Les espèces végétales utilisées dans les tests de génotoxicité sont en nombre beaucoup plus restreint, 18 seulement. Ces tests permettent l'identification des agents causant des

dommages à l'homme. Les espèces les plus souvent mentionnées dans les questionnaires sont : *Allium cepa*, *Tradescantia* et *Vicia faba*.

Les réponses des végétaux supérieurs représentent d'excellents candidats pour évaluer la toxicité général et en particulier la génotoxicité de substances chimiques et matrices complexes grâce à leur nombreux avantage en terme de: Représentativité, faisabilité, sensibilité.

3-2) Les différents tests de génotoxicité associés aux plantes supérieures

3-2-1) Test d'aberrations chromosomiques

L'induction des cassures de chromosome considérées comme l'un des tests de base de la génotoxicité. Le test d'aberration chromosomique in vitro est pratiqué chez les plantes au niveau de la zone méristématique et chez les animaux au niveau des cellules des mammifères en culture .Il permettent de détecter les agents polluant qui provoquent des anomalies s touchant la structure des chromosomes (Marcano*et al.*, 2004).

3-2-2) Induction des micronoyaux

L'induction des micronoyaux in vitro est un test de mutagénéicité utilisé pour la détection de la capacité de tout agent physique ou chimique à induit la formation de petits noyaux dans le cytoplasme des cellules en interphase. Lors d'une lésion majeure de l'ADN, une fraction de chromosome entier, après coloration.

3-2-3) Induction des échanges de chromatides sœurs

Le test SCE permet d'identifier des génotoxines même à de très faibles concentrations, Il permet de visualiser l'échange réciproque des bras chromatiques appartenant à un même chromosome et il a été employé sur différentes plantes : *Allium cepa*, *Vicia faba*, et *Nicotiana, plumbaginifolia*(Panda *et al.*, 996).

3-2-4) Test des comètes

Le test des comètes permet de mesurer les cassures induites directement par un agent génotoxique, indirectement lors des processus de réparation des dommages et enfin lors des processus secondaires de fragmentation de l'ADN. C'est une technique récente qui est considérée comme très efficace pour la détection de la génotoxicité à court terme de certains polluants.

Ce test peut détecter les cassures simples et double brin, les sites labiles alcalins et les sites incomplets de réparation. Suite à une migration électrophorétique, les noyaux dont l'ADN a subi des cassures prennent une forme de comète alors que les noyaux dont l'ADN n'est pas endommagé restent ronds. (Singh *et al.*, 1988).

3-3) *Allium cepa*

3-3-1) Les critères de génotoxicité déterminés sur *Allium cepa*

Allium cepa est utilisé depuis longtemps dans les études sur les chromosomes et en particulier sur les effets des noyaux X, en 1938 le premier scientifique à évaluer les effets du traitement d'*Allium cepa* à un produit chimique, à savoir la colchicine. La modification du comportement mitotique due à la colchicine fut baptisée qui se traduit en fait par modification du nombre de chromosomes. (Marshak, 1937).

Les racines d'*Allium cepa* ont surtout été très sensibles pour détecter le génotoxique de produit chimique, métaux, ou autres substances organique.

D'autres critères ont aussi été étudiés dans les racines d'*Allium cepa* : Les échanges de chromatide sœur et très récemment, le test des comètes. Enfin, de la même façon que dans le cas de *Vicia faba*, Les critères (micronoyaux) évaluer dans les racines est de plus en plus utilisé dans les études de génotoxicité (test *Allium*-MCN). Au niveau de la sensibilité des deux tests, quelque sur *Allium cepa* ont démontré qu'il avait peu de différences entre le test des micronoyaux et le test des aberrations chromosomiques. (Cotelle, 1999).

3-3-2) Les différents paramètres analysés par le test *Allium cepa*

3-3-2-1) Indice mitotique

L'indice mitotique (IM), caractérisé par le nombre total des divisions des cellules dans le cycle cellulaire, a été utilisé en tant que paramètre à évaluer la cytotoxicité de plusieurs substances. Le niveau de cytotoxicité d'une substance peut être déterminé par l'augmentation ou la diminution de l'IM en comparant au contrôle négatif indique une altération, découlant de l'action d'une substance chimique sur la croissance et développement des organismes exposés. D'autre part, Lorsque l'IM est plus élevé que le témoin négatif, ceci est le résultat d'une augmentation de la division cellulaire, conduit à une profération anarchique des cellules et même à la formation de tissus tumoraux. (Lemeetal., 2009).

3-3-2-2) Les aberrations chromosomiques (ACs)

Les ACs sont caractérisés par le changement soit dans le nombre total de chromosomes ou de la structure chromosomique qui se produisent en raison de l'exposition au traitement chimique. Pour évaluer les différentes anomalies chromosomiques, plusieurs types d'ACs sont considérés à différents stades du cellulaire (Prophase, métaphase, anaphase et télophase). Les ACs ont été regroupés en deux types, les aberrations clastogéniques et physiologiques. Aberrations clastogéniques comprennent les ponts chromosomiques, La rupture chromosomique alors que les aberrations physiologiques comprennent c-mitose, chromosome retardataire et la condensation des chromosomes (Khanna et Sharma, 2013).

3-3-2-3) Les anomalies nucléaires

Certains auteurs ont récemment inclus un autre caractère dans l'analyse des aberrations chromosomiques dans les cellules méristématiques d'*Allium cepa*. Ce caractère se réfère à des anomalies nucléaires (AN). Les ANs sont caractérisés par des modifications morphologiques dans les noyaux interphasiques, à la suite de l'action de l'agent testé. En général, ces altérations sont observées dans le test d'*A. cepa* (Lemeet *al.*, 2009).

3-3-2-4) Micronoyaux

Les micronoyaux (MN) ont été considérés par des nombreux auteurs comme le critère le plus efficace et le plus simple pour analyser l'effet mutagène des produits chimiques. Cela est dû au fait que les MN résultent des dommages d'ADN, pas ou mal réparés, dans les cellules parentales, étant facilement observés dans les cellules filles comme une structure similaire au noyau principal, mais dans une taille réduite. Ainsi, MN découlent de la mise au point de certaines aberrations chromosomiques, par exemple, les pertes chromosomiques (Lemeetal., 2009).

I) Préparation de la toxine

La toxine (Laboratoire de Abaraxis) a été dissoute dans l'eau physiologique (0,9% de NaCl) à une concentration égale à 0,156M.

II) Test de mutagénécité (test d'Ames)

1) Matériel biologique

Le test d'Ames a été pratiqué sur la souche de *salmonella typhimurium* auxotrophes au regard de l'histidine TA98.

Tableau(2): Génotype spécifique de la souche TA89(Bach 2011).

La souche	Gènes affectés	Mutations additionnelles		Plasmide	Type de mutation détectée
		Réparation	LPS		
TA89	HisD3052	uvrB ⁻	Rfa ⁻	PkM101 ⁺	Frameshift

La souche TA89 met en évidence une mutation de type Frameshift. Ce type de mutation consiste en l'insertion ou la délétion des paires de base dans les codons triples contenu dans la séquence de l'ADN. Cette dernière entraîne un décalage du cadre de lecture.

La mutation additionnelle dans la souche TA98 est la suivante:

- **La mutation uvrB⁻**

Consiste en l'élimination des systèmes de réparation de l'ADN pour des dommages provoqués par certaines substances mutagènes et la lumière UV.

- **La mutation rfa⁻**

Entraîne une modification de la membrane externe de la bactérie qui est composée essentiellement de lipopolysaccharides (LPS), ce qui implique une augmentation de la perméabilité cellulaire à certains types de substances chimiques.

Cette mutation est sensible au cristal violet.

De plus, la présence du plasmide pk101 (molécule d'ADN extrachromosomique) dans la souche apporte une augmentation des processus induits des erreurs lors de la réparation de l'ADN (Bach, 2011)

2) Confirmation des génotypes

Le génotype de la souche testé doit être confirmé:

- 1- Immédiatement après les avoir reçu.
- 2- Quand un let gelé lyophilisé est destiné à l'utilisation.
- 3- Quand le nombre de révertants spontanés par boîte sort de l'intervalle indiqué
- 4- Quand il y a une perte de la sensibilité vis-à-vis les mutagènes standards.
- 5- la confirmation du génotype de la souche testé est incluse dans chaque test de mutagène (Maron et Ames, 1983)

3) Activation de la souche testée

- **La préculture de nuit**

Le but de cette culture est d'arriver à la phase exponentielle de croissance c'est-à-dire 2.10^9 bactérie/ml et qui correspond à une $DO= 0,4$ à une longueur d'onde égale à 650nm.

A partir de la culture de nuit on prélève 20 μ l quand dilue dans 5ml de bouillon nutritif. On l'incube à nouveau à 37° pendant 2 heures avec agitation dans un bain marie.

Les bactéries sont couvert de papier Aluminium pour les protéger de la lumière (Maron et Ames, 1983 ; Mortelmans et Zeiger, 2000).

- **Le réisolement des souches testé**

A partir de la culture de 2 heures des souches et avec une anse de platine faire des stries dans des boîtes contenant du glucose minimal agar enrichie d'histidine et de biotine, pour les souches résistantes à l'ampicilline l'agar doit contenir de l'ampicilline à une concentration de 25 μ g/ml, incubé à 37° pendant 48h. Les boîtes sont ensuite placées dans un réfrigérateur et serviront comme source de bactéries pour des tests ultérieurs. Cette conservation dura jusqu'à 2 mois (Maron et Ames, 1983 ; Mortelmans et Zeiger, 2000).

4) Vérification des caractères génétique

- **Réclamation de l'histidine**

La mutation His⁻ rend les bactéries auxotrophes à cet acide aminé dans un milieu sélectif contient obligatoirement la biotine.

Avec un écouvillon ou une anse de platine faire un seul strie de la souche sur:

1- Des boites de contrôle contenant uniquement 100µL d'une solution (0,5 mM) stérile de biotine par boite appliquée à la surface de la GMA, avec un râteau.

2-des boites His /Bio.

L'incubation se fait à 37°C pendant 24h (Maron et Ames, 1983 ; Mortelmans et zeiger, 2000).

- **La sensibilité aux UV**

Le but de test est de vérifier l'existence de la mutation. Les souches testées et la bactérie sauvagesont déposées en stries sur de gélose nutritive.

Le moitié de la boite est couverte par une plaque en verre ensuite irradié par une lampe à UV (15W) à une distance de 30 cm pendant 8 s:TA98^R.

L'incubation durant 24 h à 37°C (Maron et Ames, 1983 ; Mortelmans et zeiger, 2000).

- **La résistance à l'ampicilline et la sensibilité au cristal violet**

Il faut s'assurer de la résistance à l'ampicilline pour vérifier la présence du plasmide pkM101 chez la TA98 qui est instable. La sensibilité au cristal violet est le résultat de la mutation rfa⁻.

Ces deux caractéristiques sont testées simultanément. On prépare deux disques de papier Wattman, chaque disque est déposé sur boite de gélose nutritive imbibé de 10 µl des solutions suivantes :ampicilline et Cristal Violet.(Maron et Ames ,1983)

Le test de mutagenèse par la méthode standard avec pré incubation.

5) Principe

Certains mutagènes ne sont pas détectés par la méthode standard (incorporation en boîte) qui doivent être testés en utilisant une modification du test standard. L'essai par préincubation a été utilisé pour détecter la mutagénicité de 10 carcinogènes, d'autres travaux ont aussi démontré la mutagénicité de produits biologiques et des séries de composés volatils en utilisant cette technique.

L'essai en préincubation nécessite l'incubation du composé à tester avec la souche test pendant 20 minutes à 37°, l'agar molle est ajoutée au mélange puis verser sur le milieu solide (glucose minimal agar) les boîtes sont incubées à 37° pendant 48 h, les révertants His⁺ sont dénombrés (Maron et Ames, 1983 ; Mortelmans et Zeiger, 2000).

6) Technique sans activation métabolique (-S9)

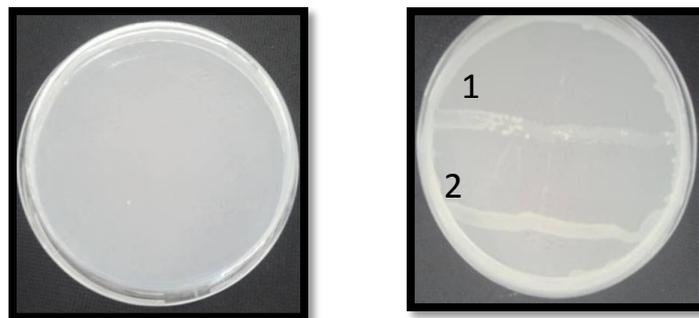
Dans des tubes en verre de 20ml, 100 µl de la culture de nuit mis en contact avec 100 µl de l'échantillon à tester placés en incubation à 37° pendant 20 minutes avec agitation dans un bain Marie. Ensuite 2,5 ml de Top agar (gélose molle) sont ajoutés au mélange puis verser sur le milieu minimum, laisser se solidifier quelques minutes et enfin mettre en incubation pendant 48h à 37° (Maron et Ames, 1983 ; Mortelmans et Zeiger, 2000).

1) vérification des caractères génétiques

Les résultats de la vérification des caractères génétiques des bactéries après culture au bouillon nutritif réalisée antérieurement aux tests de mutagénécité sont comme suit:

- **Réclamation de l'histidine**

Après incubation, les bactéries ont pu pousser sur les boites histidine/biotine et non sur les boites contenant de la biotine uniquement. Ce résultat confirme la présence de la mutation His. (Ames et Zeiger, 1984).



Milieu sans histidine

Milieu avec histidine

1 : TA100

2 : TA98

Figure 4: La réclamation de l'histidine.

- **La sensibilité aux UV**

PC : partie cachée

S : sauvage

TA98

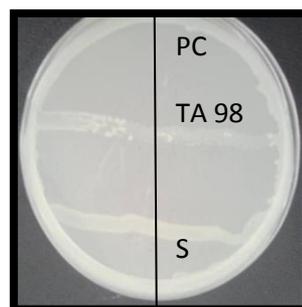
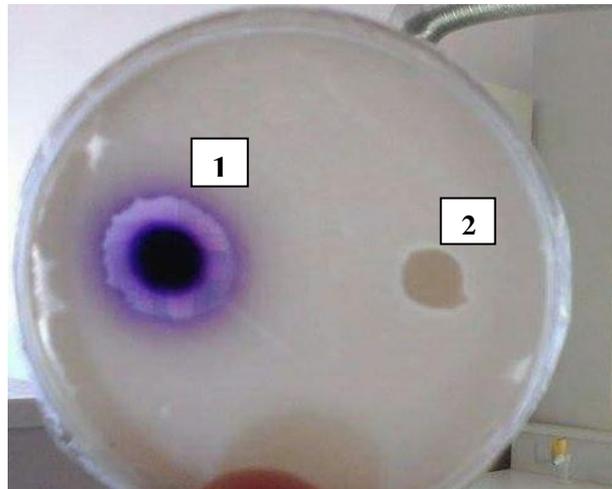


Figure 5: l'effet des UV sur les souches de *Salmonella Typhimurium* TA89 d'Ames et la souche sauvage.

La TA 98 pousse tout au long de la boite puisque la lampe disponible au niveau de notre laboratoire est à 15w alors que ce test de sensibilité aux UV nécessite une lampe à UV germicide à 60W (Ames et Zeiger, 1984).

- La résistance à l'ampicilline et la sensibilité au cristal violet



TA98

1 : Cristal violet.

2 : Ampicilline

Figure 6: l'effet de l'Ampicilline et du CV sur la souche de *salmonilla typhimurium* TA89.

Après incubation des souches, les résultats suivant ont été obtenus :

- La présence d'une zone claire uniquement autour du disque du CV dans la souche TA98. Cette souche porte donc de la mutation *rfa⁻* qui rend la bactérie sensible au cristal violet.
- L'absence d'une zone claire autour du disque d'ampicilline indique la résistance à l'Ampicilline de la souche et donc la présence du plasmide pKM101 qui porte le gène de la résistance (Ames et Zeiger, 1984)

1-2) Test de mutagénèse

Bien que l'hépatotoxicité des toxines cyanobactériennes de type microcystine sont bien documenté, leur effet génotoxique n'est pas encore complètement élucidé.

Les résultats d'essais de l'éventuel effet mutagène la microcystine sont présentés dans la figure 7, et les données numériques sont listées dans le tableau 3.

Tableau 3 : L'analyse de la mutagénécité de la MC-LR avec la souche *S.typhimurium* TA98 avec Activité métabolique

	Nombre de colonies révertantsHis ⁺	Moyenne de révertant
Témoin 1 Mc-LR (-)	48	34
Témoin 2MC-LR (-)	20	
Témoin 3MC-LR (-)	34	
MC- LR (+)	53	55
MC-LR(+)	21	
MC-LR(+)	91	
2AF – 200 µg/boite	–	1400.66

2AF:Aminofluorene

Le nombre de révertants pour la souche testée qui induit par la MC-LR est au moins deux fois supérieur au taux de révertants spontanés, mais il reste inférieur à celui du contrôle positif(1400).Donc on peut dire que la MC-LR présente un effet mutagène sur la souche *Salmonella typhimurium*TA98, ce qui indique qu'ils provoquent des mutations de type farmeshift.

On peut dire que le résultat de notre essai est révélé que la MC-LR est mutagène à concentration de 0,156M, la souche *Salmonella typhimurium*TA98détecte des mutations de type farmeshift (Maron et Ames, 1983).Pour confirmer cette effet il faut d'utilisé une gamme de concentration de la toxine.

Ding et al. (1999) rapporté dans des travaux précédents que des solutions pures de microcystine-LR ne montraient aucune mutagénécité avec le test d'Ames (souche TA98 et TA100 ; avec ou sans activation S9).



TA98 (-MC-LR)

TA98 (+MC-LR)

-MC LR : Sans Microcystine-LR.

+MC LR : Avec Microcystine-LR.

Figure 7: l'effet de la MC-LR sur la souche *Salmonella typhimurium* TA98.

Conclusion

Les microcystines de type cyanotoxins les plus étudiées à ce jour , et produites par la pullulation des bactéries, semblent en augmentation récente et elles pourraient être sous-estimées. Elles sont la cause de la mort d'animaux sauvages et domestiques, et peuvent aussi affecter des humains ; des dizaines de personnes ont trouvées la mort en 1996 lors d'une intoxication à l'hôpital de Caruaru au Brésil.

Ce travail, nous avons appliqué: le test d'Ames qui détecte des mutations réverses chez la bactérie *salmonella typhimurium* TA98, la souche la plus fréquemment utilisées pour évaluer la mutagénécité d'un produit.

Le résultat obtenu démontre un effet mutagène provoqué par la MC-LR qui induit une réversion de la souche auxotrophe et l'apparition de souche phototrophe sous forme de colonies et dites : révertants.

C'est dans cette optique que se situe notre étude dont l'objectif principal est d'évaluer l'éventuel effet mutagène de la microcystine-LR chez les procaryotes par le test d'Ames en utilisant comme souche de référence *Salmonella typhimurium* TA98.

- **Ames B.N., Zeiger H., 1984.** Measuring oxidative damage in humans : relation to cancer and ageing, *Scientific Publications*, 89, 407 -416.
- **Atencio L., Moreno I., Jos A., Pichardo S., Moyano R., Blanco A., Cameán A.M., 2008.** Dose-dependent antioxidant responses and pathological changes in tenca (*Tinca tinca*) after acute oral exposure to *Microcystis* under laboratory conditions. *Toxicon* 52,1-12.
- **Bach M., Huber A., Frede H.G., 2011.** Modeling pesticide losses from diffuse sources in Germany *Water Sci Technol.* 44 (7), 189-196.
- **Banack T., Brocker C., Lassen N., Estey T., Pappa A., Cantore M., Orlova V.V., Chavakis T., Kavanagh K.L., Oppermann U., Vasiliou V., 2010.** Aldehyde dehydrogenase 7A1 (ALDH7A1) is a novel enzyme involved in cellular defense against hyperosmotic stress. *Journal of Biological Chemistry* 285,18452-18463.
- **Banack D., 2007.** Microcystin-LR causes the collapse of actin filaments in primary human hepatocytes. *Aquat Toxicol* 65 ,85-91.
- **Blaha B., Sun B., Chang M., Liu Y., and Nie P., 2004.** Effects of cyanobacterial toxin microcystin-LR on the transcription levels of immune-related genes in grass carp *Ctenopharyngodon idella*. *Environmental Biology of Fishes* 85, 231-238.
- **Botha N., Gehringer M.M., Downing T.G., van Venter M., Shephard E.G., 2004.** The role of microcystin-LR in the induction of apoptosis and oxidative stress in CaCo2 cells. *Toxicon* 43, 85-92.
- **Carmichael W.W., 2001.** Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins. *J. Appl. Bacteriol.* 72, 445–459.
- **Cazenave J., Bistoni M.D.L.A., Pesce S.F., Wunderlin D.A., 2006.** Differential detoxification and antioxidant response in diverse organs of *Corydoras paleatus* experimentally exposed to microcystin-RR. *Aquatic Toxicology* 76, 1-12.
- **Chen T., Cui J., Liang Y., Xin X., Owen Young D., Chen C., Shen P., 2006.** Identification Of human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase as a potential target for microcystin-LR. *Toxicology* 220, 71-80.

- **Chen T., Wang Q., Cui J., Yang W., Shi Q., Hua Z., Ji J., and Shen P., 2005.** Induction of apoptosis in mouse liver by microcystin-LR: a combined transcriptomic, proteomic, and simulation strategy. *Mol Cell Proteomics* 4, 958-974.
- **Clark S.P., Ryan T.P., Searfoss G.H., Davis M.A., Hooser S.B., 2008.** Chronic microcystin exposure induces hepatocyte proliferation with increased expression of mitotic and cyclin-associated genes in p53-deficient mice. *Toxicologic pathology* 36,190-203.
- **Cotelle N., Banker D., 2000.** The Role of protein phosphorylation in human health and disease, *Journal of Biochemistry*, 268,5001-10.
- **Credle Q., Takai A., Kondo F., Masui H., Imanishi S., and Harada K., 2002.** Comparison of protein phosphatase inhibitory activity and apparent toxicity of microcystins and related compounds. *Toxicon* 40, 1017-1025.
- **Devlin K., Shen H.M., Ong C.N., 1977.** Microcystic cyanobacteria extract induces cytoskeletal disruption and intracellular glutathione alteration in hepatocytes. *Environ Health Perspect* 108,605-9.
- **Banack R., Ong F., 2007.** Microcystin-LR causes the collapse of actin filaments in primary human hepatocytes. *Aquat Toxicol* 65, 85-91.
- **Ding W., Shen H., Zhu H., 1998.** Hepatotoxicity and formation of reactive oxygen species induced by microcystis aeruginosa toxin. *Zhonghua yu fang yi xue za zhi* [Chinese journal of preventive medicine] 32,278-280.
- **Ding W.X., and Ong C.N., 2003.** Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity. *FEMS Microbiol Lett* 10880, P1-7.
- **Djediat C., Malecot M., Luze A., Bernard C., Puisieux-Dao S., Edery M., 2010.** Localization of microcystin-LR in medaka fish tissues after cyanotoxin gavage. *Toxicon* 55, 531-535, 2010.
- **Eriksson J.E., Gronberg L., Nygard S., Slotte J.P., and Meriluoto J.A.O., 1990.** Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1025, 60-66.

- **Falconer I.R., Dornbusch M., Moran G., and Yeung S.K., 1995.** Effect of the cyanobacterial(blue-green algal) toxins from *Microcystis aeruginosa* on isolated enterocytes from the chicken, 98P.
- **Falcone I.R., and Yeung D.S., 1992.** Cytoskeletal changes in hepatocytes induced by *Microcystis* toxins and their relation to hyperphosphorylation of cell proteins. *Chem Biol Interact* 81,181-196.
- **Fischer A., Hoeger S.J., Stemmer K., Feurstein D.J., Knobeloch D., Nussler A., and Dietrich D.R., 2005.** The role of organic anion transporting polypeptides (OATPs/SLCOs) in the toxicity of different microcystin congeners in vitro: A comparison of primary human hepatocytes and OATPtransfected HEK293 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*,245 ,9-20.
- **Fladmark P.,Fong W.P., Cheng C.H.K., and Tang W.K.,2006.** Antiquitin, a relatively unexplored member in the superfamily of aldehyde dehydrogenases with diversified physiological functions. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 63, 2881-2885.
- **Gan N., Sun X., Song L., 2010.** Activation of Nrf2 by Microcystin-LR Provides Advantages for Liver Cancer Cell Growth. *Chemical Research in Toxicology* 23, 1477-1484.
- **Gehring F.P., 2003.** "Forging the links between metabolism and carcinogenesis." *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* 488(3) ,195-209.
- **Moreno Qiu., Rossini G.P., Sgarbi N., Malaguti C., 2005.** The toxic responses induced by okadaic acid involve processing of multiple caspase isoforms. *Toxicon* 39, 763–770.
- **Giorgi M., 2009.** Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 1287–1312.
- **Godet F.P., Vasseur M., Babut B., 1993.** "In vitro and in vivo genotoxicity tests for studying contaminated aquatic environmental samples." *Essais de genotoxicité in vitro et in vivo applicables à l'environnement hydrique* 6(3) ,285-314.
- **Hermansky S., Miura E., Zhao U., La-Salette ., 2008.** Inhibition of protein phosphatase by microcystins and nodularin associated with hepatotoxicity. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 116, 609–614.

- **Hooser L., Heningway K.L., Wedderburn J., Lawrence A.J. 1991.** Molecular/Cellular Processes and the Population Genetics of a Species, in A. J. Lawrence & K. L. Hemingway (Eds), P99.
- **IARC D., 2010.** Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Bartsch H, Hernninki K, O'Neill K (ed.). International Agency for Research on Cancer (IARC). World Health Organization. Lyon, France.
- **Ito E., Kondo F., Harada K.I., 2000.** First report on the distribution of orally administered microcystin-LR in mouse tissue using an immunostaining method. *Toxicon* 38,37-48.
- **Ito E., Takai A., Kondo F., Masui H., Imanishi S., Harada K., 2002.** Comparison of protein phosphatase inhibitory activity and apparent toxicity of microcystins and related compound. *Toxicon* 40, 1017-1025.
- **Khan A., Batista P., Khan K. N., Knapp D. W., Denicola D. B., Harris R. K., 1995.** Expression of cyclooxygenase-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder in dogs. *American Journal Of Veterinary Research* 61, 478-481.
- **Kondo Saido., T.C., Prehn J.H.M., 2005.** Activation of calpain I converts excitotoxic neuron death into caspase independent cell death. *J. Biol. Chem.* 275, 17064–17071.
- **Lankoff D., Zhu M., Mosmann T., 1983.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 65, 55–63.
- **Lavera C., Hermansky Z., Ong C., 2009.** Studies on oxidative damage induced by cyanobacteria extract in primary cultured rat hepatocytes. *Environ. Res.* 78, 12–18.
 - **Ding W., Shen H., Ong C., 2000.** Critical role of reactive oxygen P87.
 - **Leme M., Shen H., Ong C., 2009.** Critical role of ROS formation in microcystin-induced cytoskeletal disruption in primary cultured hepatocytes. *J. Toxicol. Environ. Health* 64, 507–519.

- **Li H., Xie P., Zhang D., Chen J., 2009.** The first study on the effects of microcystin-LR on gene expression profiles of antioxidant enzymes and heat shock protein-70 in *Synechocystis* sp.PCC6803. *Toxicol* 53 ,595-601.
- **Li S., Marquardt R.R., Frohlich A.A., Vitti T.G., Crow G., 1997.** Pharmacokinetics of Ochratoxin A and Its Metabolites in Rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 145,82-90.
- **Lu L.J.W., Disher R.M., Reddy M.V., Randerath K., 2008.** postlabelling assay in mice of transplacental DNA damage induced by the environmental carcinogens safrole, 4-aminobiphenyl and benzo(a)pyrene. *Cancer Res.* 46, 3046-3054.32P.
- **Chen J.J., Wu H. M., Peng C.F., Chen I.S., Chu S.D., 2009.** seco-Abietane diterpenoids, a phenylethanoid derivative, and antitubercular constituents from *Callicarpa pilosissima*. *Journal of Natural Products*, 72(2), 223-228.
- **McConnell J.L., Wadzinski B.E 2009.** Targeting Protein Serine/Threonine Phosphatases for Drug Development. *Molecular Pharmacology* 75,1249-1261.
- **Nobre A.C.L., Nunes-Monteiro S.M., Monteiro M.C.S.A., Martins A.M.C., Havt A., Barbosa P.S.F., Lima A.A.M., Monteiro H.S.A., 2004.** Microcystin-LR promote intestinal secretion of water and electrolytes in rats. *Toxicol* 44,555-559.
- **Marie C., Maître A., Douki T., Gateau M., Tarantini A., Guiraud P., Favier A., Ravanat J.L 1989.** Influence of the metabolic properties of human cells on the kinetic of formation of the major benzo[a]pyrene DNA adducts. *J Appl Toxicol.* 28(5) ,579-90.
- **Maron D.M., Ames B.N., 1983.** Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res.* 113(3-4), 173-215.
- **Mikhailov A., Härmälä-Braskén A.S., Hellman J., Meriluoto J., Eriksson J.E.** Identification of ATP-synthase as a novel intracellular target for microcystin-LR. *Chemico-Biological Interactions* 142,223-237, 2003.
- **Milutinovic F., Wang Q., Xie P., Chen J., Liang G., 2002.** Distribution of microcystins in various organs (heart, liver, intestine, gonad, brain, kidney and lung) of Wistar rat via intravenous injection. *Toxicol* 52 , 721-727.

- **Moreno G., A.R., Boitani C., Pesce M., De Felici M., Stefanini M., 2003.** Isolation of highly purified type A spermatogonia from prepubertal rat testis. *Journal of Andrology* 17, 708–717.
- **Namikoshi J., 1991** .Structure-function relationships of microcystins, liver tumor promoters, in interaction with protein phosphatase, P545.
- **Ohta T., Nishiwaki R., Yatsunami J., Komori A., Suganuma M., Fujiki H., 1992.** Hyperphosphorylation of cytokeratins 8 and 18 by microcystin-LR, a new liver tumor promoter, in primary cultured rat hepatocytes. *Carcinogenesis* 13: 2443-2447.
- **Picanco A. Z., K. D. Jenkins., 1995.** "Metal detoxification in aquatic organisms." *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, John Wiley and Sons, Chichester, UK, 479–608.
- **Prieto A.I., Jos A., Pichardo S., Moreno I., Cameán A.M.,** Differential oxidative stress responses to microcystins LR and RR in intraperitoneally exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.). *Aquatic Toxicology* 77, 314-321.
- **Runnegar M., Berndt N., Kaplowitz N., 1995.** 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.
- **Runnegar M., Berndt N., Kong S.M., Lee E.Y.C., Zhang L., 1995.** In vivo and in vitro binding of microcystin to protein phosphatases 1 and 2A. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 216: 162-169.
- **Sekijima De., Meo T., 1996.** *Journal de la microbiologie générale*, P101.
- **Singh N.P., Lai H., Khan A., 1988.** Ethanol-induced single strand break reaction in rat brain cells. *Mutation Research* 3, 45, 191-196.
- **Sivonen et Jones., 1999.** Synthèse bibliographique et outils de gestion sur le bassin de la Dordogne, février, 2006, P07.
- **Van Schooten F.J., Maas L.M., Moonen E.J.C., Kleinjans J.C.S Van derost R., 2007.** dosimetry in biological indicator species living on PAH-contaminated soils and sediments. *Ecotoxicology and Environment Safety* 30, 171 - 179.
- **Xiong L., Klerks P.L., 2004.** Fitness costs of resistance to cadmium in the least killifish (*Heterandria formosa*), P76.

- **YueZoll-Moreux C., Ferrier V., 1999.** The Jaylet test (newt micronucleus test) and the micronucleus test in xenopus: Two in vivo tests on amphibia evaluation of the genotoxicity of five environmental pollutants and of five effluents. *Water Res.* 33 (10), P99.
- **Zegura B., Volcic M., Lah T.T., Filipic M., 2008.** Different sensitivities of human colonadenocarcinoma (CaCo-2), astrocytoma (IPDDC-A2) and lymphoblastoid (NCNC) cell lines to microcystin-LR induced reactive oxygen species and DNA damage. *Toxicon* 52, 518-525.
- **Zeller Perrine., 2001.** Cyanotoxines et barrière intestinale humaine: étude compaée de l'absorption et de la toxicité de deux variants de microcystine sur le modèle cellulaire Caco2. P257.

Test Ames

Annexe n°1 : Solution PBS (0,1M).

Utilisée dans la préparation de Microcystine

Ingrédients	Par 600ml
NaCl.....	5,1g
Nq ₂ HPO ₄	5,45g
NqH ₂ PO ₄ H ₂ O.....	1,55g
Eau distillé stérile.....	600ml

Annexe n°2 : Solution Histidine/Biotine(0,5mM)

Utilisée dans le test de mutagénèse

Ingrédients	Par 1000ml
D-Biotine	0,124g
D-histidine-HCl	0,096g
Eau distillée.....	1000ml

Annexe n°2 : Top agar

Utilisé dans le test de mutagénèse

Ingrédients	Par 1000ml
Agar	6g
Chloride de Sodium (NaCl).....	6g
Histidine / Biotine(05mM).....	100ml
Eau distillé stérile ;.....	900ml

Annexe n°3 : Solution 0,02 N NaOH

Utilisée dans la solution ampicilline

NaOH..... 0,2g
Eau distillée.....250ml

Annexe n°4 : solution ampicilline (0,8/0,02%NaOH)

Utilisée dans le test de résistance à l'ampicilline

Ingrédients

Ampicilline trihydraté0,8g
0,02 N NaOH.....100ml

Annexe n°5 : Solution de cristal violet (0,1%)

Utilisée dans le test de sensibilité au cristal violet

Ingrédients

Par 100ml

Cristal violet.....0,1g
Eau distillée.....100ml

Annexe n°6 : Milieu minimal agar (GMA)

Utilisée dans le test de mutagenèse

Ingrédients

Par 1000ml

Agar..... 15g
Eau distillée..... 900ml
50X VB sels..... 20ml
20% Glucose.....50ml

L'agar dans l'eau distillée est autoclavée à 120 pendant 20 min, une fois refroidie, nous ajoutons les sels 50X VB et le glucose autoclavés séparément

Annexe n°6 : Milieu Vogel-Bonner E (50x)

Utilisée dans le milieu minimal agar

Ingrédients	Par 1000ml
Sulfate de magnésium (MgSO ₄ , 7H ₂ O).....	10g
Acide citrique.....	100g
Phosphate de potassium dibasique (K ₂ HPO ₄).....	500g
Sodium ammonium phosphate (NaH ₂ NH ₄ PO ₄ ,4H ₂ O).....	175g
Eau distillée.....	670ml

Dans l'eau distillée est ajoutée à des ingrédients ci-dessous dans l'ordre écrit. Autoclavée à 120°C pendant 20min, est stocké dans l'obscurité à la température ambiante.

Annexe n°8 : Milieu Histidine/Biotine /Ampicilline (BHA)

Utilisée dans le test de Réclamation de l'Histidine

Ingrédient	Par 1000ml
Agar.....	15g
Eau distillée.....	900ml
50X VB sels.....	20ml
20% Glucose.....	50ml
Histidine-HCl H ₂ O.....	8ml
(05g/100mlH ₂ O)	
0,01 Mm Biotine.....	8ml
Ampicilline (08/002% NaOH).....	3ml

Annexe n°9 : Solution glucose (20%)

Utilisée dans le minimal agar

Ingrédient	Par 1000ml
Glucose.....	200g
Eau distillée.....	700ml