

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université 8 mai 1945 Guelma  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et  
de l'Univers  
Département de SNV



## Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité/Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire/ Immunologie Approfondie

**Thème : Effet de la microcystine LR administrée par voie  
orale et intrapéritonéale sur quelques paramètres du  
système immunitaire de la souris**

Présenté par :

RAMDHANE Bany Mohamed

HASRANE Mohamed

Devant le jury composé de :

Président : Mme. AYED HAYETTE (M.A.A)

Examineur : Mlle. ZIDI SOUROUR (M.A.A)

Encadreur : Mlle. MERABET RYM (M.A.A)

Université de Guelma

Université de Guelma

Université de Guelma

Juin 2015

# Remerciement

*Avant tout rendrons grâce à dieu le tout puissant qui nous a donné la volonté et la force pour réaliser ce travail de recherche.*

*Tout d'abord, nous remercions notre encadreur Melle Merabet Rym. Qu'elle a su créer une atmosphère très favorable durant le travail, pour ses remarques très pointues et pour nous avoir faits confiance en nous accordant une grande autonomie. nous voudrions également souligner vos disponibilités, vos qualités scientifiques et votre intérêt pour la recherche sont pour nous une source de motivation supplémentaire.*

*Nos remerciement vont également aux membre du jury qui nous ont fait l'honneur d'avoir accepté d'examiner ce travail : Mme Ayed Hayette et Mme Zidi Sourour .*

*Nous profitons de ces quelques lignes pour tenir à exprimer notre profonde gratitude à tout le personnel enseignant de la faculté de sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers de l'université de Guelma : Mme Benjedou, Mr. Bouden, Mme. Braïk, Mme Handiken pour leurs précieux conseils, leurs soutiens inestimables et leur encouragement, en particulier monsieur Bousbia Aissam.*

*Enfin, merci à nos amies et amis & collègues particulièrement,*

*Aboubacar, Seif-eddine, Tarek, Djamila, Omaima.*

*Nous tenons également à exprimer toute notre reconnaissance à ceux qui ont contribués de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

# Sommaire

Produced with ScanTOPDF

Liste des figures	
Liste des abréviations	
<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
Revue bibliographique.....	2
Chapitre1. Système immunitaire et immunotoxicité.....	2
<b>1. Définition et principales caractéristiques du système immunitaire.....</b>	<b>2</b>
<b>2. Acteurs principaux du système immunitaire.....</b>	<b>3</b>
2.1. La lignée myéloïde.....	3
2.1.1. Monocytes.....	3
2.1.2. Les granulocytes ou polynucléaires.....	3
2.1.3. Les cellules dendritiques.....	4
2.1.4. Les mastocytes.....	4
2.2. La lignée lymphoïde.....	4
2.2.1. Les lymphocytes B.....	4
2.2.2. Les lymphocytes T.....	5
<b>3. Fonctions immunitaires dans un organisme.....</b>	<b>5</b>
3.1. Immunité naturelle.....	6
3.2. Immunité spécifique.....	6
3.2.1. Molécules propres à l'immunité spécifique.....	6
3.2.2. Déroulement de la réponse immunitaire.....	7
<b>4. Pathologie du système immunitaire.....</b>	<b>8</b>
<b>5. Définition de l'immunotoxicité.....</b>	<b>8</b>
<b>6. Diverses manifestations d'immunotoxicité.....</b>	<b>9</b>
6.1. Immunosuppression.....	9
6.2. Hypersensibilité.....	10
6.3. Auto-immunité.....	10
6.4. Syndromes d'activation et d'hyperéosinophilie.....	11

Chapitre2. Cyanotoxines produites par les cyanobactéries.....	12
<b>1. Définition des cyanotoxines</b> .....	12
<b>2. Différentes cyanotoxines et leurs origines</b> .....	12
2.1. Les hépatotoxines.....	12
2.1.1. Les microcystines.....	13
2.1.2. La nodularine.....	14
2.1.3. La cylindrospermopsine.....	14
2.2. Les neurotoxines.....	15
2.2.1. Les saxitoxines.....	15
2.2.2. Les anatoxines.....	16
2.3. Les dermatotoxines.....	17
<b>3. Risques liés aux cyanotoxines</b> .....	17
3.1. Les sources d'exposition aux cyanotoxines.....	17
3.2. Effets des cyanotoxines sur la santé humaine.....	18
3.2.1. Intoxications humaines dues aux toxines des cyanobactéries.....	18
<b>4. Techniques de détection des cyanotoxines</b> .....	20
4.1. Techniques immunoenzymatiques.....	20
4.2. Teste biochimique.....	20
4.3. Méthodes physicochimiques.....	21
4.4. Teste biologiques.....	21
5. Recommandation et réglementation de l'organisation mondiale de la santé.....	22
6. Traitement des intoxications dues aux cyanotoxines.....	23
Chapitre3. Effets toxiques des microcystines.....	24
1. Effet cytotoxique de la microcistine LR.....	24
1.1. Inhibition de la phosphatase.....	24
1.2. Stress oxydatif.....	25
2. Effet génotoxique des microcystines.....	26

2.1. Effet sur la transcription des gènes.....	26
2.2. Induction des mutations.....	27
2.3. Cancérogénicité des microcystines.....	28
3. Effets immunotoxiques des microcystines.....	29
3.1. Effets des microcystines sur les lymphocytes.....	29
3.2. Effet sur les organes lymphoïdes (rate).....	30
3.3. Perturbation et modulation du système immunitaire.....	31
<b>II. Matériel et méthodes.....</b>	<b>32</b>
1.1. Animaux.....	32
2.1. Traitement.....	32
2.2. Sacrifice et prélèvements.....	32
2.2.1. Prélèvement sanguin.....	32
2.2.2. Prélèvement de la rate.....	33
3. Paramètres du système immunitaire.....	33
3.2. Méthode de numération des macrophages péritonéaux.....	33
4. Dosage des paramètres hématologiques.....	34
5. dosage des paramètres biochimiques.....	34
5.1. Mesure de l'aspartate aminotransférase.....	34
5.2. Mesure de l'alanine aminotransférase.....	34
5.3. Mesure de la phosphatase alcaline.....	34
6. Dosage des paramètres du stress oxydant.....	35
6.1. Préparation de l'homogénat.....	35
6.2. Détermination de la peroxydation lipidiques du statut oxydant.....	35
7. Analyse statistique.....	36
<b>III. Résultats.....</b>	<b>37</b>
1. Effet du traitement par MC-LR sur les paramètres immunologiques.....	37
2. Effet du traitement par MC-LR sur les paramètres hématologiques.....	38

<b>3. Effet de la MC-LR sur les paramètres biochimiques</b> .....	39
<b>4. Effet sur le poids relatif de la rate</b> .....	40
<b>5. Effets sur les paramètres du stress oxydant</b> .....	40
5.1. Effet du traitement sur la concentration de MDA au niveau de la rate.....	40
<b>IV-Discussion</b> .....	41
<b>Conclusion</b> .....	44

Produced with ScanTOPDF

# Liste des figures

Produced with ScanTOPDF

Figure 1. schéma montrant les organes immunitaires.....	3
Figure 2. structure chimique de la microcystine LR.....	13
Figure 3. structure chimique de la nodularine.....	14
Figure 4. structure chimique de la cylindrospermopsine.....	14
Figure 5. structure chimique de saxitoxine.....	15
Figure 6. structure chimique d'anatoxine.....	16
Figure 7. système de phosphorylation et dephosphorylation.....	27
Figure 8. schéma explicative des effets toxiques de la microcystine LR.....	28
Figure 9. lésions observés au niveau de la rate des souris traités par MC-LR.....	34
Figure 10. Réaction du formation du complexe MDA-TBAR.....	38
Figure 11. variations des paramètres immunologiques chez les souris traités par vip.....	38
Figure 12. variation des paramètres hématologique chez les souris traités par vo.....	40
Figure 13. variations des paramètres biochimiques chez les souris traités par vip.....	41
Figure 14. variation des paramètres biochimiques chez les souris traités par voie orale.....	42
Figure 15. variation de la concentration de MDA chez les souris traitées par les deux voies.....	43

Produced with Scantopdf

# Liste des abréviations

Produced with ScantOPDF

- AChE** : acétylcholinestérase
- Adda** : l'acide 3-amino-9-méthoxy-2-6,8-triméthyl-10- phényldéca-4,6-dinéoïque
- ASAT** : aspartate aminotransférase
- CCMH** : concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine
- CIRC** : Centre international de Recherche sur le Cancer
- CMH I** : complexes majeurs d'histocompatibilité type I
- CMH II** : complexes majeurs d'histocompatibilité type II
- CPA** : cellule présentatrice d'antigène
- DL50** : la dose létale 50
- ELISA** : Enzyme Linked Immunosorbent Assay
- ER** : réticulum endoplasmique
- ERO** : espèces réactives de l'oxygène
- FAO** : organisation des nations unies pour alimentation et agriculture
- FNS** : la formule de numération Sanguine
- GB** : globule blanc
- GR** : globule rouge
- GSH** : glutathion
- Hb** : hémoglobine
- HT** : hématocrite
- Ig** : immunoglobulines
- IgA** : immunoglobuline A
- IgD** : immunoglobuline D
- IgE** : immunoglobuline E
- IgG** : immunoglobuline G
- IgM** : immunoglobuline M
- IL 1** : l'interleukine 1
- IL 2** : l'interleukine 2
- IL-10** : l'interleukine 10
- IL-4** : l'interleukine 4
- IL-6** : l'interleukine 6
- INSPQ** : institut national de santé publique du québec
- LB** : lymphocyte B
- LOAEL** : Lowest Adverse Observed Effect Level

- LT** : lymphocyte T
- LY** : lymphocytes
- MC**: microcystine
- MCLR** : microcystine
- MO** : monocyte
- NHRMC** : New hanover medical center employee benefits
- NK** : Naturel killer
- NO** : oxyde nitrique
- NOAEL**: No Observed Advserved Effect Level
- OMS** : Organisation mondiale de la santé
- PA** : poids absolus
- PAL** : phosphatase alcaline
- PBS** : Phosphate buffer solution Méthanol
- PLT** : plaquettes
- p-NPP** : paranitrophenylphosphate
- PP1** : protéines phosphatases 1
- PP2A** : protéines phosphatases 2
- PP3** : protéines phosphatases 3
- PR** : poids relatif
- ROS** : oxygène réactif
- TBA** : Acide thiobarbiturique
- TCA** : Acide salicylique
- TCR** : T cell receptor
- TK** : thymidine kinase
- TNF-a** : facteur de nécrose tumoral a
- UBC** : enzyme ubiquitine
- UV** : ultraviolets
- VGM** : volume globulaire moyen des hématies

**Revue**  
**Bibliographique**

Produced with ScanTOPDF

# Introduction

Produced with ScantOPDF

## Introduction

Les microcystines (MCs) sont des cyanotoxines couramment rencontrées dans les plans d'eau douce du monde. Ce sont des heptapeptides cycliques décrits comme inhibant les protéines phosphatases à sérine /thréonine (Eriksson et al., 1990). La famille des MCs regroupe près de 90 variantes dont la plus rencontrée, la plus toxique et le mieux étudié est la microcystine LR (MC-LR).

Compte tenu du manque de données concernant les autres variantes, seule la MC-LR a été classée par le centre international de recherche sur le cancer (CIRC) dans le groupe 2B des cancérogènes potentiels (Iarc, 2010). Ces toxines font aujourd'hui l'objet d'une recommandation de l'organisation mondiale de la santé (OMS), basée sur les données toxicologiques de la MC-LR et proposant un seuil de 1 µg/L en équivalent MC-LR pour les eaux de consommation (OMS, 2003).

Chez l'homme les sources d'expositions à ces toxines peuvent être multiples via les eaux de consommation, les eaux récréatives lors d'activités aquatiques et nautiques, les eaux de dialyse, la consommation d'organismes bioaccumulateurs ou de compléments alimentaires (Chorus et Bartram, 1999). Si la voie orale constitue la principale voie d'exposition de l'homme aux MCs, la majorité des données toxicologiques ont été obtenues *in vivo* après administration intrapéritonéale. Quelques études confirment néanmoins que la MC-LR passe la barrière intestinale pour se retrouver dans la circulation sanguine (Chen et al., 2011).

Aujourd'hui, la toxicité aiguë de la MC-LR est bien caractérisée. Les dommages induits par ces heptapeptides sur d'autres organes tels que reins, cœur et intestin sont également largement étudiés. Cependant, trop peu d'informations existent sur les mécanismes moléculaires de cette toxicité ainsi que la toxicité chronique de l'ensemble des variantes de MCs (Campos et Vasconcelos, 2010). D'autres parts, il existe peu d'études qui ont documenté l'effet immunotoxique potentiel des microcystines alors que leur effets hépatotoxique, écotoxique et cytotoxique sont clairement élucidés.

D'où la contribution de ce travail de recherche qui présentera tout d'abord un état des connaissances portant sur le système immunitaire et l'immunotoxicité, les MCs et leurs effets toxiques. Ensuite, nous essayerons de chercher l'éventuel effet immunotoxique de l'heptapeptide en question une fois administré chez la souris Balb/C par voie orale et intrapéritonéale et comparer la sévérité de la toxicité selon la voie empruntée.

### 1. Définition et principales caractéristiques du système immunitaire

Le terme *immunité* (du latin *immunis* : protégé de...) évoque au premier abord les mécanismes de défenses que l'organisme développe à l'encontre des microorganismes. La notion de système quant à elle désigne un ensemble d'éléments qui vont interagir de façon hiérarchisée et intégrée afin d'assurer une fonction.

Le système immunitaire s'est développé au cours de l'évolution des espèces par de nombreuses interactions hôtes-agents infectieux. Il contribue au maintien de l'intégrité de l'organisme hôte en éliminant les constituants étrangers (virus, bactéries, parasites et autres microorganismes, greffes, allergènes) et les constituants du «soi» modifiés (Revillard, 2001). Il assure cette fonction en étroite relation avec les autres systèmes physiologiques, notamment les systèmes nerveux et endocrinien, avec lesquels il communique par l'intermédiaire de médiateurs solubles (neurotransmetteurs, hormones, cytokines) et de récepteurs spécifiques communs à ces systèmes. Par conséquent plusieurs des composantes du système immunitaire et des éléments de réponse aux agressions sont couramment utilisées en médecine comme bio-indicateurs de compétence de l'organisme entier (Descotes, 2000).

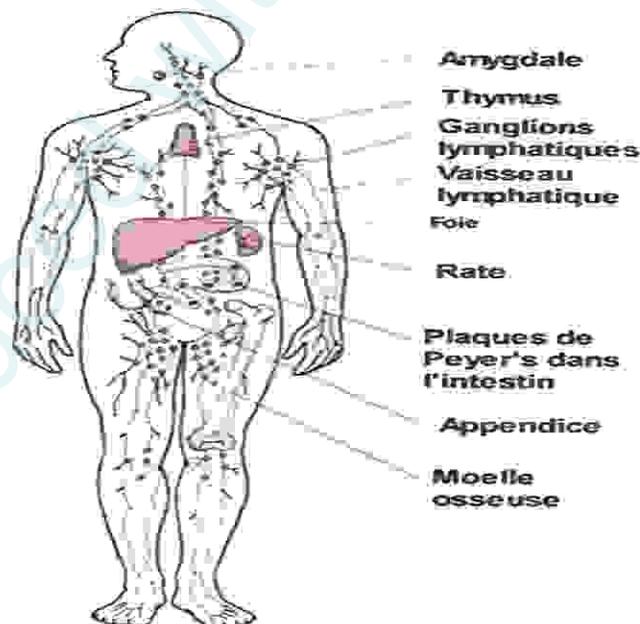


Figure 1. Schéma montrant les organes immunitaires (Janeway et al., 2009)

## 2. Acteurs principaux du système immunitaire

Le système immunitaire contribue au maintien de l'intégrité de l'organisme par l'exclusion des constituants étrangers (microorganismes, greffes) et de constituants du «soi» modifiés transport vers la membrane ou vers des sites intracellulaires de dégradation complète (protéasome, lysosome). En cas d'altération de l'ADN interviennent des enzymes de réparation et un système de contrôle régulant d'une part le cycle cellulaire, d'autre part l'expression des gènes de mort et de survie. La réparation incomplète conduit alors à l'arrêt du cycle et à la mort cellulaire par apoptose. La défaillance du système de contrôle (mutations de p53) conduit à la transmission d'altérations génétiques aux cellules du même clone (Descotes *et al.*, 2000).

### 2.1. La lignée myéloïde

Un progéniteur myéloïde commun est le précurseur des cellules du système immunitaire inné les macrophages, les granulocytes, les mastocytes et les cellules dendritiques (Janeway *et al.*, 2009).

#### 2.1.1. Monocytes

sont des cellules circulantes représentant environ 5% de leucocytes totaux du sang et qui peuvent migrer dans les tissus pour y devenir des macrophages distribués dans la plupart des tissus, Jouant un rôle important dans l'élimination de diverses particules, dans la reconnaissance de pathogènes et dans la production de cytokines de l'immunité inné (Chapel *et al.*, 2004).

#### 2.1.2. Les granulocytes ou polynucléaires

les granulocytes ou polynucléaires forment une première ligne de défense importante de l'immunité innée sont capables de quitter le sang pour migrer aux sites inflammatoires (Gorochov et Papo, 2000).

##### ➤ Les neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles représentent la plus grande population des granulocytes circulants formant 60 à 70% des leucocytes du sang et secrètent des molécules toxiques pour différents parasites (Homberg, 2004).

### ➤ Les basophiles

Représentent moins de 1% des leucocytes du sang. Ce sont des cellules avec un noyau rond et des granules ovoïdes contenant des médiateurs de haute affinité et qui entrent dans les réactions allergiques mettant en jeu les anticorps (Ac) de classe IgE (Revillard, 2001).

#### 2.1.3. Les cellules dendritiques

Sont un groupe particulier de cellules présentatrices d'antigène (CPA) distribuées dans de nombreux tissus de l'organisme. Elles se différencient à partir des précurseurs, soit lymphoïdes, soit myéloïdes (Male, 2005). Les cellules dendritiques qui ont rencontré des germes viennent à maturation, c'est-à-dire deviennent capables d'activer une classe particulière de lymphocytes (Janeway *et al.*, 2009).

#### 2.1.4. Les mastocytes

Ce sont de grandes cellules présentes dans les tissus conjonctifs de tout l'organisme dont le précurseur sanguin n'est pas bien défini (Janeway *et al.*, 2009). Ils sont particulièrement abondants dans les tissus en contact avec l'environnement (peau muqueuses). Comme les basophiles, ils contiennent de nombreux granules et expriment sur leur membrane des récepteurs aux IgE de haute affinité. Lorsqu'ils sont activés, les mastocytes libèrent de nombreux médiateurs chimiques (dont l'histamine) et interviennent dans les réactions immunitaires dépendant des IgE (Aymeric et Lefranc, 2009).

### 2.2. La lignée lymphoïde

Le précurseur lymphoïde commun ou cellule souche lymphoïde donne naissance aux lymphocytes (Gorochov et Papo, 2000). Ces derniers constituent environ 20% des leucocytes sanguins (Male, 2005), classés en petits et grands lymphocytes. Les petits lymphocytes expriment à leur surface des récepteurs antigéniques. Il existe deux classes principales de lymphocytes B et T et un autre groupe lymphocytes sont des cellules cytotoxiques naturelles NK.

#### 2.2.1. Les lymphocytes B

Ne présentent que 5 à 10% des lymphocytes du sang (Homberg, 2004), leur rôle essentiel est la synthèse d'anticorps correspondant à l'immunité spécifique humorale. La fonction des lymphocytes B ne se limite pas cependant à la production d'anticorps, mais aussi capables de présenter aux cellules T l'antigène qu'elles ont

internalisé par leurs récepteurs spécifiques, et d'influencer la polarisation de cette réponse (Chatenoud *et al.*, 2012).

### 2.2.2. Les lymphocytes T

Ils représentent 75% des cellules lymphoïdes circulantes. Ce sont les seules cellules immunitaires qui se différencient dans le thymus, d'où leur nom (T). Ces cellules expriment des récepteurs pour l'antigène (TCR) et se différencient en deux sous-populations principales, l'une portant le marqueur CD4, l'autre le marqueur CD8.

## 3. Fonctions immunitaires dans un organisme

Les cellules qui s'associent pour constituer un organisme utilisent, pour s'agréger entre elles des paires de molécules membranaires complémentaires (structure et contre structure ou encore ligand et récepteur). Parmi ces molécules certaines peuvent être produites sous forme soluble et participent à la signalisation intercellulaire, par exemple les cytokines produites en réponse à un signal activateur peuvent transmettre différents signaux aux cellules exprimant le récepteur spécifique, dans ces conditions la multiplication cellulaire, la différenciation ou la survie des cellules dépendent d'un ensemble de signaux issus de leur environnement (Male, 2005).

### 3.1. Immunité naturelle

Des structures moléculaires communes à de très nombreux microorganismes vont interagir avec des molécules complémentaires préformées de l'hôte (en solution ou à la surface de cellules) pour déclencher un signal de «danger» conduisant à l'exclusion du pathogène (Chatenoud *et al.*, 2012).

Par exemple les régions lipidiques des endotoxines des bactéries Gram négatif (LPS: lipopolysaccharides) s'associent à des molécules de transport (LBP pour «LPS binding proteins»), à des récepteurs des phagocytes mononucléés (famille des Toll récepteurs, CD14) et de l'endothélium. Elles stimulent aussi la synthèse de médiateurs chimiotactiques et l'accumulation de phagocytes polynucléés (neutrophiles).

Différentes structures moléculaires communes à un grand nombre de bactéries et de parasites activent une ou plusieurs des trois voies du complément, aboutissant à l'opsonisation du pathogène (par liaison covalente de C3b et C4b à sa membrane), étape initiale de sa phagocytose ainsi qu'à une réaction inflammatoire par libération de

peptides C3a et C5a (anaphylatoxines) et à la lyse du microorganisme par mise en jeu du complexe d'attaque membranaire (Aymeric et Lefranc, 2009). Lors de l'infection d'une cellule par des virus, des modifications membranaires (telles que la diminution de l'expression des molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) vont permettre la destruction de la cellule infectée par des lymphocytes cytotoxiques NK («natural killer»: cellules tueuses de l'immunité naturelle). Les cytokines produites dans le cadre de l'immunité naturelle agissent sur des cellules du système hématopoïétique et stimulent préférentiellement telle ou telle lignée cellulaire : augmentation des polynucléaires neutrophiles par l'action des facteurs de croissance GM et G-CSF lors des infections bactériennes, augmentation des mastocytes (IL-4) ou des éosinophiles (IL-5, éotaxine) au cours de certaines parasitoses ou d'agressions toxiques. Au total l'immunité naturelle est caractérisée par sa mise en jeu rapide et par le développement de réactions inflammatoires (bactéries, parasites) ou cytotoxiques (virus) conduisant souvent à l'exclusion du pathogène (revillard, 2005).

Une forme d'immunité intermédiaire, entre immunités naturelle et spécifique, peut intervenir dans certaines agressions, il s'agit des anticorps naturels, souvent de classe IgM et de faible affinité, ce qui explique leur capacité d'interagir avec des structures chimiques de microorganismes très différents. Parallèlement les lymphocytes T à récepteur présents surtout sur les revêtements cutanéomuqueux ont des récepteurs de structure peu diversifiée, ils constituent une première ligne de défense et peuvent reconnaître des glycolipides ou des protéines de stress de l'hôte ou des microorganismes (revillard, 2005).

### 3.2. Immunité spécifique

#### 3.2.1. Molécules propres à l'immunité spécifique

L'immunité spécifique est apparue lors de la divergence entre vertébrés et invertébrés. Elle est caractérisée par un ensemble de molécules de structure extrêmement diversifiée appartenant toutes à la superfamille des immunoglobulines (Ig): les anticorps, les récepteurs d'antigène des lymphocytes T (TCR) et les molécules CMH. Les molécules d'Ig existent sous forme soluble (les anticorps répartis en cinq classes de fonctions biologiques différentes chez l'homme: IgM, IgG, IgA, IgD et IgE et sous forme de récepteurs membranaires des lymphocytes B (BCR). La molécule d'anticorps, formée en général de 2 chaînes lourdes H et de 2 chaînes légères L (You K), interagit par son site de liaison ou paratope avec une zone

de l'antigène appelée épitope. Chaque épitope correspond à une zone de 2 à 3 nm de diamètre (Gorochov G et Papo T, 2000). Les molécules des récepteurs d'antigène des lymphocytes T (TCR $\alpha\beta$  et  $\gamma\delta$ ) existent exclusivement sous forme membranaire. Les TCR  $\alpha\beta$  interagissent avec une molécule du CMH associée à un peptide. Les chaînes des TCR comme les chaînes H et L des anticorps sont codées par des segments génétiques en mosaïque qui font l'objet d'un réarrangement au cours de la différenciation des lymphocytes T (dans le thymus) et B (dans la moelle osseuse). Ces mécanismes assurent une extrême diversité structurale de ces molécules. Les molécules de classe I du CMH, présentes sur presque toutes les cellules de l'organisme, s'associent dans la cellule à des nanopeptides produits dans le protéasome par protéolyse de protéines endogènes (constituants naturels ou protéines virales). (Janeway *et al.*, 2009). Outre dans les cellules dendritiques spécialisées dans le transport et la présentation des antigènes protéiques, les molécules de classe I du CMH peuvent présenter des peptides d'origine exogène. Les molécules de classe I interagissent avec le corécepteur CD8 présent sur environ 1/3 des lymphocytes périphériques. Les molécules de classe II du CMH interagissent avec la molécule CD4 et présentent des peptides en général d'origine exogène, pénétrant par la voie des endosomes. Ces molécules de classe II sont exprimées par les cellules dendritiques, les lymphocytes B et les monocytes/macrophages (Paul et Étienne R, 2002).

### 3.2.2. Déroulement de la réponse immunitaire

La réponse immunitaire à l'introduction d'un antigène ou d'un microorganisme comprend la capture de l'antigène par des cellules dendritiques qui migrent des tissus vers le ganglion lymphatique et présentent l'antigène sous forme de peptides associés aux molécules du CMH, aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. Les cellules T ayant un TCR spécifique du peptide sont activées et prolifèrent (expansion clonale), puis une grande partie d'entre elles meurent par apoptose (contraction clonale), les autres se différencient en cellules T à mémoire et cellules T effectrices cytotoxiques (la plupart CD8<sup>+</sup>) ou cellules T effectrices accessoires (CD4<sup>+</sup>) productrices de cytokines de type I (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-18) ou de type II (IL-4, IL-5). Les premières cytokines sont impliquées dans les réactions d'hypersensibilité retardée, les secondes dans la production d'anticorps en particulier de classe IgE et les réactions anaphylactiques (hypersensibilité immédiate). Des lymphocytes T de type Th3 ou Tr1, producteurs d'IL-10 et de TGF- $\beta$  sont impliqués dans les phénomènes de régulation et de tolérance

(Kindt et al., 2007).

Les réactions d'hypersensibilité retardée de contact par application percutanée d'haptène (et un grand nombre de réactions d'allergie aux médicaments) sont dues exclusivement aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques, les lymphocytes CD4<sup>+</sup> jouant un rôle régulateur ou suppresseur. Ceci explique probablement la fréquence de l'hypersensibilité aux médicaments chez les sidéens. À l'inverse, l'hypersensibilité retardée aux protéines (hypersensibilité de type tuberculinique) implique des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. La réponse anticorps a lieu dans le cortex superficiel du ganglion, elle implique une réaction des centres germinatifs avec prolifération des cellules B, commutation de classe et mutations somatiques permettant une sélection des anticorps de haute affinité. Les cellules B différenciées en plasmocytes se localisent dans la moelle osseuse et les muqueuses (Kindt et al., 2007).

#### 4. Pathologie du système immunitaire

La complexité du système immunitaire explique la grande variété de maladies dans lesquelles il est impliqué. L'étude des gènes des molécules impliquées dans l'immunité a conduit à la découverte d'un certain nombre de maladies génétiques mono factorielles, avec des phénotypes très variés allant des déficits immunitaire combinés sévères des nourrissons à des formes totalement asymptomatiques. Outre les mutations, avec ou sans conséquences pathologiques ces études ont conduit à la découverte de multiples allélismes, non seulement au niveau du CMH, mais aussi sur les gènes codant les cytokines et leurs récepteurs, des molécules du complément et des molécules impliqués dans la signalisation (Bach, 2012).

#### 5. Définition de l'immunotoxicité

L'immunotoxicité peut être définie comme l'ensemble des effets délétères provoqués par un xénobiotique ou par tout autre constituant biologique ou physique de l'environnement sur le système immunitaire, à la suite d'une exposition professionnelle, environnementale ou thérapeutique. Divers types d'effets immunotoxiques sont envisageables incluant l'immunosuppression qui peut favoriser les infections et les tumeurs, l'immunostimulation, l'hypersensibilité et l'auto-immunité (Descotes et al., 2000). Un même agent immunotoxique peut agir à la fois comme antigène ou haptène pour induire une hypersensibilité spécifique, et comme immunomodulateur pour modifier la réponse immunitaire à un ensemble d'antigènes

de l'environnement. L'immunotoxicologie étudie ces différents effets. Elle couvre l'étude des altérations immunologiques survenant chez l'homme et chez les animaux et elle utilise une combinaison d'approches multiples incluant :

- la mise au point et l'utilisation de tests *in vitro* et *in vivo* pour prédire un effet immunotoxique.
- l'évaluation clinique et l'enregistrement des accidents immunotoxiques, ainsi que l'établissement de la relation causale entre la maladie observée et l'exposition à un agent.
- l'étude épidémiologique des modifications immunologiques survenant dans les populations exposées.
- l'étude des mécanismes d'action immunotoxique aux niveaux cellulaire et moléculaire. Comme discipline, l'immunotoxicologie est récente, et l'analyse des nombreuses atteintes immunologiques induites par l'exposition à une substance chimique ne fait que commencer. Mais, déjà les données disponibles permettent d'entrevoir des conséquences néfastes pour les individus, les populations et les communautés exposées à des substances toxiques (Revillard, 2001).

## 6. Diverses manifestations d'immunotoxicité

On distingue quatre grandes catégories de manifestations immunotoxiques qui sont décrites ci-dessous.

### 6.1. Immunosuppression

Une diminution de la résistance vis-à-vis des infections microbiennes, virales et parasitaires signale généralement un effet immunosuppresseur des xénobiotiques. L'épidémie due à un virus proche de celui de la maladie de Carré qui a décimé plus des 2/3 des phoques de la mer du Nord à la fin des années 1980, s'explique probablement par le fort degré de pollution chimique des eaux marines. Il est relativement facile de déceler une immunosuppression aiguë par l'histologie des organes lymphoïdes, l'analyse des sous populations lymphocytaires et des tests *in vitro* de fonctionnement des cellules immunocompétentes. Par contre, l'immunosuppression à long terme comme celle induite par certains médicaments immunosuppresseurs administrés sur de longues périodes de temps (cyclosporine A) pourrait expliquer une incidence augmentée de certains types de cancers (Penn, 1988).

### 6.2. Hypersensibilité

Les xenobiotiques et les médicaments sont susceptibles d'induire des réactions d'hypersensibilité (allergies), la substance chimique ou ses produits de biotransformation jouant le rôle d'haptène. La structure chimique de l'haptène intervient probablement dans son immunogénicité après liaison aux protéines cellulaires. Les réactions allergiques résultent alors d'une seconde exposition à même antigène ou à des expositions ultérieures. Comme indiqué plus haut, on distingue plusieurs types d'hypersensibilité sur la base de leurs mécanismes immunologiques effecteurs dépendant des anticorps ou de cellules T. Certains xénobiotiques, particulièrement les métaux (nickel, béryllium, dérivés de platine), les activateurs d'époxyde, les disocyanates et certains antibiotiques anesthésiques locaux, induisent une hypersensibilité immédiate impliquant la production d'anticorps de classe IgE qui se fixent sur les mastocytes et entraînent le relargage des molécules préformées comme l'histamine et l'héparine.

Ces réactions d'intolérance chimique provoquent divers signes cliniques comme l'asthme, les rhinites et l'anaphylaxie. Les réactions d'hypersensibilité retardée les plus courantes sont celles induites par le nickel et le béryllium (qui induisent aussi une hypersensibilité immédiate tel que mentionné ci-dessus), le chrome, le mercure et le cobalt. Cliniquement, ceci correspond à des dermatoses de contact (impliquant essentiellement des cellules T cytotoxiques CD8<sup>+</sup>, spécifiques de peptides hapténisés associés aux molécules de CMH classe I et à des réactions granulomateuses.

### 6.3. Auto-immunité

Les maladies auto-immunes provoquées par les xénobiotiques sont la conséquence d'une dérégulation du système immunitaire, consistant en une réponse dirigée contre les constituants du «soi» (Kammiller et al., 1989). Celles-ci peuvent être systémiques, comme le lupus érythémateux disséminé et la polyarthrite rhumatoïde, ou spécifiques d'organes comme certaines glomérulonéphrites, thyroïdites ou hépatites. Les maladies auto-immunes bien caractérisées d'origine médicamenteuse ne sont pas nombreuses, un nombre limité de médicaments pouvant être incriminé, comme l'hydralazine, la procainamide, la chlorpromazine, l'isoniazide, la streptozotocine, la penicillamine et l'alphaméthildopa. La fréquence des réactions auto-immunes induites dans chaque cas est très faible. De plus, les produits chimiques et les toxiques de l'environnement n'ont été que rarement mis en cause dans les maladies auto-immunes. Parmi ceux-ci, les métaux lourds tels que le mercure et l'or

sont connus pour leur capacité d'induire glomérulonéphrite (Bigazzi, 1999) et certains pesticides organochlorés ou organophosphorés peuvent induire des anémies hémolytiques. Les mécanismes impliqués dans l'induction de l'auto-immunité sont encore mal connus. La liaison du xénobiotique à des molécules endogènes est un phénomène qu'on retrouve dans certaines manifestations auto-immunes telles que les anémies hémolytiques. Dans ces conditions, deux types d'anticorps sont produits:

- des anticorps dirigés contre le xénobiotique (ou un de ses métabolites) fixé à la membrane des hématies.
- des anticorps dirigés contre un constituant de la membrane des hématies. La présence de néoantigènes a été démontrée dans certaines hépatites auto-immunes induites par l'halothane et l'acide tiénilique. L'activation de clones de cellules T autoréactives et la fixation du xénobiotique sur les molécules du CMH ont été démontrées dans certains modèles animaux.

#### 6.4. Syndromes d'activation et d'hyperéosinophilie

On observe un syndrome d'activation accompagné d'hyperthermie, de malaise, de diarrhée, de fuite capillaire avec œdème cérébral et pulmonaire au cours de la première injection de certains anticorps monoclonaux (OKT3) ou lors des traitements par l'IL-2 recombinante à forte dose. Des réactions semblables sont observées à la suite d'une intoxication par certaines toxines bactériennes qui contaminent accidentellement les aliments ou l'eau de consommation, comme dans le cas de la tragédie survenue en mai 2000 à Walkerton, une petite ville de l'Ontario au Canada, à la suite de la contamination de l'eau municipale par des coliformes (*E. coli* 0157 : H7) et qui a fait à ce jour une dizaine de victimes et rendu 2000 personnes malades. Le syndrome d'activation est dû à l'induction d'une synthèse de cytokines inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6 par action directe sur l'endothélium et sur les monocytes/macrophages (comme le font notamment les endotoxines et autres substances bactériennes) ou par activation des lymphocytes T (notamment OKT3, IL-2 ou entérotoxines staphylococciques).

L'intoxication à l'huile frelatée survenue en Espagne en 1981, qui a touché plus de 20 000 personnes et provoqué 400 décès, s'est manifestée, dans sa phase aiguë, par une hyperthermie, des éruptions cutanées, une pneumopathie interstitielle et une péricardite associée à une hyperéosinophilie.

# **Cyanotoxines produites par les cyanobactéries**

Produced with ScantOPDF

## 1. Définition des cyanotoxines

Les cyanotoxines sont des toxines de cyanobactéries recouvrent une grande variété de structures chimiques et de mécanismes de toxicité. Les cyanotoxines sont généralement classées selon leur mode d'action : les hépatotoxines, les neurotoxines et les dermatotoxines. Elles peuvent également être classées selon leur structure moléculaire en trois familles: les peptides cycliques, les alcaloïdes et les lipopolysaccharides.

## 2. Différentes cyanotoxines et leurs origines

Il a été démontré qu'au moins 46 espèces de cyanobactéries ont le potentiel de produire des toxines, le potentiel d'une souche de cyanobactéries à être toxique dépend principalement du fait qu'elle possède le gène de production de toxines (Haider et al., 2003).

Les cyanotoxines sont généralement produites et concentrées dans les cellules. En phase de croissance, les toxines sont essentiellement intracellulaires, moins de 10 à 20 % de la teneur totale en toxine est extracellulaire (Jones et al., 1994). Cependant dans certains cas, comme celui de la cylindrospermopsine, une proportion importante de la toxine peut être libérée dans le milieu par les cellules en croissance (Chiswell et al., 1999).

La libération des cyanotoxines, sous forme dissoute dans l'eau, apparaît principalement lors des étapes de sénescence et de lyse cellulaire. La lyse peut être causée par les attaques virales (cyanophages ou cyanovirus naturellement présents en milieux aquatiques) et les algicides.

### 2.1. Les hépatotoxines

Les hépatotoxines des cyanobactéries sont plus abondantes que les neurotoxines et peuvent être divisées en deux groupes : des peptides cycliques de faible poids moléculaire, microcystines et la nodularines, et un composé de structure alcaloïdique, la Cylindrospermopsine. Les hépatotoxines de structure peptidique sont les toxines les plus fréquemment impliquées dans les intoxications. Elles sont synthétisées entre autre par certaines espèces de *Microcystis*, *Nodularia*, *Anabaena* et *Planktothrix* (Duy et al., 2000).

### 2.1.1. Les microcystines

À ce jour, plus de 90 variantes de microcystine (MC) ont été identifiées. Il est important de signaler que leur structure chimique variable présente des différences de solubilité dans l'eau ce qui peut conduire à des variations dans les organes cibles, le métabolisme et la bioaccumulation (Craig *et al.*, 1996)

La MC-LR, qui présente une toxicité élevée sur souris est la toxine la plus fréquemment détectée dans les écosystèmes. Elle est de ce fait la plus étudiée et la mieux connue.

Peu de données sont disponibles sur les autres variantes de la microcystine.

La DL50 de la microcystine- LR, par voie intrapéritoneale ou intraveineuse, chez la souris et le rat est respectivement de 36 et 122 µg/kg. (Bouaicha *et al.*, 1996)

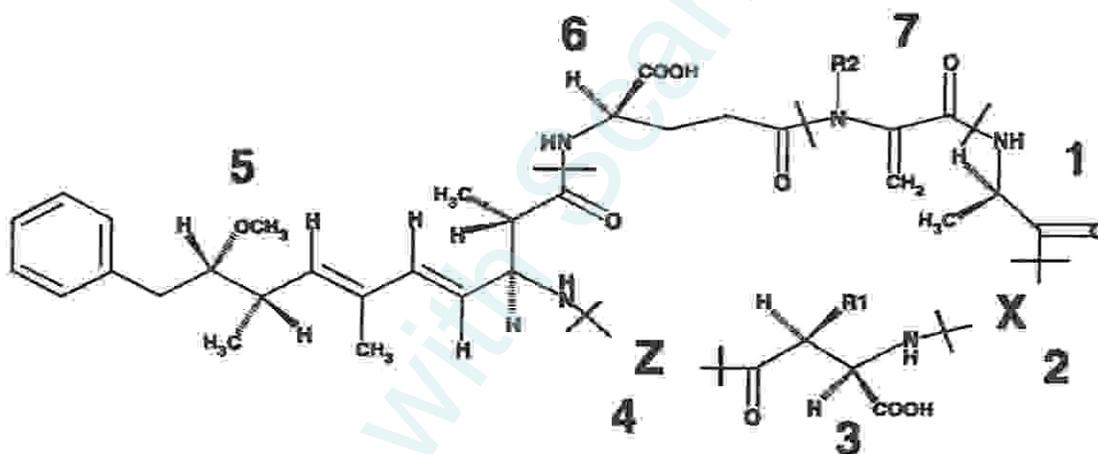


Figure 1. Structure chimique de la microcystine LR (Ting Chen *et al.*, 2004).

1-D-Alanine

2-Variable L-amino acid

3-D-Methylaspartic acid

4-Variable L-amino acid

5-Amino-9-Methoxy-2,6,8-triméthyle-10-phenyldeca-4,6-dienoic acide (adda)

6-D Glutamic acide

7-N-méthyl-D-hydroxyalanine

### 2.1.2. La nodularine

La nodularine, produite par *Nodularia spumigena*, est un pentapeptide cyclique d'enchaînement-D-MeAsp<sup>1</sup>-L-Arg<sup>2</sup>-Adda<sup>3</sup>-D-Glu<sup>4</sup>-Mdhb<sup>5</sup> (figure 1B). Sa structure contient la N-methyldehydrobutyrine (Mdhb) et acide amine Adda caractéristique des microcystines.

La DL50 de cette toxine varie entre 50 et 70 µg/kg L'action de la nodularine est identique à celle des microcystines par inhibition des PP1, PP2A et PP3. Elle inhibe préférentiellement la PP2A, puis a un même niveau la PP1 et la PP3. La nodularine a aussi des effets chroniques à faibles doses et peut être ainsi un promoteur de tumeurs (Carmichael et al., 1993).

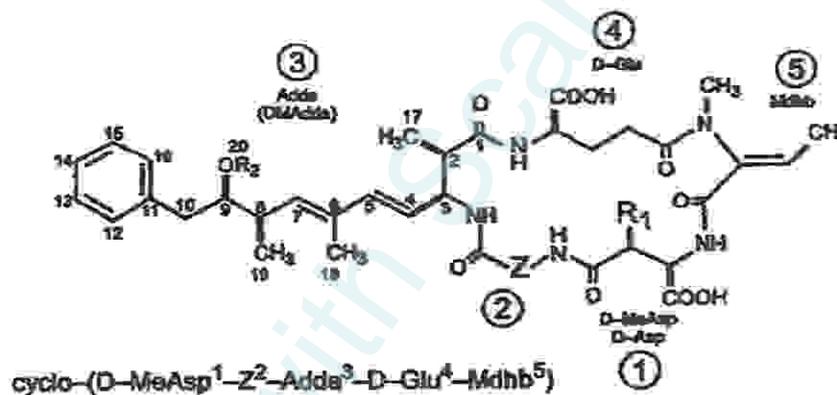


Figure 3. Structure chimique de la nodularine (Carmichael et al., 1993)

### 2.1.3. La cylindrospermopsine

La cylindrospermopsine possède une unité guanidine cyclique, Elle est synthétisée par *Cylindrospermopsis raciborskii* qui apparait souvent dans les eaux tropicales, par L'espèce japonaise *Umezakia natans* (Harda et al., 1994) et également par *Aphanizomenon ovalisporum* (Sivonen et Jones, 1999). Récemment, une nouvelle variante la desoxycylindrospermopsine a été isolée à partir de L'espèce *Cylindrospermopsis raciborskii* (Norris et al., 1999). La cylindrospermopsine est connue par son inhibition de la synthèse protéique au niveau du foie.

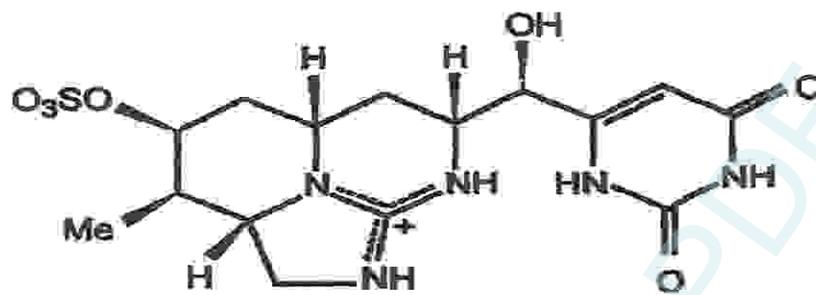


Figure 4. Structure chimique de la cylindrospermopsine (Harda et al., 1994)

## 2.2. Les neurotoxines

Les neurotoxines rassemblent deux familles : la première comprend trois anatoxines dont l'anatoxine-a, l'homoanatoxine-a et l'anatoxine-a(s) qui sont spécifiques des cyanobactéries, la seconde est celle des saxitoxines produites surtout par les genres *Anabaena* et *Aphanizomenon*. Les saxitoxines sont aussi synthétisées par des microalgues marines (dinoflagelles). Elles sont responsables de l'intoxication paralytique par les fruits de mer (IPFM) ou *paralytic shellfish poisoning* (PSP des Anglo-Saxons). La structure chimique des neurotoxines est de nature alcaloïdique. (Van apeldoorn et al., 2007)

### 2.2.1. Les saxitoxines

La saxitoxine (figure 5) ainsi que la néosaxitoxine sont principalement synthétisées par des dinoflagellés et sont responsables d'intoxications alimentaires après consommation de fruits de mer (Carmichael, 1994). Elles ont été identifiées pour la première fois en eau douce dans une souche d'*Aphanizomenon flos aquae*. La saxitoxine et la néosaxitoxine peuvent également être produites par *Aphanizomenon flosaquae* (Chorus et Bartram., 1999). La saxitoxine et la néosaxitoxine inhibent également la transmission de l'influx nerveux au niveau des jonctions neuromusculaires par blocage des canaux sodiques. Elles inhibent ainsi la transmission de l'activité électrique et empêchent la libération de l'acétylcholine. Leur toxicité est plus importante que celle des anatoxines avec une DL50 dans les mêmes conditions de 10 µg/kg (Henriksen et al., 1997).

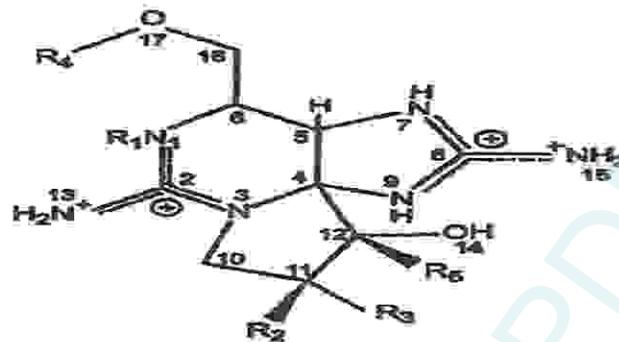


Figure 5. Structure chimique de saxitoxine (Henriksen et al 1997)

### 2.2.2. Les anatoxines

L'anatoxine-a (figure 5) est essentiellement synthétisée par *Anabaena flos-aquae*, *Anabaena spiroides*, *Anabaena circinalis* et moins fréquemment par des espèces des genres *Planktothrix*, *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon* et *Trichodesmium* (Carmichael et al., 1997).

Cette toxine ouvre les canaux sodiques en se liant aux récepteurs nicotiniques et muscariniques de l'acétylcholine ce qui déclenche une dépolarisation post-synaptique et la contraction des cellules musculaires. Cependant elle n'est pas dégradée par l'acétylcholinestérase, son action sur les cellules musculaires ne cesse pas, et à force d'être stimulées, ces cellules s'épuisent et cessent de fonctionner. Les symptômes typiques comprennent une fatigue excessive des muscles suivie par une paralysie. Quand les muscles respiratoires sont atteints, l'oxygénation insuffisante du cerveau engendre des convulsions et la suffocation (Carmichael, 1994).

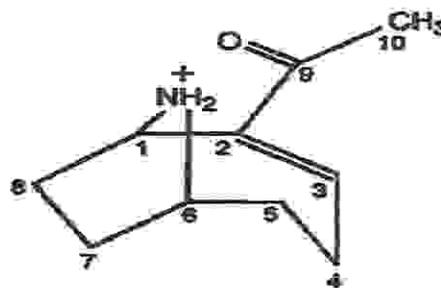


Figure 6. Structure chimique d'anatoxine (Carmichael, 1994)

### 2.3. Les dermatotoxines

Les dermatotoxines sont les toxines les moins étudiées à ce jour. Les plus connues sont essentiellement produites par les genres *Lyngbya*, *Oscillatoria* et *Schizothrix*. Ces microalgues, essentiellement d'origine marine, produisent trois sortes de dermatotoxines (aplysiatoxines, debromoaplysiatosine et lyngbyatoxin-a). Elles sont responsables d'irritations et de réponses allergiques au niveau de la peau.

La toxicité dermique des cyanobactéries a également été attribuée aux lipopolysaccharides (LPS) (Pilotto, 2004). Ces constituants de la paroi cellulaire des bactéries à gram négatif, incluant les cyanobactéries, sont présents chez toutes les cyanobactéries. Contrairement aux toxines citées ci-dessus, les LPS font partie intégrante du corps cellulaire : ce sont des endotoxines, sur le plan structural, les LPS sont constitués d'une partie lipidique (lipide A) et d'une partie polysaccharidique ; cette dernière, formée de sucres de nature et de séquences propres à la bactérie, constitue un puissant déterminant antigénique. La partie lipidique semble être le support de la toxicité de la molécule, dans le cas de *Maeruginosa*, elle présente une activité endotoxique environ dix fois plus faible que celle de l'endotoxine de *Salmonella*. Le lipide A est ancré dans la bicouche et ne peut se détacher de la bactérie qu'au moment de la lyse bactérienne, Elle correspond donc à l'endotoxine des bactéries à Gram négatif, il est à l'origine d'effets délétères tels que fièvre, irritations par contact cutané, gastro-entérite, diarrhée, et vomissement, suite à leur ingestion (Raziuddin et al., 1983).

## 3. Risques liés aux cyanotoxines

### 3.1. Les sources d'exposition aux cyanotoxines

L'exposition aux cyanotoxines se fait principalement par l'eau utilisée à des fins de consommation (cyanotoxines), à des fins domestiques comme la douche, le bain et la lessive (lipopolysaccharides et cyanotoxines) ou à des fins récréatives (cyanotoxines par ingestion accidentelle d'eau et lipopolysaccharides par contact direct). Des intoxications peuvent également se faire par voie parentérale pour les personnes en traitement de dialyse, du fait d'une eau contaminée insuffisamment traitée.

D'autres sources de contamination sont suspectées, notamment par voie alimentaire. L'irrigation des cultures agricoles avec de l'eau contaminée peut conduire à une contamination des surfaces externes des légumes (Codd et al., 2005) et

pourrait aussi provoquer une accumulation interne de cyanotoxines (Chorus et Bartram., 1999).

La consommation de la chair d'organismes aquatiques tels que les poissons, les crustacés et les mollusques représente également une source d'exposition puisque les cyanotoxines présentes en milieu aquatique peuvent s'accumuler dans ces organismes. Pour les poissons l'accumulation des toxines se fait essentiellement dans les muscles, le foie et les reins. Pour les crustacés, l'hépatopancréas, le cœur et les muscles peuvent présenter des concentrations en cyanotoxines. Enfin pour les mollusques, les toxines s'accumulent dans l'hépatopancréas, les organes reproducteurs et les muscles.

Le bétail peut également être en contact avec des cyanotoxines lors de l'abreuvement d'eau contaminée. De nombreux cas d'empoisonnement ont été rapportés chez les ovins et surtout les bovins. Il est alors légitime de s'interroger sur la possibilité d'exposition via la consommation de chair et de lait.

### 3.2. Effets des cyanotoxines sur la santé humaine

Les effets des cyanotoxines sur la santé humaine sont nombreux et comprennent :

Des gastro-entérites, des nausées et vomissements, de la fièvre, des symptômes comparables à la grippe, des irritations des yeux et des oreilles, des éruptions cutanées, une myalgie, une hépatomégalie (augmentation du volume du foie), une consolidation pulmonaire, des troubles visuels, des dommages aux reins et au foie (Codd et al., 2005).

Les lipopolysaccharides produits par les cyanobactéries peuvent également être des irritants cutanés et peuvent provoquer des réactions allergiques (Sivonen et Jones., 1999).

#### 3.2.1. Intoxications humaines dues aux toxines des cyanobactéries

Chez l'homme, l'absorption de faibles doses d'hépatotoxines par ingestion accidentelle d'eau de boisson contaminée est à l'origine de symptômes liés à une hépatite, des lésions rénales et intestinales, nausées, vomissements, céphalées, maux d'estomac, douleurs abdominales, hépatomégalie douloureuse, perte urinaire de sang, constipation suivie d'une diarrhée profuse sanglante, nécessitant souvent une hospitalisation (Falconner et al., 1996). Une consommation régulière de faibles doses de toxines favorisent l'apparition de troubles chroniques du foie et du tube digestif

avec une nécrose, une fibrose cellulaire progressive et une infiltration leucocytaire des tissus endommagés (Carmichael et al., 1994). Cependant, de fortes doses d'hépatotoxines sont responsables d'une hépatotoxicose hémorragique qui peut provoquer des troubles graves ou la mort (Jochimsen et al., 1998).

Les toxines des cyanobactéries sont essentiellement des endotoxines, qui s'accumulent à l'intérieur des cellules algales. Elles agissent soit par ingestion de ces microorganismes, soit par leur libération au cours de lyse algale. Un certain nombre de cas d'allergies ou d'intoxications ont été répertoriés chez l'homme par contact avec des cyanobactéries toxiques ou ingestion d'eau contaminée. Le degré d'intoxication dépend de l'âge de la personne, de son sexe et de son état de santé, les enfants étant les plus sensibles. La quantité d'eau polluée, fatale à un individu, dépend de la concentration en cellules dans l'efflorescence, de la concentration et de la nature des toxines dans les cellules, et de la sensibilité du sujet à ces toxines. Cette quantité varie de quelques millilitres à plusieurs Litres (Carmichael et al., 1993).

#### A. Intoxications aiguës

L'absorption de faibles doses d'hépatotoxines par ingestion accidentelle d'eau de boisson contaminée est à l'origine de maux d'estomac et de troubles intestinaux (diarrhées, vomissements, gastro-entérites (Turner P.C et al., 1990). De tels cas d'intoxications par des eaux provenant de sources ou de réservoirs d'eau potable, ou des cyanobactéries s'étaient accumulés, ont été identifiés dans le monde.

#### B. Intoxications chroniques

Les expositions chroniques et subchroniques aux hépatotoxines favorisent l'apparition de tumeurs chez les animaux. Chez les humains, les dégâts provoqués par la consommation répétée de faibles quantités de toxines sont probablement plus fréquents que les intoxications aiguës. Ce type de toxicité est difficile à évaluer aussi bien par une étude épidémiologique que par des expérimentations. En effet, de nombreux aspects concernant ces toxines restent inconnus notamment ceux relatifs à l'effet cancérigène de microcystines il faut signaler à ce propos qu'une étude épidémiologique réalisée en Chine dans la région de Jiangsu a montré une forte corrélation entre la proportion élevée de cancers du foie et la présence de forts taux d'hépatotoxines de cyanobactéries dans l'eau de boisson, Cependant, la présence d'aflatoxine B1 et de virus d'hépatite B dans l'eau de boisson pourrait aussi expliquer

le fort taux de cancers hépatiques observe dans cette région contaminées par des microcystines sont antagonisées par la cyclosporine (Negri et Jones, 1995).

#### 4. Techniques de détection des cyanotoxines

La mise en évidence des cyanotoxines dans des échantillons d'algues ou d'eau peut s'effectuer par plusieurs techniques analytiques : des essais immunologiques (test ELISA), des tests biochimiques (inhibition enzymatique) et des méthodes physicochimiques (chromatographie en phase liquide, gazeuse et électrophorèse capillaire).

##### 4.1. Techniques immunoenzymatiques

Des tests immunoenzymatiques (ELISA) permettant d'évaluer le contenu total en microcystines dans les échantillons, toute fois sans distinction possible entre les différentes variantes, ont été développés. Un kit sur plaque de 96 puits est aujourd'hui commercialisé, il permet de détecter de faibles concentrations en microcystines dans l'eau. Cette approche peut être considérée comme semi quantitative car elle peut aussi bien sous-estimer ou surestimer les quantités de microcystines (Chu et *al.*, 1990).

##### 4.2. Tests biochimiques

Partant du principe que l'activité toxique majeure des microcystines et de la nodularine résulte d'un pouvoir inhibiteur sur des phosphatases qui déphosphorylent des protéines sur des sites sérine ou thréonine (Mackintosh et *al.*, 1990), une méthode sensible et rapide de détection de ces toxines a été mise au point (le test PP2A). Une activité de la phosphatase a été mesurée soit par un test radiochimique (Lambert et *al.*, 1994). Soit par un test colorimétrique cette dernière méthode est basée sur l'utilisation du paranitrophenylphosphate (p-NPP), composé incolore qui, après déphosphorylation par diverses phosphatases, libère le paranitrophenol, composé coloré absorbant à 405 nm. Récemment, des substrats fluorescents ont été utilisés dans le but d'améliorer la sensibilité du test d'inhibition de PP2A, permettant ainsi la détection de quantité très faible en microcystines. On atteint l'ordre du pico-gramme (Fontal et *al.*, 1999). Un test d'inhibition enzymatique a été aussi développé pour la détection de l'anatoxine-a(s), il est basé sur l'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE) par cette toxine. Ce test n'est cependant pas spécifique car d'autres composés

tels que les pesticides organophosphorés peuvent également être détectés (Carmichael, 1994).

#### 4.3. Méthodes physicochimiques

Les méthodes d'analyse physico-chimiques utilisées pour la détection des cyanotoxines sont fondées sur une séparation analytique suivie d'une détection par un détecteur plus ou moins sélectif. Les microcystines, de même que les anatoxines ou les saxitoxines, sont des composés peu volatils. Par conséquent la chromatographie en phase liquide est préférée à la chromatographie en phase gazeuse. La plupart des analyses ont été réalisées par chromatographie en phase liquide à polarité de phases inversées suivie d'une détection en UV (Lawton et *al.*, 1994). L'utilisation d'un détecteur à barrette de diode permet de déterminer la présence de toxines ainsi que leur nature par comparaison des spectres d'absorption lorsque l'on dispose de standards. La sensibilité de ce mode de détection est généralement faible, en partie due à la faible absorptivité des composés. La limite de détection sur des extraits de cyanobactéries toxiques est de l'ordre de 50 à 100 pg de microcystines/g d'algues lyophilisées. Afin d'améliorer la sensibilité de ces techniques, un traitement préalable des échantillons par extraction liquide-solide est donc nécessaire.

L'utilisation de la microchromatographie en phase liquide ou de l'électrophorèse capillaire (Bouaïcha et *al.*, 1996) permet la détection de faibles quantités de microcystines, mais un problème réside dans le manque de standards. En effet, sur la cinquantaine de microcystines, seulement sept d'entre elles sont commercialisées : les microcystines -LR, -LW, -LF, -RR, -LA, -LY, -YR. La spectrométrie de masse couplée à ces techniques permet l'identification et la confirmation de la présence des cyanotoxines dans des échantillons d'algues et d'eau. Les neurotoxines peuvent être détectées et dosées par chromatographie en phase liquide. Les caractéristiques d'absorbance du groupe Adda permettent de les distinguer entre elles.

#### 4.4. Tests biologiques

Les tests biologiques sur animaux sont insuffisamment sensibles. Le test sur souris est le seul test reconnu à l'échelle internationale permettant de fournir une première information sur la présence de toxines dans l'eau de boisson. L'observation

des symptômes chez l'animal intoxiqué permet parfois de déterminer le type de toxines (Falconer, 1993).

Cependant ce test n'est pas quantitatif et de moins en moins utilisable pour des raisons éthiques. D'autres bio-essais utilisant des invertébrés pour la détection des microcystines tels que le test sur artemia (*Artemia salina*) ou celui sur les daphnies ont été développés, par ailleurs, la toxicité des extraits de cyanobactéries produisant des neurotoxines et des hépatotoxines peut être évaluée par des tests sur des cellules animales en culture. Des cultures primaires d'hépatocytes de rat ont été utilisées pour la détection de faibles concentrations en microcystines (Eriksson et al., 1990).

Des tests de toxicité sur des fibroblastes de cellules pulmonaires de hamster de la lignée V79 ont été également utilisés. En se basant sur le pouvoir de blocage des canaux sodiques par les saxitoxines, il a été possible de détecter la présence de celles-ci sur la lignée cellulaire de neuroblastomes de souris (Neuro-2A). Ce test de cytotoxicité est actuellement disponible sous forme d'un kit en plaques 96 puits et permet la détection des saxitoxines dans les produits de mer (Jellet et al., 1998).

##### 5. Recommandations et réglementations de l'organisation mondiale de la santé

Au niveau international, l'OMS a élaboré en 1999 des recommandations pour les eaux récréatives et les cyanobactéries. Des valeurs guides ont été suggérées en tenant compte des éventuels risques par contact direct (effets irritatifs et allergies), inhalation et ingestion. Il a été estimé que le risque le plus important était lié à l'ingestion accidentelle d'eau contenant des cyanotoxines (en particulier des microcystines). Ces valeurs guides sont présentées en trois niveaux et ont été établies à partir d'études ou de cas d'intoxication avérée :

- Seuil à faible risque sanitaire : la valeur guide de 20 000 cellules/ml dérive d'une étude épidémiologique de (Pilotto et al., 1999).
- Seuil à risque sanitaire modéré : l'évaluation du risque se base sur la valeur guide de la microcystine-LR dans l'eau potable.

À une abondance de 100 000 cellules/ml, une concentration de 20 µg/l de microcystines peut être attendue, un niveau 20 fois plus élevé que la valeur guide pour l'eau potable. Seuil à haut risque sanitaire: des cas d'empoisonnements mortels d'animaux et des problèmes sanitaires chez l'homme ont été rapportés, après exposition à de l'écume.

## 6. Traitement des intoxications dues aux cyanotoxines

En l'absence de traitement spécifique des intoxications dues aux cyanobactéries, la thérapeutique consiste en un traitement symptomatique afin de restaurer les fonctions de l'organisme. Toutefois, il est souhaitable d'utiliser des antihistaminiques ou des corticoïdes pour les manifestations atopiques qui surviennent après un contact avec un bloom, de cyanobactéries (Elder G.H et *al.*, 1993).

D'autre part, Negri et Jones ont montré que certains antioxydants comme les carotènes protègent les souris de manière significative des effets mortels des hépatotoxines mais ils doivent être injectés avant l'exposition aux toxines. D'autres travaux ont montré que les modifications morphologiques observées sur des cultures d'hépatocytes contaminés par des microcystines sont antagonisées par la cyclosporine (Negri A.P et Jones, 1995).

# **Effets toxiques de la microcystine**

Produced with ScantOPDF

## 1. Effet cytotoxique de la microcystine LR

Les cellules cibles des microcystines sont essentiellement les hépatocytes et les cellules épithéliales de l'intestin grêle. Les microcystines sont responsables d'une hépatotoxicité hémorragique qui peut provoquer des troubles graves tels qu'une nécrose hépatique évoluant vers la fibrose, une cytolysse hépatique, une insuffisance hépatique ou le plus souvent la mort. Une consommation régulière d'eau de boisson contaminée même à de faibles doses favorise également des effets chroniques au niveau du foie et du tube digestif, ainsi que l'initiation et la promotion de tumeurs.

### 1.1. Inhibition de la phosphatase

En effet l'activité toxique des microcystines résulte de son pouvoir inhibiteur puissant sur les phosphatases à sérine/thréonine essentielles pour le métabolisme cellulaire. Elles inhibent l'activité des sous-unités catalytiques des phosphatases, de type 1, 2A et 3 (PP1, PP2A et PP3), en se fixant sur le sites catalytique de ces enzymes, dont l'inactivation complète peut être létale (Mackintosh et *al.*, 1990). En établissant des liaisons covalentes dans le cytoplasme entre leur résidu Mdha (N-methyldihydroalanine) et les cystéines 273 et 226 des sous-unités catalytiques de ces enzymes. 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 micro filaments, des filaments intermédiaires et des microtubules), et en conséquence une nécrose des hépatocytes mais aussi des cellules glomérulaires et tubulaires proximales. Le foie endommagé peut libérer des médiateurs inflammatoires causant une inflammation pulmonaire secondaire (Dawson, 1998).

Cette inhibition peut avoir plusieurs conséquences surtout au niveau du foie. Ainsi on observe chez les mammifères une augmentation du poids et du volume hépatiques causée par des hémorragies et une infiltration de leucocytes mononucléaires. On observe aussi classiquement une perte de la structure sinusoidale et une augmentation du diamètre des canalicules biliaires (Hermansky et *al.* 1993). Les nécroses ou le développement de fibrose progressive sont aussi des phénomènes associés à une exposition aux MCs (Carmichael et *al.*, 2001). Les cellules se rétractent, s'écartent les unes des autres et se séparent des vaisseaux sinusoidaux. Les cellules des vaisseaux se détachent également, de sorte que le sang s'infiltré dans le tissu hépatique et s'y accumule. Il se forme alors une lésion locale avec, en général, un état de choc. La

mort est le résultat du choc hémorragique et se manifeste ainsi après quelques heures d'une exposition à des concentrations élevées en cette inhibition peut aussi avoir d'autres conséquences au niveau cellulaire (Carmichael *et al.*, 2001).

- les mitochondries s'agrègent, se dilatent et présentent des crêtes et des cryptes mitochondriales plus développées que la normale (Hermansky *et al.* 1993).
- réticulum endoplasmique se dilate et prend une forme spiralée (Hermansky *et al.* 1993).

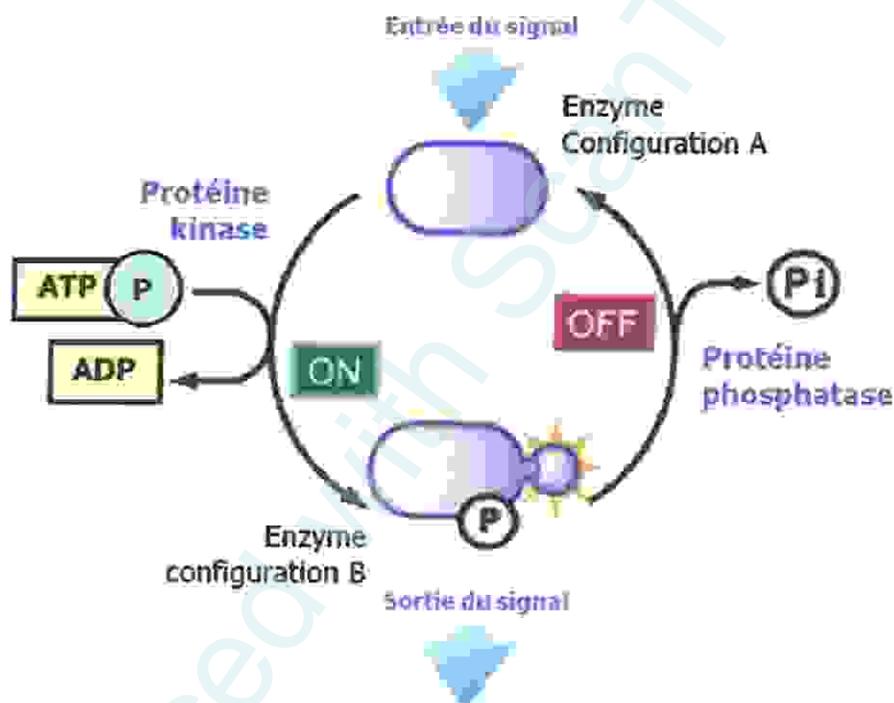


Figure 7. Système de phosphorylation et déphosphorylation (Dawson, 1988)

### 1.2. Stress oxydatif

Les microcystines induisent une production d'espèces réactives d'oxygène (ROS) et, par conséquent causent le stress oxydatif, conduisant à l'oxydation des composants cellulaires comprenant les protéines, les lipides membranaires et l'ADN. 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. On constate aussi une augmentation de la taille des crêtes mitochondriales aussi bien dans des hépatocytes, des cellules rénales épithéliales ou des fibroblastes

(Khan *et al.*, 1995). 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 (Ding *et al.*, 2001). 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. De plus deux molécules mitochondriales ont dernièrement été identifiées comme cible potentielle de la MC-LR : l'ATP synthase (synthétase) et l'aldéhyde déshydrogénase. Le stress oxydatif provoque aussi une augmentation des lipides peroxydases (Pinho *et al.*, 2005). Cependant, les causes et les mécanismes impliqués dans ces réactions n'ont été pas analysés en profondeur.

En outre l'exposition aux microcystines est directement associée à une augmentation du taux de GSH dont l'oxydation provoque un épuisement du GSH cytotoxique ce qui engendre une diminution de la concentration de GSH à l'intérieur des mitochondries, une situation qui favorise l'augmentation décrite de la production des ERO contribuant à l'intensification de la dépolarisation de la membrane mitochondriale (Chernyak, 1997).

L'abaissement de la concentration de GSH intracellulaire peut avoir des conséquences dramatiques pour la cellule notamment la perte de la capacité de détoxification aux microcystines. En plus de la perte de la capacité de désintoxication, la modification de la concentration de GSH peut également avoir des effets dans plusieurs voies de signalisation qui sont modulées par des altérations de l'état redox de la cellule. Certaines études suggèrent que l'induction du stress oxydatif est due à un état de hyperphosphorylation de la cellule après l'exposition aux microcystines et des modifications post traductionnelles modulant l'activité des enzymes anti-oxydantes (Rhee *et al.*, 2005).

## **2. Effet génotoxique des microcystines**

### **2.1. Effet sur la transcription des gènes**

Il y a beaucoup de preuves que les MCs sont impliquées dans de changements majeurs de la transcription de certains gènes. Parmi ces gènes, les microcystines perturbent la transcription des gènes du cytosquelette dans les organes suivants (foie,

reins et rate...). Les variations de la transcription des gènes du cytosquelette se fait comme suite : actine, ezrin, radixine et tous dans le foie, stathmine dans les reins, et radixine dans la rate sont significativement corrélée avec la concentration des microcystines dans ces organes. Toutefois, les facteurs qui influent sur la transcription de la plupart des gènes étudiés sont plus grandes dans le foie que dans le rein ou de la rate. Les effets des microcystines sur la transcription des gènes cytosquelettiques peuvent expliquer certains des changements morphologiques et pathologiques observées dans ces organes et de fournir de nouvelles informations sur l'hépatotoxicité de ces composés. En outre, les changements de la transcription des gènes (Ezrin, moésine et stathmine) du cytosquelette est associé qui ont été observés dans des études fournissent un indice possible du potentiel de valorisation de tumeur due à la microcystine. Des analyses ontologiques révèlent que les MCs perturbent significativement plusieurs autres gènes, dont : les gènes biomarqueurs du stress oxydatif du réticulum endoplasmique, de l'enzyme ubiquitine (UBC); GST $\alpha$  (glutathion), SLCO 4A1 codant pour le transporteur OATP-4A1, UCHL1 et UCHL5 (Wang et *al.*, 2010) ainsi que les gènes des transporteurs et des enzymes du métabolisme chez les Caco-2.

## 2.2. Induction des mutations

Suite à une exposition (intrapéritonéale) aux MC-LR, des lésions d'ADN ont été principalement induites dans le foie, mais également dans les reins, l'intestin, le côlon et le sang. Cependant, les organes affectés diffèrent en fonction de la voie d'administration des MCs. Des fragmentations de l'ADN et des cassures bicentennaires dans le foie et des mutations des gènes chez les mammifères ont été observées lors d'exposition aux microcystines LR (Suzuki et *al.*, 1998).

Dans le gène thymidine kinase (*TK*) par exemple, MC-LR élèvent la fréquence de mutants, suggérant que MCLR induit principalement une brute modification structurelle, telles que des délétions importantes, recombinaisons, et réarrangements. L'analyse moléculaire a fortement soutenu cette hypothèse. La plupart de la mutation du gène *TK* induites par MCLR était le résultat de LOH, tandis que la fraction de non-LOH mutants n'a guère changé.

Les MCs interfèrent aussi avec deux voies de réparation de l'ADN : TNS et la réparation ORD par NHEJ. Outre les dommages à l'ADN, la dépréciation de réparation de l'ADN est un facteur important impliqué dans les processus de la

cancérogène. Si les processus de réparation sont compromises la non réparation des lésions induit des erreurs, l'ADN endommagé peut causer des mutations, qui a finalement pourrait contribuer à la transformation néoplasique. Ainsi, par induction de dommages oxydatifs à l'ADN et l'inhibition ultérieure de réparation de l'ADN, l'exposition à de faibles concentrations de MC pourrait contribuer à l'instabilité génomique et, par conséquent, à un risque accru de cancer (Chorus et Bertram, 1999).

### 2.3. Cancérogénicité des microcystines

En 2010, le Centre international de Recherche sur le Cancer (CIRC) a classé MC-LR comme carcinogène humain possible (groupe 2B). Des études épidémiologiques ont montré qu'une exposition chronique à de faibles concentrations des MCs augmente le risque de développement du cancer de foie du colon gastro-entérite. Elles agissent essentiellement comme promoteur de tumeur via une inhibition des protéines phosphatases 1 et 2, les protéines phosphatases jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie dans les cellules. Elles ralentissent la division cellulaire en neutralisant les effets des diverses kinases par déphosphorylation des protéines. L'inhibition de la protéine phosphatase entraîne un déplacement de l'équilibre vers une phosphorylation plus élevée des protéines cibles. Il s'agit d'une modification post traduction importante, les microcystines perturbent également le contrôle de la prolifération cellulaire et donc favorisent la promotion des tumeurs, d'autres part la MC-LR inhibe l'expression des gènes suppresseurs de tumeur et modifie l'expression des proto-oncogènes dont les produits sont impliqués dans la régulation des gènes en réponse à une variation des stimuli, y compris des cytokines et des facteurs de croissance entraînant une progression du cycle cellulaire (Sueoka et al., 1997).

Afin de vérifier davantage l'effet du MC-LR sur les métastases, les cellules cancéreuses du sein ont été exposées à différentes concentrations de MC-LR (0, 25 et 100 nM), les cellules ont été étudiée par analyse de la cicatrisation des plaies les résultats ont montré une accélération significative de la migration cellulaire se traduisant par une propagation rapide du cancer dans l'organisme.

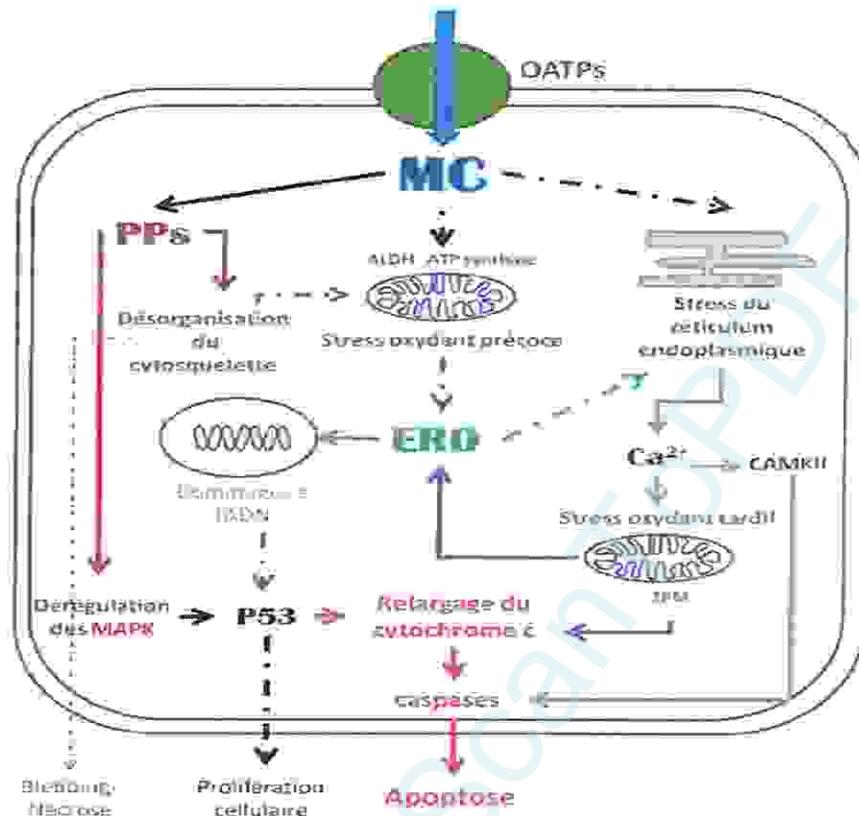


Figure 8. Schéma explicative des effets toxiques de la microcystine LR (Alverca et al., 2009).

### 3. Effets immunotoxiques des microcystines

#### 3.1 Effets des microcystines sur les lymphocytes

Des cellules de rate de souris ont été traitées avec des extraits de MC-LR, MC-YR, on constate un arrêt de la prolifération des lymphocytes T ceci se traduit par une inhibition de la transcription des gènes de IL-2 mais aussi par la réduction de la stabilité des ARNm de ces mêmes interleukines, par contre il a été constaté une augmentation de la production de l'interleukine-6. La modification du taux de l'interleukine-6 peut s'expliquer par l'inhibition par des radicaux libres dont la production est due aux microcystines, cette augmentation de la production d'IL-6 peut provoquer des effets irritants et allergiques chez les humains et les animaux. Une injection intrapéritoneale de la MC-LR modifie la libération d'IL-1 et TNF- $\alpha$  par les macrophages. Des doses de 1g/ml augmentent de façon significative la fréquence de cellules apoptotiques (lymphocytes T) dans des échantillons (poulet et humains) après un à deux jours cela est dû au fait qu'une forte inhibition de PP1 et PP2A peut induire un blocage de la métaphase provoquant l'arrêt du cycle cellulaire (Janssens et al.,

2000). D'autre part, l'adhésion des cellules T et B, qui dépend de l'inhibition PPI et PP2 est modifiée par les MCs, ce qui peut influencer l'apoptose à médiation cellulaire des cellules B. Les MC pourraient avoir une immunotoxicité plus puissante dans des conditions telles que l'insuffisance hépatique. Compte tenu du fait que la présence des récepteurs MC (ou transporteur) est critique pour l'activité cellulaire, il est suggéré qu'ils existent récepteurs ou d'autres systèmes de transport pour MC dans les lymphocytes. Il a été rapporté que les MC se lient aux récepteurs de l'acide okadaïque, qui sont présents dans les membranes des cellules. (Bagu et *al.*, 1997). Le mécanisme d'action de l'acide okadaïque s'est révélé similaire à celle des MC dans les cellules hépatiques, ce qui suggère que la voie de signalisation modifiée par l'acide okadaïque peut être un mode d'action des MCs dans les lymphocytes ; ce qui conduit au dysfonctionnement des lymphocytes.

Par ailleurs certaines études suggèrent que l'inhibition de la prolifération de lymphocyte peut se faire par la modification du niveau d'expression d'autres cytokines autre qu'IL-2 (Sung et *al.*, 2001).

### 3.2. Effet sur les organes lymphoïdes (rate)

Une exposition chronique et répétée des souris aux MCS-LR provoque une accumulation de celle-ci dans les tissus de la rate de ces animaux. Cette accumulation provoque un rétrécissement de la rate créant un fossé entre la pulpe rouge et blanche et aussi une déformation du centre germinatif (voir figure 12). On constate aussi une diminution de la taille et du poids de la rate, elle devient plus foncée et plus diffus avec un aspect atrophique après l'exposition.

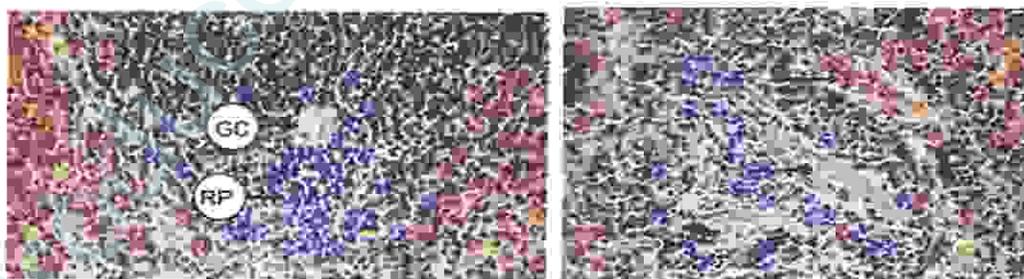


Figure 9. Lésions observés au niveau de la rate de souris traitées par MC-LR (Sung et *al.*, 2001).

Une diminution significative de l'activité du lysozyme dans la rate chez le rat pourrait être remarquée. Cette activité lysosomale est un outil indispensable dans le

fonctionnement du système immunitaire. Ces dégâts subis par la rate compromettent la fonction immunitaire. (Barrès et *al.*, 2010).

### 3.3. Perturbation et modulation du système immunitaire

Une exposition de très longue durée perturbe l'expression de plusieurs protéines impliquées dans la réponse immunitaire et inflammatoire. Parmi ces protéines touchées, la famille des galectines de la rate du rat présente à la surface des réticulocytes et les érythrocytes (Barrès et *al.*, 2010). Ces protéines jouent un rôle important dans le processus de maturation des réticulocytes ce qui contribue à l'anémie. Les sérines protéases sont des composants importantes du système immunitaire, celle-ci jouent un rôle crucial dans de nombreux processus immunitaires notamment la migration des cellules immunitaires, la phagocytose, l'élimination des infections virales et les cellules cancéreuses. Les membres de la Superfamille des serpinines régulent l'activité de ces protéases limitant des dommages aux tissus et la mort cellulaire injustifiée. La régulation et l'inhibition de serpine B9 et serpine A3n ont également été détectés. Les patients présentant un déficit en serpine A3n peuvent être vulnérables à l'élaboration d'anévrismes spléniques de l'artère, tandis que la surexpression de la serpine B9 peut empêcher les lymphocytes T cytotoxiques à éliminer certaines tumeurs (Toossi et *al.*, 2012). Le taux d'expression de la serpine B9 et serpine A3n peut être un marqueur du dommage de la MC-LR induit dans la rate. L'inhibition de l'expression de quatre protéines inflammatoires (T-Kininogène 1, T-kininogène 2 précurseur, le fibrinogène et preprohaptoglobine) a aussi été détectée. La T-kininogène inhibiteur de la cystéine protéinase joue un rôle important dans le processus de sénescence immune, cette protéine peut moduler l'activité de plusieurs éléments de la réponse immunitaire. La MC-LR est impliquée dans l'inhibition de la production de NO. Cette molécule produite par un large éventail de cellules immunitaires intervient dans la surveillance immunitaire, la modulation de la mort des cellules immunitaires. La forte inhibition de la MC-LR sur la production du NO peut permettre à cette toxine de se soustraire à la défense de l'hôte et agit comme un immunosuppresseur. Des poissons (carpes) soumis à des extraits contenant des MC à des concentrations élevées présentent une diminution considérable la capacité phagocytaire des mononucléaires affaiblissant ainsi la capacité de ces animaux à se défendre contre les agents pathogènes et les maladies infectieuses (Rymuszka, 2012).

# Matériel et méthodes

Produced with ScantOPDF

## II. Matériel et méthodes

Ce travail a été réalisé en grand partie dans le laboratoire de Biochimie et d'immunologie de l'université de Guelma, ainsi dans un autre laboratoire d'analyse médicale privé. Il s'agit d'une étude comparative de l'effet de deux voies d'introduction de la MC-LR à des doses semi-létales sur des paramètres biochimiques, hématologiques et immunologiques chez la souris.

### 1. Matériel biologique

#### 1.1. Animaux

Pour la réalisation de ce travail, 60 souris blanches de la souche Balb/C, d'un poids corporel moyen d'environ 26g âgé de 3 semaine fournie par l'institut pasteur (Alger). Ces souris ont été soumises à une période d'adaptation de deux semaine, aux conditions de l'animalerie de la faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers de l'université de Guelma à une température ambiante et nourries avec un concentré énergétiquement équilibré, les souris sont gardées dans des cages en polyéthylène, tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois.

### 2. Matériel chimique et réactifs (voir annexe)

#### 2.1. Traitement

4 lots de souris d'un effectif égale à 15 souris, ont été séparés dans des cages différentes et préparées pour le traitement.

Lot 1 : Témoins VO, les souris ont été traités par voie orale avec de PBS contenant 0.1% de méthanol.

Lot 2 : Témoin VI, les souris ont reçu 200 µl de PBS (0.1% méthanol) par voie intraperitoneale.

Lot 3 : traités VO, les souris ont été traités par voie orale de 200µl de MC-LR a une dose de 50µg/kg de poids corporel.

Lot 4 : traités VI, 200µl de MC-LR a été injecter par voie intraperitoneale par voie intraperitoneale aux souris.

#### 2.2. Sacrifice et prélèvements

##### 2.2.1. Prélèvement sanguin

Après 24 heures de traitement les 4 groupes sont sacrifiés par décapitation. Le sang est immédiatement reparti dans des tubes secs et des tubes contenant un anticoagulant (EDTA) étiquetés.

Les tubes à EDTA serviront pour la détermination de la formule de numération sanguine (FNS).

Les tubes secs sont centrifugés à 5000 tours/minute pendant 15 minutes, les sérums récupérés serviront à la détermination des paramètres biochimiques (phosphatase alcaline, transaminase ASAT/ALAT).

Tous les tubes sont immédiatement transportés dans une glacière au laboratoire d'analyse (Laboratoire d'Analyse Médicale de Guelma) pour les dosages des paramètres précédents.

### 2.2.2. Prélèvement de la rate

Les animaux sacrifiés ont été pesés avant le sacrifice puis ouverts ventralement pour le prélèvement de la rate. La rate a été pesée puis coupée et hachée en présence de tampon de phosphate à raison de 1g pour le dosage de MDA.

## 3. Paramètres du système immunitaire

### 3.1. Numération des cellules immunitaire dans le sang

Le comptage des cellules immunitaires qui se trouvent dans le sang sont compté grâce à une automate.

### 3.2. Méthode de numération des macrophages péritonéaux

Après avoir préparé et stérilisé les instruments ainsi que la planche à dissection avec l'alcool, les souris ont été placées sur la phase dorsale. Une boutonnière cutanée de 0.5cm fut ouverte sur la ligne médio-ventrale du tronc en avant de l'orifice urinaire. La peau est proprement écartée pour découvrir les muscles péritonéaux

A l'aide d'une seringue stérile, 3 ml de la solution PBS ont été introduit dans la cavité péritonéale. Après 5 minutes, le liquide de lavage est récupéré dans un tube stérile et centrifugé 5 minutes à 1500 tours/min.

Le culot issu de cette première centrifugation a été remis en suspension dans 3 ml de PBS et centrifugé 5 munité à 1500 tours/min (deux fois). A la fin du dernier lavage, le culot est remis en suspension dans 3 ml de PBS, à partir de laquelle 100 µl ont été dilués dans 900µl de la solution de bleu de Trypan. Les macrophages péritonéaux ont été comptés en utilisant la cellule de Malassez et leur pourcentage de viabilité est évalué par le test (Trypan bleu exclusion test (Ducan, 1995).

Le nombre des leucocytes par litre est calculé selon l'équation suivante:

$$N = (n / v).f$$

N (Nombre de cellules par litre) ; n (nombre de cellules comptées) ; v (volume de comptage en litre) et f (facteur de dilution) de valeur 10.

#### 4. Dosage des paramètres hématologiques

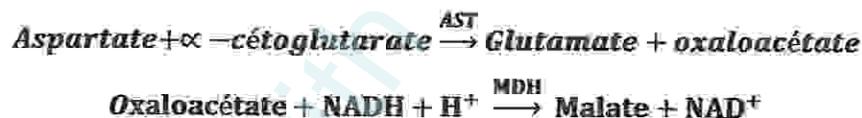
La formule de numération sanguine (FNS) a été réalisée par l'analyseur ERMA INC (full automatic blood cell counter model PCE-210N). Le tube de sang total avec l'EDTA (anticoagulant) est placé dans l'automate. Quelques secondes après, l'hémogramme des échantillons sanguins est obtenu.

Les paramètres déterminés sont : globule rouge (GR), globule blanc (GB), hémoglobine (Hb), hémocrite (HT), plaquettes (PLT), lymphocytes (LY), granulocytes (GRA), volume globulaire moyen des hématies (VGM) et la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH).

#### 5. dosage des paramètres biochimiques

##### 5.1. Mesure de l'aspartate aminotransferase

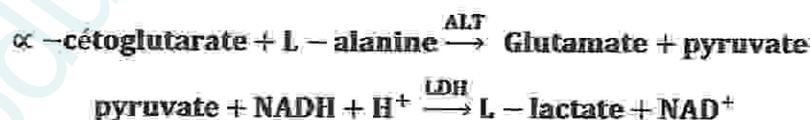
**Principe :** l'aspartate aminotransferase (ASAT) appelée aussi oxaloacetate de glutamate (GOT) catalyse le transfert réversible d'un groupe amine à partir de l'aspartate au  $\alpha$ -cétoglutarate formant le glutamate et l'oxaloacetate. L'oxaloacetate est réduit au malate par la malate deshydrogenase (MDH) et le NADH, H<sup>+</sup>.



Le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité de l'aspartate aminotransferase dans l'échantillon (Murray, 1984).

##### 5.2. Mesure de l'alanine aminotransferase

**Principe :** le principe est présent selon le schéma réactionnel suivant :

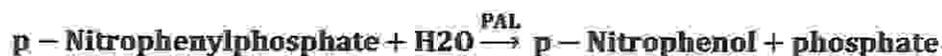


La diminution de la concentration en NADH est directement proportionnelle à l'activité enzymatique d'alanine aminotransferase dans l'échantillon (Murray, 1984).

##### 5.3. Mesure de la phosphatase alcaline

**Principe :** la phosphatase alcaline (PAL) catalyse l'hydrolyse de p-nitrophenyl Phosphate à pH 10.4 pour donner le p-nitrophenol et le phosphate. La formation de p-nitrophenol est

mesurée par spectrophotométrie, ou elle est proportionnelle à l'activité catalytique de la phosphatase alcaline dans l'échantillon (Wenger et al., 1984).



## 6. Dosage des paramètres du stress oxydant

### 6.1. Préparation de l'homogénat

La rate des souris des différents groupes étudiés, a été prélevée. Après broyage et homogénéisation des tissus dans le tampon phosphate (pH 7.2), on a procédé à une centrifugation de la suspension cellulaire (3800 tours/min, 4°C, 15 min), puis le surnageant obtenu est aliquoté dans des tubes eppendorfs puis conservés à -20°C en attendant d'effectuer les dosages de MDA.

### 6.2. Détermination de la peroxydation lipidiques du statut oxydant

Le MDA est l'un des produits terminaux formés lors de décomposition des acides gras polyinsaturés médiés par les radicaux libres, les taux du MDA évalués selon la méthode (d'ohkahawa *et al.*, 1979). La concentration repose sur la formation en milieu acide et chaud (100°C) entre le MDA et thiobarbituriques (TBA) d'un pigment coloré absorbant a une longueur d'onde  $\lambda=532\text{nm}$ .

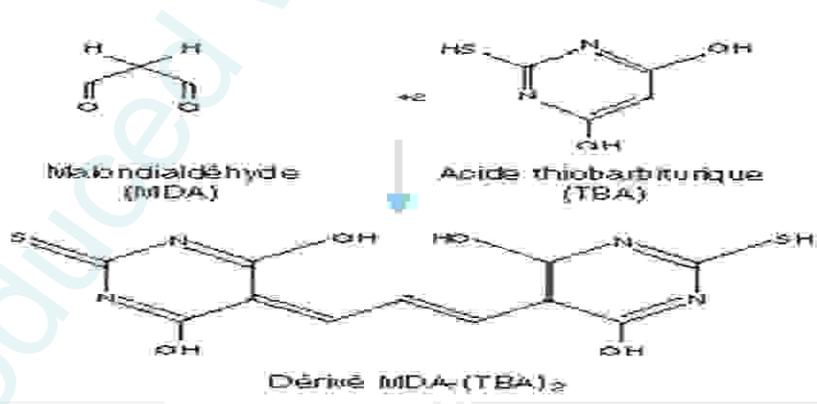


Figure 10. Réaction de formation du complexe MDA-TBAR (Ohkahawa *et al.*, 1979).

### Méthode

250µl d'échantillon ont été ajoutés à un mélange constitué de : 250µl TCA 20%(1g de TCA dans 5ml H<sub>2</sub>O), 500µl de l'acide TBA (0.67%) .Le mélange a été incubé au bain marie a 100C° pendant 15 minute, puis refroidir, ensuite 4ml de n-butanol ont été ajouté et le tout a

été centrifugés à 3000 r.p.m pendant 15 minutes, l'absorbance du surnageant a été mesurée à une longueur d'onde de 532nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La concentration du MDA est calculée selon la loi de Beer -Lambert ( $DO = E.C.L$ ).

$$C = \frac{DO}{\epsilon.L}$$

C : Concentration en nmoles

DO : Densité optique lue à 532 nm.

E : Coefficient d'extinction molaire du MDA =  $1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

L : Longueur du trajet optique = 1cm.

### 7. Analyse statistique

Les données obtenues pour tous les paramètres ont été analysées par le test t de Student à deux échantillons appariés après un traitement par le logiciel SPSS 18.

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart type avec un seuil de significativité  $P < 0.05$ .

Un premier traitement statistique reposant sur la recherche de l'effet immunotoxique des deux voies d'administration (la voie orale et l'intraperitoneale) a été effectué ; suivi d'un autre comparant les deux voies utilisées.

# **Références bibliographiques**

Produced with ScantOPDF

- Aymeric J.L.** Et **Lefranc G.** (2009): Immunologie humaine. De boock (ed). Bruxelles. Paris. 136.
- Bach J. F.** (2012): Thérapeutique immunologique. In Immunologie 6<sup>e</sup> édition. Médecine Sciences (ed). Paris. 469.
- Bagu J.R., Sykes, B.D., Craig, M.M., Holmes, C.F.B.** (1997). A molecular basis for different interactions of marine toxins with protein phosphatase-1. *J. Biol. Chem.* 272: 5087-5097.
- Barrès C., Blanc L., Bette-Bobil lo P., André S., Mamoum R., Gabius H.J.** (2010). Galectin-5 is bound onto the surface of rat reticulocyte exosomes and modulates vesicle uptake by macrophages. *Blood.* 115: 696-705.
- Bouaïcha N., Rivasseau, C., Hennion, M.C., Sandra, P.** (1996). Detection of cyanobacterial toxins (microcystins) in cells extracts by micellarelectrokinetic chromatography, *J. Chromatogr.* 685: 53-57.
- Campos A., Vasconcelos V.** (2010). Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. *International Journal of Molecular Sciences.* 11: 268-87.
- Carmichael W. W., Falconer I.R.** (1993). Diseases related to freshwater blue-green algal toxins and control measures. In: *Algal toxins in seafood and drinking water.* I. Falconer, Academic Press. London. 167-209.
- Carmichael W.W.** (1994). Les toxines des cyanobactéries, *Pour la Science* 197: 44-51.
- Carmichael W.W., Azevedo, S.M.F.O., An, J. S., Molica, J.R., Jochimsen, E.M., Lau, S., Rinehart L., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K.** (2001). Human fatalities from Cyanobacteria: Chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ. Health Persp.* 109: 663-668.
- Chapel H., Haeney M., Misbah S. et Snowden N.** (2004): Immunologie clinique. De book (ed). Bruxelles. Paris 368.
- Chernyak B.V.** (1997). Redox, regulation of the mitochondrial permeability transition pore. *Biosci Rep.* 17: 293-302.
- Chatenou D. L., Witko-Sarsat V., Vivier E., Leite De Moraes M., Dragon-Duroy M. et Fremeaux-Bacchi V.** (2012) : Immunité innée et immunité adaptative. In Immunologie 6<sup>e</sup> édition. Médecine Sciences (ed). Paris. 469.

- Chorus I., Bartram, J. (1999).** Toxic cyanobacteria in water, a guide to public health consequences, monitoring and management. E and FN Spon on behalf of WHO, London. 416.
- Chu F.S., Huang, X., Wei, R.D. (1990).** Enzyme-linked-immunosorbent assay for microcystins in blue-green algal blooms *J.assoc.analyst. chem.* 73: 451-456.
- Codd D.G.A., Lindsay A., young F. M., Morrison L.F. Et Metcalf J.S. (2005).** Harmful cyanobacteria: from mass mortalities to management measures. In Harmful cyanobacteria . Huisman J. Mthijs H.C.P & Visser P.M. (eds). Dordercht, the Netherlands. 1-24.
- Cood. G.A., Metcalf J.S.E.T Beattie K.A., (1999).** Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria. *Toxicol.* Volume 37. 8:1181-1185.
- D'ohkawahawa H., Ohishi N., Yagi., (1979).** ASSAY for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Annals of Biochemistry.* 95: 351-358.
- Descotes J., Choquet-Kastylevsky., E. Van Ganse et T. Vial. (2000).** Responses of the immune system to injury. *ToxicolPathol.* 28: 479-481.
- Ding W.X., Shen, H.M., Ong, C. N. (2001).** Critical role of reactive oxygen species formation in microcystine induced cytoskeleton disruption in primary cultured hepatocytes. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 64: 507-519.
- Ducan D.D. et Lawrence DA. (1995):** T cells and cloned and transformed T-cell lines to assess in immune function. *Wileys-liss-Inc. New-York, Chichester, Toronto, Singapore.* 1: 483-505.
- Elder G. H., Hunter P.R., Codd G. A. (1993).** Hazardous freshwater cyanobacteria (blue-green algae). *Lancet* 341 1519-1520. Environmental samples using liquid chromatography. *J. Chromat A.* 799: 155 169.
- Eriksson J.E, Grönberg L, Nygård S, Slotte JP, Meriluoto JAO. (1990).** Hepatocellular uptake of 3 H-dihydromicrocystin-LR, A cyclic peptide toxin. *Biochimica et Biophysica Acta -Biomembranes.* 1025: 60-6.

**Falconer I.R.** (1993). Measurement of toxins from blue-green algae in water and food stuffs in: Falconer I.R. (Ed), Algal toxins in sea food and drinking water. Academic Press. London. 168-175.

**Falconer I.R.** (1996). Potential impact on human health of toxic cyanobacteria. *Phycologia*. 35-6-11.

**Fontal O.L., Vieytes, M.R., Baptista de Sousa, J.M.V., Louzao, M.C., Botana, L.M.** (1999). A fluorescent microplate assay for microcystin-LR. *Analyt. Biochem.* 269: 289-296.

**Gorochoff G et Papo T.** (2000): Immunologie. Doim (ed). Paris. 487.

**Hermansky S.J., Wolff, S.N., Stohs, S.J.** (1993). Use of rifampin as an effective chemoprotectant and antidote against microcystin-LR toxicity. *Pharmacology* 41, 231– 236.

**Hombert J. C.** (2004) : Immunologie Fondamentale. Copyrighted material (ed). Paris. 215p.

**IARC.** (2010). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Ingested nitrate and nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer 94: 1-412.

**Janssens U., Van Hoof C., De Baere L, Merlevede W., Goris J.** (2000). The phosphotyrosyl phosphatase activator gene is a novel 53 target gene. *J. Biol. Chem.* 275:20488–20495.

**Janeway., Murphy., Travers. Et Walport.** (2009). Immunobiologie 3e édition. De boock (ed). Bruxelles. Paris. 889.

**Jellet J.E., Doucette, L.L, Belland, E. R.** (1998). The Mist (MT) shippable cell bioassay kits for PSP: An alternative to the mouse bioassay. *J. Shell fish Res.* 17:1653-1655.

**Khan S.A., Wickstrom, M.L., Haschek, W. M., Wyman, J.F., Eriksson, J.E., Schaeffer, D.J., Beasley, V.R.** (1995). Alterations in microtubules, intermediate filaments, and microfilaments induced by microcystin-LR in cultured cells. *Toxicol Pathol.* 23: 326–337.

**Kindt T. J., Goldsby R., Osborne B.** (2007): Immunologie. Le cours de Janis Kuby Avec questions de révision. DUNOD (ed). Paris. 684.

- Lawton L.A., Edwards, C., Codd G. (1994).** Extraction high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystin in raw and treated waters. *Analyst*. 119:1525-1530.
- Mackintosh C., Beattie, K. A., Klumpp S., Cohen, P., Codd, G.A. (1990).** Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases I and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett.* 264:187-192.
- Malc D. (2005) :** Immunologic. Aide mémoire illustré. De boeck (ed). Bruxelles. Paris. 141p.
- Murray R. (1984).** Aspartate aminotransferase. Kaplan A et al .*Clin. chem. The C.V. MosbyCo. Si louis. Tronto. Princeton.* 1: 112-116.
- Negri A. P., Jones G. I. (1995).** Bioaccumulation of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins from the Cyanobacterium *Anabaena circinalis* by the freshwater mussel *Alathryriacondola*, *Toxicon.* 33: 66-78.
- Norris R.L., Eaglesham, G. K., Pierens, G., Shaw, G.R., Smith, M.J., Chiswell, R.K., Seawright, A.A., Moore, M.R. (1999).** Deoxycylindrospermopsin. An analog of cylindrospermopsin from *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environ. Toxicol.* 14:163-165.
- Parham P. (2003):** Le système immunitaire. De boeck (ed). Bruxelles. Paris.407.
- Penn I. (1988).** Cancer is a long-term hazard of immunosuppressive therapy, *J Autoimmun* 1. 545-558.
- Pilotto L.S. (2004).** Acute skin irritant effects of Cyanobacteria (blue-green algae) in healthy volunteers, *Australian and New Zealand Journal of Public health*, vol. 28.3: 220-224.
- Pinho G.L.L., Moura da Rosa, C., Maciel, F.E., Bianchini, A., Yunes, J.S., Proença, L.A.O., Monserrat, J.M. (2005).** Antioxidant responses and oxidative stress after microcystin exposure in the hepatopancreas of an estuarine crab species. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 61:353-360.
- Paul S, et Étienne R. (2002) :** Immunothérapie génique du cancer. *Transfusion clinique et biologique.* 9. 301-321.

- Raziuddins.**, Sieglman H.W., Ttornabene T.G. (1983), Lipopolysaccharides of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Eur. J. Biochem.*, vol 137:333-336.
- Rhee SG.**, yang S.W., Kang S.W., Woo H.A., Chang TS. (2005). Controlled elimination of intracellulaire  $H_2O_2$ : regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathioneperoxidase via post-translational modification. *Antioxid Redox Signal*. 7: 619-26.
- Reveillard.** (2001) : Immunologie. De boock (ed). Bruxelles. 593.
- Sivonen K** et Jones G (1999) Cyanobacterial toxins. In Toxic Cyanobacteria in Water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. Chorus I, And Bartram J. (eds). London and New-York, E. Spon, U. And P. N. 41-111.
- Sueoka E.**, Sueoka, N., Okabe, S., Kozu, T., Komori, A., Ohta, T., Suganuma, M., Kim, S.J., Lim I.K., Fujiki, H. (1997). Expression of the tumor necrosis factor-gene and early response genes by nodularin, a liver tumor promoter in primary rat hepatocytes. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 123:413-419.
- Sung Su Yea,** Hwan Mook Kim, Hee-Mock Oh, Kye-Hyung Paik. (2001). Régulation à la baisse induite de microcystines des lymphocytes fonctions grâce à une réduction de la stabilité de l'i12 ARNm. *Toxicology Letters* 122:21 31.
- Suzuki.**, M.F Watanabe., Y. Wu., T. Sugita, K. Kita., T. sato., X. Wang., H. Teixeira M., Cesta M., Carvalho V., Perira M., Hage E.(1998). Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil, *Bull. Pan. Am. Health Org.* 27: 244-253.
- Toossi Z.**, Wu M., Rojas R., Kalsdorf B., Aung H., Hirsch C. (2012). Induction of serine protease inhibitor 9 by *Mycobacterium tuberculosis* inhibits apoptosis and promotes survival of infected macrophages. *J Infect Dis*: 205: 144-51.
- Turner P.C.**, Gamie A.J., Hallinrake K., Codd G.A. (1990). Pneumonia associated with contact with Cyanobacteria, *British Med* 3: 300 1440-1441.
- Van Appeldoorn M.E.**, van Egmond H.P., Speijers G.J.A., Bakker G.J.L. (2007). Toxins of Cyanobacteria. *Mol. Nutr. Food Res.* 51: 7-60.
- Wang M.H.**, Chan L., Si M.Z., Hong H.S., Wang D.Z. (2010). Proteomic analysis of hepatic tissue of zebrafish (*Danio rerio*) experimentally exposed to chronic microcystin-LR. *ToxicolSci.* 113:60-9.

**WHO.** (1993). *Guidelines for drinking-water quality, Addendum to vol. 2* Geneva, World Health Organisation. 416.

**Wenger** (1984). Alkaline phosphatase: Kaplan A et al. *Clin chem.* The C.V. Mosby Co, St Louis, Tronto, Princeton. 1094-1098.

Produced with ScanTOPDF

# **Annexe**

Produced with ScantOPDF

## Solutions utilisées

Nom de la solution	Composition	Quantité du réactif
Phosphate Buffer saline (PBS) PH7.4 10mM	NaCl	8g
	KCl	0.22g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24g
	Eau distillée	1000ml
Tampon phosphate PH7.2	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13.609g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	17.418g
	Eau distillée	1000ml
Solution d'acide salicylique	TCA	20g
	Eau distillée	100ml
Bleu de Trypan	Bleu de Trypan	0.2g
	Eau distillée	100ml
Solution TBA	TBA	0.67g
	Eau distillée	100ml
Solution EDTA (0.02M)	EDTA	5.613
	Eau distillée	750ml

Appareillages	Référence
-Vortex	-NUVE Bath NF200
-Balance de précision	-VELP scientifica Zx
-Agitateur magnétique	-VELP scientifica Zx
-Centrifugeuse	-Sigma
-spectrophotomètre	-Secomam basic
-Analyseur biochimique	-mindry BS200
-Micropipette	-
-Bain-Marie	-Mermert

## Tableaux récapitulatifs

Tableau 1. Effet de la MC-LR administrée par voie intrapéritonéal chez les souris

	Témoins vip	Traités vip	Signification
LT	1.78±0.44	5.29±0.63	S (P = 0.016<0.05)
GB	3.33±1.20	7.21±0.49	S (P= 0.046<0.05)
GRAN	1.05±1.44	0.78±0.30	NS (P=0.731>0.05)
MAC	9.80±1.30	5.60±1.14	HS (P=0.00<0.05)
GR	9.10±0.59	8.32±.19	NS (P=0.87>0.05)
HB	13.83±0.20	11.29±0.15	HS (P=0.00<0.05)
VGM	45.0±1.73	46.0±1.0	NS (P=0.225>0.05)
HMTC	41.41±32.65	38.22±0.52	S (P=0.025<0.05)
ALAT	66.16±32.65	555.62±181.86	S (P=0.017<0.05)
ASAT	267.90±28.94	537.20±197.58	S (P=0.028<0.05)
PAL	81.60±40.55	45.40±12.44	NS (P=0.121>0.05)
MDA	0.00±0.00	0.00±0.00	NS (P=0.88>0.05)

Tableau 2. Effet de la MC-LR administrée oralement chez les souris

	Témoins vo	Traités vo	Signification
LT	0.81±0.58	3.2±1.00	NS (P=0.072>0.05)
GB	1.54±1.17	7.45±1.41	S (P=0.023<0.05)
GRAN	0.60±0.00	2.90±0.38	S (P=0.014<0.05)
MAC	8.20±1.92	5.20±0.83	S (P=0.013<0.05)
GR	7.91±0.88	11.86±2.57	NS (P=0.082>0.05)
HB	12.80±1.77	14.66±3.15	NS (P=0.58>0.05)
VGM	44.00±1	46.66±5.77	NS (P=0.448>0.05)
HMTC	35.23±4.67	56.50±18.68	NS (P=0.132>0.05)
ALAT	61.0. ±7.51	607±56.24	HS (P=0.00<0.05)
ASAT	320.82±44.66	427.00±101.24	S (P=0.036<0.05)
PAL	320.82±44.66	427.00±101.24	S (P=0.036<0.05)
MDA	0.00±0.00	0.00±0.00	NS (P=0.819>0.05)

**Tableau 3.** Comparaison de l'effet de la MC-LR administrée par les deux voies.

	Traités vo	Traités vip	Signification
LT	3.23±1.00	5.26±0.63	NS (P=0.082>0.05)
GB	7.45±1.41	7.21±0.49	NS (P=0.748>0.05)
GRAN	2.90±0.38	0.78±0.30	S (P=0.006<0.05)
MAC	5.20±0.83	5.60±1.14	NS (P=0.61>0.05)
GR	11.66±2.75	8.32±0.19	NS (P=0.174>0.05)
HB	14.66±3.15	11.26±0.15	NS (P=0.209>0.05)
VGM	46.66±5.77	46.00±1.00	NS (P=0.837>0.05)
HMITC	56.50±18.68	38.22±0.52	NS (P=0.234>0.05)
ALAT	607.90±56.24	555.62±281.86	NS (P=0.704>0.05)
ASAT	427.80±101.49	537.20±197.58	NS (P=0.254>0.05)
PAL	427.80±101.48	45.40±12.44	S (P=0.001<0.05)
MDA	0.079±0.00	0.34±0.34	NS (P=0.154>0.05)

Produced with ScanTopdf

# Résumé

Produced with ScantOPDF

## Résumé

### Résumé

Les microcystines, hépatotoxines produites par des cyanobactéries d'eau douce, sont incriminées dans des intoxications humaines et animales. L'ingestion est la principale voie d'exposition chez l'homme. Parmi les quelques 90 variantes décrites, la MC-LR constitue la variante la plus toxique. Afin de mieux caractériser le danger pour l'homme nous avons choisi d'étudier l'effet de la toxine sur quelques paramètres du système immunitaire et de comparer la sévérité de son effet une fois administrée chez les souris Balb/C par deux voies d'administration (orale et intrapéritonéale). Après détermination de la dose semi-létale de la toxine par les deux voies étudiées, un comptage des paramètres immunologiques, hématologiques ainsi qu'une exploration de la fonction hépatique et du statut oxydant de la rate ont été réalisés. Les résultats ont révélé une augmentation considérable du taux des lymphocytes chez les lots traités avec la MC-LR par voie intrapéritonéale et un recrutement important des granulocytes. Ceci a confirmé que la molécule a favorisé une réponse adaptative de façon à éliminer la toxine et prévenir les effets néfastes de l'inflammation sur le foie. Ce travail a confirmé que la microcystine a un effet significatif et confirmé sur les cellules immunitaires une fois administrée par voie intrapéritonéale.

**Mots clés :** microcystine LR, immunotoxicité, stress oxydant, rate, FNS, protéine phosphatase, transaminases

### Abstract

Microcystins, hepatotoxins produced by freshwater cyanobacteria, are incriminated in human and animal poisoning. Ingestion is the principal route of exposure to humans. Among some 90 described variants, the MC - LR is the more toxic one. To better characterize the danger to humans we have chosen to study the effect of the toxin on some parameters of the immune system and compare the severity of its effect when administered in Balb/C mice by two routes (oral and intraperitoneal). After LD50 determination by the two studied route in mice, a count of immunological, hematological parameters as well as an exploration of liver function and the oxidative status of the spleen has been made. Results showed a considerable increase in the rate of lymphocytes in batches treated with the MC-LR through i.p. and an important recruitment of granulocytes. This confirmed that the molecule has developed an adaptive response to eliminate toxin and prevent the harmful effects of inflammation on liver. This work confirmed that the microcystin induce a significant effect on immune cells when administered intraperitoneally.

**Keyword (s):** microcystin LR, immunotoxicity, oxidative stress, spleen, NSF, protein phosphatase, aminotransferases.

### ملخص

المكر وسيتينات عبارة عن سموم مستهدفة للكبد، منتجة من طرف البكتيريا الزرقاء الموجودة في المياه العذبة و يتدخلون في التسممات البشرية و الحيوانية.

الابتلاع هو الطريقة الأساسية للتعرض عند الانسان من ضمن 90 نوعية إلا ان المكر وسيتين LR النوعية الأكثر سمية و المعروف الأكثر.

لتشخيص الخطر عند الانسان تمنا باختبار دراسة تأثير السم على بعض خصائص الجهاز المناعي و مقارنة تأثيره عن طريق الحقن تحت الصفاق و أيضا عن طريق الابتلاع عند الفئران ذات السلالة BALB/C .

بعد تحديد الجرعة نصف القاتلة بالطريقتين تمت دراسة خصائص الجهاز المناعي و كذلك الخصائص الدموية , و أيضا الوظيفة الكبدية و الاجهاد التأكسدي على مستوى الطحال .

النتائج وضحت ارتفاع ملحوظ في عدد الخلايا الليمفاوية LT عند الفئران المجربة عن طريق الحقن تحت الصفاق و أيضا اكتئاب ملحوظ في عدد الخلايا المحببة.

و هذه الدراسة تؤكد أن المكر وسيتين له تأثير ملحوظ على الخلايا المناعية.

الكلمات المفتاحية : المكر وسيتين، علم التسمم المناعي، الاجهاد التأكسدي، الطحال، البروتينات، فوسفات.

# Résultats

Produced with ScantOPDF

### III. Résultats

#### 1. Effet du traitement par MC-LR sur les paramètres immunologiques

Tous les résultats concernant les paramètres immunologiques sont regroupés dans les figures (11 et 12). En effet l'étude statistique a révélé des différences significatives dans la plupart des paramètres étudiés et avec les trois comparaisons effectuées à savoir :

- Entre les témoins V.O et le groupe traités V.O.
- Entre le groupes témoins et le groupe qui a été traité par VIP.
- Entre les groupes traités par la toxine différemment (traités VO et traités VIP).

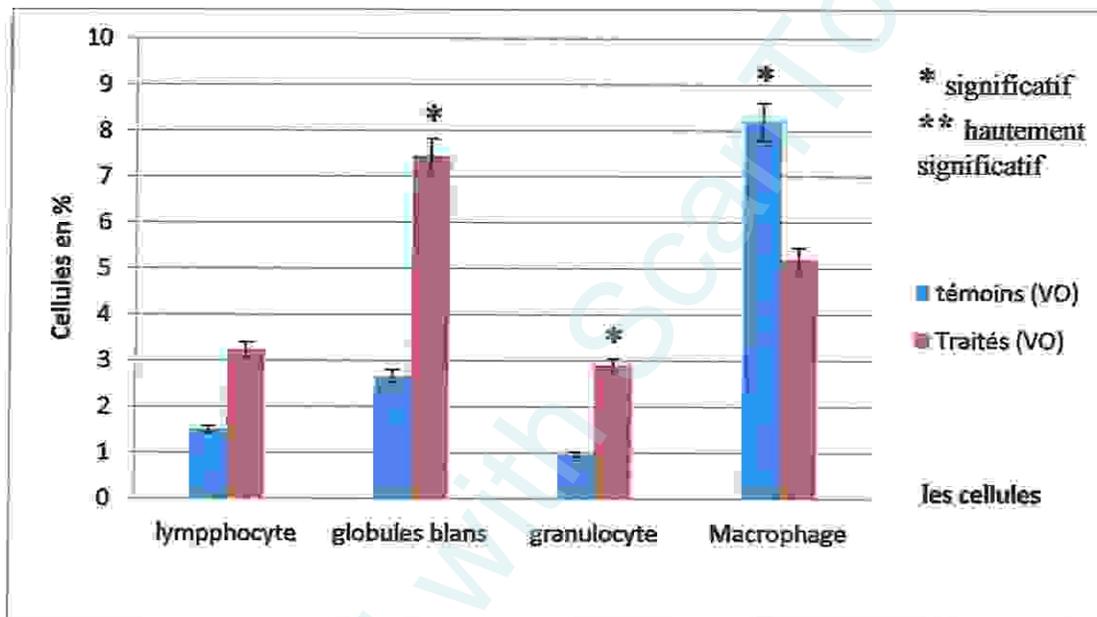


Figure 11. Variation des paramètres immunologiques chez les souris traitées par voie orale.

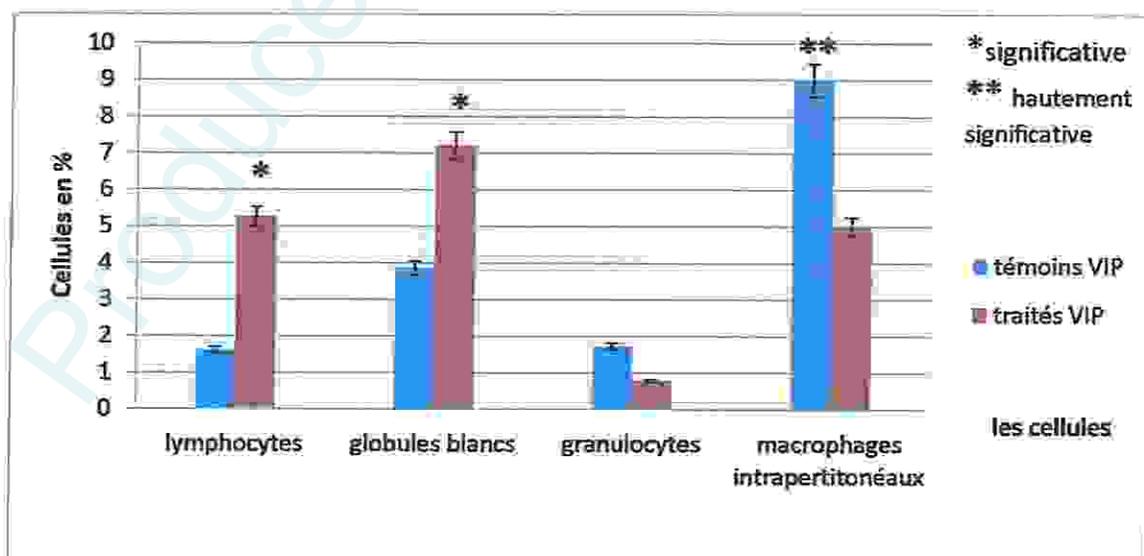


Figure 12. Variation des paramètres immunologiques chez les souris traitées par la voie intrapéritonéale.

## 2. Effet du traitement par MC-LR sur les paramètres hématologiques

Les figures (13-14) affichent les variations des paramètres hématologiques chez les 4 groupes qui font l'objet de cette étude.

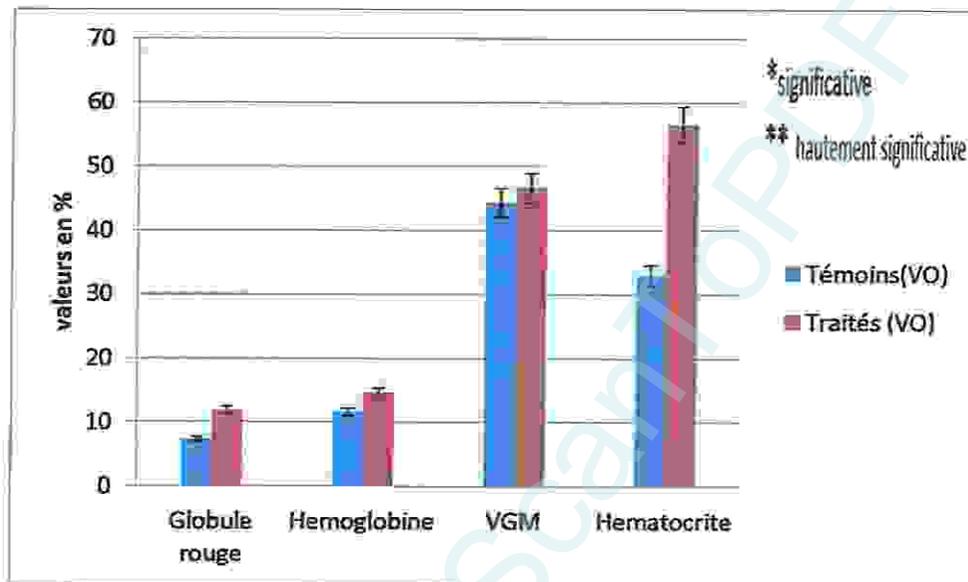


Figure 13. Variation des paramètres hématologiques chez les souris traitées par voie orale.

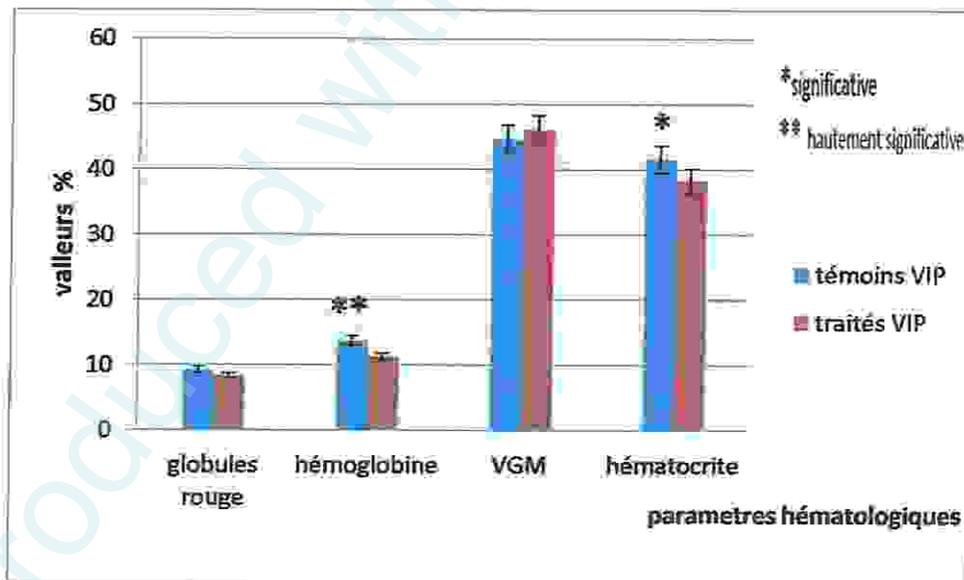


Figure 14. Variation des paramètres hématologique chez les souris traitées par voie intrapéritonéale.

### 3. Effet de la MC-LR sur les paramètres biochimiques

Les résultats de l'exploration biochimique : quantité enzymatique des transaminases et de la phosphatase alcaline sont regroupés dans les figures (15-16). La comparaison de l'activité enzymatique des transaminases a montré des différences significatives (voir figure et annexe).

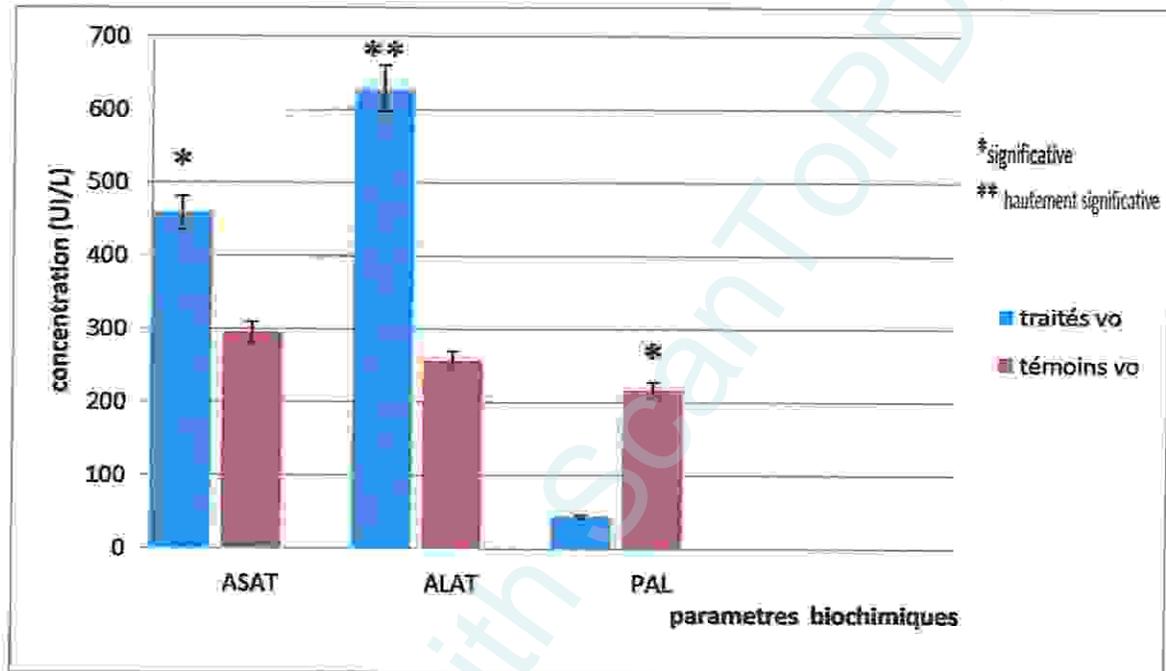


Figure 15. Variations des paramètres biochimiques chez les souris traitées par voie orale.

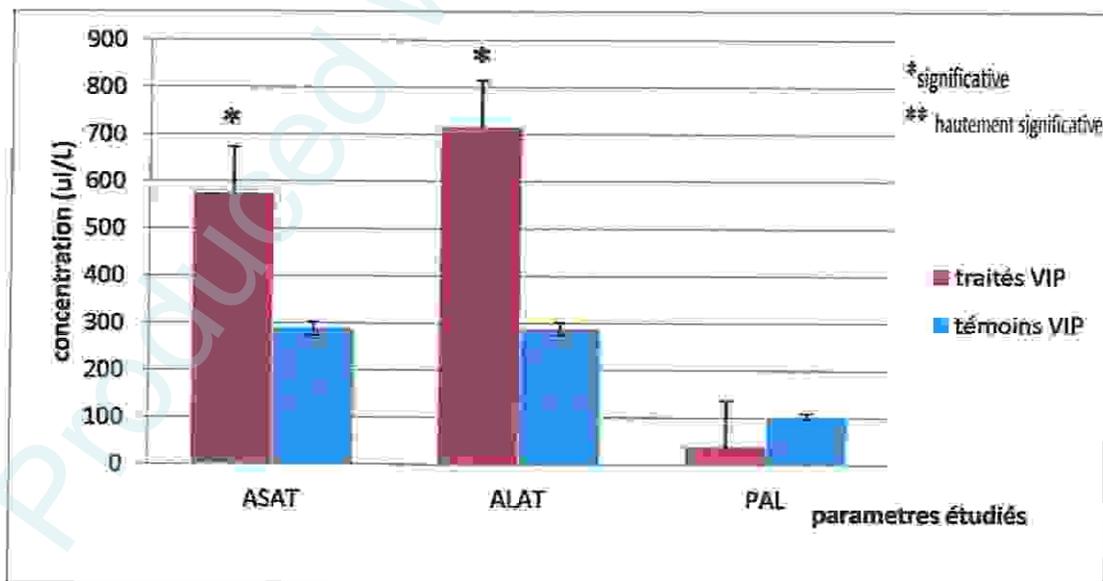


Figure 16. Variations des paramètres biochimiques chez les souris traitées par voie orale.

#### 4. Effet sur le poids relatif de la rate

Nous avons suivies l'évolution de poids relatif (PR) de la rate chez les souris témoins et les souris recevant des doses de microcystine LR par la voie orale et la voie intrapéritonéale et les résultats sont représentés dans la figure (17).

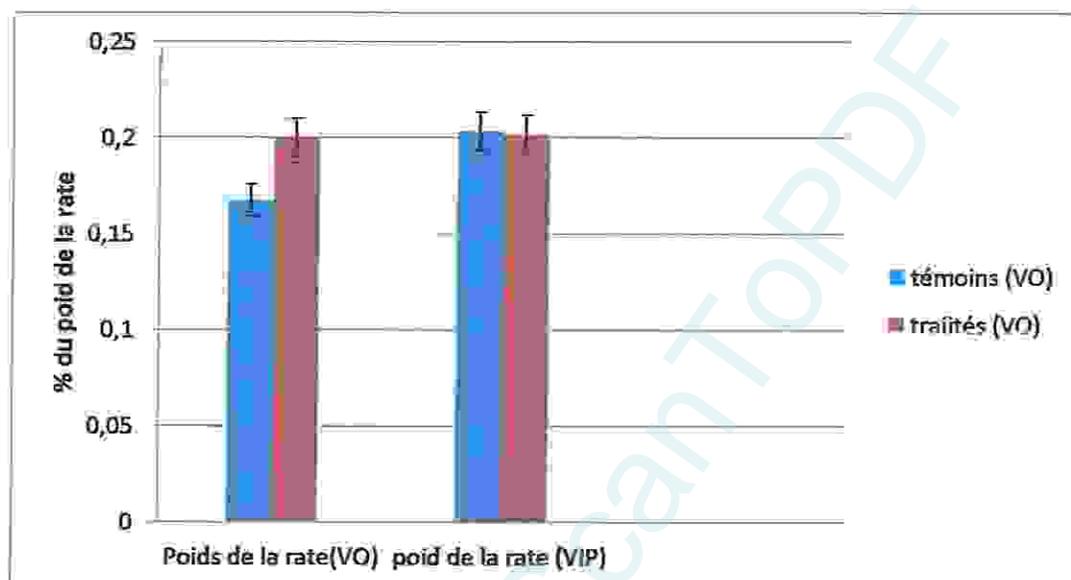


Figure 17. Variation du poids de la rate chez les souris traitées par voie orale et intrapéritonéale

#### 5. Effets sur les paramètres du stress oxydant

##### 5.1. Effet du traitement sur la concentration de MDA au niveau de la rate

Les résultats de l'effet de la microcystine administrés oralement et intrapéritonéalement sur le taux de MDA issue de la peroxydation lipidique au niveau de la rate de la souris sont représentés respectivement dans les figures (18).

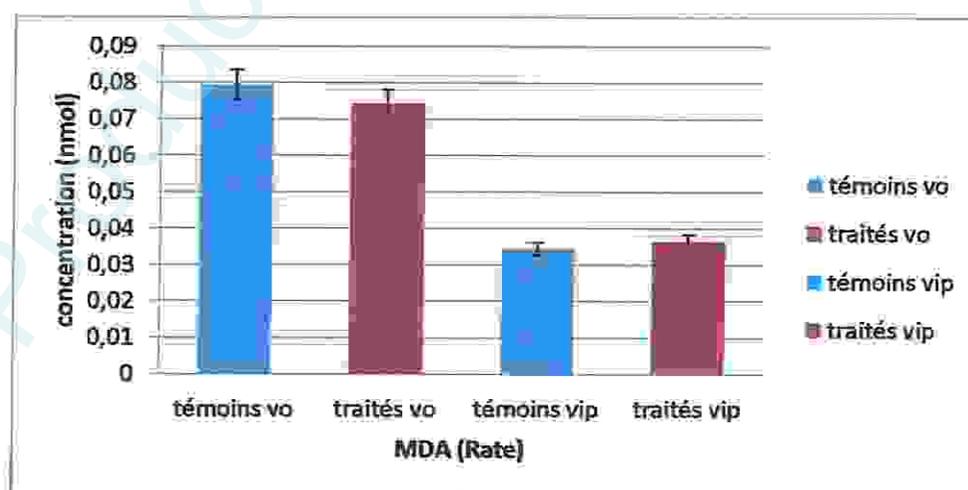


Figure 18. Variation de la concentration de MDA chez les souris traitées par la voie orale et la voie intrapéritonéale.

# Discussion

Produced with ScantOPDF

#### IV-Discussion

L'ingestion accidentelle d'eau contaminée ou le contact avec les eaux récréatives contaminées par les microcystines est considéré comme un problème de santé publique. L'induction des risques, en conséquence ce problème nécessite des études détaillées sur la toxicité aigüe par voie orale, cutanée ainsi que par d'autres voies.

L'analyse des résultats obtenus dans ce travail a montré que le traitement des souris par une dose semi-létale de la microcystine LR pendant 24h a provoqué une diminution importante des macrophages intrapéritonéaux, et une augmentation importantes des lymphocytes ; peu importe la voie d'administration. Les mêmes résultats ont été rapportées par une étude récente faite par l'équipe de Rymuszka et en 2007. Ces derniers ont étudié l'action de la microcystine sur des souris et ils ont remarqué une augmentation du nombre des lymphocytes, globules blancs et les granulocytes.

D'après ces résultats on peut dire que la microcystine a provoqué une réaction immunitaire justifiée par l'augmentation des cellules immunitaire sans dis que la diminution des macrophages intrapéritonéaux peut être expliqués par l'apoptose ; ce qui concorde aux résultats de McDermott et coll (1998). Cette équipe a porté une étude sur des patients volontaires exposés à la microcystine LR pendant 24H. les résultats obtenus laissent comprendre que les cellules polynucléaire ont subit une apoptose induite par la toxine d'où le recrutement accru des macrophages de la cavité intrapéritonéale vers les organes spécifique de la toxine. Ce recrutement est caractéristique d'une inflammation qui peut s'installer à la suite d'une réaction d'hypersensibilité.

Dans une étude similaire, Nakano et son équipe (1989) ont constaté une régulation de la production de cytokines, suggérant que cette toxine peut participer à la réponse inflammatoire. Ceci peut être aussi expliqué par l'inhibition de la production de NO. Cette molécule produite par un large éventail de cellules immunitaires, intervient dans la surveillance immunitaire, la modulation de la mort des cellules immunitaires (Brune *et al.*, 1998). La forte inhibition induite par

l'hépatotoxine sur la production du NO permettre à cette toxine de se soustraire à la défense de l'hôte et agit comme un immunosuppresseur (Kim *et al.*, 2001).

Concernant les paramètres hématologiques (globules rouges, hémoglobine, volume globulaire moyenne ainsi que l'hématocrite) on a pu constater qu'ils peuvent être des cibles de la toxine supplémentée par voie orale et intra péritonéale. La MC-LR peut facilement traverser la barrière intestinale vers le sang et peut entrer dans diverses cellules à travers les transporteurs de OATP (Zeller *et al.*, 2012). Les résultats de cette étude montrent une diminution accrue des globules rouges qui pourrait être expliqué par l'installation d'une anémie due à l'hypersensibilité de type II (Xianing *et al.*, 2013). Aussi, une diminution de l'hémoglobine chez les lots traités par la toxine par la voie intrapéritonéale. Ce qui nous conduit à déduire que la microcystine a un effet néfaste sur l'hémoglobine et l'hématocrite chez le lot traité par voie intraperitoneale plus que chez le lot traité par voie orale.

Les enzymes secrétées par le foie peuvent nous renseigner sur l'état lésionnel de cet organe. Ainsi, on a remarqué une importante inhibition de phosphatase alcaline sérique chez les souris qui ont oralement reçu DL50 de l'heptapeptide. Cette constatation est largement approuvée par une panoplie d'études mettant en évidence l'inhibition des protéines phosphatases par la chaîne latérale ADDA des microcystines (Yoshida *et al.*, 1998). Concernant les transaminases, enzymes ayant une activité métabolique importante à l'intérieur des cellules par leur capacité de transférer un groupement aminé (NH<sub>2</sub>) d'un acide aminé vers un acide  $\alpha$ -cétonique, leur augmentation reflète une lésion cellulaire en particulier au niveau hépatique, cardiaque, rénal ou musculaire. Ce qui est le cas dans cette étude, validant encore une fois l'effet hépatotoxique prononcé de la MC-LR (Dawson *et al.*, 1998).

En ce qui concerne les effets sur le poids relatif de la rate, la plupart des études se sont focalisées sur les organes suivants : foie, reins, cœur et intestins (Hermansky *et al.*, 1993). Selon les données de ce travail et peu importe la voie d'administration de la toxine, le poids relatif de la rate n'a révélé ni une augmentation ni une diminution. Donc, on pourrait supposé que la microcystine à une dose létale tuant 50% des animaux n'ait pas d'effets sur cet organe.

L'analyse des résultats concernant la peroxydation lipidique qui représente un marqueur clé du stress oxydant et qui sont déterminée par la mesure de la (MDA),

confirmerait la précédente conclusion. Le traitement statistiques qui a comparait les taux en MDA des rates des souris traitées par route orale et intrapéritonéale n'a révélé aucune s différences statistiques. Ce qui pourrait être argumenté par l'absence des récepteurs spécifiques (OATP) permettant la pénétration de la toxine à l'intérieur de la rate.

Produced with ScanTOPDF

# Conclusion

Produced with ScanTOPDF

## Conclusion

A l'issue de notre étude, nous pouvons conclure que la microcystine LR a provoqué une réponse immunitaire adaptative combinée à une inflammation délétère pour le foie caractérisé par l'augmentation des taux sériques des enzymes hépatiques. Ces effets immunotoxiques et hépatotoxiques ont été marquants dans les deux groupes de traitements (par voies orale et intrapéritonéale) avec un effet plus prononcé chez les souris intrapéritonéalement traitées par la toxine.

En fait, notre étude a révélé que la microcystine a favorisé une réponse adaptative accompagnée d'une réaction inflammatoire protectrice du foie et d'une anémie que nous avons expliqué par une réaction d'hypersensibilité de type II car certains auteurs ont confirmé que la toxine induit une anémie. Autrement dit, bien que le stimulus (la toxine) persiste, et provoque des dommages tissulaires qui sont souvent consécutifs à une réaction inflammatoire. Ceci nous amène à penser que la microcystine a un effet stimulant sur le système immunitaire impliqué dans une réaction inflammatoire.

Cette activité stimulatrice pourrait être due à sa capacité à induire la prolifération des lymphocytes qui peuvent être des lymphocytes B ou T. Les publications scientifiques ont rapporté que le traitement des souris avec une faible dose de microcystine provoque une réponse immunitaire humorale, tans dis que des forte dose provoque une apoptose. Il est donc souhaitable de procéder à des études plus approfondies afin de vérifier cette hypothèse.

Nous sommes néanmoins persuadés qu'en plus des effets hépatotoxique (augmentation de l'activité enzymatique des transaminases) et hématotoxique (anémie), l'étude mérite d'être poursuivie. Cela permettra sans doute de progresser un nouveau champ de connaissance sur les effets de la toxine sur les autres organes du système immunitaire.