



**HAL**  
open science

# Cyanotoxines et barrière intestinale humaine: Étude comparée de l'absorption et de la toxicité de deux variants de microcystine sur le modèle cellulaire Caco-2

Zeller Perrine

► **To cite this version:**

Zeller Perrine. Cyanotoxines et barrière intestinale humaine: Étude comparée de l'absorption et de la toxicité de deux variants de microcystine sur le modèle cellulaire Caco-2. Biologie cellulaire. Agrocampus - Ecole nationale supérieure d'agronomie de rennes, 2011. Français. NNT: . tel-00634649

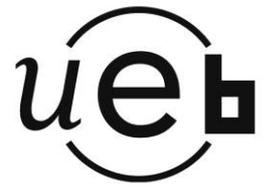
**HAL Id: tel-00634649**

**<https://theses.hal.science/tel-00634649>**

Submitted on 21 Oct 2011

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N° ordre : 2011-20

N° Série : I-62

## **THESE / AGROCAMPUS OUEST**

Sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne pour obtenir le diplôme de :

### **DOCTEUR DE L'INSTITUT SUPERIEUR DES SCIENCES AGRONOMIQUES, AGRO-ALIMENTAIRES, HORTICOLES ET DU PAYSAGE**

Spécialité biochimie - biologie moléculaire et cellulaire

**Ecole Doctorale : Vie-Agro-Santé**

présentée par :

**Perrine ZELLER**

### **Cyanotoxines et barrière intestinale humaine: Étude comparée de l'absorption et de la toxicité de deux variants de microcystine sur le modèle cellulaire Caco-2**

soutenue le 18 octobre 2011 devant la commission d'Examen

Composition du jury :	<b>Daniel Dietrich</b>	Rapporteur
	<i>Université de Constance, Allemagne</i>	
	<b>Monique Rousset</b>	Rapporteur
	<i>Centre de recherche des Cordeliers, Paris</i>	
	<b>Olivier Fardel</b>	Membre
	<i>IRSET, Rennes</i>	
	<b>Marc Edery</b>	Membre
	<i>Muséum national d'Histoire naturelle, Paris</i>	
	<b>Vincent Rioux</b>	Membre
	<i>Agrocampus Ouest, Rennes</i>	
	<b>Valérie Fessard</b>	Directeur de thèse
	<i>ANSES site de Fougères</i>	



**DOCTORAT AGROCAMPUS OUEST**

**NOM et PRENOM : ZELLER Perrine**

**TITRE DE LA THESE :**

**Cyanotoxines et barrière intestinale humaine: Étude comparée de  
l'absorption et de la toxicité de deux variants de microcystine sur le  
modèle cellulaire Caco-2**

Vu après soutenance pour autorisation de publication

Le Président de Jury

Le Directeur de thèse

Rennes, le

Le Directeur Général d'AGROCAMPUS OUEST

*Par délégation, le responsable de la  
Coordination des Formations Doctorales*

Professeur Hervé Le Bris



*A Hortense, Maximilien et Goulven,  
pour les promesses passées, présentes et futures*



Comme tout thésard qui se respecte j'ai pensé un certain nombre de fois à ce moment. Celui où certes j'aurai fini mais surtout où j'aurai l'occasion et le temps de remercier tous ceux qui ont aidé, soutenus ou aidé à la réalisation de cette thèse.

Maintenant, une seule crainte reste présente, celle d'oublier quelqu'un, chacun ayant été essentiel et irremplaçable.

Je souhaite tout d'abord remercier les rapporteurs de mes travaux de thèse, Daniel Dietrich et Monique Rousset qui ont consacré du temps et de l'énergie à évaluer le compte rendu de mes travaux. Merci à eux d'avoir pu être présents à ma soutenance malgré les à peu près causés par les aléas techniques. Je souhaite aussi remercier mes examinateurs Olivier Fardel et Marc Edery ainsi que Vincent Rioux qui a présidé ce jury. Merci à vous tous pour votre temps, votre intérêt et vos questions qui m'ont offert l'opportunité de discuter en profondeur la pertinence de mes travaux.

Merci aussi à tous les membres du site ANSES de Fougères. Merci à Pascal Sanders de m'avoir accueillie et soutenue dans son laboratoire. Merci à mes encadrants, à Valérie pour m'avoir forcée à dépasser mon manque de confiance en moi et à Antoine pour m'avoir confortée dans l'idée qu'il faut être exigeant en sciences. Merci à toute l'équipe de tox (au sens large) et plus particulièrement à Annick et Rachelle mes comparses en Caco-2. Merci à Karine, Adeline, Julie, Anne-Laure, Jérôme, Kevin, Sylvie, Martine et tous les autres pour avoir égayé les pauses café. J'ai aussi une pensée particulière pour Gérard et Natsuko, mes comparses de bureau avec qui j'ai partagé des heures si nombreuses !

Je tiens aussi à remercier Alexia, Hélène, Marie-Pierre, Lucie et Roselyne qui par leur gentillesse et leur efficacité ont facilité l'ensemble de mes déplacements et la gestion administrative. Un grand merci aussi à Mathilde, Nathalie et Catherine pour nos déjeuners à la cantine.

Au cours de ces travaux, j'ai passé pas mal de temps hors mur comme ont dit. Ainsi, j'ai eu la chance de collaborer avec Monique Clément à Nantes. Merci Monique pour ton accueil, ton expérience, dont tu m'as grandement fait profiter, et ton investissement dans mon travail malgré tout ce qui tu vivais à l'époque. Je te souhaite à nouveau une très bonne retraite que j' imagine déjà très active.

J'ai aussi été accueillie dans l'unité GVB du laboratoire ANSES de Ploufragan. J'y ai reçu un accueil chaleureux et constructif. Je veux dire un grand merci à Hélène Félix qui est une formatrice hors norme, qui sait parfaitement trouver l'équilibre entre soutien à la paillasse et autonomie nécessaire pour prendre en main de nouvelles techniques. Merci beaucoup Hélène, je ne peux pas imaginer que tes projets de formation ne soient pas couronnés de succès. Merci à Yannick Blanchard qui a toujours été de bon conseil pour la gestion de la planification de la thèse et sans qui jamais je n'aurais jamais réussi à valoriser ainsi les travaux de transcriptomique. Merci pour TOUTES tes critiques, franchement certains jours....j'aurais résumé ça par un « Grumpf », mais j'ai toujours eu conscience de la pertinence de celles-ci. Un grand merci pour ton exigence et pour avoir toujours cherché tirer le meilleur de ces résultats.

En pensant à Ploufragan j'ai aussi une petite pensée pour les membres de l'unité GVB présents ou passés avec une petite pensée particulière pour Aude et Antonin.

Enfin, je souhaite remercier l'ensemble du laboratoire de zootechnie d'Agrocampus Ouest. Merci à vous tous de m'avoir accueillie si simplement et chaleureusement pour mes derniers mois de thèse. Merci pour votre gentillesse, votre intérêt pour mon travail et votre aide dans la préparation de ma soutenance. Merci à vous tous et, je suis sûre que je ne suis pas la première, avec une pensée particulière pour Clara qui incarne ce que j'ai ressenti au sein de ces murs : gentillesse, disponibilité mais aussi sérieux et efficacité.

Il est aussi très important pour moi de remercier deux personnes sans qui jamais cette thèse ne se serait terminée ainsi. Il s'agit du Professeur Pierre-Guy Marnet et du docteur Pierre Blavy. Il est difficile pour moi de trouver les mots pour les remercier. Merci pour tout Pierre-Guy, pour tout le temps que vous avez dû me consacrer mais aussi pour votre soutien et la confiance que vous avez mise en moi au moment où j'en avais le plus besoin. Merci pour vos conseils, merci pour m'avoir poussée quand je n'avais plus la force, merci pour tant de choses encore.

Un autre acteur important de ces travaux a donc été Pierre Blavy qui au cours de déjeuners post marché des Lices ou de soirées a été d'une grande aide scientifique autant pour l'analyse des données, que la mise en place des stratégies ou que les longgggggggques discussions scientifiques que nous avons eu. Je ne sais pas lequel de nous deux est le plus têtu mais je suis certaine que sans toi ces travaux n'auraient pas été ce qu'ils sont.

Je ne serai pas originale en disant que la thèse ce n'est pas que de la science mais aussi une expérience de vie. C'est pour cela que je dois aussi remercier tous ceux qui ont été autour de moi pendant ces dernières années. Il y a ceux qui n'étaient pas loin Mathilde, Arzhel (et Arthwr ces derniers mois), Julie, Bertrand, Pierre, Yoze, Seb (et bien sûr son canapé rouge !), Alan (jamais là mais jamais loin), Laulau (qui lui est toujours là et jamais loin), chouquette et fanf. Concernant les deux derniers, je veux les remercier en particulier, oui, merci de m'avoir rappelé dans un moment particulièrement difficile qu'il n'y a pas que le travail dans la vie, merci pour ce rayon de lumière qu'est Goulven. Un grand merci à toute ma famille (et ça fait du monde) : mes parents et mes frères et sœurs toujours prêt à m'aider ET à me loger ! Un autre à tous ceux qui sont plus loin mais que je n'oublie pas pour autant : Hortense, Joey, Annabelle, Marion, Matthieu, Damien, Maud, Anne et ceux qui ne sont pas dans ma tête à l'instant mais qui sont là toujours prêts à ressurgir.

Enfin comme preuve du fait que la distance géographique ne compte pas, je veux remercier Maximilien qui bien qu'absent au début de cette aventure, m'a accompagnée jusqu'au bout de celle-ci. Il a été là tous les jours, m'a soutenue, fait rire et si jamais vous avez besoin d'un expert pour vous changer les idées je vous conseille de l'appeler car il a toujours réussi à me faire voir la beauté du monde. Merci à toi, merci pour tout...

## Résumé

Les microcystines (MCs), hépatotoxines produites par des cyanobactéries d'eau douce, sont incriminées dans des intoxications humaines et animales. L'ingestion est leur principale voie d'exposition chez l'homme. Parmi les quelques 90 variants décrits, la MC-LR constitue le variant le plus toxique et le mieux connu sur lequel est fondé l'évaluation du risque associé aux MCs. Afin de mieux caractériser le danger pour l'homme par ingestion, nous avons choisi d'étudier et de comparer l'absorption et la toxicité de deux variants, la MC-LR et la MC-RR, sur un modèle cellulaire intestinal humain, les Caco-2. Ces deux variants, de structure quasi identique, sont connus pour leur différence de toxicité aiguë. Nous avons montré que, contrairement aux cellules hépatiques, les Caco-2 absorbent les deux variants de manière similaire. De plus, nos travaux suggèrent l'existence d'un efflux actif de la MC-LR et de la MC-RR par les Caco-2. Enfin, une étude à l'échelle pangénomique a permis de mettre en évidence des différences de réponses cellulaires, avec des atteintes plus marquées de la MC-LR sur la réponse au stress oxydant, la régulation du cycle cellulaire, le stress du réticulum endoplasmique et la dégradation des protéines. Ainsi, les mécanismes de toxicité mis en jeu par les deux variants semblent diverger. Nos travaux soulignent donc la nécessité d'obtenir de données complémentaires sur d'autres variants que la MC-LR pour affiner l'évaluation du risque associé aux MCs.

**Mots-clés** : cyanotoxines, variants de microcystine, cellules intestinales, ADME, mécanismes de toxicité.

## Abstract

Microcystins (MCs), produced by freshwater cyanobacteria, are hepatotoxins involved in numerous cases of human and animal intoxications. Ingestion is the major pathway of human exposure. Among almost 90 variants described, MC-LR is the most frequent and the most toxic variant on which MCs risk assessment has been set up. In order to characterize the hazard for human ingestion, we chose to study and compare absorption and toxicity of two variant, MC-LR and MC-RR, on a human intestinal cell line (Caco-2). The two variants, even with are known for their difference in acute toxicity. . We showed that, on the contrary to hepatocytes, both variants were uptaken equally by Caco-2 cells. Moreover, our results suggest a active efflux of MCs from Caco-2 cells. Finally, comparing MC-LR and MC-RR toxicity at a pangenomic scale elicited dissimilarity in cell responses with a larger effect of MC-LR including on oxidative stress, cell cycle regulation, stress of the endoplasmic reticulum and protein degradation. So, differences on the mechanism of toxicity between both variants are suggested. Thereby, our work highlights the need of toxicity studies on other variants than MC-LR in order to improve MCs risk assessment.

**Keywords :** cyanotoxins, microcystin variants, intestinal cells, ADME, toxicity mechanism.

# Liste des abréviations

<b>aa</b>	acides aminés
<b>ADDA</b>	acide (2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-methoxy-2,6,8-triméthyl-10phényldeca-4,6-dienoïque
<b>ADME</b>	absorption distribution métabolisme excrétion
<b>AFSSA</b>	Agence française de sécurité sanitaire des aliments
<b>AFSSET</b>	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
<b>ANSES</b>	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
<b>Bax</b>	BCL2-associated X protein
<b>Bcl-X<sub>l</sub></b>	BCL2-like 1
<b>BI</b>	barrière intestinale
<b>Caco-2</b>	human caucasian colon carcinoma cell
<b>CI50</b>	concentration inhibitrice 50 (IC50)
<b>CIRC</b>	Centre international de Recherche sur le Cancer (IARC)
<b>Cyp3A4</b>	cytochrome P450 3A4
<b>DL50</b>	dose létale 50 (LD50)
<b>ERO</b>	espèce réactive de l'oxygène (ROS)
<b>GSH</b>	glutathion
<b>GST</b>	glutathion-s-transférase
<b>GS-X</b>	conjugué au glutathion
<b>ip</b>	intrapéritonéale
<b>IPA</b>	Ingenuity pathway analysis
<b>iv</b>	intraveineuse
<b>MC</b>	microcystine
<b>MC-Cys</b>	conjugué microcystine-cystéine
<b>MC-GSH</b>	conjugué microcystine-glutathion
<b>MC-LR</b>	microcystine LR (leucine et arginine)
<b>MC-RR</b>	microcystine LR (arginine et arginine)
<b>Mdha</b>	N-méthyl-déhydroalanine
<b>MDR1</b>	Gène codant pour la P-gp
<b>MRP</b>	multi resistances proteins
<b>MTT</b>	méthylthiazolyldiphényl-tétrazolium
<b>OATP</b>	organic anion transporter protein
<b>OMS</b>	organisation mondiale de la santé (WHO)

<b>P-gp</b>	P-glycoprotéine
<b>PPs</b>	protéines phosphatases à sérine thréonine
<b>RE</b>	réticulum endoplasmique
<b>SAM</b>	Significance analysis microarray
<b>SLCO</b>	gène codant pour les solute carrier organic anion transporter
<b>SRE</b>	stress du réticulum endoplasmique (ERS)
<b>SVF</b>	sérum de veau foetal (FCS)
<b>TC</b>	Taurocholate
<b>TPM</b>	transition de perméabilité mitochondriale

# Table des matières

Table des matières .....	10
Liste des figures .....	15
Liste des communications .....	18

## Introduction et Contexte Scientifique.....21

### 1. Les microcystines une problématique environnementale et de santé publique 25

1.1 Les microcystines des toxines de cyanobactéries.....	25
1.2 Les microcystines des molécules toxiques .....	35
1.3 Les microcystines un problème de santé publique.....	55

### 2. Microcystines et barrière intestinale.....65

2.1 La barrière intestinale est un organe clé de l'ADME.....	65
2.2 Les Caco-2 : un modèle de barrière intestinale .....	77
2.3 Absorption intestinale des microcystines .....	85

### 3. Comparaison de la toxicité de deux variants de microcystines : la MC-LR et la MC-RR.....91

3.1 La MC-LR et la MC-RR n'ont pas la même toxicité .....	91
3.2 La différence d'hépatotoxicité entre la MC-LR et la MC-RR est expliquée par une différence d'absorption par les hépatocytes.....	95

### 4. Conclusion.....96

## Objectifs.....99

## Matériel et Méthodes..... 103

### 1. Culture cellulaire et toxines .....105

1.1 Solubilisation et dosage des toxines.....	105
1.2 Entretien des cellules .....	106
1.3 Différenciation cellulaire.....	106

### 2. Toxicité des microcystines .....107

2.1 Test MTT de cytotoxicité .....	107
2.2 Effets de la MC-LR sur les gènes d'intérêts sélectionnés.....	109

<b>3. Imagerie cellulaire.....</b>	<b>110</b>
3.1 Culture cellulaire .....	110
3.2 Traitement des cellules.....	110
3.3 Mode opératoire des marquages.....	111
3.4 Imagerie .....	112
3.5 Traitement des données .....	112
<b>4. Étude transcriptomique .....</b>	<b>115</b>
4.1 Traitement des cellules.....	115
4.2 Mode opératoire de l'étude transcriptomique .....	115
4.3 Approche en pseudo mono-couleur.....	117
4.4 Traitement des données brutes .....	117
4.5 Analyses statistiques .....	118
4.6 Analyse ontologique .....	119

**Résultats ..... 121**

**Chapitre I : ÉTUDE DU SYSTEME D'ABSORPTION-METABOLISME-EXCRETION DES MICROCYSTINES CHEZ LES CACO-2..... 123**

<b>1. Introduction.....</b>	<b>125</b>
<b>2. Étude de la cytotoxicité des MCs sur le modèle Caco-2 .....</b>	<b>129</b>
<b>3. Étude de l'absorption des MCs par le modèle Caco-2.....</b>	<b>131</b>
<b>4. Étude exploratoire de l'effet de la MC-LR sur l'expression de gènes associé à la détoxification dans le modèle Caco-2.....</b>	<b>142</b>
<b>5. Discussion.....</b>	<b>145</b>
<b>6. Conclusion .....</b>	<b>152</b>

**Chapitre II : COMPARAISON DES EFFETS DE LA MC-LR ET DE LA MC-RR A L'ECHELLE TRANSCRIPTOMIQUE ..... 156**

<b>1. Introduction.....</b>	<b>158</b>
<b>2. Comparaison des effets de la MC-LR et de la MC-RR et effets sur la voie du stress oxydant : article 2 .....</b>	<b>159</b>
<b>3. Mise en évidence d'une différence de réponse entre la MC-LR et la MC-RR concernant la voie de dégradation des protéines- système ubiquitination/protéasome .....</b>	<b>192</b>

4. La MC-LR, et pas la MC-RR, modifie le niveau d'expression de biomarqueurs du stress du réticulum endoplasmique .....	195
5. Comparaison des effets de la MC-LR et de la MC-RR sur le niveau d'expression de gènes d'intérêts .....	195
6. Discussion .....	196
7. Conclusion.....	197
<b>Discussion générale .....</b>	<b>200</b>
1. La MC-LR et la MC-RR pénètrent dans les Caco-2 non différenciées et différenciées .....	202
2. L'absorption par les Caco-2 non différenciées et différenciées est-elle comparable ?.....	203
3. Causes possibles de la faible sensibilité des Caco-2 aux microcystines	204
4. L'absorption des variants est organe spécifique .....	205
5. La différence de toxicité entre MC-LR et MC-RR : une différence de mécanisme ?	206
<b>Conclusion.....</b>	<b>210</b>
<b>Perspectives.....</b>	<b>214</b>
1. Étude des transporteurs mis en jeu lors de l'absorption de la MC-LR et de la MC-RR chez les Caco-2.....	216
2. Étude des causes de la faible sensibilité des Caco-2 à la toxicité des MCs	217
3. Étude des différences de mécanismes de toxicité entre la MC-LR et la MC-RR	219
<b>Bibliographie.....</b>	<b>224</b>



# Liste des tableaux

Tableau 1 : Synthèse des études portant sur l'activité de promotion de tumeur et/ou de potentiel carcinogène de la MC-LR hépatique après ip d'après (IARC 2010) ..	42
Tableau 2 : Exemples d'approche réglementaires pour les microcystines et les cyanobactéries dans les eaux de boissons d'après le rapport du CIRC 2010 (IARC 2010).....	60
Tableau 3 : Valeurs guides et principales recommandations retenues pour différents pays (MC-LR : Microcystine LR ; MCs : sommes des microcystines) d'après (Levi et al 2006).....	62
Tableau 4 : Comparaison du niveau d'expression de gènes intervenant dans l'ADME entre les Caco-2 différenciées et l'intestin humain. ....	80
Tableau 5: Comparaison des effets de la MC-LR et de la MC-RR sur la PP1 et la PP2A .....	92
Tableau 6 : Liste des gènes sélectionnés pour l'étude en PCRq .....	108

## Liste des figures

Figure 1 : Schéma résumant les réponses écologiques et les impacts associés à la formation d'efflorescences de cyanobactéries dans les lacs, les rivières et les estuaires, d'après (Havens 2008) .....	28
Figure 2 : Schéma simplifié des voies de transfert des microcystines le long du réseau trophique aquatique et leur bioaccumulation dans les organismes aquatiques supérieurs d'après (Lance 2008).....	30
Figure 3 : Structure générale des microcystines, d'après (Kondo 2005) .....	34
Figure 4 : Structures de la MC-LR et de la MC-RR.....	34
Figure 5 : Effet de la MC-LR sur des cultures primaires d'hépatocytes de rat en suspension.....	36
Figure 6 : Système de phosphorylation/déphosphorylation des protéines au cours de la transduction d'un signal .....	44
Figure 7 : Schéma illustrant l'implication des PP dans la régulation de nombreux processus de la cellule eucaryote.....	46
Figure 8 : enchaînement des évènements lors de l'exposition d'hépatocytes de rat à la MC-LR .....	48
Figure 9 : Présentation schématique de la voie du stress du réticulum endoplasmique d'après (Wu and Kaufman 2006) .....	50
Figure 10 : Synthèse de l'état des connaissances sur les principales voies de toxicité cellulaire des microcystines .....	52
Figure 11 : Synthèse des différentes sources d'exposition aux MCs et des voies d'exposition associées chez l'Homme .....	58
Figure 12 : Schéma représentant les structures absorbantes de l'intestin grêle .....	66
Figure 13 : Passage de la barrière intestinale.....	68
Figure 14 : Schéma simplifié du métabolisme cellulaire.....	72
Figure 15 : Rôle des MRPs dans l'excrétion des xénobiotiques et la régulation du statut redox intracellulaire d'après (Toyoda, Hagiya et al. 2008) .....	74
Figure 16 : Caractéristiques morphologiques des Caco-2 différenciées en microscopie électronique d'après Yang et al 2007 .....	78
Figure 17 : Schéma représentant l'état des connaissances sur les mécanismes de passage de la barrière intestinale par les MCs .....	86

Figure 18 : Schéma descriptif du design de l'étude transcriptomique .....	114
Figure 19 : Cytotoxicité de la MC-LR sur des Caco-2 non différenciées exposées pendant 4h, 24h ou 48h.....	128
Figure 20 : Cytotoxicité de la MC-RR sur des Caco-2 non différenciées exposées pendant 24h.....	128
Figure 21 : Cytotoxicité de la MC-LR sur des Caco-2 différenciées exposées pendant 4h, 24h ou 48h.....	130
Figure 22 : Cytotoxicité de la MC-RR sur des Caco-2 différenciées exposées pendant 4h ou 24h. ....	130
Figure 23 : Effet de la MC-LR sur le niveau de transcription du gène SLCO 3A1.....	132
Figure 24 : Effet de la MC-LR sur le niveau de transcription du gène SLCO 4A1: .....	132
Figure 25 : Comparaison de l'absorption des MCs en fonction de la température et de la présence de compétiteur des transporteurs des sels biliaires. ....	139
Figure 26 : Effet de la MC-LR sur le niveau de transcription du gène CYP 3A4.....	141
Figure 27 : Effet de la MC-LR sur le niveau de transcription du gène GST $\alpha_1$ .....	141
Figure 28 : Effet de la MC-LR sur le niveau de transcription du gène MDR1 .....	143
Figure 29 : Effet de la MC-LR sur le niveau de transcription du gène MRP1 .....	143
Figure 30 : Hypothèses envisagées pour expliquer la dynamique des MCs dans les Caco-2 non différenciées à partir des résultats obtenus.....	149
Figure 31 : Modulation des gènes de la voie canonique d'ubiquitination/protéasome après une exposition à 10 $\mu$ M de MC-LR pendant 24h d'après IPA, en vert gènes down régulés, en rouge gènes up-régulés.....	194



# Liste des communications

## *Publications soumises*

**Similar uptake profiles of Microcystin-LR and -RR in an in vitro human intestinal model**, Zeller P., Clément M., Fessard V. soumis à Toxicology

**Transcriptomic comparison of cyanotoxin variants on a human intestinal model revealed major differences in oxidative stress response**, Zeller P., Felix H., Fessard V., Blanchard Y. soumis à Physiological Genomics

## *Communications affichées*

**Microcystin-LR and -RR difference in toxicity : an uptake hypothesis ?**, Zeller P., Clément M., Fessard V., International Conference on Toxic Cyanobacteria 8, Istanbul septembre 2010

**In vitro microcystin effect on intestinal epithelium expression of selected genes involved in biodisponibility**, Zeller P., Huguet A., Soumet C., Fessard V., 14th International Symposium Toxicology assessment, Metz septembre 2009

## ***Communications orales***

**Cyanotoxines et barrière intestinale : étude comparative de l'effet de deux variants de microcystine à l'aide d'un modèle cellulaire intestinal humain, Zeller P., Clément M., Blanchard Y., Fessard V., Réunion du Groupement d'intérêt scientifique Cyanobactéries Clermont-Ferrand janvier 2011 , Journée des doctorants de l'ANSES Paris janvier 2011**

**Étude in vitro du passage de la barrière intestinale par les cyanotoxines. Zeller P., Fessard V., Réunion du Groupement d'intérêt scientifique Cyanobactéries Sète janvier 2009**



# **Introduction et Contexte Scientifique**



Les cyanobactéries sont des organismes photosynthétiques unicellulaires qui se situent à la transition du phylum des bactéries et de celui des algues. Elles font partie des premiers êtres vivants à avoir peuplé la surface de la planète. Lorsque les conditions environnementales sont favorables, ces organismes sont capables de se multiplier à très grande vitesse formant alors des efflorescences aquatiques aussi appelées blooms. Les cyanobactéries produisent de nombreuses toxines dont certaines, comme les microcystines (MCs), sont dangereuses pour l'Homme (Chorus 2001). Les toxines de cyanobactéries (ou cyanotoxines) sont classiquement regroupées en fonction de leur toxicité en cytotoxines, dermatotoxines, hépatotoxines et neurotoxines. Elles ont été mises en cause dans de nombreux cas de mortalité des faunes sauvage et domestique. De plus, les hépatotoxines de la famille des microcystines (MCs) ont aussi été incriminées dans la mort de 76 personnes dialysées avec de l'eau contaminée à Caruaru au Brésil en 1996 (Carmichael 1996).

Les MCs sont des cyanotoxines couramment rencontrées dans les plans d'eau en France et dans le reste du monde. Ce sont des heptapeptides cycliques décrits comme inhibant les protéines phosphatases à sérine/thréonine (Eriksson et al 1990b; Honkanen et al 1990; MacKintosh et al 1990; Nishiwaki-Matsushima et al 1991; Toivola 1994). Cependant, le mécanisme associé à leur toxicité n'est pas entièrement élucidé. La famille des MCs regroupe près de 90 variants structuraux dont le plus courant, le plus toxique et le mieux étudié est la MC-LR.

Compte tenu du manque de données concernant les autres variants, seule la MC-LR a été classée par le Centre international de Recherche sur le Cancer (CIRC) dans le groupe 2B des cancérigènes potentiels (IARC 2006; 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  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  en équivalent MC-LR pour les eaux de consommation (WHO 1998; 2003).

En France, les conclusions du rapport EFFLOCYA (1998), initié par le ministère chargé de la santé et le ministère chargé de l'environnement, a mis en évidence que la prolifération des cyanobactéries dans les eaux de baignade ou dans les eaux brutes destinées à la production d'eau potable constituait un risque sanitaire émergent pour la population. Ces conclusions ont été renforcées en 2006 par les recommandations du rapport d'experts rendu par l'AFSSA et l'AFSSET (agences ayant fusionné au 1<sup>er</sup> juillet 2010 pour former l'Anses) et indiquant que les efflorescences de cyanobactéries représentent un risque pour les populations animales et humaines (Levi et al 2006). En effet, ces efflorescences sont favorisées par les activités anthropiques (enrichissement en azote, phosphore et matières organiques) et probablement par le réchauffement

climatique (Chorus 2001; de Figueiredo et al 2004; Markensten et al 2010; Paerl & Huisman 2008; Paul 2008). Ces constats mettent donc en avant une problématique écologique liée aux cyanobactéries mais aussi une problématique de santé publique.

Chez l'Homme, les sources d'exposition 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 & 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 systémique (Chen et al 2009a; Dahlem et al 1989; Falconer et al 1988; Fawell et al 1999; Ito et al 1997a; Ito et al 2000). Même si la barrière intestinale et les entérocytes sont particulièrement exposés suite à l'ingestion de MCs, peu d'études portent sur leurs effets au niveau intestinal.

Aujourd'hui, la toxicité aiguë de la MC-LR est bien caractérisée. Cependant, trop peu d'informations existent sur les mécanismes moléculaires de cette toxicité et pour évaluer correctement la toxicité chronique de l'ensemble des variants de MCs (Campos & Vasconcelos 2010).

Dans ce manuscrit nous présenterons tout d'abord un état des connaissances portant sur les MCs, leur toxicité et leurs effets connus sur la barrière intestinale. L'effet des MCs sur la barrière intestinale étant relativement peu décrit, et la mécanique d'absorption par l'intestin étant un élément crucial de leur toxicité à l'échelle de l'organisme, nous présenterons ensuite nos résultats portant sur l'absorption, le métabolisme et l'excrétion de deux variants, la MC-LR et la MC-RR, dans les cellules intestinales humaines Caco-2. Aucune différence notable d'absorption entre les deux variants n'ayant été observée, les résultats d'une étude transcriptomique comparant l'effet des deux variants sur ces cellules sur les mécanismes impliqués dans leur toxicité cellulaire seront ensuite présentés. Dans une dernière partie, nous discuterons ces résultats et proposerons de nouvelles pistes de recherche relatives aux mécanismes d'absorption intestinale des MCs et aux sources des différences de toxicité de la MC-LR et de la MC-RR.

# **1. Les microcystines une problématique environnementale et de santé publique**

## **1.1 Les microcystines des toxines de cyanobactéries**

### **1.1.1 Les cyanobactéries : des organismes photosynthétiques**

Les cyanobactéries constituent un groupe taxonomique à part entière qui regroupe des micro-organismes procaryotes capables de photosynthèse, existant sous forme unicellulaire ou de colonies (Chorus & Bartram 1999). Ces organismes sont communément appelés algues bleues ou cyanophycées à cause de leurs pigments photosynthétiques qui donnent à la plupart une teinte bleutée. Les cyanobactéries ont joué un rôle majeur dans l'histoire de notre planète. En effet, depuis leur apparition il y a environ 3,5 milliards d'années, elles auraient largement contribué à l'enrichissement massif de l'atmosphère terrestre en oxygène grâce à leur capacité photosynthétique. Ainsi elles auraient permis le phénomène appelé la « Grande oxydation » sur Terre, il y a 2,7 milliards d'années (Whitton & Potts 2000).

### **1.1.2 Les cyanobactéries : des organismes ubiquistes**

Les cyanobactéries présentent une plasticité écologique exceptionnelle. Elles sont en effet capables de coloniser des milieux variés voire hostiles et de s'y développer. Ainsi, elles ont été isolées aussi bien au niveau de sources géothermiques comme celle de l'Octopus Spring mat dans le parc national de Yellowstone aux Etats-Unis (Ward et al 1998) que dans le sol du désert d'Atacama au Chili (Wierzchos et al 2011) ou sous plusieurs mètres de glace dans le Canada arctique (Jungblut et al 2010). Elles colonisent les milieux aquatiques marins, saumâtres et continentaux sous forme planctonique ou benthique selon les espèces (Whitton & Potts 2000). En outre, les formes libres sont aussi capables de former des symbioses avec, par exemple, des champignons (lichens).

### **1.1.3 La formation d'efflorescences de cyanobactéries**

Lorsque les conditions environnementales (température, intensité lumineuse, pH, apports nutritionnels ou encore turbulence du plan d'eau) sont favorables, la population de cyanobactéries se multiplie plus rapidement, leur temps de doublement diminuant jusqu'à ne plus être que de quelques heures. Ainsi l'explosion de leur taux de croissance conduit au phénomène appelé efflorescence ou bloom (Chorus & Bartram 1999) qui se développe le plus souvent en surface et dure généralement quelques jours voire quelques semaines (Levi et al 2006). Les cyanobactéries peuvent alors former une écume recouvrant la surface de l'eau. Bien que ces efflorescences puissent apparaître dans un écosystème préservé, elles sont favorisées par les activités anthropiques participant à l'eutrophisation des eaux (enrichissement en azote, phosphore et matières organiques). Certains auteurs suggèrent aussi que le développement des efflorescences de cyanobactéries est aussi favorisé par l'augmentation de la température des eaux de surface provoquée localement par le changement climatique. En effet, il a été montré que l'augmentation de la température donnait un avantage écologique aux cyanobactéries face aux autres organismes phytoplanctoniques comme les diatomées (de Figueiredo et al 2004; Markensten et al 2010; Paerl & Huisman 2008; Paul 2008).

Ainsi, l'augmentation de l'eutrophisation des milieux due aux activités humaines ainsi que l'augmentation des températures due au réchauffement de la planète risquent d'augmenter la fréquence et l'intensité des efflorescences de cyanobactéries.

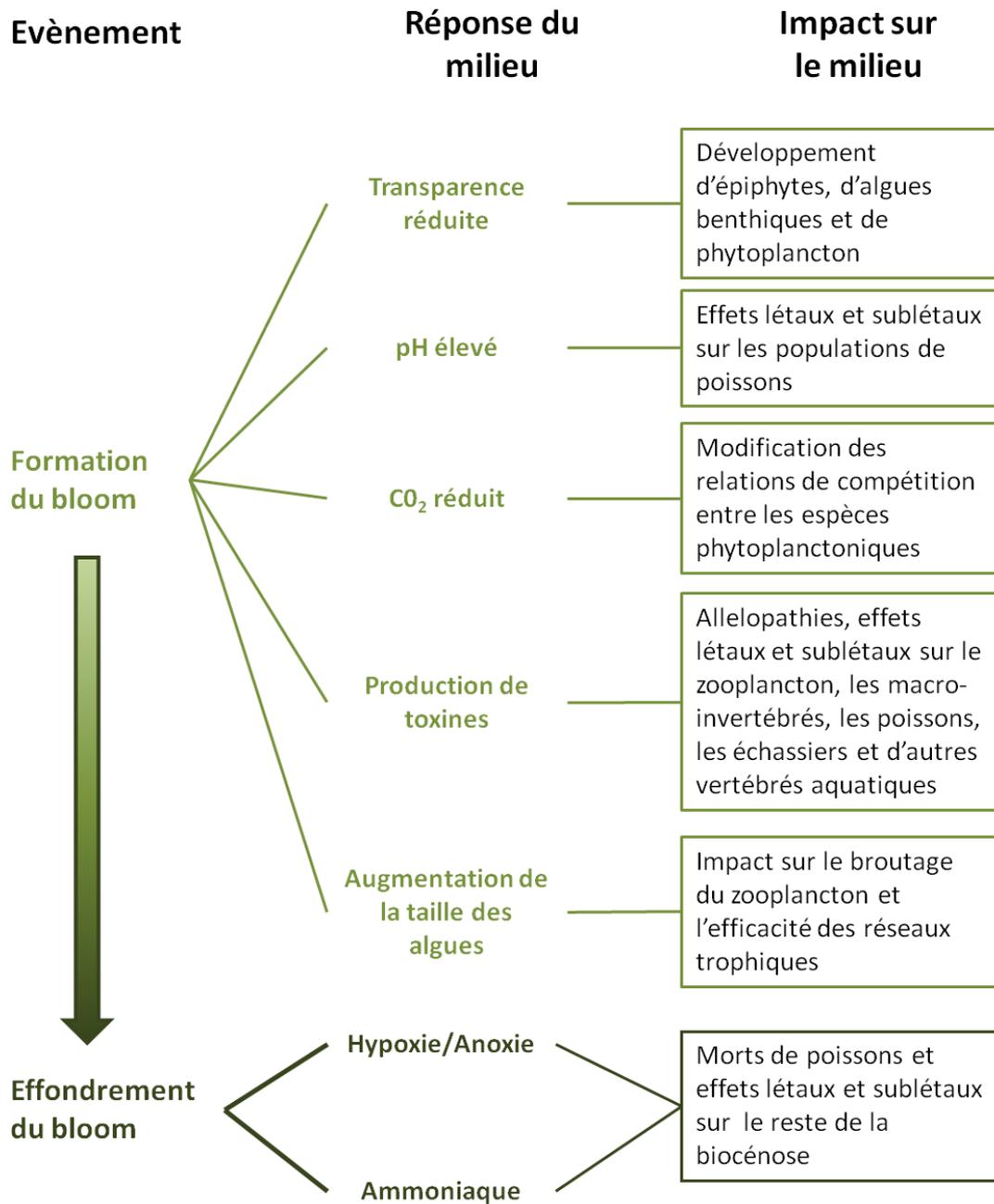
### **1.1.4 Les cyanobactéries : des organismes toxinogènes**

Au sein de la famille des cyanobactéries, plus de 60 espèces sont potentiellement toxiques (Levi et al 2006). Par ailleurs, ces espèces toxiques ne produisent pas obligatoirement un seul type de toxine et inversement une toxine peut être produite par différentes espèces. De plus, toutes les souches d'une espèce de cyanobactérie ne sont pas productrices de toxines. Ces toxines de cyanobactéries, ou cyanotoxines, ont été historiquement classifiées en quatre grands groupes en fonction de leurs organes cibles chez les mammifères : cytotoxines, dermatotoxines, hépatotoxines et neurotoxines (Chorus & Bartram 1999).

Parmi les hépatotoxines, les microcystines sont les plus communément rencontrées dans les plans d'eau, en particulier en France. Les genres *Microcystis*,

*Anabaena*, *Plankthotrix* (*Oscillatoria*), *Nostoc*, *Hapalosiphon* ou *Anabaenopsis* sont répertoriés comme producteurs potentiels de ces toxines (Chorus & Bartram 1999). Les MCs sont des heptapeptides cycliques dont la synthèse est non ribosomale et directement liée à la présence du cluster de gènes *mcy* (microcystin biosynthesis) dans le génome des cyanobactéries (Dittmann & Börner 2005). Lors d'une efflorescence de cyanobactéries produisant des MCs, la concentration de ces dernières dans l'eau n'augmente fortement qu'à la fin du phénomène. En effet, au cours de la phase de croissance du bloom, les toxines sont essentiellement intracellulaires et c'est seulement à la fin de celui-ci que les toxines sont libérées lors de la lyse cellulaire (Jones & Orr 1994; Park 2008; van Apeldoorn et al 2007; Westrick et al 2010).

Les microcystines ne sont pas des molécules nécessaires au métabolisme primaire des cyanobactéries. Elles sont donc référencées comme des métabolites secondaires (Carmichael 1992). Cependant, leur fonction biologique reste floue. La principale hypothèse consiste à considérer que la toxinogénèse des cyanobactéries augmenterait leur compétitivité dans le milieu. Selon celle-ci, les toxines limiteraient le développement d'autres organismes, ce qui offrirait aux cyanobactéries un meilleur accès aux ressources (Codd 1995). Une autre hypothèse classiquement envisagée correspond à donner aux MCs un rôle de régulateur des fonctions métaboliques des cyanobactéries (Jahnichen et al 2007; Lyck 2004; Rapala et al 2002).



**Figure 1 : Schéma résumant les réponses écologiques et les impacts associés à la formation d'efflorescences de cyanobactéries dans les lacs, les rivières et les estuaires, d'après (Havens 2008)**

## **1.1.5 Les efflorescences de cyanobactéries : problématique écologique**

### *1.1.5.1 Problématique associée à la biomasse produite lors des efflorescences*

Le développement d'efflorescences de cyanobactéries met en péril l'équilibre des écosystèmes aquatiques continentaux (lacs, rivières, estuaires) par leur toxicité mais aussi par l'importance de la biomasse produite. En effet, la décomposition de celle-ci favorise la croissance de bactéries hétérotrophes. Ces dernières consomment l'oxygène dissous dans l'eau provoquant alors l'anoxie du milieu. Les principaux effets de l'eutrophisation des milieux et de la toxicité des cyanobactéries sont synthétisés dans le schéma de la **Figure 1**.

### *1.1.5.2 Les cyanotoxines sont responsables de mortalités animales*

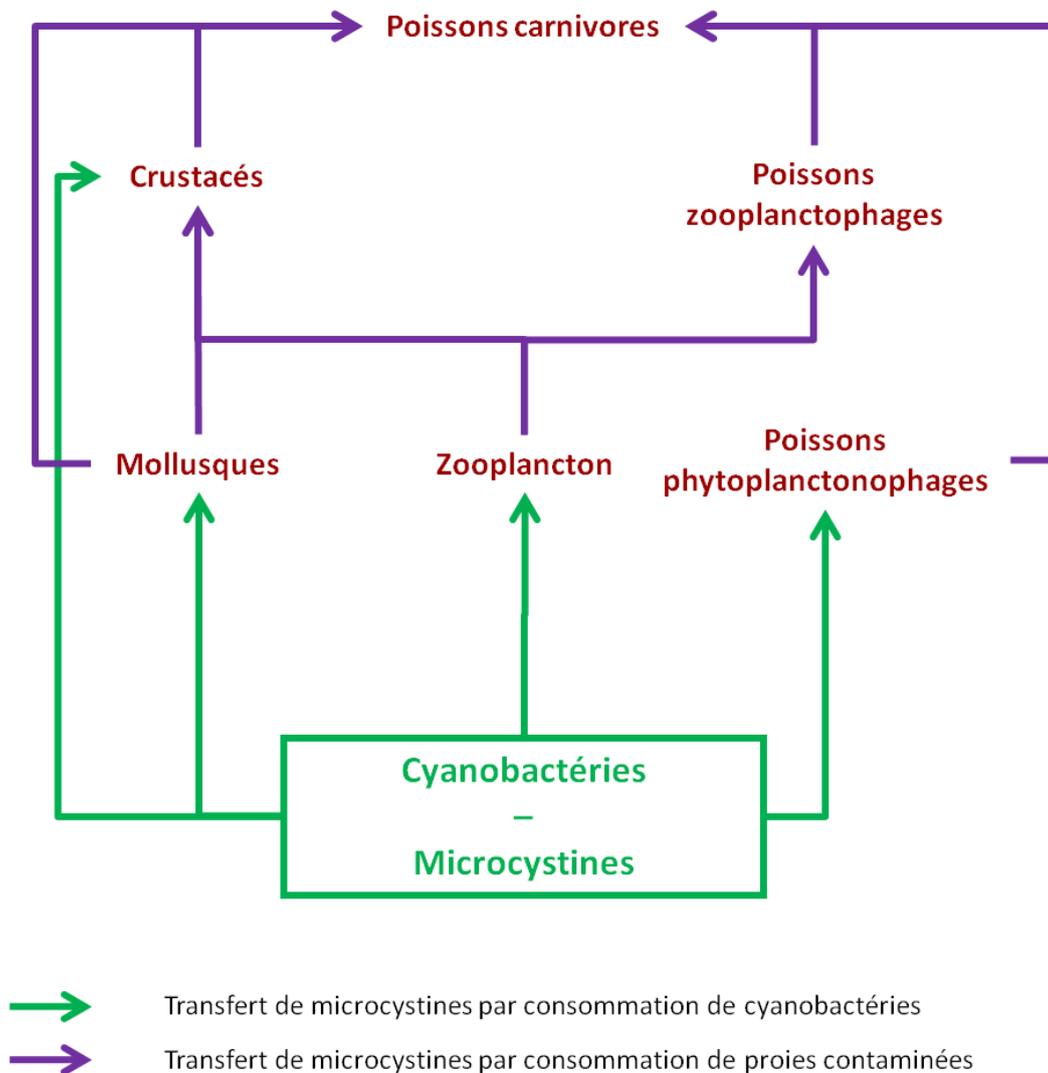
Les cyanotoxines ont été mises en cause dans des mortalités de la faune sauvage. Ces mortalités sont bien documentées en ce qui concerne les animaux terrestres (singes, visons, moufettes, rhinocéros) et aquatiques des milieux continentaux (flamands roses, poissons...) (Briand et al 2003; Chen et al 2009b; Levi et al 2006).

Récemment l'incidence de la toxicité des cyanotoxines et plus particulièrement des microcystines a été élargie au milieu marin, celles-ci ayant été mises en cause dans la mortalité de mammifères marins (Miller et al 2010). Les animaux domestiques sont aussi victimes des toxines de cyanobactéries. En effet dès la fin du XIXe siècle, Francis *et al* rapportaient une intoxication mortelle d'animaux domestiques (van Apeldoorn et al 2007). Depuis, de nombreux cas d'intoxications aiguës affectant des animaux domestiques (bovins, ovins, chevaux, porcs, chiens...) ont été décrits sur tous les continents (pour revue (Chorus & Bartram 1999, Briand *et al.* 2003)).

## **1.1.6 Les microcystines sont persistantes dans les écosystèmes aquatiques**

### *1.1.6.1 Les microcystines sont très stables dans l'eau*

En l'absence de ces conditions spécifiques, les MCs libérées dans le milieu aquatique sont connues pour être très stables dans l'eau et chimiquement très résistantes. Ainsi ni l'hydrolyse chimique, ni l'oxydation à pH neutre ou l'ébullition ne modifie leur toxicité. Il a aussi été constaté que, dans les échantillons naturels conservés



**Figure 2 : Schéma simplifié des voies de transfert des microcystines le long du réseau trophique aquatique et leur bioaccumulation dans les organismes aquatiques supérieurs d'après (Lance 2008)**

à l'obscurité, la stabilité des microcystines s'étendait sur plusieurs mois voire sur des années (Chorus & Bartram 1999; Harada et al 1996)

#### *1.1.6.2 Elimination des microcystines*

Néanmoins, il existe trois mécanismes permettant de limiter la disponibilité et/ou la toxicité des MCs présentes dans le milieu : leur adsorption, leur dégradation par des mécanismes physico-chimiques ou par des bactéries (van Apeldoorn et al 2007; Zurawell et al 2005).

En effet, les MCs peuvent être adsorbées sur les particules en suspension qui peuvent ensuite sédimenter. Ce phénomène est particulièrement efficace avec les particules fines qui restent en suspension de manière durable (Morris et al 2000). Les radiations ultraviolettes peuvent aussi induire la décomposition des MCs en particulier lorsque leur longueur d'onde atteint le maximum d'absorption des MCs ( $\lambda=237$  nm) (Wörmer et al 2010; Zurawell et al 2005).

Enfin, de nombreuses bactéries présentes dans les écosystèmes aquatiques continentaux possèdent la machinerie enzymatique nécessaire pour dégrader les MCs (van Apeldoorn et al 2007; Zurawell et al 2005). Cette machinerie est constituée de protéases, dont la microcystinase, codées par le cluster de gènes *mlrA*, *mlrB*, *mlrC* et *mlrD* (Bourne et al 1996; Bourne et al 2001). Cette biodégradation peut atteindre un taux de  $5,4 \text{ mg.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$  pour la MC-LR et même  $13 \text{ mg.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$  si les conditions sont optimales (Park et al 2001). C'est le mécanisme d'élimination naturelle le plus efficace aussi bien dans l'eau que dans les sédiments. Il suit deux phases, la première durant quelques jours au cours desquels plus de 90 % des toxines extracellulaires sont décomposées puis une seconde plus lente pouvant s'étendre sur plusieurs semaines (Grützmacher et al 2010; Zurawell et al 2006).

#### *1.1.6.3 Bioaccumulation*

Les cyanobactéries toxiques peuvent être broutées par les organismes herbivores. De même, les organismes carnivores peuvent consommer des proies contaminées (pour revue (Martins & Vasconcelos 2009)). Ainsi, il a été décrit que les MCs pouvaient s'accumuler le long des chaînes trophiques comme l'illustre la **Figure 2**. En plus du transfert des toxines par la voie trophique, les organismes peuvent être contaminés par exposition tégumentaire ou branchiale avec les microcystines dissoutes dans l'eau. Au delà de la perturbation écologique, la contamination des réseaux trophiques est un problème de santé publique. En effet, les MCs peuvent s'accumuler non seulement dans le foie mais aussi dans les muscle des poissons (Ibelings & Chorus 2007; Magalhaes et al

2003). Ce phénomène révèle donc que la problématique des microcystines est non seulement associée aux efflorescences mais aussi à la durabilité de ces toxines dans les écosystèmes sous forme dissoute ou accumulée au sein des organismes.

**❖ *Les cyanobactéries sont des organismes présents dans la plupart des écosystèmes aquatiques.***

**❖ *Les cyanobactéries peuvent produire des toxines dont les microcystines (MCs).***

**❖ *Les cyanobactéries et leurs toxines sont responsables de perturbation des écosystèmes.***

**❖ *Les MCs sont responsables de la mortalité d'animaux sauvages et domestiques.***

**❖ *Les MCs sont stables dans l'eau et peuvent être bioaccumulées par la faune aquatique.***

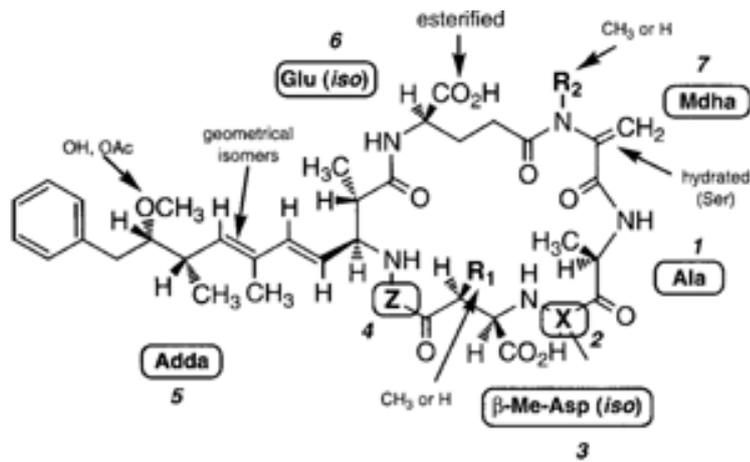


Figure 3 : Structure générale des microcystines, d'après (Kondo 2005)

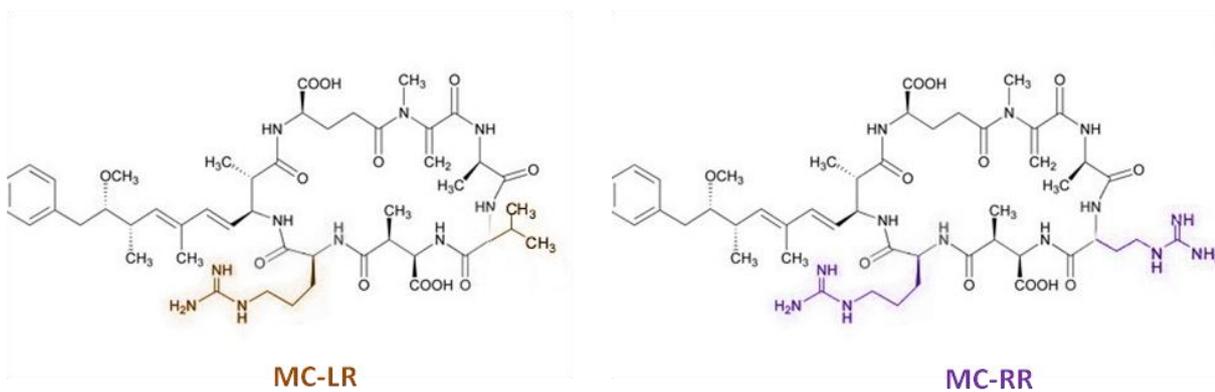


Figure 4 : Structures de la MC-LR et de la MC-RR

Les acides aminés variables sont représentés respectivement en marron et en violet

## 1.2 Les microcystines des molécules toxiques

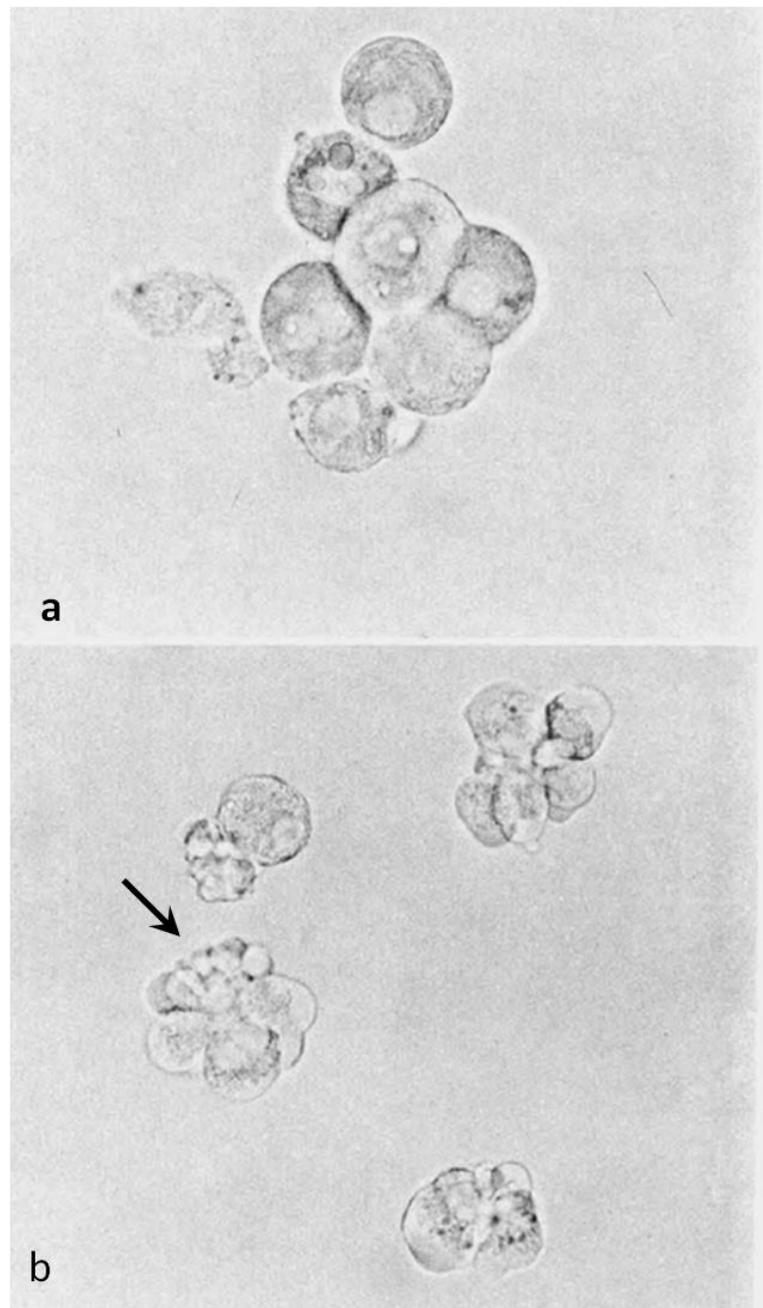
### 1.2.1 Structure chimique

Les microcystines sont des hépatotoxines dont le nom provient de la cyanobactérie *Microcystis aeruginosa* à partir de laquelle elles ont été extraites et identifiées pour la première fois (Carmichael et al 1988). Ce sont des molécules constituées de 7 acides aminés qui forment une structure cyclique (**cf. Figure 3**). Deux de ces acides aminés, le Mdha (N-méthyl-déhydroalanine) et l'ADDA (acide (2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-methoxy-2,6,8-triméthyl-10phényldeca-4,6-dienoïque), sont peu courants et sont impliqués dans la toxicité des MCs (**cf. introduction paragraphe 1.2.5**). La structure générale des MCs est donc : cyclo-(D-alanine<sup>1</sup>-X<sup>2</sup>-D-MeAsp<sup>3</sup>-Z<sup>4</sup>-AddA<sup>5</sup>-D-glutamate<sup>6</sup>-Mdha<sup>7</sup>) où X et Z sont des acides aminés variables. Ces deux acides aminés variables sont la source de nombreux variants structuraux dont près de 90 ont été identifiés à ce jour (Welker & Von Döhren 2006).

Nous avons circonscrit notre travail à l'étude et à la comparaison de deux de ces variants : la MC-LR et la MC-RR. Les deux possèdent une arginine en position Z. Par contre, la MC-LR possède une leucine en position X alors que la MC-RR présente une arginine (**cf. Figure 4**). La MC-LR est le variant le plus courant, le plus toxique, le plus étudié et donc le mieux connu aujourd'hui (IARC 2010). Malgré la forte similarité structurale entre ces deux variants, des différences de toxicité ont été rapportées (**cf. introduction paragraphe 3.1**).

### 1.2.2 Le foie, principale cible des MCs

De nombreux organes sont touchés par les MCs : le foie, les reins, les poumons, le cerveau ou les intestins (Falconer et al 1994; Hooser et al 1990; Ito et al 2000; Ito et al 2001b). Cependant la toxicité hépatique est principalement responsable de la mortalité induite par ces toxines.



**Figure 5 : Effet de la MC-LR sur des cultures primaires d'hépatocytes de rat en suspension : formation de bourgeonnements (flèche). d'après (Hooser et al 1991)**

a) Contrôle, b) après 30 min d'exposition à 10  $\mu$ M de MC-LR

### 1.2.2.1 Hépatotoxicité des microcystines

L'hépatotoxicité aiguë des microcystines a été maintes fois décrite depuis les années 80. Ces descriptions ont été réalisées *in vivo* sur souris après injection intrapéritonéale (ip) (Chen et al 2006b; Hermansky et al 1993), injection intratrachéale (Ito et al 2001a) ou après gavage (Fawell et al 1999; Yoshida et al 1997). Cette toxicité a aussi été étudiée *ex vivo*, sur foies perfusés de rats (Pace et al 1991a; Wickstrom et al 1996) et *in vitro* sur cultures primaires d'hépatocytes de mammifères (homme ou rongeurs) (Batista et al 2003; Ding et al 2001a; Khan et al 1995; Khan et al 1996).

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

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

- les mitochondries s'agrègent, se dilatent et présentent des crêtes et des cryptes mitochondriales plus développées que la normale (Hermansky et al 1993; Khan et al 1995; Miura et al 1989; Wickstrom et al 1996).

- le réticulum endoplasmique se dilate et prend une forme spiralée (Hermansky et al 1993; Khan et al 1995; Li et al 2001; Miura et al 1989; Wickstrom et al 1996).

De plus, une déplétion en glycogène est généralement constatée et de nombreux noyaux deviennent apoptotiques. Les hépatocytes meurent fréquemment après la formation de bourgeonnements de leur membrane cytoplasmique (« blebbing ») (Hermansky et al 1993; Hermansky et al 1990b; Khan et al 1995; Li et al 2001; Miura et al 1989; Wickstrom et al 1996; Wickstrom et al 1995) (**cf. Figure 5**).

### 1.2.2.2 Organotropisme des microcystines, une histoire de transporteurs

La MC-LR est décrite comme une hépatotoxine directe potentielle induisant une mort rapide causée par un choc hémorragique découlant d'une nécrose hépatique et d'un collapsus du parenchyme hépatique (Theiss et al 1988). Cet organotropisme des MCs a été confirmé par l'emploi de dihydromicrocystine-LR marquée au tritium lors d'études de cinétique (Meriluoto et al 1990; Robinson et al 1989). En effet 56 à 84 % de la toxine marquée est retrouvée dans le foie selon les espèces (Cazenave et al 2005; Robinson et

al 1991; Wang et al 2008). Au début des années 80, Runnegar *et al.* suggèrent que l'absorption des MCs par les hépatocytes de rat en culture primaire dépend du système de transport des sels biliaires par les transporteurs OATPs (« organic anion transport protein », **cf. introduction paragraphe 1.2.3.2**) (Runnegar et al 1981). Cette hypothèse est renforcée par les travaux d'Ericksson *et al.* (1990). En effet, l'incubation avec des sels biliaires (cholate et taurocholate) ou des inhibiteurs de ces transporteurs (antamanide, sulfobromophthaleine et rifampicine) induit une inhibition de l'absorption des MCs dans les hépatocytes de rat (Eriksson et al 1990a). De plus, sur culture primaire d'hépatocytes de souris, cette baisse de l'absorption de MCs en présence d'inhibiteur du transport des sels biliaires induit également une baisse de l'inhibition des protéines phosphatases à sérine/thréonine (Runnegar et al 1995a), ces protéines étant des cibles des MCs (**cf. introduction paragraphe 1.2.5**).

L'hypothèse selon laquelle les OATPs jouent un rôle dans le transport des MCs a aussi été confortée *in vivo*. En effet, les souris exposées par injection intrapéritonéale à une dose aiguë de MC-LR, présentent des foies où seuls les hépatocytes, cellules qui expriment des OATPs, semblent touchés par la toxicité, à la différence des cellules endothéliales, qui n'expriment pas d'OATPs (Hermansky et al 1993). De plus, la co-incubation avec des compétiteurs des transporteurs de sels biliaires, comme la cyclosporine A ou la rifampicine protège les souris des effets hépatotoxiques de la MC-LR (Hermansky et al 1990a; Hermansky et al 1990c). Cependant, aucune de ces études ne permet d'identifier les isoformes impliquées dans le transport des MCs.

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

### 1.2.3 D'autres organes sont touchés par la toxicité des microcystines

Cependant, le foie n'est pas le seul organe à être touché par la toxicité des microcystines. En effet, les toxines ont été détectées dans de nombreux organes tels que le cerveau, les reins, le poumon, les testicules ou les intestins après exposition par différentes voies d'administration (iv, ip, injection intratrachéale ou voie orale) (Cazenave et al 2005; Falconer et al 1994; Hooser et al 1990; Ito et al 2000; Ito et al 2001a; Robinson et al 1991). Cependant la proportion de MCs retrouvées dans ces organes est souvent marginale par rapport à celle retrouvée dans le foie (Cazenave et al 2005; Robinson et al 1991; Wang et al 2008).

#### 1.2.3.1 Neurotoxicité

Suite à l'accident de Caruaru au Brésil (cf. **introduction paragraphe 1.3**), les patients décédés présentaient, après exposition aux MCs par dialyse, non seulement des signes d'hépatotoxicité mais aussi de neurotoxicité aiguë (Jochimsen et al 1998b; Pouria et al 1998). Cependant, peu d'études ont été menées sur les mammifères afin de mieux cerner cette toxicité. Parmi celles-ci, Maidana *et al.* ont montré à l'aide de tests comportementaux un effet amnésiant des MCs après injection dans l'hippocampe des souris (Maidana et al 2006). Il a aussi été constaté que l'exposition aux MCs par diverses voies générerait une augmentation des marqueurs du stress oxydant dans le cerveau des mammifères (Gaudin 2007; Maidana et al 2006; Zhao et al 2009). De plus, des études *in vitro* ont montré que des cultures de cellules isolées du cerveau (whole brain cells) de souris étaient sensibles à différents variants de MCs et capables de les incorporer (Feurstein et al 2009). Plus précisément, les neurones sont des cibles potentielles des MCs. En effet, les neurones de rats expriment des OATPs et sont sensibles à la toxicité de plusieurs variants de microcystine (Feurstein et al 2010; Fischer et al 2005).

#### 1.2.3.2 Toxicité rénale

La toxicité rénale des MCs a historiquement été décrite comme une vacuolisation modérée de l'épithélium tubulaire proximal et une dilatation du rein après une exposition aiguë par ip (160 µg/kg)(Hooser et al 1989). Depuis, les études menées sur rein perfusé de rat ont indiqué que la MC-LR induisait des lésions glomérulaire et vasculaire (Nobre et al 2001; Nobre et al 1999). *In vivo*, les études d'exposition chronique (8 mois) par injection intrapéritonéale avec la MC-LR, indiquent que les reins des rats présentent des effondrements glomérulaires avec des membranes basales épaissies et des tubules

dilatés. De plus, les fibres d'actine sont agglomérées et accumulées dans les cellules de l'épithélium (Milutinovic et al 2002; Milutinovic et al 2003).

#### *1.2.3.3 Toxicité pulmonaire*

Peu d'études ont été menées sur la toxicité pulmonaire des MCs. Pourtant, l'inhalation de MCs a été incriminée dans le développement de pneumonies sévères en Angleterre observé chez des militaires suite à la pratique de canoë lors d'un bloom de *Microcystis Aeruginosa* (Turner et al 1990). Des études menées en laboratoire ont aussi montré un impact des MCs sur les poumons. Ainsi des nécroses importantes de l'épithélium des zones respiratoire et olfactive ont été constatées sur des souris ayant subi une exposition intranasale à la MC-LR (Fitzgeorge et al 1994). De même des extraits de *M. aeruginosa* contenant des MCs ont généré une inflammation rapide des poumons chez les souris traitées par injection intrapéritonéale (Picanco et al 2004).

#### *1.2.3.4 Reprotoxicité*

Les effets des MCs sur les organes reproducteurs n'ont été rapportés que récemment, la première étude datant de 2006. Celle-ci indique que les souris mâles exposées par ip pendant 14 jours à des extraits de *M. aeruginosa* contenant des MCs, présentent des lésions des testicules avec une augmentation de l'espace entre les tubes séminifères. De plus, la qualité du sperme mature est altérée par rapport aux souris du groupe témoin (Ding et al 2006). La MC-LR induit des effets similaires : elle est cytotoxique pour les cellules de Sertoli et les cellules de Leydig ce qui entraîne une baisse à la fois de la production de testostérone et de la qualité du sperme (Chen et al 2011; Li et al 2008b; Xiong et al 2009). Dernièrement, une étude d'exposition chronique de poisson médaka traité par baignade avec la MC-LR (5 nM pendant 30 jours), a révélé des lésions aussi bien dans les ovaires que dans les testicules ainsi qu'une baisse du nombre d'œufs par ponte (I. Trinchet, communication personnelle 2011). De plus, des études récentes suggèrent que la MC-LR pourrait jouer un rôle de perturbateur endocrinien en tant que « xéno-œstrogène » (Oziol & Bouaïcha 2010; Rogers et al 2011; Sieroslawska & Rymuszka 2009).

#### *1.2.3.5 Toxicité intestinale*

De nombreuses études ont permis de détecter la présence de MCs, et plus particulièrement de la MC-LR, au sein des cellules intestinales quelle que soit l'exposition par intraveineuse, intrapéritonéale ou orale (Ito et al 2000; Ito et al 2002; Meriluoto et al 1990; Robinson et al 1989; Robinson et al 1991). Au niveau macroscopique, la toxicité

intestinale de la MC-LR chez les mammifères se traduit par une perte de la structure des entérocytes avec une érosion des microvillosités (Ito et al 2000; Ito et al 2002). La perte de la cohésion de l'épithélium intestinal a aussi été constatée après une exposition orale aiguë à la MC-LR chez le poisson médaka (Djediati et al 2010). *In vitro*, des entérocytes de poulet exposés à des extraits toxiques de *M. aeruginosa* ont présenté des bourgeonnements de la membrane plasmique similaires à ceux observés avec les hépatocytes (Falconer et al 1992).

L'exposition à la MC-LR induit aussi une perturbation de la physiologie intestinale. En effet, certaines études rapportent des modifications du taux de peroxydation des lipides et d'activité d'enzymes membranaires dans des entérocytes après injection intrapéritonéale de MC-LR sur des rats (Moreno et al 2003). La MC-LR augmenterait aussi la sécrétion d'eau et d'électrolytes par les cellules intestinales lors de perfusions de boucles iléales (Nobre et al 2004). Enfin, elle serait responsable de lésions de l'ADN et d'une augmentation de l'apoptose au niveau intestinal (Botha et al 2004b; Gaudin et al 2008).

**Tableau 1 : Synthèse des études portant sur l'activité de promotion de tumeur et/ou de potentiel carcinogène de la MC-LR hépatique après ip d'après (IARC 2010)**

Initiateur	MC-LR ( $\mu\text{g}/\text{kgx}$ répétitions)	Espèces	hépatectomie partielle	biomarqueur	évaluation	références
-	20 x 100 injections	souris mâle ICR	-	nodules néoplastiques	carcinogène faible	(Ito et al 1997a)
DEN	10 x 12 injections	rats mâle Fischer 344	+	foyer GST-P	promoteur de tumeur	(Nishiwaki-Matsushima et al 1992)
DEN	10-50 x 12 injections	rats mâle Fischer 344	+	foyer GST-P	promoteur de tumeur	(Nishiwaki-Matsushima et al 1992)
DEN	25 x 20 injections	rats mâle Fischer 344	-	foyer GST-P	promoteur de tumeur	(Ohta et al 1994)
DEN + aflatoxine B1	10 x 12 injections	rats mâle Fischer 344	+	foyer GST-P	promoteur de tumeur	(Sekijima et al 1999)
Aflatoxine B1	10 x 12 injections	rats mâle Fischer 344	+	foyer GST-P	promoteur de tumeur	(Sekijima et al 1999)

DEN : diéthylnitrosamine, GST-P : glutathion-s-transférase placentaire

Comme pour le foie, l'emploi de compétiteurs des OATPs semblent protéger les entérocytes de la toxicité des MCs (Falconer & Yeung 1992). Les transporteurs de type OATP joueraient donc un rôle dans la sensibilité des entérocytes à ces toxines.

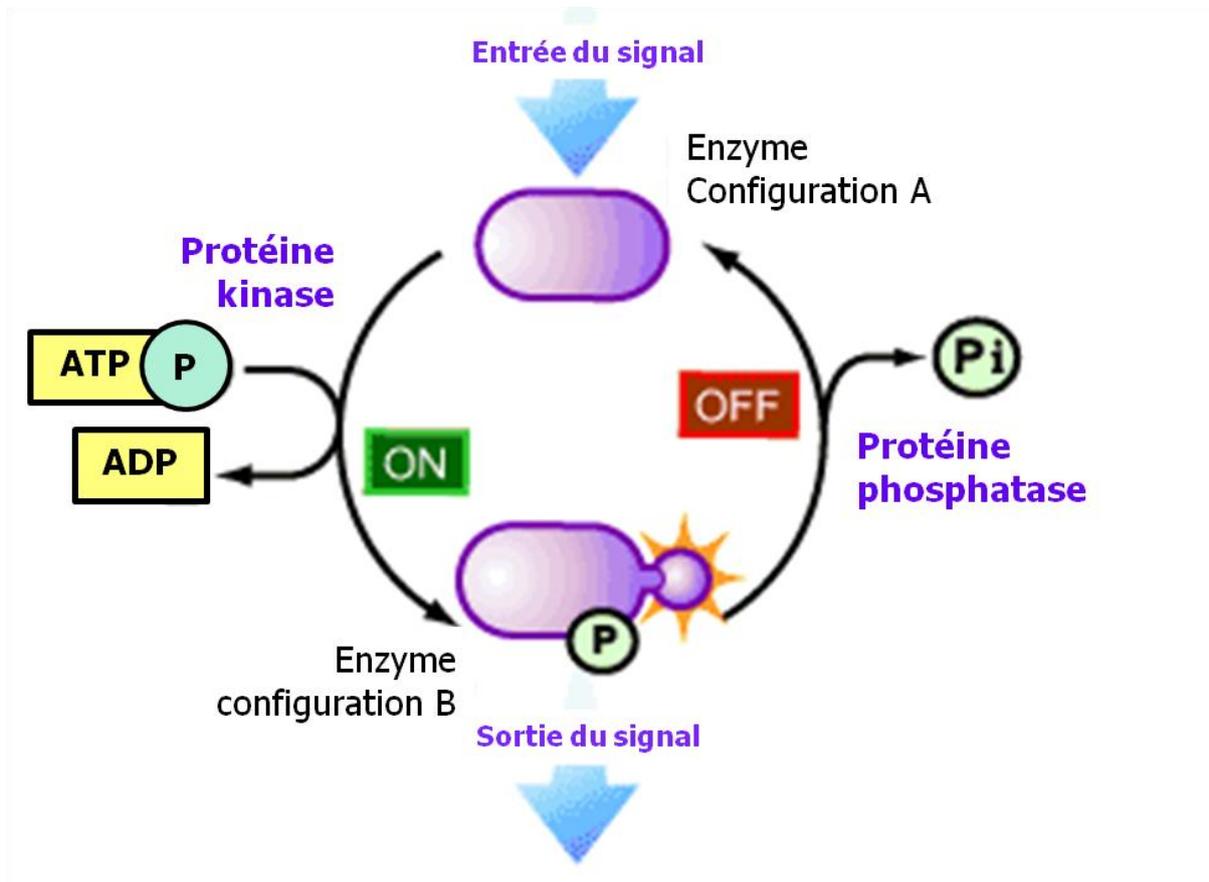
#### **1.2.4 Cancérogénicité des microcystines**

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

De plus, plusieurs études sur des modèles rongeurs (rats ou souris) ont étudié le rôle carcinogène et principalement de promotion tumorale des MCs (Falconer & Buckley 1989; Ito et al 1997b; Nishiwaki-Matsushima et al 1992; Ohta et al 1992; Sekijima et al 1999). Les études portant spécifiquement sur la MC-LR sont résumées dans le

#### **Tableau 1.**

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



**Figure 6 : Système de phosphorylation/déphosphorylation des protéines au cours de la transduction d'un signal**

*Exemple : cas où la phosphorylation active une enzyme*

## **1.2.5 Mécanismes de la toxicité des microcystines (cf.**

### **Figure 10)**

#### *1.2.5.1 Les microcystines sont des inhibiteurs de protéines phosphatase à sérine/thréonine*

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

##### 1.2.5.1.1 Les protéines phosphatases

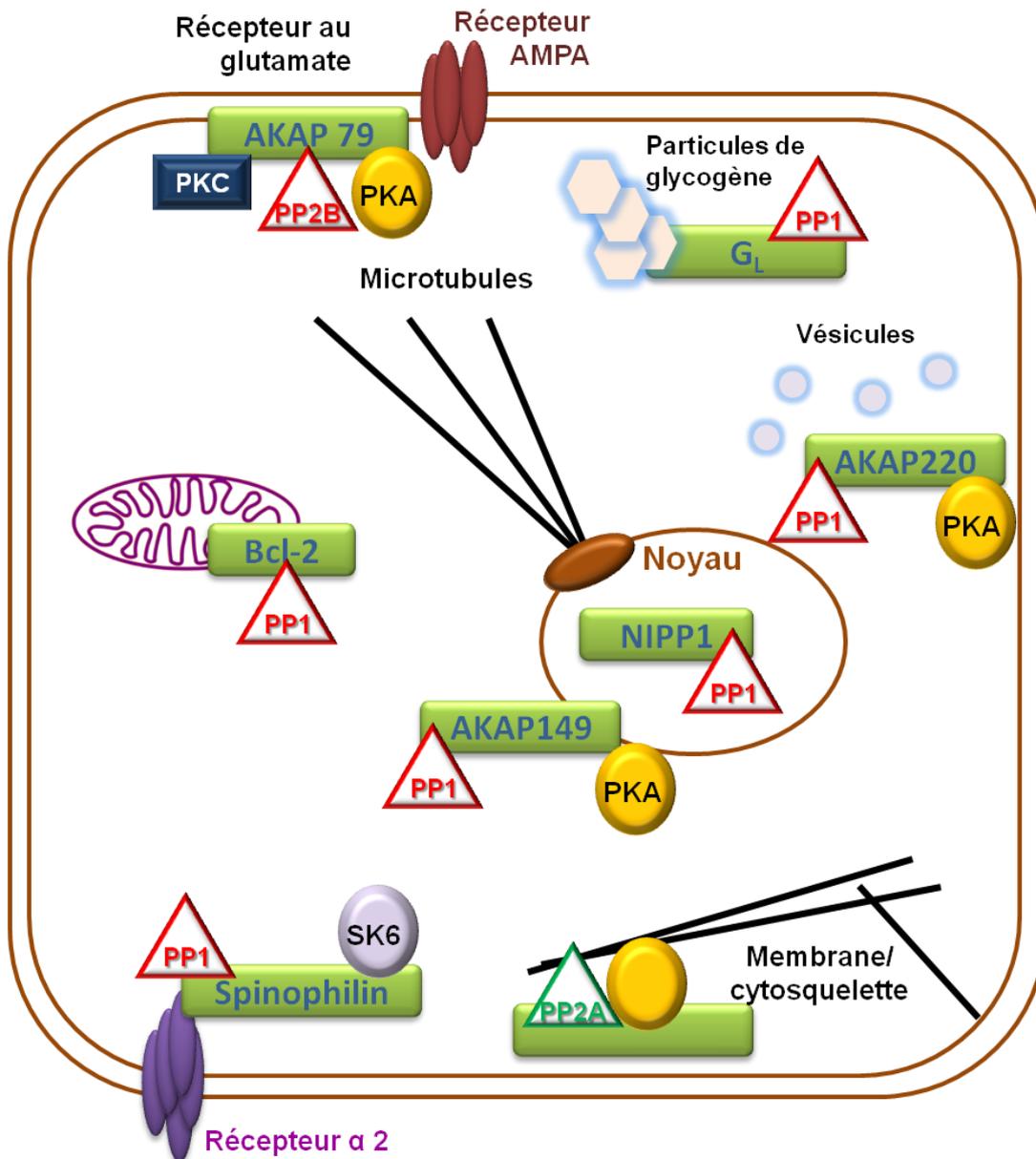
Dans le système cellulaire, l'activité protéique est en grande partie régulée par des modifications post traductionnelles y compris par la phosphorylation de certains résidus d'acides aminés. Le système de phosphorylation met en jeu deux familles d'enzymes : les protéines kinases qui phosphorylent les protéines et les protéines phosphatases qui les déphosphorylent (**cf. Figure 6**). Ainsi, à tout instant près de 30 % des protéines cellulaires sont phosphorylées (Cohen 2001).

Le statut de phosphorylation des protéines joue un rôle majeur à la fois dans leur niveau d'activité, leur localisation subcellulaire, leur fonction et leur demi-vie (**cf. Figure 7**) (McConnell & Wadzinski 2009). Les protéines kinases et phosphatases régulent ce statut de phosphorylation ce qui en fait des acteurs majeurs de la régulation de l'homéostasie cellulaire (McConnell & Wadzinski 2009).

Les protéines phosphatases sont classées en fonction de leur substrat en 2 grandes familles : les protéines phosphatases à sérine et thréonine et les protéines phosphatases à tyrosine (McConnell & Wadzinski 2009). Chez les mammifères, 98 % des protéines phosphorylées le sont sur leur résidus sérine et thréonine (Shenolikar 1994).

##### 1.2.5.1.2 Mécanisme d'inhibition des PPs par les microcystines

Les protéines phosphatases à Ser/Thr (PPs) sont les cibles des microcystines et sont puissamment inhibées par celles-ci (Eriksson et al 1990b; Honkanen et al 1990; MacKintosh et al 1990; Nishiwaki-Matsushima et al 1991; Toivola 1994). En effet, les concentrations inhibitrices 50 (CI50) constatées sur la PP1 et la PP2A sont de l'ordre de 1 nM (**cf. Tableau 5**).



**Figure 7 : Schéma illustrant l'implication des PP dans la régulation de nombreux processus de la cellule eucaryote**

Récepteur AMPA: isoformes du récepteur au glutamate; AKAP : protéine d'ancrage ; A-kinase: PKA : protéine kinase A; PKC : protéine kinase C; PP : protéine phosphatase; G<sub>L</sub> : sous-unité de PP1 se liant au glycogène; NIPP1 : inhibiteur nucléaire de la PP1; S6K : protéine kinase ribosomale S6; α2 receptor : récepteur adrénergique α2. D'après (Dombradi et al 2002)

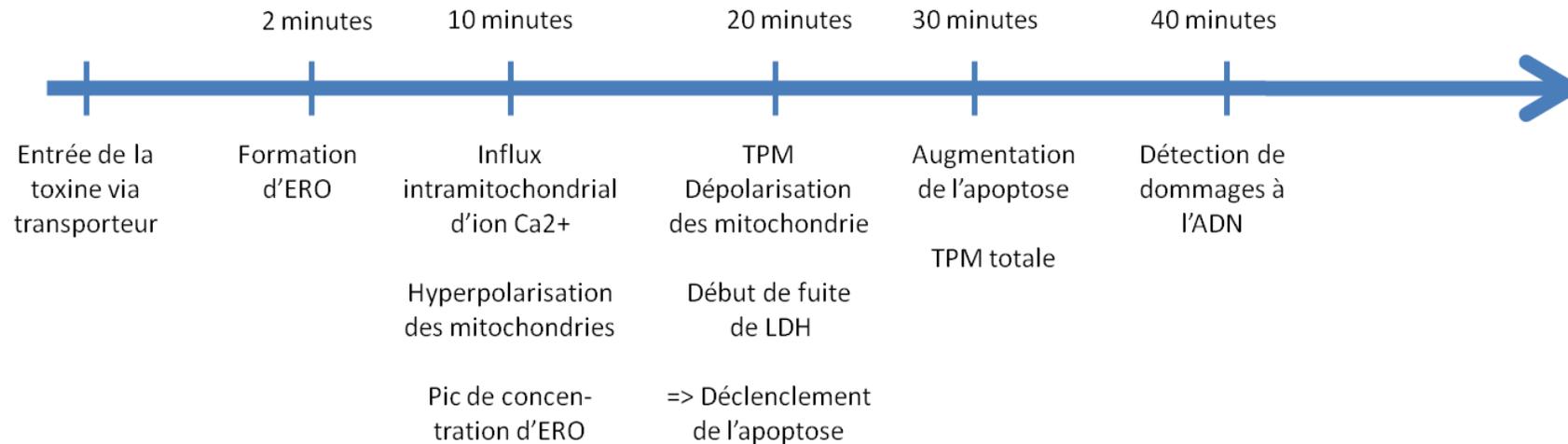
Cependant, toutes les isoformes de PPs ne sont pas sensibles aux MCs : ainsi la PP2C n'est pas inhibée alors que la PP1, la PP2A, la PPP4 et la PPP5 le sont (Hastie et al 2005; Honkanen et al 1990). Les deux acides aminés spéciaux des MCs (ADDA et Mdha, **cf. Figure 3**) participent à l'inhibition des PPs. En effet, la modification de l'ADDA de la MC-LR ou de la MC-RR induit une baisse de 10 à 100 fois du potentiel d'inhibition de la PP1 (Nishiwaki-Matsushima et al 1991). Le Mdha, quant à lui, forme une liaison forte (liaison thiol) avec le résidu Cys 273 de la PP1 ou le Cys 266 de la PP2A. Si la formation de cette liaison est empêchée, par exemple par une mutation du résidu Cys 273, le pouvoir inhibiteur de la MC-LR diminue alors d'un facteur 5 à 20 (MacKintosh et al 1995; Runnegar et al 1995b). Ce résultat indique que ces liaisons fortes jouent un rôle majeur dans l'inhibition des PPs par les MCs.

L'interaction des MCs avec les sous-unités catalytiques des PPs se déroule en deux temps. Tout d'abord, une liaison faible se forme entre l'ADDA et les PPs dès les premières minutes. Ensuite, après plusieurs heures, une liaison covalente se forme entre le Mdha et les PPs (Craig et al 1996).

#### 1.2.5.1.3 Conséquences de l'inhibition des PPs

A l'échelle cellulaire, l'inhibition des PPs par les MCs se traduit par une augmentation du niveau de phosphorylation des protéines et une perturbation du cytosquelette (Falconer & Yeung 1992; Ohta et al 1992; Yoshizawa et al 1990). En effet, la structure du cytosquelette est, entre autre, contrôlée par l'action des PPs (**cf. Figure 7**). Le cytosquelette est composé de 3 éléments: les filaments intermédiaires, les microfilaments et les microtubules. Il a ainsi été constaté que l'hyperphosphorylation des cytokératines provoquée par les MCs induit une désagrégation et un effondrement des filaments intermédiaires (Eriksson et al 1990b; Falconer & Yeung 1992; Ohta et al 1992; Toivola 1994; Toivola et al 1997).

De même, la contraction de l'actine des microfilaments induite par phosphorylation génère les déformations cellulaires (blebbing) décrites sur les hépatocytes dès les années 1980 (Ding et al 2000b; Eriksson et al 1989; Falconer & Yeung 1992; Runnegar & Falconer 1986). Enfin, une perturbation des microtubules est aussi constatée suite à l'exposition aux MCs (Alverca et al 2009; Lankoff et al 2003; Runnegar et al 1999).



**Figure 8 : enchaînement des évènements lors de l'exposition d'hépatocytes de rat à la MC-LR (1-5  $\mu$ M) d'après (Ding, Shen et al. 2000; Ding, Shen et al. 2001)**

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

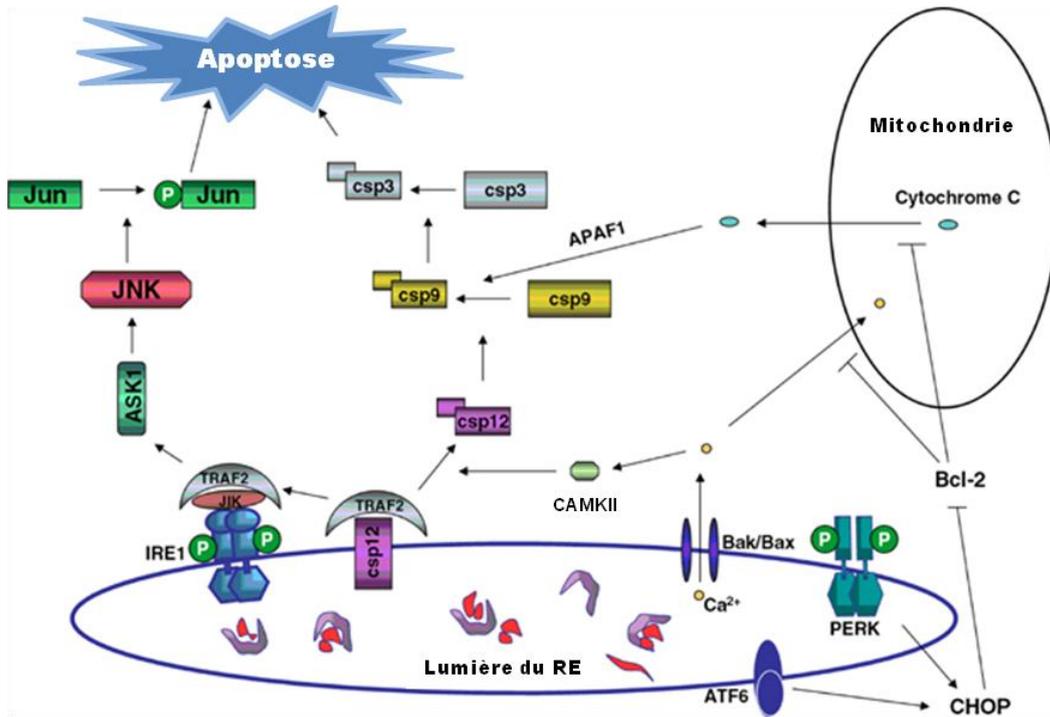
Au-delà des effets sur la structure du cytosquelette, il a aussi été observé que la MC-LR induisait une augmentation de la prolifération cellulaire (Dias et al 2010; Lankoff et al 2003; Zhu et al 2005). En effet, les PPs jouent un rôle essentiel dans la régulation du cycle cellulaire (McConnell & Wadzinski 2009). Cet effet sur la prolifération cellulaire serait à l'origine du potentiel de promoteur de tumeurs des MCs (**cf. introduction paragraphe 1.2.4**). Certains auteurs suggèrent que, comme pour l'acide okadaïque, la promotion de tumeur serait due à une surexpression du gène TNF $\alpha$  et/ou de l'interleukine 1 (Fujiki & Suganuma 2011). D'autres proposent que la promotion intervienne de manière indirecte. Les PPs inhibées induiraient l'activation de la voie Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) qui perturberait le niveau de phosphorylation de la protéine p53 (Guzman et al 2003; Komatsu et al 2007; Takumi et al 2010; Wei et al 2008; Zhu et al 2005). En effet, une étude sur des souris P53 Knock out (KO) a montré que la P53 joue un rôle important dans l'induction des tumeurs par la MC-LR (Clark et al 2008).

#### *1.2.5.2 Les microcystines génèrent du stress oxydant*

Au-delà de la capacité d'inhibition des PPs, les MCs induisent du stress oxydant dans les cellules. Les premières études portant sur cet aspect de la toxicité des MCs datent de la fin des années 1990 (Ding et al 1998; Guzman & Solter 1999). Cependant, depuis la fin des années 1980, de nombreux auteurs ont rapporté des effets des microcystines sur les mitochondries, organites clés dans la production de stress oxydant.

Ainsi, après traitement aigu avec la MC-LR, les mitochondries des hépatocytes s'agrègent, gonflent et leur chaîne respiratoire est perturbée jusqu'au découplage de celle-ci (Hermansky et al 1993; La-Salette et al 2008; Miura et al 1989; Pace et al 1991a; b; Zhao et al 2008). Les MCs induisent aussi une augmentation de la taille des crêtes mitochondriales aussi bien dans des hépatocytes, des cellules rénales épithéliales ou des fibroblastes (Khan et al 1995; Wickstrom et al 1996). 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 (TPM, **cf. Figure 8**) 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 2001b). 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 (Ding & Ong 2003; Ding et al 2000a; 2001a; b; 2002).

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



**Figure 9 : Présentation schématique de la voie du stress du réticulum endoplasmique d'après (Wu and Kaufman 2006)**

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

de type 2 (Chen et al 2006a; Mikhailov et al 2003). Il est ainsi envisagé que la perturbation du fonctionnement de ces enzymes pourrait mener à des dysfonctionnements mitochondriaux avec pour conséquence une forte production d'ERO (Chen et al 2006a; Wang et al 2010). Cependant, la production d'ERO commence avant la détection de la perturbation mitochondriale (**cf. Figure 8**).

Le métabolisme des MCs est une autre source potentielle de stress oxydant. En effet, la formation de conjugués microcystines (**cf. introduction paragraphe 2.1.4**) nécessite la consommation de GSH. Or, le GSH est un acteur majeur de la détoxification des ERO, la déplétion en glutathion causée par le métabolisme des MCs peut donc diminuer les capacités cellulaires à détoxifier les ERO et donc être source indirecte de stress oxydant (Ding & Ong 2003).

La production de stress oxydant suite à une exposition aux MCs a été confirmée *in vivo* dans de nombreux organismes par la mesure de la production d'ERO (Blaha et al 2004; Botha et al 2004a; Bouaicha & Maatouk 2004) ou de la peroxydation lipidique (Gehring et al 2004; Moreno et al 2005; Prieto et al 2007; Weng et al 2007) ou par la perturbation du système antioxydant (Gehring et al 2004; Li et al 2003; Moreno et al 2005; Qiu et al 2009). L'importance du stress oxydant dans la toxicité des MCs a été authentifiée par l'emploi d'agents antioxydants comme les vitamines C ou E entraînant une baisse de la sensibilité des organismes aux MCs (Atencio et al 2008a; Gehring et al 2003; Prieto et al 2009; Weng et al 2007).

Le stress oxydant est donc aujourd'hui considéré comme un des mécanismes principaux de la toxicité des MCs au même titre que l'inhibition des protéines phosphatases à sérine/thréonine. De plus, le stress oxydant généré par les MCs pourrait être la source de lésions de l'ADN et donc être responsable d'un effet génotoxique des MCs (Campos & Vasconcelos 2010; Zegura et al 2003; Zegura et al 2008b).

#### *1.2.5.3 Les microcystines sont probablement source de stress du réticulum endoplasmique (cf. Figure 9)*

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



(Alverca et al 2009; Hermansky et al 1993; Khan et al 1995; Li et al 2001; Miura et al 1989; Pace et al 1991a).

Dans un contexte de SRE, le RE libère des ions calcium vers la mitochondrie, mécanisme classiquement impliqué dans l'apoptose (Giorgi et al 2009) et qui a été observé avec la MC-LR (**cf. paragraphe 1.2.5.2**, (Ding & Ong 2003)). Dans ce contexte, la mitochondrie serait en réalité un effecteur en aval de la voie SRE (Giorgi et al 2009).

La protéine CAMKII joue un rôle à la fois dans la voie métabolique Fas (associée à JNK) et dans l'absorption du calcium par la mitochondrie lors d'un SRE (Timmins et al 2009). Or CAMKII et JNK sont décrites par certains auteurs comme des enzymes clés du mécanisme de toxicité de la MC-LR (Fladmark et al 2002; Krakstad et al 2006; Wei et al 2008). Enfin, il a été montré qu'en plus de jouer un rôle dans le SRE, Fas participe à l'apoptose induite par les MCs (Feng et al 2011; Xiong et al 2009). Ce résultat est un lien supplémentaire entre l'apoptose induite par les microcystines et le stress du réticulum endoplasmique.

Des études récentes ont permis d'identifier des biomarqueurs pour le stress du réticulum endoplasmique parmi lesquels la heat shock 70kDa protein 5 (HSPA5), la X-box binding protein 1 (XBP1) ou la C/EBP-homologous protein (CHOP) (Acosta-Alvear et al 2007; Guichard et al 2006). Il a récemment été décrit que, la HSPA5 est significativement surexprimée suite à une exposition à la MC-LR chez le poisson médaka (Malécot et al 2009). De même, dans le foie de souris, la MC-LR provoque une augmentation significative de la CHOP aussi bien au niveau transcriptionnel que protéique (Qin et al 2010).

- ❖ *Il existe près de 90 variants de MCs*
- ❖ *Les MCs sont principalement des hépatotoxines mais d'autres organes sont également touchés dans une moindre mesure.*
- ❖ *La MC-LR est classée par le CIRC comme cancérigène potentiel (classe 2B)*
- ❖ *La sensibilité aux MCs est corrélée à la présence des transporteurs OATPs dans les membranes cellulaires.*
- ❖ *Les MCs sont des inhibiteurs de protéines phosphatases à sérine/thréonine.*
- ❖ *Les MCs induisent la formation d'ERO et de stress oxydant.*
- ❖ *Les MCs provoquent probablement un stress du réticulum endoplasmique.*

## 1.3 Les microcystines un problème de santé publique

Plusieurs épisodes d'intoxication humaine ont été provoqués par l'exposition aux microcystines démontrant l'existence d'une vraie problématique de santé publique. Ainsi, les cyanotoxines peuvent atteindre des concentrations susceptibles de produire des effets aigus sur la santé des animaux et des hommes. Chez l'homme de nombreux troubles hépatiques et gastro-intestinaux ont été associés aux cyanobactéries et plus particulièrement aux microcystines bien qu'il soit difficile de confirmer un lien direct. En effet, il s'agit rarement d'exposition aux MCs seules. D'autres toxines ou des fragments de cyanobactéries sont aussi présents et il est très difficile d'identifier le rôle de chacun dans les intoxications causées par ces mélanges. De plus, la plupart des troubles liés aux microcystines ont été étudiés *a posteriori* et les données épidémiologiques ne sont, malheureusement, que rarement disponibles (Kuiper-Goodman et al 1999).

### 1.3.1 Exposition orale

Les rapports de l'organisation mondiale de la santé indique que pour l'homme, l'ingestion est la principale voie d'exposition. Celle-ci peut se produire via l'alimentation ou via la consommation d'eau (Chorus & Bartram 1999; WHO 1998).

#### 1.3.1.1 Par les eaux potables

Le premier cas documenté d'intoxication corrélée à une efflorescence de cyanobactéries a eu lieu à Charleston (USA). Ainsi, Tisdale décrit en 1931 des troubles intestinaux qui n'ont pas pu être associés à un agent infectieux mais qui ont eu lieu à la suite d'une prolifération de cyanobactéries dans le réservoir d'eau potable de la population touchée (Levi et al 2006). Un phénomène similaire s'est déroulé au Brésil dans les années 1990. Le barrage d'Itaparica a été touché par une efflorescence de cyanobactéries des genres *Anabaena* et *Microcystis*. Bien qu'aucun agent infectieux, ni métal lourd n'aient pu être mis en évidence, l'intoxication toucha près de 2000 personnes parmi lesquelles 88 moururent (Teixeira et al 1993).

De même, une prolifération de *Microcystis aeruginosa* dans le réservoir d'Armidale (Australie) au début des années 1980 a été associée à l'apparition de problèmes hépatiques et à une augmentation significative des gamma-glutamyl transférases sanguines (biomarqueur de lésions hépatiques) chez les personnes consommant l'eau du

réservoir par rapport à celles utilisant d'autres ressources en eau potable (Falconer et al 1983).

Cette épisode illustre bien le risque pour l'homme d'intoxication par des microcystines dissoutes dans l'eau (Levi et al 2006). L'étude des personnes touchées par ces intoxications montre également l'existence de population à risque comme par exemple les enfants (Kuiper-Goodman et al 1999).

L'hypothèse selon laquelle les MCs ingérées pourraient atteindre la circulation systémique d'un être humain a été récemment confirmée par une étude chinoise portant sur une population de pêcheurs exposés quotidiennement aux microcystines soit par l'eau de boisson soit par la consommation d'animaux aquatiques contaminés. La présence de microcystines a été détectée dans les échantillons de sérum des 35 pêcheurs (en moyenne  $0.39 \text{ ng.ml}^{-1}$ ) (Chen et al 2009a).

#### *1.3.1.2 Par les aliments contaminés*

Les microcystines sont bioaccumulées dans les animaux de la chaîne trophique dont certains sont utilisés pour l'alimentation humaine (**cf. introduction paragraphe 1.1.6.3**). La présence de MCs dans ces organismes constitue donc une voie d'exposition pour l'homme (Chen et al 2009a; Ibelings & Chorus 2007; Papadimitriou et al 2010; Rao et al 2002; Zhang et al 2009). Les MCs peuvent aussi s'accumuler dans les végétaux lorsque ceux-ci sont irrigués avec des eaux contaminées (Chen et al 2010; Codd et al 1999; Mohamed & Al Shehri 2009). Ainsi, la consommation de fruits ou de légumes représente aussi une voie d'exposition potentielle aux MCs.

Certains compléments alimentaires constitués d'algues bleues, c'est-à-dire de cyanobactéries, sont une autre source alimentaire d'exposition aux microcystines. Ainsi plusieurs études ont été menées à travers le monde afin d'évaluer le contenu potentiel en MCs de ces produits vendus sur le marché. Les MCs n'ont pas été détectées dans la plupart des lots, cependant pour certains, la concentration en MCs pouvait aller de  $0,01$  à  $0,45 \mu\text{g.g}^{-1}$  de produit (Bruno et al 2006; Levi et al 2006; Orтели et al 2008). Une étude italienne a identifié les gènes impliqués dans la production de MCs (gènes *mcy*) dans l'ensemble des compléments alimentaires à base de cyanobactéries testés même si, la présence de toxine n'a pas été confirmée dans l'ensemble de ces lots (Lavorini et al 2010).

#### *1.3.1.3 Par les eaux récréatives*

Les eaux récréatives contaminées peuvent constituer une autre source d'exposition orale principalement accidentelle lors d'activités de baignade. Les symptômes pouvant en découler sont principalement des problèmes gastro-intestinaux (nausées,

diarrhées) et aussi des maux de têtes (Kuiper-Goodman et al 1999; Levi et al 2006; Pilotto et al 1997).

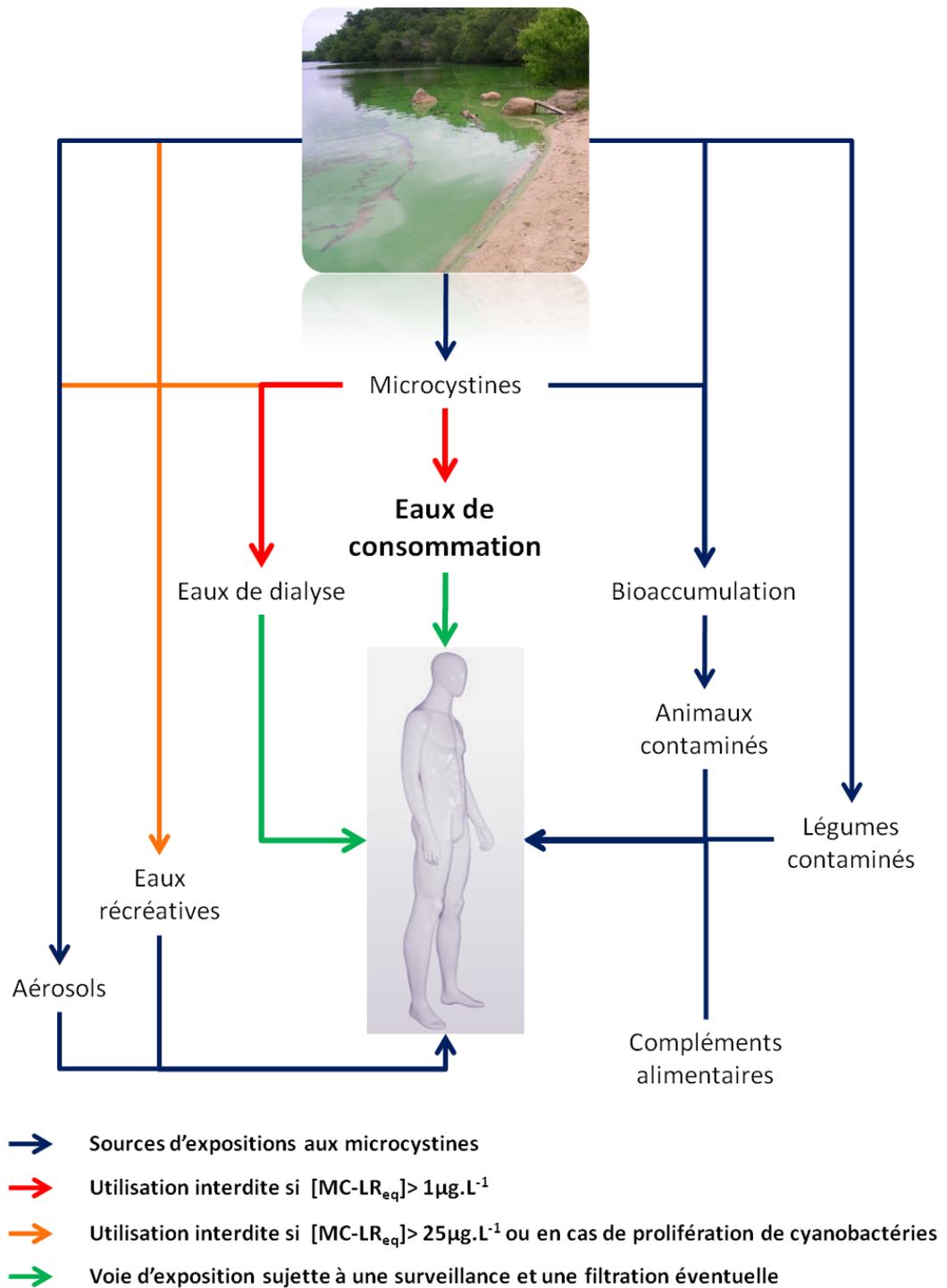
### **1.3.2 Autres voies d'expositions**

#### *1.3.2.1 Par les eaux de dialyse*

L'utilisation d'eau contaminée par des microcystines pour une hémodialyse revient à réaliser une injection intraveineuse (iv) de la toxine. Ainsi le choc endotoxique subi par 23 dialysés en 1975 à Washington (USA) a été attribué aux toxines produites par l'efflorescence de cyanobactéries présente dans le réservoir d'eau potable (Hindman et al 1975). De même, cette voie d'exposition aux MCs a été recensée au moins deux fois au Brésil. La première occurrence, et la plus dramatique, a eu lieu à Caruaru. Du 17 au 20 février 1996, 130 patients ont subi une dialyse de routine utilisant l'eau d'un barrage dans lequel se développait une efflorescence de cyanobactéries. Suite au traitement, 89 % d'entre eux ont présenté des symptômes de neurotoxicité et/ou d'hépatotoxicité. Les symptômes décrits incluaient des malaises, des douleurs musculaires, des faiblesses, des nausées accompagnées de vomissements et une hépatomégalie (Jochimsen et al 1998b; Pouria et al 1998). Suite à cette exposition, 100 patients ont présenté des défaillances hépatiques aiguës et 76 en sont morts. Il a fallu attendre le début des années 2000, et la mesure des concentrations sériques en MC-LR, pour confirmer la mise en cause des microcystines. La concentration en MC-LR mesurée dans le sérum des patients atteignait alors 19,9 ng.ml<sup>-1</sup> en moyenne (Azevedo et al 2002; Carmichael et al 2001; Hilborn et al 2005). Une prolifération de cyanobactéries, principalement des genres *Microcystis* et *Anabaena*, dans le réservoir de Funil et la rivière Guandu qui alimentent en eau la ville de Rio de Janeiro est à l'origine du second accident qui s'est produit en novembre 2001. Bien qu'aucun mort n'ait été à déplorer, 90% des dialysés testés ont présenté une concentration sérique en MCs supérieure à 0,16 ng.ml<sup>-1</sup> (Soares et al 2006).

#### *1.3.2.2 Par exposition cutanée et inhalation*

Des cas d'irritations cutanées ont pu être observés suite à des activités récréatives dans des eaux contaminées (baignade, activités nautiques...) (Levi et al 2006; Pilotto et al 1997). Il est aussi envisagé que l'inhalation des MCs sous forme d'aérosols soit une autre voie d'exposition aux toxines (Levi et al 2006; Wood & Dietrich 2011).



**Figure 11 : Synthèse des différentes sources d'exposition aux MCs et des voies d'exposition associées chez l'Homme**

L'exposition aux microcystines par dialyse est particulièrement à prendre en compte. En effet, bien qu'elle ne touche qu'un groupe de population restreint, elle peut s'avérer chronique et touche une population déjà fragile.

### **1.3.3 Aspects réglementaires concernant le risque associé aux cyanobactéries et à leurs toxines (cf. Figure 11)**

Les microcystines sont un réel problème de santé publique par la multiplicité des voies d'exposition pour l'homme ainsi que par leur toxicité et surtout leur carcinogénicité potentielle. Afin de répondre à cette problématique, l'OMS a émis un avis en 1998 recommandant de limiter à  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  la concentration en MC-LR dans les eaux de boisson (WHO 1998). Pour fixer la valeur guide de la MC-LR, l'OMS a retenu une étude de toxicité subchronique de 13 semaines chez la souris par voie orale. La dose minimale sans effet nocif observé (DSENO) a été évaluée sur la base de troubles hépatiques observés à  $40 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ . L'application d'un facteur d'incertitude de 1000 (10 pour les variations intraspécifiques x 10 pour les variations interspécifiques x 10 pour les limites de la base de données, en particulier le manque de données sur la toxicité chronique et la carcinogénicité) conduit à une dose journalière tolérable de  $0,04 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$  (WHO 1998).

Cette valeur guide est appliquée par de nombreux pays, de façon réglementaire ou sous la forme de recommandations. Certains pays appliquent cette valeur guide exprimée en équivalent MC-LR<sup>1</sup> et prennent ainsi en compte l'ensemble des variants de MCs (cf. **Tableau 2**).

En France, la réglementation sur les eaux de boisson s'est établie en deux temps. Tout d'abord, dans un décret de 2001, la France a repris la valeur guide de  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  de MC-LR pour les eaux destinées à la consommation humaine, à l'exclusion des eaux minérales naturelles. Ensuite, en 2007 un arrêté a élargi le seuil aux microcystines totales et non plus à la MC-LR seule (articles R. 1321-2, R. 1321-3, R.1321-7 et R.1321-38 du code de santé publique). Ainsi, ce n'est plus la MC-LR seule mais la somme de toutes les microcystines détectées et quantifiées qui doit être inférieure à  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Les eaux récréatives disposent elles aussi d'une recommandation de l'OMS (WHO 2003). Celle-ci

---

<sup>1</sup> Les mesures en équivalent MC-LR sont classiquement réalisées en test ELISA ou en test d'inhibition des PPs en utilisant une gamme de référence en MC-LR

**Tableau 2 : Exemples d'approche réglementaires pour les microcystines et les cyanobactéries dans les eaux de boissons d'après le rapport du CIRC 2010 (IARC 2010)**

Pays	valeur seuil	Approche réglementaire
Australie	1,3 µg/L équivalent MC-LR	ligne directrice fédérale sur l'eau de boisson pour les microcystines totales  Surveillance mensuelle de la présence de cyanobactérie dans les réservoirs d'eau potable ; si le nombre de cellules dépasse 10 000 cellules/mL ou que le biovolume dépasse 1 mm <sup>3</sup> de volume cellulaire, une surveillance hebdomadaire est alors effectuée ainsi qu'une recherche systématique de toxines ou de toxicité
Brésil	1 µg/L variant non spécifié	Concentration maximale acceptable pour la MC-LR dans l'eau de boisson afin de protéger la santé humaine contre l'exposition aux autres variants  surveillance obligatoire de l'eau du robinet pour MC-LR avec mise à jour de l'ordonnance en fonction de la quantification de la biomasse des cyanobactéries dans l'eau des réservoirs ou de bio-essais en liaison avec comptage des cellules. La recherche de toxine est mise en place si le seuil de biomasse des cyanobactéries est dépassé.
Canada	1,5 MC-LR µg/L	surveillance obligatoire de l'eau du robinet pour MC-LR avec mise à jour de l'ordonnance en fonction de la quantification de la biomasse des cyanobactéries dans l'eau des réservoirs ou de bio-essais en liaison avec comptage des cellules. La recherche de toxine est mise en place si le seuil de biomasse des cyanobactéries est dépassé.
République Tchèque	1 µg/L	Décret sur l'eau de boisson, des analyses sont requises en cas de prolifération de cyanobactéries dans les réservoirs
France	1 µg/L	Décret sur l'eau de boisson, intensité de l'échantillonnage défini en fonction de la taille de la population concernée et revue tous les 5 ans
Espagne	1 µg/L variant non spécifié	

repose en grande partie sur la présence de cyanobactéries a été adaptée par un certain nombre de pays comme décrit dans le **Tableau 3**.

En 2003, la France a émis des recommandations de surveillance et de gestion des phénomènes de prolifération de cyanobactéries dans les eaux de baignade (circulaire DGS/SD7A 2003/270(34), 2004/364(35), 2005/304(36)) sur la base d'un avis du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (avis du CSHPF du 6 mai 2003). Celui-ci reprend l'avis de l'OMS de 2003 qui prévoit 3 niveaux d'alerte relatifs aux cyanobactéries et les mesures à prendre pour chaque niveau. Des précisions ont été apportées par la suite dans l'avis du CSHPF du 6 juillet 2004. Ainsi, les responsables locaux doivent mettre en place un système de surveillance visuelle sur l'ensemble des sites. Ce système doit être renforcé pour les sites signalés comme étant à risque (sensibles à l'eutrophisation, ayant déjà présenté des proliférations de cyanobactéries ou présentant une forte fréquentation) avec l'ajout de la mesure de la turbidité et du dosage de chlorophylle a, ces deux mesures permettant une évaluation de la population de cyanobactéries potentiellement toxiques.

**Tableau 3 : Valeurs guides et principales recommandations retenues pour différents pays (MC-LR : Microcystine LR ; MCs : sommes des microcystines) d'après (Levi et al 2006)**

Niveau	Actions	Paramètres	OMS	Allemagne	Australie		Canada	Finlande	France	Pays Bas
					NHMRC	Hunter et Tasmanie	INSPQ			
I	Surveillance régulière situation normale	Nombre de cyanobactéries (cellules.mL-1)	20 000		500 à 5000 <i>Microcystis aeruginosa</i>	200 à 2000			< 20 000	< 10 µg/L-1
		MC-LR ou MCs (µg.L-1)	2 à 4 (MC-LR) si cyanobactéries toxigènes	<10						
		Indicateur	10 µg de chlorophylle a.L-1					transparence réduite		
II	Renforcement de la surveillance et interdiction de la baignade avec maintiens des activités nautiques	Nombre de cyanobactéries (cellules.mL-1)	10 000		5000 à 40 000 <i>Microcystis aeruginosa</i>	2000 à 15 000	100 000		de 20 000 à 100 000	
		MC-LR ou MCs (µg.L-1)	20 à 100 µC-LR selon la souche de <i>Microcystis aeruginosa</i> 40 MC-LR si <i>Planktothrix agardhii</i>	10 à <100	8		> 16 (MC-LR ou 40 µg.l-1 anatoxine a)		< 25 (MC-LR)	
		Indicateur	50 µg de chlorophylle a.L-1					Eau colorée et tache d'écume		10-20
III	Interdiction de la baignade	Nombre de cyanobactéries (cellules.mL-1)	écume (plusieurs centaines à plusieurs millions de cyanobactéries)		>40 000 <i>Microcystis aeruginosa</i>	>15 000 cellules toxigènes			> 100 000 (avec maintien limité des activité nautiques)	
		MC-LR ou MCs (µg.L-1)		>100					> 25 (MC-LR)(avec interdiction des activités)	> 20
		Indicateur						Nappes d'écume	Présence d'écume	Présence d'écume

- ❖ ***Les voies d'exposition aux microcystines sont nombreuses pour l'homme.***
  
- ❖ ***La principale voie d'exposition pour l'homme est la voie orale.***
  
- ❖ ***L'OMS et le CIRC ont rendu des avis concernant la MC-LR seule visant à limiter et à mettre en garde contre une exposition à celle-ci.***
  
- ❖ ***La France a mis en place une réglementation***



## **2. Microcystines et barrière intestinale**

### **2.1. 2.1 La barrière intestinale est un organe clé de l'ADME**

#### **2.1.1 Notion Absorption Distribution Métabolisme Excrétion (ADME)**

La toxicité d'une molécule sur un individu dépend de cinq paramètres principaux : la dose (concentration et temps d'exposition), l'absorption de cette molécule (quantité et vitesse), sa distribution dans l'organisme, sa biotransformation (ou métabolisme) et son excrétion. L'étude de ces paramètres est rattachée à la toxicocinétique et est classiquement désignée par le sigle ADME pour Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion.

La première étape de l'étude toxicocinétique d'une molécule consiste à évaluer son absorption. Pour les contaminants, elle est principalement réalisée par trois organes selon la voie d'exposition : le tractus gastro-intestinal, les poumons et la peau et elle dépend directement des propriétés physico-chimiques de la molécule (taille, hydrosolubilité, ...). Les molécules absorbées sont ensuite distribuées dans l'organisme par le sang et la lymphe. En fonction de leurs propriétés, les molécules peuvent circuler sous formes libre ou liée aux protéines plasmatiques ou aux cellules sanguines.

Après absorption au niveau intestinal et passage dans la circulation, les molécules sont dirigées vers le foie avant d'atteindre le cœur et les poumons puis les autres organes. Si la nature physico-chimique de la molécule le permet, l'absorption se fait par diffusion simple au travers de la barrière intestinale (BI). Cependant, dans de nombreux cas, les molécules sont prises en charge par des transporteurs pour passer la BI. Dans ce cas, la présence de ces transporteurs aux membranes cellulaires est un élément clé de la perméabilité. Leur abondance, leur affinité pour les molécules et les paramètres de l'environnement (présence de compétiteur, pH,...) influencent majoritairement l'efficacité d'absorption des molécules.

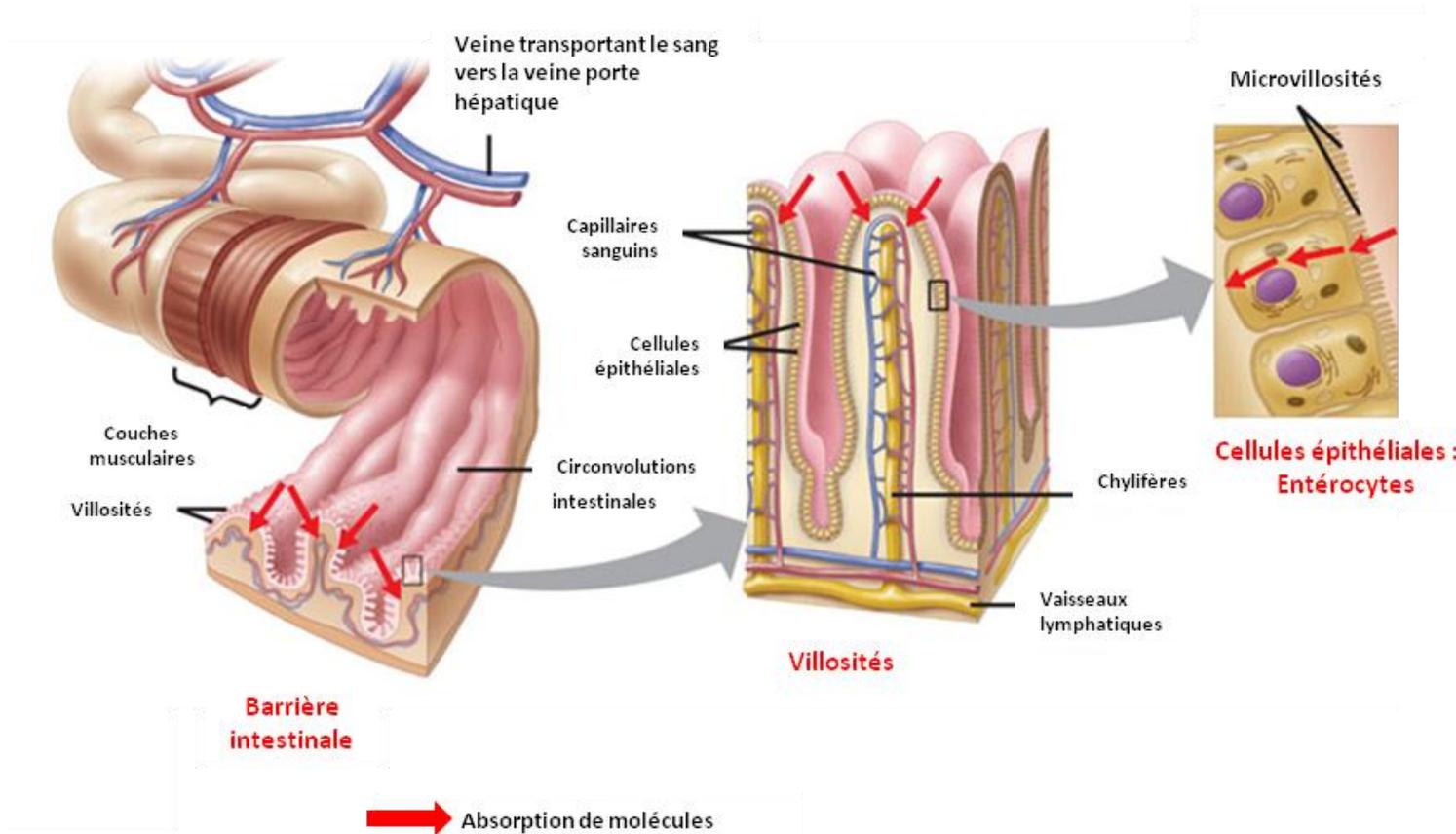


Figure 12 : Schéma représentant les structures absorbantes de l'intestin grêle

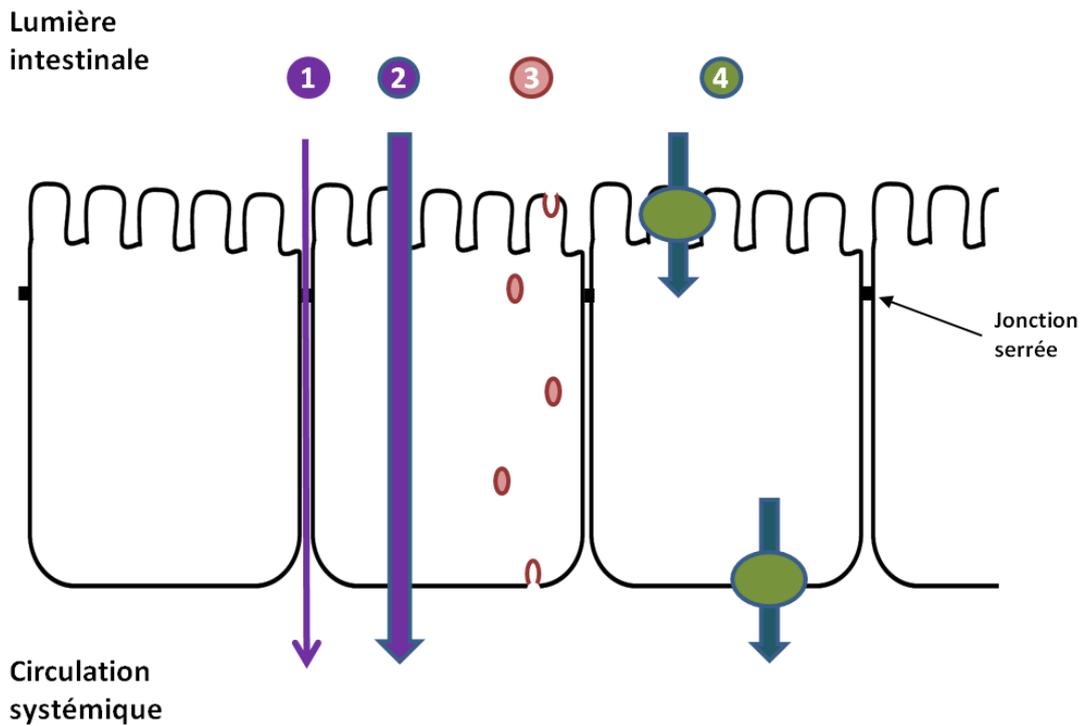
Bien qu'il existe d'autres organes (intestin, rein et poumons en particulier) capables de métabolisme, le foie est le principal organe de détoxification grâce à son système enzymatique performant. Il est impliqué dans le métabolisme de premier passage.

Pour une partie des molécules métabolisées, l'excrétion se produit par le foie via la bile et *in fine* les fèces. En fonction de leur clairance rénale, une fraction des molécules présentes dans la circulation générale sont excrétées par le rein et éliminées via l'urine.

### **2.1.2 La barrière intestinale est un organe spécialisé dans l'absorption sélective**

Lors d'une exposition orale, l'intestin grêle est, après l'estomac, l'un des premiers organes d'absorption rencontré. Cet organe est divisé en trois parties : duodénum, jéjunum et iléon (respectivement 5%, 50% et 45% de la longueur de l'organe). Il réalise l'essentiel de l'absorption des nutriments, des composés thérapeutiques mais aussi des molécules toxiques (Oostendorp et al 2009). Ses capacités d'absorption sont permises à la fois par sa longueur, sa structure permettant une grande surface d'échange (**cf. Figure 12**) et ses cellules spécialisées dans l'absorption : les entérocytes (Ganong 2005). Les entérocytes sont des cellules épithéliales polarisées de structure cylindrique avec des microvillosités sur la face apicale du cylindre (**cf. Figure 12**). L'essentiel de l'absorption des nutriments se déroule dans le jéjunum. Cependant, il est intéressant de noter quelques exceptions. Ainsi, le fer est absorbé au niveau du duodénum, la vitamine B<sub>12</sub> et les sels biliaires au niveau de l'iléon tandis que l'eau et les lipides sont absorbés tout au long de l'intestin grêle (Beedholm-Ebsen et al 2010). Les deux fonctions principales de l'intestin peuvent paraître contradictoires de premier abord. En effet, il s'agit à la fois d'absorber efficacement les nutriments, les fluides et les électrolytes et de refluer les substances potentiellement antigénique ou toxique (Knutson Lars 2001). Ainsi, l'épithélium intestinal dispose d'une perméabilité sélective en favorisant l'absorption des molécules nutritives et en limitant l'absorption de composés toxiques.

La perméabilité peut être paracellulaire ou transcellulaire en fonction des molécules (**cf. Figure 13**). La perméabilité paracellulaire s'effectue par passage entre les cellules au niveau des espaces intercellulaires formés par les jonctions serrées (**cf. Figure 13 voie 1**). Ce type de perméabilité concerne uniquement les petites molécules dont le diamètre est inférieur à celui des pores soit environ 11 Angström (Keita & Söderholm 2010; Linnankoski et al 2010; Pade & Stavchansky 1997; Smith 2001). La grande majorité des molécules passe donc la barrière intestinale par perméabilité transcellulaire,



**Figure 13 : Passage de la barrière intestinale.**

- 1 : voie paracellulaire passive par les jonctions serrées
- 2 : voie transcellulaire par diffusion passive simple
- 3 : voie transcellulaire active par endocytose, transcytose puis exocytose
- 4 : voie transcellulaire permise par des transporteurs au niveau des membranes apicale et basolatérale

au travers des entérocytes, nécessitant que les molécules traversent deux membranes cellulaires (**cf. Figure 13**). Ainsi, l'absorption des molécules au niveau de la membrane apicale des entérocytes puis leur excrétion à travers la membrane basolatérale sont nécessaires pour que les molécules puissent atteindre la circulation systémique. Il est important de noter qu'après la première étape, les molécules peuvent être effluées vers la lumière intestinale après ou sans biotransformation.

L'ensemble de ces mécanismes va donc définir la biodisponibilité des xénobiotiques, comme les microcystines, après ingestion.

### **2.1.3 Traversée de la barrière intestinale**

#### *2.1.3.1 Absorption des xénobiotiques de la lumière intestinale vers les entérocytes*

Il existe différents mécanismes d'absorption au niveau cellulaire (**cf. Figure 13 voies 2, 3 & 4**). Tout d'abord la majorité des molécules lipophiles traversent aisément les membranes plasmiques par diffusion passive simple. D'autres molécules sont internalisées par endocytose ou pinocytose au niveau de la membrane apicale des entérocytes. Elles traversent la cellule par transcytose dans des endosomes avant d'être relarguées dans le milieu intérieur au niveau de la membrane basolatérale des entérocytes (Keita & Söderholm 2010; Oostendorp et al 2009).

L'entrée de xénobiotiques dans les entérocytes est également permise par des transporteurs. Ils participent à la perméabilité sélective de la BI et sont le plus souvent des transporteurs passifs (Oostendorp et al 2009) qui utilisent l'énergie contenue dans les gradients de concentration pour transférer les molécules de part et d'autre des membranes plasmiques. Parmi les ceux-ci, deux types sont distingués. Tout d'abord, les simples canaux qui ne changent pas de conformation et qui forment donc des pores sélectifs dans la membrane plasmique des cellules. L'absorption des molécules à travers ceux-ci ne dépend que du gradient de concentration et est totalement indépendant de la température. Ensuite, il existe des transporteurs dit de « diffusion facilitée » (Keita & Söderholm 2010; Li 2001). Leur interaction avec les molécules induit un changement de leur conformation qui permet à la molécule de traverser la membrane plasmique. Ce passage est permis soit par l'énergie du gradient de la molécule d'intérêt soit grâce à l'énergie contenue dans le gradient d'une autre molécule, on parle alors de co-transport.

Le transport passif est le principal système de transport intervenant dans l'absorption de xénobiotiques et dépend fortement de la nature physicochimique des molécules (Li 2001; Oostendorp et al 2009). L'une des différences essentielle entre les

mécanismes de diffusion simple et de diffusion facilitée repose sur la rapidité de l'influx réalisé. En effet, le passage de la membrane cellulaire est beaucoup plus rapide avec un transporteur (Oostendorp et al 2009). De plus, il est intéressant de noter que la baisse de la température limite le changement de conformation des protéines par la baisse de fluidité de la membrane plasmique. Ainsi, les transporteurs de diffusion facilitée ont leur efficacité diminuée par une baisse de la température.

#### *2.1.3.2 Les OATPs : des transporteurs clé dans l'absorption des xénobiotiques*

La majorité des transporteurs d'influx localisés à la membrane apicale des entérocytes appartiennent à la famille des « solute carrier transporter ». Elle regroupe les familles (Oostendorp et al 2009):

- des « solute carrier organic anion transporter » (SLCO) dont les protéines sont nommées OATPs et les gènes SLCO.
- des « solute carrier peptide transporter » dont la protéine est nommée PepT1 et le gène SLC15A1
- des « organic anion zwitterion/cation transporter » dont les protéines sont nommées OCTN et les gènes SLC22.

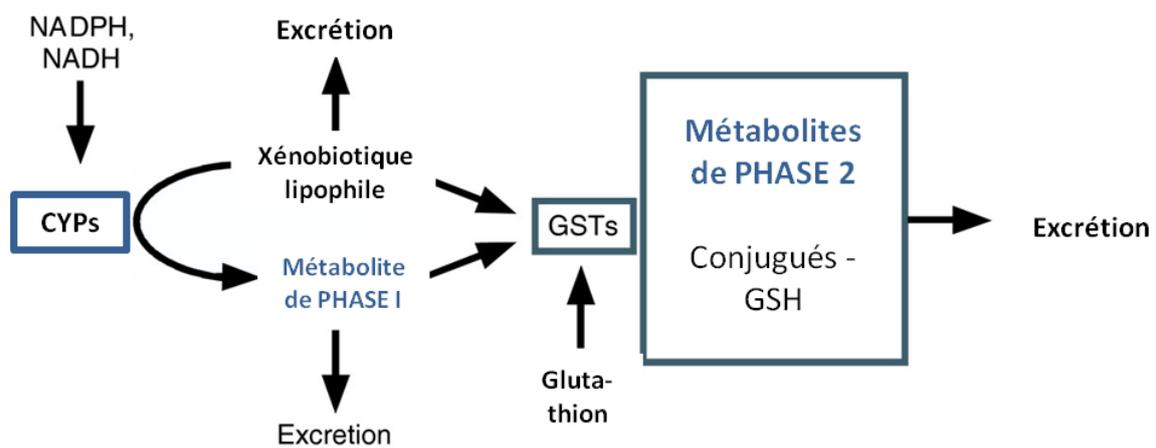
Parmi les transporteurs précédemment décrits, seule l'implication des OATPs dans le transport des MCs a été rapportée (Fischer et al 2005).

Chez l'Homme, 11 protéines sont regroupées dans la famille des OATPs. Ces transporteurs sont constitués de 12 hélices transmembranaires (Hagenbuch & Meier 2003). Le mécanisme d'absorption mis en jeu par les OATPs n'est pas complètement élucidé. Une étude basée sur l'analyse *in silico* de la structure des OATPs suggère un mécanisme de diffusion facilitée avec changement de conformation de type rocker-switch (Meier-Abt et al 2006).

Les OATPs sont des acteurs importants de l'ADME des xénobiotiques en particulier en raison de leur faible spécificité de substrat (Oostendorp et al 2009; Sasaki et al 2002). En effet, celle-ci permet à de nombreux xénobiotiques de pénétrer la barrière intestinale et donc de passer la première barrière de la perméabilité sélective de l'intestin (Konig et al 2006; Oostendorp et al 2009). Cependant, l'absence d'inhibiteur spécifique de ces transporteurs ne permet pas de caractériser exactement leur rôle dans l'influx de nombreuses molécules (Oostendorp et al 2009). Ainsi grâce à des compétiteurs comme le taurocholate leurs rôles dans l'absorption de nombreuses molécules a pu être mis en évidence (**cf. introduction paragraphe 2.1.3**). Cependant, il reste difficile de caractériser

l'implication de chaque isoformes qui de plus, n'ont certainement pas toutes été identifiées.

Des études ont montré l'expression des ARNm des OATP1A2 et 2B1 au niveau intestinal chez l'homme sans qu'il y ait confirmation de leur expression protéique. Nous pouvons y ajouter les OATP 3A1 et 4A1 qui sont considérés comme ubiquitaires (Englund et al 2006; Meier et al 2007).



**Figure 14 : Schéma simplifié du métabolisme cellulaire d'après (McElwee, Schuster et al. 2007)**

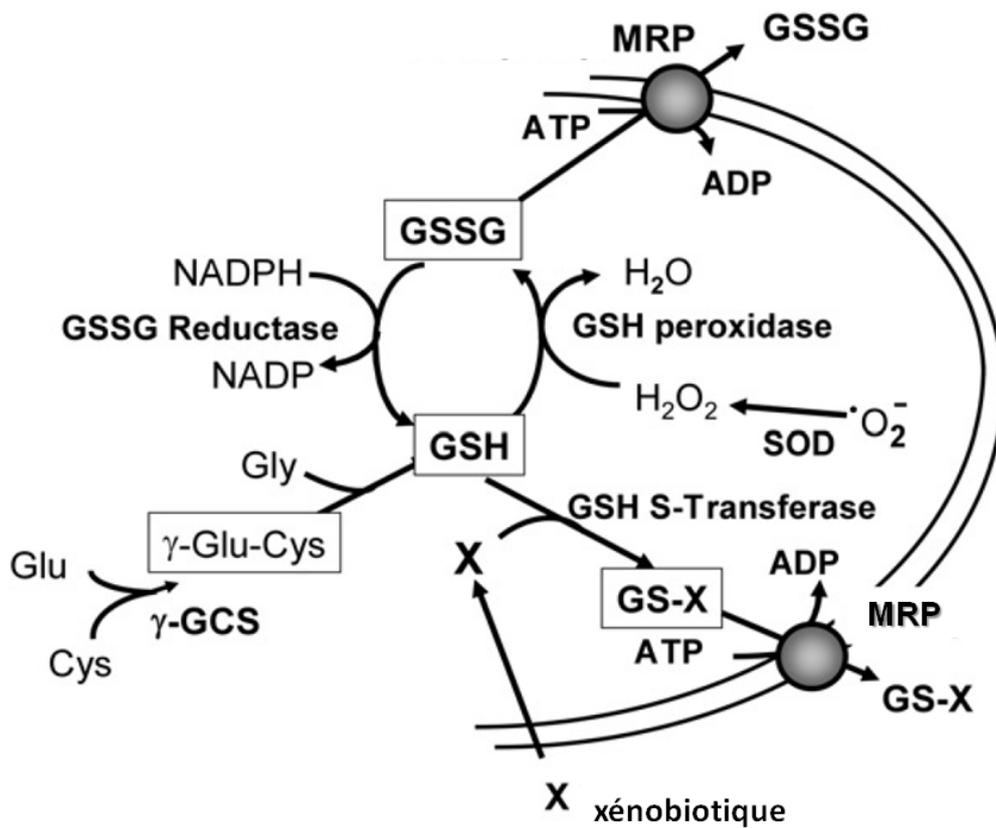
#### **2.1.4 Les entérocytes métabolisent les xénobiotiques**

Au cours des dernières années, il a été montré que l'intestin grêle possédait la capacité de métaboliser une partie des xénobiotiques (Glaeser et al 2004; Von Richter et al 2001). Cependant les informations sur le métabolisme intestinal sont encore parcellaires en particulier en ce qui concerne les activités enzymatiques de métabolisation le long du tractus digestif (Mitschke et al 2008). Classiquement le métabolisme des xénobiotiques est décrit en deux phases. La phase I, ou phase de fonctionnalisation, regroupe les réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse. La famille des cytochromes P450 regroupent les acteurs majeurs du métabolisme de phase I. La phase II, ou phase de conjugaison, regroupe les réactions de méthylation, de sulfo-conjugaison, de glucurono-conjugaison, de conjugaison aux acides aminés, d'acétylations, d'acylations, de trans-sulfurations et de conjugaisons au glutathion. Les cibles de ces conjugaisons sont tout autant les xénobiotiques eux-mêmes que leurs métabolites issus du métabolisme de phase I lorsqu'ils ne sont pas facilement excrétés par la cellule. Ces conjugaisons sont catalysées par une batterie d'enzymes de phase II (y compris UDP-glucuronosyl-transférases, sulfo-transférases, acétyl-transférases ou glutathion-s-transférases). Elles génèrent des molécules plus hydrophiles qui pourront être facilement excrétées par les cellules grâce, par exemple, aux pompes de la famille MRP (Lison & Lauwerys 2007) (**cf. Figure 14, cf. introduction paragraphe 2.1.5**).

#### **2.1.5 L'excrétion intestinale des xénobiotiques dépend souvent d'un mécanisme actif**

L'intestin représente une barrière physique entre deux compartiments : la lumière intestinale et la circulation systémique. Ainsi une fois dans le compartiment cellulaire, une molécule peut:

- être métabolisée avant une éventuelle excrétion.
- être effluée au niveau de la membrane apicale des entérocytes vers la lumière intestinale
- être effluée au niveau de la membrane basolatérale vers la circulation systémique.



**Figure 15 : Rôle des MRPs dans l'excrétion des xénobiotiques et la régulation du statut redox intracellulaire d'après (Toyoda, Hagiya et al. 2008)**

La grande majorité des transporteurs mis en jeu dans ces phénomènes d'efflux sont des transporteurs actifs et appartiennent à la famille des transporteurs ABC qui comporte au moins 48 membres chez l'homme (Cascorbi 2006; Leslie et al 2005).

Les transporteurs actifs sont classiquement assimilés à des pompes. En effet, ces protéines sont capables de transporter les molécules à travers les membranes cellulaires contre leur gradient de concentration (Cascorbi 2006; Leslie et al 2005). Leur fonctionnement est ATP-dépendant et est donc dépendant de la température. Au niveau de la barrière intestinale, la majorité des transporteurs actifs appartiennent à la famille des « ATP binding cassette » (ABC). Au sein de cette famille, trois sous-familles sont particulièrement représentées aussi bien à la membrane apicale que basolatérale des cellules épithéliales de l'intestin (Oostendorp et al 2009) :

- les P-glycoprotéines (P-gp) dont les protéines sont nommées MDR1 et les gènes ABCB1
- les « multi drug resistances proteins » dont les protéines sont nommés MRPs et les gènes ABCC
- les « breast cancer resistant proteins » dont les protéines sont nommés BCRPs et les gènes ABCB2

Les pompes les plus étudiées et les mieux connues sont la P-gp et les MRPs.

#### *2.1.5.1 La P-gp est la pompe d'efflux la mieux connue*

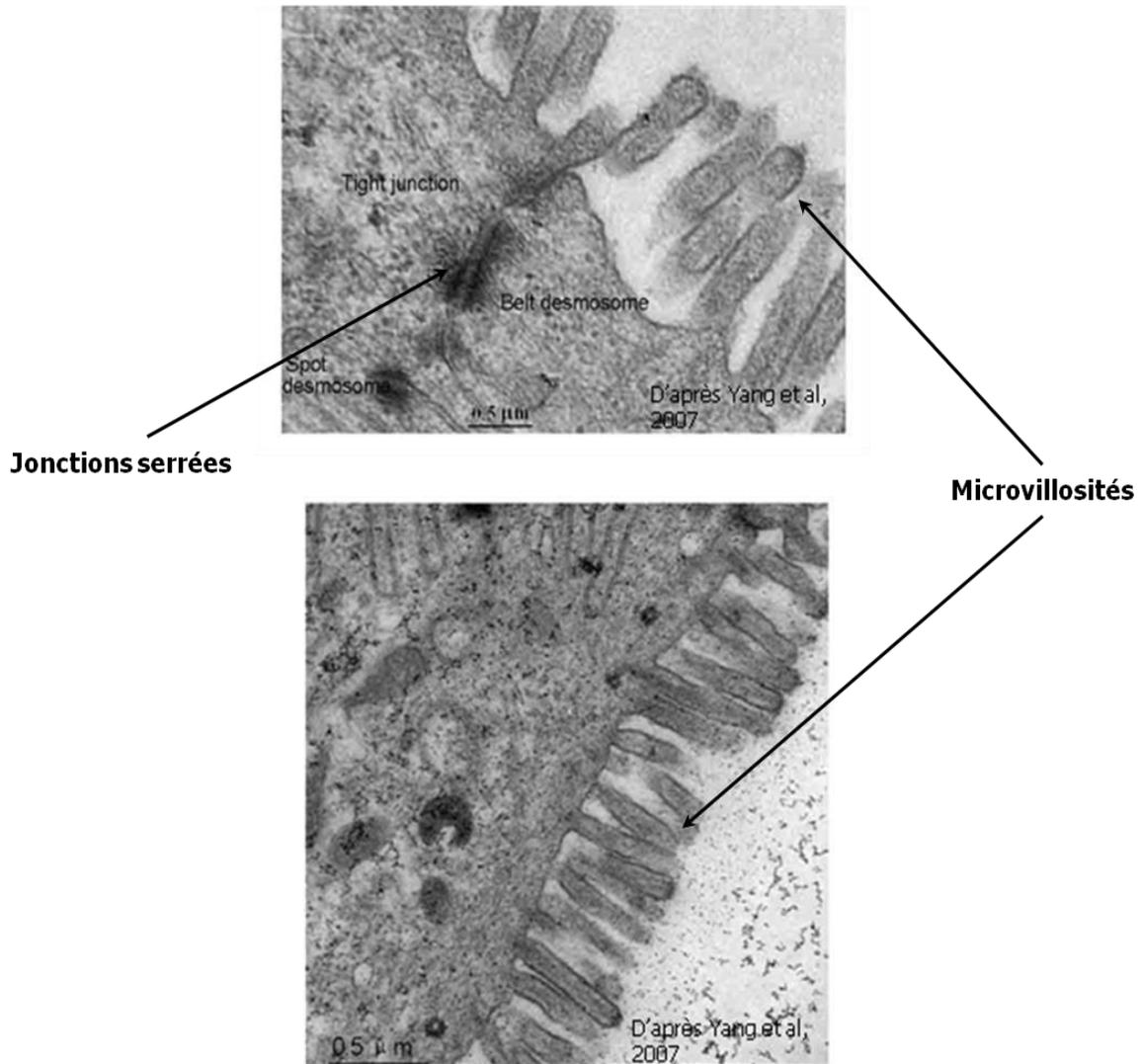
La P-glycoprotéine est certainement la pompe d'efflux la mieux connue et la plus étudiée. Comme tous les transporteurs de la famille des ABC, la P-gp nécessite de l'ATP pour son fonctionnement (Nagata et al 2000). Ces protéines sont localisées à la membrane apicale des entérocytes (Dietrich et al 2003; Glaeser et al 2007; Trezise et al 1992) et sont classiquement considérées comme des protéines clés dans la perméabilité intestinale. En effet, elles limitent l'absorption de nombreuses drogues ou toxines en les excréant vers la lumière intestinale (Ambudkar et al 2003; Borst & Schinkel 1996; Fromm 2003; Oostendorp et al 2009; Schinkel et al 1994).

#### *2.1.5.2 Les MRPs excrètent les conjugués au glutathion*

La découverte des MRPs remonte au début des années 90 avec l'identification de MRP1 (Cascorbi 2006). Chez l'homme 9 membres (MRP1 à MRP9) ont été identifiés

(Toyoda et al 2008). Ils participent largement à l'excrétion des conjugués au glutathion (**cf. Figure 15**)(Dietrich et al 2003; Toyoda et al 2008) même s'il n'est pas encore clairement défini de quelle manière (Ballatori et al 2009). Parmi ces transporteurs, MRP1 et MRP2 sont les mieux connus. Le MRP1 est localisé à la membrane basolatérale des cellules de l'intestin grêle et du colon (Flens et al 1996; Oostendorp et al 2009; Peng et al 1999) et participe donc à la perméabilité intestinale de certaines molécules comme la vitamine B<sub>12</sub> (Allen et al 2000; Beedholm-Ebsen et al 2010; Oostendorp et al 2009). Au contraire, le MRP2 est localisé à la membrane apicale et joue un rôle fonctionnel dans l'efflux de nombreuses drogues et de leurs conjugués au glutathion vers la lumière intestinale (Jedlitschky et al 1997; Oostendorp et al 2009).

- ❖ ***La barrière intestinale est un organe clé de l'ADME.***
  
- ❖ ***Pour des molécules ingérées, l'intestin est le premier organe rencontré présentant un large potentiel d'absorption.***
  
- ❖ ***Quatre mécanismes différents sont impliqués dans le processus de perméabilité intestinale.***
  
- ❖ ***Lors d'une absorption transcellulaire, les molécules doivent traverser la membrane apicale et la membrane basolatérale des entérocytes pour atteindre la circulation systémique***
  
- ❖ ***Les OATPs, les MRPs et les P-gp sont des protéines clés de la perméabilité intestinale.***



**Figure 16 : Caractéristiques morphologiques des Caco-2 différenciées en microscopie électronique d'après Yang et al 2007**

## 2.2. 2.2 Les Caco-2 : un modèle de barrière intestinale

### 2.2.1 Les Caco-2 sont un modèle classique d'entérocytes

La lignée cellulaire Caco-2 est issue d'un adénocarcinome de colon humain et a été établie en 1977 par Fogh *et al* (Fogh et al 1979). L'intérêt de ces cellules réside dans leur capacité à se différencier spontanément en cellules polarisées acquérant des caractéristiques morphologiques et biochimiques d'entérocytes humains (Hidalgo et al 1989; Pinto et al 1983; Rousset 1986). En effet, elles forment, 3 semaines après confluence, un épithélium avec des jonctions serrées, présentent une bordure en brosse à leur membrane apicale et produisent des hydrolases intestinales (Pinto et al 1983; Sambuy et al 2005) (**cf. Figure 16**).

Les Caco-2 expriment à la fois des enzymes de phase I et de phase II. Leurs présences a été déterminées aussi bien par PCR que par la mesure de leur activité grâce à des substrats spécifiques (Sambuy et al 2005). Cependant, les Caco-2 présentent un niveau d'expression et/ou d'activité de ces enzymes inférieures à celui des entérocytes. Plus précisément, elles n'expriment que très faiblement les cytochromes P450 3A qui font partis des acteurs majeurs du métabolisme des xénobiotiques (Carriere et al 2001; Glaeser et al 2007; Hayeshi et al 2008). Une autre caractéristique qui différencie les Caco-2 des entérocytes vient du fait qu'elles n'expriment pas de protéines P53 fonctionnelles mais seulement une P53 tronquée (Lee et al 2008; Liu & Bodmer 2006). Elles possèdent aussi un niveau basal de protéines anti-apoptotiques BCL2-associated X (Bcl-x<sub>l</sub>) très élevé et un niveau de protéines pro-apoptotiques BCL2-like 1 (Bax) très faible. Or la valeur du ratio Bcl-x<sub>l</sub> / Bax est, comme l'expression de la P53, un élément clé de l'entrée en apoptose des cellules (Ray et al 2011).

Les Caco-2 sont équipées de la plupart des transporteurs connus pour être présent à la barrière intestinale humain dans des proportions similaires (**cf. Tableau 4**) (Sun et al 2008a). Cependant leurs niveaux d'expression semblent dépendre des conditions de culture (nombre de passages, temps de différenciation, composition du milieu, nature du support, agitation) (Sambuy et al 2005; Volpe 2008). Cette variabilité est sans doute la cause des fortes différences qui ont pu être observées entre les résultats de différents laboratoires et la cause d'une des limites de ce modèle cellulaire (Artursson et al 2001; Hayeshi et al 2008; Sambuy et al 2005; Volpe 2008).

**Tableau 4 : Comparaison du niveau d'expression de gènes intervenant dans l'ADME entre les Caco-2 différenciées et l'intestin humain.** Les protéines associées aux gènes sont mentionnées entre parenthèses. 0 : absent ; +/-, +, ++, +++ : niveau d'expression respectivement très faible, faible, moyen et fort. ND : non déterminé

***Niveau d'expression des gènes associés aux transporteurs d'influx (OATP)***

<i>nom</i>	<i>jéjunum</i>	<i>duodénum</i>	<i>colon</i>	<i>caco-2</i>	<i>SOURCES</i>
<b><i>SLCO1A2</i></b> <b><i>(OATP 1A2)</i></b>	<b>+/-</b>	<b>++</b>	<b>0</b>	<b>+</b>	(Glaeser et al 2007; Hayeshi et al 2008; Hilgendorf et al 2007; Maubon et al 2007)
<b><i>SLCO1B1</i></b> <b><i>(OATP 1B1)</i></b>	<b>0</b>	<b>++</b>	<b>0</b>	<b>+/-</b>	(Glaeser et al 2007; Hayeshi et al 2008; Hilgendorf et al 2007; Maubon et al 2007)
<b><i>SLCO1B3</i></b> <b><i>(OATP 1B3)</i></b>	<b>0</b>	<b>+</b>	<b>0</b>	<b>+/-</b>	(Glaeser et al 2007; Hayeshi et al 2008; Hilgendorf et al 2007; Maubon et al 2007)
<b><i>SLCO2B1</i></b> <b><i>(OATP 2B1)</i></b>	<b>++</b>	<b>+++</b>	<b>+</b>	<b>+++</b>	(Glaeser et al 2007; Hayeshi et al 2008; Hilgendorf et al 2007; Maubon et al 2007; Sai et al 2006)
<b><i>SLCO3A1</i></b> <b><i>(OATP 3A1)</i></b>	<b>+</b>	<b>ND</b>	<b>0</b>	<b>+</b>	(Hayeshi et al 2008; Hilgendorf et al 2007; Sai et al 2006)
<b><i>SLCO4A1</i></b> <b><i>(OATP 4A1)</i></b>	<b>+</b>	<b>ND</b>	<b>+</b>	<b>+++</b>	(Hayeshi et al 2008; Hilgendorf et al 2007; Sai et al 2006)

### Niveau d'expression des gènes associés aux pompes d'efflux (ABC)

<i>nom</i>	jéjunum	duodénum	colon	caco-2	<i>sources</i>
<b>ABCB1</b> ( <i>P-gp</i> )	+++	+++	++	++	(Glaeser et al 2007; Hayeshi et al 2008; Hilgendorf et al 2007; Maubon et al 2007)
<b>ABCC1</b> ( <i>MRP 1</i> )	++	+++	+	++	(Glaeser et al 2007; Hayeshi et al 2008; Hilgendorf et al 2007; Maubon et al 2007)
<b>ABCC2</b> ( <i>MRP2</i> )	+	+	0	+++	(Glaeser et al 2007; Hayeshi et al 2008; Hilgendorf et al 2007; Maubon et al 2007)
<b>ABCC4</b> ( <i>MRP 4</i> )	+	+	+	++	(Hayeshi et al 2008; Hilgendorf et al 2007; Maubon et al 2007)

### Niveau d'expression des gènes associés aux enzymes du métabolisme (CYP et GST)

<i>nom</i>	jéjunum	duodénum	colon	caco-2	<i>sources</i>
<b>GSTa</b>	ND	ND	ND	+++	(Hayeshi et al 2008)
<b>Cyp1A1</b>	ND	++	ND	ND	(Glaeser et al 2007)
<b>Cyp1A2</b>	ND	+/-	ND	0	(Glaeser et al 2007; Hayeshi et al 2008)
<b>Cyp3A4</b>	ND	++	ND	+/-	(Glaeser et al 2007; Hayeshi et al 2008)
<b>Cyp3A5</b>	ND	+++	ND	ND	(Glaeser et al 2007)

### 2.2.2 Les Caco-2 sont un bon modèle pour étudier l'absorption des molécules lipophiles

Le modèle *in vitro* d'épithélium intestinal Caco-2 est aussi largement utilisé pour les études de perméabilité des molécules pharmaceutiques (Carriere et al 2001; Sun et al 2008a). La technique de culture sur inserts permet d'étudier de manière assez fidèle la perméabilité des molécules lipophiles. En effet pour ce type de molécules, le niveau de perméabilité est corrélé à la surface d'échange entre le compartiment simulant la lumière intestinale et la cellule. La morphologie des Caco-2 différenciées (microvillosité et jonctions serrées, **cf. Figure 16**) permet donc d'observer une bonne corrélation entre les données obtenues *in vitro* et celles obtenues *in vivo* (Artursson et al 2001; Bailey et al 1996). Ces résultats font d'ailleurs suggérer à Artursson *et al.* que seule une partie de la surface anatomique de l'intestin (le sommet des villosités) participe à l'absorption de ce type de molécules (Artursson et al 2001).

Cependant, ce modèle n'est pas un bon outil prédictif de la perméabilité *in vivo* de molécules traversant de manière paracellulaire ou empruntant des transporteurs (Artursson et al 2001; Lennernas 1998). En effet, les pores formés par les jonctions serrées des Caco-2 sont inférieurs en diamètre à ceux de l'intestin humain (Linnankoski et al 2010).

Enfin, concernant les molécules prises en charge par des transporteurs, l'implication de plusieurs transporteurs et les niveaux d'expression de ceux-ci peuvent expliquer la faible corrélation entre les données obtenues sur les modèles *in vitro* et celles obtenues *in vivo* (Artursson et al 2001; Hayeshi et al 2008; Lennernas 1998). Les MCs appartenant à ce type de molécules (**cf. introduction paragraphe 2.3**), le passage de la barrière intestinale peut être étudié à l'aide des cellules Caco-2 sans pour autant pouvoir prédire avec précision leur taux d'absorption chez l'Homme (Artursson et al 2001; Lennernas 1998).

### **2.2.3 Les Caco-2 sont classiquement utilisées pour étudier les mécanismes d'ADME intestinal des xénobiotiques**

Ces cellules sont classiquement utilisées comme modèle intestinal pour évaluer les effets ou les mécanismes mis en jeu suite à un traitement et plus particulièrement les interactions médicamenteuses (Béaslas et al 2008; Chicault et al 2006). Ainsi, ces dernières années, des modèles mathématiques bicaténaires ont été développés pour permettre de prédire les mécanismes de transport de molécules au niveau de la membrane apicale et de la membrane basolatérale (Blaser 2007; Sun et al 2008b). Le modèle Caco-2 est donc principalement utilisé à des fins mécanistiques afin d'évaluer si les molécules sont transportées de manière passive ou active à travers la BI ainsi que d'identifier les transporteurs mis en jeu. La popularité de ce modèle pour les études pharmaco et toxico-cinétiques s'explique sans doute par sa facilité de mise-en-œuvre et par la faible quantité de molécule requise pour mener à bien les études (Artursson et al 2001).

- ❖ ***La lignée cellulaire Caco-2 est un modèle classique d'épithélium intestinal in vitro.***
  
- ❖ ***Les Caco-2 sont classiquement utilisées pour étudier les mécanismes d'absorption de xénobiotiques.***
  
- ❖ ***Les Caco-2 expriment la majorité des transporteurs intestinaux.***



## **2.3 Absorption intestinale des microcystines**

### **2.3.1 Les microcystines traversent la barrière intestinale**

Comme nous l'avons dit précédemment, la principale voie d'exposition aux MCs est la voie orale (**cf. introduction paragraphe 1.3**). La capacité des MCs à traverser la barrière intestinale a été confirmée aussi bien chez les poissons (Bury et al 1998; Djediat et al 2010) que chez les rongeurs (rats et souris) (Dahlem et al 1989; Falconer et al 1988; Fawell et al 1999; Ito et al 1997a; Ito et al 2000) ou que chez l'homme (Chen et al 2009a). Cependant, seule une fraction réduite de la dose de toxine passe la BI aussi bien chez la souris que chez la truite (environ 1% et 0,3 % respectivement) (Bury et al 1998; Nishiwaki et al 1994). Ainsi, les doses létales 50 (DL50<sup>2</sup>) constatées après exposition orale de rongeurs aux MCs sont 3 à 100 fois supérieures à celles observées après injection intrapéritonéale (Fawell et al 1999; Yoshida et al 1997). Ainsi, il apparaît que l'intestin représente probablement une barrière pour la biodisponibilité par voie orale des MCs (Gaudin et al 2008).

### **2.3.2 Mécanismes de passage de la barrière intestinale par les microcystines (cf. Figure 17)**

#### *2.3.2.1 Les MCs ne traversent pas les épithéliums intestinaux intègres par la voie paracellulaire*

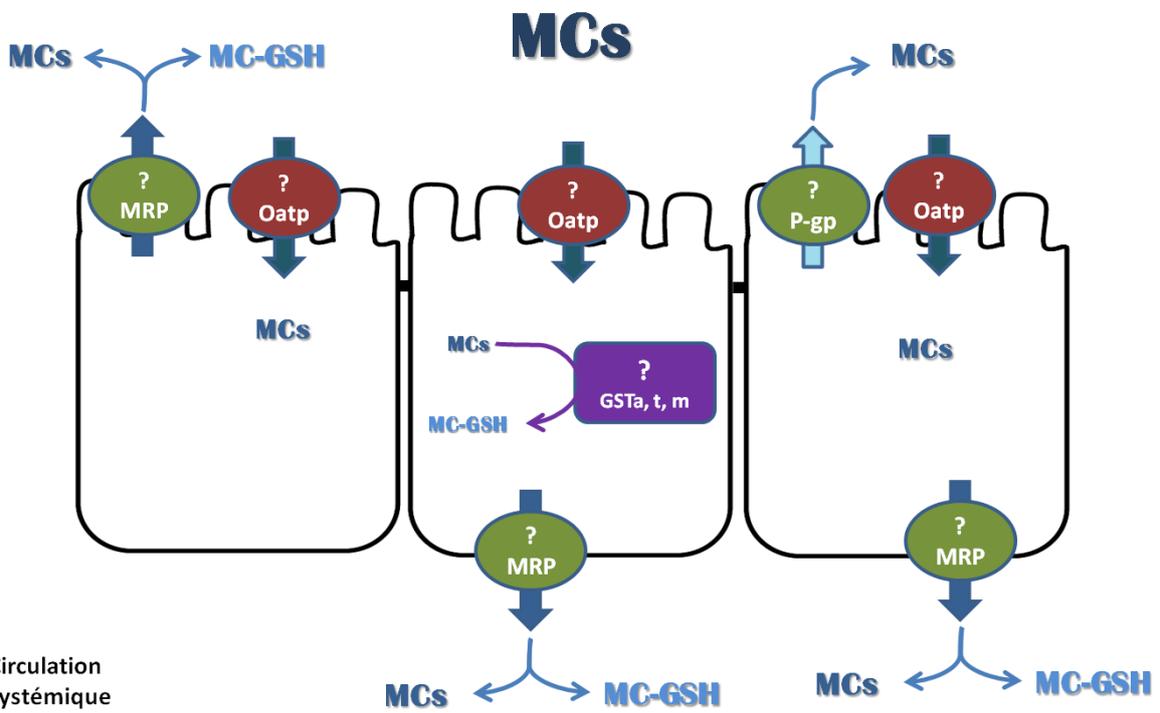
Compte tenu de la taille des MCs (960-110 kDa soit environ 20 angström (Chorus 2001; Lee 2009), et de celle des pores formés par les jonctions serrées de l'épithélium intestinal (inférieure à 11 Angström pour l'intestin humain (Linnankoski et al 2010)), les MCs ne semblent pas pouvoir emprunter la voie d'absorption paracellulaire.

Cependant, il est possible que les MCs aient une action sur la perméabilité des jonctions serrées. En effet, il a été montré que l'acide okadaïque, autre toxine inhibitrice des PPs à Ser/thr, induit une ouverture des jonctions serrées des monocouche de Caco-2

---

<sup>2</sup> DL50 : dose de toxine induisant la mort de la moitié des individus traités

Lumière intestinale



Circulation systémique

**Figure 17 : Schéma représentant l'état des connaissances sur les mécanismes de passage de la barrière intestinale par les MCs**

différenciées (Okada et al 2000). De plus, le tissu intestinal perd sa cohésion après exposition orale à la MC-LR. Les jonctions serrées entre entérocytes sont altérées et l'ancrage à la lame basale est largement diminuée (Djediati et al 2010; Ito et al 1997a; Ito et al 2000). Dans de telles conditions, il serait alors envisageable que les MCs traversent la barrière intestinale par la voie paracellulaire.

### *2.3.2.2 Les microcystines traversent la barrière intestinale par la voie transcellulaire, ADME intestinal des microcystines*

#### *2.3.2.2.1 Les microcystines sont absorbées par les entérocytes*

La toxicité hépatique des MCs par voie orale suggère qu'elles doivent être capables de passer au travers de la barrière intestinale (Chen et al 2009a; Dahlem et al 1989; Falconer et al 1988; Fawell et al 1999; Ito et al 1997a; Ito et al 2000). De plus, après exposition orale de souris à la MC-LR, non seulement la toxine est détectée dans les cellules intestinales par immunomarquage mais les entérocytes montrent une érosion de leurs villosités (Ito et al 1997a; Ito et al 2000; Ito et al 2001a) indiquant que les cellules intestinales sont capables d'absorber les microcystines. Cependant, compte tenu de leurs caractéristiques chimiques (taille, hydrophobicité...), les microcystines ne traversent pas facilement les membranes cellulaires (De Maagd et al 1999; Vesterkvist et al 2010; Vesterkvist & Meriluoto 2003). Ainsi, comme pour les hépatocytes, l'entrée dans la cellule intestinale doit être sous le contrôle de transporteurs.

A notre connaissance, seules deux équipes se sont intéressées aux mécanismes permettant aux entérocytes d'absorber les MCs. Bury *et al.* ont ainsi permis d'identifier que l'absorption des microcystines par l'intestin de truite se produisait par un mécanisme de diffusion passive ou de diffusion facilitée (Bury et al 1998). Par ailleurs, les résultats obtenus par Falconer *et al.* sur des entérocytes de poulet en culture suggèrent que, comme pour le foie, les OATPs sont des acteurs importants pour l'absorption des MCs (Falconer et al 1992). Cependant, les isoformes d'OATPs impliquées au niveau hépatique (OATP1B1 et 1B3) ne sont pas exprimées dans l'intestin (Hilgendorf et al 2007). De plus, la principale isoforme intestinale des OATPs (OATP2B1) ne transporte pas les MCs (Fischer et al 2005). Dans ce contexte, d'autres isoformes seraient responsables de l'absorption des MCs par les entérocytes. Parmi les candidats éventuels, 3 isoformes d'OATP, exprimées de manière ubiquitaire au sein de l'organisme (Hagenbuch & Gui 2008; Svoboda et al 2011), peuvent être préconisées : tout d'abord l'OATP 1A2 autre isoforme des OATPs capable de transporter les MCs (Fischer et al 2005), puis les OATP 3A1 et 4A1.

2.3.2.2.2 Les microcystines sont métabolisées sous forme de conjugués au glutathion

A ce jour, l'action des enzymes de phase I (**cf. introduction paragraphe 2.1.4**) sur les MCs reste un phénomène peu étudié. En effet, il a été montré que l'induction préalable des cytochromes P450 chez des souris pouvait augmenter significativement la survie de ces animaux exposés à des extraits de *Microcystis* (Brooks & Codd 1987). Il a aussi été constaté que la MC-LR induisait une augmentation de la transcription des cytochromes P450 1A2 et 2E1 (Han et al 2010; Hudder et al 2007; Nong et al 2007).

Cependant, le métabolisme de phase II des MCs a été rapidement découvert avec des conjugués au glutathion et à la cystéine (MC-GSH et MC-Cys) (Kondo et al 1992; Kondo et al 1996a; Pflugmacher et al 1998). Dans ces composés, le Mdha des MCs est relié au GSH par une liaison thiol. La formation de cette liaison est catalysée par la famille des glutathion-s-transférases (GSTs) (Pflugmacher et al 1998; Takenaka 2001). Dernièrement il a été montré que les GST $\alpha$ 1,  $\theta$ 1, and  $\mu$ 1, particulièrement exprimée au niveau hépatique et gastro-intestinal, sont les isoformes de GST les plus impliquées pour la formation du conjugué MC-LR-GSH (Buratti et al 2011). La formation de ces conjugués est d'ailleurs corrélée à une déplétion en GSH ce phénomène pouvant favoriser la génération ERO (**cf. introduction paragraphe 1.2.5.2**) (Bouaicha & Maatouk 2004; Ding et al 2000b).

La conjugaison au glutathion permet de détoxifier les MCs. En effet, les MC-GSH et MC-Cys sont moins toxiques *in vivo* que les molécules mères (Kondo et al 1992; Metcalf et al 2000). Cependant, l'effet de la conjugaison sur la capacité d'inhibition des PPs n'est pas clairement établi. En effet, pour Metcalf *et al.*, la conjugaison diminue le potentiel inhibiteur de la MC-LR (Metcalf et al 2000) tandis que pour Ito *et al.*, les potentiels d'inhibition ne sont pas modifiés (Ito et al 2002). En fait, la différence de toxicité observée *in vivo*, pourrait être due à une différence de toxicocinétique des conjugués. En effet, ceux-ci étant plus polaires, ils seraient plus facilement excrétés par la cellule ou via le système des MRPs par exemple connu pour prendre en charge les conjugués au GSH ((Ito et al 2002), **cf. introduction paragraphe 2.1.5**).

2.3.2.2.3 L'excrétion des microcystines est mal connue

Peu de données existent concernant l'excrétion des MCs. Cependant, elles sont retrouvées de manière peu abondante au bout de 6 jours (environ 25 % de la dose administrée) dans les fèces et les urines des souris exposées par injection intraveineuse (Ito et al 2000; Ito et al 2001a; Robinson et al 1991). La présence de MCs dans les fèces après exposition par intraveineuse indique que les MCs sont excrétées dans la lumière intestinale. Cette excrétion peut être d'origine intestinale ou biliaire comme l'indique la

présence des MCs dans le mucus et les cellules épithéliales de l'intestin après administration intraveineuse des MCs (Ito et al 2001a; Robinson et al 1991; Sahin et al 1996).

Le fait que les microcystines soient capables de traverser la barrière intestinale par la voie transcellulaire implique qu'il existe un mécanisme cellulaire d'excrétion leur permettant de passer du compartiment cellulaire à la circulation systémique (**cf. Figure 17**). Cependant, contrairement à l'absorption, ce mécanisme d'excrétion n'est absolument pas élucidé. Certains auteurs suggèrent que les P-gp pourraient jouer un rôle dans l'efflux des MCs du compartiment cellulaire vers la lumière intestinale. Ce phénomène expliquerait la résistance de certains organismes aquatiques (bivalves et poisson) ou de lignées cellulaires à l'effet de MCs (Amé et al 2009; Contardo-Jara et al 2008; de Souza Votto et al 2007). Compte tenu que la traversée de la BI par les MCs ne nécessite pas d'ATP chez la truite (Bury et al 1998), des transporteurs de type « diffusion facilitée » pourraient être impliqués dans cette excrétion (Ito et al 2002). Parmi les transporteurs potentiels, les MRPs mériteraient de plus amples investigations. En effet, certaines isoformes sont localisées à la membrane basolatérale des entérocytes et sont impliquées dans l'efflux des conjugués au GSH (Ahlin et al 2009; Glaeser et al 2007; Maubon et al 2007).

#### 2.3.2.2.4 Absorption des microcystines par le modèle Caco-2

Un certain nombre d'études récentes montre une réponse des Caco-2 différenciées et non différenciées à une exposition aux MCs (cytotoxicité, stress oxydant, apoptose) (Botha et al 2004a; Chong et al 2000; Petitpas Mélanie 2010; Puerto et al 2009; Puerto et al 2010b; Puerto et al 2010c). Cependant, tout comme les entérocytes, les Caco-2 n'expriment ni l'OATP 1B1 ni l'OATP 1B3 (Hayeshi et al 2008; Hilgendorf et al 2007). Il faut donc rechercher chez les Caco-2 des transporteurs potentiels des MCs. Les ARNm associés aux OATP 1A2, 3A1 et 4A1 ont été détectés dans ces cellules (Hayeshi et al 2008; Maubon et al 2007; Sai et al 2006; Yang 2007) mais la présence de ces transporteurs à la membrane des cellules n'a jamais été confirmée. Ces OATPs constituent donc de bons candidats pour l'absorption des MCs par les entérocytes.

❖ ***L'absorption intestinale des MCs se fait par la voie transcellulaire***

❖ ***L'absorption des MCs par les entérocytes se fait probablement par des OATPs***

❖ ***Les MCs sont métabolisées par les GST***

❖ ***La P-gp et les MRP sont des transporteurs candidats pour l'excrétion des MCs***

❖ ***Le modèle Caco-2 exprime certaines isoformes d'OATPs, de transporteurs d'efflux et d'enzymes du métabolisme les rapprochant des entérocytes***

### **3. Comparaison de la toxicité de deux variants de microcystines : la MC-LR et la MC-RR**

La toxicité des MCs a essentiellement été déduite des études menées avec la MC-LR. Cependant, il a été observé que la toxicité des autres variants peut différer de celle de la MC-LR. Ainsi, il doit exister des différences dans leurs mécanismes de toxicité (cinétique d'absorption, cible...). Cependant, aujourd'hui, l'évaluation du risque est basée principalement sur les données toxicologiques de la MC-LR. D'ailleurs seul ce variant est classé comme carcinogène potentiel (IARC 2010).

Dans ce contexte, nous avons choisi pour ce travail de comparer la MC-LR à un variant présentant à la fois une grande ressemblance structurale et une grande divergence de toxicité *in vivo*, la MC-RR.

#### **3.1. La MC-LR et la MC-RR n'ont pas la même toxicité**

##### **3.1.1 La MC-LR et la MC-RR ne produisent pas exactement les mêmes effets**

Comme nous l'avons indiqué précédemment (**cf. introduction paragraphe 1.2.1**), la MC-RR ne diffère de la MC-LR que par un seul acide aminé : une arginine à la place d'une leucine. Cependant, leur toxicité *in vivo* par ip sur rongeur diffère d'un facteur 5 à 10 (Chen et al 2006b; Gupta et al 2003). Des différences d'effet entre ces deux variants ont été également rapportées par d'autres auteurs. Un niveau de cytotoxicité de la MC-RR plus faible comparé à la MC-LR a été observé *in vitro* sur le modèle de cellules intestinales humaines Caco-2 (Puerto et al 2009; Puerto et al 2010b). De plus, la MC-RR induit moins de stress oxydant que la MC-LR dans le foie et les branchies du poisson tilapia après exposition ip (Prieto et al 2006).

**Tableau 5: Comparaison des effets de la MC-LR et de la MC-RR sur la PP1 et la PP2A** (CI50 : concentration inhibitrice 50%, nM; Ki : constante de dissociation nM, ND : non déterminé)

constante calculée	PP1		PP2A		Références
	LR	RR	LR	RR	
CI50	1,7	ND	0,04	ND	(Honkanen et al 1990)
CI50	0,1	ND	0,1	ND	(MacKintosh et al 1990)
CI50	6	3	2	1	(Eriksson et al 1990b)
CI50	0,78	ND	0,28	ND	(Nishiwaki-Matsushima et al 1991)
Ki	0,038 ± 5	ND	0,008 ± 1	ND	Takai 1995
Ki	0,28 ± 0,02	0,27 ± 0,04	0,013 ± 0,003	0,022 ± 0,005	(Ito et al 2002)
CI50	ND	ND	0,46 ± 9,9	0,6 ± 1,7	(Robillot & Hennion 2004)
CI50	0,2	ND	0,08	ND	(Hastie et al 2005)
CI 50	0,3 ± 0,1	1,7 ± 0,1	0,4 ± 0,4	58 ± 3	(Chen et al 2006b)
CI50	1,4 ± 0,3	6,9 ± 0,01	0,18 ± 0,01	22 ± 7	(Monks et al 2007)
CI50	2,5 [1,7;3,7]	1,9 [1,3;3]	0,68 [0,64; 0,78]	0,75 [0,59;0,96]	(Hoeger et al 2007)
CI 50	1,2 [1,1;1,4]	1,5 [1,3;1,6]	0,9 [0,7; 1,1]	0,9 [0,7;1,1]	(Fischer et al 2010)

Sur la lignée hépatique de poisson PLHC-1, la MC-LR induit des lésions générales (augmentation des vésicules de sécrétion, diminution du nombre de cellules, arrondissement des cellules et réduction de leur taille) de manière plus intense avec la MC-LR que la MC-RR (Pichardo et al 2005). Sur cette même lignée cellulaire, la MC-RR induit plus particulièrement des signes de stéatose ainsi qu'une baisse significative du contenu protéique à des doses plus faibles que la MC-LR (Pichardo et al 2005). Cependant, il semble que, si les dommages hépatiques sont plus sévères avec la MC-LR, le rein est plus touché avec la MC-RR (Atencio et al 2008a). Ces quelques études suggèrent donc qu'il y a des différences d'effet entre ces deux variants.

### **3.1.2 La MC-LR et la MC-RR inhibent les PPs de manière similaire**

Comme nous l'avons indiqué, les PPs sont les cibles principales des MCs (**cf. introduction paragraphe 1.2.5.1**). Il a ainsi été constaté qu'il existait une bonne corrélation entre le niveau d'inhibition des PP2A pour les différents variants de MCs et leur DL50 par ip (Chen et al 2006b). Cependant, cette règle ne peut s'appliquer à tous les variants. En effet, après injection intratrachéale, la MC-RR est moins toxique (DL50 ~ 1000µg/kg) que la MC-LR (DL50~75µg/kg) alors que leurs coefficients d'inhibition des PPs intracellulaires sont similaires (Ito et al 2002) (**cf. Tableau 5**)

De plus, la plupart des études portant sur la capacité d'inhibition des PP1 et PP2A par la MC-LR et la MC-RR ne montrent aucune différence statistiquement significative même si la MC-RR apparaît systématiquement moins puissante que la MC-LR (**cf. Tableau 5**).

Compte tenu de ces éléments, il semblerait que la nette différence de toxicité entre ces deux variants ne soit pas due à une différence d'inhibition des PPs.

### **3.1.3 Les autres cibles**

D'autres cibles de la MC-LR ont été suggérées ces dernières années comme l'ALDH2 ou l'ATP synthase mitochondriale (Chen et al 2006a; Mikhailov et al 2003). Cependant, à notre connaissance, l'effet de la MC-RR sur ces cibles potentielles ou sur l'induction du stress du réticulum endoplasmique n'a pas été étudié. Ainsi une meilleure connaissance de la toxicité spécifique de ce variant permettrait peut être d'identifier d'autres pistes que la simple différence d'inhibition des PPs qui permettraient d'explicitier

la différence de toxicité entre les variants de MCs. Celle-ci pourrait s'expliquer par une différence de mécanisme d'action ou une différence dans leur ADME respectif.

- ❖ ***La MC-LR et la MC-RR ne diffère que d'un acide aminé.***
  
- ❖ ***La MC-LR est plus toxique que la MC-RR après administration intrapéritonéale in vivo.***
  
- ❖ ***Les effets toxiques des deux variants ne sont pas systématiquement identiques.***

### **3.2 La différence d'hépatotoxicité entre la MC-LR et la MC-RR est expliquée par une différence d'absorption par les hépatocytes**

A partir d'un pH supérieur à 6, les coefficients de partage eau-octanol de la MC-LR et de la MC-RR présentent des profils complètement similaires en fonction du pH (Liang et al 2011). La MC-RR n'a donc pas plus de facilité que la MC-LR pour passer les membranes cellulaires.

Cependant, des différences d'absorption ont été signalées au niveau hépatique. En effet, il a été montré récemment que les OATP 1B1 et 1B3 transportent plus facilement la MC-LR que la MC-RR (Fischer et al 2010).

A notre connaissance il n'y a pas eu d'étude concernant la comparaison du métabolisme et de l'excrétion de la MC-LR et de la MC-RR. Cependant, les conjugués MC-RR-GSH peuvent être formés aussi bien que les conjugués MC-LR-GSH (Ito et al 2002).

- ❖ ***La MC-LR et la MC-RR ont autant de difficultés à traverser les membranes cellulaires.***
  
- ❖ ***Au niveau hépatique, certains transporteurs ont une meilleure affinité pour la MC-LR que pour la MC-RR.***
  
- ❖ ***Les études comparant les effets de la MC-LR et de la MC-RR sont très rares.***

## **4. Conclusion**

Les microcystines sont donc un problème de santé publique aussi bien dans un contexte d'exposition aiguë (**cf. introduction paragraphe 1.2**) que d'exposition chronique (**cf. introduction paragraphe 1.3**). Sur l'ensemble des 90 variants aujourd'hui identifiés, seule la MC-LR a fait l'objet de suffisamment d'études pour que son risque associé soit évalué par l'OMS et le CIRC. Cependant, comme nous venons de le voir, un certain nombre de données semblent suggérer que cette toxicité ne peut pas être extrapolée à l'ensemble des variants (**cf. introduction paragraphe 3**).

De plus, les MCs sont principalement décrites comme des hépatotoxines (**cf. introduction paragraphe 1.2.2**). Cependant, un nombre croissant de travaux montre que de nombreux organes en dehors du foie subissent la toxicité de ces molécules (**cf. introduction paragraphe 1.2.3**). La voie orale étant la principale voie d'exposition aux MCs chez l'homme (**cf. introduction paragraphe 1.3**), l'intestin est non seulement exposé aux microcystines mais il constitue un organe clé dans leur absorption (**cf. introduction paragraphe 2.1**). Pour mieux cerner l'effet de ces toxines sur celui-ci (**cf. introduction paragraphe 2.3**), il est nécessaire d'étudier l'absorption et la toxicité des MCs sur les entérocytes.





# **Objectifs**



Compte tenu du manque d'études comparant différents variants de MCs, l'objectif de cette thèse était d'étudier les effets des deux variants de microcystines les plus couramment rencontrés : la MC-LR et la MC-RR. Comme nous l'avons précédemment indiqué, l'ingestion est la principale voie d'exposition aux MCs pour l'Homme. Dans ce contexte, l'intestin est le principal organe d'absorption exposé à ces toxines. Compte tenu du manque d'information concernant cette problématique, nous avons choisi de travailler à l'aide du modèle intestinal humain Caco-2 afin d'explorer et de comparer l'absorption et la toxicité de la MC-LR et de la MC-RR au niveau intestinal.

Dans un premier temps, nous avons focalisé nos travaux sur :

- L'étude de l'absorption de la MC-LR et de la MC-RR
- L'étude des mécanismes mis en jeu dans cette absorption au niveau intestinal

Notre second objectif était la comparaison de la toxicité de la MC-LR et de la MC-RR. Pour cela, nos travaux ont porté sur à :

- L'étude de leur toxicité par une approche globale : l'analyse transcriptomique
- L'identification des cibles potentielles pour expliquer les différences de toxicité



# **Matériel et Méthodes**



# 1. Culture cellulaire et toxines

## 1.1 Solubilisation et dosage des toxines

Les toxines MC-LR et MC-RR (pureté > 95%) proviennent de chez Alexis (Enzo life science). Elles sont vendues sous forme de cristaux et sont conservées à -20°C.

Chaque toxine est solubilisée dans le solvant recommandé par le fournisseur, c'est à dire dans l'éthanol absolu pour la MC-LR et dans le méthanol à 80% - 20% H<sub>2</sub>O en volume pour la MC-RR. Les solutions sont stockées à -20°C.

Les solutions de toxines sont vérifiées par dosage en spectrophotométrie UV d'après la norme ISO/DIS 20179-Qualité de l'eau-Dosage des Microcystines. Les spectres d'absorption sont mesurés entre 220 nm et 250 nm dans une cuve en quartz de 1 cm avec les solutions de toxines diluées au 1/400<sup>e</sup>, le solvant de chaque toxine servant respectivement de référence.

La concentration des solutions est calculée grâce à la formule suivante :

$$\rho = 400 \times 1000 \times \frac{A_{\max} \times M}{\varepsilon \times d}$$

Où :

$\rho$  est la concentration de la solution mère ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )

$A_{\max}$  est l'absorbance au pic d'absorption qui se situe autour de 238 nm dans les solvants utilisés

M est la masse molaire de la toxine ( $M_{\text{mc-lr}} = 994 \text{ g.mol}^{-1}$  et  $M_{\text{mc-rr}} = 1037 \text{ g.mol}^{-1}$ )

$\varepsilon$  est le coefficient d'absorption molaire des microcystines dans les solvants assimilé à celui dans le méthanol pur ( $\varepsilon = 39\,800 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ )

400 et 1000 sont des facteurs de multiplication permettant d'obtenir la concentration des solutions mère en  $\mu\text{g.ml}^{-1}$

Les concentrations des solutions ont été ensuite confirmées et précisées par un dosage en chromatographie Liquide couplée à l'Electrospray Trappe à Ion (ESI-IT-MS/MS).

## 1.2 Entretien des cellules

Les cellules Caco-2 sont des cellules adhérentes issues d'un adénocarcinome de colon humain possédant la capacité de se différencier spontanément *in vitro*. Les cellules différenciées présentent des caractéristiques fonctionnelles et morphologiques des cellules absorbantes de l'intestin grêle (Chantret et al 1988; Pinto et al 1983). Elles ont été fournies par le laboratoire LGC Promochem (ATCC-HTB-37) et sont conservées dans l'azote liquide.

Leur temps de doublement dans les conditions de culture du laboratoire a été estimé entre 20 et 24 heures. Elles sont cultivées en flasques de 75 cm<sup>2</sup> dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) contenant des sels de Earle et du GlutaMAX™ (Gibco-Invitrogen), supplémenté avec de la pénicilline (100 UI/ml), de la streptomycine (100 µg/ml) (Gibco-Invitrogen) et 1% d'acides aminés non essentiels. Ce milieu de culture est complété avec 10% de Sérum de Veau Foetal (SVF - Invitrogen) extemporanément. Les cellules sont maintenues dans un incubateur à 5% de CO<sub>2</sub> et à 37°C.

Tous les 3-4 jours, lorsqu'elles atteignent environ 80 % de confluence, les cellules sont repiquées. Après rinçage avec du PBS afin d'éliminer le reliquat de SVF, le tapis cellulaire est recouvert de trypsine – EDTA (0,05 % - Gibco-Invitrogen) et remis à l'incubateur pendant 4-5 minutes. Après décollement et ajout de milieu avec 10% de SVF, les cellules sont centrifugées à 136 g pendant 5 minutes, puis comptées etensemencées à 10 000 cellules/cm<sup>2</sup> dans 25 ml de milieu 10% SVF dans une nouvelle flasque de 75 cm<sup>2</sup>.

## 1.3 Différenciation cellulaire

Les Caco-2 sontensemencées à 60 000 cellules/cm<sup>2</sup> dans du milieu de culture avec 10 % de SVF qui est remplacé tous les 2-3 jours. Les cellules différenciées sont obtenues à 21 jours post confluence. L'état de différenciation dans ces conditions de culture a été préalablement vérifié au laboratoire (Bazin 2009) par la mesure du niveau d'expression d'un marqueur spécifique, la sucrase isomaltase (Pinto, Robine Leon, et Appay 1983).

## 2. Toxicité des microcystines

### 2.1 Test MTT de cytotoxicité

#### 2.1.1 Culture cellulaire

Les Caco-2 sontensemencées à 60 000 cellules/cm<sup>2</sup> en plaques 96 puits. Les cellules non différenciées (24h de subculture) ou différenciées (21j après confluence) sont exposées pendant 4h, 24h ou 48h à une gamme de concentration de toxines (MC-LR ou MC-RR) de 0 à 100 µM dans 100µl de milieu de culture sans SVF ajusté en solvant à 2,5%. Chaque condition est réalisée en triplicates avec au moins 2 expériences indépendantes.

#### 2.1.2 Test MTT

À la fin du traitement, le milieu est remplacé par du milieu contenant 0,5 mg/ml de méthylthiazolyldiphényl-tétrazolium (MTT) (Sigma). Les plaques sont ensuite remises 2h à l'incubateur afin de permettre la conversion du MTT (jaune) en cristaux de formazan (violet) par les mitochondries. A la fin de l'incubation, le milieu est remplacé par de l'isopropanol acidifié (HCl 1N dans isopropanol 1/23 v/v) afin de dissoudre les cristaux. Après agitation, l'absorbance est mesurée à 570 nm grâce à un appareil Fluostar Optima (BMG Labtech).

#### 2.1.1 Analyse des données

##### 2.1.3.1 Calcul de cytotoxicité

La cytotoxicité des cellules est calculée à l'aide de la formule suivante:

$$\text{Cytotoxicité} = \text{ABS}_{\text{condition}} \times 100 / \text{ABS}_{\text{témoin}}$$

Où :

$\text{ABS}_{\text{condition}}$  est l'absorbance mesurée pour la condition étudiée

$\text{ABS}_{\text{témoin}}$  est l'absorbance du témoin solvant

**Tableau 6 : Liste des gènes sélectionnés pour l'étude en PCRq**

<b>Gène</b>	<b>Protéine</b>	<b>Fonction</b>
<i>SLCO 3A1</i>	OATP 3A1	transporteur d'influx
<i>SLCO 4A1</i>	OATP 4A1	transporteur d'influx
<i>Cyp 3A4</i>	CYP 3A4	enzyme du métabolisme de phase I
<i>GSTa 1</i>	GSTa 1	enzyme du métabolisme de phase II
<i>MDR1</i>	P-gp	transporteur d'efflux
<i>MRP1</i>	MRP1	transporteur d'efflux

Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 5.04. Une ANOVA à un facteur (concentration) est utilisée afin d'identifier l'influence potentielle de nos traitements sur la viabilité des cellules suivi du test multiple de Dunett.

#### *2.1.3.2 Calcul des CI50*

La concentration inhibitrice 50% (CI50) est calculée à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Pour cela, après transformation des données de cytotoxicité en log, et fixation du minimum à 0, un modèle de dose réponse sigmoïdale a été ajusté en fonction de la méthode des moindres carrés ( $R^2$ ). La valeur de CI50 correspond au point d'inflexion de la sigmoïde obtenue.

## **2.2 Effets de la MC-LR sur les gènes d'intérêts sélectionnés**

### **2.2.1 Traitement des cellules**

Pour cette étude, plusieurs gènes d'intérêt (**cf. Tableau 6**) ont été sélectionnés. Les cellules sontensemencées en flasques de 25 cm<sup>2</sup> à 60 000 cellules/cm<sup>2</sup>. Après différenciation, les Caco-2 sont traitées pendant 24h ou 48h avec une gamme de concentrations de MC-LR allant de 1 à 50 µM, dans du milieu de culture sans SVF. Le témoin solvant contient le pourcentage maximal de solvant utilisé soit 2,5 % EtOH absolu. Chaque condition a été réalisée en trois réplicats.

### **2.2.2 PCR quantitative (PCR q)**

#### *2.2.2.1 Extraction au TriZol® et qualité des ARN totaux*

Après élimination des milieux de traitement, les cellules sont lysées par l'ajout de 2,5 mL de TriZol® (Invitrogen Life Technologies Inc.). Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, les lysats cellulaires sont homogénéisés à la pipette, récoltés puis stockés à -80°C.

Les ARN totaux sont extraits selon le protocole standard « Trizol RNA extraction » (Invitrogen Life Technologies Inc). La concentration en ARNs est évaluée par spectrophotométrie UV (SmartSpec™ Plus, Bio-Rad).

#### 2.2.2.2 *Rétrotranscription*

Une transcription inverse est effectuée à partir d'un microgramme de chacun des échantillons à l'aide du kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription et selon les recommandations du fournisseur (Applied Biosystems).

#### 2.2.2.3 *Amplification des ADNc*

La PCRq est réalisée avec le thermocycleur Chromo4™ Real-Time Detector (BioRad). L'amplification et la quantification des ADNc sont effectuées par le kit Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) selon les recommandations du fournisseur. Les données sont analysées avec le logiciel Opticon Monitor 3™ (BioRad).

### **2.2.3 Analyse statistique**

Les données de RT-PCRq ont été analysées avec le logiciel GraphPad Prism. Pour chaque gène, une ANOVA à un facteur (concentration en toxine) a été réalisée. Afin d'étudier l'influence du solvant nous avons comparé le contrôle solvant au contrôle sans solvant et à la condition 50 µM à l'aide de tests t non appariés.

## **3. Imagerie cellulaire**

### **3.1 Culture cellulaire**

Les cellules caco-2 sontensemencées en chambre labteck 8 puits sur lame de verre (Nunc) à 70 000 cellules/cm<sup>2</sup> dans du milieu complémenté avec 10 % de SVF.

### **3.2 Traitement des cellules**

Après 24h de subculture, les cellules sont traitées avec 1 à 50 µM de MC-LR ou de MC-RR dans du milieu de culture sans SVF. Chaque condition est ajustée sur la même concentration en solvant (2,5%). Les traitements sont effectués suivant une cinétique de 30 minutes à 24h.

Lors des études de compétition, les cellules sont pré-incubées 20 minutes avec une solution de Taurocholate (TC) à 100 µM dans du milieu sans sérum. Les cellules sont ensuite traitées avec 20 µM de MC-LR ou de MC-RR dans du milieu sans sérum contenant 100 µM de TC.

### 3.3 Mode opératoire des marquages

#### 3.3.1 Fixation et perméabilisation

A la fin du traitement, les cellules sont tout d'abord rincées au PBS puis fixées au paraformaldéhyde tamponné à 4% (Labonord, France) pendant 15 minutes à température ambiante. Après un nouveau rinçage au PBS, elles sont perméabilisées avec 0,2% de Triton dans du PBS pendant 10 minutes à température ambiante.

#### 3.3.2 Immunomarquages

##### 3.3.2.1 Marquage des microcystines

Afin de limiter le bruit de fond lié à l'anticorps primaire, les sites aspécifiques de fixation sont saturés avec de la sérum albumine bovine à 1% dans du PBS (BSA 1%) pendant une heure à température ambiante. Après une incubation toute la nuit à 4°C avec l'anticorps anti-ADDA (Alexis, Enzo life science) ( $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$  dans BSA 1%), les cellules sont lavées 4 fois pendant 4 minutes avec du PBS contenant 0,2% Tween 20 (Fisher Scientific). Les cellules sont ensuite incubées à l'obscurité pendant 45 minutes avec l'anticorps secondaire anti souris couplé à l'Alexa 488 ( $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$  dans BSA 1%). Les cellules sont à nouveau rincées 4 fois avec du PBS pendant 4 minutes.

##### 3.3.2.2 Marquage des transporteurs OATP

Après incubation toute la nuit à 4°C avec les anticorps anti OATP 1A2 (réf : SC-18427, Santa Cruz), OATP 3A1 (ref : SC-66566, Santa Cruz) ou OATP 4A1 (ref : SC-51172, Santa Cruz) dilués à  $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$  dans BSA 1%, les cellules subissent 4 lavages de 4 minutes avec du PBS contenant 0,2% TWEEN20 (Fisher scientifique). Les cellules sont ensuite incubées à l'obscurité pendant 45 minutes avec l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor 568 (ref A11057, Invitrogen) anti chèvre dilué à  $6 \mu\text{g.mL}^{-1}$  dans BSA 1%. Les cellules sont à nouveau rincées 4 fois avec du PBS pendant 4 minutes.

#### 3.3.3 Marquages complémentaires

Un marquage de l'actine est réalisé par une incubation de 5 minutes avec une solution de phalloïdine TIRCT diluée à  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  suivie d'un rinçage au PBS.

Le marquage du noyau est réalisé par une incubation de 3 minutes avec  $0,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) dans du PBS suivie d'un rinçage court puis d'un lavage de 3 minutes au PBS.

### **3.3.4 Montage des lames**

Les lames sont montées avec du Mowiol puis sont laissées 4h à température ambiante pour permettre la polymérisation du liquide de montage avant stockage à 4°C.

## **3.4 Imagerie**

### **3.4.1 Immunolocalisation des OATPs et du marquage microcystine**

L'analyse des marquages OATP a été réalisée par imagerie à l'aide d'un microscope Leica équipé d'un laser SPI permettant l'observation en confocal. L'étude des marquages microcystines a été réalisée à l'aide d'un microscope Zeiss Axiovert 200M équipé d'un apotome utilisant le système Structured Illumination<sup>®</sup>. Le plan focal d'acquisition est défini grâce aux marquages DAPI des noyaux.

### **3.4.2 Étude de l'absorption des microcystines**

Afin de pouvoir comparer de manière quantitative l'intensité des marquages avec la MC-LR et la MC-RR dans différentes conditions, 6 à 8 champs par puits sont acquis (n=2 expériences indépendantes) à l'aide d'un microscope Leica DMLB. Le plan focal d'acquisition est défini grâce aux marquages DAPI des noyaux. Le temps d'acquisition de l'ensemble des conditions d'une répétition est défini en fonction des puits contrôle négatif.

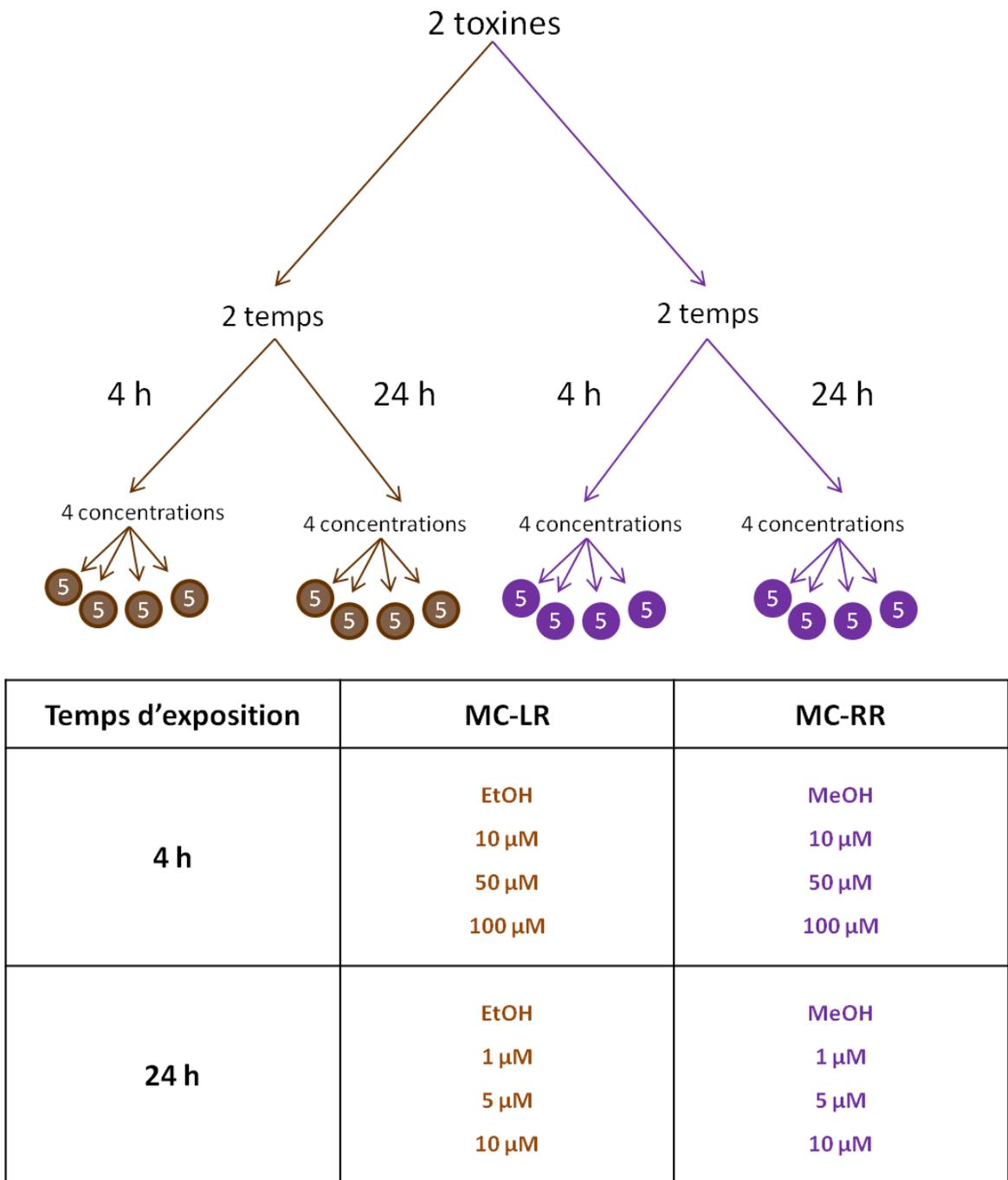
## **3.5 Traitement des données**

### **3.5.1 Immunolocalisation des microcystines**

L'estimation qualitative de la localisation des MCs suite aux études cinétique et dose/effet a été réalisée en aveugle. Les images acquises ont été anonymées puis notées sur différents paramètres (intensité du marquage, localisation subcellulaire) selon un code allant de « - » (absence de marquage) à « +++ » (marquage très intense) en fonction de l'intensité observée. Les résultats obtenus sur 3 à 5 champs (n >= 2 expériences indépendantes pour chaque condition) sont agrégés et présentés sous forme de résultats moyens.

### **3.5.2 Étude de l'absorption des microcystines**

Sur l'ensemble des cellules des champs acquis, le niveau de fluorescence en Alexa 488 (marquage des toxines) est également mesuré à l'aide de l'outil « mesure » du logiciel ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>). Le paramètre choisi pour cette mesure correspond à la valeur de l'intensité moyenne sur la zone définie.



**Figure 18 : Schéma descriptif du design de l'étude transcriptomique**

## 4. Étude transcriptomique

### 4.1 Traitement des cellules

Les Caco-2 ont étéensemencées à 60 000 cellules/cm<sup>2</sup> en plaques 12 puits (passages 30 à 33). Après différenciation, les Caco-2 sont traitées, pour chaque toxine, avec 10, 50 et 100 µM pendant 4 heures ou avec 1, 5 et 10 µM pendant 24h dans du milieu de culture sans SVF. Chaque condition est réalisée en 5 réplicats (cf. **Figure 18**). De plus, pour chaque condition, la concentration en solvant est ajustée à [EtOH] = 2% et [MeOH<sub>80%</sub>] = 1,5%.

### 4.2 Mode opératoire de l'étude transcriptomique

#### 4.2.1 Extraction au Trizol<sup>®</sup> et qualité des ARN totaux

Après élimination des solutions de traitements, les lysats cellulaires sont obtenus par ajout de 500 µl de Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen Life Technologies Inc.) pendant 10 minutes à température ambiante. Ils sont ensuite homogénéisés avant stockage à -80°C.

Les ARNs totaux sont extraits selon le protocole standard « *Trizol RNA extraction* » (Invitrogen Life Technologies Inc). La concentration en ARNs est évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre UV *NanoPhotometer* (Implen). Les ARN sont ensuite quantifiés et qualifiés par électrophorèse capillaire à l'aide du kit RNA 6000 Nano et du Bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies). La qualité des ARNs est évaluée à la fois par la mesure du ratio des quantités mesurées en ARNs ribosomiaux 28S et 18S qui doit être de l'ordre de 2 pour 1 et par l'allure de l'électrophorégramme qui doit présenter deux pics nets.

#### 4.2.2 Amplification et marquage

L'ensemble des échantillons est distribué aléatoirement en deux groupes. Un contrôle interne est ajouté à chaque échantillon en suivant les indications du kit *Spike in* (Agilent Technologies). Les ARNs sont convertis en ARN aminoallyl grâce au kit *Amino Allyl MessageAmp II aRNA Amplification* (Ambion, Austin, USA) puis sont marqués respectivement avec le Cy3 ou Cy5 selon leur groupe avec le kit *étiquetage Quick-Amp, 2*

*couleurs* (Agilent Technologies). La purification des ARNs marqués est réalisée avec le kit *Nucleospin RNA II* (Macherey Nagel) selon les indications du fournisseur.

La concentration et le niveau d'incorporation des marqueurs Cy3 ou Cy5 sont mesurés grâce au *NanoPhotometer* (Implen). Pour évaluer le niveau d'incorporation, le paramètre 'activité spécifique' est utilisé selon le conseil du fournisseur des puces à ADN (Agilent technologies). Ce paramètre correspond au rapport entre la concentration en marqueur et celle en ARN mesurée. Selon la recommandation du fournisseur, seuls les échantillons marqués présentant une activité spécifique supérieure à 8 sont utilisés.

#### **4.2.3 Hybridation des lames**

Parmi les 80 échantillons prévus initialement seuls 78 ont été hybridés. Les conditions MC-RR 50  $\mu$ M 4h et EtOH 24h n'ont donc que 4 réplicats au lieu de 5. Les 78 échantillons sont préparés avec le kit *Gene Expression Hybridization* (Agilent Technologies) en suivant les indications du fournisseur. Puis, ils sont hybridés sur des lames de 4 puces à ADN de génome humain complet (réf G4112F Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Chaque puce est hybridée avec 825 ng d'ARN d'un échantillon marqué en Cy3 et 825 ng d'ARN d'un échantillon marqué en Cy5. Les échantillons sont appariés de manière à avoir une activité spécifique similaire. L'hybridation est réalisée à 65°C pendant 17 h sur l'automate d'hybridation *HS4800 Pro* (Tecan) qui réalise l'ensemble des lavages avec la solution de lavage issue du *Gene Expression Wash Pack* (Agilent Technologies) puis le séchage et la stabilisation des lames avec la solution *Stabilization and Drying Solution* (Agilent Technologies).

#### **4.2.4 Acquisition des données brutes**

Les puces sont ensuite lues sur un scanner de microarray *Innoscan 900AL* (Innopsys). Les fluorophores Cy3 et Cy5 sont lus simultanément à 635 nm et 532 nm respectivement. La puissance d'excitation des lasers est réglée de manière à maximiser l'information collectée dans chaque canal (vert ou rouge). Pour cela, il faut choisir une puissance permettant un bon consensus entre une excitation des fluorophores suffisante pour distinguer l'information lumineuse du bruit de fond et la limitation du nombre de spots dont l'intensité sature la capacité de détection du scanner et qui sont donc inexploitable.

### 4.3 Approche en pseudo mono-couleur

Les sondes des puces à ADN Agilent utilisées sont spotées sur la lame grâce à une technologie spécifique dont le principe, selon le fournisseur, est proche de celui d'une imprimante jet d'encre, et qui permettent une grande reproductibilité du *spotting*. Dans notre étude, les caractéristiques de ces lames sont associées à l'utilisation d'un contrôle interne le kit « *Spike In* ». Ce kit offre la possibilité d'effectuer un contrôle de la qualité et la normalisation de l'étude (normalisation des résultats de chaque puce et comparaisons intra- et inter-lames). En effet, lors de l'utilisation de ce kit, des ARNs spécifiques sont ajoutés en quantité connue et fixe à chaque échantillon avant l'étape d'amplification. Ces derniers subissent donc toutes les étapes (amplification, marquage, purification et hybridation) de la même manière que les ARNs des échantillons à analyser auxquels ils sont mélangés. Or, sur chaque puce sont spotées des sondes ne correspondant pas au génome humain. Ces sondes contrôles détectent les ARNs spécifiques du kit et permettent l'évaluation interne de la qualité de chaque puce. Dans ce contexte, il est possible de réaliser des comparaisons intra lame et inter lames et donc d'utiliser l'information obtenue pour chaque canal, comme si elle avait été obtenue sur des lames séparées hybridées en mono couleur. Cette stratégie est appelée 'pseudo mono couleur'.

### 4.4 Traitement des données brutes

Les données brutes subissent tout d'abord une normalisation de Lowess afin de rendre possible la comparaison des lames entre elles. Ensuite un filtrage est réalisé pour limiter le bruit de fond et supprimer les sondes générant une trop faible intensité. En effet, une intensité trop faible implique une baisse de la fiabilité de la corrélation entre fluorescence et quantité d'ADNc. Pour cela, un seuil d'intensité est défini comme suit : l'intensité médiane de chaque échantillon puis la moyenne de ces intensités médianes ont été calculées. Cette moyenne sert alors de seuil pour le filtrage des données. Le jeu de données obtenu sera indiqué comme « données normalisées ».

Il est important de noter que cette préparation entraîne une perte d'une partie des données qui ne sont pas exploitables pour une analyse statistique rigoureuse. Ainsi, à partir de notre jeu de données brutes pangénomiques, 23017 sondes exploitables ont été extraites. De plus, parmi ces sondes, un certain nombre est associé au même gène et donc le nombre de gènes étudiés est inférieur au nombre de sondes.

## 4.5 Analyses statistiques

Les études de transcriptomique à haut débit s'intègrent dans le contexte statistique particulier des tests multiples qui nécessite diverses précautions.

Dans le contexte de l'approche transcriptomique, c'est plus de 20 000 tests qui sont réalisés. Ce qui signifie que, en fixant un seuil de significativité à 1%, il y a un risque de générer 200 faux positifs. Afin de pallier ce biais, des stratégies statistiques particulières comme l'emploi de la Significance Analysis of Microarrays (SAM) ou des tests post hoc doivent être utilisées (Tusher et al 2001).

### 4.5.1 Identification des gènes modulés par les traitements

Afin d'identifier les gènes dont le niveau d'expression est significativement différent entre la condition testée et son contrôle, nous avons utilisé la SAM.

Afin d'identifier les gènes dont le niveau d'expression est significativement différent entre la condition testée et son contrôle, nous avons utilisé la méthode SAM. Cette dernière permet d'estimer le taux de faux positifs (couramment appelé FDR pour false discovery rate), c'est à dire le nombre de gènes considérés à tort comme différentiels (i.e. Faux positifs) par rapport au nombre de gènes considérés comme différentiels. Pour plus d'information sur la SAM se référer à (Tusher, Tibshirani, et Chu 2001).

Afin d'identifier les gènes différentiellement exprimés entre les conditions testées et leur contrôle solvant, une analyse de type SAM 2-classes a été réalisée sur les données normalisées. Un FDR peu stringent ( $FDR < 5\%$ ) a été choisi pour ce contexte exploratoire. Il est en effet question de décrire de manière globale l'effet des MCs sur le profil génomique des Caco-2 différenciées. Dans la suite de ce travail, ces analyses sont référencées sous l'appellation « MCs vs contrôle ». Une SAM de type 2-classes a aussi été réalisée afin d'identifier les gènes présentant un niveau de transcription significativement différent entre la MC-LR et la MC-RR. Afin de limiter l'impact du solvant, une correction linéaire de l'effet solvant médian a été effectuée sur les données MC-LR et MC-RR avant de les comparer en SAM. Ces données corrigées sont appelées « données corrigées solvant ». Dans cette étude l'objectif est d'identifier des gènes révélant une modulation différente entre la MC-RR et la MC-LR. Dans ce cadre, afin de limiter fortement le risque de faux positifs, un FDR de 1% a été sélectionné. Dans la suite de ce travail, ces analyses sont référencées sous l'appellation « MC-RR vs MC-LR ».

#### 4.5.2 Identification des gènes subissant un effet dose linéaire

Pour chaque bloc de données (temps x toxine), nous avons identifié les gènes pour lesquels la dose de toxine induit un effet linéaire sur leur niveau de transcription. Pour cela, une ANOVA a été réalisée sur les gènes identifiés par l'analyse SAM « MCs vs contrôle » de chaque bloc de données. Dans cette analyse, la dose a été considérée comme un facteur quantitatif ce qui permet d'évaluer la linéarité de réponse vis-à-vis de celle-ci. Cette ANOVA est réalisée sur les données log-normalisées afin de mieux répondre à la condition de normalité nécessaire à l'analyse de variance. Afin de répondre à la problématique des tests multiples, les gènes présentant une p-value de l'ANOVA inférieure à 5% ont été sélectionnés pour un test post hoc : le test de Benjamini-Hochberg. Ainsi, seuls les gènes présentant une p-value post test inférieure à 5% sont considérés comme présentant un effet dose réponse linéaire.

### 4.6 Analyse ontologique

Les listes de gènes issues des différentes SAM « MCs vs contrôle » et « MC-RR vs MC-LR » sont caractérisées de manière fonctionnelle selon l'annotation Gene Ontology (GO) grâce au logiciel Ingenuity Pathway Analysis (IPA) ([www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)). Nous avons fait le choix d'extraire les données générées par rapport aux voies canoniques et non pas l'annotation fonctionnelle plus classique.

La relation de significativité statistique entre le jeu de données et le niveau de perturbation d'une voie canonique du logiciel IPA est mesurée de deux manières. Tout d'abord un paramètre appelé ratio, correspondant à la proportion de molécules du jeu de données faisant partie de la voie canonique par rapport au nombre de molécules dans cette même voie. L'autre paramètre est une p-value résultant du test exact de Fisher évaluant la probabilité que la relation entre les gènes du jeu de données et ceux de la voie canonique ne soit pas due au hasard.



# Résultats



## **Chapitre I :**

# **ÉTUDE DU SYSTÈME D'ABSORPTION-MÉTABOLISME- EXCRÉTION DES MICROCYSTINES DANS LES CACO-2**



## **1. Introduction**

La toxicité des microcystines est décrite comme touchant particulièrement le foie (Eriksson et al 1990a; Meriluoto et al 1990) (**cf. introduction paragraphe 1.2.2**). Cet organotropisme est expliqué par la présence de transporteurs des sels biliaires (OATP) à la membrane des cellules qui sont responsables de l'absorption cellulaire des MCs (Falconer & Yeung 1992; Fischer et al 2010; Fischer et al 2005). En effet, au sein du foie, seuls les hépatocytes, qui expriment ces OATPs, sont sensibles aux MCs et pas les cellules sinusoidales (Hermansky et al 1993). En plus d'être impliqués dans la sensibilité cellulaire aux MCs (Fischer et al 2010; Lu et al 2008; Takumi et al 2010), les OATPs contribueraient largement à la différence de toxicité observée entre les divers variants, y compris entre la MC-LR et la MC-RR. Ainsi la transfection du gène de l'un des deux principaux OATP hépatiques (SLCO 1B1 codant pour l'OATP 1B1 et SLCO 1B3 codant pour l'OATP 1B3) dans une lignée cellulaire (HEK 293) peu sensible aux MCs induit une augmentation de la mortalité de ces cellules plus importante avec la MC-LR qu'avec la MC-RR. Compte tenu du fait que ces deux variants présentent un niveau d'inhibition des protéines phosphatases similaire, ce résultat suggère un niveau d'absorption de la MC-LR supérieur à celui de la MC-RR (Fischer et al 2010). Cependant, les gènes SLCO 1B1 et 1B3 ne sont exprimés ni au niveau intestinal ni dans le modèle Caco-2 d'après la bibliographie (Hayeshi et al 2008; Hilgendorf et al 2007; Seithel et al 2006). Parmi les OATPs exprimés à la barrière intestinale, seul l'OATP 2B1 a été testé mais s'est avéré ne pas transporter les MCs (Fischer et al 2005). Ainsi, d'autres OATPs exprimés dans les entérocytes comme les OATP1A2, 3A1 et 4A1 pourraient jouer un rôle dans l'absorption intestinale des MCs (Glaeser et al 2007; Hayeshi et al 2008; Hilgendorf et al 2007; Kato et al 2010; Seithel et al 2006; Svoboda et al 2011).

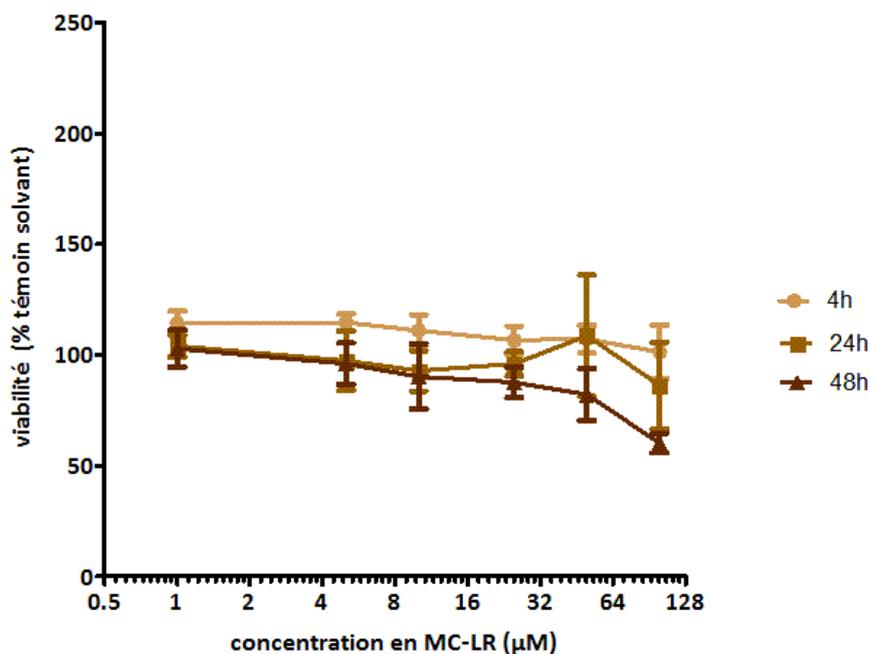
On considère donc aujourd'hui que l'absorption des MCs joue un rôle majeur dans l'expression de leur potentiel toxique au niveau cellulaire. Cependant, les systèmes cellulaires possèdent plusieurs stratégies pour limiter l'action d'un xénobiotique après pénétration à l'intérieur de la cellule. Parmi ces stratégies, la détoxification comporte plusieurs phases incluant des enzymes de métabolisation et des protéines d'excrétion (ou d'efflux)(**cf. introduction paragraphe 2**). Ainsi le cytochrome P450 3A4 (Cyp 3A4) qui est une enzyme du métabolisme de phase I connue pour son large spectre de substrat (Lakhman et al 2009; Rendic 2002; Shimada et al 1994), est la forme de cytochrome la plus exprimée à la barrière intestinale humaine (Zhang et al 1999). Les Glutathion S transférases (GST) sont quant à elles des enzymes du métabolisme de phase II. Elles catalysent la formation de liaisons entre le glutathion (GSH) et les microcystines (Buratti

et al 2011; Dai et al 2008; Kondo et al 1992; Kondo et al 1996b; Pflugmacher et al 1998). Le rôle majeur de ces enzymes dans le métabolisme intestinal et leur rôle potentiel dans le métabolisme des MCs nous ont amenés à étudier l'effet des MCs sur leur niveau de transcription.

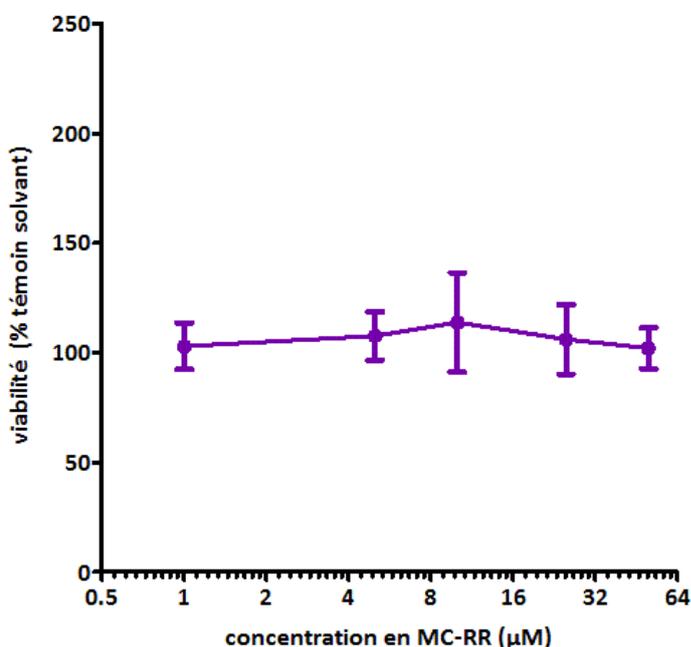
Un autre système de détoxification cellulaire des xénobiotiques consiste à les excréter à l'aide de pompes membranaires. Parmi celles-ci, la P-glycoprotéine (P-gp) est la première pompe d'efflux à avoir été décrite. C'est une protéine de transport membranaire couplée à l'ATP qui joue un rôle majeur dans l'efflux des xénobiotiques comme les médicaments mais aussi les toxines (Ambudkar et al 2003). Le transporteur MRP1 est, quant à lui, exprimé à la membrane basolatérale des cellules du tractus digestif humain (Glaeser et al 2007; Oostendorp et al 2009) et pourrait intervenir dans l'efflux des conjugués MC-GSH (**cf. introduction paragraphe 2**).

Il n'y a donc que très peu d'information sur les capacités d'absorption, de métabolisme et d'excrétion des MCs au niveau intestinal. De plus, l'expression des gènes et des protéines impliqués dans ces mécanismes a été peu explorée sur notre modèle cellulaire Caco-2. Nous avons donc commencé par mesurer la cytotoxicité provoquée par la MC-LR et par la MC-RR sur notre modèle. Puis, nous nous sommes intéressés à l'expression de transporteurs d'influx de type OATP dans les Caco-2 en étudiant l'impact de l'exposition à la MC-LR sur leur niveau de transcription. Nous avons ensuite comparé l'absorption de la MC-LR et de la MC-RR dans notre modèle cellulaire. Enfin, nous avons exploré le potentiel de détoxification des Caco-2 en étudiant l'effet de la MC-LR sur le niveau d'expression d'enzymes du métabolisme et de transporteurs d'efflux potentiels.





**Figure 19 : Cytotoxicité de la MC-LR sur des Caco-2 non différenciées exposées pendant 4h, 24h ou 48h.** Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin solvant ( $\pm$  écarts-types).  $n > 3$  études indépendantes



**Figure 20 : Cytotoxicité de la MC-RR sur des Caco-2 non différenciées exposées pendant 24h.** Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin solvant ( $\pm$  écarts-types).  $n > 3$  études indépendantes

## 2. Étude de la cytotoxicité des microcystines

### 2.1 Sur les Caco-2 non différenciées

À 4h et 24h, la MC-LR n'induit pas de cytotoxicité sur les Caco-2 non différenciées et ce jusqu'à 100  $\mu\text{M}$ . Il n'est donc pas possible de calculer la concentration inhibitrice 50% (CI50) (cf. **Figure 19**). Par contre après 48h d'exposition, la MC-LR induit une cytotoxicité qui est significative à partir de 50  $\mu\text{M}$  (18 % de cytotoxicité). La cytotoxicité augmente ensuite jusqu'à 30 % avec une concentration de 100  $\mu\text{M}$  (one-way ANOVA test de Dunett post hoc,  $p\text{-value} < 0,05$  et  $p\text{-value} < 0,001$  respectivement). La CI50 calculée par extrapolation est donc de 161,4  $\mu\text{M}$  ( $R^2 = 0.58$ , intervalle de confiance à 95 % : [99,62 ; 261,3]).

Aucune cytotoxicité n'est détectée après 24h d'exposition à la MC-RR jusqu'à 100  $\mu\text{M}$  (cf. **Figure 20**). L'effet après 48h d'exposition à la MC-RR n'a pas été testé.

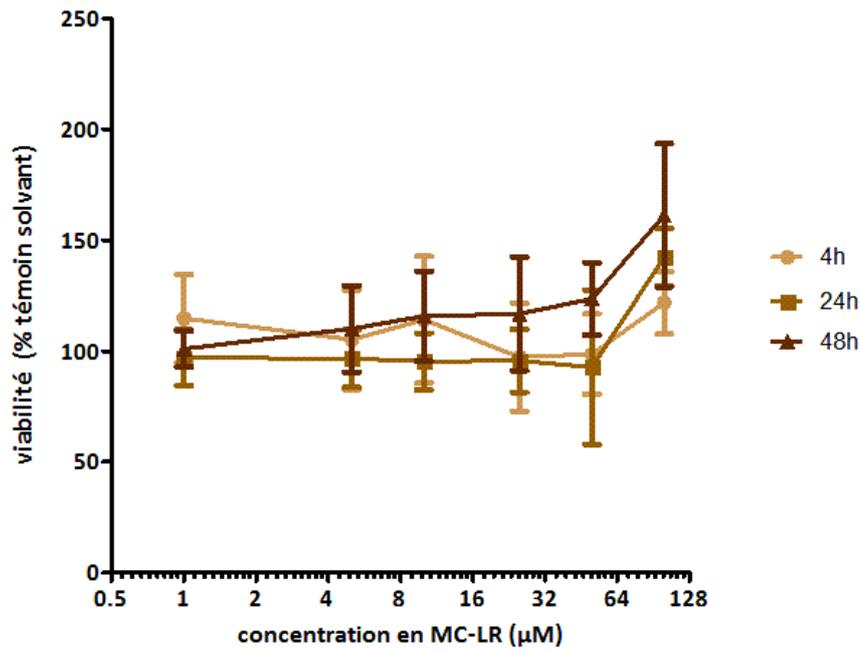
Dans nos conditions de culture, la MC-LR et la MC-RR ne sont donc pas cytotoxiques pour les cellules Caco-2 non différenciées jusqu'à 50  $\mu\text{M}$  et pour des temps d'exposition allant jusqu'à 24h. Une faible cytotoxicité est observée pour une concentration plus élevée (100 $\mu\text{M}$ ) mais uniquement avec la MC-LR.

### 2.2 Sur les Caco-2 différenciées

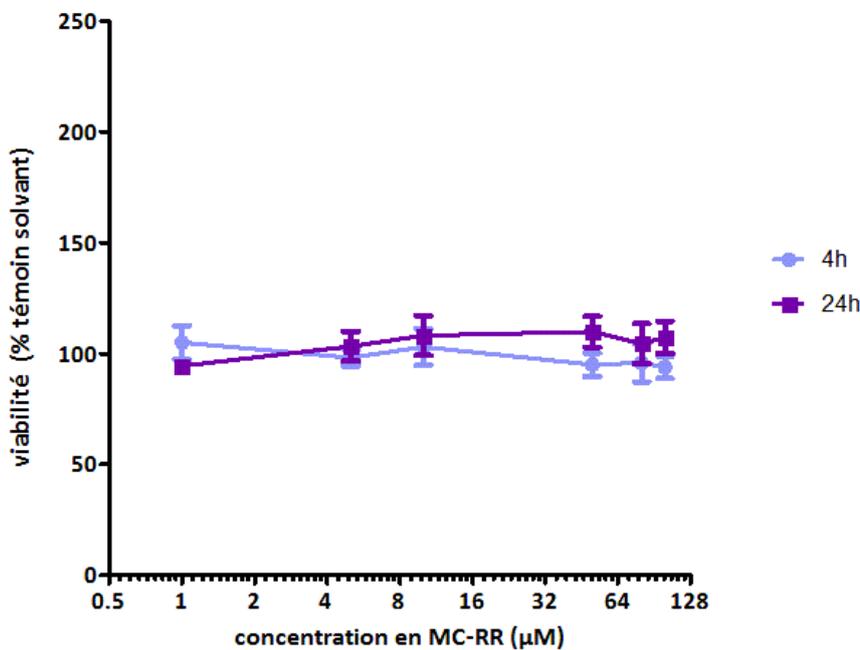
Quelles que soient les durées d'expositions testées, aucune cytotoxicité n'est mise en évidence sur les Caco-2 différenciées. Ainsi, ni la MC-LR ni la MC-RR<sup>3</sup> ne provoquent de cytotoxicité jusqu'à une concentration de 100  $\mu\text{M}$  (cf. **Figure 21 & Figure 22**).

---

<sup>3</sup> Les études de viabilité des Caco-2 différenciées suite à l'exposition à la MC-RR ont été réalisées par Mélanie Petitpas et Antoine Huguet dans le cadre d'un stage d'IUT



**Figure 21 : Cytotoxicité de la MC-LR sur des Caco-2 différenciées exposées pendant 4h, 24h ou 48h.** Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin solvant ( $\pm$  écarts-types).  $n > 3$  études indépendantes



**Figure 22 : Cytotoxicité de la MC-RR sur des Caco-2 différenciées exposées pendant 4h ou 24h.** Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin solvant ( $\pm$  écarts-types).  $n > 3$  études indépendantes

### 3. Étude de l'absorption des microcystines par le modèle Caco-2

#### 3.1 Effet de la MC-LR sur l'expression de transporteurs d'influx dans les Caco-2

L'effet de la MC-LR sur l'expression génique de deux isoformes d'OATPs (SLCO 3A1 et SLCO 4A1) a été étudié dans les cellules Caco-2 différenciées après 24h et 48h d'exposition.

##### *2.1.1 Effet de la MC-LR sur l'expression du gène codant pour le transporteur OATP 3A1*

Cette étude confirme que, dans nos conditions de culture, le gène SLCO 3A1 est bien exprimé par les Caco-2 différenciées.

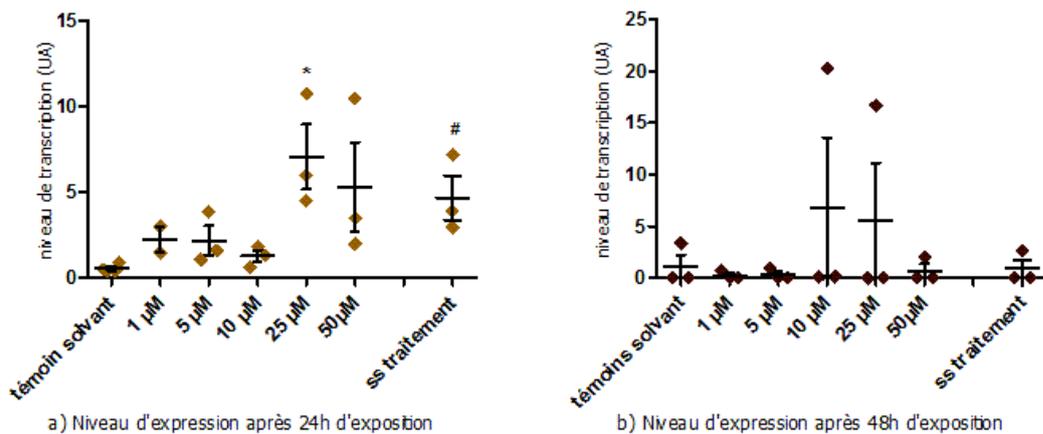
L'analyse de variance réalisée sur les données obtenues après 24h d'incubation met en évidence un effet significatif de la concentration en MC-LR (one-way ANOVA : p-value = 0,0328). Cet effet se traduit par une augmentation significative du niveau d'expression de SLCO 3A1 à 25  $\mu$ M par rapport au témoin (**cf. Figure 23 a**). Cependant, il est important de noter que le solvant induit une baisse significative du niveau de transcription de ce gène (test t non apparié témoin solvant *vs* témoin sans traitement: p-value = 0,0126). Il est donc difficile de conclure sur l'effet de la concentration en MC-LR sur le niveau de transcription de ce gène après 24h d'exposition.

A 48h, l'analyse de variance n'indique pas d'effet du traitement sur le niveau de transcription du SLCO 3A1 que ce soit avec la MC-LR ou avec le solvant. Il faut noter une grande variabilité de réponse des réplicats (**cf. Figure 23 b**).

##### *2.1.2 Effet de la MC-LR sur l'expression du gène codant pour le transporteur OATP 4A1*

Cette étude nous permet tout d'abord de confirmer que le gène SLCO 4A1 est exprimé par les Caco-2 différenciées dans nos conditions de culture.

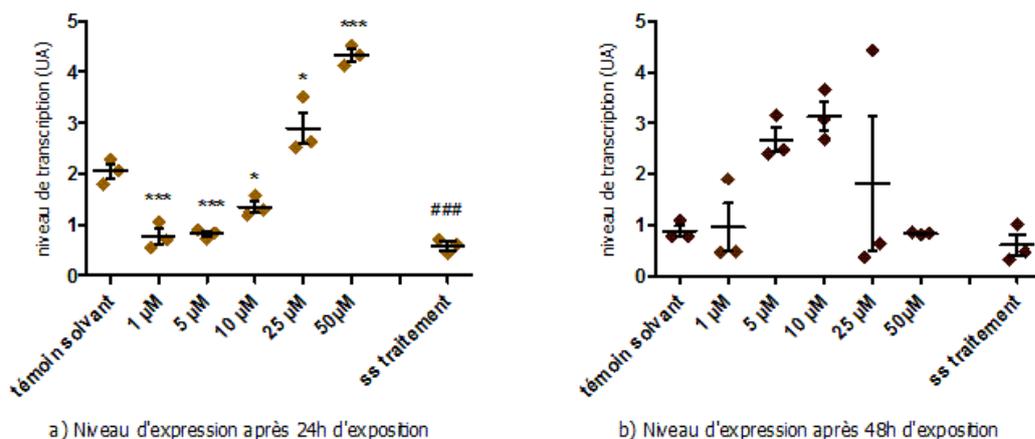
Après 24 heures d'exposition, le niveau d'expression du gène SLCO 4A1 (**cf. Figure 24 a**) montre une augmentation significative en fonction de la concentration en MC-LR (one-way ANOVA : p-value <0,0001). Cependant, le solvant seul induit déjà une augmentation d'expression par rapport au témoin (test t non apparié témoin solvant *vs* témoin sans traitement: p-value = 0,0009) même si cette augmentation reste plus faible



**Figure 23 : Effet de la MC-LR sur le niveau de transcription du gène SLCO 3A1**

\* p-value du test post hoc de Dunett vis-à-vis de la condition témoin solvant < 0,05,

#p-value du test t non apparié (témoin solvant vs témoin sans traitement) < 0,05.



**Figure 24 : Effet de la MC-LR sur le niveau de transcription du gène SLCO 4A1:**

\* p-value du test post hoc de Dunett vis-à-vis de la condition témoin solvant < 0,05, \*\*\*

p-value du test post hoc de Dunett vis-à-vis de la condition témoin solvant < 0,0001,

###p-value du test t non apparié (témoin solvant vs témoin sans traitement) < 0,0001.

que celle observée avec 50  $\mu\text{M}$  de MC-LR contenant la même proportion de solvant (post test de Dunett :  $p\text{-value} < 0,001$ ).

A 48h, l'analyse de variance n'indique pas d'effet du traitement sur le niveau de transcription du SLCO 4A1 que ce soit avec la MC-LR ou avec le solvant. Il faut noter une grande variabilité de réponse des réplicats (**cf. Figure 24 b**).

Dans ce contexte nous pouvons conclure que la MC-LR induit une augmentation de la transcription de SLCO 4A1 après 24h d'exposition.

L'expression génique ne garantissant pas l'existence de la protéine associée dans la cellule, la présence des transporteurs OATPs dans les cellules Caco-2 a donc été vérifiée à l'aide d'anticorps spécifiques. Les résultats obtenus sont présentés dans le **chapitre I paragraphe 3.2.2**.

### **3.2 Étude comparée de l'absorption de la MC-LR et de la MC-RR sur Caco-2 : article 1**

#### *3.2.1 Résumé*

Nous avons étudié l'absorption de la MC-LR et de la MC-RR par les cellules Caco-2 non différenciées. Pour cela, un anticorps primaire anti-ADDA a été utilisé en association avec un anticorps secondaire fluorescent. En effet, cette technique simple permet une détection directe de la toxine ainsi que sa localisation à l'intérieur de la cellule sans nécessiter la mise au point de méthode analytique nécessaire dans les approches cinétique classique.

Nous avons d'abord étudié l'expression et la localisation de protéines de transport appartenant à la famille des OATPs (OATP 1A2, 3A1 et 4A1) dans les Caco-2 par immunomarquage. Nous avons ainsi montré pour la première fois que ces cellules expriment les OATP 3A1 et 4A1 au niveau membranaire tandis que l'OATP 1A2 n'a pas pu être détecté.

En fonction des données de cytotoxicité, des doses subtoxiques ont été sélectionnées pour cette étude. La comparaison des études dose réponse (1 à 50  $\mu\text{M}$  pendant 4 h) et cinétique (30 minutes à 24h) des immunomarquages de MC-LR et de MC-RR a montré une augmentation de l'intensité du marquage avec la dose d'exposition mais n'a pas révélé de différence majeure entre les marquages des deux variants. Ainsi, les MCs sont localisées au niveau de la membrane plasmique aux temps les plus courts

(30 min) puis progressent à l'intérieur de la cellule au fur et à mesure du temps d'exposition.

Notre étude confirme que le marquage des MCs dans les cellules est à la fois diffus et granuleux comme cela avait pu être constaté sur des cellules du système nerveux de souris (Feurstein et al 2009). De même, un marquage nucléaire est confirmé pour la MC-LR et détecté pour la première fois pour la MC-RR.

Compte tenu de ces résultats, nous avons cherché à explorer le mécanisme d'absorption des deux variants. Pour cela, les Caco-2 ont été exposées à la MC-LR et à la MC-RR à 4°C (5 µM pendant 4h). Étonnamment, une augmentation significative de l'intensité du marquage a été constatée pour les deux variants à 4°C. Tout d'abord, ce résultat indique que l'absorption des MCs ne nécessite pas d'énergie (ATP) et renforce donc l'hypothèse d'un transport par diffusion facilitée par exemple par les OATPs. Ensuite, l'augmentation de l'intensité du marquage suggère qu'il y a plus de toxine dans les cellules à 4°C qu'à 37°C. Compte tenu de ce résultat, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'il existe un phénomène d'efflux ATP-dépendant des MCs dans les Caco-2.

Dans ce travail, nous avons donc décrit pour la première fois la localisation membranaire des OATP 3A1 et 4A1 chez les Caco-2 non différenciées. Compte tenu des nombreuses études démontrant l'importance de ces transporteurs dans l'absorption des MCs, nous pouvons supposer qu'ils jouent aussi un rôle dans leur transport au niveau intestinal. Nos résultats confirment aussi l'absorption rapide de la MC-LR et de la MC-RR dans notre modèle et suggère un mécanisme d'absorption reposant sur une diffusion facilitée et une excrétion active des deux variants par les Caco-2.

3.2.2 Article 1 :

**Similar uptake profiles of Microcystin-LR and -RR in an *in vitro* human intestinal model**

P. Zeller<sup>1\*</sup>, M. Clément<sup>2</sup>, V. Fessard<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Anses, Fougères Laboratory, contaminant toxicology unit, La Haute Marche BP 90203, 35302 Fougères cedex, France

<sup>2</sup> INSERM, U892, Université de Nantes, Institut de Biologie, 9 Quai Moncoussu, 44093 Nantes Cedex, France

Keywords: microcystins congeners, OATP, Caco-2, cyanotoxins uptake, immunofluorescence





Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/toxicol](http://www.elsevier.com/locate/toxicol)



## Similar uptake profiles of microcystin-LR and -RR in an *in vitro* human intestinal model

P. Zeller<sup>a</sup>, M. Clément<sup>b</sup>, V. Fessard<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Anses, Fougères Laboratory, Contaminant Toxicology Unit, La Haute Marche, BP 90203, 35302 Fougères Cedex, France

<sup>b</sup> INSERM, U892, Université de Nantes, Institut de Biologie, 9 Quai Moncoussu, 44093 Nantes Cedex, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 8 July 2011

Received in revised form 3 August 2011

Accepted 4 August 2011

Available online xxx

#### Keywords:

Microcystins congeners

OATP

Caco-2

Cyanotoxin uptake

Immunofluorescence

### ABSTRACT

Microcystins (MCs) are cyclic hepatotoxins produced by various species of cyanobacteria. Their structure includes two variable amino acids (AA) leading to more than 80 MC variants. In this study, we focused on the most common variant, microcystin-LR (MC-LR), and microcystin-RR (MC-RR), a variant differing by only one AA. Despite their structural similarity, MC-LR elicits higher liver toxicity than MC-RR partly due to a discrepancy in their uptake by hepatic organic anion transporters (OATP 1B1 and 1B3). However, even though ingestion is the major pathway of human exposure to MCs, intestinal absorption of MCs has been poorly addressed. Consequently, we investigated the cellular uptake of the two MC variants in the human intestinal cell line Caco-2 by immunolocalization using an anti-MC antibody. Caco-2 cells were treated for 30 min to 24 h with several concentrations (1–50  $\mu$ M) of both variants. We first confirmed the localization of OATP 3A1 and 4A1 at the cell membrane of Caco-2 cells. Our study also revealed a rapid uptake of both variants in less than 1 h. The uptake profiles of the two variants did not differ in our immunostaining study neither with respect to concentration nor the time of exposure. Furthermore, we have demonstrated for the first time the nuclear localization of MC-RR and confirmed that of MC-LR. Finally, our results suggest a facilitated uptake and an active excretion of MC-LR and MC-RR in Caco-2 cells. Further investigation on the role of OATP 3A1 and 4A1 in MC uptake should be useful to clarify the mechanism of intestinal absorption of MCs and contribute in risk assessment of cyanotoxin exposure.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

In 1996 in Caruaru (Brazil), 76 people died of acute liver failure following haemodialysis with water contaminated with cyanotoxins. Among the suspected toxins, microcystins (MCs) were incriminated (Azevedo et al., 2002; Carmichael, 1997; Pouria et al., 1998). MCs are a family of cyclic hepatotoxins regrouping more than 80 variants produced by several genera of cyanobacteria including *Planktothrix*, *Microcystis*, *Aphanizomenon*, *Nostoc* and *Anabaena* (Carmichael, 1997; Falconer and Humpage, 1996; Fastner et al., 2001). Due to the global proliferation of cyanobacteria, microcystins have been an increasing public health concern for the last several decades (Chorus and Bartram, 1999). Consequently, since 1998, WHO advised a guidance value for drinking water of 1.0  $\mu$ g/l MC-LR, the most toxic MC variant (WHO, 1998).

The toxicity of MCs is mainly due to their ability to inhibit serine/threonine protein phosphatases (Eriksson et al., 1990b; Honkanen et al., 1990; Runnegar et al., 1995b). They have also been demonstrated to induce oxidative stress (Amado and Monserrat,

2010; Ding et al., 1998; Jayaraj et al., 2006; Zegura et al., 2004) and to be potent tumor promoters (Ito et al., 1997; Nishiwaki-Matsushima et al., 1992; Svirčev et al., 2010). Among the MC variants, MC-LR is the most common and MC-RR differs by only one amino acid, an arginine replacing the leucine residue in MC-LR (Chorus and Bartram, 1999). Even though both variants share a strong structural similarity, MC-RR was described *in vivo* as 5.5 times less toxic than MC-LR after intra peritoneal injection in mice (Gupta et al., 2003).

Despite the oral route being main route of human exposure to these toxins (Chorus and Bartram, 1999), very little is known about the absorption of MCs through the intestinal barrier. The detection of MCs in the liver and the alteration of hepatic functions after oral administration of MC-LR or MC-RR (Cazenave et al., 2005; Fawell et al., 1999; Huang et al., 2010; Ito et al., 1997) suggested that MCs are able to cross the intestinal barrier. Even though it is well established that MCs do not easily cross cell membranes, organic anion transporter polypeptides (OATP) have been shown to facilitate the transport of these toxins (Fischer et al., 2005; Hermansky et al., 1993; Runnegar et al., 1995a). Several studies have suggested that the high expression of these OATPs in hepatocytes is responsible for the liver organotropism in response to MCs (Eriksson et al., 1990a; Fischer et al., 2005; Hermansky et al., 1991; Meriluoto et al.,

\* Corresponding author. Tel.: +33 0299 94 78 78; fax: +33 0299 94 78 80.  
E-mail address: [valerie.fessard@anses.fr](mailto:valerie.fessard@anses.fr) (V. Fessard).

1990; Runnegar et al., 1995a). OATPs are grouped in the bile salt transporter family. To date, the human OATP family is composed of 11 members sharing a similar structure (Konig et al., 2006). Among those transporters, three have been described as having the capacity to transport MCs: the hepatocyte-enriched OATP 1B1 and OATP 1B3 transporters, and the ubiquitous OATP 1A2, primarily expressed at the blood–brain barrier (Fischer et al., 2005; Hilgendorf et al., 2007; Oostendorp et al., 2009).

The discrepancy in toxicity between MC-LR and MC-RR observed in previous studies could be a result of differences in transporter mediated cellular uptake. Indeed, cells overexpressing OATP 1B1 or 1B3 elicited a higher sensitivity to MC-LR than to MC-RR suggesting a lower uptake of MC-RR by the hepatic OATPs (Fischer et al., 2010; Monks et al., 2007). However, despite the suggestion that OATP transporters are involved in the intestinal uptake of MCs (Falconer et al., 1992), the isoforms responsible for their uptake into enterocytes are still unknown. Indeed, although OATP 2B1 is highly expressed at the intestinal barrier (Oostendorp et al., 2009), it is not involved in the transport of MC-LR (Fischer et al., 2005). Ubiquitous OATP 1A2, 3A1 and 4A1 (Hilgendorf et al., 2007) are other potential OATP good candidates for intestinal MC uptake.

Since little is known concerning the transport of MCs across the intestinal barrier, we have studied the uptake of the two MCs variants (MC-LR and MC-RR) in the human intestinal cell line Caco-2. Commonly used as a model of the intestinal barrier (Artursson and Karlsson, 1991; Oostendorp et al., 2009), Caco-2 cells have previously been used to compare the cytotoxicity of several MC variants. The results of these studies showed a higher toxicity of MC-LR than MC-RR (Puerto et al., 2009, 2010), suggesting a disparity in uptake by enterocytes, as has already been described for MCs uptake by hepatocytes (Fischer et al., 2010). To investigate this hypothesis, the uptake of both variants was followed in Caco-2 cells by immunolocalization. Moreover, the possibility that an active mechanism was involved in the uptake was also assessed.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Toxins

MC-LR (ALX-350-012, Alexis, Switzerland) and MC-RR (ALX-350-043, Alexis, Switzerland) were purchased from Coger (Paris, France). MC-LR and MC-RR were dissolved according to the manufacturer's recommendations in absolute ethanol (EtOH) and 80% methanol (MeOH) in water (v/v), respectively.

### 2.2. Cell culture conditions

The human colon carcinoma cell line Caco-2 was obtained from the ATCC (Caco-2 HTB37). They were grown (passage 30–38) in GlutaMAX minimum essential medium (MEM) with 1% non essential amino acids (Invitrogen), penicillin (100 IU/ml) and streptomycin (100 µg/ml) (Invitrogen) and supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Invitrogen). Cells were grown in 75 cm<sup>2</sup> flasks at 37 °C in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> and subcultured twice a week.

### 2.3. MTT assay

The cytotoxicity of MC-LR and MC-RR in Caco-2 cells was determined using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT, Sigma) assay. Briefly, Caco-2 cells were seeded into 96 well-plates (Corning) at 70,000 cells/cm<sup>2</sup> in culture medium supplemented with 10% FCS. After 24 h of subculture, cells were exposed to concentrations ranging from 1 to 50 µM of MC-LR or MC-RR in serum-free culture medium for 24 h. For each condition including controls, the solvent concentration was fixed to 2.5%. Cells were then incubated with MTT (0.5 mg/ml) at 37 °C for 2 h. The culture medium was then replaced by an equal volume of acidified isopropanol (HCl 1 N, isopropanol 1/23 (v/v)) to dissolve formazan crystals. The plates were shaken at room temperature for 10 min. Absorbance was measured at 570 nm using a Fluostar Optima (BMG Labtech). At least 2 independent experiments were conducted, each one with technical triplicates. Cytotoxicity was calculated as the percentage of the solvent condition fixed at 100%. Significant differences in cytotoxicity of MCs concentrations compared to controls were determined by one-way ANOVA followed by Dunnett's Multiple Comparison Test.

### 2.4. Immunolocalization of OATPs

Caco-2 cells were seeded in 8 well glass slides Labtek (Nunc) at 70,000 cells/cm<sup>2</sup> in culture medium containing 10% FCS. After 24 h, cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature (RT). After three washes in saline buffer (PBS containing 1 mM CaCl<sub>2</sub> and 1 mM MgCl<sub>2</sub>) for 2 min each, cells were permeabilized in 0.2% Triton X-100 for 10 min at RT. Polyclonal goat anti-OATP 1A2 (E-15), anti-OATP 4A1 (L-16) or anti-OATP 3A1 (S-19) (20 µg/ml) (Santa Cruz) were applied in respective wells and the slides were incubated overnight at 4 °C. Cells were washed 4 times with the washing solution (0.2% Tween 20 in PBS) prior to incubation with 6 µg/ml of the Alexa Fluor 568-conjugated anti-goat secondary antibody (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) for 45 min at RT. After 4 rinses with the washing solution, nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) at 0.5 µg/ml for 3 min at RT. The slides were mounted in Mowiol and observed on a Leica (Heidelberg), SPI confocal laser scanning microscope.

### 2.5. Subcellular localization of MC-LR and MC-RR

Caco-2 cells were seeded in 8 well glass slides (Labtek) at 70,000 cells/cm<sup>2</sup> in culture medium containing 10% FCS. After 24 h, cells were exposed to MC-LR or MC-RR in serum-free culture medium. In the dose–response study, the cells were subjected to 1–50 µM for 4 h and to 20 µM for 30 min–24 h for the time–response study. Cells were then fixed and permeabilized as previously described for OATP detection. Following two washes in saline buffer, non specific binding sites were inactivated with blocking buffer (saline buffer containing 1% bovine serum albumin (BSA)) for 1 h at RT. Incubation with 2 µg/ml of the monoclonal mouse anti-ADDA antibody (clone AD4G2, Alexis Biochemicals) in blocking buffer (1% BSA in PBS) was performed overnight at 4 °C. Cells were rinsed 4 times with washing solution (0.2% Tween 20 in PBS) prior to incubation with 2 µg/ml of the Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse secondary antibody (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) for 45 min at RT. Negative controls were incubated only with the secondary antibody. Following 4 subsequent washes, actin fibers and nuclei were stained with TRITC-labeled phalloidin, for 5 min at 1 µg/ml and with 0.5 µg/ml DAPI for 3 min at RT or with DRAQ5™ (Biosstatus) following the manufacturer's recommendation. The slides were mounted in Mowiol and observed using a Zeiss Axiovert 200M equipped with an optical sectioning system using structured illumination.

For each condition, data from at least 3 fields per well were anonymated and quote for staining intensity and subcellular localization from “–” (no staining) to “+++” (high level staining) after random draw ( $n \geq 2$  independent experiments).

Transects across several cells were performed to confirm the colocalization of the MC staining and the nucleus using a Leica (Heidelberg, Germany) SPI confocal laser scanning microscope.

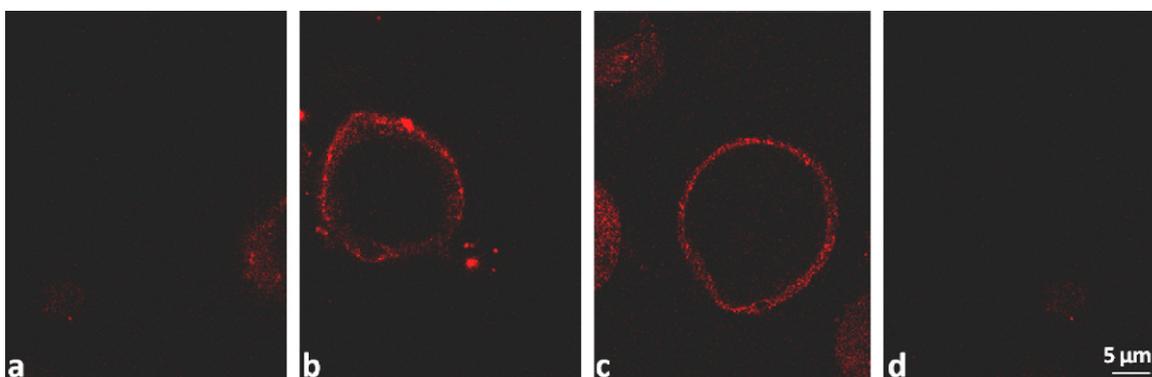
### 2.6. MC-LR and MC-RR uptake studies

Caco-2 cells were seeded in 8 well glass slides (Labtek) at 70,000 cells/cm<sup>2</sup> in medium supplemented with 10% FCS. After 24 h, cells were exposed to 5 µM of MC-LR or MC-RR for 4 h at 4 °C or 37 °C. Immunostaining was performed as previously described for the detection of the subcellular localization of MCs. For each condition, images from at least 6 fields per well were acquired by DMLB Leica microscope. For each field, the mean fluorescence intensity of the toxin staining was quantified using ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>). The mean intensity of each acquired field was linearly corrected by the mean intensity of their respective negative control. In order to normalize the data obtained from the independent experiments ( $n \geq 2$ ), the intensity values at 4 °C were expressed as the percentage of the ones measured at 37 °C. The significance of the differences was tested by the Student unpaired *t*-test.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Detection of OATPs in Caco-2 cells

Cytoplasmic or membrane associated OATP 1A2 immunostaining was undetectable in Caco-2 cells (Fig. 1a). The absence of OATP 1A2 staining was inconsistent with previous studies describing OATP A mRNA expression in this cell line (Hayeshi et al., 2008; Maubon et al., 2007). In contrast, the presence of OATP 4A1 and OATP 3A1 was clearly detected at the membrane of Caco-2 cells (Fig. 1 b and c) in agreement with previous studies demonstrating the expression of OATP 4A1 and 3A1 mRNA in these cells (Hayeshi et al., 2008; Hilgendorf et al., 2007; Sai et al., 2006). Non-specific staining due to the secondary antibody (negative control) was negligible (Fig. 1 d). Therefore, in our culture conditions, undifferentiated Caco-2 cells expressed at least two OATPs (OATP 4A1 and 3A1) at the cell membrane.



**Fig. 1.** Immunofluorescent detection of OATPs at the plasma membrane of Caco-2 cells: (a)OATP 1A2, (b) OATP 3A1, (c) OATP 4A1 and (d) negative control (secondary antibody only).

### 3.2. Cytotoxicity of MC-LR and -RR

To determine the concentrations of MC-LR and MC-RR to be used in uptake studies, we first performed a cytotoxicity assay to evaluate appropriate concentrations giving limited toxicity. No significant cytotoxic effect was induced at concentrations of MC-LR or MC-RR ranging from 1 to 50  $\mu$ M. Our data are consistent with previous studies demonstrating a lack of toxicity up to 50  $\mu$ M after 24 h exposure to either MC-LR (Chong et al., 2000; Puerto et al., 2010) or MC-RR (Puerto et al., 2009) in undifferentiated Caco-2 cells.

### 3.3. Effect of microcystin concentration on the subcellular localization of MC-LR and MC-RR

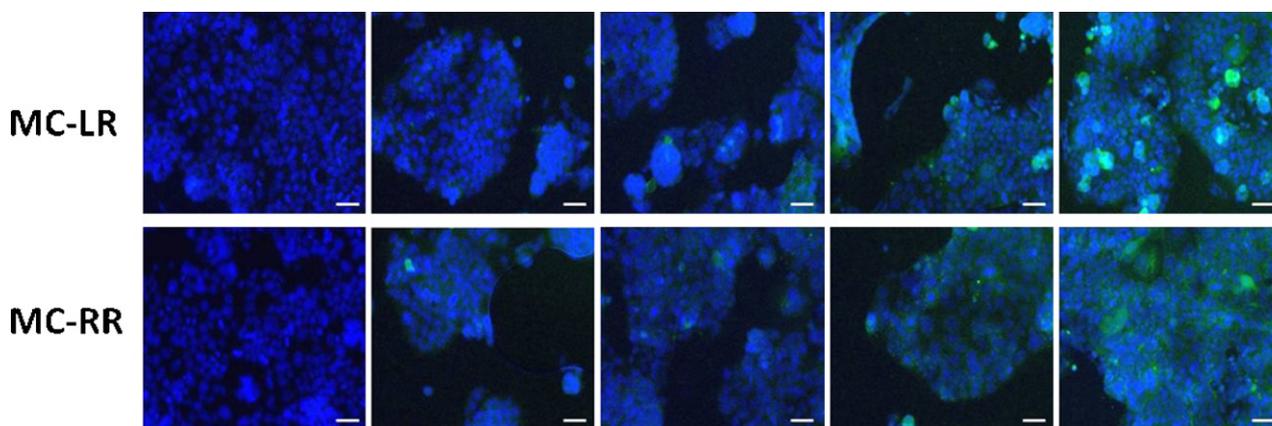
The dose–response study was performed with selected exposure duration of 4 h. While no staining was observed for the

negative control, the fluorescence intensity increased with the concentration of each toxin (Fig. 2). The presence of apoptotic cells, which was associated with intense staining, was independent of toxin exposure as no difference was observed between control and treated cells. No difference in the uptake of MC-LR and MC-RR could be observed at 4 h.

Furthermore, with the exception of 5  $\mu$ M, the subcellular localization of MC-LR and MC-RR was not dependent on concentration. Indeed, at 5  $\mu$ M MC-LR was detected primarily at the cell periphery whereas MC-RR was located close to the nucleus.

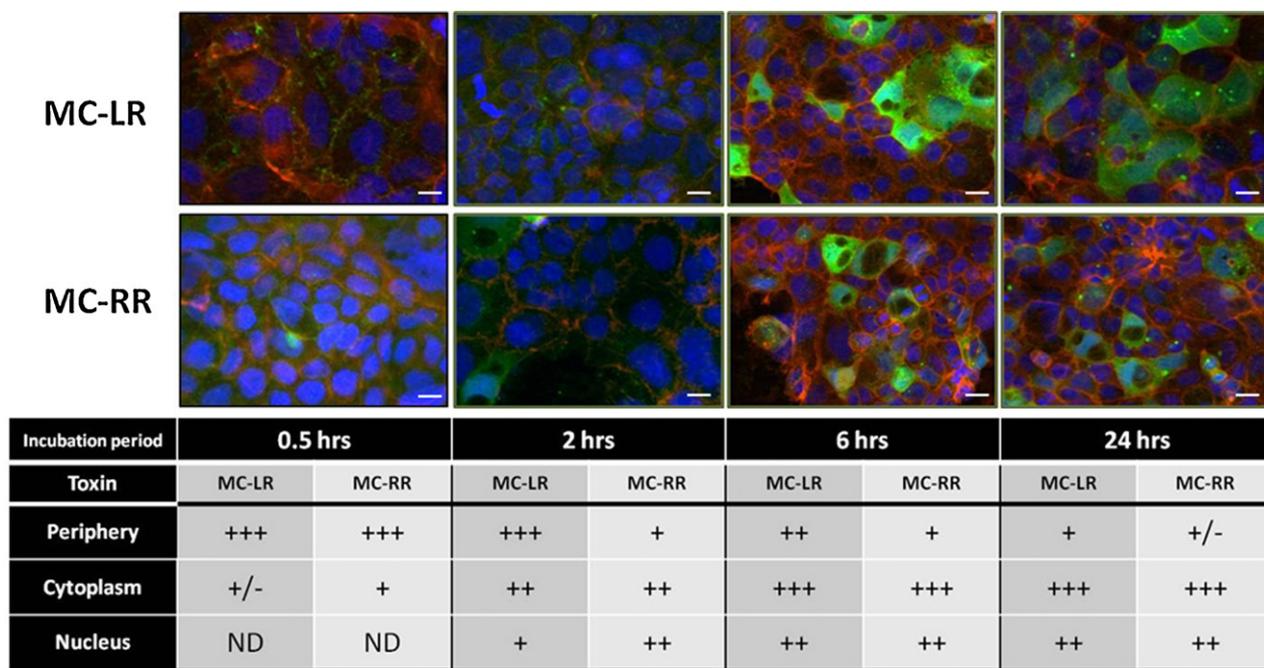
### 3.4. Time-dependent subcellular localization of MC-LR and MC-RR and effect on the actin cytoskeleton

The time course study was run with a selected concentration of 20  $\mu$ M MC-LR or MC-RR. Cell-associated immunofluorescence



Treatment	Negative control		1 $\mu$ M		5 $\mu$ M		20 $\mu$ M		50 $\mu$ M	
	MC-LR	MC-RR	MC-LR	MC-RR	MC-LR	MC-RR	MC-LR	MC-RR	MC-LR	MC-RR
Staining intensity	-	-	+/-	+/-	+	+	++	++	+++	+++
Periphery	ND	ND	LD	LD	+++	+	++	++	+++	+++
Cytoplasm	ND	ND	LD	LD	++	++	+++	+++	+++	+++
Nucleus	ND	ND	LD	LD	+	++	+++	+++	+++	+++

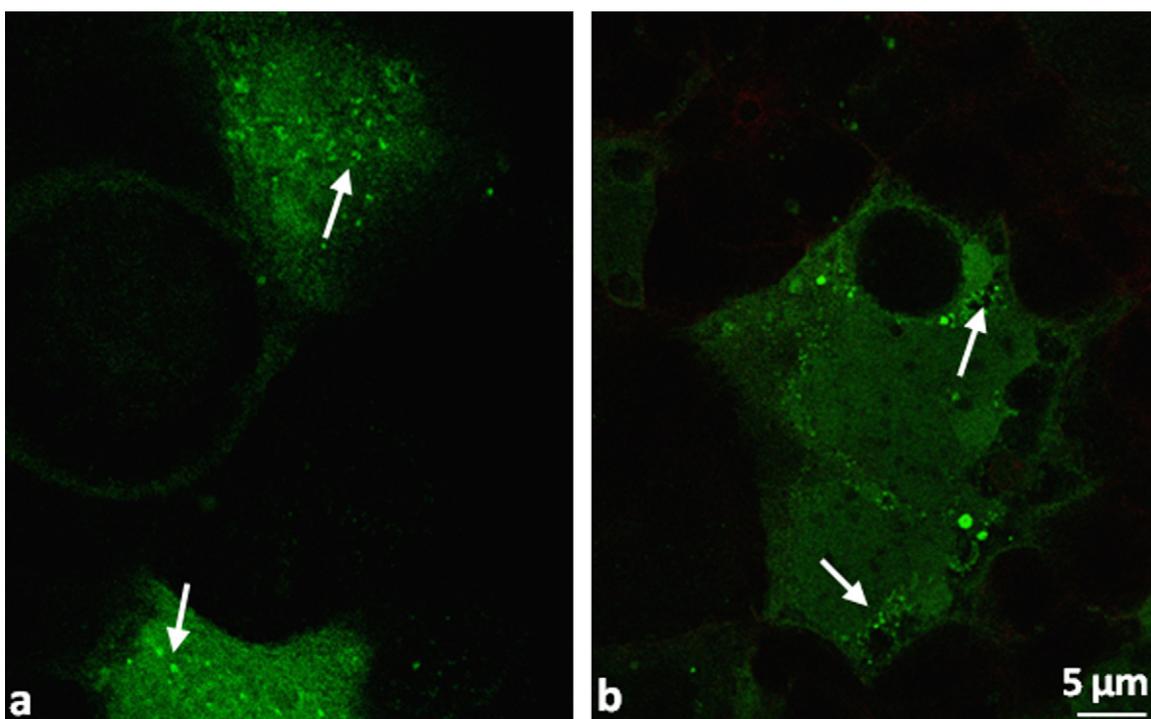
**Fig. 2.** Uptake and subcellular localization of MC-LR and MC-RR in Caco-2 cells. Caco-2 cells were treated for 4 h with concentrations of MC-LR or MC-RR ranging from 1 to 50  $\mu$ M. The cellular localization of the toxins was detected by an anti-ADDA antibody and an Alexa fluor 488 secondary antibody. Nuclei were counter-stained with DAPI. Scale bar: 20  $\mu$ m, ND: Alexa fluor 488 staining not detected, LD: low signal of Alexa fluor 488 staining. (+/-)low signal intensity. The symbols (-), (+), (++) and (+++) represent the relative importance of the staining localization into the cell.



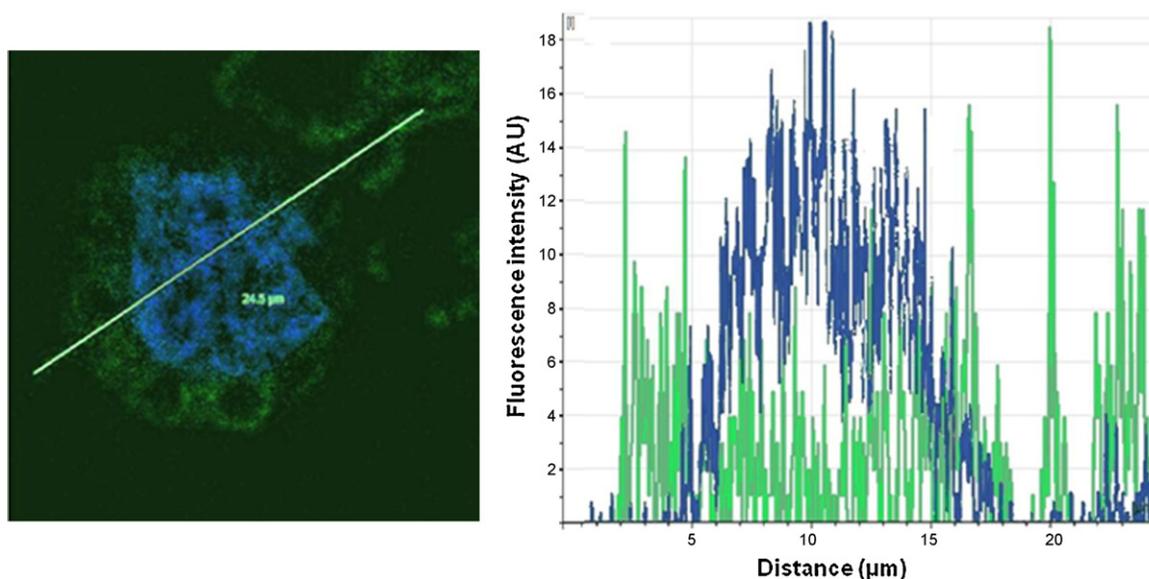
**Fig. 3.** Time dependent subcellular localization of MC-LR and MC-RR in Caco-2 cells. The Caco-2 cells were treated during several durations with 20  $\mu$ M MC-LR or MC-RR. The cellular localization of the toxins was detected by an anti-ADDA antibody and an Alexa fluor 488 secondary antibody. Nuclei were counter-stained with DAPI and actin was detected by phalloidin TRITC. Scale bar: 10  $\mu$ m, ND: Alexa fluor 488 signal not detected. The symbols (-), (+), (++) and (+++) represent the relative importance of the staining localization into the cell.

was observed from an early stage for both toxins. Indeed, after only 30 min of treatment, staining at the cell membrane could be clearly observed (Fig. 3). After 2 h the toxin progressed inside the cell reaching the cytoplasm and the nucleus after 6 h. Globally, no major difference could be distinguished between the staining of the two toxins. Although the membrane staining appeared weaker for MC-RR than MC-LR after 2 h (Fig. 3), no further difference could be detected from 6 to 24 h. The difference in toxicity between

MC-LR and MC-RR was suggested to be related to their uptake (Fischer et al., 2010). The OATP 1B1 and 1B3 involved in the MC hepatic uptake were shown to be variant selective (Fischer et al., 2010). However, in enterocytes, those isoforms are expressed at very low levels (Hilgendorf et al., 2007; Oostendorp et al., 2009) suggesting that other, less variant selective OATPs could be responsible for the MC uptake at the human intestinal barrier, at least in Caco-2 cells. Moreover, ethanol has been reported to influence drug



**Fig. 4.** Caco-2 cells treated with 20  $\mu$ M of: (a) MC-LR and (b) MC-RR for 24 h. The arrows emphasize the MCs granular staining.



**Fig. 5.** Nuclear localization of MC-RR. Caco-2 cells treated with 10 μM of MC-RR for 4 h. The MC-RR was detected by an anti-ADDA antibody and an Alexa 488 secondary antibody, the nucleus were stained with DRAQ5. On the right, confocal acquisition of a single Caco-2 cell showing the location of the transect (24.5 μm length) across a cell. On the left, fluorescence intensity profile of MC (Alexa fluor 488, green) and nucleus (DRAQ5, blue) along the transect. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

availability through modulation of transporters and metabolic enzymes expression (Fisher et al., 2008; Jin et al., 2011). Therefore, as a different solvent for MC-LR (EtOH) and MC-RR (MeOH) dissolution was used in our study, further investigation is required to confirm our results, mainly after few hours of exposure.

Furthermore, no significant alteration of the actin cytoskeleton was observed (Fig. 3) irrespective of the duration of treatment or the MC variant. Even if this outcome is contrary to most of the data published elsewhere (Batista et al., 2003; Ding et al., 2000; Eriksson et al., 1989), it is consistent with the results of MC-LR in Vero-E6 cells (Alverca et al., 2009). These results could be related to the low sensitivity of Caco-2 and Vero-E6 cells to MCs (Alverca et al., 2009; Botha et al., 2004; Dias et al., 2009; Puerto et al., 2009, 2010).

Therefore, our immunofluorescence studies indicate that Caco-2 cells were able to uptake MC-LR and MC-RR with a similar trend. To date, this study is the first to confirm the uptake of MCs by human intestinal cells.

### 3.5. Intracellular distribution of MC-LR and MC-RR

Treatment of Caco-2 cells with MC-LR or MC-RR resulted in a diffuse intracellular localization of microcystin (Fig. 4) although some accumulation in granules was observed (Fig. 4 arrows). This granular MC immunofluorescence was previously described in primary murine brain cells treated with MC-LR using the same primary antibody (Feurstein et al., 2009) and could correspond to the insoluble PP1-MC adduct described by Mikhailov et al. (2003). Thus we could conclude that this granular staining is neither cell type nor toxin variant specific.

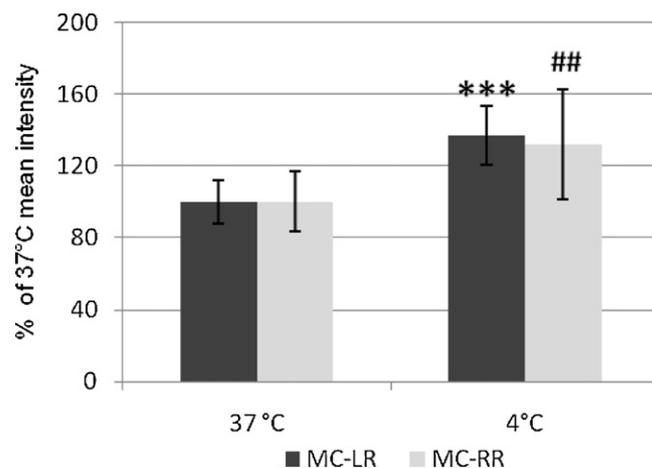
Moreover, although the nuclear localization of MC was weak, confocal analyses confirmed MC co-localization within the nucleus (Fig. 5). Furthermore, our results confirm previous studies demonstrating that MC-LR could reach the nucleus (Feurstein et al., 2009; Guzman et al., 2003) and depict for the first time a similar behavior for MC-RR.

### 3.6. Effect of temperature on MC uptake

Caco-2 cells incubated with MC-LR or MC-RR at 4 °C showed a consistent staining similar for both toxin variants (Fig. 6). This

suggests that cellular uptake occurs through a passive or a facilitated diffusion rather than an ATP dependent transfer. However, passive diffusion is likely not a physiologically significant mechanism since MC-LR and MC-RR exhibited a very low potential to pass through lipid membranes of animal cells (Vestervik et al., 2010; Vestervik and Meriluoto, 2003). This is consistent with the involvement of OATPs in the uptake of MCs as these transporters do not require ATP for transport (Hagenbuch and Meier, 2004).

The intracellular accumulation of MC-LR and MC-RR at 4 °C was significantly higher than that observed at 37 °C (Fig. 6: *t*-test: *p*-value =  $8.3 \times 10^{-6}$  and *p*-value = 0.004, respectively). This suggests that an active mechanism is likely involved in the elimination of MC from the cell. Our hypothesis is consistent with the results of several studies indicating that an active excretion of the toxin occurred through energy dependent efflux pumps such as P-gp (Amé et al., 2009; Contardo-Jara et al., 2008). Furthermore, the involvement of efflux pumps could explain the limited effects of the toxins on Caco-2 cells and Vero-6 cell lines (Alverca et al., 2009; Botha et al., 2004; Dias et al., 2009; Puerto et al., 2009, 2010).



**Fig. 6.** Comparison of MCs uptake depending on the temperature;  $n \geq 2$  independent experiment; \*\*\* significantly different (*p*-value < 0.001) from MC-LR 37 °C; ## significantly different (*p*-value < 0.01) from MC-RR 37 °C.

Therefore our data suggest that, in Caco-2 cells, the intracellular concentration of MCs is regulated both by facilitated uptake, likely involving OATP transporters, and an active mechanism of excretion through efflux pumps.

#### 4. Conclusion

In conclusion, we describe for the first time OATP 4A1 and OATP 3A1 transporters localization in undifferentiated Caco-2 cells membrane. In light of several studies demonstrating the importance of these transporters in MC uptake in hepatocytes, it is likely that they also facilitate transport in intestinal cells. Our results indicate the fast uptake of MC-LR and MC-RR in a human intestinal cell culture model, with a similar profile for both variants. Finally, our results suggest that MC-LR and MC-RR cellular contents in Caco-2 depend on both a facilitated uptake and an active excretion. Further studies on the potencies of OATP 3A1 and 4A1 in MCs uptake and of well known efflux transporters in MCs excretion should be useful to clarify this notion. Considering that MCs bioavailability accounts mainly for MCs hepatotoxicity following ingestion, investigation on MCs intestinal absorption is crucial and must also be carried on with other MCs variants to contribute in cyanotoxin risk characterization.

#### Funding

Financial support by AFSSET EST 2007 57 project.

#### Conflict of interest

None.

#### Acknowledgements

The authors thank Philippe Hulin of PICell (cellular and tissular imaging core facility of Nantes University) for his assistance on confocal microscopy and Kevin Hogeveen for english corrections.

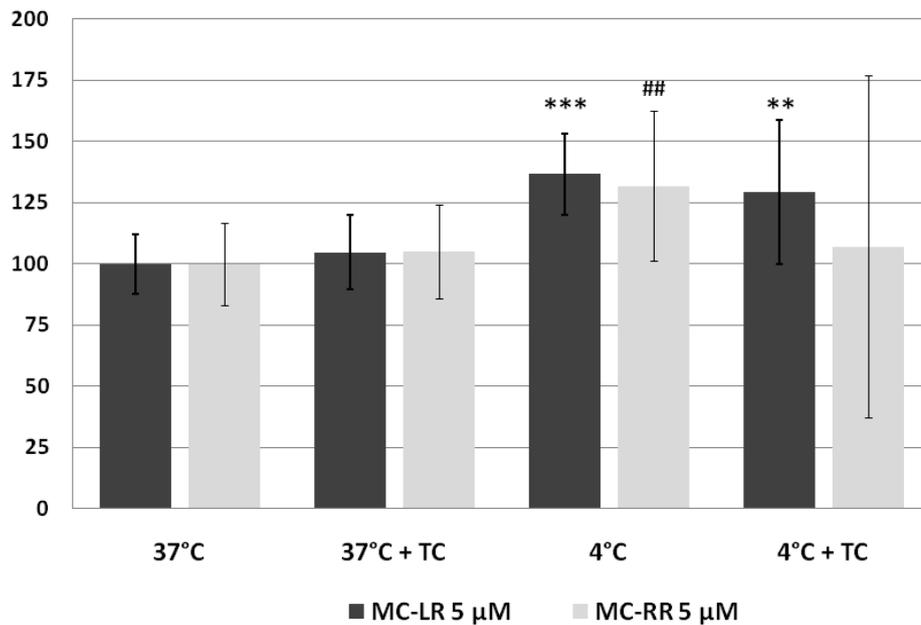
#### References

- Alverca, E., Andrade, M., Dias, E., Sam Bento, F., Batoréu, M.C.C., Jordan, P., Silva, M.J., Pereira, P., 2009. Morphological and ultrastructural effects of microcystin-LR from *Microcystis aeruginosa* extract on a kidney cell line. *Toxicol.* 54, 283–294.
- Amado, L.L., Monserrat, J.M., 2010. Oxidative stress generation by microcystins in aquatic animals: why and how. *Environ. Int.* 36, 226–235.
- Amé, M.V., Baroni, M.V., Galanti, L.N., Bocco, J.L., Wunderlin, D.A., 2009. Effects of microcystin-LR on the expression of P-glycoprotein in *Jenynsia multidentata*. *Chemosphere* 74, 1179–1186.
- Artursson, P., Karlsson, J., 1991. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175, 880–885.
- Azevedo, S.M., Carmichael, W.W., Jochimsen, E.M., Rinehart, K.L., Lau, S., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K., 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology* 181–182, 441–446.
- Batista, T., de Sousa, G., Suput, J.S., Rahmani, R., Suput, D., 2003. Microcystin-LR causes the collapse of actin filaments in primary human hepatocytes. *Aquat. Toxicol.* 65, 85–91.
- Botha, N., Gehringer, M.M., Downing, T.G., van de Venter, M., Shephard, E.G., 2004. The role of microcystin-LR in the induction of apoptosis and oxidative stress in Caco2 cells. *Toxicol.* 43, 85–92.
- Carmichael, W.W., 1997. The cyanotoxins. *Adv. Bot. Res.* 27, 211–256.
- Cazenave, J., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.D.L.A., Ame, M.V., Krause, E., Pflugmacher, S., Wiegand, C., 2005. Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis*: a field and laboratory study. *Aquat. Toxicol.* 75, 178–190.
- Chong, M.W.K., Gu, K.D., Lam, P.K.S., Yang, M., Fong, W.F., 2000. Study on the cytotoxicity of microcystin-LR on cultured cells. *Chemosphere* 41, 143–147.
- Chorus, I., Bartram, J., 1999. *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. WHO.
- Contardo-Jara, V., Pflugmacher, S., Wiegand, C., 2008. Multi-xenobiotic-resistance a possible explanation for the insensitivity of bivalves towards cyanobacterial toxins. *Toxicol.* 936–943.
- Dias, E., Andrade, M., Alverca, E., Pereira, P., Batoréu, M.C.C., Jordan, P., Silva, M.J., 2009. Comparative study of the cytotoxic effect of microcystin-LR and purified extracts from *Microcystis aeruginosa* on a kidney cell line. *Toxicol.* 53, 487–495.
- Ding, W., Shen, H., Zhu, H., 1998. Hepatotoxicity and formation of reactive oxygen species induced by microcystin aeruginosa toxin. *Zhonghua yu fang yi xue za zhi* 32, 278–280.
- Ding, W.X., Shen, H.M., Ong, C.N., 2000. Microcystin cyanobacteria extract induces cytoskeletal disruption and intracellular glutathione alteration in hepatocytes. *Environ. Health Perspect.* 108, 605–609.
- Eriksson, J.E., Paatero, G.L., Meriluoto, J.A., Codd, G.A., Kass, G.E., Nicotera, P., Orrenius, S., 1989. Rapid microfilament reorganization induced in isolated rat hepatocytes by microcystin-LR, a cyclic peptide toxin. *Exp. Cell Res.* 185, 86–100.
- Eriksson, J.E., Gronberg, L., Nygaard, S., Slotte, J.P., Meriluoto, J.A.O., 1990a. Hepatocellular uptake of 3H-dihydroxymicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin. *Biochim. Biophys. Acta: Biomembr.* 1025, 60–66.
- Eriksson, J.E., Toivola, D., Meriluoto, J.A.O., Karaki, H., Han, Y.G., Hartshorne, D., 1990b. Hepatocyte deformation induced by cyanobacterial toxins reflects inhibition of protein phosphatases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173, 1347–1353.
- Falconer, I.R., Dornbusch, M., Moran, G., Yeung, S.K., 1992. Effect of the cyanobacterial (blue-green algal) toxins from microcystis aeruginosa on isolated enterocytes from the chicken small intestine. *Toxicol.* 30, 790–793.
- Falconer, I.R., Humpage, A.R., 1996. Tumour promotion by cyanobacterial toxins. *Phycologia* 35, 74–79.
- Fastner, J., Erhard, M., Von Döhren, H., 2001. Determination of oligopeptide diversity within a natural population of microcystin spp (cyanobacteria) by typing single colonies by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5069–5076.
- Fawell, J.K., Mitchell, R.E., Everett, D.J., Hill, R.E., 1999. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse. I. Microcystin-LR. *Hum. Exp. Toxicol.* 18, 162–167.
- Feurstein, D., Holst, K., Fischer, A., Dietrich, D.R., 2009. OATP-associated uptake and toxicity of microcystins in primary murine whole brain cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 234, 247–255.
- Fischer, A., Hoeger, S.J., Stemmer, K., Feurstein, D.J., Knobeloch, D., Nussler, A., Dietrich, D.R., 2010. The role of organic anion transporting polypeptides (OATPs/SLCOs) in the toxicity of different microcystin congeners *in vitro*: a comparison of primary human hepatocytes and OATP-transfected HEK293 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 245, 9–20.
- Fischer, W.J., Altheimer, S., Cattori, V., Meier, P.J., Dietrich, D.R., Hagenbuch, B., 2005. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203, 257–263.
- Fisher, S.J., Lee, I.J., Swaan, P.W., Eddington, N.D., 2008. Evaluation of the effect of ethanol's toxic metabolite acetaldehyde on the gastrointestinal oligopeptide transporter, PEPT1: *in vitro* and *in vivo* studies. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 32, 162–170.
- Gupta, N., Pant, S.C., Vijayaraghavan, R., Rao, P.V.L., 2003. Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants (LR, RR, YR) in mice. *Toxicology* 188, 285–296.
- Guzman, R.E., Solter, P.F., Runnegar, M.T., 2003. Inhibition of nuclear protein phosphatase activity in mouse hepatocytes by the cyanobacterial toxin microcystin-LR. *Toxicol.* 41, 773–781.
- Hagenbuch, B., Meier, P.J., 2004. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO super-family, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflug. Arch. Eur. J. Physiol.* 447, 653–665.
- Hayashi, R., Hilgendorf, C., Artursson, P., Augustijns, P., Brodin, B., Dehertogh, P., Fisher, K., Fossati, L., Hovenkamp, E., Korjamo, T., Masungi, C., Maubon, N., Mols, R., Müllertz, A., Mönkkönen, J., O'Driscoll, C., Oppers-Tiemissen, H.M., Ragnarsson, E.G.E., Rooseboom, M., Ungell, A.L., 2008. Comparison of drug transporter gene expression and functionality in Caco-2 cells from 10 different laboratories. *Eur. J. Pharm. Sci.* 35, 383–396.
- Hermansky, S.J., Stohs, S.J., Eldeen, Z.M., Roche, V.F., Mereish, K.A., 1991. Evaluation of potential chemoprotectants against microcystin-LR hepatotoxicity in mice. *J. Appl. Toxicol.* 11, 65–73.
- Hermansky, S.J., Markin, R.S., Fowler, E.H., Stohs, S.J., 1993. Hepatic ultrastructural changes induced by the toxin microcystin-LR (MCLR) in mice. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 12, 101–106.
- Hilgendorf, C., Ahlin, G., Seithel, A., Artursson, P., Ungell, A.L., Karlsson, J., 2007. Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines. *Drug Metab. Dispos.* 35, 1333–1340.
- Honkanen, R.E., Zwiller, J., Moore, R.E., Daily, S.L., Khatra, B.S., Dukelow, M., Boynton, A.L., 1990. Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* 265, 19401–19404.
- Huang, P., Zheng, Q., Xu, L.-H., 2010. The apoptotic effect of oral administration of microcystin-RR on mice liver. *Environ. Toxicol.* Mar 1. [Epub ahead of print].
- Ito, E., Kondo, F., Harada, K.-I., 1997. Hepatic necrosis in aged mice by oral administration of microcystin-LR. *Toxicol.* 35, 231–239.
- Jayaraj, R., Anand, T., Rao, P.V.L., 2006. Activity and gene expression profile of certain antioxidant enzymes to microcystin-LR induced oxidative stress in mice. *Toxicology* 220, 136–146.
- Jin, M., Arya, P., Patel, K., Singh, B., Silverstein, P.S., Bhat, H.K., Kumar, A., Kumar, S., 2011. Effect of alcohol on drug efflux protein and drug metabolic enzymes in U937 macrophages. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 35, 132–139.
- Konig, J., Seithel, A., Gradhand, U., Fromm, M.F., 2006. Pharmacogenomics of human OATP transporters. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 372, 432–443.

- Maubon, N., Le Vee, M., Fossati, L., Audry, M., Le Ferrec, E., Bolze, S., Fardel, O., 2007. Analysis of drug transporter expression in human intestinal Caco-2 cells by real-time PCR. *Fundamen. Clin. Pharmacol.* 21, 659–663.
- Meriluoto, J.A.O., Nygard, S.E., Dahlem, A.M., Eriksson, J.E., 1990. Synthesis, organotropism and hepatocellular uptake of two tritium-labeled epimers of dihydromicrocystin-LR, a cyanobacterial peptide toxin analog. *Toxicol.* 28, 1439–1446.
- Mikhailov, A., Härmälä-Braskén, A.-S., Hellman, J., Meriluoto, J., Eriksson, J.E., 2003. Identification of ATP-synthase as a novel intracellular target for microcystin-LR. *Chem. Biol. Interact.* 142, 223–237.
- Monks, N.R., Liu, S., Xu, Y., Yu, H., Bendelow, A.S., Moscow, J.A., 2007. Potent cytotoxicity of the phosphatase inhibitor microcystin LR and microcystin analogues in OATP1B1- and OATP1B3-expressing HeLa cells. *Mol. Cancer Ther.* 6, 587–598.
- Nishiwaki-Matsushima, R., Ohta, T., Nishiwaki, S., Suganuma, M., Kohyama, K., Ishikawa, T., Carmichael, W.W., Fujiki, H., 1992. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 118, 420–424.
- Oostendorp, R.L., Beijnen, J.H., Schellens, J.H., 2009. The biological and clinical role of drug transporters at the intestinal barrier. *Cancer Treat. Rev.* 35, 137–147.
- Pouria, S., De Andrade, A., Barbosa, J., Cavalcanti, R.L., Barreto, V.T.S., Ward, C.J., Preiser, W., Poon, G.K., Neild, G.H., Codd, G.A., 1998. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet* 352, 21–26.
- Puerto, M., Pichardo, S., Jos, A., Camean, A.M., 2009. Comparison of the toxicity induced by microcystin-RR and microcystin-YR in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells. *Toxicol.* 54, 161–169.
- Puerto, M., Pichardo, S., Jos, A., Camean, A.M., 2010. Microcystin-LR induces toxic effects in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells. *Arch. Toxicol.*
- Runnegar, M., Berndt, N., Kaplowitz, N., 1995a. Microcystin uptake and inhibition of protein phosphatases: effects of chemoprotectants and self-inhibition in relation to known hepatic transporters. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 134, 264–272.
- Runnegar, M., Berndt, N., Kong, S.-M., Lee, E.Y.C., Zhang, L., 1995b. *In vivo* and *in vitro* binding of microcystin to protein phosphatases 1 and 2A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216, 162–169.
- Sai, Y., Kaneko, Y., Ito, S., Mitsuoka, K., Kato, Y., Tamai, I., Artursson, P., Tsuji, A., 2006. Predominant contribution of organic anion transporting polypeptide OATP-B (OATP2B1) to apical uptake of estrone-3-sulfate by human intestinal Caco-2 cells. *Drug Metab. Dispos.* 34, 1423–1431.
- Svirčev, Z., Baltić, V., Gantar, M., Juković, M., Stojanović, D., Baltić, M., 2010. Molecular aspects of microcystin-induced hepatotoxicity and hepatocarcinogenesis. *J. Environ. Sci. Health Part C: Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 28, 39–59.
- Vesterkvist, P., Misiorek, J., Spoo, L., Toivola, D., Meriluoto, J., 2010. Cytotoxicity effects of microcystins of different hydrophobicities. In: *International Conference on Toxic Cyanobacteria*, Istanbul.
- Vesterkvist, P.S.M., Meriluoto, J.A.O., 2003. Interaction between microcystins of different hydrophobicities and lipid monolayers. *Toxicol.* 41, 349–355.
- WHO, 1998. *Guidelines for Drinking Water Quality*, Addendum to vol. 1, Recommendations, p. 36.
- Zegura, B., Lah, T.T., Filipic, M., 2004. The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage. *Toxicology* 200, 59–68.







**Figure 25 : Comparaison de l'absorption des MCs en fonction de la température et de la présence de compétiteur des transporteurs des sels biliaires.**

Valeur moyenne ± écart type, n> 10 champs issus de 2 études indépendantes

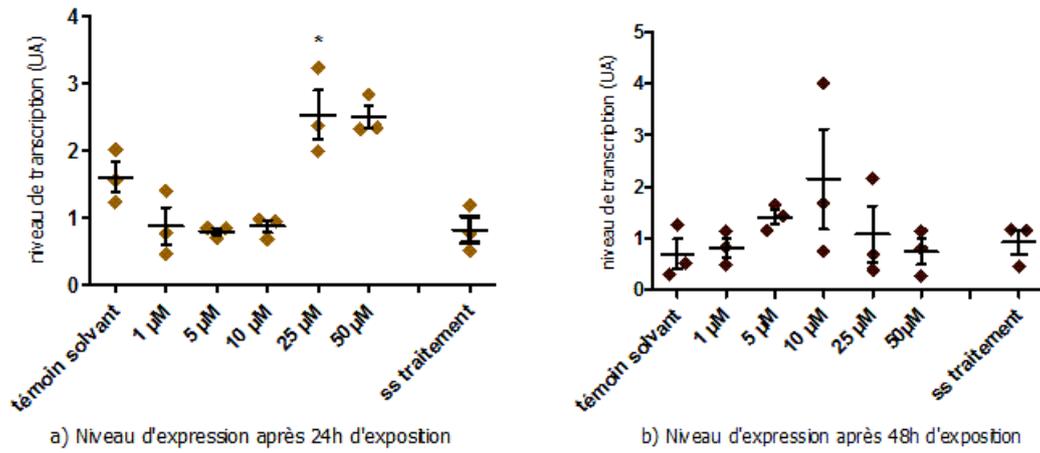
+ TC : co-incubation avec du taurocholate

\*\*\*: significativement différent de la condition MC-LR à 37°C (p-value < 0.001)

## : Significativement différent de la condition MC-RR à 37°C (p-value < 0.01)

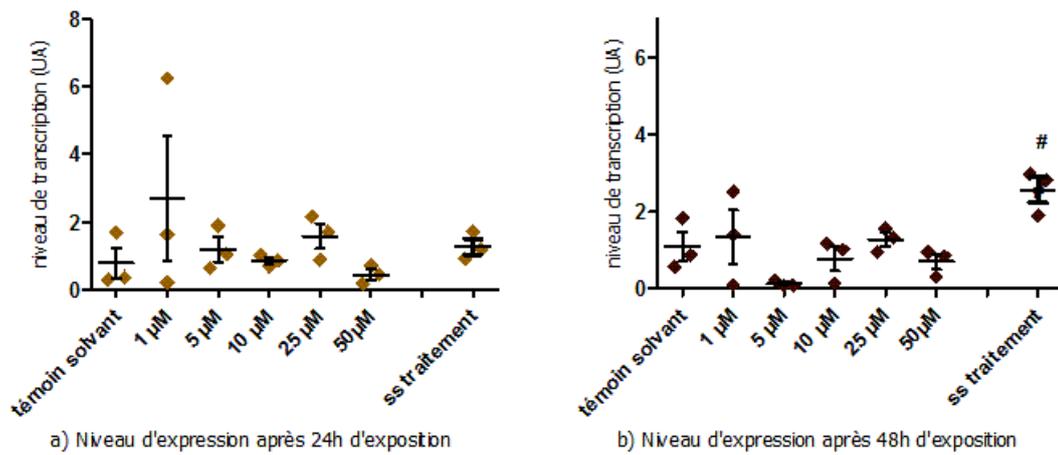
### 3.3 Étude de l'influence de compétiteurs sur l'influx des MCs dans les Caco-2

Comme déjà décrit dans l'article 1, le marquage de la MC-LR et de la MC-RR est significativement plus important à 4°C qu'à 37°C. L'incubation des MCs en présence de taurocholate n'induit pas de modification du marquage aussi bien pour la MC-LR que pour la MC-RR à 37°C (**cf. Figure 25**). A 4°C, le marquage de la MC-LR en présence de TC est significativement supérieur à celui obtenu à 37°C sans TC. Cependant, il n'y a pas de différence significative avec le marquage de la MC-LR à 4°C. Pour la MC-RR, compte tenu de la grande variabilité inter-étude, aucune différence significative n'est constatée en présence de TC aussi bien à 37°C qu'à 4°C (**cf. Figure 25**). Nous ne pouvons donc pas conclure sur un effet du TC sur l'absorption des MCs après 4 heures d'incubation.



**Figure 26 : Effet de la MC-LR sur le niveau de transcription du gène CYP 3A4**

\* p-value du test post hoc de Dunett vis-à-vis de la condition témoin solvant < 0,05.



**Figure 27 : Effet de la MC-LR sur le niveau de transcription du gène GSTα<sub>1</sub>**

# p-value du test t non apparié (témoin solvant vs témoin sans traitement) < 0,05.

## 4. Étude exploratoire de l'effet de la MC-LR sur l'expression de gènes associé à la détoxification dans le modèle Caco-2

### 4.1 Effet de la MC-LR sur l'expression d'enzymes du métabolisme dans les cellules Caco-2

#### 4.1.1 Effet de la MC-LR sur l'expression du cytochrome P450 3A4 (Cyp 3A4)

Cette étude confirme que, dans nos conditions de culture, le gène Cyp 3A4 est bien exprimé par les Caco-2 différenciées. Les données issues de 24 heures d'exposition indiquent une nette augmentation du niveau de transcription de Cyp 3A4 en fonction de la concentration en MC-LR dans les Caco-2 différenciées (one way ANOVA : p-value = 0,0002). La comparaison du témoin solvant et du témoin sans traitement n'indique pas de différence significative (cf. **Figure 26 a**). Nous pouvons donc conclure que le traitement avec la MC-LR augmente le niveau de transcription du gène Cyp 3A4.

A 48h, l'analyse de variance n'indique pas d'effet du traitement sur le niveau de transcription du Cyp3A4 que ce soit avec la MC-LR ou avec le solvant. Il faut noter une grande variabilité de réponse des réplicats (cf. **Figure 26 b**).

#### 4.1.2 Effet de la MC-LR sur l'expression de la glutathion S transférase alpha 1 (GST $\alpha$ 1)

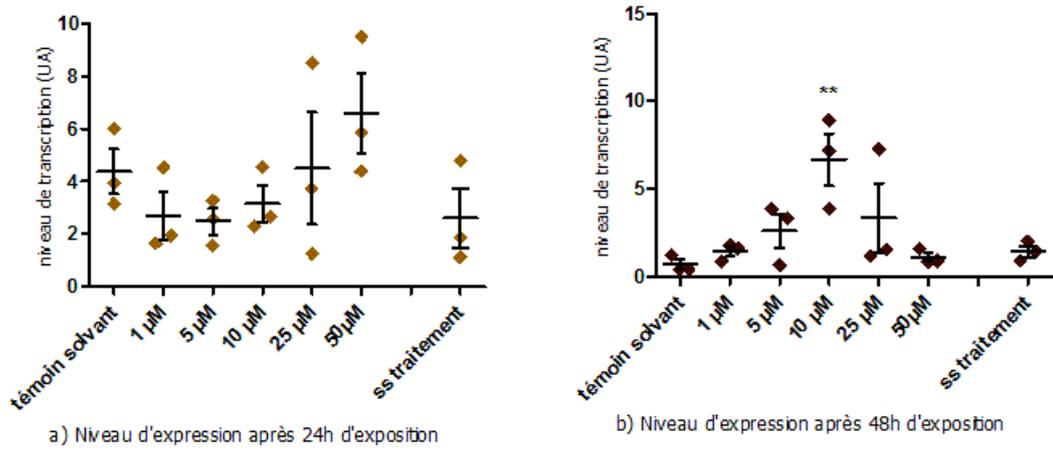
Comme pour les autres gènes étudiés, le gène de la GST $\alpha$ <sub>1</sub> est bien exprimé par les Caco-2 différenciées.

Aucun effet de la MC-LR sur le niveau de transcription n'est détecté après 24 ou 48 heures d'exposition (cf. **Figure 27**).

### 4.2 Effet de la MC-LR sur l'expression de transporteurs d'efflux dans les Caco-2

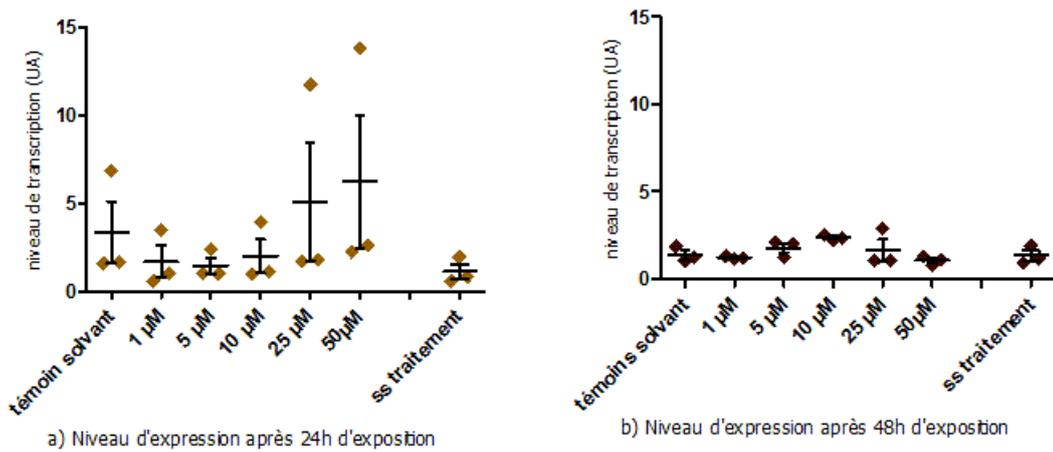
#### 4.2.1 Effet de la MC-LR sur l'expression de MDR1

Cette étude nous permet ainsi de confirmer que le gène de la P-gp (MDR1) est bien exprimé par les cellules Caco-2 différenciées dans nos conditions de culture. L'analyse de variance des données obtenues après 24 heures d'incubation avec la MC-LR n'indique pas d'effet significatif du traitement sur le niveau d'expression de MDR1 (cf. **Figure 28 a**). De même, aucune différence significative n'est détectée entre les témoins.



**Figure 28 : Effet de la MC-LR sur le niveau de transcription du gène MDR1**

\*\* p-value du test post hoc de Dunett vis-à-vis de la condition témoin solvant < 0,01



**Figure 29 : Effet de la MC-LR sur le niveau de transcription du gène MRP1**

Par contre, après 48 heures d'exposition, une augmentation significative de l'expression est observée (one-way ANOVA : p-value = 0,0230) (**cf. Figure 28 b**). Aucun effet du solvant n'est détecté pour cette durée d'exposition.

Ces résultats suggèrent donc une augmentation du niveau d'expression du gène MDR1 après 48h d'exposition à la MC-LR.

#### *4.2.2 Effet de la MC-LR sur l'expression de MRP1*

Le gène MRP1 est exprimé par les Caco-2 différenciées dans nos conditions de cultures. Les analyses de variances permettant d'étudier l'effet concentration à 24h et à 48h ne révèlent pas d'effet de la MC-LR sur le niveau de transcription. Le solvant n'induit pas non plus de modification significative de l'expression par rapport au témoin, que ce soit après 24 ou 48 heures de traitement (**cf. Figure 29**).

## 5. Discussion

### 5.1 La MC-LR et la MC-RR ne sont pas toxique pour les Caco-2 jusqu'à 50 $\mu\text{M}$ après 24h d'exposition

Que ce soit à 4h ou 24h d'exposition, la MC-LR et la MC-RR n'induisent pas de cytotoxicité sur les Caco-2 non différenciées jusqu'à 50 $\mu\text{M}$ . Une faible cytotoxicité est observée pour une concentration plus élevée (100 $\mu\text{M}$ ) mais uniquement avec la MC-LR (cf. **Figure 19 & Figure 20**). Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par les équipes de Puerto *et al.* et de Chong *et al.* (Chong et al 2000; Puerto et al 2009; Puerto et al 2010b) alors que Botha *et al.* (2004) rapportent une cytotoxicité de plus de 80 % dès 24h d'exposition à la MC-LR (à 50  $\mu\text{M}$ ). Cependant, la densité cellulaire utilisée par l'équipe de Botha *et al.* est 20 fois inférieure à celle de nos conditions de culture et 5 fois inférieure à celle des autres équipes (Chong et al 2000; Puerto et al 2009; Puerto et al 2010b), ce qui peut expliquer cette divergence de résultat.

Après 48h, un effet cytotoxique plus important est constaté avec la MC-LR sur les Caco-2 non différenciées (cf. **Figure 19**). En effet, nos résultats indiquent une cytotoxicité à partir de 50  $\mu\text{M}$  (cf. **Figure 19**) alors qu'aucune toxicité n'est détecté dans ces conditions par l'équipe de Puerto *et al.* (Puerto et al 2010b). Il semble donc que, lors d'une exposition prolongée, les Caco-2 soient moins sensibles à la MC-LR dans nos conditions de culture que dans celles de l'équipe de Puerto *et al.*. Cependant, nous avons travaillé avec une gamme de concentration moins large que l'équipe de Puerto *et al.* qui ne nous permet pas d'observer plus de 40 % de toxicité à 100 $\mu\text{M}$  (cf. **Figure 19**) alors que leur gamme leur permet d'atteindre une cytotoxicité de 35% à 100  $\mu\text{M}$  et jusqu'à 80 % à 200  $\mu\text{M}$  (Puerto et al 2010b).

Concernant les Caco-2 différenciées, les résultats de cytotoxicité obtenus (cf. **Figure 21 & Figure 22**) sont cohérents avec ceux des études de Puerto *et al.* qui ne décrivent pas non plus de cytotoxicité avant la concentration de 100  $\mu\text{M}$  (Puerto et al 2009; Puerto et al 2010b). L'augmentation du signal MTT observée avec la MC-LR (cf. **Figure 21**) a déjà été observé dans les Caco-2 (Chong et al 2000; Puerto et al 2010b) mais aussi dans d'autres types cellulaires comme les lignées de cellules cervicales humaines KB, de cellules sanguines humaines HL60 et de fibroblastes murins NIH/3T3 ou NCNC (Chong et al 2000; Zegura et al 2008a). En effet, le test MTT évalue l'activité mitochondriale des cellules. Or, il a été montré qu'au niveau mitochondrial, la MC-LR augmente l'activité du système de respiration cellulaire à faible concentration (Jasionek et

al 2010). Nous pouvons donc suggérer que l'augmentation de viabilité observée lors de cette étude soit un artéfact dû aux mécanismes précoces de toxicité des MCs.

## 5.2 Les Caco-2 expriment l'ensemble de nos gènes d'intérêt

Il est établi que les conditions de cultures peuvent largement modifier le profil d'expression des transporteurs et des enzymes du métabolisme chez les Caco-2 (Artursson et al 2001; Hayeshi et al 2008; Lennernas 1998; Sambuy et al 2005; Volpe 2008). Nous avons donc souhaité vérifier que, dans nos conditions de culture, les cellules Caco-2 exprimaient bien les gènes des transporteurs SLCO 3A1 et SLCO 4A1, les gènes du métabolisme Cyp 3A4 et GST $\alpha_1$  et les gènes des transporteurs d'efflux MDR1 et MRP1, conformément à la bibliographie (Hayeshi et al 2008; Hilgendorf et al 2007; Maubon et al 2007; Sai et al 2006; Seithel et al 2006). Pour l'ensemble de ces gènes, nous avons pu confirmer la présence d'ARNs messager dans nos conditions de culture (cf. **Figure 23, Figure 24, Figure 26, Figure 27, Figure 28 & Figure 29**).

Dans cette étude la proportion de solvant varie entre les différentes conditions d'exposition celle-ci augmentant avec la concentration en toxine. Le témoin solvant contient la quantité de solvant maximale correspondant à la concentration en toxine la plus élevée soit 2,45 % d'EtOH absolu. Nous avons vu que l'effet du solvant sur le niveau de transcription de certains gènes (SLCO 3A1, SLCO 4A1 et GST $\alpha_1$ ) n'était pas négligeable (cf. **Figure 23, Figure 24 & Figure 27**). Il est donc possible dans notre étude qu'une partie des effets de la MC-LR soit masquée par l'effet du solvant. Compte tenu de ces éléments, il est nécessaire de vérifier ces résultats par de nouvelles expériences avec des concentrations de solvant identiques pour toutes les conditions.

On considère aujourd'hui que la présence d'OATPs fonctionnels à la membrane des cellules est nécessaire pour que celles-ci soient sensibles à la toxicité des microcystines (Eriksson et al 1990a; Fischer et al 2010; Lu et al 2008; Runnegar et al 1991; Takumi et al 2010). Seuls quatre gènes codant pour des OATPs sont connus pour être exprimés à la barrière intestinale de manière spécifique (SLCO 2B1) ou ubiquitaire (SLCO 1A2, SLCO 4A1 et SLCO 3A1) (Hagenbuch & Gui 2008; Svoboda et al 2011). Cependant, il a été montré que l'OATP 2B1 ne transporte pas les MCs (Fischer et al 2005). Nous avons donc centré notre étude sur les OATP 1A2, 3A1 et 4A1. Si l'expression des ARN messagers des transporteurs OATP 3A1 et 4A1 avait déjà été observée dans les cellules Caco-2 (Hayeshi et al 2008; Hilgendorf et al 2007; Sai et al 2006), la présence des protéines dans ces cellules n'avait, à notre connaissance, jamais été publiée. Le SLCO

1A2, gène codant pour l'OATP 1A2, est peu exprimé à la barrière intestinale, cependant il a été détecté dans les cellules Caco-2 (Maubon et al 2007). Compte tenu du fait que l'OATP 1A2 est connu pour transporter la MC-LR (Fischer et al 2005), nous avons donc également testé la présence de cette isoforme. Selon les résultats présentés et discutés dans l'article 1, nous pouvons conclure que la protéine OATP 1A2 n'est pas détectée dans les Caco-2. Par contre, les OATP3A1 et 4A1 ont été détectés au niveau membranaire suggérant leur responsabilité dans de l'influx des MCs dans les cellules Caco2 et par extrapolation au niveau de la barrière intestinale humaine.

### 5.3 Les cellules Caco-2 absorbent les microcystines

Par ailleurs, Meier-Abt proposent un mécanisme de transport des molécules commun à tous les OATPs de type « rocker-switch » (Meier-Abt et al 2006). Ce mécanisme, qui nécessite un changement de conformation de la protéine membranaire, est d'ailleurs cohérent avec les résultats de Runnegar *et al.* qui ont montré que l'absorption des microcystines par les hépatocytes de rats est dépendante de la température (Runnegar et al 1995a; Runnegar et al 1991). Cependant, un tel système d'absorption des microcystines par les OATP 3A1 ou 4A1 devrait diminuer le marquage microcystine avec une incubation à 4°C et non l'augmenter.

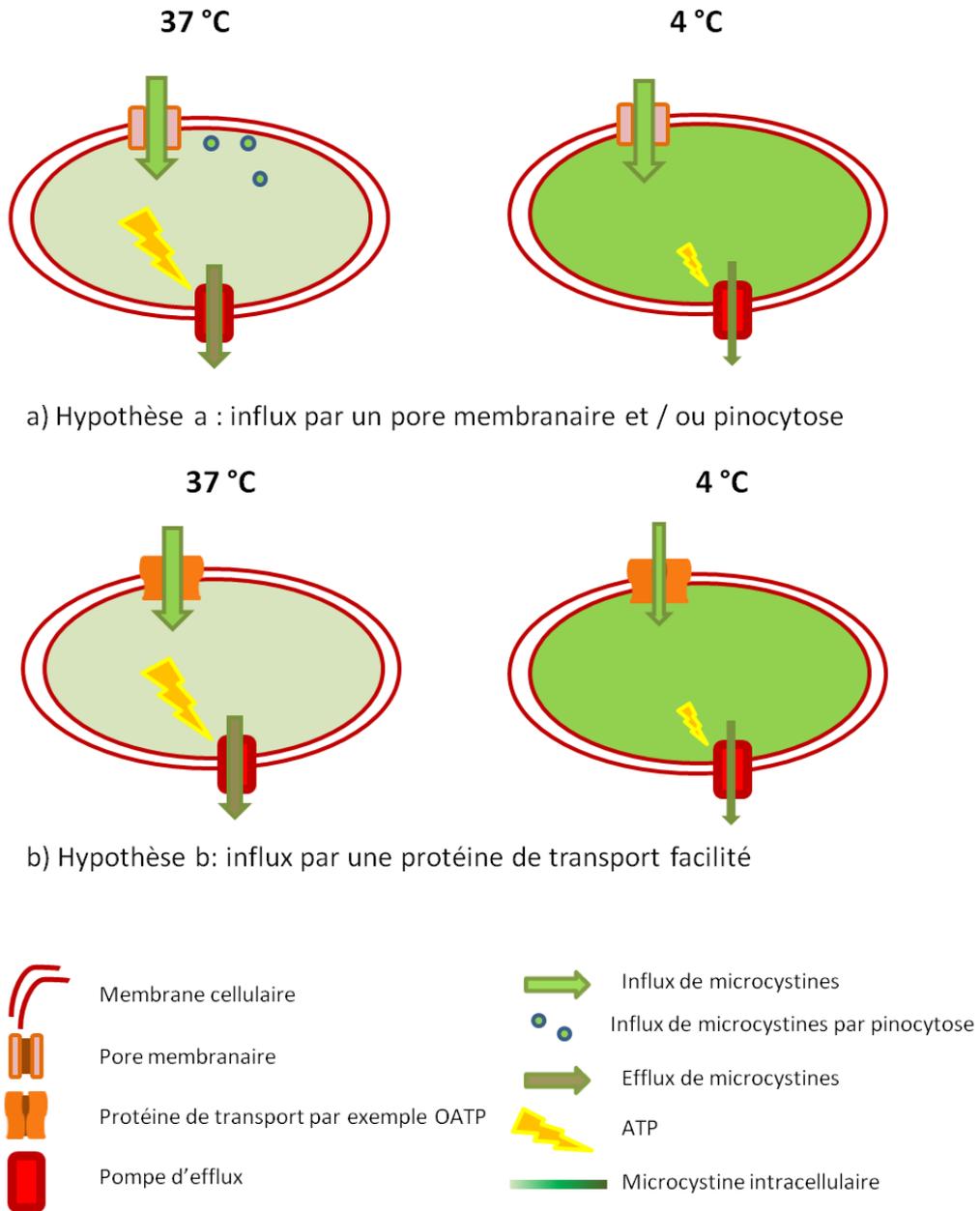
Concernant le mécanisme de traversée des membranes cellulaires par les microcystines, la diffusion passive est peu probable compte tenu de leurs caractéristiques physico-chimiques. En effet, la MC-LR et la MC-RR sont hydrophiles aux pH supérieurs à 6 (De Maagd et al 1999; Liang et al 2011) et leur interaction avec les membranes lipidiques est faible (Vestervik et al 2010; Vestervik & Meriluoto 2003). De plus, une étude de modélisation du passage de la MC-LR à travers une monocouche de cellules Caco-2 différenciées menée au laboratoire indique que l'absorption de la MC-LR au niveau de la membrane apicale s'effectue par un mécanisme de diffusion facilitée (Henri 2011, communication personnelle).

Cependant, Fischer *et al.* ont décrit une faible absorption de la MC-LR par des œufs de xénopes n'exprimant pas d'OATP (Fischer et al 2005). De même, Eriksson *et al.* montrent une absorption de la <sup>3</sup>H-DMC-LR par les HepG2. Cependant, ce niveau d'absorption n'est pas supérieure à celui de la <sup>3</sup>H-inuline (molécule servant de contrôle négatif pour l'absorption) (Eriksson et al 1990a) suggérant que l'absorption des MCs par les HepG2 est marginale, même si les auteurs suggèrent d'autres mécanismes d'absorption cellulaire des MCs indépendants des OATPs pourraient être mis en jeu. Parmi ceux-ci, nous pouvons citer le phénomène de pinocytose (Eriksson et al 1990a), cette hypothèse est peu compatible avec nos résultats montrant une absorption des MCs

à 4°C. D'autres transporteurs pouvant fonctionner comme des pores membranaires peuvent aussi être impliqués (Fischer et al 2010) (**cf. Figure 30 hypothèse a**).

Lors des études d'absorption à 4°C, nous avons systématiquement constaté que le marquage était significativement plus intense qu'à 37°C. Ce constat est probablement provoqué par l'existence d'un système de détoxification basé sur un système d'efflux actif (**cf. article 1**) qui serait donc au moins partiellement inhibé à 4°C. Par conséquent, la quantité de MCs intracellulaire ne serait pas seulement dépendante de l'influx mais aussi de l'efflux. L'augmentation de l'intensité du marquage à 4°C pourrait être le résultat combiné à la fois d'une baisse de l'influx, ce qui serait alors cohérent avec le mécanisme de transport des OATPs (Meier-Abt et al 2006), et d'une baisse de l'efflux qui serait quantitativement plus importante que la baisse d'influx (**cf. Figure 30 hypothèse b**). Par conséquent, la quantité de MCs intracellulaire ne serait pas seulement dépendante de l'influx mais aussi de l'efflux.

Les résultats de compétition avec le taurocholate (TC) ne nous permettent pas de conclure sur l'implication des OATPs dans l'absorption des MCs par les cellules Caco2. Cependant, une étude récente au laboratoire a montré que, dans nos conditions de traitement avec le TC, l'effet de compétition disparaissait au bout de 4h. Par conséquent, des expériences complémentaires simples dans des conditions optimales de compétition avec le TC, pourraient démontrer le rôle des OATPS dans l'absorption des MCs par les Caco-2.



**Figure 30 : Hypothèses envisagées pour expliquer la dynamique des MCs dans les Caco-2 non différenciées à partir des résultats obtenus**

#### **5.4 La MC-LR et la MC-RR présentent des comportements d'absorption similaires dans les Caco-2**

Les résultats présentés dans l'article 1 suggèrent que la MC-LR et la MC-RR pénètrent dans les cellules intestinales avec une cinétique similaire. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus sur le modèle hépatique. En effet, dans les cellules hépatiques, la différence de toxicité entre les deux variants est principalement due à une différence d'absorption, les OATP 1B1 et 1B3 (isoformes principalement exprimées au niveau hépatique) présentant probablement une meilleure affinité pour la MC-LR que pour la MC-RR (Fischer et al 2010). Il semblerait donc que les cellules intestinales n'aient pas le même comportement que les hépatocytes vis-à-vis de l'absorption de des variants de MCs. Ces résultats mettent donc en lumière l'importance du type cellulaire, et donc par extrapolation de l'organe, dans la réponse obtenue en fonction du variant.

Dans les résultats présentés dans l'article 1, nous avons pu constater que, comme dans les cellules de cerveau de souris (Feurstein et al 2009), dans les Caco-2 les marquages de la MC-LR et de la MC-RR apparaissent à la fois diffus et granuleux. Dans leur étude sur des extraits de cellules hépatocytaires traitées à la MC-LR, Mikhailov *et al* ont identifié des agrégats d'un diamètre supérieur à 0,1  $\mu\text{m}$ . Ces derniers sont constitués des conjugués PP1-MC insolubles qui se complexent avec le cytosquelette et le noyau (Mikhailov et al 2003). Ainsi, les granules observés aussi bien avec la MC-LR que la MC-RR dans nos expériences peuvent correspondre à des agrégats insolubles de PP1-MC.

#### **5.5 Les Caco-2 possèdent probablement un mécanisme de détoxification des microcystines**

La détoxification des xénobiotiques relève de plusieurs phases incluant des enzymes du métabolisme et des protéines d'excrétion (ou efflux). Classiquement, le métabolisme d'un xénobiotique se déroule en deux phases mettant en jeu deux types d'enzymes : les enzymes de phase I et celle de phase II (**cf. introduction paragraphe 2.1.4**). Le métabolisme de phase I des MCs a été très peu étudié et les résultats sont contrastés. En effet, certains auteurs décrivent des modifications significatives des niveaux d'expression des gènes de certains cytochromes P450 aussi bien *in vivo* sur souris qu'*in vitro* sur lignée HepG2 après exposition aux MCs le niveau d'induction ou

d'inhibition dépendant de l'isoforme de cytochrome étudié (Hudder et al 2007; Nong et al 2007) alors que d'autres ne montrent aucun effet *in vivo* (Wang et al 2006). Parmi ces études, aucune ne s'est intéressée au cytochrome P450 3A4 (Cyp3A4). Bien que peu exprimé dans les Caco-2 par rapport aux entérocytes humains (Sun et al. 2002), le Cyp3A4 est la forme de cytochrome majoritaire au niveau de la barrière intestinale humaine. Le Cyp3A4 est donc un acteur majeur du métabolisme de phase I intestinal (Zhang et al. 1999). Notre étude nous a tout d'abord permis de confirmer l'expression de ce gène par les cellules Caco-2 (Engman et al 2001; Taipalensuu et al 2001). Nous avons ensuite identifié une nette induction de son expression à 24h en fonction de la concentration en MC-LR (**cf. Figure 26 a**) qui disparaît après 48h. L'absence d'effet significatif à 48h peut aussi être imputée à la grande variabilité de réponse des Caco-2 (**cf. Figure 26 b**).

Nous avons également étudié un gène codant pour une enzyme du métabolisme de phase II : la GST $\alpha$  (GST alpha). Les GST catalysent la formation de la liaison entre les xénobiotiques ou leurs métabolites issus du métabolisme de phase I et le glutathion. La GST $\alpha$  est l'isoforme la plus exprimée au niveau intestinal (Petit). L'implication des GSTs dans le métabolisme des MCs est bien répertoriée ; en effet, des conjugués MC-GSH ont été décrits dans de nombreux organismes (Beattie et al 2003; Kondo et al 1996a; Pflugmacher et al 1998; Takenaka 2001). Comme d'autres auteurs précédemment (Hagenbuch 2007; Hayashi et al 2008), nous confirmons l'expression de la GST $\alpha$  par les Caco-2 différenciées. Cependant, aucun effet significatif du traitement avec la MC-LR n'est détecté. A nouveau la forte variabilité de réponse des Caco-2 dans cette étude peut être la raison d'une absence de significativité (**cf. Figure 27**). Cependant à 48h, une inhibition de la transcription du gène GST $\alpha_1$ , bien que non significative, est observée, ce qui est cohérent avec les données décrites au niveau de l'intestin de poisson rouge (Li et al 2008a). En effet, le niveau d'expression du gène GST $\alpha_1$  n'est pas linéairement dose dépendant (**cf. Figure 27**), comme cela a déjà été observé avec d'autres GSTs (Fu & Xie 2006; Hao et al 2008; Setlikova & Wiegand 2009).

L'augmentation de l'expression des GSTs hépatiques est souvent corrélée à une augmentation de l'activité de ces enzymes (Gehring et al 2004). Il a été récemment montré que les différentes isoformes des GSTs exprimées chez le poisson ne présentent pas les mêmes capacités de conjugaison des MCs que celles de mammifères (Setlikova & Wiegand 2009). Dernièrement, Buratti *et al* ont révélé que les isoformes de GST $\alpha_1$ ,  $\theta_1$ , and  $\mu_1$  humaines, particulièrement exprimées aux niveaux hépatique et gastro-intestinal, sont les plus impliquées dans la formation des MC-LR-GSH (Buratti et al 2011). Compte

tenu des connaissances actuelles, il serait donc intéressant de confirmer l'existence d'un métabolisme intestinal des MCs et d'identifier les enzymes responsables.

Nos résultats de marquage à 4°C et 37°C signalent la mise en jeu d'un mécanisme actif d'efflux (cf. article 1). Nous avons choisi d'étudier plus précisément le gène MDR1 qui code pour la P-glycoprotéine (P-gp), première pompe d'efflux à avoir été décrite. La P-gp est une protéine de transport membranaire couplée à l'ATP qui joue un rôle majeur dans l'excrétion des xénobiotiques comme les médicaments (Ambudkar et al 2003). De plus, il a été récemment proposé que la P-gp joue un rôle dans le système de défense de *Jenynsia multidentata* contre les MCs (Amé et al 2009) et que la présence de cette protéine soit responsable de la faible sensibilité de certains bivalves aux MCs (Contardo-Jara et al 2008). La complexité de l'effet de la concentration en MC-LR sur le niveau d'expression de ce gène chez les Caco-2 (cf. **Figure 28**) est cohérente avec celle décrite par Amé *et al.* Cependant, d'autres transporteurs d'efflux pourraient aussi être impliqués dans l'excrétion des MCs ou de leurs conjugués. Ainsi, le MRP1 est décrit comme un transporteur d'anions, de peptides cytotoxiques ainsi que de molécules conjuguées au glutathion (Oostendorp, Beijnen, et Schellens 2009). Ce transporteur est localisé à la membrane basolatérale des cellules de l'épithélium intestinal humain (Oostendorp, Beijnen, et Schellens 2009; Glaeser et al. 2007). Sachant qu'il est aujourd'hui reconnu que les MCs forment des conjugués MC-GSH (Dai et al. 2008; Pflugmacher et al. 1998; Kondo et al. 1992), le MRP1 apparaît comme un bon candidat pour leur excrétion. Cependant, aucun effet significatif sur l'expression de ce gène n'a pu être déterminé après exposition à la MC-LR même si la grande variabilité de réponse ne nous permet pas de conclure. Néanmoins, l'étude de modélisation du passage de la MC-LR à travers une monocouche de cellules Caco-2 différenciées menée au laboratoire indique qu'il existe un efflux de la toxine à travers la membrane basolatérale (Henri 2011, communication personnelle). Ainsi, le rôle des MRPs dans l'efflux des MCs reste encore à élucider.

## 6. Conclusion

Pour conclure, nous avons constaté que les Caco-2 sont un modèle cellulaire peu sensible à la toxicité des MC-LR et -RR. Ces cellules possèdent des OATPs membranaires et expriment plusieurs gènes qui pourraient être de bons candidats pour le métabolisme

et l'excrétion des MCs. Nous n'avons pas visualisé de différence d'absorption entre les deux variants indiquant qu'ils sont probablement pris en charge de manière similaire par les transporteurs présents dans les Caco-2. Le rôle joué par les OATP 3A1 et 4A1 dans le transport des MC-LR et MC-RR au niveau intestinal doit être testé spécifiquement comme cela a été précédemment réalisé pour les OATP1B1, 1B3 et 1A2 (Fischer et al 2005). Cependant, il serait aussi intéressant de rechercher d'autres transporteurs potentiels des MCs comme cela a été proposé récemment (Fischer et al 2010).

Nous avons aussi déterminé que les Caco-2 possédaient probablement un système de détoxification des MCs. La production de métabolites, dont les conjugués MC-GSH, par les cellules intestinales doit être recherchée. De même, le potentiel de transport des MCs et de leurs conjugués par des transporteurs d'efflux comme la P-gp et le MRP1 reste à investiguer.

- ⇒ **Les Caco-2 possèdent des OATPs membranaires**
- ⇒ **Les Caco-2 sont capables d'absorber la MC-LR et la MC-RR**
- ⇒ **La cinétique d'absorption de la MC-LR et de la MC-RR est similaire dans les Caco-2**
- ⇒ **Les Caco-2 pourraient détoxifier les microcystines par métabolisme ou par excrétion**



## **Chapitre II :**

**COMPARAISON DES EFFETS DE LA MC-LR ET DE**

**LA MC-RR À L'ÉCHELLE TRANSCRIPTOMIQUE**



## 1. Introduction

Bien qu'elle ne soit pas complètement élucidée, la toxicité des MCs est connue sur un certain nombre d'aspects. Ainsi, les MCs sont des inhibiteurs de protéines phosphatases provoquant une perturbation du cytosquelette des cellules (Alverca et al 2009; Ding et al 2000b; Falconer & Yeung 1992). De même, elles perturbent le cycle cellulaire et génèrent du stress oxydant (Blaha et al 2004; Dias et al 2010; Ding & Ong 2003; Lankoff et al 2003; Prieto et al 2006). Elles pourraient également provoquer un stress du réticulum endoplasmique (Qin et al 2010). Elles induisent aussi l'apoptose, même si le mécanisme mis en jeu n'est pas clairement établi (Botha et al 2004a; Ding & Ong 2003) (**cf**

**Figure 10**). Cependant, comme nous l'avons précédemment indiqué, la description de la toxicité des MCs est basée majoritairement sur les études réalisées avec la MC-LR, peu de données étant disponibles sur d'autres variants (**cf introduction paragraphe 3**).

Jusqu'à maintenant, peu d'études se sont penchées sur la comparaison de la toxicité de la MC-LR et de la MC-RR aussi bien *in vivo* (Atencio et al 2008b; Chen et al 2006b; Gupta et al 2003; Prieto et al 2006) que *in vitro* (Puerto et al 2009; Puerto et al 2010a). Une seule équipe s'est réellement concentrée sur cette comparaison avec la mesure des activités des phosphatases alcaline et acide et de biomarqueurs du stress oxydant dans le foie, les reins ou les branchies du poisson *Tilapia* exposé par ip (Atencio et al 2008b; Prieto et al 2006). Leurs résultats suggèrent des différences entre les deux variants avec des effets organe spécifiques, la MC-LR ayant plus d'effet sur le foie et la MC-RR plus nettement au niveau rénal (Atencio et al 2008b; Prieto et al 2006). Cependant, ces études ne se sont pas intéressées aux effets sur l'intestin. Ainsi, non seulement il n'existe pas d'études comparant l'effet de ces deux variants sur le tractus digestif mais en plus aucune comparaison des mécanismes de toxicité de différents variants de MCs n'a été menée sur un modèle mammifère ou humain. Par conséquent, pour combler ce manque de données et comparer les réponses cellulaires globales à la MC-LR et à la MC-RR, nous avons décidé de réaliser une analyse transcriptomique sur un modèle de cellules intestinales humaines. Nous avons tout d'abord étudié l'effet de ces deux variants séparément en fonction de la dose avant de comparer leur réponse. Cette comparaison nous a permis de mettre en évidence des voies canoniques particulièrement perturbées ainsi que des divergences de réponse pour certaines voies par le traitement avec ces deux variants.

## **2. Comparaison des effets de la MC-LR et de la MC-RR et effets sur la voie du stress oxydant : article 2**

### **2.1 Résumé**

Dans cette étude, les Caco-2 différenciées ont été exposées à des doses sublétales de MC-LR et de MC-RR pendant 4h (10 à 100  $\mu$ M) ou 24h (1 à 10  $\mu$ M). L'analyse des données issues de l'étude statistique « MCs vs contrôle » a permis de révéler qu'après 4 heures d'exposition, les gènes avec une expression significativement modulée suite à l'exposition à l'un ou l'autre variant sont assez peu nombreux. Par contre, après 24h d'exposition, les effets sont majeurs avec l'expression significativement modifiée de 1 727 gènes pour la MC-RR et 6 256 gènes pour la MC-LR après une exposition à 10  $\mu$ M. Cependant, ces modulations sont rarement corrélées de manière linéaire avec la concentration en toxine (seulement 813 gènes pour la MC-LR et 192 pour la MC-RR). Ces résultats suggèrent que le mécanisme de toxicité des MCs est global et complexe.

La ressemblance des réponses entre la MC-LR et la MC-RR suggère qu'il existe un mécanisme de toxicité commun aux deux variants. Cependant, l'analyse comparative des deux jeux de données révèle des gènes dont la modulation diffère en fonction du variant. Ainsi, les deux variants présenteraient à la fois un mécanisme de toxicité partagé, par exemple l'inhibition des PPs, et la mise en jeu d'autres mécanismes spécifiques à chaque variant.

Cette hypothèse est renforcée par la comparaison des résultats issus de l'annotation fonctionnelle des gènes. En effet, nous pouvons constater que le niveau d'expression des gènes appartenant à la voie de signalisation du stress oxydant est largement perturbé par la MC-LR mais pas avec la MC-RR.

Pour conclure, ce travail a permis d'explorer et de comparer les réponses cellulaires provoquées par la MC-LR et par la MC-RR. Il confirme tout d'abord la complexité des effets induits par les microcystines. Grâce à l'approche pangénomique qui permet d'identifier des cibles potentielles spécifiques à chaque variant, nous avons mis en évidence une perturbation majeure des voies du stress oxydant et de la régulation du cycle cellulaire suite à une exposition à la MC-LR qui n'est pas constatée avec la MC-RR. Ainsi, nos résultats soulignent l'importance d'étudier les différents variants afin de ne pas fonder l'évaluation du risque pour les MCs uniquement sur la MC-LR.

## **2.2 Article 2 :**

### **Transcriptomic comparison of cyanotoxin variants in a human intestinal model revealed major differences in oxidative stress response.**

Short title: Effect of MC-RR and MC-LR on Caco-2 cells

P. Zeller<sup>1\*</sup>, H. Félix<sup>2</sup>, A. Huguet<sup>1</sup>, Y. Blanchard<sup>2</sup>, V. Fessard<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Anses, Fougères Laboratory, contaminant toxicology unit, La Haute Marche BP 90203, 35302 Fougères cedex, France

<sup>2</sup> Anses, Ploufragan Laboratory, GVB unit, Ploufragan BP53 22400 France

**Soumis à Physiological Genomics**

Keywords: microcystin, pangenomic, Caco-2

## **ABSTRACT**

Microcystins (MCs) are cyclic hepatotoxins produced by various species of cyanobacteria. Their structure includes two variable amino acid (AA) giving rise to more than 80 MCs, however most of the studies to date have focused on the most toxic variant: microcystin LR (MC-LR). Although ingestion is the major pathway of human exposure, several *in vivo* studies demonstrated macroscopic effects on the gastrointestinal tract. However little information is available on the pathways affected by MC variants on intestinal cells. In the current study, using a non-selective method, we investigated for the first time the effects of MC-RR and MC-LR on the human intestinal cell line Caco-2 and compared their response at the pangenomic scale. The cells were incubated for 4 hrs or 24 hrs with a range of sub-toxic concentrations of MC-RR or MC-LR.

Minimal effects were observed for both variants after a short term exposure. In contrast, dose dependent modulations of gene transcription levels were observed with MC-RR and MC-LR after 24 hrs. Furthermore, the genomic profiles induced by both variants were similar suggesting a common mechanism of toxicity, even though changes in gene expression were more pronounced following exposure to MC-LR. However, the functional annotation revealed major differences between the effects of each variant. Indeed, MC-LR affected two principal pathways, the oxidative stress response and cell cycle regulation, which did not elicit significant alteration following MC-RR exposure.

This work is the first comparative description of the effects of MC-LR and MC-RR in a human intestinal cell model. It has allowed us to suggest differences in the mechanism of toxicity for MC-RR and MC-LR. These results illustrate that the toxicity of MC variants remains a key point for risk assessment.

## 1. INTRODUCTION

Microcystins (MCs) are cyclic heptapeptides toxins produced by several cyanobacteria genera including *Planktothrix*, *Microcystis*, *Aphanizomenon*, *Nostoc* and *Anabaena* (Carmichael 1997; Falconer & Humpage 1996). Due to the global proliferation of these cyanobacteria in freshwater environments microcystins have been an increasing public health concern. Indeed, since 1998 the World Health Organization has advised a guidance value for drinking water of 1.0 µg MC-LR/L (54). Composition of the MC heptapeptides shows some specificities including two variable L-amino acids at positions 2 and 4, and two particular amino acids, (2*S*,3*S*,8*S*,9*S*)-3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid (Adda) at position 5 and N-methyl dehydroalanine (MDha) at position 7. To date more than 80 variants have been identified. Among these variants, microcystin LR (MC-LR) is the most toxic (12) and therefore its toxicity has been largely investigated. Microcystin RR (MC-RR) only differs from MC-LR by an arginine replacing a leucine in position 2. Despite this structural similarity, MC-RR was described *in vivo* as being 5.5 time less toxic than MC-LR after intraperitoneal (ip) injection in mice (24). However, few studies have been conducted to explore the differences in toxicity between both variants.

At the cellular level, MCs are potent serine/threonine protein phosphatase (PP) inhibitors (17, 27, 48) inducing hyperphosphorylation of numerous proteins (19, 38, 41). However an increasing number of studies demonstrate increased oxidative stress following MC exposure. Such toxicity was described both *in vitro* (14, 34, 56, 57) and *in vivo* (1, 31).

Although the liver is the target organ which has been the most extensively investigated with respect to MC toxicity, some evidence also indicates effects on the kidney, lung, brain and the intestine (29, 32, 43, 52). Among these organs, the gut is the first exposed to MCs following ingestion, the main pathway of human exposure (12). The studies focusing on MC effects on the intestinal barrier have investigated macroscopic alterations (16, 18, 40). After acute oral exposure, MC-LR induced a loss of intestinal cell cohesion and specific structures in fish (4, 16). In mice, it also severely damages the upper small intestine, with extensive erosion of the apexes of the villi (29). However, little information exists concerning the canonical pathways affected in intestinal cells following MC exposure. Consequently, we have chosen to explore the global toxicity of MCs using a non-selective pangenomic microarray approach. To date, transcriptomic studies on MC toxicity have only been focused on the liver without considering the effects

on the GI tract (7, 13, 28). In this study the human colon adenocarcinoma Caco-2 cell line was selected to investigate the effect of MC-RR and MC-LR on the intestine. These cells are able to obtain a differentiated phenotype exhibiting morphological and biochemical characteristics of enterocytes (42). Moreover, they are frequently used as in vitro cell culture model of the human intestinal barrier (3, 49). In our study, the transcriptomic profiles of differentiated Caco-2 cells were determined after short (4 hrs) and long term (24 hrs) exposure to sub-toxic concentrations of MC-RR or MC-LR. This is the first study comparing the effects of MC-RR and MC-LR on gene expression in a human intestinal cell model. The dose and time responses of each toxin were first investigated before comparing their toxicity and concluding on their molecular mechanisms of toxicity.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Toxins**

MC-LR and MC-RR were purchased from Coger (Paris, France). MC-LR and MC-RR were dissolved according to the manufacturer's recommendations in absolute ethanol (EtOH) and 80% methanol (MeOH) in water (v/v) respectively.

### **2.2 Cell culture and treatment**

Caco-2 cells (ATCC HTB-37), passage 30-33, were cultured in minimum essential medium (MEM)-GlutaMAX with 1 % non essential amino acids, penicillin (50 IU/mL) and streptomycin (50 µg/mL) (InVitrogen) and supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, InVitrogen). Cells were grown in 75 cm<sup>2</sup> flasks at 37°C in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> and subcultured twice a week. To obtain differentiated Caco-2 cells, the cells were seeded into 12-wells plates (60× 10<sup>3</sup> cells/cm<sup>2</sup>) and maintained 24 days in 10% FCS culture medium with a medium change every 2 or 3 days.

Differentiated Caco-2 cells were exposed to MCs in serum-free culture medium for either 4 or 24 hours. Sub toxic concentrations of 10, 50 and 100 µM of MC-LR or MC-RR were chosen for 4 hours while 1, 5 and 10 µM were selected for 24 hours (based on unpublished results). For each condition including the controls, the solvent concentration was fixed at 2 % EtOH for MC-LR and 1.5% of 80% MeOH for MC-RR. Four to five culture replicates per condition were performed. This study comprised 4 series corresponding to the toxin and time conditions. These series will be referred to as MC-RR 4 hrs, MC-LR 4 hrs, MC-RR 24 hrs and MC-LR 24 hrs.

### **2.3 Microarray hybridization and data processing**

Total RNA of each replicate was extracted by the standard TriZol RNA extraction protocol (Invitrogen). The RNA integrity and quantity were assessed with the Agilent 2100 Bioanalyzer. Only the RNA samples with a RIN (RNA Integrity Number) above 8 were considered further for the transcriptomic study. RNA samples were converted to aminoallyl-RNA (aRNA) using the Amino Allyl MessageAmp II aRNA Amplification kit (Ambion) prior to labeling with either Cy3 or Cy5 dyes using the Quick Amp Labeling Kit (Agilent). The hybridization of each human pangenomic array (4x44k Agilent) was performed following the pseudo monocolor protocol of the Biogenouest transcriptome core facility of Nantes (France). Hybridization, washing and drying of the microarray were performed in a HS4800 Pro Hybridization station (Tecan). Washing was performed with the Gene Expression Wash Pack (Agilent) and drying with the Stabilization and Drying Solution (Agilent). The slides were scanned with an Innoscan 900AL scanner (Innopsys, Toulouse, France).

A Lowess normalization was performed on the raw data. The data were then filtered on a threshold intensity corresponding to the mean of the median intensities of each sample in order to remove the background and the low intensity probes. This dataset was named "normalized data".

The entire normalized data sets were processed in a hierarchical clustering analysis with the cluster 3.0 software (<http://bonsai.hgc.jp/~mdehoon/software/cluster/software.htm>) using the uncentered correlation distance and a pairwise centroid linkage so as to order the genes. It will be referred to this order as "clustering order".

As MC-RR and MC-LR were dissolved in 80 % MeOH and EtOH, part of the modulation of gene expression could be due to the presence of the solvent. For toxin comparison, each value was linearly corrected by its respective median control value. This dataset was defined as "solvent corrected data".

### **2.4 MC-LR and MC-RR dose effect**

The dose effect study was performed on the normalized data. The significance analysis microarrays (SAM) method (50) was performed with the R software and the plug in samr (<http://www.r-project.org/>, samr\_1.28 version). For each series (time x toxin), the relevant genes were identified by a two-class unpaired data analysis comparing each concentration condition to the solvent control. In this analysis, a large scale description of

the MC dose was performed and the false discovery rate (FDR) was set up to a maximum value of 5%. These analyses will be referred to as "MCs vs control".

Moreover, for each series (time x toxin), the genes extracted by the "MCs vs control" SAM analyses were processed through a one way ANOVA in order to investigate the linearity of the dose effect. The log transformed data were analyzed considering the dose as quantitative factor. Only the genes with a p-value below 0.05 were subjected to a post-hoc multiple comparison correction (Benjamini-Hochberg correction). The genes with a corrected p-value below 0.05 were considered presenting a significant linear effect. These analyses were performed using the R software and plug in.

### ***2.5 MC-LR and MC-RR comparison***

For each series, the solvent corrected data sets were organized in clustering order, to classify and compare the entire transcriptomic profile of several conditions. Those ordered data were aggregated in a 75 period moving average. A SAM two-class unpaired data analysis was performed for each condition on the solvent corrected data with a FDR<1%. It would be referred to those analyses as "MC-RR vs MC-LR".

### ***2.6 Functional annotation***

The sets of genes resulting from the different analyses "MCs vs. control" and "MC-RR vs. MC-LR" were characterized according to the Gene Ontology annotation performed on the canonical pathway functions with the Ingenuity Pathway Analysis software ([www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)). The significance of the relationship between each data set and the canonical pathways was measured in 2 different ways: 1) the ratio between the number of genes from the data set that maps the modulated pathway and the total number of genes involved in that particular pathway was calculated, 2) a Fisher's exact test was used to calculate the p-value determining the probability that the genes from the dataset and the canonical pathways were truly linked.

### **3. RESULTS**

#### **3.1 Dose effect**

This study was designed in 4 series (2 times x 2 toxins) including 3 doses for each toxin. From the SAM analysis, 12 lists of genes (one per condition) were obtained (for the complete lists see the supplementary data).

##### *3.1.1 4 hrs*

The SAM analysis identified alterations in gene expression in 1, 35 and 33 genes at 10, 50 and 100  $\mu$ M MC-RR respectively and 36, 14 and 10 genes for MC-LR at the same concentrations (figure 1 a). Irrespective of the concentration, a weak overlap between the genes modulated after 4 hours exposure was observed (figure 1 b & c). Indeed, only VDR coding for the vitamin D receptor and VEGFA (vascular endothelial growth factor A) were common to the 50 and 100  $\mu$ M MC-RR conditions. Similarly only two genes were common for 10 and 100  $\mu$ M MC-LR: ELAC2 (elaC homolog 2) and HMBS (hydroxymethylbilane synthase).

At 4 hrs, very little modulation of the gene expression was observed. No Fold Change (FC) higher than 2 was obtained for 10 and 50  $\mu$ M MC-RR and only 2 genes showed a  $|FC| \geq 2$  for 100 $\mu$ M MC-RR. These genes corresponded to an uncharacterized gene (AK024988) with a FC = +2.34 and to AGMAT (agmatine ureohydrolase) (FC = +2.03). For MC-LR at 10 $\mu$ M, the uncharacterized gene AA541413 was the only gene with a  $|FC| > 2$  (FC=-2.20). At 50  $\mu$ M, 3 genes were up-regulated to 2  $|FC|$ . The highest modulation (FC=+3.62) corresponded to the uncharacterized gene LOC387763. The ARG2 gene ( arginase type II) and ZFP36 (zinc finger protein 36) showed FC=+2.27 and +2.18 respectively. At 100 $\mu$ M MC-LR, only one gene, DUSP6 (dual specificity phosphatase 6) presented a  $|FC|$  higher than 2 (FC=+2.57).

Previous studies have demonstrated the non-linear effect of MCs on the expression of several genes (11, 33, 58). In this context, we performed a linearity study in order to investigate the degree of non-linear effects of MCs. In the 4 hrs series, only 4 and 2 genes revealed a dose-dependent modulation for MC-RR and MC-LR respectively (figure 1 d) without any overlap. Therefore, only a weak impact could be detected after 4 hrs exposure to both toxins with a slight dose dependent response.

### *3.1.2 24 hrs*

The SAM analysis on the 24 hours data identified an increasing number of genes which were significantly modulated with increasing MC concentration. For MC-RR, although no genes were identified to be modulated at 1  $\mu$ M, the expression of 35 and 1727 genes varied significantly at 5 and 10  $\mu$ M respectively (Fig 2 a). The MC-LR 24h series displayed a greater number of genes with modulated expression with 2, 3867 and 6256 genes at 1, 5 and 10  $\mu$ M respectively (fig 2 a).

Furthermore, contrary to the results from the 4 hr treatment, a strong overlap was observed in the modulated genes at 5 and 10  $\mu$ M doses of each toxin. Among the 35 genes modulated with 5  $\mu$ M MC-RR, 80% were also significantly modulated with 10  $\mu$ M (figure 2 b). Similarly, with MC-LR, 95.1% of the genes modulated at 5  $\mu$ M were also altered at 10  $\mu$ M (figure 2 c).

In the 24 hour treatment series, variations in gene expression were amplified with the dose. Although no modulation was observed at 1  $\mu$ M MC-RR, at 5  $\mu$ M the FCs ranged between -2.17 for the gene *SULT2A1* (cytosolic 2A sulfotransferase) and +3.50 for the gene *ATF3* (activating transcription factor 3). At 10  $\mu$ M MC-RR, the extreme values of FCs ranged from -3.84 to +10.09 for the *KLB* gene (klotho beta) and *DUSP6* respectively.

Within the MC-LR series, variations in the FC were more dramatic, at 1  $\mu$ M ranging from +1.47 for the *CAECAM6* (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6) and +2.01 for the *MRPS28* gene (mitochondrial 28S ribosomal protein S28). At 5 $\mu$ M, the FC values ranged between -6.67 and +11.20 for *KLB* and *DUSP6* respectively, and were further increased at 10  $\mu$ M ranging between -26.33 (*PPP2R2B* regulatory subunit B of the protein phosphatase 2) and +29.79 (*CAECAM6*).

The one-way analysis of variance revealed that MC-LR induced a linear dose response of more genes than MC-RR (813 and 192 respectively, figure 2 d, for the complete lists see the supplementary data). This result suggests that changes in the transcriptional regulation in Caco-2 cells in response to MC-LR could be distinguished from that of MC-RR in terms of intensity and linearity. However, the ratios of the genes with a linear modulation in the "MC vs control" analyses were similar for MC-RR and MC-LR (11.3 % and 12.6 % respectively). Furthermore, 60% of the genes linearly modulated by MC-RR were also modulated by MC-LR.

Therefore, for both toxins in the 24 hrs series, the number of genes modulated following toxin exposure, as well as the intensity of the modulation increased with the dose. Furthermore, the majority of the modulated genes did not show a linear dose-dependent response. The similarities between the MC-RR and MC-LR data suggest that a common mechanism of toxicity could be involved which was then investigated further by toxin comparison.

### **3.2 Transcriptomic comparison of MC-RR and MC-LR toxicity**

In order to obtain a preliminary comparison of the effects of each toxin, a moving average of the median corrected data for MC-RR and MC-LR was plotted in the "clustering order" (figure 3). At 4 hrs no trend in the modulation of gene expression could be distinguished. However, the SAM two-class analysis, comparing the effect of one toxin to the other, identified several genes (7, 5 and 26 for 10, 50 and 100  $\mu$ M MC respectively) showing differential expression between MC-RR and MC-LR (table 1).

At 24 hrs exposure (figure 3), 1  $\mu$ M concentrations of MC-RR and MC-LR induced only weak modulations in gene expression which fluctuated in opposite directions (arrowhead). At 5 and 10  $\mu$ M, the overall profiles of gene expression were extremely similar for both toxins. The main differences were noted in the intensity of the variation. With the exception of one group of genes (figure 3 asterisk), the MC-LR treated samples displayed greater amplitudes of modulation compared to those for MC-RR (figure 3 hashes). Furthermore, several genes showing weak alterations in gene expression were regulated in opposite directions in response to MC-LR or MC-RR, although these alterations did not reach statistical significance (figure 3 arrowheads).

After 24 hrs of treatment, although no genes were identified by the SAM two class analysis at 1 $\mu$ M, a significant difference was observed between both toxins for 143 and 733 genes at 5 and 10  $\mu$ M respectively (table 2, for the gene lists, see the supplementary data).

A large majority of the genes identified with the SAM two class analysis were also identified in the "MCs vs control" dose response study (90.2 % and 93.9 % for 5 and 10  $\mu$ M respectively, table 2). At 10  $\mu$ M, 43.1% of the genes that were elicited by "MC-RR vs MC-LR" were also identified by both "MC-RR vs control" and "MC-LR vs control" analyses. They corresponded to common targets for both MC-RR and MC-LR. However the extent of the modulation differed between the two variants. Moreover, 50.9 % of the modulated genes in the "MC-RR vs MC-LR" analysis were present in only one of the two "MCs vs control" analyses. Only 0.3 % of the genes modulated in "MC-RR vs control" and 50.5 %

in “MC-LR vs control” genes were toxin-specific, and could be considered specific targets of each variant. However, in a group of 6% of genes (15 genes for 5 $\mu$ M and 44 genes for 10 $\mu$ M) that were unchanged in either of the MC-LR or MC-RR vs control analyses, a statistically significant difference in the level of expression between the two toxin treatment was observed in these genes resulting from slight, but opposite variations in expression with respect to the toxin (up- or down-regulation for one toxin and the reverse for the other toxin) (table 2).

Our results indicate that, at 24 hrs, most of the genes significantly modulated by MC-LR were also modulated by MC-RR but to a lesser extent. Interestingly, the majority of genes identified through the “MC vs control” analyses were not found by the “MC-RR vs MC-LRR” analysis, suggesting large similarities in the mechanisms of the two toxins.

### **3.3 Functional annotation**

The genes highlighted by the different SAM analyses were then classified within canonical pathways according to the Ingenuity’s Knowledge Base in order to identify the pathways the most significantly modified. The complete lists of the altered pathways are presented in the supplementary data.

#### **3.3.1 4 hrs**

Although no pathways were significantly modified with the lowest concentration of MC-RR (10  $\mu$ M) in the “MC vs control” analyses, 8 canonical pathways were disrupted by 50  $\mu$ M and 26 were modulated at 100  $\mu$ M MC-RR. Furthermore, among the pathways altered at 50  $\mu$ M, 3 were also disturbed at 100  $\mu$ M (figure 4a). For MC-LR, 6 canonical pathways were modulated at the lowest concentration (10  $\mu$ M), 7 at 50  $\mu$ M and 3 at 100 $\mu$ M. No overlap was identified between the three conditions (fig 4b). As suggested by the gene expression modulation, these results reveal that toxin concentration is a key point in the cellular response induced by both MC-RR and MC-LR

The functional annotation of the “MC-RR vs MC-LR” results revealed few significantly disturbed pathways. Furthermore, those pathways were highlighted due to a limited number of genes (table 3). Indeed, the table 3 listed only 3 genes at 10  $\mu$ M, 1 at 50  $\mu$ M and 5 at 100 $\mu$ M. Among those pathways, none was affected in more than one condition and always with a very low level of significance.

### 3.3.2 24 hrs

A dose dependent increase in the number of canonical pathways modulated following MC-RR treatment was observed. Indeed 0, 7 and 76 pathways were modulated at 1, 5 and 10 $\mu$ M MC-RR respectively (Fig 5 a). In addition, 57% of the pathways altered at 5 $\mu$ M were also disturbed at 10 $\mu$ M (figure 5 a). In this series, the Aminoacyl-tRNA Biosynthesis pathway was associated with the highest modulation of gene expression (at 10 $\mu$ M, p-value=1.02x10<sup>-7</sup>) (for the pathway lists see the supplementary data).

For MC-LR, 98 and 88 pathways were modulated at 5 and 10  $\mu$ M respectively (figure 5b) and most of these pathways (69.39%) were common to both MC variants (figure 5b). In this series, the NRF2-mediated oxidative stress response pathway was the most significantly altered canonical pathway (p-value = 5.25x10<sup>-7</sup> at 10 $\mu$ M) (for the pathway lists see the supplementary data).

Selected data from the dose response study for both toxins were plotted (figure 6) focusing on the principal canonical pathways altered by MC-LR- in the dose-response study. Most of the pathways are targeted by both toxins. Four pathways were observed to be MC-LR specific: NRF2-mediated Oxidative Stress Response, ERK/MAPK Signaling, Cell Cycle Regulation by BTG Family Protein and Urea cycle and metabolism of amino groups (figure 6).

Of these 4 MC-LR specific pathways, NRF2-mediated oxidative stress response was the pathway the most significantly affected. It could therefore easily discriminate between MC-LR and MC-RR responses. Furthermore, one gene (ALDH7A1) was found in 8 out of the 11, and in 13 out of the 42 significantly altered canonical pathways identified from the 5 and 10  $\mu$ M "MC-RR vs MC-LR" comparisons respectively (for the complete pathway lists see the supplementary data). This gene encodes Aldehyde Dehydrogenase 7A1, a protein implicated in the oxidative stress response and cell cycle regulation. In the 24 hrs series, MC-RR did not induce any modulation of this gene at the transcription level whereas MC-LR induced a clear dose dependent decrease ( $R^2=0.95$ , Benjamini-Hocheberg post hoc test p-value = 7.47 x 10<sup>-4</sup>) (figure 7).

## 4. DISCUSSION

Despite the fact that ingestion is certainly the principal route of human exposure to microcystins (12), the toxicity of MCs on the intestine has been poorly addressed. Using a transcriptomic approach, this study describes and compares for the first time the

modulation of gene expression of differentiated Caco-2 cells after exposure to MC-RR or MC-LR at sub-toxic doses.

Before addressing this question, we verified that the uptake of both MCs was effective in our cell model. Cellular uptake of MCs is mediated by transporters belonging to the organic anion transport protein (OATP) family (20, 21, 47). Previous results from our laboratory have demonstrated a rapid uptake of MCs in Caco2 cells which was identical for both toxins (Zeller et al., *submitted*). In this study, the uptake of MCs in Caco-2 cells was confirmed indirectly through the observed modulations of gene expression with both MCs (figure 1 & 2).

One of the main features of our results is the very limited number of genes eliciting a linear response of gene expression with respect to MC concentration (figure 1 and figure 2). This non linear effect following MC exposure has previously been described in several studies for a limited number of genes including several apoptosis-related genes in mouse liver (11), HepG2 cells (58) or for P-gp expression in several fish (*Jenynsia multidentata*) organs (2) and for antioxidant enzymes and heat shock protein-70 in algae (33). Using the pangenomic approach, we concluded that this non-linear dose response could be extended to most of the genes affected by MC-RR and MC-LR treatments.

In the absence of any other mechanism of action described for MCs, the non linearity of the gene dose-response pattern is probably due to their serine/threonine PP inhibition potency (20). Indeed PPs regulate many cellular processes (37), inducing both negative and positive feedbacks on numerous genes. Consequently for most of the genes, variation in their gene expression level is probably not only a direct effect of the toxin but more likely results from cumulative effects on different targets involved in genes regulation which were affected by the MCs treatment.

Thus, the overall non-linear dose-response of MCs illustrates the complexity of their mechanisms of toxicity at the pangenomic scale. Limiting toxins studies to few genes, as is generally done with RT-PCR would not reveal this complexity while the non-selective approach gives a global overview of the affected genes and pathways. Therefore, selecting a pangenomic methodology should avoid misinterpretation of the toxicity of xenobiotics and contribute to the understanding of their involvement in diseases (59).

Analysis of the variation in gene expression induced by MC treatment from a functional point of view with data mining tools, revealed that the canonical pathways disrupted in our cell model (figure 6) were similar to those previously described in the

liver of fish and rodent following MC exposure (7, 11, 13, 38, 53). Our results confirmed the principal effects of MC-LR on the generation of oxidative stress, the ERK/MAPK pathway and the cell cycle (4, 5, 15, 25).

Whereas MC-LR is the standard reference for the investigation of MC toxicity, our comparative analysis of MC-RR and MC-LR treatments at a pangenomic scale revealed significant differences in the modulation of gene expression between these two variants (table 1 & 2). This result is unlikely to be due to differences in the ability of the two MC variants to inhibit PP since several studies have demonstrated similar IC<sub>50</sub> values for the inhibition of PP by MC-LR and MC-RR (20, 26, 30, 46). Consequently, our results suggest that the subtle differences observed between MC-LR and MC-RR are rather due to the involvement of distinct pathways including oxidative stress generation (figure 6). Indeed, our comparative study confirmed that MC-LR modulated the NRF2-mediated oxidative stress response (8, 15, 23, 45) whereas MC-RR did not (figure 6). These results are in agreement with the study of Prieto *et al.* who describe differences in the generation of oxidative stress between MC-RR and MC-LR concluding MC-RR was less potent (44).

An increasing number of studies suggest that the mitochondria dysfunction resulting from MC-LR toxicity is the main pathway responsible for the induction of oxidative stress (10, 15, 32, 39). Among the genes involved in the oxidative stress pathway, our results identified the aldehyde deshydrogenase 7A1 (Aldh7A1), which was down-regulated by MC-LR in a dose-dependent manner, while no effect was observed with MC-RR (figure 7). This gene encodes a mitochondrial enzyme belonging to the ALDH family of enzymes implicated in the oxidative stress response (36). Although the role of ALDH7A1 in cellular processes is still unclear (6, 55), it has been shown to play a role in hyperosmotic stress defense as well as in protection against oxidative stress (6, 9, 22). Another ALDH family member (aldehyde deshydrogenase 2, ALDH2) has previously been shown to be an MC-LR target by an *in silico* docking approach (10). Moreover, a marked reduction of ALDH 2 and ALDH 9A1 protein levels was observed in zebrafish brain following chronic MC-LR exposure (51) and for ALDH2 in medaka fish liver (35).

Considering these data, we suggest that the down-regulation of ALDH7A1 following MC-LR treatment results in an increase in mitochondrial ROS production (10, 51). This modulation was not observed with MC-RR. Therefore, modulation of ALDH7A1 gene expression could be a signature of MC-LR toxicity, and can effectively differentiate the cellular responses to two very similar toxins. This enzyme could therefore be an important MC-LR target leading to increased oxidative stress and disruption of the cell cycle, and the down regulation of ALDH7A1 could contribute significantly to MC-LR cytotoxicity,

Our original work investigating the pangenomic response of two microcystin variants, MC-RR and MC-LR, in a human intestinal cell model confirms the complexity of effects caused by these toxins. Indeed, the pangenomic approach is an attractive tool to compare the toxicity of MC variants and to identify targets specific to each toxin. In this study, oxidative stress formation and cell cycle regulation were significantly disrupted by MC-LR and not by MC-RR. Therefore, our results highlight the importance of studying MC variants to ensure a more accurate risk assessment not solely based on MC-LR toxicity.

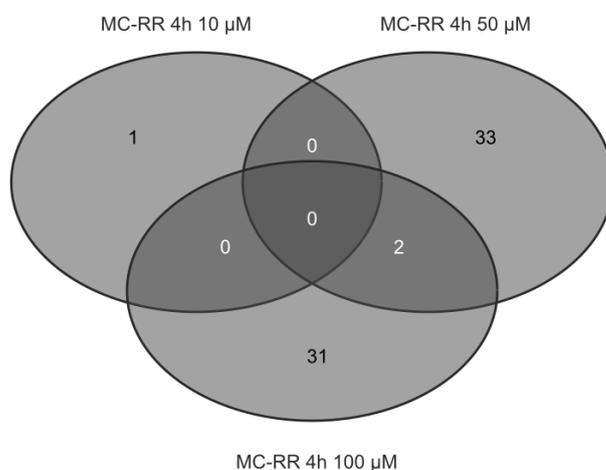
**Acknowledgment:**

The authors thank Dr Pierre Blavy for their advices concerning data analyses and Kevin Hogeveen for English corrections.

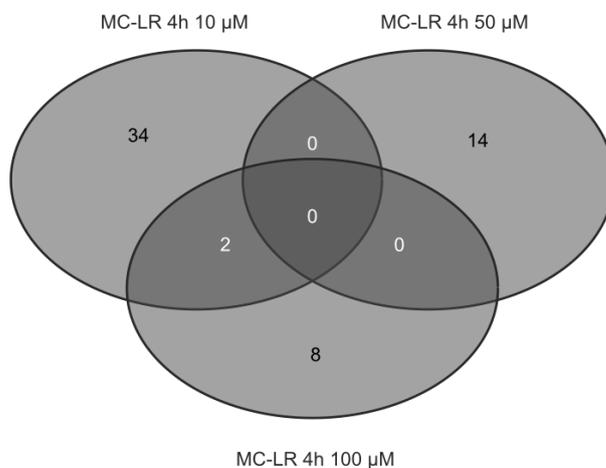
5. Figures

	MC-RR 4 hrs			MC-LR 4 hrs		
	10 μM	50 μM	100 μM	10 μM	50 μM	100 μM
up-regulated	1	18	24	17	13	10
down-regulated	0	17	9	19	1	0

a) Number of significantly altered genes



b) Venn diagram of altered genes in MC-RR 4 hrs series



c) Venn diagram of altered genes in MC-LR 4 hrs series

<i>increasing response</i>				<i>decreasing response</i>			
MC-RR 4 hrs		MC-LR 4 hrs		MC-RR 4 hrs		MC-LR 4 hrs	
<i>HUGO name</i>	<i>p-value</i>	<i>HUGO name</i>	<i>p-value</i>	<i>HUGO name</i>	<i>p-value</i>	<i>HUGO name</i>	<i>p-value</i>
ST3GAL2	8,35E-05	VEGFA	1,06E-02	FOXA1	9,43E-03	No significant gene	
VDR	2,81E-04	ZFP36	2,46E-02	AKR1C1	1,49E-02		
AGMAT	2,55E-03						
UCHL1	1,94E-02						

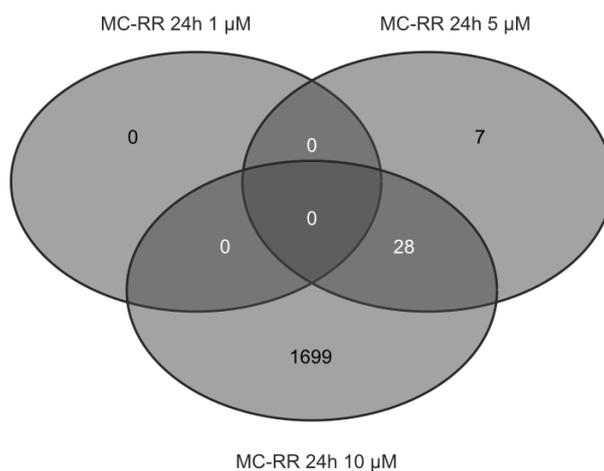
d) Genes eliciting significant linear dose response

**Figure 1 : Dose response analyses in the 4 hrs series**

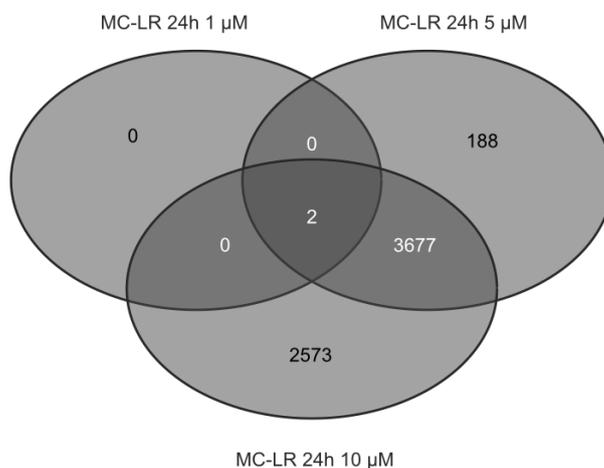
a) Number of genes identified by the “MCs vs control” SAM analyses for the 4 hr series. In b & c, gene list comparison using Venn diagrams for MC-RR (b) and MC-LR (c). The lists of genes with a linear dose response with the Benjamini-Hochebergh post hoc test p-value are presented in the table d. For further details about the statistical analyses see material and methods.

	MC-RR 24 hrs			MC-LR 24 hrs		
	1 μM	5 μM	10 μM	1 μM	5 μM	10 μM
up-regulated	0	8	1333	2	1714	3066
down-regulated	0	27	394	0	2153	3186

a) Number of significantly altered genes



b) Venn diagram of altered genes in MC-RR 24 hrs series



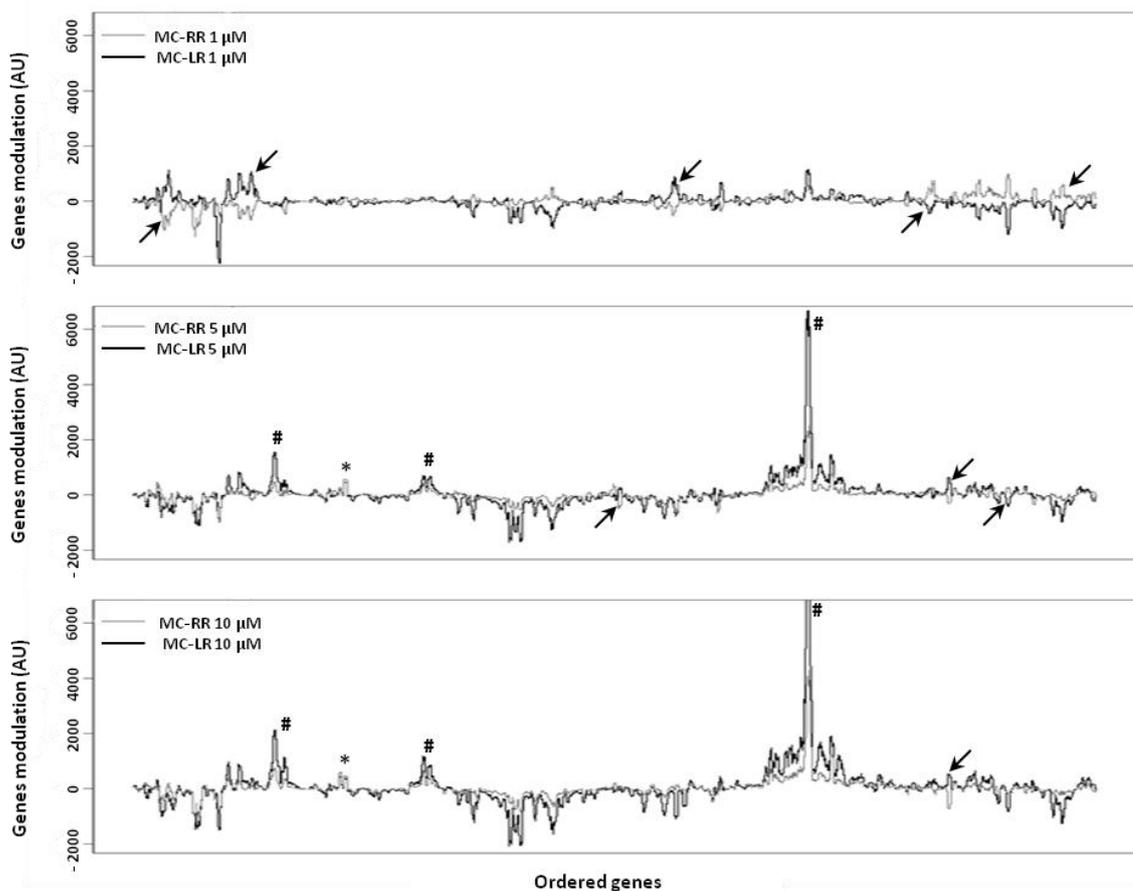
c) Venn diagram of altered genes in MC-LR 24 hrs series

	<b>MC-RR 24 hrs</b>	<b>MC-LR 24 hrs</b>
increasing	153	468
decreasing	39	345

d) Number of genes eliciting significant linear dose response

**Figure 2 : Dose response analyses in the 24 hrs series**

Number of genes identified by the "MCs vs control" SAM analyses in the 24 hr series. In b & c, gene list comparison using Venn diagrams for MC-RR (b) and MC-LR (c). The number of genes with a linear dose response is presented in table d.



**Figure 3 : Comparison of the median genomic profiles of MC-LR and MC-RR for the 24 hrs series.**

The genomic profiles were illustrated by the moving average of the solvent corrected value for each gene which was plotted according to the genes hierarchical clustering order. This figure illustrated the match of MC-RR and MC-LR on gene modulation. At 1  $\mu\text{M}$ , several gene clusters elicited an opposite regulation by MC-RR and MC-LR (arrowheads). On the contrary, at 5 and 10  $\mu\text{M}$ , the genes were modulated in the same way (up- or down-regulation) for both toxins. Furthermore, the MC-LR response was, in absolute value, always higher than the MC-RR one, except for two clusters (asterisks). Moreover, the gap between MC-LR and MC-RR responses increased with the dose as illustrated by the genes pointed out by an ash sign (#).

**Table 1 : Lists of genes modulated from SAM analyses of "MC-RR vs MC-LR" at 4 hrs**

***MC-RR vs MC-LR at 10  $\mu$ M***

<b>HUGO name</b>	<b>Fold Change</b>
CCND1	<b>1,85</b>
MON1B	<b>1,76</b>
C17orf63	<b>-1,46</b>
VDR	<b>-1,46</b>
C1orf2	<b>-1,47</b>
VDR	<b>-1,55</b>
PLXND1	<b>-1,88</b>
GAD1	<b>-1,94</b>

***MC-RR vs MC-LR at 50  $\mu$ M***

<b>HUGO name</b>	<b>Fold Change</b>
BC016022	<b>3,02</b>
ENST00000325900	<b>2,01</b>
CAPN12	<b>1,86</b>
FOXA1	<b>1,56</b>
MGC4655	<b>1,51</b>

***MC-RR vs MC-LR at 100  $\mu$ M***

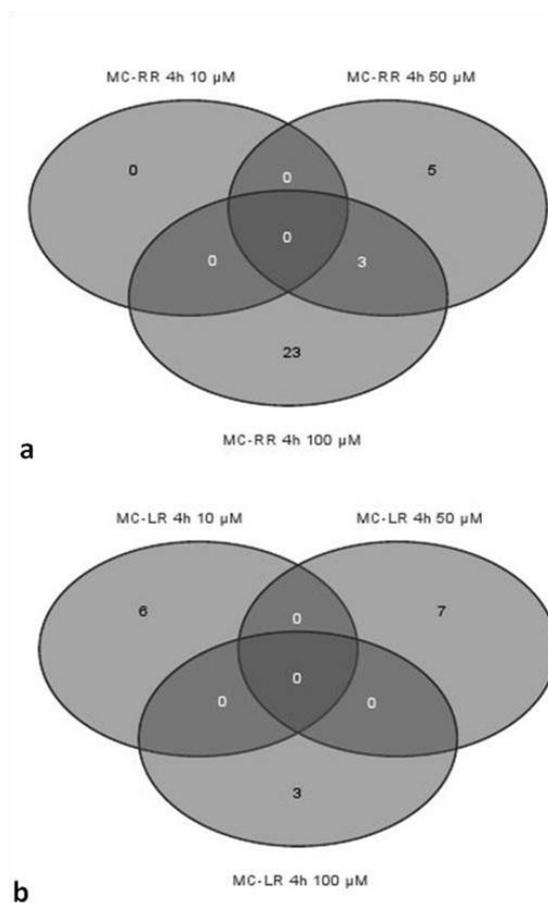
<b>HUGO name</b>	<b>Fold Change</b>
ANKRD32	<b>45,30</b>
LOC283551	<b>5,18</b>
CYP1A1	<b>4,61</b>
BC018676	<b>3,39</b>
GEMIN5	<b>3,26</b>
A_24_P357986	<b>2,89</b>
ARL13B	<b>2,36</b>
A_32_P82179	<b>2,29</b>
CR606637	<b>2,24</b>
UGT2B17	<b>2,11</b>

LOC727891	<b>1,99</b>
UGT2B15	<b>1,98</b>
FLJ11236	<b>1,86</b>
AK000038	<b>1,79</b>
BQ071182	<b>1,74</b>
HSPA5	<b>1,70</b>
TMEM15	<b>1,64</b>
CBX1	<b>1,60</b>
PFDN6	<b>1,45</b>
CRELD2	<b>1,43</b>
CHCHD8	<b>1,33</b>
HMBS	<b>1,29</b>
PGK1	<b>1,18</b>
NSMCE2	<b>-1,52</b>
CIRBP	<b>-1,63</b>
THC2612889	<b>-3,83</b>

**Table 2 : Comparison of the lists of modulated genes from "MC-RR vs MC-LR" and "MCs vs control" by SAM analyses for the 24 hrs data.**

	<b>found in (MC-RR vs control)</b>	<b>found in (MC-LR vs control)</b>	<b>found in (MC- LR vs control) &amp; (MC-RR vs control)</b>	<b>only found in (MC-LR vs MC-RR)</b>
<i>1 μM</i>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<i>5 μM</i>	<b>0</b>	<b>119</b>	<b>9</b>	<b>15</b>
<i>10 μM</i>	<b>3</b>	<b>370</b>	<b>316</b>	<b>44</b>

The genes identified through the "MC-RR vs MC-LR" analysis were compared to the "MC-RR vs control" and the "MC-LR vs control" gene lists. The numbers of common genes in those lists are summarized in this table.



**Figure 4 : Number of significantly altered canonical pathways at 4hrs with respect to the dose of a) MC-RR and b) MC-LR**

The disrupted canonical pathways were identified by the Ingenuity Pathway Analysis software through the input from the genes identified by "MCs vs control" analyses within the 4 hrs series. The lists of the significantly altered canonical pathways for each treatment series were compared.

**Table 3 : Distribution of canonical pathways from the 4 hrs "MC-RR vs MC-LR" SAM analyses.**

<b>Ingenuity Canonical Pathways</b>	<b>-log (p- value)</b>	<b>Ratio</b>	<b>Molecules</b>
<b>10 <math>\mu</math>M</b>			
Taurine and Hypotaurine Metabolism	2.4E00	2.13E-02	GAD1
Cell Cycle Regulation by BTG Family Proteins	2.03E00	2.78E-02	CCND1
Glutamate Metabolism	2E00	1.28E-02	GAD1
Alanine and Aspartate Metabolism	1.93E00	1.14E-02	GAD1
Melanoma Signaling	1.92E00	2.04E-02	CCND1
Thyroid Cancer Signaling	1.92E00	2.13E-02	CCND1
GABA Receptor Signaling	1.9E00	1.79E-02	GAD1
$\beta$ -alanine Metabolism	1.85E00	1.02E-02	GAD1
Endometrial Cancer Signaling	1.84E00	1.67E-02	CCND1
Cell Cycle: G1/S Checkpoint Regulation	1.83E00	1.64E-02	CCND1
Butanoate Metabolism	1.78E00	7.58E-03	GAD1
Estrogen-Dependent Breast Cancer Signaling	1.78E00	1.37E-02	CCND1
GM-CSF Signaling	1.76E00	1.43E-02	CCND1
Non-Small Cell Lung Cancer Signaling	1.74E00	1.22E-02	CCND1
Small Cell Lung Cancer Signaling	1.71E00	1.09E-02	CCND1
TGF- $\beta$ Signaling	1.69E00	1.2E-02	VDR
VDR/RXR Activation	1.69E00	1.23E-02	VDR
HER-2 Signaling in Breast Cancer	1.68E00	1.2E-02	CCND1
Cyclins and Cell Cycle Regulation	1.68E00	1.12E-02	CCND1
Acute Myeloid Leukemia Signaling	1.67E00	1.18E-02	CCND1
Prostate Cancer Signaling	1.65E00	1E-02	CCND1
Bladder Cancer Signaling	1.63E00	1.09E-02	CCND1
p53 Signaling	1.6E00	1.01E-02	CCND1
Chronic Myeloid Leukemia Signaling	1.59E00	9.26E-03	CCND1
Glioma Signaling	1.58E00	8.62E-03	CCND1
HGF Signaling	1.57E00	9.35E-03	CCND1
PTEN Signaling	1.55E00	8.13E-03	CCND1

Pancreatic Adenocarcinoma Signaling	1.55E00	8.26E-03	CCND1
Type I Diabetes Mellitus Signaling	1.54E00	8.26E-03	GAD1
Androgen Signaling	1.53E00	6.9E-03	CCND1
Hereditary Breast Cancer Signaling	1.5E00	7.63E-03	CCND1
PI3K/AKT Signaling	1.5E00	7.04E-03	CCND1
Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling	1.45E00	6.45E-03	CCND1
Ovarian Cancer Signaling	1.45E00	6.9E-03	CCND1
Glioblastoma Multiforme Signaling	1.41E00	6.02E-03	CCND1
Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling	1.35E00	5.71E-03	CCND1
IL-8 Signaling	1.34E00	5.18E-03	CCND1

### 50 $\mu$ M

---

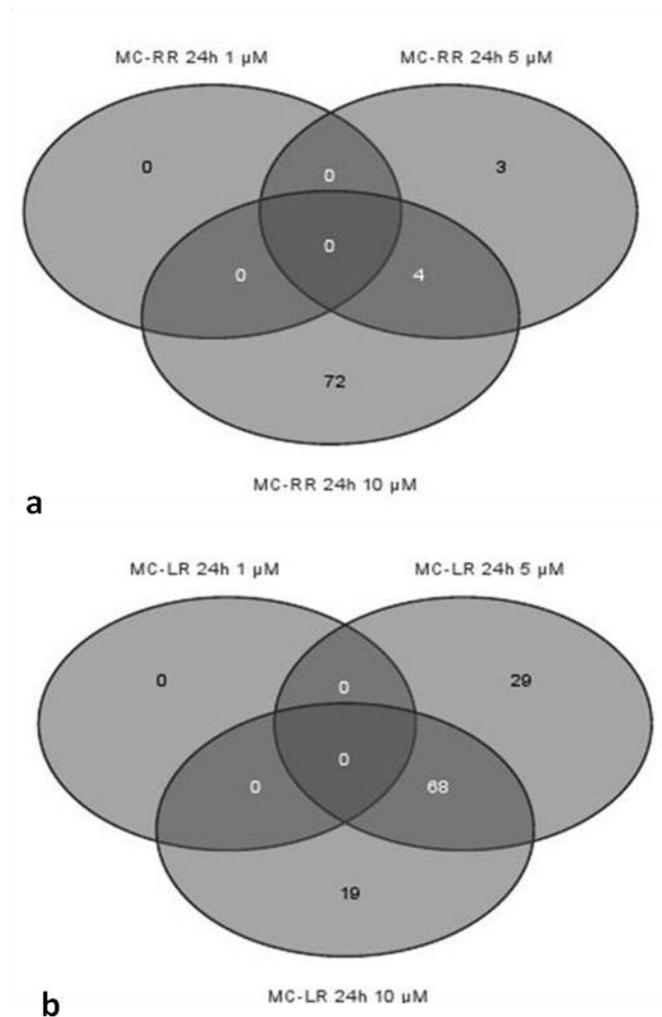
Role of Oct4 in Mammalian Embryonic Stem Cell Pluripotency	2.52E00	2.22E-02	FOXA1
FXR/RXR Activation	2.23E00	9.62E-03	FOXA1

### 100 $\mu$ M

---

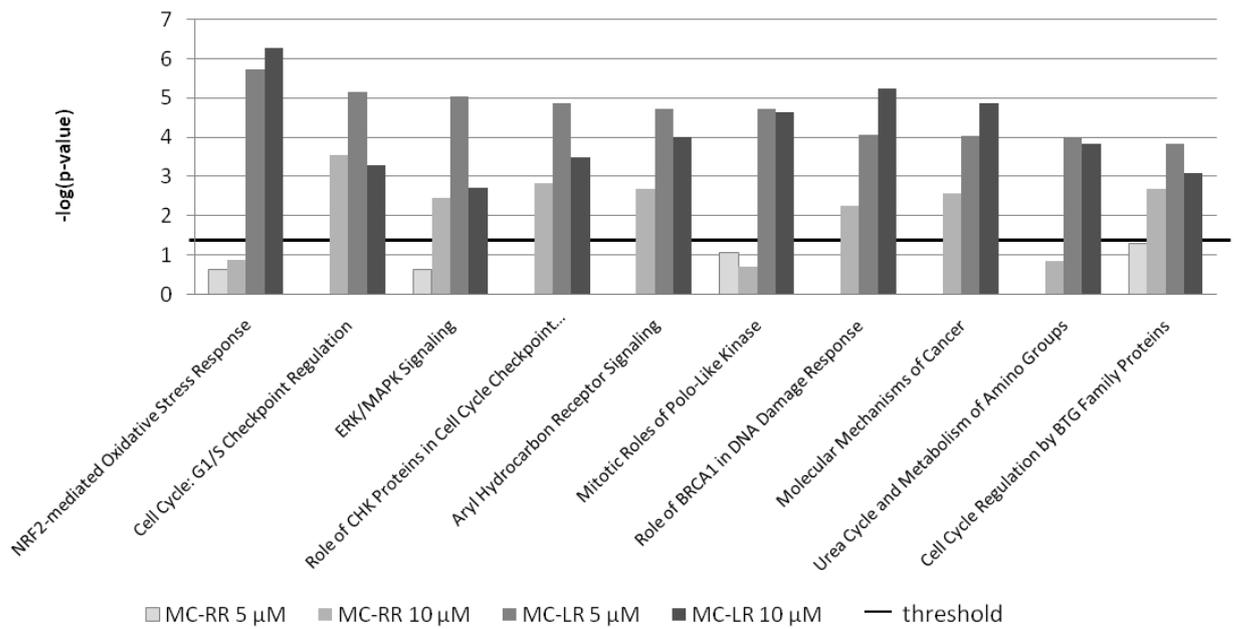
Metabolism of Xenobiotics by Cytochrome P450	3.75E00	1.41E-02	CYP1A1. UGT2B15. UGT2B17
Retinol Metabolism	3.19E00	3.23E-02	UGT2B15. UGT2B17
Pentose and Glucuronate Interconversions	3.06E00	1.34E-02	UGT2B15. UGT2B17
Xenobiotic Metabolism Signaling	2.77E00	1E-02	CYP1A1. UGT2B15. UGT2B17
Androgen and Estrogen Metabolism	2.58E00	1.41E-02	UGT2B15. UGT2B17
Starch and Sucrose Metabolism	2.53E00	1.03E-02	UGT2B15. UGT2B17
Fatty Acid Biosynthesis	1.99E00	1.96E-02	ACACA
Endoplasmic Reticulum Stress Pathway	1.81E00	5.56E-02	HSPA5

The genes were organized according to the pathways in which they are involved, and classified according to the calculated  $-\text{Log}(p\text{-values})$ . The p-value between the data set and the canonical pathway was calculated using a right-tailed Fisher's exact test, corresponding to the probability that the association between a set of focus genes and a given pathway did not happen at random. The ratio values corresponding to the ratio between the number of molecules from the data set that map the modulated pathway and the total number of molecules involved in that particular pathway were calculated.

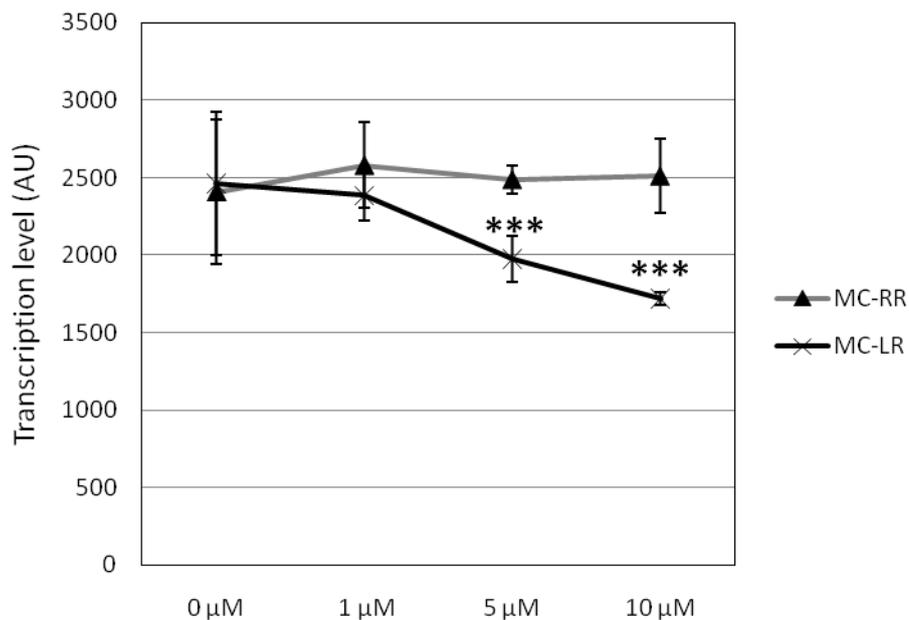


**Figure 5 : Number of canonical pathways significantly altered at 24 hrs depending on the dose of a) MC-RR and b) MC-LR**

The disrupted canonical pathways were identified by the Ingenuity Pathway Analysis software through the input from the genes identified by "MCs vs control" analyses within the 24 hrs series. The lists of the significantly altered canonical pathways for each treatment series were compared.



**Figure 6 : Classification of the modulated genes identified in the 24 hr “MCs vs control” analyses by canonical pathways.** These genes were classified using Ingenuity Pathway Analysis software according to the calculated  $-\text{Log}(p\text{-values})$ . The 10 major pathways modulated by MC-LR were compared to the modulation of the same pathways by MC-RR. The p-value of the association between the data set and the canonical pathway was calculated using a right-tailed Fisher’s exact test, corresponding to the probability that the association between a set of focus genes and a given pathway did not happen at random. The threshold corresponds to the limit of significance set by the software ( $p < 0.05$ ).



**Figure 7: Dose response of MC-RR and MC-LR on ALDH7A1 mRNA levels**

The median values of the normalized data were plotted for Aldh7A1. MC-RR did not affect the level of transcription of Aldh7A1 (triangles) whereas MC-LR induced a dose dependent decrease ( $R^2=0.95$ ) (x's). At 5 and 10μM, the level of transcription was significantly different for MC-LR and MC-RR (\*\*\*: unpaired t-test  $p$ -value<0.001)

## 6. References

1. **Amado LL, and Monserrat JM.** Oxidative stress generation by microcystins in aquatic animals: Why and how. *Environment International* 36: 226-235, 2010.
2. **Amé MV, Baroni MV, Galanti LN, Bocco JL, and Wunderlin DA.** Effects of microcystin-LR on the expression of P-glycoprotein in *Jenynsia multidentata*. *Chemosphere* 74: 1179-1186, 2009.
3. **Artursson P, Palm K, and Luthman K.** Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev* 46: 27-43, 2001.
4. **Atencio L, Moreno I, Jos A, Pichardo S, Moyano R, Blanco A, and Cameán AM.** Dose-dependent antioxidant responses and pathological changes in tenca (*Tinca tinca*) after acute oral exposure to *Microcystis* under laboratory conditions. *Toxicol* 52: 1-12, 2008.
5. **Botha N, Gehringer MM, Downing TG, van de Venter M, and Shephard EG.** The role of microcystin-LR in the induction of apoptosis and oxidative stress in CaCo2 cells. *Toxicol* 43: 85-92, 2004.
6. **Brocker C, Lassen N, Estey T, Pappa A, Cantore M, Orlova VV, Chavakis T, Kavanagh KL, Oppermann U, and Vasiliou V.** Aldehyde dehydrogenase 7A1 (ALDH7A1) is a novel enzyme involved in cellular defense against hyperosmotic stress. *Journal of Biological Chemistry* 285: 18452-18463, 2010.
7. **Bulera SJ, Eddy SM, Ferguson E, Jatkoe TA, Reindel JF, Bleavins MR, and De La Iglesia FA.** RNA expression in the early characterization of hepatotoxicants in Wistar rats by high-density DNA microarrays. *Hepatology* 33: 1239-1258, 2001.
8. **Cazenave J, Bistoni MDLA, Pesce SF, and Wunderlin DA.** Differential detoxification and antioxidant response in diverse organs of *Corydoras paleatus* experimentally exposed to microcystin-RR. *Aquatic Toxicology* 76: 1-12, 2006.
9. **Chan C-L, Wong JWY, Wong C-P, Chan MKL, and Fong W-P.** Human antiquitin: Structural and functional studies. *Chemico-Biological Interactions* 2010.
10. **Chen T, Cui J, Liang Y, Xin X, Owen Young D, Chen C, and Shen P.** Identification of human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase as a potential target for microcystin-LR. *Toxicology* 220: 71-80, 2006.
11. **Chen T, Wang Q, Cui J, Yang W, Shi Q, Hua Z, Ji J, and Shen P.** Induction of apoptosis in mouse liver by microcystin-LR: a combined transcriptomic, proteomic, and simulation strategy. *Mol Cell Proteomics* 4: 958-974, 2005.
12. **Chorus I, and Bartram J.** *Toxic cyanobacteria in water : a guide to their public health consequences, monitoring and management.* WHO, 1999.
13. **Clark SP, Ryan TP, Searfoss GH, Davis MA, and Hooser SB.** Chronic microcystin exposure induces hepatocyte proliferation with increased expression of mitotic and cyclin-associated genes in p53-deficient mice. *Toxicologic pathology* 36: 190-203, 2008.
14. **Ding W, Shen H, and Zhu H.** Hepatotoxicity and formation of reactive oxygen species induced by microcystis aeruginosa toxin. *Zhonghua yu fang yi xue za zhi [Chinese journal of preventive medicine]* 32: 278-280, 1998.
15. **Ding WX, and Ong CN.** Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity. *FEMS Microbiol Lett* 10880: 1-7, 2003.
16. **Djediati C, Malecot M, de Luze A, Bernard C, Puiseux-Dao S, and Ebery M.** Localization of microcystin-LR in medaka fish tissues after cyanotoxin gavage. *Toxicol* 55: 531-535, 2010.
17. **Eriksson JE, Gronberg L, Nygard S, Slotte JP, and Meriluoto JAO.** Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1025: 60-66, 1990.
18. **Falconer IR, Dornbusch M, Moran G, and Yeung SK.** Effect of the cyanobacterial (blue-green algal) toxins from *Microcystis aeruginosa* on isolated enterocytes from the chicken small intestine. *Toxicol* 30: 790-793, 1992.

19. **Falconer IR, and Yeung DS.** Cytoskeletal changes in hepatocytes induced by Microcystis toxins and their relation to hyperphosphorylation of cell proteins. *Chem Biol Interact* 81: 181-196, 1992.
20. **Fischer A, Hoeger SJ, Stemmer K, Feurstein DJ, Knobloch D, Nussler A, and Dietrich DR.** The role of organic anion transporting polypeptides (OATPs/SLCOs) in the toxicity of different microcystin congeners in vitro: A comparison of primary human hepatocytes and OATP-transfected HEK293 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 245: 9-20, 2010.
21. **Fischer WJ, Altheimer S, Cattori V, Meier PJ, Dietrich DR, and Hagenbuch B.** Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicol Appl Pharmacol* 203: 257-263, 2005.
22. **Fong WP, Cheng CHK, and Tang WK.** Antiquitin, a relatively unexplored member in the superfamily of aldehyde dehydrogenases with diversified physiological functions. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 63: 2881-2885, 2006.
23. **Gan N, Sun X, and Song L.** Activation of Nrf2 by Microcystin-LR Provides Advantages for Liver Cancer Cell Growth. *Chemical Research in Toxicology* 23: 1477-1484, 2010.
24. **Gupta N, Pant SC, Vijayaraghavan R, and Rao PVL.** Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants (LR, RR, YR) in mice. *Toxicology* 188: 285-296, 2003.
25. **Guzman RE, and Solter PF.** Hepatic oxidative stress following prolonged sublethal microcystin LR exposure. *Toxicologic pathology* 27: 582-588, 1999.
26. **Hoeger SJ, Schmid D, Blom JF, Ernst B, and Dietrich DR.** Analytical and functional characterization of microcystins [Asp3]MC-RR and [Asp3,Dhb7]MC-RR: consequences for risk assessment? *Environmental Science & Technology* 41: 2609-2616, 2007.
27. **Honkanen RE, Zwiller J, Moore RE, Daily SL, Khatra BS, Dukelow M, and Boynton AL.** Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *J Biol Chem* 265: 19401-19404, 1990.
28. **Hudder A, Song W, O'Shea KE, and Walsh PJ.** Toxicogenomic evaluation of microcystin-LR treated with ultrasonic irradiation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 220: 357-364, 2007.
29. **Ito E, Kondo F, and Harada K-I.** First report on the distribution of orally administered microcystin-LR in mouse tissue using an immunostaining method. *Toxicon* 38: 37-48, 2000.
30. **Ito E, Takai A, Kondo F, Masui H, Imanishi S, and Harada K.** Comparison of protein phosphatase inhibitory activity and apparent toxicity of microcystins and related compounds. *Toxicon* 40: 1017-1025, 2002.
31. **Jayaraj R, Anand T, and Rao PVL.** Activity and gene expression profile of certain antioxidant enzymes to microcystin-LR induced oxidative stress in mice. *Toxicology* 220: 136-146, 2006.
32. **La-Salette R, Oliveira MM, Palmeira CA, Almeida J, and Peixoto FP.** Mitochondria a key role in microcystin-LR kidney intoxication. *J Appl Toxicol* 28: 55-62, 2008.
33. **Li H, Xie P, Zhang D, and Chen J.** The first study on the effects of microcystin-RR on gene expression profiles of antioxidant enzymes and heat shock protein-70 in *Synechocystis* sp. PCC6803. *Toxicon* 53: 595-601, 2009.
34. **Maatouk I, Bouaicha N, Plessis MJ, and Perin F.** Detection by 32P-postlabelling of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in DNA as biomarker of microcystin-LR- and nodularin-induced DNA damage in vitro in primary cultured rat hepatocytes and in vivo in rat liver. *Mutat Res* 564: 9-20, 2004.
35. **Malécot M, Mezhoud K, Marie A, Praseuth D, Puisieux-Dao S, and Edery M.** Proteomic study of the effects of microcystin-LR on organelle and membrane proteins in medaka fish liver. *Aquatic Toxicology* 94: 153-161, 2009.
36. **Marchitti SA, Brocker C, Stagos D, and Vasiliou V.** Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 4: 697-720, 2008.

37. **McConnell JL, and Wadzinski BE.** Targeting Protein Serine/Threonine Phosphatases for Drug Development. *Molecular Pharmacology* 75: 1249-1261, 2009.
38. **Mezhoud K, Bauchet AL, Château-Joubert S, Praseuth D, Marie A, François JC, Fontaine JJ, Jaeg JP, Cravedi JP, Puiseux-Dao S, and Edery M.** Proteomic and phosphoproteomic analysis of cellular responses in medaka fish (*Oryzias latipes*) following oral gavage with microcystin-LR. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxicology* 51: 1431-1439, 2008.
39. **Mikhailov A, Härmälä-Braskén A-S, Hellman J, Meriluoto J, and Eriksson JE.** Identification of ATP-synthase as a novel intracellular target for microcystin-LR. *Chemico-Biological Interactions* 142: 223-237, 2003.
40. **Nobre ACL, Nunes-Monteiro SM, Monteiro MCSA, Martins AMC, Havt A, Barbosa PSF, Lima AAM, and Monteiro HSA.** Microcystin-LR promote intestinal secretion of water and electrolytes in rats. *Toxicon* 44: 555-559, 2004.
41. **Ohta T, Nishiwaki R, Yatsunami J, Komori A, Suganuma M, and Fujiki H.** Hyperphosphorylation of cytokeratins 8 and 18 by microcystin-LR, a new liver tumor promoter, in primary cultured rat hepatocytes. *Carcinogenesis* 13: 2443-2447, 1992.
42. **Pinto M, Robine Leon S, and Appay MD.** Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biology of the Cell* 47: 323-330, 1983.
43. **Pouria S, De Andrade A, Barbosa J, Cavalcanti RL, Barreto VTS, Ward CJ, Preiser W, Poon GK, Neild GH, and Codd GA.** Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet* 352: 21-26, 1998.
44. **Prieto AI, Jos A, Pichardo S, Moreno I, and Cameñin AM.** Differential oxidative stress responses to microcystins LR and RR in intraperitoneally exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.). *Aquatic Toxicology* 77: 314-321, 2006.
45. **Puerto M, Pichardo S, Jos A, Prieto AI, Sevilla E, FrÃ-as JE, and Cameñin AM.** Differential oxidative stress responses to pure Microcystin-LR and Microcystin-containing and non-containing cyanobacterial crude extracts on Caco-2 cells. *Toxicon*.
46. **Robillot C, and Hennion MC.** Issues arising when interpreting the results of the protein phosphatase 2A inhibition assay for the monitoring of microcystins. *Analytica Chimica Acta* 512: 339-346, 2004.
47. **Runnegar M, Berndt N, and Kaplowitz N.** Microcystin uptake and inhibition of protein phosphatases: Effects of chemoprotectants and self-inhibition in relation to known hepatic transporters. *Toxicology and Applied Pharmacology* 134: 264-272, 1995.
48. **Runnegar M, Berndt N, Kong S-M, Lee EYC, and Zhang L.** In vivo and in vitro binding of microcystin to protein phosphatases 1 and 2A. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 216: 162-169, 1995.
49. **Sun H, Chow ECY, Liu S, Du Y, and Pang KS.** The Caco-2 cell monolayer: Usefulness and limitations. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* 4: 395-411, 2008.
50. **Tusher VG, Tibshirani R, and Chu G.** Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 5116-5121, 2001.
51. **Wang M, Wang D, Lin L, and Hong H.** Protein profiles in zebrafish (*Danio rerio*) brains exposed to chronic microcystin-LR. *Chemosphere* 81: 716-724, 2010.
52. **Wang Q, Xie P, Chen J, and Liang G.** Distribution of microcystins in various organs (heart, liver, intestine, gonad, brain, kidney and lung) of Wistar rat via intravenous injection. *Toxicon* 52: 721-727, 2008.
53. **Wei L, Sun B, Chang M, Liu Y, and Nie P.** Effects of cyanobacterial toxin microcystin-LR on the transcription levels of immune-related genes in grass carp *Ctenopharyngodon idella*. *Environmental Biology of Fishes* 85: 231-238, 2009.
54. **WHO.** Guidelines for Drinking Water Quality. Addendum to Volume 1. 1998.

55. **Wong JWY, Chan CL, Tang WK, Cheng CHK, and Fong WP.** Is antiqutin a mitochondrial enzyme? *Journal of Cellular Biochemistry* 109: 74-81, 2010.
56. **Zegura B, Lah TT, and Filipic M.** Alteration of intracellular GSH levels and its role in microcystin-LR-induced DNA damage in human hepatoma HepG2 cells. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 611: 25-33, 2006.
57. **Zegura B, Volcic M, Lah TT, and Filipic M.** Different sensitivities of human colon adenocarcinoma (CaCo-2), astrocytoma (IPDDC-A2) and lymphoblastoid (NCNC) cell lines to microcystin-LR induced reactive oxygen species and DNA damage. *Toxicol* 52: 518-525, 2008.
58. **Zegura B, Zajc I, Lah TT, and Filipic M.** Patterns of microcystin-LR induced alteration of the expression of genes involved in response to DNA damage and apoptosis. *Toxicol* 51: 615-623, 2008.
59. **Zhang L, McHale CM, Rothman N, Li G, Ji Z, Vermeulen R, Hubbard AE, Ren X, Shen M, Rappaport SM, North M, Skibola CF., Yin S, Vulpe C, Chanock SJ, Smith MT, and Lan Q.** Systems biology of human benzene exposure. *Chemico-Biological Interactions* 184: 86-93, 2010.



### 3. Mise en évidence d'une différence de réponse entre la MC-LR et la MC-RR sur la voie de dégradation des protéines- système ubiquitination/protéasome

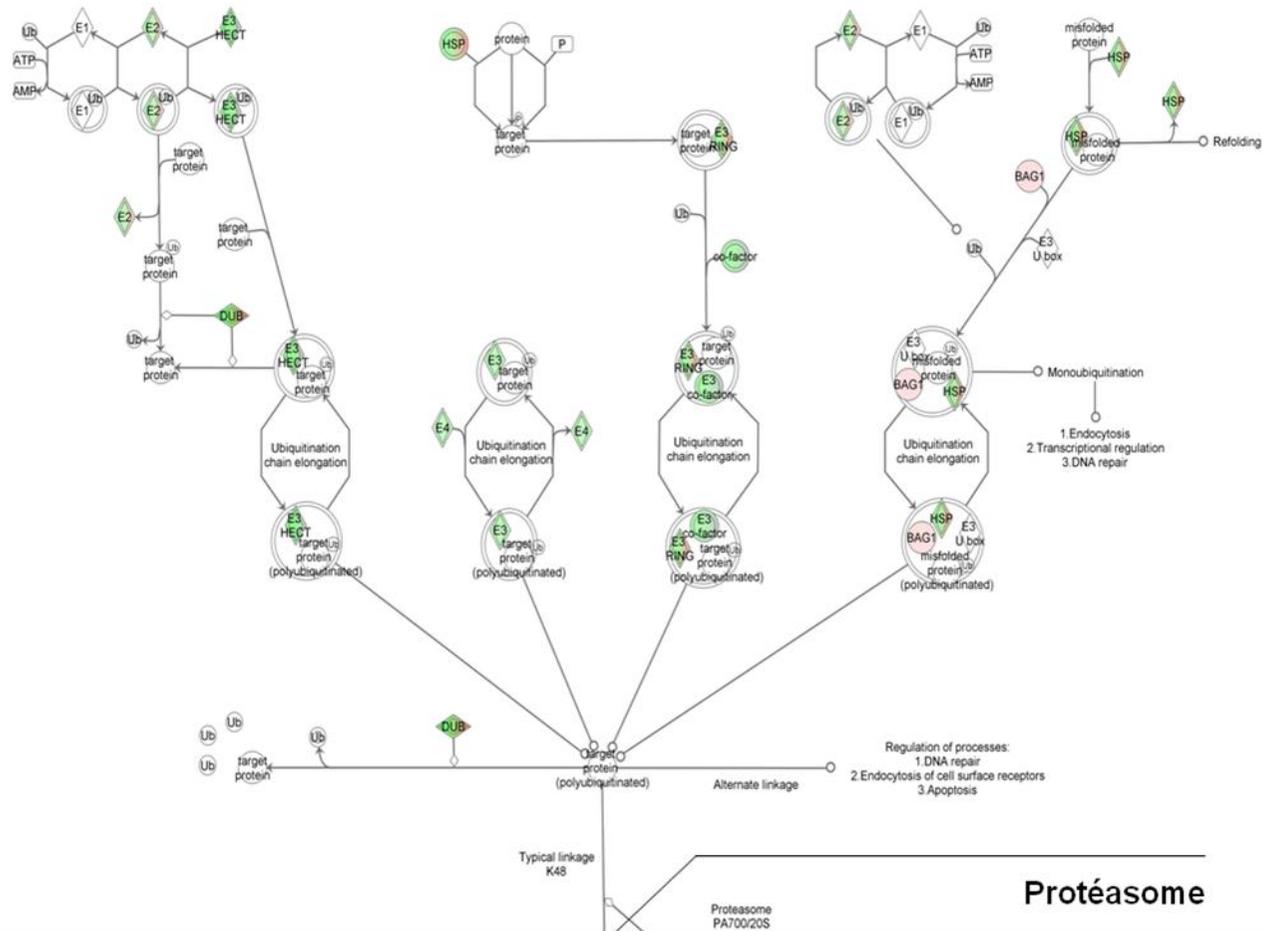
D'autres voies canoniques présentent des réponses très différentes en fonction du variant de MCs. En effet, dans notre étude (10  $\mu$ M, 24h d'exposition), la régulation des gènes de la voie d'ubiquitination des protéines n'est altérée pour un nombre significatif de gènes (37,3%) qu'avec la MC-LR alors que seuls 8,9 % des gènes de cette voie sont modulés par la MC-RR. De plus, l'analyse statistique de ces résultats indique que la MC-LR induit un effet net dès 5  $\mu$ M qui augmente à 10  $\mu$ M (p-value =  $9,2 \cdot 10^{-3}$  et  $7,78 \cdot 10^{-6}$  respectivement) après 24h d'exposition. En effet le pourcentage de gènes significativement perturbés appartenant à cette voie canonique augmente de 21,4 % à 37,3% avec la concentration. Par contre, avec la MC-RR la perturbation de ces gènes relève plus du hasard que d'un effet du traitement sur cette voie (p-value = 0,727).

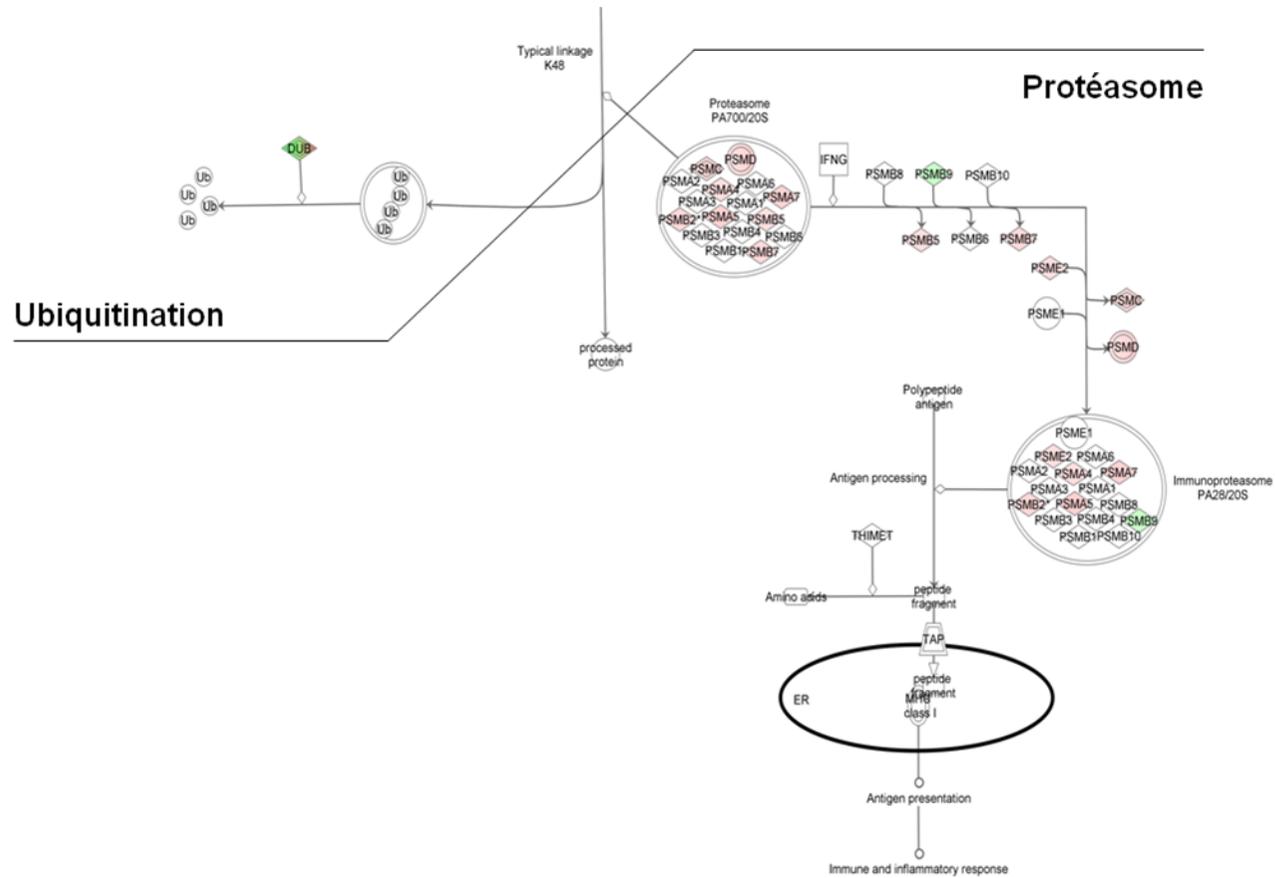
Une étude plus approfondie fait apparaître deux groupes de gènes : les gènes du système d'étiquetage des protéines avec l'ubiquitine pour lesquels leur transcription est globalement inhibée, et en particulier les enzymes du complexe ubiquitination des protéines E<sub>3</sub> (cf. **Figure 31**), et les gènes codant pour des protéines du protéasome qui sont globalement induits (cf. **Figure 31**).

La modulation des gènes codant pour les protéines du complexe de désubiquitination (DUB) et du complexe d'ubiquitination E<sub>2</sub> présentent des résultats plus contrastés (cf. **Figure 31**), certains étant up-régulés comme les estérases ubiquitines carboxyl-terminal L1 et L5 (respectivement UCHL1 et UCHL5) et d'autres down-régulés comme les peptidases ubiquitine spécifique 25 et 30 (respectivement USP25 et USP30).

Nos résultats indiquent donc que la MC-LR, à la différence de la MC-RR, pourrait avoir un effet sur le système d'ubiquitination des protéines et du protéasome.

Protein Ubiquitination Pathway





**Figure 31 : Modulation des gènes de la voie canonique d'ubiquitination/protéasome après une exposition à 10  $\mu$ M de MC-LR pendant 24h d'après IPA, en vert gènes down régulés, en rouge gènes up-régulés**

#### **4. Seule la MC-LR modifie le niveau d'expression de biomarqueurs du stress du réticulum endoplasmique**

L'analyse ontologique des résultats ne révèle pas de perturbation significative de la voie du SRE par les deux MCs. Cependant, après 24h d'exposition à 10  $\mu$ M de MC-LR, plusieurs gènes impliqués dans le SRE sont significativement induits : le gène DDIT3 (codant pour la protéine CHOP) (+1,71) et le gène XBP1 (+1,62) codant pour la protéine du même nom (**cf. introduction paragraphe 1.2.5.3**). Par contre, la MC-RR n'a pas d'effet sur le niveau d'expression de ces gènes. De plus, le niveau d'expression du gène de la HSPA5 un autre biomarqueur du SRE révèle une différence significative (un facteur de 1,77) entre la MC-LR et la MC-RR après 4 heures d'exposition à 100  $\mu$ M.

Ces résultats suggèrent donc un effet de la MC-LR mais pas de la MC-RR sur le SRE.

#### **5. Comparaison des effets de la MC-LR et de la MC-RR sur le niveau d'expression de gènes d'intérêts**

Il est important de noter en préambule que, bien que notre travail ait été réalisé avec une puce pangénomique, seule une partie des sondes étaient exploitables après le filtrage des données. Ainsi nous n'avons pas d'information sur certains gènes dont ceux des transporteurs d'influx SLCO 3A1, d'efflux P-gp et MRP1 et de l'enzyme Cyp 3A4.

##### **5.1 Transporteurs d'influx**

Parmi les analyses SAM « MCs *vs* control », 3 mettent en évidence un effet des MCs sur le niveau d'expression du gène SLCO 4A1 codant pour le transporteur OATP 4A1. En effet, à 24h, la MC-LR induit la transcription de ce gène à 5 et 10  $\mu$ M (+ 5,66 et +8,66 respectivement). L'étude de l'effet dose a conclu à un effet linéaire croissant de la concentration sur l'expression de ce gène. Un effet sur ce gène est aussi détecté avec la MC-RR à 10  $\mu$ M après 24h d'exposition mais dans une moindre mesure (+2,61). Cependant, les analyses comparatives « MC-RR *vs* MC-LR » n'ont pas révélées de différence pour l'expression de ce gène entre les 2 variants.

## 5.2 Enzymes du métabolisme

Aucun effet de la MC-RR n'a été détecté sur le niveau de transcription du gène de la GST $\alpha_1$ . Par contre, la MC-LR induit une baisse significative de l'expression de ce gène aussi bien à 5  $\mu$ M qu'à 10  $\mu$ M après 24h d'exposition (-2,92 et -3,10 respectivement). Cette différence de réponse entre les deux toxines est également mise en évidence par l'analyse comparative après 4 h d'exposition pour la concentration de 100  $\mu$ M, avec un rapport MC-RR/MC-LRR de 1,64.

## 6. Discussion

### 6.1 La MC-LR perturbe la voie de dégradation des protéines

La réponse au stress oxydant n'est pas la seule voie canonique à n'être significativement perturbée que par la MC-LR. En effet, il apparaît que le système de dégradation des protéines via l'étiquetage avec l'ubiquitine présente le même comportement (**cf. chapitre II paragraphe 3**). La modulation des enzymes de l'ubiquitination a été récemment rapportée chez des daphnies ayant consommé une souche toxique de *Microcystis aeruginosa*. Ces résultats indiquent une augmentation du gène de l'enzyme de conjugaison à l'ubiquitine (UBC) faisant partie du complexe E<sub>2</sub> (**cf. Figure 31**) (Schwarzenberger et al 2009). De même, nos résultats au niveau transcriptionnel correspondent à ceux de l'étude protéomique réalisée sur des cerveaux de poissons zèbre exposés de manière chronique à la MC-LR et montrant une augmentation significative de la quantité des protéines UCHL1 et UCHL5 (Wang et al 2010). Nos résultats confortent donc les quelques données bibliographiques indiquant un effet de la MC-LR sur le système ubiquitination/protéasome. Cependant ces modulations ne sont constatées qu'avec la MC-LR et pas la MC-RR dans notre modèle cellulaire alors qu'une étude sur la lignée épithéliale amniotique FL révèle un effet de la MC-RR sur le niveau d'expression de certaines protéines de ce système (Fu et al 2009). La source de la différence avec nos résultats peut provenir d'une différence de sensibilité cellulaire à ces variants.

Du point de vue mécanistique, la perturbation du système ubiquitination-protéasome pourrait être une conséquence du stress du réticulum endoplasmique. En effet, des études récentes montrent un lien entre les deux phénomènes, le SRE induisant une baisse de l'efficacité du système ubiquitination-protéasome (Chen & Yin 2011; Menéndez-Benito et al 2005). De plus, le système ubiquitination-protéasome est un

élément clé de la dégradation des cyclines et donc du cycle cellulaire (Yu 2007). L'effet sur ce système pourrait donc jouer un rôle dans la perturbation du cycle cellulaire observée après exposition aux MCs (Dias et al 2010; Lankoff et al 2003; Zhu et al 2005). Ce système constitue donc une nouvelle voie à explorer plus précisément dans l'étude de la toxicité des MCs.

## **6.2 La MC-LR induit des biomarqueurs du SRE mais ne perturbe pas la voie complète**

Nos résultats concernant la modulation du niveau d'expression de biomarqueurs du SRE avec la MC-LR (**cf chapitre II paragraphe 4**) viennent s'ajouter aux publications récentes suggérant une initiation de stress du réticulum endoplasmique par la MC-LR soit par des effets morphologiques (Alverca et al 2009; Hermansky et al 1993; Khan et al 1995; Li et al 2001; Miura et al 1989; Pace et al 1991a) soit par l'expression de biomarqueurs (Malécot et al 2009; Qin et al 2010). De plus, l'induction du SRE étant organe dépendant, l'effet de la MC-LR sur les Caco-2 indique que ce phénomène pourrait se produire au niveau intestinal comme cela a déjà été montré au niveau hépatique (Qin et al 2010). Cependant, l'absence d'effet sur ces biomarqueurs suggère que la MC-RR n'induit pas de SRE, comme cela a déjà été constaté pour le stress oxydant et le système ubiquitination/protéasome.

## **7. Conclusion**

Pour conclure, les réponses cellulaires induites aussi bien par la MC-LR que la MC-RR sur les Caco-2 différenciées suggèrent que ce modèle cellulaire est capable d'absorber ces deux variants. Les voies modulées sur ce modèle intestinal suite à l'exposition à la MC-LR sont assez similaires à celles décrites sur d'autres organes, en particulier le foie. Ainsi, au moins une partie de la réponse cellulaire aux MCs ne dépend pas du type cellulaire. La cohérence de ces résultats sur la MC-LR rendent pertinents ceux obtenus avec la MC-RR indiquant que celle-ci n'induit pas de réponses au stress oxydant et au SRE ni d'altération du système ubiquitination/protéasome. Bien que quelques pistes aient été proposées, des recherches supplémentaires seront nécessaires pour valider et expliquer ces différences.

- ⇒ **La MC-LR et la MC-RR modifient le profil transcriptionnel des Caco-2**
  
- ⇒ **Les effets de la MC-LR et de la MC-RR sont proches sur les Caco-2 à l'échelle transcriptomique**
  
- ⇒ **La MC-LR perturbe le niveau de transcription de biomarqueurs du stress du réticulum endoplasmique**
  
- ⇒ **Cependant certains systèmes cellulaires présentent des réponses très différentes entre la MC-LR et la MC-RR (réponse au stress oxydant, voie de dégradation des protéines)**



## **Discussion générale**



Au cours des dernières décennies, le développement des cyanobactéries est devenu un problème de santé publique. En effet, les cyanotoxines ont été mises en cause dans des cas d'intoxications humaines ou animales parfois mortelles (Chorus & Bartram 1999). Parmi ces toxines, les microcystines sont les formes les plus étudiées et les mieux connues. Cependant malgré les efforts de recherche déployés ces dernières années, l'évaluation du risque par l'OMS ou d'autres institutions ne s'est basée que sur la toxicité d'un seul variant, la MC-LR (IARC 2010; WHO 1998; 2003).

Chez l'Homme, l'ingestion est la principale voie d'exposition aux MCs (Chorus & Bartram 1999). Dans ce contexte, l'intestin est un organe clé pour caractériser la biodisponibilité de ces molécules. En effet, c'est le principal organe d'absorption rencontré par les molécules après ingestion. Pourtant, il n'existe que très peu d'études sur les capacités d'absorption de l'intestin vis-à-vis des MCs et sur les effets toxiques générés (**cf. introduction paragraphe 1.2.3.5 & 2.3**). De même, peu de travaux se sont intéressés à d'autres variants que la MC-LR et les études comparant différents variants sont très rares (**cf. introduction paragraphe 3**). Il est donc nécessaire de mettre en œuvre des travaux sur la toxicité intestinale de différents variants afin de mieux caractériser le danger pour l'homme suite à l'ingestion de microcystines.

Dans ce travail, nous avons donc choisi de comparer deux variants ayant des structures quasi identiques mais des toxicités *in vivo* significativement différentes (Gupta, Pant et al. 2003; Chen, Lee et al. 2006). Nous avons réalisé nos travaux sur des cellules intestinales humaines avec deux objectifs principaux : explorer les capacités d'absorption y compris les mécanismes mis en jeu vis-à-vis de ces deux variants ainsi que déterminer et comparer les effets provoqués par ces toxines à l'échelle pangénomique.

## **1. La MC-LR et la MC-RR pénètrent dans les Caco-2 non différenciées et différenciées**

Dans le cas de toxines hydrophiles comme la MC-LR ou la MC-RR, l'absorption cellulaire est un élément clé de leur toxicité. Nous avons observé que les cellules Caco-2 étaient peu sensibles à la toxicité des microcystines. Ce constat avait déjà été établi par d'autres auteurs amenant certains à suggérer que ces cellules n'exprimaient pas les transporteurs nécessaires pour l'influx des microcystines. Dans ce travail, nous avons utilisé les Caco-2 sous formes non différenciées et différenciées. Nous avons donc tout d'abord vérifié que la MC-LR et la MC-RR étaient capables de pénétrer dans les Caco-2 non différenciées et différenciées.

Concernant les Caco-2 non différenciées, nos résultats d'immunomarquage indiquent bien que les deux variants sont retrouvés de manière similaire dans ces cellules (**cf. chapitre I**). Pour les Caco-2 différenciées, nos travaux de transcriptomique montrent une modulation de divers gènes suite à l'exposition aux deux variants, indiquant que ces toxines ont bien pénétré dans les cellules (**cf. chapitre II**).

## **2. L'absorption par les Caco-2 non différenciées et différenciées est-elle comparable ?**

L'approche par immunomarquage rend délicate l'utilisation de cellules Caco-2 différenciées. Nous avons donc fait le choix de comparer l'absorption de la MC-LR et de la MC-RR sur le modèle Caco-2 non différenciées. Cependant, il sera important de vérifier si l'absorption des microcystines par les Caco-2 non différenciées et différenciées est équivalente. En effet, plusieurs publications montrent que la différenciation des Caco-2 augmente l'expression des protéines de transports par rapport aux Caco-2 non différenciées. Cependant, l'étude de Ahlin *et al.* (Ahlin, Hilgendorf et al. 2009) portant sur les Caco-2 non différenciées indique que l'expression de ces différents transporteurs est similaire à celle obtenue dans les travaux d'Hilgendorf et d'Hayeshi sur Caco-2 différenciées (Hilgendorf, Ahlin et al. 2007; Hayeshi, Hilgendorf et al. 2008). Des études préliminaires dans nos conditions de culture ont également montré peu de différences (Yang 2007).

Pour conforter nos résultats d'absorption, une étude cinétique a été réalisée au laboratoire et est en cours d'analyse. Cette étude quantifiera le passage de la MC-LR et la MC-RR à travers une monocouche de Caco-2 différenciées simulant l'épithélium intestinal. Les premiers résultats obtenus avec la MC-LR (**cf. annexe 1**) indiquent que l'absorption de la toxine dans les cellules se produit rapidement, dès les 30 premières minutes d'exposition. Ces résultats sont cohérents avec ceux de notre travail sur les Caco-2 non différenciées (**cf. article 1**) suggérant ainsi que la cinétique d'absorption de la MC-LR par les Caco-2 non différenciées et différenciées est similaire. De plus, les résultats préliminaires de cinétique obtenus avec la MC-RR semblent confirmer que l'absorption des deux variants est similaire sur les Caco-2 différenciées (Henri, communication personnelle).

Dans ce contexte, le modèle Caco-2 apparaît comme un modèle particulièrement intéressant pour comparer les effets cellulaires de la MC-LR et de la MC-RR.

### **3. Causes possibles de la faible sensibilité des Caco-2 aux microcystines**

Monks et Moscow sont, dans leur commentaire de l'étude de de Souza Votto (de Souza Votto, Renon et al. 2007; Monks and Moscow 2010), très critiques vis-à-vis de l'emploi de certains modèles cellulaires, y compris les cellules Caco-2, dans l'étude des MCs. Ils suggèrent que la faible sensibilité des lignées étudiées par de Souza Votto *et al* est plus probablement due à une incapacité à absorber les MCs de manière massive qu'à un profil multi résistant aux xénobiotiques comme proposé par les auteurs. Cependant, selon nos données de cinétique, l'absorption de la MC-LR par les Caco-2 différenciées n'est pas faible. En effet, après 30 minutes, jusqu'à 35 % de la dose initiale (10 µM) est absorbée par les Caco-2 (**cf. annexe 1**). Ces résultats suggèrent donc que la faible sensibilité des Caco-2 à la toxicité des microcystines (**cf. chapitre I**) ainsi que la faible modification des profils transcriptionnels à 4h (**cf. chapitre II**) n'est pas associée à une difficulté d'absorption de ces toxines par le modèle cellulaire utilisé.

Nos résultats sur l'expression des gènes d'intérêts sélectionnés sont concordants entre notre étude en PCRq et notre étude transcriptomique (**cf. chapitre II**). Ils confirment l'effet inducteur dose dépendant de la MC-LR sur le gène SLCO4A1 et inhibiteur sur le gène de la GSTa1 (**cf. chapitre II**) comme cela a été déjà observé sur l'intestin de poisson rouge (Li et al 2008a).

Les lignées cancéreuses possèdent souvent un profil multi résistant aux xénobiotiques expliqué par la surexpression d'un certain nombre de protéines d'efflux (Romsicki & Sharom 1999). Un tel profil de transporteurs, provoquant un efflux massif des toxines, pourrait être une cause de la faible sensibilité des Caco-2 aux MCs. Cette hypothèse est renforcée par les résultats de cinétique de notre équipe (**cf. annexe 1**, Henri communication personnelle) mettant en évidence un phénomène d'efflux important suite à l'exposition à la MC-LR. Les dernières études comparant le niveau d'expression de transporteurs entre les Caco-2 et l'intestin ne semblent pas conclure sur le fait que ces cellules présentent des propriétés d'efflux très différentes de celles de l'intestin (Hilgendorf, Ahlin et al. 2007).

La faible cytotoxicité des MCs sur les Caco-2 peut également provenir de l'absence de protéine P53 fonctionnelle (Djelloul et al 1997). En effet, de récents travaux mettent en lumière l'importance de cette protéine dans le mécanisme de toxicité des MCs (Fu, Chen et al. 2005; Clark, Ryan et al. 2008; Fu, Yu et al. 2009; Takumi, Komatsu et al.

2010). De plus, les travaux de Takumi et Komatsu ont montré qu'une atténuation de l'expression de la P53 induit une baisse de la sensibilité des cellules à la MC-LR (Takumi et al 2010). Il est bien décrit que les MCs induisent l'entrée en apoptose des cellules (Campos & Vasconcelos 2010; Ding & Ong 2003) et que la P53 est une protéine clé dans ce phénomène (**cf. Figure 10**). De même, comme de nombreuses cellules issues d'adénocarcinome de colon, les cellules Caco-2 présentent un niveau basal de Bcl-x<sub>i</sub> (anti-apoptotique) très élevé et un niveau de Bax (pro-apoptotique) très faible (Ray et al 2011). Or la valeur du ratio Bcl-x<sub>i</sub> / Bax est un autre élément clé de l'entrée en apoptose des cellules. Ainsi, ces autres caractéristiques des Caco-2 peuvent entraîner une limitation d'entrée en apoptose et donc expliquer leur faible sensibilité.

#### **4. L'absorption des variants est organe spécifique**

Notre étude d'absorption par des cellules intestinales de la MC-LR et de la MC-RR par immunomarquage (**cf. chapitre I**) ne décèle pas de différence entre les deux variants quelles que soient la dose et la durée de l'exposition. Par contre Fischer *et al* montrent que, dans les cellules hépatiques, la différence de toxicité entre les deux variants est principalement due à une différence d'absorption, les OATP 1B1 et 1B3 (principalement exprimés au niveau hépatique) présentant probablement une meilleure affinité pour la MC-LR que pour la MC-RR (Fischer et al 2010). Il semblerait donc que les cellules intestinales n'aient pas le même comportement que les hépatocytes vis-à-vis de l'absorption des variants de MCs.

L'interprétation de nos résultats suggère que les protéines responsables de l'influx intracellulaire des MCs au niveau intestinal (potentiellement les OATP 3A1 et 4A1) transportent de manière identique la MC-LR et la MC-RR. Or, l'influx d'un variant de microcystine dépend à la fois de l'abondance des isoformes de transporteurs membranaires leur permettant de pénétrer les cellules et de l'affinité de ce (ou ces) transporteur(s) pour ce variant. Ainsi, la différence de toxicité de la MC-LR et de la MC-RR peut s'expliquer par un effet particulier sur le foie, les isoformes exprimées dans les hépatocytes (OATP 1B1 et 1B3) présentant une meilleure affinité pour la MC-LR que pour la MC-RR (Fischer et al 2010). D'après les données bibliographiques, les Caco-2 n'expriment pas les OAPT 1B1 et 1B3 (Hayeshi et al 2008; Hilgendorf et al 2007; Seithel et al 2006) et, d'après nos résultats, il ne semble pas y avoir de différence d'influx entre la MC-LR et la MC-RR via les transporteurs mis en jeu dans l'absorption par les Caco-2. Il apparaît donc difficile d'extrapoler le comportement des différents variants observé sur le foie à l'ensemble des organes (intestins, poumon, rein, cerveau...) chaque organe

pouvant présenter un niveau d'absorption spécifique pour chaque variant. Ainsi, il a été montré que la MC-RR pouvait avoir plus d'effets (intensité des lésions, activité des catalases et des phosphatases acides ou peroxydation lipidique) que la MC-LR sur le rein ou sur les branchies de poisson *Tilapia* (Prieto, Jos et al. 2006; Atencio, Moreno et al. 2008). Compte tenu de ces résultats, la toxicité des différents variants de MCs doit aussi être caractérisée sur les organes cibles potentiels autres que le foie.

## **5. La différence de toxicité entre MC-LR et MC-RR : une différence de mécanisme ?**

Dans notre étude de cytotoxicité, nos conditions ne permettent pas d'identifier de différence de toxicité entre la MC-LR et la MC-RR. En effet, ces molécules n'induisent pas de cytotoxicité pour les Caco-2 non différenciées ou différenciées jusqu'à 50  $\mu\text{M}$  (**cf. chapitre I paragraphe 2**). Cependant, les études de Puerto et al. (Puerto, Pichardo et al. 2009; Puerto, Pichardo et al. 2010), qui utilisent une gamme de concentrations plus large (jusqu'à 200  $\mu\text{M}$ ), indiquent une moindre toxicité de la MC-RR ( $\text{CI}_{50} > 200 \mu\text{M}$ ) par rapport à la MC-LR ( $\text{CI}_{50} \sim 100 \mu\text{M}$ ) aussi bien sur les Caco-2 non différenciées que différenciées. Notre étude transcriptomique, en dehors de la condition 4h-100 $\mu\text{M}$ , indique également que la MC-RR a un effet moindre par rapport à la MC-LR aussi bien dans le nombre de gène touchés que dans l'intensité de la modulation (**cf. chapitre II**). Cependant, comme nous l'avons indiqué précédemment ces différences ne proviennent probablement pas d'une différence d'absorption entre les deux variants. Ainsi, une différence de potentiel inhibiteur des PPs (**cf. introduction paragraphe 1.2.5.1**) peut être suggérée. En effet, dans la majorité des études, la MC-RR est un inhibiteur moins puissant des PPs que la MC-LR (**cf. Tableau 5**). Cependant, non seulement les résultats de ces tests présentent une grande variabilité mais en plus la différence d'inhibition entre les 2 variants reste non significative, ces données nous laisse donc supposer qu'il peut exister des différences de mécanisme de toxicité entre la MC-LR et la MC-RR..

Afin de tester l'hypothèse de mécanismes d'action variant spécifique, nous avons utilisé une stratégie non sélective : l'étude transcriptomique. Les résultats de cette étude montrent clairement une différence de toxicité entre ces deux variants qui peut s'expliquer soit :

- par un mécanisme commun aux deux molécules activé plus efficacement par la MC-LR que par la MC-RR
- par un mécanisme différent.

L'étude transcriptomique révèle des différences d'effet de la MC-LR et de la MC-RR sur la génération de stress oxydant, voie de toxicité des MCs bien connue, mais aussi sur d'autres voies moins bien identifiées comme cibles potentielles telles que le stress du réticulum endoplasmique et le système d'ubiquitination/protéasome (**cf. chapitre II**). Nos résultats indiquent clairement une capacité de la MC-LR à perturber ces voies au contraire de la MC-RR (**cf. chapitre II**). Cependant, un nombre restreint de gènes appartenant à ces systèmes sont aussi perturbés par un traitement avec la MC-RR (**cf. chapitre II**). Ainsi, il est possible que la faible perturbation ne soit pas liée à une absence d'effet, mais à un effet trop faible de la MC-RR sur les Caco-2 aux doses testées. En effet, des études indiquent que la MC-RR peut induire du stress oxydant dans différents organismes (Prieto, Jos et al. 2006; Huang, Xing et al. 2008; Li, Xie et al. 2009). De même, ce variant peut modifier le niveau d'expression de certains gènes associés au système d'ubiquitination/protéasome chez les daphnies (Schwarzenberger et al 2009) (**cf. chapitre II paragraphe 6**).

Par ailleurs, le stress oxydant peut engendrer un stress du réticulum endoplasmique (Giorgi et al 2009) et les différences d'effets observées entre la MC-LR et la MC-RR pourraient être la conséquence de ce stress oxydant. L'absence de perturbation des voies SRE et ubiquitination/protéasome serait alors le résultat d'une faible production de stress oxydant par la MC-RR. Le faible niveau de stress oxydant induit par la MC-RR peut être le résultat :

- d'un effet moins marqué sur les différents mécanismes de production d'ERO décrits pour la MC-LR
- d'un nombre de voies de production d'ERO activées par la MC-LR supérieur à celui de la MC-RR.





## **Conclusion**



Nos travaux de transcriptomique mettent en évidence une différence de toxicité entre les variants de MCs dans les cellules intestinales humaines Caco-2. Celle-ci n'est probablement pas causée par une différence d'absorption. En effet, nous avons montré une localisation cellulaire et une absorption identiques pour les deux variants.

Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ces différences de toxicité. Ainsi, en dehors des mécanismes déjà bien connus comme l'inhibition des PPs ou le stress oxydant, de nouveaux mécanismes de toxicité comme le stress du réticulum endoplasmique ou la perturbation du système ubiquitination/protéasome ont été identifiés. Pour ces mécanismes, il serait important d'étudier plus largement les différences de réponse entre variants. De plus, notre travail a mis en évidence que le mécanisme de toxicité de la MC-LR ne peut pas être extrapolé à l'ensemble des variants de MCs et qu'il est donc important de caractériser plus spécifiquement la toxicité de ces différents variants pour disposer d'une meilleure caractérisation du danger associé aux microcystines.

Grâce à ces travaux, nous avons mis en évidence que le modèle cellulaire Caco-2 peut être un outil fonctionnel et pertinent dans l'étude de la toxicité de différents variants de microcystines. Nos résultats ont montré que la dynamique des microcystines diffère entre un modèle d'entérocytes et un modèle d'hépatocytes, en particulier concernant l'absorption des variants. Ainsi, des différences non seulement variant spécifique mais aussi organe spécifique ont été révélées soulignant l'importance de mettre en place des études de toxicité et de cinétique sur les différents variants ne se basant pas uniquement sur le foie. Ces études permettront de déterminer les caractéristiques spécifiques de la toxicité des différents variants de microcystines sur chaque organe.

Enfin, l'ensemble de ces travaux accentue l'importance des études comparatives sur les variants de microcystines dans l'évaluation du risque associé à ces toxines. Une meilleure connaissance des effets spécifiques des différents variants de MCs (90 connus à ce jour) en comparaison avec la MC-LR pourrait permettre d'affiner à terme les facteurs d'équivalence de toxicité (TEF) actuellement utilisés. Ainsi, une bonne connaissance de la toxicité spécifique des différents variants de MCs permettrait de mieux comprendre et caractériser le danger associé aux mélanges de MCs tels qu'ils sont rencontrés dans les conditions réelles d'exposition.



# Perspectives



Ces travaux de thèse ont soulevé plusieurs questions d'intérêt. Ainsi, de nombreux points nécessiteraient d'être étudiés comme le rôle des OATP 3A1 et 4A1 dans l'absorption des MCs, la source de la faible sensibilité des Caco-2 à la toxicité des MCs et les différences de toxicité observées entre la MC-LR et la MC-RR.

## **1. Étude des transporteurs mis en jeu lors de l'absorption de la MC-LR et de la MC-RR dans les Caco-2**

Une étude préliminaire que nous avons menée sur la lignée HEK 293 indique que ces cellules n'expriment pas ou peu les OATP (Ahlin et al 2009; Fischer et al 2010) sont capables d'absorber les MCs. Cette absorption des MCs par les HEK 293 a été récemment confirmée par une étude chinoise (Li T 2011). Elle peut être due à un phénomène de pinocytose ou à la mise en jeu d'autres transporteurs comme cela a été déjà suggéré (Eriksson et al 1990a; Fischer et al 2010). Il est donc nécessaire de confirmer que les OATPs sont bien impliqués dans l'absorption des MCs par les Caco-2. Pour cela, en utilisant les outils d'immunomarquage et d'imagerie développés pendant la thèse, des études de compétition (par exemple avec des sels biliaires comme le taurocholate) peuvent être envisagées pour compléter les résultats préliminaires que nous avons obtenus (**cf. chapitre I**). Dans ce cas, l'incubation des MCs avec le TC ne devra pas être prolongée au-delà de 1H30. De plus, afin de pouvoir nettement observer les variations de marquage des MCs à l'intérieur des cellules, il pourra être nécessaire d'augmenter les concentrations de MCs ce qui ne devrait pas être un problème compte tenu de la faible sensibilité des Caco-2 aux MCs (**cf. chapitre I**). Une étude quantitative de compétition a également été mise en œuvre au laboratoire sur le système Caco-2 différenciées. Les résultats sont en cours d'analyse.

Ensuite, il serait intéressant d'identifier la ou les isoformes de transporteurs mises-en-jeu. Ainsi, la capacité des OATP 3A1 et 4A1 à transporter les MCs pourrait être plus spécialement investiguée compte tenu de leur présence à la membrane cellulaire des Caco-2 (**cf. chapitre I**). Pour cela, la méthodologie décrite par Fischer et al. en 2005 utilisant des œufs de xénopes transfectés avec les OATPs d'intérêt pourrait être appliquée (Fischer et al 2005). L'exposition des œufs de xénopes transfectés à une gamme de concentration croissante de MC-LR et/ou de MC-RR permettrait alors de mesurer les constantes de la cinétique d'absorption de ces MCs par le transporteur testé ( $K_m$  et  $V_{max}$ ) (Fischer et al 2005).

Une autre approche consisterait à utiliser les outils d'immunomarquage mis en place pendant la thèse sur des cellules HEK 293 transfectées (Baldes et al 2006; Cui et al 1999) avec ces transporteurs et d'étudier l'intensité du marquage MCs par rapport à des

cellules HEK contrôles transfectées avec le vecteur vide. Les résultats d'une telle étude nous renseigneraient non seulement sur la capacité de ces protéines à transporter les MCs mais aussi sur leur affinité vis-à-vis des différents variants.

Avant de poursuivre l'exploration des mécanismes de d'absorption comparés de la MC-LR et de la MC-RR, il serait nécessaire de mettre au point l'immunomarquage des microcystines sur les Caco-2 différenciées comme plusieurs publications le rapportent déjà pour d'autres types de marquage (Acquaviva et al 2005; Schlegel et al 2010). Nous pourrions ainsi comparer les cinétiques et les dynamiques de localisation entre les deux variants dans les cellules polarisées (progression du pôle apical au pôle basal, vitesse de la progression,...). L'aspect cinétique peut aussi être étudié grâce à une approche cinétique « classique » sur monocouche de Caco-2 (**cf. annexe 1**).

Des analyses en cytométrie en flux ou à l'aide d'un système de High Cell Screening permettrait également d'affiner les données quantitatives que nous avons obtenu par une approche quantitative sur un plus grand nombre de cellules.

## **2. Étude des causes de la faible sensibilité des Caco-2 à la toxicité des MCs**

Comparé à d'autres types cellulaires, en particulier les hépatocytes, la lignée Caco-2 apparaît peu sensible aux MCs. Plusieurs explications peuvent être envisagées pour expliquer cette faible sensibilité :

- Un faible contenu cellulaire en toxine causé par une faible absorption des MCs ou un fort efflux de celles-ci hors des cellules.
- l'absence de protéine P53 fonctionnelle et/ou le ratio Bcl-x<sub>l</sub> / Bax dans les Caco-2 qui pourrait limiter leur sensibilité aux MCs via une baisse de leur capacité apoptotique.

Afin de tester l'hypothèse selon laquelle c'est un faible contenu cellulaire en MCs qui serait la cause de la faible sensibilité des Caco-2 aux MCs, nous pourrions tout d'abord mener à bien un immunomarquage sur des hépatocytes en culture primaire ou sur les HEK 293 exprimant de manière stable les OATP 1B1 ou 1B3 (Fischer et al 2010; Komatsu et al 2007; Takumi et al 2010). Un marquage significativement plus intense de ces cellules par rapport aux Caco-2 serait un indice suggérant que le faible contenu cellulaire en MCs pourrait être la cause de la faible sensibilité des cellules. Pour tester

cette hypothèse, il serait aussi possible de doser les microcystines intracellulaires dans les Caco-2 indirectement par un dosage d'inhibition des PPs intracellulaires comme cela est décrit dans la publication de Fischer (Fischer et al 2010). Il faudrait ensuite évaluer si ce faible contenu cellulaire a pour cause un faible influx et/ou un fort efflux cellulaire.

Afin de rechercher si l'absorption est le facteur limitant la sensibilité des Caco-2 aux MCs, la transfection des Caco-2 avec l'OATP 1B1 et/ou l'OATP 1B3 (Lee et al 2008) pourrait être réalisée afin de comparer la viabilité des Caco-2 transfectées au phénotype sauvage. Si la cytotoxicité des MCs s'avère significativement plus forte pour les Caco-2 exprimant les OATP 1B1 ou 1B3 que pour les Caco-2 sauvages (ou transfectées avec le vecteur vide), nous pourrions alors poser l'hypothèse que l'intensité de l'influx par les transporteurs exprimés chez les Caco-2 est un facteur limitant de la sensibilité de ces cellules aux microcystines.

Pour évaluer l'importance du phénomène d'efflux vis-à-vis des microcystines dans les cellules Caco-2, il est possible de réaliser des co-incubations avec des inhibiteurs comme le vérapamil pour la P-gp. Si cette pompe d'efflux joue bien un rôle dans la faible sensibilité de la lignée Caco-2, une co-incubation des cellules avec les microcystines et le vérapamil devrait soit sensibiliser les cellules à la toxicité des microcystines soit augmenter la quantité de MCs présente dans les cellules. A l'aide de notre technique d'immunomarquage, nous pourrions détecter l'augmentation du marquage intracellulaire provoquée par la baisse de l'efflux des MCs par rapport aux cellules non traitées. Le rôle d'autres transporteurs d'efflux, comme par exemple les MRPs qui pourraient prendre en charge les conjugués au glutathion, devra aussi être envisagé.

Les Caco-2 sont des cellules p53 négatives avec une p53 non fonctionnelle en raison d'une mutation induisant un codon stop (Djelloul et al., 1997; Liu and Bodmer, 2006; Lee et al., 2008). Or certains auteurs suggèrent que cette protéine serait un acteur clé de la toxicité des MCs via leur rôle dans le phénomène d'apoptose (Clark et al 2008; Takumi et al 2010). Pour vérifier si l'absence de p53 fonctionnelle joue un rôle dans la faible sensibilité des Caco-2 aux MCs, l'expression de la protéine p53 sauvage dans les cellules Caco-2 peut être envisagée par transfection. Ces cellules mutantes devraient s'avérer plus sensibles à la toxicité des MCs que le phénotype sauvage si la P53 contribue à la faible sensibilité des Caco-2. Cependant, il est possible que des Caco-2 exprimant la p53 soit intrinsèquement peu viable. Dans ce cas, il est possible que seules les cellules n'ayant pas intégré le vecteur porteur du gène de la P53 fonctionnelle soient vivantes avant l'exposition aux MCs, ce qui biaiserait le résultat. Il serait donc dans tous les cas nécessaire d'utiliser un marqueur de transfection (gène rapporteur, tag fluorescent) afin

de vérifier le niveau d'expression de la p53 par les Caco-2 vivantes dans chaque puit avant exposition aux toxines (Lee et al 2008).

Les résultats obtenus sur cette étude permettraient de confirmer ou d'infirmer l'importance de la p53 dans le mécanisme d'apoptose associé aux MCs.

L'ensemble de ces résultats permettra de déterminer certains paramètres ADME (influx et efflux) des microcystines au niveau intestinal, apportant un autre éclairage pour l'évaluation du risque lors de leur ingestion.

### **3. Étude des différences de mécanismes de toxicité entre la MC-LR et la MC-RR**

Les études de transcriptomique nous ont permis de déceler des différences entre les effets toxiques de la MC-RR et de la MC-LR malgré des fortes concentrations en solvant. Il est très probable que dans cette étude une partie des modifications induites par les microcystines soient masquées par l'effet du solvant. Dans ce contexte, une étude avec des concentrations en MC-LR et en MC-RR plus faible permettrait de limiter l'effet du solvant et donc d'affiner la sensibilité de notre détection en particulier aux temps plus court d'exposition. Nous pourrions alors étudier les mécanismes précoces de la toxicité des MCs et identifier les premiers effets divergents entre la MC-LR et la MC-RR.

Il serait aussi intéressant d'étudier *in silico* le potentiel de docking de la MC-LR sur l'ALDH7A1 comme cela a été fait pour l'ALDH2 (Chen et al 2006a). Il est cependant pour le moment impossible de mener une telle étude avec la MC-RR car sa structure tridimensionnelle n'est pas référencée dans la base de données « protein data bank » (PDB, <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>). La formation des liaisons avec l'ALDH2 et l'ALDH7A1 pourrait également être recherchée par une approche d'immuno-précipitation et d'identification par western blot à l'aide d'anticorps anti-MC (Feurstein et al 2009; Mikhailov et al 2003).

Compte tenu des différences d'effets observés entre la MC-LR et la MC-RR au niveau transcriptomique aussi bien sur la réponse au stress oxydant, que sur le système ubiquitination/protéasome et le SRE, il serait intéressant de valider par PCRq ces résultats. S'ils se confirment, il serait alors particulièrement intéressant d'explorer l'effet d'autres variants de MCs plus hydrophobes (MC-LF, MC-LW,...) sur le niveau d'expression de gènes biomarqueurs de ces voies canoniques. De même, des études préalables de cinétique d'absorption sur le modèle Caco-2 avec ce type de variants devraient être envisagées.

Ces études comparatives permettraient une meilleure compréhension et une meilleure caractérisation du danger associé non plus à la MC-LR seule mais aux différents variants présents lors des expositions par ingestion.



# **Bibliographie**





- Acosta-Alvear D, Zhou Y, Blais A, Tsikitis M, Lents NH, et al.** 2007. XBP1 Controls Diverse Cell Type- and Condition-Specific Transcriptional Regulatory Networks. *Molecular Cell* 27:53-66
- Acquaviva F, De Biase I, Nezi L, Ruggiero G, Tatangelo F, et al.** 2005. Extra-mitochondrial localisation of frataxin and its association with IscU1 during enterocyte-like differentiation of the human colon adenocarcinoma cell line Caco-2. *Journal of Cell Science* 118:3917-24
- Ahlin G, Hilgendorf C, Karlsson J, Szigyarto CA, Uhlen M, Artursson P.** 2009. Endogenous gene and protein expression of drug-transporting proteins in cell lines routinely used in drug discovery programs. *Drug Metab Dispos* 37:2275-83
- Allen JD, Brinkhuis RF, Van Deemter L, Wijnholds J, Schinkel AH.** 2000. Extensive contribution of the multidrug transporters P-glycoprotein and Mrp1 to basal drug resistance. *Cancer Research* 60:5761-6
- Alverca E, Andrade M, Dias E, Sam Bento F, Bator u MCC, et al.** 2009. Morphological and ultrastructural effects of microcystin-LR from *Microcystis aeruginosa* extract on a kidney cell line. *Toxicol* 54:283-94
- Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE, Gottesman MM.** 2003. P-glycoprotein: From genomics to mechanism. In *Oncogene*, pp. 7468-85
- Am  MV, Baroni MV, Galanti LN, Bocco JL, Wunderlin DA.** 2009. Effects of microcystin-LR on the expression of P-glycoprotein in *Jenynsia multidentata*. *Chemosphere* 74:1179-86
- Artursson P, Palm K, Luthman K.** 2001. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev* 46:27-43
- Atencio L, Moreno I, Jos A, Pichardo S, Moyano R, et al.** 2008a. Dose-dependent antioxidant responses and pathological changes in tenca (*Tinca tinca*) after acute oral exposure to *Microcystis* under laboratory conditions. *Toxicol* 52:1-12
- Atencio L, Moreno I, Prieto AI, Moyano R, Molina AM, Came in AM.** 2008b. Acute effects of microcystins MC-LR and MC-RR on acid and alkaline phosphatase activities and pathological changes in intraperitoneally exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.). *Toxicologic Pathology* 36:449-58
- Bailey CA, Bryla P, Malick AW.** 1996. The use of the intestinal epithelial cell culture model, Caco-2, in pharmaceutical development. *Advanced Drug Delivery Reviews* 22:85-103
- Baldes C, Koenig P, Neumann D, Lenhof HP, Kohlbacher O, Lehr CM.** 2006. Development of a fluorescence-based assay for screening of modulators of human Organic Anion Transporter 1B3 (OATP1B3). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 62:39-43
- Ballatori N, Krance SM, Marchan R, Hammond CL.** 2009. Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology. *Molecular Aspects of Medicine* 30:13-28
- Batista T, de Sousa G, Suput JS, Rahmani R, Suput D.** 2003. Microcystin-LR causes the collapse of actin filaments in primary human hepatocytes. *Aquat Toxicol* 65:85-91
- Bazin e.** 2009. *Evaluation des effets g notoxiques et canc rog nes de la cylindrospermopsine, une cyanotoxine d'eau douce*. Rennes I, Rennes
- B aslas O, Torreilles F, Casellas P, Simon D, Fabre G, et al.** 2008. Transcriptome response of enterocytes to dietary lipids: Impact on cell architecture, signaling, and metabolism genes. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 295:G942-G52
- Beattie KA, Ressler J, Wiegand C, Krause E, Codd GA, et al.** 2003. Comparative effects and metabolism of two microcystins and nodularin in the brine shrimp *Artemia salina*. *Aquatic Toxicology* 62:219-26
- Beedholm-Ebsen R, van de Wetering K, Hardlei T, Nex , E, Borst P, Moestrup SrK.** 2010. Identification of multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) as a molecular gate for cellular export of cobalamin. *Blood* 115:1632-9
- Blaha L, Kopp R,  imkov i K, Mare i J.** 2004. Oxidative stress biomarkers are modulated in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) exposed to microcystin-producing cyanobacterial water bloom. *Acta Veterinaria Brno* 73:477-82
- Blaser DW.** 2007. *Determination of drug absorption parameters in Caco-2 cell monolayers with a mathematical model encompassing passive diffusion, carrier-mediated efflux, non-specific binding and phase II metabolism*. University of Basel, Basel

- Borst P, Schinkel AH.** 1996. What have we learnt thus far from mice with disrupted P-glycoprotein genes? *European Journal of Cancer* 32:985-90
- Botha N, Gehringer MM, Downing TG, van de Venter M, Shephard EG.** 2004a. The role of microcystin-LR in the induction of apoptosis and oxidative stress in CaCo2 cells. *Toxicol* 43:85-92
- Botha N, Venter Mv M, Downing TG, Shephard EG, Gehringer MM.** 2004b. The effect of intraperitoneally administered microcystin-LR on the gastrointestinal tract of Balb/c mice. *Toxicol* 43:251-4
- Bouaicha N, Maatouk I.** 2004. Microcystin-LR and nodularin induce intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production and lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes. *Toxicol Lett* 148:53-63
- Bourne DG, Jones GJ, Blakeley RL, Jones A, Negri AP, Riddles P.** 1996. Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR. *Applied and Environmental Microbiology* 62:4086-94
- Bourne DG, Riddles P, Jones GJ, Smith W, Blakeley RL.** 2001. Characterisation of a gene cluster involved in bacterial degradation of the cyanobacterial toxin microcystin LR. *Environmental Toxicology* 16:523-34
- Briand JF, Jacquet S, Bernard C, Humbert JF.** 2003. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Vet Res* 34:361-77
- Brooks WP, Codd GA.** 1987. Distribution of Microcystic aeruginosa peptide toxin and interactions with hepatic microsomes in mice. *Pharmacology and Toxicology* 60:187-91
- Bruno M, Fiori M, Mattei D, Melchiorre S, Messineo V, et al.** 2006. ELISA and LC-MS/MS methods for determining cyanobacterial toxins in blue-green algae food supplements. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters* 20:827 - 34
- Buratti FM, Scardala S, Funari E, Testai E.** 2011. Human Glutathione Transferases Catalyzing the Conjugation of the Hepatotoxin Microcystin-LR. *Chemical Research in Toxicology*:null-null
- Bury NR, Newlands AD, Eddy FB, Codd GA.** 1998. In vivo and in vitro intestinal transport of 3H-microcystin-LR, a cyanobacterial toxin, in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 42:139-48
- Campos A, Vasconcelos V.** 2010. Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. *International Journal of Molecular Sciences* 11:268-87
- Carmichael WW.** 1992. Cyanobacteria secondary metabolites--the cyanotoxins. *J Appl Bacteriol* 72:445-59
- Carmichael WW.** 1996. Liver failure and human deaths at a haemodialysis centre in Brazil: Microcystins as a major contributing factor. *Harmful Algae News* 15:11-
- Carmichael WW, Azevedo SMFO, An JS, Molica RJR, Jochimsen EM, et al.** 2001. Human fatalities from cyanobacteria: Chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives* 109:663-8
- Carmichael WW, He JW, Eschedor J, He ZR, Juan YM.** 1988. Partial structural determination of hepatotoxic peptides from *Microcystis aeruginosa* (cyanobacterium) collected in ponds of central China. *Toxicol* 26:1213-7
- Carriere V, Chambaz J, Rousset M.** 2001. Intestinal responses to xenobiotics. *Toxicology in Vitro* 15:373-8
- Cascorbi I.** 2006. Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacology and Therapeutics* 112:457-73
- Cazenave J, Wunderlin DA, Bistoni MDLA, AmÃ©© MV, Krause E, et al.** 2005. Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis*: A field and laboratory study. *Aquatic Toxicology* 75:178-90
- Chantret I, Barbat A, Dussaulx E, Brattain MG, Zweibaum A.** 1988. Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: A survey of twenty cell lines. *Cancer Research* 48:1936-42
- Chen J, Dai J, Zhang H, Wang C, Zhou G, et al.** 2010. Bioaccumulation of microcystin and its oxidative stress in the apple (*Malus pumila*). *Ecotoxicology* 19:796-803
- Chen J, Xie P, Li L, Xu J.** 2009a. First identification of the hepatotoxic microcystins in the serum of a chronically exposed human population together with indication of hepatocellular damage. *Toxicological Sciences* 108:81-9

- Chen J, Zhang D, Xie P, Wang Q, Ma Z.** 2009b. Simultaneous determination of microcystin contaminations in various vertebrates (fish, turtle, duck and water bird) from a large eutrophic Chinese lake, Lake Taihu, with toxic *Microcystis* blooms. *Science of the Total Environment* 407:3317-22
- Chen T, Cui J, Liang Y, Xin X, Owen Young D, et al.** 2006a. Identification of human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase as a potential target for microcystin-LR. *Toxicology* 220:71-80
- Chen X, Yin XM.** 2011. Coordination of autophagy and the proteasome in resolving endoplasmic reticulum stress. *Veterinary Pathology* 48:245-53
- Chen Y, Xu J, Li Y, Han X.** 2011. Decline of sperm quality and testicular function in male mice during chronic low-dose exposure to microcystin-LR. *Reproductive Toxicology*
- Chen YM, Lee TH, Lee SJ, Huang HB, Huang R, Chou HN.** 2006b. Comparison of protein phosphatase inhibition activities and mouse toxicities of microcystins. *Toxicol* 47:742-6
- Chicault C, Toutain B, Monnier A, Aubry M, Fergelot P, et al.** 2006. Iron-related transcriptomic variations in CaCo-2 cells, an in vitro model of intestinal absorptive cells. *Physiol. Genomics* 26:55-67
- Chong MWK, Gu KD, Lam PKS, Yang M, Fong WF.** 2000. Study on the cytotoxicity of microcystin-LR on cultured cells. *Chemosphere* 41:143-7
- Chorus I.** 2001. *CYANOTOXINS : Occurrence, Causes, Consequences*: Springer
- Chorus I, Bartram J.** 1999. *Toxic cyanobacteria in water : a guide to their public health consequences, monitoring and management*: WHO
- Clark SP, Ryan TP, Searfoss GH, Davis MA, Hooser SB.** 2008. Chronic microcystin exposure induces hepatocyte proliferation with increased expression of mitotic and cyclin-associated genes in p53-deficient mice. *Toxicologic pathology* 36:190-203
- Codd GA.** 1995. Cyanobacterial toxins: Occurrence, properties and biological significance. In *Water Science and Technology*, pp. 149-56
- Codd GA, Metcalf JS, Beattie KA.** 1999. Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria. *Toxicol* 37:1181-5
- Cohen P.** 2001. The role of protein phosphorylation in human health and disease: Delivered on June 30th 2001 at the FEBS meeting in Lisbon. *European Journal of Biochemistry* 268:5001-10
- Contardo-Jara V, Pflugmacher S, Wiegand C.** 2008. Multi-xenobiotic-resistance a possible explanation for the insensitivity of bivalves towards cyanobacterial toxins. In *Toxicol*, pp. 936-43
- Craig M, Luu HA, McCreedy TL, Williams D, Andersen RJ, Holmes CFB.** 1996. Molecular mechanisms underlying the interaction of motuporin and microcystins with type-1 and type-2A protein phosphatases. *Biochemistry and Cell Biology* 74:569-78
- Credle JJ, Finer-Moore JS, Papa FR, Stroud RM, Walter P.** 2005. On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:18773-84
- Cui Y, König J, Buchholz U, Spring H, Leier I, Keppler D.** 1999. Drug Resistance and ATP-Dependent Conjugate Transport Mediated by the Apical Multidrug Resistance Protein, MRP2, Permanently Expressed in Human and Canine Cells. *Molecular Pharmacology* 55:929-37
- Dahlem AM, Hassan AS, Swanson SP, Carmichael WW, Beasley VR.** 1989. A model system for studying the bioavailability of intestinally administered microcystin-LR, a hepatotoxic peptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Pharmacology and Toxicology* 64:177-81
- Dai M, Xie P, Liang G, Chen J, Lei H.** 2008. Simultaneous determination of microcystin-LR and its glutathione conjugate in fish tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 862:43-50
- de Figueiredo DR, Azeiteiro UM, Esteves SM, Gonçalves FJM, Pereira MJ.** 2004. Microcystin-producing blooms--a serious global public health issue. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59:151-63
- De Maagd PGJ, Hendriks AJ, Seinen W, Sijm DTHM.** 1999. pH-dependent hydrophobicity of the cyanobacteria toxin microcystin-LR. *Water Research* 33:677-80

- de Souza Votto AP, Renon VP, Yunes JS, Rumjanek VM, Marques Capella MA, et al.** 2007. Sensitivity to microcystins: A comparative study in human cell lines with and without multidrug resistance phenotype. *Cell Biology International* 31:1359-66
- Dias E, Matos P, Pereira P, Batorá MCC, Silva MJ, Jordan P.** 2010. Microcystin-LR activates the ERK1/2 kinases and stimulates the proliferation of the monkey kidney-derived cell line Vero-E6. *Toxicology in Vitro* 24:1689-95
- Dietrich CG, Geier A, Oude Elferink RPJ.** 2003. ABC of oral bioavailability: Transporters as gatekeepers in the gut. *Gut* 52:1788-95
- Ding WX, Ong CN.** 2003. Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity. *FEMS Microbiol Lett* 10880:1-7
- Ding WX, Shen HM, Ong CN.** 2000a. Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition in microcystin-induced rapid apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology* 32:547-55
- Ding WX, Shen HM, Ong CN.** 2000b. Microcystic cyanobacteria extract induces cytoskeletal disruption and intracellular glutathione alteration in hepatocytes. *Environ Health Perspect* 108:605-9
- Ding WX, Shen HM, Ong CN.** 2001a. Critical role of reactive oxygen species formation in microcystin-induced cytoskeleton disruption in primary cultured hepatocytes. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A* 64:507-19
- Ding WX, Shen HM, Ong CN.** 2001b. Pivotal role of mitochondrial Ca(2+) in microcystin-induced mitochondrial permeability transition in rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 285:1155-61
- Ding WX, Shen HM, Ong CN.** 2002. Calpain activation after mitochondrial permeability transition in microcystin-induced cell death in rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 291:321-31
- Ding WX, Shen HM, Shen Y, Zhu HG, Ong CN.** 1998. Microcystic cyanobacteria causes mitochondrial membrane potential alteration and reactive oxygen species formation in primary cultured rat hepatocytes. *Environmental Health Perspectives* 106:409-13
- Ding XS, Li XY, Duan HY, Chung IK, Lee JA.** 2006. Toxic effects of Microcystis cell extracts on the reproductive system of male mice. *Toxicol* 48:973-9
- Dittmann E, Börner T.** 2005. Genetic contributions to the risk assessment of microcystin in the environment. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203:192-200
- Djediat C, Malecot M, de Luze A, Bernard C, Puiseux-Dao S, Ebery M.** 2010. Localization of microcystin-LR in medaka fish tissues after cyanotoxin gavage. *Toxicol* 55:531-5
- Djelloul S, Forgue-Lafitte M-E, Hermelin B, Mareel M, Bruyneel E, et al.** 1997. Enterocyte differentiation is compatible with SV40 large T expression and loss of p53 function in human colonic Caco-2 cells: Status of the pRb1 and pRb2 tumor suppressor gene products. *FEBS Letters* 406:234-42
- Dombradi V, Krieglstein J, Klumpp S.** 2002. Regulating the regulators. Conference on protein phosphorylation and protein phosphatases. *EMBO reports* 3:120-4
- Englund G, Rorsman F, Rånblom A, Karlbom U, Lazorova L, et al.** 2006. Regional levels of drug transporters along the human intestinal tract: Co-expression of ABC and SLC transporters and comparison with Caco-2 cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 29:269-77
- Engman HA, Lennerns H, Taipalensuu J, Otter C, Leidvik B, Artursson P.** 2001. CYP3A4, CYP3A5, and MDR1 in human small and large intestinal cell lines suitable for drug transport studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 90:1736-51
- Eriksson JE, Gronberg L, Nygard S, Slotte JP, Meriluoto JAO.** 1990a. Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1025:60-6
- Eriksson JE, Paatero GIL, Meriluoto JAO, Codd GA, Kass GEN, et al.** 1989. Rapid microfilament reorganization induced in isolated rat hepatocytes by microcystin-LR, a cyclic peptide toxin. *Experimental Cell Research* 185:86-100
- Eriksson JE, Toivola D, Meriluoto JA, Karaki H, Han YG, Hartshorne D.** 1990b. Hepatocyte deformation induced by cyanobacterial toxins reflects inhibition of protein phosphatases. *Biochem Biophys Res Commun* 173:1347-53
- Falconer IR, Beresford AM, Runnegar MT.** 1983. Evidence of liver damage by toxin from a bloom of the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. *Med J Aust* 1:511-4

- Falconer IR, Buckley TH.** 1989. Tumour promotion by *Microcystis* sp., a blue-green alga occurring in water supplies. *Med J Aust* 150:351
- Falconer IR, Burch MD, Steffensen DA, Choice M, Coverdale OR.** 1994. Toxicity of the blue-green alga (Cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment. *Environmental Toxicology and Water Quality* 9:131-9
- Falconer IR, Dornbusch M, Moran G, Yeung SK.** 1992. Effect of the cyanobacterial (blue-green algal) toxins from *Microcystis aeruginosa* on isolated enterocytes from the chicken small intestine. *Toxicon* 30:790-3
- Falconer IR, Smith JV, Jackson ARB, Jones A, Runnegar MTC.** 1988. Oral toxicity of a bloom of the cyanobacterium *microcystis aeruginosa* administered to mice over periods up to 1 year. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 24:291-305
- Falconer IR, Yeung DSK.** 1992. Cytoskeletal changes in hepatocytes induced by *Microcystis* toxins and their relation to hyperphosphorylation of cell proteins. *Chemico-Biological Interactions* 81:181-96
- Fawell JK, Mitchell RE, Everett DJ, Hill RE.** 1999. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I microcystin-LR. *Hum Exp Toxicol* 18:162-7
- Feng G, Abdalla M, Li Y, Bai Y.** 2011. NF- $\kappa$ B mediates the induction of Fas receptor and Fas ligand by microcystin-LR in HepG2 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*:1-11
- Feurstein D, Holst K, Fischer A, Dietrich DR.** 2009. Oatp-associated uptake and toxicity of microcystins in primary murine whole brain cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 234:247-55
- Feurstein D, Kleinteich J, Heussner AH, Stemmer K, Dietrich DR.** 2010. Investigation of microcystin congener-dependent uptake into primary murine neurons. *Environmental Health Perspectives* 118:1370-5
- Fischer A, Hoeger SJ, Stemmer K, Feurstein DJ, Knobeloch D, et al.** 2010. The role of organic anion transporting polypeptides (OATPs/SLCOs) in the toxicity of different microcystin congeners in vitro: A comparison of primary human hepatocytes and OATP-transfected HEK293 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 245:9-20
- Fischer WJ, Altheimer S, Cattori V, Meier PJ, Dietrich DR, Hagenbuch B.** 2005. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicol Appl Pharmacol* 203:257-63
- Fitzgeorge RB, Clatk SA, Keevil CW.** 1994. *Routes of intoxication. In Detection methods for cyanobacterial toxins*:69-74
- Fladmark KE, Brustugun OT, Mellgren G, Krakstad C, Boe R, et al.** 2002. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II is required for microcystin-induced apoptosis. *J Biol Chem* 277:2804-11
- Flens MJ, Zaman GJR, Van Der Valk P, Izquierdo MA, Schroeijers AB, et al.** 1996. Tissue distribution of the multidrug resistance protein. *American Journal of Pathology* 148:1237-47
- Fogh J, Orfeo T, Tiso J, Sharkey FE.** 1979. Establishment of human colon carcinoma lines in nude mice. *Experimental Cell Biology* 47:136-44
- Fromm MF.** 2003. Importance of P-glycoprotein for drug disposition in humans. *European Journal of Clinical Investigation, Supplement* 33:6-9
- Fu J, Xie P.** 2006. The acute effects of microcystin LR on the transcription of nine glutathione S-transferase genes in common carp *Cyprinus carpio* L. *Aquatic Toxicology* 80:261-6
- Fu W, Yu Y, Xu L.** 2009. Identification of temporal differentially expressed protein responses to microcystin in human amniotic epithelial cells. *Chemical Research in Toxicology* 22:41-51
- Fujiki H, Suganuma M.** 2011. Tumor promoters - microcystin-LR, nodularin and TNF- $\alpha$  and human cancer development. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 11:4-18
- Ganong W,** ed. 2005. *Physiologie médicale*: De Boeck. 864 pp.
- Gaudin J.** 2007. Rennes 1, Rennes
- Gaudin J, Huet S, Jarry G, Fessard V.** 2008. In vivo DNA damage induced by the cyanotoxin microcystin-LR: Comparison of intra-peritoneal and oral administrations by use of the comet assay. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 652:65-71
- Gehring MM, Govender S, Shah M, Downing TG.** 2003. An investigation of the role of vitamin E in the protection of mice against microcystin toxicity. *Environ Toxicol* 18:142-8

- Gehring MM, Shephard EG, Downing TG, Wiegand C, Neilan BA.** 2004. An investigation into the detoxification of microcystin-LR by the glutathione pathway in Balb/c mice. *Int J Biochem Cell Biol* 36:931-41
- Giorgi C, De Stefani D, Bononi A, Rizzuto R, Pinton P.** 2009. Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 41:1817-27
- Glaeser H, Bailey DG, Dresser GK, Gregor JC, Schwarz UI, et al.** 2007. Intestinal drug transporter expression and the impact of grapefruit juice in humans. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 81:362-70
- Glaeser H, Drescher S, Hofmann U, Heinkele G, Somogyi AA, et al.** 2004. Impact of concentration and rate of intraluminal drug delivery on absorption and gut wall metabolism of verapamil in humans. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 76:230-8
- Grützmaker G, Wessel G, Klitzke S, Chorus I.** 2010. Microcystin elimination during sediment contact. *Environmental Science and Technology* 44:657-62
- Guichard C, Pedruzzi E, Fay M, Marie JC, Braut-Boucher F, et al.** 2006. Dihydroxyphenylethanol induces apoptosis by activating serine/threonine protein phosphatase PP2A and promotes the endoplasmic reticulum stress response in human colon carcinoma cells. *Carcinogenesis* 27:1812-27
- Gupta N, Pant SC, Vijayaraghavan R, Rao PVL.** 2003. Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants (LR, RR, YR) in mice. *Toxicology* 188:285-96
- Guzman RE, Solter PF.** 1999. Hepatic oxidative stress following prolonged sublethal microcystin LR exposure. *Toxicologic pathology* 27:582-8
- Guzman RE, Solter PF, Runnegar MT.** 2003. Inhibition of nuclear protein phosphatase activity in mouse hepatocytes by the cyanobacterial toxin microcystin-LR. *Toxicon* 41:773-81
- Hagenbuch B.** 2007. Cellular entry of thyroid hormones by organic anion transporting polypeptides. *Best Practice and Research in Clinical Endocrinology and Metabolism* 21:209-21
- Hagenbuch B, Gui C.** 2008. Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family. *Xenobiotica* 38:778-801
- Hagenbuch B, Meier PJ.** 2003. The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim Biophys Acta* 1609:1-18
- Han ZX, Yang L, Zhang L, Xu C, Shu WQ.** 2010. The antagonistic action of epigallocatechin-3-gallate on microcystin LR-induced oxidative damage on hepatocytes of mice and the expression of cytochrome P450 2E1. *Zhonghua yu fang yi xue za zhi [Chinese journal of preventive medicine]* 44:24-9
- Hao L, Xie P, Fu J, Li G, Xiong Q, Li H.** 2008. The effect of cyanobacterial crude extract on the transcription of GST mu, GST kappa and GST rho in different organs of goldfish (*Carassius auratus*). *Aquatic Toxicology* 90:1-7
- Harada KI, Tsuji K, Watanabe MF, Kondo F.** 1996. Stability of microcystins from cyanobacteria - III. Effect of pH and temperature. *Phycologia* 35:83-8
- Hastie CJ, Borthwick EB, Morrison LF, Codd GA, Cohen PTW.** 2005. Inhibition of several protein phosphatases by a non-covalently interacting microcystin and a novel cyanobacterial peptide, nostocyclin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1726:187-93
- Havens KE.** 2008. Cyanobacteria blooms: effects on aquatic ecosystems. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 619:733-47
- Hayeshi R, Hilgendorf C, Artursson P, Augustijns P, Brodin B, et al.** 2008. Comparison of drug transporter gene expression and functionality in Caco-2 cells from 10 different laboratories. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 35:383-96
- Hermansky SJ, Casey PJ, Stohs SJ.** 1990a. Cyclosporin A - A chemoprotectant against microcystin-LR toxicity. *Toxicology Letters* 54:279-85
- Hermansky SJ, Markin RS, Fowler EH, Stohs SJ.** 1993. Hepatic ultrastructural changes induced by the toxin microcystin-LR (MCLR) in mice. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 12:101-6
- Hermansky SJ, Stohs SJ, Markin RS, Murray WJ.** 1990b. Hepatic lipid peroxidation, sulfhydryl status, and toxicity of the blue-green algal toxin microcystin-LR in mice. *J Toxicol Environ Health* 31:71-91

- Hermansky SJ, Wolff SN, Stohs SJ.** 1990c. Use of rifampin as an effective chemoprotectant and antidote against microcystin-LR toxicity. *Pharmacology* 41:231-6
- Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT.** 1989. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 96:736-49
- Hilgendorf C, Ahlin G, Seithel A, Artursson P, Ungell AL, Karlsson J.** 2007. Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines. *Drug Metab Dispos* 35:1333-40
- Hindman SH, Favero MS, Carson LA.** 1975. Pyrogenic reactions during haemodialysis caused by extramural endotoxin. *Lancet* 2:732-4
- Hoeger SJ, Schmid D, Blom JF, Ernst B, Dietrich DR.** 2007. Analytical and functional characterization of microcystins [Asp3]MC-RR and [Asp3,Dhb7]MC-RR: consequences for risk assessment? *Environmental Science & Technology* 41:2609-16
- Honkanen RE, Zwiller J, Moore RE, Daily SL, Khatra BS, et al.** 1990. Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *J Biol Chem* 265:19401-4
- Hooser SB, Beasley VR, Basgall EJ, Carmichael WW, Haschek WM.** 1990. Microcystin-LR-induced ultrastructural changes in rats. *Vet Pathol* 27:9-15
- Hooser SB, Beasley VR, Lovell RA, Carmichael WW, Haschek WM.** 1989. Toxicity of microcystin LR, a cyclic heptapeptide hepatotoxin from *Microcystis aeruginosa*, to rats and mice. *Vet Pathol* 26:246-52
- Hooser SB, Beasley VR, Waite LL, Kuhlenschmidt MS, Carmichael WW, Haschek WM.** 1991. Actin filament alterations in rat hepatocytes induced in vivo and in vitro by microcystin-LR, a hepatotoxin from the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. *Vet Pathol* 28:259-66
- Hudder A, Song W, O'Shea KE, Walsh PJ.** 2007. Toxicogenomic evaluation of microcystin-LR treated with ultrasonic irradiation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 220:357-64
- IARC.** 2006. *Cyanobacterial Peptide Toxins*
- IARC WGoTEoCRtH.** 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:v-vii, 1-412
- Ibelings BW, Chorus I.** 2007. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater "seafood" and its consequences for public health: A review. *Environmental Pollution* 150:177-92
- Ito E, Kondo F, Harada K-I.** 1997a. Hepatic necrosis in aged mice by oral administration of microcystin-LR. *Toxicon* 35:231-9
- Ito E, Kondo F, Harada K-I.** 2000. First report on the distribution of orally administered microcystin-LR in mouse tissue using an immunostaining method. *Toxicon* 38:37-48
- Ito E, Kondo F, Harada K-I.** 2001a. Intratracheal administration of microcystin-LR, and its distribution. *Toxicon* 39:265-71
- Ito E, Kondo F, Harada KI.** 2001b. Intratracheal administration of microcystin-LR, and its distribution. *Toxicon* 39:265-71
- Ito E, Kondo F, Terao K, Harada K.** 1997b. Neoplastic nodular formation in mouse liver induced by repeated intraperitoneal injections of microcystin-LR. *Toxicon* 35:1453-7
- Ito E, Takai A, Kondo F, Masui H, Imanishi S, Harada K.** 2002. Comparison of protein phosphatase inhibitory activity and apparent toxicity of microcystins and related compounds. *Toxicon* 40:1017-25
- Jahnichen S, Ihle T, Petzoldt T, Benndorf J.** 2007. Impact of inorganic carbon availability on microcystin production by *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Applied and Environmental Microbiology* 73:6994-7002
- Jasonek G, Zhdanov A, Davenport J, Bláha Lk, Papkovsky DB.** 2010. Mitochondrial Toxicity of Microcystin-LR on Cultured Cells: Application to the Analysis of Contaminated Water Samples. *Environmental Science & Technology* 44:2535-41
- Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Hummel-Eisenbeiss J, Burchell B, Keppler D.** 1997. ATP-dependent transport of bilirubin glucuronides by the multidrug resistance protein MRP1 and its hepatocyte canalicular isoform MRP2. *Biochemical Journal* 327:305-10

- Jochimsen EM, Carmichael WW, An J, Cardo DM, Cookson ST, et al.** 1998a. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *New England Journal of Medicine* 338:873-8
- Jochimsen EM, Carmichael WW, An JS, Cardo DM, Cookson ST, et al.** 1998b. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *N Engl J Med* 338:873-8
- Jones GJ, Orr PT.** 1994. Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. *Water Research* 28:871-6
- Jungblut AD, Lovejoy C, Vincent WF.** 2010. Global distribution of cyanobacterial ecotypes in the cold biosphere. *The ISME Journal* 4:191-202
- Kato K, Shirasaka Y, Kuraoka E, Kikuchi A, Iguchi M, et al.** 2010. Intestinal absorption mechanism of tebipenem pivoxil, a novel oral carbapenem: Involvement of human OATP family in apical membrane transport. *Molecular Pharmaceutics* 7:1747-56
- Keita ÁV, Söderholm JD.** 2010. The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. *Neurogastroenterology and Motility* 22:718-33
- Khan SA, Ghosh S, Wickstrom M, Miller LA, Hess R, et al.** 1995. Comparative pathology of microcystin-LR in cultured hepatocytes, fibroblasts, and renal epithelial cells. *Natural Toxins* 3:119-28
- Khan SA, Wickstrom ML, Haschek WM, Schaeffer DJ, Ghosh S, Beasley VR.** 1996. Microcystin-LR and kinetics of cytoskeletal reorganization in hepatocytes, kidney cells, and fibroblasts. *Nat Toxins* 4:206-14
- Knutson Lars FK, T. Knutson.** 2001. Permeability in the gastrointestinal tract  
In *Oral drug absorption : prediction and assessment*, ed. HL Jenifer B. Dressman
- Komatsu M, Furukawa T, Ikeda R, Takumi S, Nong Q, et al.** 2007. Involvement of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in microcystin-LR-Induced apoptosis after its selective uptake mediated by OATP1B1 and OATP1B3. *Toxicological Sciences* 97:407-16
- Kondo F, Ikai Y, Oka H, Okumura M, Ishikawa N, et al.** 1992. Formation, characterization, and toxicity of the glutathione and cysteine conjugates of toxic heptapeptide microcystins. *Chemical Research in Toxicology* 5:591-6
- Kondo F, Matsumoto H, Yamada S, Ishikawa N, Ito E, et al.** 1996a. Detection and identification of metabolites of microcystins formed in vivo in mouse and rat livers. *Chemical Research in Toxicology* 9:1355-9
- Kondo F, Matsumoto H, Yamada S, Ishikawa N, Ito E, et al.** 1996b. Detection and identification of metabolites of microcystins formed in vivo in mouse and rat livers. *Chemical Research in Toxicology* 9:1355-9
- Konig J, Seithel A, Gradhand U, Fromm MF.** 2006. Pharmacogenomics of human OATP transporters. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 372:432-43
- Krakstad C, Herfindal L, Gjertsen BT, BÅ\_e R, Vintermyr OK, et al.** 2006. CaM-kinaseII-dependent commitment to microcystin-induced apoptosis is coupled to cell budding, but not to shrinkage or chromatin hypercondensation. *Cell Death and Differentiation* 13:1191-202
- Kuiper-Goodman T, Falconer I, Fitzgerald J.** 1999. Human health aspects. *Toxic Cyanobacteria in Water*:113-53
- La-Salette R, Oliveira MM, Palmeira CA, Almeida J, Peixoto FP.** 2008. Mitochondria a key role in microcystin-LR kidney intoxication. *J Appl Toxicol* 28:55-62
- Lakhman SS, Ma Q, Morse GD.** 2009. Pharmacogenomics of CYP3A: considerations for HIV treatment. *Pharmacogenomics* 10:1323-39
- Lance E.** 2008. *Impacts des cyanobactéries toxiques sur les gastéropodes dulcicoles et sur leur rôle de vecteur dans le transdert des microcystines au sein du réseau trophique.* doctorat. université de Rennes 1, Rennes
- Lankoff A, Banasik A, Obe G, Deperas M, Kuzminski K, et al.** 2003. Effect of microcystin-LR and cyanobacterial extract from Polish reservoir of drinking water on cell cycle progression, mitotic spindle, and apoptosis in CHO-K1 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 189:204-13
- Lavorini P, Vichi S, Scardala S, Funari E, Testai E.** 2010. Contamination of food supplements present on the italian market by different cyanotoxins. *ICTC8*. Istanbul

- Lebiedzinska M, Szabadkai G, Jones AWE, Duszynski J, Wieckowski MR.** 2009. Interactions between the endoplasmic reticulum, mitochondria, plasma membrane and other subcellular organelles. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 41:1805-16
- Lee JJ.** 2009. removal of Microcystin LR from drinking water using adsorption and membrane processes, Ohio state university
- Lee W, Belkhir A, Lockhart AC, Merchant N, Glaeser H, et al.** 2008. Overexpression of OATP1B3 confers apoptotic resistance in colon cancer. *Cancer Research* 68:10315-23
- Lennernas H.** 1998. Human intestinal permeability. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 87:403-10
- Leslie EM, Deeley RG, Cole SPC.** 2005. Multidrug resistance proteins: Role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and Applied Pharmacology* 204:216-37
- Levi Y, Harvey M, Cervantès P.** 2006. Risques sanitaires liés à la présence de cyanobactéries dans l'eau : évaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et de leurs toxines dans les eaux destinées à l'alimentation, à la baignade et autres activités récréatives, AFSSA, AFSSET
- Li AP.** 2001. Screening for human ADME/Tox drug properties in drug discovery. *Drug Discovery Today* 6:357-66
- Li G, Xie P, Fu J, Hao L, Xiong Q, Li H.** 2008a. Microcystin-induced variations in transcription of GSTs in an omnivorous freshwater fish, goldfish. *Aquatic Toxicology* 88:75-80
- Li T HP, Liang J, Fu W, Guo Z, Xu L.** 2011. Microcystin -LR (MCLR) Induces a Compensation of PP2A Activity Mediated by alpha4 Protein in HEK293 Cells. *Int J Biol Sci*:740-52
- Li X, Liu Y, Song L.** 2001. Cytological alterations in isolated hepatocytes from common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to microcystin-LR. *Environmental Toxicology* 16:517-22
- Li X, Liu Y, Song L, Liu J.** 2003. Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin-LR. *Toxicon* 42:85-9
- Li Y, Sheng J, Sha J, Han X.** 2008b. The toxic effects of microcystin-LR on the reproductive system of male rats in vivo and in vitro. *Reproductive Toxicology* 26:239-45
- Liang G, Xie P, Chen J, Yu T.** 2011. Comparative studies on the pH dependence of DOW of microcystin-RR and -LR using LC-MS. *TheScientificWorldJournal* 11:20-6
- Linnankoski J, Makela J, Palmgren J, Mauriala T, Vedin C, et al.** 2010. Paracellular porosity and pore size of the human intestinal epithelium in tissue and cell culture models. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 99:2166-75
- Lison D, Lauwerys R.** 2007. *Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles* MASSON. 1268 pp.
- Liu Y, Bodmer WF.** 2006. Analysis of P53 mutations and their expression in 56 colorectal cancer cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:976-81
- Lu H, Choudhuri S, Ogura K, Csanaky IL, Lei X, et al.** 2008. Characterization of organic anion transporting polypeptide 1b2-null Mice: Essential role in hepatic uptake/toxicity of phalloidin and microcystin-Lr. *Toxicological Sciences* 103:35-45
- Lyck S.** 2004. Simultaneous changes in cell quotas of microcystin, chlorophyll a, protein and carbohydrate during different growth phases of a batch culture experiment with *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Plankton Research* 26:727-36
- MacKintosh C, Beattie KA, Klumpp S, Cohen P, Codd GA.** 1990. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett* 264:187-92
- MacKintosh RW, Dalby KN, Campbell DG, Cohen PTW, Cohen P, MacKintosh C.** 1995. The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase 1. *FEBS Letters* 371:236-40
- Magalhaes VF, Marinho MM, Domingos P, Oliveira AC, Costa SM, et al.** 2003. Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). *Toxicon* 42:289-95
- Maidana M, Carlis V, Galhardi FG, Yunes JS, Geracitano LA, et al.** 2006. Effects of microcystins over short- and long-term memory and oxidative stress generation in hippocampus of rats. *Chemico-Biological Interactions* 159:223-34

- Malécot M, Mezhoud K, Marie A, Praseuth D, Puiseux-Dao S, Ederly M.** 2009. Proteomic study of the effects of microcystin-LR on organelle and membrane proteins in medaka fish liver. *Aquatic Toxicology* 94:153-61
- Markensten H, Moore K, Persson I.** 2010. Simulated lake phytoplankton composition shifts toward cyanobacteria dominance in a future warmer climate. *Ecological Applications: A Publication of the Ecological Society of America* 20:752-67
- Martins JC, Vasconcelos VM.** 2009. Microcystin dynamics in aquatic organisms. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews* 12:65-82
- Maubon N, Le Vee M, Fossati L, Audry M, Le Ferrec E, et al.** 2007. Analysis of drug transporter expression in human intestinal Caco-2 cells by real-time PCR. *Fundamental and Clinical Pharmacology* 21:659-63
- McConnell JL, Wadzinski BE.** 2009. Targeting Protein Serine/Threonine Phosphatases for Drug Development. *Molecular Pharmacology* 75:1249-61
- Meier-Abt F, Mokrab Y, Mizuguchi K.** 2006. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLCO superfamily: Identification of new members in nonmammalian species, comparative modeling and a potential transport mode. *Journal of Membrane Biology* 208:213-27
- Meier Y, Eloranta JJ, Darimont J, Ismail MG, Hiller C, et al.** 2007. Regional distribution of solute carrier mRNA expression along the human intestinal tract. *Drug Metabolism and Disposition* 35:590-4
- Menéndez-Benito V, Verhoef LGGC, Masucci MG, Dantuma NP.** 2005. Endoplasmic reticulum stress compromises the ubiquitin-proteasome system. *Human Molecular Genetics* 14:2787-99
- Meriluoto JAO, Nygard SE, Dahlem AM, Eriksson JE.** 1990. Synthesis, organotropism and hepatocellular uptake of two tritium-labeled epimers of dihydromicrocystin-LR, a cyanobacterial peptide toxin analog. *Toxicol* 28:1439-46
- Metcalf JS, Beattie KA, Pflugmacher S, Codd GA.** 2000. Immuno-crossreactivity and toxicity assessment of conjugation products of the cyanobacterial toxin, microcystin-LR. *FEMS Microbiol Lett* 189:155-8
- Mikhailov A, Härmälä-Braskén A-S, Hellman J, Meriluoto J, Eriksson JE.** 2003. Identification of ATP-synthase as a novel intracellular target for microcystin-LR. *Chemico-Biological Interactions* 142:223-37
- Miller MA, Kudela RM, Mekebre A, Crane D, Oates SC, et al.** 2010. Evidence for a novel marine harmful algal bloom: Cyanotoxin (microcystin) transfer from land to sea otters. *PLoS ONE* 5:1-11
- Milutinovic A, Sedmak B, Horvat-Å½nidarÅ½iiÄ• I, Å½uput D.** 2002. Renal injuries induced by chronic intoxication with microcystins. *Cellular and Molecular Biology Letters* 7:139-41
- Milutinovic A, Zivin M, Zorc-Pleskovic R, Sedmak B, Suput D.** 2003. Nephrotoxic effects of chronic administration of microcystins -LR and -YR. *Toxicol* 42:281-8
- Mitschke D, Reichel A, Fricker G, Moenning U.** 2008. Characterization of cytochrome P450 protein expression along the entire length of the intestine of male and female rats. *Drug Metabolism and Disposition* 36:1039-45
- Miura GA, Robinson NA, Geisbert TW, Bostian KA, White JD, Pace JG.** 1989. Comparison of in vivo and in vitro toxic effects of microcystin-LR in fasted rats. *Toxicol* 27:1229-40
- Miura GA, Robinson NA, Lawrence WB, Pace JG.** 1991. Hepatotoxicity of microcystin-LR in fed and fasted rats. *Toxicol* 29:337-46
- Mohamed ZA, Al Shehri AM.** 2009. Microcystins in groundwater wells and their accumulation in vegetable plants irrigated with contaminated waters in Saudi Arabia. *Journal of Hazardous Materials* 172:310-5
- Monks NR, Liu S, Xu Y, Yu H, Bendelow AS, Moscow JA.** 2007. Potent cytotoxicity of the phosphatase inhibitor microcystin LR and microcystin analogues in OATP1B1- and OATP1B3-expressing HeLa cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 6:587-98
- Moreno I, Pichardo S, Jos A, Gomez-Amores L, Mate A, et al.** 2005. Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered intraperitoneally. *Toxicol* 45:395-402
- Moreno IM, Mate A, Repetto G, Vázquez CM, Cameán AM.** 2003. Influence of microcystin-LR on the activity of membrane enzymes in rat intestinal mucosa. *Journal of Physiology and Biochemistry* 59:293-300

- Morris RJ, Williams DE, Luu HA, Holmes CFB, Andersen RJ, Calvert SE.** 2000. The adsorption of microcystin-LR by natural clay particles. *Toxicol* 38:303-8
- Nagata K, Nishitani M, Matsuo M, Kioka N, Amachi T, Ueda K.** 2000. Nonequivalent nucleotide trapping in the two nucleotide binding folds of the human multidrug resistance protein MRP1. *Journal of Biological Chemistry* 275:17626-30
- Nishiwaki-Matsushima R, Nishiwaki S, Ohta T, Yoshizawa S, Suganuma M, et al.** 1991. Structure-function relationships of microcystins, liver tumor promoters, in interaction with protein phosphatase. *Japanese Journal of Cancer Research* 82:993-6
- Nishiwaki-Matsushima R, Ohta T, Nishiwaki S, Suganuma M, Kohyama K, et al.** 1992. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *J Cancer Res Clin Oncol* 118:420-4
- Nishiwaki R, Ohta T, Sueoka E, Suganuma M, Harada K, et al.** 1994. Two significant aspects of microcystin-LR: specific binding and liver specificity. *Cancer Lett* 83:283-9
- Nobre AC, Coelho GR, Coutinho MC, Silva MM, Angelim EV, et al.** 2001. The role of phospholipase A(2) and cyclooxygenase in renal toxicity induced by microcystin-LR. *Toxicol* 39:721-4
- Nobre AC, Jorge MC, Menezes DB, Fonteles MC, Monteiro HS.** 1999. Effects of microcystin-LR in isolated perfused rat kidney. *Braz J Med Biol Res* 32:985-8
- Nobre ACL, Nunes-Monteiro SM, Monteiro MCSA, Martins AMC, Havt A, et al.** 2004. Microcystin-LR promote intestinal secretion of water and electrolytes in rats. *Toxicol* 44:555-9
- Nong Q, Komatsu M, Izumo K, Indo HP, Xu B, et al.** 2007. Involvement of reactive oxygen species in Microcystin-LR-induced cytogenotoxicity. *Free Radical Research* 41:1326-37
- Ohta T, Nishiwaki R, Yatsunami J, Komori A, Suganuma M, Fujiki H.** 1992. Hyperphosphorylation of cytokeratins 8 and 18 by microcystin-LR, a new liver tumor promoter, in primary cultured rat hepatocytes. *Carcinogenesis* 13:2443-7
- Ohta T, Sueoka E, Iida N, Komori A, Suganuma M, et al.** 1994. Nodularin, a potent inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A, is a new environmental carcinogen in male F344 rat liver. *Cancer Research* 54:6402-6
- Okada T, Narai A, Matsunaga S, Fusetani N, Shimizu M.** 2000. Assessment of the marine toxins by monitoring the integrity of human intestinal Caco-2 cell monolayers. *Toxicology in Vitro* 14:219-26
- Oostendorp RL, Beijnen JH, Schellens JH.** 2009. The biological and clinical role of drug transporters at the intestinal barrier. *Cancer Treat Rev* 35:137-47
- Ortelli D, Edder P, Cognard E, Jan P.** 2008. Fast screening and quantitation of microcystins in microalgae dietary supplement products and water by liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 617:230-7
- Oziol L, Bouaïcha N.** 2010. First evidence of estrogenic potential of the cyanobacterial hepatotoxins the nodularin-R and the microcystin-LR in cultured mammalian cells. *Journal of Hazardous Materials* 174:610-5
- Pace JG, Robinson NA, Miura GA, Matson CF, Geisbert TW, White JD.** 1991a. Toxicity and kinetics of [<sup>3</sup>H]microcystin-LR in isolated perfused rat livers. *Toxicology and Applied Pharmacology* 107:391-401
- Pace JG, Robinson NA, Miura GA, Matson CF, Geisbert TW, White JD.** 1991b. Toxicity and kinetics of [<sup>3</sup>H]microcystin-LR in isolated perfused rat livers. *Toxicology and Applied Pharmacology* 107:391-401
- Pade V, Stavchansky S.** 1997. Estimation of the relative contribution of the transcellular and paracellular pathway to the transport of passively absorbed drugs in the Caco-2 cell culture model. *Pharmaceutical Research* 14:1210-5
- Paerl HW, Huisman J.** 2008. Blooms Like It Hot. *Science* 320:57-8
- Papadimitriou T, Kagalou I, Bacopoulos V, Leonardos ID.** 2010. Accumulation of microcystins in water and fish tissues: An estimation of risks associated with microcystins in most of the Greek Lakes. *Environmental Toxicology* 25:418-27
- Park HD.** 2008. Dynamics of the microcystin in aquatic ecosystem. *Bulletin of the Plankton Society of Japan* 55:58-62
- Park HD, Sasaki Y, Maruyama T, Yanagisawa E, Hiraishi A, Kato K.** 2001. Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by a new bacterium isolated from a hypertrophic lake. *Environmental Toxicology* 16:337-43

- Paul VJ.** 2008. Global warming and cyanobacterial harmful algal blooms. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 619:239-57
- Peng KC, Cluzeaud F, Bens M, Van Huyen JPD, Wioland MA, et al.** 1999. Tissue and cell distribution of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in mouse intestine and kidney. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 47:757-67
- Petit E.** *etude des glutathion transférases : caractérisation de la classe Kappa et rôle de ces enzymes dans l'hépatotoxicité des thiopurines.* faculté de pharmacie - vie agro santé, Rennes
- Petitpas Mélanie HA.** 2010. Effets de cyanotoxines sur des cellules intestinales humaines en culture, ANSES
- Pflugmacher S, Wiegand C, Oberemm A, Beattie KA, Krause E, et al.** 1998. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: The first step of detoxication. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1425:527-33
- Picanco MR, Soares RM, Cagido VR, Azevedo SMFO, Rocco PRM, Zin WA.** 2004. Toxicity of a cyanobacterial extract containing microcystins to mouse lungs. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 37:1225-9
- Pichardo S, Jos A, Zurita JL, Salguero M, Camean AM, Repetto G.** 2005. The use of the fish cell lines RTG-2 and PLHC-1 to compare the toxic effects produced by microcystins LR and RR. *Toxicology in Vitro* 19:865-73
- Pilotto LS, Douglas RM, Burch MD, Cameron S, Beers M, et al.** 1997. Health effects of exposure to cyanobacteria (blue-green algae) during recreational water-related activities. *Aust N Z J Public Health* 21:562-6
- Pinto M, Robine Leon S, Appay MD.** 1983. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biology of the Cell* 47:323-30
- Pouria S, De Andrade A, Barbosa J, Cavalcanti RL, Barreto VTS, et al.** 1998. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet* 352:21-6
- Prieto AI, Jos A, Pichardo S, Moreno I, Cameán AM.** 2006. Differential oxidative stress responses to microcystins LR and RR in intraperitoneally exposed tilapia fish (*Oreochromis sp.*). *Aquatic Toxicology* 77:314-21
- Prieto AI, Jos A, Pichardo S, Moreno I, De Sotomayor MÃ, et al.** 2009. Time-dependent protective efficacy of trolox (vitamin E analog) against microcystin-induced toxicity in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Toxicology* 24:563-79
- Puerto M, Pichardo S, Jos A, Cameán AM.** 2009. Comparison of the toxicity induced by microcystin-RR and microcystin-YR in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells. *Toxicol* 54:161-9
- Puerto M, Pichardo S, Jos A, Camean AM.** 2010a. Microcystin-LR induces toxic effects in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells. *Arch Toxicol*
- Puerto M, Pichardo S, Jos A, Cameán AM.** 2010b. Microcystin-LR induces toxic effects in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells. *Archives of Toxicology* 84:405-10
- Puerto M, Pichardo S, Jos A, Prieto AI, Sevilla E, et al.** 2010c. Differential oxidative stress responses to pure Microcystin-LR and Microcystin-containing and non-containing cyanobacterial crude extracts on Caco-2 cells. *Toxicol* 55:514-22
- Qin W, Xu L, Zhang X, Wang Y, Meng X, et al.** 2010. Endoplasmic reticulum stress in murine liver and kidney exposed to microcystin-LR. *Toxicol* 56:1334-41
- Qiu T, Xie P, Liu Y, Li G, Xiong Q, et al.** 2009. The profound effects of microcystin on cardiac antioxidant enzymes, mitochondrial function and cardiac toxicity in rat. *Toxicology* 257:86-94
- Rao PV, Gupta N, Bhaskar AS, Jayaraj R.** 2002. Toxins and bioactive compounds from cyanobacteria and their implications on human health. *J Environ Biol* 23:215-24
- Rapala J, Erkomaa K, Kukkonen J, Sivonen K, Lahti K.** 2002. Detection of microcystins with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography-UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay : Comparison of methods. *Analytica Chimica Acta* 466:213-31
- Rasheva VI, Domingos PM.** 2009. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis* 14:996-1007

- Ray R, Bhattacharya S, Johnson L.** 2011. Mdm2 inhibition induces apoptosis in p53 deficient human colon cancer cells by activating p73- and E2F1-mediated expression of PUMA and Siva-1. *Apoptosis* 16:35-44
- Rendic S.** 2002. Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metabolism Reviews* 34:83-448
- Robillot C, Hennion MC.** 2004. Issues arising when interpreting the results of the protein phosphatase 2A inhibition assay for the monitoring of microcystins. *Analytica Chimica Acta* 512:339-46
- Robinson NA, Miura GA, Matson CF, Dinterman RE, Pace JG.** 1989. Characterization of chemically tritiated microcystin-LR and its distribution in mice. *Toxicol* 27:1035-42
- Robinson NA, Pace JG, Matson CF, Miura GA, Lawrence WB.** 1991. Tissue distribution, excretion and hepatic biotransformation of microcystin-LR in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 256:176-82
- Rogers ED, Henry TB, Twiner MJ, Gouffon JS, McPherson JT, et al.** 2011. Global gene expression profiling in larval zebrafish exposed to microcystin-LR and microcystis reveals endocrine disrupting effects of cyanobacteria. *Environmental Science and Technology* 45:1962-9
- Romsicki Y, Sharom FJ.** 1999. The membrane lipid environment modulates drug interactions with the P- glycoprotein multidrug transporter. *Biochemistry* 38:6887-96
- Rousset M.** 1986. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: Two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* 68:1035-40
- Runnegar M, Berndt N, Kaplowitz N.** 1995a. Microcystin uptake and inhibition of protein phosphatases: Effects of chemoprotectants and self-inhibition in relation to known hepatic transporters. *Toxicology and Applied Pharmacology* 134:264-72
- Runnegar M, Berndt N, Kong S-M, Lee EYC, Zhang L.** 1995b. In vivo and in vitro binding of microcystin to protein phosphatases 1 and 2A. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 216:162-9
- Runnegar MT, Falconer IR.** 1986. Effect of toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on ultrastructural morphology and actin polymerization in isolated hepatocytes. *Toxicol* 24:109-15
- Runnegar MT, Falconer IR, Silver J.** 1981. Deformation of isolated rat hepatocytes by a peptide hepatotoxin from the blue-green alga &i&tMicrocystis aeruginosa&/i&t. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 317:268-72
- Runnegar MT, Wei X, Hamm-Alvarez SF.** 1999. Increased protein phosphorylation of cytoplasmic dynein results in impaired motor function. *Biochemical Journal* 342:1-6
- Runnegar MTC, Gerdes RG, Falconer IR.** 1991. The uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by isolated rat hepatocytes. *Toxicol* 29:43-51
- Sahin A, Tencalla FG, Dietrich DR, Naegeli H.** 1996. Biliary excretion of biochemically active cyanobacteria (blue-green algae) hepatotoxins in fish. *Toxicology* 106:123-30
- Sai Y, Kaneko Y, Ito S, Mitsuoka K, Kato Y, et al.** 2006. Predominant contribution of organic anion transporting polypeptide OATP-B (OATP2B1) to apical uptake of estrone-3-sulfate by human intestinal Caco-2 cells. *Drug Metabolism and Disposition* 34:1423-31
- Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stamatii A, Zucco F.** 2005. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: Influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology* 21:1-26
- Sasaki M, Suzuki H, Ito K, Abe T, Sugiyama Y.** 2002. Transcellular transport of organic anions across a double-transfected Madin-Darby canine kidney II cell monolayer expressing both human organic anion-transporting polypeptide (OATP2/SLC21A6) and multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/ABCC2). *Journal of Biological Chemistry* 277:6497-503
- Schinkel AH, Smit JJM, Van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, et al.** 1994. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 77:491-502
- Schlegel N, Meir M, Heupel W-M, Holth  fer B, Leube RE, Waschke J.** 2010. Desmoglein 2-mediated adhesion is required for intestinal epithelial barrier integrity. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 298:G774-G83

- Schwarzenberger A, Courts C, von Elert E.** 2009. Target gene approaches: Gene expression in *Daphnia magna* exposed to predator-borne kairomones or to microcystin-producing and microcystin-free *Microcystis aeruginosa*. *BMC Genomics* 10
- Seithel A, Karlsson J, Hilgendorf C, Bjo?rquist A, Ungell AL.** 2006. Variability in mRNA expression of ABC- and SLC-transporters in human intestinal cells: Comparison between human segments and Caco-2 cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 28:291-9
- Sekijima M, Tsutsumi T, Yoshida T, Harada T, Tashiro F, et al.** 1999. Enhancement of glutathione S-transferase placental-form positive liver cell foci development by microcystin-LR in aflatoxin B1-initiated rats. *Carcinogenesis* 20:161-5
- Setlikova I, Wiegand C.** 2009. Hepatic and branchial glutathione S-transferases of two fish species: Substrate specificity and biotransformation of microcystin-LR. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 149:515-23
- Shenolikar S.** 1994. Protein serine/threonine phosphatases--new avenues for cell regulation. *Annual Review of Cell Biology* 10:55-86
- Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP.** 1994. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 270:414-23
- Sieroslawska A, Rymuszka A.** 2009. Cyanohepatotoxins influence on the neuroendocrine and immune systems in fish - A short review. *Neuroendocrinology Letters* 30:13-6
- Smith PL.** 2001. The role of permeability studies in preclinical evaluation. In *Oral drug absorption : prediction and assessment*, ed. HL Jenifer B. Dressman
- Soares RM, Yuan M, Servaites JC, Delgado A, Magalhães VF, et al.** 2006. Sublethal exposure from microcystins to renal insufficiency patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Environmental Toxicology* 21:95-103
- Sun H, Chow ECY, Liu S, Du Y, Pang KS.** 2008a. The Caco-2 cell monolayer: Usefulness and limitations. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* 4:395-411
- Sun H, Zhang L, Chow ECY, Lin G, Zuo Z, Pang KS.** 2008b. A catenary model to study transport and conjugation of baicalein, a bioactive flavonoid, in the caco-2 cell monolayer: Demonstration of substrate inhibition. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 326:117-26
- Svoboda M, Riha J, Wlecek K, Jaeger W, Thalhammer T.** 2011. Organic Anion Transporting Polypeptides (OATPs): Regulation of Expression and Function. *Current Drug Metabolism* 12:139-53
- Taipalensuu J, Tornblom H, Lindberg G, Einarsson C, Sjoqvist F, et al.** 2001. Correlation of gene expression of ten drug efflux proteins of the ATP-binding cassette transporter family in normal human jejunum and in human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers. *J Pharmacol Exp Ther* 299:164-70
- Takenaka S.** 2001. Covalent glutathione conjugation to cyanobacterial hepatotoxin microcystin LR by F344 rat cytosolic and microsomal glutathione S-transferases. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 9:135-9
- Takumi S, Komatsu M, Furukawa T, Ikeda R, Sumizawa T, et al.** 2010. P53 plays an important role in cell fate determination after exposure to Microcystin-LR. *Environmental Health Perspectives* 118:1292-8
- Teixeira MG, Costa MC, de Carvalho VL, Pereira MS, Hage E.** 1993. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. *Bulletin of the Pan American Health Organization* 27:244-53
- Theiss WC, Carmichael WE, Wyman J, Bruner R.** 1988. Blood pressure and hepatocellular effects of the cyclic heptapeptide toxin produced by the freshwater cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa* strain PCC-7820. *Toxicon* 26:603-13
- Timmings JM, Ozcan L, Seimon TA, Li G, Malagelada C, et al.** 2009. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II links ER stress with Fas and mitochondrial apoptosis pathways. *Journal of Clinical Investigation* 119:2925-41
- Toivola DM.** 1994. Identification of protein phosphatase 2A as the primary target for microcystin-LR in rat liver homogenates. *FEBS Letters* 344:175-80
- Toivola DM, Goldman RD, Garrod DR, Eriksson JE.** 1997. Protein phosphatases maintain the organization and structural interactions of hepatic keratin intermediate filaments. *J Cell Sci* 110 ( Pt 1):23-33

- Toyoda Y, Hagiya Y, Adachi T, Hoshijima K, Kuo MT, Ishikawa T.** 2008. MRP class of human ATP binding cassette (ABC) transporters: Historical background and new research directions. *Xenobiotica* 38:833-62
- Treize AEO, Romano PR, Gill DR, Hyde SC, Sepulveda FV, et al.** 1992. The multidrug resistance and cystic fibrosis genes have complementary patterns of epithelial expression. *EMBO Journal* 11:4291-303
- Turner PC, Gammie AJ, Hollinrake K, Codd GA.** 1990. Pneumonia associated with contact with cyanobacteria. *British Medical Journal* 300:1440-1
- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G.** 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:5116-21
- Ueno Y, Nagata S, Tsutsumi T, Hasegawa A, Watanabe MF, et al.** 1996. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis* 17:1317-21
- van Apeldoorn ME, van Egmond HP, Speijers GJA, Bakker GJI.** 2007. Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition & Food Research* 51:7-60
- Vestervik P, Misiorek J, Spoof L, Toivola D, Meriluoto J.** 2010. Cytotoxicity effects of microcystins of different hydrophobicities. *International Conference on Toxic Cyanobacteria*. Istanbul
- Vestervik PSM, Meriluoto JAO.** 2003. Interaction between microcystins of different hydrophobicities and lipid monolayers. *Toxicon* 41:349-55
- Volpe DA.** 2008. Variability in caco-2 and MDCK cell-based intestinal permeability assays. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97:712-25
- Von Richter O, Greiner B, Fromm MF, Fraser R, Omari T, et al.** 2001. Determination of in vivo absorption, metabolism, and transport of drugs by the human intestinal wall and liver with a novel perfusion technique. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 70:217-27
- Wang L, Liang X-F, Liao W-Q, Lei L-M, Han B-P.** 2006. Structural and functional characterization of microcystin detoxification-related liver genes in a phytoplanktivorous fish, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 144:216-27
- Wang M, Wang D, Lin L, Hong H.** 2010. Protein profiles in zebrafish (*Danio rerio*) brains exposed to chronic microcystin-LR. *Chemosphere* 81:716-24
- Wang Q, Xie P, Chen J, Liang G.** 2008. Distribution of microcystins in various organs (heart, liver, intestine, gonad, brain, kidney and lung) of Wistar rat via intravenous injection. *Toxicon* 52:721-7
- Ward DM, Ferris MJ, Nold SC, Bateson MM.** 1998. A Natural View of Microbial Biodiversity within Hot Spring Cyanobacterial Mat Communities. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62:1353-70
- Wei Y, Weng D, Li F, Zou X, Young DO, et al.** 2008. Involvement of JNK regulation in oxidative stress-mediated murine liver injury by microcystin-LR. *Apoptosis* 13:1031-42
- Welker M, Von Döhren H.** 2006. Cyanobacterial peptides - Nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews* 30:530-63
- Weng D, Lu Y, Wei Y, Liu Y, Shen P.** 2007. The role of ROS in microcystin-LR-induced hepatocyte apoptosis and liver injury in mice. *Toxicology* 232:15-23
- Westrick JA, Szlag DC, Southwell BJ, Sinclair J.** 2010. A review of cyanobacteria and cyanotoxins removal/inactivation in drinking water treatment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397:1705-14
- Whitton BA, Potts M.** 2000. *The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space*: Springer
- WHO.** 1998. Guidelines for Drinking Water Quality. Addendum to Volume 1.
- WHO.** 2003. GUIDELINES FOR SAFE RECREATIONAL WATER ENVIRONMENTS
- Wickstrom M, Haschek W, Henningsen G, Miller LA, Wyman J, Beasley V.** 1996. Sequential ultrastructural and biochemical changes induced by microcystin-LR in isolated perfused rat livers. *Nat Toxins* 4:195-205
- Wickstrom ML, Khan SA, Haschek WM, Wyman JF, Eriksson JE, et al.** 1995. Alterations in microtubules, intermediate filaments, and microfilaments induced by microcystin-LR in cultured cells. *Toxicologic Pathology* 23:326-37

- Wierzchos J, Cámara B, de Los Ríos A, Davila AF, Sánchez Almazo IM, et al.** 2011. Microbial colonization of Ca-sulfate crusts in the hyperarid core of the Atacama Desert: implications for the search for life on Mars. *Geobiology* 9:44-60
- Wood SA, Dietrich DR.** 2011. Quantitative assessment of aerosolized cyanobacterial toxins at two New Zealand lakes. *Journal of Environmental Monitoring* 13:1617-24
- Wörmer L, Huerta-Fontela M, Cirés S, Carrasco D, Quesada A.** 2010. Natural photodegradation of the cyanobacterial toxins microcystin and cylindrospermopsin. *Environmental Science and Technology* 44:3002-7
- Xiong Q, Xie P, Li H, Hao L, Li G, et al.** 2009. Involvement of Fas/FasL system in apoptotic signaling in testicular germ cells of male Wistar rats injected i.v. with microcystins. *Toxicol* 54:1-7
- Yang Y.** 2007. Le modèle cellulaire Caco-2 pour prédire l'absorption intestinale des cyanotoxines : études préalables sur des marqueurs de différenciation et de perméabilité, AFSSA, Fougères
- Yoshida T, Makita Y, Nagata S, Tsutsumi T, Yoshida F, et al.** 1997. Acute oral toxicity of microcystin-LR, a cyanobacterial hepatotoxin, in mice. *Natural Toxins* 5:91-5
- Yoshizawa S, Matsushima R, Watanabe MF, Harada K, Ichihara A, et al.** 1990. Inhibition of protein phosphatases by microcystin and nodularin associated with hepatotoxicity. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 116:609-14
- Yu H.** 2007. Cdc20: A WD40 Activator for a Cell Cycle Degradation Machine. *Molecular Cell* 27:3-16
- Yu SZ.** 1995. Primary prevention of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 10:674-82
- Yu SZ, Chen G, Zhi XL, Li J.** 1998. Primary liver cancer: Natural toxins and prevention in China. *Journal of Toxicological Sciences* 23:143-7
- Zegura B, Sedmak B, Filipic M.** 2003. Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2. *Toxicol* 41:41-8
- Zegura B, Volcic M, Lah TT, Filipic M.** 2008a. Different sensitivities of human colon adenocarcinoma (CaCo-2), astrocytoma (IPDDC-A2) and lymphoblastoid (NCNC) cell lines to microcystin-LR induced reactive oxygen species and DNA damage. *Toxicol* 52:518-25
- Zegura B, Zajc I, Lah TT, Filipic M.** 2008b. Patterns of microcystin-LR induced alteration of the expression of genes involved in response to DNA damage and apoptosis. *Toxicol* 51:615-23
- Zhang D, Xie P, Liu Y, Qiu T.** 2009. Transfer, distribution and bioaccumulation of microcystins in the aquatic food web in Lake Taihu, China, with potential risks to human health. *Science of the Total Environment* 407:2191-9
- Zhang QY, Dunbar D, Ostrowska A, Zeisloft S, Yang J, Kaminsky LS.** 1999. Characterization of human small intestinal cytochromes P-450. *Drug Metabolism and Disposition* 27:804-9
- Zhao Y, Xie P, Tang R, Zhang X, Li L, Li D.** 2008. In vivo studies on the toxic effects of microcystins on mitochondrial electron transport chain and ion regulation in liver and heart of rabbit. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 148:204-10
- Zhao Y, Xie P, Zhang X.** 2009. Oxidative stress response after prolonged exposure of domestic rabbit to a lower dosage of extracted microcystins. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 27:195-9
- Zhou L, Yu H, Chen K.** 2002. Relationship between microcystin in drinking water and colorectal cancer. *Biomedical and environmental sciences : BES* 15:166-71
- Zhu Y, Zhong X, Zheng S, Ge Z, Du Q, Zhang S.** 2005. Transformation of immortalized colorectal crypt cells by microcystin involving constitutive activation of Akt and MAPK cascade. *Carcinogenesis* 26:1207-14
- Zurawell RW, Chen H, Burke JM, Prepas EE.** 2005. Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of microcystins in freshwater environments. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews* 8:1-37
- Zurawell RW, Holmes CFB, Prepas EE.** 2006. Elimination of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin from the freshwater pulmonate snail *Lymnaea stagnalis jugularis* (say). *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A* 69:303-18





# **Annexe :**

**Résultats de l'étude de cinétique**

**Poster présenté à l'ICTC 8**





J. Henri, A. Huguet, A. Besson, JM. Delmas, V. Fessard

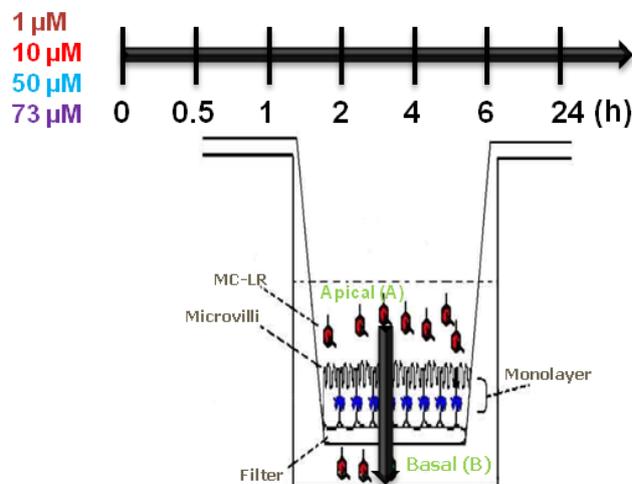
French agency for food, environmental and occupational health safety, Fougères, France

## Introduction

Microcystin LR (MC-LR) is known to be the most toxic variant of microcystin to rodents. However, its toxicity (LD<sub>50</sub>) is 100 time lower after oral treatment (5 mg/kg<sup>a</sup>) than after intraperitoneal injection (50 µg/kg<sup>b</sup>). According to these data, oral bioavailability of this molecule was suggested to be very low in spite of an uptake by OATPs. In order to confirm this hypothesis, we conducted some *in vitro* toxicokinetics studies on human intestinal Caco-2 cells known to express OATPs.

## Material and Methods

- Caco-2 cells were seeded onto transwell cell culture chambers (12 wells plates) at a density of 6.10<sup>4</sup> cells.cm<sup>-2</sup> and cultured for 21 days after confluence
- Apical (300 µL) to basal (1000 µL) transport :  
in Hank's balanced salt solution, pH 7.4, 37° C  
shaking = 100 rpm



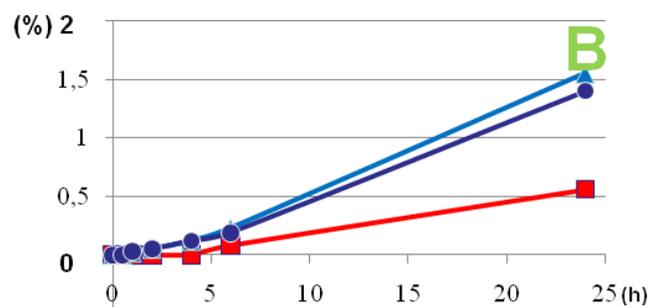
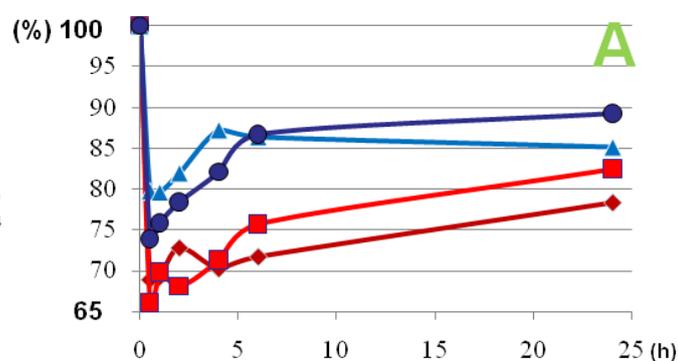
Quantification of MC-LR : validated ESI-IT-MS/MS (LOQ = 10 nM)

Integrity checking :

- ✓ TEER (Trans Epithelial Electric Resistance)
- ✓ Permeability of Lucifer Yellow (400 µg/mL, 3h)

## Results

Results are expressed according to the amount of MC-LR introduced (%) in the apical compartment. Plots represent apical (A) and basal (B) MC-LR relative amounts. Each point represents the mean of 4 repetitions.



A	T	0	0.5	1	2	4	6	24
C1	100%	68.9%	69.2%	72.8%	70.2%	71.7%	78.3%	
C10	100%	66.1%	69.8%	68.1%	71.3%	75.8%	82.5%	
C50	100%	79.7%	79.6%	82.0%	87.2%	86.4%	85.1%	
C73	100%	73.9%	75.9%	78.4%	82.1%	86.7%	89.3%	

B	T	0	0.5	1	2	4	6	24
C1	0%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C10	0%	ND	ND	ND	ND	ND	0.08%	0.56%
C50	0%	ND	0.02%	0.05%	0.12%	0.23%	1.55%	
C73	0%	ND	0.03%	0.05%	0.12%	0.19%	1.40%	

## Conclusion

In the apical compartment, a rapid decrease (20 to 35 % in 30 min) was observed due to cellular influx (see poster of Zeller *et al.*) followed by a slight increase with longer duration suggesting an efflux. MC-LR was detected in the basal medium after 4h with 10 µM and after 1h with 50 and 73 µM but never exceeding 1.5 % of the initial concentration of MC-LR. Inhibition studies should be carried on to further investigate the transporters implication in MC-LR absorption.

<sup>a</sup> Fawell JK, James CP. 1994. Toxins from blue-green algae : Toxicological assessment of microcystin LR and a method for its determination in water. Medmenham, UK:Water Research Center.

<sup>b</sup> Kuiper-Goodman T, Falconer IR. 1999. Human health aspects. In : Chorus I, Bartram J, editors. Toxic cyanobacteria in Water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. London : E & FN Spon. P 113-153