

Effet des sels de métaux lourds (chlorure de Cobalt et chlorure de Mercure) sur l'activité des hépatocytes

Gbèssohèlè Justin BEHANZIN¹, Euloge S. ADJOU², Abdou Ganiou YESSOUFOU¹, Edwige DAHOUEON AHOUSSE², Alphonse SEZAN¹.

¹Laboratoire de Biomembranes et de Signalisation Cellulaire, Département de Physiologie Animale, Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, République du Bénin, 09 BP 196 Cotonou (Bénin)

²Laboratoire d'Étude et de Recherche en Chimie Appliquée, École Polytechnique d'Abomey-Calavi, Université d'Abomey-Calavi. 01BP2009 Cotonou, (Bénin).

Adresse pour correspondance : justinbe@yahoo.fr

Original submitted in on 19th September 2014. Published online at www.m.elewa.org on 30th November 2014. <http://dx.doi.org/10.4314/jab.v83i1.4>

RESUME

Objectifs : Le présent travail vise à étudier l'action du chlorure de cobalt et du chlorure de mercure sur les différentes fractions lipidiques, l'intégrité structurelle et l'activité fonctionnelle des membranes cellulaires des hépatocytes.

Méthodologie et Résultats : Des hépatocytes de rats blancs mâles de 3 mois d'âge de la lignée wistar ont été extraits. Ces cellules isolées ont été incubées pendant 2, 5 et 10 minutes à 37°C dans une solution contenant 250 mmol de saccharose, 5mmol KCl ; 0,4 mmol KH₂PO₄ ; 0,4 mmol Na₂HPO₄ ; 0,8 mmol MgSO₄ ; 1,2 mmol CaCl₂ ; 10 mmol Tris – HCl à pH 7,4 et 1% d'albumine du sérum de bœuf. Les sels de métaux lourds à une concentration de 0,5.10⁻⁶mmol/L ont été dissouts dans la solution d'incubation. Les résultats obtenus indiquent une baisse du taux de certaines fractions lipidiques de la membrane interne des hépatocytes qui devient plus perméable au bleu de Trypan ; l'augmentation du taux de la 5'-mononucléotidase renseigne sur le changement fonctionnel dû à l'action des sels de métaux lourds sur les cellules isolées du foie. Sous l'effet des métaux lourds, les cellules du foie tentent d'opposer une réaction de compensation adaptative visant à limiter le stress provoqué par la perturbation au niveau de la structure membranaire des hépatocytes.

Conclusion et application des résultats : De cette étude, Il ressort que les sels de métaux lourds ont des effets précoces sur les hépatocytes isolés. Ces effets se caractérisent par des dommages sur la membrane plasmique, plus prononcés dans le cas du chlorure de mercure que de celui du chlorure de cobalt. La connaissance de ces symptômes permettra donc une prise en charge rapide dans les cas d'intoxication à ces métaux lourds.

Mots clés : hépatocytes, Phospholipides, Cholestérol, 5'-Mononucléotidase, Chlorure de cobalt, Chlorure de mercure

ABSTRACT

Effect of heavy metal salts (chloride and cobalt chloride Mercury) on the activity of hepatocytes

Objectives: The present work aims to study the action of cobalt chloride and mercuric chloride on the different lipid fractions, structural integrity and functional activity of the cell membranes of hepatocytes.

Methodology and Results : Hepatocytes of white rats 3 months of age, wistar line, were extracted. These isolated cells were incubated for 2, 5 and 10 minutes at 37 ° C in a solution containing 250 mmol of saccharose, 5mmol KCl; 0.4 mmol KH₂PO₄; 0.4 mmol Na₂HPO₄; 0.8 mmol MgSO₄; 1.2 mmol CaCl₂; 10 mmol Tris - HCl pH 7.4 and 1% of bovine serum albumin. The heavy metal salts in a concentration of

0.5×10^{-6} mmol / L were dissolved in the incubation solution. The results indicated a decrease in the levels of certain lipid fractions of the inner membrane of hepatocytes which becomes more permeable to trypan blue; the increase of the 5'-mononucléotidase indicated a functional change due to the action of heavy metal salts on isolated liver cells. Under the effect of heavy metals, liver cells try to oppose a reaction adaptive compensation to limit the stress caused by the disturbance at the hepatocyte membrane structure.

Conclusion: and application of results: From this study, it appears that the heavy metal salts have early effects on isolated hepatocytes. These effects are characterized by damage to the plasma membrane, more pronounced in the case of mercuric chloride than the cobalt chloride. This study will contribute to ameliorate the treatment during the contamination of heavy metal such as cobalt and mercuric chlorides.

Keywords: hepatocytes, Phospholipids, Cholesterol, 5'-Mononucléotidase, cobalt chloride, mercury chloride.

INTRODUCTION

En général, on distingue deux types de métaux en fonction de leurs effets physiologiques et toxiques. Il s'agit des métaux essentiels et des métaux toxiques. Les métaux essentiels sont des éléments indispensables à l'état de trace pour de nombreux processus cellulaires et qui se trouvent en proportion très faible dans les tissus biologiques (Loué, 1993). Cependant, certains peuvent devenir toxiques lorsque la concentration devient accidentellement élevée. C'est le cas du cuivre (Cu), du nickel (Ni), du Cobalt (Co), du zinc (Zn), du fer (Fe). Par contre les métaux toxiques, même à faible concentration ont un caractère polluant avec des effets nocifs pour les organismes vivants. Ils n'ont aucun effet bénéfique connu pour la cellule. C'est le cas, entre autre, du plomb (Pb), du mercure (Hg), du cadmium (Cd) (Baker et Walker, 1989). Du fait que l'industrie utilise de plus en plus les produits dérivés du mercure et du cobalt, il s'avère donc intéressant d'étudier l'effet de ces substances sur les cellules hépatiques. De même, ces métaux lourds ne peuvent être biodégradés, et donc persistent pendant de longues périodes dans l'environnement. La source majeure de contamination par les métaux est d'origine anthropique. Au cours des décennies dernières, l'apport de métaux lourds dans le monde s'est étendu. Les principaux types de pollutions anthropiques responsables de l'augmentation des flux de métaux, sont la pollution atmosphérique (rejets urbains et industriels), la pollution liée aux activités agricoles et la pollution industrielle. Ainsi par le biais d'activités minières, industrielles et agricoles, de nombreux produits de consommation qui terminent comme déchets, polluent l'air, l'eau, le sol, les plantes, les animaux et, finalement, les

êtres humains sont aussi pollués et intoxiqués par les métaux lourds. De même, les métaux lourds ont un effet cumulatif. Leur fixation sélective sur des organes et tissus sensibles peut être dangereuse quand leurs concentrations sont élevées (Lalogo, 1992). En effet, le mercure, un métal lourd présent à l'état naturel, peut subsister jusqu'à une année dans l'atmosphère, puis finit par s'accumuler dans les sédiments des fonds lacustres où il se transforme en un dérivé organique plus toxique, le méthylmercure, lequel s'accumule à son tour dans les tissus des poissons. Il peut provoquer une intoxication mortelle en cas d'inhalation et il est également nocif en cas d'absorption transcutanée. A cause de son effet cumulatif, il n'existe donc pas de seuil en dessous duquel il ne produirait pas d'effets indésirables (Lalogo, 1992). En effet, on distingue deux types de toxicités : la toxicité aiguë qui concerne les effets nocifs provoqués par une seule exposition à une forte dose de métal lourd (par ingestion, voie respiratoire ou cutanée), de caractère plutôt accidentel ; et la toxicité chronique qui désigne les effets nocifs dus à une exposition répétée. La principale source d'exposition à la plupart des métaux lourds est l'ingestion de nourriture contaminée (Klassen et Watkins, 2003). Face aux nombreuses nuisances associées à la contamination par les métaux lourds, la présente étude vise à investiguer l'action des sels de métaux lourds, notamment le chlorure de cobalt (CoCl_2) et le chlorure de mercure (HgCl_2) sur la composition des lipides cellulaires internes, de même que sur l'entité structurelle et sur l'activité fonctionnelle des membranes plasmiques des hépatocytes.

MATERIEL ET METHODES

Préparation du matériel biologique ; Des rats blancs mâles de lignée wistar, de 3mois d'âge pesant 180-250 g ont été utilisés comme matériel biologique dans cette étude. Ils sont conservés dans des conditions standard du vivarium. Les rats ont été anesthésiés à l'aide d'éther éthylique (Kanaévaia et al.1995). Les hépatocytes ont été obtenus après ouverture de l'abdomen et perfusion du foie dans les conditions *in-situ*, selon la méthode décrite par Berry et al. (1991), Do Carmo, (2009) et Rajesh et al. (2011).

Obtention des fractions lipidiques : L'extraction des lipides des hépatocytes a été réalisée à l'aide d'un mélange chloroforme – méthanol (1:2) (v/v) selon la méthode de gradient de solvants décrite par Stephan et al. (2004). La séparation des fractions lipidiques a été réalisée par la méthode de chromatographie sur couche mince. Le mélange de solvants chloroforme-méthanol-acide acétique-eau (25:15:4:2v/v/v/v) a été utilisé pour les phospholipides et le mélange de solvants hexane – diéthyl éther - acide acétique (75:25:2 v/v/v) pour les lipides neutres (Cot, 2006). La quantité de lipides a été déterminée suivant la méthode décrite par Stephan et al. (2004), Jouhet, (2005).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Les résultats obtenus montrent que l'incubation des hépatocytes pendant 10 minutes à 37°C dans la solution indiquée plus haut s'accompagne de la baisse des triacylglycérol (TG) et de la phosphatidylcholine (PC) (Tableau1) .Cela témoigne de la perturbation de l'intégrité fonctionnelle et métabolique des hépatocytes isolés et de la manifestation dans ces conditions de l'activité de la Triglycéridlipase et des phospholipases, probablement C ou D, puisque l'augmentation de la lysophosphatidylcholine n'est pas observée. L'addition dans le milieu d'incubation de chlorure de mercure ou de cobalt entraîne un changement spécifique dans le métabolisme, de certains lipides. Il a été noté la hausse du taux de la phosphatidylcholine et du Cholestérol non estérifié dans les hépatocytes déjà deux (02) minutes après l'addition de HgCl₂. Dans les 08 minutes suivantes, cet effet s'est accentué et aussi s'élève le taux des fractions de lipides telles que: la phosphatidyléthanolamine (PEA), la sphingomyéline (SPM), la lysophosphatidylcholine (LPC) et les acides gras libres (AGL), alors que celui des esters de cholestérol et des TG diminue. Les effets de CoCl₂ sont semblables à ceux de HgCl₂ bien que moins exprimés. Selon Rojkovskii et Krassiun (1991), l'augmentation du taux de certains lipides, dans une certaine mesure s'opère probablement, pour protéger l'enzyme des dommages directs dus aux produits de peroxydation lipidique. Les différents changements survenus dans la composition des lipides sont résultats de l'engagement

Influence des sels de métaux lourds sur les lipides, l'effet sur l'activité de la 5'-mononucléotidase et sur la survie des hépatocytes :Pour étudier l'influence des sels de métaux lourds sur le spectre de lipides des hépatocytes, sur l'activité de la 5'- mononucléotidase et sur la survie des hépatocytes, les cellules isolées ont été incubées pendant 2, 5 et 10 minutes à 37°C dans une solution contenant 250 mmol de saccharose, 5mmol KCl ; 0,4 mmol KH₂PO₄ ; 0,4 mmol Na₂HPO₄ ; 0,8 mmol MgSO₄ ; 1,2 mmol CaCl₂; 10 mmol Tris – HCl à pH 7,4 et 1% d'albumine du sérum de bœuf. Les sels de métaux lourds à une concentration de 0,5.10⁻⁶mmol/L ont été dissouts dans la solution d'incubation. L'activité de la 5'- mononucléotidase a été déterminée selon la méthode de Leskol, (1973). Le niveau de coloration par le bleu du Trypan des cellules de foie renseigne sur leur activité fonctionnelle et sur l'intégrité de leur membrane plasmatique.

Analyses statistiques : Le traitement statistique des résultats a été réalisé par la méthode de Student-Fisher (Zacks 1976) et avec utilisation de logiciel Minitab 14

dans ce processus de diverses enzymes du métabolisme des lipides. La diminution du niveau des esters de cholestérol et l'augmentation du cholestérol libre témoignent de l'activation de l'hydrolase de des esters de cholestérol, qui dans les hépatocytes est localisée dans les lysosomes. Par conséquent, l'incubation des hépatocytes dans un mélange isotonique à 37°C en présence de cobalt ou de mercure entraîne le changement de la structure des membranes des lysosomes et l'entrée à l'intérieur des cellules d'hydrolases acides parmi lesquelles la TG-lipase et des hydrolases de cholestérol estérifié. Les AGL libérés par l'hydrolyse des éthers de cholestérol seront utilisés dans la réaction de synthèse d'acyl-CoA et pris au cours de la biosynthèse de PC et de PEA. Ces dernières, probablement se synthétisent par voie de la diacylglycérine (DG) avec la participation de la phosphatidylcholine et de la phosphatidyléthanolamine-sitidyltransférase. Ainsi donc, le contact des hépatocytes avec les ions de cobalt ou de mercure entraîne la mobilisation et l'activation de systèmes d'enzymes dirigés dans le sens de la mobilisation et de la synthèse des composants lipoprotéiques que le foie secrète dans le sang. Ces derniers sont utilisés en général pour soutenir l'intégrité et l'activité fonctionnelle des membranes cellulaires des tissus périphériques. L'incubation des hépatocytes isolés pendant 2 ; 5 ou 10 minutes en absence d'ions de métaux n'a aucune influence sur l'activité de la 5'- mononucléotidase. Il est

cependant à noter la progression continue de l'entrée du bleu de Trypan à l'intérieur des cellules au cours de leur incubation, ce qui traduit une tendance à la destruction progressive des cellules. Avec l'addition dans le milieu d'incubation d'ions de cobalt ou de mercure, on note une augmentation de l'activité de l'enzyme au terme des 10 premières minutes d'incubation surtout pour les ions Hg^{2+} (alors que les ions Co^{2+} présentent une tendance à la hausse) voir Tableau 2 et figure 2. Dans ce nouveau milieu, la coloration des cellules par le bleu de Trypan se fait remarquer dès les 2 premières minutes (pour les ions Hg^{2+}) et dès les 5 premières minutes (pour les ions Co^{2+}). Ainsi donc, il n'y a pas de corrélation entre les changements de l'activité de l'enzyme et de la survie des hépatocytes. La hausse de l'activité de la 5'-mononucléotidase en présence des ions Co^{2+} , et de Hg^{2+} est sans doute le résultat de l'augmentation du taux de SPM qui est l'un des composants du complexe lipoprotéique de l'enzyme 5'-mononucléotidase de la membrane plasmique des cellules de foie. L'augmentation du niveau de ce phospholipide en présence des sels coïncide dans le temps avec la hausse de l'activité de l'enzyme étudiée. Selon Rojkovskii et Krassiun, (1991), l'augmentation de l'activité de la 5'-mononucléotidase peut être, d'une part un indicateur de l'affaiblissement des liens entre l'enzyme et la membrane et d'autre part, peut être considérée comme une manifestation des réactions de compensation adaptatives visant à limiter le stress. Les résultats de ce travail témoignent des différentes actions des chlorures de cobalt et du mercure sur l'activité fonctionnelle et sur le métabolisme des hépatocytes dans les conditions *in vitro*. L'analyse des réactions suite à l'influence des sels et la comparaison des résultats obtenus avec les données littéraires confirment que l'action des sels de métaux lourds

passent par un mécanisme de réception. Apparemment les ions Co^{2+} et Hg^{2+} agissent sur les récepteurs du système de signalisation phosphatidylinositol au niveau de la membrane plasmique des hépatocytes qui fait activer la phospholipase C. Cela peut s'expliquer par le développement d'une réaction de défense sous forme d'intensification de la synthèse de PC. Il est aussi probable que les ions des métaux lourds agissent sur les récepteurs Ca^{2+} (Nemeth, 1995) et les ions de métaux entrent à l'intérieur de la cellule, d'où ils entament l'oxydation des radicaux libres (Berridge, 1985). Il se développe alors une réaction de stress d'oxydation qui à son tour influe sur les lysosomes. Tout ceci conduit à la formation d'un système antioxydant de défense (Kouhar et al, 1991). Même après 10 minutes d'incubation, une grande partie des cellules sont restées non colorées par le bleu de Trypan. Cependant, le système isolé que forment les hépatocytes n'est pas assez efficace, ce qui entraîne la destruction de certaines cellules du foie.

Les changements notés dans la composition des lipides et dans l'activité des enzymes au cours de l'action des chlorures de mercure ou de cobalt témoignent de la formation aux niveaux moléculaire et cellulaire de processus métaboliques allant dans le sens de la défense des cellules contre les effets destructeurs du microélément toxique (Hg^{2+}) et du microélément indispensable (Co^{2+}) en doses supérieures à la norme physiologique. Le foie occupe une place prépondérante dans le métabolisme en général au niveau de l'organisme et dans le maintien de l'homéostasie dans les conditions de stress. Le caractère des changements dans la composition des lipides et dans l'activité de l'enzyme étudiée comme réponse à l'action des sels de cobalt et de mercure *in vitro* coïncide avec ce qui se passe dans l'organisme en général au cours de l'adaptation au stress

Tableau 1 : Composition des lipides (n. mol / 3.10⁶ cellules) dans les hépatocytes au cours de leur incubation en présence de Hg Cl₂ ou de CoCl₂

LIPIDES	TEMPS D'INCUBATION								
	0 minute			2 minutes			10 minutes		
	Contrôle	HgCl ₂	CoCl ₂	Contrôle	HgCl ₂	CoCl ₂	Contrôle	HgCl ₂	CoCl ₂
phosphatidylcholine	37,5±0,8	-	-	37,7±0,4	40,08±1 ^a	37,8±0,8	32,5±1,9 ^o	42,4±0,5 ^a	46,4±1,5 ^a
phosphatidyléthanolamine	25,9±0,8	-	-	26,3±0,6	27,3±0,5	28,0±0,8	25,6±0,9	30,1±0,5 ^a	27,3±0,4
phosphatidylinositol + phosphatidylsérine	17,0±0,68	-	-	16,3±0,6	18,6±0,6	17,8±1,0	15,3±0,5	16,5±0,3	17,8±0,4
sphingomyéline + lysophosphatidylcholine	13,9±1,0	-	-	13,9±1,0	15,1±1,4	15,3±0,9	12,6±0,8	15,5±0,7	18,6±0,6
triacylglycérol	37,2±0,3	-	-	37±0,6	36,2±0,5	36,5±0,3	35,4±0,4	32,9±0,4 ^a	34,1±1,1
acides gras libres	27,5±0,7	-	-	27,3±0,5	27,8±0,3	27,3±0,4	27,4±0,5	35,1±1,1 ^a	31,3±2,1
cholestérol	18,1±0,9	-	-	18,8±0,6	21,8±0,6 ^a	20,5±0,9	17,6±0,6	30,9±0,4 ^a	26,3±0,0 ^a
Ether de cholestérol	0,14±0,8	-	-	0,15±0,2	0,12±0,01	0,10±0,01	0,12±0,1	0,09±0,01 ^a	0,07±0,01 ^a

P < 0,05 (par rapport à 2 min) ; a) P < 0,05 (par rapport au contrôle)

Tableau 2 : Influence des chlorures de mercure et de chlorure de cobalt sur l'activité de la 5'- mononucléotidase des hépatocytes de rats (n-mol Pi /3. 10⁶ Cellules /min)

CONDITION D'EXPERIENCE	TEMPS D'INCUBATION			
	0 min	2min	5min	10 min
Contrôle	5,5±0,07	6,3±0,8	6,4±0,9	6,5 ±0,9
HgCl ₂		7,6 ± 0,7	8,5±0,8	9,8±0,8 ^a
CoCl ₂		7,1± 0,8	7,5 ± 0,9	9,3 ±1,0 [*]

P < 0,05 par rapport au contrôle

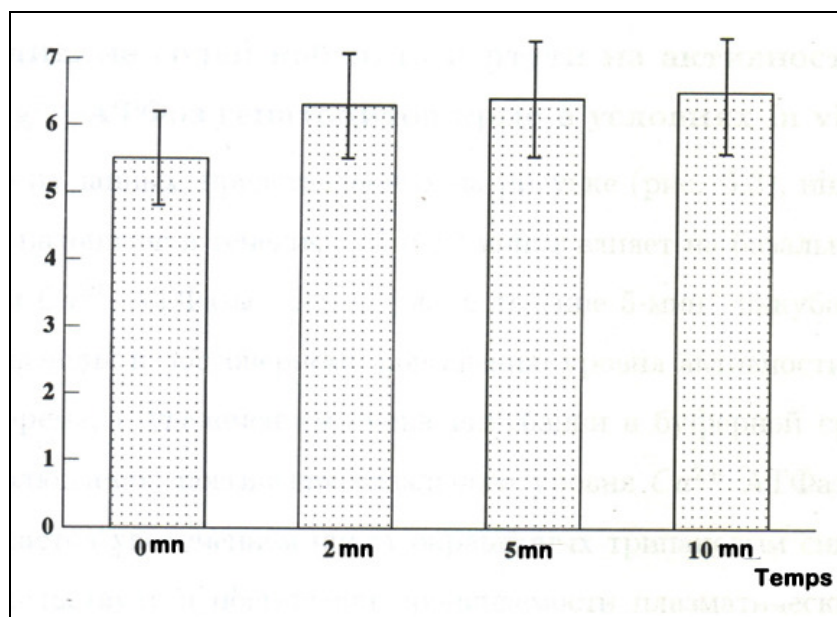
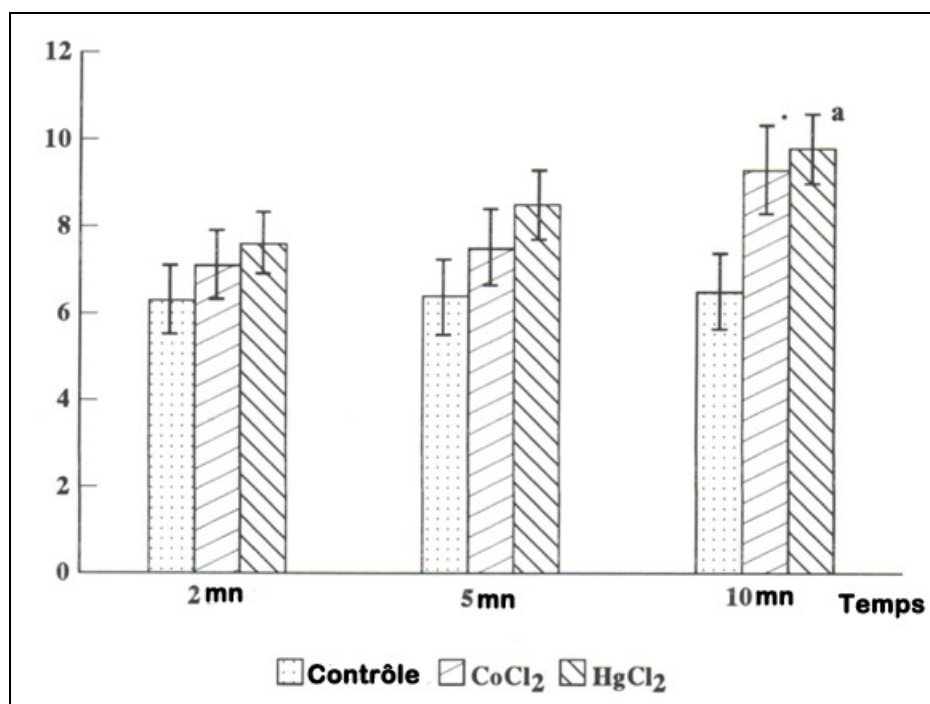


Figure 1_ Niveau basal de l'activité de la 5'-mononucléotidase des hépatocytes des rats.(n.mol Pi / 3. 10⁶ cellules par minute) n = 8



a - p < 0,05, de manière significative comparativement au contrôle

Figure 2 : Effet du chlorure de cobalt et du chlorure de mercure sur l'activité de la 5'- mononucléotidase des hépatocytes de rats dans les conditions in vitro (n.mol Pi / 3. 10⁶ cellules par 1 minute), n=8.

CONCLUSION

Il ressort de ces travaux, une réponse précoce des métaux lourds sur les hépatocytes isolés. Ainsi, déjà au bout des 2 premières minutes d'incubation en présence des ions de cobalt ou de mercure, l'impact de ces agents s'est manifesté par les dommages sur la membrane plasmique des hépatocytes (augmentation

du nombre de cellules colorées au bleu de Trypan dans les préparations obtenues). Cet effet précoce est plus prononcé dans le cas du chlorure de mercure, que de celui du chlorure de cobalt ; on note en effet, un changement dans le même sens de l'activité de la 5'-mononucléotidase et du spectre des lipides. Sous l'effet

des métaux lourds, les cellules du foie tentent d'opposer une réaction de compensation adaptative

visant à limiter le stress provoqué par la perturbation au niveau de la structure membranaire des hépatocytes.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdel-Latif A.A. 1986. Calcium-mobilizing Receptors, Polyphosphoinositides, and the Generation of second messengers .Pharmacol. Rev -38 (3):227-278.
- Baker A.J.M. and Walker P.L., 1989. Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. In: Heavy metal tolerance in plants -Evolutionary aspects. Shaw, A. (Eds). CRC Press, 155-177.
- Berridge M.J., Heslop J.P., Irvine R.F., Brown K.D., 1984. Inositol triphosphate formation and calcium mobilization in swiss 3T3 cells in response to plate derived growth factor. *Biochem.J.* 222 (1):195- 201.
- Berry M.N., Edwards A.M., Barritt G.J., 1991. Isolated hepatocytes, preparation, properties and application. Elsevier, New-York.
- Cot M., 2006. Études physiologiques de l'adaptation et de la résistance de la levure *Saccharomyces cerevisiae* au cours de la production intensive d'éthanol. Thèse de Doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, 81-83.
- Do Carmo S., 2009. Étude fonctionnelle de l'apolipoprotéine D humaine en situations de stress. Thèse de Doctorat., Université du Québec, Montréal, 37-38.
- Jouhet J., 2005. Étude des remaniements lipidiques des cellules végétales en carence de phosphate. Thèse de Doctorat., Université Joseph Fourier- Grenoble I.
- Klassen C.D., Watkins J.B., 2003. Essentials of toxicology Casarett and Doull's. USA : The McGraw-Hill Companies.
- Kouhar V.P., Louik A.I., Moguilévitch S.E. et al. ,1991. La chimie des procédés bio régulateurs. *Naoukova Dumka*, 367p. (Traduit du russe)
- Lalogo, H. 1992. Concentration de certains métaux d'importance médicale dans les poissons: cas des poissons de la lagune de Lomé. Mémoire de Technicien Supérieur en Génie Sanitaire (EAM), UL, 36 p
- Lesko L., Donlon Marinetti G.V., Hare J.D. ,1973. A rapid method for isolation of rat liver plasma membranes using an aqueous two-phase polymer system. *Biochem.et Biophys. Acta.* 311 (2) :173-179.
- Loué A., 1993. Oligo-éléments en agriculture. Ed. Nathan (ed), 45-177. Kanaevaia I.P, Kariakin A.B, Alénitchéva T.B., 1975. Respiration et phosphorylation oxydative dans les cellules de foie isolées. *Cytologie*, 17(5): 545-551.
- Nemeth E.F., 1995. Ca²⁺- Receptor-dependent regulation of cellular functions .*News in physiological Sciences.*10 (2):1-5
- Rajesh P., Rajesh P., 2011. Isolation of rat hepatocyte using cold trypsinization method and total RNA isolation using hot SDS phenol extraction method. *International Journal of Current Pharmaceutical Research.* 3(1):
- Rojkovskii Y.V., Krassiun V.I., 1991. L'activité des enzymes - marqueurs et l'état de la matrice lipidique des membranes érythrocytaires en situation de stress et de correction médicamenteuse. *Ukr. Biochem. Journal*, 63 (4): 74-80.
- Smith C.D., Lane B.C., Kusaka I. et al. 1985. Chemoattractant receptorinduced hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in human polymorphonuclear leukocyte membranes: requirement for a guanine nucleotide regulatory protein. *J.Biol.Chem* - .260, (9):5875-5878.
- Stephan J., Mailaender C., Etienne G., Daffe M., Niederweis M., 2004. Multidrug resistance of a porin deletion mutant of *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob.Agents Chemothe.* 48:4163-4170.
- Vasiliév I.M. 1983. L'activité biologique des sels de métaux lourds dans les cellules de mammifères / mutagenèse et réparation dans le système virus-cellule – M.: Science, .95-114. (Traduit du Russe).
- Zacks L., 1976. Traitement statistique. Statistique. M., 598p. (Traduit du Russe).