

THESE
PRESENTEE A
L'UNIVERSITE DE BORDEAUX 1

ECOLE DOCTORALE

« Sciences du Vivant, Géosciences et Sciences de l'environnement »

par Sébastien Cambier
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR
SPECIALITE : Ecotoxicologie

Impact d'une contamination au méthylmercure par voie alimentaire sur l'expression génétique, la bioénergétique, et la reproduction chez le poisson zèbre *Danio rerio*.



Thèse soutenue le 15 décembre 2009

Devant le jury composé de :

M. F. Leboulenger	Professeur, Université du Havre	Rapporteur
M. P. Bustamante	Professeur, Université de la Rochelle	Rapporteur
M. J. Cachot	Professeur, Université Bordeaux 1	Examineur
M. D. Brèthes	CR CNRS, HDR	Examineur
M. P. Gonzalez	CR CNRS, HDR	Directeur de Thèse
M. J.P. Bourdineaud	Professeur, Université Bordeaux 1	Directeur de Thèse

Remerciements

Je tiens à remercier le professeur Jean-Charles Massabuau pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe GEMA mais aussi pour ses astuces et les systèmes D très pratiques en expérimentation.

Je remercie le professeur Jean-Paul Bourdineaud pour avoir accepté de m'encadrer et diriger tout au long de ces trois années de thèse. Je tiens également à le remercier pour sa gentillesse et son humour tout aussi bien que pour ses connaissances scientifiques et ses précieux conseils qui couvrent de larges domaines. Je le remercie également pour les opportunités d'enseignement en travaux pratiques et dirigés, volontaires et involontaires, qu'il m'a donné.

Un grand merci à Patrice Gonzalez qui m'a également encadré et dirigé tout au long de cette thèse. Je te remercie pour tes conseils et tes réponses à mes multiples questions pas forcément limitées à la biologie moléculaire ainsi que pour ta confiance. Outre ses qualités scientifiques je tiens également à souligner ses grandes qualités humaines que sont sa gentillesse et sa grande disponibilité, et bien sûr sans oublier sa capacité surprenante à toujours avoir un carré de chocolat sous la main.

Je suis particulièrement reconnaissant envers Daniel Brèthes de m'avoir accueilli au sein de l'IBGC pour de longues journées et initié au monde de la biochimie et de la bioénergétique.

Merci à Olivier Simon de bien avoir voulu se déplacer sur Arcachon et d'avoir partagé ses connaissances concernant la reproduction des poissons zèbres. Tu possèdes en effet des compétences bien singulières dans ce domaine car ta simple présence a amené les poissons à se reproduire.

Merci à Gilles Durrieu pour ses conseils avisés concernant les analyses statistiques que j'ai été amené à faire. Je tiens également à te remercier pour ton aide dans le monde obscur et énigmatique de la programmation.

Mes remerciements vont également à l'ensemble de l'équipe, et tout particulièrement Nathalie, Pierre et Bruno pour leur humour et leur gentillesse.

Je fais un clin d'œil tout particulier à Florence et à Cathy pour leur bonne humeur et leur aide quotidienne pour passer outre les méandres administratifs qui sont si nombreux et surgissent toujours où on les attend le moins.

Je tiens aussi fortement à remercier les doctorants qui partagent le même challenge que moi : Mohamedou, Ika, Adeline, Simona, Sophie et Nicolas

Je tiens également à remercier sincèrement ma famille pour son soutien et son réconfort. Je tiens également à remercier mes amis qui ont été pour moi une bouffée d'air pur tout au long de cette thèse.

Et enfin un énorme merci à toi mon ange pour ton soutien permanent et ta gentillesse et cela malgré la distance et de bien avoir voulu me partager avec mes recherches se prolongeant bien souvent pendant les weekends.

Sommaire

Introduction	p 1
I/ Les différents sites pollués par le Hg	p 2
II/ Le cycle biogéochimique du Hg	p 6
A/ La spéciation chimique du mercure	p 6
B/ Les transformations chimiques du mercure dans les milieux aquatiques	p 6
1/ Les réactions d'oxydoréduction	p 6
2/ Les réactions de méthylation-déméthylation du mercure	p 8
III/ Bioaccumulation et bioamplification du mercure dans les organismes aquatiques	p 10
A/ La bioaccumulation du Hg par les organismes aquatiques	p 10
B/ Biodisponibilité du Hg, interactions et transferts au travers des barrières biologiques	p 11
C/ Impacts cellulaires d'une exposition au MeHg	p 14
D/ Mécanismes de protection des organismes contre le mercure	p 16
IV/ Problématique	p 17
Matériel et méthodes	p 19
I/ Modèle biologique	p 20
II/ Contamination de la nourriture	p 20
III/ Contamination des poissons	p 21
IV/ Dosage Hg	p 21
V/ Génétique	p 22
A/ Méthode appliquée au clonage d'un gène d'intérêt et à l'étude de sa fonction	p 22
B/ Analyse de la génotoxicité du MeHg	p 26
C/ Analyse de la réponse génétique des tissus à une exposition au MeHg	p 29
D/ Analyse du profil de l'expression génétique d'un tissu par utilisation de la technique SAGE	p 31
VI/ méthodes biochimiques appliquées à l'analyse des impacts du MeHg sur les mitochondries	p 37
A/ Respiration sur fibres musculaires perméabilisées	p 37
B/ Respiration sur cerveau	p 39
C/ Isolement de la fraction mitochondriale	p 39

D/ Le western-blot	p 40
VII/ Analyses histologiques appliquées à l'étude des fibres musculaires et du cerveau du poisson zèbre	p 40
A/ Préparation des échantillons pour la microscopie optique et électronique	p 40
B/ L'autométallographie	p 41
VIII/ Etude de la reproduction des poissons	p 41

Chapitre 1 : Analyse de la génotoxicité du MeHg dans le muscle squelettique et le cerveau p 42

1-I/ Utilisation de la RAPD et de PCR quantitative en temps réel pour détecter les effets génotoxiques du MeHg	p 43
1-II/ Validation de l'utilisation de la technique RAPD par l'étude de la génotoxicité d'un autre métal : le cadmium	p 50

Chapitre 2 : Approche génétique de l'impact de la contamination au méthylmercure p 83

2-I/ Analyse SAGE sur le muscle squelettique	p 85
2-II/ Exploitation expérimentale à partir des données SAGE : le cas de Laptm4 α	p 111
2-III/ Analyse génétique de voies spécifiques du système nerveux central	p 115

Chapitre 3 : Analyse des effets histologiques et bioénergétiques d'une contamination par le méthylmercure p 122

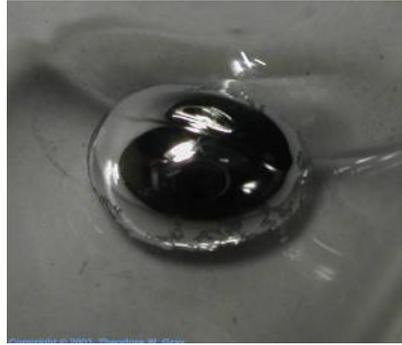
3-I/Etude sur fibre musculaire	p 123
3-II/Etude sur le cerveau	p 133

Chapitre 4 : Impact du méthylmercure sur la reproduction du poisson zèbre p 138

Conclusion et Perspectives p 146

Références bibliographiques p 152

Annexes p 173



Introduction



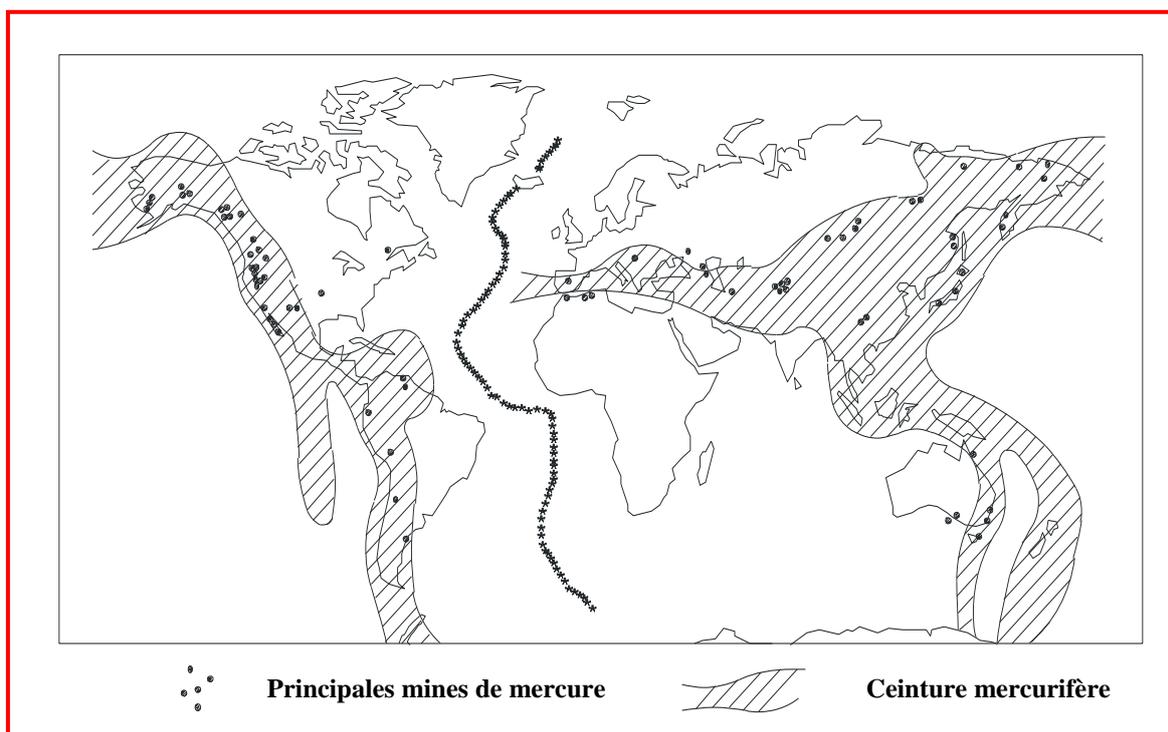


Figure 1 : Localisation des différentes zones mercurifères de la planète et des principales mines de mercure (d'après Beneš et Havlík, 1979, modifié).

I/ Les différents sites pollués par le Hg.

Le mercure (Hg) est un métal présent naturellement dans les sols. Cependant ce métal n'est pas réparti de façon homogène dans l'écorce terrestre, il se trouve naturellement concentré au niveau de certaines zones géologiques dites actives formant ainsi les « ceintures mercurifères » (Figure 1). Cette zone mercurifère se trouve principalement au niveau de différentes failles autour du Pacifique, la faille himalayenne et le bassin méditerranéen ainsi que le long de la dorsale atlantique. Le mercure se retrouve également, à des concentrations supérieures au bruit de fond géologique, dans des zones extérieures à cette ceinture comme par exemple les régions nord-tempérées et boréales (Suède, Finlande, Nord Québec...) ainsi qu'en Arctique. Dans ces zones, cette forte concentration est liée aux dépôts atmosphériques de Hg issu de sources naturelles (érosion des sols, activités volcaniques, feux de forêts, sources biogéniques ...) et anthropiques (industries, urbanisme ...), ces dernières étant l'agent principal du cycle atmosphérique global des métaux toxiques (Nriagu JO 1979). Cette répartition à l'échelle globale indique un cycle biogéochimique complexe du Hg (Figure 2) dépendant directement des flux atmosphériques qui transportent les formes volatiles. La forme la plus volatile du Hg est le mercure élémentaire (Hg^0) qui est issu du dégazage de la croûte terrestre et des océans enrichissant ainsi l'atmosphère en mercure Hg^0 gazeux. Dans le compartiment atmosphérique se retrouve également du mercure réactif gazeux qui correspond aux formes gazeuses du mercure inorganique Hg^{2+} . Ce Hg(II) se trouve associé avec des particules ou sous forme gazeuse le plus probablement sous forme HgCl_2 , $\text{Hg}(\text{OH})_2$, ou encore complexé à d'autres halogénures. Ces différentes formes de Hg possèdent des temps de résidence différents dans l'atmosphère, 1 à 2 ans pour Hg^0 alors que le Hg(II) quant à lui n'y réside que quelques jours. Le Hg(II) relargué dans le compartiment atmosphérique est majoritairement issu des fumées industrielles et autres activités anthropiques. Ces formes réactives de Hg(II) vont pour une grande partie se déposer sous forme de dépôts secs ou encore par l'intermédiaire de précipitations aux alentours des pôles d'émission telles que les industries (Lindberg *et al.*, 1998). Ces espèces vont également être soumises à un transport atmosphérique qui aura pour conséquence leurs dépôts dans des régions éloignées expliquant ainsi la présence du Hg dans les sols et les lacs des régions nord tempérées mentionnées précédemment. Dans ces régions, le mercure a été retrouvé en de fortes concentrations dans les poissons issus des lacs et cours d'eau (Evans *et al.*, 2005).

A travers le monde plusieurs cas de contamination de populations humaines par le mercure ont été recensés. Il y a tout d'abord le tristement célèbre cas de Minamata au Japon, il

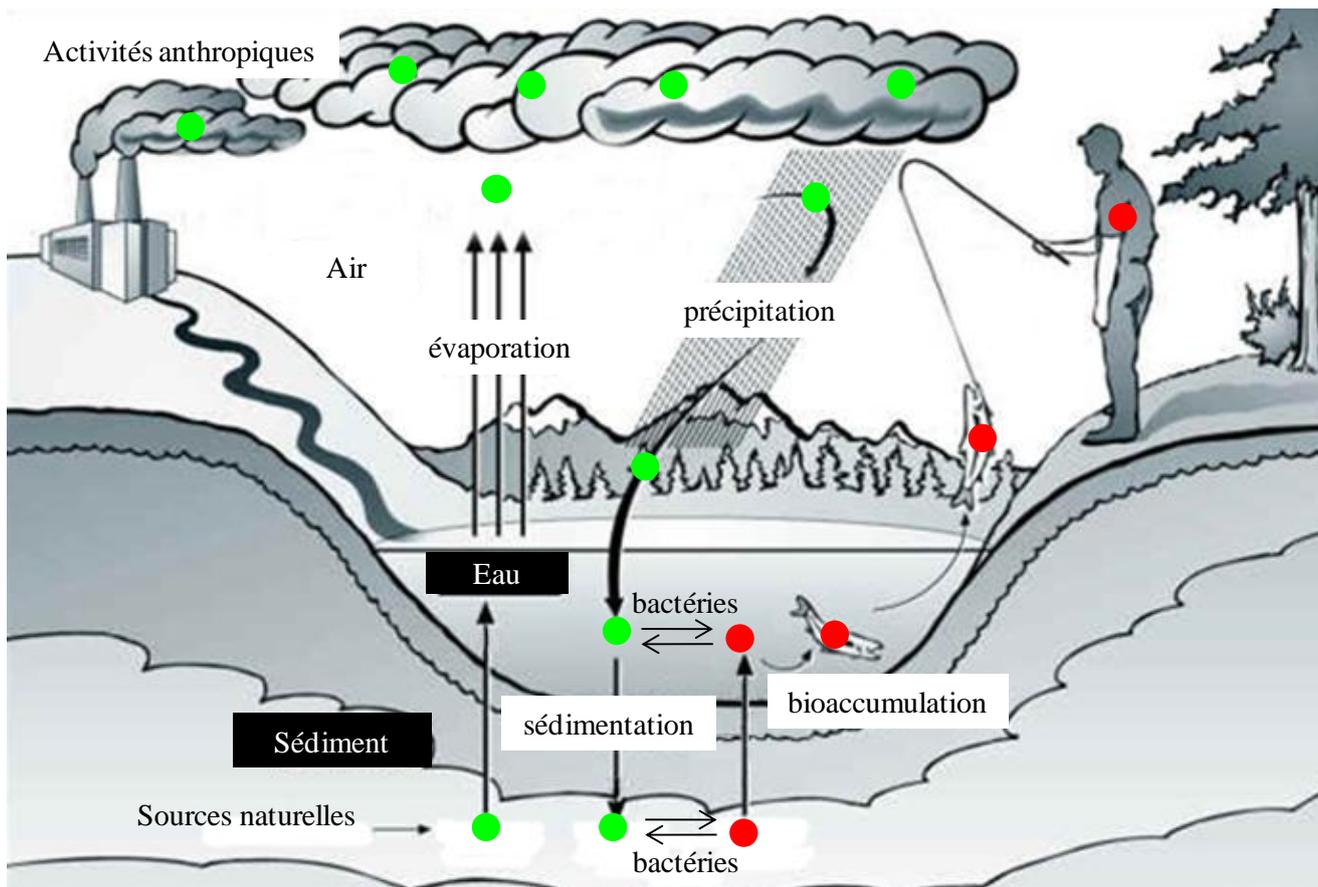


Figure 2 : Cycle biogéochimique du mercure

● : mercure élémentaire (Hg^0) et inorganique ($Hg(II)$)

● : méthylmercure ($MeHg$)

y a ensuite le cas de l'Irak, les cas des îles Féroé et des Seychelles et enfin le cas du bassin amazonien avec plus particulièrement la Guyane française.

Ces diverses intoxications au Hg sont liées à une consommation d'aliments contaminés au Hg. Dans la majorité des cas les aliments contaminés par le Hg sont les organismes aquatiques avec l'exception de l'Irak où l'intoxication par le mercure fut causée par la consommation de farine fabriquée avec du blé traité avec des alkyls de mercure (méthyl et éthylmercure) utilisés comme fongicides en 1971 (Bakir *et al.*, 1973). Cette contamination a conduit à 6530 cas d'empoisonnement recensés avec 459 décès.

Dans le cas de Minamata, au Sud-ouest du Japon sur l'île de Kyushu, la contamination de la baie par le MeHg a été la conséquence de l'implantation d'une usine de fabrication d'acétaldéhyde (Chisso Co. Ltd) dont l'une des étapes de la synthèse conduit à la génération de MeHg. Ce MeHg était relargué dans la baie de Minamata et s'est bioaccumulé dans les différents organismes aquatiques de la baie (5,61 à 35,7 µg/g de Hg) qui étaient alors consommés par les habitants de l'agglomération de Minamata et du littoral de Shiranui. A la suite de cette contamination alimentaire par le MeHg, les habitants de la baie de Minamata ont commencé à présenter des symptômes tels qu'une perte au niveau de l'audition, une constriction de leur champ visuel, une diminution de leur sensibilité au toucher, des tremblements ou encore une perte de coordination au niveau de leurs membres (Ekino *et al.*, 2007). Tous ces symptômes ont été déclarés comme étant la conséquence de l'intoxication au MeHg et furent regroupés sous l'appellation de la maladie de Minamata. Ces symptômes ont également été retrouvés lors de l'intoxication des familles irakiennes.

Les cas de contamination de l'Irak et de Minamata sont la conséquence de fortes concentrations d'exposition au Hg. Les autres contaminations sont, quant à elles, liées à de moins fortes expositions mais conduisent tout de même à des taux élevés de Hg chez les individus exposés.

Dans les cas des îles Féroé et des Seychelles, du nord canadien, ainsi que dans le bassin amazonien, les populations les plus contaminées sont celles présentant un régime alimentaire riche en poisson et plus précisément les poissons piscivores. La contamination des populations des Iles Féroé est liée à la consommation de viande de baleine (12 g par jour) et de poissons (72 g par jour) ce qui représentent 9,5% et 44% de leur repas. Le poisson principalement consommé dans ces îles est le cabillaud qui à une concentration moyenne en Hg de 0,07 µg/g. Pour ce qui concerne le muscle de baleine la concentration moyenne en Hg est de 3,3µg/g. Il est tout de même important de souligner que le mercure présent dans le cabillaud se trouve uniquement sous la forme méthylmercure et que le mercure présent chez

la baleine est au moins pour moitié sous sa forme méthylée. Des études sur les impacts de cette contamination par le Hg au sein de la population des îles Féroé ont montré des déficits neuropsychologiques chez des enfants de 7 ans ayant subit une forte exposition prénatale au MeHg (Grandjean *et al.*, 1997, 1998, 2003; Murata *et al.*, 1999; Steuerwald *et al.*, 2000).

Il a aussi été montré que cette intoxication au Hg conduisait à des effets cardiovasculaires indésirables chez les hommes (Choi *et al.*, 2009). Cette dernière étude a tout de même mis en évidence un effet sur le système nerveux avec des atteintes du potentiel évoqué auditif du tronc cérébral (PEATC). Le PEATC est formé de potentiels électriques de très petits voltages qui sont enregistrés en réponse à des stimuli auditifs avec des électrodes sur le crâne.

En revanche dans les Seychelles, malgré la contamination de la population par le mercure à hauteur de 6,6 µg/g dans les cheveux, aucune analyse n'a permis de déterminer un possible impact neurotoxique de cette contamination mercurielle (Myers et Davidson, 1998 ; Myers *et al.*, 2003). Mais chez des individus âgés de 15 ans la pression sanguine diastolique augmente de façon concomitante au niveau d'exposition prénatale au MeHg (Thurston *et al.* 2007)

Le bassin amazonien qui se trouve être éloigné de la ceinture mercurifère présente des concentrations très faibles en Hg dans la roche mère de l'ordre de 4 à 6 ng.g⁻¹ en moyenne, mais montre de fortes concentrations en mercure dans les couches supérieures de ces sols, jusqu'à dix fois supérieures à celles mesurées en sols tempérés (Roulet et Grimaldi, 2001). Ce fort enrichissement en mercure dans les sols guyanais et du bassin amazonien est lié à l'érosion de la roche mère, aux apports atmosphériques de mercure inorganique et également à de fortes activités minières (surtout clandestines) pour l'extraction de l'or et de l'argent (Passos et Mergler, 2008). Ce mercure présent en grande quantité dans les sols du bassin amazonien, soit sous la forme Hg⁰ ou Hg(II) complexé aux oxy-hydroxydes de fer et d'aluminium, est drainé dans les cours d'eau par l'érosion et le lessivage de ces sols qui sont mis à nu à cause d'une activité agricole grandissante. Les activités d'orpaillage constituent une source additionnelle de mercure dans les cours d'eau car elles conduisent elles aussi à une forte érosion des sols et à leur déforestation. Ces activités minières amènent également à un relargage de mercure important par les mines abandonnées. Toutes ces sources de Hg mènent à un fort enrichissement des cours d'eau par ce métal qui finit par se bioaccumuler dans les différents échelons du réseau trophique aquatique. Cette exposition des poissons cause *in fine* la contamination de populations éloignées des sites d'orpaillage par leur alimentation très riche en poisson. Cette exposition au Hg est quantifiée pas le dosage du Hg dans les cheveux

qui constitue un bon indicateur de la contamination mercurielle. Ces dosages donnent une valeur moyenne de $13.5 \mu\text{g Hg.g}^{-1}$ dans les cheveux à l'exception des populations des villes qui ont une concentration moyenne de $3,6 \mu\text{g Hg.g}^{-1}$. Cette différence de contamination est liée aux différences de mode de vie entre les deux types de population car les citadins ont une alimentation plus variée que les indigènes qui mangent, principalement du poisson, entre 100 à 200 g par jour. De plus les indigènes mangent préférentiellement des poissons carnivores qui sont les plus contaminés en Hg et revendent en ville, sur les marchés, les autres poissons (herbivores et omnivores) qui sont moins contaminés (Passos et Mergler, 2008 ; Durrieu *et al.*, 2005). Au sein de ces populations contaminées par le mercure, des tests permettant de déceler de possibles atteintes neurotoxiques ont été menés. A l'issue de ces tests (Passos et Mergler, 2008), des déficits neurologiques ont été décelés à différents niveaux avec des impacts sur la vue, des atteintes des processus mnésiques ou/et des perturbations du tonus musculaire chez certaines populations. De tous ces exemples d'intoxication humaine par le Hg, il en ressort des déficits musculaires ainsi que des atteintes neurotoxiques ce qui semble montrer une certaine sensibilité du tissu musculaire et du système nerveux central face à ce métal. Qui plus est, des analyses de la spéciation du Hg chez les individus issus des populations exposées montrent que l'espèce du Hg majoritairement présente (95%) est le MeHg (Porcella, 1994).

Au travers de tous ces exemples, il ressort à quel point la contamination des milieux aquatiques par le Hg est un vrai problème de santé publique à l'échelle mondiale. Ces exemples montrent également que les écosystèmes aquatiques sont au cœur du problème du Hg et donc l'importance qu'il y a de comprendre les impacts de ce toxique sur ces milieux avec des études sur les impacts et les possibles adaptations d'organismes aquatiques tels que les poissons.

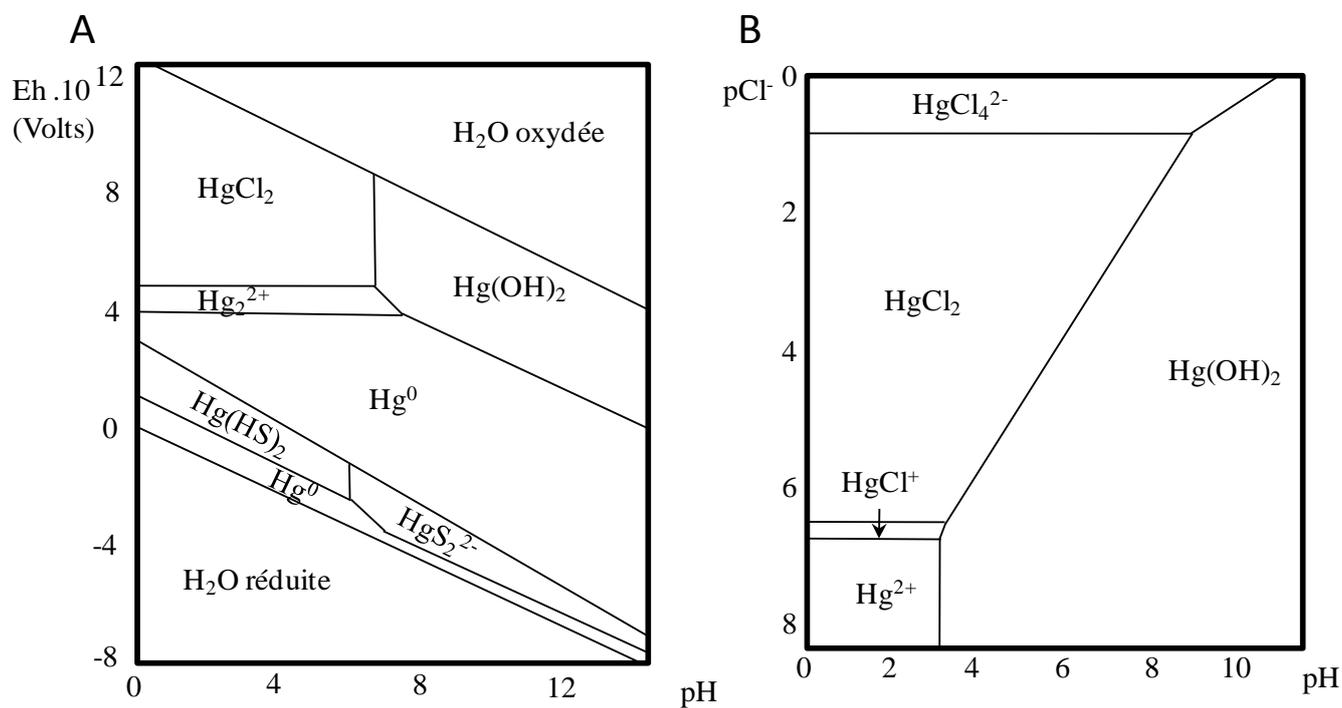


Figure 3 : Diagramme de spéciation du mercure inorganique :

A : en fonction du potentiel redox et du pH (d'après Hem, 1970)

B : en fonction de la salinité et du pH (d'après Lockwood et Chen, 1973)

II/ Le cycle biogéochimique du Hg.

Après cette importante prise de conscience durant les dernières décennies sur la contamination de divers milieux aquatiques par le Hg dans le monde, la compréhension du comportement du mercure dans ces milieux était un élément clé.

A/ La spéciation chimique du mercure

Dans ces écosystèmes aquatiques le Hg se présente sous différentes formes chimiques telles que le Hg^0 , le Hg(II) et le $(\text{CH}_3)\text{Hg}^+$. Tout comme les autres métaux, la spéciation de ce métal est dépendante des paramètres physico-chimiques du milieu, le pH, la conductivité, le potentiel redox et la salinité étant les paramètres majeurs définissant les formes chimiques du mercure. De manière générale, la spéciation du métal est contrôlée par les paramètres physico-chimiques du milieu, le pH, le potentiel redox et la salinité étant les principaux facteurs influençant les réactions de complexation du Hg. Les nombreux diagrammes thermodynamiques de spéciation en solution - Eh/pH et pCl/pH (Figure 3) - montrent la formation préférentielle en phase dissoute de chlorocomplexes et de complexes hydroxylés dans les eaux bien oxygénées ; en conditions réductrices, les complexes soufrés sont les principales espèces formées. Cette spéciation du mercure par les paramètres physicochimiques est fortement influencée par la présence de matières organiques dissoutes, acides humiques et fulviques colloïdaux (Ravichandran, 2004). Le Hg(II) va se comporter comme les métaux divalents et va être en grande partie piégé par des matières en suspension (M.E.S) sur lesquelles il va s'adsorber (Coquery *et al.*, 1997). Ces M.E.S pouvant être des oxy-hydroxydes (Kim *et al.*, 2003), des argiles et des détritiques organiques divers (Cattani *et al.*, 2009 ; Ravichandran, 2004). Le mercure est également fortement lié au fer et au manganèse montrant ici l'importance des oxy-hydroxydes dans le transport du Hg dans les cours d'eau (Quémerais *et al.* 1998). L'ensemble des espèces chimiques du Hg ainsi que leurs complexes se caractérisent par un transport, une sédimentation et un piégeage modifiant ainsi leur biodisponibilité vis-à-vis des différents organismes aquatiques.

B/ Les transformations chimiques du mercure dans les milieux aquatiques

1/ Les réactions d'oxydoréduction

Le Hg se retrouve principalement sous sa forme inorganique dans les écosystèmes aquatiques. Cette forme inorganique va se complexer différemment suivant la salinité de l'eau, il va également être soumis à la charge et à la nature des M.E.S du milieu. En plus de

ces paramètres les milieux aquatiques présentent une forte diversité de conditions abiotiques et biotiques qui vont avoir une emprise importante sur les formes chimiques de ce métal.

Le Hg^0 est un métal liquide à température ambiante, c'est aussi un métal lourd qui présente la particularité d'être volatil à température ambiante, phénomène qui augmente avec la température, ce qui explique le rôle important du compartiment atmosphérique dans la propagation du mercure issu des activités anthropiques sur divers sites dans le monde qui peuvent être très éloignés des sources d'émission (INRS, 1999). Par exemple, 1 m³ d'air est saturé par 15 mg de mercure vaporisé à 20°C, et 68 mg à 40°C (Lauwerys, 2000). Ce Hg^0 présente également la faculté de s'amalgame avec d'autres métaux comme les métaux précieux (l'or et l'argent). Cet amalgame pouvant être dissocié par chauffage permettant de volatiliser le Hg^0 . Cette forme Hg^0 est très peu hydrosoluble ($56,7 \cdot 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ à 20 °C) et ne se retrouve quasiment pas dans la colonne d'eau. Un équilibre s'établit entre le mercure non dissous, le mercure en solution et les vapeurs de mercure, si bien que l'eau ne constitue pas une protection contre les vapeurs de mercure (INRS, 1999) :



La forme Hg(II) est très peu volatile et se trouve majoritairement dans les milieux aquatiques et les sols. Le Hg(II) va se complexer à une forte diversité de ligands suivant les propriétés physicochimiques (pH, T°, propriété oxydoréductrice...), la charge en matière organique dissoute ainsi que la charge en M.E.S.

Les formes chimiques prédominantes du Hg(II) dans les eaux de surfaces sont le Hg(OH)_2 et le HgCl_2 . Le mercure inorganique présente une forte affinité pour les fonctions R-SH ainsi que le soufre. Cette forte affinité pour le soufre peut conduire à la précipitation du mercure sous la forme de cinabre qui est insoluble.

Ce mercure inorganique peut être à nouveau réduit sous la forme Hg^0 par les UV (Beucher *et al.*, 2002) ce qui représente un phénomène naturel important conduisant à une baisse de la concentration en mercure dans l'eau avec son retour dans le compartiment atmosphérique et donc limite sa précipitation dans les sédiments où il peut être méthylié. La réduction de ce Hg(II) est également le résultat d'activités biologiques. Il a été observé que dans les eaux cette réduction se faisait essentiellement par des organismes de taille inférieure à 3 µm. Dans les eaux salées et les eaux douces des expérimentations ont montré que le phytoplancton a une activité réductrice du Hg(II) mais ne permet pas d'en expliquer la totalité. Dans les eaux salées, les cyanobactéries telles que *Synechococcus* pourraient aussi

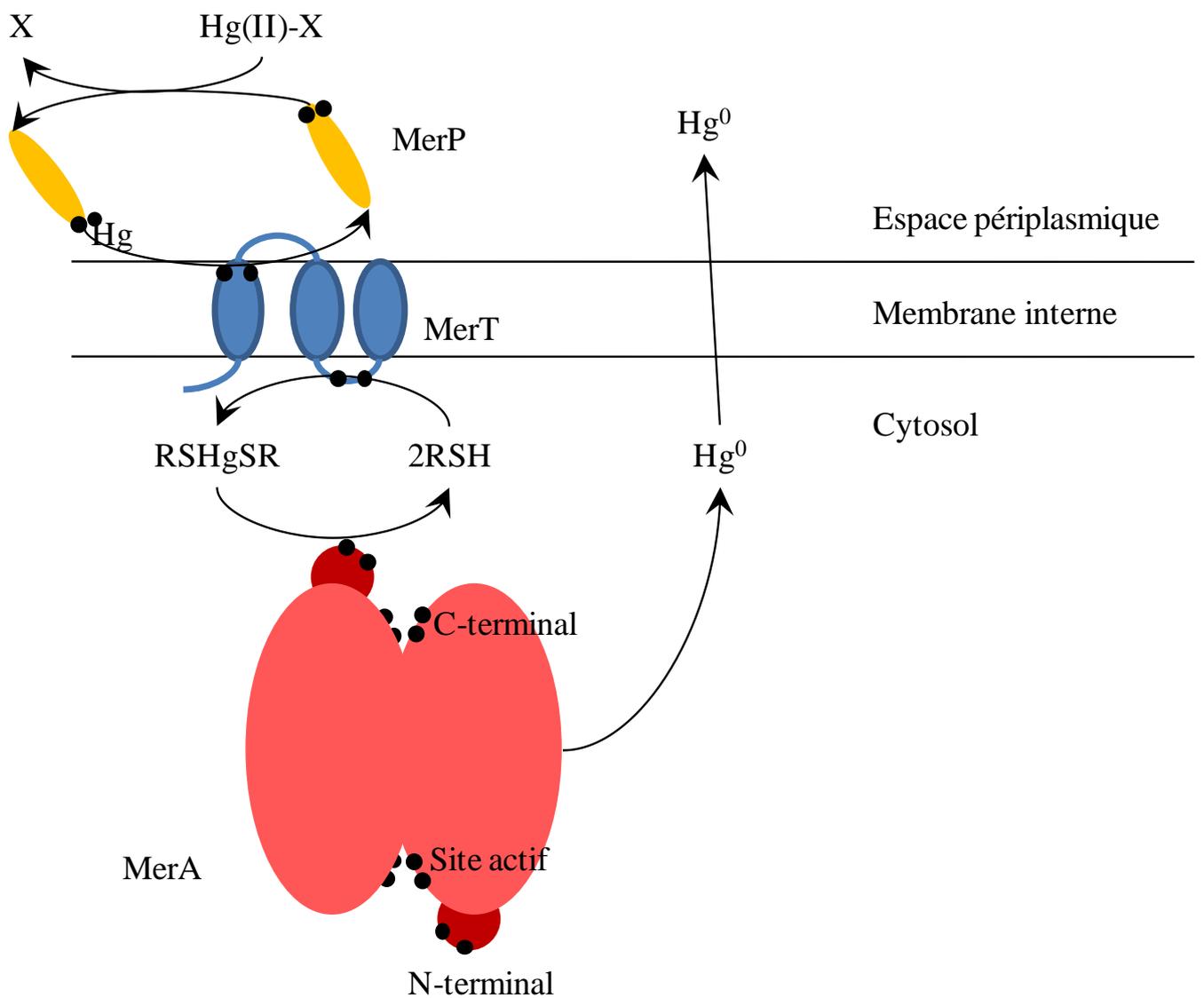


Figure 4 : Réduction du mercure inorganique par les bactéries Gram négatives (d'après Barkay et al., 2003). Les points noirs correspondent à des cystéines. RSH désigne des éléments de petite taille présents dans le cytosol porteur de groupement thiol tel que le glutathion et la cystéine.

être d'importants réducteurs de Hg(II) (Lefebvre *et al.*, 2007). Mais les bactéries sont pressenties comme les réductrices majeurs du mercure (Mason 1995 et Fantozi 2009). Cette réduction du mercure inorganique chez les bactéries repose sur des voies enzymatiques contrôlées par le promoteur MerR (metal responsive regulator). Ces voies enzymatiques impliquent l'enzyme MerA (mercuric reductase enzyme) qui permet de réduire Hg(II) en Hg⁰ en utilisant le NAD(P)H comme réducteur, la protéine MerP, une petite protéine périplasmique qui piège le Hg(II), et la protéine MerT qui transporte le Hg(II) à l'intérieur de la bactérie (Barkay *et al.*, 2003) (Figure 4).

Outre les réactions de réduction, le mercure inorganique est également soumis à des réactions de méthylation conduisant à la synthèse du méthylmercure, la forme la plus toxique de ce métal. Ces réactions de méthylation peuvent être biotiques et abiotiques.

2/ Les réactions de méthylation-déméthylation du mercure

Dans l'environnement le mercure est transformé en méthylmercure quand le mercure inorganique se retrouve complexé avec un groupement méthyl (CH₃). Cette transformation peut être le résultat de réactions abiotiques et biotiques et aussi d'un couplage des deux procédés. Le méthylmercure est la forme la plus toxique du mercure vis-à-vis des êtres vivants à cause de ses propriétés liposoluble et ionique lui conférant la capacité de passer les membranes cellulaires.

Les microorganismes capables de méthyler le mercure se trouvent sous conditions aérobies et anaérobies. Il est toutefois intéressant de noter que les zones privilégiées pour la formation du MeHg sont les interfaces entre les zones aérobies/anaérobies aquatiques (sédiments, hypolimnion des lacs ...) (Regnell *et al.*, 1996, 1997).

Deux groupes distincts de microorganismes permettent la majeure partie de la synthèse du MeHg : les bactéries sulfato-réductrices (BSR) (Compeau *et al.*, 1985) et les bactéries ferro-réductrices (Kerin *et al.*, 2006). La méthylation du mercure par les BSR est liée à la présence d'une coenzyme, la méthylcobalamine, qui est capable de convertir le Hg(II) en MeHg (Robinson *et al.*, 1984). Parmi ces BSR la souche *Desulfovibrio desulfuricans* qui utilise l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) et la vitamine B12 comme voie principale du métabolisme du carbone méthylerait le mercure par cette même voie. Cette voie de méthylation du mercure ne serait pas la seule envisageable chez les BSR car certaines d'entre elles, ne présentant pas d'acétyl-CoA, possèdent également la faculté de méthyler le Hg(II) (Ekstrom *et al.*, 2003). Ces mêmes auteurs semblent avancer l'hypothèse que la vitamine B12 ne serait pas indispensable à la synthèse du MeHg car après avoir exposé des BSR à du

chloroforme, qui inhibe cette vitamine en se liant au niveau du cobalt, ces dernières conservent leur capacité de méthylation. Quelques données semblent montrer que le groupement méthyle proviendrait de la sérine (Berman *et al.*, 1990). La voie métabolique de la méthyle transférase est également impliquée dans les processus de méthylation du Hg(II) grâce aux processus biologiques permettant la synthèse de la méthionine par utilisation de l'homocystéine (Siciliano et Lean, 2002).

Même si les BSR sont considérées comme les principales bactéries responsables du processus de méthylation, il devient de plus en plus évident que d'autres microorganismes anaérobies sont impliqués dans ce processus. Il y a par exemple les bactéries ferro-réductrices qui présentent une activité non négligeable dans le processus de synthèse du MeHg qui peut parfois être comparable à certaines BSR avec le cas de la souche *Geobacter sp* CLFeRB (Fleming *et al.*, 2006). Il faut tout de même souligner que ces processus de méthylation biologique sont intimement liés à la complexation du mercure inorganique dans l'eau. Cette observation est à la fois applicable aux BSR et aux bactéries ferro-réductrices. La capacité des BSR à méthyler le mercure dépend de la complexation du Hg(II) car la concentration optimale en sulfate à laquelle les BSR produisent du MeHg est de 0,3 mM (Gilmour *et al.*, 1992), alors qu'à 5 mM ce processus est complètement inhibé (Weber, 1993). Pour ce qui est des bactéries ferro-réductrices la complexation du Hg(II) va également avoir un impact sur le rendement de cette bactérie dans le processus de méthylation. La bactérie *Geobacter sulfurreducens* voit sa capacité à synthétiser du MeHg augmenter avec la présence de cystéine dans le milieu amenant la formation d'un complexe Hg-cystéine, alors que la présence d'autres composés possédant une fonction thiol (dithioerythriol, pénicillamine et le glutathion) ou encore le simple ajout d'ion chlorure empêche la synthèse du MeHg (Schaefer et Morel, 2009). Des processus de méthylation abiotique sont également possible dans les écosystèmes aquatiques et représentent une contribution significative dans la charge en MeHg dans la colonne d'eau et dans les sédiments (Rudd, 1995). Cette méthylation dans les écosystèmes aquatiques survient en présence des donneurs adéquats de groupement méthyle. Ces composés peuvent être des produits de processus biologiques mais la méthylation par ces composés est tout de même considérée comme abiotique. Ces composés chimiques permettant la méthylation du Hg(II) constituent un large éventail de réactifs : méthylétain, diméthylsulfure, et les composés organiques dissous acides fulviques et humiques. Celo *et al.* (2006) ont démontré que le méthylétain pouvait céder un groupement méthyle (CH₃) au Hg(II) et cela de façon privilégiée en milieu marin en raison du pH et de la présence de chlorure. Pour ce qui est des acides humiques et fulviques présents en abondance dans la

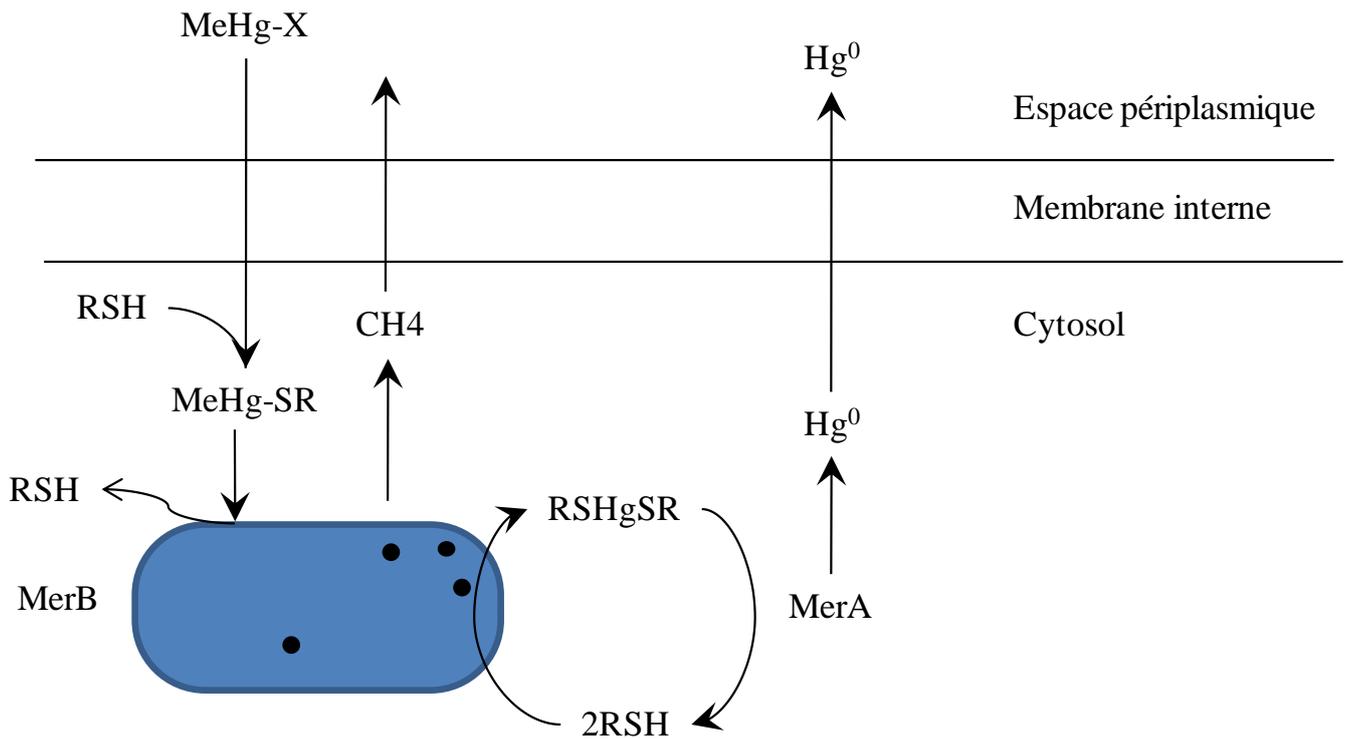


Figure 5 : Déméthylation du MeHg par utilisation de la protéine MerB chez les bactéries Gram⁻ (d'après Barkay *et al.*, 2003). Les points noirs correspondent à des cystéines. RSH désigne des éléments de petite taille présents dans le cytosol porteur de groupement thiol tel que le glutathion et la cystéine

fraction dissoute des eaux continentales (46 à 60 % du carbone organique dissous ; Coquery *et al.*, 1994 ; Weber *et al.*, 1988), ils sont capables en conditions acides de céder un groupement CH_3 au Hg (Lee *et al.*, 1985 ; Nagase *et al.*, 1982 ; Weber, 1993).

Ces processus de méthylation sont à leur tour contre-balancés par des réactions de déméthylation qui ont lieu à la fois dans les sédiments et dans la colonne d'eau. Ces réactions de déméthylation sont à l'image des réactions de méthylation, liées à des processus biologiques, principalement bactériens, et abiotiques. La déméthylation microbienne est bien caractérisée, cette réaction est faite par des bactéries résistantes aux composés organiques du mercure grâce à la présence d'un opéron *mer* possédant le gène de la lyase, appelée aussi MerB. Cette lyase permet de cliver la liaison carbone - mercure et produire ainsi du méthane et du Hg^{2+} . Conjugué à cette lyase se trouve souvent la réductase mercurique qui conduit à la synthèse de Hg^0 à partir du Hg^{2+} (Barkay *et al.*, 2003) (Figure 5). Des mécanismes abiotiques sont également impliqués dans la dégradation du MeHg. Il y a le cas de la photodégradation qui semble être le phénomène le plus important impliqué dans le cycle géochimique du Hg dans le cas des systèmes lacustres (Sellers *et al.*, 1996).

Dans l'environnement, la production de MeHg est donc le bilan de ces réactions de méthylation et de déméthylation.

III/ Bioaccumulation et bioamplification du mercure dans les organismes aquatiques

A/ La bioaccumulation du Hg par les organismes aquatiques

Les espèces les plus rencontrées du mercure dans les systèmes aquatiques sont le HgS, Hg(II) et le mercure méthylé, MeHg_x le *x* correspondant à différents composés présentant un groupement soufre pouvant établir une liaison avec le mercure. Ces différentes espèces du Hg pourront être en contact avec les organismes aquatiques par l'eau environnante, les sédiments et la nourriture. Plusieurs études ont été menées sur la bioaccumulation du mercure inorganique et du méthylmercure chez divers types d'organisme : microorganismes, invertébrés, poissons et mammifères marins. Les microorganismes montrent une grande variété de réponses leur permettant de rendre inactives les diverses espèces du mercure. Pour ce qui est des organismes invertébrés et des poissons, la nature du mercure a beaucoup d'influence sur le type d'organe ciblé et la rapidité de la bioaccumulation.

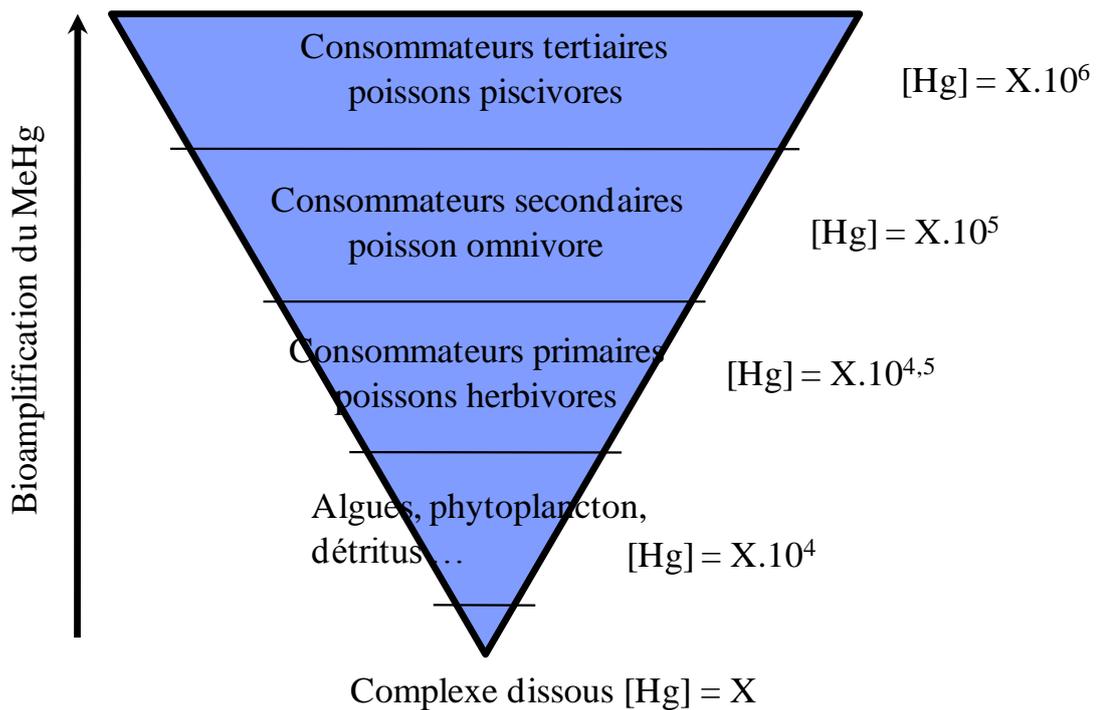


Figure 6 : Bioamplification du MeHg le long du réseau trophique aquatique (D'après Charlet et Boudou, 2002)

Chez les invertébrés le mercure se bioaccumule principalement dans les branchies et la glande digestive, de plus chez ces organismes le mercure se trouve en moyenne à 30,5 % sous le forme MeHg.

Chez les poissons, le mercure inorganique se retrouve à de fortes concentrations dans les reins, dans le foie et dans les branchies si cette contamination se fait par voie directe. Lors d'une contamination par le MeHg, les organes qui vont présenter la plus forte bioaccumulation vont être les reins et le foie suivi des muscles et du cerveau. Si l'exposition se fait par voie directe il y aura également bioaccumulation dans les branchies. Ces deux formes du mercure, Hg(II) et MeHg, peuvent être bioaccumulées par voie directe suivant la contamination de la colonne d'eau, mais le MeHg est généralement accumulé de façon plus efficace par la voie alimentaire par rapport à la forme inorganique (Boudou *et al.*, 1991). De plus le mercure inorganique se retrouve principalement dans le foie et les reins en vue d'être éliminé par excrétion. Pour ce qui concerne le méthylmercure il se retrouve moins excrété et beaucoup plus accumulé dans les muscles et le cerveau du poisson. Une partie de ce MeHg se trouve être dégradé dans le foie où l'on retrouve une partie du Hg sous sa forme inorganique (Gonzalez *et al.*, 2005 ; Burrows and Krenkel, 1973). Lors de l'analyse des concentrations en mercure dans les poissons, il a été remarqué que la concentration en mercure dans les poissons (à plus de 85 % sous la forme MeHg) augmente en fonction de leur position au sein du réseau trophique. Par exemple si l'on se réfère à l'étude menée par Dominique *et al.* (2007), ce phénomène de bioamplification du mercure le long de la chaîne trophique est bien visible dans le cas du réseau trophique du fleuve Sinnamary en Guyane française en amont de la retenue de Petit-Saut (Figure 6).

B/ Biodisponibilité du Hg, interactions et transferts au travers des barrières biologiques

La biodisponibilité du Hg dépend étroitement de sa forme chimique (Hg(II) et MeHg) dans l'environnement et des paramètres physicochimiques du milieu (T°C, salinité, pH, matières organiques dissoutes, etc...). D'autres facteurs liés à l'état physiologique de l'organisme contrôlant la capacité des métaux à traverser les barrières biologiques (peau et épithéliums branchial et intestinal) vont également avoir un rôle important dans le phénomène de bioaccumulation. Ces facteurs peuvent être les mécanismes de ventilation/respiration, de nutrition, la présence de mucus, l'état des membranes, le fonctionnement des protéines de transport et/ou canaux ioniques, ... (Boudou et Ribeyre, 1985). La bioaccumulation du Hg chez les êtres vivants est une combinaison entre la voie directe et la voie trophique.

Dans les sédiments, la forme du mercure la plus abondamment rencontrée est le mercure inorganique. Au contraire, le MeHg est présent à des concentrations extrêmement basses mais se retrouve au final bien plus accumulé dans les tissus des invertébrés benthiques. Le facteur de concentration du MeHg est 50 fois plus élevé que celui du Hg(II) chez le bivalve *Scrobicularia plana* (Bryan *et al.*, 1992).

Le mercure inorganique traverse moins facilement les barrières biologiques que le MeHg et présente un taux d'absorption au niveau de la barrière intestinale de l'ordre de 10% lors d'une contamination par voie alimentaire. Au contraire, la barrière du tractus intestinal ainsi que l'épithélium branchial sont très perméables au MeHg. Par exemple, un taux d'absorption de 76 à 86 % est observé dans le cas de la barrière intestinale chez la truite arc-en-ciel *Salmo gairdneri* (Boudou et Ribeyre, 1985).

Des résultats similaires ont été obtenus en Guyane (Boudou *et al.*, 2005). Une étude comparative des concentrations en mercure total (HgT) dans le muscle de poissons capturés dans deux cours d'eau situés à proximité ou non d'un site d'orpaillage (St Elie/Crique Leblond et Crique Courcibo, respectivement) a montré que le mercure issu de cette activité minière, principalement sous forme inorganique particulaire, est peu disponible pour les poissons. En effet, les concentrations en HgT dans plusieurs espèces communes aux deux sites, chacune ayant des caractéristiques biométriques similaires, n'étaient pas significativement différentes, alors que les concentrations du HgT dans la colonne d'eau étaient environ 10 fois supérieures dans la crique soumise aux rejets des sites d'orpaillage.

D'autre part, cette étude a mis en évidence l'importance des niveaux de contamination des biotopes par le MeHg en regard des teneurs en Hg mesurées dans le tissu musculaire des poissons : les concentrations du MeHg dans la fraction dissoute ($< 0,45 \mu\text{m}$) étaient du même ordre de grandeur dans les deux sites orpaillés et non orpaillés. Par contre, en l'aval du barrage de Petit-Saut, où les concentrations du MeHg dans l'eau étaient environ 10 fois supérieures, les niveaux de contamination des espèces communes de poissons étaient significativement supérieurs par rapport aux deux sites en amont de la retenue, atteignant un facteur proche de 10 pour l'espèce benthivore *Curimata cyprinoides*. Il faut toutefois rappeler que cette concordance entre les concentrations du MeHg dans l'eau et celles mesurées dans le muscle des poissons ne repose pas directement et uniquement sur des transferts *via* la seule voie d'exposition directe. De nombreuses publications indiquent que la contamination des poissons est principalement basée sur l'ingestion de proies contaminées (voie trophique) (Boudou et Ribeyre, 1997 ; Hall *et al.*, 1997 ; Simon et Boudou, 2001).

Une fois les barrières intestinale et branchiale passées par le MeHg, ce dernier va ensuite se distribuer dans l'organisme *via* la voie sanguine. Ce MeHg va donc être véhiculé dans tout l'organisme et sa bioaccumulation dans différents tissus sera dépendante des propriétés fonctionnelles et structurales des barrières biologiques avec par exemples les surfaces d'échange, l'abondance et l'accessibilité des sites de fixation, les processus de transport, etc. Que l'on se rapporte à n'importe quel organe ou organisme, la dernière barrière biologique, au niveau cellulaire, est en fin de compte la membrane plasmique qui est constituée d'une bicouche phospholipidique avec des protéines enchâssées ou fixées à la surface de cette bicouche. La contamination cellulaire par le Hg peut donc être décrite comme une séquence d'évènements entre le métal, des ligands cellulaires ou non et des processus de transport à travers la barrière cellulaire.

Plusieurs mécanismes de passage du Hg au travers des membranes cellulaires ont été mis en évidence avec tout d'abord la diffusion passive d'espèces neutres du mercure telles que HgCl_2 et CH_3HgCl , il y a ensuite le transport actif du Hg par complexation de ce dernier avec des acides aminés lui permettant de pénétrer la cellule en utilisant les transporteurs de ces acides aminés. Il est également possible que le métal puisse entrer dans la cellule par endocytose à la suite de sa complexation avec des protéines ou glycoprotéines présentes sur la face externe de la membrane cellulaire (Boudou *et al.*, 1991). Parmi ces transports facilités les transporteurs d'acides aminés semblent avoir un rôle très important dans le flux transmembranaire du MeHg. L'hypothèse la plus exploitée est la complexation du MeHg avec une cystéine conduisant à la création d'un composé ayant une structure comparable à la méthionine. Cette hypothèse semble confortée par le fait que, le MeHg présent dans les espaces intra et extra cellulaires est essentiellement complexé à des éléments de petites tailles présentant des groupements thiols tel que la L-cystéine. De plus, l'absorption du MeHg dans le cerveau est accentuée lors d'une co-administration avec de la L-cystéine (Aschner *et al.*, 1989) et est inhibée en présence d'autres composés tels que la L-leucine ou encore la L-méthionine utilisant les transporteurs à acides aminés de groupe L au niveau de la barrière hémato-encéphalique (Clarkson *et al.*, 1994).

L'absorption du MeHg ne serait donc pas liée à ses propriétés hydrophobes mais essentiellement basée sur le type de complexe formé par ce métal. Par exemple les composés hydroxylés traversent très difficilement les barrières biologiques par rapport aux chlorocomplexes (Delnomdedieu *et al.*, 1989), mais dans les organismes vivants le MeHg est très peu présent sous la forme d'un chlorocomplexe car il présente de forte capacité thiolo-prive et ces composés MeHg-S-R sont pris en charge par des transporteurs à acides

aminés. Chez les bactéries résistantes au mercure, le transport du Hg(II) et du MeHg se fait par l'intermédiaire des transporteurs membranaires MerC et MerT (Barkay *et al.*, 2003).

C/ Impacts cellulaires d'une exposition au MeHg

Une fois la membrane cellulaire traversée, le MeHg va induire une grande variété de dysfonctionnements cellulaires. Les études menées pour comprendre les effets du MeHg ont été réalisées à de fortes doses d'exposition et pour une grande partie sur des cultures cellulaires, mais cela a tout de même indiqué que les processus cellulaires les plus atteints sont essentiellement la fonction mitochondriale ainsi que l'homéostasie du calcium. A la suite d'une exposition au MeHg (0,5 μM) d'une culture de neurones, la concentration en Ca^{2+} intracellulaire augmente fortement. Ce Ca^{2+} aurait pour source principale le réticulum endoplasmique qui est considéré comme l'organelle cellulaire de stockage du Ca^{2+} . Cet important relargage de Ca^{2+} peut être considéré comme un signal amenant la cellule à entrer en apoptose. Pour éviter l'apoptose, une partie de ce Ca^{2+} va être prélevée par la mitochondrie. Si cette augmentation de Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale devient trop importante, le potentiel membranaire de la membrane interne, directement lié au gradient protonique, va se retrouver diminué (Limke *et al.*, 2002). Cette diminution du potentiel transmembranaire mitochondrial va causer des dysfonctionnements au niveau de la chaîne respiratoire, amenant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) ainsi que l'apoptose (InSug *et al.*, 1997). Ces ERO sont des composés chimiques très réactifs qui auront des effets délétères à différents niveaux cellulaires : phospholipides présents dans les membranes cellulaires, protéines et enzymes sensibles aux conditions rédox et l'ADN. Les effets du MeHg sur le métabolisme mitochondrial peuvent également être issus d'une action directe sur différentes voies métaboliques. Lors d'une contamination au MeHg (5 mg de MeHg/kg/jour pendant 12 jours) par l'eau de boisson chez des rats, une diminution de l'activité de la cytochrome *c* oxydase et de la succinate déshydrogénase dans le muscle squelettique du rat a été observée (Usuki *et al.*, 1998). La mitochondrie semble donc être un élément important dans l'expression de la toxicité du MeHg au niveau du muscle. Cette étude révèle également que le muscle squelettique, qui fut longtemps considéré comme un tissu de stockage du MeHg, est finalement un tissu où le MeHg exprime une certaine toxicité. Lors d'exposition à des concentrations élevées de MeHg des altérations physiologiques sont visibles au niveau de ce tissu : des crampes, une fonte de la masse musculaire et une perte du tonus musculaire (Usuki *et al.*, 1998). D'autres symptômes visibles après une exposition au méthylmercure révèlent également l'aspect neurotoxique. Dans la perspective de comprendre les mécanismes amenant

à la détérioration du système nerveux central par le MeHg, des études ont été menées *in vitro* sur des cultures cellulaires d'astrocytes ou encore *in vivo* sur le cerveau de rongeurs. Ces analyses au niveau du système nerveux central ont révélé une induction du stress oxydant par le MeHg après avoir exposé des cellules en culture à 10-20 μM ou alors après une administration intrapéritonéale d'une solution de MeHg ($5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) (Ali *et al.*, 1992). Une étude fut également faite au niveau de mitochondries isolées à partir de cerveaux de rat ou de cultures d'astrocytes exposés au MeHg et a mis en évidence une augmentation de la génération d'ERO. L'ajout d'antioxydant comme le trolox, un analogue de la vitamine E, permet de protéger les tissus exposés au MeHg administré par eau de boisson complexé au glutathion, soit $600\ \mu\text{g}$ de $\text{Hg}\cdot\text{rat}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$ (Usuki *et al.*, 2001). La mitochondrie est donc aussi un élément important dans les processus de toxicité du MeHg. Mais cette génération d'ERO est également connectée à un autre phénomène : la dérégulation de l'homéostasie du glutamate. L'exposition au MeHg conduit à un relargage du glutamate dans le fluide extracellulaire des astrocytes causant une augmentation de la concentration de ce neurotransmetteur dans les espaces intersynaptiques. Cette élévation de la concentration en glutamate va causer une hyperactivation des récepteurs au glutamate de type N-méthyl D-aspartate (NMDA) menant à une hausse de l'influx en sodium et en calcium. Cette augmentation du niveau intracellulaire en Ca^{2+} est associée à la génération d'ERO qui vont avoir à leur tour un effet inhibiteur sur les transporteurs de glutamate (Allen *et al.*, 2001).

La toxicité de ce métal se caractérise également par l'inhibition du transport de la cystéine et de la cystine. Cette inhibition du transport de la cystéine dépend de la concentration et elle n'a lieu que sur les astrocytes et non sur les neurones alors que ces deux types cellulaires transportent la cystéine par les mêmes types de transporteurs dépendant du Na^+ . Le MeHg a des effets sur les deux types de transporteurs mais les neurones ne seraient pas affectés car ils bioaccumulent moins de MeHg que les astrocytes (Shanker *et al.*, 2001). Une partie des impacts neurotoxiques du MeHg serait donc essentiellement liée à des atteintes majoritairement localisées au niveau des astrocytes avec des perturbations majeures au niveau du métabolisme mitochondrial, du système de prélèvement du glutamate au niveau des fentes intersynaptiques, et des transporteurs pour la cystéine, inhibant ainsi son entrée et ayant un impact final sur la synthèse cellulaire du glutathion (GSH). L'excitotoxicité serait en fait un pendant important de la toxicité du MeHg.

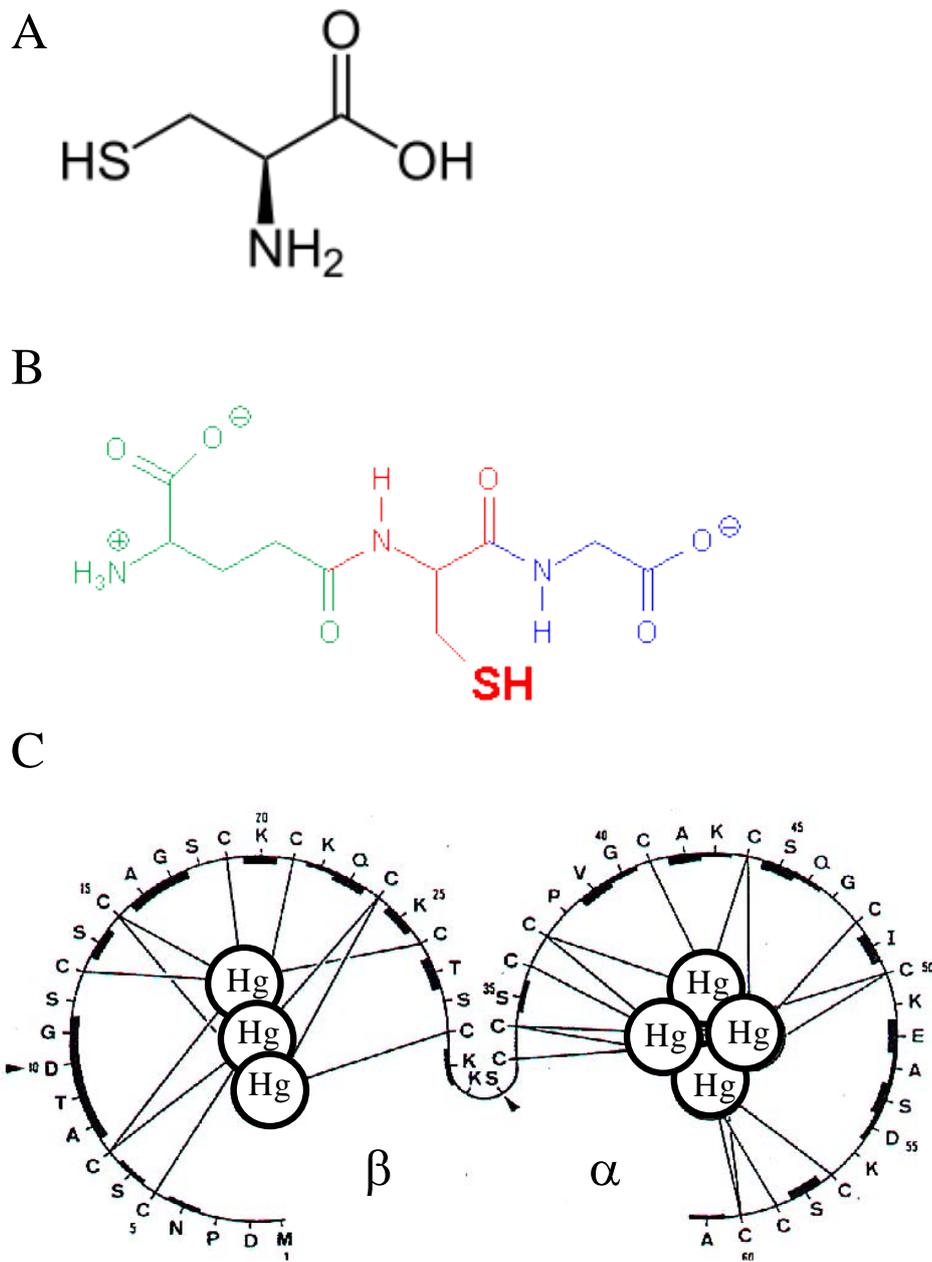


Figure 7 : Trois composés cellulaires de petites tailles présentant un groupement thiol. La cystéine (A), le glutathion (B) qui est un tripeptide formé par la condensation d'un acide glutamique (vert), d'une cystéine (rouge) et d'une glycine (bleu), et une métallothionéine (C) représentée avec les deux clusters saturés par du mercure.

D/ Mécanismes de protection des organismes contre le mercure.

Une fois dans la cellule, le MeHg va se retrouver en contact avec divers types de molécules de tailles et de propriétés chimiques différentes auxquelles il va pouvoir se complexer avec tout de même une forte affinité pour les groupements thiols (-SH). Le MeHg, une fois complexé à ces composés cellulaires, va pouvoir être pris en charge par divers mécanismes cellulaires pour être au final en partie excrété. Parmi les composés cellulaires capables de séquestrer les métaux et possédant un groupement thiol il y a le glutathion (GSH), un acide aminé libre (la cystéine) et les métallothionéines (MT) (Figure 7). Le GSH serait un élément important dans la séquestration du MeHg car lors d'analyse de fractions cellulaires, le MeHg se retrouve abondamment lié avec de petits peptides possédant des groupements -SH. Le rôle des métallothionéines dans la séquestration du MeHg a longtemps été nié car plusieurs auteurs étaient d'accord avec le fait que les MT seraient incapables de le fixer à cause de l'encombrement stérique lié à la présence du groupement CH₃, gênant l'accès aux résidus cystéines des clusters α et β (Chen *et al.*, 1973). Cependant, il a récemment été démontré que le MeHg est capable de se fixer aux MT en déplaçant les 7 atomes de zinc, en conduisant à un changement de leur configuration, avec une perte de la structure 3D que présente cette protéine en présence de Hg(II) et d'autres métaux divalents (Leiva-Presa *et al.*, 2004). *In vivo*, le MeHg ne conduit à aucune induction des MT, cette observation est également faite au niveau de culture cellulaire d'astrocytes et de neurones même en présence de symptômes neurologiques (Aschner *et al.*, 2006). Par contre, les MT présentent tout de même un effet protecteur vis-à-vis d'une exposition au MeHg car la transfection d'astrocytes n'exprimant ni MT1 ni MT2 par le gène d'une MT1 étrangère confère à ces cellules une résistance contre la toxicité du MeHg (Yao *et al.*, 1999a, 1999b).

Il a été observé qu'à la suite d'une exposition au seul MeHg, du mercure inorganique été trouvé dans le foie et les reins (Wiener *et al.*, 2002). La voie principale de déméthylation du MeHg dans les animaux a lieu dans le foie (Yasutake *et al.*, 1990, Gonzalez *et al.*, 2005). Cette déméthylation est très sensiblement liée aux mitochondries car la fraction mitochondriale présente le taux le plus élevé de Hg(II). De plus, en présence d'inhibiteurs mitochondriaux tels que le NaCN ou encore l'antimycine A, il n'y a plus de génération de Hg(II). La production de Hg(II) est par contre augmentée en présence de roténone, un inhibiteur du complexe 1 de la chaîne respiratoire, ce qui est corrélé avec une hausse de la génération d'anions superoxydes (Yasutake *et al.*, 2001). Une fois sous sa forme inorganique, le mercure peut alors être séquestré et/ou excrété par divers mécanismes avec un aspect particulier lié à un autre élément retrouvé dans le foie : le sélénium. La formation de

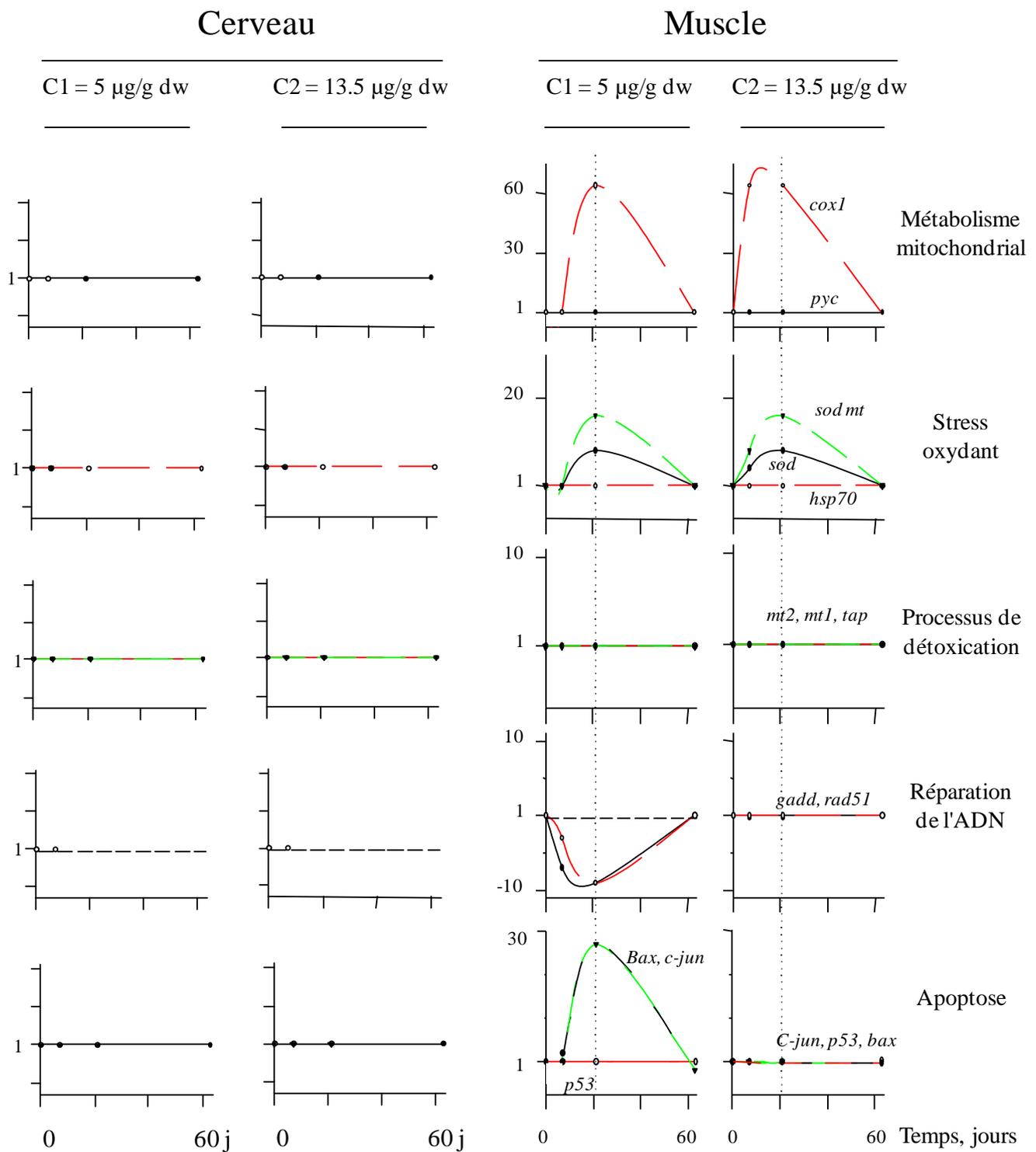


Figure 8 : Expression différentielle de 13 gènes, déterminées dans le cerveau et le muscle squelettique du poisson zèbre *Danio rerio* après 7, 21 et 63 jours de contamination par le méthylmercure *via* la voie trophique (5 et 13,5 µg Hg/g, poids sec) (D'après Gonzalez et al, 2005).

complexes séléno-mercuriels a été visualisée dans les cellules hépatiques avec une plus forte densité localisée sur la face apicale des cellules, au niveau de canalicules à partir desquels ils sont transportés *via* la bile dans la lumière de l'appareil digestif (Loubourdis et Danscher, 2004). Ces complexes séléno-mercuriels peuvent être rencontrés dans le sang d'organismes exposés au Hg. Ils sont composés d'un noyau Hg-Se largement entouré de glutathions et sont *in fine* associés à une sélénoprotéine. Ces énormes complexes sont véhiculés dans le sang et peuvent être pris en charge au niveau du foie ou encore des reins pour être excrétés dans les fèces et/ou les urines (Gailer, 2007).

IV/ Problématique

En dépit de toutes ces informations sur le mercure, au final, peu de choses sont connues quant aux effets d'une exposition chronique des poissons au MeHg sur la croissance, la survie, les impacts sur le comportement, les adaptations ou encore les perturbations physiologiques dans les muscles et le système nerveux central, lieux de bioaccumulation important de ce composé. Pourtant, les poissons sont parmi les premiers vertébrés exposés à cette espèce mercurielle. Les quelques études disponibles ont étudié les impacts d'une contamination au MeHg par voie trophique sur la reproduction et le développement embryonnaire (Hammerschmidt *et al.*, 2002, Drevnick *et al.*, 2003). Il y a également une étude qui fut conduite dans notre laboratoire (Gonzalez *et al.* 2005) et qui a abordé la réponse génique d'un poisson adulte, le poisson zèbre *Danio rerio*, à la suite d'une contamination par voie trophique avec du MeHg. Après 63 jours d'exposition, la bioaccumulation du Hg a été mesurée dans le muscle squelettique et le cerveau et atteignait respectivement 32 et 60 µg Hg/g de tissu (poids sec). Treize gènes impliqués dans différentes fonctions cellulaires (la lutte contre le stress oxydant, la chélation des métaux, le transport actif de xénobiotiques, le métabolisme mitochondrial, les processus de réparation de l'ADN, et l'apoptose) ont été analysés après 7, 21 et 63 jours d'exposition avec de la nourriture contaminée à hauteur de 13,5 µg Hg/g (dose représentative de celle trouvée dans certaines proies au niveau du barrage de Petit Saut en Guyane) sur ces 2 organes. Les résultats montrent que ces 2 tissus ont des réponses extrêmement différentes (Figure 8). Une réponse génique précoce et importante est observée au niveau du muscle squelettique. Ainsi, par exemple, sur les 13 gènes étudiés il y a eu induction d'un facteur 77 du gène de la sous-unité 1 de la cytochrome *c* oxydase ainsi que de ceux des deux superoxydes-dismutases avec un facteur de 21,5 pour l'isoforme mitochondriale et de 12 pour l'isoforme cytoplasmique après 21 jours d'exposition. Ces résultats suggèrent l'induction d'un stress oxydant à la suite de contamination

organomercurielle. En revanche, dans le cerveau aucune induction ou répression ne fut détectée pour ces 13 gènes quel que soit le temps d'exposition. Ce résultat, surprenant au premier abord, semble indiquer que d'autres mécanismes moléculaires sont mis en jeu, ou au contraire que le système nerveux central est incapable de se défendre contre une exposition au MeHg. Ceci pourrait rendre compte de la grande neurotoxicité observée pour ce composé. Cette étude a constitué le point de départ de ma thèse. Les objectifs de celle-ci sont donc de mieux comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu par les organismes aquatiques, tel que les poissons, lors d'une exposition chronique au MeHg. Mon analyse s'est focalisée sur les deux organes ayant montré des réponses génétiques particulières : le cerveau et le muscle squelettique.

En vue de comprendre la toxicité du MeHg dans ces deux organes cibles, différentes analyses ont été menées au cours de ces trois années de thèse sur le poisson zèbre *Danio rerio*. Tout d'abord l'analyse de l'aspect génotoxique de la contamination par le MeHg a été menée en vue de détecter des atteintes directes ou indirectes sur l'intégrité du génome des 2 tissus étudiés par l'utilisation de la technique de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Deux analyses génétiques ont aussi été menées : une analyse SAGE (Serial Analysis Gene Expression) sur le muscle squelettique pour en caractériser la réponse globale, puis l'analyse d'une batterie de gènes spécifiques au système nerveux central. Ces analyses génétiques ayant pour objectif de mettre en évidence la mise en place de processus d'adaptation de ces deux tissus face à la contamination organomercurielle.

Le MeHg présentant un impact sur les activités de la cytochrome *c* oxydase et de la succinate déshydrogénase (Usuki *et al.*, 1998), la respiration cellulaire sur des fibres musculaires perméabilisées et sur le cerveau de poissons zèbres a été analysée dans le but de révéler de possibles altérations du métabolisme mitochondrial. Ces analyses de bioénergétique ont été complétées par une approche histologique utilisant la microscopie électronique, permettant ainsi la détection d'altérations au niveau structural.

Enfin, peu de chose sont connues sur les effets du MeHg sur la reproduction des poissons. De plus, le MeHg est un toxique qui a la particularité d'altérer le fonctionnement mitochondrial, or la reproduction est un évènement nécessitant une très forte demande en énergie. Donc, en dernière étape, les impacts d'une contamination par le MeHg sur la reproduction des poissons zèbres ont été étudiés.



Matériel et méthodes



I/ Modèle biologique

Le poisson zèbre, *Danio rerio*, fait parti de la famille des cyprinidés. C'est un poisson d'eau saumâtre tropical originaire de l'Inde et de la péninsule Malaisienne. C'est un poisson d'aquarium très utilisé comme modèle vertébré en recherche scientifique, surtout au niveau du développement embryonnaire car celui-ci est rapide et les embryons sont transparents. Les habitats naturels de ce poisson sont les rizières, les eaux stagnantes et les petits cours d'eau au débit lent. C'est un poisson de 2 à 5 cm de couleur vive pouvant être maintenu en eau douce. Ce poisson est très robuste, il s'acclimate très bien aux aquariums, vit dans une fourchette de température allant de 18 à 25°C et à une durée de vie de 3 ans. Il peut néanmoins supporter des températures allant de 5 à 30°C mais seulement occasionnellement. Il présente une tolérance par rapport à la qualité de l'eau. Les poissons zèbres sont ovipares, et leur reproduction est assez aisée et réalisable en aquarium. Les poissons mâles peuvent être différenciés des poissons femelles car ces dernières présentent un oviducte au niveau de la papille ano-uro-génitale juste avant la nageoire anale. Un autre avantage à l'utilisation de ce poisson est qu'il a la particularité d'avoir son génome entièrement séquencé. Il est composé de 1563 millions de paire de bases (pb) (<http://www.ensembl.org>).



II/ Contamination de la nourriture

La nourriture utilisée est une nourriture vendue dans le commerce pour les aquariophiles. Cette nourriture a ensuite subi un traitement permettant d'incorporer la contamination au MeHg. La solution mère de MeHg (4,3 mg/mL soit 20 mM) a été diluée dans un volume d'éthanol à 95 % permettant ainsi une répartition homogène de ce métal sur les granulés pour obtenir 13,5 μg de Hg.g^{-1} de nourriture. Pour la condition témoin les granulés de nourriture sont également plongés dans de l'éthanol à 95 % permettant ainsi de comparer uniquement les effets dû au MeHg. La proportion d'éthanol devait être suffisante pour que la totalité de la nourriture conditionnée soit immergée, conduisant à l'utilisation de 100 mL d'éthanol pour 50 mg de nourriture. Ce cocktail nourriture éthanol avec ou sans MeHg est ensuite placé sous une hotte aspirante permettant d'évacuer l'alcool tout en laissant

le MeHg reparti de façon homogène dans la nourriture des poissons. La contamination de cette nourriture par le MeHg est ensuite contrôlée par dosage du mercure total par spectrométrie d'absorption atomique. Cette mesure étant elle même conduite sur le lot de nourriture préparé pour les conditions témoins.

III/ Contamination des poissons

A leur arrivée les poissons zèbres sont, dans un premier temps, acclimatés pendant une durée de 2 semaines avant le début de l'expérimentation. Ces poissons sont ensuite pesés afin de calculer la quantité de nourriture à leur administrer. Une fois la masse déterminée la quantité de nourriture distribuée quotidiennement correspond à 5 % de la masse moyenne de ces poissons multipliée par le nombre total de poissons par bac. Cette dose de nourriture est donnée en deux fois sur une journée, et correspond à une pression de contamination de 0,6 µg MeHg/jour/poisson. Les restes de nourriture et les fèces sont éliminés des bacs tous les jours afin d'éviter une contamination des poissons par la voie directe par du MeHg pouvant être relargué par ces restes de nourriture et ces fèces. Les bacs sont alimentés par la même eau provenant d'une nourrice où elle est chauffée à 23°C. Dans cette nourrice, l'eau est également soumise à un bullage important permettant ainsi de la déchlorer. Les bacs sont en circuit ouvert afin de renouveler l'eau tous les jours, éliminant ainsi l'accumulation des excréments azotés des poissons. Dans les bacs, il y a également des résistances permettant de maintenir l'eau à 23°C avec un bullage constant pour s'assurer de l'oxygénation du milieu.

IV/ Dosage Hg

La concentration en mercure totale (HgT) des tissus prélevés sur les poissons issus des deux conditions expérimentales a été déterminée par spectrométrie d'absorption atomique sans flamme effectué par un appareil de dosage uniquement dévolu à cette tâche (AMA 254 Leco France). Les échantillons sont pesés puis disposés dans des nacelles « propres » qui ont été, en premier lieu, passées au four à 550°C pendant 3 h afin d'éliminer le mercure potentiellement présent pouvant par la suite fausser les dosages. Les nacelles propres contenant l'échantillon sont ensuite disposées sur un passeur automatique (ASS, 254). Une fois dans le tube catalytique de l'appareil l'échantillon se trouve sous un flux d'oxygène constant où il va être soumis à plusieurs traitements thermiques. Tout d'abord il y a une étape de séchage à 200°C, puis la température va augmenter jusqu'à 600°C pour décomposer l'échantillon, à cette température toutes les espèces chimiques du mercure sont atomisées et volatilisées. La totalité du mercure se retrouve donc sous sa forme Hg⁰ à l'état gazeux et est

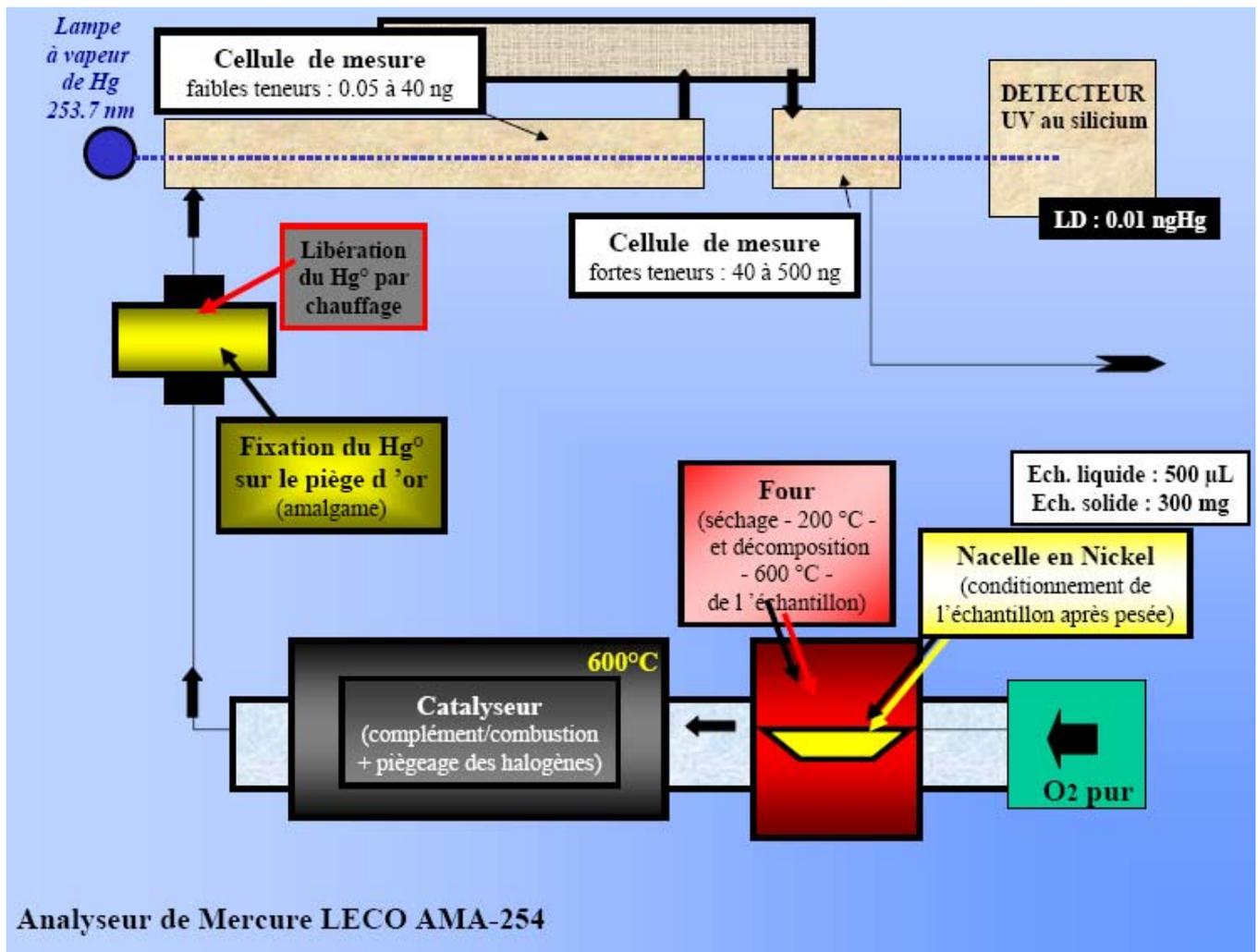


Figure 9 : Procédure analytique de dosage du Hg total par l'appareillage LECO AMA-254

véhiculé par le flux d'oxygène jusqu'au piège à or où il est concentré. L'amalgame formé au niveau du piège à or est ensuite chauffé, relarguant ainsi la totalité du Hg⁰ qui, entraîné par le flux d'oxygène, va passer devant une cellule de lecture qui va quantifier la totalité du mercure initialement présent dans l'échantillon (Figure 9). Au moment de la décomposition de l'échantillon à 600°C tous les composés volatils libérés vont traverser une résine qui va piéger tous les résidus tels que les halogènes pouvant interférer dans la quantification au niveau de la cellule de lecture. Au cours des dosages, la validité des valeurs obtenues est contrôlée par l'utilisation de standards biologiques certifiés (Tort2, Dolt3, National Research Council of Canada, Ottawa). La limite de détection de cet appareil est de 0,01 ng de Hg par échantillon avec une variabilité analytique moyenne de 5 %.

V/ Génétique

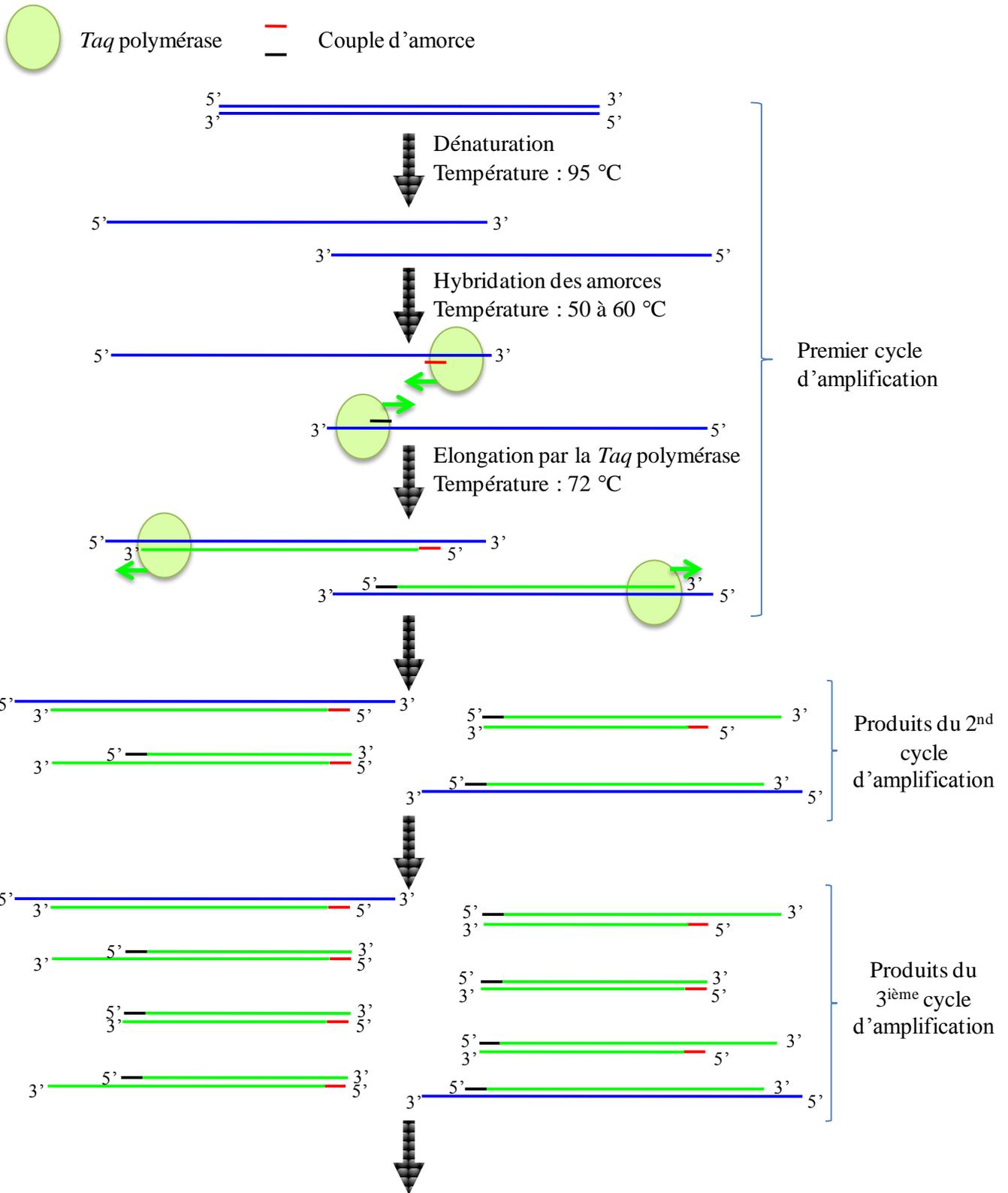
A/ Méthode appliquée au clonage d'un gène d'intérêt et à l'étude de sa fonction.

1 / PCR classique

La PCR (réaction de polymérisation en chaîne) est une technique qui permet d'acquérir rapidement une grande quantité d'un fragment précis d'ADN sélectionné par un couple d'amorce (Figure 10). La PCR repose sur l'utilisation d'une ADN polymérase, la *Taq* polymérase, extraite d'une bactérie, *Thermus aquaticus*, qui vit au niveau des sources d'eau chaude (50 à 80°C) et qui possède donc un cocktail enzymatique résistant et fonctionnel à ces températures. En plus de cette thermostabilité, la *Taq* polymérase permet d'obtenir de façon assez fidèle un brin complémentaire d'ADN avec une processivité de 1000 paires de base par min. La réaction de PCR se déroule suivant 3 étapes :

- La dénaturation qui consiste à chauffer le double brin d'ADN à 95°C pour scinder en deux simples brins d'ADN.
- L'hybridation est une étape qui permet aux amorces d'aller se positionner de part et d'autre de la région ciblée sur le génome. La température d'hybridation est déterminée au cas par cas puisqu'elle dépend de la température de fusion des amorces utilisées.
- L'élongation qui est l'étape pendant laquelle la *Taq* polymérase va synthétiser le brin complémentaire et qui se déroule à 72°C.

Ces trois étapes constituent un cycle d'amplification, et lors d'une PCR, ce cycle est répété une quarantaine de fois. Les réactions de PCR se font dans des tubes eppendorf de 200 µL dans un volume finale de 50 µL. Ces 50 µL de milieu réactionnel sont composés de 10 µL de tampon 5X, 3 µL de MgCl₂ à 25 mM, 1 µL de dNTP à 10 mM, 0,5 µL de chaque amorce à



Amplification exponentielle de la région ciblée

A chaque cycle d'amplification le nombre de copie du fragment amplifié est égal à $2^{\text{nombre de cycle}}$

Figure 10 : Fonctionnement de la PCR classique

100 μM , 1 μL d'ADNc, de 0,2 μL de *Taq* polymérase (5 U. μL^{-1}), et 33,8 d'eau ultra pure autoclavée. Les PCR sont effectuées à l'aide d'un thermocycleur (Mastercycler, Eppendorf). La qualité et l'efficacité de la PCR seront ensuite vérifiées sur gel d'agarose.

2/ Gel d'électrophorèse

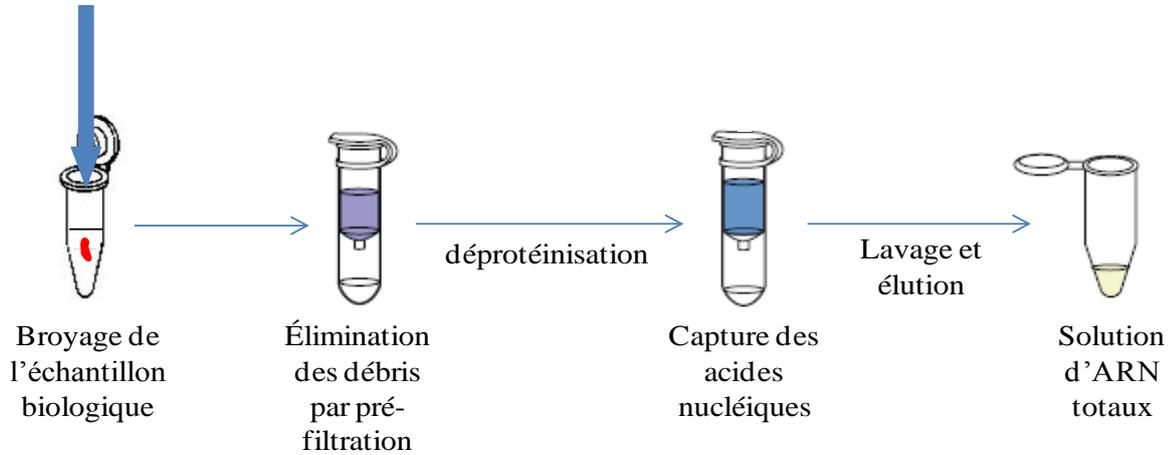
L'électrophorèse est une technique utilisée pour la séparation des fragments d'ADN. La séparation de ces fragments d'ADN se fait en fonction de leur poids moléculaire sous l'action d'un champ électrique. Les fragments d'ADN vont migrer de la borne négative vers la borne positive car ils sont chargés négativement. De façon concomitante à la migration de l'échantillon, un marqueur de poids moléculaire migre également sur le gel permettant de déterminer la taille du produit de PCR. La visualisation sur gel est réalisée grâce à l'utilisation du bromure d'éthidium (BET) présent à 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Le BET va s'intercaler dans l'ADN double brin puis fluorescer sous UV. Les gels étaient à 1 % d'agarose (poids/volume). Le tampon de migration utilisé pour la confection des gels et présent dans les cuves d'électrophorèse est constitué de Tris base à 40 mM, d'acide acétique à 5,7 % et d'EDTA à 2 mM (TAE).

3/ Purification des fragments d'intérêt

Une fois isolé sur gel d'agarose un fragment peut être purifié à l'aide du kit "QIAquick gel extraction kit" (Qiagen) selon les consignes du fournisseur (Figure 11 D). Les kits de QIAquick contiennent une membrane de silice pour la liaison de l'ADN. La purification par utilisation de ce procédé permet d'enlever les amorces, les nucléotides, les enzymes, les sels, l'agarose, et autres impuretés des échantillons d'ADN.

La zone du gel d'agarose où se trouve le fragment d'intérêt est découpé sous UV à l'aide d'une lame de scalpel. La lamelle ainsi obtenue est ensuite pesée pour ajuster les volumes de tampon à utiliser, sachant que 1 mg correspond à 1 μL . Ce fragment d'agarose est ensuite dissout dans 3 volumes de tampon QG à 50°C. Après cette étape, un volume d'isopropanol est ajouté et mélangé. Le mélange ainsi obtenu est déposé sur la colonne d'affinité qui ne va retenir que les acides nucléiques. Après centrifugation à 14000 g pendant 1 min, la colonne est ensuite soumise à deux lavages successifs l'un avec 500 μL de QG et le second avec 750 μL de PE. La colonne de fixation des acides nucléiques est ensuite placée dans un tube eppendorf neuf et 30 μL de tampon d'élution sont ajoutés sur la membrane de silice. Après une minute à température ambiante, le tout est centrifugé 1 min afin de récupérer le fragment purifié.

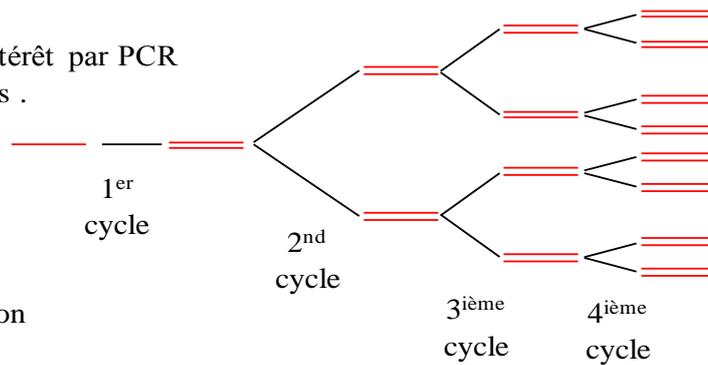
A/ Extraction et purification des ARN totaux



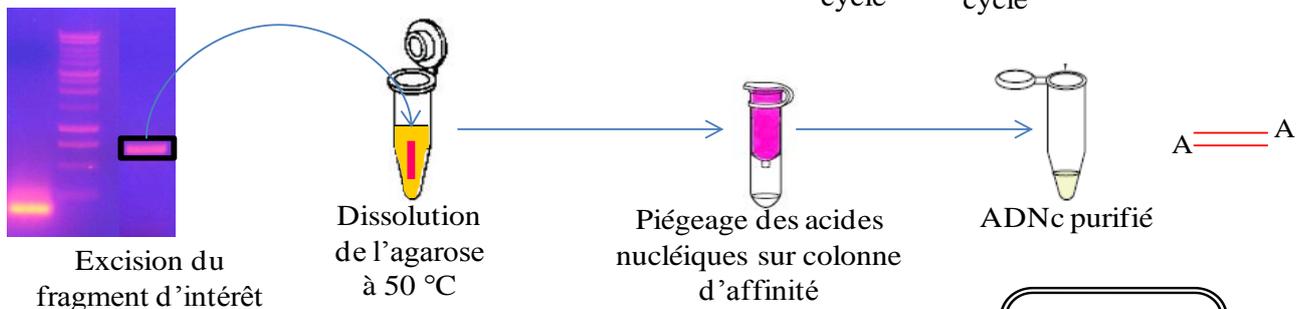
B/ Rétro-transcription des ARN



C/ Amplification du gène d'intérêt par PCR avec des amorces spécifiques .



D/ Électrophorèse et purification



E/ Clonage

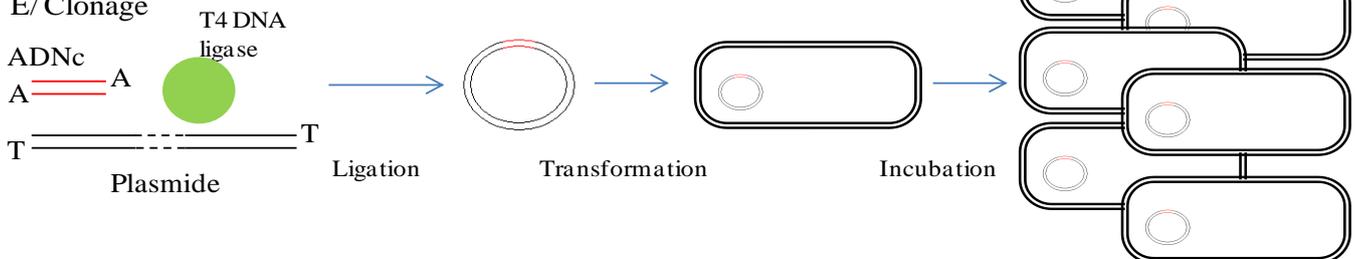


Figure 11 : Démarche expérimentale pour cloner un gène d'intérêt et étudier son expression chez une bactérie

4/ Clonage

a/ Insertion des fragments dans le vecteur

Une étape préalable à la transformation des bactéries consiste à insérer la séquence recherchée dans un vecteur qui puisse être par la suite intégré par les bactéries (Figure 11 E). Dans notre cas, nous avons utilisé le plasmide pGEMT ("pGEM®-T easy vector systems", Promega®) qui confère aux bactéries transformées la résistance à un antibiotique : l'ampicilline (gène *Ampr*). Ce dernier utilise les potentialités de la *Taq* polymérase (réaction de PCR) qui ajoute une base azotée A libre à chaque extrémité 3' du fragment amplifié. Le pGEMT est vendu par le fournisseur sous forme linéaire et présente à chaque extrémité une base azotée T libre. Le fragment à cloner est lié au vecteur grâce à l'activité d'une enzyme, l'ADN ligase qui forme des liaisons phosphodiester covalentes entre les bases T (plasmide) et A (insert) libres. Pour ce faire, 1 µL de plasmide à 50 ng.mL⁻¹ sont mélangés avec 3 µL de produit PCR purifié, 1 µL de ligase à 3 U.µL⁻¹ et 5 µL de tampon 2X. Le tout est laissé sur la paillasse à température ambiante 1 h puis une nuit à 4°C.

b/ Transformation des bactéries

Les plasmides potentiellement recombinants ont ensuite été intégrés dans des bactéries *E. coli* ("JM 109 competent cells, high efficiency", Promega®) par choc thermique (Figure 11 E). Pour ce faire, les bactéries préalablement stockées à - 80°C sont lentement décongelées dans la glace. Après homogénéisation de la suspension bactérienne, 50 µL de bactéries sont incubés pendant 20 min dans la glace avec 2 µL du mélange de ligation. Par la suite, le mélange est soumis à un choc thermique (42°C) pendant 45 s. Le mélange est ensuite replacé dans la glace pendant 2 min. Puis, 950 µL de milieu de culture liquide (milieu LB, Luria Bertani, Sambrook *et al.*, 1989) sont ajoutés et le tout est incubé 1 h à 37°C, temps nécessaire aux bactéries pour exprimer le plasmide et ainsi acquérir la résistance à l'ampicilline (appelée étape d'expression phénotypique). A l'issue de cette étape, 200 µL de suspension bactérienne sont étalés sur milieu LB solide contenant de l'ampicilline (100 µg.mL⁻¹). Après une nuit d'incubation à 37°C, 10 colonies sont isolément repiquées dans 10 tubes remplis avec 3 mL de milieu LB liquide contenant de l'ampicilline (100 µg.mL⁻¹). Les tubes sont placés une nuit à 37°C sous agitation avant discrimination des clones par PCR à l'aide d'amorces universelles présentes sur le plasmide (T7 et Sp6).

5/ Test de toxicité

Le but de ces tests de toxicité est d'appréhender l'impact que peut avoir l'expression d'un gène d'intérêt chez un organisme modèle pour lequel ce gène est étranger. L'organisme utilisé ici est une souche de la bactérie *Escherichia coli* en raison de la facilité expérimentale pour transformer cette bactérie. La souche utilisée ici est la souche *tolC* (F- λ -*tolC6::Tn10 his leu proA argT his thi galK lacY trpE nonmtl xyl ara rpsL sup*⁺) qui a la particularité d'être hyper sensible aux stress permettant de déceler de façon plus efficace une résistance, une hypersensibilité ou l'absence d'effet que lui confèrerait l'expression du gène d'intérêt (Achard-Joris *et al.*, 2005). Pour effectuer ces analyses, plusieurs techniques ont été employées, le test de la pastille, le test en goutte et la détermination de la concentration moyenne inhibitrice (CMI). Pour chacune de ces analyses la même souche de bactérie a été transformée avec le même plasmide mais dépourvu d'insert. Cette souche possédant le plasmide vecteur seul est utilisée comme contrôle pour mettre en évidence les modifications ou bien l'absence de modifications apportées par le gène étudié. Toutes les incubations nécessaires à la réalisation des tests qui sont présentés ci-après ont été réalisées à 28°C car la souche transformée avec le gène d'intérêt ne se développait pas à 37°C qui est normalement la température optimale de croissance d'*E. coli*.

a/ Test en goutte

Ce test est un test facile et rapide à mettre en œuvre, il s'agit de comparer la croissance de deux cultures de bactéries sur milieu gélifié contenant un composé toxique (métal ou composé organique) ou non. Pour cela, on effectue des dilutions de 10 en 10 de chacune des cultures qui contiennent la même concentration en bactéries dans la solution initiale. Une goutte de chacune des dilutions est déposée sur le milieu puis les bactéries sont placées à l'étuve à 28°C sur la nuit. Le lendemain des spots sont visibles au niveau des gouttes qui ont été déposées. Ces spots correspondent aux bactéries qui ont pu pousser en présence du toxique ajouté dans le milieu. Pour analyser le résultat de ce test et en extraire l'information attendue il suffit de comparer la croissance des deux cultures et de compter la différence du nombre de spot entre les deux colonies. On considère qu'il y a une différence quand on observe au moins une dilution d'écart.

b/ Détermination des concentrations moyennes inhibitrices (CMI)

Cette détermination a été réalisée en faisant croître la culture de bactéries contrôle, possédant le plasmide vierge, et la culture de bactéries possédant le plasmide et le gène

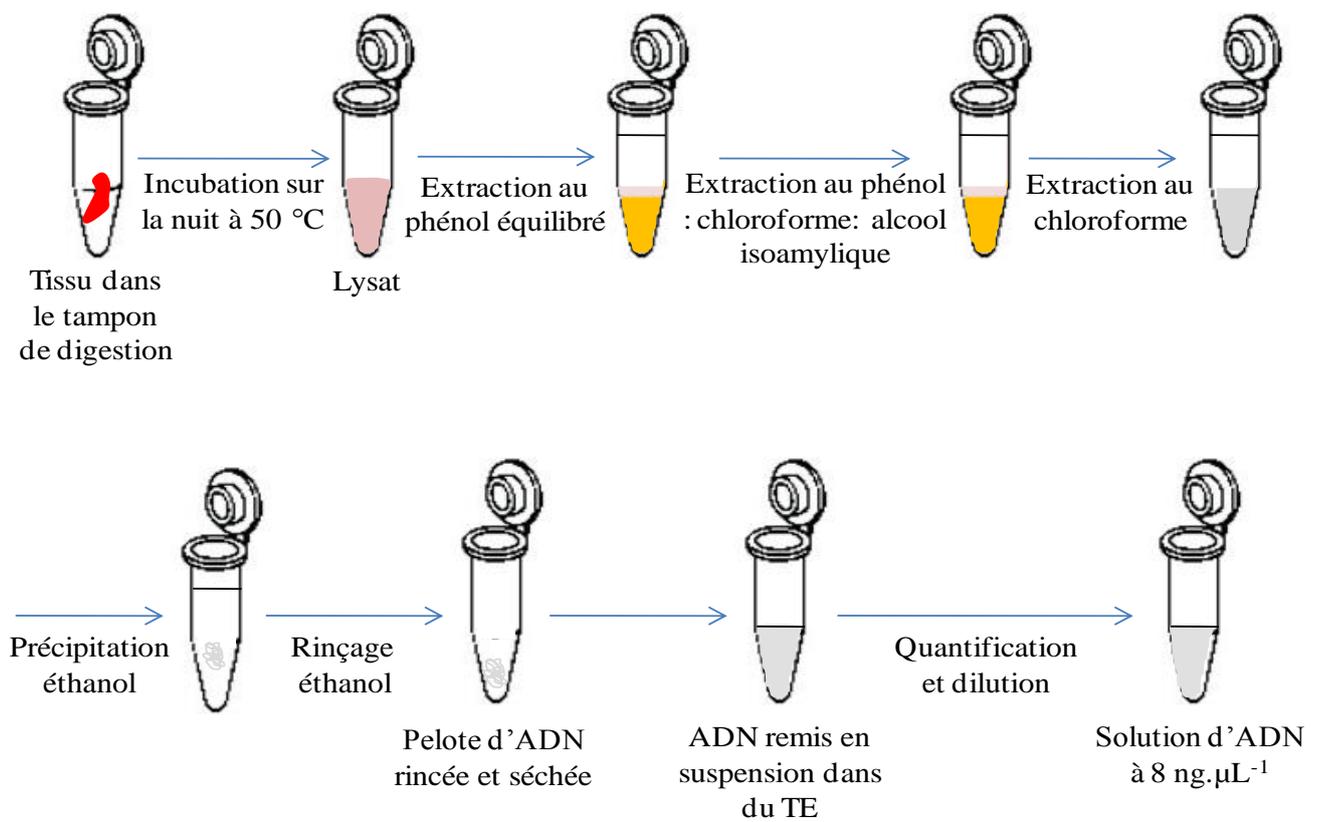


Figure 12 : Démarche expérimentale pour l'extraction d'ADN génomique issu d'un échantillon biologique

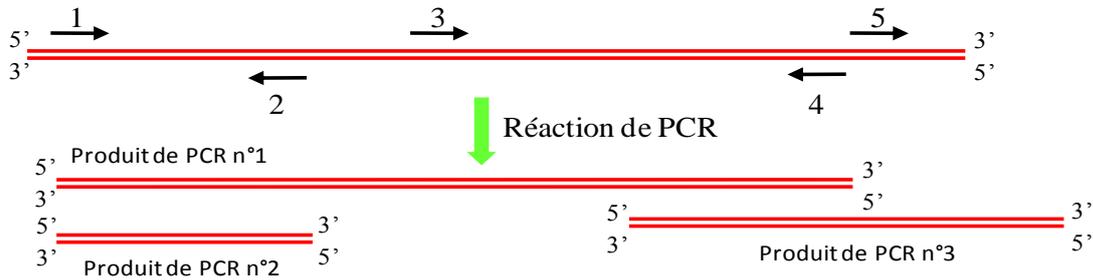
d'intérêt dans un milieu de culture liquide. Les cultures bactériennes ont été directement contaminées par ajout de solutions contenant le toxique dans le milieu. La détermination des CMI a été faite de manière suivante : une culture de bactéries de densité optique (DO) égale à 0,05 a été divisée en plusieurs tubes contenant des concentrations croissantes du toxique testé. Après une nuit d'incubation, la DO à 660 nm est à nouveau mesurée dans chacun des tubes. Cela permet de tracer un graphique DO_{660} en fonction de la concentration du composé toxique. Ces graphiques permettent de déterminer la CMI du toxique pour les deux cultures bactériennes et de dire s'il y a modification de cette CMI par l'expression du gène d'intérêt.

B/ Analyse de la génotoxicité du MeHg.

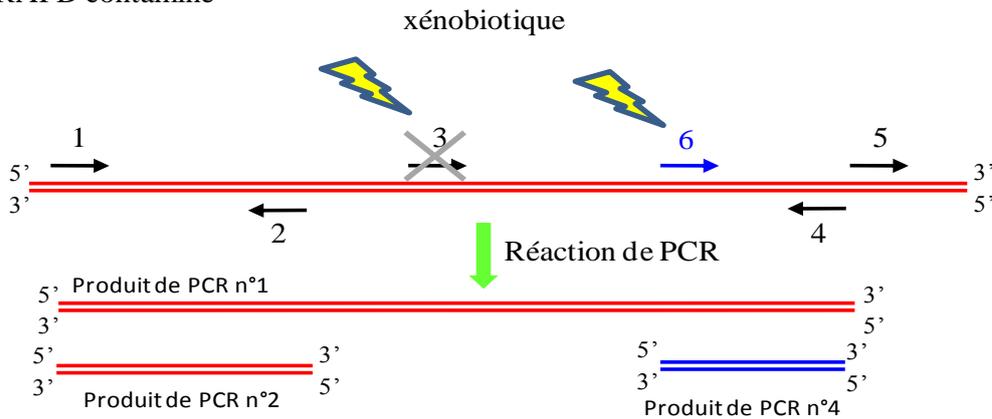
1/ Extraction d'ADN génomique de haut poids moléculaire

Lors de l'application de ce protocole des précautions particulières ont été prises afin de limiter la fragmentation de l'ADN génomique lors des étapes de mélange et de remise en suspension pour ne pas causer trop de cassures. Les poissons réservés pour l'extraction d'ADN ont été congelés et stockés à -80°C afin d'éviter toute dégradation par l'action des désoxyribonucléases (DNases) présentes dans les tissus. Les poissons encore congelés ont été disséqués afin de prélever le muscle squelettique et le cerveau. Ces tissus ont été plongés dans le tampon d'extraction (10 mM de Tris à pH 8, 100 mM d'EDTA à pH 8 également, 0,5 % de SDS et 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Protéinase K (Promega)) à 50°C sur la nuit pour dégrader le tissu entier et relarguer les acides nucléiques. Le lysat ainsi obtenu est ramené à température ambiante avant d'effectuer l'extraction d'ADN génomique par une méthode conventionnelle utilisant l'extraction au phénol chloroforme (Westerfield *et al.*, 2007) (Figure 12). Brièvement cette extraction se déroule en deux temps avec une première extraction protéique faite avec du phénol équilibré pH 8 suivi d'une extraction au phénol : chloroforme : alcool isoamylique (25 :24 :1) (PCI). La première de ces extractions consiste en l'ajout d'un volume de phénol au lysat obtenu, le tout est homogénéisé par agitation douce au vortex donnant une solution d'aspect laiteux. Cette solution est ensuite centrifugée 5 min à 5000 g pour séparer la phase organique dense constituée du phénol, qui a piégé les protéines, de la phase aqueuse contenant les acides nucléiques. Cette phase aqueuse est précautionneusement prélevée et transférée dans un nouveau tube stérile puis soumise à l'extraction au PCI. L'extraction au PCI suit exactement la même chronologie que celle au phénol. Cette extraction au PCI a pour but d'extraire les protéines restantes dans la phase aqueuse mais surtout de désaturer en phénol cette phase. Après la dernière extraction au PCI, une extraction au chloroforme est également effectuée à partir de la phase aqueuse obtenue précédemment afin de retirer les traces

A/ RAPD Témoin



B/ RAPD contaminé



C/ Analyse sur gel d'agarose

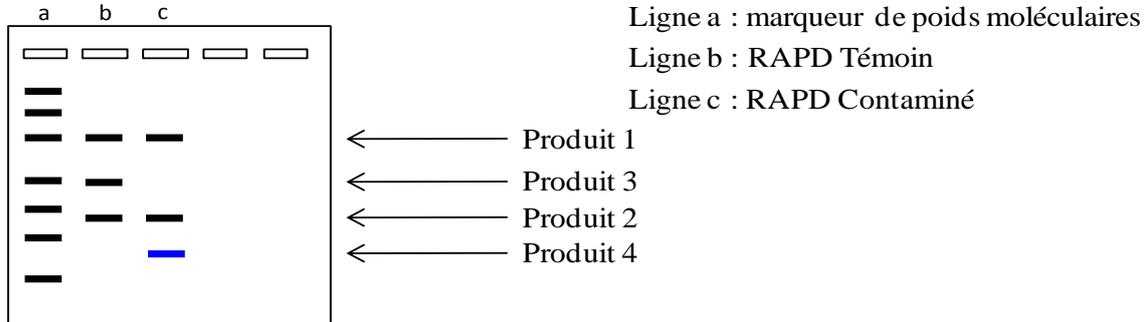


Figure 13 : Ce schéma représente le principe de la réaction de la RAPD (A) et son utilisation afin de détecter des impacts génotoxiques (B) avec le cas de la suppression du site d'hybridation n°3 simultanément à la création du site n°6 de l'amorce par un xénobiotique. L'impact du xénobiotique se traduit ici par la perte d'un des produits de PCR conjointement à l'apparition d'un autre (C).

L'ADN génomique est ici utilisé comme base pour la réaction de PCR réalisée grâce à plusieurs copies d'une seule amorce synthétisée de façon aléatoire.

Les flèches représentent des copies de la même amorce s'hybridant sur l'ADN génomique à la fois en sens et en antisens.

Le sens de la flèche indique le sens de synthèse de l'ADN lors des cycles de PCR.

Les nombres désignent les différents sites d'hybridation de l'amorce sur l'ADN.

Les copies 1, 3 et 5 de l'amorce vont s'hybrider sur le brin 3'-5' de l'ADN, et les copies 2 et 4 de l'amorce vont s'hybrider avec le brin 5'-3' de l'ADN.

Les produits de PCR 1, 2 et 3 sont issus de l'amplification des séquences d'ADN respectivement encadrées par les amorces s'étant hybridées aux positions 1 et 4, 1 et 2, et 3 et 4.

résiduelles de phénol pouvant être présentes dans la phase aqueuse. L'ADN présent dans la phase aqueuse est ensuite précipité par ajout d'acétate de sodium (3 M, pH 5,2, 1/10^{ième} du volume de la phase aqueuse) et d'éthanol absolu (2,5 fois le volume de la phase aqueuse). La pelote d'ADN ainsi obtenue est alors prélevée par utilisation d'une pipette pasteur et transférée dans de l'éthanol 70 %. Cette étape permet de retirer les sels présents en grande quantité au niveau de l'ADN lié à l'ajout préalable d'acétate de sodium. Après centrifugation à vitesse maximale (14000 g) pendant 15 min, l'éthanol 70 % est retiré des tubes et la pelote d'ADN est séchée à l'air libre pendant 5 min. L'ADN ainsi obtenue est resuspendu dans un tampon TE constitué de 10 mM de Tris à pH 8 ; 5 mM d'EDTA avec 100µg/mL de ribonucléase A (RNase A) (Quiagene). La RNase A permet de dégrader les ARN qui ont été extraits et copurifiés en même temps que l'ADN. Cette solution d'ADN est incubée à 37°C afin de resuspendre la pelote d'ADN et laisser la RNase A dégrader les ARN présents. Cette solution d'ADN est ensuite resoumise à une nouvelle extraction au phénol : chloroforme : alcool isoamylique suivi d'une précipitation à l'éthanol comme précédemment décrit. L'ADN est ensuite repris dans du TE et quantifié par spectrométrie à 260 nm en appliquant la relation 1 DO = 50 µg/mL. La solution d'ADN génomique est ensuite diluée pour obtenir une concentration de 8 ng d'ADN.µL⁻¹ puis congelée à -20°C jusqu'à son usage.

2/ PCR par amorçage aléatoire (RAPD : Random Amplified Polymorphism DNA).

a/ RAPD classique.

Les conditions optimales (Atienzar *et al.*, 2000b) sont réalisées dans 20µl de tampon comportant 50 mM de KCl, 10 mM de Tris, pH 9, 0,1% de Triton X-100, 5 mM de MgCl₂, 0,34 mM de chacun des dNTPs, 2 µM d'amorce, 8 ng d'ADN matrice et 0,1 U/µl de *Taq* (*Thermus aquaticus*) polymérase (Promega). Le programme utilisé pour ces RAPD-PCRs est le suivant : 4 minutes à 95°C, suivi de 39 cycles composés d'une minute à 95°C, 1 minute à 50°C, 1 minute à 72°C et pour finir, 10 minutes à 72°C.

Lors de ces RAPD, 10 oligonucléotides furent testés : OPA9, 5'-GGGTAACGCC-3' ; OPB1, 5'-GTTTCGCTCC-3' ; OPB6, 5'-TGTCTGCCC-3' ; OPB7, 5'-GGTGACGCAG-3' ; OPB10, 5'-CTGCTGGGAC-3' ; OPB11, 5'-GTAGACCCGT-3' ; OPB12, 5'-CCTTGACGCA-3' ; OPB14, 5'-TCCGCTCTGG-3'.

Les produits issus de ces PCRs sont ensuite analysés sur gel d'agarose 1% contenant du bromure d'éthidium (0,5µg/ml) dans l'objectif de détecter des différences au niveau des produits de PCR entre la condition témoin et la condition contaminée (Figure 13).

b/RAPD-PCR en temps réel.

Les RAPD-PCR en temps réel ont été faites à l'aide du Lightcycleur (Roche). Chaque réaction a été accomplie dans un volume réactionnel de 20 µL dans un capillaire comprenant 16 ng d'ADN génomique soit 2 µL de la solution d'ADN, 2 µL de l'amorce à 6 µM, et 16 µL du mélange de PCR constitué de 1 µL du tampon 1b activé (tampon d'activité, Sybr Green, *Taq* polymérase et dNTP), 3,2 µl MgCl₂ à 25mM et de 11,8 µL d'eau milliQ autoclavée. Le programme thermique utilisé pour cette RAPD-PCR en temps réel est composé d'une étape de chauffage de 10 minutes à 95°C suivi de 50 cycles d'amplification à 95°C pour 5 s, 50°C pour 5 s, et 30 s à 72°C. A la suite de ces 50 cycles d'amplification, les courbes de dissociation ont été obtenues en suivant la diminution du niveau de fluorescence du Sybr Green pendant un chauffage progressif des produits de PCR de 60 à 95°C.

L'analyse des courbes de fusion a été faite en utilisant le logiciel LightCycler 3.5 (Roche). Pour un capillaire donné issu de la RAPD-PCR, la température de fusion (T_m) de chaque produit de PCR est obtenue et énumérée dans une table logique couvrant 11 intervalles de température différents s'étendant de 74 à 89°C. La comparaison des tables logiques entre la condition contaminée au MeHg et la condition témoin permet de mettre en évidence des intervalles de température pour lesquels la fréquence des produits de PCR pour un T_m connu diffère.

L'analyse des courbes de température de fusion a été exécutée au lieu d'une analyse de bande par électrophorèse sur gel d'agarose car à de basses doses de toxique, les différences potentielles entre les marques des conditions contrôle et contaminée sont faibles et de basse intensité ce qui en rend l'interprétation difficile. Par conséquent, malgré le fait que la résolution entre les bandes dans un gel d'agarose est en grande partie supérieure à la résolution des courbes de fusion - une méthode à l'origine conçue pour démontrer la présence ou l'absence de seulement un produit de PCR, c'est-à-dire non prévu pour résoudre les produits multiples - l'analyse des courbes de fusion fournit plus d'information à de basses doses car un pic de température de fusion est le résultat de plusieurs produits de PCR partageant des températures de fusion très proche les unes des autres. Ainsi, des différences potentiellement minuscules sont amplifiées au lieu d'être dispersées et diluées tout au long d'un gel d'agarose.

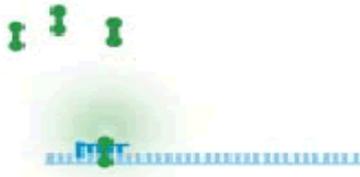
Pour chaque ADN génomique, l'analyse quantitative s'est fondée sur la différence du nombre de cycle d'amplification nécessaire calculé pour entrer dans la phase exponentielle de PCR, en utilisant les amorces OPB7 et OPB11, respectivement. En effet, OPB7 s'est avéré être une amorce ne montrant pas de polymorphisme, alors que ce fut le cas pour l'amorce

OPB11. Cette différence, marquée $\Delta(OPB7 - OPB11)$, conduit au calcul de l'efficacité relative d'hybridation entre les deux amorces, qui peut être calculée en utilisant la formule suivante : $2^{\Delta(OPB7 - OPB11)}$. La valeur de cette efficacité relative d'hybridation a été calculée à partir de la moyenne de 10 répliquats pour les deux conditions expérimentales.

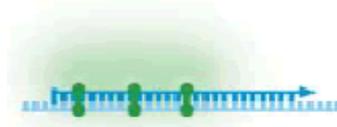
C/ Analyse de la réponse génétique des tissus à une exposition au MeHg.

1/ Extraction de l'ARN

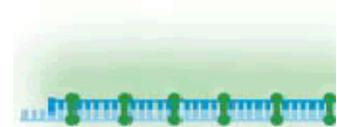
L'extraction des ARN totaux d'une cellule présente une certaine difficulté, même si cela est facilité par l'utilisation des kits d'extraction, car il faut éviter toute contamination par les RNases qui dégraderaient les ARN. Les extractions des ARN totaux des échantillons biologiques ont été extrait par utilisation des kits « Absolutely RNA RT-PCR miniprep kit » (Agilent) en suivant les consignes du fournisseur (Figure 11 A). Succinctement, 30 à 40 mg de tissu sont prélevés et broyés dans un tube eppendorf contenant du tampon de lyse (mélange de thiocyanate de guanidine et de β -mercaptoéthanol). Le broyat est ensuite déposé sur une colonne de filtration qui permet d'éliminer les débris cellulaires après centrifugation à 14000 g pendant 5 min. Au lysat ainsi obtenu va être rajouté un volume de phénol : chloroforme : alcool isoamylique (25 : 24 : 1). Les deux phases vont être mélangées au vortex et l'émulsion est ensuite centrifugée 10 min à 14000 g. La phase aqueuse est récupérée dans un nouveau tube eppendorf et un volume d'éthanol à 70 % est ajouté. Le tout est homogénéisé au vortex avant d'être déposé sur une colonne d'affinité qui va piéger les acides nucléiques après centrifugation 1 min à 14000 g. Les colonnes sont ensuite lavées par un tampon faiblement concentré en sel puis soumises à un traitement à la DNase I à 37°C pendant 15 min afin de dégrader les ADN. Après ce traitement les colonnes subissent deux lavages, le premier avec 600 μ L de tampon fortement salé permettant d'éliminer la DNase, et le second avec 300 μ L de tampon faiblement salé pour éliminer les sels du lavage précédent. Pour terminer cette extraction, 30 μ L de tampon d'élution chauffé à 60°C sont déposés sur la colonne et après une incubation de 2 min à température ambiante, les colonnes sont insérées dans de nouveaux tubes eppendorfs puis centrifugées 1 min à 14000 g. Les 30 μ L de tampon d'élution ainsi récupérés contenant les ARN peuvent directement être utilisés pour la réaction de rétro-transcription ou bien stockés à -80°C.



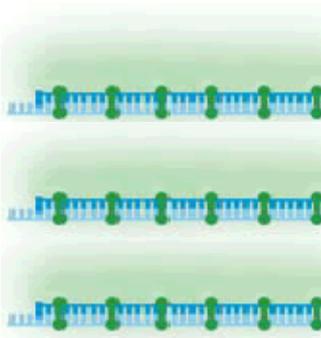
Pendant l'hybridation, les amorces vont s'hybrider et former de petites régions d'ADN double brin où le SYBR Green I va s'intercaler causant une légère augmentation du signal de fluorescence.



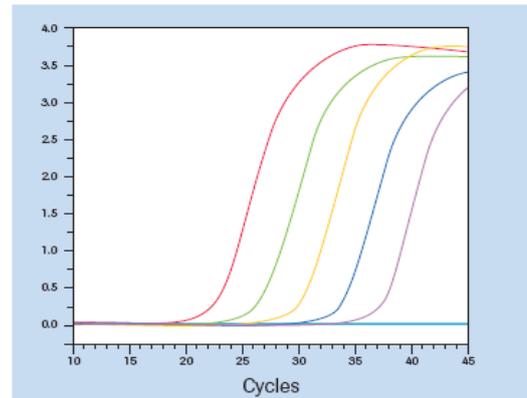
Durant la phase d'élongation, plus d'ADN double brin est synthétisé et donc plus de SYBR Green I peut s'intercaler, augmentant ainsi le signal de fluorescence.



À la fin de la phase d'élongation, tout l'ADN est sous la forme double brin permettant à un maximum de SYBR Green I de s'intercaler. La fluorescence est donc mesurée à la fin de chaque phase d'élongation.



Au cours de la PCR, la fluorescence augmente donc entre chaque cycle.



Exemple de résultat présentant l'évolution de la fluorescence en fonction du nombre de cycle de PCR

Figure 14 : Principe de la PCR en temps réel avec utilisation du SYBR Green I. (Modifié à partir de la documentation de l'appareil LightCycler, Roche)

2/ Rétro-transcription

Cette étape permet d'obtenir des ADN complémentaires à partir des ARNs. Cette transcription inverse est réalisée par une enzyme particulière, la « Stratascript reverse-transcriptase », qui est fournie dans le kit « Stratascript first strand synthesis système » (Agilent) (Figure 11 B). Pour effectuer cette rétro-transcription, 14 μL des ARN totaux purifiés sont utilisés (≈ 3 à $5 \mu\text{g}$), puis sont ajoutés 2 μL de tampon 10X, 1 μL de dNTP (25 mM chacun), 2 μL d'hexaprimer ($0,1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) et 1 μL d'oligodT ($0,5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$). Ce mélange est ensuite chauffé 1 min à 65°C dans un thermocycleur eppendorf. Après cette minute le mélange se refroidit progressivement jusqu'à 45°C permettant l'hybridation des 2 amorces sur les ARN. Ensuite 0,5 μL de RNase inhibitor ($40 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) et 1 μL de « Stratascript reverse-transcriptase » ($50 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) sont ajoutés. Le tout est à nouveau mis dans le thermocycleur pour une durée de 1 h à 42°C . Pendant cette étape, les ARN vont être rétro-transcrit en ADNc simple brin qui vont par la suite être utilisés pour effectuer des PCR ou bien conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

3/ PCR quantitative

La PCR quantitative a été utilisée au cours de nos travaux pour évaluer l'effet d'une contamination métallique sur le niveau d'expression de certains gènes, c'est-à-dire sur la production d'ARNm d'un gène donné à un instant t. La PCR quantitative, au contraire de la PCR "classique", permet la détection et la quantification des produits amplifiés en cours de réaction (Figure 14). Ceci est réalisé grâce à l'utilisation d'un fluorophore, dans notre cas le SybrGreen, qui s'intercale entre les bases d'une séquence ADN double brin et devient alors fluorescent. L'intensité de la lumière émise, mesurée à 530 nm, est directement proportionnelle au nombre de copies du fragment amplifié. L'appareil utilisé au cours de nos expériences était le LightCycler (Roche Molecular Biochemicals). Cet appareil est un thermocycleur équipé d'un spectrophotomètre qui mesure la fluorescence émise par chaque échantillon à l'issue de chaque étape d'élongation. Au cours de nos différentes études, la quantification a été relative. En plus des gènes étudiés, un contrôle endogène était systématiquement amplifié. Dans notre cas, le gène de référence choisi fut le gène codant pour la β -actine. Pour chaque échantillon analysé, le nombre de copies d'ADNc du gène d'intérêt a d'abord été normalisé par rapport au nombre de copies codant pour la β -actine avant d'être utilisé pour comparer l'expression des gènes d'intérêt chez les individus contaminés par rapport aux individus témoins. Comme pour la PCR classique, les ARNm ont dû être purifiés puis rétro-transcrits en ADNc. Les amorces ont été définies à l'aide du logiciel

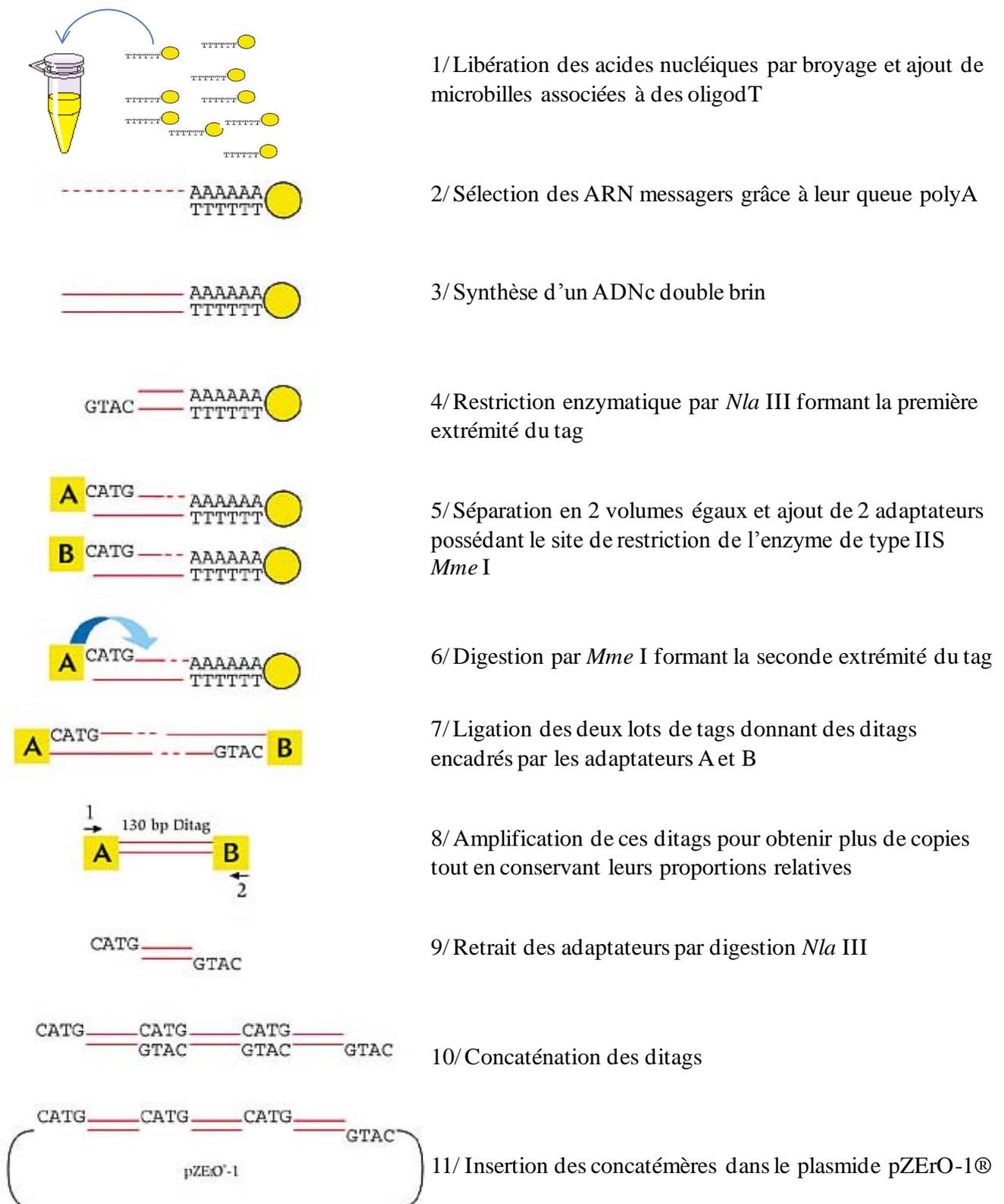


Figure 15 : Schéma explicatif pour l'obtention d'une banque SAGE

LightCycler Probe design (version 1.0, Roche). Les réactions de PCR quantitative ont été réalisées dans des capillaires en verre en présence de 1 µl de tampon 1b activé (tampon d'activité + SybrGreen + *Taq* polymérase + dNTPs), 3,2 µl de MgCl₂ à 25 mM, 2 µl d'amorces (sens et anti-sens) à 3 µM chacune, 1 µl d'ADNc et 12,8 µl d'eau ultra-pure. Le programme thermique utilisé présentait une étape préalable d'activation de l'enzyme (10 min à 95°C) suivie de la répétition de 50 cycles d'amplification (95°C, 5 s; 60°C, 5 s et 72°C, 20 s). En fin de réaction, la spécificité de la PCR fut analysée après réalisation d'une courbe de fusion. En effet, chaque produit d'amplification est caractérisé par un T_m qui lui est propre et qui dépend notamment de sa composition en bases G et C. Le lightcycleur détermine ce T_m par analyse de la décroissance de la fluorescence au cours d'un cycle de température allant progressivement de 60 à 95°C par pas de 0,5°C.

D/ Analyse du profil de l'expression génétique d'un tissu par utilisation de la technique SAGE

1/ Fabrication des banques SAGE

Le profil d'expression global des gènes dans un tissu est obtenu par l'application de la technique SAGE (Serial Analysis Gene Expression). Cette technique, qui permet de déterminer sans a priori l'expression de l'ensemble des gènes dans un tissu, a été utilisée afin de comprendre les impacts de la bioaccumulation du MeHg dans le muscle après 25 jours d'exposition. La technique SAGE a été réalisée avec le kit "I-SAGE Long Kit" (Invitrogen) utilisant la technique décrite par Velculescu *et al.* (1995) (Figure 15). Les différents tampons utilisés lors du déroulement de la technique SAGE sont détaillé en annexe dans un tableau. Pour ce faire, tous les ARN messagers présents dans le muscle squelettique ont été prélevés chez des poissons témoins et des poissons contaminés. Les ARN ont été extraits à partir de broyat de muscle squelettique dans un tampon de lyse. Le lysat est ensuite centrifugé 5 min, 15000 g à 4°C afin de culoter les débris cellulaires. Puis les microbilles magnétiques (100 µL d'une solution à 5 mg.mL⁻¹), sur lesquelles sont fixés des oligodT, ont été ajoutées au lysat. Le tout est mélangé sur un support rotatif pendant 20 min. Ce mélange, lysat plus microbilles, est ensuite transféré dans d'autres tubes eppendorf ultras propres qui ne fixent ni les ARN ni les microbilles. Les tubes sont placés 5 min sur un banc magnétique et le surnageant est enlevé. Les microbilles sont ensuite lavées 8 fois : 2 lavages avec 500 µL de tampon de lavage A, puis 2 lavages avec 500 µL du tampon B (le volume final est progressivement abaissé à 100 µL) et finalement 4 rinçages avec 100 µL de "First strand buffer" (18 µL de first strand buffer 5X, 1 µL de RNase out à 40 U.µL⁻¹, 0,1 µL de DTT à 0,1 M, 4,5 µL de

dNTP à 10 mM et 54,5 μL H_2O DEPC). Après chacun de ces rinçages, les tampons sont éliminés par utilisation du support magnétique. Une fois les lavages terminés, les microbilles sont remises en suspension et incubées 2 min à 37°C dans 87 μL de "First strand buffer". La synthèse des brins complémentaires d'ADN correspondant aux seuls ARNm est effectuée à 42°C pendant 1 h par l'ajout de 3 μL d'une rétro-transcriptase, la RT superscriptII à 200 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. Après l'heure d'incubation, les tubes sont refroidis 2 min sur la glace avant la synthèse du second brin nécessaire à l'obtention d'un ADNc double brin lui-même nécessaire pour les réactions de restriction enzymatique prévues dans la suite du protocole. Cette synthèse du second brin d'ADNc est effectuée à 16°C pendant au moins 2 h par l'ADN polymérase en présence de RNase H qui lors de la dégradation de l'ARNm de l'hybride ADN-ARN laisse de petits fragments servant d'amorce à l'ADN polymérase. Tous les petits fragments d'ADN synthétisés constituant le second brin d'ADN sont ensuite liés par l'action de la ligase. Ces trois enzymes proviennent d'*E. coli*, et la réaction a lieu dans un mélange constitué de 465 μL d'eau DEPC, 150 μL de tampon "Second Strand Buffer 5X", 15 μL de dNTP 10 mM chacun, 5 μL de ligase à 10 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 20 μL ADN polymérase à 10 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ et 5 μL RNase H à 2 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. La réaction est ensuite stoppée en plaçant le tube dans la glace et en ajoutant 45 μL d'EDTA à 0,5 M. Le tube est ensuite placé sur le support magnétique, le surnageant est prélevé délicatement puis les billes sont remises en suspension dans 750 μL de tampon de lavage C au préalablement chauffé à 75°C pour inactiver l'ADN polymérase et le tout est chauffé à 75°C pendant 10 min. Un second lavage rapide est fait avec le tampon C suivi de trois lavages avec 750 μL de tampon D afin de retirer toute trace de SDS pouvant interférer avec les réactions suivantes. Les microbilles sont ensuite reprises dans 200 μL de tampon 4 1X et transférées dans un nouveau tube ultra propre pour enlever toute activité exonucléase possible par une contamination avec l'ADN polymérase d'*E. coli*. Le nouveau tube est ensuite placé sur le support magnétique, le surnageant est jeté et remplacé par 200 μL d'un mélange réactionnel (LOTE 172 μL , 2 μL de BSA 100X, 20 μL de tampon4 10X) contenant l'enzyme de restriction *Nla* III (0,3 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) puis placé à 37°C pendant 2 h. Une fois la réaction de digestion effectuée, le surnageant est éliminé et l'enzyme de restriction est inactivée par ajout de 750 μL du tampon C chauffé suivi de trois lavages avec 750 μL de tampon D. Les fragments d'ADNc fixés aux microbilles sont rincés deux fois avec du tampon de ligation puis resuspendus dans 100 μL de ce même tampon avant d'être divisés en deux volumes égaux dans deux nouveaux tubes. Dans chacun de ces tubes sera ajouté un type d'adaptateur, soit le LSA, soit le LSB, qui sera ligué sur le double brin d'ADNc au niveau du site de restriction de *Nla* III. Pour que cette réaction soit effectuée, les tubes sont placés dans

la glace et les microbilles sont remises en suspension dans 14 μL de LOTE, 2 μL du tampon de ligation 10X et 1,5 μL d'un des adaptateurs ($40 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$). Une fois les microbilles reprises dans ce mélange les deux tubes sont placés à 45°C pendant 5 min puis laissés 15 min à température ambiante et finalement mis dans la glace. Après ces différents traitements thermiques, 2,5 μL de T4 DNA ligase ($4 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) sont ajoutés dans chaque tube, le tout est brièvement mélangé sur la glace et laissé à 16°C une nuit. Nous obtenons ainsi deux lots d'ADNc présentant chacun un type d'adaptateur. La ligase et le surplus d'adaptateur sont ensuite éliminés par trois lavages successifs avec 200 μL d'un tampon D suivi de 2 lavages avec 200 μL du mélange tampon 4 1X et tampon SAM 1X (32 mM S-adénosylméthionine). A l'aide du support magnétique, le surnageant est éliminé et les microbilles sont reprises dans 100 μL de solution contenant 77 μL de LOTE, 10 μL tampon 4 10X, 10 μL de tampon SAM 10X et 3 μL d'une enzyme de restriction de type II, l'endonucléase *Mme* I ($2 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), cette enzyme de restriction va couper l'ADNc double brin environ 21 nucléotides en aval de son site de fixation ($5' \text{-TCCRAC-}3'$) qui se trouve sur les adaptateurs adjacent à la séquence $5' \text{-CATG-}3'$ correspondant au site de restriction de *Nla*III.

La digestion effectuée par *Mme* I est faite à 37°C pendant 2,5 h et libère dans le surnageant des tags de 61 paires de base formées de l'adaptateur (40 pb) et d'un segment unique (21 pb) provenant de l'ADNc double brin. A l'aide du support magnétique, le surnageant est récupéré pour les deux adaptateurs et sont mélangés pour pouvoir former des ditags. Pour ce faire, les tags présents dans le mélange sont soumis à une extraction au phénol : chloroforme : alcool isoamylique (PCI) puis précipités avec ajout de 3 μL de glycogène de moule, 133 μL d'acétate d'ammonium (2,5 M final) et 1 mL de l'éthanol absolu froid (-20°C). Après centrifugation 20 min, 15000 g à 4°C , le culot est lavé deux fois avec de l'éthanol à 70 % froid. Après le dernier lavage, le culot est séché 5 à 10 min à l'air pour enlever les dernières traces d'éthanol, puis il est repris dans 4 μL de LOTE 15 min à 37°C pour faciliter la solubilisation. A ces 4 μL sont ajoutés 4 μL de tampon de réaction 2X (1,5 μL de Tris-HCl pH 7,5 à 3 mM, 0,9 μL de tampon de ligation 10X, 0,9 μL d'eau DEPC, et 1,4 de T4 DNA ligase à $4 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) suivi d'une incubation à 16°C sur la nuit pour former les ditags.

Trois dilutions des ditags produits (1/20, 1/40, et 1/80) ont été amplifiées par PCR avec des réactifs de Promega (solution tampon 5X, de MgCl_2 25mM, et *Taq* polymérase) avec les paramètres d'amplification suivants : 2 minutes à 95°C pour dénaturer l'ADN suivie de 27 cycles (30 sec 95°C , 1 minute à 55°C , et 1 minute à 72°C) suivi d'une période finale d'élongation de 5 minutes. Les réactions de PCR sont alors analysées par l'électrophorèse en gel d'agarose. La dilution ayant donné la meilleure amplification sera utilisée pour faire

l'amplification à grande échelle par PCR (90 réactions identiques). Une petite modification fut apportée aux amorces utilisées pour l'amplification à large échelle, elles ont été rallongées de 10 pb par rapport à celles fournies dans le kit permettant ainsi une meilleure séparation des ditags des adaptateurs rallongés sur gel après digestion avec *Nla* III, les nouveaux adaptateurs sont les suivants : LS DTP-1; 5' – GTTCCGTCTGGTGCTCGTGGGATTTGCTGG – 3', et LS DTP-2; 5' – GTTCCGTCTGGAGCTCGTGCTGCTCGAATT – 3'). Les produits obtenus par l'amplification à large échelle ont été extraits au PCI puis précipités à l'éthanol avant d'être culotés par 20min de centrifugation, 15000 g à 4°C. Le culot ainsi obtenu est lavé 2 fois avec 500 µL d'éthanol 75 %, séché à température ambiante puis incubé à 37°C 10min dans 300 µL de LOTE pour faciliter la redissolution. Un gel d'électrophorèse à 12 % polyacrylamide d'une épaisseur de 1,5 mm est confectionné avec 24 mL d'acrylamide à 40 %, 1,2 mL du bisacrylamide à 2 %, 8 mL d'ammonium persulfate à 10 %, 36 mL d'eau ultra pure autoclavée, 0,8 mL de TBE 10X, et 69 µL de TEMED. Une fois le TEMED ajouté le gel est coulé à l'aide d'une seringue de 50 mL puis le peigne est inséré. Les ditags sont chargés sur ce gel d'électrophorèse et la migration se déroule ensuite dans du TBE 1X jusqu'à sortie du front de migration du bleu de bromophénol présent dans le tampon de charge. Après l'électrophorèse le gel est coloré avec du BET (2 µg.mL⁻¹) puis les bandes sont visualisées sous UV. Les bandes à 150 pb sont excisées à l'aide d'une lame de scalpel, chaque bande est coupée en deux et chaque moitié de bande est placée dans un micro tube eppendorf de 0,5 mL dont le fond a préalablement été percé à l'aide d'une aiguille. Ces tubes sont ensuite placés dans des tubes stériles de 1,5 mL et centrifugés à 15000 g pendant 3 min cassant ainsi les bandes découpées en petits morceaux. L'ADN présent dans ces petits fragments de gel est élué à 65°C pendant 2h dans un tampon approprié constitué de 150 µL de LOTE plus acétate d'ammonium à 7,5 M (125 : 25). Les éluats obtenus sont mélangés par trois, chargés sur des colonnes SNAP puis centrifugés 2 min à 15000 g. Les nouveaux éluats sont mélangés puis aliquotés en volume de 300 µL dans de nouveaux tubes stériles de 1,5 mL pour être précipités à l'éthanol, lavés, puis les culots sont repris dans 14 µL de LOTE et à nouveau mélangés et placés à – 20°C jusqu'à utilisation. Les ADN purifiés sont ensuite repartis dans trois tubes (environ 42 µL par tube) pour effectuer la digestion *Nla* III qui va permettre d'éliminer les adaptateurs encadrant les ditags d'ADNc (34 pb), pour ce faire dans chacun des trois tubes contenant les ditags de 150 pb est ajouté 15 µL du tampon 4 10X, 2 µL de BSA 100X, 12 µL de *Nla* III et 79 µL d'eau DEPC et le tout est incubé sur la nuit à 37°C. Un gel à 12 % acrylamide/bisacrylamide est préparé pour faire migrer les produits de digestion sous un ampérage de 33 mA pendant environ 3 h jusqu'à ce que le front de migration du bleu de

bromophénol soit à 3 cm de la fin du gel. A l'issue de la migration, le gel est coloré au BET et les bandes visibles à 34 pb, correspondant aux ditags sans les adaptateurs, sont découpées sous UV en utilisant une lame de scalpel pour en extraire l'ADN comme décrit précédemment. L'ensemble des culots obtenus est alors repris à 4°C dans 7,75 µL de LOTE et 1 µL de tampon 10X de ligation. Une fois les culots dissous, 1,25 µL de T4 DNA ligase (4 U.µL⁻¹) sont ajoutés permettant ainsi de lier les ditags entre eux et former des concatémères. Cette concatémérisation a été effectuée à 16°C pendant 3 h suivi de l'inactivation de la ligase par un choc thermique 10 min à 65°C. Tout l'échantillon est ensuite déposé sur un gel d'agarose 2 % donnant après migration une trainée allant de 100 pb à 1 kpb visible sous UV. Cette trainée est divisée en trois grands groupes : le premier comprenant les fragments de 200 à 400 paires de base, le second allant de 400 à 1000 paires de base et enfin le dernier groupe allant de 1000 jusqu'au plus hautes tailles. Chaque région est ensuite coupée en deux et placée dans des tubes de 0,5 mL au fond percé eux même placés dans des tubes de 1,5 mL. Ce montage est centrifugé 5 min à 15000 g et les fragments d'agarose générés sont recouverts par 200 µL de LOTE/acétate d'ammonium (5 : 1) et placés 2 h à 65°C. A la suite de cette incubation les éluats d'une même région sont réunis et placés sur une colonne SNAP, et centrifugée 2 min à 15000 g. L'ADN présent dans les éluats issus des trois régions est extrait au PCI, précipité à l'éthanol, séché et finalement repris dans 6 µL de LOTE.

Les concatémères obtenus sont ensuite clonés dans le plasmide pZErO[®]-1 pour ensuite être insérés dans des bactéries "One Shot[®] TOP 10 Electrocomp[™] *E. coli*" (*E. coli* TOP 10) dans l'objectif de les séquencer pour finalement obtenir une banque correspondant au profil génétique reflétant l'état physiologique du tissu étudié.

Pour pouvoir cloner les concatémères dans le pZErO[®]-1, il faut tout d'abord le couper par une enzyme de restriction, l'enzyme *Sph* I, qui va former des bouts cohésifs complémentaires aux extrémités des concatémères. Cette digestion du plasmide se déroule à 37°C pendant 30 min dans un milieu réactionnel constitué de 2 µL du plasmide (1 µg.µL⁻¹), 2,5 µL du tampon 2 10X, 1,4 µL de *sph* I (5U.µL⁻¹) et 19,1 µL d'eau stérile. La réaction est stoppée par l'ajout de 175 µL de LOTE immédiatement suivi d'une extraction au PCI et d'une précipitation à l'éthanol. La pelote d'ADN obtenue est resuspendue dans 60 µL de LOTE pour finalement être répartie dans 6 micro-tubes et stockée à - 20°C.

Les concatémères purifiés précédemment sont ligués dans le pZErO[®]-1 linéarisé pour pouvoir transformer les bactéries *E. Coli* Top 10. La ligation des concatémères se fait pendant 3 h à 16°C dans un volume réactionnel de 10 µL constitué de : 6 µL de concatémères, 1 µL de pZErO[®]-1 linéarisé par *sph* I, 1 µL de tampon 10X de ligation et enfin 2 µL de T4 DNA

ligase ($4 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$). Une fois la réaction de ligation achevée, le volume est ajusté à $200 \mu\text{L}$ avec du LOTE suivi d'une extraction au PCI et d'une précipitation à l'éthanol. $12 \mu\text{L}$ de LOTE permettent de reprendre la pelote d'ADN obtenue pour effectuer la transformation des *E. coli* TOP 10. La transformation est faite avec $1 \mu\text{L}$ de mélange de ligation ajouté à $50 \mu\text{L}$ de bactéries électrocompétentes dans des cuvettes d'électroporation préalablement refroidies sur la glace en utilisant les paramètres suivants : 100Ω , $25 \mu\text{F}$ et 2500 V . Puis, $250 \mu\text{L}$ de milieu de culture liquide (milieu SOC, Hanahan, 1983) sont ajoutés et le tout est incubé 1 h à 37°C , temps nécessaire aux bactéries pour exprimer le plasmide et ainsi acquérir la résistance à la zéocine. A l'issue de cette étape, $750 \mu\text{L}$ de SOC sont ajoutés pour ajuster le volume à 1 mL et la totalité des 1 mL de suspension bactérienne est étalée sur milieu LB solide (Luria Bertani, Sambrook *et al.*, 1989) contenant de la zéocine ($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Après une nuit d'incubation à 37°C , les colonies obtenues sont isolément repiquées dans des tubes remplis avec 3 mL de milieu LB liquide contenant de la zéocine ($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Les tubes sont placés une nuit à 37°C sous agitation avant discrimination des clones par PCR à l'aide d'amorces universelles présentes sur le plasmide (T7 et Sp6) suivant le profil thermique suivant :

- Une étape à 94°C pendant 2 min permettant de lyser les bactéries et de libérer le plasmide.
- 24 cycles de PCR classique (30 s à 94°C ; 1 min à 55°C ; 1 min à 70°C)
- Une étape finale à 70°C pendant 5 min permettant d'achever l'élongation des brins.

Les produits de PCR sont ensuite analysés sur gel d'agarose 1 % et ne sont sélectionnées que les colonies présentant des inserts de taille supérieure à 400 pb. Finalement plus de 2500 colonies ont été criblées par PCR par banque SAGE. Le séquençage des concatémères a été effectué par la société Cogenix (Meylan, France).

2/ Identification des tags

La séquence et l'occurrence de chacune des tags ont été déterminées par Cogenix (Meylan, France). Pour identifier les transcripts, les séquences des tags de 21 pb (le site de restriction de *Nla* III plus les 17 pb adjacentes) de chacune des banques SAGE ont été identifiées à l'aide d'une base de données publique. Cette base de données était accessible sur le serveur d'EMBL-EBI (<http://srs.ebi.ac.uk/>). La base de données a été obtenue en utilisant la commande "uniprot< ([[EMBL-org:danio rerio]&[EMBL-mol:mrna)]! [EMBL-div:est]" ce qui permet de chercher dans la base de données "EMBL" l'ensemble des ARNm identifiés de *Danio rerio* en excluant les EST (Expressed Sequenced Tags) correspondant aux protéines

listées dans la base de données “uniprot”. En raison de l’énorme matrice de données, nous avons décidé d’automatiser l’identification des tags à l’aide de programmes informatiques permettant d’extraire le nom du gène correspondant à chaque étiquette de la SAGE en employant le langage de programmation shell BASH sous le système d’exploitation Linux Fedora.

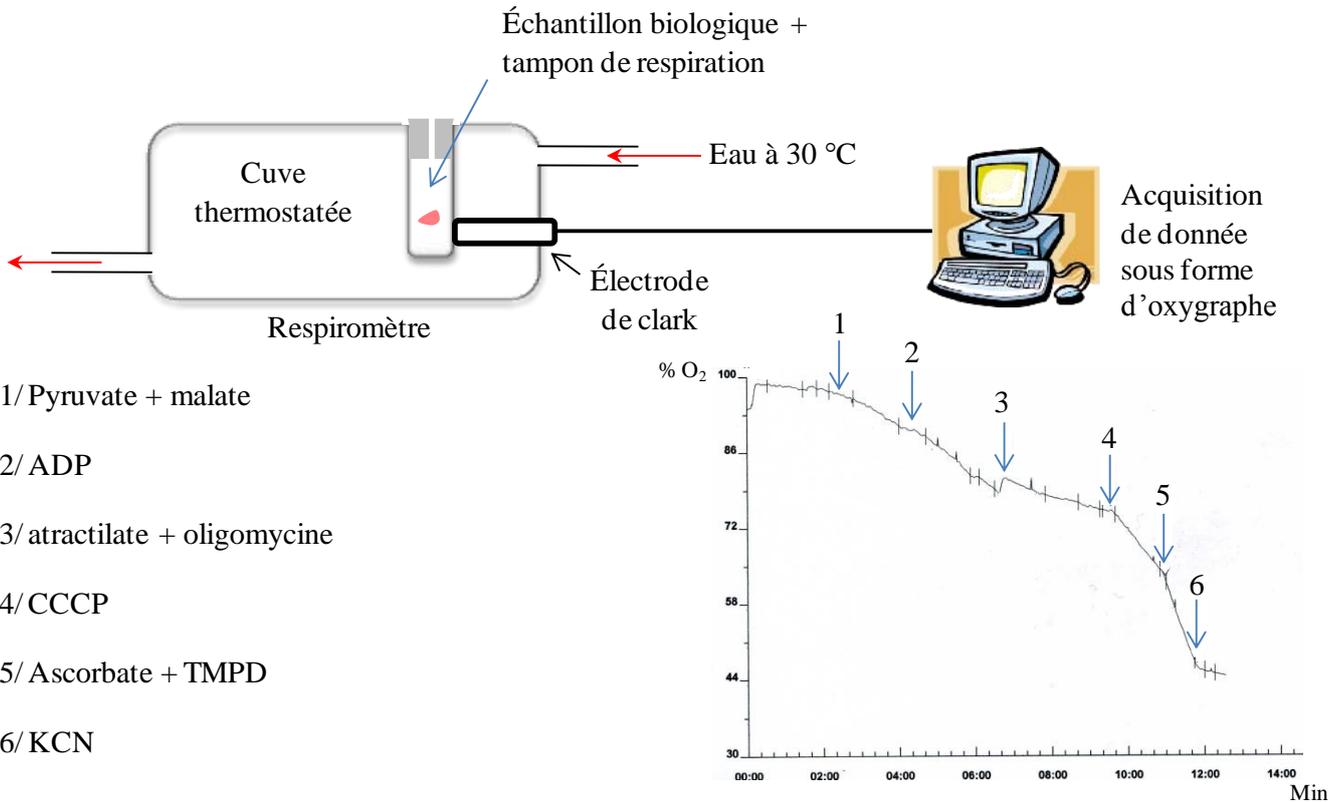
3/ Programmation sous BASH

Les programmes rédigés sous BASH ont permis de dresser la liste des tags avec le nom du gène qui code pour l’ARNm dont ils sont issus. Mais ces programmes ont également permis de mettre en forme la base de données téléchargée comportant les séquences d’ARNm clairement identifiés chez le poisson zèbre. Les programmes utilisés sont présentés en détail dans les annexes.

VI/ Méthodes biochimiques appliquées à l’analyse des impacts du MeHg sur les mitochondries

L’intégrité des mitochondries peut être abordée sous deux approches permettant d’avoir des informations complémentaires. La première approche est une approche qui permet d’analyser l’activité de la chaîne respiratoire par le suivi de la consommation de l’oxygène présent dans le milieu où l’analyse est effectuée. Cette mesure de l’activité respiratoire a été faite sur le tissu entier ayant subi un traitement préalable permettant aux substrats et inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale de pouvoir accéder et agir sur la mitochondrie. L’autre approche consiste à observer les possibles altérations au niveau des complexes de la chaîne respiratoire. Pour cela, la fraction mitochondriale des tissus est extraite, donnant ainsi la possibilité d’observer chaque complexe par utilisation de la technique du western blot. La technique du western blot va permettre d’obtenir une quantification d’une des sous-unités du complexe étudié reflétant ainsi par la même la quantité de ce complexe sachant que les sous-unités de chaque complexe sont en stœchiométrie identique. La contrainte de cette dernière approche repose sur la nécessité d’anticorps qui reconnaîtront une des sous-unités du complexe ciblé ce qui n’est pas toujours possible. La combinaison de ces deux approches permet donc de mettre en relation les modifications de la composition de la chaîne de transport des électrons et leurs répercussions sur le métabolisme mitochondrial.

A/ Obtention d'un oxygraphe



B/ Principe de l'analyse par western blot

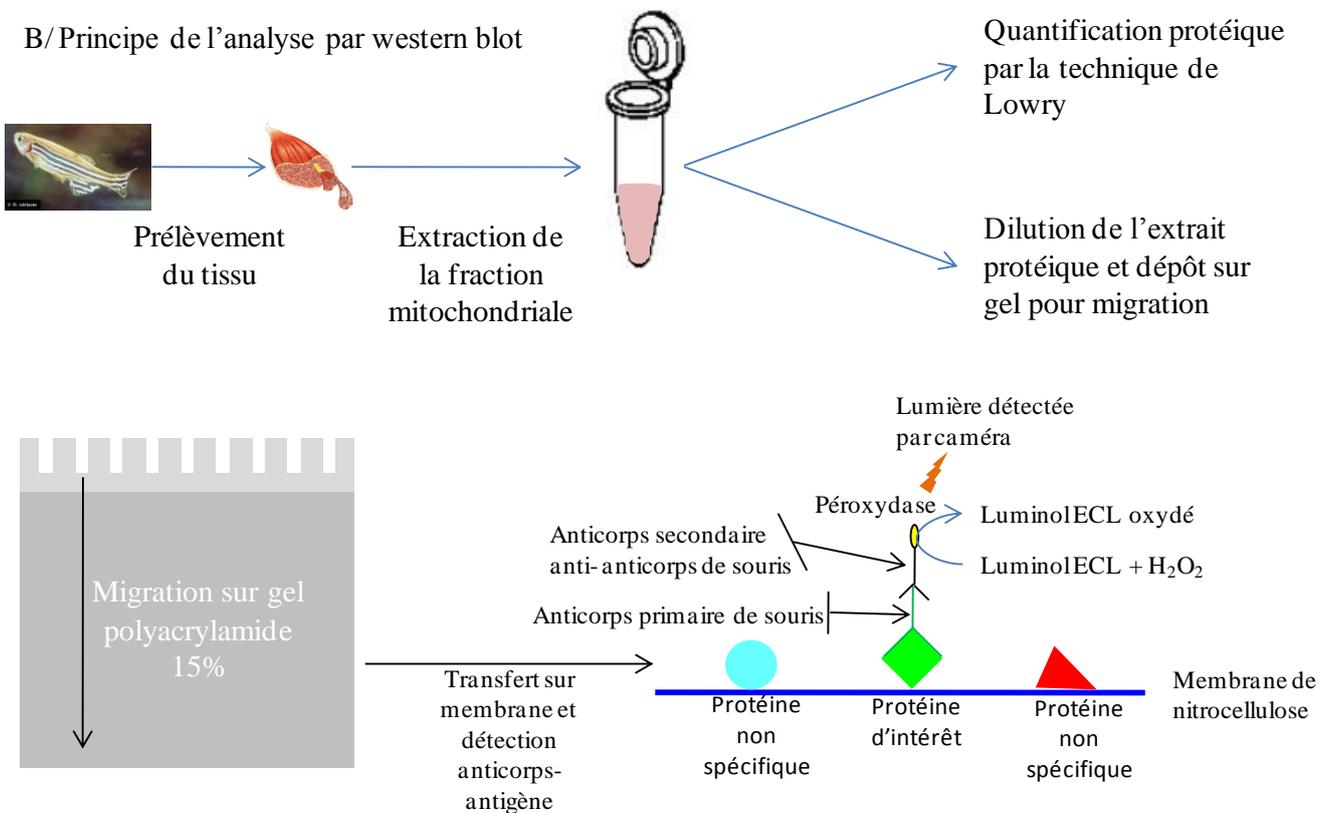


Figure 16 : Principes de la quantification de l'activité respiratoire d'un tissu et de l'analyse protéique par western blot.

A/ Respiration sur fibres musculaires perméabilisées

Les fibres musculaires du poisson zèbre sont prélevées sans peau et à proximité de la nageoire caudale car c'est une zone riche en fibres musculaires rouges. Les fibres musculaires rouges participent aux mouvements normaux de nage du poisson et consomment donc beaucoup d'ATP. Pour subvenir à ses besoins élevés en énergie, ce tissu présente une forte quantité de mitochondries qui permettent de générer suffisamment d'ATP. Cette grande quantité d'ATP est la raison principale du choix de ce tissu pour la mesure de la respiration. Une fois les fibres rouges prélevées, elles sont perméabilisées pendant 1 min dans un tampon A (10 mM d'EGTA, 3 mM de $MgCl_2$, 20 mM de taurine, 0,5 mM de dithiothréitol, 20 mM d'imidazole, dans 0,1 M de tampon MES- K^+ pH 7,0) contenant 5 mM d'ATP, 20 mM de phosphocréatine et $50 \mu g \cdot mL^{-1}$ de saponine (Letellier *et al.* 1992) (Figure 16 A). Cette étape de perméabilisation du tissu musculaire permet une diffusion facilitée de petites molécules entre le tampon de respiration et le cytoplasme où se trouvent les mitochondries. Une fois perméabilisées, ces fibres sont rincées deux fois à $4^\circ C$ pendant 15 min dans le tampon B (tampon A contenant 3 mM de KH_2PO_4 et $5 mg \cdot mL^{-1}$ d'albumine sérique bovine sans acides gras (BSA)) pour retirer toute trace de saponine. Les fibres ainsi préparées sont ensuite mises dans la cuve du respiromètre avec 1 mL de tampon de respiration (tampon B avec $50 \mu M$ de di(adenosine- 5') pentaphosphate, 10mM d'iodoacetate, 0,2 mM d'EDTA et les substrats respiratoires : 10 mM de pyruvate et 10 mM de malate). La consommation d'oxygène mitochondriale est suivie par polarographie dans la cuve thermostatée à $30^\circ C$ avec une électrode de Clark. Plusieurs vitesses de consommation d'oxygène sont enregistrées correspondant aux états 3 et 4 de la respiration mitochondriale et la vitesse maximale de la cytochrome *c* oxydase. La consommation d'oxygène à l'état 3 correspond au flux maximum d'électrons au sein de la chaîne respiratoire liée à la synthèse d'ATP par l'ATPsynthase. Pour provoquer cet état en plus des substrats respiratoires, de l'ADP est également ajouté à 2 mM. L'état 4 correspond à la respiration mitochondriale nécessaire pour contrebalancer la perméabilité passive aux protons de la membrane interne en absence de synthèse d'ATP. Pour mesurer l'activité respiratoire à cet état, 2 inhibiteurs, l'atractylate (1 mM final) et l'oligomycine ($2 \mu g/mL$ finaux), sont ajoutés. L'atractylate est un inhibiteur de la translocase ADP-ATP de la membrane interne de la mitochondrie empêchant les échanges entre la matrice mitochondriale et le cytoplasme. L'oligomycine va inhiber l'ATPsynthase en bloquant le canal à proton. Cette inhibition de l'ATPsynthase va empêcher la consommation du gradient protonique et placer la mitochondrie en état 4. Le contrôle respiratoire est défini comme le rapport de la respiration à l'état 3 sur la respiration à l'état 4. Ce contrôle

respiratoire permet d'analyser le contrôle de la respiration mitochondriale par l'ajout d'ADP. De tous les complexes de la chaîne respiratoire seule l'activité du complexe IV peut être analysée facilement et donner des informations quant à son intégrité. Pour ce faire la chaîne respiratoire est bloquée au niveau du complexe 3 par l'antimycine A puis entièrement découplée par l'ajout de carbonyl cyanide m-chloro phénylhydrazone (CCCP) ce qui va entièrement supprimer le gradient protonique de la membrane interne. Le complexe IV n'étant plus alimenté en électrons et ne pouvant plus être inhibé par le gradient protonique, son activité maximale peut être étudiée en lui administrant directement des électrons. Ces électrons sont fournis par l'ajout d'ascorbate (3 mM finaux) et de tétraméthyl-*p*-phénylènediamine (TMPD) (0,5mM finaux). La respiration est finalement stoppée par ajout de 10 µl de KCN à 0,1 M. Le graphique obtenu donne le suivi cinétique de la consommation en O₂. Pour chaque étape de la cinétique, l'activité respiratoire est calculée en nmol O₂/min/mg de fibre musculaire (poids frais).

B/ Respiration sur cerveau

La respiration est mesurée sur cerveau complet pour étudier un possible impact du MeHg sur les activités mitochondriales comme un des aspects possibles de sa neurotoxicité. Le cerveau est prélevé, pesé puis broyé en effectuant 13 passages à l'aide d'un potter dans le tampon de respiration permettant l'obtention d'un broyat homogène avec des mitochondries fonctionnelles.

Le broyat de cerveau est mis dans la cuve du respiromètre et le volume est complété jusqu'à 1 mL avec le tampon utilisé pour le broyage. Ce tampon est prévu pour suivre l'activité respiratoire des mitochondries issues du cerveau. Il est constitué de mannitol à 0,225 M, de saccharose à 0,075 M, d'EDTA à 0,1 mM, de KCl à 5 mM, d'acide phosphorique à 5 mM, de Tris 15 mM pH 7,4 et de BSA à 2 mg.mL⁻¹. Les mesures de respiration sont effectuées par le même procédé que celui décrit pour le muscle.

C/ Isolement de la fraction mitochondriale

La méthode utilisée est celle de Itoi *et al.* (2003). Les fibres musculaires sont prélevées sur des poissons venant d'être sacrifiés, puis hâchées et enfin rincées dans du tampon d'isolement (tampon I: 140 mM de KCl, 5 mM de MgCl₂, 20 mM de tampon HEPES contenant 0,5 % de BSA, 10mM d'EDTA, pH 7) à 4°C. Une fois rincées, les fibres sont mélangées dans dix volumes de tampon I puis homogénéisées dans un Potter par cinq passages de piston en Téflon : 2 lâches suivis de 3 passages serrés. L'homogénat obtenu est

centrifugé à 800 g pendant 5 minutes à 4°C ; le surnageant est ensuite récupéré et filtré à travers 9 épaisseurs de gaze. Le filtrat est centrifugé à 9000 g pendant 10 minutes, le culot mitochondrial est repris dans 12 mL du tampon I sans BSA. L'ensemble est centrifugé à nouveau à 800 g, le surnageant est récupéré puis centrifugé à 9000 g. Le culot obtenu est repris dans 200 µl de tampon I sans BSA donnant la fraction mitochondriale qui est congelée dans l'azote liquide et conservée à - 80°C.

D/ Le western-blot

Des fractions mitochondriales (1mg protéines/mL) préparées à partir des muscles de poissons contaminés pendant 25 et 50 jours furent préparées. Pour chacune des fractions, 10 µg de protéines furent déposés par piste sur gel SDS-PAGE 15%. La migration fut conduite pendant 2 h à 30 mA dans le tampon de migration de Laemmli (50 mM de Tris-HCl pH 8,6, 330 mM de glycine et 0,15 % de SDS). Les produits de migration sont ensuite transférés sur une membrane de nitrocellulose par transfert semi-sec pendant 20 min sous 1,5 mA/cm². Chacune des membranes est ensuite incubée avec un anticorps monoclonal (MitoScience) de souris spécifique d'un complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale du poisson zèbre. Les anticorps monoclonaux du poisson utilisés ciblaient respectivement les complexes I, II, IV, V (ATPsynthase), et la porine. Puis les membranes furent incubées avec un anticorps anti-IgG de souris (Jackson Immuno Research Laboratory, Inc.) couplé à la peroxydase de raifort. Les bandes protéiques reconnues par les anticorps primaires furent révélées par chimio-luminescence (ECL Western Blotting, Amersham Biosciences) (Figure 16 B).

VII/ Analyses histologiques appliquées à l'étude des fibres musculaires et du cerveau du poisson zèbre

A/ Préparation des échantillons pour la microscopie optique et électronique

Des morceaux de muscle squelettique (2 mm d'épaisseur) sont systématiquement prélevés à proximité de la nageoire anale. Ces morceaux ont été immédiatement immergés dans une solution de fixation (glutaraldéhyde à 3 % tamponné avec une solution de cacodylate de sodium à 0,1 mM, pH 7,4 ; le tout d'osmolarité 600 mosmol.L⁻¹) pendant 12 h à 4°C puis rincés dans le tampon de cacodylate de sodium (0,1 mM, NaCl 2%). Après déshydratation le tissu est inclus dans de l'Araldite dans le but de préparer des coupes à l'aide d'un ultra-microtome automatique (Reichert). Pour la microscopie optique des coupes semi-fines (1,5 µm) sont réalisées puis colorées avec du bleu de toluidine (1 %) et du borate de méthylène (1 %) avant d'être analysées sous microscope (Leitz Orthoplan). Pour la microscopie

électronique des coupes ultrafines (500 à 700 Å) sont préparées et déposées sur des grilles pour être observées au microscope électronique à transmission (Philips CM10)

B/ L'autométallographie

La technique d'autométallographie utilisée a été adaptée à partir de la technique de Danscher (1984). Le mécanisme de base sur lequel repose la technique peut être résumé à la formation d'une coquille d'argent métallique autour de "noyaux" de métaux traces après avoir recouvert la coupe de tissu avec une émulsion d'argent (Ilford Nuclear emulsion L4) et le tout est placé à l'obscurité totale pendant 15 min dans le révélateur (Ultrafin tetenal, AGFA). Après cette incubation les coupes sont rincées dans un bain d'arrêt à 1 % d'acide acétique pendant 1 min puis plongées dans le fixateur (B&W Fixer, AGE, AGFA) pendant 10 min. La qualité de l'émulsion est contrôlée par l'observation de l'uniformité des grains d'argent en recouvrant une coupe vierge d'élément biologique. Des dépôts métalliques apparaissent noir car dense aux électrons indiquant la présence d'une encapsulation du métal par de l'argent (Danscher 1984; Soto *et al.*, 1998).

VIII/ Etude de la reproduction des poissons

Des poissons zèbres adultes ont été acclimatés 2 semaines dans les bacs allant servir à leur exposition. Les poissons femelles ont été séparés des poissons mâles pour former quatre groupes au final. Deux groupes étaient composés de 10 poissons femelles chacun, l'un des lots allant servir de groupe témoin et l'autre allant être exposé au MeHg par voie trophique (13,5 µg Hg.g⁻¹ de nourriture). Les deux autres groupes ont été constitués de 20 poissons mâles dans le même but que pour les poissons femelles. L'exposition des poissons s'est déroulée exactement comme décrit précédemment dans la section "contamination des poissons" avec une différence dans le temps d'exposition, qui au lieu d'être de 50 jours, a duré 80 jours. Dix groupes de poissons témoins et 10 groupes de poissons contaminés au MeHg ont été placés séparément dans une pièce chauffée à 25°C par lot de trois poissons constitués d'une femelle et de deux mâles. Ces 20 groupes de trois poissons ont été placés séparément dans des pondoires eux même placés dans de petits aquariums permettant d'éviter la prédation des adultes sur les œufs nouvellement pondus. La ponte elle-même est induite par la lumière. La viabilité des œufs est regardée 24 h après fertilisation par observation à la loupe binoculaire. Cette viabilité est suivie jusqu'à éclosion des œufs et après l'éclosion par observation des larves et détermination de leur taux de survie.

Chapitre 1



Analyse de la génotoxicité du MeHg dans le muscle squelettique et le cerveau.



I/ Utilisation de la RAPD et de PCR quantitative en temps réel pour détecter les effets génotoxiques du MeHg

Les impacts génotoxiques du MeHg ont déjà été observés sur des cultures cellulaires ainsi que sur des organismes vivants (WHO, 1990, Hempel, 1995). Mais de façon étonnante, aucune étude n'a été conduite sur un organisme aquatique alors que cette forme du Hg est principalement produite au sein des écosystèmes aquatiques. Dans ce chapitre, nous nous sommes donc intéressés à l'étude de la génotoxicité du MeHg chez un organisme aquatique modèle, le poisson zèbre, contaminé par voie trophique. Cette étude a été réalisée sur les muscles squelettiques et le système nerveux central qui bioaccumulent fortement ce métal.

Pour mener à bien cette analyse, nous avons utilisé la RAPD, une technique qui a été mise au point dans un premier temps pour la détection du polymorphisme génétique et qui s'est également avérée efficace dans la détection d'altérations chimiques et physiques du patrimoine génétique, couplée à la PCR quantitative en temps réel permettant une approche quantitative et qualitative de la génotoxicité.

Introduction

La technique RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) est très largement utilisée dans différents domaines de recherche. La RAPD est une technique assez simple d'utilisation qui permet de détecter des modifications au niveau du génome de façon fiable et sensible sans pour autant avoir au préalable besoin de connaître quelles qu'informations que ce soit sur le génome de l'organisme étudié. Cette technique est basée sur l'utilisation de la PCR mais avec seulement une amorce de petite taille qui correspond à une séquence arbitraire de 10 nucléotides. L'utilisation de la technique RAPD a permis de détecter, par exemple, le polymorphisme génétique au sein de différentes variétés de Lotus et également entre des souches de *Renibacterium salmoninarum* provenant de diverses localisations géographiques (Campos *et al.*, 1994, Grayson *et al.*, 1999). Cette technique a également permis de différencier les souches de *R. salmoninarum* provenant de différents hôtes alors que des techniques plus conventionnelles ont échoué. L'utilisation de la RAPD s'est également montrée efficace et conforme aux données décrites dans la littérature dans la discrimination de différents groupes phylogénétiques de la bactérie *Borrelia burgdorferi*, responsable de la maladie de Lyme (Welsh *et al.*, 1992). Cette technique a également été utilisée dans le domaine de la carcinogénèse. Les tumeurs des os, des poumons et du cerveau ont été analysés par RAPD, et dans ces trois cas des dommages à l'ADN furent décelés dans les profils d'amplification obtenus (Dil *et al.*, 1998, Ong *et al.*, 1998, Singh *et al.*, 2001). Cette capacité de déceler des modifications au niveau de l'ADN génomique de tumeurs en comparaison avec des tissus sains font de cette technique un outil adéquat pour l'étude d'impacts génotoxiques (adduits à l'ADN, cassures de l'ADN et mutations) de xénobiotiques sur divers organismes (Savva *et al.*, 1996). Diverses études ont été menées dans la détection d'effets génotoxiques par l'utilisation de la RAPD. Ces études ont balayé un très large éventail de polluants incluant des polluants organiques tels que le benzo(a)pyrène (Atienzar *et al.*, 2004), la mitomycine C (Becerril *et al.*, 1999), le 4-n-nonylphénol et le β -œstradiol (Atienzar *et al.*, 2002), des polluants métalliques (plomb, manganèse, cadmium, cuivre) (Atienzar *et al.*, 2001, Enan *et al.*, 2006, Liu *et al.*, 2005) et enfin des stress physiques comme les UV, les rayons X et des radionucléides (Atienzar *et al.*, 2006). A la suite de ces diverses analyses, des effets génotoxiques ont été détectés indiquant des effets directs ou indirects de ces composés sur l'ADN génomique. Cette technique s'avère donc efficace dans la détection d'effets génotoxiques de xénobiotiques sur des organismes de tous types en allant de la daphnie jusqu'à l'orge en passant par des larves de balanes. Il est toutefois bon de rappeler que cette technique se rapporte à l'analyse de profils d'amplification sur gel d'agarose où l'on peut

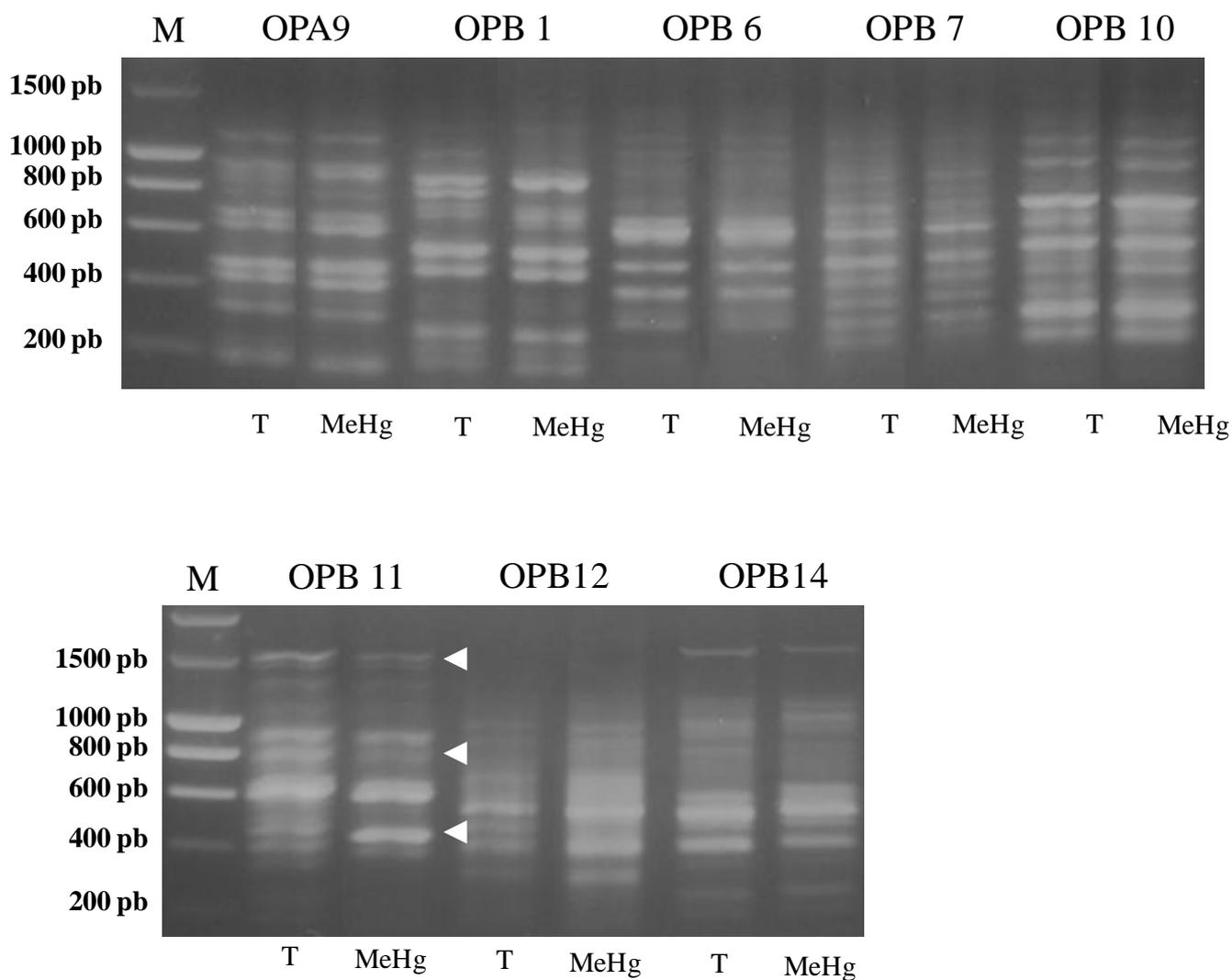


Figure 17 : Profils RAPD d'un mélange de 10 ADN génomiques obtenus à partir de muscle squelettique de poissons zèbres témoins (T) et exposés au MeHg ($0,68\mu\text{g Hg/poisson/jour}$). Les oligonucléotides utilisés pour la RAPD sont indiqués au dessus de chaque profil d'amplification. M = marqueur de poids moléculaire. Les pointes de flèches indiquent les produits de PCR différents entre les deux conditions.

observer soit des disparitions ou apparitions de bandes, soit des modifications d'intensité de bandes. Cette technique peut donc être qualifiée de qualitative et au mieux de semi-quantitative.

Le MeHg quant à lui est capable de causer des altérations au niveau de l'ADN génomique. Ces altérations peuvent être observables sur des chromosomes en culture cellulaire, ou encore chez le hamster. Des perturbations au niveau des histones sont également causées par une contamination au MeHg ainsi qu'une influence au niveau des facteurs régulant l'activité d'organisation du nucléole (WHO, 1990).

Le MeHg produit des carcinomes rénaux chez les souris ayant subi une contamination alimentaire contenant du chlorure de MeHg (15 mg MeHg/kg de nourriture) pendant environ une année (Mitsumori *et al.*, 1981). La génotoxicité du MeHg fut également décelée par utilisation de deux tests, l'un sur la croissance du nématode, *Panagrellus redivivus*, et le second le SOS-chromotest (Hempel, 1995). Ces deux tests ont montré que le MeHg est le composé mercuriel le plus génotoxique. Qui plus est, cette génotoxicité du MeHg a également été détectée chez des rats exposés (100 µg de MeHg/jour pendant 100 jours) par gavage (Grotto *et al.*, 2009) ainsi que lors d'une analyse sur une population humaine vivant sur les rives de la rivière Tapajos (Amorim *et al.*, 2000). La génotoxicité du MeHg a donc déjà été mise en évidence lors d'expérimentation *in vitro* et *in vivo* sur différents types de tissus. Or cette génotoxicité fut détectée pour des doses élevées d'exposition et aucune de ces observations n'a été conduite sur un organisme aquatique.

Pour vérifier la génotoxicité du MeHg chez le poisson, des analyses de l'intégrité de l'ADN génomique de poissons zèbres contaminés par rapport aux contrôles furent effectuées. Ces analyses ont été menées grâce à la technique RAPD à la suite d'une pression de contamination représentative de celle pouvant être rencontrée dans des milieux pollués par le mercure. Ces analyses ont été effectuées sur deux organes cibles du MeHg, le muscle squelettique et le système nerveux central, avec 8 oligonucléotides.

Résultats

A/ Analyse des cycles d'entrée en phase exponentielle d'amplification sur tissus issus de poissons exposés au MeHg

Les RAPD-PCR dont les patrons d'amplification sont présentés figure 17 furent réalisées avec des ADNs génomiques mélangés issus de muscle squelettique de 10 poissons, ce qui permet d'estomper le polymorphisme entre les individus et de distinguer plus facilement les différences induites par le MeHg. L'analyse de ces profils d'amplification

Tableau 1 : Quantification des effets génotoxiques du MeHg (C_{MeHg} : 3,4 nmol Hg/jour/poisson) sur l'ADN génomique du muscle squelettique (A) et du système nerveux central (B) du poisson zèbre.

A	50 jours			
	Témoin		MeHg	
^a OPB7	22,81 ± 0,3		21,3 ± 0,2	
^a OPB11	34,01 ± 0,3		29,9 ± 0,2	
$\Delta(\text{OPB7-OPB11})$	-11,2 ± 0,4		-8,6 ± 0,2	
^b $2^{\Delta(\text{OPB7-OPB11})}$	$(0,6 \pm 0,14) \cdot 10^{-3}$		$(2,8 \pm 0,42) \cdot 10^{-3} *$	
^c $Re = \frac{2^{\Delta(\text{OPB7-OPB11})_{\text{Cx}}}}{2^{\Delta(\text{OPB7-OPB11})_{\text{C0}}}}$	1		4,7	

B	25 jours		50 jours	
	Témoin	MeHg	Témoin	MeHg
^a OPB7	23,5 ± 1,63	22,1 ± 1,17	23,1 ± 1,75	22,2 ± 1,16
^a OPB11	31,1 ± 1,25	30,5 ± 1,12	31,98 ± 1,15	30,99 ± 0,63
$\Delta(\text{OPB7-OPB11})$	-7,6 ± 0,68	-8,3 ± 1,43	-8,9 ± 1,84	-8,76 ± 0,82
^b $2^{\Delta(\text{OPB7-OPB11})}$	$(5,7 \pm 1,9) \cdot 10^{-3}$	$(4,1 \pm 2,6) \cdot 10^{-3}$	$(3,26 \pm 2,5) \cdot 10^{-3}$	$(2,67 \pm 1,6) \cdot 10^{-3}$
^c $Re = \frac{2^{\Delta(\text{OPB7-OPB11})_{\text{Cx}}}}{2^{\Delta(\text{OPB7-OPB11})_{\text{C0}}}}$	1	0,6	1	1,1

^a les nombres donnés sont les moyennes (\pm es) des cycles nécessaires à l'entrée en phase exponentielle d'amplification pour les ADNs génomiques des 10 poissons zèbres avec les oligonucléotides OPB7 et OPB11.

^b $2^{\Delta(\text{OPB7-OPB11})}$: moyenne (\pm es) de l'efficacité d'hybridation relative d'OPB11. Les astérisques indiquent les valeurs statistiquement significatives ($p < 0,05$) déterminées à l'aide du test U de Mann-Whitney.

^c Re : rapport de l'efficacité d'hybridation relative d'OPB11 entre les conditions d'expositions Cx et C0.

permet de voir que l'amorce OPB 11 est discriminante entre la condition contrôle et la condition contaminée au MeHg avec des changements d'intensité de 3 bandes du profil d'amplification ayant pour poids moléculaire 1500, 800 et 400 pb. Pour les autres oligonucléotides utilisés, aucune différence n'est décelable entre les profils d'amplification des deux conditions. Cette première approche avait pour but de déterminer une amorce discriminante (OPB11) et une amorce non discriminante pour pouvoir effectuer l'analyse des atteintes génotoxiques *via* le couplage des techniques de la RAPD et de la PCR quantitative sur des ADN génomiques individuels. L'oligonucléotide OPB7 a été choisi comme amorce non discriminante et servira donc de référence. Le premier paramètre est l'efficacité d'hybridation relative qui permet de quantifier des mutations pouvant conduire à la création ou à la perte de sites d'hybridation. Le calcul de l'efficacité d'hybridation repose sur une analyse quantitative du nombre de cycles d'amplification nécessaires pour entrer en phase d'amplification exponentielle. La différence entre le nombre de cycles obtenus pour les amorces OPB7 et OPB11 est ensuite calculée. Cette différence, notée $\Delta(OPB7 - OPB11)$, représente l'efficacité d'hybridation relative entre les deux amorces qui peut être calculée avec la formule $2^{\Delta(OPB7-OPB11)}$. Cette valeur de l'efficacité d'hybridation relative correspond à la moyenne de 10 réplicats individuels pour chaque condition expérimentale. Pour quantifier l'effet génotoxique du métal, le ratio des efficacités relatives (Re) a été calculé entre la condition d'exposition et la condition témoin pour chaque tissu (Tableau 1). Ce calcul des Re montre une augmentation de l'efficacité relative d'hybridation (Re = 4,7) dans le muscle après 50 jours de contamination.

Cette approche a également été réalisée sur le cerveau du poisson. Le calcul du Re ne montre pas d'évolution significative du nombre de site d'hybridation après 25 et 50 jours de contamination (Tableau 1).

B/ Analyse des températures de fusion sur tissus issus de poissons exposés au MeHg

Cette approche qualitative repose sur l'analyse des températures de fusion des produits de PCR en substitution à l'analyse sur gel d'agarose. Les températures de fusion (T_m) permettent de voir des modifications au niveau de la nature des produits de PCR car à chaque produit correspond une température de fusion. L'ensemble des produits de PCR a été classé selon 11 intervalles de température permettant l'obtention d'un tableau logique reflétant les effets génotoxiques du MeHg. Avec l'amorce OPB7, aucune différence significative n'a été

A																					
C_0											C_{MeHg}										
OPB7	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	OPB7	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
I1											I1										
I2											I2										
I3			+	+	+	+				+	I3	+	+	+							
I4	+	+					+	+	+		I4				+	+	+	+	+	+	+
I5											I5										
I6					+	+					I6				+						
I7	+	+					+	+	+		I7	+	+	+		+	+	+	+	+	+
I8			+	+							I8	+									
I9	+	+			+	+	+	+	+	+	I9		+	+	+	+	+	+	+	+	+
I10			+			+			+		I10										
I11	+	+		+	+		+	+		+	I11	+	+	+	+		+	+		+	

B																					
C_0											C_{MeHg}										
OPB11	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	OPB11	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
I1	+				+		+				I1										+
I2		+				+				+	I2			+	+						+
I3			+	+		+					I3									+	
I4		+						+	+		I4		+			+	+	+	+		
I5	+				+		+	+		+	I5	+			+					+	+
I6	+	+	+	+		+					I6			+					+	+	
I7											I7					+					
I8					+		+	+	+	+	I8	+	+	+	+		+	+	+	+	+
I9	+	+		+		+					I9					+					
I10			+								I10										
I11											I11										

Tableau 2 : Classification des produits de PCR, en fonction des intervalles de températures ($^{\circ}\text{C}$) auxquels appartiennent leurs T_m , obtenus avec OPB7 (A) et OPB11 (B) à partir des ADN génomiques des muscles squelettiques de 10 poissons témoins (C_0) et contaminés au MeHg (C_{MeHg}) pendant 50 jours. La fréquence d'apparition de produits de PCR dans chaque intervalle de température a été comparée entre les conditions témoin et contaminée au MeHg à l'aide du test U de Mann-Whitney et définie comme statistiquement différente avec $p < 0,05$.

mise en évidence entre les produits d'amplification d'ADN génomiques issus de la condition contrôle et ceux issus de la condition exposée au MeHg (Tableau 2).

Pour le muscle, au temps 50 jours d'exposition, l'intervalle de température I8 montre une tendance assez forte à l'augmentation de la fréquence de présence de produits de PCR obtenue avec l'amorce OPB11 ($p = 0,057$) (Tableau 2).

Les produits de RAPD issus des amplifications sur cerveau, obtenue avec l'amorce OPB11, ont également été classés suivant leurs T_m pour les deux temps d'exposition 25 et 50 jours (Tableau 3).

Une diminution significative de la présence de produits de PCR dans l'intervalle I2 après 50 jours d'exposition a été observée.

L'intervalle de température I9 révèle, quant à lui, une tendance à la hausse de la fréquence de présence de produit de PCR chez les individus contaminés au MeHg, aux temps 25 jours ($p = 0,057$) et 50 jours ($p = 0,075$) d'exposition.

Discussion

Pour cette analyse de la génotoxicité du MeHg dans les deux tissus d'intérêt, la première étape a été de déterminer des amorces permettant d'obtenir des profils d'amplification différents entre les deux conditions en utilisant une analyse sur gels d'agarose. Cette analyse sur gels d'agarose a permis de sélectionner l'amorce OPB11 comme amorce discriminante et l'amorce OPB7 comme amorce non discriminante pouvant être utilisée comme référence. Ces analyses sur gels ont également permis de voir que l'utilisation de l'ADN génomique de 10 poissons permet de circonscrire le polymorphisme génétique car la majorité des amorces testées ont donné des profils d'amplification similaires entre les deux mélanges de 10 ADN génomiques. Cette approche par analyse sur gels d'agarose permet donc de dire que l'application de la RAPD est donc un choix judicieux pour démontrer les effets génotoxiques du MeHg. Or, cette démarche se basant sur l'apparition et/ou la disparition de bandes ne permet pas de quantifier la génotoxicité du MeHg. Pour palier à cette lacune, la technique de RAPD a été couplée à la technique de PCR quantitative en temps réel. Ce couplage a permis l'obtention de 2 types d'informations qui sont les moments d'entrée en phase exponentielle d'amplification et les courbes de température de fusion. Les moments d'entrée en phase exponentielle d'amplification vont nous renseigner sur l'évolution de l'efficacité d'hybridation de l'amorce OPB11, amplifiant des régions sensibles aux stress induit par le MeHg, par rapport à l'amorce OPB7, amplifiant des régions indifférentes à ce même stress. Dans le cas du muscle squelettique après 50 jours d'exposition, une

A		C_0												C_{MeHg}										
OPB7		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	OPB7		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
I1																								
I2																								
I3							+									+								
I4		+	+	+	+	+		+	+	+	+			+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
I5																								
I6							+							+										
I7		+	+	+	+	+		+		+	+				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I8												+				+	+							
I9		+	+	+	+	+	+	+		+	+			+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
I10							+																	
I11		+	+	+						+	+				+	+	+	+	+		+	+		

B		C_0												C_{MeHg}										
OPB11		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	OPB11		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
I1																								
I2		+		+				+		+	+			+			+							+
I3							+																	
I4																	+				+			+
I5		+	+	+	+	+		+	+					+	+		+	+				+	+	
I6			+				+				+			+	+					+	+	+		
I7																+	+							
I8		+	+	+						+	+	+						+	+					
I9							+							+	+						+	+	+	
I10		+				+	+	+	+							+	+		+					
I11																+		+		+				

C		C_0												C_{MeHg}										
OPB7		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	OPB7		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
I1																								
I2																								
I3																								
I4		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I5																								
I6																								
I7		+	+		+	+	+	+	+	+	+					+	+	+					+	+
I8					+											+					+	+		
I9		+	+		+	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+				+	+
I10														+							+	+		
I11		+		+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+			+		

D		C_0												C_{MeHg}										
OPB11		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	OPB11		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
I1																								
I2		+			+		+				+													
I3																								+
I4						+			+															+
I5		+	+	+	+		+	+			+						+			+	+		+	+
I6						+				+						+			+					+
I7		+																					+	
I8			+	+			+	+	+	+												+		
I9					+	+										+	+	+	+	+			+	+
I10				+												+			+		+			
I11																								

Tableau 3 : Classification des produits de PCR, en fonction des intervalles de températures (°C) auxquelles appartiennent leurs T_m , à partir des ADNs génomiques de cerveau de 10 poissons témoins (C_0) et contaminés au MeHg (C_{MeHg}) pendant 25 jours obtenus avec OPB7 (A) et OPB11 (B) puis après 50 jours de contamination avec OPB7 (C) et OPB 11 (D). La fréquence d'apparition de produits de PCR dans chaque intervalle de température a été comparée entre les conditions témoin et contaminée au MeHg à l'aide du test U de Mann-Whitney et définie comme statistiquement différente avec $p < 0,05$. Le trait rouge souligne l'intervalle de température statistiquement discriminant entre la condition contaminée et la condition témoin.

augmentation de l'efficacité d'hybridation de l'amorce OPB11 est observée. En ce qui concerne le système nerveux central, aucune modification nette de l'efficacité d'hybridation n'est observée après 25 et 50 jours de contamination.

Mais l'évolution du Re est la résultante à la fois d'une création et d'une perte de sites d'hybridation puisqu'une substitution d'une paire de base peut faire soit apparaître, soit disparaître ces sites. Donc si on ne considère que les Re, l'absence de différences ne veut pas pour autant dire qu'il n'y a pas de génotoxicité. Donc pour être plus résolutif, en plus des Re, il faut également regarder la répartition de chaque produit d'amplification selon son Tm.

Cette analyse quantitative est donc complétée par une analyse qualitative faite à la fois sur le muscle et le cerveau. Seulement l'intervalle I2 dans l'analyse de la génotoxicité après 50 j dans le cerveau discrimine de façon significative la condition MeHg de la condition témoin et permet de dire que pour ce dernier temps d'exposition le MeHg présente des atteintes génotoxiques au niveau du cerveau.

Les 2 approches que procure la PCR quantitative en temps réel permettent la détection d'atteintes génotoxiques causées par l'exposition au MeHg dans ces deux tissus que sont le muscle et le cerveau en apportant un aspect quantitatif à l'analyse RAPD. Différents types d'atteintes génotoxiques causées par le MeHg ont déjà été référencées comme des mutations de gène, des aberrations chromosomiques, des micronoyaux, des échanges de chromatides sœurs, et de l'aneuploïdie (Ogura *et al.*, 1996). Toutes ces atteintes génotoxiques ont été révélées sous des pressions de contamination élevées et ont pour l'essentiel été réalisées sur des cultures cellulaires de lymphocytes (Ogura *et al.*, 1996), de cellules nerveuses (Crespo-lopez *et al.*, 2007) ou encore d'ovocytes de hamster chinois (Ehrenstein *et al.*, 2002). Ces atteintes génotoxiques conduisant à des aberrations chromosomiques ont été liées, d'une part à des réactions de complexation du MeHg avec les groupements SH présents au sein des protéines du cytosquelette, comme la tubuline, agissant alors comme un inhibiteur vis-à-vis de la polymérisation des fuseaux mitotiques (Miura *et al.*, 1984 ; Imura *et al.*, 1980), et d'autre part, à la génération d'un stress oxydant révélé par la mesure de la 8-hydroxydéoxyguanosine sur des lymphocytes humains (Ogura *et al.*, 1996). Il faut toutefois noter qu'une étude sur une population amérindienne présentant une exposition chronique au mercure avec des concentrations en Hg dans les cheveux s'étalant de 0,57 à 71,85 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a révélé des atteintes génotoxiques par l'analyse de l'indice mitotique et de la polyploïdie des lymphocytes (Amorim *et al.*, 2000). Ce qui révèle une corrélation entre la concentration en mercure dans les cheveux et une baisse de l'indice mitotique d'une part et une augmentation de la fréquence de la polyploïdie d'autre part.

La technique RAPD permet donc de confirmer la génotoxicité de ce métal à des concentrations comparables à une exposition chronique pouvant avoir lieu en milieu naturel. Cette technique permet également d'appréhender ces atteintes génotoxiques au niveau de tissus particuliers comme ici les muscles squelettiques et le cerveau qui bioaccumulent de façon très importante le MeHg. Cette technique peut également être utilisée à l'échelle de l'organisme entier. Les résultats obtenus ici permettent pour la première fois de dire que le MeHg présente un potentiel génotoxique à de faibles niveaux d'exposition dans les muscles et le système nerveux central d'un organisme aquatique, et même de quantifier cette génotoxicité, chose innovante par rapport aux précédentes approches utilisant cette technique. Les résultats obtenus sur le muscle squelettique sont en adéquation avec l'induction de l'expression des gènes des 2 isoformes de la superoxyde-dismutase (Gonzalez *et al.*, 2005) qui sont impliqués dans les voies de lutte contre les espèces réactives de l'oxygène connues pour leur propriétés génotoxiques (Snyder, 1988). En ce qui concerne le système nerveux central cette étude n'a révélé aucun impact du MeHg sur l'expression des gènes d'aucune des voies étudiées. La génotoxicité du MeHg sur le tissu nerveux n'a été démontrée que sur des cultures de cellules nerveuses exposées à de fortes concentrations de MeHg (0,1 et 1 μM) dans le milieu de croissance (Crespo-Lopez *et al.*, 2007).

Or l'utilisation du couplage RAPD et PCR quantitative en temps réel a permis, pour la première fois, la détection de la génotoxicité du MeHg au niveau du système nerveux central provenant d'un organisme aquatique préalablement contaminé au MeHg à des doses pouvant représenter ce qui se passe en milieu naturel soit $0,6 \mu\text{g Hg}\cdot\text{jour}^{-1}\cdot\text{poisson}^{-1}$.

II/ Validation de l'utilisation de la technique RAPD pour observer la génotoxique d'un autre métal : le cadmium.

Afin de vérifier que notre approche était également valable pour d'autres métaux toxiques que le MeHg, la même approche a été réalisée chez le poisson zèbre après exposition au Cd par voie directe. Cette analyse a été réalisée en utilisant les mêmes amorces que celles de l'étude menée sur le MeHg. Le choix du Cd a été motivé car les propriétés génotoxiques de ce métal ont été étudiées chez de nombreux organismes (IARC, 1997). Parmi ces études antérieures, des travaux ont porté sur les réponses génétiques et biochimiques du poisson zèbre après exposition au Cd durant différents temps, et pour deux concentrations d'exposition (Gonzalez *et al.*, 2006). Cette exposition au Cd a conduit à l'induction de gènes impliqués dans les mécanismes de réparation de l'ADN, *gadd* et *rad 51*, ainsi que des gènes impliqués dans des processus pré-apoptotiques, *bax* et *c-jun*. Le choix de ce métal est donc apparu comme judicieux pour valider la technique RAPD couplée à la PCR quantitative en temps réel comme outil de détection d'atteintes génotoxiques chez le poisson zèbre.

Notre étude sur le Cd a été réalisée sur deux concentrations d'exposition (C1 : $1,9 \pm 0,6 \mu\text{g.L}^{-1}$ et C2 : $9,6 \pm 2,9 \mu\text{g.L}^{-1}$) représentatives de ce qui peut être rencontré dans des milieux naturels pollués par ce métal et cela sur une durée de 21 jours. Les résultats obtenus font l'objet d'un article (dans 'Ecotoxicology and Environmental Safety') dans lequel il est montré que l'amorce OPB11 permet de détecter les effets génotoxiques de ce métal. Il montre également que l'amorce OPB7 ne permet pas de détecter d'atteintes génotoxiques causées par ce métal et conserve son rôle de référence. Des impacts génotoxiques ont été révélés *via* les analyses quantitatives basées sur les Re et les analyses qualitatives reposant sur l'étude des fréquences d'apparition des produits de PCR, classés suivant leur Tm.

L'analyse des Re a révélé une augmentation nette du nombre de sites d'hybridation de l'amorce OPB11 par rapport à l'amorce OPB 7 d'un facteur 4 pour la concentration C1 et d'un facteur moyen de 2,5 pour la condition C2. L'analyse qualitative des produits de PCR, a également mis en évidence des impacts génotoxiques du Cd avec par exemple une augmentation de la fréquence de présence d'un produit de PCR dans la condition C2 par rapport à la condition contrôle pour l'intervalle I2. La condition C1 est discriminée de la condition contrôle par les intervalles I8 et I9 pour lesquels il y a respectivement une augmentation et une diminution de la fréquence des produits de PCR.

Cette étude a donc permis de valider cette technique dans la détection d'impacts génotoxiques de façon quantitative et qualitative pour le Cd réputé comme étant génotoxique.

Article

Cadmium-induced genotoxicity in zebrafish at environmentally relevant doses.

Sébastien Cambier, Patrice Gonzalez, Gilles Durrieu, Jean-Paul Bourdineaud*

Université de Bordeaux 1, UMR 5805 CNRS, Station Marine d'Arcachon, place du Dr.
Peyneau, Arcachon, 33120, France.

* Corresponding author:

Phone: +33-556-223-926; Fax: +33-556-549-383;

E-mail: jp.bourdineaud@epoc.u-bordeaux1.fr

Article accepté dans *Ecotoxicology and Environmental Safety*.

Summary: Genotoxic effects of cadmium on zebra fish *Danio rerio* have been assessed by random amplified polymorphic DNA and real time PCR, followed by a comparison of the melting temperature patterns between each amplification reaction. Fish were exposed to two concentrations of cadmium chloride dissolved in the medium ($1.9 \pm 0.6 \mu\text{g Cd.l}^{-1}$, C1 ; $9.6 \pm 2.9 \mu\text{g Cd.l}^{-1}$, C2) for 21 days. A discriminative RAPD probe, OPB11, was first selected producing differential band patterns between control and metal-exposed genomic DNAs. RAPD-PCR showed an increase in the relative hybridization efficiency of OPB11 on the genomic DNAs coming from fish exposed to both Cd concentrations as compared to the control condition. In addition, the RAPD-PCR melting temperature patterns showed that with the OPB11 probe, the frequency of PCR products whose fusion temperature belong to the $[86^{\circ}\text{C}-87^{\circ}\text{C}]$ interval decreased with Cd contamination, whereas an increase of frequency for the $[78^{\circ}\text{C}-80^{\circ}\text{C}]$ and $[85^{\circ}\text{C}-86^{\circ}\text{C}]$ intervals was correlated with Cd exposure.

Keywords : zebra fish; cadmium; genotoxicity; RAPD; melting curve; ecotoxicology; genomic DNA; quantitative PCR.

1. Introduction

Cadmium (Cd) is a highly toxic heavy metal. The dispersion of Cd in the environment has increased over the past decades due to its widespread industrial use. It is also a byproduct of zinc mining which explains the Lot-Garonne River continuum contamination by a zinc extraction factory crossed by the Riou-mort, a Lot tributary (Audry *et al.*, 2004; Blanc *et al.*, 1999). Numerous field studies have shown varying degrees of contamination of aquatic systems, *via* direct or indirect Cd inputs (Guinee *et al.*, 1999; Hutton, 1983). Lungs, gills, liver, and kidneys are the principal targets during a Cd exposure. This metal has many cellular impacts; it triggers induction of some proto-oncogene and inhibits the DNA repair system and several enzymes involved in oxidative stress responses (Giaginis *et al.*, 2006; Waisberg *et al.*, 2003). Moreover, it inhibits *in vitro* mitochondrial respiratory chain complexes at the micromolar range scale, inducing in mitochondria an increase in the reactive oxygen species (ROS) level (Wang *et al.*, 2004) and leads to DNA damage and apoptosis mechanisms (Chan *et al.*, 2003; Bagchi *et al.*, 2000). The International Agency for Research on Cancer has stated that “ionic cadmium causes genotoxic effects in a variety of types of eukaryotic cells, including human cells,” and has classified Cd and its compounds as carcinogenic to humans and experimental animals (IARC, 1997).

Recent works, using environmental relevant doses to contaminate the zebra fish *Danio rerio* with Cd, have shown an induction of genes involved in the DNA repair process (Gonzalez *et al.*, 2006). But nothing has been done to explore the genotoxic effects of Cd at low concentrations and environmentally realistic conditions. To examine the genotoxic impacts, three classic assays are usually used: the micronucleus assay, the comet assay (alkaline single cell gel electrophoresis), and 8-oxoguanosine quantification. Micronucleus and comet tests are the most frequently used methods in the detection of genotoxic pollutants dispersed in aquatic ecosystems (for review see Russo *et al.*, 2004). However, results have

indicated that the micronucleus test in *Anguilla anguilla* is not a sensitive method for detecting *in situ* heavy metals pollution in freshwater ecosystems (Sanchez-Galan *et al.*, 2001), and based on the results of the comet assay, Cd was found not to be genotoxic in mussel gill cells under acute and chronic exposure conditions (Pruski and Dixon, 2002). Another difficulty linked to the micronucleus test and the comet assay is the necessity to experiment on isolated cells. The 8-oxoguanosine method using a classic approach with chemical hydrolysis and high performance liquid chromatography analysis, is a sensitive technique to quantify genotoxic impacts of xenobiotics, but it is a long and fastidious tool (Halliwell, 1999). However, remarkable disagreement still remains concerning the real values at steady state of DNA damage in liver tissue, due to the elevated variability of results obtained by various laboratories (Halliwell, 1999; ESCODD, 2002).

In this work, genotoxic effects of Cd have been assessed using a random amplified polymorphic DNA (RAPD)-based methodology. RAPD is currently used for the intra-populational polymorphism detection (Welsh and McClelland, 1990), but this technique can also permit the detection of genetic alterations after animal contamination with pollutant (Savva, 1998). For instance, RAPD has been used to detect PCR product DNA modifications caused by benzopyrene exposure on *Daphnia magna* (Atienzar *et al.*, 1999). The success of this method does not necessarily rely on clonal species such as daphnids or inbred rodent strains. Indeed, this method has been successfully applied to address the genotoxic potential of pollutants on biological systems showing a high degree of genetic homogeneity such as the macroalgae *Palmaria palmata* (Atienzar *et al.*, 2000a), the crustacean barnacle *Elminius modestus* (Atienzar *et al.*, 2002), and the bivalve mollusk *Mytilus edulis* (Hagger *et al.*, 2005). Most recently, the RAPD methodology has been applied to zebra fish to detect the genotoxic potential of chemicals such as cyclophosphamide and dimethoate (Zhiyi and Haowen, 2004).

However, this method only relies on an agarose gel electrophoresis analysis of the missing or appearing PCR products between DNAs from contaminated and control individuals. In the present work this method was improved in order to obtain reliable, fast and inexpensive characterization of Cd genotoxic effects at relevant environmental doses. Our methodology eliminates the electrophoretic analysis and takes profit of the quantitative facilities of the real-time PCR to address the efficiency of hybridization of the RAPD probe to genomic DNA and to allow comparison of the melting temperature patterns between each amplification reaction. Melting curve analysis of RAPD products has already been used to identify pathogenic yeasts (Plachý *et al.*, 2005). The rationale behind our approach is also to get clues about the primary effects of a pollutant well before the animal's health is impacted. This is at first glance reasonable since the micronucleus test and comet assay detect clastogenic effects whereas the proposed method relies on subtle changes such as base pair substitutions.

2. Experimental section

2.1. Zebrafish care and contamination

240 adult male fish (weight average: 0.88 ± 0.03 g, wet weight; standard length: 3.63 ± 0.05 cm) were randomly placed in three polyethylene tanks containing 100 L of chlorine-free, permanently oxygenated water. Female fishes were excluded to avoid interferences due to reproduction processes. During all the experiment, temperature was maintained at 24.5 ± 0.1 °C. Fish from each tank were fed twice a day with the same quantity of artificial fish food corresponding to 5% of fish wet weight per day. This food was Dr. Bassleer's biofish food, tropic type, granulate size M (52% crude proteins, 13% crude lipids, 1.5% natural fibres, vitamins A, D3, C, E and 30 mg/kg copper), which is manufactured by Aquarium Münster Pahlmeier (Telgte, Germany). In a first experimental unit, they were bathing in an

uncontaminated water and constituted control animals for cadmium bioaccumulation levels and genotoxic analysis. In a second tank called C₁, fish were exposed to a low contaminated water (at a nominal cadmium concentration of 2 µg Cd.l⁻¹). In the remaining unit (C₂), fish were exposed to a highly contaminated water (at a nominal cadmium concentration of 10 µg Cd.l⁻¹). Since most of the cadmium adsorbs on the polyethylene tank walls in a few hours, contamination of the water was based on daily additions of aqueous solutions of cadmium (ultra-pure CdCl₂, Merck). The amounts of cadmium added were adapted to compensate for the decrease in metal concentrations over the 24-h cycles, which were measured on a regular basis by analysing water samples (10 ml). The kinetic of cadmium concentration within C₁ and C₂ tanks shows a typical pattern of oscillations around the nominal values (Figure 1). The record of the cadmium values over 21 days allowed the calculation of the mean cadmium concentrations which were 1.9 ± 0.6 µg Cd.l⁻¹ (17 ± 5 nM) and 9.6 ± 2.9 µg Cd.l⁻¹ (86 ± 26 nM) in C₁ and C₂ tanks, respectively. One third of the water volume from each tank was changed every two days and tank bottoms were cleaned to eliminate fish's faeces and remains of food.

Such Cd concentrations were selected because they are typical of what one can find in a polluted environment. Indeed, besides the present work we are studying a polymetallic pollution in the Lot river and its small tributary (Riou-Mort) in the South-West of France. These streams are polluted by cadmium and zinc originating from an old factory which has produced Zn for over a century, the Vieille-Montagne industrial site. Downstream on the Riou-Mort, just before its confluence with the river Lot, the cadmium concentration in the water varied between 2 and 28 µg/l after a 3 months survey (mean : 15 µg Cd/l). On the river Lot, about 300 meters downstream from the confluence with the Riou-Mort, Cd concentrations varied from 0.05 to 2.5 µg/l (mean : 1 µg Cd/l) (Achard *et al.*, 2004).

Zebrafish were killed within seconds by immersion in melting ice ($T = 0^{\circ}\text{C}$). This is in agreement with the ethical guidelines displayed and used by the NIH intramural research program. For Cd analysis, brain, gills, liver and skeletal muscles were removed from control and Cd-contaminated fish. Tissues were kept at -80°C until use.

2.2. Cd analysis

Dissected organs were thawed, dried on absorbent paper and weighed (wet wt). Samples were digested by 3 ml of nitric acid (65% HNO_3 , Sigma-Aldrich, analytical grade, Cd: ≤ 0.01 mg/kg, reference 30709) in a pressurized medium (borosilicate glass tubes) at 100°C for 3 h. After dilution of the digestates to 20 ml with ultrapure water (MilliQ plus), cadmium concentrations were measured by atomic absorption spectrophotometry with Zeeman correction, using a graphite tube atomizer (AAS, Thermoptec M6 Solaar). In order to avoid interference, analyses were carried out in a tube atomizer with a blend of $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ (2% Pd in 5% HNO_3 , analytical grade, SCP Science, Courtabœuf, France) and $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (hexahydrate powder, Merck, analytical grade). The detection limit was $0.1 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ (3 x standard deviation of the reagent blanks). The analytical method was simultaneously validated for each sample series by the analysis of standard biological reference materials (TORT-2, Lobster hepatopancreas; DOLT-2, Dogfish liver; NCR/CRNC, Ottawa, Canada). Values were in agreement with the certified ranges (data not shown). The results are expressed in average metal concentrations accumulated in organs (3 replicates per organ per exposure condition) in $\text{nmol Cd g}^{-1} \pm \text{SE}$ (Standard Error), wet wt.

2.3. DNA isolation

After cold-shock killing, whole zebra fish were minced with a scalpel blade into tiny pieces which were digested overnight at 50°C with 10 ml per gram of tissue of DNA extraction buffer: 10 mM Tris pH 8, 100 mM EDTA pH 8, 0.5 % SDS, and $200 \mu\text{g.ml}^{-1}$

proteinase K (Promega). Then, the DNA solution was treated with $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ RNase A (Quiagen) during 2 hours at 37°C . Genomic DNA was purified by a conventional phenol/chloroform method (Westerfield, 2007). Whole fish were used to be sure that DNA alterations appearing in some cells of a given tissue could represent hybridization targets for RAPD probes. The ideal methodology would have been a non-destructive sampling, but zebra fish only contain a few microliters of blood – the yield is 5 to $10 \mu\text{l}$ per fish – and blood sampling kills them. Fin clipping was discarded because cadmium does not accumulate within this structure and therefore the probability of observation of genotoxicity in fin tissue is almost zero.

2.4. Selection of discriminative PCR probes

RAPD reactions were performed in a reaction volume of $20\mu\text{l}$ as previously described (Atienzar *et al.*, 2000b). The decamer oligonucleotides OPA9 (5'-GGGTAACGCC-3'), OPB1 (5'-GTTTCGCTCC-3'), OPB5 (5'-TGCGCCCTTC-3'), OPB6 (5'-TGTCTGCCCC-3'), OPB7 (5'-GGTGACGCAG-3'), OPB8 (5'-GTCCACACGG-3'), OPB10 (5'-CTGCTGGGAC-3'), OPB11 (5'-GTAGACCCGT-3'), OPB12 (5'-CCTTGACGCA-3'), and OPB14 (5'-TCCGCTCTGG-3') were obtained from Sigma-Proligo (www.proligo.com). Sixteen ng of genomic DNA were subjected to RAPD amplification in an Eppendorf thermocycler (Mastercycler personal) in the presence of $2 \mu\text{M}$ primer, 0.3 mM dNTP, 5 mM MgCl_2 , and $0.1 \text{ U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ of *Thermus aquaticus* DNA polymerase (*Taq*) (Promega) and 1X reaction buffer (10mM Tris, pH 9, 50mM KCl, 0.1% Triton X-100). Thermal cycling parameters used for PCR amplification consisted of 4 min at 95°C to denature DNA followed by 39 cycles of 1 min for denaturation (95°C), 1 min at 50°C for annealing, and 1 min at 72°C for the extension step with a final extension period adjusted to 10 min.

2.5. Agarose gel electrophoresis and analysis of DNA profiles

Electrophoresis of RAPD reaction products was performed on 1% (w/v) agarose gel using Tris-Acetate-EDTA buffer system (40 mM Tris pH 8, 20 mM sodium acetate and 2 mM EDTA) in the presence of 0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ethidium bromide. The PCR product sizes were estimated by comparison with the SmartLadder DNA standards (Eurogentec).

2.6. Quantitative PCR and melting temperature curve analysis

Real time RAPD-PCRs were done using a Lightcycler apparatus (Roche). Each reaction was completed to 20 μl (reaction volume) in a capillary in which 16 ng of genomic DNA were loaded, 2 μl of primer (6 μM), and 16 μl of PCR mix. The thermal program used for this real time RAPD-PCR was one warming step of 10 min at 95°C followed by 50 amplification cycles at 95°C for 5 s, 50°C for 5 s, and 30 s at 72 °C. After this thermal program, the dissociation curves were obtained by following the decrease of SyberGreen fluorescence level during a gradual heating of the PCR products from 60 to 95°C.

Melting temperature curves analysis was done using the LightCycler Software 3.5 (Roche). For a given RAPD-PCR capillary, the melting temperature (T_m) of each PCR peak is obtained and listed in a logical table covering 11 different temperature intervals ranging from 74 to 89°C. The comparison of ‘exposure conditions’ to ‘control conditions’ logical tables highlighted temperature intervals for which the frequency of PCR products for a known T_m differed.

Melting temperature curves analysis was performed instead of an agarose gel electrophoresis and band pattern analysis because at low toxicant doses the potential differences between control and contaminated DNA are faint and of low intensity which makes it difficult to draw a thorough interpretation. Therefore, despite the fact that the resolution between bands in an agarose gel is largely superior to the resolution of melting

curves – a method originally designed to demonstrate the presence of only one PCR product, i.e. not intended to resolve multiple products – the analysis of melting curves gives more information at low doses because a melting temperature peak is the result of many PCR products sharing melting temperatures close to each others. Thus, the potential tiny differences are magnified instead of being dispersed and diluted all along an agarose gel.

For each genomic DNA, quantitative analysis relied on the calculated difference in the cycle numbers necessary to enter in the exponential phase of the PCR, using probes OPB7 and OPB11, respectively. Indeed, OPB7 proved to be a reference probe, whereas OPB11 was a metal contamination-sensitive probe. This difference, noted $\Delta(\text{OPB7} - \text{OPB11})$, represents the relative hybridization efficiency between the two probes, which can be calculated from $2^{\Delta(\text{OPB7} - \text{OPB11})}$. The value of this relative hybridization efficiency was calculated from the mean of ten replicates (the mean $\Delta(\text{OPB7} - \text{OPB11})$) for each experimental condition.

2.7. Mathematical treatment

The significant effect of factors taken into account was performed using non parametric one way variance analysis (Kruskal-Wallis rank sum test or Mann-Whitney U tests). Computations were performed using Statistica software (Statistica 5.1). Results are given as mean \pm standard error (SE). For all statistical results, a probability of $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Cd bioaccumulation in fish organs and mortality records

Cd concentrations determined in gills, liver, skeletal muscle and brain after 21 days of exposure are shown in Table 1. We noted a gradual increase of Cd accumulation within brain and liver when shifting from the control exposure to the mid and high range exposures C1 and

C2: the calculated accumulation factors in brain were 13 and 35.3 at C1 and C2, respectively, and in liver 12 and 27.7 at C1 and C2, respectively. Contrary to this expected accumulation pattern, we observed a stagnation in Cd accumulation in gills and skeletal muscles when shifting from C1 to C2 exposures. The calculated accumulation factors at C1 exposure were 16.7 and 8 in gills and skeletal muscles, respectively.

The follow-up of the fish mortality shows a greater impact of the high-level exposure with a cumulated relative mortality of 45 and 23 fish for the C2 and C1 exposures, respectively, after 21 days (Figure 2). Since 80 fish were present at day 1 in each tank, this represents 56 and 28 % of fish loss after 21 days of exposure to 86 and 17 nM cadmium, respectively.

3.2. Selection of Cd-discriminating probe

RAPD-PCRs were performed on two pools of genomic DNAs extracted from ten individuals of both control (C₀) and Cd-contaminated (C₂) fish. Ten different random probes were tested, each featuring a specific amplification pattern (Figure 3). The reason why genomic DNAs from ten individuals were blended was to suppress the intra-population genetic polymorphism potentially revealed by RAPD. Among the ten primers used, nine evidenced no significant differences between patterns from control and contaminated fish (Figure 3). However, the OPB11 primer gave two different RAPD-PCR patterns in Cd-contaminated and control pooled genomic DNAs. Indeed, the intensity of three PCR products of 500, 600, and 1800 bp were much decreased when contaminated pooled genomic DNAs were processed with OPB11, as compared to control DNAs. For all the remaining experiments, OPB7 was selected as a reference probe because it yielded a great number of PCR products identical for both control and contaminated genomic DNAs (Figure 3). We

therefore selected OPB11 as a Cd-discriminating probe and used it to analyze the metal genotoxic impact on individual genomic DNA samples.

3.3. Analysis of Cd-induced genotoxicity

RAPD-PCRs were performed on genomic DNAs extracted from ten individuals of control (C_0) and Cd-contaminated (C_1 and C_2) fish. C_{2a} and C_{2b} represent two different groups of 10 zebra fish exposed to 86 nM CdCl₂-contaminated fish. The use of real time quantitative RAPD-PCR allowed the calculation of the mean of the cycle numbers necessary to enter in the exponential phase of amplification from each out of ten genomic DNAs. For each exposure condition, using OPB7 and OPB11 probes, $\Delta(\text{OPB7} - \text{OPB11})$ reflects the difference of the hybridization efficiencies between OPB7 and OPB11 probes on the genomic DNAs (Table 2). It can be calculated from $2^{\Delta(\text{OPB7} - \text{OPB11})}$ for each metal exposure and control condition. For instance, for the ten control fish, the mean cycle number difference $\Delta(\text{OPB7} - \text{OPB11})$ is -11.2 ± 0.4 , therefore the control genomic DNAs are presenting 2352-times ($2^{11.2}$) more hybridization sites for OPB7 than for OPB11 probe. Results collected in Table 2 show a significant increase in the hybridization efficiency of OPB11 relative to OPB7 on the genomic DNAs coming from fish exposed to both Cd concentrations as compared to the control condition ($p < 0.05$).

Melting temperature (T_m) curve profiles obtained from each RAPD-PCR were analyzed, and the resulting PCR products obtained with either OPB11 or OPB7 probes were classified according to their T_m in a logical table (Table 3). The principle illustrated by Figure 4 is to divide the temperature axis between 74 and 89° C in eleven intervals and to report in a logical table the presence (noted “1”) or the absence (noted “0”) of a peak in the melting curve within each of the defined temperature intervals. For a given condition - control or contaminated - the distribution of PCR products T_m among the temperature intervals obtained

with OPB7 and OPB11 probes showed differences between each of the ten fish tested. For instances, using the OPB7 probe 2 control fish out of 10 presented a peak within the temperature interval I6 (Table 3A). This reflects the inter-individual genetic polymorphism in a non clonal population which was expected since RAPD methodology had been exactly designed for that purpose. Now, when comparing the frequency distribution of PCR products T_m among the temperature intervals obtained with the OPB7 oligonucleotide between control and Cd-exposed fish genomic DNAs, no significant differences were observed as expected with a non-discriminative primer (Table 3A). For instance, the I9 temperature interval contained a peak for 8, 9, 7 and 9 fish out of 10 for C₀, C₁, C_{2a} and C_{2b} groups, respectively. Therefore, the OPB7 probe is able to highlight the inter-individual genetic polymorphism but not the Cd genotoxic impact. However, this frequency distribution was quite different between control and Cd-exposed fish genomic DNAs when the OPB11 RAPD probe was used. An increased frequency of PCR products occurred within the I2, I4, and I8 intervals, whereas a decreased frequency was observed within the I9 interval (Table 3B). The statistical significance between control (C₀) and the 3 contaminated conditions (C₁, C_{2a}, and C_{2b}) ($p < 0.05$) was assessed by a Kruskal-Wallis followed by a Mann-whitney U test showing that: I2, I8 and I9 discriminated C₀ from both C₂ groups, C₁ from C₀ and C_{2b}, and C₀ from C₁ and C_{2a}, respectively. I4 presented an increase in the frequency of PCR products between C₀ and both C₂ groups however it was not significant, $p > 0.05$. Therefore, the OPB11 probe is able to significantly distinguish the Cd genotoxic impact over the inter-individual genetic polymorphism background.

4. Discussion

Several research domains use the RAPD technique to detect genomic instability (e.g. in carcinogenesis). Brain, lung, and breast cancers were analyzed with the RAPD assay, and in

these three cases damages to DNA were detected with many primers after banding profile analysis (Dil *et al.*, 1998; Ong *et al.*, 1998; Singh and Roy, 2001). The RAPD technique was also used in ecotoxicology to reveal genotoxic effects of cadmium on zebra fish (Zhiyi and Haowen, 2004) and on plants such as kidney bean *Phaseolus vulgaris* (Enan, 2006), rice *Oryza sativa* (Liu *et al.*, 2007), and barley *Hordeum vulgare* (Liu *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2005), *Arabidopsis thaliana* (Conte *et al.*, 1998). Several studies reported that RAPD was useful to detect genotoxic effects of many compounds such as benzopyrene and copper (Atienzar *et al.*, 2001; Atienzar and Jha, 2004). However, in these previous studies, the exposure to these genotoxic compounds had been done with high concentrations in comparison with doses found in environmentally polluted areas, and the interpretation of results only relied on the presence/absence of bands in RAPD patterns on agarose gels.

Here, ten oligonucleotides were screened to discriminate controls from fish contaminated with CdCl₂. RAPD banding patterns from control and metal-contaminated pooled fish genomic DNAs were similar for nine of the primers used, confirming that pooling 10 fish genomic DNAs is sufficient to remove variability due to genetic polymorphism. The OPB11 probe resulted in the production of different RAPD banding patterns between control and metal-contaminated pooled fish genomic DNAs. Therefore, this probe shows differences that can only be due to CdCl₂ genotoxic effects.

The RAPD assay applied to genotoxicity generates DNA banding profiles that are materialized on agarose gels, and relies on a comparison of the presence or absence of a given amplified product between control and contaminated populations. However, problems may occur in RAPD including the presence of spurious amplification products in negative control reactions, and the lack of reproducibility (Atienzar and Jha, 2006). To improve the RAPD technique when applied to solve ecotoxicological issues, we combined real time PCR and RAPD on control and metal-contaminated individual genomic DNA. This quantitative

analysis carried out on the individual DNA of each exposure condition showed that CdCl₂ has a genotoxic influence, since we observed an increase of the efficiency of OPB11 hybridization on genomic DNAs from contaminated fish. This can be due to DNA mutations (point mutations and large rearrangements), or other effects (structural effects), which have facilitated OPB11 hybridization. Indeed, a dose-dependent inhibition of the DNA mismatch repair mechanism has already been observed on human cell cultures with divalent cadmium (Hartmann and Hartwig, 1998).

A higher OPB11 hybridization efficiency is observed in the case of the C₁ CdCl₂ concentration exposure than with the C₂ CdCl₂ exposure. Although paradoxical at first glance, it should be reminded that the probe hybridization efficiency on a contaminated fish DNA as compared to a control DNA is the resultant of both creation and elimination of hybridization sites since for instance discrete base pair substitution can make appear or disappear such sites. Therefore, DNA insults will not necessarily increase the number of probe hybridization sites. We can even imagine situations where the sum of created and lost sites will favor the latter, and situations for which the number of created sites could be compensated for by that of lost sites. In the present study, this can be exemplified by a decrease of the frequency of PCR products belonging to the [86-87°C] melting temperature interval displayed by the contaminated fish genomic DNA compared to the control. Thus, the lack of increase or decrease of the probe hybridization efficiency on genomic DNAs extracted from contaminated animals as compared to control animals does not necessarily mean that no genotoxic effects occurred. This is a drawback of our method and that is why it was necessary to complement this quantitative approach by a qualitative one.

This qualitative analysis was based on the analysis of the PCR products' T_m profiles. The temperature intervals I2, I8, and I9 discriminated CdCl₂ contamination: PCR products with

the same GC contents were more abundant (those whose T_m belongs to the I2 and I8 intervals), or less abundant (those whose T_m belongs to the I9 interval), after exposure to Cd.

The OPB11 probe highlighted a genotoxic impact of Cd whereas OPB7 was unable to do so, although mutations caused by Cd appear randomly when taking into account the physico-chemical nature of the underlying mechanisms. However, all the regions of the genome are not equally sensitive to the genotoxic impact of a toxicant. Inactive chromatin regions are protected and less prone to modifications than active ones. Therefore, one should not expect that all RAPD probes reveal a genotoxic effect of the toxicant. Yet, all the RAPD probes tested could reveal the genetic polymorphism between fish individuals.

Detection of genotoxicity is currently performed with the micronuclei and the comet test. However, these two tests failed in several instances to detect pollutant-induced genotoxicity due to a lack of sensitivity. Meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*) exposed to polluted environment with organochlorinated pesticides and metals showed neither an increase in the micronuclei number nor an increase in the DNA comet tail size (Knopper and Mineau, 2004). The comet assay didn't reveal increased levels of pyrimidine oxidation in lymphocytes from smokers relative to non-smoker human (Collins *et al.*, 1997). Moreover the micronuclei test is not relevant to all species: after X and γ ray irradiation the test was positive for two wild mice species, but negative for two vole species (Abramsson-Zetterberg *et al.*, 1997). In the same way this test was positive when the brown trout (*Salmo trutta*) was used to detect industrial pollution, but negative when different fish species were used such as the eel (*Anguilla anguilla*) and European minnow (*Phoxinus phoxinus*) (Rodriguez-Cea *et al.*, 2003). After 21 days exposure to 45nM CdCl₂, this test was negative for *Cyprinus carpio* and *Carassius gibelio*, but positive for gills of *Coridoras paleatus* (Cavas *et al.*, 2005). This underlines the advantage of our method, because RAPD-PCR followed by an analysis of the melting temperature curves of the PCR products reflects genomic mutations caused by low

contamination pressure on the zebrafish. Micronuclei and comet assay detect pollutant clastogenic effects whereas the method developed here allows the detection of specific changes caused by mutations: rearrangements or base pair substitutions modifying the overall number of hybridization sites. However this method requires the selection of a discriminative RAPD probe according to the species and the xenobiotic. As proved by the identical results obtained with the two Cd C2-contaminated groups, scrutinizing 10 genomic DNAs per condition is enough for the method to be reliable, i.e. able to distinguish Cd effects from the natural intraspecific polymorphic background. To conclude, the advantages of this method are the low number of genomic DNAs necessary to get an answer, the sample weight, which can be a few mg, the low consumption of time, and the low cost of its execution. This method will be valuable for species for which the retrieval of single cells is not easy such as small fish or mollusks, and for use with low toxicant doses susceptible to lead to base pair substitutions but not to clastogenic effects. Therefore, this method is not concurrent but complementary to the comet assay and micronuclei detection. We established this method in laboratory conditions and we are currently challenging it under environmental situations.

5. Conclusions

Zebrafish grown in water containing doses of cadmium similar to that encountered in some polluted French rivers accumulated cadmium in their tissues, and after 21 days of exposure to 17 or 86 nM CdCl₂ displayed elevated rates of mortality reaching 28 and 56 % of fish loss, respectively. The genotoxic potential of cadmium could be assessed on the remaining living fish after 21 days by a quantitative RAPD-PCR methodology after selection of a cadmium-discriminative oligonucleotide probe. The relative hybridization efficiency of this probe increased 2 to 4 times in the contaminated fish genomic DNA as compared to the

control genomic fish meaning that cadmium had created single nucleotide modifications resulting in the net creation of hybridization sites.

Acknowledgments

The authors are grateful to Bruno Etcheverria for technical support during the exposure conditions. This work was carried out with the financial support of CNRS.

References

Abramsson-Zetterberg, L., Grawé, J., Zetterberg, G., 1997. Spontaneous and radiation-induced micronuclei in erythrocytes from four species of wild rodents: a comparison with CBA mice. *Mutat. Res.* 393, 55-71.

Achard, M., Baudrimont, M., Boudou, A., Bourdineaud, J. P., 2004. Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. *Aquat. Toxicol.* 67, 347-357.

Atienzar, F.A., Conradi, M., Evenden, A., Jha, A., Depledge, M., 1999. Qualitative assessment of genotoxicity using RAPD: comparison of genomic template stability with key fitness parameters in *Daphnia magna* exposed to benzo(a)pyrene. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2275-2282.

Atienzar, F.A., Cordi, B., Donkin, M.E., Evenden, A.J., Jha A.N., Depledge M.H, 2000a. Comparison of ultraviolet-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA with chlorophyll fluorescence and growth in a marine macroalgae, *Palmaria palmata*. *Aquat Toxicol.* 50, 1-12.

Atienzar, F.A., Evenden, A., Jha, A., Savva, D., Depledge, M., 2000b. Optimized RAPD analysis generates high-quality genomic DNA profiles at high annealing temperature. *BioTechniques* 28, 52-54.

- Atienzar, F.A., Cheung, V.V., Jha, A.N., Depledge, M.H., 2001. Fitness parameters and DNA effects are sensitive indicators of copper-induced toxicity in *Daphnia magna*. *Toxicol. Sci.* 59, 241-250.
- Atienzar, F.A., Billinghamurst, Z., Depledge M.H., 2002. 4-n-Nonylphenol and 17-beta estradiol may induce common DNA effects in developing barnacle larvae. *Environ Pollut.* 120, 735-738.
- Atienzar, F.A., Jha, A.N., 2004. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay to determine DNA alterations, repair and transgenerational effects in B(a)P exposed *Daphnia magna*. *Mutat. Res.* 552, 125–140.
- Atienzar, F.A., Jha, A.N., 2006. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review. *Mutat. Res.* 613, 76-102.
- Audry, S., Blanc, G., Schafer, J., 2004. Cadmium transport in the Lot-Garonne River system (France) - temporal variability and a model for flux estimation. *Sci. Total. Environ.* 319, 197-213.
- Bagchi, D., Joshi, S.S., Bagchi, M., Balmoori, J., Benner, E.J., Kuszynski, C.A., Stohs, S.J., 2000. Cadmium- and chromium-induced oxidative stress, DNA damage, and apoptotic cell death in cultured human chronic myelogenous leukemic K562 cells, promyelocytic leukemic HL-60 cells, and normal human peripheral blood mononuclear cells. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 14, 33-41.
- Blanc, G., Lapaquellerie, Y., Maillet, N., Anschutz, P., 1999. A cadmium budget for the Lot-Garonne fluvial system (France). *Hydrobiologia* 410, 331–341.
- Cavas, T., Garanko, N.N., Arkhipchuk, V.V., 2005. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. *Food. Chem. Toxicol.* 43, 569-574.

Chan, P.K., Cheng, S.H., 2003. Cadmium-induced ectopic apoptosis in zebrafish embryos. *Arch. Toxicol.* 77, 69-79.

Collins, R.A., Dobson, L.V., Dusinska, M., Kennedy, G., Stetina, R., 1997. The comet assay: what can it really tell us? *Mutat. Res.* 375, 183-193.

Conte, C., Mutti, I., Puglisi, P., Ferrarini, A., Regina, G., Maestri, E., Marmiroli, N., 1998. DNA fingerprinting analysis by a PCR based method for monitoring the genotoxic effects of heavy metals pollution. *Chemosphere* 37, 2739-2749.

Dil, A., Misra, A., Sulaiman, I.M., Sinha, S., Sarkar, C., Mahapatra, A.K., Hasnain, S.E., 1998. Genetic alterations in brain tumors identified by RAPD analysis. *Gene* 206, 45-48.

Enan, M.R., 2006. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to detect the genotoxic effect of heavy metals. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 43, 147-154.

ESCODD, 2002. Comparative analysis of baseline 8-oxo-7,8-dihydroguanine in mammalian cell DNA, by different methods in different laboratories: an approach to consensus. *Carcinogenesis* 23, 2129-2133.

Giaginis, C., Gatzidou, E., Theocharis, S., 2006. DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 213, 282-290.

Gonzalez, P., Baudrimont, M., Boudou, A., Bourdineaud, J.P., 2006. Comparative effects of direct cadmium contamination on gene expression in gills, liver, skeletal muscles and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *Biometals* 19, 225-235.

Guinee, J.B., van den Bergh, J.C.J.M., Boelens, J., Fraanje, P.J., Huppes, G., Kandelaars, P.P.A.A.H., Lexmond, T.M., Moolenaar, S.W., Olsthoorn, A.A., Udo de Haes, H.A., Verkuijlen, E., van der Voet, E., 1999. Evaluation of risks of metal flows and accumulation in economy and environment. *Ecol. Econ.* 30, 47-65.

Hagger, J.A., Atienzar, F.A., Jha A.N., 2005. Genotoxic, cytotoxic, developmental and survival effects of tritiated water in the early life stages of the marine mollusc, *Mytilus edulis*. *Aquat Toxicol.* 74, 205-217.

Halliwell, B., 1999. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutat. Res.* 443, 37-52.

Hartmann, M., Hartwig, A., 1998. Disturbance of DNA damage recognition after UV-irradiation by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells. *Carcinogenesis* 19, 617-621.

Hutton, M., 1983. Sources of cadmium in the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 7, 9-24.

Knopper, L.D., Mineau, P., 2004. Organismal effects of pesticide exposure on meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*) living in golf course ecosystems: developmental instability, clinical hematology, body condition, and blood parasitology. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1512-1519.

Liu, W., Yang, Y.S., Li, P.J., Zhou, Q.X., Xie, L.J., Han, Y.P., 2009. Risk assessment of cadmium-contaminated soil on plant DNA damage using RAPD and physiological indices. *J Hazard Mater.* 161, 878-883.

Liu, W., Yang, Y.S., Zhou, Q., Xie, L., Li, P., Sun, T., 2007. Impact assessment of cadmium contamination on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings at molecular and population levels using multiple biomarkers. *Chemosphere* 67, 1155-1163.

Liu, W., Li, P.J., Qi, X.M., Zhou, Q.X., Zheng, L., Sun, T.H., Yang, Y.S., 2005. DNA changes in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis. *Chemosphere* 61, 158-167.

Ong, T.M., Song, B., Qian, H.W., Wu, Z.L., Whong, W.Z., 1998. Detection of genomic instability in lung cancer tissues by random amplified polymorphic DNA analysis. *Carcinogenesis* 19, 233-235.

- Plachý, R., Hamal, P., Raclavský, V., 2005. McRAPD as a new approach to rapid and accurate identification of pathogenic yeasts. *J Microbiol Methods* 60, 107-113.
- Pruski, A.M., Dixon, D.R., 2002. Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair efficiency in the gill cells of *Mytilus edulis* L. *Aquat. Toxicol.* 57, 127-137.
- Rodriguez-Cea, A., Ayllon, F., Garcia-Vazquez, E., 2003. Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56, 442-448.
- Russo, C., Rocco, L., Morescalchi, M.A., Stingo, V., 2004. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57, 168-174.
- Sanchez-Galan, S., Linde, A.R., Ayllon, F., Garcia-Vazquez, E., 2001. Induction of micronuclei in eel (*Anguilla anguilla* L.) by heavy metals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49, 139-143.
- Savva, D., 1998. Use of DNA fingerprinting to detect genotoxic effects. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41, 103-106.
- Singh, K.P., Roy, D., 2001. Identification of novel breast tumor-specific mutation(s) in the q11.2 region of chromosome 17 by RAPD/AP-PCR fingerprinting. *Gene* 269, 33-43.
- Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., Beyersmann, D., 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 192, 95-117.
- Wang, Y., Fang, J., Leonard, S.S., Rao, K.M., 2004. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 1434-1443.
- Welsh, J., McClelland, M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18, 7213-7218.
- Westerfield, M., 2007. *The zebrafish book*, 4th Edition; A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). University of Oregon Press, Eugene.

Zhiyi, R., Haowen, Y., 2004. A method for genotoxicity detection using random amplified polymorphism DNA with *Danio rerio*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 58, 96-103.

Legend to figures

Figure 1. Kinetics of the cadmium water concentrations. The cadmium concentration was assessed regularly within the tanks in order to compensate for the cadmium concentration decrease (mainly due to metal adsorption on the tank walls) by adding a fresh quantity of a concentrated solution of cadmium chloride. The desired nominal values of 2 and 10 $\mu\text{g Cd.l}^{-1}$ (C1 and C2 exposures, respectively) are indicated by dotted lines, and the time-dependent oscillations around these values are indicated by diamonds and squares for the C1 and C2 exposures, respectively.

Figure 2. Relative cumulated mortality of zebrafish exposed to cadmium chloride. The fish mortality was daily recorded in C0, C1 and C2 exposure tanks, and after subtraction of the number of dead fish in the C0 tank to that in the C1 or C2 tanks, the cumulated mortality was plotted versus time, with black diamonds and open squares symbols for the C1 and C2 exposures, respectively.

Figure 3. Random amplified of polymorphic DNA profiles of a pool of 10 genomic DNAs from *Danio rerio* fish exposed to CdCl_2 . The RAPD probes used are indicated at the top of the figures. M = DNA ladder. Numbers at the left sides of figures indicate the standard molecular weights in kbp. Arrows indicate PCR products that are discriminative between control and contaminated fish. Lanes C₀: control DNAs; lanes C₂: zebrafish DNAs exposed to $86 \pm 26 \text{ nM CdCl}_2$.

Figure 4. Melting curves of the PCR products obtained with OPB7 (A, B) and OPB11 (C, D) from control fish n°5 (A, C), and Cd-contaminated (C_{2a}) fish n°10 (B, D) individual genomic DNAs. The first derivative of the Sybergreen fluorescence (a function of temperature) is

plotted versus temperature. Arrows indicate the PCR product peaks whose temperature intervals to which their T_m belong were reported in the logical matrix in table 2.

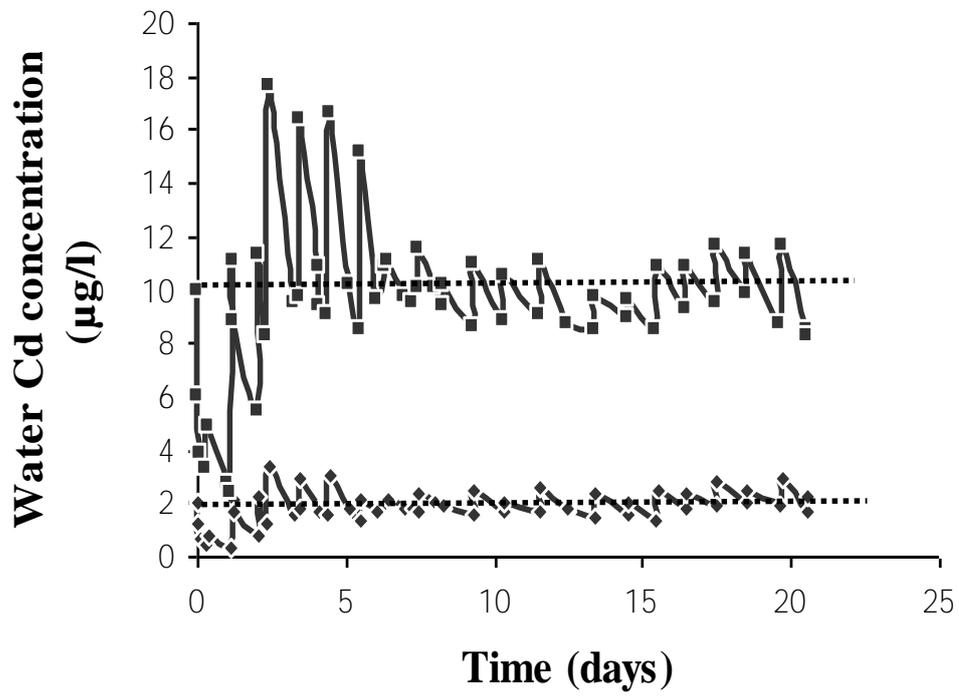


Figure 1

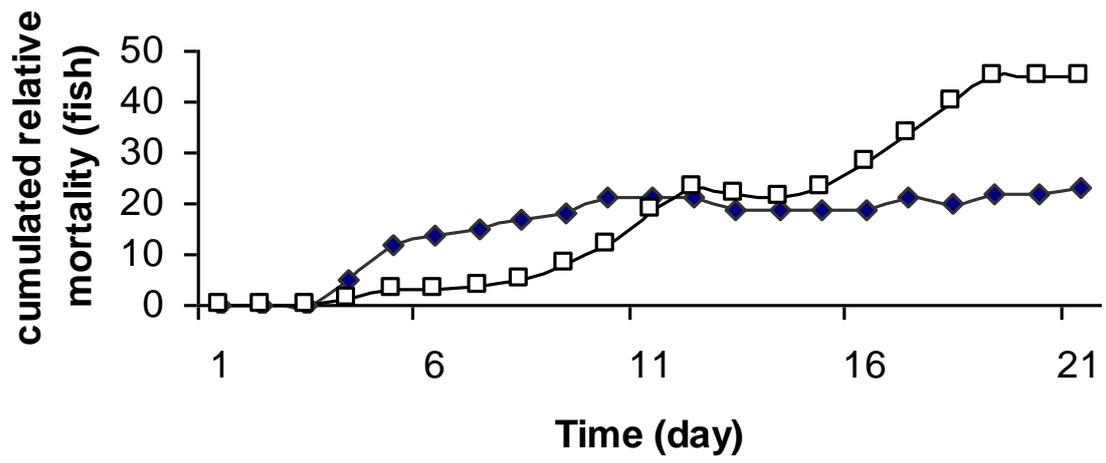


Figure 2

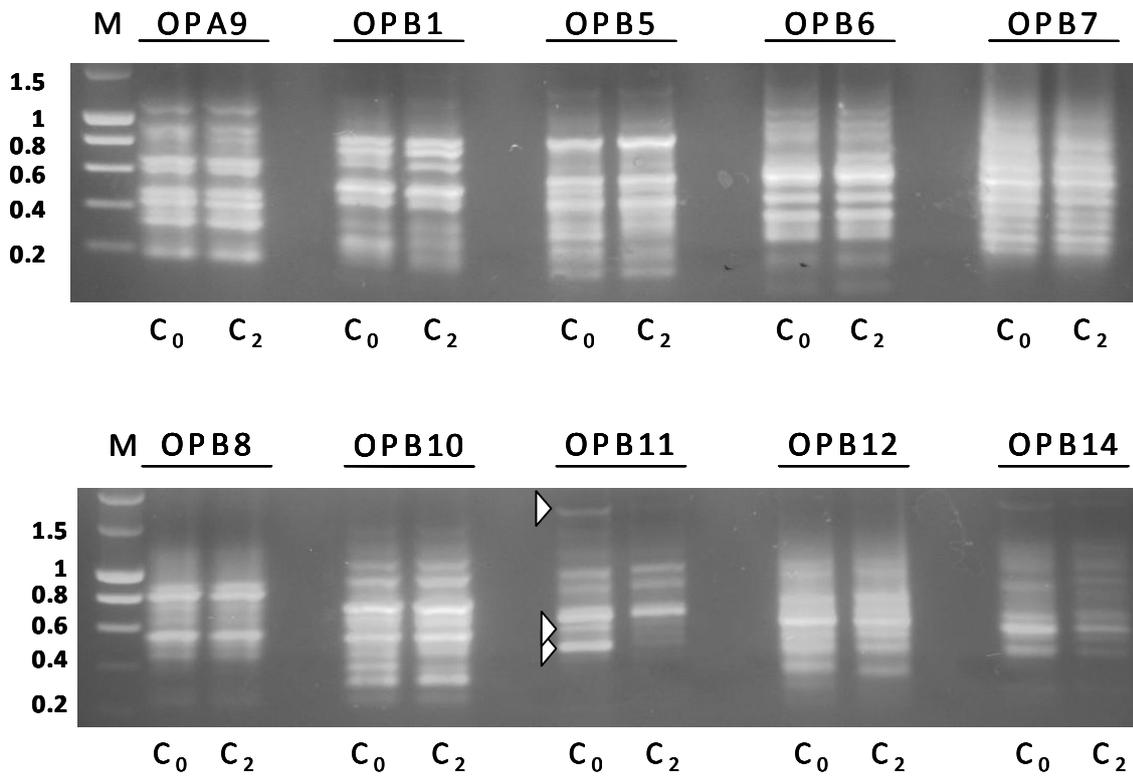


Figure 3.

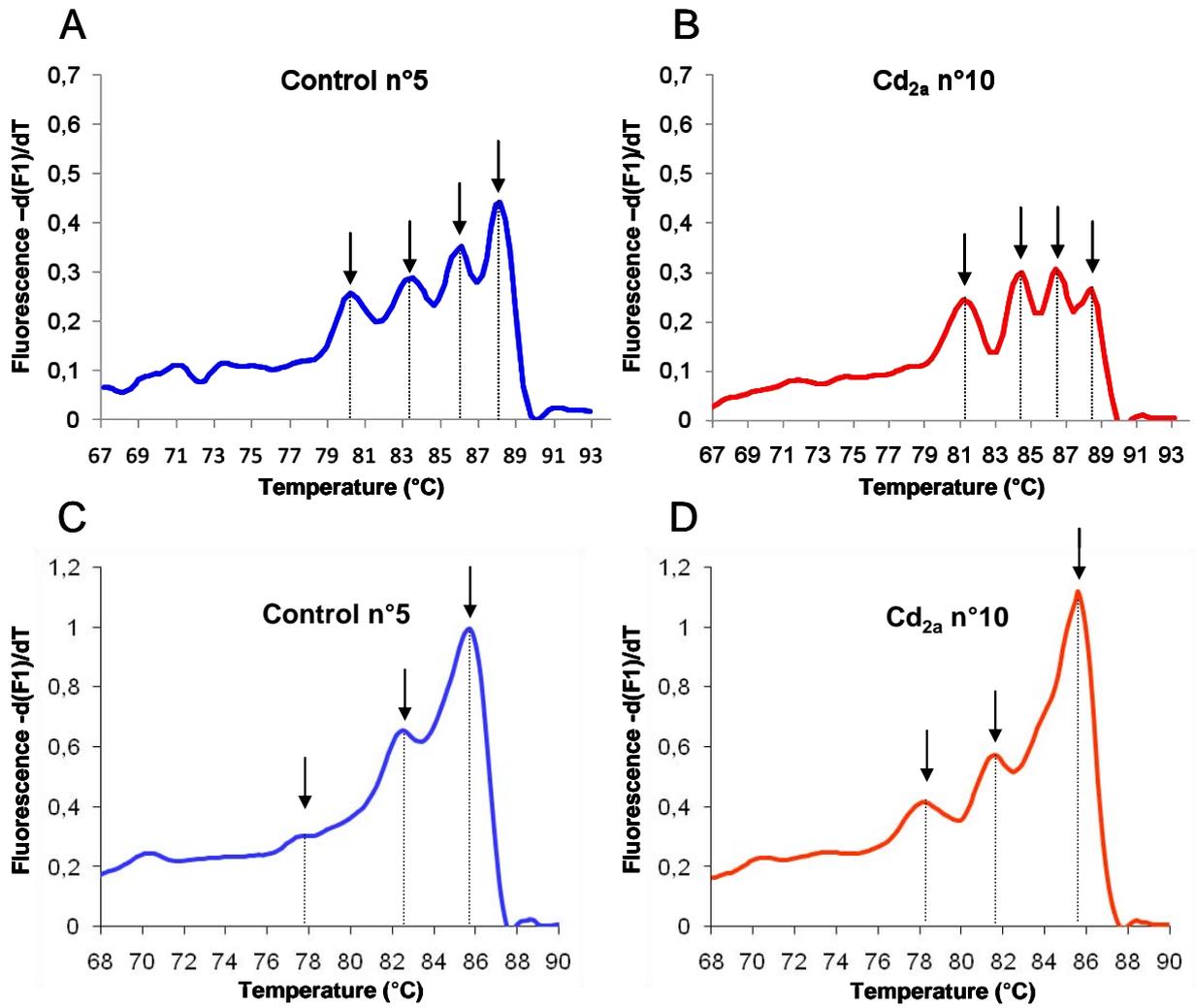


Figure 4.

Table 1. Cd accumulation (nmol.g⁻¹, wet weight) in *D. rerio* organs after 21 days of contamination (mean ± SE; *n* = 3). Values noted with different letters indicate a significant difference between metal exposure conditions for each tissue (Mann–Whitney U-test, *p* < 0.05).

Exposure	Brain	Gills	Liver	Skeletal muscles
C₀	0.3 ± 0.04^a	0.9 ± 0.3^a	0.9 ± 0.02^a	0.2 ± 0.05^a
C₁	3.9 ± 1.5^b	15 ± 2.2^b	10.8 ± 0.4^b	1.6 ± 0.4^b
C₂	10.6 ± 0.4^c	12.8 ± 1.1^b	24.9 ± 5.2^c	1.2 ± 0.4^b

Table 2. Quantification of genotoxic effects of CdCl₂ (C₁: 17nM and C₂: 86 nM) on zebrafish DNA

	<u>C₀</u>	<u>C₁ CdCl₂</u>	<u>^bC_{2a} CdCl₂</u>	<u>^bC_{2b} CdCl₂</u>
^a OPB7	22.8 0.3	22.9 0.6	22.6 0.1	22.0 0.4
^a OPB11	34.0 0.3	31.8 0.5	32.3 0.5	31.8 0.4
$\Delta(\text{OPB7} - \text{OPB11})$	-11.2 0.4	*-9.0 0.3	*-9.8 0.4	*-9.9 0.2
^c 2 $\Delta(\text{OPB7} - \text{OPB11})$	(0.6 0.14).10 ⁻³	* (2.4 0.46).10 ⁻³	* (1.7 0.48).10 ⁻³	* (1.2 0.21).10 ⁻³

^a Numbers given are the means (sem) of cycles necessary to enter in exponential amplification phase done on 10 different zebrafish genomic DNAs with oligonucleotides OPB7 and OPB11.

^b C_{2a} and C_{2b} represent two different groups of 10 zebrafish exposed to 86 nM of CdCl₂.

^c 2 $\Delta(\text{OPB7} - \text{OPB11})$: means (sem) of OPB11 relative hybridization efficiency.

Asterisks indicate statistically significant values (p < 0.05).

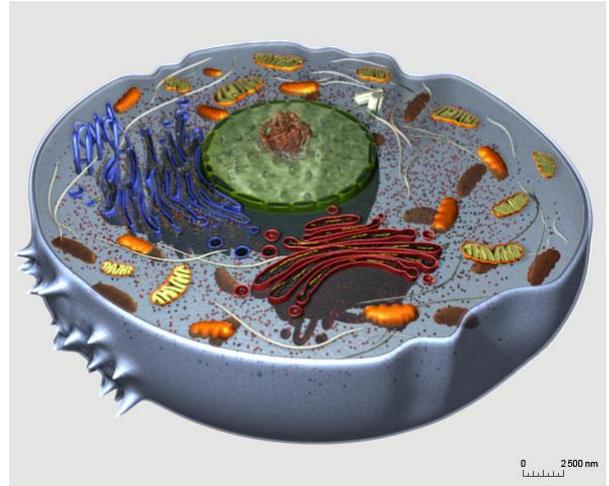
Table 3. Classification, according to the temperature intervals (°C) to which their T_m belong, of the PCR products obtained with OPB7 (A) and OPB11 (B) on 10 individual genomic DNAs' from control (C₀) and Cd(II)-contaminated (C₁ and C₂) zebrafish.

A	C ₀										C ₁ CdCl ₂ (17 ± 5 nM)										C ₂ CdCl ₂ (86 ± 26 nM)																				
																					a										b										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
I1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
I2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
I3	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
I4	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	
I5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
I6	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
I7	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	
I8	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
I9	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	
I10	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
I11	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	

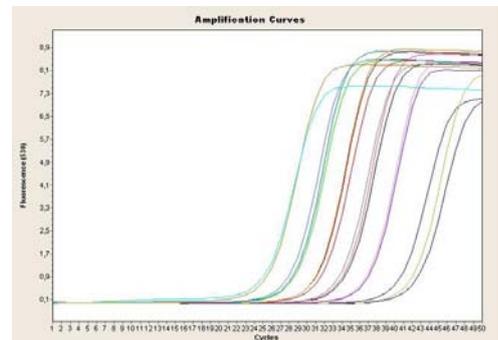
B	C ₀										C ₁ CdCl ₂ (17 ± 5 nM)										C ₂ CdCl ₂ (86 ± 26 nM)																			
																					a										b									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
I1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
I2	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1
I3	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
I4	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0
I5	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
I6	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1
I7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
I8	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1
I9	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
I10	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0

I1 : [74-78 °C]; I2 : [78-80°C]; I3 : [80-81°C]; I4 : [81-82°C]; I5 : [82-83°C]; I6 : [83-84°C]; I7 : [84-85°C]; I8 : [85-86°C]; I9 : [86-87°C]; I10 : [87-88°C]; I11 : [88-89°C] .
 0: no PCR products; 1: presence of PCR products in the temperature interval.

Chapitre 2



Approche génétique de l'impact de la contamination au méthylmercure.



Récemment dans notre laboratoire une étude fut menée sur la réponse génique d'un poisson adulte (*Danio rerio*) lors d'une exposition par voie trophique au MeHg (Gonzalez *et al.*, 2005). Treize gènes impliqués dans différentes fonctions cellulaires (la lutte contre le stress oxydant, la chélation des métaux, le transport actif de xénobiotiques, le métabolisme mitochondrial, le processus de réparation de l'ADN, et l'apoptose) ont été analysés après 7, 21 et 63 jours d'exposition avec de la nourriture contaminée à hauteur de $13,5 \mu\text{g Hg.g}^{-1}$, dose représentative de celle trouvée dans certaines proies au niveau du barrage de Petit Saut en Guyane. Sur ces 13 gènes, il y a eu induction d'un facteur 77 du gène de la sous-unité 1 de la cytochrome *c* oxydase ainsi que de ceux des deux superoxydes-dismutases avec un facteur de 21,5 pour l'isoforme mitochondriale et de 12 pour l'isoforme cytoplasmique dans le muscle squelettique après 21 jours d'exposition. Ces résultats suggèrent l'induction d'un stress oxydant suite à la contamination organomercurielle. En revanche, dans le cerveau aucune induction ou répression ne fut détectée pour ces 13 gènes tout au long de la contamination. Les objectifs de ce chapitre sont de mieux comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu par les organismes aquatiques lors d'une exposition chronique au MeHg dans ces deux tissus.

Afin de comprendre la toxicité du MeHg dans ces deux organes cibles, deux types d'analyses génétiques ont été menées : une analyse SAGE (Serial Analysis Gene Expression) sur le muscle squelettique pour en caractériser la réponse globale après 25 jours d'exposition, puis l'analyse, par PCR quantitative en temps réelle, de 10 gènes spécifiques au système nerveux central, 10 gènes codant pour des transporteurs impliqués dans l'homéostasie du calcium et 3 gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant. Ces analyses génétiques ayant pour objectif de mettre en évidence la mise en place de processus d'adaptation de ces deux tissus face à la contamination organomercurielle.

I/ Analyse SAGE sur le muscle squelettique.

L'analyse concernant l'adaptation du muscle squelettique lors d'une exposition au MeHg a permis l'obtention d'un profil génétique complet de la réponse du muscle. 215 gènes sur les 5280 identifiés présentent des niveaux d'expression statistiquement différents entre les deux banques ($p < 0,05$). Ces 215 gènes ont ensuite été identifiés, puis classés suivant différentes voies métaboliques cellulaires. Les voies métaboliques qui ressortent touchées par la contamination sont le métabolisme énergétique, les synthèses lipidique et protéique, la régulation de la mitose, la traduction, certains processus de détoxification et enfin des gènes impliqués dans le métabolisme général de la cellule. L'impact sur le métabolisme énergétique inclus à la fois la glycolyse et le métabolisme mitochondrial. Les résultats de cette étude font l'objet d'un article actuellement accepté dans le journal international « Environmental Sciences and Technology ».

Article

Serial analysis of gene expression in the skeletal muscles of zebrafish fed with a methylmercury-contaminated diet.

Sébastien Cambier, Patrice Gonzalez*, Gilles Durrieu, Régine Maury-Brachet, Alain Boudou,
Jean-Paul Bourdineaud

Université de Bordeaux 1, UMR 5805 CNRS, Station Marine d'Arcachon, place du Dr.
Peyneau, Arcachon, 33120, France

* Corresponding author: Patrice Gonzalez

Phone: +33-556-223-921; Fax: +33-556-549-383;

E-mail: p.gonzalez@epoc.u-bordeaux1.fr

Accepté dans *Environmental Science and Technology*.

Summary

Mercury (Hg) is a widespread environmental contaminant and its organic form, methylmercury (MeHg), has been known as a potent neurotoxic since the Minamata tragedy. In the Amazonian basin, gold mining leads to MeHg biomagnification all along the food web, culminating in piscivorous fish, ultimately responsible for contamination of human beings through fish consumption. In order to assess the biological impact of dietary MeHg on fish at the genome scale, we contaminated zebrafish with MeHg-contaminated food for 25 days (13.5 μg Hg/g of food). 19171 SAGE tags were sequenced from the control library and 22261 from the MeHg-contaminated library, corresponding to 5280 different transcripts. Among those identified, 60 genes appeared up-regulated and 15 down-regulated by more than 2-times. A net impact of MeHg was noticed on 14 ribosomal protein genes indicating a perturbation of protein synthesis. Several genes involved in mitochondrial metabolism, the electron transport chain, endoplasmic reticulum (ER) function, detoxification and general stress responses were differentially regulated, suggesting an onset of oxidative stress and ER stress. Several other genes for which expression varied with MeHg contamination could be clustered in various compartments of the cell's life such as lipid metabolism, calcium homeostasis, iron metabolism, muscle contraction, and cell cycle regulation.

Introduction

Centuries of emissions of anthropogenic mercury (Hg) have caused widespread environmental contamination over large regions of the earth (1). Hg, and more particularly methylmercury (MeHg), have been reported as hazardous environmental pollutants with severe risks for animal and human health and are responsible for a specific range of neurological diseases (2, 3).

For instance Minamata disease, known to be caused by MeHg contamination, is characterized by ataxia, visual and hearing disturbances, sensory impairment, convulsions, memory defects, muscle weakness and wasting, and muscle cramps (4). Potential deleterious effects of low level prenatal MeHg exposure on neurodevelopment have also been reported (5). This led to consider MeHg pollution as a continuous environmental hazard to human health, especially via fish-consumption.

In French Guiana, clandestine gold mining is intensively occurring on terrestrial sites or directly into the rivers, but this contamination is less important than that which occurred in Minamata. Mercury contamination of 35 freshwater fish species collected from the Courcibo and Leblond Rivers were analyzed in relation to their food regimens. Results showed a marked biomagnification along the food chain: the ratio between extreme Hg concentrations in the muscle from piscivorous species (14.3 $\mu\text{g/g}$, dry weight (dw) for *Acestrorhynchus guianensis*) and from herbivorous species (0.02 $\mu\text{g/g}$, dw for *Myleus ternetzi*) was 715 (6). The final predators in this food web are human beings, and consequently high mercury levels are observed in hair from some native Amerindian communities (7). This placed 57 % of the Wayanas living in the upper marshes of the Maroni River above the World Health Organization (WHO) limit (10 $\mu\text{g/g}$ Hg concentrations in hair). All individuals aged over 1 year had a Hg intake level from ingested fish greater than the safety level of 200 mg MeHg per week.

Thus, in order to analyze MeHg toxicity, brain and skeletal muscle are candidate tissues due to the strong bioaccumulation potential of this chemical. Analysis of the MeHg toxicity in the liver was discarded because it is the site of MeHg demethylation resulting in the double toxicity of the inorganic and organic mercury (8). In a previous study thirteen genes have been checked in these two tissues after MeHg contamination in the zebrafish, and only skeletal muscles had showed a genetic response. Gene expression analysis revealed that the expression levels of *coxI*, and both the cytoplasmic and mitochondrial *sod* genes were highly induced in skeletal muscles after 7 and 21 days of exposure, suggesting an impact of MeHg on mitochondrial function and the generation of an oxidative stress (9).

To understand the impact of MeHg all along the food web we decided to use the zebrafish (*Danio rerio*) as a model of the mercurial contamination of piscivorous species in French Guiana. Zebrafish were contaminated over 25 days through diet, using food containing 13.5 µg Hg per g. This mercury concentration corresponds to that found in various preys of the food web in French Guiana (6). Fish were fed each day with a food quantity representing 5% of their body weight (44 mg food/day/fish representing 0.6 µg Hg/day/fish or 3 nmol Hg/day/fish) and muscles accumulated 22 µg Hg/g after 21 days. In this study we investigated the general response of zebrafish muscles after such a dietary MeHg contamination using a Serial Analysis of Gene Expression (SAGE). The SAGE gives a picture of gene expression pattern at the genome scale (10). Our results revealed a strong impact of MeHg on several metabolism pathways.

Materials and methods

MeHg exposure conditions

Adult male fish (body weight: 0.88 ± 0.03 g, wet wt; standard length: 3.63 ± 0.05 cm, $n = 10$) were randomly placed in two tanks containing 50 L of chlorine-free, permanently oxygenated water. Female fish were excluded to avoid any interference due to reproduction processes. Throughout the experiment, the temperature was maintained at 24 ± 0.5 °C. Fish in each tank were fed twice a day with a quantity of artificial food corresponding to 5% of the fish wet weight. Control fish were fed with uncontaminated food. In the exposure tank, fish were fed with a 13.5 µg of Hg g⁻¹ (dry wt) contaminated food. The contaminated diet was prepared by mixing artificial fish food (Dr. Bassleer Biofish, Telgte, The Netherlands) with a reagent grade alcohol (95% ethanol, Prolabo) containing dissolved MeHg chloride (Alltech) as previously described (9). Total Hg concentrations in food and fish muscles were determined by flameless atomic absorption spectrometry. Analyses were carried out automatically after thermal decomposition at 750 °C under an oxygen flow (AMA 254, Prague, Czech Republic) with a detection limit of 0.01 ng Hg. The validity of the analytical methods was checked during each series of measurements against three standard biological reference materials (TORT2); Hg values were consistently within the certified ranges (data not shown). This dietary exposure level is in the range of those found in various piscivorous fish inhabiting natural lakes or flooded reservoirs in North America, Canada, or Brazil (2). To minimize fish contamination by the water, one-third of the water volume from each tank was changed every 2 days, and tank bottoms were cleaned every day to eliminate fish faeces and food remains. Five fish per tank were removed after 25 days and were killed within seconds

by immersion in melting ice and stored at -80°C . From each *Danio rerio*, skeletal muscles were collected by dissection on ice.

Global gene expression profile

The SAGE method was performed with the I-SAGE Long Kit (Invitrogen) to quantify the expressed transcripts according to the strategy described by Velculescu *et al.* (10). In each group, polyadenylated RNAs were purified from skeletal muscle with the lysis/binding buffer from pooled samples to eliminate any individual variation and extract sufficient quantities of mRNA. After binding of the mRNA to the oligo(dT) magnetic beads, mRNAs were converted to cDNA and cleaved with *NlaIII*. Restriction fragments bound to the magnetic beads were isolated with a magnetic stand. Restricted cDNAs of each condition were cleaved in two aliquots and for both condition each aliquot was ligated with one of the two annealed LS adapters. Tags with adapters were released by cleavage with the type II restriction endonuclease *MmeI*. The two tag aliquots with different LS adapter were ligated in ditags for each condition. Three dilutions of produced ditags (1/20, 1/40, and 1/80) were preliminarily amplified by PCR with Promega reagents (MgCl_2 25mM, 10x buffer, and *Thermus aquaticus*) with the following thermal cycling parameters used for the PCR amplification: 2 min at 95°C to denature DNA followed by 27 cycles of 30 sec for denaturation (95°C), 1 min at 55°C for annealing, and 1 min at 72°C for the extension step with a final extension period adjusted to 5 min and analyzed by agarose gel electrophoresis allowing the choice of the better dilution to do large-scale PCR with an optimized ditag concentration. Large-scale PCR amplification and gel purification of the ditags were performed using the extended primer (LS DTP-1; 5' – GTTCCGTCTGGTGCTCGTGGGATTTGCTGG- 3', and LS DTP-2; 5' - GTTCCGTCTGGAGCTCGTGCTGCTCGAATT- 3'). Indeed, the use of the primer furnished in the I-SAGE long kit didn't allowed the discrimination of ditags and adapters after *NlaIII* digestion, since all the generated fragments were nearly the same size. The extended primer added 10 nucleotides to the adaptors which then have a greater length than the ditags. Then, the ditags were digested with *NlaIII*, analyzed with a polyacrylamide gel electrophoresis, excised from the gel and self-ligated to produce long concatemers. The concatemers were analyzed with a polyacrylamide gel electrophoresis and separated into three groups: the first one between 300 and 500 bp, the second one between 500 and 1000 bp, and the third one 1000 bp and higher. These products were cloned into the *SphI* site of pZErO[®]-1 and One Shot[®] TOP10 Electrocomp[™] *E. coli* were transformed. More than 2500 white colonies per bank were screened by PCR to select inserts with a size greater than 400 bp for automated sequencing (Cogenix, Meylan, France).

Tag identification

The sequence and the occurrence of each of the transcript tags were determined by Cogenix (Meylan, France). To identify the corresponding transcript, the sequences of 21 pb SAGE tags (NlaIII site plus the 17 adjacent pb) were matched with a public database. This database was accessible on the EMBL-EBI server (<http://srs.ebi.ac.uk/>). The database was obtained using “uniprot<([EMBL-org:danio rerio]&[EMBL-mol:mrna])![EMBL-div:est]” query. Due to the huge gene data matrix, we decided to extract gene information corresponding to each SAGE tag by using Bash programming shell scripts on Linux Fedora OS.

Statistical analysis

The differential expression identified by the SAGE method was statistically evaluated with a comparison of frequencies between the control and MeHg-contaminated conditions using a binomial test. Statistical significance was set at $p \leq 0.05$. We focus on transcripts with > two fold difference with a statistical significance.

Results:

Hg quantification within skeletal muscles.

After 25 days of exposure to a contamination pressure of 3 nmol Hg/day/fish (0.6µg Hg/day/fish), fish skeletal muscles accumulated a high level of mercury, $25.4 \pm 5.01 \mu\text{g Hg.g}^{-1}$ (dry weight), compared to control skeletal muscles, $1.77 \pm 1.14 \mu\text{g Hg.g}^{-1}$ (dry weight). This means that MeHg enters easily into fish tissue through diet.

The most abundant genes in zebrafish skeletal muscles.

One distinct advantage of the SAGE method is its ability to quantify the expression frequency of all genes known and unknown. Table 1 presents all the genes expressed > 0.75% of the total mRNA population in zebrafish skeletal muscle. The relative frequency of tags listed in Table 1 was calculated by dividing the observed tag count for a given gene by the total tag count in the muscle of control (19171) or in MeHg-contaminated muscle (22261). A total of 22 distinct tags were expressed above the 0.75% threshold. These tags were involved principally in contraction mechanisms, and some acting in energy metabolism. Highly expressed genes involved in contraction are α -actin, myosin light chain 3 and 2, and myosin heavy chain polypeptide. Concerning energy metabolism, genes mainly expressed were those encoding for creatine kinase 3, cytochrome *c* oxidase subunits 1 and 3, and NADH dehydrogenase subunit 6. There are four ESTs which do not match in databases. Among these

23 genes, seven showed significant differential expression ($p < 0.05$) between control and contaminated conditions.

Differential gene expressions observed between control and MeHg-contaminated fish muscles.

A total of 41432 SAGE tags were sequenced corresponding to 5280 transcript species. Among these, 215 were differentially expressed ($p < 0.05$), 75 of which were identified. Among these 75 tags 60 genes were up-regulated more than 2 times and 15 were down regulated more than 2 times. These 75 genes could be indexed following different cellular functions (Table S1). Indeed, energetic and lipid metabolisms, cellular stress markers, mitosis regulation, protein translation, cell structure, and cell general metabolism were affected by MeHg contamination.

Concerning energetic metabolism, two different pathways were impacted: glycolysis and mitochondrial metabolism. For the glycolytic pathway, genes encoding for lactate dehydrogenase B4 (*ldhb*) and fructose bisphosphate aldolase b (*aldob*) were up-regulated whereas the enolase 3 β gene (*eno3*) was down regulated. For mitochondrial metabolism, genes involved in the oxidative phosphorylation and encoding for pyruvate dehydrogenase (*pdhb*), cytochrome *b* (*cytb*), cytochrome *c1* (*cyc1*), and NADH dehydrogenase subunit 3 (*nd3*) were up-regulated. Genes involved in general mitochondrial metabolism and encoding for 16S ribosomal RNA (*16S*), aminolevulinic acid synthetase 1 (*alas1*), voltage dependent anion carrier (*vdac2*), and adenine nucleotide translocator 2 (solute carrier family 25 α member 5, *slc25a5*) were up-regulated, whereas the gene for adenine nucleotide translocator 1 (solute carrier family 25 α member 4, *slc25a4*) was down regulated.

For lipid metabolism, four genes were identified encoding for apolipoprotein Eb (*apoeb*), the fatty acid binding protein 10 (*fabp10*), the high density lipoprotein-binding protein (*hdlbp*), and the lipid-transporting vitellogenin (*vtg1*) that were up-regulated in the MeHg-contaminated muscle.

An impact was also apparent on mitosis process with the induction of three genes encoding for geminin (*gmn*), cyclin a1 (*ccna1*), and cyclin b1 (*ccnb1*).

Protein synthesis was also targeted since MeHg-contaminated muscle showed a modification in ribosomal protein gene expression: 8 genes (*rps3*, *rps2*, *rplp0*, *rpl37*, *rpl7a*, *rps15*, *rps10*, *rpl36*) showed an increase of their expression and 6 genes (*rpl26*, *rps24*, *rpl6*,

rplp2, *rpl34*, *rps26l*) had decreased expressions, whereas the gene encoding elongation factor 1 α (*ef1a*) was up-regulated.

Some modifications occurred in the stress response gene expression pattern. Modifications were evident for 5 genes encoding for metallothionein isoform 2 (*mt2*), glutathione peroxidase 4a (*gpx4a*), N-acetyltransferase 5 (*nat5*), UDP-glucuronyltransferase (*ugt1ab*), and cold-inducible RNA binding protein (*cirbp*).

The secretory and endocytic pathways were impacted since genes for lysosomal-associated protein transmembrane 4 α (*laptm4 α*), Grp78 (*hsa5*), Grp94 (*hsp90b1*), the signal recognition particule 68 (*srp68*), and the VAMP (vesicle-associated membrane protein)-associated protein A (*vapa*) were up-regulated.

Three genes involved in calcium homeostasis and muscle relaxation presented different responses to the MeHg contamination. The two parvalbumin genes (*pvalb1* and *pvalb2*) were down regulated whereas the ictacalcin gene (*icn*) was up-regulated.

Genes involved in cellular cytoskeleton assembly and the contractile apparatus presented modified expression in the contaminated fish. Genes encoding for tubulin α 8 such as (*tuba8l*), tubulin β 2c (*tubb2c*), and titin a (*ttna*) were up regulated. Genes encoding for proteins necessary for muscle contraction such as cardiac muscle actin α 1, troponin T3b (*tnnt3b*), and troponin C (*tnc*) genes were down regulated.

Genes encoding for cell surface and extracellular matrix proteins such as claudin d (*cldnd*), basigin (*bsg*), collagen type I α 2 (*cd1a2*), integral membrane protein 2Ba (*itm2ba*), stroma cell derived factor 2 (*sdf2*), fusion 1 protein (*fus1*), and zona pellucida glycoprotein 2 (*zp2*) and 2.3 (*zp2.3*) were over expressed in the MeHg-contaminated group, whereas the gene for reticulon 4a protein (*rtn4a*) was less expressed in the MeHg-contaminated group.

General cell metabolism was deeply impacted by dietary MeHg since a major cell transcript encoding nucleoside diphosphate kinase Z2 (*ndpkz2*) was repressed whereas genes encoding for chaperonin containing TCP1 subunit 8(θ) (*cct8*), serpine1 mRNA binding protein (*serbp1*), and methionine adenosyltransferase 2 α (*mat2a*) were up-regulated. In addition, signal transduction cascades are likely to be influenced since the genes encoding for protein phosphatase 1A (*ppm1a*) and the catalytic subunit of protein phosphatase 1(*ppp1cb*) were up-regulated.

Iron metabolism was affected by MeHg contamination since the genes for hemoglobin (*hbaa1*), ferritin heavy polypeptide 1 (*fr1*), and transferrin (*tfa*) were up-regulated.

In addition to these identified tags, many SAGE tags could not be attributed to known genes. Among them, those up or down-regulated over tenfold are listed in table S2.

Discussion

The skeletal muscle's characteristics showed that genes with a high level of expression (> 0.75%) in the control muscle were mainly involved in contraction and energy metabolism. The most abundant expressed genes in zebrafish are similar to the most abundant mRNA expressed in the human skeletal muscle. This similarity bears on the muscle contractile properties with α actin and myosin genes, and the energetic metabolism with genes for cytochrome *c* oxidase subunit 1 and 3, NADH dehydrogenase subunit 6, and creatine kinase M3 (11). However, parvalbumin genes were much more expressed in the zebrafish skeletal muscle than in human muscle. In mice skeletal muscle a difference could be noticed between fast- and slow-twitch muscle parvalbumin content (12). Parvalbumin is present in the fast-twitch muscles which are involved in fast movement (13). The presence of the parvalbumin gene isoforms among the most expressed genes may be explained by the relative abundance of fast-twitch muscle (white muscle) as compared to the slow-twitch muscle (red muscle) in fish.

The neurotoxic impacts of MeHg have been studied on cerebellar neurons and astrocytes. It appeared that MeHg toxicity was principally based on mitochondrial metabolism impairments with Reactive Oxygen Species (ROS) production. MeHg exposure induced severe mitochondrial alterations such as a large disturbance in Ca^{2+} homeostasis inducing inner membrane depolarization and cellular apoptosis (14, 15). Rat exposure to MeHg through drinking water showed an impact on muscle mitochondrial metabolism as revealed by a decrease in cytochrome *c* oxidase (COX) and succinate dehydrogenase activity (16). More recently, the impact of a dietary MeHg contamination on zebrafish skeletal muscles was addressed quantifying mitochondrial respiration, COX activity, and muscle ATP synthesis. A strong inhibition of both state 3 mitochondrial respiration and COX activity along with a decrease in the rate of ATP production was observed after 49 days of MeHg exposure (17). In addition, mitochondria from contaminated zebrafish muscles presented structural abnormalities under electron microscopy observation (18). The present SAGE is in agreement with these previous observations. Indeed, gene expression of glycolytic and mitochondrial enzymes was modified; and this might reveal some dysfunction in the energetic process, in turn leading to production of ROS. This SAGE reveals an induction of the glutathione peroxidase 4a gene which encodes for a selenoprotein reacting with hydrogen peroxide and a

wide range of lipid hydroperoxide (19). And it has also been observed in zebrafish that MeHg triggered over-expression of cytoplasmic and mitochondrial superoxide dismutase genes after 21 days of exposure (9).

Surprisingly, the gene expression of enolase, a glycolytic enzyme, was down-regulated whereas we noticed an induction of pyruvate dehydrogenase and lactate dehydrogenase gene expression. In fact, enolase gene repression was reported to be an ageing indicator in rat skeletal muscle. Troponin T and α -actin genes also proved to be down-regulated during ageing (20). In our study, in addition to the down-regulation of the enolase gene, we also note a down-regulation of several genes encoding for myofibrillar contractile proteins α -actin, troponin T, and troponin C. Thus, the impact of MeHg on skeletal muscles, and more precisely on myofibers contraction, mimics ageing. In contrast to myofibrillar components, MeHg contamination up-regulates many genes encoding for proteins of the microtubule and the microfilament cytoskeleton such as titin and tubulins α and β . These effects combined with changes in the extracellular matrix composition and the induction of the collagen type 1 α 2 gene, might increase expression of cytoskeleton networks in MeHg-contaminated muscles as a compensation for perturbations in myofibrillar structures. This mechanism would avoid extensive damage to myofibers allowing a maintenance of muscular integrity. Compatible with such a view, electronic microscopy studies evidenced alterations in MeHg-contaminated muscle fibers with a diminution of the inter-bundle surfaces in red muscle (18).

Some genes related to the detoxification pathway were induced such as those encoding for UDP-glucuronosyltransferase, N-acetyltransferase, and metallothionein 2. Mercury-triggered increase in UDP-glucuronosyltransferase has already been observed in mouse kidney (21). MeHg, unlike divalent mercury, is not a known inducer of metallothionein (MT) gene expression, and there is no demethylation in zebrafish muscles (9). Several reports, however, have demonstrated protective effects of MT against MeHg toxicity, which was ascribed to the radical scavenging effect of MT (22, 23). Therefore, the induction of mt2 gene could result from radical generation linked to the mitochondrial impairment discussed above.

Our analysis has detected an impact on calcium homeostasis through differential regulation of genes encoding for Ca^{2+} -binding proteins: ictacalcin and two parvalbumin isoforms. The impact of MeHg on the cellular calcium homeostasis has already been observed in cerebellar granule cells where the Ca^{2+} release in the cytosol from the smooth endoplasmic reticulum lead to a mitochondrial Ca^{2+} overload (24). Besides Ca^{2+} -mediated events may have additive effects on ROS generation in mitochondria. In particular, this SAGE analysis has

revealed an induction of the expression of genes encoding for VDAC2 and adenine nucleotide translocator which could reflect an increase of exchange between cytosol and mitochondria.

A differential expression of genes encoding for the molecular chaperones glucose-related protein 78 (*Grp78* or *HSP5a*, the endoplasmic reticulum form of *Hsp70*) and glucose-related protein 94 (*Grp94*, the endoplasmic reticulum form of *Hsp90*) involved in the unfolded protein response was also detected in this SAGE analysis. Also intervening in the unfolded protein response, the VAMP-associated protein gene was up-regulated. A link between ER protein chaperones and metal stress has already been demonstrated by the study of *Grp78* and *Grp94*. *Grp78* gene was up-regulated by lead acetate and mercury chloride at 0.1 and 1 μM , but down-regulated at higher concentrations (10 μM) in rat glioma cells (25), and up-regulated by 10 μM cadmium chloride in renal epithelial cells (26). Moreover mercury chloride promoted the up-regulation of *Grp94* gene in rat kidneys (27). ER chaperones GRP78 and GRP94 protect cancer cells against ER stress-induced apoptosis, and also trigger resistance against anticancer drugs, thereby promoting cancer progression and tumour immunity (28, 29). These genes are even over-expressed in human oesophagus and gastric carcinomas (30, 31). In addition, *Grp78* protects neurons against oxidative stress and stabilizes calcium homeostasis (32). Furthermore, we discussed above about the likelihood that calcium homeostasis deregulation and oxidative stress occur in zebrafish muscles exposed to MeHg. Thus, these data and our results indicate that the expression of *Grp78* and *Grp94* are likely to play a role against heavy metal impairments including MeHg exposure.

Six ribosomal protein (RP) genes were down-regulated in muscle zebrafish in response to dietary MeHg (those encoding for RPS24, RPS26, RPLP2, RPL6, RPL26, and RPL34), and among them 2 belong to the 23 most expressed genes in control muscles (Table 1): *rplp2* was 2.3-times repressed and *rps26l*, 2.6-times. Such repression of paramount ribosomal protein genes suggests a decrease of protein synthesis. Lowering RP genes expression has serious consequences for the organism's life since the single silencing of many RP genes results in abnormalities in brain, eyes and body trunk of zebrafish (33), and among them 2 RP genes for which expression is decreased by MeHg, *rplp2* and *rpl6*. The heterozygous mutation of many RP genes causes cancer in zebrafish and among others *rpl6* (34). The expression of many RP genes is also modified in various cancer tumors, and among the six genes found down-regulated by MeHg in zebrafish, three were also shown to be repressed in colorectal carcinomas (CRC) : *rps24* (35), *rpl2* (36) and *rplp2* (37). Among the 8 genes found up-regulated by MeHg in zebrafish, 7 have been shown to display increased expression levels in various cancer types: *rps2* in colorectal adenomas and adenocarcinomas

(38, 39), *rps3* in CRC and adenocarcinomas (40, 39), *rps10* in CRC (41), *rps15* in colorectal adenocarcinomas (38), *rplp0* in hepatocellular carcinomas (42), *rpl7a* in colorectal adenomas (38), and *rpl37* in gastrointestinal tumors (43). In addition, many RPs possess extraribosomal functions such as DNA repair. For instance, RPS3 whose gene is up-regulated in MeHg-exposed zebrafish muscle, contributes to DNA integrity (44). In summary, this pattern of differential regulation featured by RP genes indicates that the toxic impact of MeHg might not only impinge on protein synthesis but also on muscle cell division regulation.

This SAGE analysis has revealed the induction of the *laptm4 α* gene encoding for a lysosomal membrane transporter. The expression of the mouse *Laptm4 α* protein in a yeast mutant strain hypersensitive to chemicals leads to an increased resistance against several drugs (45). Moreover, the compartmentalization and subsequent accumulation of several drugs in lysosomes leads to a multidrug resistance phenotype (46). Lysosomes could thus have a function in MeHg detoxification through MeHg-compound sequestration.

The gene *ndpkz2* which ranks at the 21st position in the list of the most expressed genes in the control muscle (Table 1) encodes for a nucleotide diphosphate kinase (NDPK). The expression of this major zebrafish NDPK isoform gene is here found decreased 16-times in the MeHg-exposed fish muscle. NDPK activity catalyzes conversion of nucleoside diphosphates to nucleoside triphosphates and therefore maintains nucleotide concentrations necessary for various metabolic purposes such as DNA replication, transcription, protein synthesis, and anabolic pathways (47). Beside this function, it is known that many NDPK enzymes bind DNA and regulate a diverse array of cellular events including growth and development (48, 49). Therefore, this dramatic decrease in expression of this major cellular NDPK gene can be seen as one of the most important impacts of MeHg contamination on muscle cell's life.

For the first time, to our knowledge, our results allow us to propose a schema representing the general cellular response caused by MeHg contamination (figure 1).

This cellular response could start with mitochondrial and ER metabolism disruption resulting both in the generation of oxidative and ER stresses. These oxidative and ER stresses would lead to impairment of cellular macromolecules such as lipids, proteins, and genomic DNA. This could explain the impact on lipid and protein synthesis and the disturbance of the expression of several cellular mitosis genes and with an induction of several DNA repair processes. The induction of some genes encoding for proteins involved in cellular detoxifying processes was also detected allowing cells to neutralize cellular toxic compounds.

Another result of this experiment is the large number of unidentified genes expressed in the tissue. It would be of great interest to further characterize those which are differentially expressed in MeHg-contaminated muscles.

Acknowledgments

This work was carried out with the financial support of CNRS. The authors are grateful to Bruno Etcheverria for technical support during the exposure conditions.

Supporting information

In this section there are tables which provide details about differentially expressed known and unknown tags.

References

- (1) Morel, F. M. M.; Kraepiel, A. M. L.; Amyot, M., The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. *Annual Review of Ecology and Systematics* **1998**, *29*, 543-566.
- (2) Wiener, J.G.; Krabbenhoft, D.P., Heinz, G.H., Scheuhammer, A.M. Ecotoxicology of mercury. In *Handbook of Ecotoxicology*; Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton, G.A., Cairns, J., Eds.; Lewis Publishers: Boca Raton, FL, 2003; pp 409-463.
- (3) Clarkson, T. W.; Magos, L.; Myers, G. J., The toxicology of mercury--current exposures and clinical manifestations. *N Engl J Med* **2003**, *349*, (18), 1731-7.
- (4) Harada, M. Neurotoxicity of methylmercury: Minamata and the Amazon. In *Mineral and metal neurotoxicology*; Yasui, M., Strong, M.J., Ota, K., Verity, M.A., Eds.; London: CRC Press, 1997, pp 177-188.
- (5) Grandjean, P.; Weihe, P.; White, R. F.; Debes, F.; Araki, S.; Yokoyama, K.; Murata, K.; Sorensen, N.; Dahl, R.; Jorgensen, P. J., Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol* **1997**, *19*, (6), 417-28.
- (6) Durrieu, G.; Maury-Brachet, R.; Boudou, A., Goldmining and mercury contamination of the piscivorous fish *Hoplias aimara* in French Guiana (Amazon basin). *Ecotoxicol Environ Saf* **2005**, *60*, (3), 315-23.
- (7) Cordier, S.; Grasmick, C.; Paquier-Passelaigue, M.; Mandereau, L.; Weber, J. P.; Jouan, M., Mercury exposure in French Guiana: levels and determinants. *Arch Environ Health* **1998**, *53*, (4), 299-303.
- (8) Lasorsa, B.K.; Allen-Gil, S.M., The methylmercury to total mercury ratio in marine, freshwater, and terrestrial organisms: an overview. *Water Air Soil Pollut* **1995**, *80*, 905-13.
- (9) Gonzalez, P.; Dominique, Y.; Massabuau, J. C.; Boudou, A.; Bourdineaud, J. P., Comparative effects of dietary methylmercury on gene expression in liver, skeletal muscle, and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Sci Technol* **2005**, *39*, (11), 3972-80.
- (10) Velculescu, V. E.; Zhang, L.; Vogelstein, B.; Kinzler, K. W., Serial analysis of gene expression. *Science* **1995**, *270*, (5235), 484-7.
- (11) Welle, S.; Bhatt, K.; Thornton, C. A., Inventory of high-abundance mRNAs in skeletal muscle of normal men. *Genome Res* **1999**, *9*, (5), 506-13.
- (12) Ecob-Prince, M. S.; Leberer, E., Parvalbumin in mouse muscle in vivo and in vitro. *Differentiation* **1989**, *40*, (1), 10-6.

- (13) Celio, M. R.; Heizmann, C. W., Calcium-binding protein parvalbumin is associated with fast contracting muscle fibres. *Nature* **1982**, *297*, (5866), 504-6.
- (14) Edwards, J. R.; Marty, M. S.; Atchison, W. D., Comparative sensitivity of rat cerebellar neurons to dysregulation of divalent cation homeostasis and cytotoxicity caused by methylmercury. *Toxicol Appl Pharmacol* **2005**, *208*, (3), 222-32.
- (15) Allen, J. W.; Shanker, G.; Tan, K. H.; Aschner, M., The consequences of methylmercury exposure on interactive functions between astrocytes and neurons. *Neurotoxicology* **2002**, *23*, (6), 755-9.
- (16) Usuki, F.; Yasutake, A.; Matsumoto, M.; Umehara, F.; Higuchi, I., The effect of methylmercury on skeletal muscle in the rat: a histopathological study. *Toxicol Lett* **1998**, *94*, (3), 227-32.
- (17) Cambier, S.; Benard, G.; Mesmer-Dudons, N.; Gonzalez, P.; Rossignol, R.; Brethes, D.; Bourdineaud, J. P., At environmental doses, dietary methylmercury inhibits mitochondrial energy metabolism in skeletal muscles of the zebra fish (*Danio rerio*). *Int J Biochem Cell Biol* **2008**.
- (18) de Oliveira Ribeiro, C. A.; Nathalie, M.-D.; Gonzalez, P.; Yannick, D.; Jean-Paul, B.; Boudou, A.; Massabuau, J. C., Effects of dietary methylmercury on zebrafish skeletal muscle fibres. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **2008**, *25*, (3), 304-309.
- (19) Brigelius-Flohe, R., Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* **1999**, *27*, (9-10), 951-65.
- (20) Piec, I.; Listrat, A.; Alliot, J.; Chambon, C.; Taylor, R. G.; Bechet, D., Differential proteome analysis of aging in rat skeletal muscle. *Faseb J* **2005**, *19*, (9), 1143-5.
- (21) Tan, T. M.; Sin, Y. M.; Wong, K. P., Mercury-induced UDP-glucuronyltransferase (UDPGT) activity in mouse kidney. *Toxicology* **1990**, *64*, (1), 81-7.
- (22) Kiningham, K.; Kasarskis, E., Antioxidant function of metallothioneins. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine* **1998**, *11*, (2-3), 219-226.
- (23) Yao, C. P.; Allen, J. W.; Mutkus, L. A.; Xu, S. B.; Tan, K. H.; Aschner, M., Foreign metallothionein-I expression by transient transfection in MT-I and MT-II null astrocytes confers increased protection against acute methylmercury cytotoxicity. *Brain Res* **2000**, *855*, (1), 32-8.
- (24) Limke, T. L.; Heidemann, S. R.; Atchison, W. D., Disruption of intraneuronal divalent cation regulation by methylmercury: are specific targets involved in altered neuronal development and cytotoxicity in methylmercury poisoning? *Neurotoxicology* **2004**, *25*, (5), 741-60.

- (25) Qian, Y.; Falahatpisheh, M. H.; Zheng, Y.; Ramos, K. S.; Tiffany-Castiglioni, E., Induction of 78 kD glucose-regulated protein (GRP78) expression and redox-regulated transcription factor activity by lead and mercury in C6 rat glioma cells. *Neurotox Res* **2001**, *3*, (6), 581-9.
- (26) Liu, F.; Inageda, K.; Nishitai, G.; Matsuoka, M., Cadmium induces the expression of Grp78, an endoplasmic reticulum molecular chaperone, in LLC-PK1 renal epithelial cells. *Environ Health Perspect* **2006**, *114*, (6), 859-64.
- (27) Goering, P. L.; Fisher, B. R.; Noren, B. T.; Papaconstantinou, A.; Rojko, J. L.; Marler, R. J., Mercury induces regional and cell-specific stress protein expression in rat kidney. *Toxicol Sci* **2000**, *53*, (2), 447-57.
- (28) Ni, M.; Lee, A. S., ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Lett* **2007**, *581*, (19), 3641-51.
- (29) Fu, Y.; Lee, A. S., Glucose regulated proteins in cancer progression, drug resistance and immunotherapy. *Cancer Biol Ther* **2006**, *5*, (7), 741-4.
- (30) Langer, R.; Feith, M.; Siewert, J. R.; Wester, H. J.; Hoefler, H., Expression and clinical significance of glucose regulated proteins GRP78 (BiP) and GRP94 (GP96) in human adenocarcinomas of the esophagus. *BMC Cancer* **2008**, *8*, 70.
- (31) Zheng, H. C.; Takahashi, H.; Li, X. H.; Hara, T.; Masuda, S.; Guan, Y. F.; Takano, Y., Overexpression of GRP78 and GRP94 are markers for aggressive behavior and poor prognosis in gastric carcinomas. *Hum Pathol* **2008**, *39*, (7), 1042-9.
- (32) Yu, Z.; Luo, H.; Fu, W.; Mattson, M. P., The endoplasmic reticulum stress-responsive protein GRP78 protects neurons against excitotoxicity and apoptosis: suppression of oxidative stress and stabilization of calcium homeostasis. *Exp Neurol* **1999**, *155*, (2), 302-14.
- (33) Uechi, T.; Nakajima, Y.; Nakao, A.; Torihara, H.; Chakraborty, A.; Inoue, K.; Kenmochi, N., Ribosomal protein gene knockdown causes developmental defects in zebrafish. *PLoS ONE* **2006**, *1*, e37.
- (34) Lai, K.; Amsterdam, A.; Farrington, S.; Bronson, R. T.; Hopkins, N.; Lees, J. A., Many ribosomal protein mutations are associated with growth impairment and tumor predisposition in zebrafish. *Dev Dyn* **2009**, *238*, (1), 76-85.
- (35) Kasai, H.; Nadano, D.; Hidaka, E.; Higuchi, K.; Kawakubo, M.; Sato, T. A.; Nakayama, J., Differential expression of ribosomal proteins in human normal and neoplastic colorectum. *J Histochem Cytochem* **2003**, *51*, (5), 567-74.

- (36) Bertucci, F.; Salas, S.; Eysteris, S.; Nasser, V.; Finetti, P.; Ginestier, C.; Charafe-Jauffret, E.; Loriod, B.; Bachelart, L.; Montfort, J.; Victorero, G.; Viret, F.; Ollendorff, V.; Fert, V.; Giovaninni, M.; Delpero, J. R.; Nguyen, C.; Viens, P.; Monges, G.; Birnbaum, D.; Houlgatte, R., Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histoclinical parameters. *Oncogene* **2004**, *23*, (7), 1377-91.
- (37) Cao, J.; Cai, X.; Zheng, L.; Geng, L.; Shi, Z.; Pao, C. C.; Zheng, S., Characterization of colorectal-cancer-related cDNA clones obtained by subtractive hybridization screening. *J Cancer Res Clin Oncol* **1997**, *123*, (8), 447-51.
- (38) Luo, M. J.; Lai, M. D., Identification of differentially expressed genes in normal mucosa, adenoma and adenocarcinoma of colon by SSH. *World J Gastroenterol* **2001**, *7*, (5), 726-31.
- (39) Lin, Y. M.; Furukawa, Y.; Tsunoda, T.; Yue, C. T.; Yang, K. C.; Nakamura, Y., Molecular diagnosis of colorectal tumors by expression profiles of 50 genes expressed differentially in adenomas and carcinomas. *Oncogene* **2002**, *21*, (26), 4120-8.
- (40) Pogue-Geile, K.; Geiser, J. R.; Shu, M.; Miller, C.; Wool, I. G.; Meisler, A. I.; Pipas, J. M., Ribosomal protein genes are overexpressed in colorectal cancer: isolation of a cDNA clone encoding the human S3 ribosomal protein. *Mol Cell Biol* **1991**, *11*, (8), 3842-9.
- (41) Frigerio, J. M.; Dagorn, J. C.; Iovanna, J. L., Cloning, sequencing and expression of the L5, L21, L27a, L28, S5, S9, S10 and S29 human ribosomal protein mRNAs. *Biochim Biophys Acta* **1995**, *1262*, (1), 64-8.
- (42) Barnard, G. F.; Staniunas, R. J.; Mori, M.; Puder, M.; Jessup, M. J.; Steele, G. D., Jr.; Chen, L. B., Gastric and hepatocellular carcinomas do not overexpress the same ribosomal protein messenger RNAs as colonic carcinoma. *Cancer Res* **1993**, *53*, (17), 4048-52.
- (43) Zhang, L.; Zhou, W.; Velculescu, V. E.; Kern, S. E.; Hruban, R. H.; Hamilton, S. R.; Vogelstein, B.; Kinzler, K. W., Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* **1997**, *276*, (5316), 1268-72.
- (44) Kim, S. H.; Lee, J. Y.; Kim, J., Characterization of a wide range base-damage-endonuclease activity of mammalian rpS3. *Biochem Biophys Res Commun* **2005**, *328*, (4), 962-7.

- (45) Hogue, D. L.; Nash, C.; Ling, V.; Hobman, T. C., Lysosome-associated protein transmembrane 4 alpha (LAPTM4 alpha) requires two tandemly arranged tyrosine-based signals for sorting to lysosomes. *Biochem J* **2002**, *365*, (Pt 3), 721-30.
- (46) Simon, S.; Roy, D.; Schindler, M., Intracellular pH and the control of multidrug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**, *91*, (3), 1128-32.
- (47) Postel, E. H., NM23-NDP kinase. *Int J Biochem Cell Biol* **1998**, *30*, (12), 1291-5.
- (48) Kimura, N.; Shimada, N.; Fukuda, M.; Ishijima, Y.; Miyazaki, H.; Ishii, A.; Takagi, Y.; Ishikawa, N., Regulation of cellular functions by nucleoside diphosphate kinases in mammals. *J Bioenerg Biomembr* **2000**, *32*, (3), 309-15.
- (49) Postel, E. H.; Berberich, S. J.; Rooney, J. W.; Kaetzel, D. M., Human NM23/nucleoside diphosphate kinase regulates gene expression through DNA binding to nuclease-hypersensitive transcriptional elements. *J Bioenerg Biomembr* **2000**, *32*, (3), 277-84.

Legend to figure

Figure 1. General genetic response represented at the cellular level in MeHg-contaminated skeletal muscle.

M : Mitochondria, N : Nucleus, ER : Endoplasmic Reticulum, GA : Golgi Apparatus.

Genes up-regulated are written in red and genes down-regulated are written in blue.

Tables and Figure

Table 1. The most abundant genes in control fish skeletal muscle and their corresponding level of expression in MeHg-contaminated fish.

Tags ^a (CATG+...)	Control		MeHg		Description ^b (GenBank accession no.)
	No. of tags	%	No. of tags	%	
TTGTAATAAAAACAGAT	2804	14.6	2408	10.8	Actin alpha 1 (NM_131591)
TGCAAACCTTACAATCTC	1841	9.6	722	3.2*	Parvalbumin 2 (NM_131516)
TGCAGATGTAACATTCT	1465	7.6	639	2.9*	Parvalbumin 1 (NM_205572)
ACGTTACTGTGGCCAGG	857	4.5	779	3.5	Myosin light chain 3 (NM_131619)
GTCTTTCGCATTGTAGA	702	3.7	600	2.7	Parvalbumin 3 (NM_200212)
GGATTGTTTTCAATAAA	573	3.0	460	2.1	EST myosin light chain 2 (XM_678881)
GTTCTTTGTGAGGACGA	360	1.9	84	0.4*	Parvalbumin 2 (NM_131516)
TAACAATCAAAAAAAAAA	355	1.9	331	1.5	Creatine kinase CKM3 (BC053305)
CAGCACACTGTCAAAGC	330	1.7	399	1.8	Parvalbumin 4 (NM_212783)
GTCTACACGTTATTATT	322	1.7	341	1.5	<i>Cytochrome c oxidase 3 (9735-10520)</i>
AGCTGGAGGAGGCTGAG	300	1.6	445	2.0	Myosin heavy chain 2 & 4 (NM_152982, NM_001020485)
TTCTTATTTATCTTATG	298	1.6	272	1.2	<i>Cytochrome c oxidase 1 (6425-7975)</i>
CACATCCTGAAAAAGAA	263	1.4	400	1.8	zgc:92053 (NM_205575)
TAAAGTCGCCAACAAAT	208	1.1	259	1.2	Ribosomal protein S15a (NM_212762)
CAGAAAAATAAACGGA	196	1.0	76	0.3*	Ribosomal protein S26l (NM_200742)
CCCCCAACTAGAGCTGC	196	1.0	153	0.7	<i>NADH dehydrogenase 6 (14714-15232)</i>
TGAACTGTTTTGGACAT	184	1.0	220	1.0	Hypothetical protein (XM_701315)
AGACTGTAATCTGTACA	181	0.9	12	0.1*	Actin alpha cardiac muscle 1 (NM_214784)
GGCTTTGGCCTCTTTGA	176	0.9	77	0.3*	Ribosomal protein large P2 (NM_212743)
GTCTGGGAGGGTCTGAA	163	0.9	10	0.0*	Nucleoside diphosphate kinase-Z2 (NM_130927)
CACGATTGACTTGTAAG	153	0.8	126	0.6	zgc:103637 (NM_001005951)
CTTTTGTGTACAGACAA	151	0.8	152	0.7	Ribosomal protein L35a (NM_001002487)

^a CATG indicates the *NlaIII* restriction sequence present before each sequence tag

^b Italic denote tags matching the mitochondrial genome (GenBank accession n AC024175); numbers between parenthesis indicate the location within the mitochondrial genome.

*Differentially expressed between control and contaminated groups, $p < 0.05$ and ratio > 2 .

Table S1. Genes differentially expressed between control and MeHg-contaminated fish, and clustered in functional groups.

^a CATG indicates the *NlaIII* restriction sequence present before each sequence tag

^b The ratio of one tag was calculated between the frequency of the both MeHg and control conditions. The arrow to the right of each ratio indicates an up-regulation or a down-regulation of the gene when it is oriented upside or downside, respectively.

^c All tags are differentially expressed between control and contaminated fish; $p > 0.05$ and ratio > 2

Tags ^a (CATG + ...)	No. of tags		Ratio ^b	Description ^c (GenBank accession no.)
	Control	MeHg		
Energy metabolism				
<u>Glycolysis pathways</u>				
TTGATGAGGGTGTGTGT	0	9	> 7.8 ↑	Lactate dehydrogenase B4 (BC068981)
TGCACCTACTGATGCTT	0	9	> 7.8 ↑	Aldolase b, fructose bisphosphate (NM_194367)
AGCTGGTTGTATTTGGC	6	1	7 ↓	Enolase 3β (NM_214723)
<u>Oxidative pathways and mitochondria metabolism</u>				
TGTAATATGCTGTAAAT	1	7	6 ↑	Pyruvate dehydrogenase lipoamide b (NM_213154)
AATTGGAGGGGATACCAG	42	140	2.9 ↑	<i>CYTB (15308 - 16448)</i> (AC024175)
CTTACAACACCTCAGA	3	15	4.3 ↑	Vdac2 (NM_199585)
TAGACCCTCAAGATTTA	12	0	> 13.9 ↓	Solute carrier family 25 α member 4 (NM_214702)
ACCTCTTATTACAAAAA	0	4	> 3.5 ↑	Cytochrome c 1 (BC080245)
GGTGGCGCCTTTGTGCT	0	4	> 3.5 ↑	Solute carrier family 25 α member 5 (NM_173247)
GGAGTGGTAATAGGAGA	4	14	3 ↑	<i>ND3 (10590 - 10940)</i> (AC024175)
ATTTAGCCAACACCACT	45	122	2.3 ↑	<i>16S (2043 - 3725)</i> (AC024175)
TGCAAGCATATACATAT	1	9	7.8 ↑	<i>D-loop (1 - 950)</i> (AC024175)
TCCATTCCTGTGTGATC	0	4	> 3.5 ↑	Aminolevulinate delta, synthetase 1 (NM_201287)
Lipid metabolism				
AAGAAAAAGCAAGACTC	2	71	30.6 ↑	Similar to 14 kDa apolipoprotein (XM_693887)
TTGTGCACTGATGTGT	0	7	> 6 ↑	Apolipoprotein Eb (NM_131098)
ATCAGGAAGAGCAAGAA	3	55	15.8 ↑	Fatty acid binding protein 10 (NM_152960)
TGTTACTCATTCTTGCT	0	5	> 4.3 ↑	High density lipoprotein-binding protein (NM_201474)
TGGAATTTTGACATTTT	114	525	4 ↑	Vitellogenin 1 (NM_170767)
Marker of cellular stress				
AAGCCCATTA AAAAAGTG	0	7	> 6 ↑	Cold-inducible RNA binding protein (NM_200017)
<u>Detoxification</u>				
TCCTTTGTCTAAAATAA	1	21	18.1 ↑	Metallothionein 2 (BC152694)
CTGATGTAGTGACATT	1	7	6 ↑	Glutathione peroxidase 4a (NM_001007282)
AAATAAAACGATTAAGC	0	7	> 6 ↑	N-acetyltransferase 5 (NM_001014329)
GCCTGGATAAATACTT	0	4	> 3.5 ↑	UDP glucuronosyltransferase 1 family a, b (NM_213422)

Cell cycle regulation

TATACTGCCAGTGTACA	0	6	> 5.2↑	Geminin (NM_200086)
TGCTCCATACTGCGTTT	1	7	6↑	Cyclin a1 (BC100124)
GGTTGAGCAAAAGTAAT	0	5	> 4.3↑	Cyclin b1 (NM_131513)
TACATTAAGTACTGAGTGGC	0	5	> 4.3↑	Chaperonin containing TCP1, subunit 8 (theta) (NM_201062)

Protein synthesis

CCACAGGGCACCCCAGT	1	14	12.1↑	Ribosomal protein S3 (NM_201153)
CAAGGTGACCGGTGCGCT	1	13	11.2↑	Ribosomal protein S2 (NM_213279)
GGCTTCGGCCTCTTTGA	0	46	> 39.6↑	Ribosomal protein Lp0 (BC062854)
AAGGTTGTTTTCCGCAG	0	6	> 5.2↑	Ribosomal protein L37 (NM_001002069)
ATGTGGATCCCATTGAG	0	5	> 4.3↑	Ribosomal protein L7a (NM_200047)
GTCGGCGTGTACAACGG	0	5	> 4.3↑	Ribosomal protein S15 (NM_001001819)
TGGAAAATCACTGTGGC	0	5	> 4.3↑	Ribosomal protein S10 (NM_201146)
AGGAAAGCTGCTGCCAA	11	48	3.8 ↑	Ribosomal protein L36 (NM_212952)
TGGGCATCCACCCCAGC	7	1	8.1 ↓	Ribosomal protein L26 (NM_213113)
TTCTTGATCATTGTCAT	100	22	5.3 ↓	Ribosomal protein S24 (NM_001012316)
TTCTCCCTGTCTAATGG	72	36	2.3 ↓	Ribosomal protein L6 (NM_001003844)
GGCTTTGGCCTCTTTGA	176	77	2.7 ↓	Ribosomal protein LP2 (NM_212743)
TGTGCCAAATGTGTACG	25	10	2.9 ↓	Ribosomal protein L34 (NM_201122)
CAGAAAAATAAAACGGA	196	76	3 ↓	Ribosomal protein S26 (NM_200742)
AGGCAGACCGTTGCTGT	0	4	> 3.5 ↑	Elongation factor-1, α (NM_131263)

Cell metabolism

GTGTAAGTGATCAATGC	1	11	9.5 ↑	Tubulin alpha 81 (NM_212772)
ACCGTTTTTAATTTAAT	0	33	> 28.4 ↑	Claudin d (NM_180964)
AAAAGGAACAACTGAAG	0	6	> 5.2 ↑	Tubulin beta 2c (NM_198809)

Structural compounds

Muscle contraction

GATGAGGAACAATGCAA	0	5	> 4.3↑	Titin (AY081167)
AGACTGTAATCTGTACA	181	12	17.5 ↓	Actin, alpha, cardiac muscle 1 (NM_214784)
CCTGCTACCTGCATCCC	48	13	4.3 ↓	Troponin T3b (NM_181653)
GTAGACCCCTCATTGT	85	47	2.1 ↓	Troponin C (NM_131563)

Ca²⁺ homeostasis

GCTACGTCAGATACCCA	0	5	> 4.3 ↑	Ictacalcin (NM_212761)
TGCAGATGTAACATTCT	1465	639	2.7 ↓	Parvalbumin 1 (NM_205572)
TGCAAACCTTACAATCTC	1841	722	3 ↓	Parvalbumin 2 (NM_131516)
AAGAGGATGAGATGAAA	0	4	> 3.5 ↑	Similar to parvalbumin (XM_001335724)

				<u>Reticulum endoplasmic and Golgi apparatus</u>
TGTGTAATCTTATTACT	0	6	>5.2 ↑	Lysosomal-associated protein transmembrane 4 α (NM_214685)
TGCTGAAAGTTATTTAT	3	15	4.3 ↑	heat shock 70kDa protein 5, Grp78 (NM_213058)
ATTGTAAATTTGTTAAT	0	9	>7.8 ↑	heat shock protein 90kDa b, Grp94 (NM_198210)
GAAGTTGCTTAAGCTGT	0	10	>8.6 ↑	Signal recognition particule 68 (BC076081)
CTGAAATAAAGACCTTA	0	4	>3.5 ↑	VAMP-associated protein A(NM_199918)
				<u>General metabolism</u>
GTCTGGGAGGGTCTGAA	163	10	18.9 ↓	Nucleoside diphosphate kinase-Z2 (NM_130927)
CCATTCACCCTTGAGGA	0	14	>12.1 ↑	Serpine1 mRNA binding protein (NM_214714)
ATGGTTCGTCCCTTAT	0	14	>12.1 ↑	Methionine adenosyltransferase II, alpha (NM_212637)
				<u>Iron metabolism</u>
ATGTCTGAATGAAATTT	0	4	>3.5 ↑	Hemoglobin alpha adult-1 (NM_131257)
CACTTTTGGCAACTGTA	8	36	3.9 ↑	Transferrin a (BC054944)
TGCAGCTTGTGTGATCT	0	12	>12 ↑	Ferritin, heavy polypeptide 1 (NM_131585)
				<u>Transduction cascade</u>
TAATGAACGTCCCCAGT	0	4	>3.5 ↑	Protein phosphatase 1A, Mg dependent, α isoform (NM_001007313)
AGTTTTGTATAAGTGGG	0	4	>3.5 ↑	Protein phosphatase 1, catalytic subunit, β isoform (NM_001004527)
Extracellular compounds				
TACTGACTTGCAACAATC	1	13	11.2 ↑	Basigin (BC056721)
TCATCATTTTGTA AAAA	7	25	3.1 ↑	Collagen, type I, alpha 2 (NM_182968)
TTGAACTGGTATTTTTT	0	6	>5.2 ↑	Integral membrane protein 2b (NM_199646)
TTGTTTTGTAGAAGCTA	0	5	>4.3 ↑	Stroma cell derived factor 2 (NM_200039)
TCTCTGTAGCTGTATGT	0	7	>6 ↑	Fusion I (NM_212630)
ACAGGAAGGTGACAGGC	5	0	>5.8 ↓	Reticulon 4a (NM_001004555)
TTCTTTTTAATAAACTA	0	4	>3.5 ↑	Zona pellucida glycoprotein 2.3 (NM_131828)
AAATAAACGCCCTTCAG	1	51	43.9 ↑	Similar to latrophilin 2 (BC155628)
CATTTTCTAATAAACTG	0	21	>18.1 ↑	Zona pellucida glycoprotein 2 (BC129271)

Table S2. Tags unknown and for which cognate genes cannot be identified in the zebrafish database, but differentially expressed in control and MeHg-contaminated fish.

^a CATG indicates the *MlaIII* restriction sequence present before each sequence tag

^b The ratio of one tag was calculated between the frequency of the both MeHg and control conditions. The arrow to the right of each ratio indicates an up-regulation or a down-regulation of the gene when it is oriented upside or downside, respectively.

^c All tags are differentially expressed between control and contaminated fish; $p > 0.05$ and ratio > 10

Tags ^a (CATG+...)	No. of tags		Ratio ^b	Description ^c
	Control	MeHg		
ATGCTCAGCTGGACACC	0	61	> 61 ↑	Unknown
TGAGCCAAATAAAGCCT	0	12	> 12 ↑	Unknown
TTTCTAAGCTGTTTTCC	2	36	18 ↑	Unknown
CTAGCCTAATAAAGCCT	0	27	> 27 ↑	Unknown
GGGTGCTTTTCTACAAT	0	19	> 19 ↑	Unknown
TICTTTCTGTACTTGAT	0	16	> 16 ↑	Unknown
TACACAATAAAATAAGC	11	1	11 ↓	Unknown
TGTATAAACAGATCTG	11	0	> 11 ↓	Unknown
TTGTATAAACAGATCT	24	0	> 24 ↓	Unknown
TCTTATTATCTTATGAG	13	0	> 13 ↓	Unknown
GCAGTCTCAATATTATG	19	0	>22.1 ↓	Unknown

II/ Exploitation expérimentale à partir des données SAGE : le cas de Laptm4 α

Introduction

Lors de l'analyse des banques SAGE le gène codant pour la protéine Laptm4 α (Lysosomal-associated protein transmembrane 4 alpha) a attiré notre attention car il a été induit d'un facteur 5 par la contamination métallique. Cette petite protéine de 238 acides aminés présente 4 domaines transmembranaires et est très fortement conservée entre les espèces (> 75 % d'homologie) suggérant alors un rôle important de cette protéine.

Différentes analyses de cette protéine ont permis de la localiser au niveau des lysosomes et des endosomes tardifs suggérant un rôle de ce transporteur au niveau de la compartimentalisation cellulaire de certains composés (Hogue *et al.*, 2002).

La protéine Laptm4 α de souris a été exprimée chez la levure et les oocytes de xénope, et par un artifice génétique, a été adressée dans la membrane plasmique ; dans ce compartiment, cette protéine permet le transport de nucléosides puriques et pyrimidiques (Hogue *et al.*, 1996).

Cette protéine a été testée chez la levure lors d'exposition à divers xénobiotiques (érythromycine, CCCP, valinomycine, bromure d'éthydiuim, cisplatine, ...) et cela a révélé un phénotype de résistance pour plusieurs d'entre eux (érythromycine, CCCP, valinomycine, 8-Aza-adénine, ...) lors de son adressage dans les lysosomes. Cette résistance a été liée au possible transport de ces drogues dans les lysosomes de la levure (Hogue *et al.*, 1999)

La compartimentalisation de xénobiotiques organiques a également été démontrée pour d'autres types de protéine tels les P-glycoprotéines (Gottesman and Pastan, 1993), et les protéines associées à la résistance à de multiples xénobiotiques (MRP) (Kavallaris, 1997). Ces deux types de protéines sont des transporteurs membranaires de type ABC (ATP binding cassette) permettant l'efflux de xénobiotiques organiques en utilisant l'ATP comme source d'énergie. Les protéines MRP permettent l'efflux de composés toxiques complexés à du glutathion, et parmi ces composés, figurent les métaux lourds avec par exemple le zinc et le cadmium (Ishikawa *et al.*, 1996). Le même phénomène fut observé dans le cas des P-glycoprotéines lors d'études sur les transporteurs hMDR1, LMRA et OMRA. Ces trois protéines conféraient une résistance envers le zinc, le chlorure de mercure et le cadmium en limitant leur bioaccumulation dans les bactéries *E. coli* par pompage des métaux divalents complexés au glutathion (Achard-Joris *et al.*, 2005 ; Achard-Joris et Bourdineaud, 2006). A la lumière de ces résultats concernant les P-glycoprotéines et les MRP, il est envisageable que la protéine Laptm4 α , qui ne fait pas partie de la famille des ABC transporteurs, pourrait avoir un

```

1   ATG TTT CTT CAA AGC ACC GAG AAC GAC ATG CGT TTT AAA CCG TCT CGA
1   Met Phe Leu Gln Ser Thr Glu Asn Asp Met Arg Phe Lys Pro Ser Arg
49  GAC CGA CTA TAC AGC GCG CGC TGC TGC GGC TGC TGT CAT GTG CGG ACT
17  Asp Arg Leu Tyr Ser Ala Arg Cys Cys Gly Cys Cys His Val Arg Thr
97  GGA ACC ATC ATT TTG GGT ACC TGG TAC ATG GTG GTG AAC CTG TTG ATG
33  Gly Thr Ile Ile Leu Gly Thr Trp Tyr Met Val Val Asn Leu Leu Met
145 GGC ATT CTG TTG ACT GTG GCA GTA ACT CAC CCT GAG AAT GTC CCT ACT
49  Gly Ile Leu Leu Thr Val Ala Val Thr His Pro Glu Asn Val Pro Thr
193 GTT GAC TTG CAG TAT GAG GTT ATT GAG CAT TAC TTT GCC TCA GAC AGG
65  Val Asp Leu Gln Tyr Glu Val Ile Glu His Tyr Phe Ala Ser Asp Arg
241 ATG TCA GAG AAT GCT TGT GTG GGC TTT GCC ATC TCT CTC CTG ATG CTT
81  Met Ser Glu Asn Ala Cys Val Gly Phe Ala Ile Ser Leu Leu Met Leu
289 ACC ATC AGT GCT ATG ATG GTG TAT GGA GCT ATT ACT AAT CGT GAC GGC
97  Thr Ile Ser Ala Met Met Val Tyr Gly Ala Ile Thr Asn Arg Asp Gly
337 TGG CTC ATC CCG TTC TTT TGC TAC CAG CTG TTT GAC TTT GCA CTA AGC
113 Trp Leu Ile Pro Phe Phe Cys Tyr Gln Leu Phe Asp Phe Ala Leu Ser
385 TGC CTG GTG GCC ATC AGC TCC CTC ACG TAC CTG CCC AGA ATC AAG GAC
129 Cys Leu Tyr Ala Ile Ser Ser Leu Thr Tyr Leu Pro Arg Ile Lys Asp
433 TAC CTG GAC CAG CTG CCG GAT TTC CCA TAC AAG GAC AAC CTG CTC TCT
145 Tyr Leu Asp Gln Leu Pro Asp Phe Pro Tyr Lys Asp Asn Leu Leu Ser
481 CTG GAC TCC AGC TGT CTC CTG CTG TTT GTG CTC ATT TTC TTT GCC ATT
161 Leu Asp Ser Ser Cys Leu Leu Leu Phe Val Leu Ile Phe Phe Ala Ile
529 CTT ATC GTC CTC AAG GCC TAT TTG ATC AAC TGT GTG TGG AAC TGC TAT
177 Leu Ile Val Leu Lys Ala Tyr Leu Ile Asn Cys Val Trp Asn Cys Tyr
577 AAG TAC ATA AAC AAC AGG AAC ACT CCA GAG ATT GCT GTC TAT CCT GCT
193 Lys Tyr Ile Asn Asn Arg Asn Thr Pro Glu Ile Ala Val Tyr Pro Ala
625 TTT GAG ACT CCA CCT CAG TAT ATC CTT CCC ACC TAT GAA ATG GCC ATG
209 Phe Glu Thr Pro Pro Gln Tyr Ile Leu Pro Thr Tyr Glu Met Ala Met
673 ACA ATG CCA GCG AAG GAG CCA CCG CCT CCT TAC ATG CCA GCT TAA
225 Thr Met Pro Ala Lys Glu Pro Pro Pro Pro Tyr Met Pro Ala

```

Figure 18 : Séquence nucléotidique du gène *laptm4α* de poisson zèbre cloné avec la traduction en acides aminés.

Type de plasmide	Cadmium IC ₅₀ (mM)	Mercure IC ₅₀ (μM)	BET IC ₅₀ (μM)
pGEMt	0,60 ± 0,01	17,9 ± 0,3	46,7 ± 0,9
pGEMt-Laptm4a	0,43 ± 0,02*	14,6 ± 0,1*	46,8 ± 2,1

Tableau 4 : Détermination en milieu liquide des IC₅₀ pour le cadmium, le mercure et le BET pour le mutant *tolC* de la bactérie *E. coli* transformé avec un plasmide codant pour Laptm4α.

Les astérisques indiquent les différences significatives entre les IC₅₀ du contrôle et de la souche exprimant le gène *laptm4α*. Les différences significatives entre les valeurs d'IC₅₀ ont été déterminées avec le test U de Mann-Whitney. Les résultats sont considérés comme statistiquement différents pour une valeur de $p < 0,05$.

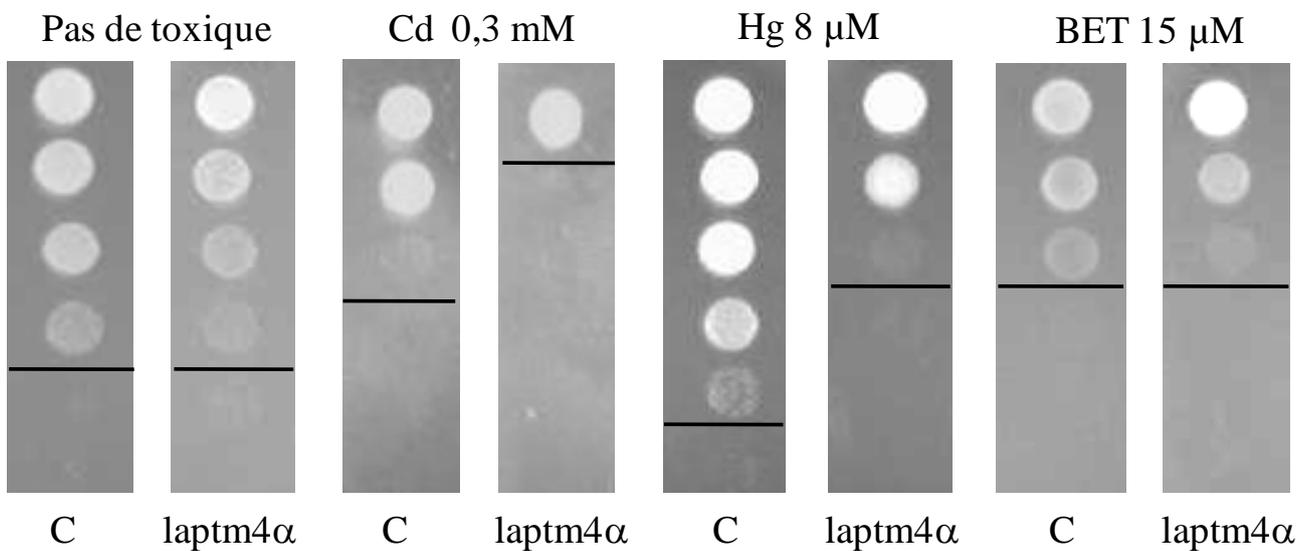


Figure 19 : L'expression hétérologue de *laptm4α* chez *E. coli* lui confère une hypersensibilité au chlorure de cadmium et de mercure. Les milieux gélifiés contiennent les concentrations indiquées en Cd, Hg et en BET. Les barres indiquent les plus fortes dilutions permettant la croissance des bactéries. C : bactérie contrôle ; *laptm4α* : bactérie transformée avec le gène *laptm4α* ; BET : Bromure d'éthidium.

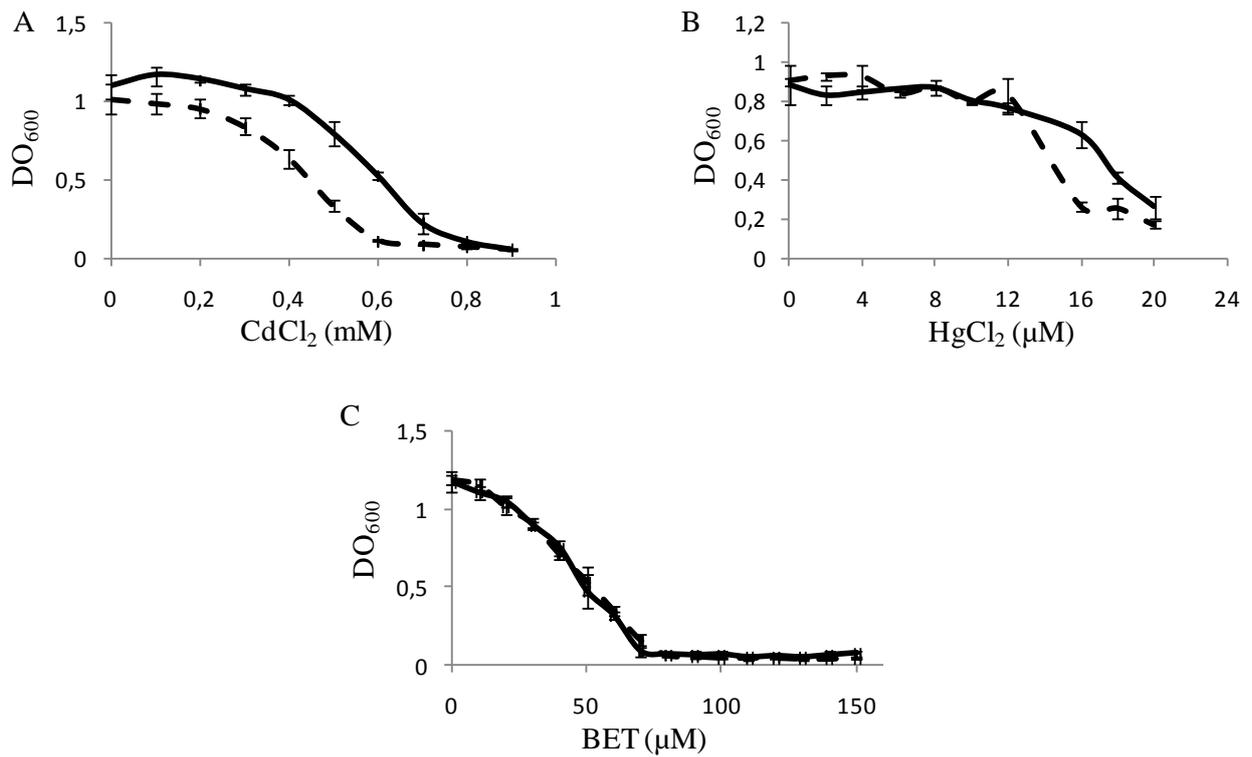


Figure 20 : Etude de la sensibilité des mutants *tolC* transformés avec le gène *laptm4α*. Les cultures de bactéries d'*E. coli tolC* transformées avec le plasmide nu (trait plein) et le plasmide abritant le gène *laptm4α* (trait pointillé) ont été incubées sur la nuit, puis diluées pour avoir une DO₆₀₀ de 0,05 dans des milieux de culture liquides contenant différentes concentrations en cadmium (A), mercure (B) et BET (C). La croissance bactérienne a ensuite été suivie avec la mesure de l'absorbance à 600 nm après 17 h d'incubation à 28°C. Les mesures ont été réalisées en triplicat et chaque valeur indiquée correspond à la moyenne ± erreur standard.

rôle dans le transport de métaux au niveau des lysosomes permettant ainsi leur détoxification. Dans cette étude, l'analyse du rôle de cette protéine en présence de métaux lourds (CdCl_2 et HgCl_2) a été effectuée par expression du gène chez le mutant *tolC* de la bactérie *E. coli* qui s'avère être hypersensible aux métaux.

Résultats

L'ADNc du gène *laptm4 α* a été cloné dans le plasmide pGEM[®]-T easy (Figure 18) après avoir été amplifié avec le couple d'amorce suivant : l'amorce sens 5'-ATGTTTCTTCAAAGCACCGAGAACG-3' et l'amorce antisens 5'-TTAAGCTGGCATGTAAGGAGGCGGT-3'. L'expression de ce gène n'a pas été induite car le simple fait d'avoir transformé la bactérie *tolC* avec le gène *laptm4 α* nous a obligé de faire croître les bactéries à 28°C et non à 37°C, la température optimale de croissance d'*E. coli*, parce que la simple expression résiduelle de ce gène est létale pour la bactérie à cette température.

L'expression de la protéine Laptm4 α du poisson zèbre chez *E. coli* en milieu liquide confère à celle-ci une sensibilité plus forte aux métaux tels que le mercure et le cadmium (Figure 19). Cette augmentation de la sensibilité est révélée en milieu liquide par l'analyse des IC₅₀ (concentration du toxique inhibant 50 % de la croissance bactérienne) qui sont plus faibles chez la bactérie possédant le plasmide abritant l'ADNc de *laptm4 α* que chez celle transformée avec un plasmide nu (Tableau 4). Cette analyse des IC₅₀ a également été réalisée avec un toxique organique, le bromure d'éthidium, et cela a montré que l'expression de cette protéine ne procurait aucune modification quant à la résistance de la bactérie face à ce toxique (Figure 19).

Cette sensibilité accrue des bactéries abritant le gène de la protéine Laptm4 α vis-à-vis de ces métaux comparativement aux bactéries transformées avec le plasmide vide a ensuite été étudiée sur milieu de culture gélifié à l'aide du test en goutte. L'expression de *laptm4 α* a conduit à la baisse de la résistance vis-à-vis du Cd et du Hg, ce qui est visualisé par la formation de colonie à de plus fortes dilutions pour le contrôle en présence de 0,3 mM CdCl_2 et 8 μM HgCl_2 (Figure 20).

L'expression du gène codant pour Laptm4 α a pour conséquence une augmentation de l'accumulation du métal dans les bactéries par rapport aux bactéries contrôles. La technique de spectrométrie d'absorption atomique a été utilisée pour quantifier les niveaux en Cd ou en Hg associés aux bactéries exprimant ou non le gène après exposition à 0,5 mM de Cd et à 15 μM

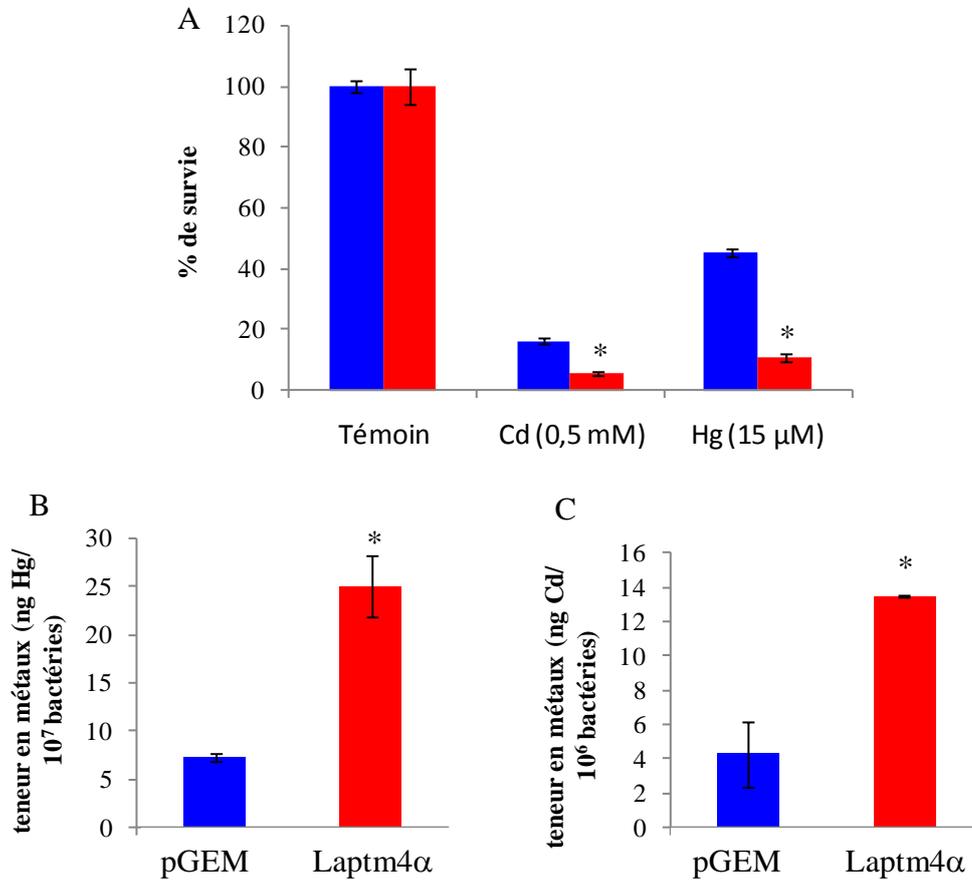


Figure 21 : Impact de l'expression hétérologue de la protéine Lptm4 α chez le mutant *tolC* d'*E. coli*. Le taux de survie des bactéries est calculé après 3 heures d'incubation dans le milieu LB liquide avec du Cd et du Hg aux concentrations indiquées. Le titre en bactérie correspondant aux 100 % est de $4,7 \cdot 10^8$ bactéries.mL⁻¹ pour les bactéries transformées avec le plasmide nu et de $4,6 \cdot 10^8$ bactéries.mL⁻¹ dans le cas du plasmide abritant *lptm4α* (A). Les concentrations de métaux associés aux bactéries ont été déterminées par spectrométrie atomique d'absorption, et les résultats ont été exprimés en ng de Hg / 10⁷ bactéries (B), et en ng de Cd / 10⁶ bactéries (C). Les barres colorées en bleues correspondent aux bactéries contrôles et les barres colorées en rouge correspondent aux bactéries exprimant le gène *lptm4α*. Les astérisques indiquent les valeurs significativement différentes chez la souche exprimant le gène *lptm4α* par rapport à la souche contrôle.

Les différences significatives ont été déterminées avec le test U de Mann-Whitney. Les résultats sont considérés comme statistiquement différents pour une valeur de $p < 0,05$.

de Hg. En comparaison aux bactéries contrôles, les bactéries exprimant le gène présentent 3 fois plus de Cd et 3,5 fois plus de Hg associés aux cellules (figure 21 B, C). Cette augmentation en métaux associés aux cellules est accompagnée d'une diminution de 10 % et de 34 % du taux de survie lors d'exposition au Cd et au Hg, respectivement (figure 21 A).

Discussion

La protéine Laptm4 α est un membre des protéines membranaires de type III qui résident dans la membrane des lysosomes ainsi que dans les endosomes tardifs. Les tests de résistance menés en milieux gélifiés et liquides ont clairement démontré que la protéine Laptm4 α de poisson zèbre conférait une sensibilité plus forte au chlorure de Hg et de Cd lors de son expression hétérologue chez le mutant *tolC* de la bactérie *E. coli*.

La souche de levure exprimant cette protéine présentait une résistance vis-à-vis de l'anthracycline, des ionophores carboxyliques et neutres, de la dihydropyridine et de stéroïdes, mais devenait également hypersensible aux cations hydrophobes, au 5-fluorouracile, au 5-fluorouridine et au trifluoperazine. L'acquisition d'une résistance envers les stéroïdes chez la levure exprimant *laptm4 α* a été attribuée à la compartimentalisation de toxique. Toutes ces observations sur le phénotype de résistance ou d'hypersensibilité de la levure envers les toxiques cités précédemment démontrent le rôle de Laptm4 α dans la compartimentalisation cellulaire de petites molécules hydrophobes (Hogue *et al.*, 1999). Les propriétés détectées chez la levure permettent également de suggérer que cette protéine joue un rôle similaire dans les cellules animales. L'action de la protéine Laptm4 α vis-à-vis des xénobiotiques organiques a ainsi été examinée mais aucune analyse sur les métaux n'avait été effectuée jusqu'à présent.

Certaines études montrent l'acquisition d'une résistance contre divers composés chimiques par augmentation des mécanismes d'efflux de ces toxiques impliquant des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) comme par exemple dans le cas des substances anticancéreuses (Simon *et al.*, 1994 ; Germann, 1996). Qui plus est, ces transporteurs ABC ont été associés à des phénomènes de compartimentalisation des toxiques dans les cellules, et parmi les compartiments cellulaires impliqués apparaissent les lysosomes (Larsen *et al.*, 2000).

Lors de l'analyse des banques SAGE obtenues à partir du muscle squelettique, le gène de cette protéine lysosomale était induit à la suite d'une exposition au MeHg. L'implication d'un transporteur de composés organiques lors d'exposition à des xénobiotiques métalliques a déjà été observée pour les protéines MXR. Des protéines MXR tels que OMRA, LMRA ou

encore hMDR1 impliqué dans l'efflux de produits organiques se sont révélés capables d'intervenir dans l'efflux de métaux complexés au glutathion (Achard *et al.*, 2005 ; Achard-Joris et Bourdineaud, 2006). La surexpression de *laptm4α* dans les muscles des poissons contaminés au MeHg laissait attendre l'acquisition d'une résistance associée à son expression dans la bactérie. Paradoxalement, l'inverse est obtenu avec une exacerbation de la toxicité du Cd^{2+} et Hg^{2+} . Cette hausse de la sensibilité est liée à une plus forte bioaccumulation de ces deux métaux dans les bactéries comme le suggère les dosages. Cette protéine facilite donc l'entrée des métaux à l'intérieur des bactéries. Cette facilitation de l'entrée des métaux dans la bactérie pourrait être causée par son positionnement dans la membrane plasmique bactérienne car la bactérie ne saurait reconnaître le signal C-terminal d'adressage dans les lysosomes, et pomper des nucléosides complexés aux métaux dans le cytoplasme.

III/ Analyse génétique de voies spécifiques du système nerveux central

Introduction

Le système nerveux central est un organe clé dans la toxicité du MeHg. Ce métal traverse facilement la barrière hémato-encéphalique *via* le système de transporteurs utilisé par les acides aminés de type L avec par exemple le cas du complexe MeHg-L-cystéine (Aschner *et al.*, 1989). Cette bioaccumulation du MeHg dans le cerveau conduit à l'apparition de nombreux symptômes mnésiques et moteurs (cf l'introduction). Ces symptômes sont en fait la conséquence d'une perte de neurones dans le cortex calcarin et des cellules granulaires du cérébellum (Oyake *et al.*, 1966 ; Eto K, 2000). Cependant, ces différents effets toxiques du MeHg ne peuvent pas être attribués à une localisation déterminée de ce métal car il se répartit de façon homogène au sein de ce tissu (Friberg et Mottet 1989). Malgré cette absence de localisation privilégiée dans le cerveau, le MeHg conduit quand même à la mort de neurones à la fois lors d'expérimentations *in vitro* et *in vivo* avec tout de même une bioaccumulation du MeHg plus forte dans les astrocytes (Charleston *et al.*, 1996; Davis *et al.*, 1994). Les astrocytes maintiennent de faibles concentrations de neurotransmetteurs au niveau des fentes synaptiques comme par exemple le glutamate, mais ils ont également un rôle nourricier en approvisionnant les neurones en divers composants tels que des molécules précurseurs de la synthèse du glutathion (LoPachin et Aschner, 1993; Murphy, 1995; Aschner et Kimelberg, 1996).

L'excès de glutamate est toxique pour les neurones car cela cause une induction du stress oxydant pouvant conduire à la mort cellulaire. Or il a été observé que les effets toxiques du MeHg pouvaient être atténués par l'action d'antagoniste du glutamate (Park *et al.*, 1996) ou encore que les neurones n'étaient pas affectés par la toxicité du MeHg en absence de glutamate extracellulaire. Cela suggère qu'une partie de l'impact neurotoxique du MeHg est liée à la perturbation du bon fonctionnement des astrocytes et de la régulation du glutamate extracellulaire (Allen *et al.*, 2001 ; Aschner *et al.*, 2000). La corrélation entre la bioaccumulation préférentielle du MeHg dans les astrocytes et le rôle du glutamate dans sa toxicité semble indiquer que le métabolisme du glutamate est altéré dans les astrocytes contaminés.

Les synapses GABAnergiques, qui sont des synapses de type inhibitrices utilisant le GABA (acide γ -aminobutyrique) comme neurotransmetteur, sont également impliquées dans la neurotoxicité du MeHg. La sensibilité de ce type de synapses est visible lors de l'analyse des potentiels d'action excitateurs et inhibiteurs à la suite d'une exposition. Le MeHg stimule tout d'abord les neurones soumis conjointement aux synapses excitatrices et inhibitrices avant

Tableau 5 : Numéro d'accension et couples d'amorce spécifiques pour les 24 gènes du poisson zèbre utilisées pour l'étude des effets toxiques du MeHg.

Fonction	gènes	Numéro d'accension	Amorces (5'-3')
Récepteur NMDA	<i>grin1b</i>	NM_001144131	CATGAGAACGGCTTCATGG ^a GCCAGCTGCATTTGCTTCC ^b
Récepteur AMPA	<i>griab2</i>	NM_131895	GTGGAGAGGATGGTGTC ^a GTGGCGATGCCGTAGCCT ^b
Glutaminase	<i>gls1</i>	NM_001045044	AGGCCATGCTGAGGTTG ^a CTGCCGTCTCTTTTTCGCT ^b
Glutamate déshydrogénase	<i>glud1a</i>	NM_212576	GCTTTGGTAATGTGGGTCTG ^a GCAGGGATCTGGATATCACAC ^b
Glutamate décarboxylase	<i>gad1</i>	NM_194419	GACGTGACCTACGACACCG ^a GCTGGCCCTCAAAGACC ^b
Glutamine synthase	<i>glula</i>	NM_181559	GTGGGAGTTCCAGTTGGC ^a GCATTGTCCAGCCTCCTT ^b
Transporteur de GABA	<i>zgc:103663</i>	NM_001007362	ATGCTGTTTATCCTGTTTATCCG ^a TGTTGAAGGGTTGTAGCTCC ^b
GABA transaminase	<i>abat</i>	NM_201498	GCGTTCAGGCAAAGCTCT ^a GCAGGACGGAAACGGAT ^b
Récepteur au GABA de type A	<i>LOC566514</i>	XM_689786	TCACAATGACAACCATCAACA ^a CACTCCGGAGCTGTCAAAGG ^b
Protéine gliale fibrillaire acide	<i>gfap</i>	NM_131373	AGTACCAGGACCTGCTCAA ^a ACAGTTCGCACAACCTATGCT ^b
Glutathion peroxydase	<i>gpx1a</i>	NM_001007281	CACCCCTCTGTTTGGGTTCC ^a CTCTTTAATATCAGCATCAAT ^b
Glutathion S-transférase	<i>gstp1</i>	AF285098	CGGATTCCTGGTTGGCG ^a TGCCATTGATGGGCAGTTT ^b
Porine	<i>vdac2</i>	NM_199585	CTATCCACGGCGCTGC ^a GGCCAGATTACCGCT ^b
β-actine	<i>β-actine</i>	NM_131031	AAGTGCGACGTGGACA ^a GTTTAGGTTGGTCGTTTCGTTGA ^b

de supprimer la transmission de signaux. La bicuculline, un composé antagoniste du récepteur GABA-A permet de prévenir l'augmentation initiale de la transmission de potentiel d'action excitateur causé par le MeHg. Le MeHg interfère dans le bon fonctionnement des synapses GABAnergique avec une action plus particulièrement ciblée sur les récepteurs du type GABA-A, rendant les synapses plus excitables avant de les neutraliser complètement (Atchison, 2005).

Dans l'objectif de comprendre l'impact du MeHg et les adaptations possibles au niveau du système nerveux central chez le poisson, une analyse génétique a été menée sur le cerveau du poisson zèbre contaminé par voie alimentaire (0,6 µg MeHg/jour/poisson), pendant 25 et 50 jours, représentative des doses prévalantes dans des écosystèmes pollués. Cette analyse génétique fut ciblée sur les deux types de synapses, les synapses glutamatergiques et GABAnergiques, ayant été décrites comme sensibles à une exposition au MeHg. Ces deux types de synapses sont donc d'une part une synapse de type excitatrice, la synapse glutamatergique, et d'autre part une synapse inhibitrice, la synapse GABAnergique. Pour l'analyse de l'impact de la contamination au MeHg sur le système nerveux central, une liste de 13 gènes fut établie (Tableau 5) permettant d'analyser les points clés des voies métaboliques concernant ces deux neurotransmetteurs. Concernant le glutamate, l'expression de 4 gènes a été analysée : ceux de la glutaminase, de la glutamate déshydrogénase, de la glutamate décarboxylase et de la glutamine synthase. Pour le GABA, l'analyse de l'expression de 2 gènes a été réalisée, le premier code pour le transporteur GABA situé au niveau des cellules nerveuses, GAT-1, et le second code pour la GABA transaminase responsable de la dégradation du GABA. Pour ces deux types de synapses, l'analyse génétique a également concerné l'expression de gènes codant pour deux types de récepteurs du glutamate, AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozol-4-propionate) et NMDA (N-méthyl-D-aspartate), et la sous-unité bêta du récepteur au GABA. En complément de cette analyse menée sur le métabolisme des neurotransmetteurs, l'expression de gènes codant pour divers transporteurs impliqués dans l'efflux du calcium a également été étudiée afin d'explorer la piste de la perturbation de l'homéostasie du calcium qui serait le point principal de toutes les perturbations causées par le MeHg au niveau du tissu nerveux. Deux types de transporteur ont été analysés, la première famille est celle des PMCA (Plasma Membrane Ca^{2+} ATPase) qui consomment de l'ATP pour transporter le calcium hors de la cellule (Di Leva *et al.*, 2008). La seconde famille est constituée de transporteurs passifs, des antiports du type $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) qui sont considérés comme étant le mécanisme cellulaire le plus important pour l'efflux du calcium.

Tableau 5 suite.

Transporteur ATPasique de Ca ²⁺			
PMCA 1a	<i>atp2b1a</i>	NM_001044757	TTCCGCAGCTCGCTGT ^a GGAGGTGTAGGGGTCCG ^b
PMCA 1b	<i>atp2b1b</i>	NM_001135631	GTGGTGCAGGGGTCTCA ^a GCGTTTGGTGGGTCCG ^b
PMCA 2	<i>atp2b2</i>	NM_001123238	ACGTGTCGTGAACGCA ^a CCGGCTGACTGGAGTTT ^b
PMCA 3a	<i>atp2b3a</i>	NM_001002472	ACCAAGCTGTGAGAGAGCA ^a GCCCTAAAAGCACGAGCC ^b
PMCA 3b	<i>atp2b3b</i>	NM_001128242	GGCCTTAACCGTATCCAGACT ^a ACGCTTTCCTACCCGC ^b
PMCA 4	<i>atp2b4</i>	NM_001077467	AGGGAGACAACGCTGC ^a CTCCTGCTCAATGCCGC ^b
Antiport sodium/calcium			
NCX 1b	<i>slc8a1b</i>	NM_001039144	AGTGGCAGCGATACAGG ^a TGAGCACCGCTACACAG ^b
NCX 2a	<i>slc8a2a</i>	NM_001123296	TGTTTGTGCTTTGGGAACCT ^a CAAGCGAACCGGGTC ^b
NCX 2b	<i>slc8a2b</i>	NM_001123284	CTGGGTATCGGAGTGGC ^a GTGTAGTGAGCAGTCGGG ^b
NCX 4a	<i>slc8a4a</i>	NM_001089419	ATACGCCGATGCGTCC ^a CAGTAGTGTCCAAACACATACCAG ^b

Abréviations : *grin1b*: glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 1b; *gria2b*: glutamate receptor, ionotropic, AMPA 2; *gls1*: glutaminase, like; *glud1a*: glutamate dehydrogenase 1a; *gad1*: glutamate decarboxylase 1; *glula*: glutamate-ammonia ligase (glutamine synthase) a; *zgc:103663*: solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 1; *abat*: 4-aminobutyrate aminotransferase; *LOC566514*: similar to gamma-aminobutyric acid receptor beta subunit; *gfap*: glial fibrillary acidic protein; *gpx1a*: glutathione peroxidase 1a; *gstp1*: glutathion S-transferase pi ; *vdac2* : voltage dependent anion channel; *atp2b*: ATPase, Ca²⁺ transporting, plasma membrane; *slc8a*: solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger).

^a Amorces sens.

^b Amorces antisens.

Résultats

Ces analyses ont permis de mettre en évidence des différences au niveau de la réponse génétique pour les deux temps d'exposition dans le cerveau du poisson zèbre. Un premier groupe de gènes spécifiques au fonctionnement du système nerveux central a été analysé. Ces gènes codent pour des récepteurs aux neurotransmetteurs ou encore pour des enzymes impliquées dans la synthèse ou la dégradation de ceux-ci. Les récepteurs qui ont été analysés concernent les voies glutamatergique et GABAnergique. Les récepteurs au glutamate analysés sont les récepteurs NMDA et AMPA et, en ce qui concerne le récepteur au GABA (acide gamma-aminobutyrique), ce fut la sous-unité β du récepteur de type A. Aucune modification de l'expression des gènes codant pour ces récepteurs n'est détectée après exposition au MeHg pour 25 et 50 jours (Tableau 6).

L'expression des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la synthèse et la dégradation du glutamate reste inchangée pour les deux temps d'exposition au MeHg alors que pour le GABA, le gène de l'enzyme permettant sa dégradation, la GABA transaminase, est induit après 50 jours d'exposition (Tableau 6).

L'étude de gènes codant pour des protéines répondant au stress oxydant ou bien reflétant l'inflammation du système nerveux central montre une répression du gène de la glutathion peroxydase d'un facteur 2,3 corrélée à une induction de 8 fois du gène de la gfap (glial fibrillary acidic protein) reflet d'une inflammation de la glie après 50 jours d'exposition. Pour la même durée d'exposition, le gène de la glutathion S-transférase est induit 2,5 fois. Le gène *vdac2* (Voltage Dependent Anion Carrier 2), codant pour une porine mitochondriale, présente quant à lui une induction après 25 jours d'exposition avec un retour à la normale pour le temps 50 jours.

Dix gènes impliqués dans la régulation de l'homéostasie du calcium ont également été analysés pour les deux temps d'exposition. Parmi ces gènes, seulement 3 sont impactés. Il y a *atp2b3a* et *atp2b3b* qui sont induits respectivement 5 et 4,2 fois après 25 jours d'exposition. Par contre, après 50 jours, ces deux mêmes gènes voient leur expression réprimée d'un facteur 3 pour *atp2b 3a* et d'un facteur 5 pour *atp2b 3b*. Et enfin parmi les transporteurs de type NCX seul le gène, *slc8a2b*, codant pour le transporteur calcium NCX 2b est induit 4,7 pour 25 jours d'exposition.

Discussion

La toxicité du MeHg envers les synapses au glutamate fut observée à la suite d'expérimentations *in vitro* sur des cultures d'astrocytes (Fonfria *et al.*, 2005). Il a été

Tableau 6 : Expression différentielle des différents gènes analysés dans le cerveau du poisson zèbre après contamination par voie trophique au MeHg (0,6 µg Hg/jour/poisson)^a

gène	Contrôle 25 jours	Contaminé 25 jours	Facteur ^b d'induction	Contrôle 50 jours	Contaminé 50 jours	Facteur ^b d'induction
<i>grin1b</i>	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,01	/	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	/
<i>griab2</i>	0,14 ± 0,06	0,1 ± 0,02	/	0,17 ± 0,05	0,22 ± 0,04	/
<i>gls1</i>	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,01	/	0,03 ± 0,01	0,05 ± 0,02	/
<i>glud1a</i>	0,06 ± 0,03	0,03 ± 0,01	/	0,026 ± 0,002	0,029 ± 0,006	/
<i>gad1</i>	0,15 ± 0,04	0,21 ± 0,04	/	0,23 ± 0,04	0,29 ± 0,05	/
<i>glula</i>	2 ± 1	2,3 ± 0,3	/	1,9 ± 0,3	3 ± 1	/
<i>zgc : 103663</i>	0,05 ± 0,02	0,1 ± 0,03	/	0,14 ± 0,03	0,18 ± 0,02	/
<i>abat</i>	0,06 ± 0,02	0,08 ± 0,01	/	0,08 ± 0,01	0,27 ± 0,06	3,5
<i>LOC566514</i>	0,007 ± 0,002	0,01 ± 0,003	/	0,01 ± 0,001	0,009 ± 0,001	/
<i>gfap</i>	0,02 ± 0,003	0,02 ± 0,01	/	0,011 ± 0,003	0,09 ± 0,03	8
<i>gpx1</i>	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,01	/	0,09 ± 0,02	0,04 ± 0,01	1/2,3
<i>gst</i>	0,08 ± 0,03	0,09 ± 0,05	/	0,04 ± 0,02	0,1 ± 0,02	2,5
<i>vdac2</i>	0,05 ± 0,01	0,12 ± 0,02	2,6	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,2	/
<i>atp2b1a</i>	0,11 ± 0,04	0,12 ± 0,06	/	0,35 ± 0,12	0,11 ± 0,02	/
<i>atp2b1b</i>	0,67 ± 0,02	0,69 ± 0,04	/	0,43 ± 0,22	0,2 ± 0,1	/
<i>atp2b2</i>	(1 ± 1).10 ⁻⁵	(0,9 ± 0,4).10 ⁻⁵	/	(100 ± 100).10 ⁻⁵	(3 ± 2).10 ⁻⁵	/
<i>atp2b3a</i>	0,3 ± 0,1	1,6 ± 0,8	5	3,6 ± 0,7	1,2 ± 0,6	1/3
<i>atp2b3b</i>	0,4 ± 0,2	1,8 ± 0,9	4,2	4,7 ± 1	0,9 ± 0,2	1/5
<i>atp2b4</i>	(30 ± 20).10 ⁻⁴	(0,3 ± 0,2).10 ⁻⁴	/	(3200 ± 3200).10 ⁻⁴	(9 ± 4).10 ⁻⁴	/
<i>slc8a1b</i>	0,006 ± 0,003	0,007 ± 0,004	/	0,01 ± 0,01	0,002 ± 0,001	/
<i>slc8a2a</i>	0,0006 ± 0,0002	0,0008 ± 0,0004	/	0,002 ± 0,001	0,002 ± 0,001	/
<i>slc8a2b</i>	0,25 ± 0,08	1,25 ± 0,63	4,7	1,7 ± 0,5	1 ± 0,3	/
<i>slc8a4a</i>	(20 ± 10).10 ⁻⁵	(3 ± 2).10 ⁻⁵	/	(50 ± 40).10 ⁻⁵	(1 ± 0,4).10 ⁻⁵	/

^a Les résultats sont donnés par rapport au niveau d'expression de la β-actine (moyenne ± erreur standard; *n* = 5 pour 25 jours et *n* = 5 pour 50 jours).

^b Le facteur d'induction est le rapport entre les valeurs obtenues à partir des poissons contaminés par rapport aux contrôles. Les valeurs indiquées correspondent aux facteurs d'induction et de répression statistiquement significatifs (test U de Mann-Whitney, *p* < 0,05).

démontré que le MeHg s'accumulait de façon préférentielle dans les astrocytes, inhibait la recapture du glutamate ainsi que le transport de la cystéine par les astrocytes, affectant ainsi leur statut rédox. De plus, une exposition de ces cellules au MeHg induisait également le relargage du glutamate par ces même cellules (Aschner *et al.*, 2007). Ces impacts ont de fortes répercussions sur le fonctionnement de ces synapses excitatrices avec un appauvrissement de la cellule en glutamate et en glutathion, et en parallèle une augmentation de la concentration en glutamate au niveau des fentes synaptiques conduisant à un dysfonctionnement majeur des synapses, et menant à l'apoptose des neurones et des astrocytes. Or de façon surprenante, notre analyse génique du système nerveux central n'a révélé aucun impact décelable du MeHg ni sur le métabolisme du glutamate, ni sur ses récepteurs synaptiques principaux et sur ses transporteurs (Tableau 6).

Les synapses glutamatergiques ne sont pas les seules cibles du MeHg. Celui-ci présente également un impact au niveau des synapses GABAnergiques et plus précisément sur celles présentant des récepteurs GABA-A (Atchison *et al.*, 2005, Fonfria *et al.*, 2001). Le MeHg a été montré comme stimulant dans un premier temps la transmission au niveau des synapses excitatrices pour finalement conduire à leur inhibition totale. Cette première phase de hausse de l'excitabilité des neurones par le MeHg est inhibée par l'ajout de bicuculline. Le MeHg inhibe également plus rapidement les potentiels synaptiques inhibiteurs que les excitateurs. Ces deux informations permettent alors de suggérer que le MeHg diminue le tonus des neurotransmissions inhibitrices liées aux récepteurs GABA de type A. Le MeHg a également un impact sur le déclenchement des potentiels synaptiques inhibiteurs qui voient leur fréquence et leur amplitude augmentées avant de totalement disparaître (Yuan *et al.* 2003). Or l'analyse génique de ces synapses au GABA et des enzymes impliquées dans son métabolisme n'a permis de mettre en évidence que la seule induction du gène de la GABA transaminase après 50 jours d'exposition. La GABA transaminase est une enzyme mitochondriale permettant aux cellules gliales de dégrader le GABA en acide succinique semi-aldéhyde lui même transformé en acide succinique pouvant être utilisé par les mitochondries au niveau du complexe 2 de la chaîne respiratoire. La modulation des effets toxiques du MeHg au niveau des synapses GABAnergiques semble se baser sur la dégradation avec la diminution du temps de demi-vie du GABA plutôt que sur la synthèse ou encore sur la quantité de récepteurs.

Quatre autres gènes furent testés dans le cerveau : ceux de la *glutathion S-transférase*, de la *glutathion peroxydase 1*, de la *gfap* et du *vdac2*. Le gène de la *glutathion S-transférase* est surexprimé à 50 jours alors que celui de l'isoforme 1 de la glutathion peroxydase est

réprimé ce qui indique une induction de la phase II du processus de détoxification cellulaire après 50 jours de contamination. Le cerveau des poissons contaminés par le MeHg présente donc une réponse vis-à-vis de composés chimiques toxiques pouvant être générés par un stress oxydant ou encore par complexation avec le MeHg. Le gène de la *gfap* se trouve également surexprimé au temps 50 jours révélant des atteintes neurologiques par l'activation de la glie (O'Callaghan et Sriram, 2005). En outre, lors d'une exposition au MeHg chez le saumon atlantique, il a été observé une forte hausse de la peroxydation lipidique au niveau du cerveau avec une tendance à la baisse de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) et de la glutathion peroxydase, des enzymes impliquées dans les processus de défense contre le stress oxydant (Berntssen *et al.*, 2003). Or, lors d'une analyse génétique menée sur le cerveau du poisson zèbre, aucune modification de l'expression des gènes codant pour les deux isoformes de la SOD n'a été décelée (Gonzalez *et al.*, 2005). Le cerveau est un organe sensible au stress oxydant mais présente une réponse très différente des autres tissus quant à ses mécanismes de défense.

Le gène *vdac2* se trouve être surexprimé après 25 jours de contamination, révélant une atteinte au niveau mitochondrial. Mais le niveau d'expression de ce gène redevient similaire à la condition témoin après 50 jours d'exposition. L'analyse de l'expression de 2 gènes liés au métabolisme mitochondrial, les gènes de la pyruvate décarboxylase et de la sous-unité 1 de la cytochrome *c* oxydase, a été réalisée lors d'une étude antérieure sur le poisson zèbre et n'a décelé aucune modification de leur expression après 21 et 63 jours d'exposition au MeHg (Gonzalez *et al.*, 2005). Pourtant l'origine du stress oxydant et de la peroxydation lipidique chez les mammifères causés par une exposition au MeHg serait la conséquence de perturbations au niveau des enzymes mitochondriales (Yee et Choi, 1996). L'évolution de l'expression du gène *vdac2* semble bien indiquer que le MeHg impacterait l'intégrité mitochondriale au début de l'exposition et que la réponse au niveau du tissu évolue dans le temps par la mise en place d'autres mécanismes.

Lors de l'analyse de l'expression génétique des transporteurs calciques il est apparu que les transporteurs les plus exprimés dans le système nerveux central sont les transporteurs PMCA3 et NCX2b. La réponse observée, après 25 jours d'exposition, est une induction des gènes des 2 isoformes du transporteur PMCA3, *atp2b3a* et *atp2b3b*, et NCX2b indiquant une perturbation de l'homéostasie du calcium. Or, l'ajout de MeHg sur des granulocytes cause une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire en deux temps, avec une première augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire qui peut avoir lieu même dans un milieu dépourvu de celui-ci, et une seconde augmentation très importante qui ne peut avoir

lieu qu'en présence de calcium extracellulaire. Le MeHg permet donc dans un premier temps le relargage d'un stock cellulaire de calcium qui conduit à une seconde entrée massive (Marty et Atchison, 1997). Les éléments impliqués dans le relargage du calcium lors de la première hausse de la concentration intracellulaire en calcium sont le reticulum endoplasmique et les mitochondries. Le Ca^{2+} est tout d'abord relargué par le reticulum puis est capté par la mitochondrie qui finit à son tour par le rejeter dans le cytoplasme (Limke *et al.*, 2003). De plus, des relargages spontanés de neurotransmetteurs ont été observés lors d'exposition au MeHg dans un milieu privé de Ca^{2+} (Minnema *et al.*, 1989).

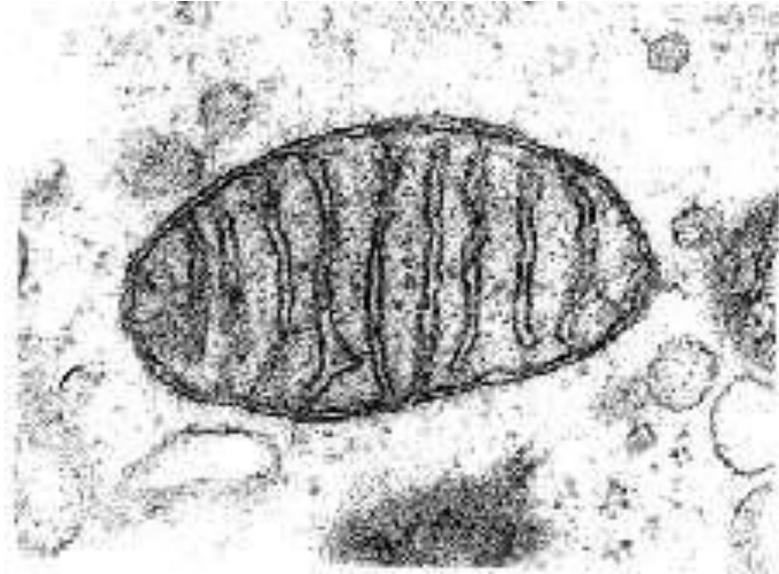
L'homéostasie du Ca^{2+} intracellulaire est donc un élément très important de la neurotoxicité du MeHg. L'impact au niveau des concentrations en Ca^{2+} intracellulaires des neurones peut avoir pour conséquence une sur-activation des synapses, comme par exemple celle au glutamate, conduisant à une augmentation du flux de Ca^{2+} au travers des récepteurs NMDA. Cette hausse du Ca^{2+} intracellulaire va devenir assez importante pour produire des dysfonctionnements au niveau du métabolisme mitochondrial et générer des espèces réactives de l'oxygène ce qui concorde avec le paradigme de l'excitotoxicité (Schramm *et al.*, 1990).

Lors d'une exposition au Hg^{2+} chez les moules, *Mytilus galloprovincialis*, l'induction de l'expression des transporteurs PMCA a été détectée et corrélée à une augmentation de l'activité de ces transporteurs. Mais cette augmentation de l'activité était très inférieure à la surexpression (Burlando *et al.*, 2004). De plus, l'activité de ces transporteurs se révèle être inhibée par l'ajout de métaux lourds sur des extraits de membranes plasmiques obtenus à partir de branchies de *M. galloprovincialis*. De tous les métaux lourds testés, le Hg^{2+} inhibe le plus fortement l'activité de ces transporteurs. Cette inhibition peut être levée par l'ajout de GSH, observation valable pour chacun des métaux lourds étudiés suggérant une action thioloprive de chaque métal (Viarengo *et al.*, 1993). Cette surexpression permettrait de renouveler les transporteurs de type PMCA qui auraient été inhibés par une complexation du MeHg au niveau des groupements $-\text{SH}$ et de maintenir le relargage du Ca^{2+} . Mais cela peut aussi permettre une augmentation de l'efflux limitant alors l'impact du MeHg sur l'homéostasie du calcium stoppant la cascade de réactions pouvant conduire à l'excitotoxicité. Cette réponse n'est cependant pas définitive car après 50 jours l'expression des gènes des *atp2b3a* et *atp2b3b* est réprimée et l'expression du gène *slc8a2b* redevient comparable entre les 2 conditions.

Le cerveau présente donc des stratégies adaptatives face à une exposition au MeHg évoluant au cours du temps pour se protéger des dysfonctionnements. Les réponses observées semblent également indiquer qu'un aspect de la toxicité de ce métal est basé sur la

perturbation de l'homéostasie du Ca^{2+} qui conduirait à diverses conséquences comme des perturbations mitochondriales ainsi qu'un relargage trop important de neurotransmetteurs même lors d'exposition à de faibles concentrations.

Chapitre 3



Analyse des effets histologiques et bioénergétiques d'une contamination par le méthylmercure.



L'analyse de l'intégrité de l'ADN du muscle squelettique et du système nerveux central a révélé les effets génotoxiques du MeHg pour ces deux tissus.

Les analyses génétiques ont révélé, quant à elles, l'induction de gènes codant pour des protéines de réponse contre le stress oxydant pour ces deux tissus. Or la production d'espèces réactives de l'oxygène est la conséquence de dysfonctionnements mitochondriaux. Conjointement à l'induction d'une réponse à un stress oxydant, une perturbation concernant l'homéostasie du calcium a également été décelée dans les deux tissus. Cette perturbation de l'homéostasie calcique peut conduire à la perturbation du métabolisme mitochondrial. Ces observations semblent indiquer que le MeHg altérerait le métabolisme mitochondrial. Afin de vérifier cela, l'activité de la chaîne respiratoire a été examinée par oxygraphie pour les deux tissus et l'intégrité de la chaîne respiratoire a été étudiée par des analyses protéique et génétique.

I/ Etude sur fibres musculaires.

Les résultats de cette étude font l'objet d'un article dans "The International Journal of Biochemistry & Cell Biology". Lors de l'analyse sur les fibres perméabilisées de muscle squelettique, il ressort une inhibition croissante de l'état 3 de la respiration mitochondriale entre 25 et 50 jours. Cette inhibition de l'état 3 passe de 32% après 25 jours de contamination à 67% pour 50 jours. En revanche l'état 4 de la chaîne respiratoire n'est pas affecté par la contamination. Ces observations faites sur ces deux états sont confirmées par le calcul du contrôle respiratoire (RCR, Ratio Respiratory Control) qui décroît de 2,3 à 1,5 après 25 jours, et de 3,1 à 1,3 après 50 jours. Or, l'intégrité et l'activité hydrolytique de l'ATP-synthase ne semblent pas être atteintes. Les dysfonctionnements causés par le MeHg seraient donc provoqués par l'altération de différents complexes de la chaîne respiratoire. L'étude de l'activité isolée de la cytochrome *c* oxydase (COX) du muscle a révélé une diminution de 25% après 25 jours et de 60% après 50 jours de contamination. Les approches génétique et protéique ont également montré un impact du MeHg causant une diminution de la synthèse de la sous-unité 4 de la COX. Le métabolisme mitochondrial musculaire se trouve donc fortement impacté par la contamination organomercurielle. Ces impacts du MeHg sur les mitochondries du muscle ont également été détectés lors d'observations menées par microscopie électronique à transmission. Les mitochondries des fibres rouges du muscle squelettique montraient des atteintes au niveau de leur structure avec une désorganisation des crêtes mitochondriales et des décollements de la membrane externe.



Contents lists available at ScienceDirect

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biocel

At environmental doses, dietary methylmercury inhibits mitochondrial energy metabolism in skeletal muscles of the zebra fish (*Danio rerio*)

S. Cambier^a, G. Bénard^b, N. Mesmer-Dudons^a, P. Gonzalez^a, R. Rossignol^b,
D. Brèthes^c, J.-P. Bourdineaud^{a,*}

^a CNRS, UMR 5805, Ecotoxicologie des Systèmes Aquatiques, Université de Bordeaux 1, Place du Dr Peyneau, 33120 Arcachon, France

^b INSERM, U688, Physiopathologie Mitochondriale, Université Victor Segalen-Bordeaux 2, Bordeaux, France

^c CNRS, UMR 5095, Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, Université Victor Segalen-Bordeaux 2, Bordeaux, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 May 2008

Received in revised form 29 July 2008

Accepted 7 August 2008

Available online 13 August 2008

Keywords:

Danio rerio

Zebrafish

Methylmercury

Mitochondria

Electron transfer chain

ATP synthesis

Complex IV

ABSTRACT

The neurotoxic compound methylmercury (MeHg) is a commonly encountered pollutant in the environment, and constitutes a hazard for human health through fish eating. To study the impact of MeHg on mitochondrial structure and function, we contaminated the model fish species *Danio rerio* with food containing 13 µg of MeHg per gram, an environmentally relevant dose. Mitochondria from contaminated zebrafish muscles presented structural abnormalities under electron microscopy observation. In permeabilized muscle fibers, we observed, a strong inhibition of both state 3 mitochondrial respiration and functionally isolated maximal cytochrome *c* oxidase (COX) activity after 49 days of MeHg exposure. However, the state 4 respiratory rate remained essentially unchanged. This suggested a defect at the level of ATP synthesis. Accordingly, we measured a dramatic decrease in the rate of ATP release by skinned muscle fibers using either pyruvate and malate or succinate as respiratory substrates. However, the amount and the assembly of the ATP synthase were identical in both control and contaminated muscle mitochondrial fractions. This suggests that MeHg induced a decoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation in the skeletal muscle of zebrafish. Western blot analysis showed a 30% decrease of COX subunit IV levels, a 50% increase of ATP synthase subunit α , and a 40% increase of the succinate dehydrogenase Fe/S protein subunit in the contaminated muscles. This was confirmed by the analysis of gene expression levels, using RT-PCR. Our study provides a basis for further analysis of the deleterious effect of MeHg on fish health via mitochondrial impairment.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The toxic compound methylmercury (MeHg) is a commonly encountered form of mercury in the environment, responsible for a specific range of neurological diseases. For instance, Minamata disease is characterized by ataxia, visual and hearing disturbances, sensory impairment, convulsions, memory defects, muscle weakness and wasting, and muscle cramp (Harada, 1997). This led to consider MeHg pollution as a continuous environmental hazard to human health, especially via fish-eating. Potential deleterious effects of low level prenatal MeHg exposure on neurodevelopment have also been reported (Grandjean et al., 1997).

In French Guiana, clandestine gold mining is intensively occurring on terrestrial sites or directly into the rivers. Mercury contamination of 35 freshwater fish species collected from the

Courcibo and Leblond rivers were analyzed in relation to their food regimens. Results showed a marked biomagnification along the food chain: the ratio between extreme Hg concentrations in the muscle from piscivorous species (14.3 µg/g, dry weight (dw) for *Acestrorhynchus guianensis*) and from herbivorous species (0.02 µg/g, dw for *Myleus ternetzi*) was 715 (Durrieu et al., 2005). The final predators in this food web are human beings, and consequently high mercury levels are observed in hair from some native Amerindian communities (Cordier et al., 1998). This placed 57% of the Wayanas living in the upper reaches of the Maroni river above the World Health Organization (WHO) limit (10 µg/g Hg concentrations in hair). All individuals aged over 1 year had an Hg intake from ingested fish greater than the safety level of 200 mg MeHg per week. Four carnivorous/piscivorous fish species (*Pseudoplatystoma fasciatum*, *Hoplias aimara*, *Ageneiosus brevifilis*, *Serrasalmus rhombeus*) accounted for at least 72% of the metal ingested by Wayana families (Fréry et al., 2001). Neurological examination and neurobehavioral development tests on children revealed significant links between impregnation levels and onset of deficiencies (Cordier et al., 2002).

* Corresponding author. Tel.: +33 556 22 39 26; fax: +33 556 54 93 83.

E-mail address: jp.bourdineaud@epoc.u-bordeaux1.fr (J.-P. Bourdineaud).

However, despite the known effect of MeHg on human health, there are no studies yet on the impact of environmental relevant low chronic dose. Here, we set up a laboratory experiment where zebra fish (*Danio rerio*) were contaminated for more than 2 months through diet, using food containing 13.5 µg Hg per g. This mercury concentration corresponds to that found in various preys of the food web in French Guiana (Durréu et al., 2005). Fish were fed each day with a food quantity representing 5% of their body weight (44 mg food/day/fish representing 0.6 µg Hg/day/fish or 3 nmol Hg/day/fish). In a previous work we have shown that, at this contamination pressure, muscles accumulated 34 µg Hg/g after 63 days. Gene expression analysis revealed also that the expression levels of *coxI*, and both the cytoplasmic and mitochondrial *sod* genes were highly induced in skeletal muscles after 7 and 21 days of exposure, suggesting an impact of MeHg on mitochondrial function and the generation of an oxidative stress (Gonzalez et al., 2005). In this study we investigated the mitochondrial bioenergetics of zebra fish muscle after such a dietary MeHg contamination. Our results reveal a strong impact of MeHg on mitochondrial function including ATP generation.

2. Experimental procedures

2.1. MeHg exposure conditions

Adult male fish (body weight: 0.88 ± 0.03 g, wet wt; standard length: 3.63 ± 0.05 cm, $n=9$) were randomly placed in two tanks containing 100 L of chlorine-free, permanently oxygenated water. Female fish were excluded to avoid any interference due to reproduction processes. Throughout the experiment, the temperature was maintained at 24 ± 0.5 °C. Fish in each tank were fed twice a day with a quantity of artificial food corresponding to 2.5% of the fish wet weight. Control fish were fed with non-contaminated food. In the exposure tank, fish were fed with a 13.5 µg of Hg/g (dry wt) contaminated food. Contaminated diet was prepared by mixing artificial fish food (Dr. Bassler Biofish, Telgte, The Netherlands) with an ethanolic solution of MeHg chloride (Alltech) as described (Gonzalez et al., 2005). This dietary exposure level is in the range of those found in various piscivorous and invertivorous fish inhabiting natural lakes or flooded reservoirs in North America, Canada, or Brazil (Wiener et al., 2003). To minimize fish contamination by the water, one-third of the water volume from each tank was changed every 2 days, and tank bottoms were cleaned every day to eliminate fish faeces and food remains.

2.2. Animal tissue sampling

Fish were removed after 25 and 49 days and killed within seconds by immersion in melting ice. Skeletal muscles were independently harvested. Fish were dissected on ice. The two skeletal muscle fillets were taken from the dorsal region between the head and the tail. For genetic analysis, three replicates were then constituted by pooling tissue samples from four fish sampled at 25 and 49 days. For crude mitochondrial fraction preparations, muscle fillets from 10 fish were pooled. For mitochondrial respiration measurements, red muscle were excised from the whole muscle fillets and processed for saponin permeabilization.

2.3. Mercury quantification

Total Hg concentrations in fish muscles were determined by flameless atomic absorption spectrometry. Analyses were carried out automatically after thermal decomposition at 750 °C under an oxygen flow (AMA 254, Prague, Czech Republic). The detection limit was 0.01 ng Hg. The validity of the analytical methods was checked

Table 1

Accession numbers and specific primer pairs for the 10 genes from *D. rerio* used in our study

Gene name	Accession number	Primer (5'–3')
<i>atp5a1</i>	NM.001077355	GGCCTACCCCGGTGAC ^a CGGACCGGATACCCCTGT ^b
<i>atp5f1</i>	BC083308	GTGTGACAGGCCCTATATGC ^a CTGAGCCTTTGCTATTTTATCCG ^b
<i>bactin1</i>	NM.131031	AAGTGCAGCCTGGACA ^a GTTTAGGTTGGTCGTTTGA ^b
<i>coxI</i>	NC.002333	GGAATACCACGACGGTACTCT ^a AGGGCAGCCGTGTAAT ^b
<i>coxIV</i>	BC095163	AGAGTGAAATCTGTGGTTGC ^a CCAAGCGTTGTTTCATAGTCCC ^b
<i>cytb</i>	AJ388456	CGCATTCTACGATCTATCCC ^a GGTGTCTACTGGTATCCCTCC ^b
<i>sdh(Fe/S)</i>	XM.685549	GGACAGCACTGACCTT ^a GTTGCTCATGTCGGGC ^b
<i>zgc:112520</i>	BC093359	AGACGCATCTTGACAGATTATGG ^a CCCCCGGTATGCAGGA ^b

Abbreviations: *atp5a1*: ATP synthase, mitochondrial F1 complex, subunit α; *atp5f1*: ATP synthase, mitochondrial F0 complex, subunit β; *bactin1*: β-actin; *coxI*: cytochrome c oxidase subunit I; *coxIV*: cytochrome c oxidase subunit IV; *cytb*: cytochrome b, mitochondrial; *sdh(Fe/S)*: succinate dehydrogenase, Fe/S protein subunit, 30 kDa; *zgc:112520*: NADH dehydrogenase, 30 kDa subunit.

^a Upstream primer.

^b Forward primer.

during each series of measurements against three standard biological reference materials (TORT2); Hg values were consistently within the certified ranges (data not shown).

2.4. Quantitative RT-PCR

Total RNAs were extracted from 40 mg of fresh tissue using the Absolutely RNA RT-PCR Miniprep kit (Stratagene), according to the manufacturer's instructions. For each exposure condition and each organ, samples were analyzed in triplicate. First-strand cDNA was synthesized from 5 µg of total RNA using the Stratascript First-Strand Synthesis System (Stratagene) according to the manufacturer's instructions. The amplification of cDNA was monitored using the DNA intercalating dye SyberGreen I. Real-time PCR reactions were performed in a LightCycler (Roche) following the manufacturer's instructions, one cycle at 95 °C for 10 min and 50 amplification cycles at 95 °C for 5 s, 60 °C for 5 s, and 72 °C for 20 s. Primer pairs used are listed in Table 1. Relative quantification of each gene expression level was normalized according to the actin gene expression.

2.5. Sample preparation for microscopy

Muscle pieces (2 mm thick) were systematically sampled immediately ahead of the 2nd dorsal fin and the anal fin. They were immediately immersed in a fixing solution (3% glutaraldehyde buffered with 0.1 mmol/l sodium cacodylate solution, pH 7.4; osmolarity 600 mosmol/l) for 12 h at 4 °C then rinsed in a cacodylate buffer (0.1 mmol/l, NaCl 2%). After dehydration, the fish were embedded in Araldite in order to prepare different types of sections using an automatic ultra-microtome (Reichert). For optical microscopy, these semi-fine sections (1.5 µm) were stained with blue toluidine (1%) with borate methylene (1%) before analysis under a Leitz Orthoplan microscope. For electronic microscopy, ultrafine sections (500–700 Å) were placed on grids and further observed under a MET Philips CM10.

2.6. Skinned muscle fibres preparation

Bundles of fibres between 10 and 20 mg were incubated for 20 min in 5 ml of solution A (MES 0.1 M pH 7.0, imidazole 20 mM, EGTA 10 mM, MgCl₂ 3 mM, taurine 20 mM, dithiothreitol 0.5 mM) containing saponin 50 µg/ml as described in Letellier et al. (1992). The bundles were then washed twice for 15 min, in solution B (solution A containing KH₂PO₄ 3 mM and 5 mg/ml fatty-acid-free bovine serum albumin) to remove saponin. All procedures were carried out at 4 °C with extensive stirring.

2.7. Mitochondrial respiration measurements

Mitochondrial oxygen consumption was monitored polarographically at 30 °C using a Clark oxygen electrode in a 1 ml thermostatically controlled chamber (Hansatech, OXY1 System). The oxygraph cuvette was containing one bundle of permeabilized muscle (around 12 mg) in 1 ml of solution B with di(adenosine-5') pentaphosphate 50 µM, iodoacetate 10 mM, EDTA 0.2 mM and the respiratory substrates (pyruvate 10 mM in presence of malate 10 mM). State 3 was obtained by addition of 2 mM ADP while state 4 was subsequently reached by using a combination of atractyloside (1 mM final) and oligomycin (2 µg/ml final). After each respiration measurement, the bundle of fibres was removed from the cuvette, dried and weighed. The respiratory control ratio (RCR) is defined as the ratio of state 3 to state 4 (as defined above) respiratory rates.

2.8. Cytochrome c oxidase activity

Cytochrome c oxidase (complex IV) activity was monitored by specifically inhibiting the first complexes of the respiratory chain with rotenone and antimycin, and using 3 mM ascorbate and 0.5 mM TMPD as an electron donor system. The respiratory rate was monitored with the polarographic method described above.

2.9. Rate of ATP production by muscle fibers

ATP synthesis in muscle fibers was measured in respiratory buffer in the presence of respiratory substrates (see above). Steady-state ATP synthesis was initiated by adding 2 mM ADP, and was recorded during 2 min as follows: every 30 s after ADP addition, 10 µl aliquots were withdrawn, quenched in 100 µl DMSO and diluted in 5 ml of ice-cold distilled water. For each sample collected from the cuvette, the quantity of ATP was measured by bioluminescence in a Biocounter M2500 (Lumac) using the ATP monitoring reagent (ATP Bioluminescence Assay Kit HS II) from Boehringer Mannheim. Standardization was performed with known quantities of ATP (0–25 pmol) measured in the same conditions. For this, we used the ATP provided with the kit. The rate of ATP synthesis was calculated using a linear regression. Rates were expressed in nmol ATP/min/mg of muscle fibers.

2.10. ATP/O calculation

The efficiency of mitochondrial ATP production is given by the number of moles of ATP produced per atom of oxygen consumed by the respiratory chain. This so-called ATP/O ratio can be calculated accurately from the data obtained during respiration and ATP synthesis measurements as the ratio of mitochondrial ATP synthesis rate over mitochondrial respiratory rate (state 3), determined simultaneously in the same experimental conditions.

2.11. Mitochondrial protein fraction preparation

Crude mitochondrial fraction was prepared as described by Itoi et al. (2003). Muscle fibers were excised and chopped at 4 °C in 10 ml of isolation buffer (HEPES 20 mM pH 7, KCl 140 mM, MgCl₂, EDTA 10 mM) containing 0.5% (w/v) lipid free BSA per gramme of fibers, homogenized with a teflon potter (8 strokes), and centrifuged 5 min at 800 × g. The supernatant was filtered through 4 layers of Miracloth and spun down 10 min at 9000 × g. The pellet was resuspended in isolation buffer without BSA and the centrifugation steps were repeated. The final pellet was resuspended in 200 µl of isolation buffer and stocked at –80 °C.

2.12. SDS-PAGE and Western blotting

SDS-PAGE was performed using 15% polyacrylamide slab gels. Western blot analyses have been described previously (Arselin et al., 1996). Proteins were electro-transferred onto nitrocellulose membranes (Membrane Protean BA83, Schleicher and Schuell). Primary antibodies were monoclonal antibodies from MitoSciences and were used at the indicated dilution. Secondary antibodies were peroxidase-conjugated goat anti-mouse antibodies (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.). Western blots were revealed using the Enhanced Chemio Luminescence method (Amersham Pharmacia Biotech) on CCD camera (GeneGnome, Syngene Bio-Imaging). Quantifications were done using ImageJ software.

2.13. BN-PAGE

Blue Native-PAGE experiments were carried out as described by Schägger and von Jagow (1991) and Wittig et al. (2006). Mitochondria (10 mg protein/ml) were incubated 30 min at 4 °C in HEPES 30 mM pH 7.4, potassium acetate 150 mM, 6-aminohexanoic acid 2 mM, glycerol 10% (m/v), and protease inhibitors containing digitonin at digitonin to protein ratio ranging from 0.75 to 2 g/g. The extracts were centrifuged at 4 °C for 15 min at 40,000 × g. Forty microliters of supernatant in which 2 µl of Serva Blue G (5%, w/v) had been added were immediately loaded onto a 3–13% polyacrylamide slab gel. After electrophoresis, ATPase activity was revealed by incubating the gel in 5 mM ATP, 5 mM MgCl₂, 0.05% (w/v) lead acetate, 50 mM glycine–NaOH pH 8.6 (Grandier-Vazeille and Guerin, 1996). After revelation and scanning of the gel, the white precipitate of lead phosphate was solubilized by incubation 30 min in EtOH 30% (v/v) HCl 1 M and the gel was stained with Comassie Brilliant Blue.

2.14. Miscellaneous

Protein concentration was determined according to the Lowry method in the presence of 5% (w/v) SDS with bovine serum albumin as standard protein.

2.15. Statistical analysis

Interindividual variability for each experimental condition was defined by mean ± standard deviations ($n=3$). Significant differences between respiratory rates, COX activity, ATP release, and gene expression levels in muscle fibers were determined using the nonparametric Mann–Whitney *U*-test ($p < 0.05$).

3. Results

3.1. Analysis of mitochondrial ultrastructure by transmission electron microscopy

After 25 and 50 days of exposure to a contamination pressure of 3 nmol Hg/day/fish (0.6 μg Hg/day/fish), fish skeletal muscles accumulated a high level of mercury meaning that MeHg enters easily into fish through diet (Table 2). After 63 days of exposure, muscle fibers were harvested and sections were observed by electron microscopy. Mitochondria from contaminated fish muscle presented a pattern of disorganized cristae as compared to the control mitochondria (Fig. 1, compare pictures A–C to D–F). Intermembrane separations and bubbling were also observed in mitochondria from contaminated fish muscle (Fig. 1, compare pictures C and G).

Table 2

Average total mercury concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$, dry wt) determined in the skeletal muscle of *D. rerio* after 25 and 50 days dietary exposure to 0.06 (control), and 13.5 (MeHg-treated) $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ (dry wt)

	25 days	50 days
Control	1.77 \pm 1.14	1.93 \pm 0.55
MeHg-treated	25.4 \pm 5.01	35.5 \pm 3.97

Results are indicated as means \pm standard error ($n = 3$).

3.2. Mitochondrial respiration in permeabilized muscular fibres

After 25 or 49 days of MeHg contamination (corresponding to 0.6 μg Hg/day/fish, or 3 nmol Hg/day/fish), mitochondrial respiration was measured directly on saponin-skinned skeletal muscle fibers, using pyruvate-malate as substrates. It appeared that state 3

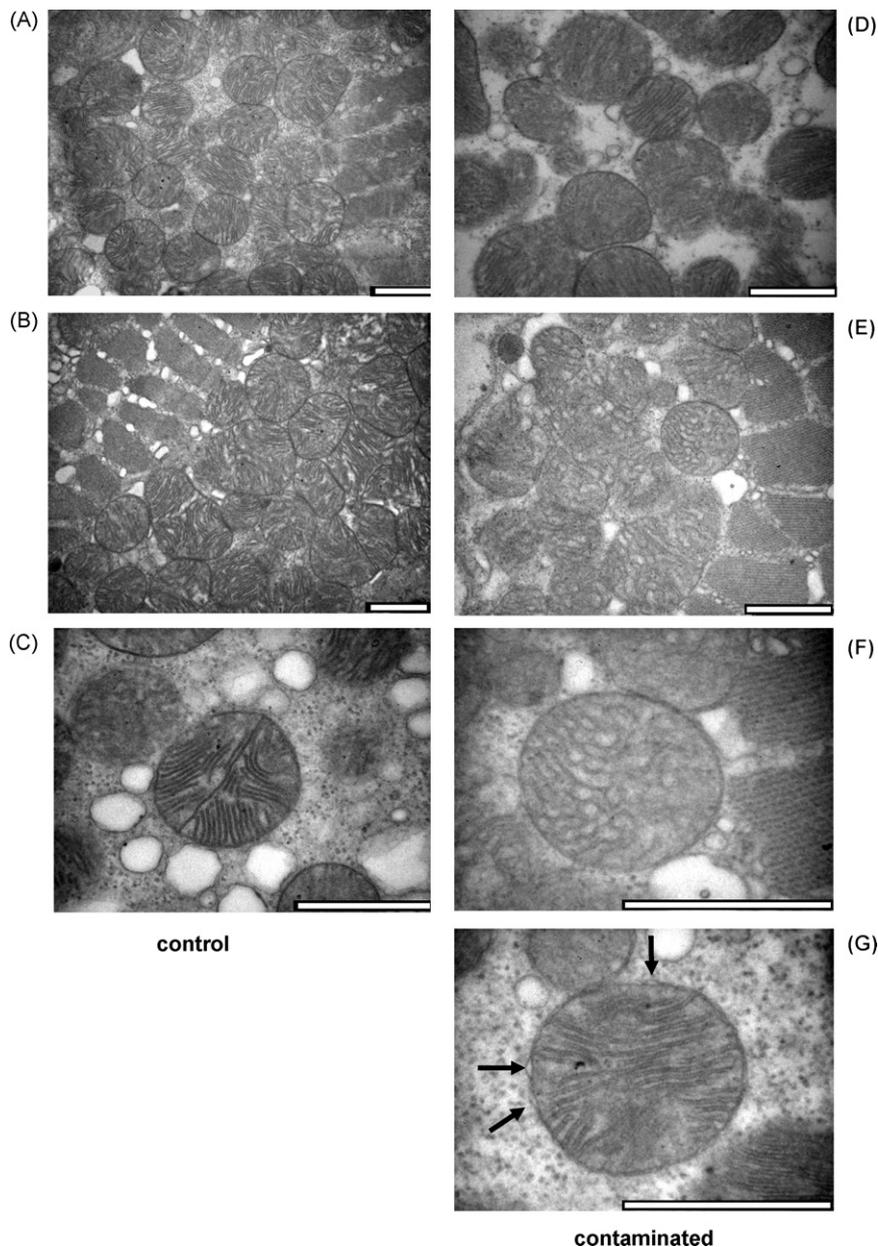


Fig. 1. Mitochondrial injuries in red muscles of zebrafish exposed to dietary MeHg. After 63 days of contamination with MeHg at a dose of 3 nmol/fish/day, red muscles from control (A–C) and contaminated (D–G) fish were collected and processed for an electronic microscopy analysis. Arrows indicate intermembrane separations. Scale bars, 1 μm .

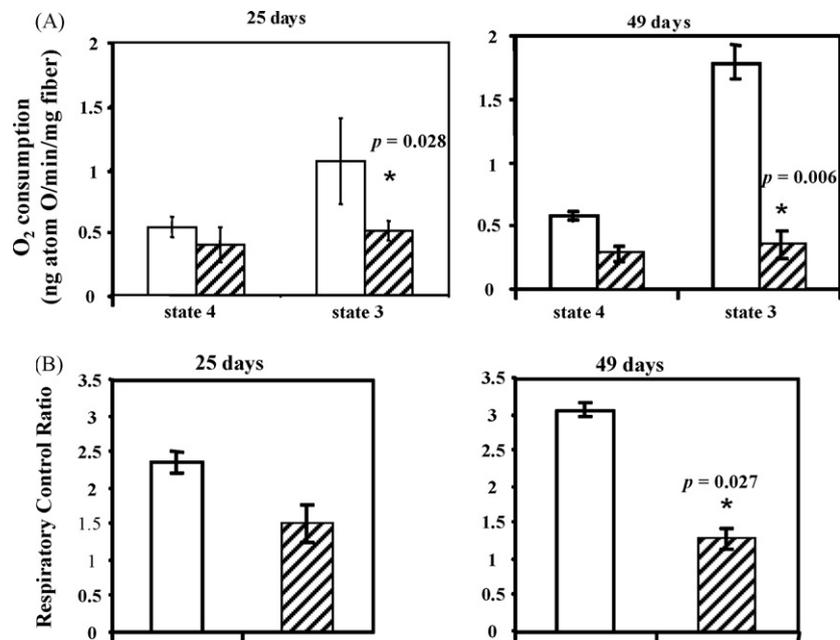


Fig. 2. Dietary MeHg impinges on mitochondrial respiration. (A) Oxygen consumption rates measured on permeabilized muscle fibers from control fish (open bars) and contaminated fish (hatched bars) after 25 and 49 days of contamination. Mitochondrial respiration was stimulated by addition of pyruvate and malate. (B) Coupling between state 3 and state 4. Respiratory control ratio: ratio of oxygen consumption rates as observed at state 3 over that at state 4. Open bars: control fish ($n=3$); hatched bars: contaminated fish ($n=3$).

respiration (obtained after addition of ADP) was severely affected by the MeHg contamination since it was inhibited to $32 \pm 15\%$ after 25 days and to $67 \pm 20\%$ after 49 days. The state 4 respiration (no ATP synthesis, basal respiration) was not significantly changed after 25 and 49 days (Fig. 2A).

Calculation of the respiratory control ratio (RCR, the ratio of the respiratory rate at state 3 over that at state 4) confirmed the significant effect of MeHg contamination on the coupling of mitochondrial respiration with ATP synthesis. Indeed, there was a significant decrease in RCR values ($p < 0.05$) from 2.34 ± 0.10 for control muscles down to 1.50 ± 0.25 for contaminated muscles after 25 days, and from 3.08 ± 0.08 to 1.30 ± 0.12 for control and contaminated muscles, respectively, after 49 days (Fig. 2B).

3.3. Effect of MeHg on complex IV (COX) activity

When COX was fed with electrons directly through ascorbate/TMPD in the presence of rotenone and antimycin, thereby bypassing the rest of the electron transfer chain, its activity was decreased by $25 \pm 4\%$ at day 25 with a low statistical significance, $p < 0.1$. Moreover, the weakening of COX activity increased with exposure time to reach $60 \pm 18\%$ after 49 days, $p < 0.05$ (Fig. 3).

3.4. Effect of MeHg on ATP production

The respiratory results indicate that state 3 respiration was strongly inhibited by the MeHg treatment, while state 4 was not. This suggests a functional defect at the level of ATP synthesis. To investigate this possibility, we measured the rate of mitochondrial ATP production in permeabilized muscle fibers, concomitantly to the respiration measurements.

Whatever the substrates used, it appeared that ATP synthesis was strongly inhibited in the contaminated fish muscles (Fig. 4). This ATP release is in fact the result of the overall yield between ATP synthesis and hydrolysis. In control muscle fibers, a net balance in favor of ATP synthesis is clearly observed. However, in contaminated muscle fibers, with pyruvate-malate as respiratory

substrates, ATP synthesis and hydrolysis are in close equilibrium, whereas with succinate, the rate of ATP consumption tends to overtake this of ADP phosphorylation (data not shown).

3.5. MeHg has no effect on the ATP-synthase complex assembly

To understand the molecular mechanisms of mitochondrial ATP synthesis alteration by MeHg contamination, and being given the relationship between supramolecular organization of ATP synthase and cristae morphology (Paumard et al., 2002; Arselin et al., 2004), we analyzed the oligomeric state and composition of the F1F0-ATP synthase complexes. To this aim, mitochondrial fractions were isolated from skeletal muscles, mitochondrial complexes were sol-

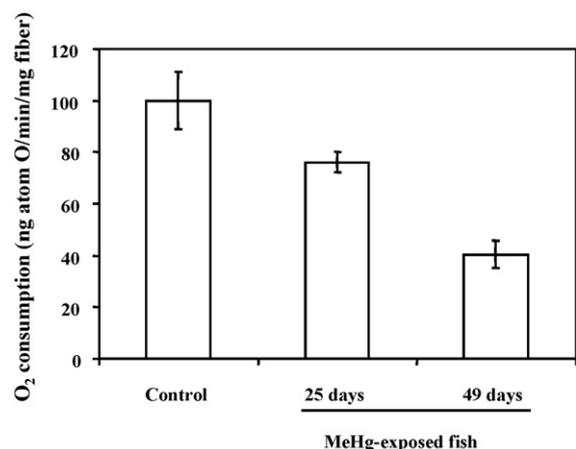


Fig. 3. Dietary MeHg inhibits cytochrome c oxidase activity in zebrafish muscles. Cytochrome c oxidase activity in permeabilized muscle fibers was measured as described in Section 2. Electrons were directly supplied to complex IV by addition of ascorbate and TMPD in the presence of complex I and II inhibitors, rotenone and antimycin, respectively. Results are given in percentage of the value measured for control fish which display a cytochrome c oxidase activity of 6.8 ± 1.3 ng atom O/min/mg fiber ($n=8$).

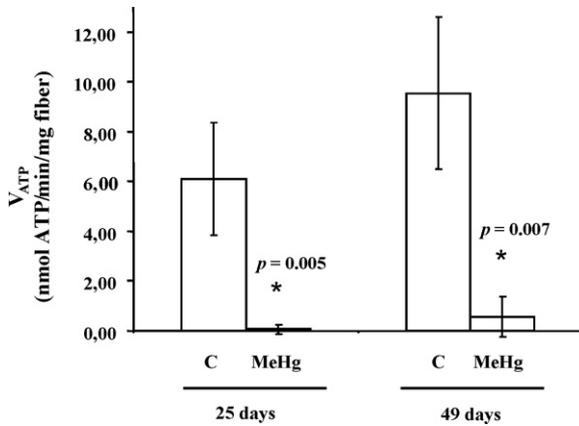


Fig. 4. Dietary MeHg triggers an impairment of ATP release by permeabilized muscle fibers. The rate of ATP release by muscle fibers is given in nmol ATP/min/mg fiber, with pyruvate and malate as respiratory substrate for control (C) and contaminated (MeHg) fish after 25 and 49 days of exposure ($n = 3$ for each condition).

ubilized with digitonin and analyzed by BN-PAGE. The hydrolytic activity of ATP synthase was revealed in the gel. We observed no significant differences between control and contaminated mitochondrial fractions after either 25 days (data not shown) or 49 days exposure time (Fig. 5A). Both the amount and the oligomeric state of this complex were not affected by MeHg contamination. When colored with Coomassie blue, the BN-PAGE showed that the quantity, the assembly, and the oligomerization of the various macromolecular complexes in the mitochondrial membranes did not present major changes (Fig. 5B).

3.6. Analysis of the electron transport chain complex content

To study the possible impact of MeHg on the steady-state abundance of the mitochondrial respiratory chain complexes, Western blotting analysis was carried out on mitochondrial protein frac-

Table 3

Levels of various proteins within mitochondrial fractions of zebrafish muscles after dietary contamination with MeHg^a

Proteins	Control	MeHg-treated 25 days	MeHg-treated 49 days
NADH dehydrogenase, 30 kDa subunit	100 ± 7	117 ± 23	87 ± 18
Succinate dehydrogenase, Fe/S subunit	100 ± 11	95 ± 17	131 ± 9
Cytochrome c oxidase subunit IV	100 ± 10	87 ± 23	59 ± 10
ATP synthase, subunit α	100 ± 16	96 ± 5	130 ± 11

^a Results are given relative to the control fish protein levels. These were normalised to the porin levels and set to the value of 100 (mean ± standard error; $n = 6$ and correspond to three data acquisitions based on camera recording of chemiluminescent emission of two independent Western blots).

tions, using appropriate monoclonal antibodies directed against discrete subunits of complex I, II, IV, and V. Complex III could not be analyzed since no monoclonal antibodies directed against mammalian complex III subunits cross-reacted with the cognate zebrafish counterparts. Porin was used as a standard, monitoring the quantity of mitochondrial proteins loaded onto each lane. The analyzed subunit of complex I displayed almost the same quantities in control and contaminated mitochondrial fractions for both exposure times. Cytochrome c oxidase subunit IV (complex IV) was less abundant in contaminated fractions than in control ones at day 49 with a mean decrease of about 40%, whereas the ATP synthase subunit F_1F_0 -α (complex V) and the succinate dehydrogenase Fe/S subunit (complex II) were more represented in contaminated fractions as compared to control ones at the longest exposure time with a mean increase of around 30% (Fig. 6 and Table 3).

3.7. Electron transport chain complex gene expression analysis

The electron transport chain gene expression study confirmed that of protein contents (Table 4). NADH dehydrogenase 30 kDa

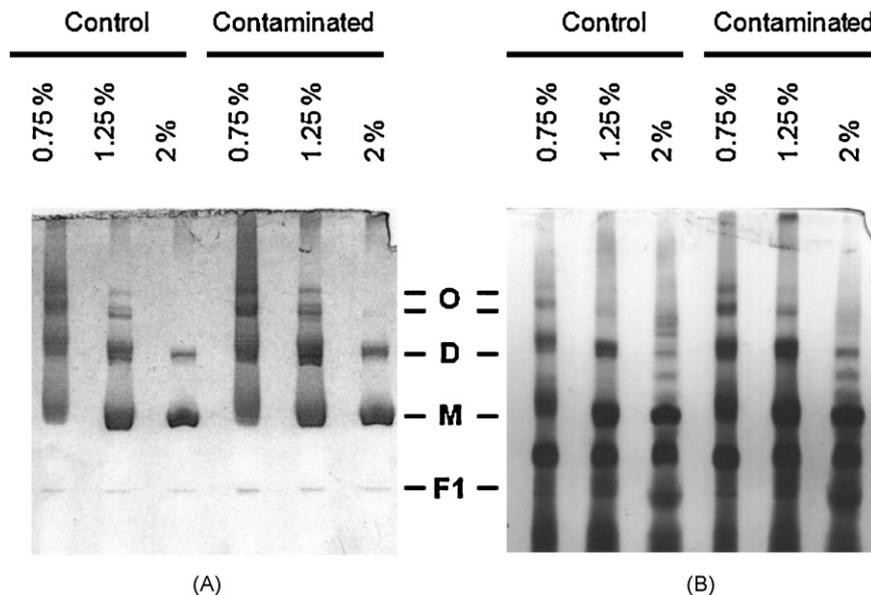


Fig. 5. BN-PAGE of mitochondrial protein fractions prepared from muscle collected on control and contaminated (49 days contamination time) fish. The mitochondria complexes were solubilized at different digitonin concentrations (0.75, 1.25 or 2%, w/v). (A) In gel ATPase activity staining; (B) Coomassie blue protein staining. F1: F1 subcomplex of ATP synthase; M: ATP synthase monomer; D: ATP synthase dimer; O: ATP synthase oligomers. Note that the apparent differences in the intensity of blue Coomassie stained complexes and proteins between control and contaminated samples reflect differences in the total amount of mitochondrial proteins loaded onto the gel due to differences in the purity grade of the crude mitochondria preparations. The overall composition and relative content of the respiratory chain complexes appeared the same in both control and contaminated samples.

Table 4
Differential gene expression observed in zebrafish muscles after dietary contamination with MeHg^a

Genes	Control 25 days	Contaminated 25 days	Response factor ^b	Control 49 days	Contaminated 49 days	Response factor ^b
<i>zgc:112520</i>	1.7 ± 0.3	2.4 ± 1.7	1.4	1.1 ± 0.6	1.1 ± 0.5	1
<i>sdh(Fe/S)</i>	0.05 ± 0.003	0.08 ± 0.02	1.6	0.01 ± 0.01	0.05 ± 0.04	5
<i>cytb</i>	282 ± 79	147 ± 40	0.5	354 ± 82	179 ± 81	0.5
<i>coxIV</i>	16 ± 2	27 ± 16	1.7	15 ± 4	12.5 ± 5	0.8
<i>atp5a1</i>	2.9 ± 0.2	3.6 ± 0.9	1.2	0.7 ± 0.4	1.2 ± 0.8	1.7
<i>atp5f1</i>	5.4 ± 0.4	4 ± 1	0.8	3.5 ± 1.1	3.4 ± 1.6	1
<i>coxI</i>	139 ± 51	203 ± 71	1.5	311 ± 53	83 ± 11	0.3 ^c

^a Results are given relative to the β -actin gene expression level (mean \pm standard error; $n = 3$).

^b Response factor was the ratio between values of contaminated fish to those of control.

^c Significant differential expression as compared to the control fish ($p < 0.05$).

subunit gene expression was not differentially affected by MeHg. ATP synthase subunit F₁F₀- α and complex II Fe/S subunit genes exhibited a 1.7- and 5-fold increase in expression after 49 days, respectively, whereas the cytochrome *b* gene expression was lowered by two times after 49 days. Nevertheless, due to the high measure variability, these mean differential expressions were not statistically significant. The *coxI* gene expression decreased five times after 49 days of exposure and this was statistically significant.

4. Discussion

To investigate the cellular toxicity of MeHg exposure, we analyzed the skeletal muscle of *D. rerio* fed with this compound. The concentration used in our study is in accordance with values measured in piscivorous fish from contaminated areas such as French Guyana. We focused our investigation on the analysis of the muscle mitochondrion. Observation of muscle section from contaminated fish by electron microscopy revealed an abnormal structure of the organelle with differences in cristae shape and the apparition of membrane blobbing. This is in agreement with findings reported on kidney OK cells treated for 9 h with 15 μ M HgCl₂ (Carranza-Rosales et al., 2005). The authors suggested that these alterations

represent highly specific pre-apoptotic lesions that are manifested prior to the execution of the apoptotic program. Other authors have also reported the presence of asymmetrical mitochondria with herniations of the external membrane, as well as disorganization of the internal membrane with partial or complete loss of the structure of the cristae. These damages were attributed to pre-apoptotic lesions (Angermuller et al., 1998; Mootha et al., 2001). Worth to note we have observed the induced expression of the pro-apoptotic *c-jun* and *bax* genes in muscles of zebrafish contaminated for three weeks with dietary methylmercury (Gonzalez et al., 2005). It has been demonstrated that the association of ATP synthase dimers and oligomers is required for the correct folding of the inner mitochondrial membrane that forms cristae (Paumard et al., 2002; Arselin et al., 2004). We show here that there are no differences in supramolecular ATP synthase organization between control and contaminated zebrafish muscle mitochondria. Therefore, the mitochondrial disorders observed in contaminated zebrafish muscle are not due to a defective ATP synthase dimerization/oligomerization process.

Dietary MeHg is here shown to decrease state 3 mitochondrial respiration, COX activity, and the rate of ATP production accumulation in red skeletal muscles permeabilized fibers. After 49 days of contamination, the COX specific activity had dropped to 40% of the control. However this decrease has almost no repercussion on the state 4 respiration level due to the existence of a high excess of COX activity in mitochondria (Rossignol et al., 2003; Gnaiger et al., 1998). This excess normally provides a safety margin to the oxidative phosphorylation system.

The toxic action of MeHg on the mitochondria is also illustrated by the decreased expression of *coxI* gene at day 49. We have already shown that *coxI* gene expression could be a valuable biomarker of heavy metal contamination in marine and freshwater bivalves (Achar-Joris et al., 2006). MeHg also provoked a decreased amount of COX IV subunit protein within mitochondrial membranes, and this could partially explain the decreased COX activity. The toxic influence of MeHg could bear on a decreased half-life of the related proteins, or an inhibition of their mRNA translations. Similarly, it has been recorded that in rat brains exposed to MeHg, the effects of MeHg on mitochondria are preceded by inhibition of protein synthesis (Yoshino et al., 1966).

Analysis of the respiratory chain content also revealed a decrease of about 40% of the amount of complex IV subunits IV. This can partially explain the decreased activity of this complex, suggesting that MeHg could trigger a direct inhibition of COX activity. Previous studies indicate a possible intervention of oxygen reactive species in this process (Usuki et al., 1998; Berntssen et al., 2003). It has been reported that in rats given MeHg orally at a concentration of 5 mg/kg per day for 12 days, mitochondria of skeletal muscles were affected by a decrease in COX and succinate dehydrogenase (SDH) activities (Usuki et al., 1998). When rats were given a MeHg–glutathione complex (1:1) solution at a con-

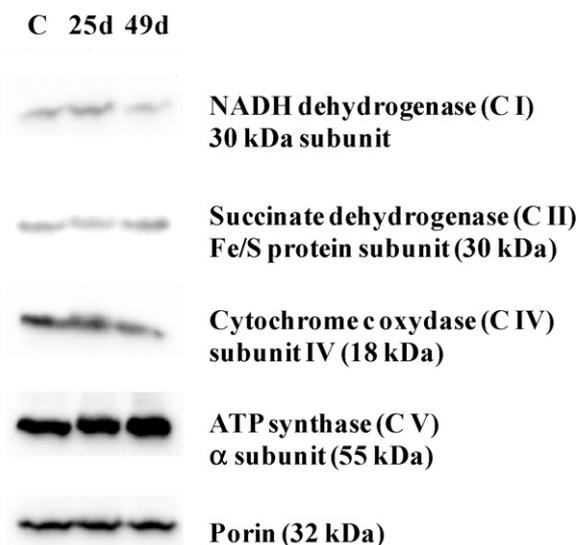


Fig. 6. Western blot of mitochondrial fractions using monoclonal antibodies directed against specific subunits of mitochondrial respiratory complexes: CI (NADH dehydrogenase, 30 kDa subunit), CII (succinate dehydrogenase Fe/S protein subunit), CIV (cytochrome c oxidase subunit IV) and CV (ATP synthase, subunit α). Mitochondrial outer membrane porin was used as a reference protein. Complex III was not tested since no zebra fish reacting antibodies against this complex are available. C: Control mitochondrial fractions, 25d and 49d: muscle mitochondrial fractions prepared from fish exposed to MeHg for 25 and 49 days, respectively.

centration of 20 mg/l every day for 28 days, an increased catalase activity and a decreased glutathione peroxidase (GPX) activity were observed in addition to the COX and SDH inhibitions. Moreover, treatment with Trolox, a water soluble vitamin E analog, restored normal levels of catalase and GPX activities, and protected MeHg-treated rat skeletal muscle against the decrease in mitochondrial enzyme activities despite the retention of MeHg (Usuki et al., 2001). These results meant that MeHg provoked an oxidative stress, in turn inhibiting mitochondrial energy metabolism. In this last study, rats were orally taking 600 µg Hg/day making an exposure dose of 2 mg Hg/kg/day, and at day 28 rats accumulated 10.7 µg Hg/g in their muscles. In the present study, by exposing zebrafish to 0.7 mg Hg/kg/day, the level of Hg within muscles reached 25.4 µg/g after 25 days. Therefore, zebrafish is at least as good mercury accumulator as rat, if not better. In salmon brains (*Salmo salar*), an increased activity levels of SOD enzymes was shown in fish fed on 5 or 10 µg MeHg/g for 4 months (Berntssen et al., 2003). Methylmercury can modify proteins due to direct chemical binding to proteinaceous thiols and through generation of an oxidative stress resulting in protein carbonylation. Accordingly, proteins displaying accessible thiols – i.e. subunits of the respiratory chain complexes, ADP/ATP translocase, Pi carrier – are susceptible to oxidative stress and to MeHg binding, and therefore are likely to present a decreased efficiency. Therefore, this would result in an altered energetic metabolism. Worth to note, it was also observed in zebrafish the MeHg-mediated settlement of an oxidative stress reflected by an overexpression of cytoplasmic and mitochondrial SOD isoform genes (Gonzalez et al., 2005). Alterations in respiration have also been observed in guinea pig brain slices at high concentrations of MeHg (Fox et al., 1975) or in mitochondria isolated from rat liver (Sone et al., 1977). More generally, *in vitro* studies indicate that MeHg inhibits several mitochondrial enzymes and decreases the mitochondrial transmembrane potential subsequently reducing ATP production and Ca²⁺ buffering capacity (Atchison and Hare, 1994). Here, a collapse of ATP release was observed in contaminated muscle fibers, reflecting an imbalance between ATP synthesis and utilization. Analysis of the content in ATP synthase complex showed that it was present at normal or slightly increased levels in mitochondria and was fully active at least for its hydrolytic activity. In contaminated muscle fibers, state 3 respiration was strongly decreased leading to a decreased proton motive force and, as a consequence, a decreased in ATP synthesis rate.

A puzzling result in our study is the fact that despite MeHg accumulation, and its strong effects on mitochondrial metabolism, no observable impact was seen at the scale of the individuals, since even after 63 days no increase in mortality or decrease in motility was evidenced. It could be that this time of contamination is too short, and that the possible onset of pathological evidence arrives later. In keeping with this it has been shown in salmon brain fed with 10 µg MeHg/g that the first molecular effects were observable only after 4 months (Berntssen et al., 2003).

It could be opposed that the present results obtained in zebrafish muscles cannot directly indicate cell toxicity in rodent or human muscles. However, when comparing the Hg concentrations impairing cell life among cell lines from various origins, no gross differences can be observed: the cell viability (LC₅₀) of human T lymphocytes, neurons, astrocytes, and neuroblastoma cells was impaired after a 24 h exposure to MeHg concentrations equal to 8, 6.5, 8.1, and 6.9 µM, respectively (Shenker et al., 1992; Sanfeliu et al., 2001); for a mouse neural cell line, 45% of cell death was recorded with 2 µM MeHg after 24 h (Tamm et al., 2006); for rat splenocytes and leukocytes, cytolethality was observed at 8 µM MeHg after 24 h (Omara et al., 1998); for rabbit renal cells, the LC₅₀ was 6.1 µM at 24 h (Aleo et al., 1992); for mosquito cells, the LC₅₀ was 5.5 µM MeHg at 24 h (Braeckman et al., 1997); and for the yeast

Saccharomyces cerevisiae, the minimal inhibitory concentration of MeHg was 2 µM after 24 h (Naganuma et al., 2000). Remarkably, these concentrations are ranging between 2 and 8 µM MeHg whatever the organism, from yeast to man, and for different cell types. The observed differences in susceptibility to MeHg and onset of symptoms among various species including primates and rodents is therefore not linked to differences in tissue cell sensitivity to MeHg, but rather to differences in MeHg trophic transfer rates and distribution within the organisms. In addition, zebrafish is now used as a model organism to study mitochondrial pathologies since a COX deficiency in this fish resulted in severe phenotypes previously observed in human pathologies linked to genetic mitochondrial disorders (Baden et al., 2007).

This study shows that mitochondrial bioenergetics can be disturbed by low levels of MeHg, typically in the range of those encountered by fish in their environments over long periods. This sensitivity of zebra fish muscle mitochondrial respiration to MeHg contamination, which is observed well before any impact at the level on the individuals is detected, could be used as a tool for monitoring mercurial pollution in ecosystems. Indeed, it just relies on a fast and simple tissue preparation protocol and needs only a Clark electrode and a luminometer.

References

- Achard-Joris M, Gonzalez P, Marie V, Baudrimont M, Bourdineaud JP. Cytochrome c oxidase subunit I gene is up-regulated by cadmium in freshwater and marine bivalves. *Biometals* 2006;19:237–44.
- Aleo MD, Taub ML, Kostyniak PJ. Primary cultures of rabbit renal proximal tubule cells. III. Comparative cytotoxicity of inorganic and organic mercury. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992;112:310–7.
- Angermuller S, Kunstle G, Tiegs G. Pre-apoptotic alterations in hepatocytes of TNF α -treated galactosamine-sensitized mice. *J Histochem Cytochem* 1998;46:1175–83.
- Arselin G, Vaillier J, Graves PV, Velours J. ATP synthase of yeast mitochondria. Isolation of the subunit h and disruption of the ATP14 gene. *J Biol Chem* 1996;271:20284–90.
- Arselin G, Vaillier J, Salin B, Schaeffer J, Giraud MF, Dautant A, et al. The modulation in subunits e and g amounts of yeast ATP synthase modifies mitochondrial cristae morphology. *J Biol Chem* 2004;279:40392–9.
- Atchison WD, Hare MF. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity. *FASEB J* 1994;8:622–9.
- Baden KN, Murray J, Capaldi RA, Guillemin K. Early developmental pathology due to cytochrome c oxidase deficiency is revealed by a new zebrafish model. *J Biol Chem* 2007;282:34839–49.
- Berntssen MH, Aatland A, Handy RD. Chronic dietary mercury exposure causes oxidative stress, brain lesions, and altered behaviour in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Aquat Toxicol* 2003;65:55–72.
- Braeckman B, Raes H, Van Hove D. Heavy-metal toxicity in an insect cell line. Effects of cadmium chloride, mercuric chloride and methylmercuric chloride on cell viability and proliferation in *Aedes albopictus* cells. *Cell Biol Toxicol* 1997;13:389–97.
- Carranza-Rosales P, Said-Fernandez S, Sepulveda-Saavedra J, Cruz-Vega DE, Gandolfi AJ. Morphologic and functional alterations induced by low doses of mercuric chloride in the kidney OK cell line: ultrastructural evidence for an apoptotic mechanism of damage. *Toxicology* 2005;210:111–21.
- Cordier S, Grasmick C, Paquier-Passelaigue M, Mandereau L, Weber JP, Jouan M. Mercury exposure in French Guiana: levels and determinants. *Arch Environ Health* 1998;53:299–303.
- Cordier S, Garel M, Mandereau L, Morcel H, Doineau P, Gosme-Seguret S, et al. Neurodevelopmental investigations among methylmercury-exposed children in French Guiana. *Environ Res* 2002;89:1–11.
- Durrieu G, Maury-Brachet R, Boudou A. Goldmining and mercury contamination of the piscivorous fish *Hoplias aimara* in French Guiana (Amazon basin). *Ecotoxicol Environ Saf* 2005;60:315–23.
- Fox JH, Patel-Mandlik K, Cohen MM. Comparative effects of organic and inorganic mercury on brain slice respiration and metabolism. *J Neurochem* 1975;24:757–62.
- Fréry N, Maury-Brachet R, Maillot E, Deheeger M, de Merona B, Boudou A. Goldmining activities and mercury contamination of native amerindian communities in French Guiana: key role of fish in dietary uptake. *Environ Health Perspect* 2001;109:449–56.
- Gnaiger E, Lassnig B, Kuznetsov A, Rieger G, Margreiter R. Mitochondrial oxygen affinity, respiratory flux control and excess capacity of cytochrome c oxidase. *J Exp Biol* 1998;201:1129–39.
- Gonzalez P, Dominique Y, Massabuau JC, Boudou A, Bourdineaud JP. Comparative effects of dietary methylmercury on gene expression in liver, skeletal muscle, and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Sci Technol* 2005;39:3972–80.

- Grandier-Vazeille X, Guerin M. Separation by blue native and colorless native polyacrylamide gel electrophoresis of the oxidative phosphorylation complexes of yeast mitochondria solubilized by different detergents: specific staining of the different complexes. *Anal Biochem* 1996;242:248–54.
- Grandjean P, Weihe P, White RF, Debes F, Araki S, Yokoyama K, et al. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol* 1997;19:417–28.
- Harada M. Neurotoxicity of methylmercury: Minamata and the Amazon. In: Yasui M, Strong MJ, Ota K, Verity MA, editors. *Mineral and metal neurotoxicology*. London: CRC Press; 1997. p. 177–88.
- Itoi S, Kinoshita S, Kikuchi K, Watabe S. Changes of carp FoF1-ATPase in association with temperature acclimation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;284:R153–163.
- Letellier T, Malgat M, Coquet M, Moretto B, Parrot-Roulaud F, Mazat JP. Mitochondrial myopathy studies on permeabilized muscle fibers. *Pediatr Res* 1992;32:17–22.
- Mootha VK, Wei MC, Buttle KF, Scorrano L, Panoutsakopoulou V, Mannella CA, et al. A reversible component of mitochondrial respiratory dysfunction in apoptosis can be rescued by exogenous cytochrome c. *EMBO J* 2001;20:661–71.
- Naganuma A, Miura N, Kaneko S, Mishina T, Hosoya S, Miyairi S, et al. GFAT as a target molecule of methylmercury toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *FASEB J* 2000;14:968–72.
- Omara FO, Flipo D, Brochu C, Denizeau F, Brousseau P, Potworowski EF, et al. Lack of suppressive effects of mixtures containing low levels of methylmercury (MeHg), polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDS), polychlorinated dibenzofurans (PCDFS), and arochlor biphenyls (PCBS) on mixed lymphocyte reaction, phagocytic, and natural killer cell activities of rat leukocytes in vitro. *J Toxicol Environ Health A* 1998;54:561–77.
- Paumard P, Vaillier J, Couлары B, Schaeffer J, Soubannier V, Mueller DM, et al. The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J* 2002;21:221–30.
- Rossignol R, Faustin B, Rocher C, Malgat M, Mazat JP, Letellier T. Mitochondrial threshold effects. *Biochem J* 2003;370:751–62.
- Sanfeliu C, Sebastia J, Ki SU. Methylmercury neurotoxicity in cultures of human neurons, astrocytes, neuroblastoma cells. *Neurotoxicology* 2001;22:317–27.
- Schägger H, von Jagow G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* 1991;199:223–31.
- Shenker BJ, Berthold P, Decker S, Mayro J, Rooney C, Vitale L, et al. Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes. II. Alterations in cell viability. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1992;14:555–77.
- Sone N, Larsstuvold MK, Kagawa Y. Effect of methyl mercury on phosphorylation, transport, and oxidation in mammalian mitochondria. *J Biochem* 1977;82:859–68.
- Tamm C, Duckworth J, Hermanson O, Ceccatelli S. High susceptibility of neural stem cells to methylmercury toxicity: effects on cell survival and neuronal differentiation. *J Neurochem* 2006;97:69–78.
- Usuki F, Yasutake A, Matsumoto M, Umehara F, Higuchi I. The effect of methylmercury on skeletal muscle in the rat: a histopathological study. *Toxicol Lett* 1998;94:227–32.
- Usuki F, Yasutake A, Umehara F, Tokunaga H, Matsumoto M, Eto K, et al. In vivo protection of a water-soluble derivative of vitamin E, Trolox, against methylmercury-intoxication in the rat. *Neurosci Lett* 2001;304:199–203.
- Wiener JG, Krabbenhoft DP, Heinz GH, Scheuhammer AM. Ecotoxicology of mercury. In: Hoffman DJ, Rattner BA, Burton GA, Cairns J, editors. *Handbook of ecotoxicology*. Boca Raton, FL, USA: Lewis Publishers; 2003. p. 409–63.
- Wittig I, Braun HP, Schägger H. Blue native PAGE. *Nat Protoc* 2006;1:418–28.
- Yoshino Y, Mozai T, Nakao K. Biochemical changes in the brain in rats poisoned with an alkylmercury compound, with special reference to the inhibition of protein synthesis in brain cortex slices. *J Neurochem* 1966;13:1223–30.

Tableau 7 : Numéro d'accèsion et couples d'amorce spécifiques pour les 7 gènes du poisson zèbre utilisés pour l'étude bioénergétique.

gènes	Numéro d'accèsion	Amorces (5'–3')
<i>atp5a1</i>	NM_001077355	GGCCTACCCCGGTGAC ^a CGGGACGGATAACCTTGT ^b
<i>atp5f1</i>	NM_001005960	GTGTGACAGGGCCTTATATGC ^a CTGAGCCTTTGCTATTTTATCCGC ^b
<i>β-actine</i>	NM_131031	AAGTGCACGACGTGGACA ^a GTTTAGGTTGGTCGTTCTTTGA ^b
<i>coxIV</i>	NM_214701	AGAGTGGAAATCTGTGGTTGC ^a CCAAGCGTTGTTTCATAGTCCC ^b
<i>cytb</i>	AJ388456	CGCCATTCTACGATCTATCCC ^a GGTGTCTACTGGTATCCCTCC ^b
<i>sdh (Fe/S)</i>	XM 685549	GGACAGCACACTGACCTT ^a GTTGCTCATGTCGGGCAC ^b
<i>ndufs3</i>	NM_001017755	AGACGCATCTTGACAGATTATGG ^a CCCCCGGTATGCAGGA ^b

Abbreviations: *atp5a1*: ATP synthase, complexe mitochondrial F1, sous-unité α; *atp5f1*: ATP synthase, complexe mitochondrial F0, sous-unité b; *β-actine*: β-actine; *coxIV*: cytochrome c oxydase sous-unité IV; *cytb*: cytochrome b mitochondrial ; *sdh(Fe/S)*: succinate déshydrogénase, protéine Fe/S sous-unité B; *ndufs3* : NADH déshydrogénase (ubiquinone) Fe-S protéine 3.

^a Amorce sens.

^b Amorce antisens.

II/ Etude sur le cerveau.

Introduction

La compréhension des mécanismes de toxicité du MeHg sont d'un intérêt fondamental pour pouvoir établir des stratégies permettant de s'en protéger. Une des cibles principales de la toxicité du MeHg est le système nerveux central où il provoque des altérations de la structure du tissu ainsi que des dysfonctionnements biochimiques. Comme présenté dans le chapitre II, le MeHg est connu pour causer des dérèglements au niveau des synapses de type glutamatergique et GABAnergique, mais conduit également à des dérèglements de l'homéostasie cellulaire du calcium. L'homéostasie du calcium est un élément très important dans la régulation des mécanismes cellulaires avec plus particulièrement le métabolisme mitochondrial. La mitochondrie permet de maintenir la concentration en calcium dans le cytosol par pompage mais si la concentration en Ca^{2+} devient trop importante dans la matrice mitochondriale, ceci amène la génération d'ERO, augmente la perméabilité des membranes, le relargage de cytochrome *c*, et finalement conduit à l'apoptose cellulaire. Qui plus est, le MeHg est reconnu pour générer des espèces réactives de l'oxygène qui seraient un des facteurs majeurs de la toxicité de ce métal. Cette dérégulation de l'homéostasie du calcium conjuguée à la génération d'un stress oxydant semble indiquer que la mitochondrie est un élément important impliqué dans la toxicité du MeHg. Plus de 40 % du MeHg dans le cerveau s'accumule dans un premier temps au niveau des mitochondries pendant les premières 48 heures. Il a été montré que le MeHg a aussi la particularité d'inhiber la respiration mitochondriale des synaptosomes du striatum (Dreiem *et al.*, 2005). Des études menées sur le muscle squelettique ont révélé des atteintes au niveau structural des mitochondries avec une désorganisation des crêtes mitochondriales, des décollements de la membrane externe et une diminution de leur surface (de Oliveira *et al.*, 2007). *In vitro*, des cellules d'insectes contaminées au MeHg montrent des altérations au niveau des mitochondries qui se condensent ou encore gonflent (Braeckman and Raes, 1999). Dans notre étude cet aspect de la toxicité du MeHg vis-à-vis des mitochondries a été exploré au niveau du cerveau chez des poissons exposés au MeHg par voie trophique à 13,5 µg Hg/g. Pour mener à bien cette approche, différentes techniques ont été utilisées regroupant l'autométallographie, la bioénergétique, l'analyse protéique et la génétique (Tableau 7).

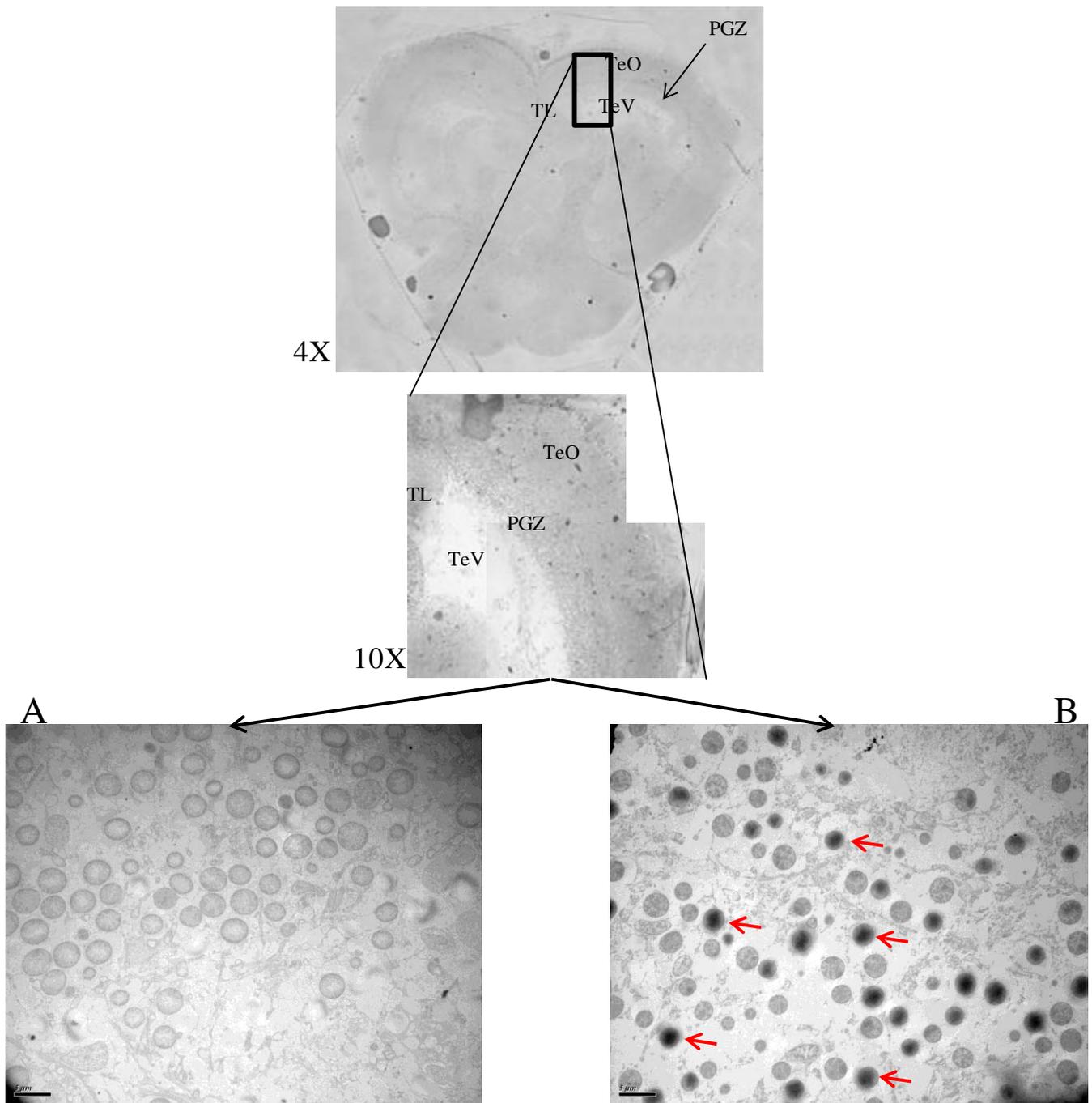


Figure 22 : Détection du Hg par autométallographie en microscopie électronique à transmission sur cerveau témoin (A) et contaminé (B) du poisson zèbre après contamination par voie alimentaire au MeHg pendant 63 jours. Les barres d'échelle correspondent à 5 μm . Les quelques flèches rouges montrent un exemple de marquage par autométallographie chez les individus contaminés. PGZ: Zone Grise Périventriculaire du tectum optique, TeO: Tectum Optique, TeV: Ventricule du Tectum optique, TL: Taurus Longitudinalis

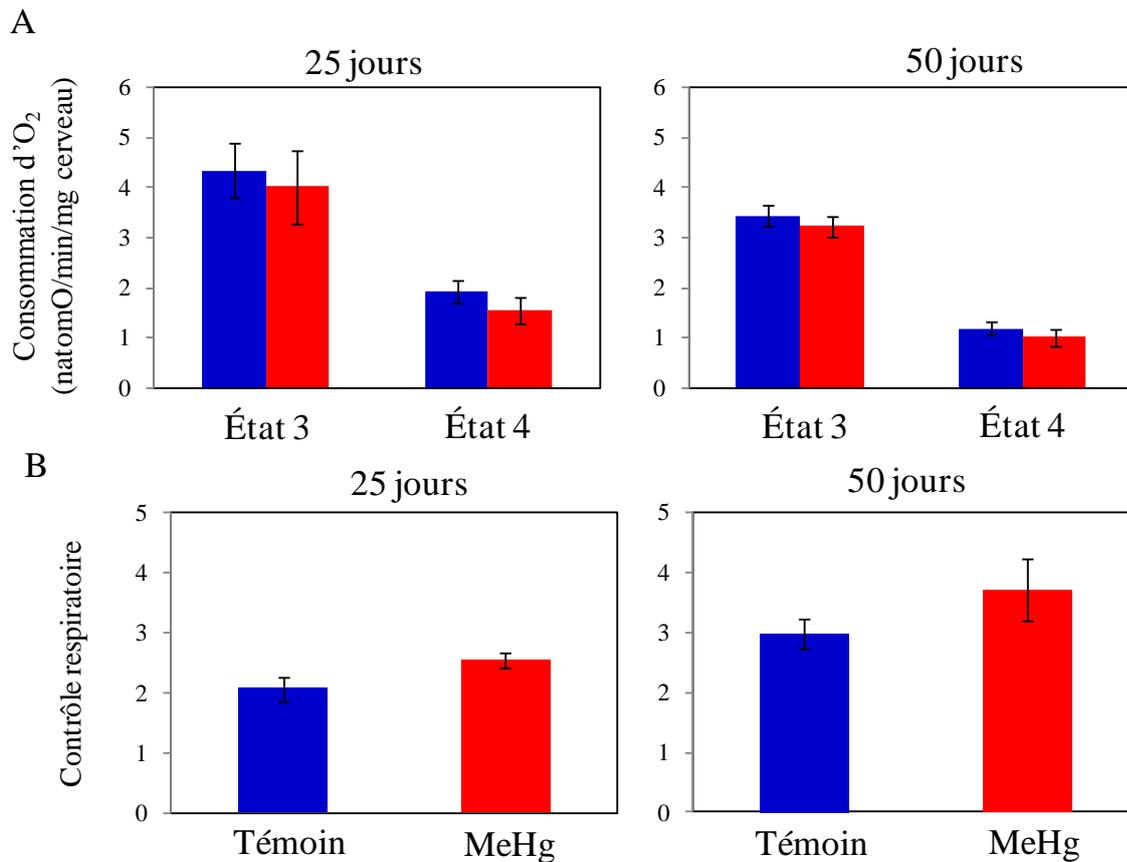


Figure 23 : L'exposition par voie alimentaire au MeHg ne présente pas d'effet décelable sur la respiration mitochondriale. (A) taux de consommation d'oxygène mesuré sur des broyats de cerveau obtenus à partir de poissons contrôles et contaminés après 25 et 50 jours. La respiration mitochondriale a été stimulée par l'ajout de pyruvate et de malate. (B) Couplage entre la chaîne respiratoire et la synthèse d'ATP n'est pas affecté par le MeHg. Contrôle respiratoire : rapport entre le taux de consommation d'oxygène observé à l'état 3 par rapport à celui observé à l'état 4. Les colonnes bleues correspondent au témoins (moyenne \pm erreur standard ; $n = 5$) ; les colonnes rouges correspondent au contaminés (moyenne \pm erreur standard ; $n = 5$).

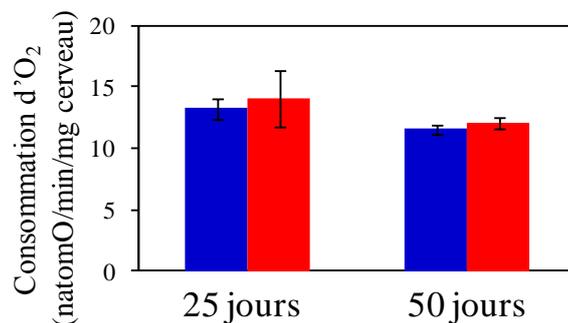


Figure 24 : L'exposition par voie alimentaire au MeHg ne présente pas d'effet sur l'activité de la cytochrome c oxydase du cerveau de poisson zèbre. Les électrons ont été directement fournis au cytochrome c par addition d'ascorbate et de TMPD en présence d'inhibiteurs des complexes 1 et 3, roténone et antimycine. Les résultats sont donnés en natom O/min/mg de fibre (moyenne \pm erreur standard ; $n = 5$).

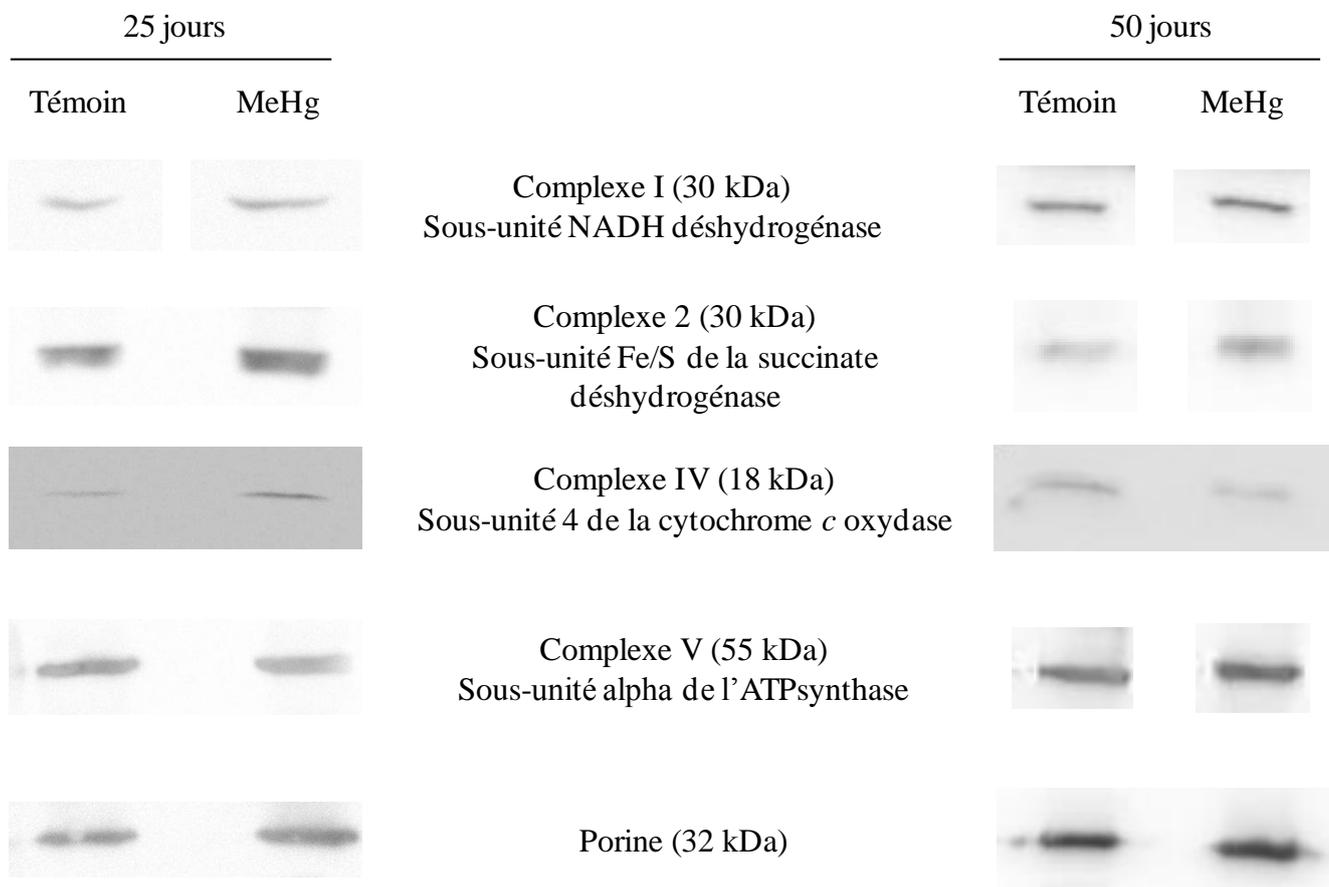


Figure 25 : Analyse Western de la fraction mitochondriale avec des anticorps monoclonaux spécifiquement dirigés contre des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire : Complexe I (sous-unité NADH déshydrogénase, 30 kDa), Complexe II (sous-unité Fe/S de la succinate déshydrogénase), Complexe IV (cytochrome *c* oxydase, sous-unité IV) and Complexe V (ATP synthase, sous-unité α). La porine, protéine de la membrane externe mitochondriale, a été utilisée comme protéine de référence. Le complexe III n'a pas été testé puisqu'aucun anticorps réagissant avec ce complexe n'était disponible pour le poisson zèbre.

Témoin : fraction mitochondriale issue des cerveaux des poissons zèbres de la condition témoin.

MeHg : fraction mitochondriale issue des cerveaux des poissons contaminés au MeHg.

25 et 50 jours correspondent aux temps d'exposition au MeHg.

Résultats

A/ Analyse descriptive du cerveau par microscopie électronique à transmission avec utilisation de la technique d'autométallographie.

L'analyse de la zone grise se situant en dessous du tectum optique a permis de montrer par l'utilisation de l'autométallographie une accumulation du MeHg au niveau des cellules de cette zone (Figure 22). Les observations de microscopie électronique montrent également une désorganisation de la zone correspondant aux cellules marquées par le précipité d'argent. Les clichés de microscopie n'ont pas révélé d'atteinte au niveau de l'organisation ultrastructurale des mitochondries.

B/ Respiration mitochondriale sur broyat de cerveau

La respiration mitochondriale a été mesurée sur des cerveaux de poissons zèbres témoins et contaminés au MeHg (0,6 µg Hg/jour/poisson) pendant 25 et 50 jours. Les substrats respiratoires utilisés étaient le pyruvate et le malate. Il est apparu que cette exposition au MeHg n'avait aucun effet détectable tant au niveau de la respiration à l'état 4, qui correspond à la respiration mitochondriale basale permettant de maintenir le gradient protonique sans qu'il n'y ait synthèse d'ATP, et au niveau de la respiration à l'état 3 obtenue par l'ajout ADP (Figure 23 A). Le calcul du contrôle respiratoire, correspondant au rapport entre le niveau de consommation de l'oxygène à l'état 3 par rapport à l'état 4, ne révèle aucune altération au niveau du couplage de la respiration mitochondriale et la synthèse d'ATP (Figure 23 B).

C/ Effet du MeHg sur l'activité du complexe IV de la chaîne respiratoire

Cette activité du complexe IV a été déterminée par l'ajout d'ascorbate et de TMPD après avoir inhibé le flux d'électron de la chaîne respiratoire par l'ajout de roténone et d'antimycine, bloquant respectivement les complexes I et III. Cette mesure de l'activité maximale du complexe IV n'a cependant pas révélé d'impact du MeHg (Figure 24).

D/ Analyse protéique de l'intégrité des complexes de la chaîne respiratoire

Pour voir si cette absence d'atteinte de la respiration mitochondriale est liée à une adaptation au niveau de la chaîne respiratoire, une analyse de l'abondance des différents complexes de la chaîne respiratoire a été faite par transfert de type Western (Figure 25). Cette analyse Western a été réalisée par utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre des sous-unités des complexes I, II, IV et V. Pour le complexe III, aucune analyse n'a pu être faite

Tableau 8 : Quantification des différents complexes issus de la fraction mitochondriale du cerveau de poissons zèbres après contamination par voie trophique par le MeHg^a

	C ₀	MeHg	
		25 jours	50 jours
Complex I (NDUFS3 30 kDa)	100 ± 23,3	130 ± 11,5	100 ± 12
Complex II (SDHB 30 kDa)	100 ± 18,5	116 ± 28	143 ± 7
Complex IV (COX IV 18 kDa)	100 ± 2	164 ± 21	66 ± 15
Complex V (ATPα 55 kDa)	100 ± 12,6	120 ± 9	117 ± 19

^a Les résultats sont donnés par rapport au niveau de protéine observé chez les poissons témoins. Ceux ci ont été normalisés par rapport au niveau de la porine et ramené à la valeur de 100 % (moyenne ± erreur standard ; $n = 6$ et correspond à trois acquisitions d'émission de chimioluminescence enregistrées par une caméra pour deux westerns indépendants).

Tableau 9 : Expression différentielle des gènes des différents complexes de la chaîne respiratoire obtenue dans le cerveau du poisson zèbre après contamination par voie trophique au MeHg ^a

Gènes	Contrôle 25 jours	Contaminé 25 jours	Facteur d'induction ^b	Contrôle 50 jours	Contaminé 50 jours	Facteur d'induction ^b
<i>NADH dh</i>	$(3,7 \pm 0,3)10^{-5}$	$(2 \pm 1)10^{-5}$	0,5	$(8 \pm 3)10^{-6}$	$(2 \pm 1)10^{-6}$	0,25
<i>Succinate dh</i>	$0,13 \pm 0,04$	$0,11 \pm 0,02$	0,8	$0,03 \pm 0,001$	$0,18 \pm 0,04$	6 ^c
<i>cytb</i>	636 ± 192	250 ± 113	0,4	63 ± 8	65 ± 12	1
<i>cox IV</i>	8 ± 1	$4,6 \pm 1$	0,6	11 ± 2	33 ± 14	3
<i>cox I</i>	19 ± 4	16 ± 3	0,8	$3,8 \pm 1$	$3,6 \pm 0,5$	0,9
<i>atp α</i>	$1,2 \pm 0,5$	$0,9 \pm 0,2$	0,75	$0,5 \pm 0,05$	$0,7 \pm 0,05$	1,4
<i>atp b</i>	$6,2 \pm 1$	12 ± 3	2	$1,6 \pm 0,3$	$1,3 \pm 0,2$	0,8

^a Les résultats sont donnés par rapport au niveau d'expression de la β-actine (moyenne ± erreur standard; $n = 4$ pour 25 jours et $n = 5$ pour 50 jours).

^b Le facteur d'induction est le rapport entre les valeurs obtenues à partir des poissons contaminés par rapport aux contrôles.

^c Expression significativement différente en comparaison aux contrôles (test U de Mann-Whitney, $p < 0,05$).

car nous ne disposons pas d'anticorps anti-complexe III. La référence utilisée pour contrôler la quantité de protéine mitochondriale chargée sur chaque piste du gel était la porine. Les analyses de la sous-unité du complexe I et de la sous-unité du complexe V ont montré une même quantité de ces deux complexes dans la fraction mitochondriale du contrôle et celle des contaminés pour les deux temps d'exposition. En ce qui concerne la sous-unité 4 de la cytochrome *c* oxydase (COX4) (complexe IV), elle se trouve être plus abondante chez les contaminés après 25 jours d'exposition, environ 60 %, pour finalement se retrouver moins abondante au temps 50 jours d'exposition avec une diminution de 23 %. En ce qui concerne la sous-unité Fe/S de la succinate déshydrogénase (complexe II), elle se retrouve en plus forte quantité, soit 40% au temps 50 jours d'exposition comparé à la condition témoin (Tableau 8).

E/ Etude de l'expression des gènes codant pour les complexes constituant la chaîne de transport des électrons

L'analyse de l'expression de gènes correspondant aux complexes V et II sont en accord avec les résultats obtenus lors de l'analyse protéique. L'expression des gènes codant pour les sous-unités α et β de l'ATP synthase n'est pas altérée par le MeHg. Le gène codant pour la sous-unité Fe/S de la succinate déshydrogénase est quant à lui significativement surexprimé 6 fois après 50 jours de contamination (Tableau 9). Pour les autres gènes étudiés, la haute variabilité des mesures ne permet pas de révéler de différences significatives malgré des facteurs d'induction ou de répression supérieurs à 2.

Discussion

Dans le but de comprendre les effets du MeHg au niveau du système nerveux central, des poissons zèbres ont été contaminés par voie trophique. Cette contamination s'est étalée sur 50 jours avec un point de prélèvement intermédiaire à 25 jours. Lors de cette approche l'étude avait pour objectif d'aborder la toxicité du MeHg au niveau mitochondrial à une dose d'exposition que peuvent subir des poissons piscivores dans des milieux contaminés par ce composé. Une première approche par microscopie électronique à transmission a mis en évidence une accumulation du Hg au niveau de cellules nerveuses présentes dans la zone grise périventriculaire du tectum optique (PGZ). Ces observations ont également montré une désorganisation du tissu dans cette région. Ces altérations au niveau de la PGZ peuvent être à l'origine de perturbations du champ visuel chez le poisson et montrent bien l'impact du MeHg sur cette région du cerveau. Mais de façon surprenante, l'analyse des mitochondries dans cette région du cerveau ne montre pas d'altération de leurs ultrastructures contrairement aux

mitochondries présentes dans les fibres rouges du muscle squelettique qui arborent des désorganisations de crêtes et des gonflements entre les membranes externe et interne (Cambier *et al.*, 2008, de Oliveira *et al.* 2007). Néanmoins, les cellules nerveuses exposées au MeHg dans des conditions *in vivo* ou *in vitro* se sont montrées sensibles à ce toxique. L'une des principales cibles de ce toxique au sein du tissu nerveux s'est révélée être la mitochondrie. Des mitochondries présentes au niveau des synaptosomes du striatum ont leur activité inhibée à la suite d'une exposition au MeHg et cette inhibition est dépendante de la dose (Dreiem *et al.*, 2005).

Cependant, lors de notre analyse, aucune perturbation dans la respiration mitochondriale ne fut détectée à l'état 3 et à l'état 4. L'activité des complexes de la chaîne respiratoire est pourtant affectée par le MeHg dans d'autres tissus tels que le muscle et le foie. Dans le muscle, le MeHg interfère sur le bon fonctionnement de la chaîne de transport des électrons avec une inhibition de la respiration mitochondriale à l'état 3 mais inhibe aussi en partie l'activité de la COX (Cambier *et al.*, 2008). Cet impact du MeHg sur la COX a également été observé lors d'une étude sur le rat où l'activité de ce complexe de la chaîne respiratoire était inhibée (Usuki *et al.*, 1998). L'analyse plus particulière de la COX au niveau du cerveau après les deux temps d'exposition ne révèle aucune altération dans son activité et les analyses génétiques et protéiques ne font ressortir aucun effet qui soit significatif après l'exposition au MeHg. Cette absence de réponse concernant la COX est en accord avec ce qui a été précédemment observé lors de la simple analyse de l'expression génétique de la sous-unité 1 de COX (Gonzalez *et al.*, 2005).

La COX qui a déjà été présentée comme un bon indicateur d'une exposition à un stress métallique ne semble pas être sensible au MeHg pour ce tissu particulier qu'est le cerveau à la condition d'exposition utilisée qui est 0,6 µg Hg/jour/poisson.

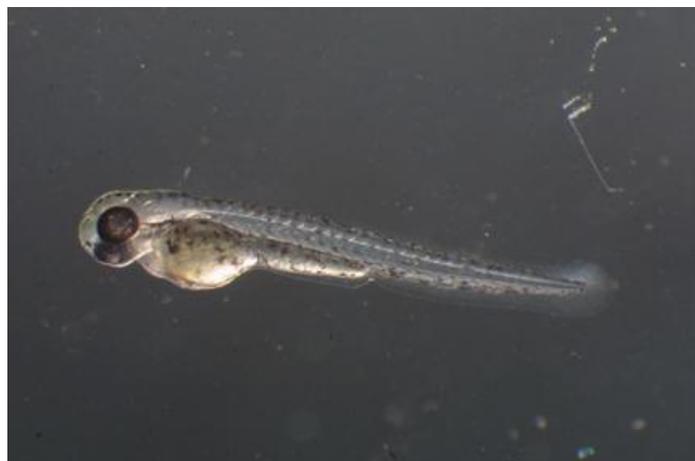
L'effet toxique du MeHg au niveau du contenu de la chaîne respiratoire est tout de même décelé lors de l'analyse protéique avec une augmentation de la quantité de la sous-unité Fe/S du complexe II après 50 jours d'exposition. Chez le rat, à la suite d'une exposition au MeHg par voie orale (5 mg MeHg.kg⁻¹.jour⁻¹) pendant 12 jours, il a été montré une inhibition de l'activité de la succinate déshydrogénase dans le muscle squelettique (Usuki *et al.*, 1998). Le complexe II de la chaîne respiratoire semble donc être une cible importante du mécanisme de toxicité du MeHg. Cette inhibition du complexe II peut être une conséquence des propriétés thiolooprives que peut avoir le MeHg. Cette sous-unité Fe/S est très riche en groupement thiol avec 6 % des acides aminés codant pour des cystéines. Lors d'une étude antérieure, il a été montré que l'ajout de composés possédant des groupements thiol (2-

mercaptoéthanol, glutathion, cystéine, et dithiotreitol) restaurait l'oxydation du succinate en fumarate précédemment inhibé par l'ajout de MeHg (Sone *et al.*, 1977), alors que l'ajout de trolox, un analogue de la vitamine E permettant de neutraliser les ERO, permet une diminution du stress oxydant généré sans restaurer l'activité de la mitochondrie (Dreiem *et al.*, 2007). De plus, cette inhibition avait lieu entre la flavoprotéine de la succinate déshydrogénase et le cytochrome *b* ce qui correspond tout à fait à la sous-unité Fe/S. L'inhibition de cette sous-unité va pouvoir conduire à une altération du métabolisme mitochondrial et causer la génération d'un stress oxydant. Il a été montré que survenait une peroxydation lipidique importante dans le cerveau du saumon atlantique nourri pendant 4 mois avec de la nourriture contaminée au MeHg (10 µg MeHg/g) (Berntssen *et al.*, 2003). Le MeHg est aussi souvent décrit comme un élément causant de nombreux dysfonctionnements mitochondriaux conduisant à une perte du potentiel transmembranaire de la mitochondrie ainsi que dans son rôle de maintien de l'homéostasie du calcium. Lors de l'analyse de l'expression des gènes des transporteurs calciques après 25 jours, les gènes *atp2b3a*, *atp2b3b* et *slc8a2b* sont induits pour ensuite être réprimés ou retourner à un niveau d'expression comparable à la condition contrôle à 50 jours coïncidant avec l'induction de la sous-unité Fe/S de la SDH et du gène de l'enzyme codant pour la GABA transaminase qui permet au final la synthèse de succinate. En dépit de l'absence d'altération au niveau de la respiration mitochondriale et de l'activité de la COX, le MeHg a finalement un impact sur le métabolisme mitochondrial. Cette étude permet également de montrer que le système nerveux central n'est pas dans l'incapacité de se protéger contre la toxicité du MeHg comme semblait le suggérer les études génétiques menées à de faibles concentrations d'exposition. Un point tout de même important à souligner est la complexité du cerveau qui peut conduire à diluer les altérations qui peuvent avoir été causées par un toxique. Lors d'une analyse du système nerveux de rats contaminés au MeHg deux régions ont été étudiées, le cervelet et le cerveau, et le cervelet s'est montré plus sensible avec une diminution de la consommation d'oxygène aux états 3 et 4 et une plus forte production d'ERO (Mori *et al.*, 2007). Or, dans le cas du poisson zèbre il est très difficile de séparer les régions du cerveau afin de les étudier séparément, mais cette sensibilité différente entre les régions du cerveau est appuyée par les observations obtenues en autométallographie.

Chapitre 4



Impact du méthylmercure sur la reproduction du poisson zèbre *Danio rerio*.



Les résultats acquis grâce aux banques SAGE et à l'analyse de l'expression génétique ont permis de conclure que le MeHg altérerait le fonctionnement des mitochondries. Or, cette altération du métabolisme mitochondrial a deux conséquences majeures : la génération d'espèces réactives de l'oxygène et une diminution de la production d'énergie. La reproduction est un mécanisme biologique nécessitant beaucoup de ressources énergétiques et donc fortement dépendant des mitochondries. L'analyse SAGE a également révélé l'induction de la vitellogénine dans le muscle squelettique de poissons mâles alors que l'expression de ce gène est spécifique aux femelles et localisée au niveau du foie. Cela semble donc indiquer que le MeHg en plus de son impact sur le métabolisme énergétique, serait également un perturbateur endocrinien. Ces deux effets combinés suggèreraient donc que le MeHg pourrait avoir un effet non négligeable sur la reproduction du poisson zèbre et en a motivé son étude.

Introduction

Le MeHg est un composé considéré comme un poison extrêmement dangereux pour les organismes de part ses propriétés neurotoxiques et tératogènes chez les mammifères. Ce toxique est connu pour sa capacité à traverser les barrières biologiques telles que la barrière hémato-encéphalique et la barrière placentaire (Aschner *et al.*, 1989 ; Dock *et al.*, 1994). Ces caractéristiques physico-chimiques permettent sa bioaccumulation dans plusieurs organes cibles, comme le système nerveux central des adultes mais également dans celui des fœtus. En effet, au stade de vie embryonnaire, les animaux s'avèrent être très sensibles à une exposition au MeHg (Jeziarska *et al.*, 2009) qui peut conduire à des déficits neurologiques et à des déformations du squelette lors de cas d'intoxication plus sévères (Samson et Shenker, 2000).

Une exposition au MeHg conduit également à une altération du fonctionnement des gonades autant chez les mâles que chez les femelles (Drevnick *et al.*, 2006). Des dommages sur la spermatogenèse ont été rapportés chez des souris contaminées par une injection intrapéritonéale d'une solution de MeHg (1 mg de Hg.kg⁻¹) (Lee et Dixon, 1975). Une étude sur l'activité d'enzymes impliquées dans la synthèse des stéroïdes et la mesure du taux de testostérone dans le sérum de rat contaminé par du MeHg a révélé des effets toxiques à un niveau d'exposition de 3 mg de MeHg.kg⁻¹.jour⁻¹ (Mc Vey *et al.*, 2008). Les différentes perturbations physiologiques de la reproduction ont été résumées chez les poissons mâles et femelles (Crump et Trudeau, 2009). Ils indiquent que la perturbation de la reproduction à la suite d'une exposition au Hg agit tout au long de l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien/testiculaire.

La toxicité du MeHg dans les processus de reproduction (ovogénèse, fécondité, survie des œufs) peut donc avoir de fortes répercussions sur la dynamique des populations.

L'analyse de l'organotropisme du Hg chez les poissons a révélé que la forme chimique du mercure la plus accumulée dans les muscles, le système nerveux central et les œufs s'avère être le MeHg (Kirubagaran et Joy, 1988 ; Hammerschmidt *et al.*, 1999). Les quelques études qui ont été menées sur les impacts du MeHg sur la reproduction des poissons ont toutefois permis de montrer les effets d'une exposition sur le système endocrinien (en particulier le taux de 17β œstradiol, Drevnick et Sandheinrich, 2003), le développement des gonades (Friedmann *et al.*, 1996), et le succès reproducteur (Hammerschmidt *et al.*, 2002). Les effets du transfert maternel du MeHg ou de son transfert à partir de la colonne d'eau à l'œuf ont été étudiés sur les embryons et les larves de doré jaune, *Stizostedion vitreum*, en provenance d'un lac pollué par le Hg, le lac Clay en Ontario au Canada, et de 2 lacs non pollués (les lacs Manitoba et Winnipeg dans la province de Manitoba). La provenance maternelle du MeHg n'avait d'incidence ni sur l'éclosion, ni sur le rythme cardiaque des embryons alors que s'il provenait de la colonne d'eau, ce toxique diminuait le taux d'éclosion et le rythme cardiaque (Latif *et al.*, 2001). Les impacts d'une contamination au MeHg présentent des effets différents suivant l'espèce de poisson utilisée et suivant l'âge à partir duquel il est exposé (Crump et Trudeau, 2009). Par exemple, chez le doré jaune, *S. vitreum*, une contamination des juvéniles pendant 6 mois par voie trophique avec une nourriture contenant $1 \mu\text{g}$ de $\text{Hg}\cdot\text{g}^{-1}$ entraîne des dommages au niveau de la structure histologique des gonades mâles alors que chez les femelles aucune perturbation n'était observable (Friedmann *et al.*, 1996).

Chez les femelles des poissons tête-de-boule (*Pimephales promelas*), une exposition au MeHg a inhibé le développement des gonades et supprimé la production d'œstrogène (Drevnick et Sandheinrich, 2003). Les femelles contrôles présentaient de 164 à 416 % d'œstrogène en plus que celles nourries 250 jours avec une nourriture contenant 0,87 ou 3,93 μg de $\text{MeHg}\cdot\text{g}^{-1}$.

L'étude des gènes impliqués dans les mécanismes de reproduction a révélé une perturbation de l'expression de la vitellogénine qui serait induite chez les mâles et réprimée chez les femelles de *P. promelas* (Klaper *et al.*, 2006). La vitellogénine est une glycoprotéine spécifiquement produite par les femelles comme précurseur du vitellus des œufs. Elle est produite par tous les animaux ovipares et synthétisée par le foie et transportée dans les gonades femelles pendant le développement des œufs. Le MeHg serait donc un perturbateur

Tableau 10 : Dosage du Hg total ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, poids frais) dans le système nerveux central, le muscle, les gonades et les œufs pour les poissons issus des conditions contrôle et contaminée par voie trophique au MeHg pendant 90 jours.

	Cerveau ^a	Muscle ^a	Gonade ^a	Œufs ^b
Témoins	$0,19 \pm 0,015$	$0,14 \pm 0,01$	$0,027 \pm 0,003$	$0,12 \pm 0,12$
Contaminés au MeHg	49 ± 9	16 ± 2	$8 \pm 0,7$	$9,4 \pm 0,9$

^a Le dosage du mercure a été uniquement fait chez des femelles. (moyenne \pm erreur standard ; $n = 3$)

^b Le dosage du mercure effectué sur les œufs a été fait sur un mélange de 10 œufs. (la masse moyenne d'un œuf est de 100 μg)(moyenne \pm erreur standard ; $n = 3$)

Tableau 11 : Détermination de la quantité de mercure par œuf et par larve dans les 2 conditions d'expérimentation. ^a

	Quantité de Hg ng Hg / œuf	Quantité de Hg ng Hg/ larve
Témoins	$0,012 \pm 0,012$	$0,037 \pm 0,002$
Contaminés au MeHg	$0,94 \pm 0,09$	$1,27 \pm 0,06$

^a Les dosages ont été réalisés sur des mélanges de 10 œufs ou de 10 larves. (moyenne \pm erreur standard ; $n = 3$)

endocrinien. Actuellement, le Hg est considéré comme un reprotoxique¹ de catégorie 2 (directive Européenne 2009/2/EC).

En plus de ces études sur les perturbations du MeHg dans le processus de reproduction, les analyses présentées dans les chapitres précédents ont révélé que le MeHg a beaucoup d'autres effets toxiques. Le MeHg perturbe fortement le métabolisme mitochondrial et par la même occasion la production d'énergie. Or les mécanismes impliqués dans la reproduction sont très coûteux en énergie, et un dysfonctionnement du métabolisme énergétique causé par le MeHg peut également nuire au succès reproducteur.

Sachant que la principale source de MeHg chez les poissons adultes est apportée par la voie alimentaire et que la principale source pour les œufs est le transfert maternel, nous avons testé les effets du MeHg sur la reproduction du poisson zèbre *D. rerio*. Nous avons nourri des poissons zèbres adultes avec une nourriture contaminée au MeHg ($13,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) pendant 90 jours dans l'objectif de déterminer les effets d'une contamination au MeHg sur la reproduction du poisson zèbre.

Résultats

A/ Accumulation du mercure

Après 90 jours d'exposition au MeHg par voie trophique à $13,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ($0,6 \mu\text{g}$ de Hg $\cdot\text{jour}^{-1}\cdot\text{poisson}^{-1}$), le niveau de bioaccumulation du Hg a été contrôlé dans trois tissus du poisson qui sont le système nerveux central, le muscle et les gonades (Tableau 10). Chez les poissons exposés au MeHg, le dosage du Hg total indique $49 \pm 9 \mu\text{g}$ de $\text{Hg}\cdot\text{g}^{-1}$ dans le cerveau, $16 \pm 2 \mu\text{g}$ de $\text{Hg}\cdot\text{g}^{-1}$ dans le muscle et enfin $8 \pm 0,7 \mu\text{g}$ de $\text{Hg}\cdot\text{g}^{-1}$ dans les gonades. Chez les poissons contrôles, très peu de Hg est présent dans les tissus : $0,19 \pm 0,015$, $0,14 \pm 0,01$ et $0,027 \pm 0,003 \mu\text{g}$ de $\text{Hg}\cdot\text{g}^{-1}$ dans le cerveau, le muscle et les gonades, respectivement. La concentration en Hg dans les œufs obtenus dans chacune des conditions a également été mesurée, donnant une concentration de $0,12$ et $9,4 \mu\text{g}$ de $\text{Hg}\cdot\text{g}^{-1}$ dans les œufs issus de poissons non contaminés et contaminés (Tableau 10). Il est important de rappeler que les œufs n'ont été contaminés que par le transfert maternel du mercure. Enfin, les larves issues de ces œufs ont en moyenne $1,27 \text{ ng}$ de Hg par larve (Tableau 11), valeur comparable à la quantité de Hg par œuf (1 ng de Hg par œuf).

-
- ¹ **CMR de catégorie 2** : substances et préparations pour lesquelles il existe une forte présomption que l'exposition de l'homme à de telles substances et préparations peut provoquer ou augmenter la fréquence d'apparition des effets cancérogène, mutagène et reprotoxique (CMR) cités ci-dessus ;

Tableau 12 : Effet de l'exposition des poissons au MeHg par voie alimentaire sur la ponte d'œuf, leur viabilité et leur éclosion .

	Nombre d'œufs pondus ^a	% de viabilité 48 hpf ^b	% d'éclosion ^c
Contrôle	514 ± 91	53 ± 11 %	77 ± 7,6 %
MeHg	525 ± 51	68 ± 8 %	45 ± 12 % *

^a Le nombre d'œufs pondus indiqué est la moyenne des pontes obtenues sur les trois jours après appariement des poissons (moyenne ± erreur standard ; $n = 8$)

^b La viabilité correspond au pourcentage d'œufs encore viables 48 h après fertilisation sur un échantillon de 60 œufs de chaque ponte (moyenne ± erreur standard ; $n = 8$)

^c Le pourcentage d'éclosion est la proportion d'œuf capable d'éclore parmi les œufs encore viables 48 heures après fertilisation (moyenne ± erreur standard ; $n = 8$)

Les astérisques indiquent les différences significatives entre contrôle et MeHg déterminées par le test U de Mann-Whitney avec $p < 0,05$.

B/ Impact sur la reproduction

Les possibles conséquences d'une contamination mercurielle de poissons adultes sur leurs facultés de reproduction ont été analysées (Tableau 12). Le succès reproducteur, c'est à dire la capacité de se reproduire, a été mesuré : 8 couples sur 10 ont été capables de se reproduire au cours de 2 jours d'appariement pour les deux conditions.

Le comptage des œufs pondus par femelles a donné 514 ± 91 œufs pour les 8 unités témoins et 525 ± 51 œufs pour les 8 unités contaminées au MeHg. La contamination au MeHg n'a donc pas eu d'incidence ni sur le nombre d'œufs pondus, ni sur le succès reproducteur.

Pour chacune des deux conditions expérimentales, le taux de survie des œufs a été calculé. Le taux de survie obtenu à 48 heures post fertilisation (hpf) était de 53 % pour la condition contrôle et 68 % pour la condition contaminée au MeHg. En ne considérant que les œufs viables, le pourcentage d'éclosion de ces œufs a été calculé donnant leur taux d'éclosion, 77 % pour les œufs témoins, mais seulement 45 % concernant les œufs issus de femelles contaminées au MeHg. Cette différence au niveau de l'éclosion des œufs viables est significativement différente entre les deux conditions étudiées (test U Mann-Whitney, $p = 0,016$) alors que le taux de viabilité des œufs après 48 heures n'est pas statistiquement différent. Au cours de la période d'éclosion comprises entre 48 et 96 heures après fertilisation, le pourcentage de mortalité des embryons est multiplié respectivement par 1,21 et 2,5 pour la condition témoin et la condition contaminée. 63 % des œufs vivants à 48 h sont morts à 96 h chez les contaminés alors que seulement 20% des œufs des témoins meurent au cours de cette période.

Discussion

L'exposition de poissons zèbres mâles et femelles adultes au MeHg par voie trophique pendant 90 jours a permis d'analyser les effets de ce métal sur la reproduction (fécondité et survie des stades précoces). En effet, seulement quelques études ont été menées soit sur des poissons issus de milieu contaminé (Latif *et al.*, 2001) soit à la suite de contamination en milieu contrôlé (Hammerschmidt *et al.*, 2002) afin de comprendre et mettre en évidence les effets du MeHg sur l'efficacité de la reproduction de divers poissons. Lors de notre étude, les modalités d'exposition des poissons reflètent une contamination de poissons piscivores dans des écosystèmes contaminés au Hg comme par exemple en Guyane française (Durrieu *et al.*, 2005). Les résultats obtenus, durant notre étude, indiquent que l'exposition au MeHg n'a pas affecté le comportement reproducteur du poisson zèbre car aucune différence n'a été détectée dans le nombre d'unité ayant pondu avec un taux de ponte de 80 % pour les femelles

contrôles et contaminées. De plus, le nombre d'œufs pondus par femelle (environ 520) ne semble pas modifié par l'exposition au MeHg contrairement à d'autres métaux comme l'arsenic (Boyle et al, 2008).

Une exposition de *P. promelas* au MeHg sur une durée de 240 jours a provoqué une baisse du succès de ponte avec 75 % de succès reproducteur dans la condition contrôle contre 46 %, 50 % et 36 % de succès reproducteur pour les trois conditions d'exposition 0,88, 4,11 et 8,46 μg de Hg.g^{-1} de nourriture. Mais l'influence d'une contamination alimentaire par le MeHg sur la ponte est apparemment liée à l'espèce et au stade de vie à partir duquel les poissons sont exposés. Si l'exposition a lieu alors que les poissons sont encore au stade juvénile, leur succès reproducteur au stade adulte mature est diminué même s'ils sont nourris avec de la nourriture non contaminée pendant la phase de reproduction. Par contre si la contamination est effectuée alors que les poissons sont sexuellement matures cela n'a pas d'incidence sur le succès reproducteur (Hammerschmidt *et al.*, 2002). Au cours de notre étude, les poissons utilisés étaient sexuellement matures ce qui pourrait expliquer l'absence d'impact de la contamination mercurielle sur le succès de ponte.

Après 90 jours de contamination, la bioaccumulation du Hg a été mesurée dans les muscles, le système nerveux central, et les gonades des poissons femelles ainsi que dans les œufs. Ces dosages ont révélé un transfert maternel du Hg vers les œufs. La quantité de Hg mesuré par œuf est d'environ 1 ng dans le cas des poissons nourris avec de la nourriture contaminée et 0,012 ng par œuf pour ceux obtenus à partir des poissons contrôles. Ces quantités de Hg par œuf sont similaires à celles dosées dans des œufs de *P. promelas* contaminés sur une durée d'environ 200 jours avec une nourriture contenant 8,5 μg de Hg.g^{-1} définie comme représentative de certains réseaux trophiques des grands lacs nord américains (Hammerschmidt *et al.*, 2005). De plus, les larves présentaient une quantité de Hg similaire à celle dosée dans les œufs. Ce résultat indique que dans l'œuf, le Hg est localisé dans l'embryon et dans le sac vitellin et non au niveau du chorion.

En outre, des études antérieures ont démontré que la principale source de MeHg pour les œufs provenait de la nourriture *via* son transfert vers le foie et non d'une remobilisation du MeHg bioaccumulé dans les tissus somatiques de la femelle (Hammerschmidt *et al.*, 1999, 2005). Or, les macromolécules qui constituent les réserves des ovocytes sont synthétisées dans le foie puis véhiculées par le sang. Parmi ces macromolécules se trouve la vitellogénine, une glycolipophosphoprotéine très riche en calcium et en zinc (Wang et Lou, 2006). Chez la truite la vitellogénine (vtg) est constituée de 79 % de protéines et 19 % de lipides composés eux même de 70 % de phospholipides (Frémont *et al.*, 1988). Durant la synthèse de la

vitellogénine dans le foie des femelles contaminées, le MeHg peut être piégé par cette macromolécule lors de sa synthèse puis transporté par le système sanguin jusqu'aux ovocytes pour y être finalement accumulé. Ce transport de métaux lourds par la vitellogénine a déjà pu être observé chez l'anguille européenne, *Anguilla anguilla*, pendant le phénomène de maturation des gonades où l'augmentation de la concentration en cadmium s'est produite de façon concomitante à l'internalisation massive de vitellogénine (Pierron *et al.*, 2008).

De plus, comparée au témoin, la synthèse de vtg diminue après exposition aux deux formes chimiques du mercure (Hg^{2+} et MeHg) (Kirubakaran et Joy, 1995 ; Klaper *et al.*, 2006) et à l'arsenic (Boyle *et al.*, 2008).

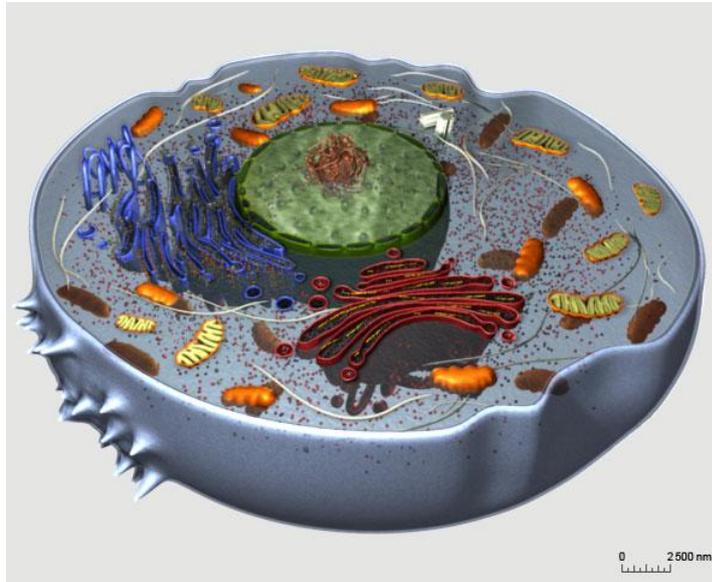
Dans notre étude, la viabilité des œufs au moment de la ponte et le développement des embryons n'ont pas été affectés par le MeHg. Cette absence d'effet, à ces niveaux d'exposition, sur la viabilité des œufs et leur développement a également été observée chez le poisson, *Pimephales promelas*, contaminé au MeHg par la nourriture (Hammerschmidt *et al.*, 2002). En outre, une diminution significative du taux d'éclosion des œufs a été observée pour les œufs pondus par des femelles contaminées au MeHg. Ces œufs présentaient des embryons viables, pigmentés, sans malformation apparente et capables de bouger dans l'œuf. Cet impact du MeHg sur l'éclosion des œufs n'a pas été décelé chez d'autres poissons après transfert maternel de ce toxique vers l'œuf. Toutefois, une tendance à la diminution du succès d'éclosion des œufs a été corrélée avec une augmentation de la concentration en MeHg dans les œufs de *Stizostedion vitreum* provenant du lac Clay (Ontario, Canada) pollué par le Hg (Latif *et al.*, 2001).

L'éclosion des œufs est un procédé combinant des mécanismes biochimiques et physiques qui peuvent être altérés par la toxicité du MeHg. Les mécanismes physiques correspondent aux mouvements de l'embryon dans l'œuf provoquant la rupture du chorion ; or lors de l'observation des œufs, aucune différence n'a été relevée entre les deux conditions d'expérimentation concernant la capacité des embryons à bouger dans les œufs. Le mécanisme biochimique correspond quant à lui à la dégradation du chorion par l'action d'enzymes choriolytiques qui sont des métalloprotéases à zinc sécrétées par l'embryon du poisson. Ces chorionases, produites au niveau de glandes de la tête de l'embryon, vont être sécrétées au niveau de l'espace périvitellin où elles vont dégrader spécifiquement les protéines constitutives du chorion. Chez le poisson zèbre, deux gènes codant pour des enzymes choriolytiques ont été identifiés, ZHE1 (Zebrafish Hatching Enzyme 1) qui est l'isoforme la plus exprimée, et ZHE2 (Sano *et al.*, 2008). L'expression d'un seul type de chorionase est particulier au cas du poisson zèbre car en général chez les poissons le

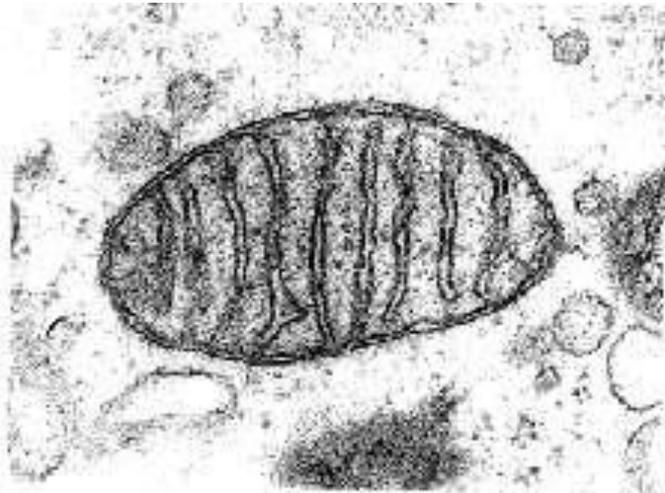
processus d'éclosion est plutôt similaire à celui du médaka, *Oryzias Latipes*, qui couple l'activité de 2 types de chorinase : la choriolysine H et la choriolysine L (Kawaguchi *et al.*, 2005).

Il a déjà été observé que la présence de métaux (cuivre, cadmium, aluminium, zinc, argent) dans la colonne d'eau perturbe l'éclosion des œufs en affectant le fonctionnement normal des glandes synthétisant les chorionases. Cet impact des métaux peut se manifester à différents niveaux tels que les processus de transcription et de traduction conduisant à la diminution de la synthèse des chorionases ou encore sur l'activité de cette enzyme (Jeziarska *et al.*, 2009). Dans le cas de notre étude, le MeHg a pu être libéré au fur et à mesure de la croissance de l'embryon car des éléments nutritifs du sac vitellin de l'œuf piégeant le MeHg ont été dégradés. Ce MeHg ainsi remobilisé a ensuite pu induire des dysfonctionnements au niveau de la synthèse ou encore de l'activité de la chorionase ZHE1. Cette enzyme étant une métalloprotéase, on peut également penser que le Hg se substitue au Zn provoquant ainsi le blocage du cœur catalytique de l'enzyme.

Cette étude permet donc de révéler un impact probable sur la dynamique de population des poissons piscivores après transfert maternel du MeHg. L'effet le plus marqué du MeHg concerne la perturbation de l'éclosion des œufs et celle possible de l'activité de la chorionase.



Conclusion et perspectives



Cette étude conduite sur le poisson zèbre a amené des éléments de réponse complémentaires sur les effets du MeHg chez le poisson et plus précisément sur le système nerveux central et le muscle squelettique.

En ce qui concerne le muscle squelettique la comparaison des deux banques SAGE a permis de dégager un schéma global de la réponse génétique de ce tissu après une exposition au MeHg. De ce schéma, quatre points importants ont pu être dégagés dans les mécanismes de toxicité du MeHg. Ils concernent le métabolisme mitochondrial, les synthèses protéique et lipidique, la mitose et le métabolisme cellulaire et notamment l'homéostasie du calcium. Cette analyse globale a également permis de mettre en évidence l'induction de mécanismes cellulaires de détoxification avec l'implication de processus de lutte contre le stress oxydant et des processus de conjugaison, ce qui aboutit à une meilleure compréhension des impacts de ce toxique et l'identification des cibles cellulaires potentielles.

Cette étude SAGE a également soulevé la possible implication des lysosomes dans les processus d'adaptation du muscle squelettique vis-à-vis du MeHg avec l'induction du gène *lapm4α*, codant une protéine transmembranaire impliquée dans des processus de transport de nucléosides du cytoplasme vers la lumière des lysosomes. Dans le but d'appréhender cette voie impliquant les lysosomes, le gène *lapm4α* a été exprimé chez le mutant *tolC* de la bactérie *E. coli*. Le choix de ce mutant a été motivé par son hypersensibilité aux toxiques tels que les métaux et le BET. L'expression de ce gène a augmenté la sensibilité de cette souche au HgCl₂ ainsi qu'au CdCl₂. L'expression de ce gène n'a toutefois pas modifié la sensibilité de cette souche bactérienne au BET. Le dosage du Cd et du Hg chez la souche exprimant le gène *lapm4α* a montré une plus forte bioaccumulation de ces deux métaux suggérant alors que cette protéine transmembranaire facilite l'entrée des métaux dans les bactéries. Ce phénomène peut être la conséquence de son positionnement dans la membrane de la bactérie suivant une orientation similaire à celle adoptée par la protéine dans la membrane des lysosomes dans les cellules eucaryotes. L'orientation de la protéine LAPTM4α dans la membrane bactérienne conduirait donc à l'augmentation de l'entrée de nucléosides complexés au Cd²⁺ ou au Hg²⁺. Ce transport des métaux complexés aux nucléosides présents dans le milieu de culture vers le cytoplasme des bactéries peut refléter l'échange qui peut avoir lieu entre le cytoplasme et la lumière des lysosomes dans les cellules musculaires. L'analyse des banques SAGE a aussi mis en avant des perturbations du métabolisme mitochondrial et de l'homéostasie calcique. Ces deux événements nous ont donc amené à étudier de façon plus ciblée la mitochondrie. L'étude de l'impact du MeHg sur l'activité mitochondriale musculaire

a dévoilé une inhibition de l'activité respiratoire à l'état 3 par ce métal. Dans la perspective d'expliquer cette inhibition, une attention toute particulière a été portée sur les différents complexes de la chaîne respiratoire. Il en est ressorti que le complexe le plus affecté par la contamination mercurielle est le complexe IV, la cytochrome *c* oxydase. En effet, l'activité de ce complexe se trouve être inhibée par le MeHg, et cela s'accroît durant la contamination. De plus les analyses protéique et génétique de la sous-unité 4 de ce complexe IV indiquent une inhibition de la synthèse au temps 50 jours d'exposition. Une baisse très importante du bilan production/consommation d'ATP a aussi été observée. Des détériorations au niveau de la structure des mitochondries sont également visibles par microscopie électronique après 63 jours de contamination. Ces détériorations se traduisent par la désorganisation des crêtes mitochondriales et des décolllements de la membrane externe conduisant à des gonflements de l'espace intermembranaire. Les analyses bioénergétiques et protéomiques confirment la sensibilité des mitochondries face au MeHg. Or, les perturbations du métabolisme mitochondrial sont connues pour être une source importante d'ERO, qui sont très toxiques pour la cellule. Le MeHg est également reconnu pour son affinité avec les groupements sulfhydryles [-SH] inhibant ainsi les défenses antioxydantes cellulaires. La génération d'ERO pourrait causer des dommages à l'ADN en plus des possibles impacts que peut avoir le MeHg sur le processus de mitose par son interaction avec les groupements thiols du cytosquelette. Or un rapport de l'IARC (IARC, 1997) a classé le MeHg comme étant un agent carcinogène probable. La génotoxicité du MeHg dans le muscle squelettique a donc été analysée par l'utilisation de la technique RAPD couplée à la PCR quantitative en temps réel. Cette étude a permis de mettre en évidence un impact génotoxique de ce métal comme permettait de le supposer les résultats obtenus en génétique et en biochimie. Cette analyse de la génotoxicité a également permis de rendre la technique de la RAPD quantitative, tout en conservant son caractère qualitatif. L'utilisation du couplage de ces deux techniques, la RAPD et la PCR quantitative en temps réel, a également permis de détecter les atteintes génotoxiques causées par une exposition au cadmium. Cette étape a permis la validation de cette technique car le Cd est, quant à lui, un métal reconnu comme cancérigène.

Des analyses similaires ont été menées sur le système nerveux central du poisson zèbre qui accumule également le MeHg. L'analyse génétique s'est portée dans un premier temps sur des gènes spécifiquement exprimés dans ce tissu. Ces 10 gènes sont impliqués dans le fonctionnement des synapses glutamatergiques et GABAnergiques, l'une excitatrice et l'autre inhibitrice. L'analyse de ces deux types de synapses n'a mis en évidence que la seule

surexpression du gène de la GABA transaminase, impliquée dans la dégradation du GABA dans les astrocytes, après 50 jours d'exposition. Cela suggère que la mise en place d'adaptations au niveau des processus synaptiques constitue une réponse du système nerveux face au MeHg. En complément de ces gènes spécifiques au système nerveux central, les expressions du gène de la porine, *vdac2*, et de deux gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant, l'isoforme 1 de la glutathion peroxydase (*gpx1*) et la glutathion-S-transférase, ont été analysées. Cela a révélé un impact du MeHg à 25 jours sur la mitochondrie avec l'induction du gène *vdac2*, et dans un second temps, la mise en place d'une réponse vis-à-vis du stress oxydant avec l'induction de la *gpx1*. Au temps 50 jours, l'induction du gène de la *gfap* a également été détectée indiquant une activation astrocytaire considérée comme une réponse à une inflammation du système nerveux central. Cette inflammation du système nerveux a pu être observée lors de l'analyse de coupes par autométallographie. L'induction des gènes de trois transporteurs calciques a lieu après 25 jours d'exposition révélant une perturbation de l'homéostasie du calcium avec une répression pour *pmca3a* et *b* et un retour à un niveau d'expression basale pour *nxc2b* au bout de 50 jours. Cette induction des transporteurs calciques permet probablement de s'opposer au dérèglement de l'homéostasie du calcium et ainsi d'éviter l'excitotoxicité pouvant être causée par un relargage massif de neurotransmetteurs comme le glutamate et le GABA. L'analyse bioénergétique n'a pas permis de déceler de modification dans l'activité de la chaîne respiratoire, ainsi que pour la cytochrome *c* oxydase. Cependant, après 50 jours d'exposition, la sous-unité Fe/S de la succinate déshydrogénase (SDH) est induite. Cette augmentation de la synthèse de cette sous-unité doit avoir pour objectif de contre balancer son inhibition par le MeHg et restaurer ainsi le métabolisme mitochondrial. L'inhibition de cette sous-unité par le MeHg doit être causée par la fixation de ce métal au niveau des groupements thiols de la protéine.

Les dysfonctionnements causés par le MeHg au niveau des mitochondries du système nerveux central sont beaucoup moins importants que dans le muscle mais, cette induction des gènes de la sous-unité Fe/S de la succinate déshydrogénase et de la glutathion S-transférase suggère tout de même la génération d'un stress oxydant. L'utilisation de la RAPD couplée à la PCR quantitative en temps réel a révélé des atteintes génotoxiques au temps 50 jours d'exposition dans le cerveau.

Ces résultats montrent donc que le muscle squelettique ainsi que le système nerveux central s'adaptent face à une contamination au MeHg chez des poissons adultes. Il s'avère également que pour ces deux tissus, les perturbations de l'homéostasie du calcium et du métabolisme mitochondrial sont des symptômes communs de la toxicité du MeHg.

D'après les résultats obtenus sur ces deux tissus, le métabolisme mitochondrial semble être particulièrement sensible au MeHg, or la reproduction est un évènement très coûteux en énergie du point de vue de la production des gamètes surtout chez les femelles qui doivent synthétiser des réserves nutritives pour les œufs. La fécondation des œufs est également très coûteuse en énergie pour les gamètes mâles dont la motilité est entièrement dépendante d'un réseau de mitochondries situé au niveau du flagelle. L'efficacité de reproduction de poissons contaminés au MeHg a donc été étudiée. Le MeHg n'a pas eu d'impact sur le nombre d'œuf pondus ainsi que sur le nombre d'œufs fécondés. En revanche, cette analyse a montré un transfert maternel du MeHg vers l'œuf et plus précisément dans le sac vitellin. La vitellogénine pourrait être responsable de ce transfert du MeHg en le véhiculant du foie vers les œufs. De plus, seulement 45% des œufs contaminés au MeHg, présentant des embryons viables, ont éclos contre 77% pour les contrôles. Le MeHg a donc bien un effet indésirable sur la reproduction du poisson zèbre mais cet effet n'a pas l'air de se situer au niveau du métabolisme énergétique mais plutôt au niveau du mécanisme d'éclosion de l'œuf avec peut être un effet sur la chorionase dont la synthèse et/ou l'activité serait inhibée.

Les résultats que nous avons obtenus dans le cadre de nos recherches en laboratoire sur le poisson zèbre ne représentent qu'une première étape dans l'analyse des effets du MeHg et des adaptations du poisson envers ce métal. Il reste en effet beaucoup d'éléments à exploiter concernant les résultats obtenus à partir de ces deux tissus. Dans le cadre de l'analyse des banques SAGE, des étiquettes correspondantes à des gènes inconnus sont significativement induits ou réprimés à la suite de la contamination mercurielle. Il serait tout à fait judicieux de cloner ces gènes et d'en analyser la fonction en les exprimant chez des organismes tels que la bactérie, *E. coli*, ou encore la levure, *Saccharomyces cerevisiae*.

Dans notre laboratoire, des banques SAGE ont également été réalisées sur des poissons zèbres exposés au Cd. Une comparaison entre les résultats obtenus pour les banques SAGE MeHg et Cd pourrait donc également être envisagée afin d'identifier de possibles éléments de réponse communs entre les deux expositions métalliques. Cela pourrait également permettre l'identification d'éléments de réponse bien spécifiques à chacun de ces deux métaux. Une attention toute particulière pourrait être apportée à l'identification des quelques gènes non identifiés apparaissant dans les deux banques SAGE, ainsi que l'analyse de leur fonction. Cette analyse SAGE a également permis de mettre en évidence un impact du MeHg sur l'expression de gène ayant un rôle majeur dans le métabolisme cellulaire, tel que le gène *ndpkz2* codant pour la nucléoside diphosphate kinase Z2 dont la fonction est la synthèse

de nucléosides triphosphates essentiels pour beaucoup de voies métaboliques. De futures expérimentations pourraient avoir comme objectif l'analyse de l'impact du MeHg sur ces gènes au niveau du système nerveux central. Concernant le gène *laptm4α* l'analyse chez la bactérie *E. coli* a permis de mettre en évidence une facilitation de l'entrée des métaux. L'hypothèse est l'implication des nucléosides qui, complexés aux métaux, permettraient leur entrée. La suite de cette expérimentation serait d'identifier les composés majeurs impliqués dans ce transport par utilisation d'un milieu de culture appauvri. Une approche concernant l'expression de ce gène serait de l'exprimer chez la levure dans le but d'étudier l'implication des lysosomes dans la compartimentalisation et l'élimination des métaux.

Les approches biochimiques réalisées sur le muscle squelettique et le système nerveux central du poisson zèbre ont permis d'acquérir de nouvelles données concernant les impacts du MeHg sur le métabolisme mitochondrial dans les tissus. Il serait très intéressant d'approfondir cette approche sur des mitochondries isolées à partir des tissus contaminés ou non, mais également d'étudier les cibles du MeHg par ajout de ce métal sur des mitochondries isolées.

Concernant la génotoxicité, le couplage de la RAPD et de la PCR quantitative en temps réel a permis de quantifier les atteintes génotoxiques grâce à l'utilisation d'une amorce discriminante et une amorce non discriminante utilisée en tant que référence. Une évolution possible de cette technique serait d'utiliser un couple d'amorce spécifique d'un gène permettant ainsi de connaître le nombre de copie d'ADN exact présent dans le milieu réactionnel et ainsi de quantifier le bilan du nombre de site d'hybridation créé et/ou supprimé pour l'amorce discriminante.

Les études que nous avons menées sur les impacts du MeHg sur la reproduction demeureront incomplètes sans un approfondissement des connaissances de l'impact de ce métal sur le mécanisme d'éclosion de l'œuf. Ainsi des études complémentaires devront être menées sur la digestion du chorion par utilisation des techniques de microscopie électronique afin d'identifier une possible inhibition des chorionases. En complément de cette analyse par microscopie, une approche utilisant l'outil de biologie moléculaire est aussi à envisager dans le but de caractériser de possibles impacts du MeHg sur la synthèse de la chorionase par l'embryon au court de son développement. Une analyse par autométallographie sur des coupes d'œuf, à différents temps de développement, permettrait de suivre la répartition du Hg dans les œufs. Il conviendra aussi de suivre le devenir de cette génération F1 afin de mesurer d'éventuelles perturbations de la reproduction à l'âge adulte avec entre autre le développement des gonades.

Références bibliographiques.

- Abramsson-Zetterberg L, Grawé J, Zetterberg G. Spontaneous and radiation-induced micronuclei in erythrocytes from four species of wild rodents: a comparison with CBA mice. *Mutat Res* 1997;393:55-71.
- Achard-Joris M, Bourdineaud JP. Heterologous expression of bacterial and human multidrug resistance proteins protect *Escherichia coli* against mercury and zinc contamination. *Biometals* 2006;19:695-704.
- Achard-Joris M, Gonzalez P, Marie V, Baudrimont M, Bourdineaud JP. Cytochrome *c* oxidase subunit I gene is up-regulated by cadmium in freshwater and marine bivalves. *Biometals* 2006; 19:237-44.
- Achard-Joris M, van den Berg van Saparoea HB, Driessen AJ, Bourdineaud JP. Heterologously expressed bacterial and human multidrug resistance proteins confer cadmium resistance to *Escherichia coli*. *Biochemistry* 2005;44:5916-22.
- Aleo MD, Taub ML, Kostyniak PJ. Primary cultures of rabbit renal proximal tubule cells. III. Comparative cytotoxicity of inorganic and organic mercury. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992; 112:310-7.
- Ali SF, Lebel CP, Bondy SC. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology* 1992;13:637-648.
- Allen JW, Mutkus LA, Aschner M. Methylmercury-mediated inhibition of 3H-aspartate transport in cultured astrocytes is reversed by the antioxidant catalase. *Brain Res* 2001; 902:92-100.
- Allen JW, Shanker G, Tan KH, Aschner M. The consequences of methylmercury exposure on interactive functions between astrocytes and neurons. *Neurotoxicology* 2002;23:755-9.
- Amorim MI, Mergler D, Bahia MO, Dubeau H, Miranda D, Lebel J, Burbano RR, Lucotte M. Cytogenetic damage related to low levels of methyl mercury contamination in the Brazilian Amazon. *An Acad Bras Cienc* 2000;72:497-507.
- Angermuller S, Kunstle G, Tiegs G. Pre-apoptotic alterations in hepatocytes of TNF alpha-treated galactosamine-sensitized mice. *J Histochem Cytochem* 1998; 46:1175-83.
- Arselin G, Vaillier J, Graves PV, Velours J. ATP synthase of yeast mitochondria. Isolation of the subunit h and disruption of the ATP14 gene. *J Biol Chem* 1996; 271:20284-90.
- Arselin G, Vaillier J, Salin B, Schaeffer J, Giraud MF, Dautant A, Brethes D, Velours J. The modulation in subunits e and g amounts of yeast ATP synthase modifies mitochondrial cristae morphology. *J Biol Chem* 2004;279:40392-9.
- Aschner M, Kimelberg HK. *The role of glia in neurotoxicity*. CRC Press: Boca Raton, 1996; p 354.
- Aschner M, Syversen T, Souza DO, Rocha JB, Farina M. Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity. *Braz J Med Biol Res* 2007;40:285-91.

- Aschner M, Syversen T, Souza DO, Rocha JBT. In *Metallothioneins: Mercury species-specific induction and their potential role in attenuating neurotoxicity*, 2006; Soc Experimental Biology Medicine: 2006; pp 1468-1473.
- Aschner M, Yao CP, Allen JW, Tan KH. Methylmercury alters glutamate transport in astrocytes. *Neurochemistry International* 2000;37:199-206.
- Aschner M. Brain, kidney and liver ²⁰³Hg-methyl mercury uptake in the rat: relationship to the neutral amino acid carrier. *Pharmacol Toxicol* 1989;65:17-20.
- Atchison WD, Hare MF. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity. *FASEB J* 1994; 8:622-9.
- Atchison WD. Is chemical neurotransmission altered specifically during methylmercury-induced cerebellar dysfunction? *Trends Pharmacol Sci* 2005;26:549-57.
- Atienzar FA, Billingham Z, Depledge MH. 4-n-Nonylphenol and 17-beta estradiol may induce common DNA effects in developing barnacle larvae. *Environ Pollut* 2002;120:735-8.
- Atienzar FA, Cheung VV, Jha AN, Depledge MH. Fitness parameters and DNA effects are sensitive indicators of copper-induced toxicity in *Daphnia magna*. *Toxicol Sci* 2001;59:241-50.
- Atienzar FA, Conradi M, Evenden A, Jha A, Depledge M. Qualitative assessment of genotoxicity using RAPD: comparison of genomic template stability with key fitness parameters in *Daphnia magna* exposed to benzo(a)pyrene. *Environ Toxicol Chem* 1999;18:2275-2282.
- Atienzar FA, Cordi B, Donkin ME, Evenden AJ, Jha AN, Depledge MH. Comparison of ultraviolet-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA with chlorophyll fluorescence and growth in a marine macroalgae, *Palmaria palmata*. *Aquat Toxicol* 2000a;50:1-12.
- Atienzar FA, Evenden A, Jha A, Savva D, Depledge M. Optimized RAPD analysis generates high-quality genomic DNA profiles at high annealing temperature. *BioTechniques* 2000b;28:52-54.
- Atienzar FA, Jha AN. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay to determine DNA alterations, repair and transgenerational effects in B(a)P exposed *Daphnia magna*. *Mutat Res* 2004;552:125-40.
- Atienzar FA, Jha AN. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review. *Mutat Res* 2006;613:76-102.
- Audry S, Blanc G, Schafer J. Cadmium transport in the Lot-Garonne River system (France) - temporal variability and a model for flux estimation. *Sci Total Environ* 2004;319:197-213.

- Baden KN, Murray J, Capaldi RA, Guillemin K. Early developmental pathology due to cytochrome *c* oxidase deficiency is revealed by a new zebrafish model. *J Biol Chem* 2007; 282: 34839–49.
- Bagchi D, Joshi SS, Bagchi M, Balmoori J, Benner EJ, Kuszynski CA, Stohs SJ. Cadmium- and chromium-induced oxidative stress, DNA damage, and apoptotic cell death in cultured human chronic myelogenous leukemic K562 cells, promyelocytic leukemic HL-60 cells, and normal human peripheral blood mononuclear cells. *J Biochem Mol Toxicol* 2000;14:33-41.
- Bakir F, Damluji SF, Aminzaki L, Murtadha M, Khalidi A, Alrawi NY, Tikriti S, Dhahir HI, Clarkson TW, Smith JC, Doherty RA. Methylmercury poisoning in Iraq - interuniversity report. *Science* 1973;181:230-241.
- Barkay T, Miller SM, Summers AO. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* 2003;27:355-84.
- Barnard GF, Staniunas RJ, Mori M, Puder M, Jessup MJ, Steele GD. Jr, Chen LB. Gastric and hepatocellular carcinomas do not overexpress the same ribosomal protein messenger RNAs as colonic carcinoma. *Cancer Res* 1993;53:4048-52.
- Becerril C, Ferrero M, Sanz F, Castano A. Detection of mitomycin C-induced genetic damage in fish cells by use of RAPD. *Mutagenesis* 1999;14:449-56.
- Berman M, Chase T, Bartha R. Carbon Flow in Mercury Biomethylation by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Appl Environ Microbiol* 1990;56:298-300.
- Berntssen MH, Aatland A, Handy RD. Chronic dietary mercury exposure causes oxidative stress, brain lesions, and altered behaviour in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Aquat Toxicol* 2003; 65:55–72.
- Bertucci F, Salas S, Eysteris S, Nasser V, Finetti P, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Loriol B, Bachelart L, Montfort J, Victorero G, Viret F, Ollendorff V, Fert V, Giovaninni M, Delpero JR, Nguyen C, Viens P, Monges G, Birnbaum D, Houlgatte R. Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histoclinical parameters. *Oncogene* 2004;23:1377-91.
- Beucher C, Wong-Wah-Chung P, Richard C, Mailhot G, Bolte M, Cossa D. Dissolved gaseous mercury formation under UV irradiation of unamended tropical waters from French Guyana. *Sci Total Environ* 2002;290:131-8.
- Blanc G, Lapaquellerie Y, Maillet N, Anschutz P. A cadmium budget for the Lot-Garonne fluvial system (France). *Hydrobiologia* 1999;410:331–341.
- Boudou A, Delnomdedieu M, Georgescauld D, Ribeyre F, Saouter E. Fundamental roles of biological barriers in mercury accumulation and transfer in fresh-water ecosystems - (analysis at organism, organ, cell and molecular-levels). *Water Air Soil Poll* 1991;56:807-822.
- Boudou A, Maury-Brachet R, Coquery M, Durrieu G, Cossa D. Synergic effect of gold mining and damming on mercury contamination in fish. *Environ Sci Technol* 2005;39:2448-54.

- Boudou A, Ribeyre F. Experimental-study of trophic contamination of salmo-gairdneri by 2 mercury-compounds - hgcl₂ and ch₃hgcl - analysis at the organism and organ levels. *Water Air Soil Poll* 1985;26:137-148.
- Boudou A, Ribeyre F. Mercury in the food web: accumulation and transfer mechanisms. *Met Ions Biol Syst* 1997;34:289-319.
- Boyle D, Brix KV, Amlund H, Lundebye AK, Hogstrand C, Bury NR. Natural arsenic contaminated diets perturb reproduction in fish. *Environ Sci Technol* 2008;42(14):5354-60.
- Braeckman B, Raes H, Van Hoye D. Heavy-metal toxicity in an insect cell line. Effects of cadmium chloride, mercuric chloride and methylmercuric chloride on cell viability and proliferation in *Aedes albopictus* cells. *Cell Biol Toxicol* 1997; 13:389–97.
- Braeckman B, Raes H. The ultrastructural effect and subcellular localization of mercuric chloride and methylmercuric chloride in insect cells (*Aedes albopictus* C6/36). *Tissue Cell* 1999; 31: 223-232.
- Brigelius-Flohe R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 1999;27:951-65.
- Bryan GW, Langston WJ. Bioavailability, accumulation and effects of heavy metals in sediments with special reference to United Kingdom estuaries: a review. *Environ Pollut* 1992;76:89-131.
- Burlando B, Bonomo M, Capri F, Mancinelli G, Pons G, Viarengo A. Different effects of Hg²⁺ and Cu²⁺ on mussel (*Mytilus galloprovincialis*) plasma membrane Ca²⁺-ATPase: Hg²⁺ induction of protein expression. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2004;139:201-7.
- Burrows WD, Krenkel PA. Studies on uptake and loss of methylmercury-203 by bluegills (*Lepomis-macrochirus raf*). *Environ Sci Technol* 1973;7:1127-1130.
- Cambier S, Benard G, Mesmer-Dudons N, Gonzalez P, Rossignol R, Brethes D, Bourdineaud JP. At environmental doses, dietary methylmercury inhibits mitochondrial energy metabolism in skeletal muscles of the zebra fish (*Danio rerio*). *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:791-799.
- Campos LP, Raelson JV, Grant WF. Genome relationships among lotus species based on Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Theor Appl Genet* 1994;88:417-422.
- Cao J, Cai X, Zheng L, Geng L, Shi Z, Pao CC, Zheng S. Characterization of colorectal-cancer-related cDNA clones obtained by subtractive hybridization screening. *J Cancer Res Clin Oncol* 1997;123:447-51.
- Carranza-Rosales P, Said-Fernandez S, Sepulveda-Saavedra J, Cruz-Vega DE, Gandolfi AJ. Morphologic and functional alterations induced by low doses of mercuric chloride in the kidney OK cell line: ultrastructural evidence for an apoptotic mechanism of damage. *Toxicology* 2005; 210:111–21.

- Cattani I, Zhang H, Beone GM, Del Re AA, Boccelli R, Trevisan M. The role of natural purified humic acids in modifying mercury accessibility in water and soil. *J Environ Qual* 2009;38:493-501.
- Cavas T, Garanko NN, Arkhipchuk VV. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. *Food Chem Toxicol* 2005;43:569-574.
- Celio MR, Heizmann CW. Calcium-binding protein parvalbumin is associated with fast contracting muscle fibres. *Nature* 1982;297:504-6.
- Celo V, Lean DRS, Scott SL. In *Abiotic methylation of mercury in the aquatic environment*, 2006; Elsevier Science Bv: 2006; pp 126-137.
- Chan PK, Cheng SH. Cadmium-induced ectopic apoptosis in zebrafish embryos. *Arch Toxicol* 2003;77:69-79.
- Charleston JS, Body RL, Bolender RP, Mottet NK, Vahter ME, Burbacher TM. Changes in the number of astrocytes and microglia in the thalamus of the monkey *Macaca fascicularis* following long-term subclinical methylmercury exposure. *Neurotoxicology* 1996;17:127-38.
- Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 2003;278:36027-36031.
- Chen RW, Ganther HE, Hoekstra KG. Studies on the binding of methylmercury by thionein. *Biochem Biophys Res Commun* 1973;51:383-90.
- Choi AL, Weihe P, Budtz-Jorgensen E, Jorgensen PJ, Salonen JT, Tuomainen TP, Murata K, Nielsen HP, Petersen MS, Askham J, Grandjean P. Methylmercury exposure and adverse cardiovascular effects in Faroese whaling men. *Environ Health Perspect* 2009;117:367-72.
- Clarkson TW, Magos L, Myers GJ. The toxicology of mercury--current exposures and clinical manifestations. *N Engl J Med* 2003;349:1731-7.
- Clarkson TW. The toxicology of mercury and its compounds. In Watras CJ et Huckabee JW. (Eds) : *Mercury pollution : integration and synthesis*. Lewis Publishers, Chelsea :631-640.
- Collins RA, Dobson LV, Dusinska M, Kennedy G, Stetina R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res* 1997;375:183-193.
- Compeau GC, Bartha R. Sulfate-Reducing Bacteria: Principal Methylators of Mercury in Anoxic Estuarine Sediment. *Appl Environ Microbiol* 1985;50:498-502.
- Conte C, Mutti I, Puglisi P, Ferrarini A, Regina G, Maestri E, Marmiroli N. DNA fingerprinting analysis by a PCR based method for monitoring the genotoxic effects of heavy metals pollution. *Chemosphere* 1998;37:2739-2749.

- Coquery M, Cossa D, Sanjuan J. In *Speciation and sorption of mercury in two macro-tidal estuaries* 1997; pp 213-227.
- Coquery M. Biogéochimie du mercure en milieu estuarien et côtier. Thèse de doctorat. Université de Paris VI : 212p.
- Cordier S, Garel M, Mandereau L, Morcel H, Doineau P, Gosme-Seguret S, et al. Neurodevelopmental investigations among methylmercury-exposed children in French Guiana. *Environ Res* 2002; 89:1–11.
- Cordier S, Grasmick C, Paquier-Passelaigue M, Mandereau L, Weber JP, Jouan M. Mercury exposure in French Guiana: levels and determinants. *Arch Environ Health* 1998;53:299-303.
- Crespo-Lopez ME, Lima de Sa A, Herculano AM, Rodriguez Burbano R, Martins do Nascimento J. L. Methylmercury genotoxicity: a novel effect in human cell lines of the central nervous system. *Environ Int* 2007;33:141-6.
- Crump KL, Trudeau VL. Mercury-induced reproductive impairment in fish. *Environ Toxicol Chem* 2009;28(5):895-907.
- Davis LE, Kornfeld M, Mooney HS, Fiedler KJ, Haaland KY, Orrison WW, Cernichiari E, Clarkson TW. Methylmercury poisoning: long-term clinical, radiological, toxicological, and pathological studies of an affected family. *Ann Neurol* 1994;35:680-8.
- de Oliveira Ribeiro CA, Mesmer-Dudons N, Gonzalez P, Dominique Y, Bourdineaud JP, Boudou A, Massabuau JC. Effects of dietary methylmercury on zebrafish skeletal muscle fibres. *Environ Toxicol Phar* 2008;25:304-309.
- Delnomdedieu M, Boudou A, Desmazes JP, Georgescauld D. Interaction of mercury-chloride with the primary amine group of model membranes containing phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine. *Biochim Biophys Acta* 1989;986:191-199.
- Di Leva F, Domi T, Fedrizzi L, Lim D, Carafoli E. The plasma membrane Ca²⁺ ATPase of animal cells: structure, function and regulation. *Arch Biochem Biophys* 2008;476:65-74.
- Dil A, Misra A, Sulaiman IM, Sinha S, Sarkar C, Mahapatra AK, Hasnain SE. Genetic alterations in brain tumors identified by RAPD analysis. *Gene* 1998;206:45-48.
- Dock L, Rissanen RL, Vahter M. Demethylation and placental-transfer of methyl mercury in the pregnant hamster. *Toxicology* 1994;94(1-3):131-142.
- Dominique Y, Maury-Brachet R, Muresan B, Vigouroux R, Richard S, Cossa D, Mariotti A, Boudou A. Biofilm and mercury availability as key factors for mercury accumulation in fish (*Curimata cyprinoides*) from a disturbed Amazonian freshwater system. *Environ Toxicol Chem* 2007;26:45-52.
- Dreiem A, Gertz CC, Seegal RF. The effects of methylmercury on mitochondrial function and reactive oxygen species formation in rat striatal synaptosomes are age-dependent. *Toxicol Sci* 2005; 87: 156-62.

- Dreiem A, Seegal RF. Methylmercury-induced changes in mitochondrial function in striatal synaptosomes are calcium-dependent and ROS-independent. *Neurotoxicology* 2007; 28: 720-6.
- Drevnick PE, Sandheinrich MB, Oris JT. Increased ovarian follicular apoptosis in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to dietary methylmercury. *Aquat Toxicol* 2006;79(1):49-54.
- Drevnick PE, Sandheinrich MB. Effects of dietary methylmercury on reproductive endocrinology of fathead minnows. *Environ Sci Technol* 2003;37:4390-6.
- Durrieu G, Maury-Brachet R, Boudou A. Goldmining and mercury contamination of the piscivorous fish *Hoplias aimara* in French Guiana (Amazon basin). *Ecotoxicol Environ Saf* 2005;60:315-23.
- Ecob-Prince MS, Leberer E. Parvalbumin in mouse muscle *in vivo* and *in vitro*. *Differentiation* 1989;40:10-6.
- Edwards JR, Marty MS, Atchison WD. Comparative sensitivity of rat cerebellar neurons to dysregulation of divalent cation homeostasis and cytotoxicity caused by methylmercury. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;208:222-32.
- Ehrenstein C, Shu P, Wickenheiser EB, Hirner AV, Dolfen M, Emons H, Obe G. Methyl mercury uptake and associations with the induction of chromosomal aberrations in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Chem Biol Interac* 2002;141:259-274.
- Ekino S, Susa M, Ninomiya T, Imamura K, Kitamura T. Minamata disease revisited: an update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning. *J Neurol Sci* 2007;262:131-44.
- Ekstrom EB, Morel FM, Benoit JM. Mercury methylation independent of the acetyl-coenzyme A pathway in sulfate-reducing bacteria. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:5414-22.
- Enan MR. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to detect the genotoxic effect of heavy metals. *Biotechnol Appl Biochem* 2006;43:147-54.
- ESCODD. Comparative analysis of baseline 8-oxo-7,8-dihydroguanine in mammalian cell DNA, by different methods in different laboratories: an approach to consensus. *Carcinogenesis* 2002;23:2129-2133.
- Eto K. Minamata disease. *Neuropathology* 2000;20:S14-S19.
- Evans MS, Muir D, Lockhart WL, Stern G, Ryan M, Roach P. Persistent organic pollutants and metals in the freshwater biota of the Canadian Subarctic and Arctic: an overview. *Sci Total Environ* 2005;351-352:94-147.
- Fantozzi L, Ferrara R, Frontini FP, Dini F. Dissolved gaseous mercury production in the dark: Evidence for the fundamental role of bacteria in different types of Mediterranean water bodies. *Sci Total Environ* 2009;407:917-24.

- Fleming EJ, Mack EE, Green PG, Nelson DC. Mercury methylation from unexpected sources: molybdate-inhibited freshwater sediments and an iron-reducing bacterium. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:457-64.
- Fonfria E, Rodriguez-Farre E, Sunol C. Mercury interaction with the GABA(A) receptor modulates the benzodiazepine binding site in primary cultures of mouse cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* 2001;41:819-33.
- Fonfria E, Vilaro MT, Babot Z, Rodriguez-Farre E, Sunol C. Mercury compounds disrupt neuronal glutamate transport in cultured mouse cerebellar granule cells. *J Neurosci Res* 2005;79:545-53.
- Fox JH, Patel-Mandlik K, Cohen MM. Comparative effects of organic and inorganic mercury on brain slice respiration and metabolism. *J Neurochem* 1975; 24:757-62.
- Fremont L, Riazi A. Biochemical analysis of vitellogenin from rainbow trout (*Salmo gairdneri*): fatty acid composition of phospholipids. *Reprod Nutr Dev* 1988;28(4A):939-52.
- Fréry N, Maury-Brachet R, Maillot E, Deheeger M, de Merona B, Boudou A. Goldmining activities and mercury contamination of native amerindian communities in French Guiana: key role of fish in dietary uptake. *Environ Health Perspect* 2001; 109:449-56.
- Friberg L, Mottet NK. Accumulation of methylmercury and inorganic mercury in the brain. *Biol Trace Elem Res* 1989;21:201-6.
- Friedmann AS, Watzin MC, Brinck-Johnsen T, Leiter JC. Low levels of dietary methylmercury inhibit growth and gonadal development in juvenile walleye (*Stizostedion vitreum*). *Aquat Toxicol* 1996;35(3-4):265-278.
- Frigerio JM, Dagorn JC, Iovanna JL. Cloning, sequencing and expression of the L5, L21, L27a, L28, S5, S9, S10 and S29 human ribosomal protein mRNAs. *Biochim Biophys Acta* 1995;1262:64-8.
- Fu Y, Lee AS. Glucose regulated proteins in cancer progression, drug resistance and immunotherapy. *Cancer Biol Ther* 2006;5:741-4.
- Gailer J. Arsenic-selenium and mercury-selenium bonds in biology. *Coordin Chem Rev* 2007;251:234-254.
- Germann UA. P-glycoprotein--a mediator of multidrug resistance in tumour cells. *Eur J Cancer* 1996;32A:927-44.
- Giaginis C, Gatzidou E, Theocharis S. DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006;213:282-290.
- Gilmour CC, Henry EA, Mitchell R. Sulfate stimulation of mercury methylation in freshwater sediments. *Environ Sci Technol* 1992;26:2281-2287.
- Gnaiger E, Lassnig B, Kuznetsov A, Rieger G, Margreiter R. Mitochondrial oxygen affinity, respiratory flux control and excess capacity of cytochrome c oxidase. *J Exp Biol* 1998; 201:1129-39.

- Goering PL, Fisher BR, Noren BT, Papaconstantinou A, Rojko JL, Marler RJ. Mercury induces regional and cell-specific stress protein expression in rat kidney. *Toxicol Sci* 2000;53:447-57.
- Gonzalez P, Baudrimont M, Boudou A, Bourdineaud JP. Comparative effects of direct cadmium contamination on gene expression in gills, liver, skeletal muscles and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *Biometals* 2006;19:225-235.
- Gonzalez P, Dominique Y, Massabuau JC, Boudou A, Bourdineaud JP. Comparative effects of dietary methylmercury on gene expression in liver, skeletal muscle, and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Sci Technol* 2005;39:3972-80.
- Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 1993;62:385-427.
- Grandier-Vazeille X, Guerin M. Separation by blue native and colorless native polyacrylamide gel electrophoresis of the oxidative phosphorylation complexes of yeast mitochondria solubilized by different detergents: specific staining of the different complexes. *Anal Biochem* 1996; 242:248-54.
- Grandjean P, Weihe P, White RF, Debes F, Araki S, Yokoyama K, Murata K, Sorensen N, Dahl R, Jorgensen PJ. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol* 1997;19:417-28.
- Grandjean P, Weihe P, White RF, Debes F. Cognitive performance of children prenatally exposed to "safe" levels of methylmercury. *Environ Res* 1998;77:165-72.
- Grandjean P, White RF, Weihe P, Jorgensen PJ. Neurotoxic risk caused by stable and variable exposure to methylmercury from seafood. *Ambul Pediatr* 2003;3:18-23.
- Grayson TH, Cooper LF, Atienzar FA, Knowles MR, Gilpin ML. Molecular differentiation of *Renibacterium salmoninarum* isolates from worldwide locations. *Appl Environ Microb* 1999;65:961-968.
- Grotto D, Barcelos GRM, Valentini J, Antunes LMG, Angeli JPF, Garcia SC, Barbosa F. Low levels of methylmercury induce DNA damage in rats: protective effects of selenium. *Arch Toxicol* 2009;83:249-254.
- Guinee JB, van den Bergh JCJM, Boelens J, Fraanje PJ, Huppes G, Kandelaars PPAH, Lexmond TM, Moolenaar SW, Olsthoorn AA, Udo de Haes HA, Verkuijlen E, van der Voet E. Evaluation of risks of metal flows and accumulation in economy and environment. *Ecol Econ* 1999;30:47-65.
- Hagger JA, Atienzar FA, Jha AN. Genotoxic, cytotoxic, developmental and survival effects of tritiated water in the early life stages of the marine mollusc, *Mytilus edulis*. *Aquat Toxicol* 2005;74:205-217.
- Hall BD, Bodaly RA, Fudge RJP, Rudd JWM, Rosenberg DM. Food as the dominant pathway of methylmercury uptake by fish. *Water Air Soil Poll* 1997;100:13-24.

- Halliwell B. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutat Res* 1999;443:37-52.
- Hammerschmidt CR, Sandheinrich MB, Wiener JG, Rada RG. Effects of dietary methylmercury on reproduction of fathead minnows. *Environ Sci Technol* 2002;36:877-83.
- Hammerschmidt CR, Sandheinrich MB. Maternal diet during oogenesis is the major source of methylmercury in fish embryos. *Environ Sci Technol* 2005;39(10):3580-3584.
- Hammerschmidt CR, Wiener JG, Frazier BE, Rada RG. Methylmercury content of eggs in yellow perch related to maternal exposure in four Wisconsin lakes. *Environ Sci Technol* 1999;33(7):999-1003.
- Harada M. Neurotoxicity of methylmercury: Minamata and the Amazon. In *Mineral and metal neurotoxicology*; Yasui M, Strong MJ, Ota K, Verity MA. Eds, London: CRC Press, 1997, pp 177–188.
- Hartmann M, Hartwig A. Disturbance of DNA damage recognition after UV-irradiation by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells. *Carcinogenesis* 1998;19:617-621.
- Hempel M, Chau YK, Dutka BJ, McInnis RK, Wan KK, Liu D. In *toxicity of organomercury compounds - bioassay results as a basis for risk assessment* 1995; 1995; pp 721-724.
- Hogue DL, Ellison MJ, Young JD, Cass CE. Identification of a novel membrane transporter associated with intracellular membranes by phenotypic complementation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1996;271:9801-8
- Hogue DL, Kerby L, Ling V. A mammalian lysosomal membrane protein confers multidrug resistance upon expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1999;274:12877-82.
- Hogue DL, Nash C, Ling V, Hobman TC. Lysosome-associated protein transmembrane 4 alpha (LAPTM4 alpha) requires two tandemly arranged tyrosine-based signals for sorting to lysosomes. *Biochem J* 2002;365:721-30.
- Hutton M. Sources of cadmium in the environment. *Ecotoxicol Environ Saf* 1983;7:9-24.
- Imura N, Miura K, Inokawa M, Nakada S. Mechanism of methylmercury cytotoxicity: by biochemical and morphological experiments using cultured cells. *Toxicology* 1980;17:241-54.
- INRS. Le mercure : prévention de l'hydrargyrisme. Ed INRS. ED 546- 4^e édition, avril 1999.
- InSug O, Datar S, Koch CJ, Shapiro IM, Shenker BJ. Mercuric compounds inhibit human monocyte function by inducing apoptosis: evidence for formation of reactive oxygen species, development of mitochondrial membrane permeability transition and loss of reductive reserve. *Toxicology* 1997;124:211-24.

- Ishikawa T, Bao JJ, Yamane Y, Akimaru K, Frindrich K, Wright CD, Kuo MT. Coordinated induction of MRP/GS-X pump and gamma-glutamylcysteine synthetase by heavy metals in human leukemia cells. *J Biol Chem* 1996;271:14981-8.
- Itoi S, Kinoshita S, Kikuchi K, Watabe S. Changes of carp FoF1-ATPase in association with temperature acclimation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 284:R153–163.
- Jeziarska B, Lugowska K, Witeska M. The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). *Fish Physiol Biochem* 2009;35(4):625-40.
- Kasai H, Nadano D, Hidaka E, Higuchi K, Kawakubo M, Sato TA, Nakayama J. Differential expression of ribosomal proteins in human normal and neoplastic colorectum. *J Histochem Cytochem* 2003;51:567-74.
- Kavallaris M. The role of multidrug resistance-associated protein (MRP) expression in multidrug resistance. *Anticancer Drugs* 1997;8:17-25.
- Kawaguchi M, Yasumasu S, Shimizu A, Hiroi J, Yoshizaki N, Nagata K, Tanokura M, Iuchi I. Purification and gene cloning of *Fundulus heteroclitus* hatching enzyme. *FEBS J* 2005;272(17):4315-4326.
- Kerin EJ, Gilmour CC, Roden E, Suzuki MT, Coates JD, Mason RP. Mercury methylation by dissimilatory iron-reducing bacteria. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:7919-21.
- Kim CS, Rytuba JJ, Brown GE Jr. EXAFS study of mercury(II) sorption to Fe- and Al-(hydr)oxides. I. Effects of pH. *J Colloid Interface Sci* 2004;271:1-15.
- Kim SH, Lee JY, Kim J. Characterization of a wide range base-damage-endonuclease activity of mammalian rpS3. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;328:962-7.
- Kimura N, Shimada N, Fukuda M, Ishijima Y, Miyazaki H, Ishii A, Takagi Y, Ishikawa N. Regulation of cellular functions by nucleoside diphosphate kinases in mammals. *J Bioenerg Biomembr* 2000;32:309-15.
- Kinningham K, Kasarskis E. Antioxidant function of metallothioneins. *J Trace Elem Exp Med* 1998;11:219-226.
- Kirubakaran R, Joy KP. Changes in lipid profiles and ³²P-uptake into phosphoprotein (vitellogenin) content of the ovary and liver in the female catfish, *Clarias batrachus*, exposed to mercury. *Biomed Environ Sci* 1995;8(1):35-44.
- Kirubakaran R, Joy KP. Toxic effects of mercuric chloride, methylmercuric chloride, and emisan 6 (an organic mercurial fungicide) on ovarian recrudescence in the catfish *Clarias batrachus* (L.). *Bull Environ Contam Toxicol* 1988;41(6):902-9.
- Klaper R, Rees CB, Drevnick P, Weber D, Sandheinrich M, Carvan MJ. Gene expression changes related to endocrine function and decline in reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*) after dietary methylmercury exposure. *Environ Health Perspect* 2006;114(9):1337-43.

- Knopper LD, Mineau P. Organismal effects of pesticide exposure on meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*) living in golf course ecosystems: developmental instability, clinical hematology, body condition, and blood parasitology. *Environ Toxicol Chem* 2004;23:1512-1519.
- Lai K, Amsterdam A, Farrington S, Bronson RT, Hopkins N, Lees JA. Many ribosomal protein mutations are associated with growth impairment and tumor predisposition in zebrafish. *Dev Dyn* 2009;238:76-85.
- Langer R, Feith M, Siewert JR, Wester HJ, Hoefler H. Expression and clinical significance of glucose regulated proteins GRP78 (BiP) and GRP94 (GP96) in human adenocarcinomas of the esophagus. *BMC Cancer* 2008, 8, 70.
- Larsen AK, Escargueil AE, Skladanowski A. Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents. *Pharmacol Ther* 2000;85:217-29.
- Lasorsa BK, Allen-Gil SM. The methylmercury to total mercury ratio in marine, freshwater, and terrestrial organisms: an overview. *Water Air Soil Pollut* 1995;80:905-13.
- Latif MA, Bodaly RA, Johnston TA, Fudge RJ. Effects of environmental and maternally derived methylmercury on the embryonic and larval stages of walleye (*Stizostedion vitreum*). *Environ Pollut* 2001;111(1):139-48.
- Lauwerys RR. Mercure et dérivés organomercurels. In : *Toxicologie industrielle et intoxication professionnelles* 4^{ème} édition. Masson Paris: 219-246.
- Lee IP, Dixon RL. Effects of mercury on spermatogenesis studied by velocity sedimentation cell separation and serial mating. *J Pharmacol Exp Ther* 1975;194(1):171-81.
- Lee YH, Hultberg H, Andersson I. Catalytic effect of various metal-ions on the methylation of mercury in the presence of humic substances. *Water Air Soil Poll* 1985;25:391-400.
- Lefebvre DD, Kelly D, Budd K. Biotransformation of Hg(II) by cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:243-9.
- Leiva-Presa A, Capdevila M, Cols N, Atrian S, Gonzalez-Duarte P. Chemical foundation of the attenuation of methylmercury(II) cytotoxicity by metallothioneins. *Eur J Biochem* 2004;271:1323-8.
- Letellier T, Malgat M, Coquet M, Moretto B, Parrot-Roulaud F, Mazat JP. Mitochondrial myopathy studies on permeabilized muscle fibers. *Pediatr Res* 1992; 32:17-22.
- Limke TL, Atchison WD. Acute exposure to methylmercury opens the mitochondrial permeability transition pore in rat cerebellar granule cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002;178:52-61.
- Limke TL, Heidemann SR, Atchison WD. Disruption of intraneuronal divalent cation regulation by methylmercury: are specific targets involved in altered neuronal development and cytotoxicity in methylmercury poisoning? *Neurotoxicology* 2004;25:741-60.

- Limke TL, Otero-Montanez JK, Atchison WD. Evidence for interactions between intracellular calcium stores during methylmercury-induced intracellular calcium dysregulation in rat cerebellar granule neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;304:949-58.
- Lin YM, Furukawa Y, Tsunoda T, Yue CT, Yang KC, Nakamura Y. Molecular diagnosis of colorectal tumors by expression profiles of 50 genes expressed differentially in adenomas and carcinomas. *Oncogene* 2002;21:4120-8.
- Lindberg SE, Stratton WJ. Atmospheric mercury speciation: Concentrations and behavior of reactive gaseous mercury in ambient air. *Environ Sci Technol* 1998;32:49-57.
- Liu F, Inageda K, Nishitai G, Matsuoka M. Cadmium induces the expression of Grp78, an endoplasmic reticulum molecular chaperone, in LLC-PK1 renal epithelial cells. *Environ Health Perspect* 2006;114:859-64.
- Liu W, Li PJ, Qi XM, Zhou QX, Zheng L, Sun TH, Yang YS. DNA changes in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis. *Chemosphere* 2005;61:158-67.
- Liu W, Yang YS, Li PJ, Zhou QX, Xie LJ, Han YP. Risk assessment of cadmium-contaminated soil on plant DNA damage using RAPD and physiological indices. *J Hazard Mater* 2009;161:878-883.
- Liu W, Yang YS, Zhou Q, Xie L, Li P, Sun T. Impact assessment of cadmium contamination on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings at molecular and population levels using multiple biomarkers. *Chemosphere* 2007;67:1155-1163.
- LoPachin RMJr, Aschner M. Glial-neuronal interactions: relevance to neurotoxic mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993;118:141-58.
- Loumbourdis NS, Danscher G. Autometallographic tracing of mercury in frog liver. *Environ Pollut* 2004;129:299-304.
- Luo MJ, Lai MD. Identification of differentially expressed genes in normal mucosa, adenoma and adenocarcinoma of colon by SSH. *World J Gastroenterol* 2001;7:726-31.
- Marty MS, Atchison WD. Pathways mediating Ca^{2+} entry in rat cerebellar granule cells following in vitro exposure to methyl mercury. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997;147:319-30.
- Mason RP, Morel FMM, Hemond HF. In *the role of microorganisms in elemental mercury formation in natural-waters* 1995; pp 775-787.
- McVey MJ, Cooke GM, Curran IH, Chan HM, Kubow S, Lok E, Mehta R. An investigation of the effects of methylmercury in rats fed different dietary fats and proteins: testicular steroidogenic enzymes and serum testosterone levels. *Food Chem Toxicol* 2008;46(1):270-9.
- Minnema DJ, Cooper GP, Greenland RD. Effects of methylmercury on neurotransmitter release from rat brain synaptosomes. *Toxicol Appl Pharmacol* 1989;99:510-21.

- Mitsumori K, Maita K, Saito T, Tsuda S, Shirasu Y. Carcinogenicity of methylmercury chloride in ICR mice: preliminary note on renal carcinogenesis. *Cancer Lett* 1981;12:305-10.
- Miura K, Inokawa M, Imura N. Effects of methylmercury and some metal ions on microtubule networks in mouse glioma cells and in vitro tubulin polymerization. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984;73:218-31.
- Mootha VK, Wei MC, Buttle KF, Scorrano L, Panoutsakopoulou V, Mannella CA, et al. A reversible component of mitochondrial respiratory dysfunction in apoptosis can be rescued by exogenous cytochrome *c*. *EMBO J* 2001; 20:661–71.
- Morel FMM, Kraepiel AML, Amyot M. The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. *Annu Rev Ecol Syst* 1998;29:543-566.
- Mori N, Yasutake A, Hirayama K. Comparative study of activities in reactive oxygen species production/defense system in mitochondria of rat brain and liver, and their susceptibility to methylmercury toxicity. *Arch Toxicol* 2007; 81, 769-776.
- Murata K, Weihe P, Araki S, Budtz-Jorgensen E, Grandjean P. Evoked potentials in Faroese children prenatally exposed to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol* 1999;21:471-2.
- Murphy MG. Effects of exogenous linoleic acid on fatty acid composition, receptor-mediated cAMP formation, and transport functions in rat astrocytes in primary culture. *Neurochem Res* 1995;20:1365-75.
- Myers GJ, Davidson PW, Cox C, Shamlaye CF, Palumbo D, Cernichiari E, Sloane-Reeves J, Wilding GE, Kost J, Huang LS, Clarkson TW. Prenatal methylmercury exposure from ocean fish consumption in the Seychelles child development study. *Lancet* 2003;361:1686-92.
- Myers GJ, Davidson PW. Prenatal methylmercury exposure and children: neurologic, developmental, and behavioral research. *Environ Health Perspect* 1998;106:Suppl 3 841-7.
- Naganuma A, Miura N, Kaneko S, Mishina T, Hosoya S, Miyairi S, et al. GFAT as a target molecule of methylmercury toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *FASEB J* 2000; 14:968–72.
- Nagase H, Ose Y, Sato T, Ishikawa T. Methylation of mercury by humic substances in an aquatic environment. *Sci Total Environ* 1982;25:133-142.
- Ni M, Lee AS. ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Lett* 2007;581:3641-51.
- Nriagu JO. *The biochemistry of mercury in the environment* Elsevier/North-Holland Biomedical Press: **1979**; Vol. 3 p 696.
- O'Callaghan JP, Sriram K. Glial fibrillary acidic protein and related glial proteins as biomarkers of neurotoxicity. *Expert Opin Drug Saf* 2005;4:433-42.

- Ogura H, Takeuchi T, Morimoto K. A comparison of the 8-hydroxydeoxyguanosine, chromosome aberrations and micronucleus techniques for the assessment of the genotoxicity of mercury compounds in human blood lymphocytes. *Mutat Res* 1996;340:175-82.
- Omara FO, Flipo D, Brochu C, Denizeau F, Brousseau P, Potworowski EF, et al. Lack of suppressive effects of mixtures containing low levels of methylmercury (MeHg), polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDS), polychlorinated dibenzofurans (PCDFS), and aroclor biphenyls (PCBS) on mixed lymphocyte reaction, phagocytic, and natural killer cell activities of rat leukocytes in vitro. *J Toxicol Environ Health A* 1998; 54:561-77.
- Ong TM, Song B, Qian HW, Wu ZL, Whong WZ. Detection of genomic instability in lung cancer tissues by random amplified polymorphic DNA analysis. *Carcinogenesis* 1998;19:233-235.
- Oyake Y, Tanaka M, Kubo H, Chichibu M. Neuropathological studies on organic mercury poisoning with special reference to the staining and distribution of mercury granules. *Shinkei Kenkyu No Shimpo* 1966;10:744-50.
- Park ST, Lim KT, Chung YT, Kim SU. Methylmercury-induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor antagonists. *Neurotoxicology* 1996;17:37-45.
- Passos CJ, Mergler D. Human mercury exposure and adverse health effects in the Amazon: a review. *Cad Saude Publica* 2008;24;Suppl 4 s503-20.
- Paumard P, Vaillier J, Couлары B, Schaeffer J, Soubannier V, Mueller DM, et al. The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J* 2002; 21:221-30.
- Piec I, Lustrat A, Alliot J, Chambon C, Taylor RG, Bechet D. Differential proteome analysis of aging in rat skeletal muscle. *FASEB J* 2005;19:1143-5.
- Pierron F, Baudrimont M, Dufour S, Elie P, Bossy A, Baloché S, Mesmer-Dudons N, Gonzalez P, Bourdineaud JP, Massabuau JC. How cadmium could compromise the completion of the European eel's reproductive migration. *Environ Sci Technol* 2008;42(12):4607-12.
- Plachý R, Hamal P, Raclavský V. McRAPD as a new approach to rapid and accurate identification of pathogenic yeasts. *J Microbiol Methods* 2005;60:107-113.
- Pogue-Geile K, Geiser JR, Shu M, Miller C, Wool IG, Meisler AI, Pipas JM. Ribosomal protein genes are overexpressed in colorectal cancer: isolation of a cDNA clone encoding the human S3 ribosomal protein. *Mol Cell Biol* 1991;11:3842-9.
- Porcella D, Biogeochemistry. In: Watras C. J, Huckabee J. W. (Eds) : *Mercury pollution: integration and synthesis*. CRC Boca Raton 1994 pp 3-19
- Postel EH, Berberich SJ, Rooney JW, Kaetzel DM. Human NM23/nucleoside diphosphate kinase regulates gene expression through DNA binding to nuclease-hypersensitive transcriptional elements. *J Bioenerg Biomembr* 2000;32:277-84.

- Postel EH. NM23-NDP kinase. *Int J Biochem Cell Biol* 1998;30:1291-5.
- Pruski AM, Dixon DR. Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair efficiency in the gill cells of *Mytilus edulis* L. *Aquat Toxicol* 2002;57:127-137.
- Qian Y, Falahatpisheh MH, Zheng Y, Ramos KS, Tiffany-Castiglioni, E., Induction of 78 kD glucose-regulated protein (GRP78) expression and redox-regulated transcription factor activity by lead and mercury in C6 rat glioma cells. *Neurotox Res* 2001;3:581-9.
- Quemerais B, Cossa D, Rondeau B, Pham TT, Fortin B. Mercury distribution in relation to iron and manganese in the waters of the St. Lawrence river. *Sci Total Environ* 1998;213:193-201.
- Ravichandran M. Interactions between mercury and dissolved organic matter - a review. *Chemosphere* 2004;55:319-331.
- Regnell O, Ewald G, Lord E. Factors controlling temporal variation in methyl mercury levels in sediment and water in a seasonally stratified lake. *Limnol Oceanogr* 1997;42:1784-1795.
- Regnell O, Tunlid A, Ewald G, Sangfors O. Methyl mercury production in freshwater microcosms affected by dissolved oxygen levels: Role of cobalamin and microbial community composition. *Can J Fish Aquat Sci* 1996;53:1535-1545.
- Robinson JB, Tuovinen OH. Mechanisms of microbial resistance and detoxification of mercury and organomercury compounds: physiological, biochemical, and genetic analyses. *Microbiol Rev* 1984;48:95-124.
- Rodriguez-Cea A, Ayllon F, Garcia-Vazquez E. Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. *Ecotoxicol Environ Saf* 2003;56:442-448.
- Rossignol R, Faustin B, Rocher C, Malgat M, Mazat JP, Letellier T. Mitochondrial threshold effects. *Biochem J* 2003; 370:751-62.
- Roulet M, Grimaldi C. Le mercure dans les sols d'Amazonie. Origine et comportement du mercure dans les couvertures ferrallitiques du bassin amazonien et des Guyanes. In Carmouze JP, Lucotte M, Boudou A. (Eds) : *Le mercure en Amazonie* ; IRD Paris : 121-166.
- Rudd JWM. In *Sources of methyl mercury to fresh-water ecosystems - a review*, 1995; 1995; pp 697-713.
- Russo C, Rocco L, Morescalchi MA, Stingo V. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. *Ecotoxicol Environ Saf* 2004;57:168-174.
- Samson JC, Shenker J. The teratogenic effects of methylmercury on early development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Aquat Toxicol* 2000;48(2-3):343-354.
- Sanchez-Galan S, Linde AR, Ayllon F, Garcia-Vazquez E. Induction of micronuclei in eel (*Anguilla anguilla* L.) by heavy metals. *Ecotoxicol Environ Saf* 2001;49:139-143.

- Sanfeliu C, Sebastia J, Ki SU. Methylmercury neurotoxicity in cultures of human neurons, astrocytes, neuroblastoma cells. *Neurotoxicology* 2001; 22:317–27.
- Sano K, Inohaya K, Kawaguchi M, Yoshizaki N, Iuchi I, Yasumasu S. Purification and characterization of zebrafish hatching enzyme - an evolutionary aspect of the mechanism of egg envelope digestion. *FEBS J* 2008;275(23):5934-46.
- Savva D. DNA fingerprinting as a biomarker assay in ecotoxicology. *Toxicol Ecotoxicol News Rev* 1996;3:110-114.
- Savva D. Use of DNA fingerprinting to detect genotoxic effects. *Ecotoxicol Environ Saf* 1998;41:103-106.
- Schaefer JK, Morel FMM. High methylation rates of mercury bound to cysteine by *Geobacter sulfurreducens*. *Nat Geosci* 2009;2:123-126.
- Schägger H, von Jagow G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* 1991; 199:223–31.
- Schramm M, Eimerl S, Costa E. Serum and depolarizing agents cause acute neurotoxicity in cultured cerebellar granule cells: role of the glutamate receptor responsive to N-methyl-D-aspartate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:1193-7.
- Sellers P, Kelly CA, Rudd JWM, MacHutchon AR. Photodegradation of methylmercury in lakes. *Nature* 1996;380:694-697.
- Shanker G, Allen JW, Mutkus LA, Aschner M. Methylmercury inhibits cysteine uptake in cultured primary astrocytes, but not in neurons. *Brain Res* 2001;914:159-65.
- Shenker BJ, Berthold P, Decker S, Mayro J, Rooney C, Vitale L, et al. Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes. II. Alterations in cell viability. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1992; 14:555–77.
- Siciliano SD, Lean DR. Methyltransferase: an enzyme assay for microbial methylmercury formation in acidic soils and sediments. *Environ Toxicol Chem* 2002;21:1184-90.
- Simon O, Boudou A. Direct and trophic contamination of the herbivorous carp *Ctenopharyngodon idella* by inorganic mercury and methylmercury. *Ecotoxicol Environ Saf* 2001;50:48-59.
- Simon S, Roy D, Schindler M. Intracellular pH and the control of multidrug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:1128-32.
- Singh KP, Roy D. Identification of novel breast tumor-specific mutation(s) in the q11.2 region of chromosome 17 by RAPD/AP-PCR fingerprinting. *Gene* 2001;269:33-43.
- Snyder RD. Role of active oxygen species in metal-induced DNA strand breakage in human-diploid fibroblasts. *Mutat Res* 1988;193:237-246.
- Sone N, Larsstuvold MK, Kagawa Y. Effect of methyl mercury on phosphorylation, transport, and oxidation in mammalian mitochondria. *J Biochem* 1977; 82:859–68.

- Steuerwald U, Weihe P, Jorgensen PJ, Bjerve K, Brock J, Heinzow B, Budtz-Jorgensen E, Grandjean P. Maternal seafood diet, methylmercury exposure, and neonatal neurologic function. *J Pediatr* 2000;136:599-605.
- Tamm C, Duckworth J, Hermanson O, Ceccatelli S. High susceptibility of neural stem cells to methylmercury toxicity: effects on cell survival and neuronal differentiation. *J Neurochem* 2006; 97:69–78.
- Tan TM, Sin YM, Wong KP. Mercury-induced UDP-glucuronyltransferase (UDPGT) activity in mouse kidney. *Toxicology* 1990;64: 81-7.
- Thurston SW, Bovet P, Myers GJ, Davidson PW, Georger LA, Shamlaye C, Clarkson TW. Does prenatal methylmercury exposure from fish consumption affect blood pressure in childhood? *Neurotoxicology* 2007;28:924-30.
- Uechi T, Nakajima Y, Nakao A, Torihara H, Chakraborty A, Inoue K, Kenmochi N. Ribosomal protein gene knockdown causes developmental defects in zebrafish. *PLoS ONE* 2006, 1, e37.
- Usuki F, Yasutake A, Matsumoto M, Umehara F, Higuchi I. The effect of methylmercury on skeletal muscle in the rat: a histopathological study. *Toxicol Lett* 1998;94:227-32.
- Usuki F, Yasutake A, Umehara F, Tokunaga H, Matsumoto M, Eto K, Ishiura S, Higuchi I. *In vivo* protection of a water-soluble derivative of vitamin E, Trolox, against methylmercury-intoxication in the rat. *Neurosci Lett* 2001;304:199-203.
- Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science* 1995;270:484-7.
- Viarengo A, Mancinelli G, Pertica M, Fabbri R, Orunesu M. Effects of heavy metals on the Ca(2+)-ATPase activity present in gill cell plasma-membrane of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lam.). *Comp Biochem Physiol C* 1993;106:655-60.
- Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 2003;192:95-117.
- Wang Y, Fang J, Leonard SS, Rao KM. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 2004;36:1434-1443.
- Wang Y-S, Lou S-W. Structural and expression analysis of hepatic vitellogenin gene during ovarian maturation in *Anguilla japonica*. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006;100(4-5):193-201.
- Weber JH. Binding and transport of metals by humic materials. In Frimmel F. H. et Christman R. F. (Eds) : *Humic substances and their role in the environment*. John Wiley & sons, New York : 165-178.
- Weber JH. Review of possible paths for abiotic methylation of mercury(II) in the aquatic environment. *Chemosphere* 1993;26:2063-2077.
- Welle S, Bhatt K, Thornton CA. Inventory of high-abundance mRNAs in skeletal muscle of normal men. *Genome Res* 1999;9:506-13.

- Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 1990;18:7213-7218.
- Welsh J, Pretzman C, Postic D, Saint Girons I, Baranton G, McClelland M. Genomic fingerprinting by arbitrarily primed polymerase chain reaction resolves *Borrelia burgdorferi* into three distinct phyletic groups. *Int J Syst Bacteriol* 1992;42:370-7.
- Westerfield M.. The zebrafish book, 4th Edition; A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). **2007** University of Oregon Press Eugene.
- WHO (1990) Environmental health criteria 101: Mercury, Geneva, World Health Organization, 103 pp.
- Wiener JG, Krabbenhoft DP, Heinz GH, Scheuhammer AM. Ecotoxicology of mercury. In Hoffman D. J, Rattner B. A, Burton Jr. G. A, Cairns Jr. J. (Eds). *Handbook of ecotoxicology. Second edition*. Lewis publisher London. 409-463.
- Wiener JG, Krabbenhoft DP, Heinz GH, Scheuhammer AM. Ecotoxicology of mercury. In *Handbook of Ecotoxicology*; Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton, G.A., Cairns, J., Eds.; Lewis Publishers: Boca Raton, FL, 2003; pp 409-463.
- Wittig I, Braun HP, Schägger H. Blue native PAGE. *Nat Protoc* 2006; 1:418–28.
- Yao CP, Allen JW, Aschner M. Metallothioneins attenuate methylmercury-induced neurotoxicity in cultured astrocytes and astrocytoma cells. *Ann N Y Acad Sci* 1999a;890:223-6.
- Yao CP, Allen JW, Conklin DR, Aschner M. Transfection and overexpression of metallothionein-I in neonatal rat primary astrocyte cultures and in astrocytoma cells increases their resistance to methylmercury-induced cytotoxicity. *Brain Res* 1999b;818:414-20.
- Yao CP, Allen JW, Mutkus LA, Xu SB, Tan KH, Aschner M. Foreign metallothionein-I expression by transient transfection in MT-I and MT-II null astrocytes confers increased protection against acute methylmercury cytotoxicity. *Brain Res* 2000;855:32-8.
- Yasutake A, Hirayama K. Evaluation of methylmercury biotransformation using rat liver slices. *Arch Toxicol* 2001;75:400-6.
- Yasutake A, Hirayama K. Selective quantification of inorganic mercury in tissues of methylmercury-treated rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 1990;45:662-6.
- Yee S, Choi BH. Oxidative stress in neurotoxic effects of methylmercury poisoning. *Neurotoxicology* 1996;17:17-26.
- Yoshino Y, Mozai T, Nakao K. Biochemical changes in the brain in rats poisoned with an alkylmercury compound, with special reference to the inhibition of protein synthesis in brain cortex slices. *J Neurochem* 1966; 13:1223–30.

- Yu Z, Luo H, Fu W, Mattson MP. The endoplasmic reticulum stress-responsive protein GRP78 protects neurons against excitotoxicity and apoptosis: suppression of oxidative stress and stabilization of calcium homeostasis. *Exp Neurol* 1999;155:302-14.
- Yuan Y, Atchison WD. Methylmercury differentially affects GABA(A) receptor-mediated spontaneous IPSCs in Purkinje and granule cells of rat cerebellar slices. *J Physiol* 2003;550:191-204.
- Zhang L, Zhou W, Velculescu VE, Kern SE, Hruban RH, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW. Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* 1997;276:1268-72.
- Zheng HC, Takahashi H, Li XH, Hara T, Masuda S, Guan YF, Takano Y. Overexpression of GRP78 and GRP94 are markers for aggressive behavior and poor prognosis in gastric carcinomas. *Hum Pathol* 2008;39:1042-9.
- Zhiyi R, Haowen Y. A method for genotoxicity detection using random amplified polymorphism DNA with *Danio rerio*. *Ecotoxicol Environ Saf* 2004;58:96-103.

Annexe 1

Programmes utilisés lors de l'analyse SAGE.

I/ Programme de mise en forme de la base de donnée.

Le programme permettant la mise en forme de la base de données avait pour but de retirer tous les retours à la ligne présent dans la rédaction de la séquence d'ARNm récupérée car la coupure de la chaîne caractère introduite par le retour à la ligne empêchait l'identification du tag si sa séquence se trouvait de part et d'autre du retour à la ligne. Pour ce faire le programme avait pour fonction de lire ligne par ligne la base de données et de supprimer les retours à la ligne présent dans les séquences en conservant ceux présents entre les différentes séquences. Le programme utilisé est le suivant :

```
#!/bin/bash
# Permet de lire chaque ligne du fichier complete.cdna-list.danio
cat complete.cdna-list.danio | while read line
do
# Mise en mémoire des 4 ou 7 premiers caractères dans les variables chaine1 et chaine2
chaine1=${line:0:4}
chaine2=${line:0:7}
# Ce test permet de savoir si les 4 caractères placés dans chaine1 correspondent à EMBL et si
oui réécrire la ligne avec un retour à la ligne
if test "$chaine1" = "EMBL"
then
echo -ne '\n' & echo "$line"
# Si la condition précédente n'est remplie ce test permet de savoir si les 7 caractères placés
dans chaine2 correspondent à UNIPROT et si oui réécrire la ligne avec un retour à la ligne
elif test "$chaine2" = "UNIPROT"
then
echo -ne '\n' & echo "$line"
# Si aucune des conditions précédentes n'est validées cela permet de réécrire la ligne sans
retour à la ligne permettant d'écrire les séquences d'un seul bloc.
else
echo "$line" | tr -d '\n'
fi
done > bank-cdna-mis-en-forme-3-Mars-2006
```

II/ Programme d'identification des tags

Une fois cette base de données mise en forme un autre programme a été rédigé pour identifier les tags des banques SAGE. Cette identification se fait en deux étapes avec en premier lieu la recherche de la séquence du tag parmi les séquences rapatriées et mises en forme. La seconde étape consiste à récupérer la ligne descriptive de la séquence correspondante au tag et écrire ces informations plus la séquence du tag dans un nouveau document. Le programme utilisé est le suivant :

```
#!/bin/bash
# Permet de lire chaque ligne du fichier analyse-generale.txt
cat analyse-generale.txt | while read line
do
# Mise en mémoire de la ligne qui correspond au tag dans la variable chaine et réécriture de
ce tag dans un nouveau fichier
chaine=${line}
echo "$chaine"
#Recherche du tag dans la base de données et écriture de la ligne contenant la description du
gène dans le fichier bb
grep -n1 "$chaine" bank-cdna-mis-en-forme-3-Mars-2006 > bb
taille=$(wc -l bb | awk '{print $1}')
#Control de l'absence de ligne dans le fichier bb et si pas de ligne écrire la mention PAS
TROUVE sous le tag
if test $taille -eq 0
then
echo "PAS TROUVE"
#Dans le cas de la négative du test précédent écrire la ligne possédant la description du gène
sous le tag
else
grep -n1 "$chaine" bank-cdna-mis-en-forme-3-Mars-2006 | head -1 | awk '{print $7 " " $8 " "
$9 " " $10 " " $11 " " $12 " " $13 " " $14 " " $15 " " $16 " " $17 " "$18}'
fi
done > liste-tag-identifié
```


Annexe 2

Ce tableau liste les divers milieux réactionnels utilisés pour mener à bien la construction des banques SAGE. La composition de tous ces milieux est indiquée dans le tableau suivant :

Tampon de lyse	100 mM Tris-HCl, pH 7,5 500 mM LiCl 10 mM EDTA 1 % lithium dodecyl sulfate 5 mM DTT
Tampon A	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM LiCl 1 mM EDTA 0,1 % lithium dodecyl sulfate 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ glycogène
Tampon B	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM LiCl 1 mM EDTA 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ glycogène
First strand buffer 5X	250 mM Tris-HCl, pH 8,3 375 mM KCl 15 mM MgCl_2
Second Strand Buffer 5X	100 mM Tris-HCl, pH 6,9 450 mM KCl 23 mM MgCl_2 0,075 mM β -NAD ⁺ 50 mM sulfate d'ammonium
Tampon C	5 mM Tris, pH 7,5 0,5 mM EDTA 1 M NaCl 1 % SDS 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ glycogène de moule
Tampon D	5 mM Tris, pH 7,5 0,5 mM EDTA 1 M NaCl 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ BSA (Albumine Sérique de Bœuf)
Tampon 4 10 X	200 mM Tris-acétate, pH 7,9 100 mM acétate de magnésium 500 mM acétate de potassium 10 mM DTT
Tampon LOTE	3 mM Tris-HCl, pH 7,5 0,2 mM EDTA, pH 7,5

Tampon de ligation 10X	60 mM Tris-HCl, pH 7,5 60 mM MgCl ₂ 50 mM NaCl 1 mg.mL ⁻¹ BSA 70 mM β-mercaptoéthanol 1 mM ATP 20 mM DTT 10 mM spermidine
TBE 10X	178 mM Tris 178 mM acide borique 4 mM EDTA
Milieu SOC	2 % tryptone 0,5 % d'extrait de levure 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM glucose

Résumé

Les effets de la contamination au méthylmercure chez le poisson zèbre *Danio rerio* ont été interrogés au sein de deux tissus, le muscle squelettique et le système nerveux central, dont le choix fut motivé par leur fort potentiel bioaccumulateur de cet organométallique.

Après contamination par voie trophique, à un niveau d'exposition représentatif de ce qui peut advenir dans certains écosystèmes aquatiques, nos observations expérimentales indiquent que ce métal perturbe fortement le métabolisme mitochondrial dans les muscles, mais épargne celui du cerveau ; en outre, l'analyse de l'expression génique suggère une perturbation de l'homéostasie du calcium dans ces deux tissus. Dans le système nerveux central, parmi les synapses glutamatergique et GABAnergique, seule la voie métabolique du GABA semble montrer une adaptation face au MeHg. Concernant le muscle squelettique, l'analyse SAGE a permis d'appréhender les impacts du MeHg à l'échelle cellulaire, révélant également une perturbation de la synthèse protéique, l'induction d'un stress au niveau du reticulum endoplasmique ainsi que l'induction de plusieurs gènes impliqués dans les processus de détoxification et les voies de réponse générale au stress. Notre étude a également mis en évidence la surexpression du gène de la vitellogénine dans le muscle chez des poissons mâles désignant ainsi ce métal comme un perturbateur endocrinien. Enfin, nous avons également révélé une perturbation importante de l'éclosion des œufs associée à un transfert maternel de ce toxique.

Mots clés : Méthylmercure, SAGE, bioénergétique, génotoxicité, reproduction, cerveau, muscle, *Danio rerio*.

Abstract

The effects of methylmercury contamination on the zebrafish, *Danio rerio*, were assessed in two tissues, the skeletal muscle and the central nervous system, whose choice was motivated by their high potential to bioaccumulate this organometallic.

After contamination by dietary, at a representative exposure level of which may arise in some aquatic ecosystems, our experimental observations indicate that metal strongly disrupts the mitochondrial metabolism in the muscles, but savings that the brain; in addition, the gene expression analysis suggests a disruption of the calcium homeostasis in these two tissues. In the central nervous system among glutamatergique and GABAnergique synapses, only the metabolic pathway of the GABA seems to show an adaptation to the MeHg. Concerning the skeletal muscle scanning SAGE analysis helped to understand the impacts of the MeHg at the cellular scale. It is also revealing a disruption of the protein synthesis, the induction of a stress at the endoplasmic reticulum level as well as the induction of several genes involved in detoxification process and general stress response. Our study has also highlighted the induction of the vitellogenin gene in the muscle of male fish designating this metal as an endocrine disruptor. Finally, we have also revealed a significant disruption of hatching eggs associated with maternal transfer of this toxic.

Keywords: Methylmercury, SAGE, bioenergetic, genotoxicity, breeding, brain, muscle, *Danio rerio*.