

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

"DÉVELOPPEMENT DE BIOMARQUEURS POUR LA SURVEILLANCE
PRÉCOCE DE LA NEUROTOXICITÉ DU MÉTHYLMERCURE CHEZ LE
RAT"

PAR

KOVANA MARCEL LOUA

DÉPARTEMENT DE SANTÉ ENVIRONNEMENTALE ET SANTÉ AU
TRAVAIL

FACULTÉ DE MÉDECINE

DÉPARTEMENT SANTÉ ENVIRONNEMENTALE ET SANTÉ AU TRAVAIL

THÈSE PRÉSENTÉE À LA FACULTÉ DES ÉTUDES SUPÉRIEURES
EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE PHILOSOPHIÆ DOCTOR (Ph.D.)
EN SANTÉ PUBLIQUE,
OPTION TOXICOLOGIE ENVIRONNEMENTALE

Août, 2000

© KOVANA MARCEL LOUA



W

4

US8

2001

v. 053

3

100
100
100

U

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

FACULTÉ DES ÉTUDES SUPÉRIEURES

Cette thèse intitulée :

“DÉVELOPPEMENT DE BIOMARQUEURS POUR LA SURVEILLANCE
PRÉCOCE DE LA NEUROTOXICITÉ DU MÉTHYLMERCURE CHEZ LE
RAT”

Présentée par

KOVANA MARCEL LOUA

a été évaluée par le jury composé des membres suivants :

| | | |
|---------|-------------------|---|
| Docteur | Jules BRODEUR. | Président Rapporteur |
| Docteur | Donna Mergler. | Examinatrice externe |
| Docteur | Saroj CHAKRABARTI | Directeur de la recherche |
| Docteur | Heather D. DURHAM | Codirectrice de recherche |
| Docteur | Maurice PTITO | Membre de jury |
| Docteur | Gabriel Plaa | Représentant du Doyen de la Faculté des études supérieures |

Thèse acceptée le : mars 2001

SOMMAIRE

L'objectif de cette étude était de développer des biomarqueurs de la neurotoxicité précoce du MeHg chez le rat adulte, en utilisant les lymphocytes et plaquettes du sang circulant comme substituts de neurones centraux. Pour ce faire, nous avons d'abord évalué la captation de la choline, de la dopamine (DA), de la sérotonine (5-HT), la liaison aux récepteurs muscarinergiques (mChRs) et dopaminergic D₂ dans les synaptosomes du cortex cérébral, du striatum, de l'hypothalamus, de l'hippocampe, du tronc cérébral et du cervelet, après exposition *in vitro* à différentes concentrations de chlorure de MeHg (0, 1, 2.5 et 5 µM). Dans ces conditions, la captation de la 5-HT était mesurée au niveau des plaquettes. De même, la captation de la DA et la liaison aux récepteurs mChRs et D₂ étaient évaluées au niveau des lymphocytes du sang circulant. Enfin, les résultats *in vitro* étaient validés en évaluant les voies cholinergiques et monoaminergiques dans les mêmes régions du cerveau et au niveau des plaquettes et lymphocytes chez des rats mâles adultes gavés au chlorure de MeHg (0, 2, 4 et 6 mg/kg pendant 10 jours consécutifs). Les résultats de ces travaux sont donnés ci-dessous.

4.1) Effets *in vitro* sur le système cholinergique. La captation de la choline était inhibée de 27 (tronc cérébral) à 56.24% (hypothalamus) à 2.5 µM de chlorure de MeHg, et de 58.25% (tronc cérébral) à 79,21% (hippocampe) à 5 µM de chlorure de MeHg. La liaison du [³H]-QNB était aussi inhibée de 46.30 (tronc cérébral) à 62.5% (cervelet), et de 58.00 (tronc cérébral) à 84.00% (cervelet) aux mêmes niveaux d'exposition respective. Au niveau des lymphocytes, la liaison aux mChRs était inhibée à 37.43 et 56.71% à 2.5 et 5 µM du chlorure de MeHg respectivement. La concentration inhibitrice 50% (CI₅₀) en chlorure de MeHg variait de 2.7 à 4.33 µM pour la captation de la choline et de 5 à 7.64 µM pour la liaison du [³H]-QNB au niveau des synaptosomes. Au niveau des lymphocytes, la CI₅₀ était d'environ 8.33 µM pour la liaison du [³H]-QNB.

4.2) Effets *in vitro* sur les systèmes monoaminergiques. La captation de la DA était inhibée de 33.31 (hypothalamus) à 58.98% (cortex cérébral) à 2.5 µM et de 54.78 (hypothalamus) à 87.62% (striatum) à 5 µM de chlorure de MeHg. À ces mêmes niveaux d'exposition respectives, la captation de la 5-HT était inhibée de 16.94 (hypothalamus) à 42.10% (cortex cérébral), de 38.11

(hypothalamus) à 82.30% (striatum). Parallèlement, la captation de la 5-HT était inhibée de 37.31 à 68.65% respectivement à 2.5 et 5 μM du chlorure de MeHg au niveau des plaquettes. De l'autre côté, la liaison de la [^3H]raclopride était inhibée de 23.33 (tronc cérébral) à 48.57% (cervelet) à 2.5 μM et de 53.33 (tronc cérébral) à 77.86% (cervelet) à 5 μM du chlorure de MeHg. Sur les lymphocytes, la liaison de la [^3H]raclopride était inhibée de 36.42 et 58.21% respectivement à 2.5 et 5 μM du chlorure de MeHg. Dans nos conditions expérimentales, la captation de la DA n'a pu être mesurée au niveau des lymphocytes. De plus, aucun effet statistiquement significatif n'a pu être observé au niveau des synaptosomes, des lymphocytes et plaquettes exposés à 0.5 μM du chlorure de MeHg. La concentration inhibitrice 50% (CI_{50}) en chlorure de MeHg correspondant aux effets observés était de 4.38 à 2.87 μM pour la captation de la DA, de 6.50 à 3.20 μM pour la captation de la 5-HT au niveau des synaptosomes. Au niveau des plaquettes, la CI_{50} pour la captation de la 5-HT était de 3.62 μM de chlorure de MeHg. Cette valeur était de 4.95 (tronc cérébral) à 3.14 (cervelet) μM pour la liaison de la [^3H]raclopride dans les synaptosomes et de 6.53 μM au niveau des lymphocytes.

4.3) Effets *in vivo* sur le système cholinergique. L'activité de la ChAT, la concentration de l'ACh ainsi que la liaison du [^3H]-QNB étaient réduites dans différentes régions du cerveau chez les rats traités aux doses cumulatives de 40 et 60 mg/kg de chlorure de MeHg. Parallèlement, la liaison du [^3H]-QNB était réduite au niveau des lymphocytes à ces mêmes doses cumulatives.

4.4) Effets *in vitro* sur les systèmes monoaminergiques. On a observé l'augmentation de la concentration de la DA, NE et de la 6-HT dans différentes régions du cerveau à la dose cumulative de 40 mg/kg. Par contre à 60 mg/kg, le MeHg a provoqué la réduction de ces monoamines dans les mêmes régions du cerveau. En même temps, on a observé une diminution significative de la concentration des métabolites DOPAC, HVA, VMA, MHPG et de la 5-HIAA, et une réduction de l'activité de la MAO-B et la liaison de la [^3H]raclopride dans les différentes régions du cerveau chez les rats traités aux doses cumulatives de 40 et 60 mg/kg du chlorure de MeHg. Parallèlement, la réduction de la liaison de la [^3H]raclopride aux lymphocytes et de la concentration de la 5-HT, l'inhibition de l'activité de la MAO étaient observées au niveau des lymphocytes et des plaquettes aux doses cumulatives de 40 et 60 mg/kg. Toutefois, dans les mêmes conditions d'exposition, seules la liaison de la [^3H]raclopride aux lymphocytes et le niveau de la 5-HT dans les plaquettes ont montré une corrélation significative avec les mêmes

effets survenus au niveau des différentes régions du cerveau chez les rats traités aux doses cumulatives de 40 et 60 mg/kg du chlorure de MeHg.

4.5) Effets *in vitro* sur les microtubules. L'administration répétée du chlorure de MeHg a entraîné une perte significative des microtubules au niveau des plaquettes et lymphocytes du sang circulant chez le rat adulte. La perte des microtubules était fonction de la dose du MeHg et de la cellule sanguine. Ainsi, cette perte était estimée à 17.00, 36.25 et 47.53% respectivement aux doses cumulatives de 20, 40 et 60 mg/kg au niveau des plaquettes. Par contre, au niveau des lymphocytes, la perte en microtubules n'était estimée qu'à 1.08, 1.38 et 4.30% respectivement aux mêmes doses du MeHgCl.

Ainsi, les résultats de nos travaux ont montré que dans nos conditions expérimentales, le MeHg est capable d'inhiber, *in vitro* et *in vivo*, les systèmes cholinergiques et monoaminergiques dans différentes régions du cerveau chez le rat adulte. Ces effets apparaissent en l'absence de tout signe et symptôme de l'intoxication au MeHg et sont reflétés par la diminution de la liaison aux récepteurs mChRs et D₂ au niveau des lymphocytes et de la concentration de la 5-HT dans les plaquettes du sang circulant. Par contre, les rats traités aux doses cumulatives de 40 et 60 mg/kg ont présenté une perte significative de poids corporel par rapport à ceux du groupe 20 mg/kg et contrôles. Chez les rats traités, l'accumulation du mercure dans les différentes régions était comme suit : striatum > cortex cérébral > cervelet > hypothalamus > hippocampe > tronc cérébral. Au niveau du sang total, cette accumulation était en moyenne de 55.82 ± 4.38 µg/ml, 166.72 ± 0.92 et de 183.93 ± 2.41 µg/ml, aux doses cumulatives respectives de 20, 40 et 60 mg/kg du chlorure de MeHg chez les rats.

Par conséquent, nos résultats suggèrent que la liaison aux récepteurs mChRs et D₂ au niveau des lymphocytes, les niveaux de la 5-HT et des microtubules dans les plaquettes du sang circulant pourraient servir comme biomarqueurs périphériques dans l'évaluation de la neurotoxicité précoce du MeHg chez les rats adultes après exposition répétée.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|------|
| SOMMAIRE | III |
| TABLE DES MATIERES | VI |
| LISTE DES FIGURES | IX |
| LISTE DES TABLEAUX | X |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | XI |
| DÉDICACE | XIII |
| REMERCIEMENTS | XIV |
| AVANT-PROPOS | XV |
| | |
| CHAPITRE 1: INTRODUCTION GENERALE | 1 |
| 1.1. PROPRIETE PHYSICO-CHIMIQUES | 2 |
| 1.2. SOURCES ET NIVEAUX D'EXPOSITION | 2 |
| 1.2.1 SOURCES D'EXPOSITION | 2 |
| 1.2.2 NIVEAUX D'EXPOSITION | 7 |
| 1.3. TOXICOCINETIQUE DU MeHg | 9 |
| 1.3.1. Chez l'humain | 9 |
| 1.3.1.1 Absorption | 9 |
| 1.3.1.2 Distribution | 9 |
| 1.3.1.3 Métabolisme et excrétion | 11 |
| 1.3.2. Chez l'animal | 13 |
| 1.3.2.1 Absorption | 13 |
| 1.3.2.2 Distribution | 13 |
| 1.3.2.3 Métabolisme et excrétion | 16 |
| 1.4. MANIFESTATIONS CLINIQUES ET HISTOPATHOLOGIE | 20 |
| 1.4.1. Chez l'humain | 20 |
| 1.4.1.1 Signes cliniques et symptômes | 20 |
| 1.4.1.1.1 Épidémie de Minamata et de Niigata au Japon | 21 |
| 1.4.1.1.2 Épidémie d'Irak | 23 |
| 1.4.1.1.3 Autres cas | 23 |
| 1.4.1.2 Histopathologie | 23 |
| 1.4.1.3 Signification des données histopathologiques | 25 |
| 1.4.1.4 La relation dose - réponse | 26 |
| 1.4.1.4.1 Incidence des signes liés à la prise ou à la charge corporelle | 27 |
| 1.4.1.4.2 Incidence des signes liés à la concentration du MeHg dans le sang | 27 |
| 1.4.1.4.3 Incidence des signes liés à la concentration du MeHg dans les cheveux | 28 |
| 1.4.1.4.4 Incidence des signes liés à la concentration du MeHg dans le cerveau | 29 |

| | |
|---|----|
| 1.4.2. Chez l'animal | 30 |
| 1.4.2.1. Manifestations cliniques et histopathologiques | 30 |
| 1.4.2.2. La relation dose - effet | 33 |
| 1.4.3 Variations pathologiques inter-espèces | 34 |
| 1.5. MECANISMES BIOCHIMIQUES DE LA NEUROTOXICITE DU MeHg | 36 |
| 1.5.1 Blocage des groupements -SH | 36 |
| 1.5.2 Inhibition du métabolisme énergétique | 36 |
| 1.5.3 Troubles de l'homéostasie du calcium | 37 |
| 1.5.4 Induction de la peroxidation lipidique | 39 |
| 1.5.5 Inhibition de la synthèse protéique | 39 |
| 1.5.6 Effets sur les microtubules | 40 |
| 1.6. BIOMARQUEURS NEUROCHIMIQUES DE LA NEUROTOXICITE | 43 |
| 1.6.1 Concept et définition de biomarqueurs de la neurotoxicité | 43 |
| 1.6.2 Biomarqueurs de la neurotoxicity du MeHg au niveau du cerveau | 47 |
| 1.6.2.1 Systèmes monoaminergiques | 48 |
| 1.6.2.1.1 Dopamine et norépinephrine | 48 |
| 1.6.2.1.2 Sérotonine | 48 |
| 1.6.2.1.3 Activité de la MAO | 49 |
| 1.6.2.2. Système cholinergique | 49 |
| 1.6.2.3 Système GABAergique | 50 |
| 1.6.3 Biomarqueurs au niveau du sang périphérique | 51 |
| 1.6.3.1 Au niveau des plaquettes | 52 |
| 1.6.3.1.1 Captation et libération de la 5-HT | 54 |
| 1.6.3.1.2 Récepteurs de la sérotonine | 56 |
| 1.6.3.1.3 Activité de la monoamine oxydase (MAO) | 56 |
| 1.6.3.2 Au niveau des lymphocytes | 58 |
| 1.6.3.1.1 Système cholinergique | 58 |
| 1.6.3.1.2 Système monoaminergiques | 58 |
| 1.7. PROBLEMATIQUE, HYPOTHESE, OBJECTIFS ET APPROCHE EXPERIMENTALE | 60 |
| 1.7.1 Problématique | 60 |
| 1.7.2 Hypothèse | 61 |
| 1.7.3 Objectifs | 62 |
| 1.7.3.1 Objectif général | 62 |
| 1.7.3.2 Objectifs spécifiques | 62 |
| 1.7.4 Approche expérimentale | 63 |
| CHAPITRE 2 : Effects of methylmercury on high affinity choline uptake and muscarinic cholinergic receptors binding in rat brain synaptosomes and blood lymphocytes, <i>in vitro</i> | 64 |

| | |
|---|-----|
| CHAPITRE 3 : Effects of methylmercury on high affinity dopamine and serotonin uptake, and D ₂ binding to in rat brain synaptosomes, and blood lymphocytes and platelets, <i>in vitro</i> | 89 |
| CHAPITRE 4 : Evaluation of cholinergic system in both brain and lymphocytes following repeated administration of methylmercury chloride in rats | 113 |
| CHAPITRE 5 : Effects of repeated administration of methylmercury chloride On the monoaminergic system in rat brain, Blood platelets and lymphocytes | 146 |
| CHAPITRE 6 : Changes in platelets and lymphocytes microtubules as possible peripheral biomarker for neurotoxicity of methylmercury chloride in adult rats | 186 |
| CHAPITRE 7 : DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION | 205 |
| 7.1. Discussion générale | 205 |
| 7.1.1 Effets sur le système cholinergique | 205 |
| 7.1.1.1 Captation de la choline et liaison aux mChRs | 205 |
| 7.1.1.2 Effets <i>in vivo</i> | 207 |
| 7.1.2 Effets sur les systèmes monoaminergiques | 209 |
| 7.1.1.1 Captation de la DA, de la 5-HT et la liaison aux D ₂ | 209 |
| 7.1.1.2 Effets <i>in vivo</i> | 212 |
| 7.1.3. Effets sur les microtubules | 215 |
| 7.1.4. Signification comportementale de nos résultats | 217 |
| 7.2 Conclusion | 220 |
| 7.3 Limites et perspectives de l'étude | 221 |
| BIBLIOGRAPHIE | 224 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|-----|
| 1. Cycle géochimique du mercure dans l'environnement | 4 |
| 2. Les biomarqueurs | 44 |
| 3. Inhibition of High Affinity choline Uptake in brain synaptosomes following <i>in vitro</i> exposure to MeHgCl in rats | 84 |
| 4. Inhibition of [³ H]QNB binding to mChRs in brain synaptosomes and lymphocytes following <i>in vitro</i> exposure to MeHgCl in rats | 85 |
| 5. Inhibition of High Affinity Uptake of DA in brain synaptosomes following <i>in vitro</i> exposure to MeHgCl in rat | 109 |
| 6. Inhibition of High Affinity Uptake of 5-HT by synaptosomes and platelets following <i>in vitro</i> exposure to MeHgCl in rats | 110 |
| 7. Effects of <i>In vitro</i> exposure to MeHg on [³ H]raclopride binding to D ₂ receptors synaptosomes from brain regions and lymphocytes in rats | 111 |
| 8. Variation of body weight (BW) in adult rats treated to MeHgCl | 138 |
| 9. Accumulation of total mercury in brain regions and whole blood in adult rats treated to MeHgCl | 142 |
| 10. Pearson's correlation (r) between [³ H]-QNB binding to mChRs in blood lymphocytes and brain regions in rats | 143 |
| 11. Variation of body weight (BW) after repeated treatment of adult rats to MeHgCl | 174 |
| 12. Accumulation of total mercury in brain regions and whole blood in adult rats treated to MeHgCl | 183 |
| 13. Pearson's correlation (r) between [³ H]raclopride binding to D ₂ receptors in blood lymphocytes and brain regions from rat | 184 |
| 14. Pearson's correlation (r) between 5-HT content in blood platelets and brain regions in rat | 185 |
| 15. Percent of peripheral blood lymphocytes and platelets without microtubules in rats treated to MeHgCl | 204 |

LISTES DES TABLEAUX

| | |
|--|-----|
| 1. Principales épidémies de l'intoxication au MeHg à travers le monde | 21 |
| 2. Fréquences des signes et symptômes de la maladie de Minamata | 22 |
| 3. Comparaison entre plaquettes et neurones sérotoninergiques | 53 |
| 4. IC ₅₀ (μM of MeHgCl) for high affinity choline uptake and [³ H]-QNB binding in brain synaptosomes and lymphocytes in rats | 86 |
| 5. IC ₅₀ of MeHgCl (μM) for high affinity uptake DA and 5 HT, and [³ H]raclopride binding in synaptosomes from brain regions, lymphocytes and platelets | 112 |
| 6. Inhibition of ChAT activity in brain regions of adult rats repeatedly treated to MeHgCl | 139 |
| 7. Changes in ACh concentration in brain regions of adult rats following repeated treatment to MeHgCl | 140 |
| 8. Inhibition of [³ H]-QNB binding to mChRs in brain regions and blood lymphocytes in adult rats treated to MeHgCl | 141 |
| 9 Pearson's correlation (r) between [³ H]-QNB binding and ChAT activity in brain regions in adult rats treated to MeHgCl | 144 |
| 10. Pearson's correlation (r) between [³ H]QNB binding and ACh concentration in brain regions in adult rats treated to MeHgCl | 145 |
| 11. Effect of repeated administration of MeHgCl on DA levels and its metabolites in brain regions in adult rats | 175 |
| 12. Effects of repeated administration of MeHgCl on NE levels and its metabolites in brain regions in adult rats | 177 |
| 13. Effects of repeated administration of MeHgCl on 5-HT levels and its metabolite in brain regions and blood platelets in adult rats | 179 |

14. Effect of repeated administration of MeHgCl on [³H]raclopride binding to D₂ receptors in brain regions and blood lymphocytes in rats 181
15. Effect of repeated administration of MeHgCl on MAO activity in brain regions and blood platelets in rats 182

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|----------------|--|
| ACh | acétycholine |
| $[Ca^{2+}]_i$ | concentration en calcium intracellulaire |
| ChAT | choline acétyltransférase |
| DA | Dopamine |
| DOPAC | 3,4-dihydroxyphenyl acétique acide |
| D ₁ | récepteur dopaminergique D ₁ |
| D ₂ | récepteur dopaminergique D ₂ |
| GABA | gamma aminobutyrique acide |
| $[^3H]$ -QNB | quinuclidinyl benzylate tritiée |
| HVA | acide homovanilique |
| 5-HIAA | acétyle 5, hydroxyindole |
| 5-HT | 5, hydroxytryptamine |
| i.p | intrapéritonéale |
| i.v. | intra veineuse |
| kg | kilogramme |
| l | litre |
| MAO | monoamine oxidase |
| mChRs | récepteurs cholinergiques muscariniques |
| MeHg | méthylmercure |

| | |
|--------|--|
| MeHgCl | methylmercury chloride |
| MHPG | 3-méthoxy-4-hydroxy-phenylglycol |
| µg | microgramme |
| µl | microlitre |
| µmol | micromole |
| mg | milligramme |
| nChRs | récepteurs cholinergiques nicotiniques |
| ppb | partie par billion |
| ppm | partie par million |
| sc. | sous cutané |
| SNC | système nerveux central |
| SNP | système nerveux périphérique |
| VMA | acide 3-méthoxy-4-hydroxy-mandélique |

DÉDICACE

À ma mère, feu Yalamö LAMA,

A mon père, Nyéréké LOUA,

À mon épouse, Marie Jeanne LAMA

À nos enfants, Félicité et Nyéréké Dominique

À mes parents

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout d'abord mes directeurs de thèse, Saroj Chakrabarti, Ph.D., professeur titulaire à la Faculté de médecine de l'Université de Montréal et Mme Durham D. Heather, Ph.D., professeur titulaire à l'Institut Neurologique de Montréal à l'Université de McGill. Leurs conseils et supports inlassables m'ont conduit à ces résultats.

Mes remerciements vont à Monsieur Tomas Reader, Ph.D, professeur titulaire à la Faculté de médecine de l'Université de Montréal pour m'avoir enseigné les techniques de coupes du cerveau ainsi que la mise au point des méthodes chromatographiques. Je remercie Messieurs Bai, Anwar Malick, Mesdames Sandra Minotti et Diane Talbot pour leur assistance technique durant l'exécution de cette thèse. Je remercie également Stéphane Beaudin, mon collègue de thèse, pour nos discussions enrichissantes sur la relation entre la neurochimie et le comportement en neurotoxicologie, particulièrement pour le MeHg, chez l'animal expérimental.

Je voudrais remercier particulièrement Docteur Jules Brodeur pour son soutien moral et matériel tout le long de notre formation doctorale. À Monsieur Krishnan Kannan et à tous les professeurs du département de la santé environnementale et professionnelle, pour leur appui inestimable durant ces travaux.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mon épouse, Marie Jeanne Lama, à nos enfants Félicité et Nyéréké Dominique pour leur courage et leur soutien inestimable durant nos différents programmes d'études. Mes reconnaissances vont à mes parents qui m'ont supporté dans ces différents parcours de ma scolarité. Enfin, mes profonds remerciements à tous mes amis, pour leur appui inoubliable.

AVANT PROPOS

Le nombre de substances chimiques incluant les métaux, les pesticides, les médicaments, les solvants, les drogues, les éléments radioactifs, ainsi que les additifs et contaminants alimentaires est de plus en plus croissant. Le diagnostic et l'évaluation du risque neurotoxicologique associé à l'exposition à ces substances neurotoxiques sont de nos jours basés essentiellement sur l'établissement d'une corrélation entre les signes et symptômes des intoxications d'une part et les niveaux des toxiques ou de leurs métabolites dans le sang de l'autre. Malheureusement, les signes et symptômes des altérations induites au niveau du système nerveux par les agents neurotoxiques sont, pour la plupart, non spécifiques et tardifs. De plus, il n'a pas encore été facile d'établir une relation dose-réponse indispensable à l'évaluation du risque en santé publique pour la majorité des substances neurotoxiques. Parmi ces dernières figure le méthylmercure (MeHg), un contaminant environnemental des plus dangereux pour la santé publique.

La population générale est exposée au MeHg à travers la consommation d'aliments contaminés, notamment le poisson en tant que l'une des principales sources de protéine. L'intoxication au MeHg a entraîné plus de 10,000 décès à travers le monde. Malgré ces catastrophes humaines, le risque associé à l'exposition au MeHg continue d'être un enjeu de taille en santé publique, aussi bien dans les pays développés que dans ceux en développement. En fait, de plus en plus l'exposition au MeHg est répétitive ou chronique à des faibles niveaux. En plus du manque d'une relation dose-réponse claire comme indiqué ci-haut, de nouvelles données humaines et animales démontrent l'existence d'effets subtils à des niveaux d'exposition antérieurement jugés sécuritaires pour la santé humaine. D'autre part, de plus en plus, des voies nous interpellent pour tenir compte des préoccupations alimentaires et autres bénéfiques qu'apportent les poissons contaminés aux populations à risques.

C'est sur la base des considérations évoquées ci-dessus et dans le souci d'assurer une santé de qualité aux populations à risque, que nous avons entrepris ce travail dans le but de développer des biomarqueurs de la neurotoxicité précoce du MeHg chez le rat adulte. Ces biomarqueurs nous permettront de détecter les signes avant coureurs de l'intoxication au MeHg dans une population adulte à risque, avant l'apparition des signes irréversibles de l'intoxication, en utilisant le rat adulte comme animal expérimental.

Pour ce faire, ce travail mené uniquement chez l'adulte a été divisé en quatre parties à savoir, l'introduction générale ; la problématique, l'hypothèse et l'approche méthodologique de la recherche, la présentation des résultats sous forme d'articles scientifiques, une discussion et une conclusion générale. Dans l'introduction nous avons présenté et critiqué les données existantes de la littérature notamment sur la neurotoxicité du MeHg chez l'adulte humain et animal. Ces données nous ont permis de supporter notre hypothèse de recherche.

CHAPITRE 1:

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. 1 PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES

Le mercure, omniprésent dans la nature, existe sous trois états d'oxydation qui sont ; le mercure métallique (Hg^0), le mercure inorganique mercurieux (Hg_2^+) et mercurique (Hg^{++}). Ce dernier forme une liaison covalente avec une ou deux atomes de carbone, souvent alkyl ou aryle, pour donner le mercure organique. Le méthylmercure, représentant la forme alkylée, est formé d'une liaison covalente entre l'ion mercurique (Hg^{++}) et un atome de carbone provenant du groupement méthyle (CH_3^+), d'où le nom de *monométhyle de mercure*. Ce composé à courte chaîne est extrêmement toxique car il est facilement absorbé et est par contre difficilement décomposable dans l'organisme (WHO, 1990 ; ATSDR, 1997).

À l'état pur, le MeHg est une poudre cristalline blanche avec un poids moléculaire de 251.1. Il bout à 170°C et possède une grande pression de vapeur (1.13 Pascale, soit 0.0085 mmHg à 25°C). Il est probablement non inflammable. Dans l'eau, la solubilité du chlorure de MeHg est estimée à moins de 0.1 mg/ml à 21°C . Par contre dans les solvants organiques cette solubilité varie de 10 à 50 mg/ml dans l'alcool et est de plus de 100 mg/ml dans l'acide acétique à 27°C . Le MeHg forme des complexes stables avec les composés organiques (Miskimmin, 1991). Ainsi dans l'eau, sa solubilité décroît à mesure que la concentration en matières organiques dissoutes augmente (Miskimmin, 1991). Du point de vue biochimique, le MeHg possède une grande affinité pour les groupements sulfhydriques des acides aminés et protéines (Clarkson, 1972).

1. 2 SOURCES ET NIVEAUX D'EXPOSITION

1.2.1 SOURCES D'EXPOSITION

Le mercure présent dans l'environnement est de sources naturelles et anthropogéniques (WHO, 1990 ; Cranmer et al., 1996 ; ATSDR, 1997). Les sources naturelles du mercure comprennent le dégagement à partir de la croûte terrestre, les émissions volcaniques et l'évaporation à partir de l'eau (WHO, 1990 ; ATSDR, 1997). Dans ces conditions, le mercure est émis sous sa forme élémentaire (Hg^0). Les émissions naturelles ont été estimées de 2700 à 6000 tonnes par an (Lindberg et al., 1987 ; ATSDR, 1997).

Les sources anthropogéniques ou humaines en mercure environnemental sont variées. Le mercure est extrait à partir des minerais de cinnabar (Cranmer et al., 1996). Il est utilisé dans l'industrie pour la production du chlore et du sodium (Urbain et al., 1966), dans la peinture comme préservatifs et pigments ; dans les batteries, les instruments de mesure électriques et les équipements médicaux. Il est aussi utilisé dans les protèges dentaires et dans l'agriculture comme fongicide pour la conservation des semences. L'extraction du métal pur est estimée à 10,000 tonnes par an, ce qui constitue une importante source de pollution par le dégagement et les déversements des déchets miniers dans l'atmosphère et dans l'eau. L'utilisation industrielle du métal compte pour seulement 10% des sources environnementales humaines. La combustion des fossiles (Lipfert et al., 1995), du charbon, les incinérations des déchets et les émissions provenant des hôpitaux comptent pour environ 87% des sources anthropogéniques du mercure libéré dans l'environnement (Cranmer et al., 1996). De plus, environ 25% de la contamination atmosphérique humaine proviennent de la combustion des fossiles (Cranmer et al., 1996). Dans l'ensemble, il a été estimé que les activités humaines ajoutent annuellement environ 2000 à 4500 tonnes de mercure dans l'environnement global (ATSDR, 1997).

Une autre source en expansion de la pollution environnementale en mercure consiste en l'utilisation du mercure liquide (Hg^0) dans l'extraction de l'or (Boischio et Henshel, 1996; Lebel et al., 1996; Counter et al., 1998). Par exemple, dans le seul bassin de l'Amazonie au Brésil, on estime à plus de 100 tonnes la quantité de mercure métallique annuellement libérée dans l'environnement (Boischio et Henshel, 1996). De même, on estime à 6000 tonnes la quantité de mercure déversé dans l'ancienne mine d'or de la rivière Carson au Nevada, aux États Unis d'Amérique (Boischio et Henshel, 1996; Counter et al., 1998).

Le mercure organique sous formes méthyle, phényle et méthoxy était introduit en agriculture au début du vingtième siècle comme fongicide pour la conservation des semences. De plus, le mercure organique a été utilisé dans les peintures, mais cette utilisation est de plus abandonnée. Toutefois, le niveau de contamination environnementale par ces dérivés mercuriels a été antérieurement jugé inférieur aux autres sources humaines (WHO, 1990). Mais leur grande utilisation a souvent été la cause de nombreuses intoxications professionnelles avant de découvrir que le mercure inorganique est naturellement méthylé dans l'environnement et accumulé dans la chaîne alimentaire (Jensen and Jernelov, 1969 ; Stokes et Wren, 1987 ; Winfrey et Rudd, 1990 ; D'Itri, 1991).

Le mercure libéré dans l'atmosphère est transporté par le vent et l'eau, des rivières aux lacs et aux océans, où il est déposé dans les sédiments (Jensen and Jernelev, 1969 ; D'Itri, 1991 ; ATSDR, 1997). Les eaux peuvent être aussi polluées par le déversement des déchets industriels. Ainsi, la baie de Minamata au Japon était polluée par le déversement de mercure inorganique provenant d'une usine qui utilisait le mercure comme catalyseur dans la production du chlorure de vinyle. En Amérique du Nord, les industries de la pâte à papier, du chlore et du sodium, d'électrolyse sont les principales sources de la pollution aquatique (D'Itri, 1991 ; ATSDR, 1997).

Dans l'air, le mercure métallique constitue la principale forme de mercure (Schroeder et al., 1991 ; D'Itri, 1991 ; ATSDR, 1997). Il est simultanément oxydé et réduit en Hg^{++} par plusieurs composés dont l'ozone, le peroxyde d'hydrogène et les générateurs de radicaux (Schroeder et al., 1991). Dans l'eau et dans le sol, la méthylation du mercure est la principale voie dominante (D'Itri, 1991 ; ATSDR, 1997). Les différentes voies de la conversion des formes du mercure dans l'air, l'eau et dans le sol sont présentées dans la figure ci-dessous (D'Itri, 1991).

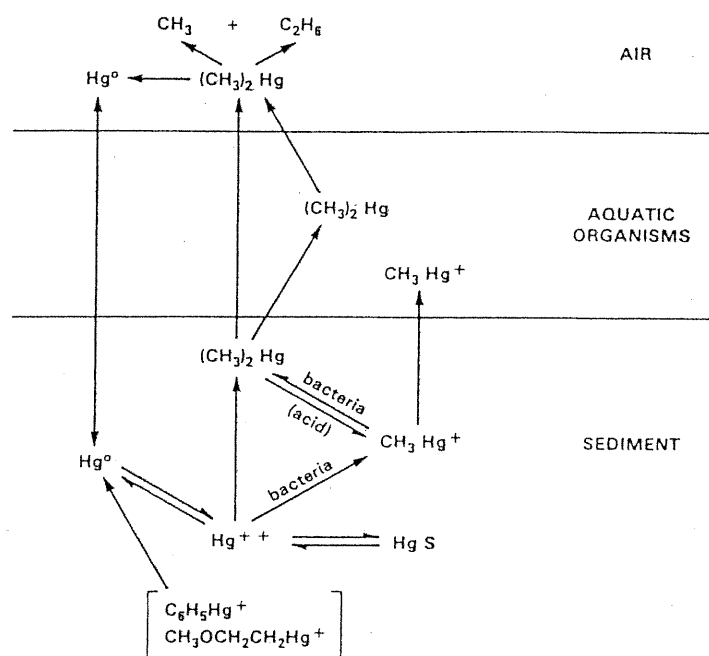


Figure 1 : Cycle géochimique du mercure dans l'environnement

Cette figure montre que dans la nature, il existe une inter-conversion biogéochimique entre toutes les formes de mercure (D'Itri, 1991). Le mercure libéré dans l'environnement subit

une oxydoréduction pour former le mercure inorganique, la conversion réversible du mercure inorganique en mercure organique, ensuite la décomposition du mercure organique. Sous l'influence de certains micro-organismes, l'ion mercurique est méthylé en méthylmercure en milieu aquatique et dans le sol. La méthylation non enzymatique du mercure inorganique a lieu dans les conditions aérobiques et anaérobiques en présence du méthylcobalamine (un analogue de la vitamine B₁₂) comme donneur de groupement méthyle (CH₃) (D'Itri, 1991).

Le mercure organique ainsi formé, surtout le monométhylmercure (MeHg⁺), est très stable. D'autres formes de mercure, les dialkyles du mercure, représentés par le diméthylmercure [(MeHg(CH₃)₂)] sont relativement insolubles (ATSDR, 1997). Le diméthylmercure est très volatile bien qu'il ne constitue que moins de 3% de la vapeur du mercure dissout dans l'eau (Andersson et al., 1990 ; Vandal et al., 1991).

De nombreux facteurs peuvent contrôler la production du MeHg dans l'eau et dans le sol (Stokes et Wren, 1987 ; Winfrey et Rudd, 1990 ; D'Itri, 1991). Parmi ces facteurs, l'acidité, la disponibilité du mercure inorganique et celle des matières organiques dissoutes du milieu aquatique paraissent jouer un important rôle dans la méthylation de l'ion mercurique (Winfrey et Rudd, 1990 ; D'Itri, 1991). Ainsi, il est démontré que dans les conditions aérobiques, une acidité (pH 4.5) augmente la production du MeHg et son accumulation subséquente dans les animaux aquatiques (Stokes et Wren, 1987). D'autre part, il est démontré que la production du MeHg atteint son optimum au pH entre 5- 7. Par contre, un pH supérieur à 7 est requis pour la production du diméthylmercure (Winfrey and Rudd, 1990). La méthylation du mercure est particulièrement importante dans les régions nordiques de notre planète comme le Canada, où la déposition de l'acide est significative (D'Itri, 1991).

Aussi, de nombreux travaux ont démontré que la méthylation du mercure est augmentée par la disponibilité croissante des matières organiques (D'Itri, 1991 ; ATDR, 1997). La décomposition des matières organiques est fortement associée à l'augmentation du taux de la méthylation du mercure dans les réservoirs nouvellement inondés, comme le cas des barrages hydroélectriques (D'Itri, 1991 ; ATSDR, 1997) De plus, la méthylation est rapide à la surface des sédiments, où l'activité microbologique et la concentration de matières organiques décomposables sont élevées (D'Itri, 1991). Par contre, la méthylation est très peu importante dans les sédiments, dans des conditions anaérobiques, même en milieu acide (D'Itri, 1991).

Par contre, Nielsen (1992) a évoqué un aspect controversé. En effet, ce chercheur a suggéré que la flore intestinale de plusieurs espèces animales, incluant les poissons, est capable de méthyler le mercure. Cette hypothèse n'est pas supportée par les données existantes. Par contre on pense que le mercure inorganique est méthylé à travers d'autres mécanismes comme la photolyse et la transalkylation (Beijer et Jernelöv, 1986). La transalkylation, réalisée par certaines espèces de *Pseudomonas*, a été observée dans la baie Chesapeake (Huey et al., 1974). Toutefois, bien que le MeHg formé dans la nature ne soit pas encore bien identifié, on pense que le MeHg existerait sous forme de sulfures et de bisulfures plutôt que le chlorure de MeHg. En effet ce dernier, longtemps utilisé dans les protocoles expérimentaux, n'a été identifié qu'après utilisation de l'acide chlorhydrique comme réactif d'extraction du MeHg (ATSDR, 1997).

Dans l'environnement, le MeHg formé est hautement accumulé et biomagnifié par la faune aquatique, particulièrement dans les planctons et poissons prédateurs (WHO, 1990 ; ATSDR, 1997). Le facteur de bioconcentration du MeHg est ordinairement de 104 dans les poissons contre 105 dans l'eau (WHO, 1990). Ainsi, les animaux marins peuvent accumuler des quantités de MeHg de l'ordre du 20 mg/g de tissu frais dans les poissons des régions fortement polluées, contre un maximum de 200 mg/kg de poids frais dans les poissons des régions non polluées. Le MeHg représente plus de 80% et le mercure inorganique les 20% du mercure total dans un poisson provenant d'un environnement contaminé (WHO, 1990 ; ATSDR, 1997).

Ainsi, l'exposition humaine a lieu essentiellement à travers l'ingestion d'aliments contaminés (Bakir et al., 1972 ; WHO, 1990 ; ATSDR, 1997 ; Renzoni et al., 1998). L'exposition humaine a lieu essentiellement à travers l'ingestion d'animaux aquatiques comme sources de protéines alimentaires (WHO, 1990 ; ATSDR, 1997). Aussi, la consommation des semences de céréales traitées au MeHg, comme fongicide, a aussi été une source accidentelle importante d'exposition au MeHg chez l'humain (Bakir et al., 1972).

Toutefois dans la nature, certaines bactéries sont capables de décomposer le MeHg et de réduire le Hg^{++} en Hg^0 (Clarke et al., 1977 ; Nakamura et al., 1990). Ainsi, les lyases organomercuriques du genre *Bacillus subtilis* sont capables de couper la liaison carbone-mercure, tandis que les reductases peuvent transformer l'ion mercurique en mercure métallique (Hg^0) volatile (Begley et al., 1986 ; Schiering et al., 1991). Dans l'air, la photolyse semble être la principale voie de la décomposition du mercure organique (ATSDR, 1997). Ainsi, ces processus

pourraient jouer un important rôle dans la réduction des niveaux environnementaux en mercure organique.

1.2.2 NIVEAUX D'EXPOSITION

Dans les régions non polluées, principalement dans les produits de pêche, le niveau de mercure varie de 0.1 à 0.2 g/g de poids frais. Par contre, des concentrations de plus de 25 à 35 g/g de poissons ont été rencontrées dans les zones contaminées (D'Itri, 1991). Ainsi, dans la Baie de Minamata, le niveau de mercure dans les produits de pêches se situait en moyenne à 35 mg/kg de MeHg. Aussi, on estime présentement à 0.7 mg /kg, la concentration de MeHg dans les poissons et fruits de mer, ce qui est encore supérieur à la norme au Japon qui est de 0.3 mg/kg (D'Itri, 1991). Aux États Unis, des concentrations maximales de plus de 0.19 (0.01 - 1.10 µg/g de mercure ont été détectées dans les poissons des eaux polluées (ATSDR, 1997). Dans le lac Ontario, des niveaux élevés de l'ordre de 11.6 à 69 µg/kg ont été rapportés (Kohler *et al.*, 1990). De plus dans l'arctique Est et Ouest au Canada, des niveaux maximales de 78 et 22 µg/g de MeHg sont détectés respectivement dans la baleine et dans le béluga arctique (Wageman *et al.*, 1995).

Les données environnementales révèlent que chez les populations, notamment chez les pêcheurs et leurs familles, on note des apports de plus de 600 mg de mercure par kg de poisson frais (Piotrowski et Inskip, 1981). La moyenne quotidienne d'apport en MeHg varie largement d'un pays à un autre et elle dépend des habitudes alimentaires des populations respectives. L'apport hebdomadaire est estimé à 40 à 60 g en mercure au Danemark, en Suède et en Espagne, contre 200 g au Japon (NAS, 1978; WHO, 1972, 1974). Aux USA, la quantité de MeHg apportée quotidiennement par la consommation de poisson pourrait osciller entre 3 et 5 mg/jour/70 kg chez la population générale (ATSDR, 1997).

Au Canada, une étude menée de 1972 à 1992 a montré des niveaux supérieurs à 200 µg/L de sang chez les populations autochtones. D'après ces enquêtes, des changements saisonniers sont observés avec des variations individuelles de l'ordre de 30 - 430 µg/L (Wheatley et Paradis, 1995). Toujours selon ces données, l'exposition varie d'une province à une autre, les niveaux élevés étant observés au Québec suivi par l'Ontario.

Malgré les efforts déployés par la communauté internationale pour réduire l'apport anthropogénique en mercure, la situation continue d'être préoccupante dans nombreux pays comme le Brésil (Lebel et al., 1996) et dans la Méditerranée (Renzoni et al., 1998). Renzoni et al., (1998) ont rapporté des niveaux de 31.54 $\mu\text{g/L}$ (maximum 142.38 $\mu\text{g/L}$) et 10.39 $\mu\text{g/g}$ (maximum 42.61 $\mu\text{g/g}$) respectivement dans le sang et les cheveux chez des femmes en grossesse de familles pêcheuses en Méditerranée. Bien que les niveaux d'exposition soient élevés, la concentration du mercure total dans certaines espèces de poissons peut atteindre des concentrations de l'ordre de 4.2 $\mu\text{g/g}$ de poids (Renzoni et al., 1998).

1.3. TOXICOCINÉTIQUE DU MeHg

Chez l'humain et l'animal expérimental, le MeHg ingéré est presque entièrement absorbé du tractus gastro-intestinal au sang avant de traverser la barrière hématoencéphalique pour ensuite se distribuer dans le cerveau, sa principale cible. Le MeHg est par la suite éliminé, tel quel ou métabolisé, principalement par les fèces. Dans cette section nous nous limiterons, et cela d'une manière brève, aux données pertinentes les plus récentes chez l'humain et l'animal expérimental adulte.

1.3.1. Chez l'humain

1.3.1.1 Absorption

On estime qu'environ 90 à 100% du MeHg provenant de l'ingestion d'aliments (poissons, pain) contaminés sont absorbés dans le tractus gastro-intestinal. En plus de cette voie, l'inhalation et le passage transcutané sont à considérer en milieu professionnel et dans l'environnement (WHO, 1990 ; ATSDR, 1997).

1.3.1.2 Distribution

Le MeHg absorbé est distribué du sang dans tous les tissus et organes. Dans l'organisme, cette distribution est complète environ dans les 4 jours qui suivent l'ingestion d'une dose unique chez l'humain (Kershaw et al., 1980). Dans le sang, le MeHg est essentiellement lié aux globules rouges et seulement 1 % existe sous forme de complexes diffusibles (Naganuma et al., 1980) avec un ratio globule rouge : plasma de 20 (Clarkson, 1972). Il a été démontré que le niveau de mercure total dans le sang est plus élevé chez l'homme que chez la femme (Mahaffey et Mergler, 1998; Akagi et al., 1995). Des résultats contraires ont été rapportés par Lommel et collaborateurs (1992).

Dans l'organisme, l'accumulation du mercure varie grandement selon les organes (Takeuchi et al., 1989 ; Harada, 1995). Ainsi, les données du Japon indiquent qu'après exposition chronique au MeHg, les reins, le foie, les poumons et les muscles striés retiennent plus de

mercure total (Takeuchi et al., 1989 ; Harada, 1995). Ces organes sont suivis par le cœur, le pancréas et la rate (Takeuchi et al., 1989 ; Harada, 1995). Toujours selon ces données, de fortes quantités de mercure total sont retrouvées au niveau du cerveau, et cette accumulation varie entre les individus et les populations. Ainsi, chez les victimes du Japon, le niveau de mercure était de 21.2 à 140.0 mg/g dans les reins ; de 22 à 70.5 mg/g dans le foie et de 2.0 à 24.8 mg/g dans le cerveau (Harada, 1995). Il n'y a pas de données sur les cas d'exposition répétée et sur l'accumulation du MeHg dans les tissus adipeux bien que le toxique soit considéré comme liposoluble.

Dans le système nerveux, le mercure s'accumule plus dans le cerveau suivi de la moelle épinière et des nerfs périphériques. Le MeHg pénètre dans le cerveau à travers la barrière hémato-encéphalique ou à partir de certaines régions qui ne possèdent pas cette barrière (Aschner et al., 1992).

La distribution du MeHg dans le cerveau est biphasique bien que certains chercheurs l'aient souvent considérée comme étant uniforme. Au niveau du cerveau, la concentration maximale en mercure est atteinte au moins deux jours après l'exposition à une dose unique de MeHg, comparativement aux autres tissus (Berlin, 1986). Le niveau du mercure dans le cerveau représente environ 6% de la dose de MeHg administré (Kershaw et al., 1980), ce qui correspond à un maximum de 10% de la charge corporelle totale en mercure (WHO, 1976). Le ratio du mercure dans le cerveau : sang varie de 55 à 10 (WHO, 1990).

Dans le cerveau, le mercure s'accumule plus dans le cortex cérébral suivi du cortex calcarine, du cervelet, du striatum, du tronc cérébral et de l'hippocampe (Okabe et Takeuchi, 1980 ; Takeuchi, et al., 1989). Toutefois, beaucoup de régions n'ont pas souvent été évaluées. Au niveau du cortex cérébral et du cervelet, le mercure montre une distribution homogène et cela particulièrement dans les cellules gliales et dans les macrophages. Dans les neurones, la distribution du mercure est fonction de la région et du temps d'exposition. Elle est plus marquée dans les neurones du thalamus et du cortex cérébral. Dans les cas d'intoxications chroniques comme au Japon, il a été constaté que les cellules de Purkinje accumulent parfois fortement le mercure (Okabe et Takeuchi, 1980) et peu ou pas du tout (Takeuchi et al., 1989). En dehors des cas d'intoxications chroniques du Japon (Okabe et Takeuchi, 1980 ; Takeuchi et al., 1989), les données sur la distribution du mercure dans le cerveau humain sont très limitées aux cas d'exposition subaiguë et répétée. De plus, dans les épidémies, les informations cruciales

notamment sur la quantité absolue de MeHg ingérée ainsi que la durée d'exposition manquant. Ces lacunes peuvent rendre l'estimation de la relation dose-réponse difficile au niveau de la population générale.

1.3.1.3 Métabolisme et excrétion

Le MeHg accumulé dans l'organisme est éventuellement métabolisé dans le sang, le foie, la rate et dans le cerveau en donnant l'ion mercurique (Hg^{++}) et le groupement méthyle (CH_3^+) (WHO, 1990). Le MeHg est par la suite éliminé principalement dans les selles suivis par les urines et le lait (WHO, 1990 ; ATSDR, 1997).

Le MeHg est métabolisé au niveau du sang et dans certains organes comme le foie, la rate, le pancréas et le cerveau (Bakir et al., 1973 ; Magos et al., 1976 ; ATSDR, 1997). Ainsi, après exposition à de fortes doses de MeHg pendant deux mois environ, le mercure inorganique constitue 7% du mercure total dans le sang, 22% dans le plasma, 16 à 40% dans le foie et 73% dans les urines (Bakir et al., 1973 ; Magos et al., 1976). Ces niveaux de mercure inorganique augmentent avec le temps d'exposition et le temps écoulé après l'exposition.

Chez l'humain, le MeHg est essentiellement excrété tel quel ou sous forme métabolite dans la bile, est enfin éliminé dans les fèces. Dans l'intestin, le MeHg excrété dans la bile y est ensuite réabsorbé et remis dans la circulation sanguine, formant ainsi le cycle entéro-hépatique (IPCS, 1990). En plus des selles, le MeHg est éliminé par le lait. Par contre, l'ion mercurique provenant de la dégradation du MeHg est essentiellement excrété dans les urines (WHO, 1990). Toutefois, ces données ont été obtenues après administration de dose unique de traceur (Aberg et al., 1969) et il n'existe pas de données après exposition répétée ou chronique au MeHg.

Dans l'organisme, l'élimination du mercure en fonction du temps est estimée par la demi-vie du MeHg. Ainsi, la demi-vie du MeHg radiomarqué administré en dose unique chez les volontaires humains a été estimée de 70 à 74 jours dans le sang (Aberg et al., 1969). Dans l'épidémie d'Irak, la demi-vie du mercure dans le sang était estimée entre 40 à 120 jours avec une moyenne de 65 jours (Tsubaki, 1974). Aussi, Birke et Skerfving (1972) ont estimé à 80 jours la demi-vie du MeHg dans les cheveux, de 99 à 120 jours dans le sang et de 47 à 130 jours dans le plasma chez un volontaire. De plus, chez les volontaires ayant consommés des grains contaminés au MeHg, la demi-vie du MeHg dans les cheveux était estimée entre 35 et 189 jours (Al-Shahristani et Shihab, 1974). D'autre part, Smith et al., (1994) ont montré qu'après

l'administration d'une dose unique de MeHg radiomarqué, la demi-vie du mercure dans le sang était en moyenne de 44 jours, pour un rythme d'élimination journalière qui était estimé à 1.6% de la dose ingérée. Ces informations indiquent clairement que la demi-vie du MeHg varie largement au niveau de la population. Ainsi, du point de vue de santé publique, cette grande variation individuelle au sein de la population humaine révèle qu'au même niveau d'exposition, certains sujets pourraient être plus à risque par rapport à d'autres.

Aussi, contrairement à la courte durée de séjour du mercure dans le sang et les cheveux, les données épidémiologiques suggèrent qu'au niveau du cerveau, la demi-vie du mercure pourrait s'exprimer en terme d'années (Takeuchi, 1986, Takeuchi et al., 1974, 1989). Ainsi, l'analyse de 37 cas d'autopsies montre que la demi-vie du MeHg dans le cerveau a été estimée à environ 245 jours (Takeuchi et Eto, 1975 ; Takeuchi et al., 1989). Ces résultats sont supportés par le fait que le niveau de mercure total dans le cerveau des patients ayant développé la maladie de Minamata pendant au moins 20 ans était toujours resté supérieur aux valeurs contrôles. Par contre dans tous ces cas, le niveau du MeHg dans le sang est souvent descendu à la valeur normale (Takeuchi, 1986, Takeuchi et al., 1989). Par conséquent, ces données démontrent que le niveau du MeHg dans le sang ne peut prédire la concentration du MeHg dans le cerveau, une longue période après exposition.

De plus, plusieurs facteurs peuvent influencer la cinétique du MeHg chez l'humain (Greenwood et al., 1978 ; Elhassani, 1982 ; WHO, 1990 ; ATSDR, 1997). Parmi ces facteurs figurent entre autres, le sexe, l'allaitement, le régime alimentaire, la géographie et les facteurs environnementaux (WHO, 1990 ; ATSDR, 1997). Par exemple chez la femme allaitante, la demi-vie du MeHg a été estimée à 42 jours en moyenne contre 75 jours chez celle non allaitante (Greenwood et al., 1978). On estime qu'environ 3% la charge corporelle totale en MeHg sont éliminés par le lait maternel (Elhassani, 1982).

Cependant, malgré la grande variation des paramètres cinétiques du MeHg au niveau de la durée du séjour du mercure entre le cerveau d'une part, le sang et les cheveux de l'autre, il est encore établi qu'il n'y a aucune évidence de penser à l'existence d'une différence significative entre la demi-vie du mercure dans le sang et le cerveau (WHO, 1990). C'est sur la base de cette hypothèse d'égalité de la demi-vie en mercure entre le sang et du cerveau qu'est basée la méthode actuelle de l'utilisation de la charge corporelle en mercure (sang et cheveux) dans l'évaluation du risque neurotoxique chez les populations exposées au MeHg.

1.3.2. Chez l'animal

1.3.2.1 Absorption

Chez la souris (Nielsen et al., 1990), le rat (Alberg et al., 1972) et le singe (Berlin et al., 1975b ; Willes et al., 1977) plus de 90% du MeHg ingéré sont absorbés à partir du tractus gastro-intestinal. Bien que non quantifié, le MeHg serait aussi rapidement et totalement absorbé par la voie pulmonaire (Fang, 1980).

Dans l'intestin, le MeHg est réabsorbé sous forme des complexes MeHg-cystéine (MeHg-cys) et MeHg-cystéine-glycine (MeHg-cys-Gly). Ces complexes pourraient jouer un important rôle dans la réabsorption intestinale du MeHg à travers le cycle entéro-hépatique (Urano et al., 1990).

Chez l'animal, des facteurs comme le sexe et certains aliments peuvent modifier l'absorption gastro-intestinale du MeHg. Chez la souris, on estime que l'absorption du MeHg tombe à 80% de la dose lorsque celui-ci est administré sous forme de mélange alimentaire (Nielsen, 1992). Chez la souris, l'âge n'aurait aucune influence dans l'absorption gastro-intestinale du MeHg. Ces données manquent chez les autres espèces animales.

1.3.2.2 Distribution

Après absorption, la concentration du MeHg sanguin s'élève rapidement, et cela en fonction de la dose pour enfin plafonner à des niveaux d'exposition élevée (Albert et al., 1973). Dans le sang, le MeHg est essentiellement lié aux globules rouges, une faible proportion existe sous forme libre dans le plasma. La liaison aux globules rouges est dépendante de l'espèce, elle est de 75 à 90% chez la souris (Nielsen, 1992 ; Friberg and Vostal 1972), plus de 95% chez le rat (Ulfvarson 1962 ; Gage 1964 ; Norseth et Clarkson 1970) et environs 90% chez le singe (Nordberg et al., 1971).

Au niveau du sang, le MeHg est transporté par les systèmes de transport des anions organiques, du D-glucose, de la cystéine et de l'ion chlorure (Wu, 1995a). Aussi, le MeHg existe sous forme de complexes diffusibles avec des molécules hydrosolubles (Wu, 1995b) comme la cystéine et le glutathion dans le sang (Naganuma et Imura, 1979 ; Rabenstein et Fairhurst 1975) ; avec le glutathion (GHS) dans le cerveau (Thomas et Smith, 1979), le foie (Omata et al., 1978) et dans la bile (Refsvik et Norseth, 1975). Le complexe MeHg-L-cystéine formé traverse facilement

la barrière hématoencéphalique en empruntant le système de transport de la méthionine, avec laquelle il ressemble (Carty et Malone, 1979 ; Aschner M., et al., 1992).

Généralement, par sa liposolubilité, le MeHg traverse la barrière hémato-encéphalique par la diffusion passive ou en provoquant des lésions au niveau de cette barrière (Chang et Hartman, 1972 ; Aschner and Aschner, 1990). Cependant, la forme liposoluble du MeHg n'est obtenue qu'après extraction analytique du MeHg en présence de l'acide chlorhydrique concentré (Gage, 1961). Aussi, la forme liposoluble du MeHg n'est obtenue qu'après formation du bis diméthyl-sélénide de Hg chez les animaux traités avec de grandes quantités de sélénite de sodium (Magos et al., 1979).

Le MeHg est distribué par le sang dans presque tous les tissus et organes. Par exemple, chez la souris exposée à une seule dose orale de MeHg (5 mmol/kg de poids corporel), le profil de distribution du mercure est comme suit : carcas > reins > foie > intestin > cerveau (Nielsen, 1992). Dans ces conditions, la concentration du mercure sanguin reste en parfaite corrélation avec la charge corporelle totale durant les trois premiers jours qui suivent l'administration du MeHg (Nielsen, 1992). Aussi, la concentration du mercure dans le foie, le rein, la rate et dans le tractus gastro-intestinal reste presque identique et est estimée à environ de 8 à 10 % de la charge corporelle totale (Nielsen, 1992). De plus, dans la carcasse, où 60 à 80% de la charge corporelle totale est accumulée au cours des 30 jours, le mercure est déposé essentiellement dans les fourrures, la peau et muscle avec une faible accumulation dans les os et graisses (Nielsen et Andersen, 1992). L'accumulation du mercure dans les fourrures, reflet du niveau sanguin, augmente en fonction du temps chez le rat et cela pendant et après exposition (Magos et Butler, 1976).

Chez le singe, après exposition chronique au MeHg, le profil de distribution du mercure dans l'organisme est le suivant ; le foie > reins > sang > cerveau ; ceux-ci sont suivis par les autres organes (Rice 1989 ; Evans et al., 1977).

La distribution du mercure dans le cerveau a été étudiée chez le rat (Berlin et al., 1975 ; Sakai, 1974 ; Suda et al., 1989 ; Moller-Madsen et Danscher, 1986, 1991 ; Moller-Madsen, 1990, 1991) et le singe (Rice, 1989 ; Vahter et al., 1994). Ces travaux montrent que le ratio du mercure dans le cerveau par rapport au sang varie beaucoup en fonction de la dose et de la durée d'exposition. Ce ratio a été estimé à 10 chez la souris et à 300 chez le rat (Berglund et al., 1971 ;

Albert et al., 1973). Chez le singe, le ration cerveau : sang en mercure varie entre les régions du cerveau où il se situe entre 0.1 et 4.7 (Berlin et al., 1975 ; Rice, 1989).

Dans le cerveau, le MeHg s'accumule d'abord dans les cellules gliales avant d'entrer plus tard dans les neurones (Berlin et al., 1975 ; Sakai, 1974). L'accumulation tardive dans les neurones pourrait expliquer la période de latence (Berlin et al., 1975 ; Sakai, 1974). Chez la souris, l'accumulation relative dans le cerveau augmente à partir du 3ème jour pour ensuite atteindre le plateau durant les 10 premiers jours de l'expérience. Environ 1.2% de la charge corporelle totale s'accumule dans le cerveau (Nielsen et Andersen, 1992).

Chez le rat, le MeHg est distribué dans le cortex cérébral, le noyau basal, le thalamus, l'hypothalamus, le tronc cérébral, le cervelet et l'hippocampe (Moller-Madsen, 1990, 1991). Dans le cervelet, les cellules de Purkinje du cortex et les cellules nerveuses dans les noyaux profonds accumulent plus de mercure (Moller-Madsen et Danscher, 1991). La concentration maximale du MeHg dans le cerveau est atteinte au moins 3 jours après administration de 8.0 mg du chlorure de MeHg à raison de 4 doses par semaine (Magos et al., 1978). Aussi, l'injection sous-cutanée du chlorure de MeHg (10 mg/kg, pendant 12 jours consécutifs) produit en moyenne 50.7 µg de mercure total par gramme de poids frais de cerveau entier chez le rat adulte (Okuda et al., 1978). Par contre, après i.p du chlorure de MeHg, le mercure s'accumule préférentiellement dans les lysosomes des ganglions de la racine dorsale au niveau de la moëlle épinière (Schionning et al., 1991). Mais il n'existe pas de donnée sur la distribution du mercure au niveau du système nerveux périphérique après administration aiguë ou répétée du chlorure de MeHg chez le rat.

Chez le singe, après administration du chlorure de MeHg (50, 70 et 90 µg/kg, pendant cinq mois consécutifs), l'accumulation du mercure dans le cerveau est comme suit : cortex occipital > autres régions corticales > cervelet > autres régions du cerveau (Evans et al., 1977 ; Stinson et al., 1989 ; Rice, 1989 ; Vather et al., 1994). Des concentrations appréciables sont mesurées dans le ganglion basal, le cervelet, le thalamus et dans la moëlle épinière. Aussi selon ces données, l'accumulation du mercure dans le cerveau est biphasique et elle est fonction de la dose de MeHg administrée (Evans et al., 1977 ; Stinson et al., 1989 ; Rice, 1989 ; Vather et al., 1994).

Dans l'ensemble, les données ci-dessus indiquent que la distribution du MeHg dans le cerveau dépend de la charge corporelle en mercure, et il existe une corrélation linéaire entre le cerveau et le sang seulement jusqu'à la concentration de 1 mg de Hg/g de sang. Au delà de ce

niveau, le ratio cerveau :sang augmente, probablement suite à la hausse de la concentration du MeHg dans le cerveau (Berlin et al., 1975b). Cette accumulation est lente, elle est trois à six fois supérieure au niveau sanguin à l'équilibre (Vahter et al., 1995). La lente accumulation du mercure dans le cerveau pourrait expliquer, en partie, l'apparition tardive des signes et symptômes de l'intoxication au MeHg. D'après ces données, la distribution du MeHg est homogène dans le cerveau à l'intérieur d'une même espèce, mais qu'elle varie substantiellement entre les espèces animales.

1.3.2.3 Métabolisme et excrétion

Le métabolisme et l'excrétion du MeHg ont été évalués chez différentes espèces animales (Syversen, 1974 ; Berlin et al., 1975). Après exposition à une dose unique ou répétée de MeHg, environ 20% du mercure total sont trouvés dans le foie sous forme de mercure inorganique, 50% dans les reins et de 30 à 65% sont détectés dans la bile (Syversen, 1974 ; Berlin et al., 1975). Dans ces conditions, seulement moins de 5% de mercure total sont présents dans le cerveau sous forme de mercure inorganique chez la souris, le rat et le singe (Syversen, 1974 ; Berlin et al., 1975). Ainsi, de ces travaux il était conclu que le MeHg ne saurait être métabolisé dans le cerveau. Par contre, chez le singe exposé au chlorure de MeHg (50 µg/kg, pendant 6, 12 et 18 mois respectivement), Vahter et al., (1995) ont détecté que 9% du mercure total présents dans le cerveau étaient sous forme inorganique après 6 à 12 mois d'exposition. Dans ces expériences, l'accumulation du mercure inorganique était de 18% après 18 mois d'exposition, et de 74%, 6 mois après 18 mois d'exposition. Pendant ces périodes, seulement environ 7% du mercure total sous forme de mercure inorganique étaient détectés dans le sang.

Ces données révèlent que les concentrations de mercure inorganique détecté dans le cerveau augmente significativement dans différentes régions du cerveau en fonction de la durée d'exposition et du temps écoulé après cette exposition (Rice, 1989 ; Vahter et al., 1994, 1995 ; Charleston et al., 1995). Toutefois, étant donné la capacité du mercure (inorganique et organique) à altérer les structures et fonctions de la barrière hémato-encéphalique, on ne saurait éliminer l'apport extérieur en mercure inorganique (Rice, 1989).

Malgré les multiples travaux effectués sur la distribution du mercure dans le cerveau chez l'animal après exposition au MeHg, l'utilisation de différents protocoles expérimentaux rend difficile la comparaison des résultats obtenus. Par exemple, l'accumulation du mercure dans le

cerveau de rat recevant le MeHg par voie i.p augmente durant les trois premiers jours avant de diminuer dans les 17 jours qui suivent l'exposition (Nakano et al., 1987). Par contre, après administration orale du chlorure de MeHg chez le rat, l'accumulation croissante du mercure dans le cerveau s'équilibre à partir du 4ème jour d'exposition (Fang, 1977).

Dans l'organisme, le MeHg est essentiellement excrété dans la bile avant d'être éliminé dans les fèces (Norseth et Clarkson 1970 ; Cherian et Vostal 1973 ; Berlin et al., 1975b). Ainsi, moins de 10% du mercure total sont éliminés dans les urines (Berglund et al., 1971 ; Friberg and Vostal 1972 ; Hollins et al., 1975). Cette élimination a été caractérisée par une cinétique de premier ordre (WHO, 1990), quand bien même les données utilisées soient recueillies après exposition aiguë au MeHg. Par exemple, chez la souris, la cinétique d'élimination du mercure est de premier ordre dans les 14 jours qui suivent l'exposition aiguë au MeHg (Nielsen et Andersen, 1990). Par contre, après une exposition répétée ou chronique, on observe une déviation de la cinétique de premier ordre (Nielsen, 1992 ; Nielsen et al., 1991a, b). La déviation de la cinétique du mercure dans ces cas pourrait s'expliquer par la longue vie du mercure inorganique dans le cerveau, estimée en terme d'années (Vahter et al., 1994).

Une autre raison de la déviation de la cinétique du premier ordre du mercure peut être associée à la différence du rythme d'élimination du MeHg entre les tissus d'une même espèce (Suzuki et al., 1963 ; Ostlund 1969 ; Ulfvarson 1970 ; Berglund, 1969 ; Swensson, 1968 ; Nordberg et al., 1971 ; Friberg et Vostal, 1972). Ainsi, la plus grande vitesse d'élimination du mercure est observée au niveau du sang, le foie et le rein, le plus grand séjour se localise dans le cerveau (Friberg et Vostal, 1972). Dans le sang, la demi-vie du MeHg varie considérablement entre les espèces animales, elle est 6 à 7 jours chez la souris (Suzuki et al., 1963 ; Ostlund 1969 ; Ulfvarson 1970), 40 à 51 jours chez le rat (Berglund, 1969 ; Swensson, 1968) et 150 jours chez le singe (Nordberg et al., 1971). Mais il convient de rappeler que ces valeurs ont été estimées, pour la plus part, par comptage de radioactivité dans l'organisme, y compris la quantité de mercure accumulée dans les fourrures. De telles valeurs devraient être interprétées avec la plus grande prudence. Par exemple, dans ces conditions, la demi-vie de la charge corporelle en mercure total a été estimée à 117 jours chez le chat. Après correction de cette valeur en l'absence de la fourrure, la demi-vie était en moyenne de 76 jours (Hollin et al., 1975).

Par contre, chez le singe exposé au chlorure de MeHg (50 µg/kg pendant 12 mois consécutifs), la demi-vie du MeHg dans le cerveau était de 35 jours. Alors que, celle du mercure

inorganique était extrêmement longue au niveau du cerveau, elle était estimée en terme d'années (Vahter et al., 1994). Par ailleurs, Rice (1989) a évalué l'élimination du mercure chez le singe après exposition chronique au MeHg (10, 25 ou 50 µg/kg par jour pendant 1 année 7 mois). D'après ces travaux, l'accumulation du mercure dans le cerveau est plus de trois fois le niveau sanguin. De plus, l'auteur a montré que l'accumulation et la demi-vie varient en fonction de la dose du MeHg administrée et de la région du cerveau examinée. Il a été suggéré que l'élimination du mercure dans le SNC diffère en fonction du temps mais aussi en fonction de la région du cerveau (Clarkson, 1972). Ainsi, le mercure est plus rapidement éliminé du cortex cérébral et du cervelet par rapport à la médullaire de ces deux régions. Par contre, le mercure est faiblement éliminé du cortex cérébral par rapport au cortex calleux, de sorte que le niveau du mercure dans ce dernier est plus élevé par rapport à celui dans le cortex cérébral (Clarkson, 1972). De telles informations manquent chez les autres espèces animales, y compris le rat.

Ainsi d'après les informations recueillies ci-dessus, la cinétique du MeHg varie aussi en fonction de l'espèce, du sexe, de l'âge et du régime alimentaire (Nielsen, 1992). Par exemple, chez les mammifères les demi-vies de l'exposition aiguë au MeHg et au Hg^{2+} diffèrent de celles chroniques. Ainsi, la demi-vie du mercure est plus longue après exposition chronique, probablement à cause de l'altération progressive des fonctions de défense cellulaire de l'organisme à mesure que l'exposition s'étale dans le temps et de l'accumulation concomitante de mercure inorganique (Lorscheider et al., 1995). Aussi, les facteurs alimentaires peuvent influencer la charge corporelle en MeHg absorbé (Sundberg et al., 1998). Par exemple, la lactation diminue la demi-vie du mercure total dans le plasma chez la souris (Sundberg et al., 1998). Aussi, les phospholipides comme la leucithine de gras alimentaire qui peuvent augmenter l'excrétion de la bile peuvent par conséquent augmenter celle du MeHg ou de réduire sa réabsorption intestinale (Sundberg et al., 1998).

Ainsi, tenant compte des considérations cinétiques évoquées ci-dessus, la pratique basée sur l'évaluation du risque à partir de l'estimation de la charge corporelle nécessite d'être révisée. Cette approche repose sur l'hypothèse selon laquelle, le niveau du mercure dans le cerveau pourrait être prédit à partir des niveaux sanguins (Swedish Expert Group, 1971 ; Task group, 1973 ; WHO, 1990). Malheureusement, cette hypothèse n'est pas souvent vérifiée. En fait plusieurs études ont montré une corrélation négative entre le sang et le cerveau ($P < 0.01$, $r = -0.688$) chez le rat après exposition répétée au MeHg (0.84 or 3.36 mg/kg 5 fois par semaine pendant 4 à 8 semaines). De plus, il a été démontré que ont montré que chez les victimes de Minamata, la demi-vie du mercure est estimée à 240 jours (Takeuchi et Eto, 1975 ; Takeuchi et al., 1989).

1.4. MANIFESTATIONS CLINIQUES ET HISTOPATHOLOGIE

La neurotoxicité du MeHg a été étudiée chez humain et l'animal expérimental (Bakir et al., 1973 ; Tsubaki et Irukayama 1977 ; Gerstner and Huff, 1977; Rhuel and Chang, 1979 ; Clarkson, 1972, 1992 ; Braunwald et al., 1994 ; Uchino et al., 1995a,b ; Harada, 1995 ; Ratcliffe et al., 1996). D'après ces données, le système nerveux, particulièrement le cerveau, représente le principal organe cible de l'intoxication au MeHg.

L'objectif de cette section est de recenser les données cliniques et histopathologiques sur l'intoxication au MeHg chez l'adulte afin de justifier notre hypothèse de travail.

1.4.1. Chez l'humain

1.4.1.1 Signes cliniques et symptômes

Chez l'humain, plusieurs cas d'intoxications massives au MeHg ont été rapportés à travers le monde. Les principaux cas sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 1 : Principales épidémies de l'intoxication au MeHg à travers le monde.

| Sources d'exposition | Lieux | Périodes | Bilan (Cas/Décès) |
|----------------------|------------------|----------------------|-------------------|
| Profession | Angleterre | 1940 | 4/3 |
| Poisson | Minamata (Japon) | 1953-1960 | 121/NR |
| Poisson | Niigata (Japon) | 1964-1965 | 48/NR |
| Semence | Guatemala | 1963-1965 | 45/NR |
| Semence | Pakistan | 1969 | 100/NR |
| Viande | Nouveau Mexique | 1969 | NR |
| Semence | Irak | Trois mois (1972) | 6530/459 |

NR non reporté.

Les premiers syndromes cliniques de l'intoxication au MeHg ont été décrits en 1940 par Hunter et al., (1940) chez quatre hommes professionnellement exposés au MeHg. Les signes caractéristiques de cette intoxication qui sont apparus 3 à 4 mois après l'exposition, consistaient en une paresthésie localisée surtout au niveau des extrémités. Ces signes qui étaient suivis d'un mois plus tard par l'ataxie, la dysarthrie et les troubles visuels ont été appelés "*Syndrome de Hunter-Russell*" (Hunter et al., 1940).

Pathologiquement, le *Syndrome de Hunter-Russell* se caractérise par une atrophie des zones focales corticales, la destruction des cellules granulaires du cervelet, la préservation relative des cellules de Purkinje et une atrophie focale du cortex calleux (Hunter et al., 1940). En dehors de cette intoxication d'origine professionnelle, les autres cas qui suivent proviennent de l'ingestion d'aliments contaminés.

1.4.1.1.1 Epidémies de Minamata et de Niigata au Japon

Les signes et symptômes de l'intoxication chronique au MeHg qui sont connus sous le nom de la maladie de Minamata ont aussi été observés à Niigata, une autre ville du Japon (Tsubaki et Irukayama 1977). Ces signes peuvent être regroupés en troubles sensoriels, moteurs,

affectifs et mentaux (Gerstner et Huff, 1977). Les signes cardinaux de l'intoxication au MeHg sont la dysarthrie, les tremblements ou la paresthésie au niveau des extrémités (lèvres et langue), l'ataxie, l'incoordination motrice, la constriction concentrique des champs visuels, la sudation excessive, les troubles mentaux, la dépression, la rigidité des membres et la chorée. Dans les cas graves, les victimes deviennent comateux et meurent dans quelques semaines qui suivent l'apparition des signes (Tsubaki and Irukayama 1977 ; Takeuchi et al., 1989 ; Uchino et al., 1995). Les signes de l'épidémie de Niigata sont identiques à ceux de Minamata, mais avec une faible intensité. La fréquence des symptômes de la maladie de Minamata est présentée dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2 : Fréquences des signes et symptômes de la maladie de Minamata

| Symptômes | Fréquence (%) |
|---------------------------------------|---------------|
| Construction du champ visuel | 100 |
| Troubles sensoriels | 100 |
| Ataxie | 98 |
| Troubles de langage | 88 |
| Troubles de l'audition | 85 |
| Perte de l'équilibre et de la posture | 82 |
| Tremblement | 76 |
| Troubles mentaux | 71 |
| Exagération du tendon réflexe | 38 |
| Hypersalivation | 24 |
| Hypersudation | 24 |
| Rigidité musculaire | 21 |
| Chorée | 15 |

Tiré de Uno et al., (1995).

Les signes et symptômes de l'intoxication aiguë et subaiguë au MeHg dans les épisodes du Japon sont presque identiques à ceux des formes chroniques, mais avec une faible intensité (Marsh, 1994 ; Harada, 1994 ; Uno et al., 1995).

1.4.1.1.2 Epidémie d'Iraq (1972 - 1973)

Malgré sa courte période de trois mois (octobre - décembre, 1972), comparée au cas du Japon, l'épisode d'Iraq est l'une des intoxications ayant marquée l'histoire. Cette intoxication provenant de la consommation de semence de blé traité au MeHg a causé 6530 cas d'hospitalisation avec 459 décès (Bakir et al., 1980). Les signes et symptômes qui étaient apparus à partir du 15^{ème} jour de l'exposition, voir entre 1 et 2 mois sont identiques à ceux de Minamata mais avec une forte intensité (Bakir et al., 1980). Aussi, on a reporté une myasthénie grave chez 14% des victimes de l'intoxication, ce signe avait bien répondu à la prostigmine (Von Burg et Rustam, 1974). Ces observations suggèrent l'implication des troubles de la neurotransmission myoneuronale (Von Burg et Rustam, 1974). En plus des signes de la maladie de Minamata, les larmolements et la perte du contrôle des sphincters ont été également reportés (Bakir et al., 1980 ; Marsh 1994).

1.4.1.1.3 Autres cas

En dehors des situations tragiques du Japon et d'Iraq, l'émergence des changements comportementaux provenant de l'exposition répétée saisonnière et chronique au Canada (Wheatley et Paradis, 1996 ; Beuter et al., 1998), Brésil (Lebel et al., 1996, 1998 ; Dolbec et al., 2000) et d'ailleurs (Cranmer et al., 1996 ; Grandjean et al., 1996) mérite attention. Ces intoxications se manifestent surtout par des troubles comportementaux de types sensoriels et moteurs (Lebel et al., 1996, 1998 ; Dolbec et al., 2000), le tremblement (Beuter et al., 1998) et la perte de mémoire (Grandjean et al., 1996). De tels signes et symptômes précoces sont difficiles à identifier par les tests habituels utilisés dans le diagnostic de la maladie de Minamata et d'Iraq.

1.4.1.2 Histopathologie

Les caractéristiques pathologiques de la maladie de Minamata sont identiques à celles du "*syndrome de Hunter et Russel*" (Takeuchi et al., 1972). Elles consistent essentiellement en une atrophie focale sévère au niveau du cortex cérébral et du cervelet (Hunter and Russell, 1954). En plus de ces caractéristiques, d'importantes lésions sont observées dans différentes régions du cerveau et au niveau de système nerveux périphérique (SNP), surtout dans les cas chroniques (Takeuchi et al., 1972 ; Harada 1995).

L'examen histopathologique post-mortem des victimes de Minamata montre une atrophie du cortex cérébral qui présente un aspect spongieux suite à la nécrose et à la perte neuronale. Cette perte est sélective et marquée au niveau des régions calcarines du lobe occipital (centre visuel), du cortex pré et post central (centre moteur et sensoriel) et du cortex temporal (centre auditif) (Takeuchi et al., 1972 ; Harada 1995). Le cortex calleux reste sévèrement atteint dans tous les cas. Aussi, les cellules nerveuses et les gaines de myéline sont sévèrement lésées avec plus ou moins d'astrocytose ; c'est à dire une prolifération des cellules gliales et une mobilisation de phagocytes. De plus, la perte des cellules granulaires et des petites cellules pyramidales est accompagnée par une prolifération des cellules gliales et de la matière blanche démyélinisée (Marsh, 1994).

Également on observe une profonde désintégration des cellules du cortex calleux (Shiraki 1979 ; Yoshikawa 1963). Chez les survivants des cas chroniques, on observe une démyélinisation considérable des hémisphères cérébraux. Aussi, des anomalies de la circulation sanguine et un œdème cérébral sont reportées dans les cas chroniques du Japon (Shiraki 1979 ; Chang, 1992). Il est démontré que le MeHg augmente la perméabilité sélective de la barrière hémato-encéphalique (Chang and Hartman, 1972 ; Shiraki, 1979 ; Chang, 1992).

Au niveau du cervelet, on observe une perte marquée des couches granulaires internes de neurones par rapport à une préservation relative des celles de Purkinje (Takeuchi 1985). Les cellules granulaires sont les premières à se désintégrer de la région sous adjacente à la couche de cellules de Purkinje. Ces deux types de cellules sont détruits dans la plus part des cas sévères (Takeuchi 1985). Par contre, les cellules de Golgi de type II sont épargnées (Shiraki, 1979). Dans l'ensemble, la susceptibilité particulière du cervelet pourrait s'expliquer, entre autre, par la pauvreté de cette région en ribosomes, le centre de la synthèse protéique (Marsh 1994).

Les données histopathologiques de l'intoxication aiguë au MeHg en Irak sont très limitées (Komulainen, 1988). Chez ces victimes, le poids du cerveau était généralement réduit, mais aucune différence significative n'a été reportée entre les cas aigus, subaigus et chroniques (Kojima et Fujita, 1971). Au niveau du cortex cérébral et du cervelet, les neurones présentent des astrocytoses diffuses dans la matière blanche sans nécroses neuronales (Choi et al., 1981). De plus, le cortex cérébral devient plus sensible au MeHg avec une profonde désintégration des neurones du cortex calleux (Shiraki, 1979). De même, après exposition aiguë au MeHg à travers une application cutanée (liniment contenant 0.2% de MeHg), le cortex calleux est sévèrement

désintégré des cellules nerveuses sans aucune lésion observable au niveau du cervelet (Shiraki 1979 ; Yoshikawa (1963). Ainsi d'après ces informations, le cortex cérébral est plus sensible aux intoxications aiguës par rapport au cervelet.

Au niveau du système nerveux périphérique, Hunter and Russel (1954) n'ont observé aucune anomalie. Mais selon Shiraki (1979), Hunter and Russel (1954) n'ont accordé aucune attention particulière au système nerveux périphérique dans leurs travaux. Par contre, d'importantes altérations histologiques ont été observées au niveau périphérique, dans les formes chroniques au Japon (Etoh, 1971 ; Tsubaki et Irukayama, 1977 ; Harada, 1995). Les nerfs sensoriels sont plus sensibles au MeHg par rapport aux nerfs moteurs, ces lésions se caractérisent par la dégénération des axones, de la myéline et des ganglions de la racine postérieure (Etoh, 1971 ; Krigman 1982). Les lésions observées au niveau des nerfs périphériques sont probablement causées par l'accumulation du mercure inorganique provenant de la décomposition métabolique du MeHg (Marsh 1994).

1.4.1.3 Signification des données histopathologiques

Bien qu'il ait été difficile d'établir une corrélation significative entre les signes et les données pathologiques de l'intoxication au MeHg chez l'humain, quelques tentatives ont été menées (Kojima et Fujita, 1973 ; Marsh, 1994). Par exemple, la constriction concentrique du champ visuel correspond bien à la destruction bilatérale du cortex bilatéral (Kojima et Fujita, 1973). Cette région reçoit la projection des fibres optiques provenant de la rétine (Guyton, 1989). Aussi, il est démontré que les lésions du lobe occipital sont impliquées dans les troubles de la vision bilatérale et collatérale au niveau du cortex cérébral chez l'humain (Guyton, 1989). Par contre, la partie caudale du cortex cérébral qui reçoit les nerfs centraux de la rétine est moins endommagée ou parfois sans lésion (Guyton, 1989). Aussi, la désintégration du cortex transverse et insulaire adjacent fournit une base morphologique aux troubles de l'audition (Guyton, 1989).

L'ataxie reportée dans la plupart des cas d'intoxication au MeHg peut être attribuée à la lésion sévère du cortex cérébelleux (Kojima et Fujita, 1973 ; Marsh, 1994). La rigidité musculaire occasionnelle et l'hyperkinesie impliquent le putamen. Les lésions des lobes temporaux du cortex cérébral sont associées aux troubles des habiletés manuelles (Kojima et Fujita, 1973). De plus, la destruction de l'aire somesthésique associative située dans le lobe

pariétal, entraîne chez un individu la perte de la perception spatiale et de la localisation des différentes parties de son corps (Guyton, 1989).

En plus du rôle de coordination de la motricité, le cervelet est impliqué dans les hautes fonctions du cerveau comme l'apprentissage et la mémoire (Wallesch et Bartels, 1997 ; Thompson et al., 1997). Par exemple, le cervelet est impliqué dans les tâches spatiales comme le test *Maze learning* (Wallesch et Bartels, 1997 ; Thompson et al., 1997).

Les fibres du corps calleux, en reliant ensemble les régions corticales des deux hémisphères du cerveau, rendent le corps calleux nécessaire à la coopération entre les deux hémisphères (Guyton, 1989). Ainsi, les lésions provoquées par le MeHg au niveau du corps calleux sont susceptibles de rompre la coopération entre les deux hémisphères du cerveau (Guyton, 1989). Dans ces conditions, le transfert de l'information somatique et visuelle de l'hémisphère droit à la région de Wernicke de l'hémisphère dominant (l'hémisphère gauche) est bloqué (Guyton, 1989). Ainsi, l'utilisation de l'information à des fins de décision pourrait être rendue impossible chez les sujets intoxiqués aux MeHg (Guyton, 1989).

Aussi, les troubles mentaux et psychiatriques (l'excitation psychomotrice, l'altération de la conscience, la dépression et les troubles émotionnels) fréquemment rapportés sont probablement causés par la destruction des neurones, particulièrement au dans la région frontale du cortex cérébral (Takeuchi et al., 1971).

Étant donné que dans les cas aigus aucune anomalie n'a été détectée au niveau du système nerveux périphérique, les troubles sensoriels comme la douleur, l'engourdissement, la démangeaison et les brûlures de la peau pourraient être attribués aux lésions au niveau du SNC (Bakir et al., 1980 ; Marsh 1994).

Toutefois, la majorité des signes et symptômes de l'intoxication au MeHg pourraient être liés à l'âge surtout dans les formes chroniques de la maladie de Minamata (Harada, 1995). De plus, dans les données antérieures, les détails sur l'exposition au MeHg de même que l'antécédent physiopathologique des victimes n'ont pas été évalués. Ces conditions pourraient compliquer l'interprétation des données histopathologiques de la maladie de Minamata.

1.4.1.4 La relation dose - réponse

Ici, la relation dose - réponse pourrait idéalement représenter la relation entre la dose de MeHg ingéré qui produit une certaine concentration du mercure dans le cerveau, d'une part, et la

proportion de la population exposée qui développe des effets spécifiques à partir de la dose ingérée, de l'autre part. Les données sur la relation dose - réponse de l'intoxication au MeHg proviennent des épidémies d'Irak (Bakir et al., 1973), du Japon (Swedish Expert Groupe, 1971) et des études de populations exposées au MeHg à travers la consommation de poissons contaminés (Skerfving, 1973 ; Clarkson et al., 1973 ; Lebel et al., 1996, 1998 ; Grandjean et al., 1996 ; Dolbec et al., 2000). Dans ces cas, la dose du MeHg peut être exprimée par la quantité 1) ingérée ou administrée, 2) absorbée qui est reflétée par la concentration du mercure dans le sang ou dans les cheveux et enfin, 3) ou la concentration du mercure dans l'organe cible, le cerveau.

1.4.1.4.1 Incidence des signes liés à la prise ou à la charge corporelle

Dans toutes les épidémies d'intoxication au MeHg, les doses de MeHg ingérées ont été estimées de façon rétrospective. Aussi, les informations disponibles sont très limitées sur les quantités ingérées et les opportunités pour l'obtention des données sur la concentration du mercure dans le cerveau ont été très rares. Malgré ces difficultés, Bakir et al., (1973) ont estimé qu'en Irak, la charge corporelle de 0.5 à 0.8 mg de MeHg/kg de poids corporel était nécessaire pour produire la paresthésie chez 5% des victimes de cette intoxication.

1.4.1.4.2 Incidence des signes liés à la concentration du MeHg dans le sang

Face à l'absence quasi totale de données sur la concentration du mercure dans l'organe cible, le cerveau, le mercure sanguin est utilisé comme indicateur de la dose ingérée. Ainsi, la concentration du mercure dans le sang est bon indicateur d'une exposition courante et récente (Candy *et al.*, 1994) ou à l'équilibre, lorsque l'ingestion est égale à l'élimination. Par contre, dans les cas intermittents, chroniques et surtout à la fin de telles expositions, le mercure sanguin revient à la normale lorsque le niveau dans le cerveau reste anormalement élevé (Takeuchi, 1989). Par exemple, à partir des données épidémiologiques du Japon, la concentration de MeHg la plus faible susceptible de déclencher les signes de l'intoxication a été estimée à 200 µg/L de sang (Groupe d'Experts Suédois, 1971). Cette équipe a montré que les concentrations sanguines de l'ordre de 200 à 300 µg/l étaient nécessaires pour produire 5% de risque chez les victimes de l'épidémie du Japon, 65 jours après la fin de l'exposition. Par contre, une étude récente menée chez les aborigènes indiens du Canada de 1970 à 1992 a montré que des signes d'intoxication au MeHg sont observés à des niveaux sanguins de 100 µg/l et plus (Wheatley et Paradis, 1996). Dans

l'ensemble, l'analyse des données sanguines du Japon et d'Irak démontrent la difficulté d'établir une relation dose - réponse entre le niveau sanguin et les effets neurotoxiques rapportés chez les victimes de ces intoxications.

1.4.1.4.3 Incidence des signes liés à la concentration du MeHg dans les cheveux

Le niveau du mercure dans les cheveux est un indicateur de la concentration sanguine en mercure. L'avantage de l'utilisation des cheveux comme indicateur d'exposition au MeHg est qu'il est possible de faire une estimation rétrospective de l'exposition en analysant différents segments de cheveux, donc d'évaluer ainsi les expositions historiques au MeHg. La concentration du mercure dans les cheveux est proportionnelle à la concentration du mercure dans le sang au moment de la formation des cheveux (Al-Shahristani et al., 1974 ; Tsubaki et al., 1978 ; WHO, 1990). Ainsi au niveau des cheveux, la concentration minimale de MeHg capable d'induire les effets neurotoxiques a été estimée à 50 µg/g pour un risque se situant entre 10 et 5% chez les victimes de Niigata au Japon Tsubaki et al., (1978). Aussi, ces chercheurs ont montré que la concentration du mercure nécessaire pour déclencher les symptômes de l'intoxication était de 96 µg/g avec un pic de 200 µg/g de cheveux. De plus, chez les victimes de l'épidémie d'Irak, la plus faible concentration en MeHg capable de déclencher ces signes neurologiques était de 120 µg/g (Al-Shahristani et al., 1974). De plus, il était estimé que des niveaux de 250 - 500 µg/g de mercure dans les cheveux (correspondant à 1,001 et 2000 µg/g de mercure dans le sang) étaient nécessaires pour déclencher particulièrement la paresthésie, un symptôme non spécifique, chez les victimes de l'épidémie d'Irak (Bakir et al., 1973). Par contre, des données récentes ont montré qu'il existe une relation significative entre le niveau du mercure dans les cheveux et certains effets neurotoxiques du MeHg dans certaines populations humaines (Lebel et al., 1998; Grandjean et al., 1999; Dolbecl et al., 2000).

Plusieurs études ont démontré qu'il est difficile d'établir une corrélation entre les niveaux du mercure dans les cheveux et les effets neurotoxiques du MeHg (Kosatsky et Foran, 1996 ; Ratcliffe et al., 1996 ; Meyers et al., 1997 ; Harada et al., 1998). Par exemple, Harada et al., (1998) ont observé des troubles sensoriels et moteurs, de l'ataxie, des altérations de l'ouïe et de la vision au Japon, 20 années après la cessation de l'exposition au MeHg. Ces chercheurs ont montré que plus de 85% des personnes évaluées avaient un niveau de mercure inférieur à 10 µg/g dans les cheveux. Ces résultats suggèrent qu'après une longue période d'exposition, le

niveau du mercure dans les cheveux ne saurait être un bon indicateur des effets neurotoxiques du MeHg.

Aussi, l'analyse récente de 12 publications antérieures sur la relation dose - réponse a montré qu'à des niveaux de mercure $\geq 50 \mu\text{g/g}$ dans les cheveux, la paresthésie n'a pu être observée chez les populations contaminées (Kosatsky et Foran, 1996). Ainsi, les différences entre les niveaux de mercure dans le sang et dans les cheveux pourraient expliquer la difficulté d'établir une relation dose - réponse chez les populations à risque.

14.1.4.4 Incidence des signes liés à la concentration du MeHg dans le cerveau

Les données sur le niveau du cerveau en mercure chez l'adulte humain sont limitées. Les quelques données disponibles proviennent uniquement de l'analyse postmortem du cerveau des victimes des cas d'intoxication accidentelle du Japon (Mottet et al., 1997). Dans tous ces cas, les informations sur la quantité de mercure et la durée d'exposition au MeHg ne sont pas souvent connues. Ces lacunes pourraient compliquer l'établissement d'une relation fiable entre les changements intervenus au niveau du cerveau et la dose de MeHg ingéré. De plus, il n'existe pas d'informations sur la relation entre les effets à long terme et les niveaux correspondant en mercure dans le cerveau chez l'humain adulte.

Ainsi, la plus faible concentration en MeHg pouvant induire les effets neurotoxiques était de $5 \mu\text{g/g}$ dans le cerveau chez les victimes de la maladie de Minamata. Cette valeur correspondait à environ $600 \mu\text{g/l}$ dans le sang et $200 \mu\text{g/g}$ dans les cheveux (Swedish Expert Group, 1971). Ces valeurs sont plutôt faibles pour induire les signes précoces comme la paresthésie. Toutefois, il n'existe pas de données récentes sur la relation entre le niveau du mercure dans le cerveau et les effets correspondants chez l'adulte humain.

En conclusion, les données recueillies sur la relation dose - réponse suggèrent que les indicateurs d'exposition au MeHg ne permettent pas de prédire les effets neurotoxiques du MeHg. Pour combler les lacunes répertoriées chez l'humain, plusieurs travaux ont été entrepris chez l'animal.

1.4.2. Chez l'animal

1.4.2.1 Manifestations cliniques et histopathologie

La neurotoxicité du MeHg a été largement étudiée chez la souris (Berthoud et al., (1976 ; MacDonald and Harbison 1977), le rat (Miyakawa et al., 1970 ; Chang et Hartman, 1972 ; Fehling et al., 1975 ; Leyshon and Morgan, 1991 ; Kinoshita et al., 1999), le lapin (Jacob et al., 1977) et le singe (Berlin et al., 1975 ; Sato et Ikuta, 1977) après exposition aiguë, répétée et chronique. Selon ces travaux, les signes neurologiques sont identiques à ceux produits chez l'humain (Takeuchi, 1989). Ces signes sont, entre autres, les troubles sensoriels et moteurs, l'ataxie, le déficit de la mémoire et de l'apprentissage. Dans les cas graves, ces signes peuvent progresser de la paralysie partielle aux altérations pathologiques graves dans le cerveau et parfois au niveau du SNP.

Chez la souris, l'exposition au MeHg (0, 0.25, 1 et 4 mg/kg pendant 65 jours consécutifs) entraîne l'ataxie après 14 jours à la dose de 4 mg/kg, cet effet était apparu au 44^{ème} jour à 1 mg/kg (Berthoud et al., 1976). Dans tous ces cas, les neurones étaient profondément dégénérées dans le striatum, le cortex cérébral, le thalamus et l'hypothalamus (Berthoud et al., 1976). Aussi le MeHg (1 mg/kg pendant 110 jours consécutifs, et de 10 à 20 mg/kg pendant 14 mois consécutifs) induit la fatigue générale et l'ataxie des membres antérieures (MacDonald and Harbison 1977). D'après ces résultats, le MeHg (20 mg/kg) provoque une perte focale des cellules de Purkinje du cervelet sans perturber le comportement des animaux.

Chez le rat adulte, la dose cumulative de 55 à 135 mg de MeHg par kg de poids corporel est nécessaire pour induire la maladie de Minamata, l'ataxie (Klein et al., 1972). Mais cet effet apparaît en fonction de la dose, du rythme d'administration et du temps écoulé après l'administration du MeHg. Ainsi, Klein et al., (1972) ont montré que le MeHg (10 mg/kg pendant 5 et 7 jours consécutifs en sc.) provoque le croisement des pattes antérieures, le "*hand-crossing*" du jour 9 au jour 14 de la première dose chez les animaux traités. Cette manifestation apparaît à la concentration moyenne de 41.2 µg/g du mercure dans le cerveau. Huit jours après la dernière dose de MeHg, cet effet correspondait à des anomalies au niveau des systèmes nerveux périphérique et central. Dans le SNP, le nerf sciatique et les ganglions de la racine dorsale étaient hypertrophiés avant de présenter une démyélinisation et une destruction des axones. Au niveau du cerveau, le cervelet et le tronc cérébral étaient les plus affectés sans aucune anomalie

apparente au niveau du cortex cérébral. Aussi, le chlorure de MeHg (10 mg/kg par jour pendant 7 jours sc.) produit le croisement des pattes antérieures, le "*hand-crossing*". Cet effet débute à partir du jour 11 de la première dose (Kinoshita et al., 1999). L'examen microscopique de ces animaux révèle des astrocytoses dans le cortex et dans le striatum. Selon ces résultats, les axons des nerfs optiques ont un aspect gonflé. À la microscopie électronique, on observe une destruction massive des microtubules des nerfs optiques et une réduction modérée des microfilaments dans les axones myélinisés. Aussi, l'administration orale du dicyandiamide de MeHg (5 à 7.5 mg/kg pendant 8 jours consécutifs) provoque une ataxie franche, le croisement des pattes antérieures, le "*hand-crossing*" (Cavanagh et Chen, 1971). Ces signes qui sont observés entre les huitième et treizième jours de la première dose de MeHg, sont probablement causés par les altérations histologiques au niveau du cervelet et de la moelle épinière (Cavanagh 1968; Cavanagh and Chen, 1971). D'importantes dégénérationes sont observées au niveau des cellules granulaires du cortex calleux et du cervelet (Cavanagh et Chen, 1971). En plus du cortex cérébral et du cervelet, le MeHg altère l'hippocampe après exposition aiguë et subchronique chez le rat (Diamond et Sleight, 1972). Ces résultats montrent que le MeHg est capable de causer des altérations dans presque toutes les régions du cerveau chez le rat.

Au niveau du SNP, les nerfs sensitifs sont les plus affectés par rapport aux nerfs moteurs chez le rat (Fehling et al., 1975). Aussi, il est démontré que les ganglions de la racine dorsale sont plus sensibles aux effets du MeHg par rapport à ceux du centre (Chang 1980; Kumamoto et al., 1986). Les changements histopathologiques au niveau du SNP consistent en une dégénération wallerienne, un oedème et une dégénération des ganglions des nerfs sensoriels (Fehling et al., 1975). En effet, la racine dorsale, qui ne possède pas de barrière protectrice, est plus touchée par rapport à celle ventrale (Arimura et al., 1988 ; Olsson, 1994). Le dicyandiamide de MeHg (5 et 7.5 mg/kg) provoque des lésions au niveau des pattes antérieures suivies d'une l'ataxie franche (Shiraki and Nagashima 1977). Mais la rotation de la queue était le principal signe de l'intoxication, trois semaines après le traitement au chlorure de MeHg (20 mg/kg) (Shiraki and Nagashima 1977). Dans ce dernier cas, les principaux changements histopathologiques étaient intervenus au niveau des récepteurs sensoriels de la peau et de leurs axones adjacents (Yagy et al, 1976 ; Shiraki and Nagashima 1977). Toutefois, en dehors du cervelet, les autres régions du cerveau n'ont pas été examinées. L'utilisation de différents sels de MeHg, le manque d'information sur les espèces de rat ainsi que la durée du traitement pourraient expliquer la

variation des résultats rapportés par les travaux antérieurs (Komulainen, 1988). Par exemple, l'implication du SNP a été importante dans les travaux où le MeHg a souvent été administré en sc. (Kinoshita et al., 1999).

Chez le lapin, l'administration orale du chlorure de MeHg (1, 10 et 20 mg/kg pendant 14 jours) cause l'ataxie accompagnée d'intermittentes convulsions (Jacob et al., 1975). Ces effets sont présents chez la totalité des animaux traités à 20 mg/kg et chez 53% de ceux traités à 10 mg/kg. Sur le plan histopathologique, ces manifestations cliniques correspondaient à une nécrose précoce des cellules de Purkinje au niveau du cervelet (Jacob et al., 1975). Ces lésions sont suivies par celles de la couche granulaire et une nécrose d'aspect spongieux au niveau de la couche moléculaire. Dans les cas sévères, à la dose de 20 mg/kg, on observe une prolifération de la névroglie, un ramollissement et une nécrose des pédoncules cérébraux. Ainsi, la grande sensibilité des cellules de Purkinje chez le lapin fait de cet animal un modèle inadéquat pour l'évaluation de la neurotoxicité du MeHg chez l'humain.

De tous les animaux expérimentaux, le singe est l'espèce animale capable de reproduire les lésions du cortex calleux et les troubles de la vue similaires à ceux observés chez l'humain (Berlin et al., 1975 ; Sato et Ikuta, 1977). Ainsi le tremblement, l'incoordination motrice et l'ataxie, l'anorexie ont été observés chez le singe entre 57 et 62 jours après avoir reçu des doses cumulatives de 11.45 à 12.80 mg/kg du chlorure de MeHg. Ces signes sont suivis par les troubles de la motricité fine avec des crises myocloniques périodiques aux extrémités, des troubles de la vision et de l'audition. Ces signes progressent vers les crises toniques et cloniques généralisés (Sato et Ikuta, 1977).

Au niveau histopathologique, les signes et symptômes de l'intoxication au MeHg correspondent à une atrophie marquée dans la région calcarine du cortex (Sato et Ikuta, 1977 ; Evans et al., 1977). Ces lésions sont moins évidentes dans les cellules de Purkinje du cervelet (Evans et al., 1977). De plus, on note une destruction des axones des nerfs optiques, la prolifération des astrocytes, la destruction des neurones dans le tronc cérébral, le striatum, le thalamus et la moelle épinière (Sato et Ikuta, 1977 ; Evans et al., 1977). La prolifération des astrocytes était particulièrement observée au niveau des lobes occipital, pariétal et temporal et dans le noyau latéral geniculé. Ces altérations histopathologiques sont similaires à ceux observés chez les victimes de la maladie de Minamata (Takeuchi et Etoh, 1989).

Les données humaines et animales démontrent l'existence d'une période de latence entre l'exposition et l'apparition des signes cliniques de l'intoxication au MeHg (WHO, 1990 ; ATSDR, 1997). Il est aussi démontré que cette période de latence est précédée par des altérations biochimiques, fonctionnelles et morphologiques (Fukuhara, 1969 ; WHO, 1990 ; ATSDR, 1997). Ainsi, au niveau cellulaire et moléculaire, le MeHg cause une profonde désintégration des axones, du reticulum endoplasmique et des mitochondries dans les neurones du cerveau avant l'apparition des signes cliniques chez le rat (Fukuhara, 1969). Également, chez le singe, l'examen ultrastructural montre la disparition des mitochondries et du reticulum endoplasmique, et la destruction de la membrane nucléaire dans les cellules nerveuses dans le cortex cérébral (Fukuhara, 1969). Ces modifications qui précèdent l'apparition des signes cliniques chez l'animal expérimental suggèrent que les modifications biochimiques sont plus précoces par rapport aux signes cliniques et symptômes de l'intoxication au MeHg.

1.4.2.2 La relation dose - effet

La concentration critique du mercure dans le cerveau, nécessaire pour déclencher les signes neurologiques du MeHg, a été testée par plusieurs chercheurs (Suzuki et Miyama, 1971). Chez la souris, le signe le plus sensible, par exemple la réduction de la capacité de maintenir la tête en position horizontale lorsque l'animal est maintenu par la queue, a lieu à la concentration de 10 µg/g de cerveau frais (Berthoud et al., 1976).

L'administration de MeHg (2 mg/kg pendant 17 et 18 jours) provoque la dégénération neuronale et la prolifération astrogliale essentiellement dans le noyau caudé, le corps geniculé latéral, le thalamus chez le singe (Berlin et al., 1975). Munro et al., (1980) ont rapporté que les niveaux de l'ordre de 1 à 2 µg/g de mercure dans le cerveau représentent le seuil probable pour déclencher la phase clinique de l'intoxication tant chez l'humain que chez l'animal expérimental. Aussi, il a été rapporté que 20 µg/g de mercure dans le cerveau sont nécessaires pour induire l'incoordination motrice chez la souris testée par le test de rotarod (Tagashira et al., 1980). Mais il existe des différences entre les régions du cerveau. Ainsi, Hoskins et Hupp (1978) ont démontré que chez le rat, des concentrations de 8 µg/g de mercure sont nécessaires dans le cortex cérébral ou dans le cervelet pour induire l'ataxie. Par contre, plus de 6 µg/g sont requis dans le tronc cérébral pour induire cet effet toujours chez la même espèce animale (Hoskins et Hupp, 1978). D'après Berlin et al., (1975), 9 µg/g étaient indiqués pour produire de tel effet chez le singe.

1.4.3 Variations pathologiques inter-espèces

Si les altérations histopathologiques observées au niveau du système nerveux chez les victimes des épidémies du Japon et d'Irak sont expérimentalement reproductibles chez l'animal expérimental, il faut cependant rappeler qu'il existe des différences entre les animaux étudiés. Deux caractéristiques histopathologiques essentielles de l'intoxication au MeHg sont à remarquer chez les mammifères : les lésions au niveau du système nerveux central avec de proéminentes dégénération au niveau des cellules granulaires du cortex calleux et du cervelet. Ces lésions sont irréversibles (Clarkson, 1983). Par contre, les lésions dans d'autres régions comme le cortex moteur apparaissent diffuses (Clarkson, 1983).

Il y a une variation entre les espèces au niveau des troubles visuels et de l'implication du SNP dans la neurotoxicité du MeHg (Hunter et al, 1940; Etoh, 1971 ; Takeuchi et Eto, 1975 ; Chang, 1977 ; Magos et al., 1981 ; Clarkson, 1983 ; Mottet et al., 1987). Le MeHg cause la perte de la vue chez l'humain, le singe et le porc, mais pas chez le chat. Les altérations de la couche granulaire du cervelet constituent l'une des manifestations les plus communes chez l'humain (Takeuchi et Eto, 1975), le rat et le chat (Chang, 1977), mais non chez le singe (Chang, 1977 ; Mottet et al., 1987). Le rat femelle qui accumule plus de MeHg dans le cerveau par rapport au mâle, développe aussi de sévères lésions dans le cervelet (Magos et al., 1981). Chez le rat et la souris, les changements au niveau du cervelet semblent être moins sévères par rapport à ceux développés chez le lapin et l'humain (Komulainen, 1989). Par contre, l'ataxie et les lésions du SNP sont surtout reproduits chez le rat, bien que ces derniers effets apparaissent de façon précoce chez celui-ci (Hunter et al, 1940 ; Etoh, 1971)

Chez le chat, le cervelet est plus sensible aux effets du MeHg (Shiraki, 1979 ; Charbonneau et al, 1974). Toutefois, la deuxième couche du cortex cérébral n'est pas du tout affectée chez le chat. Par contre, cette région est plus touchée chez l'humain (Takeuchi et Eto, 1975).

Contrairement à l'humain, chez qui les cellules de Purkinje du cervelet sont plus résistantes, ces cellules sont précocement et sélectivement détruites par le MeHg chez le lapin (Jacobs et al., 1977).

De toutes les espèces animales étudiées, le singe semble reproduire exactement les troubles de la vision qui sont caractéristiques de l'intoxication au MeHg chez l'humain. À ces signes correspondent, chez l'humain et le singe, une perte des neurones des régions cérébrales temporales qui reçoivent les projections visuelles périphériques de la rétine (Berlin et al., 1975 ; Komulainen, 1988).

En général, les données existantes démontrent que les effets cliniques de l'intoxication au MeHg varient en fonction de l'espèce animale, du sel de MeHg, de la durée d'exposition (aiguë, subaiguë ou chronique). Aussi, chez une même espèce, il existe une variation régionale du site de lésions observées selon différents rythmes et voie d'exposition au MeHg (Komulainen 1988). Aussi, les données humaines et animales démontrent l'existence d'une période de latence entre l'exposition et l'apparition des signes cliniques de l'intoxication au MeHg. Il est démontré que cette période de latence est précédée par des altérations biochimiques, fonctionnelles et morphologiques. De plus, la relation dose - réponse, établie à partir des niveaux sanguins en mercure et des effets neurologiques centraux, a été difficile à établir. Cette relation devient encore compliquée dans des conditions d'exposition saisonnière et chronique telle qu'observée présentement au niveau des populations humaines. Enfin, bien qu'il soit clairement établi que le cerveau constitue le principal organe cible de l'intoxication au MeHg, le SNP est aussi impliqué chez l'humain et chez l'animal expérimental, particulièrement chez le rat, et cela dans les cas chroniques. En plus, plusieurs facteurs dont l'alimentation peuvent affecter les effets neurotoxiques du MeHg. Parmi ces facteurs, le sélénium (Ganther et al., 1972), les antioxydants comme la vitamine C (Chang et al., 1978) et l'alcool (Turner et al., 1981) sont les plus connues.

1.5 MECANISMES BIOCHIMIQUES DE LA NEUROTOXICITE DU MeHg

Au niveau cellulaire, plusieurs mécanismes peuvent expliquer les effets inhibiteurs du MeHg sur les systèmes cholinergiques et monoaminergiques de la neurotransmission et la diminution de la quantité des microtubules dans les lymphocytes et plaquettes du sang périphériques. Parmi ces mécanismes citons entre autres 1) le blocage des groupements thiols (-SH) des acides aminés et des protéines, 2) les troubles du métabolisme énergétique 3) les altérations de l'homéostasie de l'ion calcium, 4) la formation d'espèces réactives oxygénées, 5) l'inhibition de la synthèse protéique et 6) les perturbations des microtubules.

1.5.1 Blocage des groupements -SH

Le MeHg inhibe les groupements -SH des acides aminés présents aux sites actifs des protéines comme les membranes, les enzymes et les récepteurs (Clarkson, 1972 ; Prakash et al., 1973 ; Prasad, 1979 ; Rajanna and Hobson, 1985; Kerlavage et al., 1987 ; Andersen 1990; Bonnet et al., 1993). Ainsi, il est démontré que le MeHg diminue la captation de la choline, de la DA, de la 5-HT en inhibant l'activité de la Na^+/K^+ ATPase impliquée dans les processus de captation et de la libération des neurotransmetteurs au niveau des membranes (Prakash et al., 1973 ; Prasad, 1979 ; Rajanna et Hobson, 1985).

1.5.2 Inhibition du métabolisme énergétique

MeHg inhibe le fonctionnement de la mitochondrie (Verity et al., 1975 ; Grundt and Bakken, 1986 ; Kauppinen et al., 1989 ; Komulainen et al., 1989 ; Bano and Hasan, 1989 ; Levesque and Atchison, 1991; Harare et al. 1992 ; Yee and Choi., 1996). En effet, le MeHg diminue la consommation cellulaire en oxygène et inhibe de façon compétitive l'activité du cytochrome c (Yee and and Choi., 1996). Cet effet suggère l'implication de la chaîne du transport des électrons au niveau des mitochondries pourrait être le site d'action privilégié du MeHg. Aussi, le MeHg inhibe la respiration cellulaire au niveau de la mitochondrie dans les synaptosomes du cerveau (Verity et al., 1975). Cet effet pourrait expliquer la réduction du niveau énergétique dans les cellules exposées *in vitro* au MeHg (Grundt and Bakken, 1986).

Après exposition *in vitro* et *in vivo*, le MeHg est capable de perturber la respiration cellulaire dans les tranches de cerveau et dans les synaptosomes (Cheung et al., 1977 ; Fox et al., 1975 ; Corda et al., 1981 ; Kauppinen et al., 1989). Kauppinen et al., (1989) ont observé que 30 et 100 μmol de MeHg sont nécessaires pour réduire la concentration de l'ATP et de l'adénosine diphosphate (ADP) dans les synaptosomes. Aussi, Corda et al., (1981) ont montré que le MeHg (10 mg/kg en dose unique) réduit de 50% de la valeur normale du GMPc mais sans produire aucun effet sur le niveau de l'AMPc dans le cervelet. De plus, le MeHg interfère avec la glycolyse, le métabolisme des lipides et le cycle tricarboxylique (Yee and Choi., 1996).

Toutefois, les mécanismes moléculaires par lesquels le MeHg inhibe la transduction de l'énergie mitochondriale restent encore inconnus. En se fixant aux groupes SH, le MeHg peut dénaturer et d'inactiver les enzymes et les transporteurs des électrons et substrats renfermant ces groupements au niveau de la chaîne respiratoire (Grundt and Bakken, 1986). La baisse énergétique et la lésion possible de la membrane cellulaire (Bano and Hasan, 1989) pourraient conduire à l'augmentation de la captation du Ca^{2+} dans les terminaisons nerveuses. Ainsi, la diminution de l'énergie suivie par la dépolarisation des membranes semble être l'une des principales causes de la neurotoxicité du MeHg.

1.5.3 Troubles de l'homéostasie du calcium

Le mécanisme régulant la concentration interne de l'ion calcium (Ca^{2+}) du neurone est extrêmement complexe (Clapham, 1995). Dans les neurones au repos, environ 10,000 fois le gradient de concentration du calcium à travers la membrane plasmique (1 - 2 mM à l'extérieur et 50 - 100 nM à l'intérieur de la cellule) est maintenue essentiellement par l'activité de la Ca^{2+} -ATPase au niveau de la membrane plasmique (Clapham, 1995). Par exemple dans les neurones stimulés, la concentration du calcium intracellulaire ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) cytosolique est rapidement réduite soit au profit de la concentration extérieure de la cellule ou par une augmentation du stockage dans le reticulum endoplasmique et dans la mitochondrie (Baimbridge et al., 1992 ; Clapham, 1995). Dans ces derniers cas, le Ca^{2+} intracellulaire est complexé par des protéines de stockage comme la calmoduline, la calbindine et la parvalbumine (Baimbridge et al., 1992).

Dans les conditions physiologiques, le signal qui déclenche la libération du Ca^{2+} intracellulaire n'est pas encore bien connu (Miller et al., 1989). Cependant, certaines conditions pathologiques comme le stress oxydatif sont de puissants déclencheurs de la libération du Ca^{2+}

mitochondrial (Budd et Nicholls, 1996). Aussi, il existe une relation réciproque entre la $[Ca^{2+}]_i$ et la formation d'espèces réactives oxygénées (Miller et al., 1989 ; Budd et Nicholls, 1996). Par exemple, l'élévation du $[Ca^{2+}]_i$ induit la production d'espèces réactives oxygénées (O_2^- , H_2O_2 , OH, NO et le peroxy-nitrite = N_2O_2). En retour, les espèces réactives oxygénées perturbent l'homéostasie du calcium (Mattson *et al.*, 1998).

Ainsi, l'élévation excessive de la $[Ca^{2+}]_i$ peut induire la mort des neurones soit par nécrose (Choi, 1988 ; Bonfoco et al., 1995a) ou par apoptose (Bonfoco et al., 1995a; Mark et al., 1995; Kruman et al., 1997). Dans la nécrose, la dégénération et à la mort cellulaire sont induites, entre autres, par l'activation des enzymes lipolytiques (lipases et phospholipases) et protéolytiques (Calpain et autres protéases Ca-dépendant) (Robert-Lewis et Siman, 1994 ; Farooqui et Horrocks, 1998). Par ailleurs, l'activation des enzymes lipolytiques déclenche une cascade de réactions conduisant à la formation de puissantes substances pro-oxidantes comme les prostaglandines, les leucotriènes et thromboxanes (Farooqui et Horrocks, 1998). Ces substances qui sont formées à partir de l'acide arachidonique provenant de la décomposition des phospholipides des membranes neuronales induisent la génération d'espèces réactives oxygénées (Verity, 1993; Mattson, 1998). Aussi, l'activation des protéases suite à l'augmentation du $[Ca^{2+}]_i$, déclenche la décomposition du squelette protéique, ce qui conduit à d'importants dommages cellulaires (Farooqui et Horrocks, 1998).

Il est démontré que le MeHg augmente de façon anormale la $[Ca^{2+}]_i$ dans différentes préparations du cerveau (Kauppinen et al., 1989 ; Komulainen and Bondy, 1987 ; Levesque and Atchison, 1991 ; Oyama et al., 1994), dans les plaquettes et lymphocytes sanguins (Nakatsuru et al., 1985; Tan et al., 1993). Le MeHg pourrait provoquer cet effet en induisant la libération du Ca^{2+} de ses complexes intracellulaires, notamment au niveau de la mitochondrie (Komulainen and Bondy, 1987 ; Levesque and Atchison, 1988 ; Minnem et al., 1989). Cette fuite calcique pourrait refléter l'inhibition de la respiration et une augmentation de la perméabilité de la membrane interne des mitochondries (Salvaterra et al., 1973 ; Verity et al., 1975). Aussi, la libération du Ca^{2+} de ses complexes protéiques entraîne la libération spontanée des neurotransmetteurs (Komulainen 1988 ; Minnema et Cooper, 1990). En effet, ces derniers sont également stockés dans les granules des terminaisons nerveuses sous forme de complexes avec le Ca^{2+} (Cooper, 1996).

1.5.4 Induction de la peroxydation lipidique

Plusieurs travaux ont montré que Le MeHg induit le stress oxydatif (Yonaha et al. 1983; Lebel et al., 1990; Choi et Verity, 1996; Yee and Choi, 1996 ; Park, et al., 1996). Le MeHg induit la formation d'espèces réactives oxygénées dans différentes régions du cerveau après exposition *in vitro* et *in vivo* chez le rat et la souris (Yonaha et al., 1983; Lebel et al., 1990 ; Yee and Choi, 1996), dans les plaquettes (Ally et al., 1993; Hornberger and Patscheke, 1989; Macfarlane, 1980) et probablement au niveau des lymphocytes.

Yee et Choi (1996) ont suggéré que le transport des électrons le long de la chaîne mitochondriale constitue la cible précoce de la neurotoxicité du MeHg. Ces auteurs suggèrent qu'à ce niveau, les effets sont probablement causés par une production excessive d'espèces réactives oxygénées.

Les espèces réactives oxygénées sont capables de perturber les fonctions et structures des membranes à travers la peroxydation lipidique (Donaldson and Labella, 1984). Ainsi, il est démontré que ces substances sont à mesure de réduire la liaison de ligands aux récepteurs des neurotransmetteurs au niveau du cerveau (Yonaha et al. 1983; Andorn et al., 1988), probablement par la peroxydation lipidique des membranes cellulaires (Donaldson and Labella, 1984). Aussi, Komulainen et al., (1985) ont démontré que le MeHg est capable de diminuer l'affinité et le nombre des récepteurs dopaminergiques D₂ dans le cerveau de rat.

La modulation du stress oxydatif dans différentes régions du cerveau par l'administration d'antioxydants comme le glutathion (Loua et al., 1998; Safran et al., 1996), le sélénium et les antagonistes des récepteurs de la N-méthyl-D-aspartate (NMDA) (Park et al., 1996) est capable de réduire les effets neurotoxiques du MeHg. Ces données suggèrent l'implication de la peroxydation lipidique dans la neurotoxicité du MeHg.

1.5.5 Inhibition de la synthèse protéique

MeHg inhibe la synthèse protéique dans plusieurs préparations du tissu nerveux après exposition *in vitro* et *in vivo* (Yoshino et al., 1966; Chang, 1977; Sarafian and Cheung et al., 1984; Cheung and Verity, 1985; Sarafian et Verity, 1990; Aschner et al. 1992; Chang, 1990; Atchison and Hare, 1994). Cheung et Verity (1985) ont montré que le MeHg inhibe la synthèse protéique surtout en perturbant l'aminocyclisation au niveau de l'ARNt et non dans l'initiation,

l'élongation au niveau des fonctions ribosomales. Aussi, le MeHg (10 mg/kg en dose unique) provoque la phosphorylation excessive des protéines, y compris les sous-unités de tubulines chez le rat (Yagame et al., 1994). D'après ces auteurs, les modifications fonctionnelles de ces espèces protéiques peuvent conduire à l'altération de la synthèse protéique. Aussi, il a été suggéré que les troubles ioniques intracellulaires résultant de l'augmentation de la perméabilité membranaire pourraient contribuer à l'inhibition de la synthèse protéique induite par le MeHg (Komulainen, 1988; Sarafian, 1984). Dans l'ensemble, les résultats de ces différents travaux suggèrent que la synthèse protéique est plus affectée après exposition *in vivo* qu'*in vitro*. De plus, ces données suggèrent que dans les conditions d'exposition *in vivo*, l'inhibition de la synthèse protéique précède l'apparition des signes cliniques de l'intoxication au MeHg. Aussi, ces travaux qui démontrent que le MeHg est capable d'altérer plusieurs processus biochimiques avant l'apparition des signes cliniques.

1.5.6 Effets sur les microtubules

Les microtubules et les microfilaments sont les principaux éléments du squelette de la cellule neuronale (Lapadula and Abou-Donia, 1992). Parmi ces éléments de la structure nerveuse, les microtubules sont les plus vulnérables aux agents neurotoxiques (Lapadula and Abou-Donia, 1992). Les microtubules sont formées de plusieurs résidus de cystéine, et la maintenance de certains groupements SH de la cystéine dans la forme réduite est essentielle pour la polymérisation des tubulines en microtubules (Clarkson, 1987; Lapadula and Abou-Donia, 1992). Aussi, la polymérisation des dimers de tubulin en microtubules est optimale en présence de la guanosine triphosphate (GTP), de l'adénosine triphosphate (ATP), de l'ion Mg^{++} et en l'absence du Ca^{2+} (Weisenberg, 1972). Par contre, la dépolymérisation des microtubules a lieu en présence d'un excès de Ca^{2+} . Elles forment approximativement 10% des protéines du cerveau, la sous unité, un dimère α - β forme des polymères linéaires (Gelfand et Bershadsky, 1991). Les microtubules sont impliqués dans le transport des métabolites du corps cellulaire aux autres parties de la cellule et vis versa.

Le MeHg est capable d'empêcher la polymérisation et ou d'induire la dépolymérisation des microtubules dans les neurones (Clarkson, 1987; Imura et al., 1980; Miura and Imura, 1987) et dans les plaquettes et lymphocytes (Brown et al., 1988; Thrombetta and Kromidas 1992; Durham et al., 1996). Tout comme le cadmium et le plomb, le MeHg est capable de

dépolymériser les microtubules en se fixant à la calmoduline, une protéine fixatrice du calcium (Lapadula and Abou-Donia, 1992). La calmodulin maintient la $[Ca^{2+}]_i$ nécessaire à la polymérisation des dimères de tubulines (Lapadula and Abou-Donia, 1992).

En altérant les structure des microtubules, le MeHg est capable d'interférer avec plusieurs fonctions cellulaires comme le transport des aliments et des métabolites, la synthèse protéique, la division et la migration dans la cellules (Choi et al., 1978 ; Alberts et al., 1989 ; Abe et al., 1975). Aussi, les microtubules sont impliquées dans la fixation des neurotransmetteurs à leurs récepteurs au niveau des membranes cellulaires (Lechardeur et al., 1993 ; Whatley and Harris, 1996 ; Ishida et al., 1997). Ces fonctions qui exigent des microtubules intacts et normalement fonctionnels sont inhibées après exposition au MeHg ; et les cellules granulaires du cervelet sont extrêmement sensibles à cet effet (Sager et al., 1982 ; Lapadula and Abou-Donia, 1992). Sager et al., (1982) ont montré que le MeHg est capable de d'inhiber la division cellulaire dans les neurones en agissant au niveau de la mitose.

Le MeHg interfère avec les microtubules en bloquant les groupements SH- des tubulines ou en les oxydant, ce qui peut entraîner une peroxidation lipidique (Kromidas et al., (1990). Cette dernière action est soutenue par le fait que l'administration du glutathion réduit prévient de façon significative, les effets délétères du MeHg sur les microtubules en préservant leur architecture aussi bien que leurs fonctions (Kromidas et al., 1990). Toutefois, cette protection n'étant pas complète, les auteurs ont suggéré l'implication de nombreux autres facteurs comme l'homéostasie du calcium et la synthèse protéique dans la cytotoxicité du MeHg au niveau des microtubules (Kromidas et al., 1990).

Tout comme au cerveau, le MeHg interfère avec la structure et les fonctions des microtubules au niveau des lymphocytes et des plaquettes (Brown et al., 1988; Thrombetta and Kromidas 1992 ; Durham et al., 1996) et de réduire aussi le transport des neurotransmetteurs et la liaison à leurs récepteurs. De tels effets sur les microtubules présentes dans les lymphocytes et les plaquettes pourraient probablement refléter de similaires changements au niveau du cerveau.

En plus des actions directes sur les groupes thiols des microtubules, le MeHg peut aussi altérer les fonctions de ces composés à travers différents autres mécanismes comme les troubles énergiques (Kauppinen et al., 1989), la perturbation de l'homéostasie du calcium cellulaire (Kromidas et al., 1990 ; Levesque et Atchison, 1991) et la synthèse protéique. Par ces effets, le

MeHg est capable d'induire, de façon indirecte, les troubles de fonctionnement des microtubules (Ponce et al., 1994).

Dans l'ensemble, les différents mécanismes de la neurotoxicité du MeHg démontrent que les changements neurochimiques précèdent les changements du comportement et plus tard l'apparition des signes cliniques irréversibles chez l'humain et l'animal expérimental. Cependant, malgré les multiples travaux entrepris afin d'élucider les mécanismes de la neurotoxicité du MeHg, il convient de souligner que ces efforts n'ont jusque là pas abouti à des conclusions évidentes. Les divergences entre les différents résultats rapportés jusqu'ici, pourraient s'expliquer par l'utilisation de différents protocoles, des niveaux et durées d'exposition et le grand spectre d'action du MeHg.

1.6. BIOMARQUEURS NEUROCHIMIQUES DE LA NEUROTOXICITÉ

1.6.1. Concept et définition de biomarqueurs en neurotoxicologie

Le but de la santé publique est de prévenir les maladies au sein de la population humaine. En santé professionnelle et environnementale, particulièrement en toxicologie, cela signifie identifier les substances ou toute condition dangereuse, et de contrôler l'exposition de la population à des niveaux de risques acceptables. Plutôt que d'utiliser les niveaux régulateurs tels qu'adoptés par la majorité des pays, il est de plus en plus admis de donner une définition plus précise de l'exposition et de la maladie, ceci dans un but de prévention de la maladie. Dans ces conditions, la maladie est définie non pas en terme d'excès de fréquence d'une manifestation clinique prédéfini, mais comme une augmentation de l'incidence de manifestations précliniques, avant l'apparition des signes francs d'une maladie.

Une telle approche de la santé publique est basée sur les hypothèses suivantes : 1) en général, les maladies causées par les substances toxiques débutent par des événements subcellulaires précoces qui progressent vers des manifestations cliniques apparentes pouvant conduire à la mort ; 2) cette progression se traduit par une série d'événements biologiques et la probabilité de chaque étape est augmentée par la survenue de l'étape précédente ; 3) la prévention d'une maladie toxicologique exige l'identification et la réduction de l'exposition avant l'induction de lésions irréversibles au niveau des organes cibles ; 4) la surveillance de l'exposition, dans le but de réduire le risque, est mieux pratiquée par la surveillance précoce des effets biologiques précoces chez les personnes exposées (Silbergeld et al., 1991). Les marqueurs biologiques ont été développés pour atteindre ces objectifs.

Ainsi, les biologiques marqueurs ou biomarqueurs sont définis comme étant tout changement au niveau cellulaire, biochimique, structural ou encore toute fonction mesurable dans un organisme ou échantillon à partir d'un organisme donné (NRC, 1992). Comme indique la figure suivante, ils ont été divisés en biomarqueurs d'exposition, d'effet et de susceptibilité (NRC, 1992).

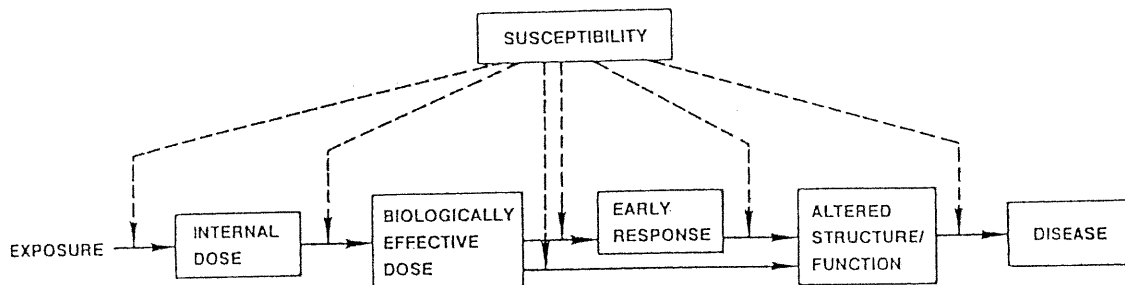


Figure 2 : Les biomarqueurs (NAS, 1987).

Un marqueur biologique d'exposition est une substance exogène, son ou ses métabolites ou encore ses produits d'interactions avec des cellules ou molécules qui sont mesurables dans un compartiment de l'organisme cible. Alors qu'un marqueur biologique d'effet est tout changement biochimique, physiologique ou toute autre altération dans un organisme qui, dépendant de l'amplitude de la perturbation, peut être reconnu comme étant un problème sanitaire potentiel ou une maladie. Enfin, un biomarqueur de susceptibilité est un indicateur d'une déficience inhérente ou acquise de la capacité d'un organisme à résister contre un agent toxique (NAS, 1989).

Par conséquent, les biomarqueurs d'effet, contrairement aux biomarqueurs d'exposition, ont l'avantage de fournir des informations qui ne peuvent être obtenues que par la mesure de la concentration des substances chimiques dans l'environnement et dans les milieux biologiques (McCarthy et Shugart, 1990). Par exemple, les biomarqueurs d'effet peuvent montrer l'évidence que l'organisme a été exposé à un contaminant, à des niveaux qui excèdent sa capacité normale de détoxification et de réparation et que le contaminant a induit des lésions au niveau des cibles moléculaires et cellulaires (McCarthy et Shugart, 1990). Ces données constituent ainsi un fondement scientifique capital dans l'établissement d'un lien évident entre l'exposition et les effets résultants au sein d'une population à risque toxicologique.

En général, les événements biochimiques forment une source inestimable de marqueurs biologiques. Puisque les altérations biochimiques précèdent les lésions structurales, la détection des changements biochimiques pourrait offrir l'opportunité d'identifier, et cela de façon précoce, l'excès de l'exposition, afin d'intervenir pour la prévention des lésions irréversibles et les signes cliniques de l'intoxication (NRC, 1992 ; McCarthy et Shugart, 1990 ; Silbergeld, 1991, 1993). Cette stratégie est basée sur l'identification des événements biochimiques précoces et irréversibles qui sont des indicateurs spécifiques et sensibles de l'exposition et de la réponse immédiate de l'organe cible. Ainsi plus le marqueur en progression est précoce, moins il est prédictif de la maladie. Cependant, un tel marqueur devient plus utile à des fins de prévention. Cette section ne discute pas des marqueurs biologiques d'exposition. Ici, notre propos concerne essentiellement les marqueurs biologiques des effets dans le contexte de la neurochimie.

Les processus conduisant aux manifestations toxicologiques déclenchées dans un système biologique par un agent exogène peuvent être résumés comme suit ; a) la pénétration du toxique dans l'organisme et sa distribution subséquente dans la cellule cibles (*phase de livraison*) ; b) interaction du toxique avec la cible biologique responsable ou non de l'effet toxique (*phase réceptrice*) ; c) l'induction des modifications biochimiques et fonctionnelles dans l'organe cible (*phase toxicodynamique*) ; d) et l'apparition des changements fonctionnels et structuraux dans l'organe cible (*phase clinique*). Au niveau du système nerveux central, un biomarqueur d'effet peut être tout changement qualitatif ou quantitatif au niveau de la neurotransmission, d'une fonction neuronale ou de tout autre processus qui pourrait induire les perturbations de ce système par un agent toxique, biologique, physique ou par une maladie (NRC, 1992). Les lésions causées

par les substances neurotoxiques pourraient provenir d'une ou de plusieurs altérations qui sont d'abord réversibles avant de devenir irréversibles au niveau des cellules (NRC, 1992). Ces lésions peuvent alors conduire à la mort cellulaire et permanente de l'organe.

Cependant, contrairement aux autres domaines de la toxicologie, le développement de biomarqueurs d'effet pour la détection précoce de la neurotoxicité des agents chimiques semble accuser un grand retard. Parmi les causes de ce retard, on peut noter en premier lieu la complexité et l'inaccessibilité du tissu nerveux. Aussi pour la majorité de ces agents incluant le MeHg, les signes et symptômes de l'intoxication sont latents (WHO, 1990). De plus, de considérables lésions surviennent au niveau du système nerveux avant l'apparition des signes et symptômes de l'intoxication au MeHg chez l'humain et l'animal expérimental (WHO, 1990).

Ainsi, ces difficultés sont à la base de la croyance selon laquelle les meilleurs marqueurs pourraient être représentés par la mesure des effets et que l'utilisation des biomarqueurs destinés à la réduction des risques neurotoxiques devrait mieux se faire par la surveillance des effets biologiques précoces chez les personnes exposées (Silbergeld, 1993 ; Tilson et al., 1995). Ainsi, les effets neurotoxiques peuvent être mesurés à différents niveaux d'organisation du système nerveux en utilisant des méthodes neurophysiologiques, comportementales, neurochimiques et anatomiques (Tilson et al., 1995 ; Manzo et al., 1996).

Si les méthodes neurophysiologiques comme la conduction nerveuse, le potentiel évoqué et l'électroencéphalographie sont largement utilisées dans le diagnostic clinique, leur validité dans l'identification des changements précoces et subtils induits par les agents neurotoxiques reste à établir (Calne et al., 1986 ; Hietala et al., 1994 ; Triebig and Lang, 1993 ; Anger 1993 ; Winneke, 1995). Par exemple, les techniques d'imagerie ont parfois été utilisées pour l'évaluation des effets neurotoxiques de certains agents comme le 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP) (Calne et al., 1986), l'éthanol (Hietala et al., 1994) et les solvants organiques (Triebig and Lang, 1993) *in vivo* chez l'humain. Malheureusement, cette approche nécessite des dépenses et des techniques qui restent encore très peu accessibles pour les études de population. De l'autre côté, les tests de comportements neurologiques pourraient permettre de prédire les modifications responsables des changements de la performance des activités intégratives du système nerveux central (Anger, 1993). Toutefois, la mesure des altérations

comportementales est très souvent sujet à des nombreux facteurs confondants incluant les facteurs socio-économiques et héréditaires (Winneke, 1995).

Contrairement aux méthodes précédentes, l'approche neurochimique à l'avantage de détecter les lésions causées par les maladies neurologiques ou par les agents neurotoxiques aux stades encore généralement progressifs (Tilson et al., 1995 ; Manzo et al., 1996). De plus, les altérations biochimiques ont l'avantage de précéder les changements anatomiques qui, eux, conduisent à des lésions irréversibles au sein du système nerveux (Tilson et al., 1995 ; Manzo et al., 1996). Au niveau biochimique, la neurotransmission représente une cible sélective aux substances neurotoxiques (Manzo et al., 1996). Ainsi, les travaux qui comparent les effets des agents neurotoxiques sur la neurotransmission d'une part et les effets cliniques de l'autre, indiquent que les paramètres de neurotransmission, pourraient fournir des indications fiables sur des effets précoces non détectables à des niveaux cliniques après exposition à des agents neurotoxiques (Silbergeld, 1993).

1.6.2. Biomarqueurs de la neurotoxicité du MeHg au niveau du cerveau

Il est démontré que le MeHg interfère avec les systèmes de neurotransmission au niveau du cerveau humain (Von Burg et Rustam, 1971, 1974 ; Juang et Yonemura 1975) et l'animal expérimental (Komulainen, 1987). L'interférence du MeHg avec la neurotransmission a été d'abord constatée chez les victimes de l'épidémie d'Irak où un syndrome myasthénique avec myotonie était observé (Von Burg et Rustam, 1971, 1974). Ces signes répondaient à la néostigmine, un inhibiteur de la cholinestérase (Von Burg et Rustam, 1974). Par la suite, Juang et Yonemura (1975) ont observé que le MeHg réduit la fréquence du potentiel d'action au niveau des ganglions cervicaux supérieurs post-synaptiques. À la lumière de ces observations, il a été suggéré que le MeHg pourrait manifester ses effets neurotoxiques en agissant au niveau des récepteurs pré (Juang, 1976) et post synaptiques (Von Burg et Landry, 1976). Ces observations ont ainsi ouvert une nouvelle ère dans la recherche neurotoxicologique sur le MeHg, la neurotransmission. Ainsi, parmi les multiples substances impliquées dans la transmission et la régulation de l'influx nerveux le long des neurones, les effets du MeHg sur les systèmes

monoaminergiques (dopamine et norépinephrine, sérotonine), cholinergiques et GABAnergiques ont été les plus évalués.

1.6.2.1 Systèmes monoaminergiques

1.6.2.1.1 Dopamine et norépinephrine

Le MeHg est capable d'inhiber la synthèse de la dopamine (DA) sans affecter celle de la norépinephrine (NE) à la dose ne causant aucune toxicité franche chez le rat adulte (Sharma et al., 1982). Par contre, Tsuzuki, (1982) a montré que le MeHg (4.0 mg/kg de MeHg pour 50 jours consécutifs) augmente le niveau de la DA dans le striatum, le tronc cérébral, le pon oblonga et dans l'hypothalamus. Le niveau de ses métabolites, l'acide 3,4-dihydroxyphenyl acétique acide (DOPAC) et l'acide homovanillic (HVA) est parallèlement diminué dans les mêmes régions (Tsuzuki, 1982).

Le MeHg (0.5 à 100 μ M) inhibe *in vitro* la captation de la DA et de la NE dans l'homogenat et dans les synaptosomes du cerveau total (Komulainen et Tuomisto, 1982, 1985). Il induit aussi la libération spontanée ou la fuite de ces monoamines de leurs granules de stockage, mais ces effets ne sont observés qu'à des niveaux d'exposition de plus de 100 μ M (Komulainen, 1988).

Bien que les données *in vitro* montrent qu'à la concentration de 10 μ M, le MeHg cause une inhibition significative de la liaison d'antagonistes aux récepteurs dopaminergiques (Bondy et Agrawal, 1980). Komulainen et Tuomisto (1985) n'ont observé aucun changement sur la liaison aux récepteurs dopaminergiques D₂ dans les tranches de striatum prélevées chez le rat ayant reçu une dose unique (10 mg/kg) ou répétée (10 mg/kg pendant 6 jour). Les données ci-dessus suggèrent que parmi les systèmes de la DA et NE, la captation de la DA et la liaison aux récepteurs D₂ pourraient constituer des cibles potentielles de la neurotoxicité du MeHg.

1.6.2.1.2 Sérotonine

L'exposition chronique au chlorure de MeHg (4.5 mg/kg pendant 45 et 50 jours consécutifs) cause une réduction significative du niveau de la sérotonine (5-HT) dans le striatum, l'hypothalamus, et dans le tronc cérébral (Tsuzuki, 1982 ; Hrdina et al., 1976). Par contre, après exposition aiguë, le MeHg (10 mg/kg) entraîne une augmentation de la concentration de la 5-HT

dans le diencéphale et dans le cerveau moyen chez le rat adulte (Sudo et Arito, 1982). De plus, Komulainen et Tuomisto (1985) n'ont observé aucune réduction de la captation de la 5-HT dans les tranches de striatum chez le rat traité au MeHg (5 mg/kg pendant 45 jours consécutifs). Par ailleurs, l'exposition *in vitro* au chlorure de MeHg (0.5 et 100 M μ M) inhibe significativement la captation de la 5-HT au niveau des synaptosomes de l'hypothalamus (Komulainen and Tuomisto, 1981, 1987).

1.6.2.1.3 Activité de la MAO

La réduction des métabolites de la DA et de la 5-HT dans le cerveau évoque une action inhibitrice du MeHg sur l'activité de la monoamine oxydase (MAO), l'enzyme impliquée dans la dégradation métabolique des monoamines. Ces observations ont été confirmées par les résultats des travaux ultérieurs (Tsuzuki, 1981; Chakrabarti et al., 1998). Par exemple, Tsuzuki (1981) a démontré que le MeHg (5.0 mg/kg pour 10 jours) inhibe l'activité de la MAO et la catécholamine-O-méthyltransférase (COMT) dans le cervelet chez le rat adulte. Par contre, Omata et al., (1983) ont rapporté une augmentation de l'activité de la tyrosine hydroxylase, l'étape limitante de la synthèse de la DA, chez le rat adulte traité au chlorure de MeHg (10 mg/kg, en injection s/c pendant 7 jours consécutifs). De plus, Chakrabarti et al., (1998) ont démontré que le MeHg (5 et 7.5 mg/kg pendant 10 jours consécutifs) inhibe l'activité de la MAO dans différentes régions du cerveau chez le rat adulte.

1.6.2.2 Système cholinergique

Le MeHg interfère *in vitro* et *in vivo* avec plusieurs étapes de la neurotransmission cholinergique dans le cerveau chez le rat (Tsuzuki, 1981; Omata et al., 1982; Hrdina et al., 1976; Omata et al., 1982; Tunnicliff and Wood, 1973; Kobayashi et al., 1979). Par exemple, l'activité de la choline acétyltransférase (ChAT), l'enzyme responsable de la synthèse de l'acétylcholine (ACh) est faiblement inhibée par le MeHg, *in vivo* (Tsuzuki, 1981; Omata et al., 1982; Hrdina et al., 1976) et *in vitro* (Omata et al., 1982; Tunnicliff and Wood, 1973; Kobayashi et al., 1979). Hrdina et al., (1976) ont rapporté que le MeHg réduit considérablement le niveau de l'ACh dans le cerveau chez le rat. Kobayashi et al., (1980) ont obtenu des résultats identiques au niveau du cortex cérébral et du striatum chez la souris exposée au chlorure de MeHg (4.0

mg/kg pendant 5 jours consécutifs) et dans les tranches de cerveau après exposition *in vitro* (Kobayashi et al., 1979). Par contre, l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE), l'enzyme impliquée dans la dégradation de l'ACh, n'est pas sensible au MeHg après exposition *in vivo* (Omata et al., 1982; Hrdina et al., 1976) et *in vitro* (Omata et al., 1982 ; Hrdina et al., 1976 ; Kobayashi et al., 1979).

Le MeHg inhibe *in vitro* la captation de la choline (Bondy et al., 1979; Kobayashi et al., 1979; Araki et al., 1981). Cependant, Araki et al., (1981) n'ont observé aucun changement dans les synaptosomes du cortex du cerveau de rat ayant reçu une administration subaiguë au MeHgCl. De plus, à plus de 10 μ M, le MeHg inhibe la liaison aux récepteurs nicotiques (Eldefrawi et al., 1977) et muscariniques (Eldefrawi et al., 1977; Aronstam and Eldefrawi, 1979; Bondy and Agrawal, 1980; Vong Burg et al., 1980 ; Northington and Shamoo, 1980 ; Abd Elfattah and Shamoo, 1981; Zanolli et al., 1994; Cagianò et al., 1994; Zhang and Wu, 1994; Castoldi et al., 1996) dans les synaptosomes et l'homogénat total du cerveau de rat.

1.6.2.3 Système GABAergique

Les effets du MeHg sur la voie GABAergique ont été évalués *in vivo* et *in vitro* dans différentes préparations du cerveau chez le rat (Bondy et al., 1979 ; Bondy et Agrawal, 1980 ; Kung et al., 1989). Par exemple, Kung et al., (1989) ont trouvé que le chlorure de MeHg (7.05 mg/kg pendant 7 jours consécutifs) inhibe l'activité de la glutamine synthétase dans le cervelet chez le rat adulte. Toutefois, ces effets étaient observés chez les animaux ayant développés une paralysie partielle au niveau des pattes postérieures et des perturbations morphologiques au niveau du cerveau. Par contre à faible dose, le MeHg (3.5 mg/kg pendant 7 jours consécutifs) augmente de 45% l'activité de la glutamine synthétase (GS) dans le cervelet de rat, en l'absence de tout signe clinique et de toute altération histopathologique à la microscopie optique (Kung et al., 1989). De plus, ni la concentration de la GABA, ni la liaison au récepteurs GABAergiques n'ont montré aucun changement significatif au niveau du cerveau chez le rat adulte après administration d'une dose unique du chlorure de MeHg (Bondy et Agrawal, 1980). Par contre, le MeHg inhibe la captation de l'acide gamma aminobutyrique (GABA) *in vitro* dans les tissus cérébraux tout en induisant sa libération spontanée à partir des synaptosomes (Bondy et al., 1979).

Dans l'ensemble, les informations répertoriées ci-dessus révèlent qu'au niveau du cerveau, les systèmes de neurotransmission dopaminergiques, sérotonergiques et cholinergiques sont plus sensibles à l'exposition au chlorure de MeHg par rapport au système GABAergique (Komulainen, 1988). Cependant malgré la grande sensibilité de ces paramètres et la grande accumulation du mercure dans les différentes régions du cerveau, les effets du MeHg sur les voies dopaminergiques, sérotonergiques et cholinergiques ne sont pas encore évalués dans ces régions du cerveau. Aussi, l'utilisation des différents protocoles (doses ou concentrations du MeHg, espèces animales, voies et temps d'administration, périodes post traitement, différentes préparations de tissus nerveux) peuvent varier les résultats reportés et compliquer leur interprétation. De plus, bien que les travaux démontrent l'implication des systèmes de neurotransmission dans les signes et symptômes de l'intoxication au MeHg, leur mesure directe comme marqueurs d'effets chez l'humain reste irréaliste du fait de l'inaccessibilité du cerveau.

1.6.3. Biomarqueurs au niveau du sang périphérique

Pour parer à l'inaccessibilité du cerveau, les cellules sanguines comme plaquettes et lymphocytes ont été utilisées comme substituts des cellules neuronales (Manzo et al., 1996). En effet, cette stratégie repose sur le fait que de nombreux paramètres neurochimiques considérés comme cible neurochimique au niveau du cerveau soient également présents au niveau des cellules sanguines qui sont facilement accessibles (Manzo et al., 1996). Parmi les paramètres de la neurotransmission présents au niveau des cellules sanguines figurent, entre autres, les systèmes de captation de haute affinité (captation de la 5-HT par les plaquettes), les récepteurs membranaires (nicotinerigiques, muscarinerigiques, dopaminergiques, sigma et β -adrenorécepteurs sur les lymphocytes; sérotonergiques et α_2 -adrénorécepteur sur les plaquettes), les enzymes de dégradation (monoamine oxydase B au niveau des plaquettes ; cholinestérase dans les lymphocytes et érythrocytes ; Na/K ATPase, neuropathie target esterase sur les lymphocytes) et des seconds messagers (concentration en ion calcium intracellulaire, adénylate cyclase, métabolisme du phosphoinositide dans les plaquettes et lymphocytes) (Manzo et al., 1996). Ces marqueurs périphériques de la neurotransmission centrale pourraient fournir

l'opportunité d'évaluer les effets des substances neurotoxiques par des méthodes non invasives, en utilisant des tissus périphériques comme substituts des cellules neuronales. Examinons la similarité de certains paramètres cibles du MeHg qui sont présents au niveau des plaquettes et lymphocytes du sang circulant.

1.6.3.1 Au niveau des plaquettes

Les plaquettes sont utilisées comme substituts périphériques de neurones sérotonergiques depuis 1955 avec l'introduction de la reserpine, un alcaloïde indolique de *Rauwolfia serpentina*, en neuropharmacologie expérimentale et dans le traitement de certaines affections mentales comme la schizophrénie (Manzo et al., 1996). Il était alors observé que la reserpine provoquait une déplétion très marquée de la 5-HT dans le cerveau chez le lapin (Pletscher, 1956). Plus tard, avec la découverte de la 5-HT dans les plaquettes et la facilité d'accès des plaquettes par rapport aux neurones centrales, la déplétion de la 5-HT a été démontrée aussi dans les plaquettes (Shore et al., 1956 ; Paasonen and Pletscher, 1959). Par la suite, de nombreux travaux ont conduit à l'établissement de similitudes morphologiques, biochimiques et pharmacologiques entre les neurones et les plaquettes chez l'humain, le lapin et le rat (Pletscher 1968, 1988; Sneddon 1973 ; Stahl, 1985 ; Pletscher, 1988 ; Prada et al., 1988 ; Rehavi et al., 1988). Ces similarités ont permis l'utilisation des plaquettes comme modèle périphérique pour l'évaluation des neurones sérotoninergiques au niveau du cerveau. Ces similarités sont présentées dans le tableau ci-dessous.

**Tableau N° 3: Comparaison entre plaquettes et neurones
sérotoninergiques.**

| CARACTÉRISTIQUES | CELLULES | |
|---|------------|----------|
| | Plaquettes | Neurones |
| 1. Morphologie | | |
| Membrane limitante | + | + |
| Mitochondrie | + | + |
| Granule de stockage | + | + |
| Noyau | + | + |
| Granules à glycogène alpha | + | - |
| 2. Biochimie | | |
| 5-HT synthèse | - | + |
| Monoamine oxydase activité (MAO) | + | + |
| Transport actif de la 5-HT | + | + |
| Sites liaison de l'imipramine-H ³ | + | + |
| Récepteurs 5-HT | + | + |
| Stockage granulaire de la 5-HT | + | + |
| Libération granulaire de la 5-HT | + | + |
| 3. Pharmacologie | | |
| Inhibition du transport actif de la 5-HT | | |
| Ouabaïne/Inhibiteurs métaboliques | + | + |
| Antidépresseurs tricycliques | + | + |
| Inhibition du site de liaison de l'imipramine | | |
| 5-HT/ Antidépresseurs tricycliques | + | + |
| Inhibition de la MAO | | |
| Pargyline et deprenyl (type B) | + | + |
| Clorgyline (type A) | - | - |
| Inhibition de stockage de la 5-HT | | |
| Reserpine /Tétrabenazine/ N-ethylmaleimide | + | + |
| Libération de 5-HT (couplage excitation/sécrétion) | | |
| Dépolarisation nerveuses | - | + |
| Potassium/Calcium | + | + |
| Thrombine/Plaquettes activateurs | + | - |
| Récepteurs 5-HT (5-HT ₁ /5-HT ₂) | + | + |
| Adenylate cyclase | + | + |
| Agrégation, changement de forme | + | + |

Tiré de Stahl (1985)

D'après ce tableau, plaquettes et neurones sérotoninergiques possèdent à la fois des ressemblances et des différences. Sur le plan de la ressemblance, plaquettes et neurones sont limitées par une membrane et contiennent des mitochondries, des granules de stockage, des

lysosomes, des particules de glycogène, des microtubules et des microfilaments (Sneddon, 1973). Aussi, les neurones et les plaquettes accumulent la 5-HT qu'elles emmagasinent dans les granules de stockage (Sneddon, 1973). De plus, neurones et plaquettes possèdent la monoamine oxydase, une enzyme impliquée dans la dégradation des monoamines. Par contre, contrairement aux neurones, les plaquettes manquent de synapses, donc elles ne sont pas innervées et n'innervent pas (Stahl, 1985). Dans cette section, nous examinerons les ressemblances entre plaquettes et neurones du point de vue de la captation de la 5-HT et de l'activité de la monoamine oxydase.

1.6.3.1.1 Captation et libération de la 5-HT

Tout comme les neurones centraux, les plaquettes de toute espèce animale sont capables de capter, de stocker et de libérer la 5-HT (Sneddon, 1973 ; Pletscher, 1968; Stahl, 1985). Aussi, il existe une ressemblance de ces processus entre les plaquettes et neurones d'une part et entre le rat, le lapin et l'humain de l'autre (Pletscher 1968; Stahl 1985). De plus, il a été récemment démontré que le site de captation de la 5-HT au niveau des plaquettes était identique à celui trouvé dans le cerveau humain. (Lesch et al., 1993)

On estime que 10^9 les plaquettes du sang circulant sont capables de capter environ 0.5 mg de 5-HT chez le rat, 12 mg chez le lapin et 1 mg chez l'humain (Gordon et al., 1978). La 5-HT captée est stockée sous forme de complexe avec le Ca^{2+} et de l'ATP dans des granules et dans les corps denses des plaquettes par un système de transport actif sodium dépendant (Stahl, 1985). Ces granules de stockage sont similaires à celles contenues dans les synaptosomes des terminaisons présynaptiques nerveuses (Stahl 1985). À $37^{\circ}C$, les plaquettes peuvent accumuler la 5-HT contre un gradient de concentration pouvant atteindre 200:1, plaquettes : plasma (Costa et al., 1974; Costa et al., 1978).

Parallèlement à la captation, les plaquettes peuvent libérer leur contenu en 5-HT à la fois par un mécanisme exocytotique physiologique ou par des stimulus chimiques (Costa et al., 1977) et à la suite d'une déplétion par certaines substances comme la reserpine (Costa et al., 1977; Costa et al., 1979). L'exocytose est un processus physiologique Ca^{2+} -dépendant, comparable à celle survenant dans les cellules nerveuses (Costa et al., 1977, 1979).

Aussi, les processus membranaires de la captation et de la libération de la 5-HT sont affectés à la fois au niveau des plaquettes et des neurones centraux par différentes substances

chimiques incluant les antidépresseurs, les neuroleptiques, les anorexiques et nombreuses substances neurotoxiques (Drummond and Gordon, 1976; Koe, 1976 ; Gaetano 1978 ; Poirier et al., 1984 ; Goodnick et al., 1995). Ainsi, la chlorimipramine, principal métabolite de l'imipramine, un antidépresseur tricyclique, est capable d'inhiber la captation de la 5-HT avec une CI_{50} de 20 nM dans les synaptosomes de rat (Tuomisto, 1974) et de 22.4 nM dans les plaquettes humaines (Stahl and Meltzer, 1978). Une étude récente a démontré que la paroxétine, un inhibiteur spécifique de la captation de la 5-HT dans les neurones présynaptiques, diminue de 30% la concentration de la 5-HT dans les plaquettes chez les patients souffrant de la dépression (Goodnick et al., 1995). Ces résultats ont aussi montré que la diminution de la concentration de la 5-HT dans les plaquettes, résultant de l'inhibition de la captation de la 5-HT par la paroxétine, présente une parfaite corrélation avec l'amélioration des signes cliniques de la dépression chez les patients (Goodnick et al., 1995). Une telle relation a été établie entre la concentration de la 5-HT dans le cerveau et l'amélioration des signes chez les malades souffrant de la maladie d'Alzheimer (Palmer et al., 1987 ; Kumar et al., 1995). Par contre, la captation de la 5-HT dans les plaquettes est augmentée chez les travailleurs exposés aux solvants organiques contenus dans les peintures (Lam et al., 1985) et au styrène (Checkoway, 1992).

De la même manière, l'administration d'une dose unique de substances chimiques comme la réserpine, la d-fenfluramine ou la p-chloroamphetamine, entraîne une réduction significative de la concentration de la 5-HT, à la fois au niveau du cerveau et dans le sang total chez le rat (Martin and Artigas, 1992). Aussi, ces résultats ont montré qu'il existe une corrélation significative entre les niveaux de 5-HT dans le cerveau et sang total. Par contre, deux semaines après l'administration, ces produits ont causé une réduction marquée de la 5-HT non seulement dans le cerveau, mais aussi dans les plaquettes chez le rat (Celada et al., 1994). La concentration de la 5-HT dans le sang total était en parfaite corrélation avec celle au niveau du cortex frontal, bien que l'effet du traitement soit plus prononcé au niveau du cerveau (Celada et al., 1994). Comme dans l'étude aiguë, il n'y avait aucune variation significative de la 5-HT dans le plasma après deux semaines de traitement au d-fenfluramine chez le rat (Celada et al., 1994). Ces données supportent l'utilisation de la 5-HT dans les plaquettes comme index périphérique des changements induits de la neurotransmission sérotoninergiques au niveau du système nerveux central.

En outre, les substances susceptibles d'induire la libération de la 5-HT sont plus efficaces dans le cerveau que dans le sang total. Par contre, la fraction extracellulaire de la 5-HT circulante reste inchangée, ceci probablement du fait de sa disparition rapide suite à la captation par les plaquettes et les cellules endothéliales, par métabolisme ou excrétion. Enfin ces résultats indiquent que la concentration de la 5-HT dans les plaquettes pourrait refléter le niveau de cette amine dans les neurones sérotoninergiques du cerveau.

Aussi, le MeHg inhibe la captation de la 5-HT dans les synaptosomes de l'hypothalamus et dans les plaquettes sans provoquer de façon significative la libération spontanée de cette monoamine à partir de ces cellules (Komulainen et Tuomisto, 1982; Tuomisto et Komulainen, 1983). La CI_{50} du MeHg pour la captation de la 5-HT est estimée à 4.5 μ M au niveau des plaquettes humaines et à 3.4 μ M dans les synaptosomes du cerveau chez le rat (Komulainen et Tuomisto, 1982 ; Tuomisto and Komulainen 1983). Aussi, le MeHg inhibe de 30% la liaison de l'imipramine sur son récepteur avec une CI_{50} d'environ 2 mM (Briley et al., 1979).

1.6.3.1.2 Récepteurs de la sérotonine

Les récepteurs sérotoninergiques, 5-HT₁ et 5-HT₂ ont été identifiés au niveau des plaquettes chez l'animal et l'humain (Born et al., 1972 ; Elliot and Kent, 1989 ; McBride et al., 1983 ; Murphy 1990 ; 1987 ; Ostrowitzki 1993 ; Steckler et al., 1993). Le récepteur 5-HT₁ serait associé au transport actif de la 5-HT à travers la membrane, tandis que le récepteur 5-HT₂ mimerait à la fois l'agrégation et les changements de forme des plaquettes (Born et al., 1972 ; Murphy 1990). De plus, on pense que le récepteur 5-HT₂ présent au niveau des plaquettes serait biologiquement similaire à celui identifié dans le cortex frontal des espèces animales (Elliot and Kent, 1989 ; McBride et al., 1983 ; Murphy 1990 ; 1987 ; Ostrowitzki 1993 ; Steckler et al., 1993). Malgré ces données, la nature exacte du récepteur sérotonergique présent au niveau des plaquettes est encore sujette à controverse (Murphy 1990).

6.3.1.1.3 Activité de la monoamine oxydase (MAO)

La monoamine oxydase (MAO) est une enzyme microsomale impliquée dans la désamination oxydative des monoamines biogènes. Parmi les deux types de la MAO ; A et B existant au niveau du cerveau, seule la MAO-B a été identifiée au niveau des plaquettes (Prada et

al., 1988). La MAO-B ne métabolise presque pas la 5-HT au niveau du cerveau et dans les plaquettes (Westlund et al., 1985; Garrick and Murphy 1982 ; Donneley et Murphy 1977). Par contre, la 5-HT est bon substrat pour la MAO-A au niveau des neurones (Westlund et al., 1985; Garrick et Murphy, 1982). Aussi, il existe une analogie structurale et fonctionnelle entre la MAO-B au niveau du cerveau et des plaquettes (Prada et al., 1988). De plus, l'activité de la MAO-B est très élevée dans les plaquettes chez l'humain, le singe Rhesus et le lapin, mais très faible chez le rat (Prada et al., 1988). De plus, une étude récente a démontré que chez l'humain, la séquence de la MAO-B dans le cortex cérébral est identique à celle dans les plaquettes et que l'activité de l'enzyme dans les plaquettes pourrait refléter celle présente dans le système nerveux (Chen et al., 1993). L'activité de la MAO B a été proposée comme marqueur de la sécrétion catécholaminergique (Checkoway et al., 1992 ; Mutti, 1993). Aussi, l'activité de la MAO est utilisée comme marqueur de la neurotransmission au niveau du SNC dans les maladies affectives (Wirz, 1988).

Pour toutes ces raisons et du fait de leur facile accès, l'activité de la MAO-B dans les plaquettes a été longtemps utilisée pour évaluer la sécrétion monoaminergique au niveau du SNC en neuropharmacologie expérimentale et clinique, dans certaines maladies mentales et affectives et après exposition à des agents neurotoxiques (Stephen and Stahl, 1985; Husain et al., 1980 ; Cesura et al., 1987; Da Prada and Kettler 1986; Wirz-Justice 1988; Costa and Manzo, 1995; Bergamaschi et al., 1996). Aussi, chez l'humain, le manganèse et le styrène causent une inhibition de l'activité de la MAO-B dans les plaquettes, cet effet montre une corrélation significative avec l'apparition des signes cliniques de l'intoxication (Husain et al., 1980). De plus, il est démontré que le 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP) est oxydé dans les neurones et plaquettes par la MAO-B pour former un puissant neurotoxique, le N-méthyl-4-phenylpyridinium (MPP^+) (Cesura et al., 1987; Da Prada and Kettler 1986). Le MPP^+ ainsi formé serait impliqué dans la destruction sélective des neurones dopaminergiques au niveau de la substance noire dans le striatum, causant ainsi le syndrome de Parkinson chez l'humain et le singe (Cesura et al., 1987; Da Prada et Kettler, 1986).

1.6.3.2 Au niveau des lymphocytes

1.6.3.2.1 Système cholinergique

Les récepteurs mChRs et nChRs, l'activité de la cholinestérase et la captation de la choline ont été identifiés au niveau des lymphocytes (Costa et Manzo, 1995). Les récepteurs mChRs ont été identifiés à la fois au niveau des lymphocytes humains (Bronzetti et al., 1996 ; Masuyama et al., 1996) et chez le rat (Rabey et al., 1986 ; Maslinski et al., 1988 ; Costa et al., 1988). Par contre, les récepteurs nChRs n'existent que sur les lymphocytes humains et non chez le rat (Bronzetti et al., 1996 ; Masuyama et al., 1996 ; Mihovilovic et al., 1997). Aussi, les mChRs présents à la surface des lymphocytes sont capables de refléter les modifications induites au niveau du cerveau par des maladies, les agents neurotoxiques et certains médicaments (Stahl, 1985 ; Costa et al., 1990 ; Fitzgerald and Costa, 1993 ; Masuyama et al., 1996). Par exemple dans la maladie d'Alzheimer, le site de la liaison aux mChRs est similairement réduit dans le cerveau (Mash et al., 1985) et au niveau des lymphocytes (Adem et al., 1986 ; Rabey et al., 1986 ; Rabey et al., 1991). De même, l'exposition de rats adultes à certaines substances neurotoxiques comme les pesticides entraîne une diminution de la liaison aux mChRs à la fois au niveau des lymphocytes et dans différentes régions du cerveau (Costa et al., 1990 ; Fitzgerald et Costa, 1993). Il n'y a pas de données pour les lymphocytes.

Par ailleurs, seulement plus de 100 μ M du chlorure de MeHg sont requises pour présenter une faible inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE), *in vitro* (Omata et al., 1982 ; Tunnicliff and Wood, 1973 ; Kobayashi et al., 1979) et *in vivo* (Bondy et al., 1979 ; Hrdina et al., 1976 ; Sobotka et al., 1974). De plus, contrairement aux neurones qui captent la choline par la haute affinité pour servir à la synthèse de l'ACh (Simon et al., 1976), les lymphocytes captent la choline par la diffusion passive qui sert à la synthèse de la phosphatidylcholine membranaire (Blusztajn and Wurtman, 1983). Donc ces deux derniers paramètres ne sauraient servir comme biomarqueurs d'effets précoces de la neurotoxicité du MeHg.

1.6.3.2.2 Systèmes monoaminergiques

Parmi les voies monoaminergiques, le système dopaminergique est le plus connu au niveau des lymphocytes de rat (Le Fur et al., 1980a ; Bondy et al., 1984 ; Rabey et al., 1986 ;

Maslinski et al., 1988; Stahl, 1989; Ricci et al., 1994 ; Caronti et al., 1998) et l'humain (Nobuyuki et al., 1992; Ricci et al., 1994; Bronzetti et al., 1996 ; Barbanti et al., 1996; Ricci et al., 1997). Ainsi, il est rapporté que les lymphocytes peuvent capter la dopamine et possèdent des récepteurs adrénergiques et dopaminergiques (Stahl, 1989). Les récepteurs dopaminergiques D₂ et ceux de la famille D₁ ont été identifiés au niveau des lymphocytes du sang périphérique chez le rat (Le Fur et al., 1980a; Bondy et al., 1984; Caronti et al., 1998) et l'humain (Barbanti et al., 1996; Ricci et al., 1994, 1997). Ricci et al., (1994) ont trouvé que les récepteurs dopaminergiques D₂ exprimés au niveau des lymphocytes sont identiques à ceux identifiés au niveau du striatum chez le rat. Aussi, il est rapporté que la modulation de ces récepteurs au niveau du sang pourrait refléter les mêmes changements intervenus au niveau du cerveau dans certaines maladies, les facteurs génétiques et environnementaux comme les médicaments et autres substances chimiques (Le Fur et al., 1980 a, b; Bondy and Ackenheil, 1987; Grodzicki et al., 1990; Przedborski et al., 1991; Barbanti et al., 1996; Fartacek et al., 1997 ; Ricci et al., 1997 ; Tanji et al., 1999). Par exemple, chez les malades souffrant de la de la maladie de Parkinson (Le Fur et al., 1980) et de la schizophrénie (Bondy and Ackenheil, 1987; Grodzicki et al., 1990), on observe une diminution et une augmentation respective de la liaison au récepteurs dopaminergiques D₂ au niveau des lymphocytes. De plus, la liaison aux récepteurs D₂ et non aux D₁ est réduite dans les striatum chez le singe (Przedborski et al., 1991) et le rat adulte (Tanji et al., 1999) traité au 1-méthyl, 4-phenyl-1,2,3,6 tétrahydropyridine (MTPP). Par conséquent, l'évaluation de la captation de la DA et de la liaison aux récepteurs D₂ au niveau des lymphocytes pourrait servir à évaluer les changements intervenus au niveau du cerveau suite à l'exposition au MeHg.

À la lumière des informations recueillies ci-dessus, on peut suggérer qu'au niveau des plaquettes sanguines, la captation de la 5-HT et l'activité de la MAO pourraient servir comme biomarqueurs périphériques pour évaluer les effets du MeHg sur les voies sérotonergiques au niveau du SNC. De même, la liaison aux récepteurs D₂ et mChRs au niveau des lymphocytes sanguins pourrait servir à évaluer respectivement les altérations induites par le MeHg sur la neurotransmission dopaminergique et cholinergique au niveau du cerveau.

1.7. PROBLEMATIQUE, HYPOTHESE, OBJECTIFS ET APPROCHE EXPERIMENTALE

1.7.1. Problématique

Des données récentes montrent que la contamination environnementale par le mercure prend de plus en plus d'ampleur (Lebel et al., 1996, 1998; Dolbec et al., 2000 ; Grandjean and Weihe, 1998 ; Cranmer et al., 1996). Chez les populations à risque, la concentration du MeHg dans le sang et les cheveux est utilisée comme indicateur du niveau de mercure dans l'organe cible, le cerveau (WHO, 1990 ; ATSDR, 1997). Cette approche est basée sur l'hypothèse que le niveau du toxique dans le substitut reflète son niveau dans l'organe cible (WHO, 1990 ; Hulka and Wilcosky, 1993). Ainsi, la mesure du mercure dans le sang et dans les cheveux est utilisée dans la surveillance des populations exposées au MeHg (WHO, 1990 ; ATSDR, 1997). Le mercure dans le sang est seulement utile pour évaluer une exposition récente. Par contre, le niveau du mercure dans les cheveux est utilisé pour retracer les expositions historiques. En fait, le niveau du mercure dans les cheveux n'est que le reflet du MeHg accumulé dans le sang au moment de la formation des cheveux (WHO, 1990). De plus, il y existe une relation inverse entre l'accumulation du mercure dans le sang et dans le cerveau (Takeuchi et al., 1989). En effet, après une longue exposition ou après la fin d'une l'exposition au MeHg, la concentration du mercure dans le sang est égale à la valeur contrôle lorsque le niveau dans le cerveau est anormalement élevé (Takeuchi, 1986 ; Takeuchi et al., 1989).

Un autre problème lié au choix de biomarqueur en épidémiologie est que la persistante du marqueur dans l'organe substitut devrait être égale à celle dans l'organe cible (Hulka and Wilcosky, 1993). Malheureusement, cette condition n'est pas remplie dans le cas du MeHg. En effet, la demi-vie d'élimination du mercure est estimée à 70 jours en moyenne dans le sang (WHO, 1990), alors qu'elle est de plus de 245 jours dans le cerveau chez l'humain (Takeuchi, 1989). Aussi, il existe des différences de sensibilité entre les individus et les populations exposées à la même charge corporelle en MeHg. Malgré cette différence, le MeHg sanguin

continue d'être utilisé comme reflet du mercure au niveau du cerveau chez les populations exposées au MeHg.

Aussi, l'évaluation du risque de l'intoxication au MeHg se fait présentement par l'établissement d'une corrélation entre le niveau sanguin en mercure et l'apparition des signes traditionnels de la maladie de Minamata, à savoir la dysarthrie et l'ataxie (WHO, 1990) bien que ce dernier correspond à la phase irréversible de l'intoxication (WHO, 1990). Or, des données épidémiologiques récentes montrent que le MeHg induit des effets subtils au niveau du système nerveux central à des niveaux d'exposition environnementale antérieurement jugés sécuritaires (Lebel et al., 1996, 1998 ; Dolbec et al., 2000 ; Grandjean and Weihe, 1998 ; Cranmer et al., 1996). Ces observations qui sont supportées par des données expérimentales (Mottet et al., 1997) révèlent la nécessité de réduire les niveaux d'exposition au MeHg jugés sécuritaires au sein de la population humaine.

Face à ces difficultés, les biomarqueurs d'effet pourraient constituer une approche complémentaire importante aux bioindicateurs d'exposition pour la surveillance précoce de la neurotoxicité du MeHg. Ainsi, bien que le mécanisme d'action pathologique du MeHg ne soit pas encore clairement établi, les paramètres de la neurotransmission centrale pourraient servir à cet effet. Mais, la difficulté d'accès du cerveau pour des raisons éthiques en vue de prélever des échantillons pour analyse, pourrait compliquer cette approche. Pour ce faire, les plaquettes et les lymphocytes sanguines qui possèdent certains paramètres de la neurotransmission centrale pourraient alors servir comme substituts des neurones centraux dans l'évaluation de la neurotoxicité du MeHg.

1.7.2 Hypothèse

Les plaquettes et les lymphocytes sanguins possèdent en commun avec les neurones du cerveau certaines fonctions comme la captation, la liaison aux récepteurs des neurotransmetteurs, l'activité de la monoamine oxydase B et l'intégrité des microtubules dans les plaquettes et lymphocytes. Ces paramètres pourraient ainsi servir à développer des biomarqueurs de la neurotoxicité du MeHg.

1.7.3 Objectifs

1.7.3.1 Objectif général

Développer, *in vitro* et après administration répétée du chlorure de MeHg, les biomarqueurs subcliniques de la neurotoxicité du MeHg en utilisant les lymphocytes et les plaquettes sanguins comme substituts des neurones du cerveau chez le rat mâle Sprague Dawley.

1.7.3.2 Objectifs spécifiques

a) Tester la sensibilité comparée de la captation de la choline et la liaison aux récepteurs muscariniques au niveau des synaptosomes de différentes régions du cerveau et dans les lymphocytes du sang périphériques suite à l'exposition *in vitro* au chlorure de MeHg chez le rat SD adulte.

b) Tester la sensibilité comparée de la captation de la DA de la 5-HT et la liaison aux récepteurs dopaminergiques au niveau des synaptosomes de différentes régions du cerveau et sur les lymphocytes et plaquettes du sang périphérique chez le rat SD adulte.

c) Valider la sensibilité des paramètres du système cholinergique comme les concentrations de l'ACh, l'activité de la choline acétyltransférase (ChAT) et la liaison aux récepteurs muscariniques (mChRs), après exposition répétée au chlorure de MeHg du rat SD adulte. Les résultats sont comparés à ceux obtenus au niveau des lymphocytes du sang périphérique.

d) Valider la sensibilité des paramètres du système monoaminergic comme les concentrations de la DA, NE, 5-HT et de leurs principaux métabolites correspondants, de l'activité de la monoamine oxidase (MAO) et la liaison d'antagonistes aux récepteurs dopaminergiques D₂ après administration répétée au chlorure de MeHg chez le rat SD adulte ; ces résultats sont comparés à ceux obtenus au niveau des plaquettes et des lymphocytes du sang périphérique.

e) Valider la sensibilité des microtubules des plaquettes et lymphocytes isolés du sang circulant chez le rat SD adulte après administration répétée au chlorure de MeHg.

1.7.4 Approche expérimentale

Malgré les différences sur la cinétique du MeHg, il existe une similarité entre l'humain et le rat sur la neurotoxicité du MeHg (Mottet et al., 1997). En effet, les altérations histopathologiques causées par le MeHg au niveau de la couche granulaire du cervelet chez l'humain (Hunter et Russel, 1954 ; Takeuchi et Eto, 1977) sont reproductibles chez le rat (Cavanagh and Chen 1971 ; Magos et al., 1978). Aussi, bien que le MeHg soit capable de causer, de façon plus précoce, des troubles histopathologiques dans la racine dorsale par rapport au cervelet, seules les lésions provoquées au niveau du cervelet évoluent en fonction du temps (Hartman et al., 1973 ; Jacob et al. , 1975). De plus, l'humain et le rat développent l'ataxie et une perte de la sensation sensorielle tout en conservant un comportement normal au niveau des nerfs moteurs (Takeuchi, 1968 ; Somenjen et al., 1973 ; Von Burg and Rustam, 1974). Enfin parmi les espèces animales, les effets du MeHg sur les paramètres de la neurotransmission sont essentiellement limités aux données obtenues chez le rat (Komulainen, 1989). Ainsi, sur la base des considérations évoquées ci-dessus, le rat a été choisi comme modèle expérimental dans cette étude.

CHAPITRE 2:

Effects of methylmercury on High Affinity Choline Uptake and Muscarinic Cholinergic Receptors binding in Rat Brain Synaptosomes and Blood Lymphocytes, *In Vitro*.

Kovana M. LOUA¹, Heather D. DURHAM², and aroj K. CHAKRABARTI^{1*}

¹Département de médecine du travail et d'hygiène du milieu, Faculté de médecine, Université de Montréal, 2573 Côte Ste-Catherine, H3T 1A8, Montreal; and ²Montreal Neurological Institute, Quebec, Canada.

All correspondence including request for reprints should be addressed to;

Dr Saroj Chakrabarti

Département de médecine du travail et d'hygiène du milieu, Faculté de médecine, Université de Montréal; P.O. Box 6128, Main Station; Montreal, Quebec, H3C 3J, Canada

Tel:514-343-5847; Fax: 514- 343-2200

(To be submitted to *Journal of Toxicology and Environmental Health*)

ABSTRACT

The present study was carried out to evaluate *in vitro* effects of methylmercury chloride on high affinity choline uptake and muscarinic cholinergic receptors (mChRs) binding in rat brain synaptosomes and peripheral blood lymphocytes, and hence to find out whether mChRs in lymphocytes could be used as potential candidate surrogate biomarker for the central cholinergic dysfunction due to methylmercury. In this study, high affinity choline uptake and the antagonist quinuclidinyl benzylate ($[^3\text{H}]\text{-QNB}$) binding were measured *in vitro* in the synaptosomes from different brain regions incubated with different concentrations of MeHgCl (0, 0.5, 2.5 and 5 μM). Similarly, the $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ binding was also evaluated in the peripheral blood lymphocytes. Results have shown that *in vitro* exposure to MeHgCl significantly inhibited both the high affinity choline uptake and the $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ binding in brain synaptosomes and blood lymphocytes, and these effects were dependent on both the dose of MeHg and the brain regions examined. MeHg at 2.5 μM , inhibited significantly the high affinity choline uptake from 27% to 56.24% depending on the brain region when compared to the control synaptosomes ($p < 0.02$). In addition, at 5 μM , MeHg was found to induce a statistically significant inhibition of the high affinity choline uptake as follows: brainstem < cerebellum < striatum < hippocampus < hypothalamus < cerebral as compared to the controls ($p < 0.001$). On the other hand, MeHg at 2.5 μM significantly inhibited the $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ binding in brain synaptosomes as follows: brainstem < hypothalamus < striatum < hippocampus < cerebellum < cerebral when compared to the 0.5 μM MeHg treated and controls ($p < 0.01$). MeHgCl at 5 μM also caused a statistically significant inhibition of $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ binding in this order: brainstem < cerebral cortex = striatum = hypothalamus < hippocampus < cerebellum as compared to 2.5 and 0.5 μM ($p < 0.01$). In the peripheral blood lymphocytes, MeHg at 2.5 and 5 μM inhibited the $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ binding by 37.43% and 56.71% respectively when compared to the controls ($p < 0.02$). The IC_{50} of MeHgCl ranged from 2.7 to 4.33 μM for the high affinity choline uptake and 5 to 7.64 μM for the $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ binding in the rat brain synaptosomes. In blood lymphocytes, the IC_{50} was about 8.33 μM of MeHgCl for $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ binding. Thus MeHgCl inhibited the mChRs binding in synaptosomes from different brain regions, which are similar in the peripheral blood lymphocytes, suggesting that $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ binding to mChRs in lymphocytes due to MeHg could be used as potential surrogate biomarker of MeHg neurotoxicity. It remains to examine whether these results reflect similar changes following *in vivo* exposure.

Key Words: MeHg, Choline Uptake, Muscarinic Receptors, Brain Synaptosomes, Blood Lymphocytes, Neurotoxicity, Biomarkers.

INTRODUCTION

Methylmercury, an environmental neurotoxic ingested through contaminated foods, particularly predatory fish, causes irreversible damage to the central nervous system (Takeuchi, 1970). Signs and symptoms of MeHg intoxication include dysarthria, fine tremor, mental unbalance such as inability to concentrate, forgetfulness, difficulties in learning and loss of memory (Ratcliffe et al., 1996; Counter et al., 1998; Grandjean et al., 1997, 1998; Lebel et al., 1998); these symptoms may progress to ataxia (hindlimb crossing), paralysis and death at high exposure levels (Hunter et al., 1940; Takeuchi et al., 1989; Bakir et al., 1973). In spite of the controversy evidence that no clear relationship has not been easily established between the neurological signs and symptoms of MeHg intoxication on the one hand, and the mercury contents in blood and hair on the other (Grandjean et al., 1997; Beuter and et al., 1998), health risk assessment due to MeHg intoxication still continues to be based only on measurements of blood and hair mercury levels (IPCS, 1990). The major drawback of such approach is that the half-life of mercury in the central nervous system is more than 240 days (Takeuchi et al., 1989), compared to only 74 days in blood (IPCS, 1990). Besides, not all individuals or populations respond to the same extent to MeHg exposure. Moreover, considerable damage can occur to the nervous system before the onset of any clinical signs and symptoms of MeHg intoxication. Thus biomarkers of effect should help not only to understand mechanism of neurotoxicity, but also to improve risk assessment.

The events leading to neurotoxic injury is thought to proceed from one or more primary biochemical alterations through reversible cellular injury, to eventual irreversible cell death and permanent organ lesion. Early markers for neurotoxic effects should therefore provide reliable indications of early-stage changes related to biochemical alterations that might precede irreversible cell damage. However the current approach to monitor population at risk for MeHg exposure consist of measuring mercury in the body, notably in the blood and hair, and hence to predict the possibility of occurrence of adverse effects in the central nervous system. The major pitfall of such approach is that the life-span of MeHg and its metabolite, the inorganic mercury, in the central nervous system is about 245 days (Takeuchi et al., 1989), compared to only 65 days in blood (IPCS, 1990). In addition, the effects of MeHg intoxication are not measured and not all individuals or populations respond to a given amount of chemical in the same way. By such

approach, it may be difficult to identify individuals which are particularly sensitive to MeHg exposure. Moreover, considerable damage can occur to the central nervous system before onset of any clinical symptoms of neurological lesions due to MeHg. Therefore, it is important to develop early biomarkers of MeHg neurotoxicity that can detect early biological effects, while they are still reversible. Intoxication to MeHg, which affects the central nervous system as its target organ, arises mainly from contaminated marine foods (IPCS, 1990; Ratcliffe et al., 1996). In humans and experimental animals, the behavioral changes associated with low exposure include dysarthria, fine tremor, mental unbalance such as inability to concentrate, forgetfulness, impairment of learning and memory loss (Takeuchi et al., 1968; Marsh, 1994; Rice, 1996; Ratcliffe et al., 1996; Counter et al., 1998; Magos, 1998; Lebel et al., 1998, 1999; Grandjean et al., 1999; Dolbec et al., 2000). These changes may progress to clinical symptoms, which are dysarthria, fine tremor, ataxia (hindlimb crossing) and ultimately to death at high exposure levels (Hunter et al., 1940; Kurland et al., 1960; Tokuomi et al., 1961; Takeuchi et al., 1968; Bakir et al., 1973; Chang, 1977; Marsh, 1994; Rice, 1996; Ratcliffe et al., 1996; Counter et al., 1998; Magos, 1998).

Although the exact mechanism of these effects remains unknown yet, the cholinergic system has been involved in the MeHg neurotoxicity. The first report on interaction of MeHg with the synaptic transmission was published by Von Burg and Rustam (1974) from the Iraq episode patients. This report which was followed by others (Juang and Yonemura, 1975; Von Burg and Landry, 1976; Shamoo et al., 1976; Eldefrawi et al., 1976) proposed a hypothesis that MeHg may interfere with neuronal transmission systems. These findings formed the basis for investigating the interactions of MeHg with the cholinergic system. Studies then demonstrated that MeHg ($> 100 \mu\text{M}$) inhibits the activity of choline acetyltransferase (ChAT) in brain tissue preparations *in vitro* (Kobayashi et al., 1976, 1979; Tunnicliff and Wood, 1973; Dwevedi, et al., 1980; Omata et al., 1982) and also triggers the spontaneous release of acetylcholine (ACh) from the preloaded nerve ending pinched (Traxinger and Atchison, 1987; Levesque, 1992). In contrast, MeHg up to $100 \mu\text{M}$ has little inhibitory effect on the activity of acetylcholinesterase (AChE), the enzyme involved in the hydrolysis of ACh (Omata et al., 1982; Tunnicliff and Wood, 1973; Kobayashi et al., 1979) or *in vivo* (Bondy et al., 1979; Hrdina et al., 1976; Sobotka et al., 1974). On the other hand, MeHg at $10 \mu\text{M}$ inhibits the high affinity choline uptake in homogenate or synaptosomes from whole brain in mice (Kobayashi et al., 1979) and rat (Levesque et al., 1992).

In addition, MeHg (> 10 M) inhibits the nicotinic (Eldefrawi et al., 1977) and muscarinic (Eldefrawi et al., 1977; Aronstam and Eldefrawi, 1979; Bondy and Agrawal, 1980; Vong Burg et al., 1980; Northington and Shamoo, 1980; Abd Elfattah and Shamoo, 1981; Zanolini et al., 1994; Cagiano et al., 1994; Zhang and Wu, 1994; Castoldi et al., 1996) cholinergic receptors binding following *in vitro* exposure of crude synaptosomes or whole brain homogenate in rats. Although the above reports suggest that high affinity choline uptake and cholinergic receptors seem to be the most sensitive cholinergic targets for MeHg *in vitro*, they are derived from a large range of concentration of MeHg and no data are available for discrete brain regions. The concentration of MeHg needed to inhibit high affinity choline uptake and mChRs binding presents a very large variation according to previous reports, and concentrations range from below 10 to 100 μ M. In addition, although studies have shown that mercury accumulates in various rat brain regions such as the cerebral cortex, striatum, hypothalamus, hippocampus, brainstem and cerebellum (Moller-Madsen, 1994), the high affinity choline uptake and mChRs binding have been evaluated only in either homogenate or synaptosomes from whole brain, striatum or cerebral cortex of rats.

In spite of high sensitivity of the high affinity choline uptake and the mChRs binding toward MeHg, such measurements in human brain as potential biomarkers for MeHg neurotoxicity is rather complicated and requires expensive tests and equipments, because of the inaccessibility of the human brain tissue for sampling. In this regard, circulating blood cells, which are easily accessible, could satisfy the non-invasive and ethic demands of sampling. Furthermore, several biochemical parameters of central neurotransmission are also present in blood cells. These include receptors (e.g. cholinergic nicotinic and muscarinic, dopaminergic and β -adrenergic in lymphocytes; α adrenergic, serotonergic receptors in platelets), enzymes (e.g. monoamine oxidase B in platelets, Na^+/K^+ -ATPase and cholinesterase in erythrocytes, cholinesterase and neurotoxic target esterase in lymphocytes, glutamine oxidase in serum), or neurotransmitter uptake systems (e.g. serotonin in platelets). However, among the cholinergic receptors, only the mChRs are present on the peripheral blood lymphocytes in both rats and humans (Hiemke et al., 1996; Rabey et al. 1986; Maslinski et al., 1988; Costa et al., 1988). On the other hand, the nicotinic cholinergic receptors (nChRs) are found only in the circulating blood lymphocytes of humans, but not in rats (Bronzetti et al., 1996; Masuyama et al., 1996; Mihovilovic et al., 1997). Moreover, modulation of mChRs on blood lymphocytes has been shown to reflect similar changes occurring in the central nervous system (CNS) due to diseases,

genetic and environmental factors such as chemical or pharmacological exposure (Stahl, 1985; Costa et al., 1990; Fitzgerald and Costa, 1993; Masuyama et al., 1996). For instance, the mChRs binding is similarly reduced in the brain and blood lymphocytes in Alzheimer patients (Mash et al., 1985; Adem et al., 1986; Rabey et al., 1986). In addition, mChRs binding is also similarly decreased both in the blood lymphocytes and brain regions in adult rats exposed to other neurotoxicants such as pesticides (Costa et al., 1990; Fitzgerald and Costa, 1993). In peripheral blood lymphocytes, mChRs binding, which has been used to monitor similar changes in the central nervous system due to diseases or other neurotoxicants, may prove useful as a potential surrogate marker for the changes occurring in the central cholinergic system following *in vitro* exposure to MeHg.

Based on the aforementioned information, the present investigation was designed to identify a potential candidate peripheral cholinergic biomarker for MeHg neurotoxicity under *in vitro* exposure conditions. For this study, the high affinity choline uptake and [³H]QNB binding to mChRs were measured in synaptosomes from cerebral cortex, striatum, hypothalamus, hippocampus, brainstem and cerebellum of rat brain following *in vitro* exposure to different concentrations of MeHg chloride. Similarly, the [³H]QNB binding to mChRs was measured on the peripheral blood lymphocytes. The changes in these cholinergic parameters measured in the different brain regions were then compared with the [³H]QNB binding in the peripheral blood lymphocytes, hence to find a peripheral candidate surrogate biomarker for central cholinergic neurotransmission due to MeHg exposure *in vitro*.

MATERIEL AND METHODS

Chemicals

Methylmercury chloride (MeHgCl) (purity >95%) was obtained from Alfa ESAR, A Johnson Matthey Company (MA, USA). Acetylcholine (ACh) and choline (Ch) chlorides, eserine hemisulfate sodium salt and Tris base were obtained from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Atropine sulfate was obtained from ICN (Biochemicals Inc. Aurora, Ohio). Ethylenediamine-tetracetic disodium (EDTANa₂) was purchased from Fisher Chemical Co. ¹⁴C-Choline (specific activity 2.0 Gbq/nmol, concentration 3.7 μmol/ml) and the tritiated quinuclidinyl benzylate (³H-QNB; specific activity = 52.3 Ci/mmol; Concentration = 0.019

$\mu\text{mol/m}$) were obtained from Dupont Canada (NEN/Dupont, Boston, MA). All other reagents were purchased from available commercial sources and were of analytical grades.

Preparation of Brain Synaptosomes and Blood Lymphocytes

Male Sprague Dawley rats obtained from Charles River (Saint Constant, Quebec) were used in these experiments. Fifteen untreated rats (350-400g) were decapitated and blood was then immediately collected into a plastic tube containing 1.5% of EDTA-Na₂ as anticoagulant. Meanwhile, brains were quickly removed on ice, and frozen at -80°C for 1 hour. Thereafter, brains were dissected out in cerebral cortex, striatum, hippocampus, hypothalamus, brainstem and cerebellum as described by Glowinski & Iversen (1966). Tissues from each region of all fifteen rats were pooled and homogenized in cold ice 0.32 M sucrose with Teflon pestle homogenizer (10 tours/min, Polytron Kinematica, PCU-2, Switzerland). The synaptosomes were finally prepared using the gradient ultracentrifugation method described by Gray and Whittaker (1962) and modified by Dodd et al., (1981). Synaptosomes were used intact or lysed for the uptake and the binding studies respectively. Synaptosomes were lysed at 4°C by ultrasonification (Solid State, Ultrasonic FS-9, Fisher Scientific) and membranes were separated by ultracentrifugation at 1200 g, 4°C for 40 min (Beckman, L8-70 ultracentrifuge, Beckman Instruments, Inc. CA, USA). The intact and membranes synaptosomes were resuspended in an appropriate buffer and conserved at -80°C under liquid nitrogen until analysis. Lymphocytes separated from the collected blood using the Ficoll-Paque method (Pharmacia, 1989) were prepared and conserved as described above for synaptosomes.

High Affinity Choline Uptake

The high affinity uptake system provides choline as substrate for the ACh synthesis in the cholinergic neurons (Simon et al., 1976). On the other hand, the low affinity choline uptake found in the lymphocytes is basically used for the synthesis of membrane components such phosphatidylcholine (Blusztajn and Wurtman, 1983). Therefore, the high affinity sodium-dependant choline uptake was measured only in the synaptosomes from brain regions as described by Gulya et al., (1990). Briefly, the incubation mixture of 5 ml consisted of 3 ml Krebs-Henseleit bicarbonate buffer, pH 7.4 (Krebs, 1950) equilibrated with 5% CO₂ + 95% O₂ contained, 0.2 mg/ml of ascorbic acid, 1 μM of eserine sulfate (an cholinesterase inhibitor), 0.2

ml of the intact synaptosomes (200 µg protein), 0.4 ml of different concentrations of MeHgCl (0, 0.5, 2.5 and 5 µM) in saline contained in sealed polystyrene tubes. After pre-warming this mixture for 2 min, the incubation started by adding 0.4 ml of 0.1 µM of ¹⁴C-choline chloride in the buffer at 37°C for an additional 2 min in a metabolic shaker incubator (Orbit Shaker Bath, USA). The incubation was stopped by adding 5 ml of ice cold buffer. These samples were then rapidly filtered under pressure over cellulose acetate membrane filters (pores size 0.22 µm; Millipore Bedford, MA), and filters were washed three times with 5 ml of the incubation buffer each. Filter was then transferred into disposable scintillation vials, dissolved in 6 ml Aquasol (NEN, Dupont Canada). The radioactivity was counted with 50-60% of efficiency using a liquid scintillation spectrometer (Liquid Scintillation Analyzer; 1500 Tri-Carb, Packard Canada). All incubations were carried out in quadruplicate, and the high affinity choline uptake was determined as the difference between the incubation with and without sodium minus the passive diffusion obtained from a paired samples incubated at 0°C. Protein content in synaptosomes from each brain region were determined by the protein-dye binding method (Bradford, 1976) using the bovine serum albumin as standard. The high affinity choline uptake activity was expressed in nmoles of the choline taken up per mg of protein per min (nmoles/mg protein/min).

Muscarinic Cholinergic Receptors (mChRs) Binding

Although the nicotinic and muscarinic cholinergic receptors are both sensitive to MeHg *in vitro*, the nicotinic cholinergic receptors (nChRs) have not been identified in rat peripheral blood lymphocytes (Bronzetti et al., 1996; Masuyama et al., 1996; Mihovilovic et al., 1997). Thus the muscarinic cholinergic receptors (mChRs) binding was only evaluated in this study using the antagonist quinuclidinyl benzylate ([³H]-QNB) binding as described by Costa et al., (1988) and Kobayashi et al., (1987). Briefly, in 50 mM Sodium/Phosphate buffer (pH 7.4), the incubation mixture of synaptosomes membranes (140 µg of protein) from each brain region and lymphocytes, and different concentrations of MeHgCl (0, 0.1, 2.5 and 5 µM) in saline was prewarmed for 20 min at 25°C. Then, the [³H]-QNB (0.5 nM) was added in a total volume of 1 ml and the incubation continued for an additional 60 min, 60 tours/min in a metabolic shaker (Orbit Shaker Bath, USA). The incubation was terminated by cooling the samples with 5 ml of ice-cold buffer followed by rapid filtration under pressure through a Whatman GF/F glass fiber filters (Whatman Inc., NJ); filters were previously soaked for 6 hours in 0.5 % polyethyleneimine

solution. Filters were then washed three times with 5 ml of ice cold buffer and the radioactivity remained on the filters was counted as processed above for the high affinity choline uptake. Specific binding was calculated as the difference between the incubation without atropine (total binding) minus the binding measured in the presence of 0.1 μM of atropine sulfate (non-specific binding). The [^3H]-QNB bound to muscarinic cholinergic receptors was expressed in fmol/mg protein.

Data Analysis

Statistical analyses were carried out using the SPSS program package. One-way ANOVA was performed for each receptor to compare individual means within each brain region or lymphocytes among the exposed and control groups. Difference between treated and controls were considered significant when $p < 0.05$. The concentration needed to inhibit 50% of the uptake and the binding systems, the inhibitory concentration (IC_{50}) of MeHg, was estimated from the percent of inhibition against different concentrations of MeHgCl, using a linear regression analysis. The IC_{50} is expressed in μM of MeHgCl for the uptake and the binding.

RESULTS

High Affinity Choline uptake (HACU)

The high affinity choline uptake into the synaptosomes from different brain regions of rats was measured following *in vitro* exposure to MeHgCl and results are presented in **Figure 1**. Results show that MeHg inhibited the high affinity choline uptake into the synaptosomes, and this effect was dependent on the concentrations of MeHgCl and brain regions examined. Thus MeHg at 2.5 μM inhibited significantly the high affinity choline uptake and such inhibition ranged from 27% to 56.24% dependent on the brain regions examined when compared to the controls ($p < 0.02$). On the other hand, MeHg at 5 μM was found to induce a statistically significant inhibition of the high affinity choline uptake as follows; brainstem (%) < cerebellum < striatum < hippocampus < hypothalamus < cerebral cortex (%) as compared to corresponding controls ($p < 0.01$). MeHg at 0.5 μM did not cause any significant inhibitory effect on the high affinity choline uptake into the brain synaptosomes when compared to corresponding controls ($p > 0.05$). High affinity choline uptake by blood lymphocytes could not be measured under the present experimental conditions.

Muscarinic cholinergic Receptor Binding

The *in vitro* effects of MeHgCl on [^3H]-QNB binding in synaptosomes from different brain regions and peripheral blood lymphocytes are presented in **Figure 2**. These results show that MeHg inhibited [^3H]-QNB binding in a concentration-dependent manner, and such effect also varied according to the brain region evaluated. Thus MeHg at 2.5 μM significantly inhibited the [^3H]-QNB binding in brain synaptosomes, and such ranged from 46.27 to 64.41% as compared to the corresponding value for 0.5 μM ($p < 0.01$) and controls as well ($p < 0.002$). The inhibitory effect was in the following order: brainstem < hypothalamus < striatum < hippocampus < cerebellum < cerebral cortex. On the other hand, MeHgCl at 5 μM caused a statistically significant inhibition of [^3H]-QNB binding, and such effect ranged from 58.21 to 81.06% in brain regions compared to the corresponding the controls ($p < 0.001$). This inhibitory effect is as follows: brainstem < cerebral cortex = striatum = hypothalamus < hippocampus < cerebellum. Similarly, MeHg at 2.5 and 5 μM was found to inhibit the [^3H]-QNB binding by 37.43% and 56.71% respectively in rat blood lymphocytes. However, in both the synaptosomes and

lymphocytes. MeHg at 0.5 μM did not produce any significant inhibition of the [^3H]-QNB binding when compared to the corresponding controls ($p > 0.05$).

The sensitivity of the high affinity choline uptake and the [^3H]-QNB binding for the inhibitory effect of MeHg were estimated using the IC_{50} of MeHgCl (μM) and results are presented in **Figure 3**. These results show that the high affinity choline uptake seems to be more sensitive to MeHg compared to [^3H]-QNB binding. Thus the IC_{50} for the high affinity choline uptake ranged from 4.34 μM in the brainstem to 2.8 μM in the hippocampus. On the other hand, the IC_{50} value was about 7.64 μM in the brainstem compared to 5.00 μM in the hippocampus for the [^3H]-QNB binding. In the peripheral blood lymphocytes, the IC_{50} was about 8.36 μM of MeHg for the [^3H]-QNB binding.

DISCUSSION

Overall, the present study have shown that MeHg inhibited the high affinity choline uptake and the [^3H]-QNB binding in synaptosomes from different brain regions following *in vitro* exposure in adult rats. Similarly, MeHg also inhibited the [^3H]-QNB binding in peripheral blood lymphocytes. Previous studies have shown that MeHg *in vitro* inhibited high affinity choline uptake in the brain tissue preparations (Bondy et al., 1979; Kobayashi *et al.*, 1979, 1981, 1982; Araki *et al.*, 1981; Levesque et al., 1992) however only the present study demonstrated that this effect depends on both the concentration of MeHg and brain region. In the current study, we used purified synaptosomes from discrete brain regions of adult rats. In addition, based on the IC_{50} values, the present study has shown that high affinity choline uptake was more sensitive in the hippocampus, hypothalamus, cerebral cortex and striatum when compared to cerebellum and brainstem (**Table**). In contrast, Bondy et al., (1979) reported that MeHg at 10 μM inhibited high affinity choline uptake in mice brain homogenate by 63% when incubated for 5 min. Kobayashi et al., (1982) found that high concentration of MeHg (20 μM) is needed to almost completely produce such effect in crude synaptosomes from rat forebrain. On the other hand, Levesque et al., (1992) reported that MeHg at 10 and 100 μM depressed high affinity choline uptake approximately by 25 and 45% respectively in rat forebrain synaptosomes. Araki et al., 1981 reported that MeHg (100 to 10 μM) decreased by 96.6% high affinity choline uptake in the

cerebral cortex slice, but after 10 min of incubation at 25⁰C. In contrast, our results have shown that such an effect was about 27 to 56.24% and from 58.25 to 77.39% at 2.5 and 5 μ M of MeHg respectively. We have also shown that inhibition of high affinity choline uptake was dependent on brain region. This discrepancy may be attributed to the use of either whole brain homogenate or synaptosomes used in the previous studies (Komulainen and Tuomisto, 1982; Tuomisto and Komulainen, 1982). In addition, Snyder et al., (1969) have reported that there is a great difference in brain regions, uptake sites and affinity of monoamines for their transporter either in the same brain region or in different brain regions. Our present results agree with this conclusion.

The [³H]QNB binding to mChRs has been demonstrated to be inhibited in brain tissue preparations following *in vitro* exposure to MeHgCl (Aronstam and Eldefrawi, 1979; Von Burg et al., 1980; Anwar et al., 1981; Eldefrawi et al., 1977; Bondy and Agrawal, 1980; Zhang and Wu, 1994; Castoldi et al., 1996). In the present study, we have used purified synaptosomes of different brain regions and thus provided information on [³H]-QNB binding in different brain regions at different concentrations of MeHgCl. Thus, this study has shown that the sensitivity of [³H]-QNB binding varies between different brain areas. However our results do not agree with previous reports. For instance, Von Burg *et al.*, (1980) reported an IC₅₀ of 10 μ M of MeHgCl in synaptosomes from whole rat brain. Zhang and Wu (1994) also indicated an IC₅₀ of 13.7 μ M of MeHgCl with regard to the inhibition of ³H-QNB binding to mChRs in whole brain homogenate of rats. In addition Castoldi et al., (1996) found an IC₅₀ of 149 μ M of MeHg hydroxide (MeHgOH) in rat brain cortical membrane. On the contrary, we used purified synaptosomes from different brain regions (Dodd et al., 1981) with an IC₅₀ varying from 7.64 to 5.0 μ M of MeHg. The inconsistency between our results and previous reports appears to be due to either whole brain homogenate or non purified synaptosomes used in previous studies. The later preparations have been shown to lower MeHg binding to the receptors (Von Burg et al., 1980; Komulainen and Tuomisto, 1982; Tuomisto and Komulainen, 1982). In addition, we have shown a regional variation of the inhibitory effect of MeHg. These results may be explained by the finding that membranes from various areas of brain contain receptors that differ in their distribution between the high and low agonist forms (Aronstam et al., 1978). In addition, mChRs from various brain areas display different sensitivities to sulfhydryl agents and mercury compounds (Stavinoha et al., 1976; Aronstam et al., 1978). These reports may lend support to the differential sensitivity of [³H]-QNB binding observed in different brain regions in the present study due to MeHg.

Furthermore, the present study was the first to report inhibition of [^3H]-QNB binding in blood lymphocytes due to MeHg *in vitro*. Although direct evidence is missing, the findings that mChRs in peripheral blood lymphocytes may be similarly modulated as in different brain regions in mental diseases (Rabey et al., 1986) and other neurotoxicants (Costa et al., 1990; Fitzgerald and Costa, 1993) may support the results of the current study. However in this study, affinity of mChRs was lower in blood lymphocytes when compared to that in brain regions; such difference has been similarly reported in all other previous studies (Costa et al., 1990; Fitzgerald and Costa, 1993). This study has demonstrated that inhibition of the [^3H]QNB binding in different rat brain regions may be reflected by similar changes in blood lymphocytes due to MeHg *in vitro*.

Mechanisms of inhibition of high affinity choline uptake and mChRs binding by MeHg at cellular levels have been well established. The active binding sites of high affinity choline uptake and the mChRs on the membrane of the cholinergic neurons contains high levels of sulfhydryl (-SH) groups (Kerlavage et al., 1987; Andersen 1990). MeHg blocks the -SH groups at the active site of high affinity choline uptake and mChRs binding systems in cholinergic neurons (Jacobson et al., 1972; Prakash et al., 1973; Aronstam et al., 1978; Waku and Nakazawa, 1979; Anwar et al., 1981; Kobayashi *et al.*, 1982a). Microtubules are involved in the transport of metabolites for the vital functions of cells, and MeHg also blocks the SH groups of the microtubules and thus disturbs their structures in the bloods cells *in vitro* (Durham et al., 1994) and brain (Ishida et al., 1997). Furthermore, MeHg is capable of generating reactive species in brain tissue (Yonaha et al. 1983; Lebel *et al.*, 1990; Park, et al., 1996). These reactive species are able to alter the membrane structure and decrease [^3H]-QNB binding through lipid peroxidation (Donaldson and Labella, 1984). MeHg is also known to inhibit protein synthesis in brain tissue (Syversen, 1977; Atchison and Hare, 1994) and lymphocytes (Nakatsuru et al., 1985). However, inhibition of protein synthesis in brain tissue has been found to be sensitive only following *in vivo* exposure (Syversen, 1977; Castoldi *et al.*, 1996). Thus, by inducing the above processes, MeHg may inhibit high affinity choline uptake and the [^3H]-QNB binding in both brain synaptosomes and blood lymphocytes, as observed in the present study.

The inhibitory effect of MeHg on various cholinergic parameters has been considered as evidence for involvement of the central cholinergic neurotransmission in intoxication by this compound. Cholinergic transport system as measured by high affinity choline uptake has been considered to be the rate limiting step for ACh synthesis within central cholinergic nerve

terminals (Barker and Mittag, 1975; Simon and Kuhar, 1976; Simon et al., 1976). Thus it has been demonstrated that administration of hemicholinium-3 (HC-3), a specific inhibitor of high affinity choline uptake induce a reversible depletion of ACh contents in mice and rat brains (Hagan et al., 1989; Freedman et al., 1979). In addition, studies have shown that chronic administration of MeHg could decrease the ACh contents in rat and mice brains (Kobayashi *et al.*, 1980; Hardina, 1979; Taylor and Distefano, 1976; Okuda et al., 1978). On the other hand, MeHg is known to decrease mChRs binding in whole brain synaptosomes of rat (Von Burg et al., 1980) and membranes from cerebral cortex (Castoldi et al., 1996) *in vitro*. Results of *in vitro* study of MeHg on high affinity choline uptake and mChRs binding agree with those of *in vivo*, where repeated administration of MeHgCl was found to decrease activity of choline acetyltransferase, ACh content and inhibit mChRs binding in different brain regions in adult rats (Loua et al., 1997).

In Alzheimer's patients, studies have shown that mChRs binding is similarly reduced in both brain and blood lymphocytes (Mash et al., 1985; Adem et al., 1986; Rabey et al., 1986). Costa et al., (1990) have shown also that mChRs in brain and blood lymphocytes are similarly modulated by cholinergic agents, following *in vitro* and *in vivo* exposure. In addition, Fitzgerald et al., (1994) have demonstrated that in adult rats exposed to neurotoxic agents such as pesticides, the mChRs binding is similarly inhibited in different brain regions and blood lymphocytes. Moreover, the present study has demonstrated that the inhibition of mChRs binding in the different brain regions paralleled with that in the blood lymphocytes.

In summary, the study suggests that the mChRs binding in blood lymphocytes may be used as potential surrogate biomarker for the central cholinergic dysfunction due to *in vitro* exposure to MeHgCl. Results of an *in vivo* study which is presented in next manuscript was found to corroborate these findings.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors express their sincere acknowledgements to Dr Tomas Reader for his helpful assistance in the dissection of different brain regions, to Anwar Malick for his assistance in counting radioactivity and making the graphs, to Diane Talbot for her technical assistance. This work was supported by MRCC, Hydro-Québec, CEA and James Bay Committee on MeHg. A financial support to Kovana Marcel Loua from the Medical Research Council grant for his Ph.D study is also gratefully acknowledged

REFERENCES

- Adem, A., Nordberg, A., Bucht, G., and Winblad, B. 1986. Extraneural cholinergic markers in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Progr Neuro-Psychopharmacol. Biol Psychiat.* 10:247-257
- Andersen, P. H., Gingrich J. A., Bates M. D. Dearry A., Falardeau P., Senogles S. E., and Caron M. G. (1990). Dopamine receptor subtypes; beyond the D1/D2 classification. *Trends Pharmacol. Sci.* 11: 231
- Anwar, S. A., Abd Elfattah, A. A., and Shamoo, A. E. 1981. Regeneration of a functionally active rat brain muscarinic receptor by D-Penicillamine after inhibition with methylmercury and mercuric chloride: Evidence for essential sulfhydryl groups in muscarinic receptor binding sites. *Mol. Pharmacol.* 20:492-497
- Araki, K., Wakabayashi, M., Sakimura, K., Kushiya, E., Ozawa, H., Kunamoto, T., and Takahashi, Y. 1981. Decreased uptake of GABA by dorsal ganglia in MeHg treated rats. *Neurotoxicology.* 2:557-566
- Aronstam RS, Abood LG, Hoss W. (1978). Influence of sulfudryl reagents and heavy metals on the functional state of the muscarinic ACh receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 14, 575-586
- Bakir, F., Damluji, S. F., Amin-Zaki, Murtadha, M., Khalidia, A., AL-Rwi, N. Y., Tikriti, S., Dharir, H. I. , Clarkson, T. W., Smith, J. C., and Dohery, R. A. 1973. MeHg Poisoning in Iraq : An interuniversity report. *Science.* 181, 230-241
- Barker, I. A. and Mittag, T. W. 1975. Comparative studies of substrates and inhibitors of choline transport and ChAT. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 192; 86-94)
- Bluzztajn, J. K., Wurtman, R. J. The syntheses of choline and ACh in brain. In Handbook of neurochemistry Second ed. Plenum Press, New York, Ed. Abel Lajtha, Vol. 5: Metabolic turnover in the nervous system, pp-295-310, 1983.
- Bondy, S. C., Anderson, C. L., Harrington, M. E., and Prasad, K. N. 1979. The Effects of Organic and Inorganic Lead and Mercury on Neurotransmitter High-Affinity Transport and Release Mechanisms. *Environ. Res.* 19:102-111.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Castoldi, A. F., Candura, S. D., Costa, P., Mango, L., and Costa, L. G. 1996. Interaction of mercury compounds with muscarinic receptor subtypes in the rat brain. *Neurotoxicology.* 17(2-3)735-742
- Chang, L. M. 1980. Mercury, In Spencer P. S., schauburg H. H., (eds.), Experimental and Clinical Neurotoxicology, Vol. 1, William & Wilkins, Baltimore, pp 508-526
- Chang, L., Hartman. 1972. Electron microscopic histochemical study on the localisation and distribution of mercury in nervous system after mercury intoxication. *Exp. Neurol.* 35, 22-
- Clarkson, T. W. 1972. The pharmacology of mercury compounds. *Annu. Rev. Pharmacol.* 12:375-406

- Cooper, J. R., Bloom, F. E., and Roth, R. H. 1996. Acetylcholine, In the Biochemical Basis of Neuropharmacology (Cooper J.R., Bloom F. E., and Roth R. H., eds.), Seventh ed., pp. 194- 225, Oxford University Press, New York.
- Costa, L. G., Kaylor, G., and Murphy, D. 1988. Muscarinic cholinergic binding sites on rat lymphocytes. *Immunopharm.* 16:139-149
- Costa, L. G., Kaylor G, Murphy SD. 1990. *In vitro* and *in vivo* modulation of cholinergic muscarinic receptors in rat lymphocytes and brain by cholinergic agents. *Int. J Immunopharmacol.* 12:67-75.
- Dales, L. G. 1972. The neurotoxicity of alkyl mercury compounds. *Amer. J. Med.* 53:219-232
- Dodd, P. R., Hardy, J. A., Oakley, A. E., Edwardson, J. A., Perry, E. K., Deaunoy, J. P. 1981. A rapid method for preparing Synaptosomes: comparison, with alternative procedures. *Brain Res.* 226:107-118.
- Dolbec J., Mergler D., Sousa Passos C.-J., Sousa de Morais S., and Lebel J. (2000). Methylmercury exposure affects motor performance of a riverine population of the Tapajós river, Brazilian Amazon. *Int. Arch Occup Environ Health* 73 :195-203
- Donaldson, J., and Labella, F. S. 1984. The effects of manganese on the cholinergic receptor *in vitro* and *in vivo* may be mediated through modulation of free radicals. *Neurotoxicology* 5(1):105-112
- Durham, H. D., Minotti, S., Capriccio, E., Chakrabarti, S. K., and Panisset, J. C. Sensitivity of platelet microtubules to disassembly by methylmercury. *J. Toxicol Environ. Health.* 1996; 48:57-69
- Dwevedi, C., Raghunathan R., Joshi B. C., Foster Jr, H. W. 1980. Effect of mercury compounds on cholineactyl transferase. *Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol.* 30(2):381-384
- Eldefrawi, M. E., Mansour, N. A., and Eldefrawi, A. T. 1977. Interaction of acetylcholine receptors with organic mercury compounds. *Adv. Exp. Med. Biol.* 84:449-463
- Fitzgerald, B. B., and Costa, L. G. 1993. Modulation of Muscarinic receptors and Acetylcholinesterase Activity in Lymphocytes and in Brain Areas Following repeated organophosphate Exposure in Rats. *Fund Appl Toxicol.* 20:210-216
- Fox, J. H., Patel, M. K., and Cohen M. M. 1975. Comparative effects of organic and inorganic mercury on brain slice respiration and metabolism. *J. Neurochem.* 24:757-762.
- Freedman, J. J., Maci, J. R., Choi, R., G., and Jenden, D., J. 1979. Studies on the behavioral and biochemical effects of hemicholinium *in vivo*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 210:91-97
- Grandjean P., Weihe P., White R. F., and Debes F. (1998). Cognitive performance of children prenatally exposed Safe levels of methylmercury. *Environ. Res.* 77:165-172
- Gray, E.G., and Whittaker, V. P. 1962. The isolation of nerve ending from brain: an electron-microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. *J. Anat.* 96:79-88
- Hagan, J. J., Jansen, J. H. M., and Broekkamp, C. L. E. 1989. Hemicholinium-3 impairs spatial learning and the deficit is reversed by cholinomimetics, *Psychopharmacology.* 98:347-356
- Hrdina, P. D., Peters, D. A. V., and Singhal, R. L. 1976. Effects of chronic exposure of cadmium, lead and mercury on brain biogenic amines in the rat. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 15:483-493
- IPCS (1990). Environmental Health Criteria 101: Methylmercury, Geneva, IPCS, World Health Organisation, 144 pp.
- Jacobson, M. S., Chang, T., and Okita, G. T. 1972. *In vitro* inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase by MeHg. *Fedn Proc.* 31:561

- Kerlavage, A. R., Fraser, C. M., Venter, J. C. (1987). Muscarinic cholinergic receptor structure: molecular biological support for subtypes. *Trends Pharmacol Sci* 81, 426.
- Kobayashi, H., Yuyama, A., Matsusaka, N., Takeno, K., and Yanagiya, I. 1979. Effects of MeHg chloride on various cholinergic parameters in vitro. *J. Toxicol Sci.* 4:351-362
- Kobayashi, H., Yuyama, A., Matsusaka, N., Takeno, K., and Yanagiya, I. 1981. Neuropharmacological effect of MeHg in mice with special reference to the central cholinergic system. *Japan. J. Pharmacol.* 31:711-718
- Kobayashi, H., Yuyama, A., Tokonabe, Y., and Matsusaka, N. 1982. Reversible effects of monothiol (D-Penicillamine) and Dithiol (Dimercaptosuccinic acid) chelating compounds on MeHg-inhibited ChAT activity and high affinity choline uptake. *Japan. J. Pharmacol.* 32:655-663
- Komulainen, H. 1988. Neurotoxicity of MeHg: Cellular and subcellular aspects, pp. 167-182, in Bondy S. C., and Prasad K. N., (eds.), Metal neurotoxicity. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- Kung, M. P., Kostyniak, P. J., Olson, J. R., Sansone, F. M., Nickerson, P. A., Malone, M. A., Ziembiec, N., and Roth J. A. 1989. Cell specific enzyme markers as indicators of neurotoxicity: Effects of acute exposure to methylmercury. *Neurotoxicology* 10: 41-52
- Kung, M. P., Kostyniak, P., Malone, M., and Roth J. A. 1987. Studies of the in vitro effect of methylmercury chloride on rat brain neurotransmitters enzymes *J. Appl. Toxicol.* 7(2):119-121
- Lapierre Y, Beaudet A, Demianczuk N, et al. 1973. Noradrenergic axon terminals in the cerebral cortex of rat. II: Quantitative data related by light and electron microscopic radioautography of the frontal cortex. *Brain Res.* 63:175-
- Lebel, C. P., Ali, S. F., MCKee, M., and Bondy, C. S. (1990). Organometal-induced increases in oxygen radical activity: The potential of 2', 7' dichlorofluorescein diacetate as an index of neurotoxic damage. *Toxicol Appl. Pharmacol.* 104:17-24.
- Lebel J., Mergler D., Lucotte M., Amorim M., Dolbec J., Miranda D., Arantès G., Rheault I., Pichet P. (1996). Evidence of early nervous system dysfunction in Amazonian populations exposed to low-levels of methylmercury. *Neurotoxicology.* 17:157-168
- Lebel J., Mergler D., Branches F., Lucotte M., Amorim M., Laribe F., Dolbec J. (1998). Neurotoxic effects of low -level methylmercury contamination in the Amazonina basin. *Environ Res.* 79:20-32
- Levesque, P. C., Hare, M. F., and Atchison, W. D. (1992.) Inhibition of Mitochondrial Ca^{2+} release diminishes the effectiveness of methylmercury to release ACh from synaptosomes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 115:11-20
- Loua, K. M., Chakrabarti S. K., and Durham, D. D. 2000. Evaluation of cholinergic system both in brain and lymphocytes following repeated administration of Methylmercury Chloride in rats (To be submitted)
- Mash, D. C., Flynn, D. D., and Potter, L. T. 1985. Loss of M_2 receptors in cerebral cortex in Alzheimer's disease and experimental cholinergic denervation. *Science* 228:1115-1117
- Molinengo L., Orsetti M., Ghi P. 1997. Behavioral and neurochemical effects of a chronic choline-deficient diet in the rat. *Behav. Brain Res.* 84(1-2):145-150
- Moller-Madsen B. 1994. Localisation of Mercury in CNS of rat : An Autometallographic Study. *Pharmacology & Toxicology* 75 (Suppl. 1):1- 41).
- Nakatsuru, S., Oohashi, J., Nozaki H., Nakada, S., and Imura, N. 1985. Effect of mercurials on lymphocytes functions in vitro. *Toxicology.* 36 : 297-305

- Okuda J, Tsuzuki Y, Yamada T. 1978. Some neurochemical changes in the brain of rats with acute intoxication of MeHg chloride. *Jap J Legal Med.* 32(2):51-58.
- Pharmacia, USA. 1989. Ficoll-Paque for in vitro isolation of Lymphocytes.
- Prakash, N. J., Fontana, J., and Henkin, R. I. 1973. Effect of transitional metal ions on Na^+/K^+ ATPase Activity and the uptake of Norepinephrine and Choline by brain synaptosomes. *Life Sci.* 12 (1):249-259.
- Quandt, F. N., Kato, E., and Narahashi, T. 1982. Effects of MeHg on electrical responses of neuroblastoma cells. *Neurotoxicology* 3:205-220.
- Rabey, J. M., Shenkman, L., and Gilad, G. M. 1986. Cholinergic muscarinic binding by human lymphocytes: changes with aging, antagonist treatment and senile dementia of the Alzheimer type. *Ann. Neurol.* 20:628-631
- Ratcliffe, H. E., Swanson, G. M., and Fisher, L. J. 1996. Human exposure to mercury: Critical assessment of the evidence of adverse health effects. *J. Toxicol. Environ. Health* 49:221-270
- Sarafian, T. 1984. In vitro MeHg inhibition of protein synthesis in neonatal cerebellar perikarya. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 10:85-92.
- Simon, J. R., and Kuhar, M. J. 1976. High affinity choline uptake: ionic and energy requirements *J. Neurochem.* 27:91-99
- Snyder, S. H., and Coyle, J. T. 1969. Regional differences in H3-norepinephrine and H3-dopamine uptake into rat brain homogenate. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 165(1):78-86
- Takeuchi T., Eto K., and Tokunaga H. (1989). Mercury level and histochemical distribution in a human brain with Minamata disease following a long-term clinical course of twenty six years. *Neurotoxicology* 10:651-658
- Verity, M. A., Brown, W. J., Cheung, M., and Czer, G. 1977. MeHg inhibition of synaptosomes and brain slice protein synthesis- in vivo and in vitro studies. *J. Neurochem.* 29:673-679.
- Von Burg, R., Northington, F. K., and Shamoo, A. 1980. MeHg inhibition of rat brain muscarinic receptors. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 53:285-292.
- Von Burg, R., and Rustam, H. 1974. Neurophysiological and electromyographic studies on MeHg poisoned patients in Iraq. *EEG Clin Neurophysiol* 37:381-392.
- Waku, K., and Nakazawa, Y. 1979. Toxic effects of several mercury compounds on SH- and non-SH enzymes. *Toxicol. Lett* 4:49-55
- Walum, E. 1982. Membrane lesion in cultured mouse neuroblastoma cells exposed to metal compounds. *Toxicology.* 25:67-74
- Yonaha, M, Saito M, and Sagai, M. 1983. Stimulation of lipid peroxidation by MeHg in rats. *Life Sci.* 32:1507-1514.
- Zanoli P., Truzzi C., Veneri C., Braghiroli D., Baraldi M. 1994. MeHg during late gestation affects temporarily the development of cortical muscarinic receptors in rat offspring. *Pharmacol. Toxicol.* 75:261-264
- Zhang Z., Wu D. 1994. Effect of methylmercury chloride on brain muscarinic receptor in rat. *J. West China University of Medical Sci.* 25(4) : 388-392
- Zilles K. 1985. The cortex of rat : A stereotaxic Atlas. Springer -Verlag, Berlin and Heidelberg.

RESULTS

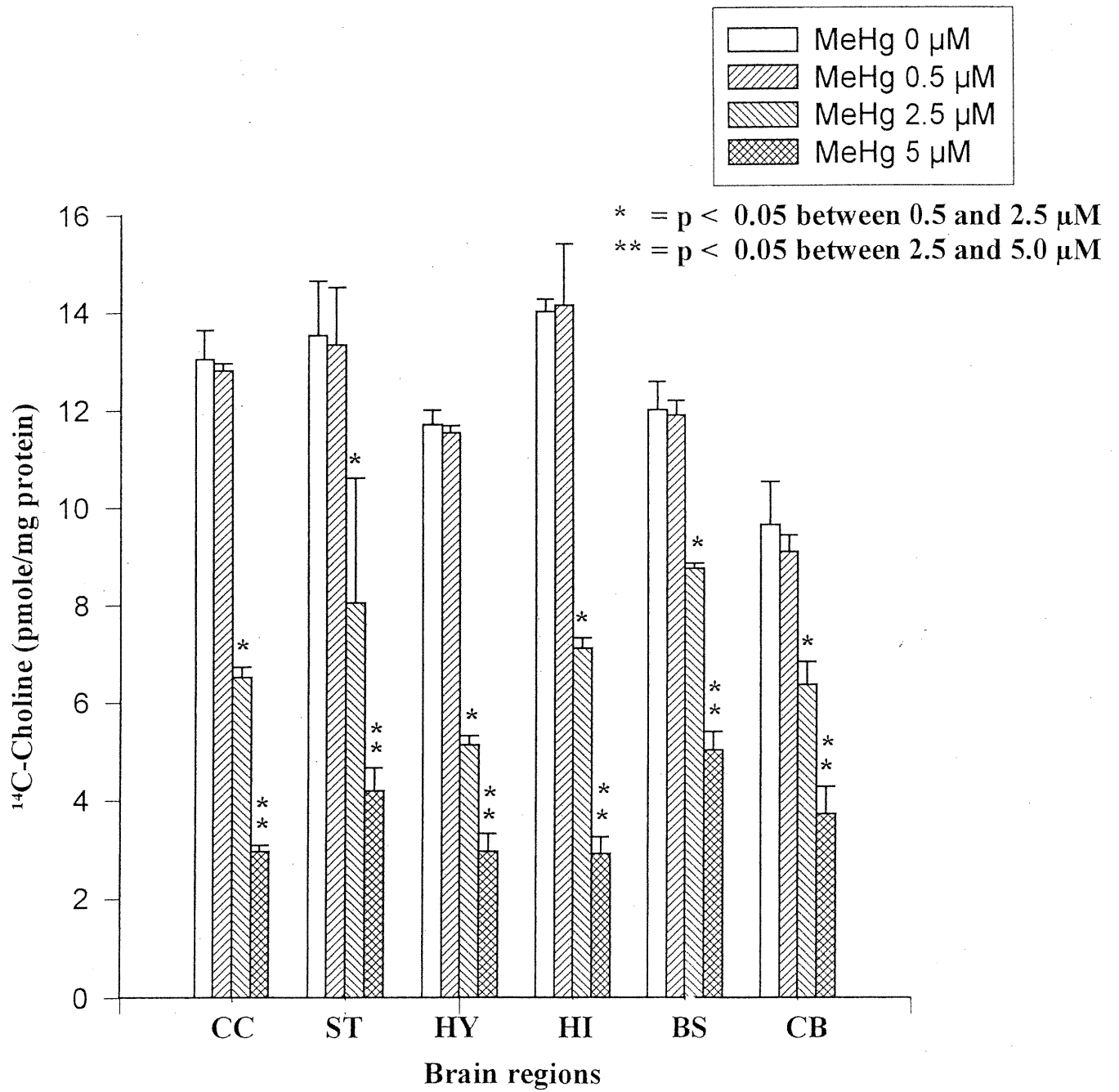


Figure 1: Inhibition of high affinity choline uptake in brain synaptosomes following *in vitro* exposure to MeHgCl in rats. High affinity choline uptake by synaptosomes from different cerebral cortex (CC), striatum (ST), hypothalamus (HY), hippocampus (HI), brainstem (BS) and cerebellum (CB) were incubated with different concentration of MeHgCl (0, 0.5, 2.5 et 5 μ M). Data reported are means (n = 4) \pm S.D of choline taken up in nmol/mg protein.

* Difference significant at $p < 0.05$ between 0.5 and 2.5 μ M

** Difference significant at $p < 0.001$ between 2.5 and 5.0 μ M

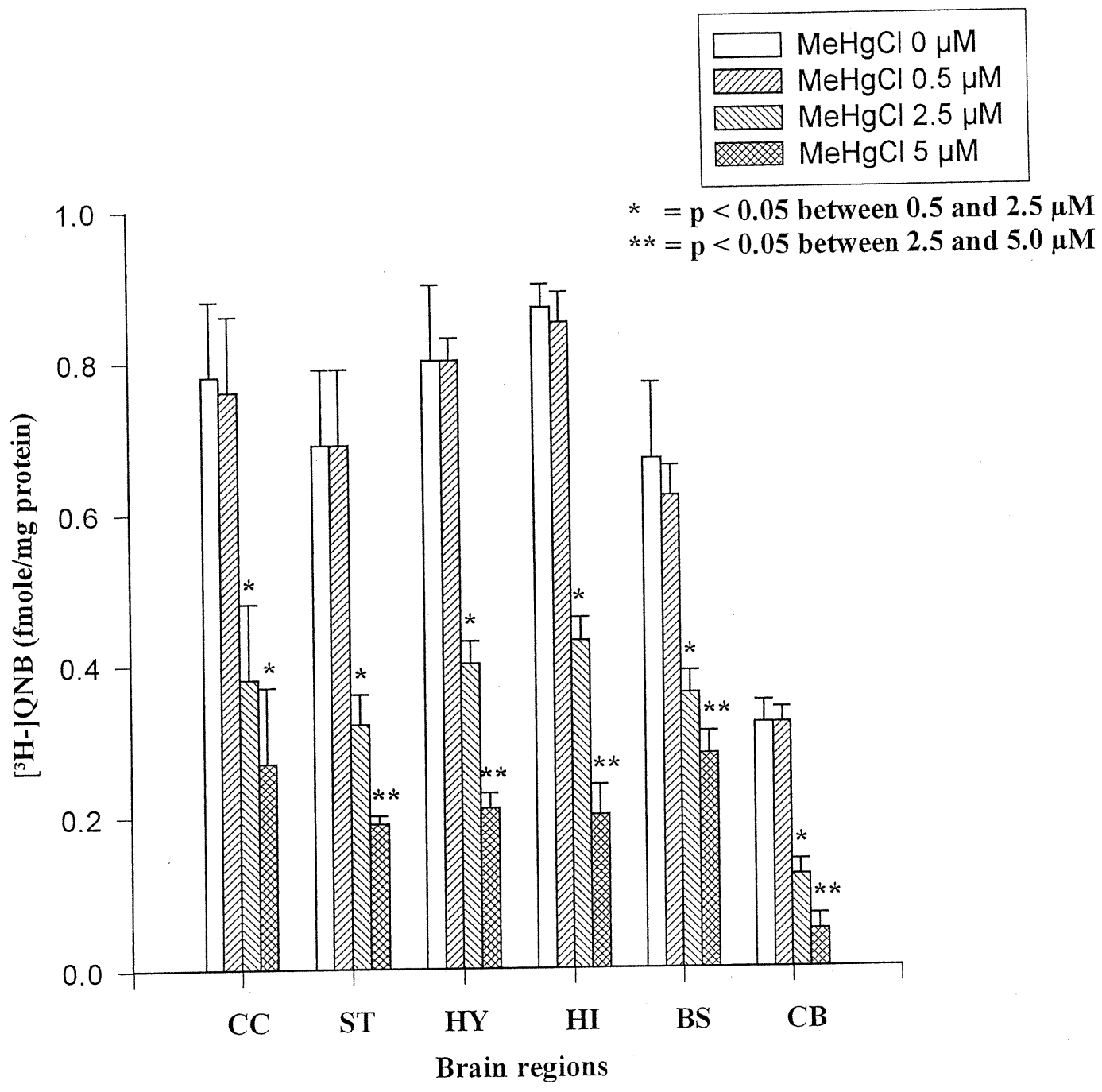


Figure 2: Inhibition of [³H]QNB binding to mChRs in brain synaptosomes and lymphocytes following *in vitro* exposure to MeHgCl in rats. [³H]QNB binding to mChRs by synaptosomes from cerebral cortex (CC), striatum (ST), hypothalamus (HY), hippocampus (HI), brainstem (BS) and cerebellum (CB) and lymphocytes were incubated with different concentration of MeHgCl (0, 0.5, 2.5 et 5 μM). Data reported are means (n = 4) ± S.D of [³H]QNB binding to mChRs in fmol/mg protein.

* Difference significant at p < 0.05 between 0.5 and 2.5 μM

** Difference significant at p < 0.001 between 2.5 and 5.0 μM

Table: IC₅₀ (μM of MeHgCl) for high affinity choline uptake and [³H]-QNB binding in brain synaptosomes and lymphocytes in rats.

| | IC ₅₀ (μM of MeHgCl) | | | | | | |
|----------------|---------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------------|
| | CC | ST | HY | HI | BS | CB | LY |
| Uptake | 3.01 | 3.54 | 3.01 | 2.8 | 4.34 | 4.01 | Not measured |
| Binding | 6.62 | 6.35 | 6.41 | 5.00 | 7.64 | 5.45 | 8.336 |

Note: IC₅₀ of MeHgCl was estimated from individual values of high affinity choline uptake and [³H]QNB binding to mChRs in the cerebral cortex (CC), striatum (ST), hypothalamus (HY), hippocampus (HI), brainstem (BS), cerebellum (CB) of brain and blood lymphocytes (LY)

CHAPITRE 3:

Effects of Methylmercury on High Affinity Dopamine and Serotonin Uptake, and [³H]raclopride Binding in Rat Brain Synaptosomes, and Blood Lymphocytes and Platelets, *In Vitro*.

Kovana M. LOUA¹, Saroj K. CHAKRABARTI^{1*}, and Heather D. DURHAM²

¹Département de Médecine du Travail et Hygiène du Milieu, Faculté de médecine, Université de Montréal and ²Montreal Neurological Institute, Quebec, Canada. 2573 Côte Ste-Catherine, H3T 1A8, Montreal;

*Address for corresponding author: Département de Médecine du Travail et Hygiène du Milieu, Université de Montréal, C.P. 6128, Main Station, Montreal, QC H3C 3J7 Canada.
Tel:514-343-5847; Fax: 514- 343-2200

(To be submitted to NEUROTOXICOLOGY)

ABSTRACT

This study was undertaken to evaluate *in vitro* effects of methylmercury chloride (MeHgCl) on high affinity uptake of dopamine (DA) and serotonin (5-HT) and dopaminergic D₂ receptors binding to brain synaptosomes and peripheral blood lymphocytes and platelets in adult male rat, and thus to find out the potential surrogate biomarkers for the serotonergic and dopaminergic changes due to MeHgCl *in vitro*. To this end, the uptake of DA and 5-HT and the D₂ receptors binding using the radioligand antagonist [³H]raclopride were measured in synaptosomes from cerebral cortex, striatum, hypothalamus, hippocampus, brainstem and cerebellum exposed to MeHgCl (0, 0.5, 2.5 and 5 μM) *in vitro*. Similarly, DA uptake and [³H]raclopride binding to D₂ receptors and 5-HT uptake were measured in lymphocytes and platelets respectively. Results show that MeHgCl significantly inhibited DA and 5-HT uptake and [³H]raclopride binding to synaptosomes. Such effects were found to be dependent on MeHgCl concentration and brain region. MeHg at 2.5 μM inhibited DA uptake from 33.31% in hypothalamus to 58.98% in cerebral cortex when compared to the corresponding controls. At 5 μM, MeHg was also found to inhibit DA uptake from 54.78% in hypothalamus to 87.62% in striatum. 5-HT uptake by different brain synaptosomes was also inhibited by 16.94% in hypothalamus to 42.10% in cerebral cortex due to MeHgCl at 2.5 μM, when compared to control values. Inhibition of 5-HT uptake varied from 38.11% in hypothalamus to 82.30% in striatum due to MeHg at 5 μM. Similarly, MeHg at 2.5 and 5 μM caused significant inhibition of 5-HT uptake by 37.31 and 68.65% of control values in rat peripheral blood platelets respectively, while the DA uptake could not be detected in the lymphocytes. Additionally, MeHg at 2.5 μM, inhibited the [³H]raclopride binding to brain synaptosomes and such effect ranged from 23.33% in brainstem to 48.57% in cerebellum as compared to control values. Inhibition of [³H]raclopride binding by MeHg at 5 μM, ranged from 53.33% in brainstem to 77.86% to cerebellum. In lymphocytes the [³H]raclopride binding was inhibited by 36.42 and 58.21% of the control (p < 0.002) at 2.5 and 5 μM of MeHg respectively. The IC₅₀ of MeHg (μM) ranged from 4.38 in hypothalamus to 2.87 in cerebral cortex for the uptake of DA and from 6.50 in hypothalamus to 3.20 in striatum for 5-HT uptake. For the [³H]raclopride binding, the IC₅₀ of MeHg (μM) varied from 4.95 in brainstem to 3.14 in cerebellum. The IC₅₀ of MeHgCl was 3.62 μM for 5-HT uptake in platelets and 6.53 μM for the [³H]raclopride binding in lymphocytes. The data indicate that MeHgCl inhibited the high affinity uptake of 5-HT in synaptosomes from different rat brain regions similarly to rat platelets and lymphocytes respectively. The studies suggest that these peripheral markers could be used as potential surrogate biomarkers for MeHg neurotoxicity, *in vitro*. However *in vivo* studies are required to validate these results.

Key Words: Methylmercury, Neurotoxicity, Dopamine and Serotonin Uptake, D₂ Receptors. Brain Synaptosomes, Blood Lymphocytes and Platelets, Biomarkers

INTRODUCTION

Methylmercury is an environmental pollutant which causes irreversible damage to the central nervous system (Takeuchi, 1970 ; Bakir et al 1973). Signs and symptoms of MeHg intoxication include dysarthria, fine tremor, mental unbalance such as inability to concentrate, forgetfulness, difficulties in learning and loss of memory (Ratcliffe et al., 1996; Counter et al., 1998; Grandjean et al., 1997, 1998; Lebel et al., 1996, 1998 ; Dolbec et al., 2000). These symptoms may progress to ataxia (hindlimb crossing), paralysis and death at high exposure levels (Hunter et al., 1940; Takeuchi et al., 1989; Bakir et al., 1973). In spite of the difficulty of establishing a clear relationship between neurological signs and symptoms of MeHg intoxication and the mercury contents in blood and hair, health risk assessment due to MeHg intoxication still continues to be based only on the measurements of mercury levels in blood and hair (IPCS, 1990). The major drawback of such approach is that the half-life of mercury in the central nervous system is more than 240 days (Takeuchi et al., 1989), compared to only 74 days in blood (IPCS, 1990). Besides, not all individuals or populations respond to the same extent to MeHg exposure. Moreover, considerable damage can occur to the nervous system before the onset of any clinical signs and symptoms of MeHg intoxication (WHO, 1990 ; Ratcliffe et al., 1996 ; ATSDR, 1997). Thus, neurotoxic injury is thought to proceed initially from one or more primary biochemical alterations through reversible cellular injury, to eventual irreversible cytotoxicity and permanent organ damage. Based on above considerations, health risk assessment due to MeHg should therefore rely on reliable biomarker of early-stage effects related to biochemical alterations that 1) may not only identify sensitive individuals or populations at such risk but 2) could also detect early effects before occurrence of any irreversible damage to the brain cells. To this end, the finding that MeHg interferes at various stages of neurotransmission involving monoamines systems at exposure levels not associated with any clinical changes (Tunnicliff and Wood, 1973; Hrdina et al., 1976; Komulanain and Tuomisto 1983; Komulainen, 1987; 1988; Bondy and Agrawal, 1980) should be considered.

MeHg is known to inhibit *in vitro* high affinity uptake of dopamine (DA), norepinephrine (NE) and serotonin (5-HT) and induce the spontaneous release of these neurotransmitters from brain tissues in rats (Komulainen and Tuomisto, 1981a, 1982, 1987; Tuomisto and Komulainen, 1983; Rajanna and Hobson, 1985; Komulainen, 1988; Minnema et al., 1989; Oudar et al., 1989; Bonnet et al., 1994) and in mice brain homogenate (Bondy et al., 1979). The inhibition of dopamine (DA) and norepinephrine (NE) uptake was evaluated only in the striatal and cerebral synaptosomes with an IC_{50} of 2.5 and 3.4 μ M of MeHg respectively (Bondy et al., 1979; Komulainen and Tuomisto, 1981, 1982). On the other hand, Rajanna and Hobson (1985) found an IC_{50} of 50 and 100 μ M of MeHg for the uptake of DA and NE respectively in whole brain synaptosomes from rat. However, it is known that NE forms coordination complexes and chelates with MeHg which may decrease the availability of both compounds (Komulainen and Tuomisto, 1982). With regard to serotonergic system, MeHg inhibits the high affinity uptake of serotonin (5-HT) with an IC_{50} of 3.4 μ M in synaptosomes from rat brain hypothalamic. Similarly, MeHg was found to inhibit the high affinity uptake of 5-HT in blood with an IC_{50} of 0.2 μ M in human (Komulainen and Tuomisto, 1981a; Tuomisto and Komulainen, 1983) and rabbit (Komulainen and Tuomisto, 1981a; Tuomisto and Komulainen, 1983), however this effect was compared between rat brain.

In contrast to the inhibitory effect of MeHg on the uptake which is observed at less than 10 μ M, induction of the spontaneous release of DA, NE and 5-HT from preloaded slices or synaptosomes from striatum, cerebral cortex and hypothalamus of rat brain occurred only at above 10 μ M of MeHgCl (Komulainen and Tuomisto, 1981a, 1982, 1987; Tuomisto and Komulainen, 1983; Minnema et al., 1989; Oudar et al., 1989; Komulainen, 1988). These reports also indicated that release of DA was more sensitive to MeHg exposure than that of NE and 5-HT (Komulainen and Tuomisto, 1981; Minnema et al., 1989; Oudar et al., 1989). In regard to 5-HT, MeHg was found to induce the spontaneous release of this neurotransmitter by only 10% from preloaded hypothalamic synaptosomes in human and rabbit platelets (Macfarlane 1981; Komulainen and Tuomisto, 1981a; Tuomisto and Komulainen, 1983).

In addition, MeHg is a powerful inhibitor of the dopaminergic D_2 receptors binding with an IC_{50} of 2.5 μ M in synaptosomes (Bondy and Agrawal, 1980) and of 0.9 μ M in membrane (Komulainen et al., 1985) from rat brain. Moreover, we have found that MeHg *in vitro* up to 10 μ M also inhibits the activity of monoamine oxidase (MAO) in synaptosomes from different brain

regions of rat (Chakrabarti et al., 1998). All above reports suggest that uptake of DA and 5-HT and the dopaminergic D₂ receptor binding systems seem to be more susceptible to MeHg exposure *in vitro*. Unfortunately, these data are still not sufficient. For instance, although MeHg accumulates in different brain regions such as in cerebral cortex, hypothalamus, hippocampus, brainstem and cerebellum, following oral administration in adult rats (Moller-Madsen, 1994), no study has evaluated effect of MeHg on the uptake of DA and 5-HT and the dopaminergic D₂ receptors binding in these brain regions.

However, measurements of monoamine and D₂ binding in human brain as potential biomarkers for MeHg neurotoxicity is rather complicated and requires expensive tests and equipments, because of the inaccessibility of human brain tissue for sampling. In this regard, circulating blood cells, which are easily accessible, could satisfy the non-invasive and ethic demands of sampling. Furthermore, several biochemical parameters of central neurotransmission are also present in blood cells. These include receptors (e.g. cholinergic nicotinic and muscarinic, dopaminergic and β -adrenergic in lymphocytes; α adrenergic, serotonergic receptors in platelets), enzymes (e.g. monoamine oxidase B in platelets, Na⁺/K⁺-ATPase and cholinesterase in erythrocytes, cholinesterase and neurotoxic target esterase in lymphocytes, glutamine oxidase in serum), or neurotransmitter uptake systems (e.g. serotonin in platelets). Measurements of 5-HT stored in platelets has been used as reliable estimation of the central serotonergic neurons in the uptake studies (Gaetano, 1978; Da Prada et al., 1988). In addition, a remarkably good correlation exists between 5-HT uptake in both platelets and brain synaptosomes following exposure to neurotoxics such as styrene (Checkoway, 1992) and solvents (Lam et al., 1985). Similar result has been found in human with Alzheimer's disease (Kumar et al., 1995). Moreover, studies have shown that MeHg is able to inhibit the high affinity uptake of 5-HT in synaptosomes from brain hypothalamus and blood platelets from rats (Komulainen and Tuomisto, 1982; Tuomisto and Komulainen, 1983). In addition, dopaminergic D₁ and D₂ receptors have been found in peripheral blood lymphocytes from rats (Rabey et al., 1986; Maslinski et al., 1988; Ricci et al., 1994) and humans (Nobuyuki et al., 1992; Ricci et al., 1994; Bronzetti et al., 1996). Ricci et al., (1994) found that dopaminergic D₂ receptors expressed in rat peripheral blood lymphocytes are similar to those identified in striatum. Thus, changes in D₂ receptors binding from blood lymphocytes are thought to reflect similar changes occurring in the central nervous system following pharmacological manipulations, diseases or environmental factors (Le Fur et al., 1980; Bondy

and Ackenheil, 1987; Grodzicki et al., 1990; Przedborski et al., 1991; Tanji et al., 1999; Ricci et al., 1997). For instance, decrease and increase of dopaminergic D₂ binding has been observed in lymphocytes from patients with idiopathic Parkinson's disease (Le Fur et al., 1980) and schizophrenic patients (Bondy and Ackenheil, 1987; Grodzicki et al., 1990), respectively. In addition, D₂ but not the D₁ receptors were decreased in brain striatum from monkeys (Przedborski et al., 1991) and adult rats (Tanji et al., 1999) treated with 1-methyl, 4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine (MTPP), an irreversible neurodegenerator of the dopaminergic neurons.

Based on the above considerations, the present investigation was designed to identify the potential candidate peripheral monoaminergic biomarkers due to MeHg under *in vitro* exposure conditions using the non neuronal blood lymphocytes and platelets in adult rats. For these studies, the high affinity uptake of DA and 5-HT and [³H]raclopride binding to the dopaminergic D₂ receptors were measured in synaptosomes from different rat brain regions such as cerebral cortex, striatum, hypothalamus, hippocampus, brainstem and cerebellum following *in vitro* exposure to MeHg chloride. Similarly, the high affinity uptake of 5-HT in platelets, and DA uptake and the dopaminergic D₂ binding to lymphocytes were measured. Results from brain regions were then compared with those in lymphocytes and platelets, and hence to find out a peripheral non neuronal potential candidate surrogate biomarker that could reflect similar changes in the central monoaminergic parameters due to MeHg *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Methylmercury chloride (MeHgCl) (>95%) was obtained from Alfa Aesar (A Johnson Matthey Company, MA, USA). Dopamine and serotonin hydrochlorides, octylsulfonate sodium, 3,4-Dihydroxybenzylamine (DHBA), monochloroacetic acid and pargyline were obtained from Sigma Chemical Comp (St. Louis). Ethylenediamine-tetracetic disodium (EDTA_N2), sodium bisulfite (NaHSO₃), methanol and acetonitril (HPLC grade), tetrahydrofuran and perchloric acid (HClO₄) were purchased from Fisher Chemical Co. [³H]raclopride (Specific activity = 85.6 Ci/mmol; Concentration = 0.012 μmol/ml) were purchased from NEN/Dupont (Boston, MA). (±) Sulpiride was obtained from ICN (Biochemicals Inc. Aurora, Ohio). All other reagents were purchased from available commercial sources and were analytical grades.

Preparation of Brain Synaptosomes

Male Sprague Dawley rats (300-350g) obtained from Charles River (St Constant, Quebec) were used in this study. Rats were kept under standard laboratory conditions; 12/12 light/dark cycle with free access to water and lab chow *ad libitum*. Fifteen untreated animals were decapitated at each time and brains were quickly removed on ice, frozen at -80°C for 1 hour before dissecting out in different brain regions such as cerebral cortex, striatum, hippocampus, hypothalamus, brainstem and cerebellum using the method described by Glowinski and Iversen (1966). Tissues from each region of all animals were pooled and homogenized with Teflon pestle homogenizer (10 tours/min) in ice colded 0.32 M sucrose. Synaptosomes were finally prepared using the gradient ultracentrifugation method described by Gray and Whittaker (1962) as modified by Dodd et al., (1981). Intact and lysed synaptosomes were used for the uptake and binding studies, respectively. Synaptosomes were lysed by ultrasonification (Solid State, Ultrasonic FS-9, Fisher Scientific) at 4°C, and membranes were separated by centrifugation at 10, 000 g, 4°C for 20 min (Beckman, L8-70 ultracentrifuge, Beckman Instruments, Inc. CA, USA) in the incubation buffer. Intact and membranes synaptosomes were resuspended in the incubation buffer and conserved under liquid nitrogen at -80°C until analysis.

Preparation of blood lymphocytes and platelets

Whole blood from decapitated rats was collected in polystyrene tube containing 1.5% EDTA-Na₂. Lymphocytes and platelets were prepared using the Ficoll-Paque method (Pharmacia, 1989) and the method described by Momo et al. (1992) respectively. For the uptake studies, the isolated platelets and lymphocytes were resuspended in the corresponding incubation medium and conserved in sealed polystyrene tubes filled with a Krebs incubation buffer equilibrated with O₂ + CO₂ (95% : 5%). Viability of the suspended lymphocytes and platelets assessed by the trypan blue exclusion was found to be greater than 90%. For the binding study, lymphocytes were used as described above for synaptosomes.

Protein Assay

Protein concentrations in blood lymphocytes and platelets and in brain synaptosomes preparations were determined using the dye binding Coomassie method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard.

High Affinity Uptake of DA and 5-HT

The high affinity uptake of DA and 5-HT by synaptosomes of different brain regions, lymphocytes and platelets was measured by the method of Komulainen and Tuomisto (1982) with some modifications by using a non labelled DA and 5-HT. The non labelled DA and 5-HT taken up by synaptosomes and blood cells was then measured by a high performance liquid chromatography electrochemical (HPLC-EC) method as described by Reader et al., (1989). In brief, a total incubation mixture of 4 ml consisted of 0.1 mM of pargyline (an inhibitor of MAO activity), suspension of synaptosomes, blood lymphocytes or platelets (200 µg of protein contents), different concentrations of MeHgCl (0, 0.5, 2.5 and 5 µM in saline) in 3.1 ml of Krebs-Henseleit bicarbonated incubation buffer (pH 7.4) equilibrated with 5% CO₂ + 95% O₂, containing 0.2 mg/ml of ascorbic acid in a sealed disposable polystyrene tube. This range of MeHgCl concentration was chosen because at the high concentration (5 µM) used in this study, MeHg was found to be in human brain without any history of intoxication (Dales, 1972). After pre-incubating, the mixture for 5 min at 37°C, the incubation started for an additional 2 min in the presence of 0.1 µM of non labelled DA or 5-HT in a metabolic shaker. The incubation was then terminated by adding 5 ml of cold incubation buffer followed by ultracentrifugation at 1500 g for 10 min at 4°C. Pellets were washed two times in the incubation buffer (5 ml x 2) and homogenized in 0.1 M HClO₄. 100 ng/ml of 3, 4-dihydroxybenzylamine (3,4-DBHA) were added to the homogenate as intern standard for DA and 5-HT, before centrifuging at 1500 g for 20 min at 4°C and filtered through cellulose acetate membrane filters (pores size 0.22 µm; Millipore Bedford, MA). Quadruple samples were always used and pair of sample incubated at 0°C was included to control passive binding and diffusion; the latter value was subtracted from the control results. An aliquot of filtrate (20 µl) was injected into an isocratic Hewlett Packard dual piston pump (Hewlett-Packard 1050 series of HPLC modules). The mobile phase constituted of trichloroacetic acid (0.12 M) buffer (pH 3.2±1) containing EDTA Na₂ (2 mM), methanol (6%), octyl sodium sulfate (2 mM), acetonitril (3%) and tetrahydrofuran (1.5%). This mobile phase was pumped at 2.0 ml/min through a 250 x 4 mm adsorbosphere catecholamine HPLC reverse phase column (3 µm particle size; Alltech Associates, Inc., IL). DA and 5-HT in the column eluent were passed through an amperometric electrochemical detector (EG&G Instruments Princeton Applied Research EC, Model 400) and detected on a glassy carbon

electrode set at +750 mV against an Ag/AgCl reference cell (Bioanalytical Systems West Lafayette, IN, USA). The output was recorded using an Hewlett-Packard integrator (Hewlett-Packard 3396 series II Integrator). DA and 5-HT were identified and quantified in comparisons with chromatographs obtained of DA, 5-HT standards (10 to 100 µg/ml) as intern standards for DA and 5-HT respectively. Results were expressed in nmoles of DA or 5-HT taken up per mg of protein (nmoles/mg of protein) compared to picks of the standard intern.

[³H]raclopride binding

Among the dopaminergic D₁ and D₂ receptors, changes in D₂ have been associated with various neuronal dysfunctions including schizophrenia and Parkinson diseases (Le Fur et al., 1980 ; Grodzicki et al., 1990). Additionally, studies have shown that D₂, but not the D₁ receptors are vulnerable to the powerful degenerative dopaminergic neurotoxicant, the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in striatum and substantia nigra in monkey (Przedborski et al., 1992) and mouse (Tanji, et al., 1999) brain regions. Moreover, Bondy et Agrawal (1980), found that MeHg inhibited *in vitro* the dopaminergic D₂ receptors in synaptosomes from rats brain striatum. Based on above considerations, dopaminergic D₂ receptors binding was then evaluated in the present studies using the D₂ antagonist radioligand [³H]raclopride binding method described by Dewar and Reader (1989). Briefly, in a final assay volume of 500 µl, membranes from synaptosomes of different brain regions and lymphocytes (200 µg of protein concentration per incubation) were incubated in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) for 60 min at 25°C in the presence of various concentrations of MeHgCl (0, 0.5, 2.5 and 5 µM; in saline) and 1 nM of [³H]raclopride. After incubation, samples were diluted with 5 ml of ice-cold buffer and rapidly filtered (<5 s) over Whatman GF/F glass fiber filters (Whatman Inc., NJ) which were previously soaked for 6 hours in 0.5 % polyethyleneimine. Filters were then washed three times with 5 ml of cold buffer each, air dried and dissolved in 6 ml of liquid scintillation solution (Aquasol, NEN/Dupont, Boston, MA) for 24 hours. Radioactivity was quantified as total binding using a liquid scintillation spectrometry (Liquid Scintillation Analyzer; 1500 Tri-Carb, Packard Canada) with 50-60% of efficiency. Specific binding was defined as the total binding minus the non-specific counts obtained in the presence of 300 µM of the D₂ antagonist (±) Sulpiride. Results are expressed in fmoles of raclopride bound to the DA₂ receptors per mg of protein (fmol/ mg protein).

Statistical analyses

Statistical analyses were carried out using the SPSS program package. ANOVA was performed for the results of uptake and receptor binding to compare individual means in brain regions and blood cells between the exposed and control groups. Significant differences ($p < 0.05$) were calculated using the Student Newman Keul's t-test. The concentration needed to inhibit 50% of the uptake or binding activity (IC_{50}) is expressed in μM of MeHgCl, derived from the percent of the inhibitory effect at different concentrations of MeHgCl, using linear regression analysis.

RESULTS

High Affinity Dopamine Uptake

Effects of MeHgCl on the high affinity uptake of DA by synaptosomes from different brain regions of rats were measured and results are presented in **Figure 1**. Results show that MeHg inhibited the high affinity uptake of DA in a concentration-dependent manner, and such effect also varied according to the brain region. Thus, MeHg at 2.5 μM significantly inhibited the DA uptake and this effect ranged from 33.31% in hypothalamus to 58.98% in cerebral cortex of the corresponding controls ($p < 0.02$). MeHg at 5 μM caused a significant more inhibition of the DA uptake which was as follows (**Figure 1**): striatum > cerebellum > cerebral cortex > hippocampus > brainstem > hypothalamus as compared to the corresponding values of 2.5 μM ($p < 0.02$) and of control as well ($p < 0.001$). Although MeHg at 0.5 μM concentration caused a slight increase of DA uptake, this effect was not statistically significant from controls ($p > 0.05$). The results also show that under the present experimental conditions, we could not measure the high affinity uptake of DA in the peripheral blood lymphocytes of rats.

High Affinity serotonin uptake

Figure 2 depicted the effects of MeHgCl *in vitro* on the high affinity uptake of 5-HT by synaptosomes from different rat brain regions and peripheral blood platelets. Results show that MeHg inhibited the high affinity uptake of 5-HT in a concentration-dependent manner and this

effect was also dependent on the brain region examined. The results demonstrate that MeHg at 2.5 μM significantly inhibited 5-HT uptake which ranged from 16.94% (hypothalamus) to 42.10% (cerebral cortex) as compared to the corresponding controls ($p < 0.03$). MeHg at 5 μM caused a statistically significant inhibition of 5-HT uptake, and this effect ranged from 38.11% to 82.30% as compared to their corresponding values of MeHgCl at 2.5 μM ($p < 0.02$) and of control values ($p < 0.001$). Uptake of 5-HT was inhibited in different brain regions as follows (**Figure 2**): striatum > cerebral cortex > cerebellum > hippocampus > brainstem > hypothalamus. Similarly, MeHg caused a statistically significant inhibition of the 5-HT uptake by 37.31 and 68.65% in rat peripheral blood platelets exposed to 2.5 and 5 μM respectively (**Figure 2**). Whereas, MeHg at 0.5 μM did not cause any significant inhibition of this high affinity uptake by brain synaptosomes and blood platelets when compared to the corresponding control values ($p > 0.05$).

Dopaminergic D₂ receptors Binding

We measured effects of MeHgCl *in vitro* on the [³H]raclopride binding to D₂ receptors in different brain regions and peripheral blood lymphocytes and results are presented in **Figure 3**. These results show that MeHg inhibited [³H]raclopride binding in a concentration-dependent manner, and such effect was also dependent on the brain region. Thus, MeHg at 2.5 μM , significantly inhibited [³H]raclopride binding in brain synaptosomes, and such inhibition ranged from 23.33 in brainstem to 48.57% in cerebellum as compared to the corresponding value of MeHgCl at 0.5 μM ($p < 0.02$) and the controls as well ($p < 0.003$). MeHgCl at 5 μM concentration caused a statistically significant inhibition of [³H]raclopride binding, and this effect ranged from 53.33 in brainstem to 77.86% in cerebellum as compared to the corresponding values at 2.5 μM of MeHgCl ($p < 0.01$) and of controls ($p < 0.001$). Such inhibitory effect of MeHg at 5 M was as follows (Table 3): cerebellum < cerebral cortex < hippocampus < striatum < hypothalamus < brainstem. Similarly, MeHg at 2.5 and 5 μM concentrations inhibited in a statistically significant manner the [³H]raclopride binding by 36.42 and 58.21% respectively of the control values ($p < 0.001$) in rat blood lymphocytes. However at 0.5 μM , MeHg did not cause any such significant inhibition in both synaptosomes and lymphocytes when compared to their controls values ($p > 0.05$).

Sensitivity of the monoamines uptake and D₂ binding to MeHg

The sensitivity of DA and 5-HT uptake and [³H]raclopride binding toward to MeHg *in vitro* was estimated using the IC₅₀ of MeHgCl (μM) and results are presented in **Table**. The results show that the inhibitory effect of MeHg on the uptake and receptor binding were dependent on brain regions and blood cells as well. Thus, the inhibitory potency as expressed in IC₅₀ of MeHgCl (μM) for the DA uptake ranged from 4.38 to 2.91 and from 3.20 to 6.50 for 5-HT uptake in different rat brain regions. With regard to [³H]raclopride binding, the IC₅₀ of MeHgCl (μM) varied from 3.14 to 6.55 μM in synaptosomes from different rats brain regions. In rat blood cells, the IC₅₀ of MeHg was 3.62 μM for the 5-HT uptake in platelets and 6.53 μM for the [³H]raclopride binding in lymphocytes (**Table**).

DISCUSSION

The present studies have demonstrated that MeHg at low concentration is capable of inhibiting the high affinity uptake of DA and 5-HT as well as the [³H]raclopride binding in synaptosomes from different brain regions in adult rats, *in vitro*. Our studies have also shown that in similar conditions, MeHg was also capable of inhibiting the high affinity uptake of 5-HT and [³H]raclopride binding in rat peripheral blood platelets and lymphocytes respectively. Other studies have shown that MeHg *in vitro* inhibited the high affinity uptake of DA and 5-HT by rat brain tissue preparations (Bondy et al., 1979; Komulainen and Tuomisto, 1981a, 1982; Rajanna and Hobson, 1985). However only the present studies have provided information on a concentration-dependent inhibitory effect on the high affinity uptake of DA and 5-HT in synaptosomes from different rats brain regions. In addition, according to the IC₅₀ values, our studies indicated that the high affinity uptake of DA was relatively more sensitive to MeHg than that of 5-HT and this sensitivity varied among the different brain regions examined. In contrast, Komulainen and Tuomisto, (1981a, b) reported that MeHg inhibited the high affinity uptake of DA by only synaptosomes from rat brain striatum and found an IC₅₀ value about 2.5 μM. These workers also reported that MeHg inhibited 5-HT uptake by synaptosomes from rat hypothalamus with an IC₅₀ of 3.2 μM (Komulainen and Tuomisto, 1981a). On the other hand, Rajanna and Hobson (1985) reported that MeHg inhibited the high affinity uptake of DA by synaptosomes

membrane with an IC_{50} of 50 μ M from rat whole brain. Used of different protocols such as concomitant addition of non labelled DA, 5-HT in the incubation medium for the high affinity uptake study (Bondy et al., 1979; Komulainen and Tuomisto, 1981a, b), whole brain synaptosomes preparations (Rajanna and Hobson, 1985) and buffer (Komulainen, 1989) may explain, in part, the differences between our results and those from these reported studies. Finally, the regional sensibility observed in the present studies is consistent with the finding that there are marked regional differences in the affinity of monoamines for their transporters, even among the same brain region (Snyder et al., (1969).

Platelets have been used as useful model for the central serotonergic neurons in 5-HT uptake studies. Thus studies have shown that *in vitro*, MeHg inhibited the high affinity uptake of 5-HT in similar fashion both in brain synaptosomes and blood platelets (Komulainen and Tuomisto, 1982; Tuomisto and Komulainen, 1983), however such effect were compared between human platelets and synaptosomes from only rat brain hypothalamus. In their studies, Komulainen and Tuomisto, 1982) reported an IC_{50} of 3.4 μ M in rat hypothalamus and 0.2 μ M in human washed blood platelets (Tuomisto and Komulainen, 1982). Latter, Tuomisto and Komulainen, (1983) found similar results in human blood platelets. On the other hand, we have compared the inhibitory effect of different concentrations of MeHgCl on 5-HT uptake between synaptosomes from different brain regions and blood platelets in rats. According to IC_{50} values, ours results indicated that the potency of MeHg on the high affinity uptake of 5-HT varied according to different brain regions as follows: striatum = cerebral cortex < hippocampus = brainstem = platelets < hypothalamus. The discrepancy between previous reports (Komulainen and Tuomisto, 1982; Tuomisto and Komulainen, 1983) and results of the present studies in hypothalamus and blood platelets could be based on used of human blood platelets, low protein contents, high monoamine concentrations and temperature and the long incubation period in the former. With regard to protein content, previous reports have demonstrated that difference between blood platelets and brain synaptosomes may be due to the protein concentration used rather than the difference in sensitivity between both cells (Komulainen and Tuomisto, 1982; Kumar et al., 1995). It is well established that central serotonergic neurons and peripheral blood platelets are able to take up and release 5-HT by similar mechanisms via an active transport processes which are inhibited by MeHg *in vitro* (Da Prada et al., 1988; Anderson et al., 1992). The finding that MeHg inhibits in similar fashion 5-HT uptake in both brain regions and blood

platelets therefore suggests that the latter may be used as reliable model for the central serotonergic neurons for in the 5-HT uptake studies in rat brain regions following *in vitro* exposure to MeHg.

Although MeHg inhibits *in vitro* the dopaminergic D₂ receptors binding in rat striatal brain synaptosomes (Bondy and Agrawal, 1980; Komulainen et al., 1985), we have provided such information in different brain regions and concentrations of MeHg. Our studies have demonstrated that binding to D₂ receptors was dependent on MeHgCl concentration and the brain region regions as well. On the hand, Bondy and Agrawal, (1980) have shown that MeHgCl at only 10 μ M caused significant inhibition of [³H]spiroperidol binding in rat striatal membranes which contained 0.400 mg of protein. Komulainen et al., (1985) also reported an IC₅₀ of 0.9 μ M of MeHg for [³H]-haloperidol binding in rat striatal membranes (P₂ fraction). However, in the latter case, Komulainen et al., (1985) used both 1 μ M of unlabelled haloperidol and 0.125 nM of [³H]-haloperidol, the unlabelled compound could decrease the [³H]-haloperidol binding. In addition, both studies used the [³H]spiroperidol and [³H]haloperidol radioligands (Komulainen and Tuomisto, 1985; Tuomisto and Komulainen, 1981), which also possesses high affinity for the serotonergic 5-HT₂ and 5-HT₁, sigma receptors and the adrenoceptors (Leysen et al., 1978; Hall, 1994; Coccini et al., 1991; Morgan et al., 1984). By using [³H]raclopride, we have demonstrated that the inhibitory effect of MeHg on D₂ receptors binding varied greatly between synaptosomes from different brain regions. In fact, studies have indicated that D₂ receptors in different brain regions possesses either high or low affinities for antagonists or agonist, these differences have been also reported in the same brain region (Anderson et al., 1990). The regional sensitivity of the D₂ receptors binding as observed in the present studies may rely on the above considerations. In addition to brain regions, we first reported that *in vitro* MeHg inhibited [³H]raclopride binding to D₂ receptors in peripheral blood lymphocytes, and such effect was dependent on MeHgCl concentration.

The mechanism underlying inhibition of the high affinity uptake of DA and 5-HT and D₂ receptors binding due to MeHg *in vitro* may be associated with blocking the thiol or sulfhydryl (-SH) groups (Clarkson, 1972), inhibition of Na⁺/K⁺ ATPase activity (Prasad, 1979; Rajanna and Hobson, 1985; Prakash et al., 1973) and induction of reactive oxygen species (Lebel et 1990). MeHg inhibits sulfydryl (-SH) groups which are located on the active sites of the uptake systems of DA and 5-HT, as well as of the dopaminergic D₂ receptors (Kerlavage et al., 1987; Andersen

1990; Bonnet et al., 1993). In addition, MeHg alters microtubules structures (Durham et al., 1996) and functions such as transport of nutrients and metabolites in both neurons and blood platelets. Moreover, MeHg induces reactive oxygen species formation in different brain regions (Lebel et al., 1990) and blood platelets (Ally et al., 1993; Hornberger and Patscheke, 1989; Macfarlane, 1980; Cooper et al., 1996) and probably in lymphocytes. Reactive oxygen species have also been found to inhibit radiolabeled ligands binding to D₂ receptors in brain regions (Yonaha et al. 1983; Andorn et al., 1988), probably through lipid peroxidation of cell membranes. Komulainen et al., (1985) have shown that MeHg is able to decrease the affinity but not the number of the dopaminergic D₂ receptors binding sites, suggesting that protein synthesis is not involved in MeHg effect following *in vitro* exposure (Verity et al. 1977). Taken together, the above mechanisms may explain the results of the present studies.

The relevance of the results of the current studies may first be suggested by the finding that MeHg exerts its inhibitory effects on DA and 5-HT uptake as well as on D₂ receptors at a concentration lower than that present in human brain without any history of MeHg exposure (Dales, 1969). In addition, the uptake systems of DA and 5-HT are mainly involved in terminating action of the corresponding released monoamines by removing them at the synaptic cleft and by recycling them into nerve endings. Inhibition of removal and recycling of these neurotransmitters should increase and prolong their actions at receptors level. However, since MeHg concomitantly inhibits neurotransmitters binding to their corresponding receptors at the same concentration, actions of neurotransmitters are neither increased nor prolonged. Inhibition of DA and 5-HT uptake would also contribute to deplete brain regions contents in such neurotransmitters in rat exposed to MeHg (Hrdina et al., 1976; Suzuki 1981; Loua et al., 1997). Moreover, our results support the finding that the dopaminergic system is more sensitive to MeHg *in vitro* compared to the serotonergic neurons (Bondy et al., 1976; Sharma et al., 1982). The selective vulnerability of dopaminergic neurones to MeHg is consistent with the nature of the neurological dysfunctions due to MeHg; these consisted mainly of the motor disturbances occurring in the finger and around the lips (Bakir et al., 1973; Beuter et al., 1998).

Moreover, in humans and rats dopamine receptors in lymphocytes (Nobuyuki et al., 1992) and 5-HT uptake system platelets (Gaetano 1978 ; Slotkin et al., 1997) have been used to monitor similar dysfunctions in brain regions (Costa et al., 1982; Le Fur et al., 1981; Bondy and Ackenheil, 1987; Da Prada et al., 1988; Andres et al., 1992; Kumar et al., 1995). With regard to

D₂ receptor, the relative potencies of dopaminergic antagonists for the D₂ receptor binding sites in lymphocytes closely paralleled to those in rat brain striatum (Costa et al., 1982; Slotkin et al., 1997). In humans, there is marked decrease (Le Fur et al., 1981) and increase (Bondy and Ackenheil (1987) of the dopaminergic D₂ binding sites in lymphocyte from patients with Parkinson's disease and schizophrenia, respectively. On the other hand, blood platelets are used as peripheral model for central neurons in 5-HT uptake studies. Platelets contents in 5-HT are used to diagnose and monitor therapeutic in depressive disorders and mental diseases such as Alzheimer's (Gaetano, 1978; Kumar et al., 1995; Bakish et al., 1997). In addition, a remarkably good relationship also exists between platelets and brain synaptosomes for 5-HT uptake (Tuomisto and Komulainen, 1983). However, a few disparity results have been reported in 5-HT uptake between brain tissues and blood platelets, but such conflicting results may be ascribed to the use of different protocols (Slotkin et al., (1997). Based on the above considerations, we assumed that lymphocytes and platelets should be used as peripheral model for the central serotonergic neurons in evaluating *in vitro* effect of MeHg on D₂ receptor binding and 5-HT uptake in synaptosomes from different rat brain regions.

In summary, the present studies demonstrated that MeHg inhibited high affinity DA and 5-HT uptake and binding to D₂ receptors in different brain regions. Similarly, MeHg *in vitro* significantly inhibited the dopaminergic D₂ receptors binding in lymphocytes and 5-HT uptake by platelets. Our study therefore suggested that the binding to D₂ receptors in lymphocytes and 5-HT uptake by platelets could be used as potential candidate markers for similar changes in synaptosomes from different brain regions of rats due to MeHgCl *in vitro*. However *in vivo* studies are required to validate the reliability of the present results.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors express their acknowledge to Tomas Reader for his helpful assistance in the dissection of brain region tissues and for the development of the HPLC- ECD method; to Anwar Malick for his assistance in counting radioactivity and making the graphs; to Diane Talbot for her assistance. This work was supported by MRCC, Hydro-Québec, CEA and James Bay Committee on methylmercury.

REFERENCES

- Ally A., Buist R., Mills P., and Reuhl K.** (1993). Effects of methylmercury and trimethyltin on cardiac, platelets, and aorta eicosanoid biosynthesis and platelets serotonin release. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 44:555-563
- Andersen, P. H., Gingrich J. A., Bates M. D. Dearry A., Falardeau P., Senogles S. E., and Caron M. G.** (1990). Dopamine receptor subtypes; beyond the D1/D2 classification. *Trends Pharmacol. Sci.* 11: 231
- Anderson G. M., and Horne W. C.** Activators of protein kinase C decrease serotonin transport in human platelets. *Biochem et Biophysica Acta* 1992; 1137:331-337
- Andorn, A. C., Bacon, B. R., Neuyen-Henh, A. T., Parlato S. J., and Stitts, J., A.** (1988). nyl nucleotide interaction with dopamine binding sites s labeled by ³H-spiroperidol in human caudate and putamen: Guanyl nucleotides enhance ascorbate-induced lipid peroxidation and cause an apparent loss of high affinity binding sites. *Mol. Pharmacol* 33:155-162
- Andres A. H, Rao M. L., Ostrowitzki S., Entrian W.** Human brain cortex and platelet serotonin receptor binding properties and their regulation by endogenous serotonin. *Life Sci* 1992; 52:313-321
- Anner B. M.** The receptor function of the Na⁺/K⁺ATPase activated adenosine triphosphate system. *Biochem. J* 1985; 227:1-11
- Bakir F., Damluji S. F., Amin-Zaki, Murtadha M., Khalidi, A., Al-Rwi N. Y., Tikriti S., Dhahir H. I., Clarkson T. W., Smith J. C., Dohery R. A.** Methylmercury Poisoning in Iraq: An interuniversity report. *Science*, 1973; 181: 230-241.
- Bakish D., Cavazzoni P., Chudzik J., Ravindran A., Hrdina P. D.** Effects of selective serotonin reuptake inhibitors on platelets serotonin parameters in Major depressive disorder. *Biol Psychiatry* 1997; 41(2):184-190
- Beuter A., and Edwards R.** (1998). Tremor in Cree subjects exposed to methylmercury: a preliminary study. *Neurotoxicol & Teratol.* 20(6), 581-589
- Bondy S.C., Agrawal A. K.** The inhibition of cerebral high affinity receptor sites by lead and mercury compounds. *Ach. Toxicol* 1980; 46:249-256
- Bondy S.C., Anderson C. L., Harrington M. E., and Prasad K. N.** The Effects of Organic and Inorganic Lead and Mercury on Neurotransmitter High-Affinity Transport and Release Mechanisms. *Environ. Res* 1979; 19:102-111
- Bonnet J. J., Benmansour S., Amejkedki-Chab N., and Costentin J.** Effect of CH₃HgCl and several transition metals on the dopamine neuronal carrier; peculiar behaviour of Zn²⁺ *Eur. J. Pharmacol.* 1993; 266:87-97
- Bradford M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72, 248-254
- Caronti B., Calderato C., Parasselli F., Palladini G., Pontieri F. E.** Dopamine receptor mRNAs in the rat lymphocytes. *Life Science* 1998; 62(21):1919-1925
- Chakrabarti S. K., Loua K. M., Bai C., Durham D. H., and Panisset J. C.** (1998). Modulation of Monoamine oxidase activity in different brain regions and platelets following exposure of rats to methylmercury. *Neurotoxicology & Teratology.* 20(2), 161-168
- Chang L. M.** (1980), Mercury, In Spencer P. S., schauburg H. H., (eds.), Experimental and Clinical Neurotoxicology, Vol. 1, William & Wilkins, Baltimore, pp 508-526

- Chang, L., and Hartman** Electron microscopic histochemical study on the localisation and distribution of mercury in nervous system after mercury intoxication. *Exp. Neurol* 1972; 35, 22
- Chang L. W., Ware R. A., Desnoyers P. A.** A histochemical study on some enzyme changes in the kidney, liver and brain after chronic mercury intoxication in the rat. *Fd. Cosmet Toxicol* 1973; 11:283-286
- Checkoway, H., Costa L. G., Camp J., Coccini T., Daniell W. E., Dillis R. L.** (1992). Peripheral markers of neurochemical function among workers exposed to styrene. *Br. J. Ind. Med.* 49:560-565
- Cheung M. K., and Verity M. A.** Experimental methyl mercury neurotoxicity: Locus of mercurial inhibition of brain protein synthesis in vivo and in vitro. *J Neurochem.* 1985; 44:1799-1808
- Clarkson T. W.** (1972). The pharmacology of mercury compounds. *Annu. Rev. Pharmacol*; 12: 375-406
- Coccini T., Mango L., Costa L. G.** (1991). [³H]-spiroperidol labels sigma receptors not dopamine D₂ receptors, in rat and human lymphocytes. *Immunopharmacology* 22:93-106
- Counter S.A., Buchanan L. H., Laurell G., and Ortega F.** (1998). Blood mercury and auditory neuro-sensory responses in children and adult in the Nambija gold mining areas of Ecuador. *Neurotoxicology* 19(2), 185-196
- Da Prada M., Cesura A. M., Launay J. M., and Richards J. G.** (1988). Platelets as a model for neurones ? *Experientia* 44 :115-126
- Dales, L. G.** (1972). The neurotoxicity of alkyl mercury compounds. *Amer. J. Med.* 53:219-232
- Dewar K. M., and Reader A. T.** (1989). Distribution of dopamine D₁ and D₂ receptors in Rabbit cortical areas, hippocampus, and neostriatum in relation to dopamine contents. *Synapse.* 4, 378-386
- Dodd P. R., Hardy J. A., Oakley A. E., Edwardson J. A., Perry E. K., Deaunoy J. P.** (1981). A rapid method for preparing Synaptosomes: comparison, with alternative procedures. *Brain Res.* 226, 107-118.
- Dolbec J., Mergler D., Sousa Passos C.-J., Sousa de Morais S., and Lebel J.** (2000). Methylmercury exposure affects motor performance of a riverine population of the Tapajós river, Brazilian Amazon. *Int. Arch Occup Environ Health* 73 :195-203
- Durham H. D., Minotti, S., Caporicci E., Chakrabarti S. D., and Panisset J.C.** Sensitivity of platelet microtubules to disassembly by methylmercury. *J. Toxicol Environ. Health.* 1996; 48:57-69
- Faraj B. A., OIKowski Z. L., Jackson R. T.** Binding of [3H]-dopamine to human lymphocytes: Possible relationship to neurotransmitters uptake sites. *Pharmacology*, 1994; 48:320-327
- Fox, J. H., Patel, M. K., and Cohen M. M.** (1975). Comparative effects of organic and inorganic mercury on brain slice respiration and metabolism. *J. Neurochem.* 24:757-762
- Gaetano de G.,** (1978). Blood platelets as a pharmacological model of serotonergic synaptosomes, In *Platelets: A Multidisciplinary Approach*, ed. Gaetano de G., pp, 373-384. Ed Raven Press, New York.
- Giros B., Caron M. G.** (1993). Molecular characterization of the dopamine transporter. *Trends Pharmac. Sci.* 14:43-49
- Grandjean P., Weihe P., White R. F et al.,** (1997). Cognitive deficits in 17 - year old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol. Teratol.* 20, 417-428
- Grandjean P., Weihe P., White R. F., and Debes F.** (1998). Cognitive performance of children prenatally exposed Safe levels of methylmercury. *Environ. Res.* 77, 165-172

- Gray E. G., and Whittaker V. P.** (1962), The isolation of nerve ending from brain: an electron-microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation, *J. Anat.* **96**, 79-88.
- Herken H., and Hocho F.** (1994), Selective Neurotoxicity, Handbook of Experimental Pharmacology; Vol. **102**. Springer-Verlag, New York.
- Hornberger W., Patscheke H.** (1989). Hydrogen peroxide and methylmercury are primary stimuli of eicosanoid release in human platelets. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **27**:567-575
- Hrdina, P. D., Peters , D. A. V., and Singhal, R. L.** (1976). Effects of chronic exposure of cadmium, lead and mercury on brain biogenic amines in the rat. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **15**, 483-493
- Hunter D., Bomford R. R., and Russell D. S.** (1940). Poisoning by methylmercury compounds. *Quart J. Med* **9**:193
- IPCS** (1990). Environmental Health Criteria 101: Methylmercury, Geneva, IPCS, World Health Organisation, 144 pp.
- Kalisch B. E., and Racz W. I.** (1996). The effects of methylmercury on endogenous dopamine efflux from mouse striatal slices. *Toxicol Lett* **89**(1):43-49
- Komulainen H.,** (1988) Neurotoxicity of methylmercury: Cellular and subcellular aspects, In Bondy S. C., and Prasad K. N., (eds.), Metal neurotoxicity. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida pp. 167-182
- Komulainen H., and Tuomisto J.** (1987). The neurochemical effects of methylmercury, In *the toxicity of Methylmercury*. C.U Eccles, and Z. Annau eds. pp: 172-188. The Johns Hopkins University Press, Baltimore
- Komulainen H., Anttonen P., Tuomisto J., and Tuomisto L.** (1985). Effect of transition heavy metals on haloperidol binding in rat striatal membranes in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* **1985**: 114:113-119
- Komulainen H., and Tuomisto J.** (1985). ³H-Dopamine uptake and ³H-haloperidol binding in striatum after administration of methylmercury to rats. *Arch. Toxicol.* **57**:268-271
- Komulainen, H., and Tuomisto, J.** (1981a). Interference of Methyl mercury with monoamine uptake and release in rat brain synaptosomes. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **48**:214- 222
- Komulainen, H., and Tuomisto, J.** (1981b). Effects of heavy metals on dopamine, noradrenaline and serotonin uptake and release in rat brain synaptosomes. *Acta Pharmacol. Toxicol.*; **48**:199-204
- Komulainen, H., and Tuomisto, J.** (1982). Effects of heavy metals on monoamines uptake and release in rat brain synaptosomes and blood platelets. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*; **4**:647-649
- Kozik M. B., and Wigowska-Sowinska J.** (1978). Cerebral damage in the course of mercury phenylacetate. *Exp. Pathol.* **16**:267-275
- Kung M. P., Kostyniak P., Olson J., Malone M., Roth J A.** (1987). Studies of the *in vitro* effect of methylmercury chloride on rat brain neurotransmitter enzymes. *J. App. Toxicol.* **7**:119-122
- Kumar A. M., Kumar M., Sevush S., Ruiz J., Eidorfer C.** (1995). Serotonin uptake and its kinetics in platelets of women with Alzheimer's disease. *Psychiat. Res.* **59**:145-150
- Lam H. R., Tarding, F., Stockholm J., Gyatelberg F.** (1985). Human platelets 5-hydroxytryptamine concentration as a tool in the prediction of solvent induced neurotoxic effects. *Act. Pharmacol. Toxicol.* **56** :233-238

- Lapierre Y, Beaudet A, Demianczuk N, et al.** (1973). Noradrenergic axon terminals in the cerebral cortex of rat. II: Quantitative data related by light and electron microscopic radioautography of the frontal cortex. *Brain Res.* 63:175-
- Le Fur G., Phan T., and Uzan A.** (1980). Identification of stereospecific [³H]spiroperidol binding sites in mammalian lymphocytes. *Life Sciences.* 26:1139-1148
- Lebel C. P., Ali S. F., McKee M., and Bondy S. C.** (1990). Organo-metal induced increases in Reactive Oxygen Species: The potential of 2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate as an Index of Neurotoxic Damage. *Toxicol Appl Pharmacol.* 104:17-24
- Lebel J., Mergler D., Lucotte M., Amorim M., Dolbec J., Miranda D., Aranthès G., Rheault I., and Pichet P.** (1996). Evidence of early nervous system dysfunction in Amazonian populations exposed to low-levels of methylmercury. *Neurotoxicology.* 17(1), 157-168
- Lebel J., Mergler D., Branches F., Lucotte M., Amorim M., Laribe F., Dolbec J.** (1998). Neurotoxic effects of low-level methylmercury contamination in the Amazonia basin. *Environ. Res.* 79:20-32
- Leysen J. F., Niemeegers C. J. E., Tollenaere J. P., and Laduron P. M.** 1978. *Nature* 272: 168
- Macfarlane, D. E.** 1981. Induction of aggregation and release via activation of the prostaglandin synthesis pathway. *Mol. Pharmacol.* 19: 470-476
- Minnema D., Cooper P. G., and Greenland D. R.** (1989), Effects of methylmercury on neurotransmitter release from rat brain synaptosomes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 99, 510-521
- Moller-Madsen B.** (1994). Localisation of Mercury in CNS of rat : An Autometallographic Study. *Pharmacology & Toxicology* 75 (Suppl. 1), 1- 41
- Momo K., et al.,** (1992), Effects of the new Antiplatelet agent 2-Methyl-3-(1,4,5,6-tetrahydronicotinoyl) pyrazolo[1,5-a]pyridine on platelet aggregation and Thrombosis in Experimental animals. *Drug Res.* 42 (1), 32-39
- Morgan D. C., Marcusson J. O., and Finch C. E.** 1984. *Life Sci.* 34:2507
- Nakatsuru S., Oohashi J., Nozaki H., Nakada S., and Imura N.** 1985 Effect of mercurials on lymphocytes functions *in vitro*. *Toxicology* 36 :295-305
- Oudar P., Caillard L., and Fillion G.** (1989) In vitro Effect of Organic and Inorganic Mercury on the Serotonergic System. *Pharmacology & Toxicology* 65, 245-248
- Pharmacia, USA** (1989). Ficoll-Paque for *in vitro* isolation of Lymphocytes
- Prakash N. J., Fontana J., and Henkin R. I.** Effect of transitional metal ions on Na⁺/K⁺ ATPase Activity and the uptake of Norepinephrine and Choline by brain synaptosomes. *Life Sci.* 1973; 12 (1):249-259
- Prasad K N., Harrington M. E., and Bondy S. C.** Effects of Methylmercury chloride on the high affinity uptake of certain putative neurotransmitters in neuroblastoma and glioma cell culture cultures. *Toxicol. Lett.* 1979; 4:373-377
- Przedborski S., Lewis-Jackson V., Popilskis S., Kostic V., Levivier M., Fashn S., Cadet J. L.** (1991). Unilateral MPTP-induced parkinsonism in monkeys: A quantitative autoradiographic study of dopamine D1 and D2 receptors and re-uptake sites. *Neurochirurgie* 37:377-382
- Rajanna B., and Hobson M.** (1985). Influence of mercury on uptake of [³H]dopamine and [³H]norepinephrine by rat brain synaptosomes. *Toxicol Lett* 27:7-14
- Ratcliffe H. E., Swanson G. M. and Fisher L. J.** (1996). Human exposure to mercury: Critical assessment of the evidence of adverse health effects. *J. Toxicol. Environ. Health* 49:221-270

- Reader T. A., Dewar K M, and Groudin L.** (1989). Distribution Monoamines and Metabolites in Rabbit Neostriatum, Hippocampus and Cortex. *Brain Res. Bull.* **23**, 237-247
- Ricci A., Maritta S., Greco S., Bisetti.** 1997. Expression of Dopamine receptors in immune organs and circulating immune cells. *Clin. And Exper. Hypertension* 19 (1&2):59-71
- Sarafian T.** (1984). In vitro methylmercury inhibition of protein synthesis in neonatal cerebellar perikarya. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **10**, 85-92
- Sawas A. H., Gilbert J. C.** (1984). Possible mechanisms of inhibition by lipid peroxidation of APTase activities of rat cerebral cortex synaptosomes. *Arch. Int Pharmacodyn* 269:4-11
- Shrivastav B. B., Brodwick M. S., and Narahashi T.** (1976), Methylmercury: Effects on electrical properties on squid axon membranes. *Life Sci.* **18**, 1077-1082
- Slotkin, T. A., McCook E. C., Ritchie J. C., Carroll B. J., and Seidler F. J.** (1997). Serotonin transporter expression in rat brain regions and blood platelets: Aging and Glucocorticoid effects. *Biol Psychiat* 41(2):172-183
- Snyder S. H., and Coyle J. T.** (1969). Regional differences in H³-norepinephrine and H³-dopamine uptake into rat brain homogenate. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 165(1):78-86
- Suzuki T.** Neurological symptoms from concentration of mercury in the brain. In: Chemical fallout. Miller M. W, Berg G. G. eds. Springfield, C. C. Thomas, 1969; pp 245-257
- Takahashi N., Nagai, Y., Ueno S., Saeki, Y., Yanagihara T.** 1992. Human peripheral blood lymphocytes express D₅ dopamine receptor gene and transcribe the two pseudogenes. *FEBS* 314(1):23-25
- Takeuchi T., Eto K., and Tokunaga H.** (1989). Mercury level and histochemical distribution in a human brain with Minamata disease following a long-term clinical course of twenty six years. *Neurotoxicology* 10:651-658
- Tan X., Tang C., Castoldi Manzo L., and Costa L. G.** 1993. Effects of inorganic and organic mercury on intracellular calcium levels in rat lymphocytes. *J. Toxicol. Envir. Health.* 38:159-170
- Tanji, H., Araki, T., Nagasawa, H., Itoyama, Y.** (1999). Differential vulnerability of dopamine receptors in the mouse brain treated with MPTP. *Brain Res.* 824(2):224-234
- Tomas A. R., Karen M D., and Groudin L.** (1989). Distribution Monoamines and Metabolites in Rabbit Neostriatum, Hippocampus and Cortex. *Brain Res. Bull.* **23**:237-247
- Tunnicliff, G., and Wood, J.D.** (1973). Inhibition of mouse brain neurotransmitters enzymes by mercury compounds and a comparison with the effects of hyperbaric oxygen. *Comp Gen Pharmacol* 4:101-105
- Tuomisto J., and Komulainen H.** (1983). Release and inhibition of Uptake of 5-Hydroxytryptamine in blood platelets *in vitro* by Copper and Methylmercury. *Acta Pharmacol. et toxicol.*, **52**, 292-297
- Tsuzuki, Y. J.** (1982). Effects of methylmercury on different neurotransmitter systems in rat brain. *Toxicol Lett.* 13:159
- Tsuzuki, Y. J.** (1981). Effects of chronic methylmercury exposure on activities of neurotransmitter enzymes in rat cerebellum. *Toxicol Appl. Pharmacol.* 60; 379
- Uhl G. R., and Hartig P. R.** (1992). Transport explosion : update on uptake. *TiPS* 13 421-425
- Verity M. A., Brown W. J., Cheung, M., and Czer G.** (1977). Methylmercury inhibition of synaptosomes and brain slice protein synthesis- *in vivo* and *in vitro* studies. *J. Neurochem.*; **29**, 673-679
- Walum E.** (1982) Membrane lesion in cultured mouse neuroblastoma cells exposed to metal compounds. *Toxicology*; **25**, 67-74

RESULTS

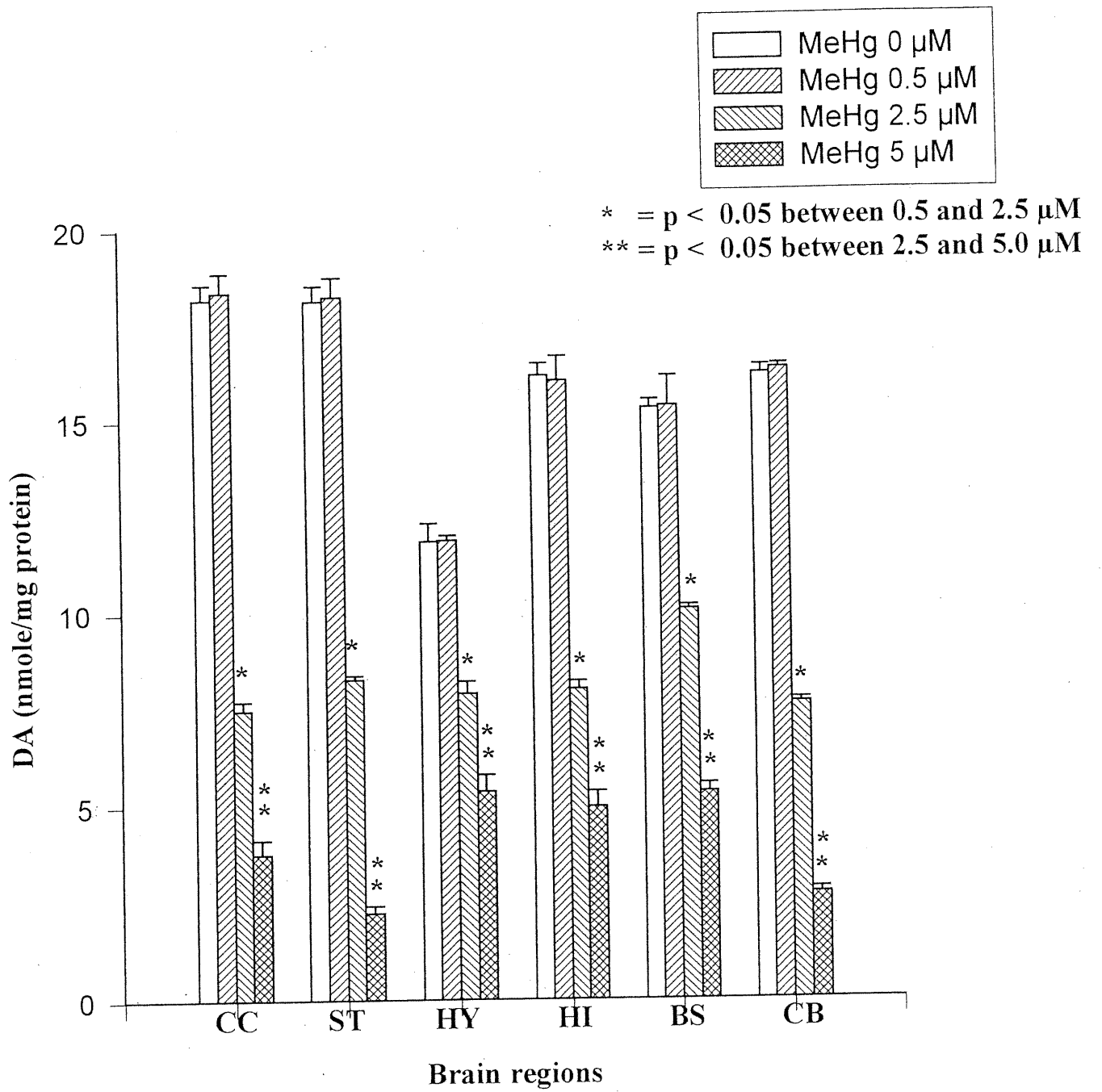


Figure 1: Inhibition of High Affinity Uptake of DA in brain synaptosomes following *in vitro* exposure to MeHgCl in rats. High Affinity Uptake of DA by synaptosomes from cerebral cortex (CC), striatum (ST), hypothalamus (HY), hippocampus (HI), brainstem (BS) and cerebellum (CB) were incubated with different concentration of MeHgCl (0, 0.5, 2.5 et 5 μ M) for 2 min incubation in Krebs-Henseleit bicarbonate buffer pH 7.4 at 37 °C. Data are means (n = 4) \pm S.D of the DA taken up in nmol/mg protein.

* Difference significant at $p < 0.05$ between 0.5 and 2.5 μ M,

* Difference significant at $p < 0.001$ between 2.5 and 5.0 μ M

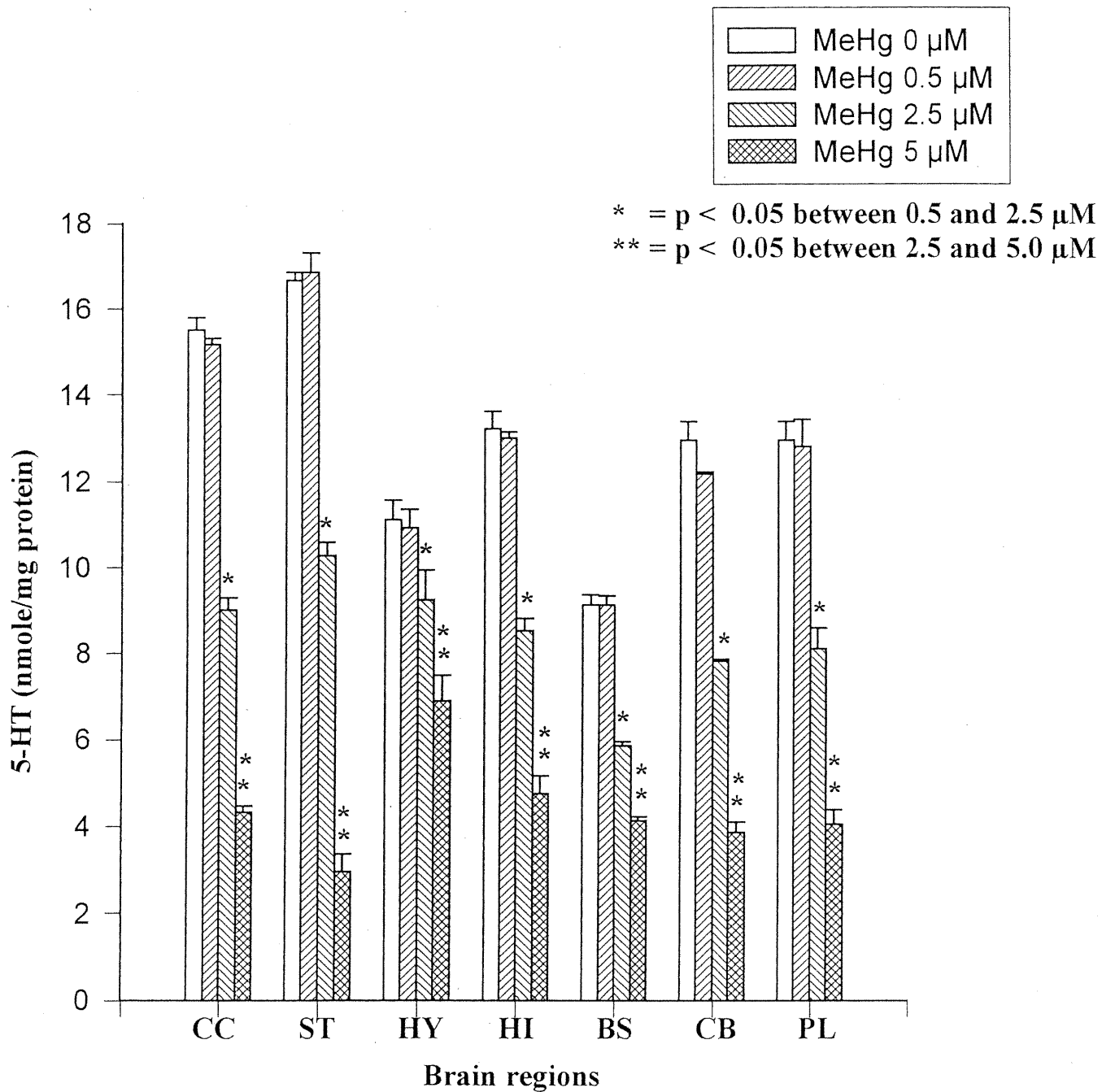


Figure 2: Inhibition of High Affinity Uptake of 5-HT in synaptosomes and platelets following *in vitro* exposure to MeHgCl in rats. High Affinity Uptake of 5-HT in synaptosomes from cerebral cortex (CC), striatum (ST), hypothalamus (HY), hippocampus (HI), brainstem (BS) and cerebellum (CB) and by blood platelets (PL) were incubated with different concentration of MeHgCl (0, 0.5, 2.5 et 5 μ M) for 2 min incubation in Krebs-Henseleit bicarbonate buffer pH 7.4 at 37 °C. Data are means (n = 4) \pm S.D of the 5-HT taken up in nmol/mg protein.

* Difference significant at $p < 0.05$ between 0.5 and 2.5 μ M,

** Difference significant at $p < 0.001$ between 2.5 and 5.0 μ M

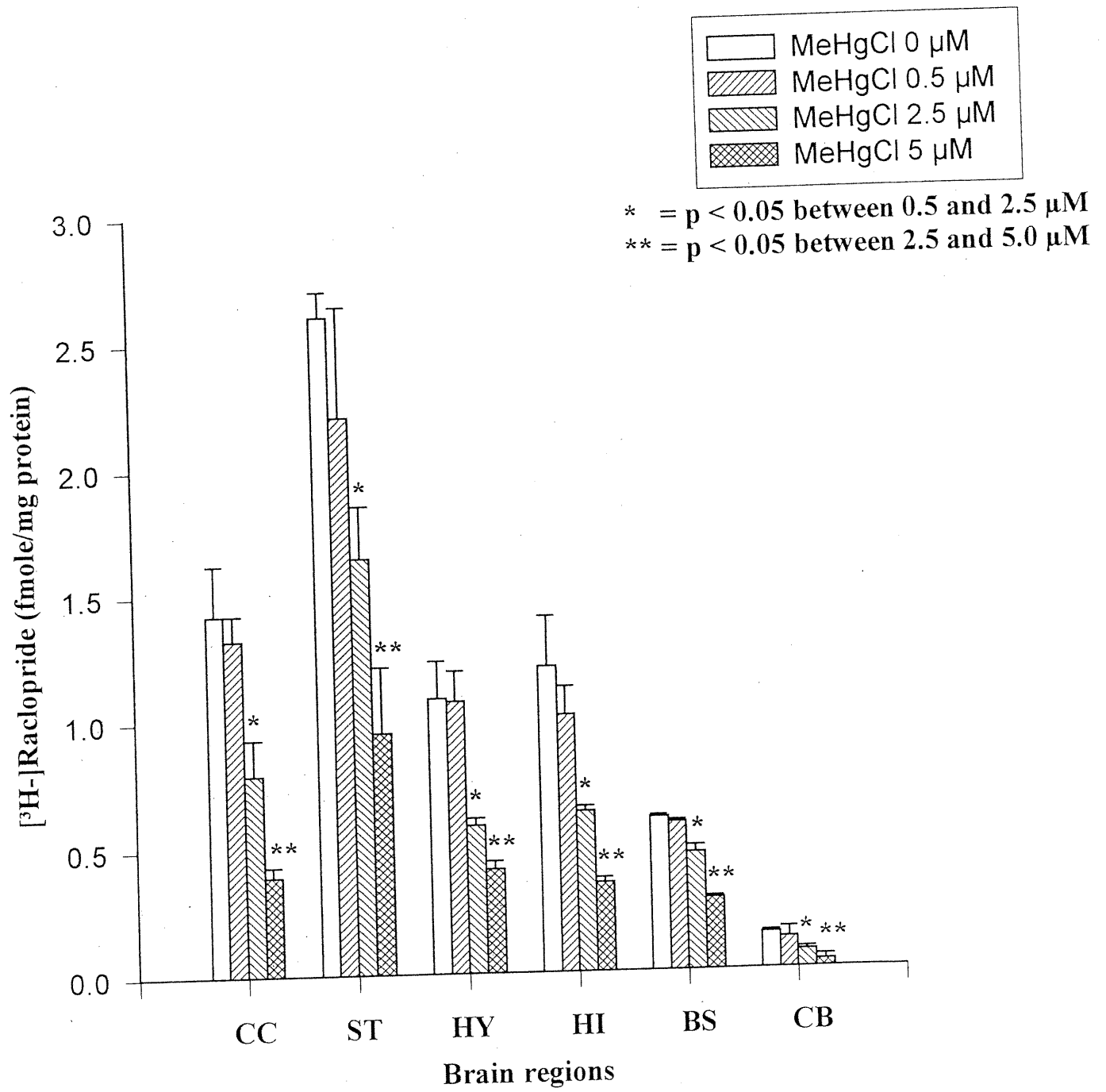


Figure 3: Effect of *in vitro* exposure to MeHgCl on [³H]Raclopride binding to dopaminergic D₂ receptors in synaptosomes from different rat brain regions and lymphocytes. [³H]Raclopride (D₂) binding were evaluated on synaptosomes from cerebral cortex (CC), striatum (ST), hypothalamus (HY), hippocampus (HI), brainstem (BS) and cerebellum (CB) and blood lymphocytes (LY) in presence of different concentrations of MeHgCl (0, 0.5, 2.5 et 5 µM). Data are means (n = 4) ± S.D of the [³H]raclopride (D₂) bound in fmol/mg protein.

* Difference significant at p < 0.05 between 0.5 and 2.5 µM

** Difference significant at p < 0.001 between 2.5 and 5 µM

Table: IC₅₀ of MeHgCl (μ M) for high affinity uptake DA and 5-HT, [³H]raclopride binding in synaptosomes from brain regions, lymphocytes and platelets in rats.

| | IC ₅₀ of MeHgCl (μ M) | |
|----|---------------------------------------|----------------|
| | DA | D ₂ |
| CC | 2.87 | 4.66 |
| ST | 3.69 | 3.65 |
| HY | 4.38 | 4.95 |
| HI | 3.32 | 4.31 |
| BS | 3.83 | 4.39 |
| CB | 2.91 | 3.14 |
| LY | ND | 6.53 |
| PL | ND | ND |

Note: IC₅₀ of MeHgCl was estimated from individual values of high affinity DA and 5-HT uptake and [³H]raclopride binding to D₂ receptors in synaptosomes from the cerebral cortex (CC), striatum (ST), hypothalamus (HY), hippocampus (HI), brainstem (BS), cerebellum (CB) of brain and blood lymphocytes (LY). High affinity DA uptake was not detected in blood lymphocytes under the present experimental conditions.

CHAPITRE 4:

EVALUATION OF CHOLINERGIC SYSTEM BOTH IN BRAIN AND LYMPHOCYTES FOLLOWING REPEATED ADMINISTRATION OF METHYLMERCURY CHLORIDE IN RATS

Kovana M. LOUA¹, Heather D. DURHAM², and Saroj K. CHAKRABARTI¹

¹Département de médecine du travail et d'hygiène du milieu, Faculté de médecine, Université de Montréal and ²Montreal Neurological Institute, Quebec, Canada. 2573 Côte Ste Catherine, H3T 1A8, Montreal;

Correspondence including reprint requests: Dr Saroj Chakrabarti
Département de Médecine du Travail et d'Hygiène du Milieu, Faculté de médecine, Université de Montréal; P.O. Box 6128, Main Station; Montreal, Quebec, H3C 3J, Canada
Tel: 514-343-5847; Fax: 514- 343-2200

To be submitted to Toxicological Sciences
(Formerly Fundamental and Applied Toxicology)

ABSTRACT

Modulation of certain central neurotransmitter systems by toxic chemicals may be reflected by similar changes in non neuronal tissues such as blood cells. This study was aimed to develop early biomarkers of methylmercury (MeHg) neurotoxicity by evaluating the effects of MeHg on the central cholinergic system as well as similar effects on circulating blood lymphocytes as surrogate neuron. To this end, the central cholinergic markers such as the activity of choline acetyltransferase (ChAT), binding to the muscarinic cholinergic receptors (mChRs), and the contents of acetylcholine (ACh) were measured in different brain regions, and the peripheral blood lymphocytes in adult male rats treated to MeHgCl (0, 2, 4 and 6 mg/kg/day) for 10 consecutive days. Animals were then sacrificed four days after the last dose of MeHgCl. The changes in these central cholinergic markers were correlated with those in the peripheral blood lymphocytes. The studies did not show overt toxicity in the treated rats at the highest cumulative dose level. However, significant body weight losses were observed in a dose dependent manner for rats treated with the cumulative doses of 40 and 60 mg/kg. Mercury accumulated in a dose dependent manner, in brain regions as follows: striatum > cerebral cortex (CR) > cerebellum (CB) > hypothalamus (HY) > hippocampus (HI) > brainstem (BS). MeHg was found to inhibit the activity of ChAT, decrease the contents of ACh, and reduce the [³H]-QNB binding to mChRs in the different brain regions, and these effects were dependent on the total mercury accumulated and the brain regions as well. The activity of ChAT was inhibited as follows: CB (50.44%), ST (45.42%), CR (41.68%), HI (52.61%), HY (36.43%), BS (38.90%) at 40 mg/kg, MeHg. At 60 mg/kg, MeHg was found to reduce the activity of ChAT such as: CB (78.70%), ST (75.10%), CR (73.92%), HI (71.86%), HY (59.47%), BS (64.97%). In addition, MeHg at 40 mg/kg decreased the ACh contents such as CB (18.03%), ST (17.24%), CR (19.42%), HI (13.66%), HY (21.81), BS (28.82%). Similarly MeHg at 60 mg/kg, reduced the contents of ACh as follows: CB (60.34%), ST (60.26%), CR (44.19%), HI (46.44%), HY (43.21%), BS (57.65%). MeHg at 40 mg/kg reduced the [³H]-QNB binding such as : CB (37.71%), ST (37.96%), CR (37.71%), HI (74.17%), HY (66.61), BS (72.28%). At 60 mg/kg, MeHg reduced the [³H]-QNB binding as follows: CB (68.07%), ST (56.72%), CR (57.41%), HI (66.78%), HY (56.32), BS (64.87%). Similarly, MeHg significantly reduced by 34.25% and 62.36% at 40 and 60 mg/kg cumulative doses in lymphocytes, respectively. Furthermore, the decrease of [³H]-QNB binding in different brain regions significantly correlated with similar changes in the peripheral blood lymphocytes. The study therefore suggests that the inhibition of mChRs binding to the peripheral blood lymphocytes may be used as a potential surrogate biomarker of the early changes occurring in the cholinergic neurotransmission system following short term repeated administration of MeHgCl in adult rats.

Key Words: MeHg, Biomarker, Neurotoxicity, Cholinergic neurotransmission system, Brain Regions, Peripheral Lymphocytes.

INTRODUCTION

Methylmercury (MeHg) has been considered as a ubiquitous environmental contaminant, which causes a human poisoning outbreaks through contaminated food consumption. MeHg affects particularly the central nervous system in both humans and animals. In human, signs and symptoms of MeHg neurotoxicity are dysarthria, fine tremor, mental unbalance such as inability to concentrate, forgetfulness, difficulties in learning and loss of memory (Marsh, 1994; Rice, 1996; Ratcliffe et al., 1996; Counter et al., 1998; Magos, 1998 ; Grandjean et al., 1997, 1998 ; Lebel et al., 1996, 1998 ; Dolbec et al., 2000). These effects may progress to ataxia (hindlimb crossing), paralysis and death (Hunter et al., 1940; Kurland et al., 1960; Tokuomi et al., 1961; Takeuchi et al., 1968; Bakir et al., 1973; Chang, 1977; Marsh, 1994; Rice, 1996; Ratcliffe et al., 1996; Counter et al., 1998; Magos, 1998) at high exposure levels. Similarly, MeHg at low chronic or repeated exposure levels, diminished motor and visual fonctions (Lebel et al., 1996, 1998 ; Dolbec et al., 2000), induces tremor (Beuter and Edwards, 1998), impairs learning and memory in human (Grandjean et al., 1997, 1998) and experimental animal (Rice, 1996; Beaudin et al., 1999a, b).

Estimation of such risk in human populations continues to be based only on measurements of biomarkers of mercury exposure, the mercury levels in blood and hair (IPCS, 1990). To this end, no satisfactory correlation was found between the levels of mercury in the blood and hair and the adverse effects of MeHg in the central nervous system. The major pitfall of such an approach is that the half-life of MeHg and its metabolite, inorganic mercury, in the central nervous is on the order of years (Takeuchi, 1989), compared to only 65 days in blood (IPCS, 1990). In addition, not all individuals or populations respond to the same extent for MeHg exposure. Moreover, emerging evidence indicates difficulties in establishing a correlation between mercury levels in blood and hair on the one hand, and the clinical or behavioral changes on the other hand (Cranmer et al., 1996; Ratcliffe et al., 1996; Counter et al., 1998; Grandjean et al., 1997, 1998). These data indicate that such approaches cannot identify individuals who are particularly sensitive to MeHg intoxication. Moreover, considerable damage can occur to the nervous system before the onset of any clinical signs and symptoms. Neurotoxic injury is thought to arise initially from one or more primary biochemical alterations through reversible cellular injury, to eventual irreversible cytotoxicity and permanent organ damage. Markers for

neurotoxicity should therefore be developed to provide reliable indicators of early-stage effects related to biochemical alterations that might precede irreversible cell damage. It is therefore, important to develop biomarkers of MeHg neurotoxicity that could detect early effects while they are still reversible. Based on the available data, it is possible to hypothesize that changes in some neurochemical parameters may account for some behavioral changes or clinical symptoms observed due to MeHg exposure. Therefore, a method complementary to using mercury levels in blood and hair should be developed to detect early effects of MeHg. Such biomarkers could serve to monitor human populations at risk of MeHg exposure before onset of any irreversible clinical symptoms.

Although mechanisms by which MeHg induces neurotoxic effects are not yet completely understood, available evidence indicate that MeHg interferes with the cholinergic neurotransmission in the central nervous system of experimental animals (Hardina et al., 1976; Okuda et al., 1978; Dwivedi et al., 1980; Kobayashi et al., 1980, 1981; Komulainen, 1989 for review; Cagiano et al., 1994; Zanolli et al., 1994). MeHg inhibits the activity of choline acetyltransferase (acetyl-CoA: Choline-O-acetyltransferase, E.C.2.3.1.6; ChAT), the enzyme catalysing the synthesis of Ach, while no effect was observed on the activity of acetylcholinesterase (Okuda et al., 1978; Dwivedi C et al., 1980; Kobayashi et al., 1980, 1981). Kobayashi et al., (1980) reported that i.p administration of MeHg (5 mg/kg) for 15 consecutive days to mice decreased ACh turnover and the activity of ChAT in cerebral cortex and striatum. In addition, Kobayashi et al., (1981) indicated that at the same exposure conditions (5 mg/kg for 14 consecutive days), MeHg decreased the spontaneous motor activity, cause rotarod dysfunction and induce hypothermia before an abrupt loss in body weight and appearance of overt signs in adult mice. These researchers suggested such behavioural changes were associated with inhibition of high affinity choline uptake. However, these studies did not measure cholinergic system in different brain regions nor behaviours such as learning and memory, which have been associated with the central cholinergic neurotransmission (Cooper et al., 1994). Moreover, MeHg inhibits muscarinic cholinergic receptors (mChRs) binding in offspring rat cerebral cortex following repeated administration of MeHgCl in their mothers (Cagiano et al., 1990; Zanolli et al., 1994). These studies were carried out in developing rats, and no such information is available in adult animals. In addition, inhibition of central cholinergic system following *in vivo* administration of MeHg in rat is supported by the results of *in vitro* studies where MeHg was

found to induce the spontaneous release of ACh, and decrease high affinity choline uptake. The studies also indicated that MeHg inhibits binding to mChRs and ChAT activity in whole homogenate or synaptosomes from rat brains (Komulainen, 1989 for review; Castoldi et al., 1996). Thus, although the above reports indicate that MeHg is able to impair the central cholinergic transmission, these studies did not evaluate effects of MeHg on the cholinergic system, e.g. the activity of ChAT, the contents of ACh and the mChRs binding in the central nervous system.

Several studies involving behavioural tasks such as impairment of motor activity, forgetfulness, learning and memory have been ascribed to the compensatory of the muscarinic receptors in the central nervous system (McDonald et al., 1988; Upchurch et al., 1987; Bushnell et al., 1991). MeHg has been shown to reduce alpha adrenoreceptor binding prior to the onset of any apparent clinical signs or histopathological change in treated rats (Lapierre et al., 1973; Sato and Nakamura, 1991). There is no data regarding effects of MeHg on the mChR binding associated to behaviour such learning and memory.

Furthermore, MeHg has been found to distribute and accumulate in the cerebrum, striatum, hypothalamus, hippocampus, brainstem and cerebellum in human (Takeuchi, 1989), monkey (Rice, 1989; Vahter et al., 1994) and rat (Moller-Madsen, 1994) following chronic or repeated exposure to MeHg. We have previously reported that, *in vitro*, MeHg significantly inhibited high affinity choline uptake and mChRs binding in synaptosomes from different brain regions (Loua et al., 1997). This suggests that alterations in central cholinergic neurotransmission system could serve as early biological markers for MeHg neurotoxicity. However, there is no available data of MeHg effects on cholinergic system in different brain regions following repeated administration of MeHgCl in adult rat.

Besides, measurement of cholinergic system in human brain is rather complicated and requires expensive tests and equipment, because of the inaccessibility of the brain tissue for sampling. In this regard, the circulating blood lymphocytes could satisfy these criteria, they are easily accessible. Several biochemical parameters of central neurotransmission are also present in blood cells. These included receptors (e.g. cholinergic muscarinic, dopaminergic and β -adrenergic in lymphocytes; α adrenergic, serotonergic receptors in platelets), enzymes (e.g. monoamine oxidase B in platelets, Na^+/K^+ -ATPase and cholinesterase in erythrocytes, cholinesterase and neurotoxic target esterase in lymphocytes, glutamine oxidase in serum). Also,

one can find uptake systems such as serotonin in platelets and dopamine in lymphocytes. On, Muscarinic cholinergic receptors (mChRs) have been identified on rat (Rabey *et al.* 1986; Maslinski *et al.*, 1988; Costa *et al.*, 1988) and human (Bronzetti *et al.*, 1996; Masuyama *et al.*, 1996) peripheral blood lymphocytes. In addition, modulation of mChRs on lymphocytes has been shown to reflect similar changes occurring in the central nervous system (CNS) due to disease, genetic and environmental factors such as chemical or pharmacological exposure (Stahl, 1985; Costa *et al.*, 1990; Fitzgerald and Costa, 1993; Masuyama *et al.*, 1996). For example, in Alzheimer patients, binding to mChRs are similarly reduced in brain (Mash *et al.*, 1985) and in the blood lymphocytes (Adem *et al.*, 1986; Rabey *et al.*, 1986). Also, exposure to neurotoxics such as pesticides, causes similar decreased of mChRs binding both in lymphocytes and different brain regions in adult rats (Costa *et al.*, 1990, Fitzgerald and Costa, 1993). In addition, we have demonstrated that following *in vitro* exposure, MeHg inhibits [³H]QNB binding to mChRs in synaptosomes from different brain regions and blood lymphocytes from adult rats (Loua *et al.*, 1997). The similar behavioural binding to mChRs in brain and lymphocytes suggests that mChRs on lymphocytes may be used to monitor changes in the central cholinergic system.

In view of the above considerations, the present investigation was therefore designed to develop peripheral surrogate biomarkers for the early effects of MeHg exposure following a short-term repeated administration of MeHgCl in adult rats. For these studies, activity of ChAT, ACh content and [³H]QNB binding to mChRs were measured in cerebral cortex, striatum, hypothalamus, hippocampus, brainstem and cerebellum of rat brain following repeated treatment with different doses of MeHgCl. Similarly, [³H]QNB binding was measured on the peripheral blood lymphocytes. The changes in the cholinergic parameters measured in different brain regions were then compared with [³H]QNB binding. Results from brain regions were then compared to [³H]QNB binding in blood lymphocytes, in order to find possible surrogate biomarkers for changes of central cholinergic neurotransmission due to MeHg.

MATERIEL AND METHODS

Chemicals

Methylmercury hydrochloride (MeHgCl; purity > 95%) was obtained from Alfa AESAR (A Johnson Matthey Company, MA, USA). Acetylcholine (ACh) chloride, choline (Ch) chloride, acetyl-CoA, eserine hemisulfate sodium salt and Tris base were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Atropine sulfate was obtained from ICN (Biochemical Inc. Aurora, Ohio). Hydroxy sodium hyperchlorate ($\text{NaClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) was obtained from Fisher Chemical Co (USA). Tritiated quinuclidinyl benzylate (^3H -QNB) (specific activity 52.3 Ci/mmol) was bought from Dupont (NEN/Dupont, Boston, MA). All other reagents were purchased from commercial source and were analytical grade.

Animals Treatments

Adult male Sprague Dawley rats purchased from Charles River (St Constant, Quebec) were used in these studies. Animals were individually housed in plastic cages with wood shavings for bedding. Room was maintained at 22 ± 2 °C with $40 \pm 4\%$ relative humidity and a 12hr/12hr (06:00 AM - 06:00 PM) light/dark cycle. Food (Purina Laboratory Chow) and demineralized water were allowed *ad libitum* during all experiments. After a period of 7 days of acclimation, rats (225-250 g body weight) were randomised and assigned to four groups of 6 rats each. These four groups were given 0, 2, 4 and 6 mg of MeHgCl /kg of body weight per day by gavage, for 10 consecutive days. This protocol was chosen because preliminary study from our laboratory had indicated that adult rats repeatedly exposed to MeHgCl, under these exposure conditions, manifested difficulties in learning and memory tasks only at 6 mg/kg/day for 10 consecutive days (Beaudin *et al.*, submitted). MeHgCl was administrated per os, between 8h30 - 9h30 Am, in a total volume of 4 ml of saline per kg body weight. During the experiment, animals were weighed every two days to adjust the exposure dose volume during treatment. All solutions were made in fresh demineralized water, and MeHgCl was dissolved in saline (0.9% NaCl) containing 2% of bovine serum albumin (fraction V). Albumin was added to reduce irritant effects of MeHg on the gastrointestinal tract in the animals. Earlier studies have shown that in rats, the peak concentration of MeHg in brain is reached 1 to 5 days after the last dose of repeated daily administration of MeHgCl (Magos and Butler, 1976; Magos *et al.*, 1978). Also using the same protocol, Beaudin *et al.*, (submitted) found significant changes in Morris Water Maze tasks from

rats treated with a cumulative dose of 60 mg/kg, 4 days after the last dosing. Thus, rats were sacrificed 4 days after the last dose, and the brain was quickly removed, placed on ice and frozen at -80°C . Mercury level in whole blood, ChAT activity and mChRs binding in lymphocytes were carried out on blood collected on an EDTA- Na_2 anticoagulant. Lymphocytes were separated from blood by using the Ficoll-Paque method (Pharmacia, 1989). The freshly isolated lymphocytes were lysed by ultracentrifugation, resuspended in the incubation medium, and conserved at -80°C until analysis of receptors binding. Certain aliquots of non-lysed lymphocytes were used to evaluate ACh content.

Measurement of acetylcholine (ACh)

ACh levels were measured in different brains regions and in lymphocytes by HPLC-ECD method using a Bioanalytical System (BSA) kit for Choline/ACh assays (Bioanalytical System, Inc., Lafayette, IN, USA). Animals were sacrificed by focal irradiation of microwave to the head with strength of 5 kW for 0.85 second by a microwave applicator (TMW-6402C, Muromachikikai, Co., Tokyo) to avoid breakdown of ACh by cholinesterase. After decapitation, the brain was isolated from the skull placed on ice and immediately frozen at -80°C for one hour. Thereafter, the brain was dissected out on ice into cerebral cortex, striatum, hypothalamus, hippocampus, brainstem and cerebellum. Tissues from each brain region were pooled and homogenized with a Polytron homogenizer (PT-10, Kinematica, Switzerland) in cold 0.2 M HClO_4 containing 1 μM of acetylthiocholine as a internal standard and 0.01% disodium EDTA. Homogenate was centrifuged at 10,000 g for 15 min at 4°C . The supernatant was filtered through a membrane filter (0.22 μm ; Millipore filter membrane). An 20 μl aliquot of the filtrate was injected into the HPLC-ECD system which consisted of a Hewlett Packard isocratic dual piston pump (Hewlett-Packard 1050 series of HPLC modules), an ACh/choline assay kit MF-8910 (the reactor or enzymatic and analytical columns, July, 1992; Bioanalytical System, Inc., IN., USA), and an amperometric electrochemical detector (EG&G Instruments, Princeton Applied Research EC, Model 400) equipped with a MP1298 platinum electrode. All this equipment was obtained from the Bioanalytical System (Bioanalytical System, Inc., IN., USA), and data were recorded using a Hewlett-Packard integrator (Hewlett-Packard 3396 series II Integrator). The mobile phase, which consisted of 0.05 M Tris base ($\text{pH } 8.5 \pm 0.05$), $\text{NaClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, and 5.0 ml 1% Kathon (BAS CF-2150), was filtered through a 0.2 μm nylon membrane filter (Millipore membrane) prior to use at

flow of 130 $\mu\text{l}/\text{min}$. ACh and the internal standard were converted in hydrogen peroxide on the reactor column before detecting on an electrode potential set at +500 mV against an Ag/AgCl reference electrode. Under these conditions, the retention times were 12.04 min for ACh and 13.53 min for acetylthiocholine.

Assay of choline acetyltransferase (ChAT) Activity

The activity of choline acetyltransferase (ChAT) was assayed in each brain region according to the method described by Kanedia and Nagatsu (1985). Briefly, brain tissue was homogenized in ice cold 25 mM phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.5% TritonX-100/g of wet tissue. The homogenate was centrifuged at 20,000 g for 60 min, and the activity of ChAT was assayed in the supernatant fluid. To end, 100 μl of a substrate mixture containing 5 mM choline chloride, 0.2 mM Acetyl-CoA, 0.1 mM eserine hemisulfate, 0.15 mM sodium chloride, and 10 mM EDTANa₂ in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) were added to 100 μl of homogenate and incubated at 37 °C for 20 min. The enzyme reaction was stopped by adding 50 μl of 1 M perchloric acid in ice. After 10 min, 6 μl of 1.0 μM of acetylthiocholine was added to the incubation medium as an internal standard, and the mixture was centrifuged at 1600 g for 10 min at 4 °C. The supernatant was filtered through a membrane filter (0.22 μm ; Millipore membrane filters). An aliquot of 20 μl of the filtrate was injected to the HPLC-ECD column and the ACh synthesized was analysed as described above. Protein concentration was assayed according to the method described by Bradford (1972), using bovine serum albumin (fraction V) as standard. The activity of ChAT in brain tissue was expressed in pmoles of ACh synthesized by ChAT per mg of protein per minute (fmoles/mg of protein/ 30 min).

β^3 -HJQNB Binding to Muscarinic Cholinergic Receptor (mChRs)

In mammalian brain, mChRs are more abundant than nicotinic cholinergic receptors (nChRs). In addition, in contrary to nChRs which are found only in humans blood lymphocytes (Mihovilovic et al., 1997), mChRs are also present in the circulating blood lymphocytes of both rats and humans (Hiemke et al., 1996). In view of these considerations, mChRs binding was assayed in different brain regions and lymphocytes using the method described by Costa et al., (1988). In brief, the membrane homogenate of each brain region and lymphocyte was pre-

incubated in a total volume of 1 ml containing 750 μ l of Tris buffer (pH 7.5) and 200 μ l of the membrane homogenate. The non specific antagonist radioligand [3 H]QNB (0.5 nM) was used to label the mChRs. After 60 min of incubation at 25 $^{\circ}$ C, the binding was terminated by rapid filtration (< 5 s) over GF/F glass filters (Millipore, USA). Filter was washed three times (<10 s) with 5 ml of cold buffer each and air-dried. Filters were then placed into scintillation vials and dissolved in 5 ml of liquid scintillation solution (Aquasol, NEN/Dupont, Boston, MA) for 24 hours. Radioactivity on the filters was quantified as total binding by liquid scintillation spectrometry (Liquid Scintillation Analyzer; 1500 Tri-Carb, Packard Canada) with 50-60% of efficiency. The non-specific binding was determined as the total binding in presence of 1 μ M atropine sulfate, a muscarinic antagonist. All incubations were done in quadruplicate, and the specific binding was calculated as the difference between the total binding minus the non-specific binding.

Measurement of the accumulated Mercury

Since in adult rats, more than 98% of the total mercury accumulated in the brain is in unchanged form following repeated exposure to MeHg (5 mg/kg/day) during 8 and 12 days, respectively (Suda *et al.*, 1989), we therefore measured total mercury in the present studies. Mercury accumulated in whole blood and brain regions was measured only as total mercury (MeHg plus inorganic mercury) by using the neutron activation method described by Kennedy (1990). The neutron activation method has been considered as reference method for mercury measurement (IPCS, 1990). The detection limit by this method is about 0.005 ppm of total mercury (0.005 ng/mg of fresh tissue), and the results are given in ng/ml of whole blood or ng/mg of brain wet tissue.

Statistics Analysis

Statistical analyses of the data were performed using the SPSS statistical package for personal computer. Changes in body weights were evaluated using repeated measure. Differences in means of ChAT activity, ACh content, mChRs binding and mercury accumulation were tested for significance between groups by ANOVA followed by the Scheffe or Tamhane's 2 tests when homogeneity of variance was assumed or not, respectively. Data represent means \pm SD (standard deviation) of four separate measurements, and the difference of $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Variations of Body weights

When adult rats were repeatedly treated with cumulative doses of 20, 40 and 60 mg/kg of MeHgCl for 10 consecutive day and sacrificed 4 days latter after the last dose, body weights changed as presented in **Figure 1**. Multiple post hoc comparison revealed that the body weights in rats treated with 40 and 60 mg/kg cumulative doses were significantly lower ($p < 0.02$), compared to those treated with 20 mg/kg and controls. At 20 mg/kg cumulative dose, body weights were increased by 34.60% compared to 42.49% in controls from day 1 to 14 (the day of sacrifice). At the cumulative dose of 40 mg/kg, body weights were increased from 0.47 to 3.90% from day 1 to day 8 during the dosing period. Thereafter, animals at this dose started to loose the body weight about 0.59% on day 14. On the other hand, the 60 mg/kg cumulative dose was found to decrease body weights by 12% of control value ($p < 0.002$) on day 14 post administration period. However, no clinical sign or symptoms of overt toxicity were observed in the treated groups when compared with the controls.

ChAT Activity

The effects of repeated administration of MeHgCl on the activity of choline acetyltransferase (ChAT) in different brain regions from adult rats are summarised in **Table 1**. The results indicate a statistically significant inhibition of the activity of ChAT at the cumulative doses of 40 and 60 mg/kg when compared to the group treated with the cumulative dose of 20 mg/kg and the control group. In the rats treated at a cumulative dose of 40 mg/kg, ChAT activity was inhibited in brain regions as follows: cerebellum > brainstem > hippocampus > hypothalamus > cerebral cortex > striatum relative to the rats treated to 20 mg/kg and control groups. At the highest cumulative dose (60 mg/kg), the activity of ChAT was inhibited in the following order: cerebellum > striatum > hippocampus > cerebral cortex > brainstem > hypothalamus, and these effects were about 66.61% to 78.70% ($p < 0.01$) relative to the cumulative dose of 40 mg/kg. A marginal (a non statistically significant) inhibition of the activity of ChAT was found in different brain regions of rats treated at a cumulative dose of 20 mg/kg, compared to the control group ($p > 0.05$). Under our experimental

conditions, we could not detect any activity of ChAT in peripheral blood lymphocytes of the adult rats.

ACh Content in Brain Regions

The ability of MeHg to alter the concentration of acetylcholine (ACh) in different brain regions of adult male rats after repeated administration for 10 consecutive days is presented in **Table 2**. A statistically significant decrease of ACh contents in the brain regions was observed relative to the control values, and this effect was dependent on the dose of MeHgCl and the brain region. In rats treated to 40 mg/kg cumulative dose of MeHgCl, ACh content were significantly reduced in different brain regions as follows: cerebellum > striatum > cerebral cortex > hippocampus > hypothalamus > brainstem. On the other hand, at a cumulative dose of 60 mg/kg of MeHgCl, ACh contents in brain regions were statistically significantly decreased as follows: striatum > cerebellum > cerebral cortex > hippocampus > brainstem > hypothalamus, compared to rats treated to 20 and 40 mg/kg cumulative doses ($p < 0.01$). No statistically significant difference in ACh contents was found in different regions at the cumulative dose of 20 mg/kg compared to the control group. We could not detect ACh in blood lymphocytes of adult rats under our experimental conditions.

Binding to mChRs

The specific [^3H]QNB binding to muscarinic cholinergic receptor (mChRs) was significantly inhibited in different brain regions and blood lymphocytes due to repeated treatment of adult rats with MeHgCl (**Table 3**). [^3H]QNB binding to mChRs was statistically significantly inhibited in different brain regions and in blood lymphocytes of rats treated with the cumulative dose of 40 and 60 mg/kg of MeHgCl. At 40 mg/kg cumulative dose of MeHgCl, [^3H]QNB binding to mChRs was significantly inhibited as follows: hippocampus > brainstem > cerebellum > striatum > cerebral cortex > hypothalamus, relative to 20 mg/kg cumulative dose and control ($p < 0.01$). A statistically significant inhibition of [^3H]QNB binding was found at the highest cumulative dose (60 mg/kg) and such inhibition follows the order: cerebellum > hippocampus > brainstem > striatum > cerebral cortex > hypothalamus when compared to 40 mg/kg group ($p < 0.01$). Similarly, MeHgCl at the 40 and 60 mg/kg cumulative doses, significantly decreased [^3H]-QNB binding to mChRs in the circulating lymphocytes when compared to control or to 20 mg/kg group ($p < 0.002$). Although at the cumulative dose of 20 mg/kg, MeHgCl inhibited [^3H]-QNB binding to mChRs in different brain

regions and blood lymphocytes, such effects were not statistically significant, relative to the control values.

Mercury Accumulation

Accumulation of total mercury in different brain regions and whole blood in adult rats treated with cumulative doses of 40 and 60 mg/kg of MeHgCl were measured and the results are presented in **Figure 2**. These results indicate that, in treated animals, mercury level was much higher in whole blood than in different brain regions of rats and such accumulation was found to be dose-dependent. Thus, in rats treated at a cumulative dose of 20 mg/kg of MeHgCl, total mercury was significantly higher in the cerebral cortex than that in control ($p < 0.003$). But at a cumulative dose of 40 mg/kg, total mercury was significantly and evenly accumulated in the striatum, hypothalamus, hippocampus, cerebral cortex and the cerebellum, whereas this accumulation was significantly lower in brainstem than that of control ($p < 0.03$). At the cumulative dose of 60 mg/kg, total mercury was significantly much higher in the striatum followed by cerebellum and cerebral cortex when compared to the other two lower doses ($p < 0.001$). Furthermore, accumulation of mercury in the latter regions was significantly higher than that in the hippocampus. Mercury accumulation in the later region was, in turn, higher than in the hypothalamus ($p < 0.02$). However in the whole blood, mercury accumulation was considerably much higher than in different brain regions.

Relationship between effects in brain regions and blood Lymphocytes

Pearson's correlation was used to seek relationship between effect of MeHg on [^3H]-QNB binding in different brain regions and in blood lymphocytes (**Figure 3**). Results show significant positive correlation ($r > 0.70$ for $p < 0.02$) between [^3H]-QNB binding in brain regions and peripheral blood lymphocytes. Furthermore, inhibition of [^3H]-QNB binding was also correlated with the decrease of ChAT activity and ACh content in different brain regions of rats (**Table 4**). All these effects were dependent on the mercury accumulated in brain regions and blood cells.

DISCUSSION

The present study has shown that short term repeated administration of MeHgCl is capable of disturbing cholinergic system not only in different brain regions but also in peripheral blood lymphocytes. Although previous studies have demonstrated that MeHg inhibits activity of choline acetyltransferase (ChAT) in rat brains (Okuda *et al.*, 1978; Dwivedi *et al.*, 1980; Tsuzuki, 1981; Omata *et al.*, 1982), the present study has provided complete dose and regional dependent related effects. Analysis of various discrete brain regions demonstrated that ChAT activity was more inhibited in the cerebellum followed by brainstem (Table 1) at the highest cumulative dose (60 mg/kg). The low activity of ChAT in the cerebellum may explain its greatest sensitivity to MeHg exposure (Kobayashi *et al.*, 1980; Takeuchi, 1989) compared to other brain regions with high ChAT activity (Cooper *et al.*, 1996). Inhibitions of ChAT activity, a specific marker for central cholinergic neurons, indicated that MeHg is capable of altering cholinergic neurotransmission in different brain regions of rats.

Previous reports have shown that subchronic and acute administration of MeHg decreased ACh contents in rat brains (Hrdina *et al.*, 1976; Okuda *et al.*, 1978). We found that this decrease depends both on the dose of MeHg and the brain region. The decrease in ACh contents in rat brain due to MeHg may be attributed to multiple effects. First, MeHg inhibits high affinity choline uptake, the rate limiting in the synthesis of ACh in the cholinergic neurons (Barker and Mittag, 1975; Simon *et al.*, 1976) in brain tissue preparations (Kobayashi, 1979, 80, 1981; Levesque *et al.*, 1992; Loua *et al.*, 1997). Secondly, MeHg inhibits also acetyl-CoA synthesis in the mitochondria of brain synaptosomes (Dwivedi *et al.*, 1980; Okuda *et al.*, 1978) and ChAT activity in rat brains (Hrdina *et al.*, 1976; Dwivedi *et al.*, 1980; Okuda *et al.*, 1978). Finally, MeHg can induce the spontaneous release of ACh from cholinergic neurons (Levesque *et al.*, 1992). Thus, by inhibiting the above regulatory processes of ACh synthesis, MeHg may significantly decrease ACh levels in different brain regions of rats, as observed in the present study.

In addition, this study is the first to report that short term repeated administration of MeHgCl to adult rats inhibited [³H]-QNB binding to mChRs in different brain regions. In brain regions, inhibition of [³H]-QNB binding was depending on the dose of MeHgCl and the brain

regions. The differential sensitivity among brain regions with regard to mChRs binding has been demonstrated (Aronstam *et al.*, 1978). MeHg induces reactive species in brain (Lebel *et al.*, 1990; Choi *et al.*, 1996; Yee and Choi, 1996), and these substances are able of altering structures and functions of cell membranes through lipid peroxidation (Chang, 1990). Also, studies have shown that lipid peroxidation can decrease [³H]-QNB binding in brain tissues (Donaldson and Labella, 1984). These effects may explain the decrease of mChRs binding on the cell surfaces both in brain regions and lymphocytes by MeHg.

Among the cholinergic markers evaluated in the present study, of ChAT activity was found to be the most sensitive to MeHg, based on the percent of inhibition. However, inhibition of [³H]-QNB binding in different brain regions and lymphocytes shows a paralleled statistically significant relationship. However, affinity of [³H]-QNB binding to mChRs has been found to be higher in brain compared to blood lymphocytes. In spite of the low affinity of mChRs in blood lymphocytes compared to brain tissue (Costa *et al.*, 1988, 1990; Loua *et al.*, 1997), [³H]-QNB binding to mChRs share most of its biochemical and pharmacological characteristics in both tissues (Costa *et al.*, 1988, 1990). Results of the present study agree with our previous report where *in vitro* exposure to MeHgCl (1 to 5 μ M) inhibited high affinity choline uptake and mChRs binding in synaptosomes from different brain regions and mChRs binding in lymphocytes (Loua *et al.*, 1997). In addition, it is demonstrated in Alzheimer's patients that mChRs binding is decreased both in lymphocytes (Rabey *et al.*, 1986; Eva *et al.*, 1988) and brain (Mash *et al.*, 1985; Araujo *et al.*, 1988). Results of the present study suggest that inhibition of mChRs binding to lymphocytes may reflect similar changes in brain regions following short term repeated exposure to MeHg in adult rats.

Number of studies have demonstrated an association between inhibition of the cholinergic markers evaluated in the present study and impairment of certain behavioural tasks such as learning and memory, and motor function in humans (Mash *et al.*, 1985; Rabey *et al.*, 1986; Adem *et al.*, 1986; Mesulam, 1995) and rats (Chrobak *et al.*, 1987; McDonald *et al.*, 1988; Altonen *et al.*, 1991; Day *et al.*, 1991; Llorens *et al.*, 1993; Olton *et al.*, 1994; Mesulam, 1995; Farkas *et al.*, 1996). For instance, administration of ethylcholine aziridinium ion (AF64A) and ibotenic acid in rats, severely impaired recent memory as assessed on radial arm maze (Altonen *et al.*, 1991; Chrobak *et al.*, 1988; Bartus *et al.*, 1985). In addition, impairment of recent memory by both compounds was accompanied by a profound inhibition of ChAT activity in the hippocampus and the cortical projection areas of the nucleus basalis magnocellularis in adult rats

(Chrobak *et al.*, 1988; Bartus *et al.*, 1985). These data support the hypothesis that compounds that inhibit or destroy cholinergic neurotransmission system in brain are likely to impair learning, memory and motor processes in the central nervous system (Olton *et al.*, 1994).

As mentioned earlier, epidemiological (Grandjean *et al.*, 1997, 1998; Ratcliffe *et al.*, 1996) and experimental (Kobayashi *et al.*, 1980; Sudo and Arito, 1982; Rice, 1996; Beaudin *et al.*, 1999a, b) data indicated that MeHg causes learning and memory deficits. However, only Kobayashi *et al.*, (1980) tried to explain changes of behavioural parameters in regard with alteration of cholinergic markers in brain due to MeHg. These researchers (Kobayashi *et al.*, 1981) found that MeHgCl (5 mg/kg for 15 consecutive days) impaired the spontaneous motor activity, rotarod and hypothermia behaviour in adult mice. These workers also suggest that changes of such behaviours resulted from a decrease of high affinity choline uptake which could decrease ACh contents in mice brain. However, Kobayashi *et al.*, extrapolated data from different protocols, an overt toxicity for the behavioural studies (Kobayashi *et al.*, 1980) and no sign of toxicity for ACh contents in mice brain (Kobayashi *et al.*, 1981).

On the other hand, with the same protocol used in the present study, Beaudin *et al.*, (1999a, b) have evaluated equilibrium behavior (rotarod), spontaneous locomotor and exploratory activity (open field), spatial reference (Morris task) and working memory (two choice water escape task) in adult rats. They evaluated these behavioural parameters from day 5 of the first dose of MeHgCl to day 30 post treatment period. In these conditions, Beaudin *et al.*, found that MeHg impaired the behavioural parameters evaluated and that such effects were dependent both on the dose of MeHgCl and the post administration period. Hence, the rotarod test was significantly decreased at the cumulative dose of 60 mg/kg of MeHgCl, day 7 after the first dosing as compared to other groups including the control ($p < 0.002$). Morris Water tasks were also significant delayed from day 4 of the post-treatment period at 60 mg/kg cumulative dose of MeHgCl when compared to the other treated groups including the control ($p < 0.002$). In one hand, both Morris Water tasks and the two choice water escape tests were significantly delayed only from day 19 after the last dosing in all treated groups. In contrast, the open field test did not significantly changed in any treated groups, suggesting that the locomotion and exploratory functions were not significantly affected in the treated rats. Our results show that at 60 mg/kg cumulative dose, MeHg significantly reduced ChAT activity, ACh contents and [^3H]QNB binding in different brain regions of rats. In addition, other studies have demonstrated that DA

and 5-HT are tough to modulate ACh neurotransmission in brain (Luebke et al., 1992; Day et al., 1993).

Concomitantly, our results further demonstrated that at 60 mg/kg cumulative dose, MeHg significantly inhibited the DA, NE and 5-HT neurotransmission markers in the same brain regions. Thus, changes in the behavioural parameters evaluated by Beaudin et al., may result from inhibition of the cholinergic markers measured in brain following exposure of rats to MeHgCl. This hypothesis is supported by the finding that perturbation of cholinergic neurotransmission by neurotoxics may caused behavioural changes in experimental animals (Chrobak et al., 1987; Mcdonald et al., 1988; Altonen et al., 1991; Bushnell et al., 1991; Day et al., 1991; Olton *et al.*, 1994; Mesulam, 1995; Farkas et al., 1996).

Although direct evidence for neurotoxics is missing for human, studies have shown that impairment of memory and learning is associated with alteration of cholinergic and monoaminergic systems in brain (Coyle et al., 1983; Adem et al., 1986). For instance, in Alzheimer's disease, which is characterized by impairment of memory, cholinergic markers such as ChAT activity and ACh contents are significantly reduced in cerebral cortex, striatum and hippocampus brain regions (Coyle et al., 1983; Adem et al., 1986). Thus, based on above information and evidence of epidemiological data, it is quite possible to speculate that changes in the cholinergic markers in human brain following exposure to MeHg may result, in part, to the memory deficits reported in the populations at risk for MeHg intoxication.

mChRs have been reported to be similarly modulated both in brain and blood lymphocytes in patients of mental diseases (Rabey *et al.*, 1986; Eva et al., 1988; Mash et al., 191985; Araujo et al., 1988). However, the life-span of peripheral blood lymphocytes is estimated to be only several months in rat (Klein, 1982; Little *et al.*, 1962; Robinson *et al.*, 1965). Because of this short life-span, mChRs on rats lymphocytes could only be good indicator in monitoring mChRs binding in rat brain following short term exposure to MeHg. In contrast, since the life-span of lymphocytes in human blood ranges from few months to 5 years (Carson, 1990), mChRs in human peripheral blood lymphocytes may be relevant for monitoring changes of brain cholinergic system following chronic exposure to MeHg.

In summary, the present study has demonstrated that short-term repeated administration of MeHg alters the cholinergic system in different brain regions and blood lymphocytes without any overt toxicity in adult rats. However, a part of mChRs binding, ChAT activity and ACh

contents could not be detected in lymphocytes under the same experimental conditions used in this study. The study therefore suggests that mChRs binding to peripheral blood lymphocytes could serve as a surrogate biomarker for the early monitoring of cholinergic system changes in adults rats brain following repeated administration of MeHgCl. However, additional studies are needed to assess temporal changes and recovery of mChRs binding in lymphocytes and different brain regions for the continuous monitoring during chronic exposure to MeHg and after cessation of such exposure. These data will further examine the suitability of mChRs lymphocytes as a potential surrogate biomarker for brain cholinergic system following repeated or chronic exposure to MeHg. This could serve as an early surrogate biomarker for MeHg neurotoxicity. In addition to mChRs, it is possible that the nicotinic cholinergic receptors (nChRs) may also be an important biomarker of neurotoxicity in human. This needs further investigation.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors express their acknowledge to Dr Tomas Reader for his helpful assistance in the dissection of brain region tissues method; to Anwar Malick for his assistance making tables; to Diane Talbot for her assistance. This work was supported by MRCC, Hydro-Québec, CEA and James Bay Committee on MeHg.

REFERENCES

- Adem A, Nordberg A., Bucht, G., and Winblad, B. (1986) Extraneural cholinergic markers in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Progr Neuro-Psychopharmacol. Biol Psychiat.* **10**, 247-257
- Altonen, M.; Riekkinen, P., Jr.; Sirviö, J.; Riekkinen, P. Jr. (1991). Effects of THA on passive avoidance and spatial performance in quisqualic acid nucleus basalis-lesioned rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **39**, 563-567
- Abd-Elfattah ASA, Shamo AE. (1981). Regeneration of functionally active rat brain muscarinic receptor by D-penicillamide after inhibition with MeHg and mercuric chloride. Evidence for essential sulfhydryl groups in muscarinic receptor binding sites. *Mol Pharmacol* **20**, 492-497
- Araujo, D. M., Lapchak, K. P., Robitaille Y., Gauthier S., and Quirion, R. (1988). Differential alteration of various cholinergic markers in cortical and subcortical regions of human brain in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **50**, 1914-1923
- Aronstam RS, and Eldefrawi ME. (1979). Transition and heavy metal inhibition of ligand binding to muscarinic ACh receptors from rat brain. *Toxicol Appl Pharmacol* **48**, 489-496
- Aronstam RS, Abood LG, Hoss W. (1978). Influence of sulfhydryl reagents and heavy metals on the functional state of the muscarinic ACh receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* **14**, 575-586

- Bakir F., Damluji S. F., Amin -Zaki, Murtadha M., Khalidi A., Al-Rwi N. Y., Tikriti S., Dhahir H. I., Clarkson T. W., Smith J. C., Dohery R. A., (1973). MeHg Poisoning in Iraq: An interuniversity report. *Science*. **181**, 230-241.
- Baraldi, M., Zanolli, P., Truzzi, C., Vaccari, G., and Veneri, C. (1993). Evidence that exposure to MeHg during gestation affects the opiate system in the brain of rat offspring. *Neuroendocrinol. Lett.* **15**, 301
- Beaudin S., Chakrabarti S. K., Doré F. Y., and Ptito M. (1999a). Exposure to methylmercury: Effects on behavior, learning and memory in juvenile rats. (*Submitted to Neurotoxicology and Teratology*)
- Beaudin S., Chakrabarti S. K., Doré F. Y., and Ptito M. (1999b). Exposure to methylmercury impairs motor coordination and water maze learning tasks in juvenile rats. (*Submitted to Behavioral Neuroscience*)
- Berlin, M., and Ullberg, S. (1963). Accumulation and retention of mercury in the mouse III: An autoradiographic comparison of MeHg dicyandiamide with inorganic mercury. *Arch. Environ. Health*. **6**, 610-616
- Berthoud, H. R., Garman, R. H., and Weiss, B. (1976). Food intake, body weight, and brain histopathology in mice following chronic MeHg treatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **36**, 19-30
- Beuter A., and Edwards R. (1998). Tremor in Cree subjects exposed to methylmercury: a preliminary study. *Neurotoxicol & Teratol.* **20(6)**:581-589
- Bondy SC, Agrawal AK. (1980). The inhibition of cerebral high affinity receptor sites by lead and mercury compounds. *Arch Toxicol* **46**, 249-256
- Bradford M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Bronzetti E., Adani O., Amenta F., Felici L., Mannino F., Ricci A. (1996). Muscarinic cholinergic receptors subtypes in human peripheral blood lymphocytes. *Neurosci. Lett.* **208(3)**, 211-215
- Bushnell PJ, Padilla SS, Ward T, Pope CN, Olszk VB. (1991). Behavioural and neurochemical changes in rats dosed repeatedly with diisopropylfluorophosphate. *J Pharmacol Exp. Ther* **256**, 741-750
- Cagianò, R., De Salvia M. A., Renna, G., Tortella, E., Braghiroli, D., Parenti, C., Zanolli, P., Baraldi, M., Anneau, Z., and Cuomo, V. (1990). Evidence that exposure to MeHg during gestation induces behavioral and neurochemical changes in offspring of rats. *Neurotoxicol. Teratol.* **12(1)**, 23-28
- Carson D. A. Composition and biochemistry of lymphocytes and plasma cells. In Williams Hematology. Ernest Beutler, Marshall A. Lichtman, Barry S. Coller and Thomas J. Kipps (eds.). Fifth ed. pp. 916-921. McGraw-Hill, Inc., New York, 1995.
- Castoldi A. F. Candura S. M.; Costa P.; Manzo L.; and Costa L. G. (1996). Interaction of Mercury Compounds with Muscarinic receptor Subtypes in the Rat brain. *Neurotoxicology* **17(3-4)**, 35-742
- Chang L. M., (1980), Mercury, In Spencer P. S., Schaumburg H. H., (eds.), Experimental and Clinical Neurotoxicology, Vol. 1, William & Wilkins, Baltimore, pp 508-526.
- Chang L. W., and Hartman, H. A. (1972). Electron microscopic histochemical study on the localisation and distribution of mercury in nervous system after mercury intoxication. *Exp. Neurol* **35**, 22-
- Chang L. W., and Hartman, H. A. (1972). Ultrastructural studies of the nervous system after mercury intoxication. I. pathological changes in the nerve cell bodies. *Acta Neuropath.* **20**, 122

- Chrobak J. J., Hanin I., Schmechel D. E., Walsh, T. J. (1987). AF64A- induced working impairment: behavioral, neurochemical and histopathological correlates. *Brain Res* **46**, 3107-117
- Clarkson TW. (1972). The pharmacology of mercury compounds. *Annu. Rev. Pharmacol.* **12**, 375-406.
- Cooper J.R., Bloom F. E., and Roth R. H., (1996). ACh, In *The Biochemical Basis of Neuropharmacology* (Cooper J.R., Bloom F. E., and Roth R. H., eds.), Seventh ed., pp. 194- 225, Oxford University Press, New York.
- Costa L. G., Peripheral models for the study of occupational health. In: Foa V. Emmett EA., Maroni M., Colombi A., eds. *Occupational and Environmental chemical hazards*. Chichester, UK: Ellis Horwood Ltd., 1987; 524-528
- Costa LG, Fox DA. (1983). A selective decreased of cholinergic muscarinic receptors in the visual cortex of adult rats following developmental lead exposure. *Brain Res* **276**:259-266
- Costa LG, Kaylor G, Murphy SD. (1988). Muscarinic cholinergic binding sites in rat lymphocytes. *Immunopharmacology* **16**, 139-149.
- Costa LG, Kaylor G, Murphy SD. (1990). In vitro and in vivo modulation of cholinergic muscarinic receptors in rat lymphocytes and brain by cholinergic agents. *Int. J Immunopharmacol* **12**, 67-75.
- Costa LG, Kaylor G, Murphy SD. (1988). Muscarinic cholinergic binding sites in rat lymphocytes. *Immunopharmacology* **16**, 139-149.
- Counter S. A., Buchanan L. H., Laurell G., and Ortega F. (1998). Blood mercury auditory neuro-sensory responses in children and adults in the Nambija gold mining area of Ecuador. *Neurotoxicology*. **19**(2), 185-196
- Dales, L. G. (1972). The neurotoxicity of alkyl mercury compounds. *Amer. J. Med.* **53**, 219-232.
- Day J, and Fibiger HC. (1993). Dopaminergic regulation of cortical ACh release: effects of dopamine receptors agonist. *Neuroscience*. **54**, 643-648
- Day J, Damsma G, and Fibiger HC. (1991). Cholinergic activity in the rat hippocampus, cortex and striatum correlates with locomotor activity: an vivo microdialys study. *Pharmacol Biochem Behav.* **38**, 723-729
- Dolbec J., Mergler D., Sousa Passos C.-J., Sousa de Morais S., and Lebel J. (2000). Methylmercury exposure affects motor performance of a riverine population of the Tapaj.: s river, Brazilian Amazon. *Int. Arch Occup Environ Health* **73** :195-203
- Dweveli C, Raghunathan R, Joshi BC, Foster HW. (1980). Effect of mercury compounds on ChAT. *Res Comm Chem Pathol Pharmacol.* **30**(2), 381-384
- Eva, C., Rocca, P., Perrero P., Bergamansco B., Ravizza L., and Genazzani, E. (1988). 3H-N-Methylscopolamine binding to human lymphocytes. A model to study cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease. *Pharmacol. Res Commun.* **20** (suppl. 1), 69-70
- Evans HL, Garman RH, and Weiss B. (1977). MeHg: Exposure Duration and Regional Distribution as determinants of Neurotoxicity in Nonhuman Primates. *Toxicol Appl Pharmacol* **41**, 15-33
- Farkas T., Korodi K., Toldi J. (1996). Muscarinic cholinergic effects on stimulus-evoked responses in rat primary somatosensory cortex. An electrophysiological study. *Act Biologica Hungarica* **47**(1-4), 113-118
- Fitzgerald BB, Costa LG. (1993). Modulation of Muscarinic receptors and acetylcholinesterase Activity in Lymphocytes and in Brain Areas following repeated organophosphate Exposure in Rats. *Fund Appl Toxicol* **20**, 210-216

- Glowinski J, Iversen L. L. (1966). Regional studies of catecholamines in the rat brain I. The disposition of [³H] norepinephrine, [³H] dopamine and [³H] dopa in various region of the brain. *J Neurochem* **13**, 655-669
- Grandjean P., Weihe P., White R. F., Debes F., Araki S., Yokohama K., Murata K., Sorensen N., Dhal R., and Jorgensen P. J. (1997). Cognitive deficit in 7 year old children with prenatal exposure to methyl mercury. *Neurotoxicol. Teratol.* **19(6)**, 417-428
- Grandjean P., Weihe P., White R. F., and Debes F. (1998). Cognitive performance of children prenatally exposed Safe levels of methylmercury. *Environ. Res.* **77**, 165-172
- Hiemke, C., Stolp, M., Reuss, S., Wevers, A., Reinhardt, S., Maelicke, A., Schlegel, S., and Schroder, H. (1996). Expression of alpha subunit genes of nicotinic of acetylcholine receptors in human lymphocytes. *Neurosci. Lett.* **214(2-3)**, 171-174
- Herken H., and Hocho F. (1994). Selective Neurotoxicity, Handbook of Experimental Pharmacology; Vol. 102. Springer-Verlag, New York.
- Hoskins, Betty B., and Hupp, E. W. (1978). MeHg effects in Rat, Hamster, and Squired Monkey: Lethality, Symptoms, Brain Mercury, and Amino Acids. *Env Res.* **15**, 5-19
- Hrdina, P. D., Peters, D. A. V., and Singhal, R. L. (1976). Effects of chronic exposure of cadmium, lead and mercury on brain biogenic amines in the rat. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **15**, 483-493
- Iverson, F, Downie, R. H., Trenholm, H. L., and Paul, C. (1974). Accumulation and Tissue Distribution of Mercury in the Guinea Pig during subacute administration of MeHg. *Toxicol Appl Pharmacol.* **27**, 60-69
- Jaarsama, D., Ruigrok T. J., Caffè R., Cozzari C., Levey A. I., Mugnaini E., Voogd J. (1997). Cholinergic innervation and receptors in the cerebellum. *Progr. Brain Res.* **114**, 67-96
- Kanedia, N., Nagatsu, T. (1985). Highly sensitive assay for ChAT activity by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr.* **341**, 23-30
- Kennedy, C. G. (1990). Trace Element determination in Polymers by Neutron Activation. In metallization of Polymers, ed. by E. Sacher, J.J. Pireaux, and S. P. Kowalczyk. American chemical Society, pp. 128-134 Washington.
- Kerlavage, A. R., Fraser, C. M., Venter, J. C. (1987). Muscarinic cholinergic receptor structure: molecular biological support for subtypes. *Trends Pharmacol Sci* **81**, 426.
- Kobayashi, H., Yuyama, A., Matsusaka, N., Takeno, K., and Yanagiya, I. (1979). Effects of MeHg chloride on various cholinergic parameters in vitro. *J. Toxicol. Sci.* **4**, 351-362.
- Kobayashi, H., Yuyama, A., Matsusaka, N., Takeno, K., and Yanagiya, I. (1980). Effect of MeHg on brain ACh concentration and turnover in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **54**, 1-8
- Kobayashi, H., Yuyama, A., Matsusaka, N., Takeno, K., Yanagiya, I. (1981). Neuropharmacological effect of MeHg in mice with special reference to the central cholinergic system. *Japan J Pharmacol.* **31**, 711-718
- Kobayashi, H., Yuyama, A., Ishihara M., Nutsusaka, N. (1987). Effects of Arsenic on cholinergic parameters in brain in vitro. *Neuropharmacology* **12**, 1707-1713
- Kobayashi, H, Yuyama, A, Tokonabe, Y, Matsusaka, N. (1982). Reversible effects of monothiol (D-penicillamine) and dithiol dimercaptosuccinic acid) chelating compounds on MeHg inhibited ChAT activity and high affinity uptake of choline. *Jap J Pharmacol* **32**, 655-663
- Komulainen, H. Neurotoxicity of MeHg: Cellular and subcellular aspects, In; Metal neurotoxicity. Bondy SC, Prasad KN. eds., CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 1988, pp 167-182
- Komulainen, H., and Bondy, S. C. (1987). Increased free intrasynaptosomal Ca²⁺ by neurotoxic organometals: Distinctive mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol.* **88**, 76-86

- Komulainen, H., and Tuomisto, J. The neurochemical effects of MeHg, In: The toxicity of MeHg, Eccles C., Annau Z., eds., Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1987, pp 173-185
- Kutsuna, M. Minamata diseases: Study groups of Minamata diseases. Japan: Kumamoto University, 1968, pp. 1-4.
- Kung, M. P., Kostyniak, P. J., Olson, J. R., Sansone, F. M., Nickerson, P. A., Malone, M. A., Ziembiec N., Roth, J. A. (1989). Cell specific enzyme markers as indicators of neurotoxicity: Effects of acute exposure to methylmercury. *Neurotoxicology* **10**, 41-52
- Lapierre Y, Beaudet A, Demianczuk N, et al. 1973. Noradrenergic axon terminals in the cerebral cortex of rat. II: Quantitative data related by light and electron microscopic radioautography of the frontal cortex. *Brain Res.* **63**:175-
- Lebel, C. P., Ali, S. F., McKee, M., and Bondy, S. C. (1990). Organo-metal induced increases in Reactive Oxygen Species: The potential of 2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate as an Index of Neurotoxic Damage. *Toxicol Appl Pharmacol.* **104**, 17-24
- Lebel J., Mergler D., Lucotte M., Amorim M., Dolbec J., Miranda D., Arantès G., Rheault I., Pichet P. (1996). Evidence of early nervous system dysfunction in Amazonian populations exposed to low-levels of methylmercury. *Neurotoxicology.* **17**:157-168
- Lebel J., Mergler D., Branches F., Lucotte M., Amorim M., Laribe F., Dolbec J. (1998). Neurotoxic effects of low-level methylmercury contamination in the Amazonia basin. *Environ. Res.* **79**:20-32
- Levesque, P. C. Hare, M. F. and Atchison, W. D. (1992). Inhibition of Mitochondrial Ca^{2+} release diminishes the effectiveness of methyl mercury to release ACh from synaptosomes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **115**, 11-20
- Little, J. R., Brecher, G., Bradley, T. F., Rose, S. (1962). Determination of lymphocytes turnover by continuous infusion of 3H -thymidine. *Blood* **19**, 236
- Loua K. M., Chakrabarti K. S., Heather D., and Panisset J. C. (1997). Effects of methylmercury on the uptake of dopamine, choline and serotonin by and the binding to receptors in rat brain synaptosomes, lymphocytes and platelets. *Fund Appl Toxicol. Suppl.* **36 (1)** Part 2:68 (351)
- Luebke JI, Greene RW, Semba K, Kamondi A, McCartney RW, Reiner PB. (1992). Serotonin hyperpolarizes cholinergic low threshold burst neurons in the rat laterodorsal tegmental nucleus in vitro. *Proc Natl Acad. Sci USA.* **89**, 743-747
- Lundgren G., Karlén B., Holmstedt B. (1977). ACh and choline in mouse brain- influence of peripheral acting cholinergic drugs. *Biochem. Pharmacol.* **26**, 1607-1612
- Magos L. (1998). Three cases of MeHg intoxication which eluded correct diagnosis. *Arch Toxicol* **72**, 701-705
- Magos, L., Peristianis G. C., and Snowden, R. T. (1978). Postexposure preventive treatment of methylmercury intoxication in rats with dimercaptosuccinic acid. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **45**:463-475
- Magos, L., and Butler W. H. (1976). The kinetics of methylmercury administered repeatedly to rats. *Arch Toxicol* **35**:25-39
- Mash DC., Flynn DD., and Potter L. T. (1985). Loss of M_2 receptors in cerebral cortex in Alzheimer's disease and experimental cholinergic denervation. *Science* **228**:1115-1117
- Masuyama, K., Uno, K., Minoda, R., Eura, M., Samejima, Y., and Ishikawa, T. (1996). Muscarinic Acetylcholine receptors on human lymphocytes in patients with Meniere's disease. *Acta Oto-Laryngologica*, **116**(3):369-373
- Mcdonald B. E, Costa L. G, Murphy S. D. (1988). Spatial memory impairment and central muscarinic receptor loss following prolonged treatment with organophosphates. *Toxicol Lett*; **40**:47-56

- Mesulam M-M. Structure and Function of Cholinergic Pathways in the Central Cortex, Limbic System, Basal Ganglion, and Thalamus of the Human Brain. In *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*, eds. Floyd E Bloom and David J. Kupfer. Raven Press, Ltd, new York 1995. Chter 12; pp 135-146
- Mihovilovic M., Denning S., Mai Y., Whichard L. P., Patel D. D., and Roses A. D. (1997). Thymocytes and cultured thymic epithelial cells express transcripts encoding alpha-3, alpha-5 and beta-4 subunits of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: preferential transcription of the alpha-3 and beta-4 genes by immature CD4+8+ thymocytes. *J. Neuroimmunology*, 79(2):176-184
- Minnema D., Cooper P. G., and Greenland D. R. (1989). Effects of MeHg on neurotransmitter release from rat brain synaptosomes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 99, 510-521.
- Moller-Madsen B. (1994). Localisation of Mercury in CNS of rat: An Autometallographic Study. *Pharmacology & Toxicology*. 75 (Suppl.1), 1-41
- Olton D. S., and Markowska, A., L. (1994). Memory and Hippocampal Function as Targets for Neurotoxic Substances. *Neurotoxicology* 15(3):439-444.
- Okuda J, Tsuzuki Y, Yamada T. (1978). Some neurochemical changes in the brain of rats with acute intoxication of MeHg chloride. *Jap J Legal Med*; 32(2):51-58.
- Omata S. et al. (1982). MeHg induced changes in the activities of neurotransmitter enzymes in nervous tissues of the rat. *Arch Toxicol*; 51:285-294.
- Omata S, Horgone T, Momose Y, Kambayashi M, Moshizuki M, Sugano H. (1980). Effect of MeHg chloride on the in vivo rate of protein synthesis in the brain of rat: Examination with the injection of a large quantity of (¹⁴C)valine. *Toxicol Appl Pharmacol* 56:207-
- Donaldson J., and Labella F. S. (1984). The effects of manganese on the cholinergic receptor *in vitro* and *in vivo* may be mediated through modulation of free radicals. *Neurotoxicology* 5(1) : 105-112
- Pharmacia Biotech (1989). Ficoll-Paque for in vitro isolation of Lymphocytes, USA.
- Prakash N. J., Fontana J., and Henkin R. I. (1973). Effect of transitional metal ions on Na⁺/K⁺ APTase Activity and the uptake of Norepinephrine and Choline by brain synaptosomes. *Life Sci.* 12 (1):249-259.
- Rabey J.M., Shenkman, L., and Gilad, G. M. (1986). Cholinergic muscarinic binding by human lymphocytes: Changes with ageing, antagonist treatment and senile dementia of the Alzheimer type. *Ann. Neurol.* 20, 628-631
- Ratcliffe H. E., Swanson G. M. and Fisher L. J. (1996). Human exposure to mercury: Critical assessment of the evidence of adverse health effects. *J. Toxicol. Environ. Health* 49, 221-270
- Rice, D. C. (1989). Brain and tissue levels of mercury after chronic methylmercury exposure in the monkey. *J. Toxicol. Environ. Health* 27, 189-198
- Rice, D. C. (1996). Sensory and cognitive effects of developmental methylmercury exposure in monkeys, and a comparison to effects in rodents. *Neurotoxicology*. 17(1), 139-154
- Riekkinen, P., Jr Sirviö, J., Riekkinen, M., Riekkinen, P. (1991). Effects of THA on passive avoidance retention performance of intact, nucleus basalis + frontal cortex lesioned rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 39, 841-846
- Robinson, S. H., Brecher, G., Lourie, I. S., Haley, J. E. (1965). Lymphocytes labelling in rats during and after continuous infusion with tritiated thymidine. *Blood* 26:281
- Rodgers DA, Soliman MRI, Ali SF. (1994). Effects of mercuric chloride administration on receptor binding in various rat brain region. *Neurotoxicology*. 15(4), 967

- Sarafian T. (1984). In vitro MeHg inhibition of protein synthesis in neonatal cerebellar perikarya. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 10, 85-92.
- Sato T, and Nakamura Y. Neuropathology of MeHg intoxication. In: Advances in mercury Toxicology, Edited by Suzuki et al. pp. 335-366., Plenum Press, New York 1991
- Sharma RP. ET al. (1982). MeHg induced alterations in brain amine syntheses in rats. *Toxicology Letter.* 13, 195-201
- Skerfving S. Exposure to mercury in the population; In Advances in mercury Toxicology, pp 411-425; eds. by Tsuzuki et al. Plenum, New York, 1991
- Somjen G. C., Herman S. P., Klein R., Brubaker P. E., Briner, W. H., Goodrich J. K., Krigman M. R., and Haseman J. K. (1973). The uptake of MeHg (203)Hg in different tissues related to its neurotoxic effects. *The J. Pharmacol. Exp. Ther.* 187(3), 602-611
- Suda, I., Eto, K., Tokunaga H., Furusawa R., Suetomi K., and Takahashi, H. (1989). Different histochemical finding in the brain produced by mercuric chloride and MeHg chloride in rats. *Neurotoxicology* 10, 113-126
- Sudo A, Arito H. (1982). Neurochemical correlates of sleep disorder of rats administered with MeHg chloride. *Ind Health* 20, 67-70
- Suzuki T., and Miyama, T. (1971). Neurological symptoms and mercury concentration in the brain of mice fed with MeHg salt. *Industr. Health.* 9, 51-58
- Syversen, T.L.M. (1974). Biotransformation of Hg-203 labelled methyl mercuric chloride in rat brain measured by specific determination of Hg²⁺. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 35, 277-283
- Takeuchi T., Eto K., Kinjo Y., and Tokunaga H. (1996). Human Brain disturbance by MeHg Poisoning, Focusing on the long term effect on brain weight. *Neurotoxicology* 17(1), 187-190,
- Takeuchi T, Eto K. (1975). Chronic occurrence from pathological viewpoints. In: Tsubaki T, ed.: Studies on the health effects of alkylmercury in Japan. Environment Agency, Japanese Government. 28-62
- Traxinger DL, Atchison WD. (1987). Reversal of MeHg induced block of nerve-evoked release of ACh at the neuromuscular junction. *Toxicol Appl Pharmacol* 90, 23-33
- Tsubaki T, and Takahashi H. Recent advances in Minamata diseases studies. 1986, Tokyo, Japan: Kodansha, Ltd.
- Tsuzuki YJ. (1982). Effect of MeHg exposure on different neurotransmitter system in rat brain. *Toxicology Lett* 13, 159-162
- Tsuzuki YJ. (1981). Effect of chronic MeHg exposure on activities of neurotransmitters enzymes in rat cerebellum. *Toxicol Appl Pharmacol* 60, 379-381
- Vahter M., Monett N. K., Friberg L., Lind B., Shen D. D. Burbacher T. (1994). Speciation of mercury in the primate blood and brain following long term exposure to methylmercury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 124, 221-229
- Verity MA, Brown WJ, and Cheung M, (1975). Organic mercurial encephalopathy: In vitro and in vivo effects of MeHg on synaptosomal respiration. *J Neurochem.* 25, 759-765
- Von Burg R, Northington EK, Shamoo A. (1980). MeHg inhibition of rat brain muscarinic receptors. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 53, 285-292.
- IPCS (1990). Environmental Health Criteria 101: Methylmercury, Geneva, IPCS, World Health Organisation, 144 pp.
- Zanoli P., Truzzi C., Veneri C, Braghiroli D, Baraldi M. (1994). MeHg during late gestation affects temporarily the development of cortical muscarinic receptors in rat offspring. *Pharmacol & Toxicol* 75, 261-264
- Zimmer L, Cater DE. (1979). Effects of complexing treatment administered with the onset of MeHg neurotoxic signs. *Toxicol Appl Pharmacol* 51, 29-38

RESULTS

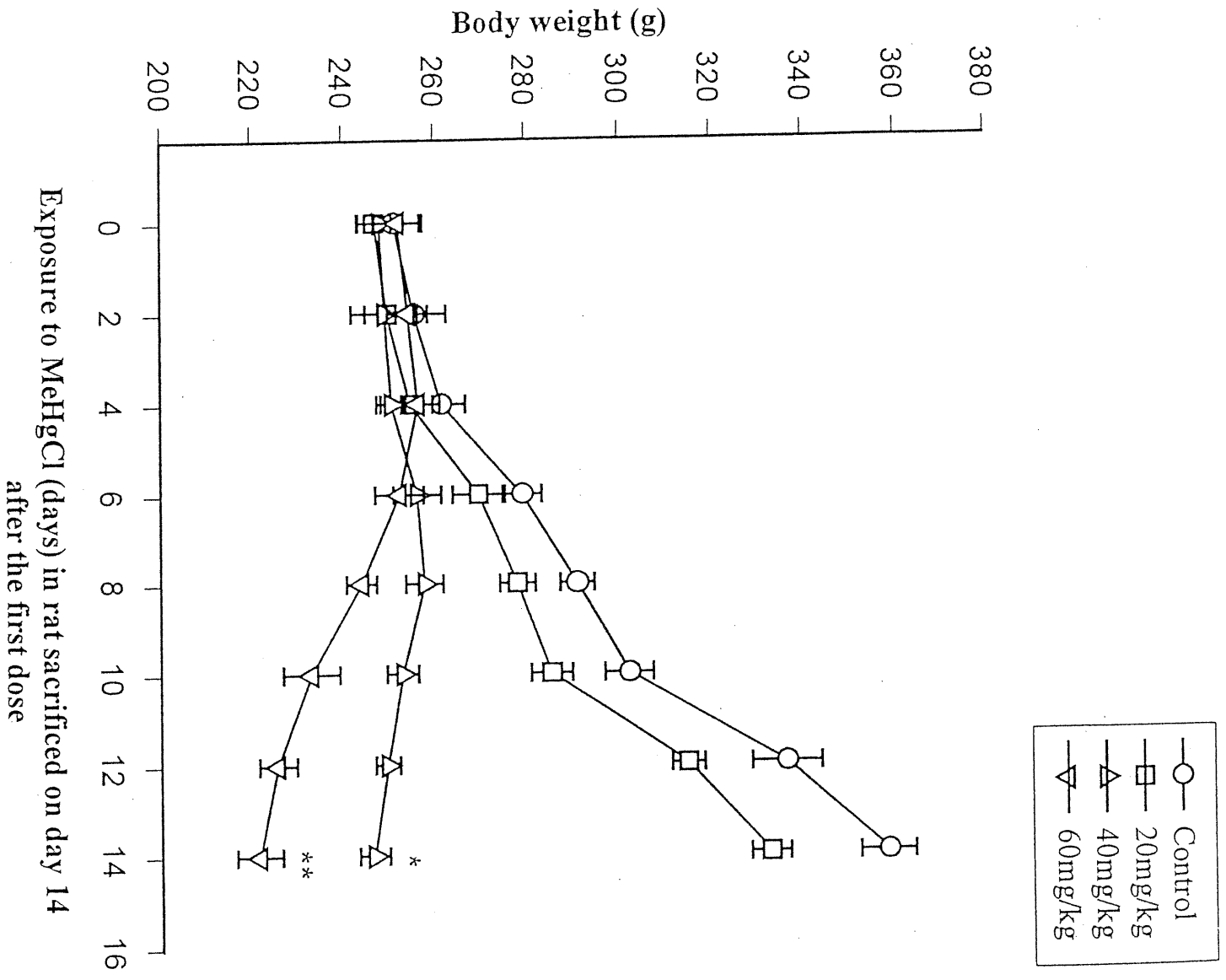


Figure 1. Variation of body weight (BW) in adult rats treated to MeHgCl. Adult male SD rats were repetitively treated with the cumulative doses of 20, 40 and 60 mg/kg of MeHgCl for 10 consecutive days. Body weights were measured every two days from day 0 to 14, and animals were sacrificed 4 days after the last dose of MeHgCl. Means \pm SD in 6 rats per groups (g of body weight).

* Difference significant at $p < 0.05$ versus 0 and 2 mg/kg;

** Difference significant at $p < 0.01$ versus 4 and 2 mg/kg

Table 1: Inhibition of ChAT activity in brain regions of adult rats repeatedly treated to MeHgCl

| | Control | 20mg/kg | 40 mg/kg | 60 mg/kg |
|----|------------------|-------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| CC | 3776.25 ± 105.99 | 3669.51 ± 75.31(2.83) | 2202.29 ± 64.30(41.68) ^a | 984.91 ± 19.72(73.92) ^b |
| ST | 4895.44 ± 71.65 | 4846.54 ± 70.11(1.00) | 2671.90 ± 59.78(45.42) ^a | 1220.94 ± 55.52(75.10) ^b |
| HY | 539.05 ± 34.10 | 497.74 ± 12.47(7.66) | 342.67 ± 37.76(36.43) ^a | 219.03 ± 8.72(59.47) ^b |
| HI | 2336.71 ± 85.51 | 2146.56 ± 180.59(8.14) | 1107.63 ± 145.11(52.60) ^a | 657.50 ± 15.41(71.86) ^b |
| BS | 1417.57 ± 63.52 | 1088.66 ± 142.98(23.20) | 866.140 ± 67.37(38.90) ^a | 496.57 ± 31.18(64.97) ^b |
| CB | 238.50 ± 17.76 | 200.37 ± 13.82(15.99) | 118.19 ± 5.94(50.44) ^a | 50.80 ± 2.44(78.70) ^b |
| LY | ND | ND | ND | ND |

Note: Means ± S.D. (fmol/mg protein/30 min), N = 6. Numbers in parenthesis are percents of the effects compared the control values;

^a Significantly different from 20 mg/kg (p < 0.02)

^b Significantly different from 40 mg/kg (< 0.001)

Adult male SD rats were repetitively treated to MeHgCl (cumulative doses of 20, 40 and 60 mg/kg) for 10 consecutive days, and were sacrificed 4 days after the last dose. Effects MeHg on choline acetyltransferase (ChAT) activity in the cerebral Cortex (CC), striatum (ST), hypothalamus (HY), hippocampus (HI), brainstem (BS) and the cerebellum (CB) and in the blood lymphocytes (LY). ND = Not detected

Table 2: Changes in ACh concentration in brain regions of adult rats following repeated treatment to MeHgCl.

| | Control | | | MeHg | | |
|----|----------------|----------------------|------------------------------------|------------------------------------|----------|----------|
| | 20mg/kg | 40 mg/kg | 60 mg/kg | 20mg/kg | 40 mg/kg | 60 mg/kg |
| CC | 218.44 ± 5.35 | 222.90 ± 16.81(2.04) | 176.01 ± 6.03(19.42) ^a | 122.03 ± 5.40(44.14) ^b | | |
| ST | 954.50 ± 25.56 | 971.34 ± 88.71(1.76) | 789.93 ± 60.61(17.24) ^a | 379.36 ± 17.4(60.26) ^b | | |
| HY | 109.82 ± 6.57 | 117.27 ± 7.30(6.78) | 85.87 ± 2.83(21.81) ^a | 62.37 ± 3.60(43.21) ^b | | |
| HI | 360.34 ± 4.10 | 381.26 ± 13.45(5.81) | 311.10 ± 18.50(13.66) ^a | 193.01 ± 14.82(46.44) ^b | | |
| BS | 182.29 ± 5.27 | 186.60 ± 8.60(2.36) | 129.76 ± 6.7(28.82) ^a | 77.20 ± 7.61(57.65) ^b | | |
| CB | 58.85 ± 2.28 | 68.66 ± 3.86(16.67) | 48.24 ± 3.10(18.03) ^a | 23.34 ± 3.45(60.34) ^b | | |
| LY | ND | ND | ND | ND | | |

Note: Means ± S.D (fmol/mg protein/30 min). N = 6. Numbers in parenthesis are percents of the effects compared the control values;

^a Significantly different from 20 mg/kg (p < 0.02)

^b Significantly different from 40 mg/kg (< 0.001)

Adult male SD rats were repetitively treated to MeHgCl (cumulative doses of 20, 40 and 60 mg/kg) for 10 consecutive days, and were sacrificed 4 days after the last dose. Effects of MeHg on the ACh content in the cerebral Cortex (CC), striatum (ST), hypothalamus (HY), hippocampus (HI), brainstem (BS) and the cerebellum (CB) and in the blood lymphocytes (LY). ND = Not detected.

**Tableau 3: Inhibition of [³H]-QNB binding to mChRs
in brain regions and blood lymphocytes in adult rats
treated to MeHgCl**

| | Control | 20mg/kg | 40 mg/kg | 60 mg/kg |
|----|------------------|------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| CC | 793.89 ± 15.90 | 724.27 ± 51.91(8.77) | 494.51 ± 28.10(37.71) ^a | 338.14 ± 35.64(57.41) ^b |
| ST | 1071.22 ± 109.77 | 892.54 ± 34.27(16.68) | 664.63 ± 54.95(37.96) ^a | 463.58 ± 37.57(56.72) ^b |
| HV | 726.45 ± 53.50 | 674.10 ± 51.20(7.21) | 489.73 ± 36.82(32.59) ^a | 317.315 ± 26.17(56.32) ^b |
| HI | 907.98 ± 50.91 | 737.47 ± 95.29(18.78) | 476.10 ± 11.67(47.56) ^a | 301.62 ± 31.10(66.78) ^b |
| BS | 510.06 ± 10.22 | 444.768 ± 55.83(12.80) | 261.84 ± 7.92(48.66) ^a | 179.19 ± 9.92(64.87) ^b |
| CB | 111.04 ± 14.10 | 84.77 ± 10.41(23.66) | 62.31 ± 5.58(43.89) ^a | 35.46 ± 5.14(68.07) ^b |
| LY | 88.56 ± 4.52 | 84.84 ± 8.46(4.20) | 58.23 ± 4.28(34.25) ^a | 33.33 ± 4.39(62.36) ^b |

Note: Means ± S.D. (fmol/mg protein/30 min). N = 6. Numbers in parenthesis are percents of the effects compared to the control values;

^a Significantly different from 20 mg/kg (p < 0.02)

^b Significantly different from 40 mg/kg (< 0.002)

Adult male SD rats were repetitively treated to MeHgCl (cumulative doses of 20, 40 and 60 mg/kg) for 10 consecutive days, and were sacrificed 4 days after the last dose. Effects of MeHg on [³H]-QNB binding in the cerebral Cortex (CC), striatum (ST), hypothalamus (HV), hippocampus (HI), brainstem (BS) and the cerebellum (CB) and in the blood lymphocytes (LY). ND = Not detected

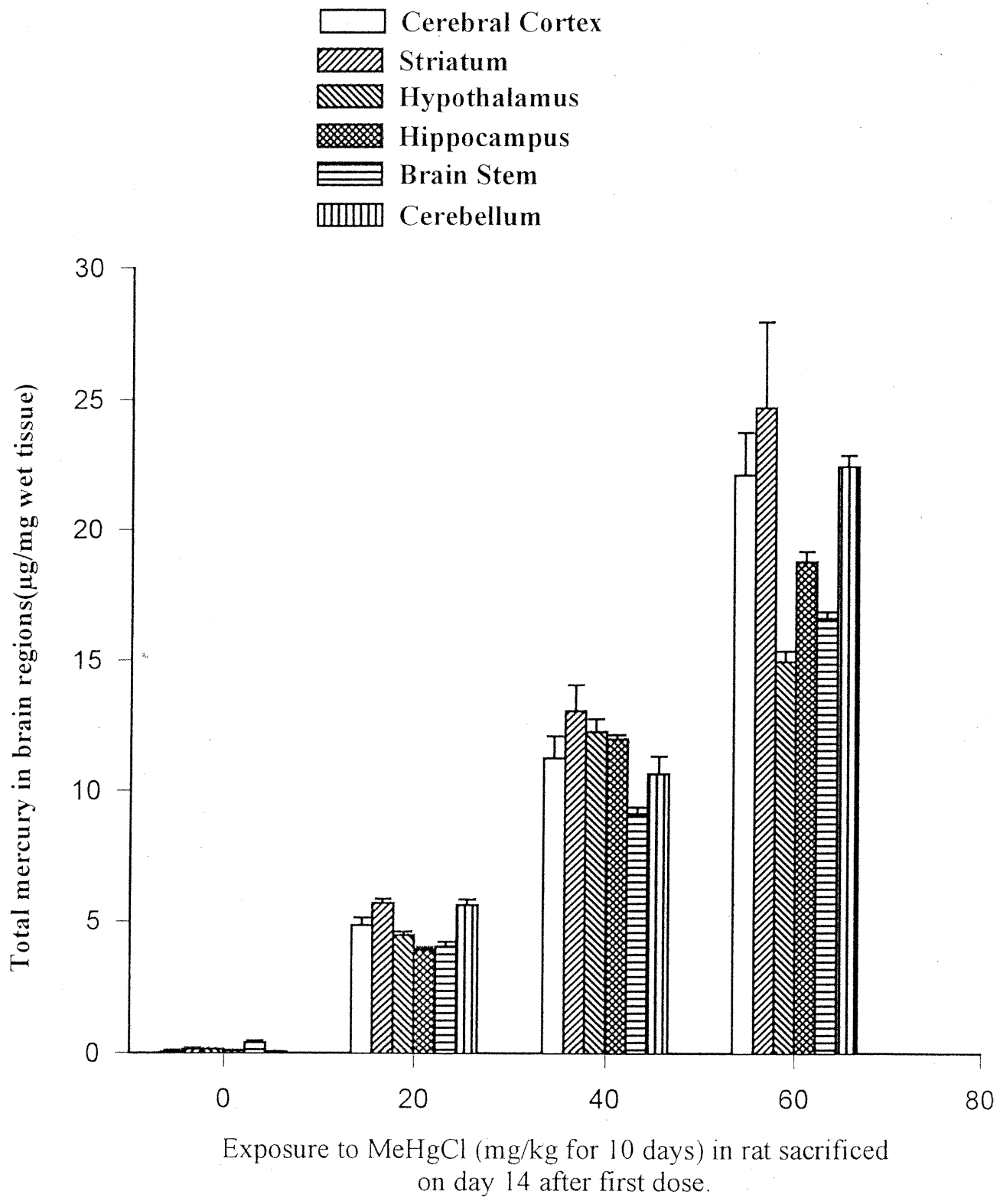


Figure 2

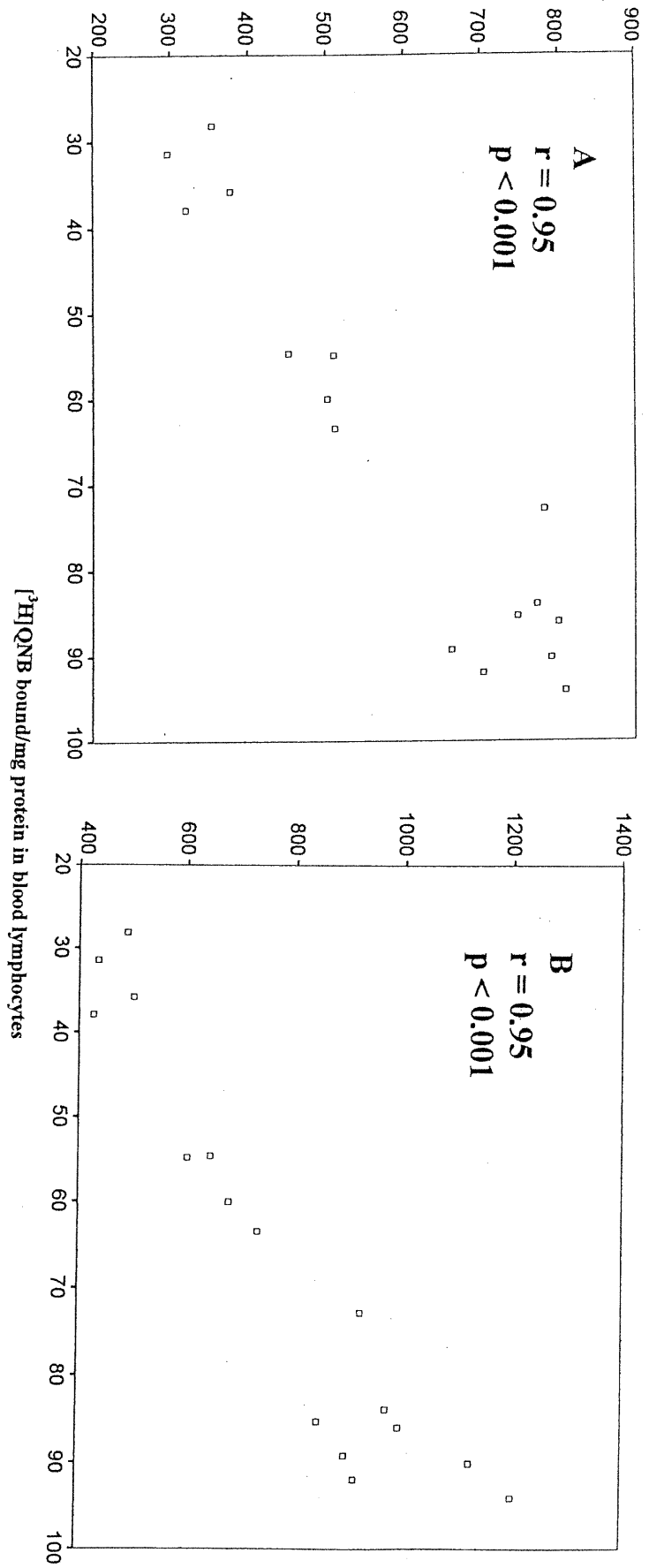
Figure 2. Accumulation of total mercury in brain regions and whole blood in adult rats treated to MeHgCl. Adult male SD rats were repetitively treated to MeHgCl (cumulative doses of 20, 40 and 60 mg/kg) for 10 consecutive days, and were sacrificed 4 days after the last dose. The total mercury was measured in the different brain regions and in the whole according the method indicated in the protocol. Values represent means \pm SD of 6 measurements of total Hg (organic and inorganic) in brain regions ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of the weight brain tissue) and whole blood ($\mu\text{g}/\text{ml}$ of the whole blood).

^a significant difference from control ($p < 0.01$)

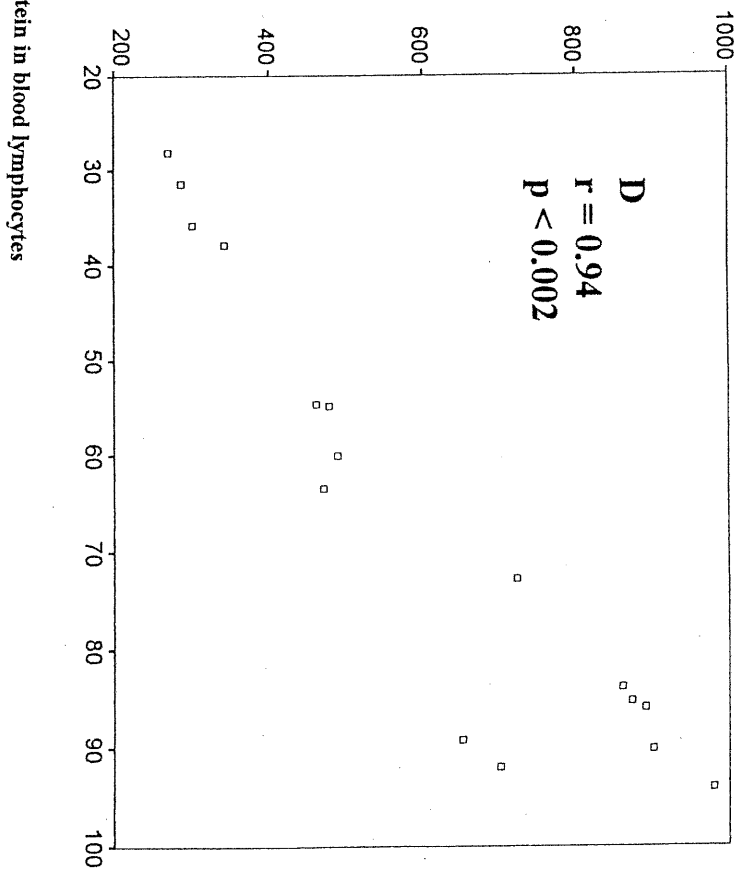
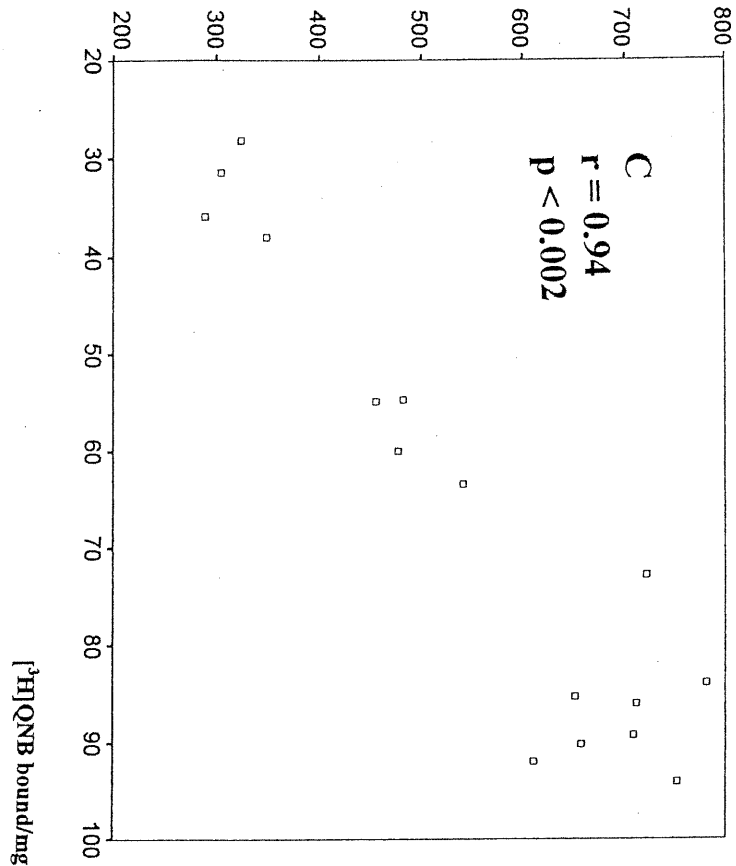
^b significant difference from 20 mg/kg ($p < 0.01$)

^c significant difference from 40 mg/kg ($p < 0.002$).

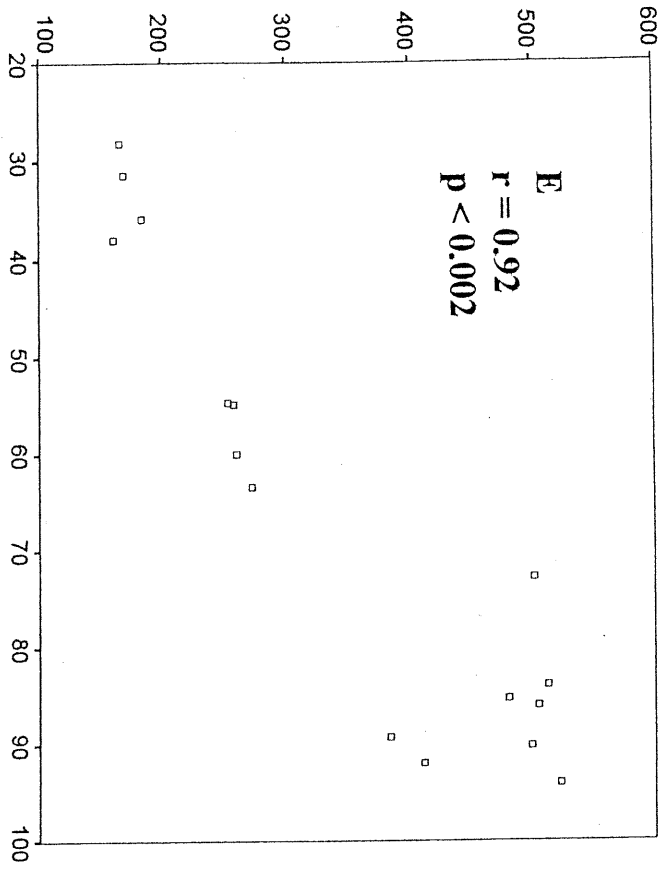
[³H]-QNB bound/mg protein in brain regions



[³H]-QNB bound/mg protein in brain regions



[³H]-QNB bound/mg protein in brain regions



[³H]QNB bound/mg protein in blood lymphocytes

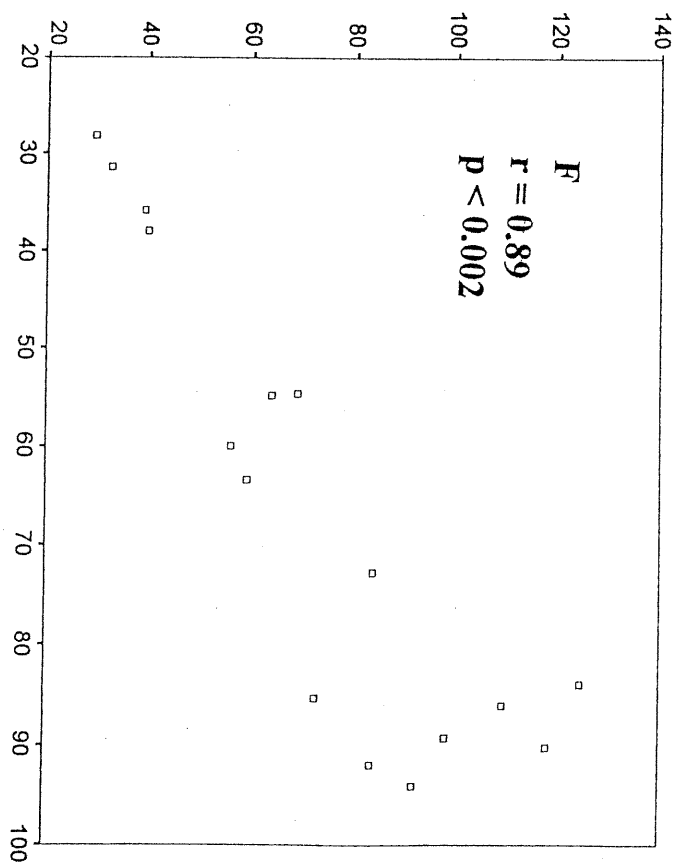


Figure 3. Pearson's correlation (r) between [^3H]-QNB binding to mChRs in blood lymphocytes and brain regions in rats. Adult male SD rats were repetitively treated to MeHgCl (cumulative doses of 20, 40 and 60 mg/kg) for 10 consecutive days, and were sacrificed 4 days after the last dose. Effects MeHg on [^3H]-QNB binding on blood lymphocytes (LY) and 5-HT contents in platelets (PL) were compared with similar effects in the cerebral cortex (A), striatum (B), hypothalamus (C), hippocampus (D), brainstem (E) and the cerebellum (F).

The Pearson's correlation (r) was significant when $r \leq 0.50$; * $p < 0.05$

Table 4. Pearson's correlation (*r*) between [³H]-QNB binding and ChAT activity in brain regions in adult rats treated to MeHgCl

| ChAT activity | [³ H]-QNB binding | | | | | |
|---------------|-------------------------------|------|------|------|------|------|
| | CC | ST | HY | HI | BS | CB |
| CC | 0.98 | 0.98 | 0.98 | 0.97 | 0.97 | 0.96 |
| ST | 0.94 | 0.94 | 0.96 | 0.95 | 0.97 | 0.95 |
| HY | 0.97 | 0.97 | 0.95 | 0.96 | 0.95 | 0.96 |
| HI | 0.95 | 0.95 | 0.96 | 0.96 | 0.96 | 0.95 |
| BS | 0.96 | 0.96 | 0.97 | 0.97 | 0.97 | 0.97 |
| CB | 0.91 | 0.91 | 0.90 | 0.90 | 0.94 | 0.92 |

Note: Numbers are Pearson's correlation (*r*).

* Statistically significant differences for $r \leq 0.50$ (* $p < 0.05$).

Adult male SD rats were repetitively treated to MeHgCl (cumulative doses of 20, 40 and 60 mg/kg) for 10 consecutive days, and were sacrificed 4 days after the last dose. Effects MeHg on [³H]-QNB binding to mChRs were compared with effects on ChAT activity in the cerebral Cortex (CC), striatum (ST), hypothalamus (HY), hippocampus (HI), brainstem (BS) and the cerebellum (CB).

Table 5. Pearson's correlation (*r*) between [³H]-QNB binding and ACh concentration in brain regions from adult rats treated to MeHgCl

| Concentration of ACh | [³ H]-QNB binding | | | | | |
|----------------------|-------------------------------|------|------|------|------|------|
| | CC | ST | HY | HI | BS | CB |
| CC | 0.92 | 0.88 | 0.93 | 0.91 | 0.96 | 0.88 |
| ST | 0.90 | 0.85 | 0.87 | 0.85 | 0.92 | 0.83 |
| HY | 0.91 | 0.91 | 0.92 | 0.92 | 0.96 | 0.91 |
| HI | 0.91 | 0.80 | 0.89 | 0.85 | 0.93 | 0.81 |
| BS | 0.90 | 0.84 | 0.90 | 0.87 | 0.94 | 0.84 |
| CB | 0.84 | 0.80 | 0.82 | 0.83 | 0.87 | 0.78 |

Note: Numbers are Pearson's correlation (*r*).

* Statistically significant differences for $r \leq 0.50$ (* $p < 0.05$).

Adult male SD rats were repetitively treated to MeHgCl (cumulative doses of 20, 40 and 60 mg/kg) for 10 consecutive days, and were sacrificed 4 days after the last dose. Effects of MeHg on [³H]-QNB binding to mChRs were compared with effects on ACh concentration in the cerebral Cortex (CC), striatum (ST), hypothalamus (HY), hippocampus (HI), brainstem (BS) and the cerebellum (CB).

CHAPITRE 5:

EFFECTS OF REPEATED ADMINISTRATION OF METHYLMERCURY CHLORIDE ON THE MONOAMINERGIC SYSTEM IN RAT BRAIN, BLOOD PLATELETS AND LYMPHOCYTES

Kovana M. LOUA¹, Heather D. DURHAM², and Saroj K. CHAKRABARTI¹,

¹Département de médecine du travail et d'hygiène du milieu, Faculté de médecine, Université de Montréal and ²Montreal Neurological Institute, Quebec, Canada. 2573 Côte Ste-Catherine, H3T 1A8, Montreal;

Address correspondence including reprint requests: Dr Saroj Chakrabarti
Département de Médecine du Travail et d'Hygiène du Milieu, Faculté de médecine, Université de Montréal; P.O. Box 6128, Main Station; Montreal, Quebec, H3C 3J, Canada
Tel: 514-343-5847; Fax: 514- 343-2200

To be submitted to TOXICOLOGY AND APPLIED PHARMACOLOGY

ABSTRACT

This study examined the possibility of whether any changes in brain monoaminergic system might reflect similar changes occurring in blood lymphocytes and platelets after repeated administration of methylmercury chloride (MeHgCl) to adult male Sprague Dawley rats. We, therefore, measured dopamine (DA), norepinephrine (NE), serotonin (5-HT), and their corresponding principal metabolites as well as activity of monoamine oxidase (MAO) and [³H]raclopride binding to dopaminergic D₂ receptors in different brain regions, and blood lymphocytes and platelets in rats treated with repetitive oral doses of 0, 2, 4 and 6 mg/kg of MeHgCl per day for 10 consecutive days. No overt signs of toxicity were observed in the treated animals at the highest dose level. MeHg at the cumulative dose of 40 mg/kg was found to significantly increase DA, NE and 5-HT levels whereas at the cumulative dose of 60 mg/kg MeHg significantly decreased these monoamines in different brain regions. However both such doses significantly reduced DOPAC, HVA, VMA, MHPG and 5-HIAA levels, and inhibited the MAO activity and the [³H]raclopride binding in different brain regions examined. These effects were dependent on the total mercury content in different brain regions. Similarly, MeHg inhibited the [³H]raclopride binding in the lymphocytes, and decreased the 5-HT contents and the MAO activity in platelets significantly at both cumulative doses of 40 and 60 mg/kg. Moreover, the inhibition of the [³H]raclopride binding and the contents of 5-HT in different brain regions significantly correlated with similar changes in lymphocytes and platelets respectively in the rats treated at cumulative dose of 60 mg/kg of MeHgCl. Thus changes in binding to the dopamine D₂ receptor in lymphocytes and 5-HT contents in platelets derived from rat peripheral blood could therefore be used as potential surrogate biomarkers for the similar early alterations occurring in the central monoaminergic system due to short term repeated oral administration of MeHgCl to rats.

Key Words: Methylmercury, Neurotoxicity, Monoaminergic System, Brain Regions, peripheral blood Lymphocytes and Platelets, Biomarkers, Adult Rats.

INTRODUCTION

Methylmercury is an ubiquitous environmental pollutant which causes irreparable damage to the central nervous system (Choi, 1989; Clarkson, 1992). Risk assessment in human population exposed to MeHg has been solely based on the relationship between mercury levels in blood and hair, and clinical symptoms of such intoxication (IPCS, 1990). However there are number of reports indicating lack of significant relationship between these two parameters (Candy and et al., 1994; Kosatsky and Foran, 1996; Ratcliffe et al., 1996; Harada et al., 1998). On contrast, other reports have found significant relationship with regard to some early and subtle effects such as motor disturbance (Lebel et al., 1996; Dolbec et al., 2000), tremor (Beuter and Edwards, 1998), learning and memory difficulties (Grandjean et al., 1997, 1998) at low and repeated exposure to MeHg in human populations.

In humans and experimental animals, MeHg is able to induce sensory and motors disturbances, irritability and inability to concentrate, learning deficit and memory loss; these symptoms may progress to ataxia (hindlimb crossing), paralysis and death (Hunter et al., 1940; Takeuchi et al., 1989; Bakir et al., 1973; Ninomiya et al., 1995; Ratcliffe et al., 1996; Counter et al., 1998; Magos, 1998). At low exposure levels, early or subtle effects of MeHg include tremor (Beuter and Edwards, 1998), motor deficits (Lebel et al., 1998), learning and memory disturbance (Grandjean et al., 1997, 1998; Beuter and Edwards, 1998; Beaudin et al., 1999a, b). Motor deficit, tremor, learning and memory disorders have been associated with alterations in various neurotransmission systems in human (Scatton et al., 1983) and animal brains (Arnsten et al., 1988; Beatty et al., 1988; Brozoski et al., 1979; Galkina and Podgornaya, 1992, Hagan et al., 1983; McNamara and Skelton, 1993; Silbergeld et al., 1989). Based on this information, it is possible to hypothesize that changes in some neurochemical parameters may account for some behavioral changes or clinical symptoms observed with MeHg exposure. Therefore an complementary method for risk assessment, instead of using mercury contents in blood and hair, should be developed to detect early biomarkers of neurotoxic effects due to MeHg. Such early biomarkers could serve to monitor human populations at risk due to MeHg exposure before onset of any irreversible clinical symptoms.

Although the mechanisms of MeHg neurotoxicity are not yet fully understood, a substantial body of existing evidence indicates that MeHg alters different brain neurotransmission

systems. Thus MeHg decreases dopamine (DA) synthesis without any change in the synthesis rate of norepinephrine (NE) and serotonin (5-HT) in whole brain and in the striatum from adult rats treated at cumulative doses of 5, 15 and 50 mg/kg b.w (Sharma et al., 1982). Kung et al., (1989) confirmed that the decrease of DA synthesis was due to inhibition of tyrosine hydroxylase activity in the striatum of adult rats when given MeHgCl (7.05 mg/kg) orally for 7 consecutive days. In contrast, Tsuzuki (1982) found an increase of DA contents with concomitant decrease of its metabolites, dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanilic acid (HVA) in the striatum, brainstem, pons oblonga and hypothalamus of male Wistar rats treated to MeHgCl (4 mg/kg) for 50 consecutive days. MeHg also alters the metabolism of norepinephrine (NE) in brain. For example, Tsuzuki (1982) and Hrdina et al., (1976) have reported increased levels of NE in the striatum, pons oblonga and hypothalamus and brain stem in adult rats treated with MeHgCl (4 mg/kg of b.w) for 50 and 45 consecutive days respectively.

On the serotonergic system, Hrdina et al. (1976) found decreased of 5-HT levels in brainstem of adult rats. Tsuzuki (1982) reported a similar decrease 5-HT levels as well as its metabolite 5-HIAA in the brainstem, striatum and hypothalamus of adult rats treated with the same dose of MeHgCl as used by Hrdina et al., (1976). On the contrary, increased levels of 5-HT have been reported in whole brain homogenate of adult rats treated with an acute dose of MeHgCl (Sudo and Arito, 1982), and in the cerebral cortex of developing rats (Taylor and Di Stephano, 1986; O'Kushy and al., 1988). Decrease in the DA, NE and 5-HT content in the central nervous system may be ascribed to the findings that MeHg is able to inhibit the activities of tryptophan hydroxylase in the whole brain (Okuda et al., 1978), monoamine oxidase (MAO) and catechol-o-methyltransferase (COMT) in the brain cerebellum (Tsuzuki, 1981), following acute and subchronic treatment of rat with MeHg, respectively. Moreover, decrease in monoamines levels in rat brain due to MeHg may be supported by the findings that, *in vitro*, MeHg induces the spontaneous release of DA, NE and 5-HT and inhibits their uptake from whole brain homogenate or synaptosomes (Bondy et al., 1979; Komulainen and Tuomisto, 1981).

In contrast to D₁ receptors, strong correlation has been found between dopaminergic D₂ receptor binding and clinical symptoms or behavioral functions in humans and experimental animals (Hall, 1994 *for review*; Seeman, 1995). Studies have shown that the neurotoxicity of MTPP is associated with the loss of D₂ but not D₁ receptors in monkey (Przedborski et al., 1992) and mouse (Tanji et al., 1999) brain regions. Previous studies did not found any significant

changes in D₂ receptor binding following acute or repeated exposure to MeHg in rats (Corda et al., 1981; Komulainen and Tuomisto, 1985). Corda et al., (1981) failed to detect any changes in spiroperidol binding to D₂ receptors in rats treated with a single dose of MeHgCl (10 mg/kg). Similarly, Komulainen and Tuomisto (1985) demonstrated that neither single nor five repeated doses of MeHg (10 mg/kg) every three days did not cause significant changes in [³H]-haloperidol binding to D₂ receptors in a striatal membrane of male Wistar rats. However, *in vitro* studies have demonstrated that MeHg potentially inhibited antagonist binding to D₂ receptors from homogenates and synaptosomes of rat whole brain (Bondy and Agrawal, 1980). We also have previously shown that *in vitro* exposure to MeHg inhibited the binding to the D₂ receptors in synaptosomes from different brain regions from adult rats (Loua et al., 1997). The discrepancy between previous reports and ours may result from the different MeHg administration schedules, animal sacrificed times, and the difference in the animals used. These factors are believed to cause the different results reported by previous workers (Komulainen, 1989).

Taken together, the above data indicate that MeHg is able to alter the central monoaminergic neurotransmission system. In addition, alterations in neurotransmitter systems occurred before manifestation of any behavioural change or clinical symptom in the treated animals (Tsuzuki, 1982; Hrdina et al., 1976; Faro et al., 1998). Such changes may thus serve as early biological markers of MeHg intoxication. However, measurements of central monoaminergic system in humans are rather complicated and require expensive tests and equipment, because of the inaccessibility of brain tissue for sampling. As an alternative approach, neurotransmitter parameters present in blood cells have been used to examine similar changes in the central nervous system. For example, D₂ and D₁-like dopaminergic receptors have been identified in peripheral blood lymphocytes in rats (Le Fur et al., 1980a; Bondy et al., 1984; Caronti et al., 1998) and humans (Barbanti et al., 1996; Ricci et al., 1997). Modulation of these dopaminergic receptors in blood lymphocytes have been shown to reflect similar changes in the central nervous system due to diseases, genetic and environmental factors (Le Fur et al., 1980 a, b; Grodzicki et al., 1990; Barbanti et al., 1996; Fartacek et al., 1997). In addition, measurement of 5-HT contents in platelets vesicles permits reliable estimation of central serotonergic neurons, as used in uptake studies with rats and humans (Meltzer and Arora, 1991; Heninger, 1995). Furthermore, a remarkably good correlation has been found to exist between the effects of MeHg on the high affinity 5-HT uptake in rat platelets and brain synaptosomes (Komulainen and

Tuomisto, 1982; Tuomisto and Komulainen, 1983). But all these results come from different *in vitro* protocols and no data are available for the *in vivo* studies.

Therefore, the present study involving both central and peripheral monoaminergic systems has been carried out establish *in vivo* surrogate biomarkers of MeHg neurotoxicity. To this end, DA, NE and 5-HT contents and their corresponding principal metabolites, activity of MAO, and antagonists binding to D₂ receptors have been measured in the cerebral cortex, striatum, hypothalamus, hippocampus, brainstem and cerebellum of rat brain following repeated administration of MeHgCl in adult male rats. Similarly, 5-HT content and MAO activity as well as D₂ receptors binding were also measured in rat platelets and lymphocytes, respectively. Correlation was then sought between changes in the central monoaminergic parameters and those in 5-HT content and MAO activity in platelets and D₂ receptors binding in lymphocytes. Such relationship allows us to finally establish certain monoaminergic parameters in platelets and lymphocytes as surrogate biomarkers for monitoring early neurotoxicity of MeHg.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Methylmercury chloride (MeHgCl) was purchased from Alfa AESAR (purity > 99%; Alfa Aesar, A Johnson Matthey Company, MA). (±)-Sulpiride base was obtained from ICN (Biochemicals Inc., Aurora, Ohio). Dopamine, norepinephrine, serotonin and their metabolites, sodium octylsulfonate, 3,4-Dihydroxybenzylamine (DHBA), N-methyl 5-HT, monochloroacetic acid, ascorbic acid and sodium chloride (NaCl) were purchased from Sigma Chemical Comp. (St. Louis, MO). Ethylenediamine-tetracetic disodium (EDTANa₂), sodium bisulfite (NaHSO₃), methanol and acetonitrile (HPLC grade); tetrahydrofuran and perchloric acid (HClO₄) were purchased from Fisher Chemical Co. [³H]raclopride (Specific activity = 85.6 Ci/mmol; Concentration = 0.012 μmol/ml) was obtained from NEN/Dupont, Boston, MA. All other chemicals were purchased from available commercial sources and were of analytical grades.

Animals and treatments

Adult male Sprague Dawley rats purchased from Charles River Canada (St Constant, Quebec) were used in these studies. Animals were individually housed in plastic cages with wood

shavings for bedding. Room was maintained at 22 ± 2 °C with $40 \pm 2\%$ relative humidity and a 12hr/12hr (06:00 AM - 06:00 PM) light/dark cycle. Food (Purina Laboratory Chow) and demineralized water were allowed *ad libitum* during all experiments. After a period of 7 days of acclimatization, the rats (225-250 g body weights) were randomised and assigned to groups of 6 rats. Each group was given by gavage 0, 2, 4 and 6 mg of MeHgCl per kg body weight per day for 10 consecutive days. This protocol was adopted because preliminary study from our laboratory has indicated that adult rats when repeatedly exposed to MeHgCl under these conditions manifested delay in learning and memory tasks only at the cumulative dose of 60 mg/kg body weight (Beaudin et al., 1999a,b). MeHgCl was administered daily between 8h30 - 9h30, in a total volume of 4 ml of saline per kg body weight. During the experiment, animals were weighed every two days to adjust the dose volume, if necessary. All solutions were made in fresh demineralized water, and MeHgCl was dissolved in saline (NaCl 0.9%) containing 2% of bovine serum albumin (fraction V). Albumin was added to reduce the irritant effects of MeHgCl on the gastrointestinal tract in the treated animals. Studies have shown that brain concentration of MeHg reaches maximum from 1 to 5 days after the last dose of repeated administration of MeHgCl in rats (Magos and Butler, 1976; Magos et al., 1978). Furthermore, using the current protocol, Beaudin et al., (unpublished) found significant changes in Morris Water Maze tasks in rats treated to cumulative dose of 60 mg/kg, 4 days after the last dosing. Animals were therefore sacrificed on day 4 after the last dose of MeHgCl in this study, and the brain was quickly removed on ice and frozen at -85 °C for 1 hour. Whole Blood was collected on EDTA-Na₂ as anticoagulant, from the sacrificed rats.

Preparations of Brain Regions, Blood lymphocytes and platelets

Brains were dissected on ice into cerebral cortex, striatum, hypothalamus, hippocampus, brainstem and cerebellum based on methods described by Glowinski and Iversen (1966). Platelets and lymphocytes were separated as described by Mono et al., (1987) and Ficoll-Paque (Pharmacia, 1989), respectively, from whole blood. For measurements of monoamines and their metabolites, tissues from each brain region and lymphocytes were homogenized with a teflon pestle homogenizer (Polytron^R Homogenizer Brunkman Instruments, Westbury, N.Y., 10 revolutions/min) in 10 volume (W/V) of ice cold 0.4 M perchloric acid containing 0.4 mM sodium metabisulfite, 100 µM of 3,4-Dihydroxybenzylamine hydrobromide (DHBA) and N-methyl 5-HT

as internal standard for catecholamines and indoleamine, respectively. Platelets were lysed in 5M perchloric acid, and homogenized as for brain tissues. This homogenate was centrifuged at 1500 x g for 25 min at 4°C with a RC5C refrigerated centrifuge (Sorvall Instruments Dupont, Canada) and the supernatant was filtered through membrane filters (0.22 µm pore size; Millipore, MA). The MAO activity was measured in homogenate of brain regions and platelets in phosphate buffer (pH 7.4). Regarding the binding study of the dopaminergic D₂ receptors, each brain region and the freshly isolated lymphocytes were homogenized for the preparation of the corresponding membrane as described by Fitzgerald and Costa (1993). The membranes were then resuspended in the incubation medium. The filtrates for monoamines and metabolites, homogenates for MAO and membranes suspension for the D₂ receptor binding were conserved at -80°C under liquid nitrogen until analysis. The concentrations of proteins in the pellets, homogenates, and membranes of brain region, platelets and lymphocytes were determined by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard.

Measurement of monoamines and metabolites

The monoamines and their metabolites were measured in the same sample from different brain regions, platelets and lymphocytes, using a high performance liquid chromatography with electrochemical detector (HPLC-E) following the method described by Reader et al., (1989). Briefly, an aliquot of 20 µl of the thawed filtrate was injected into an isocratic Hewlett Packard dual piston pump (Hewlett-Packard 1050 series of HPLC modules). The mobile phase consisted of trichloroacetic acid (0.12 M) buffer (pH 3.2±1), EDTA Na₂ (2 mM), methanol (6%), octyl sulfate (2mM), acetonitrile (3%) and tetrahydrofuran (1.5%). This phase was pumped at a rate of 2.0 ml/min through a 250 x 4 mm Adsorbosphere catecholamine HPLC reverse phase column (3 µm particle size; Alltech Associates, Inc., IL). The monoamines and their metabolites in the column eluant were passed through an amperometric electrochemical detector (EG&G Instruments Princeton Applied Research EC, Model 400) and detected on a glassy carbon electrode set at +850 mV against an Ag/AgCl reference cell (Bioanalytical Systems West Lafayette, IN, USA). The output was recorded using an Hewlett-Packard integrator (Hewlett-Packard 3396 series II Integrator). Samples were injected in duplicate, and monoamines and metabolites were identified in corresponding chromatographs obtained from different standards

and quantified using an internal standard. Results were expressed in ng of monoamines or metabolites measured per mg of protein.

[³H]raclopride binding to Dopaminergic D₂ Receptors

The clinical roles of the dopaminergic D₁ receptors are not as well documented compared to that of D₂ receptors. In the latter case, high correlation between inhibition of receptors and various psychiatric and neurologic diseases is well established (Hall, 1994; Seeman, 1995). Based on the above finding, D₂ receptors binding was studied in the current work. [³H]raclopride binding to the dopaminergic D₂ receptors was carried out as described by Dewar and Reader (1989). In brief, aliquots of 140 µg of protein of membrane preparations for each brain region and lymphocytes were preincubated in 1 ml total volume at 25^oC for 30 min. The incubation started by adding 0.5 nM of the D₂ receptor antagonist, [³H]raclopride for an additional 60 min at 25^oC in a total volume of 1 ml. The latter consisted of 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 120 mM NaCl, 5 mM KCl. Incubation was maintained with constant agitation in a metabolic shaker (60 rotations/min). After incubation, samples were diluted with 5 ml of ice-cold buffer and rapidly filtered under pressure, through Whatman GF/F glass fiber filters (Whatman Inc., NJ) previously soaked in 0.5 % polyethyleneimine solution for 6 hours. Filters were then washed three times with 5 ml of cold buffer, air dried and placed into scintillation vials. Filters were dissolved in scintillation liquid (Aquasol, NEN/Dupont, Boston, MA) for 24 hours. The radioactivity retained on filters was quantified by a liquid scintillation spectrometry using a Packard Tricab counter (efficiency 52-62%). The result obtained was considered as the total binding. Specific binding was then calculated as the difference between the total and the non-specific binding (in the presence 300 µM of the D₂ antagonist (±) Sulpiride). All incubations were done in quadruplicate. Results are expressed in fmol/mg of protein.

Determination of Monoamine oxidase activity

The activity of monoamine oxidase (MAO) was measured in the homogenates of brain regions and blood platelets based on a spectrofluorometric method (Krajl, 1965) with some modifications as previously described by Chakrabarti et al., (1998). Results are expressed in nmoles of 4-hydroxyquinoline formed per mg of protein/30 min.

Measurement of Mercury in brain regions and in whole blood

When adult rats were exposed to 5 mg/kg of MeHgCl per day for 8 and 12 days, more than 98% of the total mercury accumulated in the brain was found in the form of unchanged MeHg with very little being converted to inorganic mercury (Suda *et al.*, 1989). We therefore measured total mercury in whole blood and brain regions. The total mercury containing mostly unchanged MeHg plus little inorganic mercury, was measured using the neutron activation method as described by Kennedy (1990). The neutron activation method is considered to be a reference method for mercury measurements in biological tissues (IPCS, 1990). The detection limit using this method is about 0.005 ppm of total mercury (0.005 ng/mg of fresh tissue), and results are given in ng/ml of whole blood or ng/mg of brain wet tissue.

Statistics Analysis

All statistical tests were carried out using the SPSS statistical program for Windows release 7.0 (SPSS Inc., 1995, Michigan). One way analysis of variance (ANOVA) was used to test differences between means of monoamines parameters, mercury accumulation in different brain regions and blood cells. Post hoc multiple comparison Scheffe or Tamhane's T2 tests were used to test further the differences between groups of treated and control rats, when homogeneity of variance was assumed or not, respectively. Differences were considered significant at $p < 0.05$. The relationship between effects on monoaminergic parameters in brain regions and blood lymphocytes and platelets was tested by Pearson's correlation (r) coefficient.

RESULTS

Effect of MeHg on Body weights

Effects of repeated administration of MeHg on body weights in adult rats are presented in the **Figure 1**. Multiple post hoc comparison revealed that body weights in rats treated with 40 and 60 mg/kg cumulative doses were significantly lower ($p < 0.02$), compared to those treated with 20 mg/kg and controls from day 4 of the treatment to the sacrifice day. At 20 mg/kg cumulative dose, body weights increased by 34.60% compared to 42.49% in controls from day 1 to day 14, the day of sacrifice. At the cumulative dose of 40 mg/kg, body weights were almost stable with high increased from 0.47 to 3.90% from days 1 to 8 during the dosing period. Thereafter, animals at this dose started to loose body weight about 0.59% on day 14. At the cumulative dose of 60 mg/kg, MeHg was found to decrease body weight by 12% of control value ($p < 0.002$) on day 14 post administration period. However, no clinical signs or symptoms of overt toxicity were observed in the treated animals when compared to controls.

Monoamines and metabolites

Effects of short term repeated administration of MeHgCl on the levels of DA, NE, 5-HT and their metabolites were measured in different brain regions, blood platelets and lymphocytes in adult rats and results are presented in **Tables 1, 2 and 3**, respectively. Results indicated that MeHg was associated with a biphasic increase and decrease of DA, NE and 5-HT levels, paralleled by a decreasing concentration of their metabolites. This effect was dependent on the dose and brain region.

DA contents were significantly increased at a cumulative dose of 40 mg/kg but statistically decreased at 60 mg/kg. However the levels of DOPAC and HVA were significantly decreased at both dose levels. Thus, MeHg at the cumulative dose of 40 mg/kg significantly increased DA concentration by 18.31% in the hypothalamus to 45.0% in the cerebellum, compared to control rats ($p < 0.001$). On the other hand, at 60 mg/kg cumulative dose, DA levels were significantly reduced in the following order; cerebellum > striatum > cerebral cortex > hippocampus > brainstem > hypothalamus. A dose and regional dependent statistically significant reduction of DA metabolites, DOPAC and HVA was observed also at 40 and 60 mg/kg cumulative doses in different brain regions when compared to those in controls ($p < 0.001$). Although at 20 mg/kg cumulative dose, MeHg increased DA levels in different brain regions, such an increase was however not statistically

significant, compared to controls. DA and its metabolites could not be detected in lymphocytes in the treated and controls rats, under our experimental conditions.

Effects of repeated administration of MeHgCl on the contents of NE and its metabolites VMA and MHPG in the rat brain regions are presented in **Table 2**. At a cumulative dose of 40 mg/kg, MeHg increased NE levels in different brain regions from the hypothalamus (7.51%) to hippocampus (24.99%), compared to their control values ($p < 0.001$). At 60 mg/kg of cumulative dose of MeHgCl, NE level was however significantly reduced in the striatum followed by the cerebral cortex, cerebellum, hippocampus, brainstem and hypothalamus when compared to rats treated with cumulative doses of 40, 20 mg/kg ($p < 0.01$) as well as to the controls ($p < 0.001$). On the other hand, both the cumulative doses of 40 and 60 mg/kg were found to significantly decrease, in a dose-dependent manner, the contents of VMA and MHPG in different brain regions, compared to their corresponding controls ($p < 0.002$). Furthermore, the content of MHPG was found to be more reduced in all brain regions than that of VMA at both 40 and 60 mg/kg cumulative dose levels. Rats treated with the 20 mg/kg cumulative dose did not, however, show any significant changes in concentration of NE and its metabolites in different brain regions. However, NE, VMA and MHPG could not be detected in lymphocytes and platelets under our experimental conditions.

Repeated administration of MeHg in adult rats was found to change 5-HT and 5-HIAA contents in different brain regions and blood platelets and the results are presented in **Table 3**. Result show that MeHg at a 40 mg/kg cumulative dose increased 5-HT levels in brain as follow: cerebral cortex > striatum > hippocampus > cerebellum > brainstem > hypothalamus when compared to their corresponding control values ($p < 0.002$). In contrast, the cumulative dose of 60 mg/kg, was found to significantly decrease 5-HT content as follows: striatum > brainstem > hypothalamus > hippocampus > cerebral cortex > cerebellum compared to rats treated at 40 and 20 mg/kg cumulative doses of MeHgCl ($p < 0.002$) as well as controls ($p < 0.001$). MeHgCl, at a cumulative dose of 40 mg/kg was found to significantly decrease 5-HIAA contents in brain cerebellum (49.22%), while reducing it by 56.23% in the striatum to 76.34% in hypothalamus ($p < 0.004$) at 60 mg/kg. In rats treated with 20 mg/kg, although an apparent increases of 5-HT were observed in brain regions, such increase were not found to be statistically significant when compared to control values ($p > 0.05$). Similarly, MeHg also significantly decreased 5-HT levels in platelets at the cumulative doses of 20, 40 and 60 mg/kg ($p < 0.004$). 5-HIAA could not be detected in blood platelets under our experimental conditions.

[³H]raclopride binding to the dopaminergic D₂ receptors

Effects of repeated administration of MeHgCl on [³H]raclopride binding to D₂ receptor in different brain regions and blood lymphocytes are depicted in the **Table 4**. These results have shown that MeHgCl significantly inhibited the [³H]raclopride binding in different brain regions and blood lymphocytes, and such effects were dependent on the dose and the brain region studied. Thus, MeHg at a cumulative dose of 40 mg/kg inhibited [³H]raclopride binding as follows; cerebral cortex > hippocampus > cerebellum > striatum > hypothalamus > brainstem. MeHg at a cumulative dose of 60 mg/kg, significantly inhibited [³H]raclopride binding in the cerebellum followed by the cerebral cortex > hippocampus > striatum > hypothalamus > brainstem compared to those at the 40 and 20 mg/kg cumulative doses of MeHgCl in treated rats ($p < 0.001$) and the controls ($p < 0.002$). Similarly, [³H]raclopride binding was significantly inhibited in blood lymphocytes in the rats treated with the cumulative doses of 40 and 60 mg/kg of MeHgCl (Table 4). However, the cumulative dose of 20 mg/kg did not cause any significant changes on the [³H]raclopride binding in both the brain regions and blood lymphocytes when compared to their controls.

Monoamine Oxidase Activity

The effects of repeated oral administration of MeHgCl on the MAO activity in different brain regions and platelets were measured and results are presented in the **Table 5**. In rats treated with cumulative doses of 20, 40 and 60 mg/kg of MeHgCl, the activity of MAO in different brain regions was significantly decreased 4 days after the last dosing, and this decrease was found to be a function of increase in mercury accumulation. For example, at 20 mg/kg cumulative dose, MeHg did not significantly decrease the activity of MAO in any brain region examined, whereas at the cumulative dose of 40 mg/kg, such activity was significantly decreased when compared to that of corresponding control ($p < 0.02$) in the cerebral cortex followed by the cerebellum > hippocampus > striatum > hypothalamus > brainstem. At the highest cumulative dose (60 mg/kg), MeHg caused much more profound inhibition of such activity in the following order: cerebellum > cerebral cortex > striatum > hippocampus > brainstem > hypothalamus. The decrease of MAO activity at this dose level was found to be 70.65% and 45.16% of the controls ($p < 0.001$), in the cerebellum and hypothalamus respectively. In rat blood platelets, although the activity of this enzyme is very low significant inhibition of such activity occurred at the cumulative doses of 40

and 60 mg/kg (**Table 5**). But the cumulative dose of 20 mg/kg of MeHgCl did not significantly inhibit such activity in the brain regions and blood platelets (**Table 5**).

Mercury Accumulation

Accumulation of total mercury in different brain regions and whole blood in adult rats treated with the cumulative doses of 40 and 60 mg/kg of MeHgCl were measured and results are presented in **Figure 2**. These results indicate that mercury content is much higher in whole blood than in the different brain regions of rats and this accumulation is found to be dose-dependent. Thus, in rats treated with cumulative dose of 20 mg/kg of MeHgCl, total mercury was significantly higher in the cerebral cortex when compared to control value ($p < 0.003$). But at the cumulative dose of 40 mg/kg, total mercury was significantly and evenly accumulated in the striatum, hypothalamus, hippocampus, cerebral cortex and the cerebellum, whereas such accumulation was significantly lower in the brainstem than that of the control ($p < 0.03$). In rats treated with the cumulative dose of 60 mg/kg, total mercury was significantly higher in the striatum followed by cerebellum and cerebral cortex when compared to the other two lower doses ($p < 0.001$). Furthermore, mercury accumulation in the latter regions was significantly higher than in the hippocampus which, in turn, was higher than in the hypothalamus ($p < 0.02$). However in the whole blood, mercury accumulation was considerably higher than in the different brain regions.

Relationship between neurotoxic effects in the rat brain regions and blood cells

Analysis of Pearson's or Spearman correlation was used to seek the relationship between the disturbances in various monoaminergic parameters measured in different brain regions and those in blood cells. The results indicated a significant positive correlation between the changes in a) the [^3H]raclopride binding in different brain regions and blood lymphocytes (**Figure 3**) and b) in the contents of 5-HT in different brain regions and bloods platelets (**Figure 4**). On the other hand, the inhibition of the activity of MAO in different brain regions did not show any significant correlation with that in blood platelets ($r = 0.34$ for $p > 0.05$).

All these effects were dependent on the mercury accumulated in brain tissues and blood cells.

DISCUSSION

The present study has demonstrated that short-term repeated administration of MeHgCl is capable of disturbing the monoaminergic system in different brain regions without producing any overt toxicity in the treated rats. The study has shown that the contents of various monoamines in different brain regions could be either increased, or decreased depending on the cumulative dose of MeHg. The study also showed that MeHg decreased the [³H]raclopride binding to the dopaminergic D₂ receptors as well as the contents of the 5-HT in different brain regions which significantly paralleled to similar changes occurring in peripheral blood lymphocytes and platelets respectively.

An increase of brain levels in DA, NE and 5-HT has been found in rats treated with MeHg (Hrdina et al., 1976; Tsuzuki, 1982). Tsuzuki (1982) reported that in rats treated with MeHg (4 mg/kg) for either 45 or 50 consecutive days, an increase in content of DA, NE and 5-HT in the striatum, cerebral cortex and hypothalamus occurred, respectively. In meantime, the levels of their corresponding metabolites were concomitantly decreased in the same brain areas. Also, O'Kushy et al., (1988) reported an increase of DA, NE and 5-HT in the striatum and 5-HT in the cerebral cortex of a postnatal rats from mothers exposed to MeHgCl. However, none of these studies provided any information regarding the mercury levels in these brain regions. Although increase in monoamines is not understood, MeHg may increase the brain levels of these monoamines by inhibiting the activities of the monoamine oxidase (MAO) and catechol-o-methyl transferase (COMT), the enzymes responsible for degradation of these monoamines in the rat brain (Tsuzuki 1981; Komulainen, 1989 *for review*). Alternatively, the increasing effect could reflect a compensatory mechanism, which has occurred with the biochemical lesion induced by MeHg (Sudo and Arito, 1982). The present study and previous report from our laboratory have demonstrated that repeated administration of MeHgCl in adult rats significantly inhibited the activity of MAO in different brain regions (Chakrabarti et al., 1998). Due to these effects, MeHg may increase the contents of these monoamines in different brain regions of adult rats treated repeatedly with MeHgCl.

Decreases of DA, NE and 5-HT contents have been reported after subchronic exposure to MeHgCl (Hrdina et al., 1976; Tsuzuki, 1982; Okuda et al., 1978; Komulainen, 1989 *for review*). Our study provided a regional difference on the decrease of the monoamines concentration in rat brain regions. The differences among brain regions may rely first on the accumulated mercury

and secondly on the various density and heterogeneity of the monoaminergic systems in different brain regions (Snyder and Coyle, 1969). MeHg may decrease the concentration of neurotransmitters by inhibiting the high affinity uptake of DA, NE and 5-HT and induces at the same time their spontaneous release from their storage vesicles in the nerve endings (Komulainen, 1989; Loua et al., 1997). In fact, significant release of DA has been demonstrated in the striatum of rats treated with either acute or repeated doses of MeHgCl (Faro et al., 1997, 1998). MeHg also inhibits the high affinity 5-HT uptake and induces its spontaneous release from its storage vesicles of rat peripheral blood platelets (Komulainen, 1989 for review; Loua et al., 1997). In addition, MeHg inhibits the synthesis of DA and NE (Okuda et al., 1978; Kung et al., 1978) and 5-HT (Tsuzuki, 1981) in the brain tissue; these effects appear before any manifestation of neurological signs due to MeHg. Moreover, MeHg induces auto-oxidation of DA and NE in brain synaptosomes (Komulainen and Tuomisto, 1982). In view of these considerations it is possible that such factors may decrease the concentrations of the monoamines and their metabolites in different rats brain regions as observed in the present study.

Inhibition of MAO activity in different brain regions as observed in this study is consistent with our previous results (Chakrabarti et al., 1998). Decreased of MAO activity of has also been reported by other workers (Tsuzuki 1981; Komulainen, 1989 for review). Tsuzuki (1981) showed that a daily oral administration of MeHg (4 mg/kg) for 50 days decreased the activity of MAO and other neurotransmitter enzymes such as choline acetyltransferase, tryptophan hydroxylase, catechol-*O*-methyltransferase (COMT) in rat cerebellum (Tsuzuki 1981). In contrast, Omata et al., (1982) have reported an increase of such activity in brain synaptosomes and whole brain homogenates from rat treated with MeHgCl (10 mg/kg) for 7 consecutive days. The discrepancy between our results and those of Omata et al., may be attributed to different experimental conditions used in these studies. Omata and co-workers used whole brain homogenate of female rats, instead of specific brain regions for measurement of such activity. In normal conditions, neurotransmitter amines released in the synaptic cleft are essentially eliminated by the uptake system for their recycling and the remaining are degraded by the MAO enzyme (Cooper et al., 1991). Bondiolotti et al., (1995) have reported that inhibitors of MAO-B decrease monoamine uptake. Similarly, the inhibition of the activity of the MAO in the blood platelets due to the MeHg may be partly responsible for the dose-dependent decrease in 5-HT contents in rat platelets.

This study first reported effects of MeHg on [³H]raclopride binding to the dopaminergic D₂ receptors in different brain regions and the peripheral blood lymphocytes. The results showed that MeHg decreased the [³H]raclopride binding to D₂ receptors in different brain regions and peripheral blood lymphocytes in adult rats. However previous studies from other laboratories did not find any significant inhibition of D₂ receptors binding in either the cerebral cortex or striatum of rats treated to MeHg (Corda et al., 1981; Komulainen and Tuomisto, 1985). The controversy between these results and those of our studies may reside in the use of different protocols. For example, Corda and al., (1981) injected either a single dose or 5 repeated doses of MeHg (10 mg/kg) in every 3 days in Wistar rats. In addition, both studies (Corda et al., 1981; Komulainen and Tuomisto, 1985) used the [³H]spiroperidol and [³H]haloperidol radioligands which also possess a high affinity for 5-HT and NE receptors (Hall, 1994). By using the specific antagonist, the present study has shown that inhibition of D₂ binding varies depending on the MeHg accumulated and the brain region. Thus, the inhibition of D₂ receptors binding was more pronounced in the cerebral cortex and cerebellum of rats treated to cumulative doses of 40 and 60 mg/kg of MeHgCl₂, respectively. However, the dopaminergic D₂ receptors have different binding affinity toward their antagonists in various brain regions of rat (Andersen et al., 1990). This may explain, in part, the discrepancy in the results between these studies. The observation of a parallel decrease in the dopaminergic D₂ receptors binding to rat lymphocytes (**Table 4**) suggests that a similar dysfunction of the central dopaminergic system does exist in the peripheral lymphocytes as well.

Decrease of D₂ receptors binding and of 5-HT content in the peripheral blood lymphocytes (**Figure 3**) and platelets (**Figure 4**), respectively, were significantly correlated with similar changes in different brain regions of rats at the cumulative dose of 60 mg/kg of MeHgCl₂. However, no such relationship was found between inhibition of MAO activity in brain regions and blood platelets ($p > 0.05$ for $r < 0.40$), probably because of the low activity of this enzyme in rat platelets. At the dopaminergic receptors level, a high correlation has been found between inhibition of the binding of the dopaminergic D₂ receptors in lymphocytes and all different brain regions, while the decrease of 5-HT levels in platelets significantly correlated only with that in hypothalamus and brainstem. A strong correlation has been observed between D₂ binding in brain regions and blood lymphocytes in Alzheimer and Parkinson's diseases (Le Fur et al., 1981; Mash et al., 1985; Adem et al., 1986) and in schizophrenia (Bondy and Ackenheil, 1987) in humans.

However, in spite of the disparity in reports between brain tissues and platelets with regard to uptake studies (Slotkin et al., 1997), 5-HT levels in blood platelets have been used as a reliable surrogate marker for the central serotonergic neurons (Bakish et al., 1997). MeHg inhibits their uptake system and induces spontaneous release of the monoamines in brain tissue and blood cells (Oudar et al., 1989; Komulainen, 1989; Loua et al., 1997). Overall, the results of study are in agreement with those of previous *in vitro* investigation (Loua et al., 1997). MeHg (0.5 to 5 μ M) inhibited significantly the high affinity DA and 5-HT uptake and the D₂ receptors binding to synaptosomes from different brain regions, blood lymphocytes and platelets (Loua et al., 1997).

In addition to the aforementioned mechanisms, MeHg is known to block the sulfhydryl groups, disturb functions and structure of the cell membrane (Yoshino et al., 1966; Clarkson, 1972). It is also able to inhibit protein synthesis (Yoshino et al., 1966; Omata et al., 1978, 1982), and induce the oxidative stress (Lebel et al., 1990; Choi et Verity, 1996; Yee and Choi, 1996) in rat brain regions. For example, in rats treated to MeHg (10 mg/kg in sc. for 7 consecutive days) significant inhibition of protein synthesis was observed in the brainstem, hypothalamus, striatum, hippocampus and cerebral cortex (Omata et al., 1982). This effect was observed 3 days after the last dosing, at the latent period (Omata et al., 1982). In addition, the reactive species generated by MeHg exposure has been found to decrease the antagonist binding to the dopaminergic receptors (Andorn et al., 1988). In the brain tissue, MeHg increases the free cytosolic calcium concentration, and inhibits the protein synthesis in lymphocytes (Nakatsuru et al., 1985; Tan et al., 1993). Thus, neurotransmitter synthesis, storage and release are all dynamic processes, and MeHg could affect either of these processes alone or together. These could result in differences in the contents of various neurotransmitters amines, their metabolites and the activity of the MAO in different regions and blood cells.

Studies have shown that inhibition of the central monoaminergic system may impair the behavioural parameters in the experimental animals (Sawaguchi et al., 1988; Beninger, 1989; Beatty and Rush, 1989; McNamara and Skelton, 1993; Sokolowski and Salamone, 1994; Brozoski et al., 1979; Whishaw and Dunnett, 1985; Robbins and Everitt, 1995; Green and Backus, 1990; Frederick et al., 1994; Slikker et al., 1989; Maes and Meltzer, 1995; Herges and Taylor, 1998; Pranzatelli et al., 1994; Barry and Casimir, 1995; Heninger, 1995). In rats, significant decreases in DA levels and inhibition of D₂ receptor binding in the cerebral cortex, striatum, hippocampus are known to impair behavioural functions in the sensory, motor,

sensorimotor domains. But these effects are also associated with deficit in place learning in the Morris water maze tasks (Whishaw and Dunnett, 1985; Beninger, 1989; Beatty and Rush, 1989; Sokolowski and Salamone, 1994; Galkina and Podgornaya, 1992). In addition, alterations of the NE system have been associated with dysfunction of behavioral tasks such as global orienting function in the limbic system, cerebral cortex and the brainstem (Robbins and Everitt, 1995) and memory in spatial response paradigm (Arnsten et al., 1988; Trevor and Barry, 1995). Furthermore, inhibition of 5-HT neurotransmission has been also involved in disturbance of motor, sleeping and cognitive processes (Green and Backus, 1990; Frederick et al., 1994; Slikker et al., 1989; Maes and Meltzer, 1995; Herges and Taylor, 1998; Pranzatelli et al., 1994; Barry and Casimir, 1995; Heninger, 1995).

As mentioned earlier, epidemiological studies have shown that MeHg induces tremor (Beuter and Edwards, 1998), motor deficits (Lebel et al., 1996, 1998; Dolbec et al., 2000), learning and memory deficits (Grandjean et al., 1997, 1998). In experimental animals, there are some reports regarding effects of MeHg on behaviours such as motor disorders, sleeping, and learning and memory as well in mice (Kobayashi *et al.*, 1980), rats (Sudo and Arito, 1982; O'Kushy and al., 1988; Beaudin et al., 1999a, b) and monkeys (Rice, 1996). However, only Kobayashi *et al.*, (1980) and O'Kushy and al., (1988) have attempted to explain whether the changes of the neurotransmitter systems in the central nervous may be involved in such behavioural changes due to MeHg.

Using the same protocol as in this study, Beaudin et al., (1999a, b), from our laboratory, have evaluated the equilibrium behavior (rotarod), spontaneous locomotor and exploratory activity (open field), spatial reference (Morris task) and working memory (two choice water escape task) in adult rats. The evaluation started from day 5 after the first dose of MeHgCl and lasted up to 30 days post-treatment period. Beaudin et al., (1999a, b) demonstrated that effects of MeHg on these behavioral parameters were dependent on both the dose and the time elapsed after MeHg administration. For instance, the rotarod test was significantly inferior from day 7 of the treatment period in rats treated with a cumulative dose of 60 mg/kg of MeHgCl when compared to the other groups, including the control ($p < 0.002$). Also, the Morris water tasks were significantly delayed from day 4 of the post-treatment period in the rats treated with a cumulative dose of 60 mg/kg of MeHgCl when compared to the other treated and the control groups ($p < 0.002$). On the other hand, both the Morris water tasks and the two choice water escape test

were significantly delayed only after day 19 of the last dosing in all treated groups. In contrast, the open field test was not significantly different between any of the treated rats, suggesting that the locomotion and exploration functions were not affected in the treated rats. Based on results of the present study, rats treated to 60 mg/kg cumulative dose of MeHgCl, the monoaminergic system involving DA, NE and 5-HT was significantly decreased in different brain regions.

In Parkinson's disease, characterized by tremor, various neurotransmitter systems such as DA, NE, 5-HT and their corresponding metabolites are significantly decreased in the cerebral cortex, striatal and hippocampal brain regions (Scatton et al., 1983). Thus, based on the existing data, different neurotoxicants which are able to alter neurotransmitter systems have been implicated in the perturbation of behaviours (Herve et al., 1980; Sawaguchi et al., 1988; Beninger, 1989; Beatty and Rush, 1989; McNamara and Skelton, 1993; Sokolowski and Salamone, 1994; Brozoski et al., 1979; Whishaw and Dunnett, 1985; Robbins and Everitt, 1995; Green and Backus, 1990; Frederick et al., 1994; Slikker et al., 1989; Maes and Meltzer, 1995; Herges and Taylor, 1998; Pranzatelli et al., 1994; Barry and Casimir, 1995; Heninger, 1995). The aforementioned data, combined with the neurobehavioral changes reported by Beaudin et al., (1999a, b), indicate that changes in the central neurotransmitter systems such as measured in the present study may be associated to with the behavioural dysfunction observed in the rats treated to MeHg.

In conclusion, the present study has demonstrated that the impairments of certain monoaminergic systems e.g. the dopaminergic D₂ receptor binding and the 5-HT content in different brain regions are reflected by similar changes in the peripheral blood lymphocytes and platelets following repeated administration of MeHgCl to adult rats. This study therefore suggests that the binding to dopaminergic D₂ receptors and 5-HT content in the peripheral blood lymphocytes and platelets could be used as potential surrogate biomarkers for early markers of neurotoxicity of a short term repeated exposure to MeHgCl. However, the temporal changes and recovery of these surrogate biomarkers in peripheral blood lymphocytes and platelets in comparison to different brain regions should also be assessed following chronic low level exposure to MeHg and the cessation of such exposure. In addition, although the D₂ receptor binding is found to be important in development of early biomarker for neurotoxicity due to MeHg, it is possible that other dopaminergic receptors may also be important in the development of such biomarkers. Therefore, these need further investigation.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors express their acknowledge to Dr Tomas Reader of Department of Physiology for his kind assistance in the dissection of brain region tissues and for the development of the HPLC-ECD method; to Anwar Malick for his great assistance in making the graphs; to Diane Talbot for her assistance. MRCC, Hydro-Québec, CEA and James Bay Committee on methylmercury supported this work.

REFERENCES

- Aghajanian G. K. Electrophysiology of serotonin receptor subtypes and signal transduction pathways. *In, Psychopharmacology: The fourth Generation in progress*. Bloom, F. E., and Kupfer D. J., eds.) Raven Press, New York, 1994, pp. 451-460
- Andersen P. H., Gingrich J. A., Bates M. D., Dearry A., Falardeau P., Senogles S. E., Caron M. G. (1990). Dopamine receptor subtypes: beyond the D1/D2 classification. *TIPS* **11**, 231-236
- Andorn, A. C., Bacon, B. R., Neuyen-Henh, A. T., Parlato S. J., and Stitts, J., A. 1988. Guanyl nucleotide interaction with dopamine binding sites labeled by ³H-spiroperidol in human caudate and putamen: Guanyl nucleotides enhance ascorbate-induced lipid peroxidation and cause an apparent loss of high affinity binding sites. *Mol. Pharmacol.* **33**:155-162
- Arito and Takahashi, (1991). In *Advance of Mercury Toxicology*, p 23, Suzuki T et al., eds., Plenum Press, New York
- Arnsten A. F. T., Cai J. X., Goldman Rakic P. S. (1988). The alpha 2 adrenergic agonist guanfacine improves memory in aged monkeys without sedative or hypotensive side effects: evidence for alpha 2 receptor subtypes. *J. Neurosci* **8**, 4287-4298
- Bakir F., Damluji S. F., Amin-Zaki, Murtadha M., Khalidi, A., Al-Rwi N. Y., Tikriti S., Dhahir H. I., Clarkson T. W., Smith J. C., Dohery R. A. (1973). Methylmercury Poisoning in Iraq : An interuniversity report. *Science*, **181**, 230-241.
- Bakish D., Cavazzoni P., Chudzik J., Ravindran A., and Hrdina P. D. (1997). Effects of selective serotonin reuptake inhibitors on platelet serotonin parameters in major depressive disorder. *Biol Psychiat* **41(2)**, 184-190
- Barry L. J., and Casimir A. F. Serotonin and behavior: A general hypothesis. *In Psychopharmacology: The Fourth generation of progress*, eds. Floyd E. Bloom and David J. Kupfer. Raven Press. New York, pp 461-469. 1995
- Beatty, W. W., and Rush J. R. (1989). Spatial working memory in rats; Effects of monoaminergic antagonists. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **18**, 7-12
- Beaudin S., Chakrabarti S. K., Doré F. Y., and Ptito M. (1999a). Effects of methylmercury on behavior, learning and memory in juvenile rats. (Ph.D, Thesis; Submitted to *Neurotoxicology and Teratology*)

- Beaudin S., Chakrabarti S. K., Doré F. Y., and Ptito M. (1999b). Subacute exposure to methylmercury impairs motor coordination and Water Maze Learning task in juvenile rats. (Ph.D, Thesis; Submitted to *Behavioral Neuroscience*)
- Beninger R. J. (1989). Dissociating the effects of altered dopaminergic function of performance and learning. *Brain Res. Bull.* **23**, 365-371
- Beuter A., and Edwards R. (1998). Tremor in Cree subjects exposed to methylmercury: a preliminary study. *Neurotoxicol & Teratol.* **20(6)**, 581-589
- Bondiolotti G. P., Galva M. D., Villa F., Sciaba L., Picotti G. B. (1995). In vitro effects on monoamine uptake and release by the reversible monoamine oxidase-B inhibitors Lazabemide and N-(2-aminoethyl)-p-chlorobenzamide: A comparison with L-deprenyl. *Biochem. Pharmacol.* **50(1)**, 97-102
- Bondy B., Ackenheil M., Birzle W., Elbers R., and Fröhler M. (1984). Catecholamines and their receptors in blood: evidence for alterations in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* **19**, 1377-1392
- Bondy S. C., Agrawal A. K. (1980). The inhibition of cerebral high affinity receptor sites by lead and mercury compounds. *Ach. Toxicol.* **46**, 249-256
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- Brozoski T. J., Brown R. M., Rosvold H. E., and Goldman P. S. (1979). Cognitive deficit caused by regional depletion of dopamine in frontal cortex of rhesus monkey. *Science* **205**, 929-931
- Cagianò, R., De Salvia M. A., Renna, G., Tortella, E., Braghiroli, D., Parenti, C., Zanoli, P., Baraldi, M., Anneau, Z., and Cuomo, V. (1990). Evidence that exposure to MeHg during gestation induces behavioral and neurochemical changes in offspring of rats. *Neurotoxicol. Teratol.* **12(1)**, 23-28
- Caronti B., Calderaro C., and Passarelli F. (1998). Dopaminergic receptor mRNAs in the rat lymphocytes. *Life Sci.* **62(21)**, 1919-1925
- Chakrabarti S. K., Loua K. M., Bai C., Durham D. H., and Panisset J. C. (1998). Modulation of Monoamine oxidase activity in different brain regions and platelets following exposure of rats to methylmercury. *Neurotoxicology & Teratology.* **20(2)**, 161-168
- Chang L. W. (1990). The neurotoxicology and pathology of organomercury, organolead, and organotin. *J. Toxicol Sci* **15**, 125-151
- Chang, L., and Hartman (1972). Electron microscopic histochemical study on the localisation and distribution of mercury in nervous system after mercury intoxication. *Exp. Neurol.* **35**, 22-
- Checkoway H., Echeverria D., Moon J-D., Heyer N., and Costa L. G. (1994). Platelets monoamine oxidase B activity in workers exposed to styrene. *Int. Arch. Environ. Health.* **66**, 359-362
- Clarkson T. W. (1972). The pharmacology of mercury compounds. *Annu. Rev. Pharmacol.* **12**, 375-406
- Coccini T., Manzo L., and Costa L. G. (1990). ³H-piperone labels sigma receptors, not dopamine D₂ receptors, in rats and human Lymphocytes. *Immunopharmacology.* **22**, 93-106
- Corda M. G., Concas A., Rossetti Z., Guarneri F. P., Corongiu and Biggio G. (1981). Methylmercury enhances [³H]diazepam binding in different areas of the rat brain. *Brain Res.* **229**, 264-269
- Costa L. G. Peripheral models for the study of occupational health. In: *Foa V. Emmett EA., Maroni M., Colombi A., eds. Occupational and Environmental chemical hazards.* Chichester, UK: Ellis Horwood Ltd., 1987; pp 524-528

- Counter S.A., Buchanan L. H., Laurell G., and Ortega F. (1998). Blood mercury and auditory neuro-sensory responses in children and adult in the Nambija gold mining areas of Ecuador. *Neurotoxicology* **19**(2), 185-196
- Cooper J. R., Bloom F. E., and Roth R. H. (1996). Norepinephrine and Epinephrine. In *Biochemical Basis of Neuropharmacology, Seventh edition*, pp. 226-292, Oxford University Press, New York
- Cranmer M., Gilbert S., Cranmer J. (1996). Neurotoxicity of mercury - Indicators and Effects of Low-Level Exposure: Overview. *Neurotoxicology* **17**(1), 9-14
- Dewar K. M., and Reader A. T. 1989. Distribution of dopamine D₁ and D₂ receptors in Rabbit cortical areas, hippocampus, and neostriatum in relation to dopamine contents. *Synapse*. **4**, 378-386
- Dolbec J., Mergler D., Sousa Passos C.-J., Sousa de Morais S., and Lebel J. (2000). Methylmercury exposure affects motor performance of a riverine population of the Tapajós river, Brazilian Amazon. *Int. Arch Occup Environ Health* **73** :195-203
- Faro L. R., Duran R., do Nascimento J. L., Alfonso M., and Picanco-Diniz C. W. 1998. Effects of methylmercury in vivo release of dopamine and its acidic metabolites DOPAC and HVA from striatum of rats. *Ecotoxicol & Environ. Safety* **38**(2), 95-98
- Faro L. R., do Nascimento J. L., Alfonso M., and Duran R. 1997. Acute administration of methylmercury changes in vivo dopamine release from rat striatum. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **60**(4), 632-638
- Fartacek R., Geretsegger C., Breitfuss A., Ackenheil M., and Bondy B. (1997). Elevated lymphocytes spiperone binding: a vulnerability factor for affective psychosis? *Biol. Psychiatry* **41**(1), 107-110
- Fitzgerald B. B, Costa L. G. (1993). Modulation of Muscarinic receptors and Acetylcholinesterase Activity in Lymphocytes and in Brain Areas Following repeated organophosphate Exposure in Rats. *Fund Appl Toxicol.* **20**, 210-216
- Galkina O. V., and Podgornaya E. K. (1992). Regional brain patterns of dopamine, metabolites and D₂ receptors in memory. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **54**(2), 453-460
- Glowinski J. and Iversen L. L. (1966). Regional studies of catecholamines in the rat brain I. The disposition of [³H] norepinephrine, [³H] dopamine and [³H] dopa in various region of the brain. *J Neurochem* **13**, 655-669
- Grandjean P., Weihe P., White R. F et al., (1997). Cognitive deficits in 17 - year old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol. Teratol.* **20**, 417-428
- Grandjean P., Weihe P., White R. F., and Debes F. (1998). Cognitive performance of children prenatally exposed Safe levels of methylmercury. *Environ. Res.* **77**, 165-172
- Grodzicki J., Pardo M., Schived G., Schlosberg A., Fuchs S., Kanety H. 1990. ³H-spiperone binding to peripheral blood lymphocytes from neuroleptic responsive and nonresponsive schizophrenics. *Biol. Psychiatry* **27**, 1327-1330
- Hagan, J. J., Alpert, J. E., Morris, R. G. M., and Iversen S. D. (1983). The effect of catecholaminergic depletion on the spatial learning in rats. *Brain Res*, **9**, 83-104
- Harada M., Nakanishi J., Konuma S., Ohno K., Kimura T., Yamaguchi T., Tsuruta K., Kizaki T., Ookawara T., and Ohio H. (1998). The present mercury contents of scalp hair and clinical symptoms in inhabitants of the Minamata area. *Environ. Res.* **77**, 160-164
- Hall H. Dopamine Receptors: Radioligands for pharmacological and biochemical characterization. In: *Dopamine receptors and Transporters: Pharmacology, structure, and function*. Hyman B. Niznik. ed. Marcel Dekker, Inc. New York pp. 3-35, 1994

- Heninger G. R. Indoleamines: The role of serotonin in clinical disorders. In *Psychopharmacology: The Fourth generation of progress*, eds. Floyd E. Bloom and David J. Kupfer, Raven Press. New York. pp 471-482. 1995
- Herken H., and Hocho F. (1994). Selective Neurotoxicity, *Handbook of Experimental Pharmacology*; Vol. 102. Springer-Verlag, New York
- Hrdina P. D., Peters D. A. V., and Singhal R. L. (1976). Effects of chronic exposure of cadmium, lead and mercury on brain biogenic amines in the rat. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 15, 483-493
- IPCS (1990). Environmental Health Criteria 101: Methylmercury, Geneva, IPCS, World Health Organisation, 144 pp.
- Kalisch B. E., Racz, W. J. (1996). The effects of methylmercury on endogenous dopamine efflux from mouse striatal slices. *Toxicology Lett.* 89(1), 43-49
- Kennedy C. G. Trace Element determination in Polymers by Neutron Activation. In, *Metallization of Polymers*, ed. by E. Sacher, J.J. Pireaux, and S. P. Kowalczyk. American Chemical Society, 1990, pp. 128-134 Washington
- Kobayashi H., Yuyama A., Matsusaka N., Takeno K., and Yanagiya I. (1980). Effect of MeHg on brain ACh concentration and turnover in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 54, 1-8
- Komulainen H., and Tuomisto J. (1982). Effects of heavy metals on monoamine uptake and release in brain Synaptosomes and blood platelets. *Neurobehav. Toxicol.* 4, 647-649
- Komulainen H., and Tuomisto J. (1985). ³H-Dopamine uptake and ³H-haloperidol binding in striatum after administration of methylmercury to rats. *Arch. Toxicol.* 57, 268-271
- Komulainen H., and Tuomisto J. (1987). The neurochemical effects of methylmercury, In *the toxicity of Methylmercury*. C.U Eccles, and Z. Annau eds. pp: 172-188. The Johns Hopkins University Press, Baltimore
- Kosatsky, T., and Foran, P. (1996). Do Historic studies of fish consumers support the widely accepted LOEL for methylmercury in adults. *Neurotoxicology.* 17(1), 177-186
- Krajl M. (1965). A rapid microfluorometric determination of monoamine oxidase. *Biochem Pharmacol* 14, 1683-1685
- Kung M. P., Kostyniak P. J., Olson J. R., Sansone F. M., Nickerson P. A., Malone M. A., Ziembiec N., Roth J. A. (1989). Cell specific enzyme markers as indicators of neurotoxicity: Effects of acute exposure to methylmercury. *Neurotoxicology* 10, 41-52
- Le Fur G., Phan T., and Uzan A. (1980a). Identification of stereospecific [³H]spiroperidol binding sites in mammalian lymphocytes. *Life Sciences.* 26, 1139-1148
- Le Fur G., Meininger V., Phan T., Gérard A., Baulac M., and Uzan A. (1980b). Decrease in lymphocytes [³H]spiroperidol binding sites in parkinsonism. *Life Sciences.* 27, 1587-1591
- Lebel C. P., Ali S. F., McKee M., and Bondy S. C. (1990). Organo-metal induced increases in Reactive Oxygen Species: The potential of 2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate as an Index of Neurotoxic Damage. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 104, 17-24
- Lebel J., Mergler D., Lucotte M., Amorim M., Dolbec J., Miranda D., Aranthès G., Rheault I., and Pichet P. (1996). Evidence of early nervous system dysfunction in Amazonian populations exposed to low-levels of methylmercury. *Neurotoxicology.* 17(1), 157-168
- Lebel J., Mergler D., Lucotte M., Amorim M., Dolbec J., Miranda D., Arantès G., Rheault I., Pichet P. (1996). Evidence of early nervous system dysfunction in Amazonian populations exposed to low-levels of methylmercury. *Neurotoxicology.* 17:157-168
- Lebel J., Mergler D., Branches F., Lucotte M., Amorim M., Laribe F., Dolbec J. (1998). Neurotoxic effects of low-level methylmercury contamination in the Amazonia basin. *Environ. Res.* 79:20-32

- Levesque, P. C. Hare, M. F. and Atchison, W. D. (1992). Inhibition of Mitochondrial Ca^{2+} release diminishes the effectiveness of methyl mercury to release ACh from synaptosomes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **115**, 11-20
- Lindström, H., Luthman, J., Oskarsson, A., Sundberg J., and Olson L. (1991). Effects of long-term treatment with methyl mercury on the developing rat brain. *Envir. Res.* **56**, 158-169
- Loua K. M., Chakrabarti K. S., Heather D., and Panisset J. C. (1997). Effects of methylmercury on the uptake of dopamine, choline and serotonin by and the binding to receptors in rat brain synaptosomes, lymphocytes and platelets. *Fund Appl Toxicol. Suppl.* 1997, **36** (1) Part 2; 68 (351)
- Magos, L., Peristianis G. C., and Snowden, R. T. (1978). Postexposure preventive treatment of methylmercury intoxication in rats with dimercaptosuccinic acid. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **45**, 463-475
- Magos, L., and Butler W. H. (1976). The kinetics of methylmercury administered repeatedly to rats. *Arch Toxicol* **35**, 25-39
- McNamara R. K., and Skelton R. W. 1993. The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in Morris water maze. *Brain Res. Rev.* **18**, 33-49
- Meltzer, H. Y., Arora, R. C. (1991). Platelets serotonin studies in affective disorder: evidence for a serotonergic abnormality. In: Sandler M., Coppen A., Harnett S, eds. 5-Hydroxytryptophane in psychiatry: a spectrum of ideas. New York: oxford University Press, 1991, 50-89
- Minnema, D., Cooper, P. G., and Greenland, D. R. (1989). Effects of methylmercury on neurotransmitter release from rat brain synaptosomes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **99**, 510-521
- Möller-Madsen B., (1994). Localisation of Mercury in CNS of rat: An Autometallographic Study. *Pharmacology & Toxicology* **75** (Suppl. 1), 1- 41
- Murray A. R. (1995). Alzheimer's Disease: treatment of non cognitive behavioral abnormalities. In *Psychopharmacology: The Third Generation of Progress*. Bloom, F. E.; Kupfer, D. J. eds. Pp. 1427-1435, Raven Press, New York
- Nakatsuru S., Oohashi J., Nozaki H., Nakada S., and Imura N. (1985). Effect of mercurials on lymphocytes functions in vitro *Toxicology* **36**, 297-305
- Ninomiya T., Ohmori H., Hashimoto K., Tsuruta K., and Ekino S. 1995. Expansion of methylmercury poisoning outside of Minamata: An epidemiological Study on chronic methylmercury poisoning outside of Minamata. *Env. Res* **70**, 47-50
- Norseth, T. and Clarkson, T. W. (1970). Studies on the biotransformation of ^{203}Hg -labelled methylmercury chloride in rats. *Arch. Environ. Health.* **21**, 717-727
- Okuda J., Tsuzuki Y., and Yamada T. 1978. Some neurochemical changes in the brain of rats with acute intoxication of methylmercury chloride. *Jap J. Legal Med.* **32(2)**, 51-58
- O'Kusky J. R., Boyes B. E., McGeer E. C. (1988). Methylmercury-induced movement and postnatal disorders in developing rat: regional analysis of brain catecholamines and indolamines. *Brain Res.* **439**, 138-146
- Omata S., Sakimura K., Tsubaki H., and Sugano H. (1978). In vivo effect of methylmercury on protein synthesis in brain and liver of the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol* **44**, 367-378
- Omata S., Sato M., Sakimura K., Sugano H. (1980). Time-dependent accumulation of Inorganic mercury in the Subcellular fractions of kidney, liver and Brain of rats Exposed to Methylmercury *Arch Toxicol.* **44**, 231-241
- Omata S., Hirakawa E., Daimon Y., Uchiyama M., Nakshita H., Horigome T., Sugano I., Sugano H. (1982). Methylmercury induced changes in the activities of neurotransmitter enzymes in nervous tissues of the rats. *Arch. Toxicol.* **51**, 285-294

- Oudar P., Caillard L., and Fillion G. (1989) In vitro Effect of Organic and Inorganic Mercury on the Serotonergic System. *Pharmacology & Toxicology* **65**, 245-248
- Pilowsky L. S., Costa D. C., Ell P. C., Murray R. M., Verhoeff NPLG. Kerwin R. G. (1992). Clozapine, single photon emission tomography, and the D₂ dopamine receptor blockage hypothesis of schizophrenia. *Lancet* **340**, 199-202
- Przedborski S., Lewis-Jackson V., Popilskis S., Kostic V., Levivier M., Fashn S., Cadet J. L. (1991). Unilateral MPTP-induced parkinsonism in monkeys: A quantitative autoradiographic study of dopamine D1 and D2 receptors and re-uptake sites. *Neurochirurgie* **37**:377-382
- Ratcliffe H. E., Swanson G. M. and Fisher L. J. (1996). Human exposure to mercury: Critical assessment of the evidence of adverse health effects. *J. Toxicol. Environ. Health* **49**, 221-270
- Reader T. A., Dewar K M, and Groudin L. (1989). Distribution Monoamines and Metabolites in Rabbit Neostriatum, Hippocampus and Cortex. *Brain Res. Bull.* **23**, 237-247
- Rice D. C. (1996). Evidence for Delayed Neurotoxicity produced by Methylmercury. *Neurotoxicology*, **17(3-4)**, 583-596
- Ricci A., Mariotta S., Greco S., and Bisetti A. (1997). Expression of dopamine receptors in immune organs and circulating immune cells. *Clin. and Exper. Hypertension* **19(1&2)**, 59-71
- Robbins T. W., and Everitt B. J. (1995). Central norepinephrine neurons and behavior. In *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress* (F. E. Bloom and D. J. Kupfer, eds.) pp.373-386, Raven Press, New York
- Sarafian T., and Verity M. A. (1990). Altered patterns of protein phosphorylation and synthesis caused methylmercury in cerebellar granule cell culture. *J. Neurochem.* **55(3)**, 922-929
- Sato T., and Nakamura Y. (1990). Neuropathology of methylmercury intoxication. In *Advances in Mercury Toxicology*, Tsuzuki et al. Eds.; pp. 355-366. Plenum Press, New York
- Sawaguchi T., Matsumura, M., and Kubota K. (1988). Dopamine enhances the neuronal activity of spatial short-term memory task in the primate prefrontal cortex. *Neurosci. Res.* **5**, 465-473
- Scatton B., Javaoy-Agid F., Rouquier L., Dubois B., Agid Y. (1983). Reduction of cortical dopamine, norepinephrine, serotonin and their metabolites in Parkinson disease. *Brain Res.* **275**, 321-328
- Seeman P. 1995. Dopamine receptors: Clinical correlates. In *Psychopharmacology: The fourth generation of Progress* Ed. Flood E. Bloom and David J. Kupfer, Raven Press, New York. pp 295-302
- Sharma R. P., Aldous C. N., and Farr C. H. (1982). Methylmercury induced alterations in brain amine synthesis in rats. *Toxicol Lett* **13**, 195-201
- Siever L. J. Kahn R. S., Lawlor B. A., Trestman R. L. Lawrence T. L., and Coccaro E. F. (1992). Critical issues in defining the role of serotonin in psychiatric disorders. *Pharmacol. Rev.* **43**, 509-525
- Silbergeld E. K. (1993). Neurochemical approaches to developing biochemical markers of neurotoxicity: Review of current status and evaluation of future prospects. *Environ. Res.* **63**, 274-286
- Slikker W. Jr., Holson r. R., Ali S. F., Kolta M. G., Paule M. G., Scallet A. C., McMillan D. E., Bailey J. R., Hong J. S., and Scalo F. M. (1989). Behavioral and neurochemical effects of orally administrated MDMA in the rodent and nonhuman primate. *Neurotoxicology* **10**, 529-542

- Slotkin T. A., McCook E. C., Ritchie J. C., Carroll B. J., and Seidler F. J. (1997). Serotonin transporter expression in rat brain regions and blood platelets: Aging and Glucocorticoid effects. *Biol Psychiat* **41**(2), 172-183
- Snyder S. H., and Coyle J. T. (1969). Regional differences in H³-norepinephrine and H³-dopamine uptake into rat brain homogenate. *J. Pharmacol. Exp. Ther* **165**(1):78-86
- Sokolowski J. D., and Salamone J. D. (1994). Effects of dopamine depletion in the medial prefrontal cortex on DRL performance and motor activity in the rat. *Brain Res.* **642**, 20-28
- Sudo, A., and Arito, H. 1982. Neurochemical correlates of sleep disorder of rats administered with methylmercury chloride. *Ind Health* **20**, 67-70
- Tan X., Tang C., Castoldi Manzo L., and Costa L. G. (1993). Effects of inorganic and organic mercury on intracellular calcium levels in rat lymphocytes. *J. Toxicol. Envir. Health.* **38**, 59-170
- Tanji, H., Araki, T., Nagasawa, H., Itoyama, Y. (1999). Differential vulnerability of dopamine receptors in the mouse brain treated with MPTP. *Brain Res.* **824**(2):224-234
- Taylor, L. L., and Di Stephano. (1986). Effects of methylmercury on brain biogenic amines in the developing rat pup. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **38**, 489-497
- Tsuzuki Y. 1981. Effect of chronic methylmercury exposure on activity of neurotransmitters enzymes in rats cerebellum. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **60**:379-381
- Tsuzuki, Y. 1982. Effects of methylmercury on different neurotransmitter systems in rat brain. *Toxicol. Lett* **13**, 159-162
- Trevor W R., and Barry J. E. (1995). Central norepinephrine neurons and behavior. In *Psychopharmacology: The fourth generation of Progress* Ed. Flood E. Bloom and David J. Kupfer, Raven Press, New York, pp 363-372
- Tuomisto J., and Komulainen H. (1983). Release and inhibition of Uptake of 5-Hydroxytryptamine in blood platelets *in vitro* by Copper and Methylmercury. *Acta Pharmacol. et Toxicol.*, **52**, 292-297
- Verity M. A., Brown W. J., Cheung, M., and Czer G. (1977). Methylmercury inhibition of synaptosomes and brain slice protein synthesis- *in vivo* and *in vitro* studies. *J. Neurochem.* **29**, 673-679
- Warfvinge K., and Berlin M. (1992). Mercury distribution in the rat brain after mercury vapor exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **117**, 46-52
- Whishaw, I. Q., and Dunnett, S. B. 1985. Dopamine depletion, stimulation of blockade in the rat disrupt spatial navigation and locomotion dependent upon beacon and distal cues. *Behav. Brain. Res.* **18**, 11-29
- Yagame, H., et al., 1994, Differential effects of methylmercury on the phosphorylation of protein species in the brain of acutely intoxicated rats. *Toxicology*, **92**, 101-113
- Yee S., and Choi B. H. 1996. Oxidative stress in Neurotoxic effects of methylmercury Poisoning. *Neurotoxicology.* **17**(1), 17-26
- Yoshino Y., Mozai T., Nakao K. (1966). Distribution of mercury in the brain and its subcellular units in the experimental organic mercury poisonings. *J. Neurochem.* **13**, 397-406

RESULTS

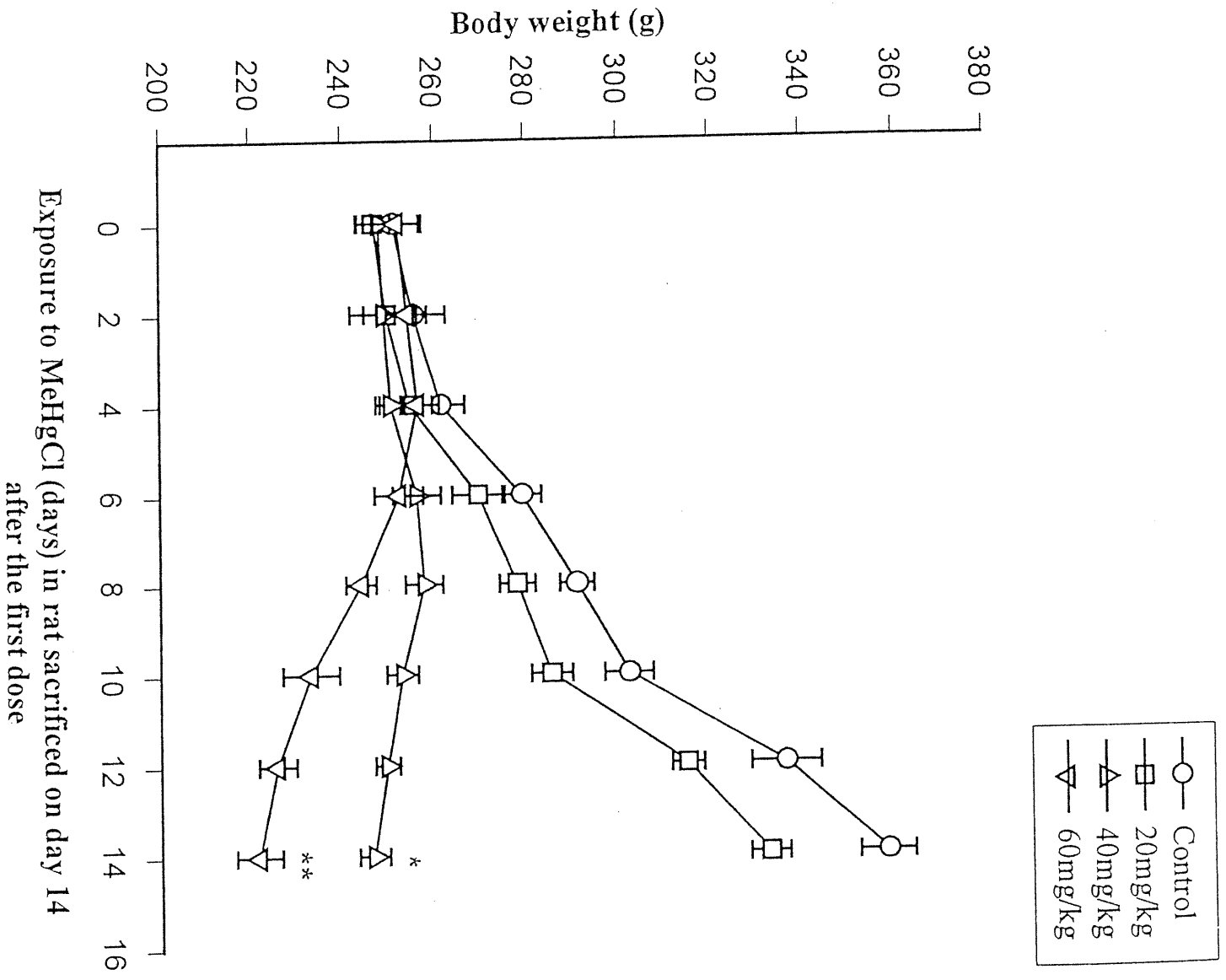


Figure 1: Variations of body weight after repeated treatment of adult rats to MeHgCl

Data reported are means of 4 measurements \pm S.D of body weight of rats.

* Difference significant at $p < 0.05$ versus 0 and 2 mg/kg;

** Difference significant at $p < 0.002$ versus 4 and 2 mg/kg

Adult male SD rats were repetitively treated with MeHgCl (cumulative doses of 20, 40 and 60 mg/kg) for 10 consecutive days. Body weights BW were measured every two days from day 0 to 14, and animals were sacrificed 4 days after the last dose.

Table 1: Effect of repeated administration of MeHgCl on DA levels and its metabolites in brain regions in adult rats

| | MeHg (mg/kg/days/10days) | | |
|---|--------------------------|---------------------|------------------------------------|
| | 0 | 2 | 4 |
| CEREBRAL CORTEX | | | |
| DA | 66.94±2.78 | 72.47±5.91 (+8.26) | 89.03±2.70(+33.00) ^a |
| DOPAC | 51.06±2.57 | 47.71±2.28 (8.52) | 29.33±2.43(42.56) ^a |
| HVA | 37.11±0.70 | 34.70±2.04 (6.49) | 25.89±1.60 (30.23) ^a |
| STRIATUM | | | |
| DA | 3538.74±49.60 | 3602.35±6.62(+1.80) | 4997.67±9.41(+41.23) ^a |
| DOPAC | 680.00±4.79 | 665.42±7.97(2.14) | 508.77±14.30 (25.18) ^a |
| HVA | 572.89±7.67 | 554.54±9.69(3.20) | 403.50±21.75 (29.57) ^a |
| HYPOTHALAMUS | | | |
| DA | 408.23±13.94 | 431.69±7.70(+5.75) | 482.99±6.52(+18.31) ^a |
| DOPAC | 130.40±6.64 | 122.18±6.95 (6.30) | 92.13±1.90 (29.35) ^a |
| HVA | 89.29±4.75 | 76.51±7.94(14.31) | 52.18±3.18(41.56) ^a |
| HIPPOCAMPUS | | | |
| DA | 136.21±8.78 | 152.44±9.10(+11.92) | 177.31±4.22 (+30.17) ^a |
| DOPAC | 90.82±7.26 | 81.13±6.33(10.67) | 48.00±3.77 (47.15) ^a |
| HVA | 61.42±4.10 | 53.79±4.36(12.42) | 42.70±4.10 (30.48) ^a |
| BRAINSTEM | | | |
| DA | 182.12±7.37 | 185.31±7.61 (+1.75) | 232.33±15.50 (+27.57) ^a |
| DOPAC | 111.80±13.99 | 92.26±10.10(17.48) | 54.68±4.90 (48.41) ^a |
| HVA | 50.37±3.79 | 42.32±4.14 (15.98) | 29.70±3.11 (41.04) ^a |
| CEREBELLUM | | | |
| DA | 45.14±3.69 | 50.46±5.32(+11.79) | 65.55±4.17(+45.22) ^a |
| DOPAC | 32.22±3.14 | 26.49±2.73(17.78) | 14.29±1.70(55.65) ^a |
| HVA | 31.32±2.28 | 27.64±2.45(11.75) | 17.16±0.96(45.21) ^a |
| 6 | | | |
| DA | | | 24.20±3.30(63.85) ^b |
| DOPAC | | | 14.58±2.41(71.45) ^b |
| HVA | | | 15.42±0.91 (58.45) ^b |
| 1202.80±27.76(66.01)^b | | | |
| 293.67±8.03 (56.81)^b | | | |
| 198.66±9.43 (65.32)^b | | | |
| 229.30±2.75 (43.83)^b | | | |
| 57.89±2.90 (55.61)^b | | | |
| 21.58±3.18 (75.83)^b | | | |
| 50.99±6.65 (62.57)^b | | | |
| 15.84±2.30 (82.56)^b | | | |
| 12.20±2.21 (80.14)^b | | | |
| 75.13±7.65 (58.75)^b | | | |
| 17.47±2.78 (84.37)^b | | | |
| 11.86±1.61 (76.45)^b | | | |
| 13.10±1.84 (70.98)^b | | | |
| 5.65±0.68 (82.46)^b | | | |
| 6.43±0.70 (79.47)^b | | | |

Note: Results are means of 6 measurements \pm S.D. (ng/mg protein) of DA, DOPAC and HVA; Number in the parenthesis represent percents of the effects.

^a $p < 0.05$ for 4 mg/kg versus 2 mg/kg;

^b $p < 0.001$ for 6 mg/kg versus 4 mg/kg.

Adult male SD rats were repetitively treated to MeHgCl (cumulative doses of 20, 40 and 60 mg/kg) for 10 consecutive days, and were sacrificed 4 days after the last dose. Concentrations of DA, DOPAC and HVA were measured in brain regions and in blood lymphocytes.

Table 2: Effects of repeated administration of MeHgCl on NE levels and its metabolites in brain regions in adult rats

| | MeHg (mg/kg/days/10days) | | | |
|------------------------|--------------------------|-----------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | 0 | 2 | 4 | 6 |
| CEREBRAL CORTEX | | | | |
| NE | 187.53±11.15 | 199.58±3.76 (+6.43) | 218.18±7.20 (+16.34) ^a | 70.61±3.80 (62.35) ^b |
| MHPG | 112.63±5.48 | 111.57±1.33 (0.94) | 89.55±4.28 (20.49) ^a | 43.51±3.23 (61.37) ^b |
| VMMA | 139.67±3.10 | 133.07±5.10(4.73) | 119.68±1.21 (14.31) ^a | 76.89±7.31 (44.95) ^b |
| STRIATUM | | | | |
| NE | 374.57±5.42 | 381.93±2.57 (+1.96) | 420.07±10.05 (+12.15) ^a | 115.20±2.83 (69.25) ^b |
| MHPG | 233.33±4.37 | 226.93±3.44 (2.74) | 116.83±1.77(49.93) ^a | 49.72±4.71 (78.69) ^b |
| VMMA | 216.93±6.80 | 214.22±6.74 (1.25) | 113.05±6.76(47.89) ^a | 81.60±4.13 (62.38) ^b |
| HYPOTHALAMUS | | | | |
| NE | 1361.44±18.76 | 1402.33±45.24 (+3.00) | 1467.70±7.33(+7.81) ^a | 775.73±61.54 (43.02) ^b |
| MHPG | 690.39±39.56 | 619.24±20.60 (10.31) | 493.61±7.69 (28.50) ^a | 195.84±16.66 (71.63) ^b |
| VMMA | 673.9±8.24 | 650.48±20.47 (3.36) | 554.24±32.93(17.66) ^a | 309.27±15.98 (54.11) ^b |
| HIPPOCAMPUS | | | | |
| NE | 299.33±9.74 | 306.56±15.70 (+2.42) | 374.13±19.66 (+25.00) ^a | 145.67±11.34 (51.33) ^b |
| MHPG | 111.00±3.97 | 93.90±3.47 (15.41) | 70.12±2.48(36.830) ^a | 31.64±2.97 (71.50) ^b |
| VMMA | 189.14±7.05 | 179.25±4.97 (5.23) | 157.82±3.62 (16.56) ^a | 104.55±7.04 (44.72) ^b |
| BRAINSTEM | | | | |
| NE | 819.96±31.40 | 874.77±51.48 (+6.68) | 976.18±8.55 (+19.50) ^a | 420.82±7.34 (48.70) ^b |
| MHPG | 617.90±20.81 | 585.87±13.44 (5.18) | 481.96±15.22 (22.00) ^a | 195.95±15.34 (68.290) ^b |
| VMMA | 554.58±20.53 | 522.17±24.44 (5.84) | 365.26±17.99 (34.14) ^a | 238.94±13.89 (48.80) ^b |
| CEREBELLUM | | | | |
| NE | 250.11±6.74 | 258.10±5.84 (+3.20) | 284.01±7.91 (+13.55) ^a | 98.41±7.43 (60.65) ^b |
| MHPG | 85.60 ± 10.10 | 77.80±4.12 (9.95) | 58.83±2.70 (31.27) ^a | 22.98±3.50(73.15) ^b |
| VMMA | 127.63±4.91 | 121.73±2.14 (4.62) | 111.83±2.42 (12.38) ^a | 47.18±4.20(63.03) ^b |

Note: Results are means of 6 measurements \pm S.D. (ng/mg protein) of norepinephrine (NE), MHPG and vanilyl mandelic acid (VMA); Numbers in the parenthesis represent percents the effects.

^a $p < 0.05$ for 4 mg/kg versus 4 mg/kg;

^b $p < 0.001$ for 6 mg/kg versus 4 mg/kg.

Adult male SD rats were repetitively treated to MeHgCl (cumulative doses of 20, 40 and 60 mg/kg) for 10 consecutive days, and were sacrificed 4 days after the last dose. Concentration of NE, MHPG and VMA were measured in brain regions.

Table 3: Effects of repeated administration of MeHgCl on 5-HT levels and its metabolite in brain regions and blood platelets in adult rats

| | MeHg (mg/kg/days/10days) | | | |
|------------------------|--------------------------|-----------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| | 0 | 2 | 4 | 6 |
| CEREBRAL CORTEX | | | | |
| 5-HT | 183.00±6.16 | 191.21±6.64 (+4.49) | 234.52±16.22(+28.15) ^a | 94.10±8.26(48.58) ^b |
| 5-HIAA | 204.86±10.45 | 185.70±9.75 (9.35) | 122.47±6.17(40.22) ^a | 70.57±9.89(65.55) |
| STRIATUM | | | | |
| 5-HT | 384.36±5.52 | 410.60±19.10 (+6.830) | 469.51±6.67(+21.63) ^a | 142.23±7.12(63.00) ^b |
| 5-HIAA | 626.36±8.40 | 598.85±20.25 (4.39) | 407.88±22.74(34.88) ^a | 274.17±23.59(56.23) ^b |
| HYPOTHALAMUS | | | | |
| 5-HT | 363.40±8.38 | 375.33±8.51 (+3.28) | 405.11±18.48(+11.48) ^a | 140.50±11.38(61.34) ^b |
| 5-HIAA | 636.51±10.53 | 597.25±21.50 (6.17) | 352.90±42.00(44.56) ^a | 150.63±11.33(76.34) ^b |
| HIPPOCAMPUS | | | | |
| 5-HT | 220.48±10.61 | 229.00±9.72 (+3.86) | 262.11±2.90 (+18.88) ^a | 91.10±12.25(58.68) ^b |
| 5-HIAA | 389.62±9.47 | 376.68±7.40 (3.32) | 320.10±9.50 (17.84) ^a | 134.02±10.86(65.60) ^b |
| BRAINSTEM | | | | |
| 5-HT | 487.75±7.65 | 505.62±15.34 (+3.66) | 545.92±9.10 (+11.93) ^a | 194.89±5.91 (60.04) ^b |
| 5-HIAA | 776.43±36.92 | 667.60±39.42 (14.02) | 394.30±25.28(49.22) ^a | 210.93±14.93(72.83) ^b |
| CEREBELLUM | | | | |
| 5-HT | 111.51±4.60 | 117.84±3.00 (+5.67) | 130.50±4.16 (+17.02) ^a | 57.80±6.60 (48.17) ^b |
| 5-HIAA | 146.41±2.62 | 136.80±5.82 (6.56) | 116.32±4.40 (20.55) ^a | 47.79±5.56 (67.36) ^b |
| PLATELETS | | | | |
| 5-HT | 50.76±2.67 | 32.86±3.93 (35.26) | 10.12±1.84 (+80.06) ^a | 3.48±0.71 (93.14) ^b |
| 5-HIAA | ND | ND | ND | ND |

Note: Results are means of 6 measurements \pm S.D. (ng/mg of protein) of 5-HT (serotonin) and 5-HIAA (5-hydroxyindoleacetic acid). The numbers in the parenthesis represent percent of effects compared to controls values.

^a $p < 0.05$ for 4 mg/kg versus 20 mg/kg;

^b $p < 0.001$ for 6 mg/kg versus 40 mg/kg;

N.D. = not detected.

Adult male SD rats were repetitively treated to MeHgCl (cumulative doses of 20, 40 and 60 mg/kg) for 10 consecutive days, and were sacrificed 4 days after the last dose. Levels of 5-HT and HIAA were measured in brain regions and peripheral blood platelets.

Table 4: Effect of repeated administration of MeHgCl on [³H]raclopride binding to D₂ receptors in brain regions and blood lymphocytes in rats

| | MeHg (mg/kg/days/10days) | | | |
|----|--------------------------|------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| | 0 | 2 | 4 | 6 |
| CR | 40.90 ± 3.66 | 35.29 ± 2.57 (13.72) | 17.63 ± 1.60 (56.90) ^a | 8.73 ± 1.46 (78.66) ^b |
| ST | 331.59 ± 10.10 | 307.53 ± 8.12 (7.26) | 176.70 ± 14.0 (46.71) ^a | 82.69 ± 9.70 (75.10) ^b |
| HY | 190.89 ± 6.33 | 170.53 ± 10.45 (10.67) | 113.80 ± 8.48 (40.39) ^a | 53.66 ± 5.87 (71.89) ^b |
| HI | 26.10 ± 2.16 | 20.75 ± 2.15 (20.50) | 12.30 ± 0.85 (52.87) ^a | 5.74 ± 1.40 (78.01) ^b |
| BS | 96.19 ± 2.82 | 86.32 ± 4.31 (10.26) | 71.37 ± 6.80 (25.80) ^a | 49.51 ± 3.82 (48.53) ^b |
| CB | 13.72 ± 0.83 | 12.31 ± 1.11 (10.28) | 6.75 ± 0.72 (50.80) ^a | 2.27 ± 0.50 (83.46) ^b |
| LY | 26.11 ± 1.80 | 23.52 ± 2.13 (9.92) | 17.66 ± 0.69 (32.36) ^a | 8.74 ± 1.12 (66.53) ^b |

Note: Results are means of 6 measurements ± S.D. (fmol/mg protein). The numbers in parenthesis represent percent of the effects compared to the controls values.

^a p < 0.05 for 4 mg/kg versus 2 mg/kg;

^b p < 0.001 for 6 mg/kg versus 4 mg/kg.

Adult male SD rats were repetitively treated to MeHgCl (cumulative doses of 20, 40 and 60 mg/kg) for 10 consecutive days, and were sacrificed 4 days after the last dose. Effects MeHg on [³H]-raclopride binding to D₂ receptors were measured in the cerebral Cortex (CC), striatum (ST), hypothalamus (HY), hippocampus (HI), brainstem (BS) and the cerebellum (CB) of the brain and blood lymphocytes (LY).

Table 5: Effect of repeated administration of MeHgCl on MAO activity in brain regions and blood platelets in rats

| | MeHg (mg/kg/days/10days) | | | |
|----|--------------------------|-----------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| | 0 | 2 | 4 | 6 |
| CC | 182.68 ± 2.25 | 178.80 ± 6.84(2.12) | 102.10 ± 3.20(44.12) ^a | 59.83 ± 1.82(67.25) ^b |
| ST | 281.67 ± 3.65 | 268.10 ± 7.40(4.82) | 181.40 ± 3.80(35.60) ^a | 109.46 ± 12.70 (61.14) ^b |
| HY | 230.69 ± 10.10 | 204.38 ± 20.22(11.41) | 159.54 ± 3.50(30.84) ^a | 126.50 ± 9.70 (45.17) ^b |
| HI | 203.88 ± 7.20 | 191.63 ± 8.65(6.01) | 126.38 ± 3.96(38.01) ^a | 87.92 ± 7.57 (56.88) ^b |
| BS | 81.46 ± 3.63 | 79.23 ± 5.80(2.74) | 58.32 ± 2.30(28.41) ^a | 38.01 ± 2.32 (53.34) ^b |
| CB | 68.97 ± 2.82 | 66.66 ± 4.34(3.35) | 40.48 ± 2.01(41.31) ^a | 20.24 ± 1.82 (70.65) ^b |
| PL | 31.24 ± 4.56 | 30.72 ± 5.31(2.16) | 26.14 ± 9.03(16.33) ^a | 19.90 ± 3.56 ± (36.30) ^b |

Note: Results are means of 6 measurements ± S.D. (ng/mg protein/30 min). Numbers in parenthesis are percents of inhibition compared the control values.

^a p < 0.05 for 4 mg/kg versus 2 and 0 mg/kg;

^b p < 0.001 for 6 mg/kg versus 4 and 2 mg/kg;

Adult male SD rats were repetitively treated to MeHgCl (cumulative doses of 20, 40 and 60 mg/kg) for 10 consecutive days, and were sacrificed 4 days after the last dose. Effects MeHg on MAO activity in the cerebral Cortex (CC), striatum (ST), hypothalamus (HY), hippocampus (HI), brainstem (BS) and the cerebellum (CB) and blood platelets (PL).

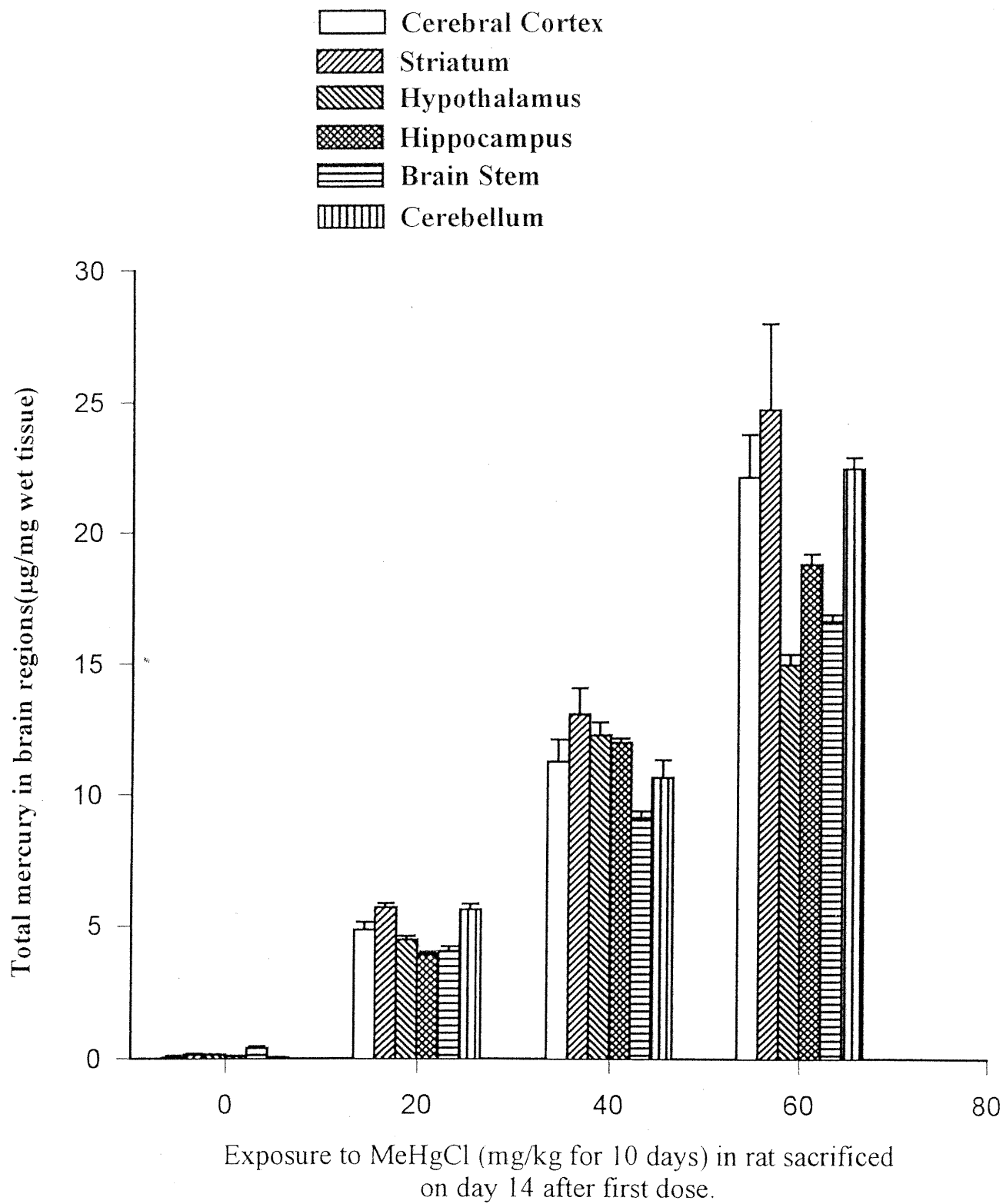


Figure 2

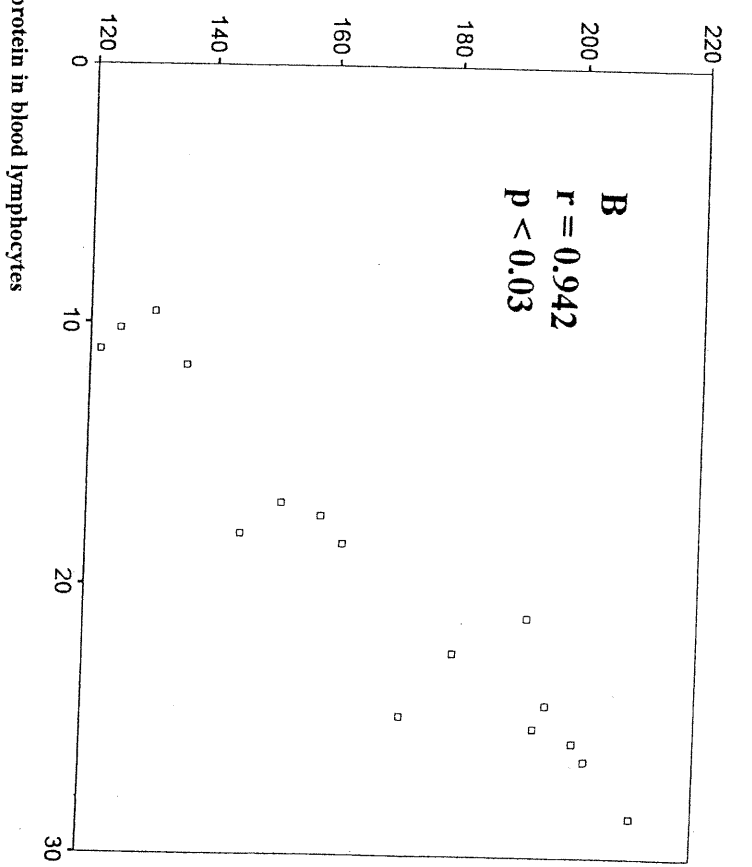
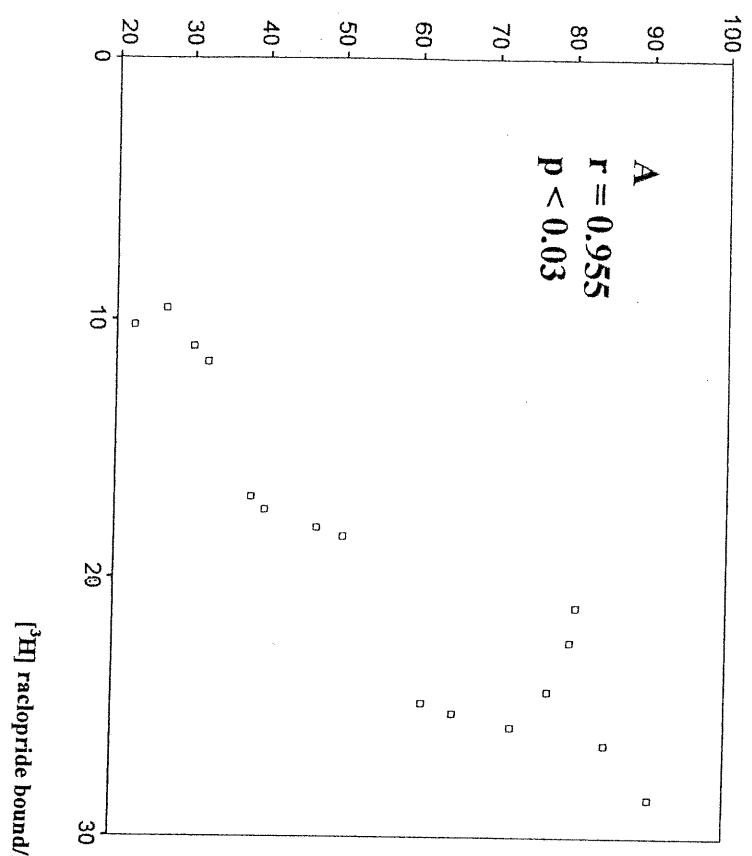
Figure 2: Accumulation of total mercury in brain regions and whole blood in adult rats treated to MeHgCl. Adult male SD rats were repetitively treated to MeHgCl (cumulative doses of 20, 40 and 60 mg/kg) for 10 consecutive days. Animals were sacrificed 4 days after the last dose. The total mercury was measured in brain regions and whole blood according the method indicated in the protocol. Values are means \pm SD of 6 measurements of total Hg (organic and inorganic) in brain regions and whole blood ($\mu\text{g}/\text{mg}$ for weight brain tissue; $\mu\text{g}/\text{ml}$ for whole blood).

^a $p < 0.05$, 20 mg/kg versus 0 mg/kg

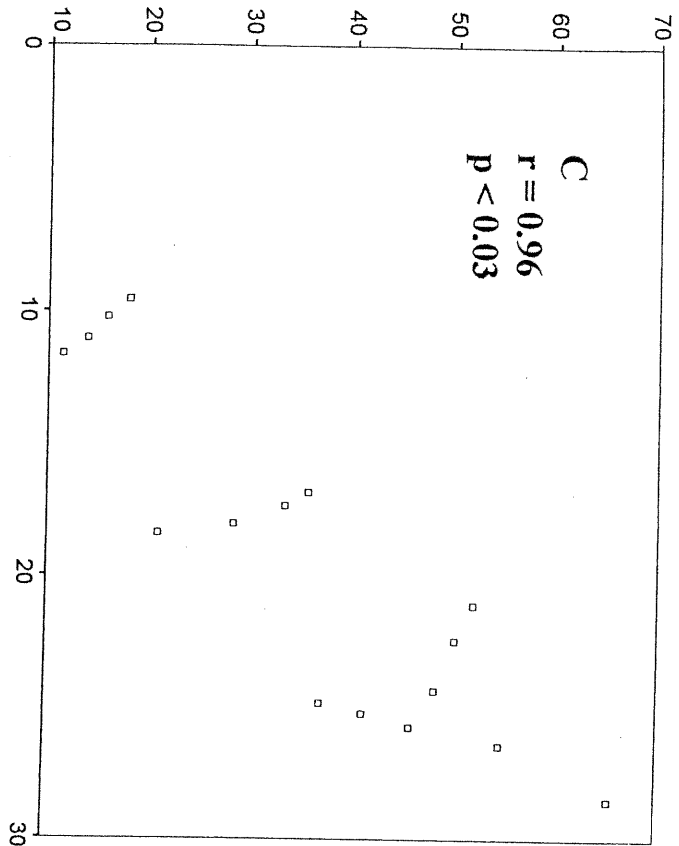
^b $p < 0.02$ 40 mg/kg versus 20 mg/kg

^c $p < 0.001$, 60 mg/kg versus 40 mg/kg.

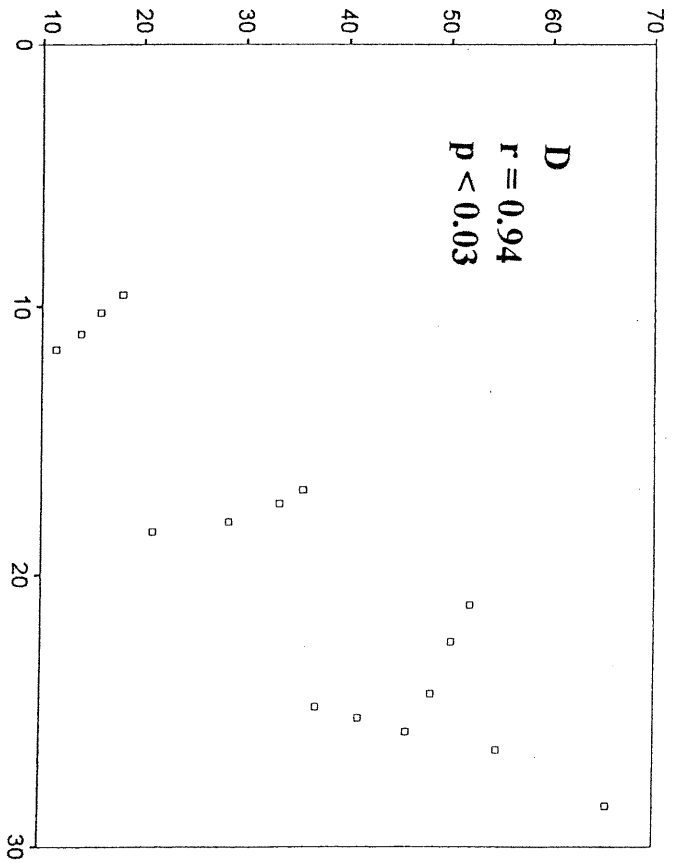
$[^3\text{H}]$ raclopride bound/mg protein in brain regions



$[^3\text{H}]$ raclopride bound/mg protein in brain regions



$[^3\text{H}]$ raclopride bound/mg protein in blood lymphocytes



³H] raclopride bound/mg protein in brain regions

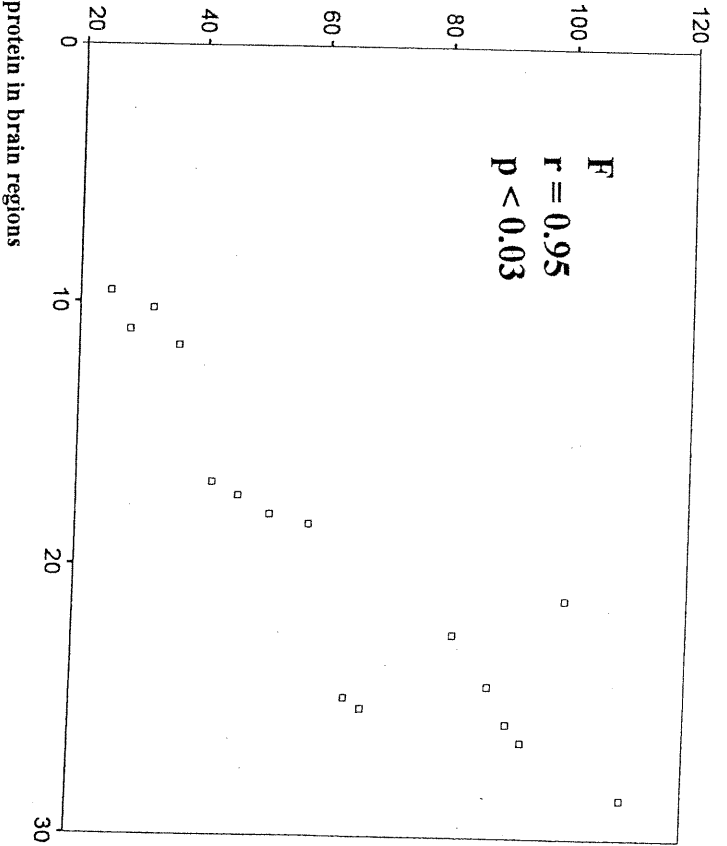
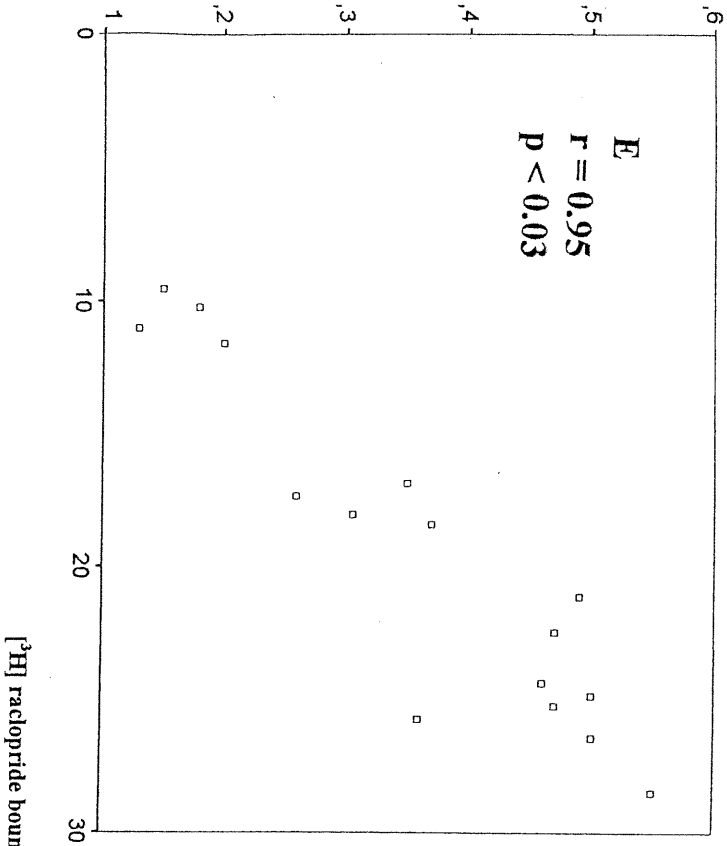


Figure 3. Pearson's correlation (r) between [^3H]raclopride binding to D_2 receptors in blood lymphocytes and in different brain regions from rats. Adult male SD rats were repetitively treated to MeHgCl (cumulative doses of 20, 40 and 60 mg/kg) for 10 consecutive days, and were sacrificed 4 days after the last dose. Effects MeHg on [^3H]raclopride binding to D_2 receptors on the blood lymphocytes (LY) and 5-HT contents in platelets (PL) were compared with similar effects in the cerebral cortex (A), striatum (B), hypothalamus (C), hippocampus (D), brainstem (E) and the cerebellum (F).
Pearson's correlation (r) was significant when $r \leq 0.50$; * $p < 0.05$

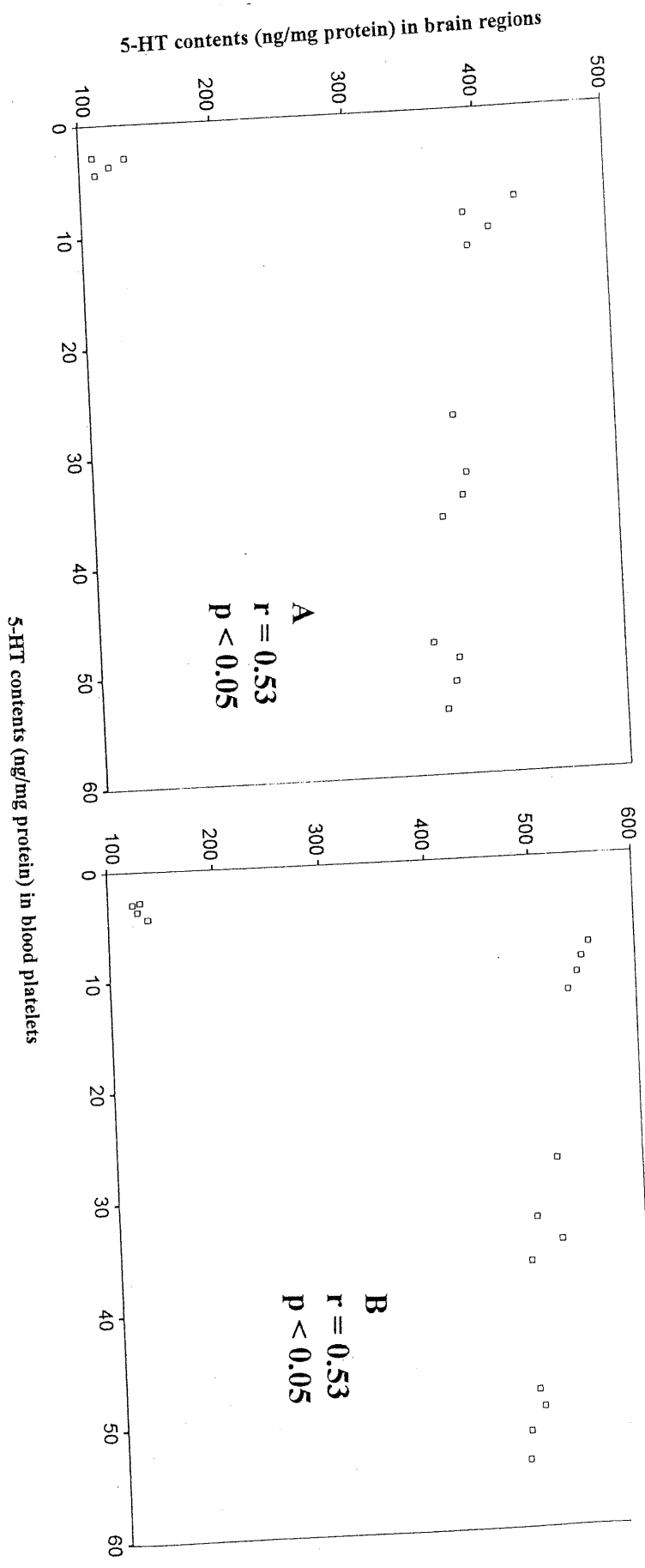


Figure 4. Pearson's correlation (r) between 5-HT content in blood platelets and brain regions in rats. Adult male SD rats were repetitively treated to MeHgCl (cumulative doses of 20, 40 and 60 mg/kg) for 10 consecutive days, and were sacrificed 4 days after the last dose. Effects MeHg on serotonin content in blood Platelets (PL) were compared with similar effects in brain regions. Only significant results in the hypothalamus (A) and brainstem (B) are shown. Pearson's correlation (r) was significant when $r \leq 0.50$; * $p < 0.05$

CHAPITRE 6 :

CHANGES IN PLATELETS AND LYMPHOCYTES MICROTUBULES AS POSSIBLE PERIPHERAL BIOMARKER FOR NEUROTOXICITY OF METHYLMERCURY CHLORIDE IN ADULT RATS

Kovana M. Loua², Saroj K. Chakrabarti² and Heather D. Durham^{1*}.

¹ Montreal Neurological Institute and Department of Neurology and Neurosurgery, McGill University, Montreal, Quebec, Canada.

² Département de médecine du travail et d'hygiène du milieu, Faculté de médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

* Corresponding author: Dr. Heather D. Durham
Room. 649, Montreal neurological Institute, 3801,
University Street, Montreal, Quebec H3A 2B4, Canada.
Phone: 514-398-8509; Fax : 514-398-1509
E-mail address: mddm@musica.mcgill.ca

(To be Submitted to **Toxicology Letters**)

ABSTRACT

Previous studies have demonstrated that MeHg disrupts the network of microtubules in peripheral blood lymphocytes and platelets microtubules. The utility of using loss of microtubular integrity as an early surrogate biomarker of MeHg neurotoxicity was examined following repeatedly administration of male adult rats to 0, 2, 4 and 6 mg/kg of MeHg per kg of body weight for 10 consecutive days. Four days after the last dose, blood was taken under light anaesthesia, and lymphocytes and platelets were separated from blood. Microtubules were visualised by immunolabelling with antibody specific to tubulin and percent of viable platelets and lymphocytes without microtubules was determined. A dose dependent loss of microtubules was observed in both platelets and lymphocytes from MeHg-treated rats compared to vehicle-treated controls. Platelet microtubules were more vulnerable to disassembly by MeHg than were microtubules in lymphocytes. Loss of the microtubular network with the cumulative doses of 0, 20, 40 and 60 mg/kg in platelets was observed in 6, 17, 36 and 48% of platelets, respectively, but only 0.4, 1.1, 1.4 and 4.4% in lymphocytes. Thus the integrity of microtubules in peripheral blood platelets may be used as peripheral surrogate biomarker of MeHg neurotoxicity following repeated administration of MeHg.

Key words: Microtubules, Platelets, Lymphocytes, Biomarker, Methylmercury, Neurotoxicity

INTRODUCTION

Methylmercury (MeHg) is a foodborne neurotoxicant (Chang, 1980), which in developing brain, causes aberrant cytoarchitecture and reduces brain weight by inhibiting cell proliferation through mitotic arrest (Sager et al., 1982, 1984; Rodier et al., 1984). In post migratory neurons, MeHg also inhibits elaboration of neurites and may cause cell death (Takeuchi, 1977; Choi et al., 1978). At the subclinical exposure level, MeHg alters biosynthetic processes (Omata, 1991). In both developing and mature brains, MeHg perturbs various neuronal functions, including axonal transport (Abe et al., 1975; Aschner et al., 1986; Aschner et al., 1987), neuronal migration and synaptic transmission (Atchison, 1986).

Toxicity of MeHg may involve interference with the assembly of microtubules. Microtubules, composed of polymerized tubulin molecules, provides cytoskeletal structure to the CNS neurons, and serves as the framework for axoplasmic transport (Choi et al., 1978) and is involved in cellular migration during neuronal development (Albert et al., 1989; Lechardeur et al., 1993). In addition, studies have shown that microtubules can interact with membrane proteins including neurotransmitter receptors and ion channels; such interaction may play a role in channel function and neurotransmission (Whatley and Harris, 1996).

Numerous studies have demonstrated that MeHg alters the integrity of microtubules in brain tissues (Abe et al., 1975; Miura et al., 1984; Vogel et al., 1985; Sager et al., 1986; Brown et al., 1988). *In vitro* and in tissue culture, MeHg inhibits tubulin polymerization and promotes depolymerization of the assembled microtubules in several neural cell preparations (Miura et al., 1984; Vogel et al., 1985; Cadrin et al., 1988; Miura and Imura, 1991; Duhr et al., 1991; Durhr et al., 1993; Pendergrass and Haley, 1995) and *in vivo* (Omata et al., 1991; Falconer et al., 1994; Ishida et al., 1997; Kinoshita et al., 1999). For instance, Miura and Imura (1991) have reported that MeHg specifically disrupted microtubules in the cultured mouse glioma cells at the lowest concentrations before any morphological disorder at other organelles. In rat and human brain homogenate, abnormal microtubular polymerization has been reported following *in vitro*

treatment with Hg-EDTA complex (Duhr et al., 1991; Durh et al., 1993; Pendergrass and Haley, 1995). In rat and human brain homogenate, abnormal microtubule polymerization has been reported following *in vitro* treatment with Hg-EDTA complex (Duhr et al., 1991; Durh et al., 1993; Pendergrass and Haley, 1995). Additionally, MeHg decreases the actin and tubulin contents, the cytoskeletal protein in rat brain at the symptomatic periods of intoxication (Omata et al., 1991). Studies have shown that administration of MeHg (10 mg/kg of body weights) for 7 consecutive days caused disturbance in the integrity of microtubules and microfilaments before any apparent signs and symptoms in adult brain (Ishida et al., 1997; Kinoshita et al., 1999). Thus, microtubules are vulnerable target of MeHg toxicity (Miura and Miura, 1998). Since microtubules in nervous tissue are not accessible for biomonitoring, the microtubular network in peripheral blood platelets and lymphocytes might serve as a surrogate biomarker for the cytoskeletal changes occurring in the neurons due to MeHg exposure. Brown et al., (1988) demonstrated that MeHg reduced the number of microtubules in splenic lymphocytes following a single dose of MeHg (10 mg/kg after 2 to 5 days post treatment. Durham et al., (1996) have shown that *in vitro*, MeHg is able to disassemble microtubules in platelets and lymphocytes. This study was therefore undertaken to investigate effects of MeHg on the microtubules from blood platelets and lymphocytes following repeated *in vivo* exposure of adult male rats to MeHg to determine the sensitivity of this measurement as an indicator of MeHg neurotoxicity.

MATERIELS AND METHODS

Chemicals

Methylmercury hydrochloride (MeHgCl; purity > 95%) from Alfa AESAR (A Jonhson Matthey Company, MA, USA); Ficoll-Paque from Pharmacia Biotechnic; paraformaldehyde from Fisher Scientific; goat anti-rabbit IgG-FITC (Fluorescein isothiocyanate conjugated immunoglobulin G) from Biolab Canada; Nonidet P40 from BDH. Rabbit antiserum to chick embryo tubulin from ICN.

Animals Treatments

Adult male Sprague Dawley rats purchased from Charles River (St Constant, Quebec) were used in these studies. Animals were individually housed in plastic cages with wood shavings for bedding. Room was maintained at 22 ± 2 °C with $40 \pm 4\%$ relative humidity and a 12hr/12hr (06:00 AM - 06:00 PM) light/dark cycle. Food (Purina Laboratory Chow) and demineralized water were allowed *ad libitum* during all experiments. After a period of 7 days of acclimation, rats (225-250 g body weight) were randomised and assigned to four groups of 6 rats each. These four groups were given 0, 2, 4 and 6 mg of MeHgCl /kg of body weight per day by gavage, for 10 consecutive days. This protocol was chosen because preliminary study from our laboratory had indicated that adult rats repeatedly exposed to MeHgCl, under these exposure conditions, manifested difficulties in learning and memory tasks only at 6 mg/kg/day for 10 consecutive days (Beaudin et al., submitted). MeHgCl was administrated per os, between 8h30 - 9h30 Am, in a total volume of 4 ml of saline per kg body weight. During the experiment, animals were weighed every two days to adjust the exposure dose volume during treatment. All solutions were made in fresh demineralized water, and MeHgCl was dissolved in saline (0.9% NaCl) containing 2% of bovine serum albumin (fraction V). Albumin was added to reduce irritant effects of MeHg on the gastrointestinal tract in the animals. Earlier studies have shown that in rats, the peak concentration of MeHg in brain is reached 1 to 5 days after the last dose of repeated daily administration of MeHgCl (Magos and Butler, 1976; Magos et al., 1978). Also using the same protocol, Beaudin et al., (submitted) found significant changes in Morris Water Maze tasks from rats treated with a cumulative dose of 60 mg/kg, 4 days after the last dosing. Thus, blood sample was taken 4 days after the last dose of MeHgCl.

Isolation of blood Platelets and Lymphocytes

Animals were anaesthetised with 0.5 mg/kg of pentobarbital, and fresh blood taken from abdominal aortic into heparinized polystyrene tubes at room temperature. Lymphocytes were separated from whole blood as described by Durham et al., (1996) using the gradient Ficoll-Paque (Pharmacia, 1989) method, and platelets were obtained from plasma picked up with the lymphocytic layer. Pellets of lymphocytes and platelets were resuspended and adjusted in PBS to a final concentration of 1×10^6 lymphocytes/ml.

Quantification of Integrity of Microtubules

Immunocytochemistry was carried out to visualize the microtubules network in lymphocytes and platelets as described by Durham et al., (1996) using a rabbit polyclonal antibody against chick embryo tubulin (ICN number 650951). Slides were coverslipped in mounting medium and sealed with wax, they were visualized at 800 X using a Leitz Orthoplan microscope with epifluorescence optics (Wild Leitz) and photographed using Kodak TMAX3200 film. To quantify the integrity of microtubules, the percentage of lymphocytes and platelets without visible intact microtubules were counted in quadruplicate.

Statistics

Data were analyzed by one way of variance (ANOVA), followed by the Kruskal-Wallis rank test. To test if any treatments were significantly different from the single control group, the Scheffe multiple range post host comparison two tailed t-test was used. The p values of less than 0.05 were considered statistically significant. The data were analyzed using the SPSS program.

RESULTS

Effects of MeHg on Platelets and Lymphocytes microtubules

Effects of repeated administration of MeHgCl on platelet and lymphocytic microtubules in adult rats are presented in the Figure. The results indicated that MeHg induced loss of microtubules in platelets and lymphocytes and that this effect was proportional to the cumulative dose of MeHgCl given (Figure).

Microtubular networks from control rats show microtubules in platelets appear in star-shaped or circular arrangements. In lymphocytes, bundles of microtubules radiate from the centrosome through the cytoplasm. In the adult rats treated to the cumulative dose of 20, 40 and 60 mg of MeHgCl/kg of body weight, respectively, labelled microtubules appear as stars or circles in unaffected platelets, but as small, diffusely labelled spheres when disrupted by MeHg. Decrease of microtubules was more easily quantified in platelets than in lymphocytes.

Accumulation of mercury in blood

The results indicated that the accumulation of mercury in whole blood following the repeated exposure of adult male rats to MeHgCl was dose dependent. The total mercury accumulated was as follow; 0.10 ± 0.01 , 55.82 ± 4.38 , 166.72 ± 0.92 and 183.93 ± 0.98 $\mu\text{g/ml}$ of whole blood at 0, 20, 40 and 60 mg/kg cumulative doses of MeHgCl, respectively. In this study, the total mercury retained in whole blood represents 0.3, 0.4 and 0.31% of the respective cumulative doses.

DISCUSSION

This study demonstrated loss of microtubular networks in platelets and lymphocytes in peripheral blood of adult rats following repeated oral administered of MeHg. MeHg decreased microtubules in both platelets and lymphocytes, but platelet microtubules were considerably more vulnerable to MeHg than those in the lymphocytes. Previous studies reported that MeHg decreased the microtubules in blood platelets and lymphocytes exposed to the toxicant *in vitro* (Durham et al., 1996) and in splenic lymphocytes after both *in vitro* and *in vivo* exposure (Brown et al., 1988). In our previous study, the IC_{50} for loss of microtubules in lymphocytes exposed to MeHg *in vitro* was 182 μ M, but only 3.1 μ M in the platelets (Durham et al., 1996). Similarly, our results of *in vivo* exposure have shown that at blood concentration of 166.72 and 183.83 μ g/ml, 2.5% and 3% of microtubules in lymphocytes were lost at 40 and 60 cumulative doses of MeHgCl, respectively. At the same exposure levels, 39% and 50% of microtubules were lost in the platelets. The study suggests that both results paralleled.

In brain neurons, MeHg alters microtubule integrity and microtubule-dependent functions after exposure in tissue culture (Abe et al., 1975; Sager and Syversen, 1984; Vogel et al., 1985) and *in vivo* (Rodier et al., 1984; Yagame et al., 1994; Ishida et al., 1997; Miura, 1998; Kinoshita et al., 1999). For instance, MeHg decreases the mitotic activity in the developing brain following prenatal exposure (Rodier et al., 1984) and reduces the neuronal migration (Choi et al., 1989). Moreover, Hunter and Russel, (1954) have reported that in an adult human subject, MeHg poisoning causes focal cerebral and cerebellar atrophy. Ishida et al., (1997) reported that in the adult rats, MeHgCl (10 mg/kg for 7 consecutive days, *in sc.*), decreased tubulin polymerization in brain homogenate, and that such an effect was observed at the presymptomatic period. Kinoshita et al., (1999) also demonstrated that MeHg (10 mg/kg for 7 consecutive days *in sc.*) markedly decreased microtubules in the axons of myelinated fibers of the optic nerves in the rat brain. The decrease in microtubules in the optic nerves was observed four days after the last dose in the rats. Thus the decrease in platelet microtubules following repeated administration of MeHg is an

observation that is biologically relevant to those that have been shown to occur in the rat central nervous system, under similar exposure conditions.

Microtubules are composed of tubulin molecules that contain several cysteine residues important for assembly. Maintenance of these sulfhydryl groups in the reduced form is essential for the polymerization of tubulin onto microtubules (Clarkson, 1987). However, many biological effects of MeHg are known to be related to its high affinity for the sulfhydryl (-SH) groups of amines and proteins (Clarkson, 1987; Imura et al., 1980; Miura and Imura, 1987). MeHg can induce metabolic perturbation through diverse pathways, including intracellular calcium homeostasis (Kauppinen et al., 1989; Komulainen and Bondy, 1987; Levesque and Atchison, 1991; Oyama et al., 1994), membrane potential (Bondy and McKee, 1991), lipid peroxidation (Yonaha et al., 1983; Yee and Choi, 1996), inhibition of protein synthesis (Yoshino et al., 1966; Cheung and Verity, 1981; Cheung and Verity, 1985; Omata et al., 1991) and the alteration in excitatory amino acid pathways (Choi, 1989). Many of these effects are induced in the peripheral blood lymphocytes (Nakatsuru et al., 1985; Kageyama et al., 1986; Tan and Tang, 1993) and platelets (Kostka and Wachowicz, 1983; Hornberger and Patscheke, 1989).

MeHg is able to alter DNA synthesis in lymphocytes from mice following *in vitro* exposure (Nakatsuru et al., 1985). MeHg also significantly increases sister chromatid exchanges only at 20 μ M and increases the frequency of endoreduplicated mitosis in human lymphocytes (Lee et al., 1997). Additionally, MeHg increases the proliferative response in the lymphocytes after repeated *in vivo* exposure in rats (Ortega et al., 1997). In human, MeHg inhibits the mitogenic stimulation of peripheral lymphocytes (Lee et al., 1997). MeHg was also found to deplete lymphocytes in thymus and lymph nodes in human poisoned with MeHg (Takeuchi et Eto, 1977).

In platelets, MeHg induces shape changes, causes aggregation, releases serotonin and activation of platelets *in vitro* in human (Hornberger and Patscheke, 1989). MeHg also induces oxidative stress in platelets (Hornberger and Patscheke, 1989). In addition, Tuomisto and Komulainen, (1983) have reported that MeHg releases and inhibits the uptake of serotonin from human and rabbit blood platelets *in vitro*. Moreover, in other studies, we demonstrated a dose-related inhibition of the serotonin uptake by blood platelets following *in vitro* (Loua et al., 1997) and *in vivo* administration (Loua et al., thesis). Administration of MeHgCl (0, 2, 4 and 6 mg/kg

per body weight for 10 consecutive days) to adult rats decreased serotonin contents in the platelets by 35.26, 80.06 and 93.14% respectively (Loua et al., Thesis).

In summary, our results suggest that platelets may be used as suitable surrogate biomarkers for microtubule changes in the central nervous system of adult rat following repeated administration of MeHg. However, other environmental substances such as organometals (Ally et al., 1993; Blakley et al., 1980), solvents (Johnson et al., 1991), and the antimetabolic drugs as well are known to impair microtubules functions and integrity. Therefore interpreting data from platelet microtubules as early biomarkers for MeHg neurotoxicity requires verification of exposure to this toxicant.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their acknowledge to Diane Talbot for her help in collecting blood from treated rats, and to Sandra Minotti for her kind assistance in analysing the microtubules. This work was supported under joint University-Industry Program, Medical Research Council of Canada, Hydro-Québec, Bay James Methylmercury Committee and the Canadian Electricity Association.

REFERENCES

- Abe T., Haga T., Kurokawa M.** Blockage of axoplasmic transport and depolymerization of reassembled microtubules by methyl mercury. *Brain Res* 1975; 86:504-508
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., and Watson J. D.** (Eds.) 1989. Molecular Biology of the cell. 2nd ed., pp. 613-680. Garland Press, New York.
- Atchison, W. D., Hare, M. F.** Mechanism of methylmercury induced neurotoxicity. *FASEB J.* 1994; 8:622-629
- Atchison W. A.** 1986. Extracellular calcium-dependent and independent effects of methylmercury on spontaneous and potassium-evoked release of acetylcholine at the neuromuscular junction. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 237:672-680
- Bakir F., Damluji S. F., Amin-Z, Murtadha M., Khalidi A., Al-Rwi N. Y., Tikriti S., Dhahir H. I., Clarkson T. W., Smith J. C., Dohery R. A.** Methylmercury Poisoning in Iraq: An interuniversity report. *Science*, 1973; 181:230-241
- Bano Y, Hasan M.,** Mercury induced time-dependent alterations in lipid profiles and lipid peroxidation in different body organs of cat-fish heteropneustes fossilis, *J Environ Sci Health [B]* 1989; 24:145-166
- Blakley, B. R., Sisodia C. S., and Mukkur T. K.** 1980. The effect of methylmercury, triethyl lead and sodium arsenite on the humoral immune response in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 52:245-254
- Bondy S C., and McKee M.** Disruption of the potential action across the synaptosomal plasma membrane and mitochondria by neurotoxic agents. *Toxicol Lett* 1991; 58:13-21
- Brown D. L., Reuhl K. R., Bormann S, and Little J. E.** Effects of methylmercury on the microtubule system of mouse Lymphocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 1988; 94:66-75

Cadrin M., Wasteneys G. O., Jones-Villeneuve, E. M., Brown D. L., and Reuhl, K. R. Effects of methylmercury on retinoic acid-induced neuroectodermal derivatives of embryonal carcinoma cells. *Toxicol. Cell Biol.* 1988; 4:61-80

Canizares C., Vivar N., and Herdoiza, M. 1994. Role of microtubules systems in platelets aggregation. *Braz. J. Med & Biological Res.* 27(7) :1533-1551

Chang L W. Neurotoxic effects of mercury : A review. *Environ Res* 1977; 14:329-373

Chang L. W. Mercury, In *Experimental and Clinical Neurotoxicology*, Spencer P. S., Schaumburg H. H., (eds.), Vol. 1, pp 508-526. Williams and Wilkins, Baltimore, 1980

Chang L. W., and Verity M. A., Mercury Neurotoxicity: effects and mechanisms, In *Handbook of Neurotoxicology* (L. W. Chang, and R. S. Dyer Eds.) pp. 31-59, Dekker, New York, 1995

Cheung M. K., Verity M. A. Experimental methylmercury neurotoxicity: Locus of mercurial inhibition of brain protein synthesis *in vitro* and *in vivo*. *J. Neurochem.* 1985; 44:1799-1808

Cheung M. K., Verity M. A. Methylmercury inhibition of synaptosome protein synthesis: The role of mitochondrial dysfunction. *Environ Res* 1981; 24:186-298

Choi, B. H. The effects of methylmercury on the developing brain. *Progr Neurobiol* 1989; 32:447-470

Clarkson TW. The pharmacology of mercury compounds. *Annu. Rev. Pharmacol.* 1972; 12, 375-406.

Clarkson T. W. Metal toxicity in the central nervous *Envir Health Persp* 1987; 75:59-64

Clarkson T. W., Sager P. R., and Syversen T. L. M. (Eds.) The cytoskeleton : A target for Toxic Agents pp. 1-254. Plenum, New York 1986.

Doi R. individual difference of methylmercury metabolism in animals and its significance in methylmercury toxicity. In *Advances in Mercury Toxicology*, ed. T. Suzuki et al., Plenum Press, New York, 1991, pp-77-98

Duhr E., Pendergrass C., Kasarskis E., Slevin J., Haley B. (1991). Hg²⁺ induces GTP-tubulin interactions in rat brain similar to those observed in Alzheimer's disease. *FASEB J* 5:A456

Duhr E., Pendergrass C., Kasarskis E., Slevin J., Haley B. (1993). HgEDTA complex inhibits GTP interactions with the E-site of brain β -tubulin. *Toxicol Appl. Pharmacol* 122:273-280

Durham H. D., Minotti, S.; Caporicci E.; Chakrabarti S. D; and Panisset J.C. Sensitivity of platelet microtubules to disassembly by methylmercury. *J. Toxicol Environ. Health.* 1996; 48:57-69

Falconer MM., Vaillant A., Reuhl K R., Laferriere N., Brown D. L. (1994). The molecular basis of microtubule stability in neurons. *Neurotoxicology* 15:109-122

Fox, J. E. B. Regulation of platelet function by the cytoskeleton. *Adv. Exp. Med. Biol.* 344:175-185

Fox, J. H., Patel, M. K., and Cohen M. M., Comparative effects of organic and inorganic mercury on brain slice respiration and metabolism. *J. Neurochem.* 1975; **24**, 757-762.

Gelfand, V. I., Bershadsky, A. D. Microtubule dynamics: mechanism, regulation and function. *Ann. Rev. Biol* 1991; 7:93-116

Grundt I. K., Bakken A. M., Adenine nucleotides in cultured brain cells after exposure to methylmercury and triethyl lead. *Acta Pharmacol Toxicol* 1986; 59:11-16

Herken H., and Hocho F. Selective Neurotoxicity, Handbook of Experimental Pharmacology; Vol. 102. Springer-Verlag, New York, 1994.

Hornberger W. and Patscheke H. 1989. Hydrogen peroxide and methylmercury are primary stimuli of eicosanoid release in human platelets. *J. Clin. Chem. Biochem.* 27:567-575

Hunter D, Bomford R. R , and Russel D. S. 1940 Poisoning by methylmercury compounds. *Quart J. Med* 9:193

Hunter D., and Russel D. S. (1954). Focal cerebral and cerebral atrophy in a human subject due to organic mercury compounds. *J. Neurosurg. Psychiatry* 17:235-241

Ishida Y., Ichimura, T., Sumi H., Horigome T., Omata S. Methylmercury alters the tyrosination statute of tubulin in the brains of acutely intoxicated rats. *Toxicology* 1997;122:171-181.

Imura, M. Miura, K., Inokawa, M., Nakada, S. (1980). Mechanism of methylmercury cytotoxicity: biochemical and morphological experiments using cultured cells. *Toxicology* 17:241-254

Johnson, K. J., Hall, E. S., and Boekelhide, K. 1991. 2,5-hexanedione exposure alters the rat Sertoli cell cytoskeleton. I. Microtubules and seminiferous tubule fluid secretion. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 111 :432-442

Kageyama K., Onoyama Y., and Kano E. 1986. Effects of methyl mercuric chloride and the sulfhydryl inhibitors on phospholipid synthetic activity of lymphocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 6(1), 49-53

Kauppinen R. A., Komulainen H., Taipale H. T., Cellular mechanism underlying the increase in cytosolic free calcium concentration induced by methylmercury in cerebrospinal synaptosomes from guinea pig. *J Pharmacol Exp. Ther* 1989; 218:1248-1254

- Kennedy C. G.** Trace Element determination, In Polymers by Neutron Activation. *In metallization of Polymers*, E. Sacher, J.J. Pireaux, and S. P. Kowalczyk eds. Washington: American chemical Society, pp. 128-134, 1990,
- Kennedy D. M., and Linck R. W.** 1985. The cytoskeleton of unstimulated blood platelets: structure and composition of the isolated marginal microtubular band. *J. Cell Sci.* 78, 1-23
- Kinoshita Y., Ohnishi A., Kohshik., and Yokota A.** 1999. Apparent diffusion coefficient on rat brain and nerves intoxicated with methylmercury. *Environ. Res.* 80(4):348-354
- Komulainen H.** Neurotoxicity of methylmercury: Cellular and subcellular aspects, In; Metal neurotoxicity. Bondy SC. and Prasad KN. eds., pp. 167-182, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 1988.
- Komulainen H., and Bondy S. C.** Increased of free intrasynaptosomal Ca²⁺ by neurotoxic organometals: Distinctive mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol* 1987; 104:17-24
- Kostka B., and Wachowicz B.** 1983. Effects of mercurial compounds on adenine nucleotides of washed pig platelets. *Environ. Res* 30:420-426
- Krigman M.R.** Neuropathology of heavy metal intoxication. *Environ. Health Perspec* 1978; 26:117-120
- Kromidas L., Trombetta L. D., and Jamal I. S.** The protective effects of glutathion against methylmercury cytotoxicity. *Toxicol Lett* 1990; 51:67-80
- Kuriyama R., and Sakai H.** Role of tubulin-SH groups in polymerization to microtubules. *J. Biochem* 1974; 76:651-654
- Kutsuna, M.** Minamata diseases: Study groups of Minamata diseases. Japan: Kumamoto University, 1968, pp. 1-4.
- Lebel C. P., Ali S. F., McKee M., and Bondy S. C.** Organometal-induced increases in oxygen radical activity: The potential of 2', 7' dichlorofluorescein diacetate as an index of neurotoxic damage. *Toxicol Appl Pharmacol* 1990; 104:17-24
- Lechardeur D., Castel M. N., Reibaud M., Scherman D., Laduron P. M.** Axonal transport of dopamine-containing vesicles labelled in vitro with [³H]reserpine. *Eur J Neurosci.* 1993, 5(5):449-453
- Lee, C. H., Liu S. H., Lin-Shiau S. Y.** 1997. Distinct genotoxicity of phenylmercury acetate in human lymphocytes as compared with other mercury compounds. *Mutation Res.* 392(3):269-276
- Levesque P C., and Atchison W. D.** Disruption of brain mitochondrial calcium sequestration by methylmercury. *J Pharm Exp. Ther* 1991; 256:236-256

Lim S. S., Sammak, P. J., Brisj, G. G. 1989. Progressive and spatially differentiated stability of microtubules in developing neuronal cells. *J. Cell Biol.* 109:253-263

Loua K. M., Chakrabarti K. S., Heather D., and Panisset J. C. (1997). Effects of methylmercury on the uptake of dopamine, choline and serotonin by and the binding to receptors in rat brain synaptosomes, lymphocytes and platelets. *Fund Appl Toxicol. Suppl.* **36 (1)** Part 2:68 (351)

Macfarlane D. C. The effects of methylmercury on platelets. Induction of aggregation and release via activation of the prostaglandin synthesis pathway. *Mol. Pharmacol.* 19:470-476

Miura, K. Neurotoxic mechanism of methylmercury. *Jap. J. Toxicol & Environ. Health* 1998; 446(6):393-412

Miura, K., Inokawa, M., and Imura, N. Effects of methylmercury and some metal ions on microtubules networks in mouse glioma cells and in vitro tubulin polymerisation. *Toxicol Appl. Pharmacol.* 1984; 73:218-231

Miura, K., and Imura, N. Mechanism of methylmercury induced neurotoxicity. *Crit. Rev. Toxicol* 1987; 18:161-188

Miura, K., and Imura, N. Microtubules, as susceptible target of methylmercury cytotoxicity. In *Advances in Mercury Toxicology* (T. Suzuki, N. Imura, and T. W. Clarkson, Eds.), Plenum Press, New York, 1991, pp. 241-254

Naganuma A, Koyama Y and Imura N. Behavior of methylmercury in mammalian erythrocytes. *Toxicol Appl. Pharmacol.* 1980; 54:405-410

Nakada S., Nomoto A., and Imura N. Effect of methylmercury and inorganic mercury of protein synthesis in mammalian cells, *Ecotoxicol Environ Saf.* 1980; 4:184

Omata S, Terui Y., Kasama H., Ichimura T. Alterations in gene expression due to methylmercury in central and peripheral nervous tissues of the rat. In *Advances in Mercury Toxicology*, T. Suzuki et al., eds. Plenum Press, New York, 1991; pp 223-240

Ortega, H. G., Lopez M., Salvaggio J. E., Reimers R., Hsiao-Lin C., Bollinger J. E., W G. Lymphocytes proliferative response and tissue distribution of methylmercury sulfide and chloride in exposed rats. *J. Toxicol Environ. Health.* 1997; 50:605-616

Pendergrass J. C., Haley B E., Vimy M. J., Winfield S. A., and Lorscheider F. L. (1997). Mercury vapor inhalation inhibits binding of GTP to tubulin in rat brain: Similarity to a molecular lesion in Alzheimer Diseased brain. *Neurotoxicology* 18(2):315-324

Pendergrass J. C., and Haley B. E. Mercury-EDTA complex specifically blocks brain β -tubulin-GTP interactions: similarity to observations in Alzheimer's disease. In: Status Quo and perspective s of Amalgam and other dental Materials, Friberg LT, Schrauzer GN, eds., Stuttgart, Georg Thiem Verlag, 1995, pp 98-105

Prasad KN, Harrington ME, Bondy SC. Effects of Methylmercury chloride on the high affinity uptake of certain putative neurotransmitters in neuroblastoma and glioma cell culture. *Toxicol. Letters* 1979; 4:373-377

Reuhl K. R., Lagunowich L. A., and Brown D. L., Cytoskeleton and cell adhesion molecules: Critical targets of toxic agents. *Neurotoxicology* 1994; 15:133-146

Rodier, P. M., Ascher, M., and Sager P. R. Mitotic arrest in the developing CNS after prenatal exposure to methylmercury. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 6 :379-385

Sager P. R., and Syversen T. L. M. Differential responses to methylmercury exposure and recovery in neuroblastoma and glioma cells and fibroblasts. *Exp. Neurol* 1984; 85:371

Sager P. R., and Syversen, T. L. M. Disruption of microtubules by methylmercury, In *The Cytoskeleton: A target for Toxic Agents* J. W. Clarkson, P. R. Sager, and T. L. M. Syversen, Eds., pp. 97-116, Plenum, New York, 1986.

Sager P. R., Ascher, M., and Rodier, P. M. Persistent, differential alterations in developing cerebellar cortex of male and female mice after methylmercury exposure. *Devel. Brain Res.* 12:1-11

Sarafian T. In vitro methylmercury inhibition of protein synthesis in neonatal cerebellar perikaya. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1984; 10:85-92.

Sarafian, T., Verity, M. A. Inhibition of RNA and protein synthesis in isolated cerebellar cells by in vitro and in vivo methylmercury. *Neurochem. Pathol* 1985; 3:27-39

Sarafian T. Verity, M. A. Changes in protein phosphorylation in cultured neurons after exposure to methylmercury. *Ann New York Acad. Sci.* 1993; 679:65-77

Sato T, Nakamura Y. Neuropathology of methylmercury intoxication. In: *Advances in mercury Toxicology*, Edited by Suzuki et al., Plenum Press, New York, 1991, pp. 335-366.

Skerfving S. Organic mercury compounds. Relation between exposure and effects. In: *Mercury in the Environment*. Friberg L, Vostal J, eds. Cleveland, CRC Press, 1972, pp. 148-168.

Takeuchi T. Neuropathology of Minamata disease in Kumamoto: especially at the chronic stage, in *Neurotoxicology*, Roizin L., Shiraki H and Greevic n eds., pp. 235-346, Raven Press, New York, 1977.

Takeuchi T, and Eto K. Chronic occurrence from pathological viewpoints. In: Studies on the health effects of alkylmercury in Japan. Tsubaki T, ed., Environment Agency, Japanese Government 1975; 28-62

Tsubaki T, and Irukayama K. Minamata Diseases: Methylmercury Poisoning in Minamata and Niigata, Japan, pp. 317. Elsevier Scientific Publishing Company Ed, New York, 1977.

Tuomisto J., and Komulainen H. (1983). Release and inhibition of Uptake of 5-Hydroxytryptamine in blood platelets *in vitro* by Copper and Methylmercury. *Acta Pharmacol. et toxicol.*, **52**, 292-297

Thrombetta, L. D. and Kromidas, L. A scanning electron-microscopic study of the effects of methylmercury on the neuronal cytoskeleton. *Toxicol Lett* 1992; 60:329-341

Verity MA, Brown WJ, Cheung M, Czer G. Methylmercury inhibition of synaptosomes and brain slice protein synthesis *in vivo* and *in vitro* studies. *J. Neurochem* 1977; **29**:673-679

Verity M. A., Brown W. J., Cheung M. Organic mercurial encephalopathy ; *In vivo* and *in vitro* effects of methyl mercury on synaptosomal respiration. *J. Neurochem.* 1975; 759-766

Vogel D. G., Margolis R. L., and Mottet N. K. The effects of methylmercury binding to microtubules. *Toxicol Appl. Pharmacol* 1985; 80:473-486

Von Burg R, Northington FK, Shamoo A. Methylmercury inhibition of rat brain muscarinic receptors. *Toxicol Appl Pharmacol* 1980; 53:285-292.

Weisenberg, R. C. Microtubule formation *in vitro* in solutions containing low calcium. *Science* 1972; 177:1104-1105

Wasteneys, G. O., Cadrin, M., Reuhl, K. R., Brown, D. L. 1988. The effects of methylmercury on the cytoskeleton of murine embryonal carcinoma cells. *Cell Biol. Toxicol.* 4:41-60

Whatley V. J., and Harris, R. A. 1996. The cytoskeleton and neurotransmitters receptors. *Intern. Rev. Neurobiol.* 39:113-143

Yagame, H., Horigome, T., Ichimura, T., Uchiyama, J., Omata, S. Differential effects of methylmercury on the phosphorylation of protein species in the brain of acutely intoxicated rats. *Toxicology* 1994; 92:101-113

Yee S., and Choi B. H. Oxidative stress in neurotoxic effects of methylmercury poisoning. *Neurotoxicology* 1996; 17(1):17-26

Yoshino Y, Mozai T, and Nakao K. Biochemical changes in brain of rats poisoned with an alkylmercury compound with special reference to inhibition of protein synthesis in brain cortex slices. *J. Neurochem* 1966; 13:1223-1230

RESULTS

Figure : Percent of peripheral blood lymphocytes and platelets without microtubules in rats treated to MeHgCl. Adult male SD rats were repetitively treated to MeHgCl (cumulative doses of 20, 40 and 60 mg/kg)

Animals were sacrificed 4 days after the last dose. Effects of MeHg on the microtubules were expressed in percent of peripheral blood platelets and lymphocytes without microtubules.

Statistically significant differences for:

* $p < 0.50$ for 40 mg/kg versus control rats

** $p < 0.01$ for 60 mg/kg versus 20 mg/kg and control rats

*** $p < 0.002$ for 60 mg/kg versus control rats

CHAPITRE 7:

7. DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

7.1. Discussion générale

L'hypothèse de cette étude était que les systèmes de neurotransmission cholinergique et monoaminergique ainsi que les microtubules présents au niveau des lymphocytes et plaquettes du sang circulant, souvent utilisées dans le diagnostic de certaines affections psychologiques et mentales, en neuropharmacologie et en psychothérapie pourraient servir à évaluer les troubles de la neurotransmission au niveau du cerveau après exposition au MeHg. Pour vérifier cette hypothèse, ce travail s'était fixé comme objectifs d'évaluer les effets du MeHg sur la neurotransmission dans différentes régions comme le cortex cérébral, le striatum, le l'hypothalamus, le l'hippocampe, le tronc cérébral et le cervelet après exposition *in vitro* (0, 1, 2.5 et 5 μM) et *in vivo* (0, 2, 4 et 6 mg/kg par jour pendant 10 jours consécutifs) chez le rat adulte mâle au chlorure de MeHg. Dans les mêmes conditions d'exposition, les effets du MeHg sur des paramètres de neurotransmission et les microtubules ont été évalués au niveau des lymphocytes et des plaquettes du sang périphérique, les résultats obtenus ont été comparés aux effets mesurés au niveau du cerveau.

7.1.1. Effets sur le système cholinergique

7.1.1.1 Captation de la choline et liaison aux mChRs

Nos travaux ont démontré que le MeHg est capable de réduire la captation de la choline et d'inhiber la liaison du [^3H]-QNB aux mChRs au niveau des synaptosomes du cerveau chez le rat adulte. Des travaux antérieurs ont montré que le MeHg est capable d'inhiber, *in vitro*, la captation de la choline dans différentes préparations de tissus nerveux (Bondy et al., 1979; Kobayashi *et al.*, 1979, 1981, 1982; Araki *et al.*, 1981; Levesque et al., 1992). Cependant, seul nos travaux ont

démontré que ces effets étaient dépendants à fois de la dose du MeHgCl utilisée et de la région du cerveau. Par exemple, Bondy et al., (1979) ont observé qu'à 10 μM , le MeHg inhibe de 63% la captation de la choline dans l'homogénat du cerveau de souris. Kobayashi et al., (1982) ont trouvé que plus de 20 μM de chlorure de MeHg étaient nécessaires pour inhiber, presque totalement, la captation de la choline dans les synaptosomes du cerveau antérieur de rat. De l'autre côté, des travaux ont démontré que 10 et 100 μM de chlorure de MeHg sont nécessaires pour inhiber de 25 et 45% la captation de la choline dans le cerveau antérieur (Levesque et al., (1992) et de 96.6% dans les tranches de cortex cérébral (Araki et al., 1981). Contrairement à ces résultats, nous avons montré qu'à 2.5 μM , le MeHg inhibe la captation de la choline à environ 27 à 56.24% ; cette inhibition est de 58.25 à 77.39% à 5 μM . La $\text{CI}_{50}\%$ était de 2.7 à 4.33 μM . Enfin nos travaux ont de plus montré que la réduction de la captation de la choline était plus forte dans l'hippocampe suivi de l'hypothalamus, du cortex cérébral et du striatum, du cervelet et du tronc cérébral.

Egalement, le MeHg inhibe, *in vitro*, la liaison de la [^3H]-QNB aux récepteurs mChRs dans différentes préparations du cerveau (Aronstam and Eldefrawi, 1979; Vong Burg et al., 1980; Anwar et al., 1981; Eldefrawi et al., 1977; Bondy and Agrawal, 1980; Zhang and Wu, 1994; Castoldi et al., 1996). Par exemple, Von Burg *et al.*, (1980) ont rapporté que la CI_{50} en MeHg est de 10 μM dans les synaptosomes du cerveau total de rat. Aussi, Zhang and Wu (1994) ont rapporté une CI_{50} de 13.7 mM de chlorure de MeHg en utilisant l'homogénat de cerveau entier. De plus, Castoldi et al., (1996) ont récemment rapporté que la CI_{50} était de 149 μM d'hydroxyde de MeHg pour les membranes corticales de cerveau de rat. Contrairement à ces travaux, nous avons trouvé une CI_{50} variant entre 5 et 7.64 μM de chlorure de MeHg.

En utilisant des synaptosomes purifiées (Dodd et al., 1981) de différentes régions du cerveau, nous avons démontré que la captation de la choline et la liaison du [^3H]-QNB sont fonction de la concentration de chlorure de MeHg et de la région du cerveau évaluée. La différence entre nos résultats et ceux antérieurement rapportés pourrait probablement s'expliquer, entre autre, par l'utilisation d'homogénat ou de synaptosomes de cerveau total dans les premiers travaux (Von Burg et al., 1980; Komulainen and Tuomisto, 1982; Tuomisto and Komulainen, 1982). Aussi, la captation et l'affinité des transporteurs des monoamines varient largement entre les différentes régions du cerveau chez le rat (Snyder et al., (1969). De plus, il existent des différences de sensibilité pour les mChRs de différentes régions du cerveau à l'égard des agents

sulfudryls et les composés de mercure comme le MeHg (Stavinoha et al., 1976; Aronstam et al., 1978). Ces facteurs pourraient expliquer la différence de sensibilité régionale de la liaison de [³H]-QNB, tel qu'observée dans la présente étude.

De plus, nous reportons ici pour la première fois que le MeHg inhibe, après exposition *in vitro*, la liaison du [³H]-QNB au niveau des lymphocytes. Aussi, nos résultats montrent qu'il y a une corrélation significative par rapport à cet effet entre lymphocytes et les différentes régions du cerveau. Ainsi, bien que l'affinité des mChRs soit faible au niveau des lymphocytes par rapport au cerveau (Costa et al., 1990; Fitzgerald and Costa, 1993), nos résultats suggèrent que l'inhibition de la liaison de [³H]-QNB au niveau des lymphocytes pourrait refléter les changements intervenus dans différentes régions du cerveau de rat, après exposition *in vitro* au MeHg

7.1.1.2. Effets *in vivo*

Chez le rat adulte, l'administration répétée du chlorure de MeHg (0, 2, 4 et 6 mg/kg par jour pendant 10 jours consécutifs) provoque une réduction de l'activité de la ChAT, de la concentration de l'ACh et la liaison du [³H]-QNB dans les différentes régions du cerveau, dans nos conditions expérimentales. Des résultats antérieurs montrent que le MeHg est capable d'inhiber l'activité de la ChAT dans le cerveau de rat (Okuda *et al.*, 1978; Dwivedi *et al.*, 1980; Tsuzuki, 1981; Omata *et al.*, 1982). Nos résultats ont montré que cet effet varie en fonction de la dose et de la région du cerveau. Par exemple à la dose cumulative de 60 mg/kg, l'activité de la ChAT était plus inhibée dans le cervelet, suivi par le tronc cérébral. En effet, l'activité de la ChAT est plus faible dans le cervelet par rapport aux autres régions du cerveau (Cooper et al., 1996). Cette faible activité pourrait expliquer la grande sensibilité de l'enzyme dans cette région (Kobayashi et al., 1980; Takeuchi, 1989). L'inhibition de l'activité de la ChAT, un marqueur spécifique de la synthèse de l'ACh dans les neurones cholinergiques au niveau du cerveau, indique le MeHg est capable de diminuer la concentration de ce neurotransmetteur au niveau du cerveau chez le rat

Ainsi, il a été démontré que l'administration aiguë ou subchronique du MeHg diminue la concentration de l'ACh dans le cerveau chez le rat (Hrdina et al., 1976; Okuda et al., 1978). Les résultats de la présente étude montrent que cette réduction dépend de la dose du chlorure de MeHg et de la région du cerveau examinée. La réduction du niveau de l'ACh par le MeHg pourrait s'expliquer par l'inhibition 1) de la captation de la choline dans les neurones

cholinergiques centraux (Barker and Mittag, 1975; Simon et al., 1976 ; Kobayashi, 1979, 80, 1981; Levesque et al., 1992; Loua et al., 1997), 2) de la synthèse de l'acétyl-CoA dans les mitochondries des synaptosomes du cerveau (Dwivedi et al., 1980; Okuda et al., 1978) et de l'activité de la ChAT dans le cerveau (Hrdina et al., 1976; Dwivedi C et al., 1980; Okuda et al., 1978) 3) l'induction de la libération spontanée de l'ACh à partir des terminaisons nerveuses dans les neurones cholinergiques (Levesque et al., 1992). Ainsi en inhibant les processus régulateurs de la synthèse de l'ACh, le MeHg est capable de réduire de façon significative la concentration de l'ACh dans les régions du cerveau chez le rat, après exposition répétée au chlorure de MeHg.

Aussi, nous avons démontré que dans nos conditions expérimentales, le MeHg est capable d'inhiber la liaison de [³H]-QNB aux récepteurs mChRs dans différentes régions du cerveau chez le rat. Ces résultats montrent que l'inhibition de la liaison aux récepteurs mChRs varie entre les différentes régions du cerveau (Aronstam *et al.*, 1978). Similairement, nous avons démontré que dans les mêmes conditions d'exposition, le MeHg est capable d'inhiber la liaison du [³H]-QNB au niveau des lymphocytes.

Parmi les paramètres cholinergiques évalués dans cette étude, l'activité de la ChAT semble être la plus sensible au MeHg sur la base du pourcentage d'inhibition. Cependant seul l'inhibition de la liaison du [³H]-QNB dans les différentes régions du cerveau présente une corrélation statistiquement significative avec les mêmes changements intervenus au niveau des lymphocytes. Malgré la faible affinité de [³H]-QNB pour les récepteurs mChRs dans les lymphocytes par rapport au cerveau (Costa et al., 1988, 1990; Loua et al., 1997), ces récepteurs partagent des ressemblances biochimiques et pharmacologiques au niveau des lymphocytes et du cerveau (Costa et al., 1988, 1990). Les résultats des études *in vivo* supportent ceux de l'exposition *in vitro*. Ainsi, les résultats de l'exposition *in vitro* (Loua et al., 1997) et *in vivo* suggèrent que l'inhibition de la liaison aux récepteurs mChRs au niveau des lymphocytes pourrait refléter les mêmes changements produits dans les régions du cerveau chez le rat adulte suivant l'administration répétée au chlorure de MeHg.

Dans l'ensemble, l'inhibition des voies cholinergiques par le MeHg évoque l'implication de la neurotransmission cholinergique dans les effets neurologiques de ce composé. Le système de transport cholinergique tel que mesuré par la captation de haute affinité de la choline est considéré comme l'étape limitante de la synthèse de l'ACh dans les neurones cholinergiques du cerveau (Barker and Mittag, 1975; Simon and Kuhar, 1976; Simon et al., 1976). Ainsi, il a été démontré que l'administration de l'hémicholinium-3 (HC-3), un inhibiteur spécifique de la captation de la

choline, est capable de dépleter de façon réversible la concentration de l'ACh dans le cerveau chez la souris et le rat (Hagan et al., 1989; Freedman et al., 1979). De la même manière, l'administration chronique du chlorure de MeHg est capable de réduire la concentration de l'ACh dans le cerveau de rat et de souris (Kobayashi *et al.*, 1980; Hardina, 1979; Taylor and Distefano, 1976; Okuda et al., 1978). Aussi, le MeHg diminue la liaison aux mChRs dans les synaptosomes de cerveau entier chez le rat (Von Burg et al., 1980) et dans les membranes du cortex cérébral après exposition *in vitro* (Castoldi et al., 1996). Les effets inhibiteurs de l'exposition *in vitro* au MeHg sur la captation de la choline et de la liaison aux récepteurs mChRs, supportent les résultats de nos travaux *in vivo*. Ainsi, en induisant les différents effets mentionnés ci-dessus, le MeHg est capable de diminuer l'activité de la choline acetyltransferase, de réduire le niveau de l'ACh et d'inhiber la liaison aux récepteurs mChRs dans différentes régions du cerveau après l'administration répétée du chlorure de MeHg chez le rat adulte.

7.1.2. Effets sur les systèmes monoaminergiques

7.1.2.1. Captation de la DA, de la 5-HT et la liaison aux D₂

D'après nos travaux, le MeHg est capable d'inhiber *in vitro* la captation de la DA et de la 5-HT ainsi que la liaison de la [³H]raclopride aux D₂ au niveau des synaptosomes de différentes régions de cerveau. Aussi, le MeHg inhibe la captation de la 5-HT dans les plaquettes et la liaison de la [³H]raclopride au niveau des lymphocytes.

Des travaux antérieurs ont montré que le MeHg inhibe la captation de la DA et de 5-HT par les tranches, l'homogénat et les synaptosomes du cerveau de rat (Bondy et al., 1979; Komulainen and Tuomisto, 1981a, 1982; Rajanna and Hobson, 1985). Cependant, seuls nos travaux ont établi une relation dose - effet et démontré que ces effets varient en fonction de la région du cerveau. Komulainen and Tuomisto, (1981a, b) ont montré que le MeHg inhibe la captation de la DA dans les synaptosomes de striatum de rat avec une CI₅₀ de 2.5 µM. Ces travailleurs ont de plus montré que le MeHg inhibe la captation de la 5-HT dans les synaptosomes d'hypothalamus de rat pour une CI₅₀ de 3.2 µM (Komulainen and Tuomisto, 1981a). Aussi, Rajanna and Hobson (1985) ont observé que le MeHg inhibe la captation de la DA dans les synaptosomes de cerveau total de rat avec une CI₅₀ de 50 µM. Sur la base de la CI₅₀, nos

résultats indiquent que la captation de la DA est plus sensible au MeHg par rapport à celle de la 5-HT. Les effets mesurés varient également en fonction de la région du cerveau. Ainsi, l'utilisation de différents protocoles comme 1) l'addition des DA et 5-HT non radioactifs dans le milieu d'incubation (Bondy et al., 1979; Komulainen and Tuomisto, 1981a), 2) l'utilisation de synaptosomes provenant de cerveau entier (Rajanna and Hobson, 1985) et de tampon (Komulainen, 1989) pourraient expliquer, en partie, les différences entre nos résultats et ceux des travaux rapportés ci-dessus.

Les plaquettes sont utilisées comme modèle de neurones sérotonergiques dans les études de captation de la 5-HT au niveau du SNC. Ainsi, il a été montré qu'*in vitro* le MeHg réduit la captation de la 5-HT dans les synaptosomes d'hypothalamus du cerveau de rat et dans les plaquettes du sang humain (Komulainen and Tuomisto, 1982; Tuomisto and Komulainen, 1983). Dans leurs études, Komulainen and Tuomisto, 1982, 1983) ont obtenu une CI_{50} de 3.4 μM dans les synaptosomes et 0.2 μM dans les plaquettes du sang humain. Toutefois, l'utilisation de différentes espèces animales, rat et humain, pourrait compliquer l'interprétation des résultats obtenus. De l'autre côté, les valeurs de la CI_{50} obtenues dans nos travaux indiquent que la réduction de la captation de 5-HT varie entre les différentes régions du cerveau comme suit : striatum = cortex cérébral < hippocampe = tronc cérébral = plaquettes < l'hypothalamus. En comparant les effets observés entre les synaptosomes et plaquettes, la différence observée pourrait s'expliquer, entre autre, par l'origine des tissus analysés, la faible concentration de protéine, la forte concentrations de 5-HT et la longue période d'incubation souvent utilisées dans les travaux antérieurs (Komulainen and Tuomisto, 1982; Tuomisto and Komulainen, 1983; Kumar et al., 1995). Ainsi, il est démontré que le neurones sérotonergiques et les plaquettes sanguines sont capables de capter et de libérer la 5-HT par les mêmes mécanismes pouvant être inhibé par le MeHg (Da Prada et al., 1988; Anderson et al., 1992). La similarité de l'inhibition de la captation de la 5-HT entre les synaptosomes du cerveau et plaquettes révèlent que les plaquettes pourraient servir comme substituts des neurones sérotonergiques dans l'évaluation de la captation de la 5-HT au niveau du cerveau, après *in vitro* exposition au chlorure de MeHg.

L'inhibition de la liaison aux récepteurs dopaminergiques D_2 par l'exposition *in vitro* au MeHg a été rapportée dans les synaptosomes de striatum provenant du cerveau de rat (Bondy and Agrawal, 1980; Komulainen et al., 1985). Toutefois, nos résultats ont démontré que ces effets varient en fonction de la concentration du chlorure de MeHg et de la région du cerveau.

Contrairement à nos résultats, Bondy and Agrawal, (1980) ont montré que le MeHg ne cause qu'une inhibition significative de la liaison de la [³H]spiroperidol seulement à la concentration de 10 µM dans les membranes de striatum contenant 0.400 mg de protéine. Aussi, Komulainen et al., (1985) ont trouvé une CI₅₀ de 0.9 µM of chlorure de MeHg pour la liaison de [³H]haloperidol dans les membranes de striatum (P₂ fraction). Dans leurs travaux, Komulainen et al., (1985) ont à la fois utilisé de l'haloperidol non marqué et [³H]haloperidol. De cette manière, le composé non marqué pourrait réduire la liaison de celui marqué. De plus, les composés [³H]spiroperidol et [³H]haloperidol utilisés dans les travaux antérieurs (Komulainen and Tuomisto, 1985; Tuomisto and Komulainen, 1981) possèdent aussi une forte affinité pour les récepteurs sérotonergiques 5-HT₂ et 5-HT_{1c}, les récepteurs sigma et les adrénorécepteurs (Leysen et al., 1978; Hall, 1994; Coccini et al., 1991; Morgan et al., 1984). Par contre, en utilisant [³H]raclopride, nous avons démontré un effet très significatif de la liaison aux D₂ au niveau des synaptosomes de différentes régions du cerveau. Cette grande variation pourrait s'expliquer, entre autre, par la différence d'affinité des récepteurs D₂ dans différentes régions du cerveau (Anderson et al., 1990). En plus du cerveau, nous avons observé que le MeHg inhibe *in vitro* la liaison de la [³H]raclopride aux récepteurs D₂ au niveau des lymphocytes. Tout comme au cerveau, l'inhibition de la liaison de la [³H]raclopride au niveau des lymphocytes était dépendant de la concentration du chlorure du MeHg utilisée.

Les résultats de cette étude pourraient tout d'abord être supportés par les données selon lesquelles le MeHg exerce ses effets inhibiteurs sur la captation et la liaison aux récepteurs D₂ à des niveaux d'exposition inférieures à celles détectées dans les cerveaux des populations humaines n'ayant aucune histoire d'exposition au MeHg (Dales, 1969). De plus, les processus de captation de la DA et de la 5-HT permettent de terminer l'action de ces neurotransmetteurs en les enlevant dans la fente synaptique et en les recyclant dans les terminaisons nerveuses. Ainsi, l'inhibition des ces processus par le MeHg pourrait augmenter ou prolonger l'action de ces neurotransmetteurs aux niveaux de leurs récepteurs respectifs. Mais puisqu'au même moment, le MeHg inhibe la liaison des neurotransmetteurs à leurs récepteurs aux même concentrations, l'action des neurotransmetteurs ne pourrait être ni réduite ni prolongée. Aussi, l'inhibition de la captation de la DA et de 5-HT pourrait aussi contribuer à la réduction de leurs concentrations dans les régions du cerveau chez le rat exposé au MeHg (Hrdina et al., 1976; Suzuki 1981; Loua et al., 1997). De plus, en comparant les neurones dopaminergiques et sérotoninergiques, nos

résultats supportent les données selon lesquelles, le système dopaminergique est plus sensible à l'exposition *in vitro* au MeHg (Bondy et al., 1976; Sharma et al., 1982). Cette grande vulnérabilité des neurones dopaminergiques au MeHg est bien illustrée par la nature des troubles comportementaux causés par le MeHg. Ces changements comportementaux sont, entre autres, les troubles moteurs qui se manifestent au niveau des doigts et autour de la bouche ainsi que les tremblements (Bakir et al., 1973; Beuter et al., 1998).

7.1.2.2 Effets *in vivo*

L'administration répétée du chlorure de MeHg (0, 2, 4 et 6 mg/kg par jour pendant 10 jours consécutifs) chez le rat adulte cause des perturbations au niveau des systèmes monoaminergiques dans différentes régions du cerveau. Les résultats de ces travaux montrent que les effets observés varient en fonction de la dose du chlorure de MeHg administrée et de la région du cerveau. Ainsi, nous avons observé soit l'augmentation ou la diminution du niveau de la DA, de la NE et de la 5-HT ; la réduction de la concentration de leurs principaux métabolites, l'inhibition de l'activité de la MAO et de la liaison de la [³H]raclopride dans différentes régions du cerveau. De même, on a observé la réduction de la liaison de la [³H]raclopride au niveau des lymphocytes et une baisse de la concentration de la 5-HT dans les plaquettes du sang périphérique. Dans l'ensemble, ces effets sont fonctions de la dose de chlorure de MeHg administrée et de la région du cerveau.

Chez le rat, le MeHg provoque une augmentation significative du niveau de la DA, de la NE et de la 5-HT dans le cerveau (Hrdina et al., 1976; Tsuzuki, 1982). Par exemple, Tsuzuki (1982) a observé chez le rat traité au chlorure de MeHg (4 mg/kg pendant soit 45 ou 50 jours consécutifs), une augmentation significative de la concentration de la DA, de la NE et de la 5-HT respectivement dans le striatum, le cortex cérébral et l'hypothalamus. Pendant ce temps, le niveau des métabolites correspondant aux neurotransmetteurs mentionnés ci-dessus était significativement diminué dans les mêmes régions. Aussi, O'Kushy et al., (1988) ont montré que le MeHg est capable d'accroître la concentration de la DA, de la NE et de la 5-HT dans le striatum et dans le cortex cérébral chez le rat. Cependant, ces études n'ont fourni aucune information sur le niveau de mercure dans les régions du cerveau. Bien que le mécanisme le associé à l'augmentation des monoamines dans le cerveau ne soit pas encore compris, le MeHg pourrait induire cet effet en inhibant l'activité de la MAO (Tsuzuki 1981; Komulainen, 1989 pour revue ; Chakrabarti et al., 1998) et de la catéchol-O-méthyle transférase (COMT), deux

enzymes impliquées dans la dégradation des monoamines au niveau du cerveau (Tsuzuki 1981; Komulainen, 1989 pour revue). Alternativement, l'augmentation des monoamines pourrait révéler la présence d'un mécanisme compensatoire induit par le MeHg (Sudo and Arito, 1982). Par les effets mentionnés ci-dessus, le MeHg pourrait augmenter la concentration de la DA, de la NE et de la 5-HT dans les différentes régions du cerveau chez le rat.

La réduction de la concentration de la DA, de la NE et de la 5-HT a été rapportée par d'autres chercheurs après exposition subchronique au MeHgCl (Hrdina et al., 1976; Tsuzuki, 1982; Okuda et al., 1978; Komulainen, 1989 pour revue). Les résultats de nos travaux indiquent que la réduction de ces monoamines dans le cerveau était fonction de la dose du chlorure de MeHg et de la région du cerveau. Cette différence pourrait dépendre tout d'abord de la quantité de mercure accumulée dans ces régions du cerveau. Mais, elle pourrait provenir des différences de densité et d'hétérogénéité entre les systèmes monoaminergiques au niveau de ces régions du cerveau (Snyder and Coyle, 1969). Le MeHg peut aussi réduire la concentration des monoamines ainsi mesurées en inhibant leurs systèmes de captation ainsi que leur libération spontanée au niveau des terminaisons nerveuses (Komulainen, 1989; Loua et al., 1997). Par exemple, en l'absence d'effet toxique observable, l'administration aiguë ou répétée au MeHg produit la libération significative de la DA à partir du striatum chez le rat adulte (Faro et al., 1997, 1998). De plus, le MeHg est capable d'inhiber la synthèse de la DA et de la NE (Okuda et al., 1978; Kung et al., 1978) et celle de la 5-HT (Tsuzuki, 1981) dans les préparations de tissus nerveux. Aussi, le MeHg favorise l'autoxydation de la DA et de la NE dans les synaptosomes du cerveau (Komulainen and Tuomisto, 1982). Au regard des considérations évoquées ci-dessus, il est possible que le MeHg puisse réduire le niveau des monoamines et de leurs métabolites dans différentes régions du cerveau chez les rats traités au chlorure de MeHg.

L'inhibition de l'activité de la MAO par le MeHg dans différentes régions du cerveau a été reportée (Chakrabarti et al., 1998). Des effets similaires ont été rapportés en utilisant différents protocoles (Tsuzuki 1981; Komulainen, 1989 pour revue). Ainsi, Tsuzuki (1981) a montré que l'administration orale du chlorure de MeHg (4 mg/kg par jour pendant 50 jours) était capable de réduire l'activité de la MAO et de celle de la choline acétyltransférase (ChAT), la tryptophan hydroxylase et la catéchol-O-méthyle transférase dans le cervelet du rat. Par contre, Omata et al., (1982) ont observé une augmentation de l'activité de la MAO dans les synaptosomes et dans l'homogénat du cerveau total chez le rat traité au chlorure de MeHg (10

mg/kg) pendant 7 jours consécutifs. La contradiction entre nos résultats et ceux obtenus par Omata et al., (1982) pourrait s'expliquer par les différentes conditions expérimentales. En effet, plutôt qu'une région spécifique, Omata et al., (1982) ont utilisé l'homogénat de cerveau entier chez le rat femelle. Dans les conditions normales, les neurotransmetteurs libérés dans la fente synaptique sont essentiellement recyclés par les systèmes de captation, le reliquat étant dégradé par la MAO (Cooper et al., 1991). Aussi, on a rapporté que les inhibiteurs de la MAO sont susceptibles de réduire la captation des monoamines (Bondiolotti et al., 1995). De plus, nous avons observé une inhibition de la MAO dans les plaquettes de rats bien que l'activité soit très faible chez cette espèce animale.

Cette étude rapporte pour la première fois les effets du MeHg sur la liaison de la ^3H]raclopride aux D_2 dans le cerveau et au niveau des lymphocytes. Cependant, les travaux antérieurs n'ont montré aucune réduction significative de cette liaison au niveau de cortex du cortex cérébral et du striatum chez le rat traité au MeHg (Corda et al., 1981; Komulainen and Tuomisto, 1985). La différence entre ces résultats pourrait résider dans les différents protocoles utilisés par les différents chercheurs. Par exemple, Corda and al., (1981) ont injecté soit une dose unique de MeHg (10 mg/kg) ou 5 doses espacées de 3 jours chacune chez le rat Wistar. Aussi, les ligands [^3H]spiroperidol et [^3H]haloperidol ont respectivement été utilisés au cours de ces travaux (Corda et al., 1981; Komulainen and Tuomisto, 1985); ces ligands possèdent une grande affinité pour les récepteurs de la 5-HT et de la NE (Hall, 1994). Les variations ainsi observées sont expliquées dans la section *in vitro*. Ainsi, nous avons montré que l'inhibition de la liaison aux récepteurs D_2 était plus prononcée dans le cortex cérébral et dans le cervelet chez les rats traités respectivement aux doses cumulatives de 40 et 60 mg/kg de chlorure de MeHg. En plus des différences d'accumulation du mercure, la variation d'affinité entre les récepteurs D_2 par rapport à leurs ligands au niveau des différentes régions du cerveau pourrait expliquer, en partie, les effets régionaux observés dans cette étude (Andersen et al., 1990).

L'inhibition de la liaison aux récepteurs D_2 au niveau des lymphocytes et la réduction du contenu des plaquettes en 5-HT montrent une corrélation significative avec les mêmes changements intervenus au niveau du cerveau chez les rats traités à la dose cumulative de 60 mg/kg de chlorure de MeHgCl. Par contre, cette relation n'a pu être démontrée par rapport à l'activité de la MAO entre le cerveau et les plaquettes du sang périphérique ($p > 0.05$ pour $r < 0.40$). Cette faible corrélation serait probablement due à la faible activité de la MAO au niveau

des plaquettes chez le rat.

La corrélation observée au niveau de la liaison aux récepteurs D₂ entre les différentes régions du cerveau et les lymphocytes est soutenue par les données humaines. Par exemple, dans les maladies comme l'Alzheimer et le Parkinson, il existe une forte corrélation au niveau de la liaison aux récepteurs D₂ entre les régions du cerveau et les lymphocytes (Le Fur et al., 1981; Mash et al., 1985; Adem et al., 1986), des résultats semblables ont été rapportés dans la schizophrénie (Bondy and Ackenheil, 1987).

Concernant le niveau de la 5-HT dans les plaquettes, malgré le débat continu sur la validité de l'utilisation des plaquettes dans les études sur la captation de la 5-HT (Slotkin et al., 1997), la concentration de la 5-HT dans les plaquettes pourrait constituer un marqueur idéal du fonctionnement des neurones sérotonergiques centrales (Bakish et al., 1997). Ainsi, les résultats de nos travaux suggèrent que le niveau de la 5-HT dans les plaquettes pourrait refléter les mêmes changements intervenus au niveau du cerveau suite l'exposition *in vitro* et *in vivo* au MeHg.

7.1.3 Effets sur les microtubules

La présente étude a évalué les effets de l'administration répétée du chlorure de MeHg (0, 2, 4 et 6 mg/kg par jour pendant 10 jours) sur les microtubules des lymphocytes et plaquettes du sang périphériques chez le rat adulte. Dans ces conditions, nos résultats montrent que le MeHg cause la perte des microtubules dans les lymphocytes et plaquettes. De plus, ces résultats montrent que les plaquettes sont plus vulnérables par rapport aux lymphocytes.

Des travaux antérieurs ont montré que le MeHg provoque la réduction des microtubules dans les plaquettes et dans les lymphocytes, *in vitro* (Durham et al., 1996) et dans les lymphocytes, après exposition *in vitro* et *in vivo* (Brown et al., 1988). Par exemple, Durham et al., (1996) ont montré que le MeHg cause la perte des microtubules dans les lymphocytes et plaquettes dans les cellules en culture ou en suspension et dans le sang total obtenu chez le lapin et l'humain. Par contre chez la souris, Brown et al., (1988) ont rapporté que le MeHg altère la structure des microtubules au niveau des lymphocytes immatures prélevées au niveau de la rate, deux jours après l'administration d'une dose unique du chlorure de MeHg (10 mg/kg en i.p).

Chez l'humain, le MeHg altère les chromosomes et inhibe la stimulation mitogénique au

niveau des lymphocytes du sang périphérique (Lee et al., 1997). Aussi, le MeHg déplete les lymphocytes dans le thymus et dans les nodules lymphatiques chez les personnes intoxiquées au MeHg (Takeuchi et Eto, 1977). Dans tous ces cas, les microtubules sont dépolymérisés et ces effets sont fonction du niveau d'exposition et du temps écoulé après la fin de l'exposition (Brown et al., 1988; Durham et al., 1996). Ces constatations sont consistantes avec les résultats de la présente étude.

De plus, le MeHg induit le changement de la forme, cause l'agrégation et l'activation des plaquettes. Il provoque la libération spontanée de la 5-HT *in vitro* chez l'humain (Hornberger and Patscheke, 1989). Aussi, Tuomisto and Komulainen, (1983) ont rapporté que le MeHg induit, *in vitro*, la libération et inhibe la captation de la 5-HT à partir des plaquettes obtenues chez l'humain et le lapin. Les résultats de nos travaux *in vitro* et *in vivo* ont montré l'existence d'une relation dose - effet sur l'inhibition de la captation de la 5-HT par le MeHg au niveau des plaquettes.

Les résultats de nos travaux *in vivo* ont montré que les plaquettes sont plus vulnérables aux effets du MeHg par rapport aux lymphocytes. Ces effets dépendent de la dose cumulative administrée. Durham et al., (1996) ont rapporté des résultats identiques après exposition *in vitro*.

Dans les neurones du SNC, le MeHg altère les fonctions et la structurale des microtubules après exposition *in vitro* (Abe et al., 1975; Sager and Syversen, 1984; Vogel et al., 1985) et *in vivo* (Rodier et al., 1984; Yagame et al., 1994; Ishida et al., 1997; Miura, 1998; Kinoshita et al., 1999). Par exemple chez le rat adulte, Ishida et al., (1997) ont rapporté que le MeHg (10 mg/kg pendant 7 jours consécutifs, en sc.), réduit la polymérisation des tubulines dans l'homogénat du cerveau, et cet effet est observé pendant la période de latence. Aussi, Kinoshita et al., (1999) ont démontré que le MeHg (10 mg/kg pendant 7 jours consécutifs, en sc.) cause une diminution très marquée des microtubules dans les axones des fibres optiques dans le cerveau de rat adulte. Dans ce dernier cas, la diminution des microtubules était observée quatre jours après la dernière dose du chlorure de MeHg. Enfin chez l'humain, le MeHg diminue l'activité mitotique dans le SNC en développement (Rodier et al., 1984), réduit la migration neuronale (Choi et al., 1989) et provoque une atrophie cérébrale (Hunter and Russel, 1954). Ainsi, bien qu'une comparaison directe soit difficile entre les observations faites au niveau du SNC et les résultats obtenus sur les lymphocytes et plaquettes, du fait de la différence de protocole entre ces études. On pourrait ainsi suggérer que la diminution des microtubules dans les plaquettes pourrait refléter les mêmes changements dans le SNC chez le rat, dans des conditions d'exposition identiques.

7.1.4. Signification comportementale de nos résultats

La signification des changements provoqués par l'administration répétée du MeHg au niveau de la neurotransmission dans le SNC centrale peut être illustrée par la ressemblance des troubles de comportement chez l'humain ou l'animal expérimental exposé à ce neurotoxique.

Ainsi chez l'humain, le MeHg induit des troubles sensori-moteurs avec tremblement, un retard de la mémoire et des troubles de l'attention (Harada, 1994 ; Lebel et al., 1996 ; Beuter and Edwards, 1998 ; Grandjean et al., 1997, 1998). Ces troubles du comportement sont aussi reproduits chez la souris (Kobayashi *et al.*, 1980), le rat (Sudo and Arito, 1982; O'Kushy and al., 1988; Beaudin et al., 1999a, b) et le singe (Rice, 1996). Par exemple, Kobayashi *et al.*, (1981) ont observé que le chlorure de MeHg (5 mg/kg pendant 15 jours consécutifs) altère l'activité motrice spontanée, le rotarod et induit une hypothermie chez la souris adulte. Selon ces chercheurs, ces perturbations seraient la conséquence de la baisse du niveau de l'ACh qui elle-même résulterait de l'inhibition de la captation de la choline dans les neurones cholinergiques au niveau du cerveau chez les souris exposées au MeHg.

Utilisant le même protocole que celui développé dans nos travaux, Beaudin et al., (1999a, b) ont évalué l'équilibre (*rotarod*), l'activité motrice spontanée et exploratoire (*open field*), la mémoire de référence spatiale (*Morris task*) et la mémoire de travail (*two choice water escape task*), chez les rats adultes. Les résultats de ces travaux ont montré une réduction significative du *rotarod* à partir du jour 7 de la première dose du MeHg chez les rats adultes traités à la dose cumulative de 60 mg/kg, par rapport aux autres groupes ($p < 0.002$). Quant au test du *Morris Water*, il était significativement réduit à partir du jour 4 de la période post traitement chez les rats soumis à la même dose cumulative par rapport aux autres groupes traités et contrôle ($p < 0.002$). À l'exception du *Open field*, tous les tests étaient significativement retardés à partir du jour 19 de la période post traitement chez tous les rats traités par rapport aux contrôles. L'absence d'effet sur le test *open field* indique que la locomotion et les activités exploratrices ne sont pas sensibles chez les rats traités au MeHg. Nos résultats ont montré que les troubles comportementaux observés étaient devenus significatifs avec une importante inhibition de la neurotransmission cholinergique et monoaminergique dans le cerveau.

En effet, plusieurs ont montré qu'il existe une association entre les altérations du système cholinergique dans le cerveau et certains troubles comportementaux comme l'apprentissage et la mémoire, et les fonctions motrices chez le rat (Chrobak et al., 1987; McDonald et al., 1988; Altonen et al., 1991; Day et al., 1991; Llorens et al., 1993; Olton *et al.*, 1994; Mesulam, 1995; Farkas et al., 1996) et l'humain (Mash et al., 1985; Rabey et al., 1986; Adem et al., 1986; Mesulam, 1995). Ainsi chez le rat, il a été démontré que l'éthylcholine aziridinium ion (AF64A) et l'acide ibotenic altèrent sévèrement la mémoire récente (Altonen et al., 1991; Chrobak *et al.*, 1988; Bartus *et al.*, 1985). Les perturbations de la mémoire récente par ces deux composés sont accompagnées d'une profonde réduction de l'activité de la ChAT dans l'hippocampus et dans les régions de la projection corticale au niveau du noyau basal chez le rat (Chrobak *et al.*, 1988; Bartus *et al.*, 1985). Ces données supportent l'hypothèse selon laquelle les composés qui inhibent ou détruisent la neurotransmission cholinergique au niveau du cerveau sont capables d'altérer l'apprentissage, la mémoire et la motricité au niveau du système nerveux central chez le rat (Olton et al., 1994).

Aussi chez l'humain, dans certaines maladies mentales ou suite à l'exposition à des agents neurotoxiques, les perturbations de la neurotransmission cholinergique dans le cerveau ont été souvent reflétées par les mêmes altérations au niveau des lymphocytes du sang périphériques (Mash et al., 1985; Adem et al., 1986; Rabey et al., 1986; (Costa et al., 1990; Fitzgerald et al., (1994). Ainsi dans la maladie d'Alzheimer, la réduction de la liaison aux récepteurs mChRs dans le cerveau est reflétée par de semblables effets au niveau des lymphocytes du sang périphériques (Mash et al., 1985; Adem et al., 1986; Rabey et al., 1986). De même chez les rats adultes exposés à des agents cholinergiques comme les pesticides organophosphorés, on a observé une inhibition parallèle de la liaison aux récepteurs mChRs dans différentes régions du cerveau et dans les lymphocytes (Costa et al., 1990; Fitzgerald et al., (1994).

De plus, les altérations de la neurotransmission monoaminergique au niveau du cerveau ont aussi été associées à des troubles de comportements chez l'humain (Scatton et al., 1983) et l'animal expérimental (Brozoski et al., 1979; Whishaw and Dunnett, 1985; Sawaguchi et al., 1988; Beninger, 1989; Beatty and Rush, 1989; Slikker et al., 1989; McNamara and Skelton, 1993; Sokolowski and Salamone, 1994; Robbins and Everitt, 1995; Green and Backus, 1990; Frederick et al., 1994; Maes and Meltzer, 1995; Herges and Taylor, 1998; Pranzatelli et al., 1994; Barry and Casimir, 1995; Heninger, 1995). Par exemple dans la maladie de Parkinson qui se

caractérisée par les tremblements au niveau des extrémités, les voies dopaminergiques, noradrenergiques et sérotoninergiques sont significativement inhibées au niveau du cortex cérébral, du striatum et de l'hippocampus (Scatton et al., 1983). Chez le rat, dans les troubles sensori-moteurs et dans les déficits de l'apprentissage et de la mémoire comme évalués par les tests de *Morris Water Maze*, on observe une diminution significative de la DA et une réduction de la liaison aux récepteurs D₂ dans le cortex cérébral, le striatum et l'hippocampe (Whishaw and Dunnett, 1985; Beninger, 1989; Beatty and Rush, 1989; Sokolowski and Salamone, 1994; Galkina and Podgornaya, 1992). Aussi, les altérations de la neurotransmission noradrénergique ont été associées aux difficultés d'orientation globale suite aux perturbations au niveau du système limbique, dans le cortex cérébral et dans le tronc cérébral (Robbins and Everitt, 1995) et de la mémoire dans les paradigmes de la réponse spatiale (Arnsten et al., 1988; Trevor and Barry, 1995). De plus, l'inhibition des voies sérotonergiques est impliquée dans les troubles moteurs, du sommeil et dans les processus cognitifs (Green and Backus, 1990; Frederick et al., 1994; Slikker et al., 1989; Maes and Meltzer, 1995; Herges and Taylor, 1998; Pranzatelli et al., 1994; Barry et Casimir, 1995; Heninger, 1995).

Dans certaines maladies mentales et psychologiques, les changements de la neurotransmission monoaminergique au niveau du cerveau sont parfois reflétés par les mêmes modifications au niveau des lymphocytes et des plaquettes du sang périphérique (Le Fur et al., 1981; Bondy and Ackenheil, 1987; Costa et al., 1982; Slotkin et al., 1997). C'est ainsi qu'on observe une réduction (Le Fur et al., 1981) ou une augmentation (Bondy and Ackenheil (1987) significative de la liaison aux récepteurs D₂ au niveau des lymphocytes chez les patients souffrant respectivement de la maladie de Parkinson et de la schizophrénie. Aussi, l'affinité relative des antagonistes pour les récepteurs D₂ au niveau des lymphocytes reflète celle au niveau du striatum chez le rat (Costa et al., 1982; Slotkin et al., 1997).

De plus, les plaquettes sanguines sont utilisées comme modèles périphériques dans l'étude de la captation de 5-HT au niveau des neurones centrales. En effet, la concentration de 5-HT, tributaire de la captation de celle-ci dans les plaquettes est utilisée pour le diagnostic et la surveillance thérapeutique de la dépression et de la maladie d'Alzheimer (Gaetano, 1978; Kumar et al., 1995; Bakish et al., 1997). De plus, il existe une parfaite corrélation entre les plaquettes et les synaptosomes du cerveau par rapport à la captation de la 5-HT (Tuomisto and Komulainen, 1983). Cependant, malgré ces ressemblances, quelques disparités ont été signalées entre les

régions du cerveau et les plaquettes, mais ces différences seraient plutôt attribuées à l'usage de différents protocoles (Slotkin et al., (1997).

Ainsi, les informations recueillies ci-dessus ont démontré l'implication des perturbations de la neurotransmission centrale dans les troubles comportementaux induits par les substances neurotoxiques (Herve et al., 1980; Sawaguchi et al., 1988; Beninger, 1989; Beatty and Rush, 1989; McNamara and Skelton, 1993; Sokolowski and Salamone, 1994; Brozoski et al., 1979; Whishaw and Dunnett, 1985; Robbins and Everitt, 1995; Green and Backus, 1990; Frederick et al., 1994; Slikker et al., 1989; Maes and Meltzer, 1995; Herges and Taylor, 1998; Pranzatelli et al., 1994; Barry and Casimir, 1995; Heninger, 1995). Ces données, combinées avec nos résultats, permettent de suggérer l'implication de l'inhibition de la neurotransmission cholinergique et monoaminergique dans les troubles de comportements observés chez le rat après exposition répétée au chlorure de MeHg, comme reporté par Beaudin et al., (1999a, b).

Dans les mêmes conditions d'exposition, nous avons démontré que les changements intervenus au niveau du cerveau sont en parfaite corrélation avec la diminution de la liaison aux récepteurs mChRs et D₂ au niveau des lymphocytes, ainsi que la réduction de la concentration de la 5-HT dans les plaquettes du sang périphérique. De la même manière, nous avons observé que le MeHg diminue les microtubules dans les plaquettes et lymphocytes, mais plus significativement dans les plaquettes. Ces effets observés au niveau des lymphocytes et plaquettes pourraient probablement refléter similaires changements intervenus au niveau du cerveau.

7.2 Conclusion

Malgré les efforts déployés par les agences de régulations aux échelons nationales et internationales, l'exposition environnementale au méthylmercure (MeHg) continue d'être une préoccupation majeure en santé publique. Devant la difficulté d'établir une relation dose-réponse claire, entre le niveau de mercure dans le sang et les cheveux d'une part, et les troubles comportementaux de l'autre, dans les conditions d'exposition environnementales au MeHg, le développement de biomarqueurs d'effets de la neurotoxicité devient de plus qu'une nécessité pour le dépistage des effets précoces de l'exposition au MeHg au sein de la population humaine.

Les perturbations de la neurotransmission cholinergiques et monoaminergique au niveau du cerveau au cours de certaines maladies mentales par les substances neurotoxiques peuvent être reflétées des changements similaires à ceux présents au niveau des plaquettes et des lymphocytes du sang circulant. Face à l'inaccessibilité du cerveau humain pour la surveillance des populations humaines exposées au MeHg, cette étude s'était proposée de d'évaluer les paramètres de la neurotransmission cholinergique et monoaminergique, ainsi que les microtubules au niveau des plaquettes et des lymphocytes du sang périphérique comme substituts des neurones pour le développement des biomarqueurs d'effets précoces de l'exposition répétée au MeHg chez le rat adulte.

Dans ces conditions, la présente étude a démontré que l'inhibition de la neurotransmission cholinergique et monoaminergique dans différentes régions du cerveau sont reflétées par la liaison aux récepteurs mChRs et D₂ au niveau des lymphocytes et par le contenu des plaquettes en 5-HT et en microtubules suivant l'exposition répétée au chlorure de MeHg chez le rat adulte. Par conséquent, les résultats de nos travaux suggèrent que la liaison aux récepteurs mChRs et D₂ au niveau des lymphocytes et la concentration de la 5-HT dans les plaquettes du sang paramètres pourraient être utilisés comme des biomarqueurs périphériques potentiels de la neurotoxicité précoce du MeHg chez le rat adulte après exposition répétée.

7.2 Limites et perspectives de l'étude

Nous pouvons retenir deux limites majeures à cette étude, à savoir le protocole expérimental et la non-spécificité des marqueurs développés.

Au niveau du protocole, nous avons utilisé une exposition répétée de courte durée. Par contre chez l'humain et dans les conditions environnementales, l'exposition est souvent saisonnière et chronique à faible dose. Ces aspects devraient être pris en compte dans les prochains travaux.

Aussi, les biomarqueurs développés dans cette étude ne sont pas spécifiques du MeHg. En effet, comme nous l'avons mentionné plus haut, chez l'humain et l'animal expérimental, ces biomarqueurs sont également perturbés par certaines maladies mentales, des médicaments et nombreux agents neurotoxiques. Ainsi, des précautions devraient être prises lors de

l'interprétation de ces biomarqueurs d'effets au sein de la population humaine.

Malgré ces limites, les biomarqueurs développés dans cette étude, lorsque utilisés en combinaison avec les biomarqueurs d'exposition, pourraient faciliter l'évaluation du risque au niveau de la population humaine. En effet, cette stratégie permettrait de raffiner, entre autre, la relation dose-réponse difficile à établir surtout à de faibles niveaux d'exposition environnementale chez les populations sensibles. En plus, les biomarqueurs permettraient de comprendre les mécanismes des changements comportementaux observés chez les populations exposées au MeHg.

Enfin, des travaux additionnels sont nécessaires pour évaluer les biomarqueurs mesurés au niveau des lymphocytes et plaquettes sanguins en fonction de la durée de l'exposition au MeHg et du temps écoulé après la fin de cette exposition. Aussi, il serait important d'évaluer les effets du MeHg sur les récepteurs D_1 et nChRs au niveau du cerveau et des lymphocytes sanguins comme biomarqueurs de la neurotoxicité du MeHg. Enfin, les biomarqueurs d'effets ainsi développés chez l'animal devraient être validés chez l'humain dans les conditions d'exposition environnementale.

BIBLIOGRAPHIE

- Abd-Elfattah, A.-S.A., and Shamoo, A. E. (1981). Regeneration of a functionally active rat brain muscarinic receptor by D-Penicillamine after inhibition with methylmercury and mercuric chloride. *Mol Pharmacol* **20**:492-497
- Abe T., Haga T., Kurokawa M. (1975). Blockage of axoplasmic transport and depolymerization of reassembled microtubules by methyl mercury. *Brain Res* **86**:504-508
- Adem A, Nordberg A., Bucht, G., and Winblad, B. (1986) Extraneural cholinergic markers in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Progr Neuro-Psychopharmacol. Biol Psychiat.* **10**:247-257
- Adler, M.W., and Adler, C. H. (1977). Toxicity of heavy metals and relationship to seizure thresholds. *Clin Pharmacol* **22**:774-779
- Aghajanian G. K. Electrophysiology of serotonin receptor subtypes and signal transduction pathways. In, *Psychopharmacology: The fourth Generation in progress*. Bloom, F. E., and Kupfer D. J., eds.) Raven Press, New York, pp. 451-460, 1994.
- Akagi H., Malm O., Branches F. J. P., Kinjo Y., Kashima Y., Guimaraes J. R. D., Oliveria R. B., Karaguchi K., Pfeiffer C., Takizawa Y., and Kato H. (1995). Human exposure to mercury due to gold mining in the Tapajos River Basin, Amazon, Brazil: Speciation of mercury in human hair, blood and urine. *Water Air Soil Pollut.* **80**: 85-94
- Akagi, H., Kinjo, Y., Branches F. J. P., Malm, O., Harada, M., Pfeiffer, W. C., and Kato, H. (1994). Methylmercury pollution in Tapajos river bassin, Amazon. *Environ. Sci.* **3(1)**:25-32.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., and Watson J. D. (Eds.) *Molecular Biology of the cell*. 2nd ed., Garland Press, New York, pp. 613-680, 1989.
- Alice Bezman Tarcher. Principles and scope of environmental medicine, In *Principles and Practice of Environmental Medicine*, Alice Bezman Tarcher edit.; Plenum Medical Book Comany, New York, pp 3-18, 1992.
- Ally A., Buist R., Mills P., and Reuhl K. (1993). Effects of methylmercury and trimethyltin on cardiac, platelets, and aorta eicosanoid biosynthesis and platelets serotonin release. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **44**:555-563
- Al-Shahristani H., and Shihab K. M. (1974). Variation of biological half-life of methylmercury in man. *Arch. Environ. Health* **28**:342-344
- Altonen, M.; Riekkinen, P., Jr.; Sirviö, J.; Riekkinen, P. Jr. (1991). Effects of THA on passive avoidance and spatial performance in quisqualic acid nucleus basalis-lesioned rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **39**:563-567

- Andersen, P. H., Gingrich J. A., Bates M. D., Dearry A., Falardeau P., Senogles S. E., and Caron M. G. (1990). Dopamine receptor subtypes; beyond the D₁/D₂ classification. *Trends Pharmacol. Sci.* **11**:231-236
- Andorn, A. C., Bacon, B. R., Neuyen-Henh, A. T., Parlato S. J., and Stitts, J., A. (1988). Guanyl nucleotide interaction with dopamine binding sites labeled by ³H-spiroperidol in human caudate and putamen: Guanyl nucleotides enhance ascorbate-induced lipid peroxidation and cause an apparent loss of high affinity binding sites. *Mol. Pharmacol* **33**:155-162
- Andres A. H, Rao M. L., Ostrowitzki S., Entrian W. (1992). Human brain cortex and platelet serotonin receptor binding properties and their regulation by endogenous serotonin. *Life Sci*:**52**:313-321
- Anner B. M. (1985). The receptor function of the Na⁺/K⁺ATPase activated adenosine triphosphate system. *Biochem. J.* **227**:1-11
- Anwar, S. A., Abd Elfattah, A. A., and Shamoo, A. E. (1981). Regeneration of a functionally active rat brain muscarinic receptor by D-Penicillamine after inhibition with methylmercury and mercuric chloride: Evidence for essential sulfhydryl groups in muscarinic receptor binding sites. *Mol. Pharmacol.* **20**:492-497
- Araki, K., Wakabayashi, M., Sakimura, K., Kushiya, E., Ozawa, H., Kunamoto, T., and Takahashi, Y. (1981). Decreased uptake of GABA by dorsal ganglia in MeHg treated rats. *Neurotoxicology* **2**:557-566
- Araujo, D. M., Lapchak, K. P., Robitaille Y., Gauthier S., and Quirion, R. (1988). Differential alteration of various cholinergic markers in cortical and subcortical regions of human brain in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **50**:1914-1923
- Arito H., and Takahashi M. Effect of methylmercury on sleep patterns in the rat, In *Advances of Mercury Toxicology*, Suzuki T et al., eds., Plenum Press, New York, p 381-409 1991.
- Arnsten A. F. T., Cai J. X., Goldman Rakic P. S. (1988). The alpha 2 adrenergic agonist guanfacine improves memory in aged monkeys without sedative or hypotensive side effects: evidence for alpha 2 receptor subtypes. *J. Neurosci* **8**:4287-4298
- Aronstam RS, Abood LG, Hoss W. (1978). Influence of sulfudryl reagents and heavy metals on the functional state of the muscarinic ACh receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* **14**:575-586
- Aronstam RS, and Eldefrawi ME. (1979). Transition and heavy metal inhibition of ligand binding to muscarinic ACh receptors from rat brain. *Toxicol Appl Pharmacol* **48**:489-496
- Aschner M. (1996). Methylmercury in astrocytes. What possible significance?. *Neurotoxicology* **17**(1):93-106

- Aschner M., Aschner J. L. (1990). Methylmercury neurotoxicity: Mechanisms of blood brain barrier transport *Neurosci. Behavior Rev.* **14**(2):169-176
- Aschner M., Aschner J. L., and Kimelberg. Methylmercury neurotoxicity and its uptake across the blood-brain-barrier. In: *The Vulnerable brain and Environmental Risks*, R. L. Isaacson and K. F., Jensen, New York, Plenum Press, pp. 3-14. 1992.
- Aschner, M., and Clarkson, T.W. (1988). Uptake of Methylmercury in the rat brain: Effects of amino acid. *Brain Res.* **462**:31-39
- Aschner, M., and Clarkson, T.W. (1989). Methylmercury uptake across bovine brain capillary endothelial cells in vitro: The role of amino acids. *Pharmacol. Toxicol.* **65**:17-20
- Atchison W. A. (1986). Extracellular calcium-dependent and independent effects of methylmercury on spontaneous and potassium-evoked release of acetylcholine at the neuromuscular junction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **237**:672-680
- Atchison, W. D., Hare, M. F. (1994). Mechanism of methylmercury induced neurotoxicity. *FASEB J.* **8**:622-629
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological Profile for Mercury (update) TP- 93/10 Atlanta, GA, USA, 1997
- Baimbridge , R. G., Celio, M. R., and Rogers, J. H. (1992) *Trends Neurosci.* **15**:303-308
- Bakir F., Damluji S. F., Amin-Zaki, Murtadha M., Khalidi A., Al-Rwi N. Y., Tikriti S., Dahir H. I., Clarkson T. W., Smith J. C., Dohery R. A. (1973). MeHg Poisoning in Iraq : An interuniversity report. *Science* **181**:230-241
- Bakish D., Cavazzoni P., Chudzik J., Ravindran A., Hrdina P. D. (1997). Effects of selective serotonin reuptake inhibitors on platelets serotonin parameters in Major depressive disorder. *Biol Psychiatry* **41**(2):184-190
- Bano Y, Hasan M. (1989). Mercury induced time-dependent alterations in lipid profiles and lipid peroxidation in different body organs of cat-fish heteropneustes fossilis. *J Environ Sci Health [B]* **24**:145-166
- Baraldi, M., Zanoli, P., Truzzi, C., Vaccari, G., and Veneri, C. (1993). Evidence that exposure to MeHg during gestation affects the opiate system in the brain of rat offspring. *Neuroendocrinol. Lett.* **15**:301
- Barker, I. A. and Mittag, T. W. (1975). Comparative studies of substrates and inhibitors of choline transport and ChAT. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **192**:86-94
- Barry L. J., and Casimir A. F. Serotonin and behavior: A general hypothesis. In *Psychopharmacology: The Fourth generation of progress*, eds. Floyd E. Bloom and David J. Kupfer. Raven Press. New York, pp 461-469. 1995

- Beatty, W. W., and Rush J. R. (1989). Spatial working memory in rats; Effects of monoaminergic antagonists. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **18**:7-12
- Beaudin S., Chakrabarti S. K., Doré F. Y., and Ptito M. (1999a). Exposure to methylmercury: Effects on behavior, learning and memory in juvenile rats. (*Submitted in Neurotoxicology and Teratology*)
- Beaudin S., Chakrabarti S. K., Doré F. Y., and Ptito M. (1999b). Exposure to methylmercury impairs motor coordination and water Maze learning tasks in juvenile rats. (*Submitted in Behavioral Neuroscience*)
- Begley, T. P. Walts, A. E., and Walsh C. T. (1986). Bacterial organomercuric lyase: Overproduction, isolation, and characterization. *Biochem.* **25**:7186-7192
- Beijer K., and Jernelöv (1986): Sources, Transport and Transformation of metals in the environment. In Handbook on The Toxicology of Metals, Vol. I, Chter 4, pp 68-84, Ed. Friberg L., et al., Ed. Elsevier. N.Y
- Beninger R. J. (1989). Dissociating the effects of altered dopaminergic function of performance and learning. *Brain Res. Bull.* **23**:365-371
- Bergamaschi E., Mutti A., Cavazzini S., Vettori M. V., Renzulli F. S., and Franchini I. (1996). Peripheral markers of neurochemical effects Among Styrene-exposed workers. *Neurotoxicology* **17(3-4)**:753-760
- Berlin, M. Mercury. In : Friberg, L., Nordberg, G. F., & Voulk, V., ed. Handbook on the toxicology of metals, 2nd ed., Amsterdam, Oxford, New York, Elsevier Science Publishers, pp. 387-445, 1986.
- Berlin M., Carlson J., Norseth T. (1975a). Dose-dependence of methylmercury metabolism. A study of distribution: Biotransformation and excretion in the squirrel monkey. *Arch. Environ. Health.* **30**:307-312
- Berlin M., Grant C. A., Hellberg J., Hellström J., and Schütz A. (1975b). Neurotoxicology of Methylmercury in squirrel monkeys. *Arch. Environ. Health,* **30**:340-348
- Berlin, M., and Ullberg, S. (1963). Accumulation and retention of mercury in the mouse III: An autoradiographic comparison of MeHg dicyandiamide with inorganic mercury. *Arch. Environ. Health.* **6**:610-616
- Berthoud H. R., Garman R. H., and Weiss B. (1976). Food intake, body weight, and brain histopathology in flowing chronic methylmercury treatment. *Toxicol Appl. Pharmacol* **36**:19-30
- Beuter A., and Edwards R. (1998). Tremor in Cree subjects exposed to methylmercury: a preliminary study. *Neurotoxicol & Teratol.* **20(6)**:581-589

- Bigham G. N., and Vandal G. M. 1996. A drainage basin perspective of mercury transport and bioaccumulation: Onondaga lake, New York. *Neurotoxicology* **17(1)**:279-290
- Birke G., and Skerfving S. (1972). Studies on humans exposed to methylmercury through fish consumption. *Arch. Environ health.* **25**:77-83
- Blakley, B. R., Sisodia C. S., and Mukkur T. K. 1980. The effect of methylmercury, triethyl lead and sodium arsenite on the humoral immune response in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **52**:245-254
- Bluzztajn, J. K., Wurtman, R. J. The syntheses of choline and ACh in brain. In Handbook of neurochemistry Second ed. Plenum Press, New York, Ed. Abel Lajtha, Vol. 5: Metabolic turnover in the nervous system, pp-295-310, 1983.
- Boischio A. P., and Henshel D. S. 1996. Risk Assessment of mercury exposure through fish consumption by the riverside people in the Madeira basin, Amazon, 1991. *Neurotoxicology* **17(1)**:169-175
- Bondy B., Ackenheil M., Birzle W., Elbers R., and Fröhler M. (1984). Catecholamines and their receptors in blood: evidence for alterations in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* **19**:1377-1392
- Bondy S. C., and Agrawal, A.K., 1980; The inhibition of cerebral high affinity receptor sites by lead and mercury compounds. *Arch. Toxicol* **46**:249-256
- Bondy, S. C., Anderson, C. L., Harrington, M. E., and Prasad, K. N. 1979. The Effects of Organic and Inorganic Lead and Mercury on Neurotransmitter High-Affinity Transport and Release Mechanisms. *Environ. Res.* **19**:102-111.
- Bondy S C., and McKee M. (1991). Disruption of the potential action across the synaptosomal plasma membrane and mitochondria by neurotoxic agents. *Toxicol Lett.* **58**:13-21
- Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcrona, M., Nicotera, P., and Lipton, S. A. (1995). Proc. Natl Acad. Sci. USA **92** :7162-7166
- Bonnet J. J., Benmansour S., Amejkedki-Chab N., and Costentin J. (1993). Effect of CH₃HgCl and several transition metals on the dopamine neuronal carrier; peculiar behaviour of Zn²⁺ *Eur. J. Pharmacol.* **266**:87-97
- Born G.V.R., et al., (1972). Relatives activities on and uptake by human blood platelets of 5-hydroxytryptamine and several analogues. *Br. J. Pharmacol.* **44**:117-137
- Braunwald E., Issebacher K. J., Petersdorf R. G., Wilson J. D., Martin J. B., Fauci A. S. eds. Harrison's Principles of Internal Medicine. 13th ed. New York, McGraw Hill. 1994.
- Bronzetti E., Adani O., Amenta F., Felici L., Mannino F., Ricci A. (1996). Muscarinic cholinergic receptors subtypes in human peripheral blood lymphocytes. *Neurosci. Lett.* **208(3)**:211-215

- Brown D. L., Reuhl K. R., Bormann S, and Little J. E. (1988). Effects of methylmercury on the microtubule system of mouse Lymphocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* **94**:66-75
- Browning, E. T., and Nicklas, W.J., (1982). Induction of glutamine synthetase by dibutyryl cyclic AMP in C-6 glioma cells. *J.Neurochem* **39**:336-341
- Brozoski T. J., Brown R. M., Rosvold H. E., and Goldman P. S. (1979). Cognitive deficit caused by regional depletion of dopamine in frontal cortex of rhesus monkey. *Science* **205**:929-931
- Budd, S. L., and Nicholls, D. G. (1996). *J. Neurochem.* **66** :303-319
- Bushnell PJ, Padilla SS, Ward T, Pope CN, Olszk VB. (1991). Behavioural and neurochemical changes in rats dosed repeatedly with diisopropylfluorophosphate. *J Pharmacol Exp. Ther* **256**:741-750
- Cadrin M., Wasteneys G. O., Jones-Villeneuve, E. M., Brown D. L., and Reuhl, K. R. (1988). Effects of methylmercury on retinoic acid-induced neuroectodermal derivatives of embryonal carcinoma cells. *Toxicol. Cell Biol.* **4**:61-80
- Cagiano, R., De Salvia M. A., Renna, G., Tortella, E., Braghiroli, D., Parenti, C., Zanoli, P., Baraldi, M., Anneau, Z., and Cuomo, V. (1990). Evidence that exposure to MeHg during gestation induces behavioral and neurochemical changes in offspring of rats. *Neurotoxicol. Teratol.* **12**(1):23-28
- Calne D. B., Eiosen, A., McGeer, E., and Spencer, P. (1986). Alzheimer's disease, Parkinson's disease and motoneuron disease: A biotrophic interaction between aging and environment. *Lancet* **II**:1067-1070
- Candy, R., Almer R., Lybarger, J. Biomarkers of human mercury exposure and neurotoxic effects: Review. Neurotoxicology Abstracts of the twelfth international neurotoxicology conference: Neurotoxicity of mercury: indicators and Effects of Low-level Exposure. Arkansas. USA October 30 November 2, pp 955, 1994
- Canizares C., Vivar N., and Herdoiza, M. (1994). Role of microtubules systems in platelets aggregation. *Braz. J. Med & Biological Res.* **27**(7):1533-1551
- Caronti B., Calderato C., Parasselli F., Palladini G., Pontieri F. E. (1998). Dopamine receptor mRNAs in the rat lymphocytes. *Life Science*; **62**(21):1919-1925
- Carson D. A. Composition and biochemistry of lymphocytes and plasma cells. In Williams Hematology. Ernest Beutler, Marshall A. Lichtman, Barry S. Coller and Thomas J. Kipps (eds.). Fifth ed. McGraw-Hill, Inc., New York, pp. 916-921, 1995.
- Castoldi A. F. Candura S. M.; Costa P.; Manzo L.; and Costa L. G. (1996). Interaction of Mercury Compounds with Muscarinic receptor Subtypes in the Rat brain. *Neurotoxicology* **17**(3-4):735-742

- Carty, A.J., and Malone, S. F. The chemistry of mercury in biological systems, in: The Biogeochemistry of Mercury in the Environment; Nriagu, J.O., ed., Elsevier/North Holland biomedical Press, Amsterdam, pp. 433-479, 1979.
- Cavanagh J. B. (1988). Long term persistence of mercury in the brain. *Br J. Ind. Med* **45(10)**:649-651
- Cavanagh J. B., and Chen F. C. K. (1971). The effects of methylmercury dicyandiamide on the peripheral nerves and spinal cord of rats. *Acta Neuropathol.* **19**:208-215
- Celada P., Martin F., Artigas F. (1994). Effect of chronic treatment with dexfenfluramine on serotonin in rat blood, brain and lung tissue. *Life Sci* **55**:1237-1243
- Cesura, A. M., Ritter A., Picotti G. B., and Da Prada (1987). Uptake, release and subcellular localisation of 1-methyl-4-phenyl-pyridinium in blood platelets. *J. Neurochem.* **49**:138-145
- Chakrabarti S. K., Loua K. M., Bai C., Durham D. H., and Panisset J. C. (1998). Modulation of Monoamine oxidase activity in different brain regions and platelets following exposure of rats to methylmercury. *Neurotoxicology & Teratology.* **20(2)**:161-168
- Chang L W. (1977). Neurotoxic effects of mercury : A review. *Environ Res* **14**:329-373
- Chang L. W. (1990). The neurotoxicology and pathology of organomercury, organolead and organotin. *J. Toxicol Sci* **15**:125-151
- Chang L. W., and Hartman, H. A. (1972a). Ultrastructural studies of the nervous system after mercury intoxication. I. pathological changes in the nerve cell bodies. *Acta Neuropath.* **20**:122
- Chang L. W., Hartman A. A. (1972b). Electron microscopy histochemical study on the localisation and distribution of mercury in the nervous system after mercury intoxication. *Exp. Neurol.* **35**:122-137
- Chang L. M. Mercury ; In Spencer P. S., schauburg H. H., (eds.), Experimental and Clinical Neurotoxicology, Vol. 1, William & Wilkins, Baltimore, pp 508-526, 1980.
- Chang, L.W., Ware R. A., and Desnoyers P. A. (1973). A histochemical study on some enzyme changes in the kidney, liver and brain after chronic mercury intoxication in the rat. *Food Cosmet Toxicol* **11**:351-359
- Chang L. W., and Verity M. A. Mercury neurotoxicity : Effects and mechanisms, In Chang L. W., Dyer R. S., (eds.), Handbook of Neurotoxicology. Marcel Dekker, Inc. New York, pp 31-59, 1995.

- Charleston J. S., Body R. L., Mottet N. K., Vahter M. E., and Burbacher T. M. (1995). Autometallographic determination of inorganic mercury distribution in the cortex of the calcarine sulcus of the monkey *Macaca fascicularis* following long term subclinical exposure to methylmercury and mercuric chloride. *Toxicol Applied Pharmacol.* **132**:325-333
- Checkoway, H., Costa L. G., Camp J., Coccini T., Daniell W. E., Dillis R. L. (1992). Peripheral markers of neurochemical function among workers exposed to styrene. *Br. J. Ind. Med.* **49**:560-565
- Checkoway H., Echeverria D., Moon J-D., Heyer N., and Costa L. G. (1994). Platelets monoamine oxidase B activity in workers exposed to styrene. *Int. Arch. Environ. Health.* **66**:359-362
- Checkoway, H., Costa L. G., Camp J., Coccini T., Daniell W. E., Dillis R. L. (1992). Peripheral markers of neurochemical function among workers exposed to styrene. *Br. J. Ind. Med.* **49**:560-565
- Chen W. J., et al., (1979). Some effects of continuous low dose congenital exposure to methylmercury on organ growth in the rat fetus. *Teratology* **20**:31-36
- Cheung M. K., and Verity M. A. (1985). Experimental methylmercury neurotoxicity: Locus of mercurial inhibition of brain protein synthesis in vivo and in vitro. *J. Neurochem.* **44**(1):1799-1808
- Cheung M. K., Verity M. A. (1981). Methylmercury inhibition of synaptosome protein synthesis: The role of mitochondrial dysfunction. *Environ Res* **24**:186-298
- Cheung M., Verity M., Brown W. J., Czer G. (1977). Methylmercury inhibition of synaptosomes and brain slice protein synthesis: in vivo and in vitro studies. *J. Neurochem.* **29**:673-
- Choi, B. H. (1989). The effects of methylmercury on the developing brain. *Progr Neurobiol* **32**:447-470
- Choi, B. H., and Verity (1996). *Neurotoxicology* **17**(1)
- Choi, B. W. (198). *Neuron* **1** :623-634
- Chrobak J. J., Hanin I., Schmechel D. E., Walsh, T. J. (1987). AF64A- induced working impairment: behavioral, neurochemical and histopathological correlates. *Brain Res* **46**:3107-117
- Clapham, D. E. (1995). *Cell* **80** :259-268
- Clark D. L., Weiss A. A., and Silver, S. (1977). Mercury and organomercurial resistance determined by plasmids in *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.* **132**:186-196.

- Clarkson T.W. (1972). The pharmacology of mercury compounds. *Annu. Rev. Pharmacol.* **12**:375-406.
- Clarkson T. W. (1992). Mercury: Major issues in environmental health. *Environ Health Perspect.* **100**:522-526
- Clarkson T. W. (1987). Metal toxicity in the central nervous *Envir Health Persp.* **75**:59-64
- Clarkson T. W., Sager P. R., and Syversen T. L. M. (Eds.) The cytoskeleton : A target for Toxic Agents Plenum, New York, pp. 1-254, 1986.
- Coccini T., Mango L., Costa L. G. (1991). [³H]-spiroperidol labels sigma receptors not dopamine D₂ receptors, in rat and human lymphocytes. *Immunopharmacol.* **22**:93-106
- Cooper, J. R., Bloom, F. E., and Roth, R. H. Acetylcholine, In the Biochemical Basis of Neuropharmacology (Cooper J.R., Bloom F. E., and Roth R. H., eds.), Seventh ed., Oxford University Press, New York, pp. 194- 225, 1996.
- Cooper J. R., Bloom F. E., and Roth R. H. Norepinephrine and Epinephrine. In *Biochemical Basis of Neuropharmacology, Seventh edition*, Oxford University Press, New York, pp. 226-292, 1996.
- Costa L. G., Peripheral models for the study of occupational health. In: Foa V. Emmett EA., Maroni M., Colombi A., eds. Occupational and Environmental chemical hazards. Chichester, UK: Ellis Horwood Ltd., 1987; pp.524-528
- Costa L.G. Effect of Neurotoxicants on brain neurochemistry, In Neurotoxicology, ed. Tilson H., and Mitchell Clifford, Raven Press, N.Y, p.101-123, 1992,
- Costa, G. L., Kaylor G., and Murphy S. D.(1988). Muscarinic cholinergic binding sites on rat lymphocytes. *Immunopharmacol.* **16**: 139-149
- Costa LG, Kaylor G, Murphy SD. (1990). In vitro and in vivo modulation of cholinergic muscarinic receptors in rat lymphocytes and brain by cholinergic agents. *Int. J Immunopharmacol* **12**:67-75.
- Costa, G. L., and Manzo L. (1995). Biochemical markers of neurotoxicity : research strategies and epidemiological applications. *Toxicol. Lett.* **77**:137-144
- Costa, J.L., et al., (1974). Serotonin storage in platelets: Estimation of storage-packet size. *Science* **183**:537-538
- Costa, J.L., et al., (1977). Quantitative evaluation of loss of human platelet dense bodies following stimulation by thrombin or A23187. *J. Physiol.* **264**:297-306
- Costa, J.L., et al., (1977). Effects of reserpine and imipramine on vesicular serotonin uptake and storage in intact human platelets. *Life Sc.* **21**:181-188

- Costa, J.L., et al., (1978). Maximal packet size for serotonin in storage vesicles of intact human platelets. *Life Sci.* **23**:2193- 2197
- Costa, J. L., et al., (1979). Electron probe microanalysis of changes in dense body phosphorus and calcium content following alterations in platelet serotonin levels. *Biochem. Pharmacol.* **28**:23-26
- Corda M. G., Concas A., Rossetti Z., Guarneri F. P., Corongiu and Biggio G. 1981. Methylmercury enhances [³H]diazepam binding in different areas of the rat brain. *Brain Res.* **229**:264-269
- Counter S. A., Buchanan L. H., Laurell G., and Ortega F. (1998). Blood mercury and auditory neuro-sensory responses in children and adult in the Nambija gold mining areas of Ecuador. *Neurotoxicology* **19**(2):185-196
- Cranmer M., Gilbert S., and Cranmer Joan. (1996). Neurotoxicity of mercury - indicators and effects of low-level exposure: Review. *Neurotoxicology* **17**(1):9-14.
- Da Prada M., Cesura A. M., Launay J. M., and Richards J. G. (1988). Platelets as a model for neurones ? *Experientia* **44**:115-126
- Dales, L. G. (1972). The neurotoxicity of alkyl mercury compounds. *Amer. J. Med.* **53**:219-232
- Day J, Damsma G, and Fibiger HC. (1991). Cholinergic activity in the rat hippocampus, cortex and striatum correlates with locomotor activity: an vivo microdialys study. *Pharmacol Biochem Behav.* **38**:723-729
- Day J, and Fibiger HC. (1993). Dopaminergic regulation of cortical ACh release: effects of dopamine receptors agonist. *Neuroscience.* **54**:643-648
- Denny M. F., and Atchison W. D. (1996). Mercurial induced alterations in neuronal divalent cation homeostasis. *Neurotoxicology* **17**(1):47-62
- Diamond S. S., and Sleight S. D. (1972). Acute and subchronic methylmercury toxicosis in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **23**:197-207
- D'Itri, F. M. (1991). Mercury contamination. What we have learned since Minamata. *Environ. Monitor. Assess.* **19**:165-182
- Dodd P. R., Hardy J. A., Oakley A. E., Edwardson J. A., Perry E. K., Deaunoy J. P. (1981). A rapid method for preparing Synaptosomes: comparison, with alternative procedures. *Brain Res.* **226**:107-118.
- Doi R. Individual difference of methylmercury metabolism in animals and its significance in methylmercury toxicity. In *Advances in Mercury Toxicology*, ed. T. Suzuki et al., Plenum Press, New York, pp-77-98, 1991

- Dolbec J., Mergler D., Sousa Passos C.-J., Sousa de Morais S., and Lebel J. (2000). Methylmercury exposure affects motor performance of a riverine population of the Tapajós river, Brazilian Amazon. *Int. Arch Occup Environ Health* 73 :195-203
- Donaldson, J., and Labella, F. S. (1984). The effects of manganese on the cholinergic receptor *in vitro* and *in vivo* may be mediated through modulation of free radicals. *Neurotoxicology* 5(1):105-112
- Donneley, C. H., and Murphy D.L. (1977). Substrate and inhibitor-related characteristics of human platelet monoamine oxidase. *Biochem. Pharmacol.* 26:853-858
- Duhr E., Pendergrass C., Kasarskis E., Slevin J., Haley B. (1991). Hg²⁺ induces GTP-tubulin interactions in rat brain similar to those observed in Alzheimer's disease. *FASEB J* 5:A456
- Duhr E., Pendergrass C., Kasarskis E., Slevin J., Haley B. (1993). HgEDTA complex inhibits GTP interactions with the E-site of brain β -tubulin. *Toxicol Appl. Pharmacol* 122:273-280
- Durham, H. D., Minotti, S., Capriccio, E., Chakrabarti, S. K., and Panisset, J. C. (1996). Sensitivity of platelet microtubules to disassembly by methylmercury. *J. Toxicol Environ. Health.* 48:57-69
- Dweveli C, Raghunathan R, Joshi BC, Foster HW. (1980). Effect of mercury compounds on ChAT. *Res Comm Chem Pathol Pharmacol.* 30(2):381-384
- Eckernas, S.A. (1977). Plasma choline and cholinergic mechanisms in the brain. Methods function and role in Huntington's chorea. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 449:4-62
- Eldefrawi, M. E., Mansour, N. A., and Eldefrawi, A. T. (1977). Interaction of acetylcholine receptors with organic mercury compounds. *Adv. Exp. Med. Biol.* 84:449-463
- Elliot, J.M., and Kent, A. (1989). Comparison of [¹²⁵I]Iodolysergic Acid Diethylamine Binding in Human Frontal Cortex and Platelet Tissue. *J. Neurochem.* 53:191-196
- Endo T., Nakaya S., Kimura R. (1989). Factors involved in absorption of organic mercuric compounds from rat small intestine: Comparative study with mercuric chloride *in situ*. *Pharmacol. Toxicol* 65(2):128-135
- Etoh K. (1971). Pathological changes of peripheral nerves in human Minamata disease : An electron microscopic observation. *Advan. Neurol. Sci.* 15:606-618
- Eva, C., Rocca, P., Perrero P., Bergamansco B., Ravizza L., and Genazzani, E. (1988). 3H-N-Methylscopolamine binding to human lymphocytes. A model to study cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease. *Pharmacol. Res Commun.* 20 (suppl. 1):69-70
- Evans H. L., Garman R. H., and Weiss B. (1977). Methylmercury : Exposure duration and regional distribution as determinants of neurotoxicity in nonhuman primates. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 41:15-33

- Fang S. C. (1980). Comparative study of uptake and tissue distribution of methylmercury in female rats by inhalation and oral routes of administration. *Bull Environ Contam. Toxicol.* **24**:65-72
- Falconer MM., Vaillant A., Reuhl K R., Laferriere N., Brown D. L. (1994). The molecular basis of microtubule stability in neurons. *Neurotoxicology* **15**:109-122
- Farkas T., Korodi K., Toldi J. (1996). Muscarinic cholinergic effects on stimulus-evoked responses in rat primary somatosensory cortex. An electrophysiological study. *Acta Biologica Hungarica* **47(1-4)**:113-118
- Faraj B. A., Olkowski Z. L., Jackson R. T. (1994). Binding of [3H]-dopamine to human lymphocytes: Possible relationship to neurotransmitters uptake sites. *Pharmacology* **48**:320-327
- Faro L. R., Duran R., do Nascimento J. L., Alfonso M., and Picanco-Diniz C. W. (1998). Effects of methylmercury in vivo release of dopamine and its acidic metabolites DOPAC and HVA from striatum of rats. *Ecotoxicol & Environ. Safety* **38(2)**:95-98
- Faro L. R., do Nascimento J. L., Alfonso M., and Duran R. (1997). Acute administration of methylmercury changes in vivo dopamine release from rat striatum. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **60(4)**:632-638
- Fartacek R., Geretsegger C., Breitfuss A., Ackenheil M., and Bondy B. (1997). Elevated lymphocytes spiperone binding: a vulnerability factor for affective psychosis? *Biol. Psychiatry* **41(1)**:107-110
- Farooqui A. A., et Horrocks L. A. (1998). Excitotoxicity and neurological disorders: Involvement of membrane phospholipids. *Internat. Rev Neurobiol.* **36**:267-323
- Fehling, C., Abdulla M., Brun A., Dictor M., Schütz A., and Skerfving S. (1975). Methylmercury poisoning in rat: A combined neurological, chemical, and histopathological study. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **33**:27-37
- Feng Q., Suzuki Y., and Hisashige. (1998). Hair mercury levels of residents in China, Indonesia and Japan. *Arch. Envir. Health.* **53**:36-443
- Fitzgerald, W. F. (1995). Is mercury increasing in the atmosphere: The need for an atmospheric mercury network (AMNET). *Water Air Soil Pollut.* **80**:245-254
- Fitzgerald, B. B., and Costa, L. G. (1993). Modulation of Muscarinic receptors and Acetylcholinesterase Activity in Lymphocytes and in Brain Areas Following repeated organophosphate Exposure in Rats. *Fund Appl Toxicol.* **20**:210-216
- Flament, M.F., Rapoport J. L., Murphy D. L., Berg C. J., and Lake C. R. (1987). Biochemical changes during clomipramine treatment of childhood obsessive-compulsive disorder. *Arch. Gen. Psychiatry* **44**:219-225

- Fox, J. E. B. (1975). Regulation of platelet function by the cytoskeleton. *Adv. Exp. Med. Biol.* **344**:175-185
- Fox J. H., Patel-Mandlik K., and Cohen M. M. (1975). Comparative effects of organic and inorganic mercury on brain slice respiration and metabolite. *J. Neurochem.* **24**:757-762
- Francis A., Rivett J., Roth J. A. (1983). Activity of neuronal-specific enolase in normal and lesioned rat brain. *Brain Res.* **263**:89-95
- Freedman, J. J., Maci, J. R., Choi, R., G., and Jenden, D., J. (1979). Studies on the behavioral and biochemical effects of hemicholinium in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **210**:91-97
- Friberg L., Mottet N. K. (1989). Accumulation of methylmercury and inorganic mercury in the brain. In First International Meeting on Molecular Mechanisms of Metal Toxicity and Carcinogenicity, Urbino, Italy, September 19-22, 1988.
- Fukuhara N. (1969). Ultrastructural changes in the cerebellar granular cell layers of experimental organic mercury poisoning in rats. *Clin. Neurol.* **9**:187-198
- Gaetano G. (1978). Blood platelets as a pharmacological model of synaptosomes, In; Platelets: A multidisciplinary approach, pp.373-384, ed. Gaetano and Garatini S., Ed. Raven Press, N.Y.
- Galkina O. V., and Podgornaya E. K. (1992). Regional brain patterns of dopamine, metabolites and D₂ receptors in memory. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **54(2)**:453-460
- Gelfand, V. I., Bershadsky, A. D. (1991). Microtubule dynamics: mechanism, regulation and function. *Ann. Rev. Biol* **7**:93-116
- Gerstner H. B., and Huff J. E. (1977). Clinical Toxicology of mercury. *J. Toxicol. Environ Health* **2**:491-526
- Giros B., Caron M. G. (1993). Molecular characterization of the dopamine transporter. *Trends Pharmac. Sci.* **14**:43-49
- Goodnick P. J., Henry J., and Kumar A. M. (1995). Neurochemistry and paroxetine in major depression. *Biol. Psychiat.* **37**:417-419
- Gordon J.L., H.J. Olverman H. J., and Drummond A. H. Interaction of platelets with biogenic amines, In Platelets: A multidisciplinary approach, , ed. Gaetano and Garatini S., Ed. Raven Press, N.Y. pp.361-371, 1978.
- Grandjean P., and Weihe P. (1998). Editorial: A new era of mercury hazards. *Environ. Res.* **77**:67

- Grandjean P., White R. F., Nielsen A., Cleary D., and de Oliveira S. E. C. (1999). Methylmercury neurotoxicity in Amazonian children downstream from gold mining. *Environ Health Persp.* **107**(7):587-597
- Grandjean P., Weihe P., White R. F., Debes F., Araki S., Yokohama K., Murata K., Sorensen N., Dhal R., and Jorgensen P. J. (1997). Cognitive deficit in 7 year old children with prenatal exposure to methyl mercury. *Neurotoxicol. Teratol.* **19**(6):417-428
- Grandjean P., Weihe P., White R. F., and Debes F. (1998). Cognitive performance of children prenatally exposed Safe levels of methylmercury. *Environ. Res.* **77**:165-172
- Greenwood M., Clarkson T. W., Doherty R. A., Gates A. H., Amin Zaki L., and Majeed M. A. 1978. Blood clearance half times in lactating and nonlactating members of a population exposed to methylmercury. *Environ. Res.* **16**:48-54
- Grodzicki J., Pardo M., Schived G., Schlosberg A., Fuchs S., Kanety H. 1990. ³H-spiperone binding to peripheral blood lymphocytes from neuroleptic responsive and nonresponsive schizophrenics. *Biol. Psychiatry* **27**:1327-1330
- Gruenwedel, D.W., and Friend, D. (1980). Long term effect of methylmercury (II) on the viability of HeLa S3 cells. *Bull Envir Contam Toxicol* **25**:441-447
- Guyton A. C. Cortex cérébral et fonction supérieures du cerveau du cerveau. Dans, Anatomie et Physiologie humaine du système nerveux ed. Décarie, Montréal pp-251-265, 1989.
- Hagan, J. J., Alpert, J. E., Morris, R. G. M., and Iversen S. D. (1983). The effect of catecholaminergic depletion on the spatial learning in rats. *Brain Res*, **9**:83-104
- Hagan, J. J., Jansen, J. H. M., and Broekkamp, C. L. E. 1989. Hemicholinium-3 impairs spatial learning and the deficit is reversed by cholinomimetics, *Psychopharmacology*. **98**:347-356
- Hall H. Dopamine Receptors: Radioligands for pharmacological and biochemical characterization. In: Dopamine receptors and Transporters: Pharmacology, structure, and function. Hyman B. Niznik. ed. Marcel Dekker, Inc. New York pp. 3-35, 1994
- Harada M. (1995). Minamata disease : Methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Critic. Rev. Toxicol.* **25**:1-24
- Harada M., Nakanishi J., Konuma S., Ohno, K., Kimura T., Yamaguchi H., Tsuruta K., Kizaki T., Ookawara and Ohno H. (1998). The present mercury contents of Scalp hair and clinical symptoms in inhabitants of the Minamata areas. *Environ Res.* **77**:160-164.
- Hawiger, J. (1992). Repertoire of platelet receptors. *Methods in Enzymology*, **215**:131-136

- Heninger G. R. Indoleamines: The role of serotonin in clinical disorders. In *Psychopharmacology: The Fourth generation of progress*, eds. Floyd E. Bloom and David J. Kupfer, Raven Press. New York. pp 471-482, 1995
- Herken H., and Hocho F., Selective Neurotoxicity, *Handbook of Experimental Pharmacology*; Vol. 102. Springer-Verlag, New York, 1994.
- Herman S. P., Klein R., Talley F. A., and Krigman, M. R. (1973). An ultrastructural study of methylmercury induced primary sensory neuropathy in the rat. *Lab. Invest.* **28**:105-118
- Hiemke, C., Stolp, M., Reuss, S., Wevers, A., Reinhardt, S., Maelicke, A., Schlegel, S., and Schroder, H. (1996). Expression of alpha subunit genes of nicotinic of acetylcholine receptors in human lymphocytes. *Neurosci. Lett.* **214(2-3)**:171-174
- Hietala J., et al. (1994). Striatal dopamine receptor binding characteristics in vivo in patients with alcohol dependence. *Psychopharmacology.* **116**:285-290
- Hirayama, K. (1980). Effects of amino acids on brain uptake of methylmercury, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **55**:318-323;
- Hirayama, K., (1985). Effects of combined administration of thiol compounds and methylmercury chloride on mercury distribution in rat. *Biochem. Pharmacol.* **34**:2032-2034
- Hojberg S., Nielsen J. B., Andersen O. Effects of dietary factors on Methyl mercury Toxicokinetics In: *Metal compounds in environmental and life, 4; interrelation between chemistry and biology*, Eds. Merian E., and Haerdi Werner, ed. Science Reviews INC. Wilmington, USA pp 349-355, 1992.
- Hoover, D.B., et al., (1978). A mapping of the distribution of acetylcholine, choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in discrete areas of rat brain. *Brain Res.* **153**:295-306
- Hoskins, Betty B., and Hupp, E. W. (1978). MeHg effects in Rat, Hamster, and Squired Monkey: Lethality, Symptoms, Brain Mercury, and Amino Acids. *Env Res.* **15**:5-19
- Hosli, E., and Hosli, L. (1974). The effects of methylmercury on morphological and histochemical properties of human and rat spinal cord and cerebellum in tissue culture. *Experientia* **30**:1300-1304
- Hornberger W. and Patscheke H. (1989). Hydrogen peroxide and methylmercury are primary stimuli of eicosanoid release in human platelets. *J. Clin. Chem. Biochem.* **27**:567-575
- Hrdina, P. D. (1974). Metabolism of brain acetylcholine and its modification by drugs. *Drug metal Rev.* **3**:89-129

- Hrdina, P. D., Peters, D. A. V., and Singhal, R. L. (1976). Effects of chronic exposure of cadmium, lead and mercury on brain biogenic amines in the rat. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **15**:483-493
- Hughes, W.H. (1957). A physiochemical rationale for the biological activity of mercury and its compounds. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **65**:454-460
- Hulka B. S., Wilcosky T. (1993). Biological markers in epidemiologic research *Arch Environ Health.* **4392**:83-89
- Hunter D, Bomford R. R., and Russel D. S. (1940). Poisoning by methylmercury compounds. *Quart J. Med* **9**:193
- Hunter D., and Russel D. S. (1954). Focal cerebral and cerebral atrophy in a human subject due to organic mercury compounds. *J. Neurosurg. Psychiatry* **17**:235-241
- Imura, M. Miura, K., Inokawa, M., Nakada, S. (1980). Mechanism of methylmercury cytotoxicity: biochemical and morphological experiments using cultured cells. *Toxicology* **17**:241-254
- Inskip, M., and Piotrowski, J. (1985). Review of health effects of methylmercury. *Toxicol Appl. Pharmacol.* **5**:113-133
- Ishida Y., Ichimura, T., Sumi H., Horigome T., Omata S. (1997). Methylmercury alters the tyrosination statute of tubulin in the brains of acutely intoxicated rats. *Toxicology* **122**:171-181.
- Iverson, F, Downie, R. H., Trenholm, H. L., and Paul, C. (1974). Accumulation and Tissue Distribution of Mercury in the Guinea Pig during subacute administration of MeHg. *Toxicol Appl Pharmacol.* **27**:60-69
- Jaarsama, D., Ruigrok T. J., Caffè R., Cozzari C., Levey A. I., Mugnaini E., Voogd J. (1997). Cholinergic innervation and receptors in the cerebellum. *Progr. Brain Res.* **114**:67-96
- Jacobs J. M. Vascular permeability and neural injury, In: Spencer P. S., Schaumburg H. H., (eds.), *Experimental and clinical neurotoxicology*, vol. 1 William & Wilkins, Baltimore, pp 102-117, 1980.
- Jacob J. M., Carmichael, N., and Cavanagh J. B. (1975). Ultrastructural changes in the dorsal root and trigeminal ganglia of rats poisoned with methylmercury. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **1**:1-19
- Jacobson, M. S., Chang, T., and Okita, G. T. (1972). In vitro inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase by MeHg. *Fedn Proc.* **31**:561
- Johnson, K. J., Hall, E. S., and Boekelhide, K. (1991). 2,5-hexanedione exposure alters the rat Sertoli cell cytoskeleton. I. Microtubules and seminiferous tubule fluid secretion. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **111**:432-442

- Juang, M. (1976). Electrophysiological study of the action of methylmercury chloride on the sciatic nerve sartorius muscle preparation of frog. *Toxicol Appl. Pharmacol.* **37**:339-348
- Juang, M., and Yonemura, K. (1975). Increased spontaneous transmitters release from presynaptic nerve terminal by methylmercury chloride. *Nature (London)*, **256**:211-213
- Kageyama K., Onoyama Y., and Kano E. (1986). Effects of methyl mercuric chloride and the sulfhydryl inhibitors on phospholipid synthetic activity of lymphocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **6(1)**:49-53
- Kalisch B. E., and Racz W. I. (1996). The effects of methylmercury on endogenous dopamine efflux from mouse striatal slices. *Toxicol Lett* **89(1)**:43-49
- Kanedia, N., Nagatsu, T. (1985). Highly sensitive assay for ChAT activity by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr* **341**: 23-30
- Kauppinen R. A., Komulainen H., and Taipale, H. (1989). Cellular mechanisms underlying the increase in cytosolic free calcium concentration induced by methylmercury in cerebrocortical synaptosomes from guinea pig. *J. Pharmacol Exp. Ther.* **248**:1248-1254
- Kehrig, H. A., Malm, O., and Akagi, H. (1997). Methylmercury in hair sample from different riverin groups. Amazon, Brazil. *Water Air Soil Pollut.* **97**:17-29.
- Kennedy D. M., and Linck R. W. (1985). The cytoskeleton of unstimulated blood platelets: structure and composition of the isolated marginal microtubular band. *J. Cell Sci.* **78**:1-23
- Kerlavage, A. R., Fraser, C. M., Venter, J. C. (1987). Muscarinic cholinergic receptor structure: molecular biological support for subtypes. *Trends Pharmacol Sci* **81**:426.
- Kinoshita Y., Ohnishi A., Kohshik., and Yokota A. (1999). Apparent diffusion coefficient on rat brain and nerves intoxicated with methylmercury. *Environ. Res.* **80(4)**:348-354
- Klein R., Herman S. P., Brubaker P. E., Lucier G. W., Krigman M. R. (1972). A model of acute methylmercury intoxication in rats. *Ach. Pathol.* **93**:408-412
- Kobayashi, H., Yuyama, A., Matsusaka, N., Takeno, K., and Yanagiya, I. (1979). Effects of MeHg chloride on various cholinergic parameters in vitro. *J. Toxicol Sci.* **4**:351-362
- Kobayashi H., Yuyama A., Matsusaka N., Takeno K., and Yanagiya I. (1980). Effect of MeHg on brain ACh concentration and turnover in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **54**:1-8

- Kobayashi, H., Yuyama, A., Matsusaka, N., Takeno, K., Yanagiya, I. (1981). Neuropharmacological effect of MeHg in mice with special reference to the central cholinergic system. *Japan J Pharmacol.* **31**:711-718
- Kobayashi, H., Yuyama, A., Tokonabe, Y., and Matsusaka, N. (1982). Reversible effects of monothiol (D-Penicillamine) and Dithiol (Dimercaptosuccinic acid) chelating compounds on MeHg-inhibited ChAT activity and high affinity choline uptake. *Japan. J. Pharmacol.* **32**:655-663
- Koller, L. D., et al. (1977). Methylmercury: Effect on serum enzymes and humoral antibody, *J. Toxicol Envir Health* **2**:115-123
- Komulainen H. Neurotoxicity of methylmercury: Cellular and subcellular aspects, In Stephen C. Bondy and Kedar N. Prasad (eds.), Metal neurotoxicity. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 167- 182, 1988.
- Komulainen H., Anttonen P., Tuomisto J., and Tuomisto L. (1985). Effect of transition heavy metals on haloperidol binding in rat striatal membranes in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* **114**:113-119
- Komulainen H., and Bondy S. (1987). Increased free intrasynaptosomal Ca^{2+} by neurotoxic organometals: distinctive mechanisms. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **88**:77-86
- Komulainen, H., and Tuomisto J. (1982). Effects of heavy metals on monoamines uptake and release in brain synaptosomes and blood platelets. *Neurobiav. Toxicol. and Teratol.* **4**:647-649
- Komulainen, H., and Tuomisto, J. The neurochemical effects of MeHg, In: The toxicity of MeHg, Eccles C., Annau Z., eds., Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp 173-185, 1987
- Komulainen H., and Tuomisto J. (1985). 3H -Dopamine uptake and 3H -haloperidol binding in striatum after administration of methylmercury to rats. *Arch. Toxicol.* **57**:268-271
- Komulainen, H., and Tuomisto, J. (1981a). Interference of Methyl mercury with monoamine uptake and release in rat brain synaptosomes. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **48**:214- 222
- Komulainen, H., and Tuomisto, J. (1981b). Effects of heavy metals on dopamine, noradrenaline and serotonin uptake and release in rat brain synaptosomes. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **48**:199-204
- Kostka B., and Wachowicz B. (1983). Effects of mercurial compounds on adenine nucleotides of washed pig platelets. *Environ. Res* **30**:420-426
- Kosatsky T., and Foran P. (1996). Do historic studies of fish consumers support the widely accepted LOEL for methylmercury in adults. *Neurotoxicology* **17**(1):177-186
- Kozik M. B., and Wigowska-Sowinska J. (1978). Cerebral damage in the course of mercury phenylacetate. *Exp. Pathol.* **16**:267-275

- Krigman M. R. (1978). Neuropathology of heavy metal intoxication. *Environ. Health Perspec* **26**:117-120
- Kromidas L., Trombetta L. D., and Jamal I. S. (1990). The protective effects of glutathion against methylmercury cytotoxicity. *Toxicol Lett* **51**:67-80
- Kruman, L., Bruce-Keller, A. J., Bredescen, D. E., Waeg, G., and Mattson, M. P. (1997). *J. Neurosci.* **17** :5089-5100
- Kumamoto T., et al., (1986). Experimental neuropathy induced by methylmercury compounds: autoradiographic study of GABA uptake by dorsal root ganglia. *Eur. Neurol.* **25**:269-277
- Kumar A. M., Kumar M., Sevush S., Ruiz J., Eidorfer C. (1995). Serotonin uptake and its kinetics in platelets of women with Alzheimer's disease. *Psychiat. Res.* **59**:145-150
- Kumar A. M., Sevush S., Kumar M., Ruiz J., Eidorfer C. (1995). Peripheral serotonin in Alzheimer's disease. *Neuropsychobiology* **32**:9-12
- Kung M. P., Kostyniak P. J., Olson J. R., Sansone F. M., Nickerson P. A., Malone M. A., Ziembiec N., Roth J. A. (1989). Cell specific enzyme markers as indicators of neurotoxicity: Effects of acute exposure to methylmercury. *Neurotoxicology* **10**:41-52.
- Kung, M. P., Kostyniak, P., Malone, M., and Roth J. A. (1987). Studies of the *in vitro* effect of methylmercury chloride on rat brain neurotransmitters enzymes *J. Appl. Toxicol.* **7**(2):119-121
- Kuriyama R., and Sakai H. (1974). Role of tubulin-SH groups in polymerization to microtubules. *J. Biochem* **76**:651-654
- Kutsuna, M. Minamata diseases: Study groups of Minamata diseases. Japan: Kumamoto University, pp. 1-4.1968
- Lam H. R., Tarding, F., Stockholm J., Gyatelberg F. (1985). Human platelets 5-hydroxytryptamine concentration as a tool in the prediction of solvent induced neurotoxic effects. *Act. Pharmacol. Toxicol.* **56**:233-238
- Langer S.Z., et al., (1980). Specific [³H]imipramine binding in human platelets. *Arch. Pharmacol.* **313**:189-194
- Lapadula D. M., and Abou-Donia M. B. Cytoskeletal proteins, In; Neurotoxicology, Abou-Donia M. B., ed., CRP Press, Boca Raton pp: 45-59, 1992.
- Lapierre Y, Beudet A, Demianczuk N, et al., (1973). Noradrenergic axon terminals in the cerebral cortex of rat. II: Quantitative data related by light and electron microscopic radioautography of the frontal cortex. *Brain Res.* **63**:175-

- Le Fur G., Meininger V., Phan T., Gérard A., Baulac M., and Uzan A. (1980b). Decrease in lymphocytes [³H]spiroperidol binding sites in parkinsonism. *Life Sciences*. **27**:1587-1591
- Le Fur G., Phan T., and Uzan A. (1980). Identification of stereospecific [³H]spiroperidol binding sites in mammalian lymphocytes. *Life Sciences*. **26**:1139-1148
- Lebel, C. P., Ali, S. F., MCKee, M., and Bondy, C. S. (1990). Organometal-induced increases in oxygen radical activity: The potential of 2', 7' dichlorofluorescein diacetate as an index of neurotoxic damage. *Toxicol Appl. Pharmacol.* **104**:17-24.
- Lebel J., Mergler D., Lucotte M., Amorim M., Dolbec J., Miranda D., Arantès G., Rheault I., Pichet P. (1996). Evidence of early nervous system dysfunction in Amazonian populations exposed to low-levels of methylmercury. *Neurotoxicology*. **17**:157-168
- Lebel J., Mergler D., Branches F., Lucotte M., Amorim M., Laribe F., Dolbec J. (1998). Neurotoxic effects of low-level methylmercury contamination in the Amazonia basin. *Environ. Res.* **79**:20-32
- Lechardeur D., Castel M. N., Reibaud M., Scherman D., Laduron P. M. (1993). Axonal transport of dopamine-containing vesicles labelled in vitro with [³H]reserpine. *Eur J Neurosci.* **5(5)**:449-453
- Lee, C. H., Liu S. H., Lin-Shiau S. Y. (1997). Distinct genotoxicity of phenylmercury acetate in human lymphocytes as compared with other mercury compounds. *Mutation Res.* **392(3)**:269-276
- Lesch, K. P., Wolozin, D. L., Murphy, D. L., and Riedeter, P. (1993). Primary structure of the human platelet serotonin uptake site: identity with the brain serotonin transporter. *J. Neurochem.* **60**:2319-2322
- Levesque P. C, and Atchison W. D. (1988). Effects of alteration of nerve terminal Ca²⁺ regulation on increased spontaneous quantal release of acetylcholine by methylmercury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **94**:55-65
- Levesque P. C, and Atchison W. D. (1991). Disruption of brain mitochondrial calcium sequestration by methylmercury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **256**:236-242
- Levesque, P. C., Hare, M. F., and Atchison, W. D. (1992). Inhibition of Mitochondrial Ca²⁺ release diminishes the effectiveness of methylmercury to release ACh from synaptosomes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **115**:11-20
- Leyshon K, and Morgan A. J. (1991). An integrated study of the morphological and gross-elemental consequences of methylmercury intoxication in rats, with particular attention on the cerebellum. *Scanning Microscopy*, **5(3)**:895-904
- Lim S. S., Sammak, P. J., Brisj, G. G. (1989). Progressive and spatially differentiated stability of microtubules in developing neuronal cells. *J. Cell Biol.* **109**:253-263

- Lindberg, S. P., Strokes P., Goldberg E., and Wren C. Group report: Mercury. In Lead, mercury, cadmium and Arsenic in the Environment, eds. T. W. Hutchinson, and K. M. Meena, New York, Wiley. pp. 17-34, 1987.
- Lindström, H., Luthman, J., Oskarsson, A., Sundberg J., and Olson L. (1991). Effects of long-term treatment with methyl mercury on the developing rat brain. *Envir. Res.* **56**:158-169
- Lipfer F., Moskowitz P., Fthenakis V., Dephillips M, Viren J. Saroff L. (1995). An assessment of adult risks of paresthesia due to mercury from coal combustion. *Water, Air and Soil Pollution* **80**:1139-1148
- Little, J. R., Brecher, G., Bradley, T. F., Rose, S. (1962). Determination of lymphocytes turnover by continuous infusion of ³H-thymidine. *Blood* **19**:236
- Lommel A., Kruse H., Müller E., and Wassermann O. (1992). Organochlorine pesticides, octachlorostyrene, and mercury in blood of Elb River residents, Germany. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **22**:14-20
- Loua K. M., Chakrabarti K. S., Heather D., and Panisset J. C. (1997). Effects of methylmercury on the uptake of dopamine, choline and serotonin by and the binding to receptors in rat brain synaptosomes, lymphocytes and platelets. *Fund Appl Toxicol. Suppl.* **36** (1) Part 2:68 (351)
- Loua K. M., Chakrabarti S., and Bai C. (1998). Effects of antioxidants and inhibitor of protein synthesis on the development of ataxia due to methylmercury intoxication. *Res. Comm. Pharmacol. And Toxicol* **3**(1&2) 23-34.
- Luebke JI, Greene RW, Semba K, Kamondi A, McCartney RW, Reiner PB. (1992). Serotonin hyperpolarizes cholinergic low threshold burst neurons in the rat laterodorsal tegmental nucleus in vitro. *Proc Natl Acad. Sci USA.* **89**:743-747
- MacDonald, J. S., and Harbison, R. D. (1977). Methylmercury induced encephalopathy in mice. *Toxicol Appl. Pharmacol* **39**:195-205
- Macfarlane, D. E. (1980). Induction of aggregation and release via activation of the prostaglandin synthesis pathway. *Mol. Pharmacol.* **19**:470-476
- Mahaffey K. R., and Mergler D. (1998) Blood levels of total and organic mercury in residents of the upper St Lawrence River Basin, Quebec: Association with age, gender, and fish consumption. *Environ. Res.* **77**:104-114
- Magos L. (1998). Three cases of MeHg intoxication which eluded correct diagnosis. *Arch Toxicol* **72**:701-705
- Magos L., et al., (1979). Complex formation between Se and MeHg *Chem. Biol. Interact.* **28**:359-362

- Magos, L., and Butler W. H. (1976). The kinetics of methylmercury administered repeatedly to rats. *Arch Toxicol* **35**:25-39
- Magos, L., Peristianis G. C., and Snowden, R. T. (1978). Postexposure preventive treatment of methylmercury intoxication in rats with dimercaptosuccinic acid. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **45**:463-475
- Manzo L., Artgas F., Martinez E., Mutti A., Bergamaschi E., Nicotera P., Tonini M., Candura S. M., Ray D. E., and Costa L. (1996). Biochemical markers of neurotoxicity. A review of mechanistic studies and applications. *Human Exp. Toxicol.* **15**, Suppl (1):S20-S35
- Mark, r. J., Henseley, K., Butterfield, D. A., and Mattson, M. P. (1995). *J. Neurosci.* **15** :6239-6249
- Martin F., and Artigas F. (1985). Simultaneous effects of p-chloroamphetamine, d-fenfluramine, and reserpine on free and stored 5-hydroxytryptamine in brain and blood. *J. Neurochem.* **59**:1138-1148
- Mash DC., Flynn DD., and Potter L. T. (1985). Loss of M₂ receptors in cerebral cortex in Alzheimer's disease and experimental cholinergic denervation. *Science* **228**:1115-1117
- Masuyama, K., Uno, K., Minoda, R., Eura, M., Samejina, Y., and Ishikawa, T. (1996). Muscarinic Acetylcholine receptors on human lymphocytes in patients with Meniere's disease. *Acta Oto-Laryngologica.* **116**(3):369-373
- Mattson, M. P. (1998). Free radicals, calcium, and the synaptic plasticity-cell death continuum; emerging roles of the transcription factor NFκB. *Internat. Rev Neurobiol.* **42**:103-168
- Mcbride, P.A., et al., (1983). Characterisation of serotonin binding sites on human platelets. *Life Sci.* **33**:2033-2041
- McCarthy J. F. and Shugart L. R. Biological markers of environmental contamination. In *Biological markers of environmental contamination*, J. F. McCarthy, and Shugart L. R eds. Lewis Publishers, pp: 3-14, 1990
- Mcdonald B. E, Costa L. G, Murphy S. D. (1988). Spatial memory impairment and central muscarinic receptor loss following prolonged treatment with organophosphates. *Toxicol Lett.* **40**:47-56
- McNamara R. K., and Skelton R. W. (1993). The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in Morris Water Maze. *Brain Res. Rev.* **18**:33-49
- Mehra M, and Kanwar K. (1980). Absorption, distribution, and excretion of methylmercury in mice. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **24**:627-633

- Mellerup et al., (1983). High affinity binding of [³H]imipramine to human platelet membranes. *Eur. J. Pharmacol.* **96**:303-309
- Meltzer, H. Y., Arora, R. C. Platelets serotonin studies in affective disorder: evidence for a serotonergic abnormality. In: Sandler M., Coppen A., Harnett S, eds. 5-Hydroxytryptophane in psychiatry: a spectrum of ideas. New York: oxford University Press, pp. 50-89, 1991,
- Mesulam M-M. Structure and Function of Cholinergic Pathways in the Central Cortex, Limbic System, Basal Ganglion, and Thalamus of the Human Brain. In *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*, eds. Floyd E Bloom and David J. Kupfer. Raven Press, Ltd, new York, pp 135-146, 1995.
- Mihovilovic M., Denning S., Mai Y., Whichard L. P., Patel D. D., and Roses A. D. (1997). Thymocytes and cultured thymic epithelial cells express transcripts encoding alpha-3, alpha-5 and beta-4 subunits of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: preferential transcription of the alpha-3 and beta-4 genes by immature CD4+ 8+ thymocytes. *J. Neuroimmunology.* **79(2)**:176-184
- Miller, R. J., Murphy, S. N., and Glaum, S. R. (1989). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **568** :149-158
- Minnema D., and Cooper G. Assessment of the effects of lead and mercury in vitro on neurotransmitters release, in: *biological Effects of Heavy metals*, Volume 1, Floulkes, E, ed., CRC Press, Boca Raton, Fl., pp. 19-57, 1990.
- Minnema D., Cooper P. G., and Greenland D. R. (1989). Effects of MeHg on neurotransmitter release from rat brain synaptosomes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **99**: 510-521.
- Miskimmin, B. M. (1991). Effects of natural levels of dissolved organic carbon (DOC) on methylmercury formation and sediment water partitioning. *Bull Environ Contam. Toxicol.* **47(5)**:43-750
- Miskimmin, B. M., Rudd J W M., Kelly C. A. (1992). Influence of dissolved organic carbon, pH, and microbial respiration rates on mercury methylation and demethylation in lake water. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* **49(1)**:17-22
- Miura, K. (1998) Neurotoxic mechanism of methylmercury. *Jap. J. Toxicol & Environ. Health.* **446(6)**:393-412
- Miura, K., and Imura, N. (1987). Mechanism of methylmercury induced neurotoxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* **18**:161-188
- Miura, K., and Imura, N. Microtubules, as susceptible target of methylmercury cytotoxicity. In *Advances in Mercury Toxicology* (T. Suzuki, N. Imura, and T. W. Clarkson, Eds.), Plenum Press, New York, pp. 241-254, 1991
- Miura, K., Inokawa, M., and Imura, N. (1984). Effects of methylmercury and some metal ions on microtubules networks in mouse glioma cells and in vitro tubulin polymerisation. *Toxicol Appl. Pharmacol.* **73**:218-231

- Molinengo L., Orsetti M., Ghi P. (1997). Behavioral and neurochemical effects of a chronic choline-deficient diet in the rat. *Behav. Brain Res.* **84(1-2)**:145-150
- Möller-Madsen B. (1994). Localisation of Mercury in CNS of rat: An Autometallographic Study. *Pharmacology & Toxicology* **75 (Suppl. 1)**:1- 41.
- Moller-Madsen B., and Danscher G. (1991). Localisation of mercury in CNS of the rat. IV. Effect of selenium on orally administered organic and inorganic mercury *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **108**:457-473
- Mottet N. K., Vahter M. E., Charleston J. S., and Friberg L. T. (1997). Metabolism of methylmercury in the brain and its toxicological significance. *Metal Ions in Biological Systems* **34**:371-403
- Murphy D.L. (1990). Peripheral indice of central serotonin function in Humans, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **600**:282-296
- Murray A. R. Alzheimer's Disease: treatment of non cognitive behavioral abnormalities. In *Psychopharmacology: The Third Generation of Progress*. Bloom, F. E.; Kupfer, D. J. eds. Raven Press, New York, pp. 1427-1435, 1995.
- Myers G. J. Davidson P. W., Shamlaye C. F., Axtell C. D., Cernichiari E., Choisy O., Choi A., Cox C., Clarkson T. W. (1997). Effects of prenatal methylmercury exposure from a high fish diet on developmental milestones in the Seychelles child development study. *Neurotoxicology* **18(3)**:819-830
- Naganuma, A., and Imura, N. (1979). Methylmercury binds to a low molecular weight substance in rabbit and human erythrocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **47**:613-616
- Naganuma A., Koyama Y., and Imura N. (1980). Behavior of methylmercury in mammalian erythrocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **54**:405-410
- Nakada S., Nomoto A., and Imura N. (1980). Effect of methylmercury and inorganic mercury of protein synthesis in mammalian cells. *Ecotoxicol Environ Saf.* **4**:184
- Nakamura, K., Sakamoto, M., Uchiama, H., and Yagi, O. (1990). Organomercurial-volatilizing bacteria in the mercury polluted sediment of Minamata Bay, Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:30-305
- Nakatsuru, S., Oohashi, J., Nozaki H., Nakada, S., and Imura, N. (1985). Effect of mercurials on lymphocytes functions in vitro. *Toxicology.* **36**:297-305
- National Academy of Sciences, An assessment of mercury in the environment, National Academy Sciences, Washington DC, 1978
- Nicklas, W., et al., (1979). Neuronal-glia contribution to transmitter amino acid metabolism: studies with Kainic acid induced lesions of rat striatum. *J. Neurochem.* **33**:839-844

- Nielsen, J. B. (1992). Toxicokinetics of mercuric chloride and methylmercury chloride in mice. *J. Toxicol. Environ. Health* **37**:85-122
- Nielsen J. B., Andersen O. (1991a). Methylmercuric chloride toxicokinetics in mice I: Effects of strain, sex, route of administration and dose. *Pharmacol. Toxicol.* **68**:201-207
- Nielsen J. B., Andersen O. (1991b). Methylmercuric chloride toxicokinetics in mice II: Sexual differences in whole-body retention and deposition in blood, hair, skin, muscle and fat. *Pharmacol. Toxicol.* **68**:208-211
- Nielsen J. B., and Andersen O. Time dependent disposition of mercury after oral dosage, In: Metal compounds in environmental and life4; Interrelation between chemistry and biology, Eds. Merian E., and Haerdi Werner, ed. Science Reviews INC. Wilmington, USA, pp, 341-348, 1992.
- Nielsen J. B., Andersen O., and Grandjean P. (1994). Evaluation of mercury in hair, blood and muscle as biomarkers for methylmercury exposure in male and female mice. *Arch. Toxicol.* **68**:317-321
- Nielsen, J. B., and Grandjean P. Mercury. In Environmental toxicants : Human exposures and their health effects, second ed. eds. M. Lippmann, New York, Wiley Interscience, pp. 563-575, 2000
- Ninomiya T., Ohmori H., Hashimoto K., Tsuruta K., and Ekino S. (1995). Expansion of methylmercury poisoning outside of Minamata: An epidemiological Study on chronic methylmercury poisoning outside of Minamata. *Env. Res* **70**:47-50
- Nordberg, A. (1977). Apparent regional turnover of acetylcholine in mouse brain. Methodological and functional aspects. *Acta Physiol Suppl.* **445**:3-51
- Nordberg, G., and Skerfving, S. Metabolism. In Mercury in the environment. An epidemiological and Toxicological Appraisal L. Friberg and J. Vostal, Eds.), CRC Press, Cleveland, Ohio, pp. 29-91, 1972.
- Norseth, T. and Clarkson, T. W. (1970). Studies on the biotransformation of ²⁰³Hg-labelled methylmercury chloride in rats. *Arch. Environ. Health.* **21**:717-727
- NRC. Environmental Neurotoxicology. Biologic Markers in Neurotoxicology, Chter 3, National Research Council, National Academy Press, Washington, DC. Pp, 43-52; 1992.
- Okabe M. and Takeuchi T. (1980). Distribution and fate of mercury in tissue of human organs in Minamata disease. *Neurotoxicology* **1**:607-624
- Okuda J, Tsuzuki Y, Yamada T. (1978). Some neurochemical changes in the brain of rats with acute intoxication of MeHg chloride. *Jap J Legal Med.* **32(2)**:51-58.

- O'Kusky J. (1983). Methylmercury poisoning of the developing nervous system: Morphological changes in neuronal mitochondria. *Acta Neuropath (Berl)*. **61**:116-122
- O'Kusky J. R., Boyes B. E., McGeer E. C. (1988). Methylmercury-induced movement and postnatal disorders in developing rat: regional analysis of brain catecholamines and indolamines. *Brain Res*. **439**:138-146
- Oldendorf W. H. (1970). Measurement of brain uptake of radiolabeled substances using a tritiated water internal standard. *Brain Res*. **24**:372-376
- Olsson Y. Protective Barriers in the peripheral nervous system to Neurotoxic agents, In: Herken H., and Hocho F., Selective Neurotoxicity, Handbook of Experimental Pharmacology; Springer-Verlag, New York, Vol. 102; pp, 29-65, 1994.
- Olszewski, W.A., et al. (1974). Mercury in human brain. *Acta Neurol. Scand*. **50**:581-588
- Olton D. S., and Markowska, A., L. (1994). Memory and Hippocampal Function as Targets for Neurotoxic Substances. *Neurotoxicology* **15**(3):439-444.
- Omata S., Hirakawa E., Daimon Y., Uchiyama M., Nakshita H., Horigome T., Sugano I., Sugano H. (1982). Methylmercury induced changes in the activities of neurotransmitter enzymes in nervous tissues of the rats. *Arch. Toxicol*. **51**:285-294
- Omata S., Horigome T., Momose Y., Kambayashi M., Moshizuki M., Sugano H. (1980a). Effect of MeHg chloride on the in vivo rate of protein synthesis in the brain of rat: Examination with the injection of a large quantity of (¹⁴C)valine. *Toxicol Appl Pharmacol* **56**:207-
- Omata S., Sakimura K., Tsubaki H., and Sugano H. (1978a). In vivo effect of methylmercury on protein synthesis in brain and liver of the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol* **44**:367-378
- Omata S., Sato M., Sakimura K., Sugano H. (1980b). Time-dependent accumulation of Inorganic mercury in the Subcellular fractions of kidney, liver and Brain of rats Exposed to Methylmercury. *Arch Toxicol*. **44**:231-241
- Omata S, Terui Y., Kasama H., Ichimura T. Alterations in gene expression due to methylmercury in central and peripheral nervous tissues of the rat. In *Advances in Mercury Toxicology*, T. Suzuki et al., eds. Plenum Press, New York, pp 223-240, 1991
- Omata, S., et al., (1978b). Chemical nature of a methylmercury complex with a low molecular weight in the liver cytosol of rats exposed to methylmercury chloride. *Biochem. Pharmacol*. **27**:333-335
- Ostrowitzki, M. L., Rao M. L., Rédei J., and Andres H. (1993). Concurrence of cortex and platelet serotonin₂ receptor binding characteristics in the putative regulation by serotonin. *J. Neur. Transm [GenSect]* **93**:27-35

- Ortega, H. G., Lopez M., Salvaggio J. E., Reimers R., Hsiao-Lin C., Bollinger J. E., W G. (1997). Lymphocytes proliferative response and tissue distribution of methylmercury sulfide and chloride in exposed rats. *J. Toxicol Environ. Health.* **50**:605-616
- Oudar P., Caillard L., and Fillion G. (1989). In vitro Effect of Organic and Inorganic Mercury on the Serotonergic System. *Pharmacology & Toxicology* **65**:245-248
- Paasonen, M.K., and Pletscher, A. (1959). Increase of free 5-hydroxytryptamine in blood plasma by reserpine and a benzoquinolizine derivate. *Experientia* **15**:477-479
- Palmer, A. M., Francis, P. T., Benton, J. S., Sims, N. R., Mann, D.M.A., Neary, D., Snowdown, J. S., and Bowen, D. M. (1987). Presynaptic serotonergic dysfunction in patients with Alzheimer disease. *J. Neurochem.* **48**:8-15
- Park S. T., Lim, K. T., Chung Y. T., and Kim, S. U. (1996). Methylmercury - induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor antagonists. *Neurotoxicology* **17**(1):37-46
- Pendergrass J. C., Haley B E., Vimy M. J., Winfield S. A., and Lorscheider F. L. (1997). Mercury vapor inhalation inhibits binding of GTP to tubulin in rat brain : Similarity to a molecular lesion in Alzheimer Diseased brain. *Neurotoxicology* **18**(2):315-324
- Pendergrass J. C., and Haley B. E. Mercury-EDTA complex specifically blocks brain β -tubulin-GTP interactions: similarity to observations in Alzheimer's disease. In: Status Quo and perspective s of Amalgam and other dental Materials, Friberg LT, Schrauzer GN, eds., Stuttgart, Georg Thiem Verlag, pp 98-105, 1995.
- Pilowsky L. S., Costa D. C., Ell P. C., Murray R. M., Verhoeff NPLG. Kerwin R. G. (1992). Clozapine, single photon emission tomography, and the D₂ dopamine receptor blockage hypothesis of schizophrenia. *Lancet* **340**: 199-202
- Piotrowski J. K., and Inskip M. J. Heath effects of methylmercury, MARC report No. 24. Monitoring and Assessment Research Center, Chelsea College, University of London, 1981.
- Pletscher, A. (1956). Serotonin as a mediator of reserpine action brain. *J. Pharmac. Exp. Ther.* **116**:84-89
- Pletscher, A. (1988). Platelets as models: Use and limitations, *Experientia*, **44**:152-155
- Poirier, M. , et al., (1984). [³H]5-HT uptake in human blood platelets: Changes after one week chlorimipramine treatment. *Eur. J. Pharmacol.* **106**:629-633
- Ponce R. A., Kavanagh T. J., Mottet N. K., Whittaker S. G., and Faustman, E. M. (1994). Effects of methylmercury on the cell cycle of primary rat CNS in vitro. *Toxicol Applied Pharmacol.* **127**:83-90

- Prada, M., and Kettler, R. (1986). Uptake, metabolism and subcellular localization of MPTP and MPP⁺ in blood platelets. *Clin. Neuropharm.* **9** (Suppl.):347-349
- Prada, M. D., Cesura, A. M., Launay J. M., and Richards J. G. (1988). Platelets as a model for neurones? *Experientia.* **44**:115- 126
- Prakash, N. J., Fontana, J., and Henkin, R. I. (1973). Effect of transitional metal ions on Na⁺/K⁺ ATPase Activity and the uptake of Norepinephrine and Choline by brain synaptosomes. *Life Sci.* **12** (1):249-259.
- Prasad K N., Harrington M. E., and Bondy S. C. (1979). Effects of Methylmercury chloride on the high affinity uptake of certain putative neurotransmitters in neuroblastoma and glioma cell culture cultures. *Toxicol. Lett.* **4**:373-377
- Pryor et al., (1983). Assessment of chemicals using a battery of neurobehavioral tests; A comparative study. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* **5**:91-117
- Przedborski S., Lewis-Jackson V., Popilskis S., Kostic V., Levivier M., Fashn S., Cadet J. L. (1991). Unilateral MPTP-induced parkinsonism in monkeys: A quantitative autoradiographic study of dopamine D1 and D2 receptors and re-uptake sites. *Neurochirurgia* **37**:377-382
- Rabey M. J., Grynberg E., and Graff E. (1991). Changes of muscarinic cholinergic binding by lymphocytes in Parkinson's disease with and without dementia. *Ann. Neurol.* **30**(6):847-850
- Rabey M. J., Shenkman L., and Gad M. G. (1986). Cholinergic muscarinic binding by human lymphocytes: Changes with aging, antagonist treatment, and senile dementia of the Alzheimer Type. *Ann. Neurol.* **20**:628-631
- Rajanna B., and Hobson M. (1985). Influence of mercury on uptake of [³H]dopamine and [³H]norepinephrine by rat brain synaptosomes. *Toxicol Lett* **27**:7-14
- Ratcliffe H. E., Swanson G. M. and Fisher L. J. (1996). Human exposure to mercury: Critical assessment of the evidence of adverse health effects. *J. Toxicol. Environ. Health* **49**:221-270
- Refsvik, T., and Norseth, T. (1975). Methylmercuric compounds in rat bile. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **52**:22-29
- Rehavi M., Weizman R., Weizman A. In platelets membrane receptors. Molecular Biology, Immunology, Biochemistry and Pathology. Vol. 100. G. A. Jamieson, (ed) Alan R Liss, Inc., New York, pp. 569-583, 1988.
- Reuhl K. R., and Chang L. W. (1979). Effects of methylmercury on the development of the nervous system : A review. *Neurotoxicology.* **1**:21-55
- Reuhl K. R., Lagunowich L. A., and Brown D. L. (1994). Cytoskeleton and cell adhesion molecules: Critical targets of toxic agents. *Neurotoxicology* **15**:133-146

- Rice D. C. (1989a). Brain and tissue levels of mercury after chronic methylmercury exposure in the monkey *J. Toxicol Environ. Health*. **27**:189-198
- Rice D. C. (1989b). Blood mercury concentrations following methylmercury exposure in adult and infant monkeys. *Exp. Res.* **49**:115-126
- Rice, D. C. (1996a). Sensory and cognitive effects of developmental methylmercury exposure in monkeys, and a comparison to effects in rodents. *Neurotoxicology*. **17**(1):139-154
- Rice D. C. (1996b). Evidence for Delayed Neurotoxicity produced by Methylmercury. *Neurotoxicology*, **17**(3-4):583-596
- Ricci A., Mariotta S., Greco S., and Bisetti A. (1997). Expression of dopamine receptors in immune organs and circulating immune cells. *Clin. and Exper. Hypertension* **19**(1&2):59-71
- Riekkinen, P., Jr Sirviö, J., Riekkinen, M., Riekkinen, P. (1991). Effects of THA on passive avoidance retention performance of intact, nucleus basalis + frontal cortex lesioned rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **39**:841-846
- Robbins T. W., and Everitt B. J. Central norepinephrine neurons and behavior. In *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress* (F. E. Bloom and D. J. Kupfer, eds.), Raven Press, New York, pp.373-386, 1995.
- Roberts-Lewis, J. M., and Siman, R. (1994). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **679** :78-86
- Robinson, S. H., Brecher, G., Lourie, I. S., Haley, J. E. (1965). Lymphocytes labelling in rats during and after continuous infusion with tritiated thymidine. *Blood* **26**:281
- Rodier, P. M., Ascher, M., and Sager P. R. Mitotic arrest in the developing CNS after prenatal exposure to methylmercury. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* **6**:379-385
- Roland P. E., Erikson L., Widen L., Stone Elander S. (1989). Changes in regional cerebral oxidative metabolism induced by tactile learning and recognition in man. *Eur. J. Neurosci*, **1**:3-18
- Sager P. R., Ascher, M., and Rodier, P. M. (1982) Persistent, differential alterations in developing cerebellar cortex of male and female mice after methylmercury exposure. *Devel. Brain Res.* **12**:1-11
- Sager P. R., and Syversen, T. L. M. Disruption of microtubules by methylmercury, In *The Cytoskeleton: A target for Toxic Agents* J. W. Clarkson, P. R. Sager, and T. L. M. Syversen, Eds., Plenum, New York, pp. 97-116, 1986.
- Sakai, K. (1974). Time-dependant distribution of ²⁰³Hg-methylmercuricchloride in tissues and cells of rats. *Japan J. Exp. Med* **45**:63-77

- Sakamoto M., Nakano A., Kinjo Y., Higashi H., and Futatsuka M. (1991). Present mercury levels in red blood cells of nearby inhabitants about 30 years after the outbreak of Minamata disease. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **22**:58-66.
- Salvaterra P., Lown B., Morganti J., et al., (1973). Alteration in neurochemical and behavioral parameters in the mouse induced by low doses of methylmercury. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **33**:177-183
- Sarafian, T. A. (1984). *In vitro* MeHg inhibition of protein synthesis in neonatal cerebellar perikarya. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **10**:85-92.
- Sarafian T. A., Bredesen Dale E., and Verity, M. A. (1996). Cellular resistance to methylmercury. *Neurotoxicology* **17**(1):27-36
- Sarafian T., and Verity M. A. (1990). Altered patterns of protein phosphorylation and synthesis caused methylmercury in cerebellar granule cell culture. *J. Neurochem.* **55**(3):922-929
- Sarafian, T., Verity, M. A. (1985). Inhibition of RNA and protein synthesis in isolated cerebellar cells by in vitro and in vivo methylmercury. *Neurochem. Pathol* **3**:27-39
- Sarafian T. Verity, M. A. (1993). Changes in protein phosphorylation in cultured neurons after exposure to methylmercury. *Ann New York Acad. Sci.* **679**:65-77
- Sato T., and Ikuta F. Neuropathology of methylmercury intoxication in Niigata and chronic effect in monkeys. In L. Roizin, H. Shiraki and N. Grcevic (Eds.), *Neurotoxicology*, Raven Press, New York. pp 261-269, 1977.
- Sato T, Nakamura Y. Neuropathology of methylmercury intoxication. In: *Advances in mercury Toxicology*, Edited by Suzuki et al., Plenum Press, New York, pp. 335-366, 1991.
- Sawaguchi T., Matsumura, M., and Kubota K. (1988). Dopamine enhances the neuronal activity of spatial short-term memory task in the primate prefrontal cortex. *Neurosci. Res.* **5**:465-473
- Sawas A. H., Gilbert J. C. (1984). Possible mechanisms of inhibition by lipid peroxidation of APTase activities of rat cerebral cortex synaptosomes. *Arch. Int Pharmacodyn* **269**:4-11
- Scatton B., Javaoy-Agid F., Rouquier L., Dubois B., Agid Y. (1983). Reduction of cortical dopamine, norepinephrine, serotonin and their metabolites in Parkinson disease. *Brain Res.* **275**:321-328
- Schiering, N., Kabsch, W., Moore, M. J., Distefano, M. D., Walsh, C. T. and Pai, E. F. (1991). Structure of detoxification catalyst ion mercuric ion reductase from *Bacillus* sp. Strain RC 607. *Nature* **352**:168-171

- Schionning J. D., Moller-Madsen B., and Danscher G. 1991. Mercury in the dorsal ganglia of rats treated with inorganic or organic mercury. *Environ. Res* **56**:48-56
- Seeman P. Dopamine receptors: Clinical correlates. In *Psychopharmacology: The fourth generation of Progress* Ed. Flood E. Bloom and David J. Kupfer, Raven Press, New York. pp 295-302, 1995.
- Sharma R. P., Aldous C. N., and Farr C. H. (1982). Methylmercury induced alterations in brain amine synthesis in rats. *Toxicol Lett* **13**:195-201
- Shiraki, H. Neuropathological aspects of organic mercury intoxication, including Minamata disease. In; *Handbook of clinical Neurology. Intoxication of the Nervous System Part I*, vol. 36, ed Vinken P. J., and Bruyn G. W., North-Holland Publishing company New York, pp: 83-145, 1979.
- Shore, P.A., et al., (1956). Release of blood platelet serotonin by reserpine and lack of effect on bleeding time. *J. Pharmac. Exp. Ther.* **117**:232-236
- Shrivastav B. B., Brodwick M. S., and Narahashi T. (1976). Methylmercury : Effects on electrical properties on squid axon membranes. *Life Sci.* **18**:1077-1082
- Siever L. J. Kahn R. S., Lawlor B. A., Trestman R. L. Lawrence T. L., and Coccaro E. F. (1992). Critical issues in defining the role of serotonin in psychiatric disorders. *Pharmacol. Rev.* **43**:509-525
- Silbergeld E. K. (1991). New approaches to monitoring environmental neurotoxicants. *Ann. NY Acad. Sci.* **694**:62-74
- Silbergeld E. K. (1993). Neurochemical approaches to developing biochemical markers of neurotoxicity: Review of current status and evaluation of future prospects. *Environ Res.* **63**:274-286.
- Simon, J. R., and Kuhar, M. J. (1976). High affinity choline uptake: ionic and energy requirements *J. Neurochem.* **27**:91-99
- Skerfving S. Exposure to mercury in the population; In *Advances in mercury Toxicology*, eds. by Tsuzuki et al. Plenum, New York, pp 411-425, 1991.
- Skerfving S. Organic mercury compounds. Relation between exposure and effects. In: *Mercury in the Environment*. Friberg L, Vostal J, eds. Cleveland, CRC Press, pp. 148-168, 1972.
- Slikker W. Jr., Holson R. R., Ali S. F., Kolta M. G., Paule M. G., Scallet A. C., McMillan D. E., Bailey J. R., Hong J. S., and Scalo F. M. (1989). Behavioral and neurochemical effects of orally administered MDMA in the rodent and nonhuman primate. *Neurotoxicology* **10**:529-542
- Slotkin T. A., and Bartolome J. (1987). Biochemical mechanisms of development neurotoxicity of methylmercury. *Neurotoxicology* **8**(1):65-84

- Slotkin, T. A., McCook E. C., Ritchie J. C., Carroll B. J., and Seidler F. J. (1997). Serotonin transporter expression in rat brain regions and blood platelets: Aging and Glucocorticoid effects. *Biol Psychiat* **41**(2):172-183
- Smith J. C., Allen P. V., Turner M D., Most B., Fisher H. L., and Hall L. L. 1994. The kinetics of intravenously administrated methylmercury in man. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **128**:251-256.
- Sobotka, T. J., Cook M. P., and Brodie R. E. (1974). Effects of perinatal exposure to methylmercury on functional brain development and neurochemistry, *Biol. Psychiat* **8**:307-320
- Sokolowski J. D., and Salamone J. D. (1994). Effects of dopamine depletion in the medial prefrontal cortex on DRL performance and motor activity in the rat. *Brain Res.* **642**:20-28
- Somjen G. C., Herman S. P., Klein R., Brubaker P. E., Briner, W. H., Goodrich J. K., Krigman M. R., and Haseman J. K. (1973). The uptake of MeHg (203)Hg in different tissues related to its neurotoxic effects. *The J. Pharmacol. Exp. Ther.* **187**(3):602-611
- Sneddon, J.M. (1973). Blood platelets as a model for monoamine-containing neurones. *Prog. Neurobiol.* **1**:151-198
- Snyder, S. H., and Coyle, J. T. (1969). Regional differences in H3-norepinephrine and H3-dopamine uptake into rat brain homogenate. *J. Pharmacol. Exp. Ther* **165**(1):78-86
- Stahl, S.M. Platelets as pharmacological models for the receptors and biochemistry of monoaminergic neurons. In: Longecker G., (ed) *The platelets: Physiology and pharmacology*. Academic Press, N.Y, pp 307-340, 1985.
- Steckler, T., Rüggeberg-S., and Oerlinghausen M. (1993). Human platelet 5-HT₂ receptor binding sites re-evaluated: a criticism of recurrent techniques, *J. Neur. Transm [GenSect]* **92**:11-240
- Stephen M., and Stahl M. D. (1985). Peripheral models for the study of Neurotransmitters Receptors in Man. *Psychopharmacology Bulletin.* **21**(3):663-671
- Stinson C. H., Shen D. M., Burbacher T. M., Mohamed M. K., and Mottet N. K. (1989). Kinetics of methyl mercury in blood and brain during chronic exposure in the monkey *Maca fascicularis*. *Pharmacology & Toxicology* **65**:233-230
- Stokes, P.M, and Wren, C.D. Bioaccumulation of mercury by aquatic biota in hydroelectric reservoirs: A review and consideration of mechanisms, in: Lead, Mercury, and Arsenic in the environment, Hutchinson T.C., and Meema K.M., eds.; John Wiley, New York, pp-255-278, 1987.

- Suda, I., Eto, K., Tokunaga H., Furusawa R., Suetomi K., and Takahashi, H. (1989). Different histochemical finding in the brain produced by mercuric chloride and MeHg chloride in rats. *Neurotoxicology* **10**:113-126
- Sudo, A., and Arito, H. (1982). Neurochemical correlates of sleep disorder of rats administered with methylmercury chloride. *Ind Health* **20**:67-70
- Sundberg J., Johnson S., Karlson M. O., Hallén I. P., Oskarsson A. (1998). Kinetics of methylmercury and inorganic mercury in lactating and nonlactating mice. *Toxicol. Applied Pharmacol.* **151**:319-329
- Suzuki T. Neurological symptoms from concentration of mercury in the brain. In: Chemical fallout. Miller M. W, Berg G. G. eds. Springfield, C. C. Thomas, pp 245-257, 1969.
- Suzuki, T., and Miyama T. (1971). Neurological symptoms and mercury concentration in the brain of mice fed with methylmercury salt. *Ind. Health* **9**:51-58
- Syversen, T.L.M. (1974). Biotransformation of Hg⁻²⁰³ labelled methyl mercuric chloride in rat brain measured by specific determination of Hg²⁺. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **35**:277-283
- Tagashira, E., Urano T., and Yanaura S. (1980). Methylmercury toxicosis. I. relationship between the onset of motor incoordination and mercury contents in the brain. *Folia Pharmacol. Jpn.* **76**:169
- Takahashi N., Nagai, Y., Ueno S., Saeki, Y., Yanagihara T. (1992). Human peripheral blood lymphocytes express D₅ dopamine receptor gene and transcribe the two pseudogenes. *FEBS* **314**(1):23-25
- Takeuchi, T. Pathology of mild prolonged cases of Minamata disease. In Recent Advances in Minamata Disease Studies. Tsubaki T., Takahashi H, eds. Tokyo Kodansha Ltd pp 117-134, 1986.
- Takeuchi T. Neuropathology of Minamata disease in Kumamoto: Especially at the chronic stage, in Neurotoxicology, Roizin L., Shiraki H and Greevic n eds., Raven Press, new York, pp. 235-346, 1977.
- Takeuchi T, and Eto K. Chronic occurrence from pathological viewpoints. In: Studies on the health effects of alkylmercury in Japan. Tsubaki T, ed., Environment Agency, Japanese Government 28-62, 1975.
- Takeuchi T., Eto K., Kinjo Y., and Tokunaga. (1996). Human brain disturbance by methylmercury poisoning, focusing on the long-term effect on brain weight. *Neurotoxicology* **17**(1):187-190
- Takeuchi T., Eto K., Sakai K., Kojima H. (1974). Accumulation of mercury in human body and its variation. *J. Kumamoto Med Soc. (Jpn ed)* **48**:199-209.

- Takeuchi T., Eto K., and Tokunaga H. (1989). Mercury level and histochemical distribution in a human brain with Minamata disease following a long term clinical course of twenty six years. *Neurotoxicology* **10**:651-658
- Tan X., Tang C., Castoldi Manzo L., and Costa L. G. (1993). Effects of inorganic and organic mercury on intracellular calcium levels in rat lymphocytes. *J. Toxicol. Envir. Health.* **38**:159-170
- Tanji, H., Araki, T., Nagasawa, H., and Itoyama, Y. (1999). Differential vulnerability of dopamine receptors in the mouse brain treated with MPTP. *Brain Res.* **824(2)**:224-234
- Taylor, L. L., and Di Stephano. (1986). Effects of methylmercury on brain biogenic amines in the developing rat pup. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **38**:489-497
- Thomas, D. J., and Smith, C. J., (1979). Partial characterisation of a low molecular weight methylmercury complex in rat cerebrum. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **47**:547-556
- Thompson, R. F., Bao, S., Chen L., Cipriano B. D., Grethe J. S., Kim, J. J., Thompson, J. K., Tracy J. A., Weninger M. S., and Krupa D. J. (1997). The associative learning, *Internal. Rev. Neurobiol.* **41**:151-189
- Thrombetta, L. D. and Kromidas, L. (1992). A scanning electron-microscopic study of the effects of methylmercury on the neuronal cytoskeleton. *Toxicol Lett.* **60**:329-341
- Tilson H. A., MacPhail R. C. Crofton K. M. (1995). Defining neurotoxicity in a decision-making context. *Neurotoxicology* **16**:363-376
- Traxinger D. L, Atchison W. D. (1987). Reversal of MeHg induced block of nerve-evoked release of ACh at the neuromuscular junction. *Toxicol Appl Pharmacol* **90**:23-33
- Trevor W. R., and Barry J. E. Central norepinephrine neurons and behavior. In *Psychopharmacology: The fourth generation of Progress* Ed. Flood E. Bloom and David J. Kupfer, Raven Press, New York, pp 363-372, 1995.
- Triebig G., and Lang C. (1993). Brain imaging techniques applied to chronically exposed solvents workers: current results and clinical evaluation. *Environ Res.* **61**:239-250.
- Tsubaki T, and Takahashi H. Recent advances in Minamata diseases studies. Tokyo, Japan: Kodansha, Ltd. 1986.
- Tsubaki T, and Irukayama K. Minamata Diseases: Methylmercury Poisoning in Minamata and Niigata, Japan, Elsevier Scientific Publishing Company Ed, New York, pp. 317, 1977.
- Tsuzuki, Y. (1981). Effects of chronic Methylmercury exposure on activities of neurotransmitters enzymes in rat cerebellum, *Toxicol Appl. Pharmacol.* **60**:379-381

- Tsuzuki, Y. (1982). Effects of methylmercury on different neurotransmitter systems in rat brain, *Toxicol. Lett* **13**:159-162
- Tunnicliff, G., and Wood, J. D. (1973). Inhibition of mouse brain neurotransmitters enzymes by mercury compounds and a comparison with the effects of hyperbaric oxygen. *Comp Gen Pharmacol* **4**:101-105
- Tuomisto J., and Komulainen H. (1983a). Release and inhibition of Uptake of 5-Hydroxytryptamine in blood platelets *in vitro* by Copper and Methylmercury. *Acta Pharmacol. et Toxicol.* **52**:292-297
- Tuomisto, J., and Komulainen H. (1983b). Uptake inhibiting metals do not inhibit 5-HT binding to platelet membranes. *Toxicol Lett* **18 (Suppl. 1)**:103
- Turner, P., and Ehsanullah, R. S. B. Platelets, 5-HT, Dopamine, chorea and Parkinson disease, In: *In Platelets: A multidisciplinary approach*, ed. Gaetano and Garatini S., Ed. Raven Press, N.Y. pp.385-387, 1978.
- Uchino M., Okajima T., Eto K., Kumamoto T., Mishima I., Ando M. (1995). Neurological features of Chronic Minamata Disease (organic mercury poisoning) certified at autopsy. *Intern Med* **34**:744-747
- Uchino M., Tanaka Y., Ando Y., Yonehara T., Hara A., Mishima I., Okajima T., and Ando M. (1995). Neurological features of Chronic Minamata Disease (organic mercury poisoning) and incidence of complications with aging. *J. Environ. Sci. Health.* **30(5)**:699-715
- Uhl G. R., and Hartig P. R. (1992). Transport explosion : update on uptake. *TiPS* **13**:421-425
- Vahter M., Mottet N. K., Friberg L., Lind B., Shen D. D., and Burbacher T. (1994). Speciation of mercury in the primate blood and brain following long term exposure to methylmercury. *Toxicol. Applied Pharmacol.* **124**:221-229
- Vahter M., Mottet N. K., Friberg L., Lind S. B., Charleston J. S., and Burbacher T. (1995). Demethylation of methylmercury in different brain sites of *Macaca fascicularis* monkeys during long term subclinical methyl mercury exposure. *Toxicol. Applied Pharmacol.* **134**:273-284
- Verity MA, Brown WJ, and Cheung M. (1975). Organic mercurial encephalopathy: In vitro and in vivo effects of MeHg on synaptosomal respiration. *J. Neurochem.* **25**:759-765
- Verity, M. A., Brown, W. J., Cheung, M., and Czer, G. (1977). MeHg inhibition of synaptosomes and brain slice protein synthesis- in vivo and in vitro studies. *J. Neurochem.* **29**:673-679
- Vogel D. G., Margolis R. L., and Mottet N. K. (1985). The effects of methylmercury binding to microtubules. *Toxicol Appl. Pharmacol* **80**:473-486