

PIERRE-YVES TREMBLAY

**IDENTIFICATION DE PROFILS MÉTABOLIQUES URINAIRES RELIÉS À L'EXPOSITION AU  
MÉTHYLMERCURE PAR APPROCHE MÉTABONOMIQUE**

Mémoire présenté

à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de maîtrise en médecine expérimentale  
pour l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DE MEDECINE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2011

## Résumé

La consommation de produits de la mer s'accompagne d'une exposition élevée au méthylmercure (MeHg) chez la population crie du Nord du Québec. Afin d'obtenir des pistes quant aux conséquences de cette exposition sur la santé de cette population autochtone, une étude de type métabonomique a été réalisée. Cette approche permet d'analyser les variations des concentrations de nombreux métabolites dans les fluides biologiques entre différents groupes de sujets. Par le biais d'analyses statistiques, il est possible d'obtenir de nouvelles informations sur les voies métaboliques altérées par le MeHg et de découvrir des biomarqueurs d'effets précoces générés par cette substance. Pour réaliser cette étude, 83 participants ont été recrutés afin de constituer trois groupes: un groupe de référence du sud du Québec, un groupe de cris montrant des faibles concentrations sanguines en mercure total (<10 nmol/L) et un groupe de cris montrant des fortes concentrations sanguines en mercure total (> 72 nmol/L). Les échantillons d'urine des participants, obtenus après un jeûne de 12 heures, ont été analysés à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse ou liquide couplé à un spectromètre de masse de type temps de vol (LC-TOF-MS et GC-TOF-MS). Des tests bi- et multivariés des données LC-TOF-MS ont permis de cibler 11 biomarqueurs potentiels différents chez l'homme alors que deux l'ont été chez la femme. À partir des données du GC-TOF-MS, quatre candidats ont été observés chez l'homme, incluant l'acide lactique, l'adénosine et le xylose. Des analyses préliminaires par LC-Q-TOF-MS ont été effectuées pour caractériser certains métabolites ciblés. D'autres travaux seront nécessaires afin d'identifier la structure de ces biomarqueurs potentiels.

## Avant-Propos

Je voudrais débiter ce mémoire en remerciant tous ceux qui m'ont supporté tout au long de la réalisation de ma maîtrise.

D'abord, je témoigne ma reconnaissance à mon directeur de recherche, le docteur Pierre Ayotte, qui a fait en sorte que mon projet voit le jour et qui m'a offert une bourse d'études pour le réaliser. Je voudrais également le remercier pour avoir cru en moi, pour ses nombreuses compétences, ses qualités scientifiques, ses conseils, sa complicité et pour m'avoir donné l'opportunité, au printemps 2010 de parfaire mes compétences lors d'un stage au Centre de Génomique de l'Université de la Californie à Davis.

En second lieu, je remercie Éric Gaudreau, chimiste à l'institut National de Santé Publique du Québec, pour son amitié, ses conseils, sa coopération et pour avoir pris le temps de me transférer ses connaissances concernant la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase liquide, qui m'ont été d'une grande utilité tout au cours de mes études graduées.

À Pierre Dumas, je te témoigne tout mon respect pour ton amitié, ton écoute, ton professionnalisme et pour m'avoir appris plusieurs principes importants concernant la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse.

Nathalie Ouellet, je te remercie pour tous tes conseils, ton écoute, ton ouverture, ta gentillesse et ta bonne humeur contagieuse.

À tous les autres membres de l'équipe de l'INSPQ que j'ai côtoyés pendant plus de deux ans, je souhaite sincèrement vous remercier de m'avoir accepté parmi vous. J'espère que les prochaines années à vos côtés seront toutes aussi enrichissantes. Votre aide a été très appréciée et ne sera jamais oubliée. Vous n'avez ménagé aucun effort pour répondre à mes demandes, mes questions et pour avoir rendu mes études beaucoup plus faciles, agréables et enrichissantes.

Je remercie enfin mes chers parents, mes amis et tous ceux qui ont pu contribuer de près ou de loin à la réalisation de mes études graduées.

Ce mémoire sera présenté sous forme d'article scientifique. L'ébauche de l'article inséré dans ce mémoire a été rédigée par le candidat tout en étant le fruit de nombreuses discussions et révisions avec les coauteurs, Éric Gaudreau, Éric Dewailly et mon directeur Pierre Ayotte, lequel a préparé la version finale de l'article.

*Je dédicace ce mémoire à ma mère, Mona Dufour  
et à mon père, Yves Tremblay*

## Table des matières

|  |             |
|--|-------------|
| <b>RESUME.....</b>   | <b>II</b>   |
| <b>AVANT-PROPOS .....</b>  | <b>III</b>  |
| <b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>  | <b>VIII</b> |
| <b>LISTE DES FIGURES.....</b>  | <b>IX</b>   |
| <b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>  | <b>XI</b>   |
| <b>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GENERALE.....</b>   | <b>1</b>    |
| <b>1. LA POPULATION CRIE DU NORD DU QUEBEC .....</b>                                   | <b>1</b>    |
| 1.1 HISTORIQUE .....   | 1           |
| 1.2 LES VILLAGES.....  | 2           |
| 1.3 HABITUDES DE VIE.....  | 3           |
| 1.4 NIVEAUX D'EXPOSITION MOYENS AU METHYLMERCURE DES CRIS DU NORD DU QUEBEC.....       | 5           |
| <b>2. LE MERCURE .....</b>   | <b>6</b>    |
| 2.1 PERSPECTIVE HISTORIQUE DE LA TOXICITE DU MERCURE.....                              | 6           |
| 2.2 SOURCES D'EXPOSITION AU MERCURE .....  | 7           |
| 2.3 TRANSFORMATION DU MERCURE .....  | 8           |
| 2.4 CYCLE BIOGEOCHIMIQUE, BIOACCUMULATION ET BIOAMPLIFICATION .....                    | 9           |
| 2.5 PHARMACOCINETIQUE DU MEHG .....  | 11          |
| 2.5.1 <i>Absorption</i> .....  | 11          |
| 2.5.2 <i>Distribution</i> .....  | 11          |
| 2.5.3 <i>Métabolisme</i> .....   | 12          |
| 2.5.4 <i>Élimination</i> .....   | 12          |
| 2.6 PHARMACODYNAMIE DU MEHG.....   | 13          |
| 2.6.1 <i>Effets cellulaires</i> .....  | 14          |
| 2.6.2 <i>Effets neurotoxiques</i> .....  | 15          |
| 2.6.3 <i>Effets sur les systèmes cardiovasculaires et rénaux</i> .....                 | 19          |
| 2.6.4 <i>Effets sur le système immunitaire</i> .....                                   | 21          |
| 2.6.5 <i>Effet génotoxique</i> .....   | 23          |
| <b>3. ENQUETE POPULATIONNELLE : NITUUCHISCHAAYIHTITAAU ASCHII<sup>(10)</sup> .....</b> | <b>23</b>   |
| 3.1 LES OBJECTIFS DE L'ENQUETE.....  | 23          |
| 3.2 FONDEMENTS DE L'ENQUETE.....   | 24          |
| 3.3 ÉVALUATION DE L'EXPOSITION AU METHYLMERCURE .....                                  | 25          |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>4. LA METABONOMIQUE .....</b>              | <b>26</b> |
| 4.1 PRINCIPES DE BASE.....                    | 26        |
| 4.2 ANALYSES INSTRUMENTALES .....             | 27        |
| 4.3 ANALYSES STATISTIQUES.....                | 28        |
| <b>5. RESUME DU PROJET DE MAITRISE .....</b>  | <b>30</b> |
| 5.1 OBJECTIFS .....                           | 30        |
| 5.2 DEMARCHES .....                           | 31        |
| <b>CHAPITRE 2: ARTICLE .....</b>              | <b>32</b> |
| <b>CHAPITRE 3 : CONCLUSION GENERALE .....</b> | <b>58</b> |
| <b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>                    | <b>64</b> |

## Liste des Tableaux

### Chapitre 1 : Introduction générale

**Tableau 1** : Nombre d'habitants vivant dans chacun des villages criés du Nord du Québec, en 2007.....3

**Tableau 2** : Concentrations moyennes de [Hg]total dans le sang en fonction de l'âge, du sexe et de la communauté crie étudiée.....6

### Chapitre 2 : Article

**Table 1.** Potential urinary biomarkers associated with elevated blood mercury levels in Cree men and women by LC-TOF-MS analysis.....48

**Table 2.** Fragmentation information of three potential biomarkers of MeHg exposure targeted in the Cree dataset (LC-Q-TOF-MS) .....49

**Table 3:** Potential urinary biomarkers associated with elevated blood mercury levels in Cree men and women by GC- TOF-MS analysis. ....50



## Liste des figures

### Chapitre 1 : Introduction générale

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 1 :</b> Cycle biogéochimique conceptuel du mercure.....                | 10 |
| <b>Figure 2 :</b> Similitude entre un complexe MeHg-Cys et la méthionine.....    | 12 |
| <b>Figure 3 :</b> Effet du méthylmercure sur les astrocytes et les neurones..... | 19 |

### Chapitre 2 : Article

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 1:</b> OPLS discriminant analysis of the Cree men dataset obtained by LC-TOF-MS analysis of urine samples (HSS T3 column). Characteristics of entities labelled 1 to 8 are presented in Table 1.....   | 52 |
| <b>Figure 2:</b> AUC values measured by LC-TOF-MS and ANOVA test results for selected potential urinary biomarkers of MeHg exposure in Cree groups with elevated and low blood mercury levels, and a reference group from southern Quebec. Panel A: male participants; column: RP18; ret. time: 13.84; m/z: 482.143. Panel B: female participants; column: HSS T3; ret. time: 14.77; m/z: 438.113..... | 53 |
| <b>Figure 3:</b> Separation of Cree men groups with high and low blood mercury levels (A) and important features ranked by variable influence on the projection parameter (B) following a PLS-DA analysis of GC-TOF-MS data.....   | 54 |
| <b>Figure 4:</b> Peak height values measured by GC-TOF-MS and ANOVA test results for selected potential urinary biomarkers of MeHg exposure in Cree groups with elevated and low blood mercury levels, and a reference group from southern Quebec. Panel A: male participants; lactic acid. Panel B: male participants; unknown 349036.....  | 55 |

**Figure 5:** Between-run reproducibility of LC-TOF-MS urine analyses. Two LC-TOF-MS analytical runs were performed with each LC column. Panel A shows the correlation between intensities (AUC) of 32 entities measured in two analytical runs for a randomly selected urine sample (ID # 31) (Pearson's r coefficient = 0.985). The percent change in mean intensity values between the two LC-TOF-MS analytical runs was within 20% for most metabolites (panel B).....56

**Supplemental materials:** Retention time, m/z and raw intensity values for the cocaine D4 standard analysed at the beginning and the end of the two different analytical runs. A: Sample #7, Analytical sequence 1, HSS T3 column. B: Sample #31, Analytical sequence 1, HSS T3 column. C: Sample #1, Analytical sequence 2, HSS T3 column. D: Sample #31, Analytical sequence 2, HSS T3 column.....57

## Liste des abréviations

|                     |  |
|---------------------|--|
| AA:                 | Acide arachidonique  |
| ADP:                | Adénosine diphosphate  |
| ATP:                | Adénosine triphosphate   |
| BPC :               | Biphényle polychloré   |
| CaG:                | Étude CARTaGENE  |
| CBHSSJB:            | Conseil Cri de la santé et des services sociaux de la Baie-James     |
| CBJNQ:              | Convention de la Baie-James et du Nord québécois                     |
| CIRC:               | Centre International de Recherche sur le Cancer                      |
| DHA:                | Acide docosahexaénoïque  |
| DPA:                | Acide docosapentaénoïque   |
| EPA:                | US Environmental Protection Agency                                   |
| ERO:                | Espèces réactives de l'oxygène                                       |
| GABA:               | Acide gamma-aminobutyrique   |
| GC-MS:              | Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse |
| GGT:                | $\gamma$ -glutamyltranspeptidase                                     |
| GSH:                | Glutathion   |
| Hg :                | Mercure  |
| HgCl <sub>2</sub> : | Dichlorure de mercure  |
| HgS:                | Sulfure de mercure   |
| LC-MS:              | Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse |
| MeHg:               | Méthylmercure  |
| OMS:                | Organisation mondiale de la santé                                    |
| OPLS-DA:            | Analyse discriminante partielle orthogonale des moindres carrés      |
| PCA:                | Analyse par composantes principales                                  |
| PKC:                | Protéine kinase C  |
| PLS-DA:             | Analyse discriminante partielle des moindres carrés                  |
| Q-TOF:              | Quadripôle-Temps de vol  |
| RMN:                | Résonance magnétique nucléaire                                       |
| TOF:                | Temps de vol   |

## Chapitre 1 : Introduction générale

### 1. La population crie du Nord du Québec

#### 1.1 Historique

La nation crie est un peuple autochtone d'Amérique du Nord. Les Cris habitent des régions allant des montagnes Rocheuses jusqu'à l'océan Atlantique à la fois au Canada et aux États-Unis. Cette nation autochtone appartient à la grande famille linguistique et culturelle algonquienne.<sup>(1)</sup> La langue crie appelée « Michif » est l'une des langues amérindiennes les plus parlées en Amérique du Nord. La totalité de la population crie parle cette langue.<sup>(1)</sup> L'anglais est la langue seconde pour la majorité de cette population. Originaires des plaines de l'Ouest canadien, les Cris vivaient traditionnellement en petits groupes nomades, tirant leur subsistance de la chasse et de la pêche.<sup>(1)</sup> Au Québec, ils étaient et sont encore établis dans le secteur de la Baie-James. Le premier contact entre les Européens et les Cris de la Baie-James date du XVII<sup>e</sup> siècle. En 1670, ils ont commencé à faire le commerce de la fourrure avec la Compagnie de la Baie d'Hudson. À partir du XVII<sup>e</sup> siècle, cette région est le théâtre d'un important commerce des fourrures et de l'évangélisation des résidents.<sup>(2)</sup> Vers 1950, avec le déclin de la traite des fourrures, les Cris n'ont pas eu d'autres choix que de se sédentariser. Puis au milieu des années 1970, de grands projets de centrales hydroélectriques sont venus perturber de façon importante la vie de cette communauté autochtone.<sup>(2)</sup> De nos jours, plus de 200 000 Cris sont enregistrés au Canada. Environ un tiers de la population autochtone totale du Canada et presque 3 % de la population totale du pays sont de descendance crie.<sup>(2)</sup> Les Cris font parties des premières Nations amérindiennes d'Amérique du Nord et forment du coup la plus grande nation amérindienne du Canada.<sup>(2)</sup> Ils se situent principalement au Québec, en Ontario et en Saskatchewan.<sup>(2)</sup> Les Cris du Québec sont réunis au sein du Grand Conseil des Cris (Eeyou Istchee) et de l'Administration régionale crie.<sup>(3)</sup>

La population crie québécoise s'élève à plus de 16 000 personnes, répartie dans neuf villages situés au nord du 45<sup>e</sup> parallèle, sur les rives de la Baie-James et de la baie d'Hudson ainsi qu'à l'intérieur des terres.<sup>(3)</sup> Cinq de ces communautés sont situées le long du littoral est de la Baie-James : Chisasibi, Eastmain, Waskaganish, Wemindji et Whapmagoostui alors que quatre sont situées à l'intérieur des

terres : Mistissini, Nemaska, Oujé-Bougoumou et Waswanipi. Chacune de ces communautés a un caractère particulier qui provient de son environnement physique et de son architecture.<sup>(3)</sup>

## **1.2 Les villages** <sup>(3-5)</sup>

La construction et la mise en fonction du barrage hydroélectrique Robert Bourassa en 1981 a forcé la population crie qui vivait sur l'île du Fort George à déménager. Les maisons ont été transportées sur la rive de la Baie-James où se situe actuellement le village de Chisasibi. Sa population, jumelée à celle du village de Mistissini constitue près de 50 % de la population crie du Nord du Québec. Eastmain a été le deuxième village crie à être implanté vers 1685 et constitue également la plus petite communauté. Il est situé à l'embouchure de la très longue rivière Eastmain, qui fait 700 kilomètres avant de se jeter dans la Baie-James. Waskaganish se trouve au creux de la baie de Rupert, au confluent des rivières Nottaway, Broadback et Rupert. Établie en 1670, Waskaganish est la plus ancienne des communautés cries. Wemindji, un village en plein essor, est situé sur les rives de la Baie-James, à l'embouchure de la rivière Maquatua. Plus au nord, on trouve le village de Whapmagoostui construit sur les rives de la baie d'Hudson, à l'embouchure de la Grande rivière de la Baleine. Elle est adjacente à la communauté inuite de Kuujjuarapik. Le village de Mistissini est localisé au sud-est de la plus grande étendue d'eau douce du Québec, le lac Mistassini. À la fin du 17<sup>e</sup> siècle, des négociants français s'y sont installés pour intercepter les fourrures destinées au marché anglais. Mistissini est aujourd'hui l'un des plus grands villages cris du territoire. Nemaska est la deuxième plus petite des communautés cries. En 1970, la fermeture du dernier poste de traite de la Compagnie de la Baie d'Hudson a entraîné la dispersion de sa population vers les communautés avoisinantes. Village devenu moderne, accessible par la route du Nord, Nemaska est aujourd'hui un important centre administratif qui abrite notamment les bureaux du Grand Conseil des Cris d'Eeyou Astchee et l'Administration régionale crie. Situé dans la forêt, loin des villes et des villages environnants, le village d'Oujé-Bougoumou a été créé en 1992 pour former le plus récent village crie. Combinant à la fois modernisme et tradition, la conception originale du village s'est vue décerner un prix par l'Organisation des Nations Unies. Pour sa part, le village de Waswanipi a été implanté sur son site actuel en 1969. Il s'agit également du village situé le plus au sud.

**Tableau 1** : Nombre d'habitants vivant dans chacun des villages cris du Nord du Québec, en 2007.<sup>(6)</sup>

| <b>Villages</b> | <b>Population<br/>(habs)</b> |
|-----------------|------------------------------|
| Eastmain        | 656                          |
| Nemaska         | 623                          |
| Oujé-Bougoumou  | 709                          |
| Wemindji        | 1 361                        |
| Waswanipi       | 1 790                        |
| Waskaganish     | 2 396                        |
| Mistissini      | 3 982                        |
| Chisasibi       | 3 813                        |
| <b>Total</b>    | <b>16 151</b>                |

### 1.3 Habitudes de vie

Plusieurs études populationnelles ont montré qu'encore aujourd'hui, les différentes communautés autochtones du Québec sont de grandes consommatrices de produit de la mer et principalement de poisson.<sup>(7-9)</sup> Bien que cette consommation semble diminuer depuis quelques années au sein des nouvelles générations, la pêche et la consommation de nombreux produits de la mer constituent des traditions encore bien existantes chez la population crie.<sup>(10)</sup> Le problème associé à une exposition plus importante au mercure préoccupe cependant les 9 communautés cries du territoire. Les familles s'adonnant aux activités dites traditionnelles, soit environ 30 % de la population, sont les plus susceptibles d'être fortement exposées au mercure, plus précisément à la forme organique la plus toxique de ce métal, soit le méthylmercure.<sup>(11)</sup>

Dans le milieu des années 70, des chercheurs ont découvert la présence d'une teneur élevée en mercure chez les poissons vivant dans des plans d'eau situés au sud du territoire de la Baie-James, résultant d'une source de pollution industrielle.<sup>(11)</sup> La principale raison est qu'à partir de 1974, la construction du complexe hydroélectrique La Grande a mené à la dérivation de plusieurs rivières et à

la création de plusieurs réservoirs. Dans les années qui ont suivi, l'activité bactérienne intense générée par ces nombreux mouvements a converti une partie du mercure inorganique présent dans la terre, en méthylmercure (MeHg ou CH<sub>3</sub>Hg).<sup>(11-13)</sup> Sous sa forme méthylée, ce métal aux propriétés neurotoxiques est facilement absorbé et s'accumule dans la chaîne alimentaire aquatique, notamment dans des espèces de poissons piscivores. Une partie du mercure que l'on retrouve dans la majorité des lacs, rivières et réservoirs du Nord québécois provient également des retombées d'émissions polluantes des centrales thermiques fonctionnant au charbon opérant au Canada et aux États-Unis.<sup>(11-13)</sup> Cette constatation a incité les Cris de toutes les communautés à modifier leurs stratégies de pêche et de consommation de poisson.

La présence grandissante du gouvernement fédéral à la Baie-James, l'introduction de l'école obligatoire, la construction de maisons permanentes et le déclin du commerce des fourrures ont donc bouleversé le mode de vie des Cris. Dans le contexte des projets hydroélectriques et de développement de la Baie-James, ceux-ci se sont dotés d'une organisation politique structurée, nommée : le Grand Conseil des Cris du Québec. En 1975, le conseil signe, avec les Inuit et les gouvernements du Québec et du Canada, la Convention de la Baie-James et du Nord québécois (CBJNQ), qui leur assure la propriété ou l'usage exclusif de territoires couvrant 5 544 km<sup>2</sup>, des droits exclusifs de chasse, de pêche et de piégeage sur une superficie de 69 995 km<sup>2</sup>, en plus de l'obtention d'une indemnité pour la prise en charge et le financement de diverses obligations des gouvernements dans les domaines de la santé et des services sociaux, de l'éducation et de la sécurité du revenu principalement. La CBJNQ a ainsi transformé l'univers des Cris, en entraînant la création d'institutions et d'organismes administratifs cris, de même que de nombreuses entreprises qui contribuèrent à l'essor économique de la population crie.<sup>(14)</sup> La mise en œuvre de la CBJNQ a cependant engendré de nombreux problèmes, que le gouvernement du Québec et la nation crie ont convenu de régler par la signature de la *Paix des braves* en 2002, établissant ainsi les bases d'une nouvelle relation. Suite à cette signature, la Corporation Niskamoon, comprenant des membres du Grand Conseil Cri et d'Hydro-Québec, a été formée dans le but d'assurer la gestion des programmes découlant de cet accord.<sup>(15)</sup>

Au début des années 80, la découverte de fortes teneurs en mercure dans les poissons des réservoirs du complexe La Grande faisait toujours augmenter les craintes et appréhensions au sein des communautés cries présentes sur le territoire. C'est pour cette raison qu'en 1986, les Cris de la Baie-James, Hydro-Québec et le gouvernement du Québec ont signé la convention de la Baie-James sur le

mercure.<sup>(2,13,14)</sup> Sa mise en œuvre a été assurée par le Comité de la Baie-James sur le mercure. Les principaux objectifs de cette convention étaient de minimiser chez les Cris les effets potentiels du mercure sur leur santé, de préserver leur mode de vie et leurs activités traditionnelles de chasse et de pêche et d'identifier, le cas échéant, des travaux pour diminuer la teneur en mercure des poissons.<sup>(11,13)</sup> Le Comité de la Baie-James sur le mercure devait répondre à une question complexe ayant des implications multiples, soit environnementales, culturelles et de santé publique. Il était à la fois important de réduire le risque pour la santé, généré par de fortes expositions au mercure, sans ignorer pour autant les bénéfices reliés à la consommation de poissons. Le financement était assuré pour une période de 10 ans. Pendant cette période, le Comité a supervisé le programme de suivi de la teneur en mercure des poissons, soit le volet environnement qui était sous la responsabilité d'Hydro-Québec.<sup>(12,14)</sup> Il a également supervisé le programme de suivi du niveau d'exposition au mercure des Cris du territoire de la baie James, soit le volet santé qui était sous la responsabilité du Conseil cri de la santé et des services sociaux de la Baie-James. De plus, des recherches portant sur l'environnement, la santé et sur des aspects socioculturels ont été entreprises et des mesures d'atténuation ont été proposées.<sup>(13)</sup>

#### **1.4 Niveaux d'exposition moyens au méthylmercure des cris du Nord du Québec**

Des mesures sanguines en mercure total (organique et inorganique) ont été réalisées chez une partie de la population crie du Nord du Québec entre 2005 et 2010 à même l'étude populationnelle appelée Nituuchischaayihititaa Aschii, laquelle est décrite à la section 3. Les concentrations moyennes sanguines en Hg total, pour cinq villages, sont présentées dans le tableau 2. On constate que dans toutes les communautés, les concentrations sanguines moyennes chez les plus de 20 ans sont nettement plus élevées que celle documentée dans la population de la grande région de Québec, laquelle était de 3,7 nmol/L en 2003.<sup>(16)</sup> La section suivante résume les caractéristiques physico-chimiques et toxicologiques du MeHg.



**Tableau 2 : Concentrations moyennes de  $[Hg]_{total}$  dans le sang en fonction de l'âge, du sexe et de la communauté crie étudiée.**

| Communautés | Groupes d'âge | Femmes |                        | Hommes |                        |
|-------------|---------------|--------|------------------------|--------|------------------------|
|             |               | N      | $[Hg]_{sang}$ (nmol/L) | N      | $[Hg]_{sang}$ (nmol/L) |
| Chisasibi   | ≤20 ans       | 30     | 4.15                   | 37     | 8.76                   |
|             | >20 ans       | 91     | 25.46                  | 63     | 45.38                  |
| Eastmain    | ≤20 ans       | 24     | 4.02                   | 20     | 7.51                   |
|             | >20 ans       | 57     | 25.02                  | 30     | 29.79                  |
| Mistissini  | ≤20 ans       | 41     | 11.74                  | 26     | 15.26                  |
|             | >20 ans       | 95     | 63.82                  | 67     | 62.75                  |
| Waskaganish | ≤20 ans       | 23     | 9.4                    | 30     | 9.66                   |
|             | >20 ans       | 51     | 21.13                  | 37     | 32.43                  |
| Wemindji    | ≤20 ans       | 21     | 4.61                   | 21     | 5.57                   |
|             | >20 ans       | 70     | 33.34                  | 58     | 50.74                  |

## 2. Le mercure

### 2.1 Perspective historique de la toxicité du mercure

Depuis le milieu du XXe siècle, le mercure est devenu une préoccupation mondiale dû à son impact sur l'environnement et sur la santé humaine. Trois événements majeurs sont à l'origine de ces préoccupations. La toxicité du MeHg a été observée pour la première fois dans les années 1950 (1953-1956) lors des intoxications massives ayant eu lieu chez des habitants de Minamata, un village de pêcheurs au Japon.<sup>(17,18)</sup> Ces derniers avaient pêché et consommé du poisson fortement contaminé au mercure, qui était rejeté par une fabrique de plastique situé à proximité du village. En date d'aujourd'hui, plus de 2 200 cas d'intoxication reliés à cet événement ont été reconnus.<sup>(18,19)</sup>

Les effets ayant été observés sont nombreux. On parle principalement d'atteintes cérébrales comme la sclérose en plaques, des syndromes cérébelleux, et de très nombreux décès.<sup>(17,19)</sup> Plusieurs cas démontrant des atteintes graves au niveau du fœtus ont été observés, et ce, même en l'absence de symptômes chez la mère. Encore aujourd'hui, les symptômes d'empoisonnement sévère au mercure sont désignés sous l'appellation de « maladie de Minamata ».

Cette catastrophe environnementale et sanitaire ne fut pas la seule de la sorte à survenir au Japon. Un autre épisode d'intoxication, par la consommation de poisson d'eau douce, a eu lieu à Niigata dans les années 60.<sup>(19)</sup> Finalement, en 1972, un empoisonnement collectif s'est produit en Irak, à cause cette fois de la consommation de grains de blé traités à l'aide d'un fongicide contenant un organomercurel. Plus de 6000 personnes ont été exposées et pas moins de 600 en sont mortes.<sup>(20,21)</sup> Ces trois tragédies ont jeté les bases des connaissances actuelles sur les effets d'un empoisonnement aigu au MeHg.

À la suite de ces événements, plusieurs pays partout à travers le monde ont commencé à prendre des mesures préventives afin d'assurer la diminution des émissions de mercure dans l'atmosphère. Le Canada joue un rôle de chef de file en ce qui concerne l'élaboration et la mise en œuvre de ces mesures, notamment avec le protocole d'Aarhus (métaux lourds) en vertu de la Convention des Nations Unies sur la pollution atmosphérique transfrontalière à longue distance, le Conseil de l'Arctique, la Stratégie binationale sur les produits toxiques dans les Grands Lacs, le plan d'action régional nord-américain relatif au mercure ainsi que divers programmes de surveillance nationaux et bilatéraux.<sup>(22)</sup>

## **2.2 Sources d'exposition au mercure**

Au début du 19<sup>e</sup> siècle, le mercure inorganique est utilisé depuis très longtemps pour diverses raisons, mais ce n'est que lors de la révolution industrielle qu'il a commencé à être exploité à très grande échelle. Avant la découverte de la toxicité du mercure, celui-ci était utilisé de bien des façons, par exemple dans les thermomètres, la peinture et les batteries, à cause de ses propriétés uniques.<sup>(23)</sup> Le mercure inorganique a longtemps été utilisé pour traiter la syphilis.<sup>(24)</sup> Sous sa forme élémentaire, puisque ses propriétés lui permettaient d'effectuer des solutions métalliques, il a aussi

été utilisé pour l'extraction de l'or. Maintenant que sa grande toxicité est connue, la majorité de ces pratiques ne sont plus courantes. Le mercure est toutefois utilisé dans la fabrication des ordinateurs portatifs, des téléphones, des amalgames dentaires, de certains équipements d'éclairage, certaines pièces automobiles, etc.<sup>(23)</sup> Ceci contribue par le fait même à la présence du mercure dans notre environnement, que ce soit au niveau du sol ou de l'atmosphère.

Il ne faut pas négliger l'apport des industries, qui constituent les plus grandes sources de mercure d'origine humaine. Au Canada, des usines utilisant des procédés « chloralcali » se servent du mercure dans le but de produire du chlore et de l'hydroxyde de sodium. La fusion de métaux, la production d'électricité et l'incinération des déchets sont trois des industries qui émettent le plus de mercure dans l'atmosphère.<sup>(23)</sup> La législation canadienne limite dorénavant les émissions de mercure rejetées par ces industries, ce qui a contribué à une diminution de 90 % de ces émissions entre 1970 et 2003.<sup>(23)</sup>

En plus des émissions résultant de l'activité humaine, il existe des sources naturelles sur lesquelles il n'y a pas vraiment de contrôle. En effet, la croûte terrestre contient une substance, portant le nom de cinabre, qui est composée en grande partie de sulfure de mercure (HgS). Le mercure est aussi présent dans une moindre mesure dans le granit et dans d'autres roches dites crustales. Certains phénomènes naturels comme les éruptions volcaniques et les cheminées sous-marines permettent la libération du mercure contenu dans la croûte terrestre, vers l'atmosphère et les cours d'eau où il peut être absorbé par les organismes vivants et entrer dans le cycle biogéochimique (voir **2.4. Cycle biogéochimique, bioaccumulation et bioamplification**).<sup>(25,26)</sup>

### 2.3 Transformation du mercure

Des émissions de mercure sous forme élémentaire ( $H^0$ ) sont souvent relâchées dans l'atmosphère. Cet élément est ainsi sujet à diverses transformations. Premièrement, une réaction d'oxydation permet sa transformation en mercure divalent selon l'équation suivante :  $Hg^0 \leftrightarrow Hg^{2+} + 2e^-$ . Cette réaction photochimique s'effectue dans l'atmosphère. La forme divalente du mercure est alors moins volatile et plus soluble, ce qui lui permet de s'accumuler dans les cours d'eau et de s'adsorber sur différentes particules. Donc, une fois à l'état divalent, le mercure a la

capacité de s'accumuler dans l'environnement. Cependant, sous cette forme, il est plus réactif et il peut donc subir d'autres transformations.<sup>(27-29)</sup>

Parmi ces réactions, une fait l'objet d'une attention particulière à cause de la grande toxicité de son produit final. En effet, une fois sous sa forme divalente, un groupement méthyle peut être ajouté au mercure ( $\text{Hg}^{2+}$ ) pour ainsi former le MeHg ( $\text{CH}_3\text{-Hg}^+ \text{X}^-$ ). Cependant, cette réaction est peu favorisée dans des conditions normales. Certains microorganismes, principalement des bactéries qui ont besoin de sulfate et des bactéries méthanogènes, participent à la formation du MeHg. Afin que la réaction soit effectuée, ces microorganismes doivent croître dans des conditions anaérobiques spécifiques, que l'on retrouve souvent dans des milieux aquatiques à faible pH avec une grande concentration en matière organique. Par conséquent, tout changement augmentant la prolifération de ce type de microorganismes favorisera la production de MeHg. C'est pourquoi les changements saisonniers affectent grandement les concentrations de chacune des formes du mercure dans l'environnement.<sup>(27-29)</sup>

## 2.4 Cycle biogéochimique, bioaccumulation et bioamplification

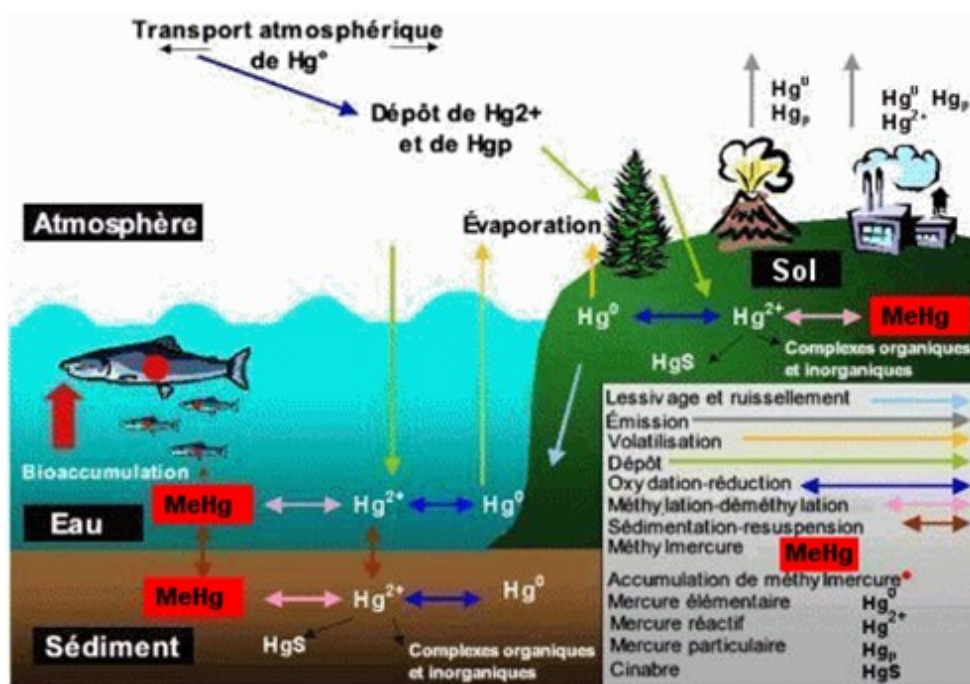
Le cycle biogéochimique du mercure décrit le passage des différentes formes du mercure dans la géosphère, l'atmosphère, l'hydrosphère et la biosphère.<sup>(27)</sup> Le cycle commence lorsque le mercure est sous forme de cinabre ( $\text{HgS}$ ) dans la croûte terrestre. Par l'activité terrestre ou humaine, il est libéré dans l'atmosphère où il peut être transporté par les vents durant de longues périodes de temps. Suite à certains phénomènes photochimiques, le mercure élémentaire contenu dans l'atmosphère se fait oxyder en  $\text{Hg}^{2+}$ , sa forme divalente. Étant plus soluble et moins volatile sous cette forme, le mercure peut alors se déposer dans l'environnement dans des milieux humides ou secs. Lorsque les conditions sont adéquates, la production de MeHg peut se faire à partir du mercure avec l'aide des microorganismes capables d'effectuer cette transformation, tel que mentionné précédemment.<sup>(28,29)</sup>

Une fois sous cette forme, le MeHg possède la capacité de traverser les barrières biologiques, ce qui lui permet de s'accumuler dans les organismes vivants, comme le phytoplancton, par un phénomène que l'on appelle bioaccumulation.<sup>(30)</sup> Règle générale, plus on monte dans la chaîne alimentaire, plus la quantité de MeHg est importante dans les organismes ; c'est le phénomène de bioamplification. En effet, les prédateurs absorbent le MeHg déjà présent dans leurs proies qui elles en avaient déjà

accumulé grâce à leur régime alimentaire.<sup>(31)</sup> C'est le cas de l'humain se nourrissant de poissons se retrouvant au sommet la chaîne alimentaire. Ces phénomènes sont amplifiés par le fait que le MeHg est une substance qui est éliminée lentement par l'organisme, de sorte qu'il y a accumulation de MeHg dans l'organisme lors d'expositions répétées.<sup>(32)</sup>

Chez l'humain, l'exposition au mercure sous sa forme organique se fait majoritairement via la consommation de poissons. C'est pourquoi les communautés de pêcheurs montrent des concentrations sanguines élevées de MeHg. En fait, ce composé est présent dans la chair du poisson (muscle) puisqu'il se lie aux groupements thiols (SH) des résidus cystéine et méthionine constituant les protéines.<sup>(33)</sup> Les grands consommateurs de poissons piscivores sont donc fortement exposés au MeHg.<sup>(32)</sup> La figure 1 explique le cycle du mercure.

Figure 1 : Cycle biogéochimique conceptuel du mercure<sup>(27)</sup>



## 2.5 Pharmacocinétique du MeHg

### 2.5.1 Absorption

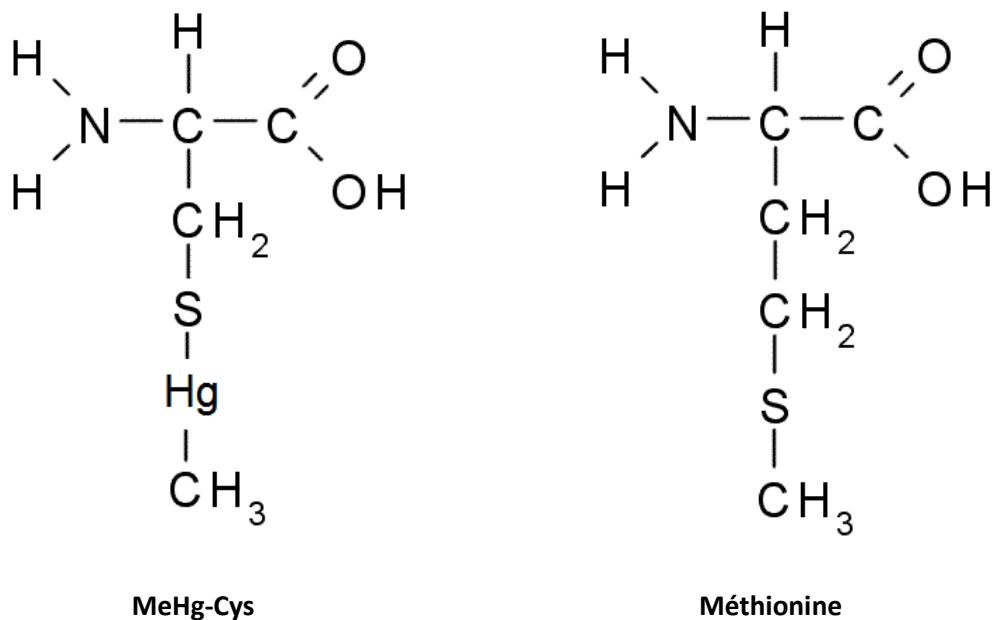
L'ingestion d'aliments contenant des concentrations élevées de MeHg, constitue la voie d'exposition principale à ce métal toxique. Contrairement au mercure inorganique qui est peu absorbé au niveau du tractus gastro-intestinal (entre 7 et 15 %), il a été démontré que plus de 90 % du MeHg est absorbé par la paroi gastro-intestinale et parvient à rejoindre les globules rouges, dans la circulation sanguine.<sup>(34,35)</sup>

### 2.5.2 Distribution

La digestion des protéines dans l'intestin permet la libération d'acides aminés dont la cystéine. Le groupe S-H de cet acide aminé réagit avec le MeHg pour former un complexe dont la structure ressemble à celle de la méthionine, un acide aminé essentiel. Cette molécule emprunte le transporteur de la méthionine et amène donc le MeHg dans la circulation sanguine et par la suite à l'intérieur des cellules de l'organisme.<sup>(32,36)</sup> La figure 2 montre la grande ressemblance entre la structure du complexe MeHg-cystéine et celle de la méthionine.

Au niveau du transport cellulaire, le MeHg se lierait à la cystéine seule ou au glutathion, un tripeptide aux propriétés antioxydantes, très abondant au niveau intracellulaire et contenant un groupement thiol. Le même mécanisme de transport serait impliqué lors du passage du MeHg à travers la barrière hémato-encéphalique.<sup>(33,37,38)</sup> Le mercure organique ou inorganique se retrouve dès lors en quantité importante au niveau des muscles, des reins, du foie et même du cerveau. Suite à une exposition au MeHg, les concentrations de mercure qu'on retrouve au cerveau sont généralement de 3 à 6 fois plus grandes que celles présentes dans n'importe quel autre organe.<sup>(39)</sup> Chez l'humain, il a été établi que le ratio de concentrations cerveau/sang était d'environ 6.<sup>(39,40)</sup>

Figure 2 : Similitude entre un complexe MeHg-Cys et la méthionine



### 2.5.3 Métabolisme

Le métabolisme du MeHg est relativement simple. Par le biais de différents mécanismes endogènes, encore peu compris, présents dans le cerveau et dans la majorité des organes d'un organisme vivant, une partie du MeHg est convertie en mercure inorganique. Certaines études ont montré que dans le cerveau, le mercure inorganique serait la forme prédominante lors d'exposition chronique au mercure organique.<sup>(41)</sup>

### 2.5.4 Élimination

Le foie est responsable en majeure partie de la détoxification des substances chimiques. Le mercure inorganique et organique étant soit liés à des molécules de glutathion ou à des peptides contenant un groupement thiol, accèdent au foie et sont éliminés dans la bile. Le mercure inorganique est très peu réabsorbé par la paroi intestinale. Il sera donc rapidement éliminé dans les

fèces. Concernant le MeHg, une grande partie est remise en circulation (réabsorbée par les parois de l'intestin).<sup>(35,39)</sup> Cependant, pour une autre partie du MeHg, une déméthylation se produit par l'action de la flore microbienne intestinale et le mercure inorganique résultant est ensuite excrété dans les fèces. Le mercure inorganique s'élimine difficilement et aurait, entre autres, tendance à s'accumuler dans les reins et le cerveau.<sup>(35,39)</sup> Cependant, les cellules responsables de la transformation du MeHg en Hg divalent sont encore mal connues. La voie fécale est donc la voie d'élimination principale grâce à laquelle plus de 90 % d'une dose de MeHg est éliminée.<sup>(35,39)</sup> Zalups et coll ont également montré la présence d'un mécanisme de sécrétion intestinale dans l'élimination fécale du mercure inorganique via l'action de transporteurs membranaires.<sup>(40)</sup> Une autre étude a modélisé la cinétique du mercure chez le rat en plus de discuter de la nécessité d'inclure un mécanisme de sécrétion intestinale pour expliquer les profils hépatique et sanguin du mercure. L'urine, la sueur et les cheveux sont également des voies d'élimination qui doivent être considérées.<sup>(42)</sup>

Le taux d'excrétion quotidien du MeHg se situe à environ 1% de la dose ayant été ingérée. Sa demi-vie sanguine est considérée par certains experts comme étant biphasique, soit de 2 à 4 jours et de 15 à 45 jours.<sup>(35)</sup> Sa demi-vie urinaire varie entre 41 et 90 jours. L'OMS a publié en 1990 un modèle toxicocinétique pour le MeHg dans l'urine. Ce modèle implique qu'un état d'équilibre est atteint après environ 1 an d'exposition chronique à une même dose quotidienne de MeHg.<sup>(43)</sup>

## 2.6 Pharmacodynamie du MeHg

Les effets toxiques provoqués par le MeHg sont causés par plusieurs mécanismes d'actions. Tous sont cependant basés sur sa haute affinité de liaison envers les groupements sélénols et thiols présents sur des peptides, des protéines ou sur d'autres molécules. La recapture de peptides comme le glutathion ou des acides aminés soufrés comme la cystéine peut être inhibée par le MeHg. La liaison aux protéines entraîne une modification de leurs structures tertiaire ou quaternaire ayant pour effet de les inactiver. Les protéines contenant ce genre de groupement sont très communes et occupent une multitude de fonctions différentes, principalement dans les membranes cellulaires et les organelles. Parmi ces protéines, on retrouve des enzymes, des récepteurs d'hormones ou de neuromédiateurs, des protéines membranaires, des molécules de tubuline et de myéline. Par exemple, la thiorédoxine réductase est significativement inhibée par le MeHg.<sup>(44)</sup> Cette protéine joue un rôle important dans le fonctionnement des cellules, la prolifération cellulaire, la défense



antioxydante et la régulation de la signalisation de la cascade redox.<sup>(44)</sup> Le MeHg inhibe également l'enzyme créatine kinase. Cette enzyme a pour fonction principale de catalyser la conversion de la créatine en phosphocréatine, impliquant la conversion de l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine diphosphate (ADP).<sup>(45) (46,47)</sup> Il est également permis de croire que la toxicité et les effets néfastes engendrés par une exposition chronique au MeHg seraient en fait, principalement dus au mercure inorganique.<sup>(41,48)</sup>

C'est donc pour cette raison que les cibles exactes du MeHg ne sont pas toutes identifiées. Il est à noter que ce type d'interaction avec les protéines n'est probablement pas le seul responsable des effets toxiques générés par le MeHg. Il a aussi été suggéré que les effets toxiques du MeHg, lors d'expositions chroniques de longue durée, pourraient se produire via son métabolite, le mercure inorganique. En effet, cette forme de mercure peut également se lier aux groupements thiols des protéines et inhiber leur activité.<sup>(49,50)</sup> L'élimination du mercure inorganique étant lente, on peut observer une accumulation de celui-ci au niveau du cerveau. Les prochains paragraphes résument l'information au sujet des altérations et des principaux mécanismes d'action de la toxicité découlant d'une exposition au MeHg.

### 2.6.1 Effets cellulaires

Au niveau cellulaire, le MeHg cause un déséquilibre de l'homéostasie intracellulaire en libérant le calcium des compartiments où il est emmagasiné.<sup>(51,52)</sup> Plusieurs mécanismes potentiellement complémentaires sont proposés pour expliquer ce phénomène. Une des sources principales du calcium intracellulaire ainsi libéré est le réticulum endoplasmique via la voie de l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP3). Or, le MeHg agit possiblement de deux façons sur cette voie.<sup>(44,53)</sup> Ce composé aurait une action activatrice sur la protéine kinase C (PKC) responsable du début de la voie de l'IP3 et il aurait aussi une fonction de régulation du récepteur à l'IP3 en augmentant son affinité pour l'inositol triphosphate. De plus, il est possible que le MeHg puisse se lier aux canaux calciques sur la membrane cellulaire et ainsi favoriser l'entrée du calcium dans la cellule.<sup>(51,52)</sup> Ce sont ces phénomènes qui permettent l'augmentation de la concentration cytosolique en calcium.<sup>(36,54,55)</sup>

Cette augmentation de la quantité de calcium intracellulaire peut alors modifier la fonction de certaines protéines et par le fait même de la cellule. En effet, le MeHg peut causer une augmentation de la perméabilité de la membrane mitochondriale et laisser entrer davantage de calcium, ce qui modifiera le fonctionnement de cette organelle, produisant ainsi un surplus d'espèces réactives de l'oxygène (ERO).<sup>(51,53)</sup> Ce faisant, un stress oxydatif est créé dans la cellule. L'augmentation de la perméabilité de la membrane mitochondriale peut être provoquée de deux façons : premièrement via sa biotransformation en mercure inorganique qui peut se fixer à sa membrane interne et deuxièmement via la fixation du MeHg directement sur la membrane de la mitochondrie.<sup>(36,53)</sup>

Le stress oxydant créé par l'intoxication au MeHg peut être potentialisé par une perturbation de l'homéostasie du glutathion.<sup>(36)</sup> En effet cette substance est un puissant réducteur (antioxydant) et permet d'éliminer en grande partie les espèces réactives de l'oxygène à l'aide de l'enzyme glutathion S-transférase.<sup>(56)</sup> Donc, dans le cas où la quantité de glutathion diminue par l'effet du MeHg, la détoxification des ERO est, elle aussi diminuée, ce qui permet de potentialiser l'effet du stress oxydatif.<sup>(36)</sup>

De plus, la prolifération cellulaire est altérée en cas d'intoxication au MeHg.<sup>(57)</sup> En effet, le mercure sous sa forme organique possède la capacité d'inhiber la formation du réseau de microtubule essentiel à la division cellulaire, ce qui fait en sorte que le cycle cellulaire arrête au moment de passer de la phase G<sub>2</sub> vers la phase M. Aussi, le MeHg pourrait induire la protéine p21 responsable de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G<sub>1</sub> et possiblement au passage G<sub>2</sub>-M.<sup>(58)</sup> Cependant, p21 pourrait aussi avoir un effet au niveau de la différenciation cellulaire, ce qui aurait pour conséquence d'altérer la fonction de certaines cellules en cas d'intoxication au MeHg, surtout chez l'embryon.<sup>(58)</sup>

### 2.6.2 Effets neurotoxiques

Une exposition aiguë au MeHg peut entraîner un rétrécissement du champ visuel, une baisse de l'acuité auditive, puis à plus forte dose, une cécité et une surdité corticale. Comme autres effets indésirables, on peut observer de la fatigue, apathie, maux de tête, vertiges, paresthésies, trouble de la mémoire, tremblements des extrémités, myalgies, ataxie cérébelleuse, dysarthrie, encéphalites, polynéphrite, détérioration intellectuelle, irritabilité, confusion, etc.<sup>(59)</sup>

Il est bien connu, au sein de la communauté scientifique, que le MeHg cause des dommages neurologiques lors d'une exposition chronique significative. En effet, celle que l'on nomme la maladie de Minamata consiste en plusieurs symptômes neurologiques causés par une exposition prolongée au MeHg : le premier symptôme est la paresthésie aux extrémités des membres (fourmillements), suivie de l'ataxie (manque de coordination), de la perte graduelle de la vue et de l'ouïe, de la dysarthrie (trouble de la parole) et de tremblements.<sup>(60)</sup> La neuropathie périphérique, les troubles de la démarche et une détérioration mentale sont aussi des symptômes de la maladie.<sup>(61)</sup> D'autres symptômes ont été identifiés comme l'anosmie, la perte du goût, divers problèmes de vessie et des spasmes. Ces effets sont cependant variables d'un patient à l'autre.<sup>(61)</sup> Différents symptômes neuronaux peuvent être engendrés par l'apoptose cellulaire dans différentes régions du système nerveux. La perte graduelle de la vue serait causée par des pertes cellulaires au niveau du lobe occipital de l'encéphale; la paresthésie et la neuropathie périphérique au niveau des nerfs périphériques ou de la zone sensitive du système nerveux central; l'ataxie et les troubles de la démarche au niveau des granuloctes du cortex cérébelleux.<sup>(61,62)</sup> D'autres mécanismes d'actions alternatifs ou complémentaires peuvent cependant expliquer la production de ces symptômes neuronaux. Une des explications possibles implique l'atteinte et dans certains cas, la mort des cellules neuronales. En effet, la forme organique du mercure peut se lier de façon irréversible au récepteur muscarinique, activant ainsi la voie de signalisation conduisant à la relâche de calcium du réticulum endoplasmique, ce qui entraîne finalement une augmentation de la concentration intracellulaire de cet ion. Une autre partie du MeHg se fixe à la membrane de la mitochondrie, augmentant ainsi sa perméabilité. Le surplus de calcium dans la cellule va ainsi pouvoir entrer dans la mitochondrie et en modifier son fonctionnement.<sup>(53)</sup> Au lieu de produire de l'ATP, elle produirait alors des ERO, engendrant un stress oxydatif. C'est ce stress oxydatif qui va induire l'activation de la voie des caspases menant à l'apoptose.<sup>(63)</sup> Il est à noter que cet effet de mort cellulaire est surtout présent dans les cellules de Purkinje, Basket, Stellate ainsi que dans les neurones périphériques.<sup>(36)</sup>

Le MeHg peut aussi provoquer une augmentation de la fréquence de libération spontanée d'acétylcholine aux jonctions neuromusculaires, mais la quantité de neurotransmetteur est diminuée. L'augmentation de la fréquence de libération vide les réserves d'acétylcholine dans le neurone. Ce phénomène est causé par le fait que le MeHg, au niveau intracellulaire, induit la libération de  $Ca^{2+}$  de la mitochondrie vers le cytosol, ce qui permet l'exocytose du neurotransmetteur. Ceci expliquerait les tremblements causés par une intoxication au MeHg, car la

libération d'acétylcholine à la jonction neuromusculaire provoque des contractions musculaires via les récepteurs nicotiques à l'acétylcholine.<sup>(64)</sup>

Une autre théorie veut que le MeHg possède la capacité d'inhiber le potentiel d'action de la membrane neuronale en bloquant partiellement les canaux sodiques et potassiques, résultant en une conduction neuronale diminuée.<sup>(65)</sup>

Un autre phénomène peut être important pour l'altération de l'efficacité de conduction des neurones est la perte du réseau de microtubules. En effet, la toxicité du mercure organique fait en sorte que la formation de ce réseau est inhibée. En plus de dégrader les microtubules, le MeHg a aussi la capacité de diminuer la concentration de l'ARN<sub>m</sub> des tubulines, une composante importante des microtubules. Ce faisant, les neurones perdent une partie de leur réseau responsable du transport axonal et donc leur capacité à bien effectuer la conduction de l'influx.<sup>(66)</sup> La perte de l'efficacité de la conduction des neurones, causée par les deux phénomènes décrits plus haut, pourrait expliquer pourquoi les personnes intoxiquées au MeHg souffrent de neuropathies périphériques. Ce phénomène est accentué par le fait que les gaines de myélines des neurones périphériques ont tendance à s'amincir et à disparaître après une intoxication au MeHg.<sup>(66)</sup>

Aussi, le courant chloré inhibiteur généré par le récepteur GABA (acide gamma-aminobutyrique) est diminué en présence de MeHg.<sup>(67)</sup> Dans le cortex cérébelleux, ce phénomène agit de concert avec la perte des granulocytes pour mener à l'ataxie. Cependant, cet effet est beaucoup moins important dans les cellules de Purkinje que dans les granulocytes. En effet, ces deux types de cellules exprimeraient deux récepteurs GABA<sub>A</sub> légèrement différents (probablement au niveau de la sous-unité  $\alpha_6$ ), ce qui expliquerait la réponse différente de ces deux types cellulaires.<sup>(68)</sup> Il est à noter que le même phénomène se produit aussi au niveau des cellules corticales cérébrales et au niveau de l'hippocampe, même si les symptômes qui y sont associés restent encore inconnus pour le moment.<sup>(69)</sup> En dépit du fait que la toxicité du MeHg sur les récepteurs GABA<sub>A</sub> soit connue, le mécanisme exact par lequel celui-ci est inhibé ne l'est pas. On pense que cet effet pourrait avoir lieu via l'accumulation de calcium ou de zinc dans les cellules.<sup>(67)</sup>

La théorie pour laquelle l'information est la plus complète, implique le flux glutamatergique qui se trouve à être, lui aussi, perturbé par l'exposition au MeHg. En présence de MeHg au niveau extracellulaire, on constate la diminution de la recapture du glutamate, principalement au niveau des astrocytes et des cellules gliales du système nerveux central. <sup>(70,71)</sup>

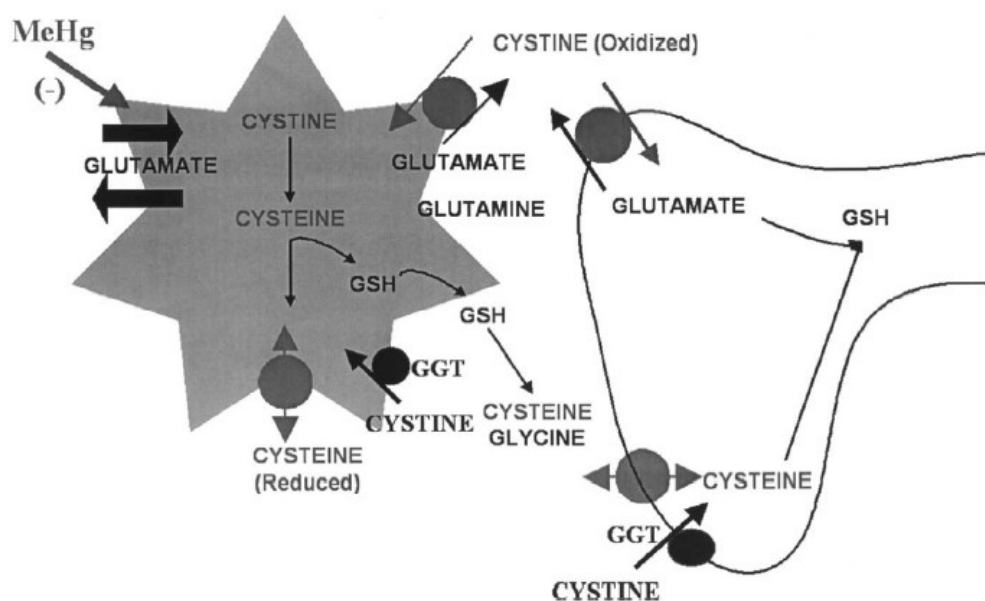
La première explication implique le cycle glutamate-glutamine présent dans les neurones et les astrocytes. Une fois le glutamate relâché par les neurones, il peut agir au niveau de ses récepteurs localisés sur le neurone postsynaptique. En temps normal, cet effet est arrêté par la recapture de ce neurotransmetteur par des transporteurs (ex : EAAT1) présents sur les astrocytes ou les terminaisons nerveuses des neurones.<sup>(72)</sup> Au niveau des astrocytes, l'inhibition de ce type de transporteur empêche par le fait même la recapture de cystéine.<sup>(73)</sup> Le glutamate et la cystéine étant deux précurseurs de glutathion, les quantités intracellulaires de ce tripeptide sont également diminuées.<sup>(70,73)</sup> Le glutathion est considéré comme un antioxydant majeur chez les mammifères. Finalement, la présence de MeHg au niveau intracellulaire et l'inhibition du transporteur EAAT1 génèrent une quantité importante d'espèces ERO, ce qui pourra éventuellement mener à la mort cellulaire.<sup>(73)</sup>

Lorsque le MeHg inhibe la recapture du glutamate dans les astrocytes, le neurotransmetteur reste plus longtemps au niveau de la synapse, ce qui lui permet d'exercer son effet plus longtemps. Une diminution de la recapture du glutamate par les vésicules synaptiques se fait via l'action du MeHg sur la pompe à proton, également située au niveau des vésicules. En effet la recapture du glutamate dans les vésicules nécessite la présence du gradient de concentration créé par la pompe à proton. Or, en diminuant l'efficacité de cette pompe, le transport du glutamate est lui aussi diminué et le neurotransmetteur peut agir plus longtemps au niveau du neurone postsynaptique.<sup>(74)</sup> L'augmentation de la quantité de glutamate dans la fente synaptique favorise donc la liaison de celui-ci à ses récepteurs postsynaptiques. Ces récepteurs, une fois activés, vont moduler de façon importante le fonctionnement des neurones. En effet, cela permet l'augmentation du calcium intracellulaire, la modification des gradients de concentration du sodium et du potassium et l'activation de diverses cascades intracellulaires.<sup>(75)</sup> L'augmentation du calcium cytosolique, comme mentionné plus haut, mène à l'apoptose par la voie des caspases.<sup>(53,63)</sup> L'augmentation du flux glutamatergique et une suractivation des récepteurs liés au glutamate comme les récepteurs NMDA et AMPA, causées par le MeHg, vont mener à une mort cellulaire, plus précisément à une excitotoxicité.<sup>(70,71)</sup> Il a également été montré qu'une exposition au MeHg pouvait générer un

gonflement des astrocytes. Finalement, certaines études récentes ont montré que l'augmentation d'ERO, due à la présence intracellulaire de MeHg, activerait la phospholipase systolique A2 qui génère l'acide arachidonique (AA). Une fois à l'extérieur de la cellule, l'AA inhiberait certains transporteurs responsables de la recapture du glutamate. <sup>(71)</sup>

Enfin, l'altération du niveau de calcium intracellulaire affecte aussi les cellules endothéliales qui forment la barrière hémato-encéphalique. Ce faisant, elle devient plus perméable et laisse entrer plus de substances dans le cerveau. La distribution du MeHg dans l'encéphale est donc augmentée et il en est de même pour plusieurs autres substances neurotoxiques pouvant induire des symptômes neurologiques. <sup>(36)</sup>

**Figure 3 : Effet du méthylmercure sur les astrocytes et les neurones. <sup>(71)</sup>**



Note : GSH : Glutathion, GGT :  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase

### 2.6.3 Effets sur les systèmes cardiovasculaires et rénaux

Plusieurs études épidémiologiques ont été effectuées récemment sur les effets cardiovasculaires du MeHg, tentant de montrer l'existence d'une relation entre l'exposition à cette substance et l'augmentation des risques de maladies cardiovasculaires. <sup>(76-78)</sup> Une revue de la

littérature a déjà été publiée sur ce sujet et inclut les travaux de onze chercheurs différents sur les effets du mercure sous sa forme organique sur les maladies du cœur et l'hypertension.<sup>(79)</sup> Les résultats de ces études, quoique quelques fois contradictoires, montrent qu'il semble y avoir une relation en ce qui concerne certaines des maladies du cœur tel que l'infarctus du myocarde et l'exposition au MeHg. Il semblerait aussi que les hommes soient plus susceptibles à développer des maladies ischémiques tandis que les femmes subiraient surtout des maladies non ischémiques.<sup>(78,79)</sup> Cette augmentation des risques cardiovasculaires pourrait être expliquée par l'action antagoniste du MeHg envers les acides gras polyinsaturés DHA et DPA. Ces acides gras étant protecteurs du système cardiovasculaire, cet antagonisme ferait donc en sorte d'augmenter les risques. Bien sûr, cette explication est encore au stade d'hypothèse et d'autres mécanismes pourraient très bien expliquer ce phénomène, tel un déséquilibre de l'homéostasie du calcium et l'altération des microtubules, par exemple. Une de ces études a aussi montré que le MeHg pourrait favoriser l'athérosclérose, mais des études supplémentaires doivent être réalisées pour confirmer ce résultat.<sup>(79)</sup>

Une étude a également montré que des expositions prénatales au MeHg, provenant de la consommation de poisson chez la mère, étaient reliées à des tensions artérielles plus élevées chez les enfants âgés de sept ans. La tension artérielle des enfants, dont les mères avaient consommé du poisson (concentration moyenne de mercure dans le sang au cordon ombilical de 10 µg/L) durant leur grossesse était supérieur de 0,7 mm de mercure comparativement aux enfants dont les mères n'avaient consommé que de faibles quantités de poisson durant leur grossesse (concentration moyenne de mercure dans le sang au cordon de 1 µg/L). Cette même étude a également révélé une diminution significative de la capacité de réponse neurovégétative du cœur.<sup>(80)</sup>

En ce qui concerne l'hypertension, les études épidémiologiques chez l'humain ne sont pas très concluantes, mais celles effectuées chez les rats indiquent que l'exposition au MeHg produit de l'hypertension.<sup>(79)</sup> C'est un phénomène qui pourrait s'expliquer par une action via le système nerveux parasympathique. L'exposition au MeHg du fœtus in utero pourrait aussi induire une hypertension après la naissance et durant l'enfance, mais celle-ci ne semble pas persister jusqu'à l'adolescence. Il est à noter que les effets sur l'hypertension pourraient cependant être produits par le mercure inorganique provenant du métabolisme du MeHg.<sup>(79)</sup> Cette hypothèse est, de plus, appuyée par le fait que le mercure inorganique agit sur le rein en causant une relâche d'angiotensine, laquelle a un effet sur la pression sanguine. Une autre étude datant de 1991 montre que le MeHg potentialise l'effet de l'angiotensine II, probablement via un effet stimulant sur la protéine kinase C (PKC), un

second messenger de l'angiotensine II menant à la libération du calcium contenu dans le réticulum endoplasmique. Ceci provoque une augmentation plus durable de la concentration de calcium intracellulaire, ce qui pourrait mener à l'augmentation de la pression sanguine. La même étude montre des effets similaires avec le MeHg.<sup>(81)</sup>

Le rein est l'organe le plus touché suite à une exposition au mercure inorganique. En fait, une exposition aiguë au chlorure de mercure peut générer la nécrose et l'apoptose des cellules tubulaires rénales. Des expositions chroniques à différents sels de mercure peuvent induire une néphropathie glomérulaire à caractère immunologique. Chez l'homme, la néphrite glomérulaire peut évoluer en néphrite interstitielle à complexes immuns. Les personnes exposées peuvent développer une protéinurie, un effet réversible une fois l'exposition terminée, consistant au passage de protéines, principalement d'albumine, à travers le glomérule lésé.<sup>(82,83)</sup> Malgré le fait que l'effet du mercure inorganique sur les reins soit bien documenté, celui du MeHg est moins connu. Une étude, réalisée chez des rats chroniquement exposés au MeHg, a montré que l'accumulation de mercure dans les reins, tant sous forme organique que inorganique, produit des néphrites ou des nécroses tubulaires.<sup>(84-86)</sup>

#### **2.6.4 Effets sur le système immunitaire**

En plus de ses effets sur les systèmes nerveux et cardio-vasculaires, le MeHg affecte aussi le système immunitaire.<sup>(87,88)</sup> Même si les effets au niveau de ce système sont moins importants et dangereux que les effets neurologiques, il est important de les mentionner, car ils apparaissent à plus faibles doses de MeHg. Les symptômes immunologiques incluent l'immunosuppression, une baisse de la production d'IgM et d'IgG, une diminution de l'activité « natural killer » (NK) et une diminution de la production d'histamine par les mastocytes.<sup>(87,88)</sup> Cependant, différentes études ont montré une activation du système immunitaire caractérisée par des maladies auto-immunes et des allergies.<sup>(55,87)</sup>

Une étude effectuée sur des lymphocytes T humains a montré que le MeHg induit l'apoptose de ce type de cellule en activant la voie des caspases par un mécanisme similaire à celui causant l'apoptose des cellules neuronales.<sup>(89)</sup> En effet, les cellules non neuronales possédant des récepteurs muscariniques à l'acétylcholine sont rares, mais les lymphocytes en font partie, ce qui pourrait expliquer pourquoi seuls les systèmes immunitaire et nerveux sont affectés de cette façon.<sup>(89,90)</sup>



Donc, la liaison du mercure sous sa forme organique à ce récepteur va provoquer l'apoptose de cellules responsables de l'immunité. La diminution du nombre de lymphocytes T causée par une intoxication au MeHg engendrera plusieurs désordres du système immunitaire, comme l'augmentation du nombre d'infections bactériennes et virales.<sup>(63)</sup> D'ailleurs, plusieurs personnes mortes d'une pneumonie causée par une intoxication au MeHg ont été recensées.<sup>(19,19,36,58)</sup> Une étude propose une autre explication pour l'augmentation de l'apoptose chez les cellules du système immunitaires. En effet, suite à la liaison du MeHg au récepteur muscarinique à l'acétylcholine, la protéine p38 va se faire phosphoryler et va donc pouvoir activer la protéine *c-fos* impliquée dans l'apoptose.<sup>(19,90)</sup>

Même à des concentrations trop faibles pour provoquer la mort cellulaire, le MeHg peut causer des effets sur le système immunitaire. En effet, cette substance possède la capacité de diminuer la production d'interleukine-2, laquelle est essentielle aux fonctions des lymphocytes, dont la production d'anticorps.<sup>(19,90,90)</sup> Il est donc logique de constater une diminution de la production d'IgM et d'IgG.<sup>(55)</sup> Cependant, le mécanisme par lequel cette production est altérée demeure inconnu à ce jour.<sup>(90)</sup>

La libération d'histamine par les mastocytes est un processus important du système immunitaire qui nécessite du calcium pour permettre la fusion des vésicules à la membrane et ainsi libérer l'histamine par exocytose.<sup>(55)</sup> Comme mentionné précédemment, le MeHg permet d'augmenter la quantité de calcium cytosolique, causant ainsi la libération d'histamine par les mastocytes.<sup>(55)</sup> Cependant, à une plus grande concentration de MeHg, c'est l'effet inverse que l'on observe.<sup>(55)</sup> La cause exacte de ce phénomène demeure inconnue, mais il pourrait être expliqué par les effets cytotoxiques du mercure organique sur la cellule. En effet, le calcium libéré ne permet pas que d'induire la libération d'histamine; il peut aussi avoir d'autres effets sur la cellule qui modifient son fonctionnement.<sup>(55)</sup> C'est probablement cette libération excessive d'histamine qui induit les réactions d'allergiques et les maladies auto-immunes recensées dans quelques cas d'intoxication au MeHg.

L'influence d'une exposition prénatale au MeHg sur le développement du système immunitaire a été étudiée par Bilrha et coll.<sup>(91)</sup> La commission des sciences de la vie du Conseil National Américain de la Recherche estime qu'il est nécessaire qu'une prise de conscience au sujet des effets toxiques potentiels du MeHg sur le système immunitaire ait lieu.<sup>(92,93)</sup>

### 2.6.5 Effet génotoxique

Certaines études ont réussi à mettre en évidence le potentiel génotoxique du MeHg. En fait, le MeHg semble exercer un effet clastogène (bris de chromosomes). Une augmentation significative du nombre d'aberrations chromosomiques est par le fait même observée. Finalement, il semblerait que le MeHg possède des propriétés antimitotiques.<sup>(94)</sup> Deux études ont réussi à montrer un lien entre les expositions chroniques au MeHg et le risque de développer une leucémie.<sup>(95,96)</sup> Le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) et la US Environmental Protection Agency (EPA) ont classé le MeHg comme cancérogène possible pour l'homme.<sup>(97,98)</sup>

## 3. Enquête populationnelle : Nituuchischaayihitaaau Aschii<sup>(10)</sup>

Depuis 2005, une enquête de santé populationnelle est réalisée dans le territoire de la Baie-James Cri du Québec, dans 7 des 9 communautés présentes sur le territoire. L'étude comportant le prélèvement d'échantillons biologiques (urine et sang) a débuté en juillet 2005 et s'est terminée en septembre 2009. Un total de 1426 personnes a participé à l'étude en répondant aux questions concernant leur état de santé, leurs habitudes de vie et leur alimentation. Tous les groupes d'âge sont représentés : 239 participants sont entre 0 et 7 ans, 221 entre 8 et 14 ans, 582 entre 15 et 39 ans et 384 avaient 40 ans et plus. Pour certains aspects de l'enquête, des groupes d'âge spécifiques sont ciblés. Différents tests ou questionnaires sont ainsi administrés à ces sous-groupes de participants. C'est dans le cadre de cette enquête que le projet de recherche discuté dans ce mémoire se déroule.

### 3.1 Les objectifs de l'enquête

En raison de la nouvelle convention sur le mercure, le Conseil Cri de la santé et des services sociaux de la Baie-James (CBHSSJB) a reconstitué son programme sur le mercure dans un contexte propre à l'environnement et à la santé. Pour cette étude, l'un des objectifs de la CBHSSJB était de mettre en place un système de biosurveillance à long terme en mettant l'accent sur l'exposition et les charges corporelles de certains contaminants, dont le mercure, dans les communautés liiyiu. Ces

activités doivent être réalisées de façon à favoriser l'intérêt communautaire tout en impliquant des questions d'environnement et de santé.

### 3.2 Fondements de l'enquête

Cette enquête, réalisée par le Public Health Department of the Cree Health Board et subventionnée par la corporation Niskamoon, porte en partie sur l'exposition à certains contaminants environnementaux par la consommation d'aliments traditionnels dans la population crie du Nord du Québec. Les concentrations observées ne sont pas encore considérées comme alarmantes, mais justifient la création d'une enquête visant à approfondir les effets potentiels d'une telle exposition sur la santé. Une surveillance des contaminants environnementaux doit se poursuivre afin de suivre l'évolution des niveaux de différents contaminants étant associés aux centrales hydro-électriques. Toutefois, étant donné les avantages connus de la consommation d'aliments traditionnels, cette pratique doit encore être encouragée au sein de cette population autochtone. D'autres enquêtes sur les sources d'exposition pourraient aider à fournir des recommandations visant à diminuer l'exposition aux contaminants tout en maintenant une alimentation traditionnelle.<sup>(10)</sup>

Plusieurs tests cliniques ont donc été effectués au cours de l'étude afin de fournir un portrait de l'état de santé globale de la population crie du Nord du Québec. Les chercheurs ont mis l'accent sur certaines maladies chroniques ou sur les conditions de santé qui peuvent être liées aux habitudes de vie ou encore à l'environnement. Ainsi, plusieurs paramètres ont été mesurés. Par exemple, des mesures de qualité du tissu osseux, les taux d'hormones thyroïdiennes, l'analyse de l'épaississement de la paroi des artères, l'hypertension, les taux d'obésité et de diabète ont été déterminés chez les participants.<sup>(10)</sup>

La santé environnementale reconnaît le lien étroit qui existe entre un environnement sain et une population en santé. Ceci est particulièrement vrai pour les populations humaines qui vivent un lien étroit avec leur environnement, par exemple pour se nourrir. La chasse et la pêche sont des activités faisant partie de la vie traditionnelle crie et la consommation d'aliments traditionnels amène de nombreux avantages, principalement en ce qui concerne la culture et la santé. En effet, il est maintenant bien documenté que la perte du mode de vie traditionnel cause des détresses chez les

populations touchées; de plus, une diminution de la quantité d'aliments traditionnels consommés a des conséquences négatives sur la santé.<sup>(99)</sup>

Les aliments traditionnels sont plus faibles en matières grasses totales, en graisses saturées et en glucides, en plus d'être d'excellentes sources d'acide gras de type oméga-3, de sélénium, des vitamines A, C, D et E, de fer, de zinc, de cuivre, de magnésium et de manganèse. L'absence de gras trans est un autre avantage. Ces attributs sont associés à un risque plus faible de, et la protection contre les maladies comme les maladies cardiovasculaires, certains cancers (par exemple, le cancer colorectal et de la prostate), l'obésité et diabète de type 2. Cependant, certains produits alimentaires traditionnels peuvent être contaminés par des polluants environnementaux tels que des métaux toxiques et divers produits chimiques organiques provenant de sources anthropiques. Les animaux sauvages peuvent également transmettre certaines maladies appelées zoonoses aux humains. La transmission peut se produire par la manipulation ou la consommation de spécimens infectés. Par conséquent, une évaluation des risques et des avantages associés à un régime alimentaire traditionnel a été jugée nécessaire. On souhaite aussi promouvoir des modes de vie sains et intégrer les habitudes traditionnelles au mode de vie actuel qui est en constante évolution. Cette étude visait donc à fournir des données quantitatives qui allaient permettre de répondre correctement à ces questions. Cette étude de santé environnementale a été créée pour répondre aux exigences de la convention sur le mercure de 2001 et fournir un suivi à l'étude Iiyiyu Aschii réalisée dans les communautés d'Oujé-Bougoumou et de Nemaska en 2005.<sup>(100)</sup>

### **3.3 Évaluation de l'exposition au méthylmercure**

Afin de caractériser, la charge corporelle en métaux toxiques et en organochlorés dans les différentes communautés cibles, les participants ont été invités à fournir différents échantillons biologiques. Le sang a été recueilli pour l'analyse du plomb, du mercure et du cadmium. Des échantillons de cheveux et d'ongles ont été obtenus pour l'analyse du mercure et du sélénium, respectivement. Enfin, des échantillons d'urine ont également été obtenus chez les participants des communautés visitées après 2007. Ces échantillons ont notamment été obtenus pour la mesure d'iode urinaire et pour déterminer les concentrations de métabolites urinaires de pesticides et d'autres contaminants. Ces échantillons urinaires ont été utilisés dans le présent travail pour identifier, par une approche métabonomique, des biomarqueurs d'effets de l'exposition au MeHg.

## 4. La métabonomique

### 4.1 Principes de base

La métabonomique est une discipline de la biologie moderne qui a vu le jour dans les années 1980. Cependant, cette discipline joue un rôle important, en recherche fondamentale ou en développement pharmaceutique, que depuis quelques années seulement.<sup>(101)</sup>

La métabonomique permet la mesure de changements survenant au niveau de l'ensemble des métabolites d'un organisme (petites molécules dont le poids moléculaire est inférieur à 1500 daltons), à la suite de stimuli physiopathologiques et ainsi de cibler des biomarqueurs d'intérêt spécifiques à ces stimuli.<sup>(102)</sup> En d'autres mots, grâce à la métabonomique, il est possible de mieux caractériser diverses pathologies, expositions ou intoxications, à partir de modèles animaux ou d'études chez l'humain, et de préciser les voies biochimiques altérées.<sup>(102,103)</sup> Appliquée à la toxicologie, la métabonomique permet d'étudier les perturbations métaboliques spécifiques liées aux effets indésirables générés par l'exposition aux substances chimiques (médicaments, produits industriels, etc.). Afin d'identifier de nouveaux biomarqueurs de toxicité, il est également nécessaire de connaître les variations normales de métabolites endogènes à l'intérieur de la population étudiée. Il est ainsi possible de découvrir les perturbations métaboliques étant spécifiques à la situation étudiée.

Une étude métabonomique se déroule en quatre étapes principales : l'obtention de fluides biologiques (sang, urine, salive, etc.) ou de biopsies contenant les métabolites à analyser, l'analyse des échantillons de l'étude, l'extraction des données métaboliques et finalement l'analyse statistique des données. La dernière de ces étapes requiert l'utilisation d'outils statistiques visant principalement à isoler un nombre restreint et significatif de paramètres parmi tous ceux ayant été mis en évidence lors des analyses instrumentales. Le principe général veut que les profils métaboliques d'au moins deux groupes d'études différents soient comparés les uns aux autres. Par exemple, dans le présent projet de maîtrise, les valeurs d'intensité moyennes pour différents métabolites urinaires ont été comparées entre deux groupes d'adultes crûs : un premier groupe de participants montrant de faibles teneurs sanguines en Hg et un second groupe montrant de fortes teneurs sanguines en Hg.

## 4.2 Analyses instrumentales

Différents instruments permettent la réalisation d'études sur l'altération des voies métaboliques. Des instruments analytiques à résonance magnétique nucléaire (RMN), ou encore des chromatographes en phase liquide ou gazeuse couplés à la spectrométrie de masse (LC-MS et GC-MS) sont les principaux instruments utilisés pour identifier des marqueurs de toxicité.<sup>(104-106)</sup> Au niveau de la spectrométrie de masse, les appareils de type « temps de vol » (Time of Flight ou TOF) sont souvent utilisés. Ces appareils permettent d'effectuer une analyse simultanée des différentes intensités de masses présentes dans un échantillon en une seule acquisition.<sup>(104)</sup>

Durant la réalisation de ce projet de maîtrise, des appareils de type LC-MS et GC-MS ont été utilisés. Ces deux techniques visent à séparer et caractériser les différents composés présents dans un échantillon. Ainsi, lorsqu'un LC ou un GC est couplé à un MS, les temps de rétention, les masses moléculaires et les intensités propres à différentes molécules inconnues peuvent être obtenus. Le temps de rétention dépendra d'une part de l'affinité (interaction chimique) entre la molécule et la phase stationnaire contenue dans la colonne chromatographique, et d'autre part de l'affinité de la substance pour les phases mobiles (solvants) utilisées. Plus l'affinité est grande pour la phase stationnaire, plus la molécule mettra du temps à sortir de la colonne pour rejoindre la partie MS du complexe analytique.<sup>(107,108)</sup> Concernant les valeurs d'intensités brutes, elles sont dépendantes de la sensibilité du spectromètre de masse envers chacune des molécules séparées. Dans le fluide analysé, deux molécules ayant la même intensité n'auront donc pas nécessairement la même concentration. Il est cependant possible de comparer les valeurs d'intensités obtenues entre plusieurs échantillons, pour une même molécule, en considérant que l'effet matrice est équivalent pour chaque échantillon.<sup>(107,108)</sup>

La spectrométrie de masse à temps de vol est une technologie dans laquelle les molécules ionisées sont accélérées par un champ électrique ayant une valeur connue.<sup>(109)</sup> Grâce à cette accélération, les ions de même charge électrique acquièrent la même énergie cinétique. La vitesse des ions par contre dépend du rapport masse/charge ( $m/z$ ). La valeur exacte de ce rapport est mesurée par le temps que met la molécule ionisée à atteindre un détecteur situé à une distance connue. Les particules les plus petites sont accélérées aux vitesses les plus élevées et mettent moins de temps pour atteindre le détecteur. La détermination du rapport  $m/z$  découle de ce temps de vol et de la connaissance des autres paramètres expérimentaux comme la position du détecteur et la tension d'accélération. À

l'aide d'un algorithme, la valeur temps est alors changée en valeur  $m/z$ .<sup>(109)</sup> Les valeurs  $m/z$  sont très utiles lors de la caractérisation de molécules analysées par GC ou LC-MS-TOF.

Ainsi, les intensités brutes, les temps de rétention et les masses exactes ( $m/z$ ) des différents métabolites détectés sont recueillis. Une masse de grande précision permet de réduire le nombre de formules moléculaires correspondant à chaque métabolite observé durant l'analyse. La variabilité inter-instrument étant beaucoup moins importante en GC, les bases de données sont plus complètes et le temps de rétention peut également être utilisé lors de l'identification de molécules. Certains spectromètres de masse du type « TOF » ont la capacité d'effectuer de la fragmentation moléculaire. Ces MS sont appelés « Q-TOF ». En fragmentant les molécules ciblées, aux endroits où les liens chimiques sont les plus faibles, il est possible de caractériser davantage un composé d'intérêt, en essayant d'avoir une meilleure idée de sa structure moléculaire et ainsi permettre une éventuelle identification. Des bases de données (en GC et LC) sont également accessibles qui contiennent les masses de fragmentation pour différentes molécules.

La RMN a pendant longtemps été considérée comme la technique de choix pour l'analyse métabonomique des biofluides provenant des études de toxicité. Désormais, en raison de sa meilleure sensibilité et de la possibilité d'obtenir la masse moléculaire des molécules étudiées, la GC-MS et la LC-MS sont utilisées de préférence à la RMN. La RMN demeure toutefois utile pour élucider la structure moléculaire des métabolites inconnus.<sup>(105)</sup>

### 4.3 Analyses statistiques

L'abondance des données issues de l'application de ces deux techniques instrumentales nécessite l'utilisation d'outils d'analyses statistiques multivariées. Pour avoir une idée générale des différences existant entre deux groupes, des tests de type bivariés (test de t de Student ou ANOVA) peuvent être appliqués sur les données obtenues lors des analyses instrumentales. Dans le cas où on souhaite savoir spécifiquement quelles entités possèdent le plus d'impact pour discriminer les profils métaboliques entre deux groupes, des tests multivariés comme une analyse en composantes principales (PCA), une analyse partielle de moindre carré (PLS-DA) ou une analyse partielle de

moindre carré orthogonale (OPLS-DA) peuvent être réalisées. Dans les cas où plus de deux groupes sont comparés, l'analyse par PLS-DA reste la meilleure option disponible.<sup>(110)</sup>

#### 4.4 Champs d'application

L'approche métabonomique est la toute dernière des sciences « omiques ». Cette méthode vise essentiellement à comparer les fluides biologiques provenant de participants sains à des participants atteints de la maladie ou de l'intoxication qui est à l'étude. Cette approche peut être utilisée tant chez l'humain que chez différentes espèces animales ou végétales.<sup>(111)</sup> Certains chercheurs expliquent plus en détail les grands principes, les avantages et les désavantages de l'application d'une telle approche scientifique appliquée à la toxicologie. C'est notamment le cas de Robertson, Wishart et coll., de Beger et coll. et de Feihn et coll.<sup>(102,103,111,112)</sup>

Depuis quelques années, la métabonomique a été utilisée dans divers axes d'études et a généré plusieurs résultats très intéressants. Par exemple, diverses études métabonomiques ont été réalisées dans le but de cibler des biomarqueurs spécifiques à certaines maladies comme le cancer de la prostate, le cancer du foie, l'athérosclérose et le diabète.<sup>(104,113-117)</sup> Un plus faible nombre d'études métabonomiques ont cependant été réalisées sur les altérations métaboliques générées par des expositions chroniques ou aiguës aux agents toxiques. Pour l'instant, la majorité de ces études ont été réalisées chez l'animal, principalement chez le rat. Des études sur le cadmium, le cuivre, le phénobarbital, le benzène, le déoxinivalénol, le butylbenzyl phtalate, sur certains fongicides de même que sur certains types de radiation, ont entre autres été réalisées.<sup>(118-125)</sup>

Au moment d'écrire ce mémoire, aucune étude n'avait encore été publiée sur l'analyse métabonomique en lien avec l'exposition chronique au MeHg chez l'humain. Une étude métabonomique réalisée chez des rats ayant été traités avec des doses croissantes de MeHg a récemment été réalisée par mon directeur de recherche. Les résultats de cette étude n'ont cependant pas encore été publiés et permettront éventuellement de comparer les biomarqueurs identifiés chez l'animal exposé à de fortes doses de mercure à ceux identifiés dans la présente étude chez une population exposée par la consommation de poissons.



## 5. Résumé du projet de maîtrise

Tel que mentionné auparavant, c'est dans le cadre de l'enquête populationnelle Nituuchischaayihititaa Aschii que la présente étude pilote visant à évaluer la relation entre les profils métaboliques urinaires et l'exposition au MeHg chez la population crie par approche métabonomique a été réalisée. Avant le début du projet, les concentrations sanguines en mercure total (organique et inorganique) avaient été mesurées chez les individus ayant participé à l'enquête. Ces valeurs ont donc été utilisées pour constituer les groupes de notre étude. Les échantillons d'urine provenant de chacun des individus sélectionnés ont été analysés par chromatographie liquide ou gazeuse couplée à la spectrométrie de masse dans le but de réaliser une analyse métabonomique en lien avec l'importance de leur niveau d'exposition au MeHg.

### 5.1 Objectifs

Ce projet de maîtrise comportait trois objectifs précis :

- Se familiariser avec les méthodes analytiques et statistiques propres à la métabonomique.
- Caractérisation de potentiels biomarqueurs urinaires reliés à une exposition chronique au MeHg.
- Suggérer des explications concernant les variations des niveaux de métabolites à l'aide de mécanismes biochimiques.

Ainsi, il a été possible d'étudier la relation entre les profils métaboliques urinaires et une teneur sanguine élevée en mercure total chez des adultes de la population crie du Nord du Québec, et ce, par approche métabonomique. Comme la consommation de poissons constitue la principale source d'exposition au mercure de cette population, ceux-ci sont donc exposés au mercure organique (MeHg).

## 5.2 Démarches

Des analyses instrumentales et statistiques, propres à l'approche métabonomique, ont été réalisées sur des échantillons urinaires provenant d'individus appartenant à trois groupes différents. Deux groupes d'adultes cris ont été constitués, l'un composé de participants dont les teneurs sanguines en mercure étaient faibles ( $< 12\text{nmol/L}$ ), et l'autre dont les participants avaient des teneurs élevées en mercure ( $> 70\text{ nmol/L}$ ). Le 3<sup>e</sup> groupe agissait comme groupe de référence et était composé d'adultes vivant dans le sud du Québec (population caucasienne) ayant été recrutés durant la phase d'optimisation du projet CARTaGENE (CaG). Le projet CaG recrute des participants dans le but de soutenir l'avancement de la recherche sur la génétique avec l'intention d'améliorer la santé de la population du Québec. Cette ressource comprend des banques de données environnementales, démographiques et relatives à la santé en plus d'une biobanque (ADN, prélèvements de sang, urine, etc.).

C'est en comparant les résultats obtenus pour les deux groupes des participants cris qu'il a été possible d'établir une liste de biomarqueurs urinaires susceptibles de varier en fonction de l'exposition au MeHg. Les échantillons d'urine de 53 adultes cris, soit 24 hommes et 29 femmes, en bonne santé, non-fumeurs et âgés entre 40 et 65 ans ont donc été analysés par des techniques de GC-TOF-MS et de LC-TOF-MS, et les profils métaboliques comparés à l'aide de diverses analyses statistiques. Les analyses par LC-TOF-MS ont été effectuées à l'Institut National de Santé Publique du Québec alors que les analyses par GC-TOF-MS ont été réalisées au Centre de Génomique de l'Université de la Californie à Davis. Le groupe de référence composé de 30 adultes du sud du Québec (15 hommes et 15 femmes) a été utilisé afin de pouvoir observer chez une autre ethnie, l'intensité de certains de ces biomarqueurs d'intérêt.

## Chapitre 2: Article

### **Relation between methylmercury exposure and urinary metabolite profiles in Cree adults from Northern Quebec (Canada)**

Cet article sera soumis pour publication à la revue *Toxicological Sciences*

#### **Résumé**

La consommation de produits de la mer a été reliée à une exposition relativement élevée au méthylmercure chez la population crie habitant dans le nord du Québec (Canada). Nous avons adopté une approche métabonomique afin d'identifier des biomarqueurs urinaires d'effets précoces en plus d'avoir un aperçu des voies métaboliques qui sont altérées par cette exposition. Les technologies de chromatographie en phase gazeuse (GC) et en phase liquide (LC) couplée à la spectrométrie de masse (MS) ont été utilisées pour le profilage métabolique des échantillons d'urine. Ces échantillons provenaient d'adultes (40-65 ans) ayant participé à une enquête de santé entre 2007 et 2009 et ayant soit une faible concentration (<12 nmol / L; 12 hommes et 14 femmes) ou une forte concentration (> 70 nmol / L, 12 hommes et 15 femmes) de mercure sanguin. Des analyses statistiques multivariées et bivariées ont été effectuées dans le but de comparer les profils métaboliques urinaires et d'isoler des biomarqueurs potentiels liés à une exposition chronique au méthylmercure. Douze métabolites différents ont pu être ciblés suite à l'analyse des données ayant été obtenues par LC-MS, alors que 5 l'on été par GC-MS. Trois des métabolites ciblés par GC-MS ont été identifiés sans ambiguïté (adénosine, acide lactique et xylose). Les intensités de la plupart des biomarqueurs potentiels chez le groupe d'hommes crs faiblement exposés étaient similaires à ceux d'un groupe de référence composés d'hommes du sud du Québec. L'augmentation du lactate urinaire suivant une exposition au MeHg pourrait refléter une diminution de la réabsorption des acides organiques au niveau du tubule proximal. Une caractérisation plus poussée des biomarqueurs potentiels ciblés par LC-MS a été tentée et sera poursuivie afin de mieux comprendre les voies métaboliques affectés lors d'une exposition chronique au méthylmercure et d'identifier les biomarqueurs qui serviront à prévenir les effets toxiques induits par une exposition à ce contaminant.

## **Relation between methylmercury exposure and urinary metabolite profiles in Cree adults from Northern Quebec (Canada)**

Pierre-Yves Tremblay<sup>a,b</sup>, Éric Gaudreau<sup>a</sup>, Mine Palazoglu<sup>c</sup>, Oliver Fiehn<sup>c</sup>, Éric Dewailly<sup>b</sup>, and Pierre Ayotte<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de toxicologie, Direction de la santé environnementale et de toxicologie, Institut national de santé publique, Québec, Canada ; <sup>b</sup> Axe en santé des populations et environnementale, Centre de recherche du CHUQ, Québec, Canada ; <sup>c</sup> UC Davis Genome Center, University of California, Davis, CA

\* To whom correspondence should be addressed:

Laboratoire de toxicologie  
Direction de la santé environnementale et de toxicologie  
INSPQ  
945 Wolfe, Quebec, QC  
Canada G1V 5B3

Keywords: methylmercury; urinary metabolites; metabolomics; mass spectrometry; Cree population.

### **Abstract**

Seafood consumption has been linked to a relatively high exposure to methylmercury in Cree people living in northern Quebec (Canada). We used a metabolomic approach to identify potential biomarkers of early effects and gain some insight on metabolic pathways altered by this exposure. Gas-chromatography (GC)/mass spectrometry (MS) and liquid-chromatography (LC)/MS platforms were used for the metabolic profiling of urine samples obtained from adults (40-65 years old) with either low (<12 nmol/L; 12 men and 14 women) or high (>70 nmol/L; 12 men and 15 women) blood mercury concentrations, who participated to a comprehensive health survey between 2007 and 2009. Multivariate discriminant analyses and bivariate analyses were conducted to compare urinary metabolite profiles and identify potential biomarkers related to chronic methylmercury exposure. We targeted a total of 12 different metabolites from entities measured by LC-MS analyses and 5 from entities measured by GC-MS analyses, including three unambiguously identified metabolites

(adenosine, lactic acid, xylose). Intensities of most biomarkers measured in Cree men belonging to the low-exposure group were similar to those determined in a reference group of Caucasian men from southern Quebec. Increases in urinary lactate with MeHg exposure may reflect a decreased reabsorption of organic acids at the proximal tubule. Further characterization of potential biomarkers targeted by LC-MS was attempted and should be pursued, in order to better understand metabolic pathways that are affected by methylmercury exposure and identify biomarkers for the prevention of toxic effects induced by exposure to this food-chain contaminant.

## Introduction

The acute toxicity of methylmercury (MeHg) on the nervous system was revealed following major poisoning events. One such episode happened in Minamata (Japan) in the mid 1950's and was caused by the consumption of fish caught around Minamata Bay, which received wastewater containing MeHg produced by a nearby factory. Another major event was the poisoning epidemic that occurred in Iraq in 1971–72, which was linked to the consumption of MeHg-treated wheat grain. MeHg is formed through methylation of inorganic mercury by microorganisms in waterbodies and is biomagnified in species from the aquatic food web, leading to relatively high concentrations (ppm levels) in predatory fish and sea mammals. Populations throughout the world that rely on seafood for subsistence exhibit chronically elevated blood mercury levels and may be at risk of adverse effects mainly on the nervous and cardiovascular systems.<sup>(8,9,126)</sup> Seafood consumption has been linked to high blood mercury concentrations in northern Quebec Crees, an aboriginal fish eating population.<sup>(7,8)</sup> The consequences of this exposure for the health of Cree people have yet to be investigated.

Biochemical effects induced by MeHg exposure include the generation of reactive oxygen species and the interaction with thiol and selenol groups of small molecules and proteins.<sup>(70,127)</sup> These biochemical changes may constitute intermediary effects in pathological sequences leading to cardiovascular effects and neurotoxicity.<sup>(78,128)</sup> Considering the numerous biochemical targets of MeHg, exposure to this compound is likely to modify the profile of small molecules in biological fluids of exposed individuals.<sup>(70,127)</sup> A thorough analysis of metabolites in biological fluids of individuals exposed to MeHg using a metabonomic approach may generate new information on the mechanism of action leading to MeHg-induced toxicity and could lead to the discovery of biomarkers of early effects.

A metabolomic study comprises four main steps: 1) the collection of biological fluids or biopsies containing metabolites to be analyzed; 2) the instrumental analyses of samples; 3) the extraction of all metabolic data; and 4) the identification of a limited number of significant entities that best discriminate study groups, using multivariate statistical analyses.<sup>(78,102,112)</sup>

In 2005, a large scale health survey was initiated in the Cree population of northern Quebec, entitled "Nituuchischaayihitaa Aschii: A Multi-Community Environment-and-Health Longitudinal Study in liyiyiu Aschii". In the course of the current study, we investigated the relationship between urinary metabolic profiles and blood mercury levels in northern Quebec Cree adults using a metabolomic approach. This was done to identify biomarkers potentially related to MeHg exposure using a metabolomic approach. This new analytical approach aims at measuring changes in all metabolites of an organism (small endogen molecules with a molecular weight less than 1500 daltons), following pathophysiological stimuli.<sup>(78,102,103,112)</sup>

Liquid chromatography (LC) and gas chromatography (GC) hyphenated to time-of-flight mass spectrometry (TOF-MS) were used to generate metabolic profiles in urine samples of participants. We then used multivariate statistical analyses to identify entities that are most influential in explaining differences in metabolic profiles between study groups. In addition, comparisons of peak intensities for potential biomarkers were made with those of a reference group from a different ethnicity (Caucasians from southern Quebec).

## **Materials and methods**

### **Study groups**

We constituted groups of Cree men and women with elevated (>70 nmol/L; 12 men and 15 women) or low (<12 nmol/L; 12 men, 14 women) blood Hg concentrations, who were selected among

participants to the health survey entitled: “Nituuchischaayihitaa Aschii: A Multi-Community Environment-and-Health Longitudinal Study in liyiyiu Aschii”. Participants were residents of one of four communities visited from 2007 to 2009, aged between 40 and 65 years old, non-smokers and in good health. The 40-65 years age group was chosen over other age groups because of the larger proportion of individuals showing high blood mercury levels.

We also constituted a reference group comprised of 15 men and 15 women of Caucasian origin who were recruited during the optimisation phase of the CARTaGENE project ([www.cartagene.qc.ca](http://www.cartagene.qc.ca)). These individuals were residents of a southern Quebec urban centre, non-smokers, in good health and were matched by age (5-year category) and gender to each Cree participant. Although no blood mercury measurement was available for these participants, it is assumed that their levels are most likely very low, since in 2003, the average concentration determined into a sample of the general population of Quebec City was 3.7 nmol/L.<sup>(16)</sup> This reference group was used for statistical comparisons (see statistical analyses section), once the potential biomarkers were targeted, as further evidence that the differences observed between the two Cree study groups were probably due to MeHg exposure. Hence, a total of 83 urinary samples obtained from Cree and southern Quebec individuals were included in each sequence analyzed either by LC- or GC-TOF-MS. All participants had fasted for a period of at least 12 hours and provided a spot urine sample during their visit at the clinic. Samples were stored frozen at -80°C until time of analysis.

The protocol of the study was approved by ethics committee from CHUQ Research Centre and Université de Montréal. In addition the Sample and Data Access Committee from CARTaGENE approved the use of urine samples and access to the database for the purpose of the present study.

### **Instrumental platforms**

Urine samples were analyzed on LC-TOF-MS (two different chromatography columns) and GC-TOF-MS platforms to screen a wide array of metabolites for potential biomarkers. Relative intensities, retention times and exact masses of entities measured with both platforms were compiled for each participant.

GC-TOF-MS. This platform comprises an Agilent 6890 GC (Agilent technologies) coupled to a Leco Pegasus IV TOF-MS (Leco Corp. St-Joseph, MI); it was used to screen for primary metabolites after sample extraction and derivatization. A complete description of the platform, sample preparation, chromatography and mass spectrometry conditions, and the procedure for data extraction can be found in Taylor et al. <sup>(129)</sup>

LC-TOF-MS. Urinary metabolites were separated on a high-performance liquid chromatography instrument (Acquity UPLC system; Waters Ltd, Mississauga, ON, Canada) and exact mass determined by time-of-flight mass spectrometry using a Micromass LCT Premier™ system (Waters).

LC-Q-TOF-MS. Further characterization of potential biomarkers identified by LC-TOF-MS analyses was attempted by fragmenting the molecules of interest using a quadrupole time of flight instrument (Xevo-G2-Q-TOF from Waters).

The procedures used for metabolomic analyses on the LC-TOF-MS and LC-Q-TOF-MS platforms are described below.

### **Chemicals and reagents**

Formic acid and HPLC grade solvents were purchased from EM Science (Gibbstown, NJ). All compounds used in quality control samples were obtained from Cerilliant (Round Rock, TX) or Sigma Aldrich (St-Louis, MO).

### **Sample preparation**

The procedure for urine sample preparation was derived from that of Chen et al. <sup>(130)</sup> First, a 500- $\mu$ L aliquot of urine was pipetted into a 1.5-mL microtube (Sarstedt, Montréal, QC, Canada). One mL of MeOH was added to each sample to precipitate proteins. After standing at 4°C for 2 h, samples were centrifuged at 4°C (13,000 x g) during 15 min. A 1-mL aliquot of the supernatant was transferred into another 1.5-mL microtube and evaporated using a Rapidvap instrument (Labconco Corp., Kansas City, MO). Samples were then reconstituted in 1 mL of a mixture containing 98% water, 2% methanol and 0.1% formic acid. The final dilution factor of the urine sample was therefore 1:3. A 250- $\mu$ L aliquot of



the resulting mixture was transferred into a polypropylene vial specific to the Acquity UPLC system. The same procedure was used to prepare samples for LC-Q-TOF-MS analyses.

### **Chromatography conditions**

Separation of metabolites by a high pressure HPLC system was achieved on two different Waters Acquity columns: a HSS T3 column (1.8 microns, 2.1 x 100 mm) and a BEH Shield RP18 column (1.7 microns, 2.1 x 100 mm). Columns and samples were maintained at temperatures of respectively 35°C and 20°C. The flow of the mobile phases was 0.350 mL/min. The two mobile phases were H<sub>2</sub>O (0.1% formic acid) for phase A and methanol (MeOH; 0.1% formic acid) for phase B. The concentration gradient was as follows: 1) at the start the proportion of phases A:B was 98:2 and was increased gradually to reach 2:98 within a 26-min period, 2) 2 min at 0:100; 3) 2 min at 98:2. A seal wash was performed every 5 min to avoid accumulation of salts in and on the gear pump. Between each injection, two washes of the injection syringe were performed: 1) 200 µL of a 50% H<sub>2</sub>O, 50% MeOH and 0.1% formic acid mixture; 2) 600 µL of a 95% H<sub>2</sub>O, 5% MeOH and 0.1% formic acid mixture. The injection volume of the urine samples was 5 µL. The same chromatography conditions were used for LC-Q-TOF-MS analyses.

### **Mass spectrometry conditions**

Data were acquired with the Micromass LCT Premier™ operated in electrospray positive mode using a capillary voltage of 3 kV and a sample cone voltage of 50 V. The desolvation temperature was 350°C while the source was maintained at 120°C. The sample cone gas flow was 10 L/h while that for desolvation was 800 L/h. A reference solution (lock mass) containing sulfadimetoxine ( $m/z$  +H: 311.0814) at a concentration of 0.3 mg/L was injected continuously throughout each analytical sequence at 5 µL/min. Data were collected in continuum mode over a 30-min period (liquid chromatography separation time) for  $m/z$  values between 100 and 800. Data acquisition was conducted every 0.25 sec and a measurement of the reference solution was made once every 20 acquisitions.

Fragmentation data were acquired with the Xevo-G2-Q-TOF-MS operated in positive polarity sensitive mode and in a normal dynamic range. The capillary voltage was 3 kV and sample cone voltage was set at either 40, 50 or 60V depending of the molecule analyzed. Desolvation

temperature was 350°C while the source was held at 120°C. The gas flow to the sample cone was 10 L/h while that for desolvation was 600 L/h. The lock mass reference solution contained leucine enkephalin ( $m/z$  +H: 556.7117) at a concentration of 0.3 mg/L and was injected continuously throughout each analytical sequence at a flow rate of 15  $\mu$ L/min. Data were collected in centroid mode over a mass range of  $m/z$  50 to 1000. To generate molecular fragmentation, a collision energy ramp starting at 15V and ending at 70V was also used. Data acquisition measurement was performed every 0.20 sec and a measurement of the reference solution was made once every 20 acquisitions.

### **Data Extraction**

Mass spectra corresponding to the intensity values of numerous unknown entities obtained by LC-TOF-MS were compiled with the MarkerLynx XS application manager software (Waters). First, all chromatographic data were compiled, based on the mass spectra and the corresponding retention times. By setting some inclusion parameters, the Markerlynx software can treat, compile and statistically analyze all intensity values acquired during instrumental analysis. For this study, the retention time range was set from 1 to 23 min, due to the fact that the background noise was more important from 24 to 30 minutes. The mass range was from 100 to 700 Da since endogenous metabolites rarely have mass values outside this range. For a mass and the corresponding intensities to be considered in the data compilation, at least one chromatographic peak had to exceed an intensity of 300 counts. For a mass value to be considered the same between samples, the mass window was 0.05 Da, while the window for the retention time was 0.45 min. Finally the parameter that controls the noise level was set at 5.00. Once the data compiled, the MarkerLynx XS software was used to perform multivariate data analyses.

Raw intensities expressed as area under the curve (AUC) values for chromatographic peaks were normalised based on the average of total intensities measured in samples. Before performing statistical analyses, all mass spectra and corresponding intensity values were sorted by sample and by groups.

### **Statistical Analysis**

As mentioned previously, the main purpose of this study was to identify biomarkers potentially related to a high MeHg exposure. The aim of the statistical analysis was to compare intensity values

of entities measured in urine samples of individuals in the low blood [Hg] group vs high blood [Hg] group. Each injection sequence done on either LC- or GC-TOF-MS included all urine samples (83) to minimize the impact of possible instrumental drift. However, to remove the gender variable as a potential source of error, statistical analysis of the data was performed separately for men and women.

As stated above, all samples were analysed on two different LC columns and in duplicate. An orthogonal partial least square discriminant analysis (OPLS-DA) was conducted for each resulting dataset. Therefore, a total 8 OPLS-DA were conducted. OPLS regression is performed to reduce the intensity measurements of a large number of peaks to a small number of latent components that explain most of the intergroup variation.<sup>(131)</sup> "S-plot" graphics were generated to help visualize intergroup differences and identify metabolites that are mainly responsible for the difference in metabolic profiles between study groups. For each OPLS-DA, entities that had a covariability or a covariance value  $<-0.06$  or  $>0.06$  were selected for further statistical testing. A Student t-test was then conducted on each candidate that had been selected through this procedure. To be considered as a potential biomarker, differences in mean intensities between groups had to be statistically significant (Student's t-test;  $p < 0.05$ ) and the percentage of positive intensity values greater than 80% at least in one of the two study groups. Finally, as samples were analyzed in duplicate analyses, potential biomarkers had to be statistically targeted in both analytical sequences to be retained.

For the GC-TOF-MS data analysis, the statistical selection process was similar to the one used for LC-TOF-MS data. A PLS-DA analysis was performed using the MetaboAnalyst web server.<sup>(132)</sup> To identify which variables were responsible for the separation, the variable influence on the projection (VIP) parameter was used to select variables that have the most significant contribution in discriminating between metabolomic profiles of the high blood [Hg] group vs the low blood [Hg] group in the PLS-DA model. VIP is a weighted sum of squares of the PLS weight which indicates the importance of the variable to the whole model.

Using box and whiskers plots, intensity value distributions for each potential biomarker targeted during this statistical evaluation were visually compared between the two groups exposed to MeHg and also with a southern Quebec reference group. One-way analyses of variance were conducted to

compare intensity values between groups. Two orthogonal comparisons were made: 1) southern Quebec group vs low blood [Hg] Cree group, and 2) low blood [Hg] vs high blood [Hg] Cree groups.

## Results

LC-TOF-MS. On average 7000 different chromatographic peaks (entities) were detected in each analytical sequence. Retention times, masses and intensities (normalized AUC), corresponding to each entity were compiled separately for each of the 8 datasets (2 runs x 2 columns x 2 genders). We used a multivariate discriminant analysis (OPLS-DA in MarkerLynx software) to find metabolites responsible for the difference in metabolic profiles between groups with low and high MeHg exposure (as indicated by blood Hg levels). We subsequently tested the difference in mean peak intensity between the groups (by Student t-test) for each entity targeted by the discriminant analysis.

A total of 14 potential biomarkers were targeted during the instrumental analyses (9 with HSS T3 and 5 with the Shield RP18). Table 1 lists for all of them the exact mass, the retention time, the mean intensity ratio (High [Hg]/ Low [Hg]), the p-value for the Student-t test, a possible molecular formula and the corresponding exact mass suggested by the MarkerLynx software. Twelve out of these 14 entities were observed by contrasting men groups. One of the potential biomarkers was targeted on both columns; therefore 11 different biomarkers were observed by contrasting men groups. Figure 1 shows results of the OPLS-DA for the men dataset obtained with the HSS T3 column. Only two potential biomarkers were noted in women. One potential biomarker was observed with the HSS T3 column (Table 1); interestingly this entity was also noted in men when analyses were performed using the HSS T3 column ( $m/z$ : 438.115). The other potential biomarker was observed when the Shield RP18 column was used to analyse urine samples from Cree women.

Figure 2 shows box and whiskers plots of peak intensity distributions and the ANOVA test results for two potential biomarkers in the Cree groups with high and low [Hg], and in the southern Quebec reference group. For both entities, mean intensity values were similar in the southern Quebec group and the Cree low [Hg] group, but much higher in the Cree high [Hg] group. Differences between the reference group and the Cree low [Hg] group were not statistically significant for all potential biomarkers except  $m/z$  203.10 and 258.107. However, statistically significant differences were observed for all potential biomarkers when comparing intensities between the Cree high [Hg] group and the other two groups pooled together ( $p < 0.05$ ).

Additional instrumental analyses were performed to further characterize entities that seem to be important contributors to the difference in metabolic profiles observed between the two Cree groups differently exposed to MeHg. Using a Xevo-G2-Q-TOF-MS instrument, these entities were fragmented and exact masses obtained for several fragments. Table 2 summarizes the fragmentation information for the two targeted biomarkers. Fragment masses  $m/z$  181.011, 199.023, 219.020 and 245.079 were common to both biomarkers  $m/z$  262.079 and 438.166.

GC-TOF-MS Several potential biomarkers were also targeted following GC-TOF-MS data analysis. The metabolomics BinBase database allowed for the unambiguous identification of entities based on matching retention index and mass spectra features. Processing of the raw data for the two groups differently exposed to MeHg yielded 151 peaks, corresponding to either identified metabolites or unknown metabolites that had already been seen in previous analysis performed in the Fiehnlab. Gender-specific PLS-DA analyses were performed to pinpoint metabolites that discriminate groups of participants according to their MeHg exposure. The intensity measurements of 151 peaks were reduced to a small number of latent components that explained most of the variation. Figure 3A show the separation of Cree men groups with high and low blood mercury levels by partial least square analysis. Candidates were targeted depending on the magnitude of their VIP scores and the 15 compounds with highest scores are presented in Figure 3B. From these candidates, those for which mean intensity values were different between groups by a Student t-test were selected as potential biomarkers. One unidentified (349036) and three identified metabolites (adenosine, lactic acid, xylose) were targeted for the Cree men dataset, while one unidentified entity (223531) was targeted for the Cree women dataset (Table 3).

Figure 4 shows box and whiskers plots of peak intensity distributions and the ANOVA test results for two potential biomarkers in the Cree groups with high and low blood [Hg], and the southern Quebec reference group. Although the mean intensity value of lactic acid in the Cree high blood [Hg] group appears higher than those of the other groups, this difference was not statistically significant (figure 4A). The mean intensity value of unknown 349036 (figure 4B) in the Cree high blood [Hg] group was lower than those in the southern Quebec group and the Cree low [Hg] group ( $p < 0.05$ ). Differences between the reference group and the Cree low [Hg] group were not statistically significant for all potential biomarkers. Except for lactic acid, statistically significant differences were observed for the other potential biomarkers when comparing intensities between the Cree high [Hg] group and the other two groups pooled together ( $p < 0.05$ ).

Quality assurance data for the LC-TOF-MS analyses are shown in figure 5. Figure 5A shows the scatter plot of metabolite intensities measured in two different analytical runs for a randomly selected urine sample (ID #31). The Pearson's correlation coefficient was 0.985 between both sets of intensity measurements. Mean intensity values were also consistent between runs, with mean values varying by less than 20% between LC-TOF-MS runs for the vast majority of metabolites (Fig. 5B). Hence the between run variability was acceptable for the LC-TOF-MS analyses. QA data for the GC-TOF-MS platform used in the present study were provided by Taylor et al.<sup>(129)</sup>

## Discussion

The main purpose of this pilot study was to target potential biomarkers that are specific to environmental MeHg exposure in the northern Quebec Cree population. To do so, several unknown entities were separated and partially characterized in urine samples. Using a metabolomic approach and two analytical platforms, several potential biomarkers were targeted that are major contributors to differences in metabolic profiles noted between Cree participants with high vs low MeHg exposure.

Using the LC-TOF-MS platform, 11 different biomarkers were observed after statistical analysis of the Cree men database. By comparing exact mass spectra and their respective intensity values, we noted that one potential biomarker was present in each duplicate analysis for both chromatographic columns used ( $m/z$ : 354.148). Hence the confidence level regarding the significance of this biomarker is high. Analysis of Cree women samples yielded a smaller number of potential biomarkers: only two potential biomarkers were noted, but one of them was also present among the potential biomarkers observed in the Cree men analyses ( $m/z$ : 438.113). Further characterization of these potential biomarkers was therefore warranted.

We used a LC-Q-TOF-MS instrument to gain more information on the possible identity of metabolites  $m/z$  438.113, 354.164 and 262.079. The fragmentation data shown in Table 2 suggest that metabolites  $m/z$  438.113 and 262.079 are structurally related. Indeed, the exact mass spectra of  $m/z$  262.079 was found at the 5.7-min retention time with the column HSS T3, but also as the first major fragmentation in the exact mass spectra of  $m/z$  438.113. These two compounds also have other mass fragments in common (see Table 2). The mass difference of 176 Da between these two candidates indicates that metabolite  $m/z$  438.113 is probably the glucuronidated metabolite of compound  $m/z$

262.079. Unfortunately, we could not further precise the identity of the metabolites using the fragmentation data and major databases such as ChemSpider and NIST.

Analyses performed on the GC-TOF-MS platform allowed additional potential biomarkers to be targeted. Contrasting metabolite patterns between the two Cree men groups revealed 4 candidates, including adenosine, xylose and lactic acid. Holmes and colleagues have reported increased concentrations of lactic acid in the urine of rats treated with mercuric chloride compared to saline-treated controls.<sup>(133,134)</sup> An increase in urinary lactate levels is consistent with renal damage (cortical region) caused by  $\text{HgCl}_2$ , which was previously reported by Holmes et al. and Gartland et al.<sup>(133,135)</sup> Hence, the higher levels of lactic acid in the group with high MeHg exposure may indicate some renal toxicity in these individuals, which could be due in part to the accumulation of inorganic mercury in this organ. Alternatively, cysteine conjugates of MeHg have been shown to be transported by OAT1 and amino acid transporters.<sup>(40)</sup> Competition between MeHg-Cys, organic acids and amino acids for these transporters located in the proximal tubules could explain the increase of lactic acid and adenosine in urine of Cree participants highly exposed to MeHg.

Comparisons of mean intensity levels between the Cree groups and the southern Quebec reference group revealed that for most potential biomarker candidates, mean intensity values were similar for the Cree group with low MeHg exposure and the southern Quebec reference group. This provides increased confidence that the potential biomarkers are indeed related to MeHg exposure. However, because exposure to MeHg is linked to fish consumption and a more traditional way of life, differences between groups could also be linked to these confounding factors.

One strength of our study is the use of GC-MS and LC-MS instrumental platforms to maximize the number of observed entities and in turn potential biomarkers that could be targeted. Furthermore, the use of two different chromatographic columns in LC-TOF-MS analyses (HSS T3 and a Shield RP18) provided additional metabolite coverage. The HSS T3 consists of a C18 chain bonded to a high strength silica particle substrate (HSS) and can separate adequately polar compounds. The Shield RP18 column, which contains C18 chains and also polar groups bonded to ethylene bridged hybrid substrate (BEH), can also separate properly non-polar compounds in addition to polar ones. Both columns were therefore well suited to separate metabolites found in urine samples.

Quality controls were also analyzed within the LC-MS-TOF analytical sequences. A blank and a reference sample were inserted every 12 urine samples. The reference sample consisted in a mixture of acetaminophen D4, cocaine D3, sulfadimetoxin, leucine enkephalin and erythromycin. The use of the blank sample allowed verifying for the occurrence of compound carry over between runs. No significant changes in the exact mass or the retention time of the standards in the reference sample occurred during this study that comprised four analytical sequences. The figure provided in the supplemental materials shows the good reproducibility on the retention times, m/z and intensity values for the cocaine D4 standard injected at the beginning at the end of the two analytical runs (Supplemental materials). Quality controls for the GC-TOF-MS method were described previously and include various external standards.<sup>(129)</sup> The addition of internal standards to urine samples should be considered in future studies in order to monitor for analyte loss during sample preparation. We should also mention that only semi-quantitative measurements of metabolite abundance can be achieved by the platforms used in the present study.

In this pilot study, we were limited by the number of Cree adults who participated in the health survey and exhibited elevated blood mercury levels. The low number of participants in each group diminished our ability to identify additional potential biomarkers related to MeHg exposure in this population. Increasing the number of participants would also allow to control for possible confounding factors such as nutrient intake (omega-3 fatty acid, selenium) and exposure to polychlorinated biphenyls and other persistent organic pollutants that are associated to fish consumption in the Cree population.<sup>(136)</sup>

In summary, we identified 17 different urinary biomarkers that may be linked to a high exposure to MeHg in an aboriginal fish-eating population of northern Quebec. Additional analyses using our newly acquired LC-Q-TOF-MS instrument are warranted to identify the chemical structure of unknown biomarkers targeted in the present study. Only then will it be possible to improve our knowledge of chemical pathways that are altered following chronic MeHg exposure. Moreover, the discovery of biomarkers of exposure and effects may also help to better assess the health condition of individuals exposed to MeHg. Biomarkers of MeHg toxicity on the nervous, cardiovascular and renal systems are needed for the prevention of adverse health effects in population exposed to this marine food-chain toxicant.



## Acknowledgments

We would like to thank Suzanne Côté who supervised the field work in the Cree communities and Yves Payette, the curator of the CARTaGENE database. We gratefully acknowledge the financial support of FRSQ's Environmental Health Research Network.

## References

- (1) Noel F, Rondeau E, Sbeghen J. Communication of risks: organization of a methylmercury campaign in the Cree communities of James Bay, Northern Quebec, Canada. *Int J Circumpolar Health*;57 Suppl 1:591-5.
- (2) Valera B, Dewailly E, Poirier P. Environmental mercury exposure and blood pressure among Nunavik Inuit adults. *Hypertension*;54(5):981-6.
- (3) Dorea JG. Fish are central in the diet of Amazonian riparians: should we worry about their mercury concentrations? *Environ Res*;92(3):232-44.
- (4) Girard M, Noel F, Dumont C. Varying mercury exposure with varying food source in a James Bay Cree community. *Arctic Med Res*;55(2):69-74.
- (5) Allen JW, Shanker G, Tan KH, Aschner M. The consequences of methylmercury exposure on interactive functions between astrocytes and neurons. *Neurotoxicology*;23(6):755-9.
- (6) Ercal N, Gurer-Orhan H, ykin-Burns N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem*;1(6):529-39.
- (7) Ceccatelli S, Dare E, Moors M. Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis. *Chem Biol Interact*;188(2):301-8.
- (8) Park K, Mozaffarian D. Omega-3 Fatty acids, mercury, and selenium in fish and the risk of cardiovascular diseases. *Curr Atheroscler Rep*;12(6):414-22.
- (9) Robertson DG. Metabonomics in toxicology: a review. *Toxicol Sci*;85(2):809-22.
- (10) Weckwerth W, Fiehn O. Can we discover novel pathways using metabolomic analysis? *Curr Opin Biotechnol*;13(2):156-60.
- (11) Beger RD, Sun J, Schnackenberg LK. Metabolomics approaches for discovering biomarkers of drug-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*;243(2):154-66.
- (12) Direction Toxicologie Humaine, Direction Risques Biologiques Environnementaux et Occupationnels. Étude sur l'établissement de valeurs de référence d'éléments traces et de métaux dans le sang, le sérum et l'urine de la population de la grande région de Québec. 2003. p. 24.

- (13) Taylor SL, Ganti S, Bukanov NO, Chapman A, Fiehn O, Osier M, Kim K, Weiss RH. A metabolomics approach using juvenile cystic mice to identify urinary biomarkers and altered pathways in polycystic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*;298(4):F909-F922.
- (14) Chen J, Zhao X, Fritsche J, Yin P, Schmitt-Kopplin P, Wang W, Lu X, Haring HU, Schleicher ED, Lehmann R, Xu G. Practical approach for the identification and isomer elucidation of biomarkers detected in a metabolomic study for the discovery of individuals at risk for diabetes by integrating the chromatographic and mass spectrometric information. *Anal Chem*;80(4):1280-9.
- (15) Nguyen DV, Rocke DM. Partial least squares proportional hazard regression for application to DNA microarray survival data. *Bioinformatics*;18(12):1625-32.
- (16) Xia J, Psychogios N, Young N, Wishart DS. MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. *Nucleic Acids Res*;37(Web Server issue):W652-W660.
- (17) Holmes E, Bonner FW, Sweatman BC, Lindon JC, Beddell CR, Rahr E, Nicholson JK. Nuclear magnetic resonance spectroscopy and pattern recognition analysis of the biochemical processes associated with the progression of and recovery from nephrotoxic lesions in the rat induced by mercury(II) chloride and 2-bromoethanamine. *Mol Pharmacol*;42(5):922-30.
- (18) Holmes E, Nicholls AW, Lindon JC, Connor SC, Connelly JC, Haselden JN, Damment SJ, Spraul M, Neidig P, Nicholson JK. Chemometric models for toxicity classification based on NMR spectra of biofluids. *Chem Res Toxicol*;13(6):471-8.
- (19) Gartland KP, Bonner FW, Nicholson JK. Investigations into the biochemical effects of region-specific nephrotoxins. *Mol Pharmacol*;35(2):242-50.
- (20) Zalups RK, Ahmad S. Handling of cysteine S-conjugates of methylmercury in MDCK cells expressing human OAT1. *Kidney Int*;68(4):1684-99.
- (21) Dewailly E, Ayotte P, Lucas M, Blanchet C. Risk and benefits from consuming salmon and trout: a Canadian perspective. *Food Chem Toxicol*;45(8):1343-8.

**Table 1:** Potential urinary biomarkers associated with elevated blood mercury levels in Cree men and women by LC-TOF-MS analysis.

| Ret. Time (min) | Mesured m/z* | Gender | OPLS-DA number** | Chomatographic column | Intensity ratio High/Low [Hg] | t-test (p-value) | Possible Molecular Formula                                      | Theoretical m/z |
|-----------------|--------------|--------|------------------|-----------------------|-------------------------------|------------------|---|-----------------|
| 5.82            | 180.084      | M      |                  | RP 18                 | 0.21                          | 0.0153           | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> S                  | 180.083         |
| 1.22            | 203.107      | M      | 8                | HSS T3                | 2.08                          | 0.0043           | C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>    | 203.110         |
| 3.99            | 231.143      | M      | 7                | HSS T3                | 1.63                          | 0.0048           | C <sub>11</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>                 | 231.149         |
| 6.30            | 258.107      | M      | 2                | HSS T3                | 10.31                         | 0.0005           | C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>                  | 258.109         |
| 17.35           | 262.079      | M      | 5                | HSS T3                | 5.64                          | 0.0120           | C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>    | 262.081         |
| 15.97           | 354.164      | M      |                  | RP 18                 | 0.34                          | 0.0014           | C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O                | 354.1732        |
| 18.07           | 354.164      | M      | 1                | HSS T3                | 0.28                          | 0.0087           | C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O                | 354.1732        |
| 15.48           | 424.172      | M      | 4                | HSS T3                | 4.11                          | 0.0072           | C <sub>22</sub> H <sub>29</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>   | 424.176         |
| 14.77           | 438.113      | F      |                  | HSS T3                | 5.20                          | 0.0075           | C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>13</sub>  | 438.113         |
| 14.78           | 438.113      | M      | 3                | HSS T3                | 8.89                          | 0.0003           | C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>13</sub>  | 438.113         |
| 18.04           | 466.139      | M      | 6                | HSS T3                | 1.88                          | 0.0251           | C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>13</sub>  | 466.146         |
| 16.41           | 466.170      | F      |                  | RP 18                 | 5.10                          | 0.0249           | C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> O <sub>9</sub>   | 466.171         |
| 13.84           | 482.143      | M      |                  | RP 18                 | 2.36                          | 0.0175           | C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S | 483.143         |
| 7.64            | 494.232      | M      |                  | RP 18                 | 0.57                          | 0.0013           | C <sub>17</sub> H <sub>38</sub> N <sub>2</sub> O <sub>14</sub>  | 494.233         |

\* Because instrumental analyses were conducted in positive ionisation mode, the exact mass value of hydrogen (1.007 Da) was subtracted from all experimentally determined m/z values.

\*\* See Figure 1 for matching numbers with entities in the S-plot graphic.

**Table 2:** Fragmentation information for three potential biomarkers associated with elevated blood mercury levels in Cree adults (LC-Q-TOF-MS)

| Parent metabolite mass (m/z) | Fragments masses (m/z)                         |
|------------------------------|--|
| 262.079                      | 181.011, 199.023, 219.020 and 245.079.         |
| 438.116                      | 181.011, 199.023, 219.020, 245.079 and 262.079 |
| 354.164                      | 82.078, 138.141, 158.021, and 302.981          |

**Table 3:** Potential urinary biomarkers associated with elevated blood mercury levels in Cree men and women by GC-TOF-MS analysis.

| Compound/unknown | Quantified ion (m/z) | Gender | Molecular Formula   | Intensity ratio High/Low [Hg] | t-test (p-value) | Theoretical m/z |
|------------------|----------------------|--------|---|-------------------------------|------------------|-----------------|
| Adenosine        | 236                  | M      | C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> | 1.893                         | 0.001            | 267.0968        |
| Lactic acid      | 191                  | M      | C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>                  | 2.22                          | 0.046            | 114.0317        |
| Xylose           | 103                  | M      | C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>                 | 0.434                         | 0.02             | 150.0528        |
| 349036           | 297                  | M      | NA  | 2.128                         | 0.002            | NA              |
| 223531           | 262                  | F      | NA  | 0.605                         | 0.03             | NA              |

## Figure legends

**Figure 1.** OPLS discriminant analysis of the Cree men dataset obtained by LC-TOF-MS analysis of urine samples (HSS T3 column). Characteristics of entities labelled 1 to 8 are presented in Table 1.

**Figure 2.** AUC values measured by LC-TOF-MS and ANOVA test results for selected potential urinary biomarkers of MeHg exposure in Cree groups with elevated and low blood mercury levels, and a reference group from southern Quebec. Panel A: male participants; column: RP18; ret. time: 13.84; m/z: 482.143 . Panel B: female participants; column: HSS T3; ret. time: 14.77; m/z: 438.113.

**Figure 3.** Separation of Cree men groups with high and low blood mercury levels (A) and important features ranked by variable influence on the projection parameter (B) following a PLS-DA analysis of GC-TOF-MS data.

**Figure 4.** Peak height values measured by GC-TOF-MS and ANOVA test results for selected potential urinary biomarkers of MeHg exposure in Cree groups with elevated and low blood mercury levels, and a reference group from southern Quebec. Panel A: male participants; lactic acid. Panel B: male participants; unknown 349036.

**Figure 5.** Between-run reproducibility of LC-TOF-MS urine analyses. Two LC-TOF-MS analytical runs were performed using two different LC columns. Panel A shows the correlation between intensities (AUC) of 32 entities measured in two analytical runs for a randomly selected urine sample (ID # 31) (Pearson's  $r$  coefficient = 0.985). The percent change in mean intensity values between the two LC-TOF-MS analytical runs was within 20% for most metabolites (panel B).

**Supplemental materials.** Retention time, m/z and raw intensity values for the cocaine D4 standard analysed at the beginning and the end of the two different analytical runs. A: Sample #7, Analytical sequence 1, HSS T3 column. B: Sample #31, Analytical sequence 1, HSS T3 column. C: Sample #1, Analytical sequence 2, HSS T3 column. D: Sample #31, Analytical sequence 2, HSS T3 column.

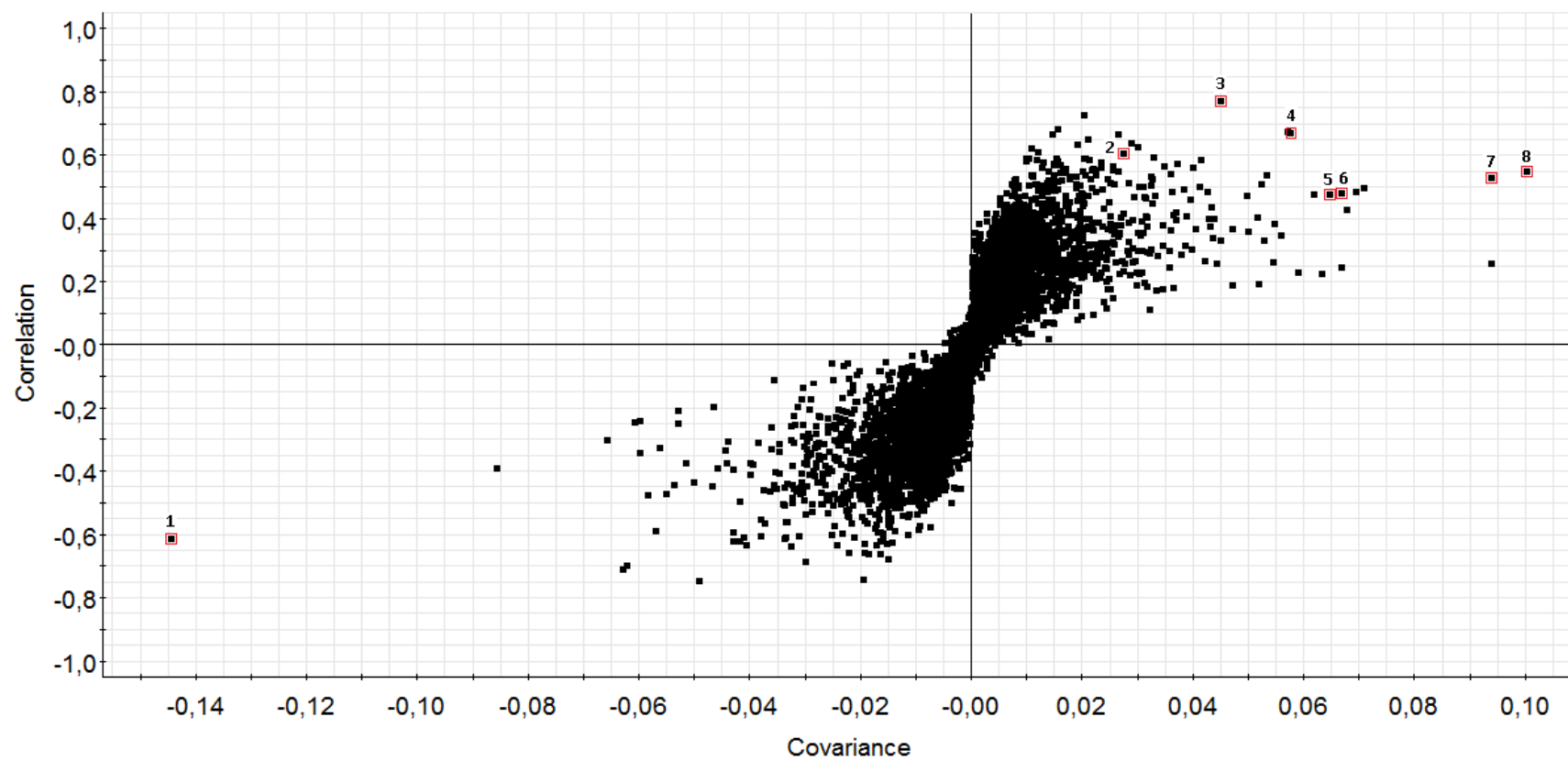


Figure 1

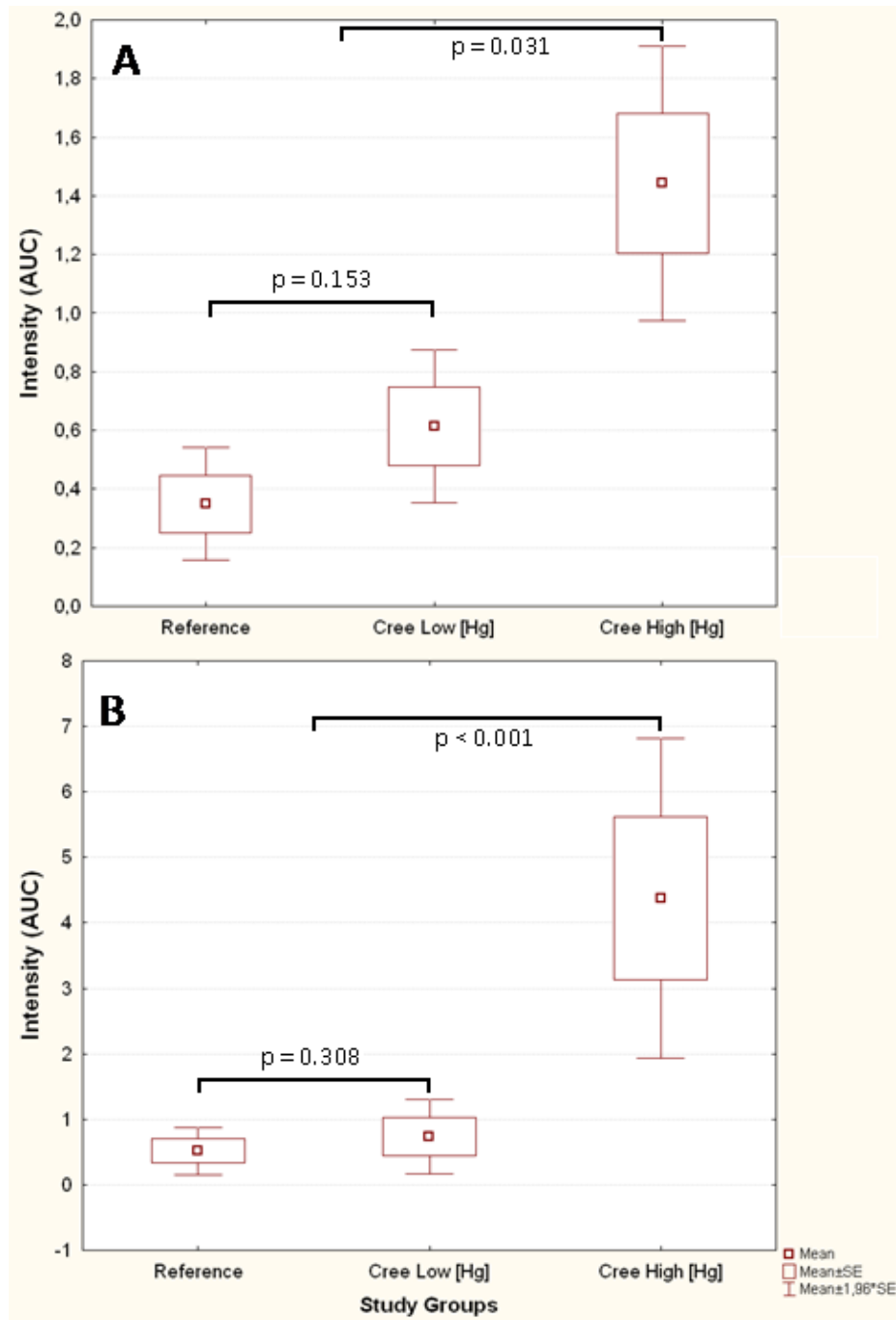


Figure 2



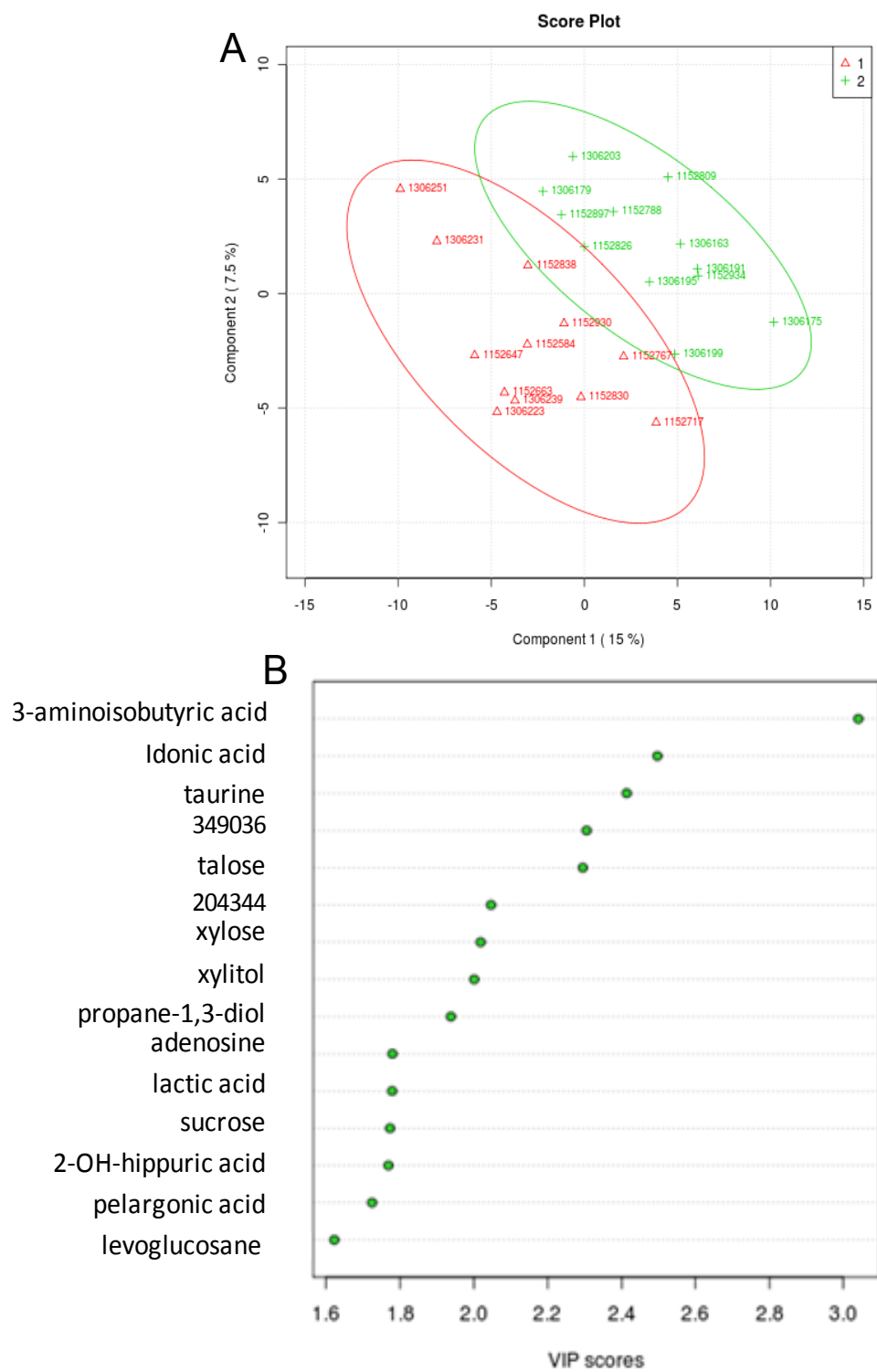


Figure 3

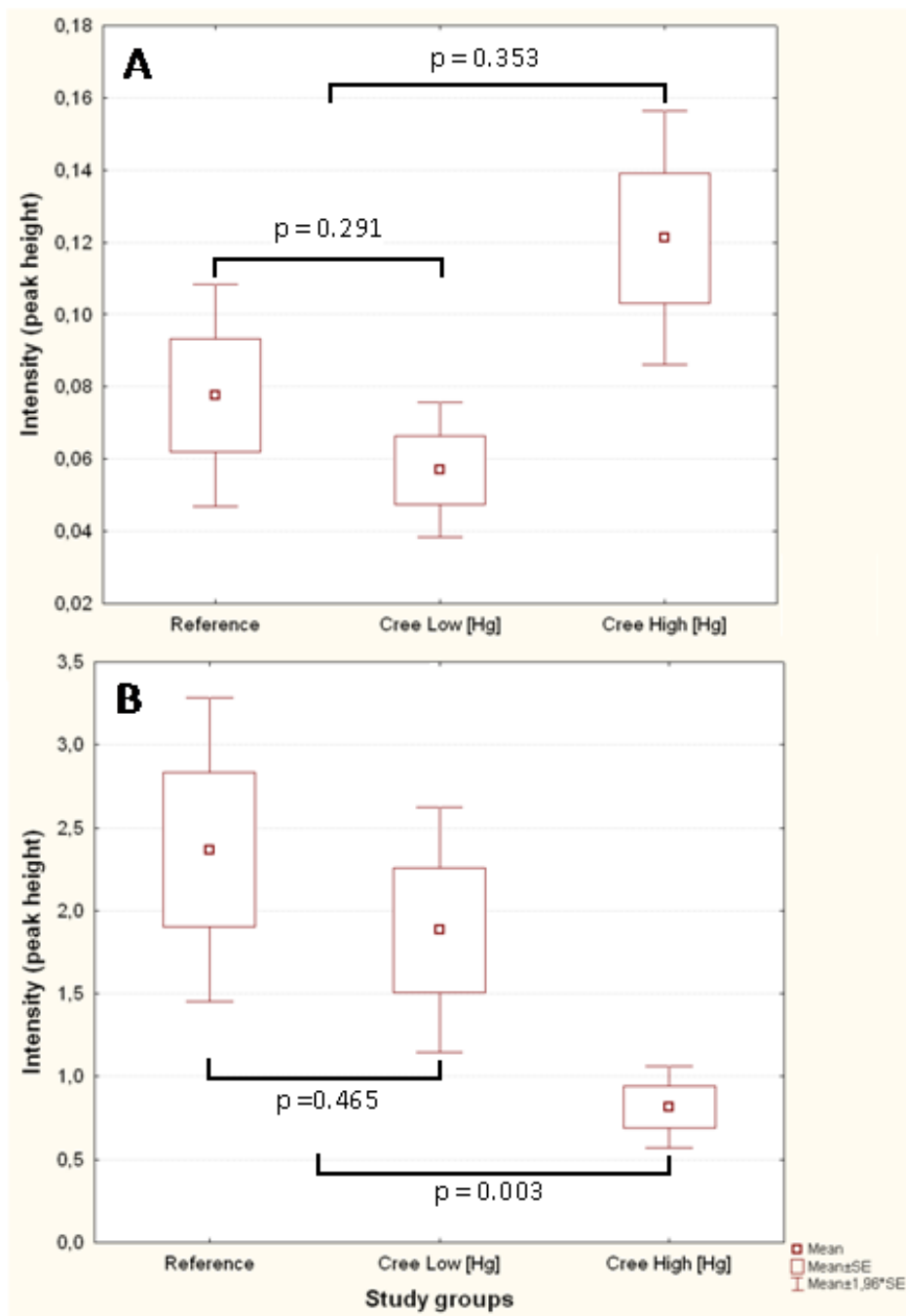


Figure 4

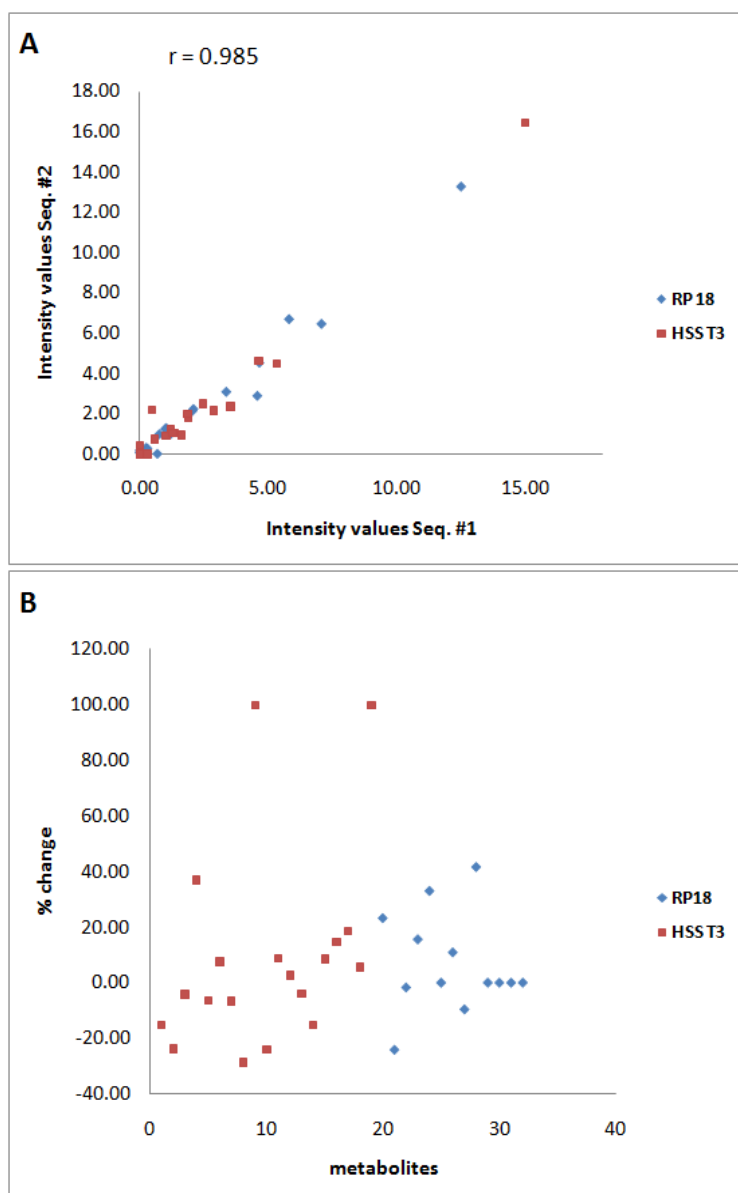
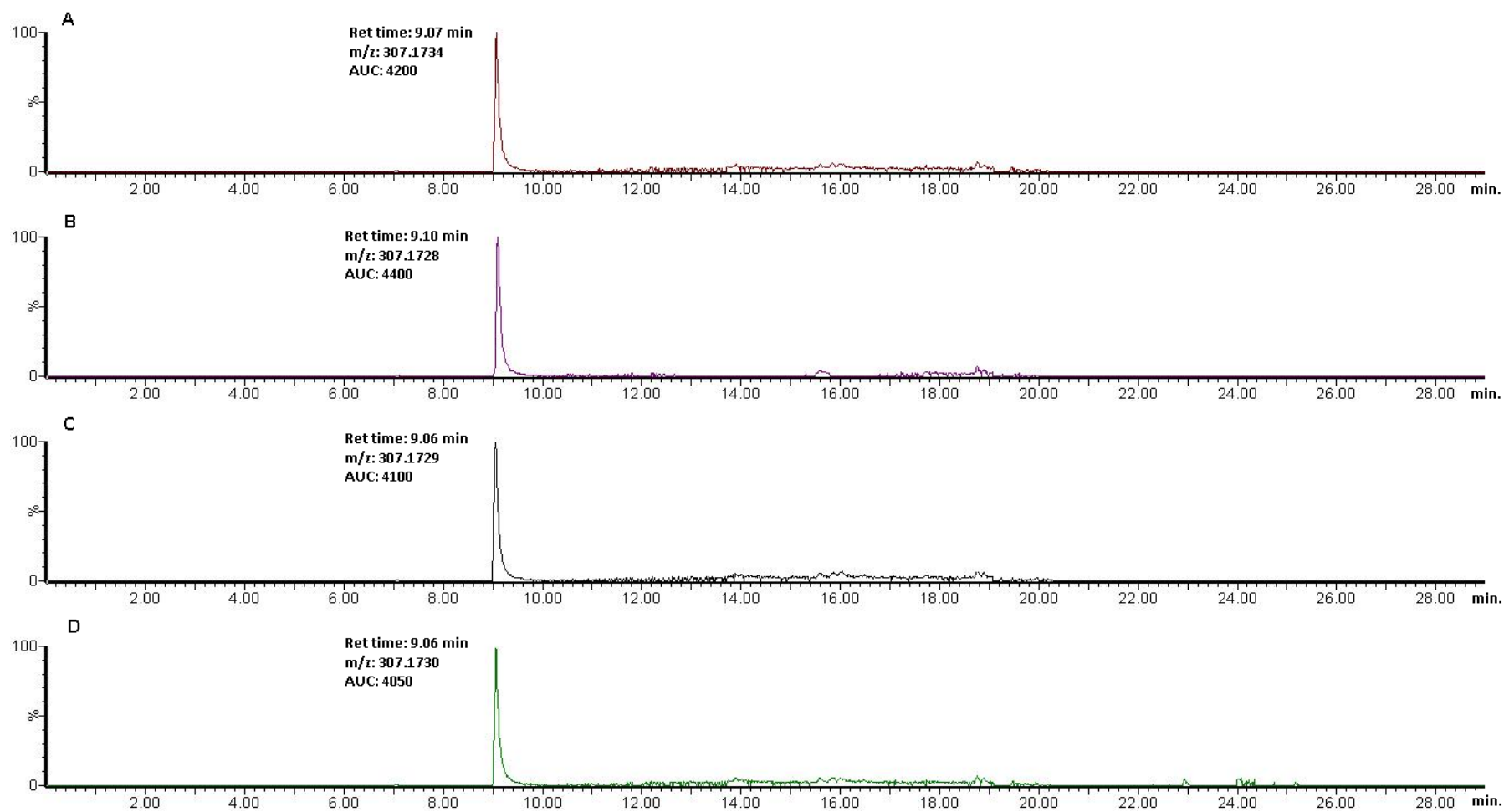


Figure 5



Supplemental materials

### Chapitre 3 : Conclusion générale

L'objectif principal de cette étude pilote était de cibler des biomarqueurs potentiellement spécifiques à une exposition élevée au méthylmercure. À l'aide d'une approche métabonomique, les profils métaboliques urinaires de groupes d'adultes cri du Nord du Québec, différemment exposés au méthylmercure, ont été comparés. Des entités présentes dans l'urine des participants ont été séparées et caractérisées par GC- et LC-TOF-MS. Ensuite, des analyses statistiques effectuées séparément chez les hommes et les femmes sur l'ensemble des valeurs d'intensités ont permis la mise en évidence de biomarqueurs potentiellement associés à l'exposition au méthylmercure.

D'abord, des analyses discriminantes multivariées de type OPLS (LC-TOF-MS) ou PLS (GC-TOF-MS) ont été réalisées sur l'ensemble des données obtenues lors des analyses instrumentales. Ces analyses ont permis d'identifier des candidats (métabolites) ayant un impact sur les différences de profils métaboliques, entre les deux groupes à l'étude. Pour les différents candidats s'étant démarqués, un test de t de student (bivarié) ainsi qu'un triage statistique isolant les masses ayant une valeur d'intensité positive ( $> 0$ ) chez au moins 80 % des individus d'un des deux groupes étudiés, étaient réalisés. Comme les échantillons étaient analysés en duplicata et sur deux colonnes chromatographiques différentes, seuls les candidats s'étant démarqués lors des deux analyses sur une même colonne étaient considérés comme biomarqueurs potentiels. Finalement, les intensités de chaque biomarqueur potentiel identifié à l'étape précédente ont été comparées avec celles d'un groupe de référence constitué de Caucasiens habitant un centre urbain du sud du Québec.

Il a d'abord été possible d'observer plusieurs biomarqueurs potentiellement associés à une exposition élevée au MeHg chez les hommes cri sélectionnés pour cette étude. En combinant l'ensemble des biomarqueurs potentiels obtenus lors des analyses sur l'une ou l'autre des deux colonnes chromatographiques, 14 biomarqueurs ont été retenus. En comparant les masses exactes et les valeurs d'intensités de ces composés, nous avons constaté qu'un d'entre eux ( $m/z : 354,148$ ) avait été retenu lors de l'analyse des données obtenues avec les deux colonnes chromatographiques utilisées. Chez les groupes de femmes crie, des différences intergroupes significatives n'ont été observées que pour deux biomarqueurs. Un d'entre eux était également présent parmi les biomarqueurs potentiels chez les groupes d'hommes cri ( $m/z : 438,113$ ).

Nous avons été surpris de la différence importante entre les hommes et les femmes quant au nombre de biomarqueurs potentiels mis en évidence dans cette étude. En raison de la démarche analytique utilisée, cette différence n'a pu être causée par des variations instrumentales. La difficulté à cibler des biomarqueurs reliés à l'exposition au MeHg chez les femmes pourrait résulter d'une plus grande variabilité des intensités de métabolites, laquelle pourrait être en lien avec le statut ménopausique variable de nos participantes. Ce facteur n'a pas été pris en compte dans notre étude. Cette différence pourrait aussi s'expliquer par une exposition plus faible au méthylmercure chez les femmes. En effet, la moyenne de concentration sanguine en mercure total était plus faible chez les femmes crie que chez les hommes crie fortement exposés au MeHg (115.1  $\mu\text{mol/L}$  vs 151.2  $\mu\text{mol/L}$ ).

L'analyse multivariée des résultats tant chez les hommes que chez les femmes a permis de cibler le métabolite m/z 438,113 comme biomarqueur potentiel. De plus, une forte corrélation ( $r$  de Pearson = 0.78,  $p < 0.01$ ) a été observée entre les valeurs d'intensité de ce métabolite et celles du métabolite m/z 262,079, un autre biomarqueur potentiel. C'est pourquoi des analyses supplémentaires limitées ont été effectuées sur une plateforme LC-Q-TOF-MS pour tenter de préciser l'identité de ces biomarqueurs. Ceci a permis l'obtention de plusieurs fragments communs à ces deux biomarqueurs potentiels. Au départ, le spectre de masse exacte ayant un m/z de 262,079 a été obtenu lors des analyses par LC-TOF-MS sur une colonne chromatographique HSST3. Cette masse fut également présente comme première fragmentation du spectre de masse exacte 438,113 Da lors des analyses LC-Q-TOF-MS (voir le tableau 2), la différence (176 Da) correspondant à la perte d'un groupement glucuronide. À noter que l'entité de m/z 262,079 a également été observée lors des analyses avec la colonne chromatographique RP18, en tant que métabolite urinaire, sans toutefois donner des différences intergroupes significatives. Pour sa part, l'analyse statistique du spectre de masse 438,113 Da a donné des différences intergroupes significatives quelque soit la colonne chromatographique utilisée.

En utilisant une plateforme GC-TOF-MS, d'autres différences d'intensités intergroupes, statistiquement significatives, ont pu être ciblées. En effet, l'utilisation de cette plateforme a permis la caractérisation de nouveaux composés, incompatibles avec la chromatographie liquide. Chez les groupes d'hommes crie, quatre biomarqueurs potentiels ont été mis en évidence dont l'adénosine, l'acide lactique et le xylose. Chez la femme, un seul candidat (inconnu) s'est démarqué lors des analyses statistiques.

Les différences intergroupes observées pour l'acide lactique pourraient s'expliquer par l'effet néphrotoxique du mercure. En effet, une étude évaluant l'impact d'une dose unique de 0.75mg/kg de mercure, chez des rats Sprague Dawley, a montré que les concentrations urinaires d'acide lactique augmentait suite à ce traitement.<sup>(134)</sup> Ces perturbations métaboliques sont compatibles avec les dommages rénaux (région corticale), causés par l'exposition au HgCl<sub>2</sub> ayant déjà été observés par Holmes et coll. et Gartland et coll.<sup>(133,135)</sup>

Une autre étude, menée par Zalpus et coll., a évalué l'affinité du complexe MeHg-cystéine pour un type de transporteur d'anions organiques situé au niveau rénal, le récepteur OAT1. Cette étude a montré que le niveau d'expression du récepteur OAT1 pouvait avoir un impact sur la concentration urinaire de certains métabolites endogènes.<sup>(40)</sup> Ce récepteur membranaire transporte activement une grande variété de molécules à l'extérieur des tubules proximaux en échange de molécules d' $\alpha$ -cétoglutarate. C'est le cas pour divers acides organiques et composés neutres de faible poids moléculaire. Cette étude a également montré que la survie des cellules rénales exprimant OAT1 diminuait significativement en présence de concentrations croissantes de MeHg-Cys (0 à 300  $\mu$ mol/L). Cette diminution du nombre de transporteurs pourrait expliquer pourquoi certains composés, comme l'acide lactique ou l'adénosine, se retrouve en quantité plus importante dans l'urine. Dans le même ordre d'idées, d'autres transporteurs membranaires étant également présents sur les cellules exprimant OAT1, verraient leur nombre diminuer, inhibant du même coup la recapture ou l'élimination de plusieurs métabolites.

Différents points forts et points faibles caractérisent cette étude. D'abord concernant les points forts, la totalité des 83 échantillons urinaires étaient analysés en duplicata et sur deux colonnes chromatographiques, et seuls les biomarqueurs potentiels qui étaient ciblés dans les deux séquences analytiques réalisées sur une colonne étaient retenus. Ceci a pour effet d'augmenter la robustesse des résultats obtenus. En utilisant cette procédure de sélection, il a été possible d'éliminer une quantité importante d'entités ayant des variations d'intensité intergroupes plus ou moins significatives.

Afin de sélectionner les colonnes chromatographiques les plus appropriées, une quantité importante d'informations a été obtenue des représentants de la compagnie Waters concernant les différents types de colonnes offerts, leurs propriétés, avantages et inconvénients respectifs. Les colonnes Shield

RP18 et T3 HSS sont celles ayant été retenues pour notre projet. La première contient des chaînes C18 et des groupes polaires dans sa phase stationnaire et peut séparer adéquatement une bonne quantité de composés. La seconde colonne, présente des groupements C18 reliés à des bases de silices sur sa phase stationnaire, est utilisée pour séparer les composés moyennement polaires. Due à l'utilisation de deux colonnes chromatographiques différentes, les nombres d'entités totales et donc de biomarqueurs potentiels ont été augmentés.

Nous avons tenu compte de plusieurs facteurs lors de la sélection des participants afin de minimiser l'impact de variables autres que l'exposition au MeHg qui auraient pu influencer les résultats de l'étude. Ces critères d'appariement étaient le sexe, l'origine ethnique, la classe d'âge, le statut de non-fumeurs et l'état de santé. Les groupes ayant été appareillés en fonction de plusieurs caractéristiques influençant le métabolisme, ceci a contribué à réduire considérablement la probabilité que les différences observées étaient dues à d'autres facteurs que l'exposition à l'étude. Toutefois, il est possible que d'autres facteurs associés à l'exposition au MeHg dans cette population, comme la consommation de poisson ou d'autres habitudes de vie liée à cette habitude alimentaire, aient été responsables de certaines différences observées entre nos groupes.

Des contrôles de qualité ont également été mis en place au sein des différentes séquences analytiques de cette étude. Des échantillons blancs et de référence ont été analysés par LC-TOF-MS à tous les 12 échantillons d'urine. L'échantillon de référence était constitué d'un mélange de quatre composés, soit l'acétaminophène D4, la cocaïne D3, la sulfadimétoxine et la leucine enképhaline. Le tout était dans une solution à 50:50 H<sub>2</sub>O et MeOH. L'utilisation de blancs a permis de vérifier l'absence de contamination pendant les analyses instrumentales (effet mémoire). Les échantillons de référence ont permis d'évaluer la variabilité des différents spectres de masses et de leur temps de rétention respectif au sein d'une même séquence analytique et également entre les quatre séquences réalisées au cours de cette étude. Des différences significatives au niveau de ces variables auraient pu signifier une mauvaise préparation des échantillons ou des phases mobiles, une mauvaise calibration instrumentale ou encore l'utilisation d'une colonne chromatographique désuète. Différents standards internes ont aussi été utilisés lors des analyses effectuées par GC-TOF-MS.<sup>(129)</sup>



Un groupe de référence du sud du Québec a été utilisé lors de comparaisons des valeurs d'intensité pour chaque entité ayant été retenu lors de l'analyse statistique initiale limitée aux groupes cris. Ces comparaisons visaient à vérifier si les différences d'intensités observées pour les biomarqueurs potentiels se démarquaient de celles d'individus d'une autre ethnie non exposée au mercure. Pour la plupart des biomarqueurs potentiels, les valeurs d'intensité étaient similaires à celles notées chez le groupe cris faiblement exposé au MeHg, ce qui suggère que les biomarqueurs ciblés ne seraient pas spécifiques à la population crie du nord du Québec. L'applicabilité des biomarqueurs sélectionnés à d'autres populations doit cependant faire l'objet d'études additionnelles.

La plateforme instrumentale LC-TOF-MS utilisée durant cette étude peut procéder à la séparation et à la caractérisation (masses exactes, temps de rétention et valeur intensité) de plusieurs milliers d'entités présentes dans un échantillon.<sup>(130)</sup> Comme l'analyse instrumentale pour un seul échantillon d'urine prend environ 30 minutes, cette technologie permet de générer une quantité impressionnante d'information sur la composition d'échantillons biologiques dans un court laps de temps. Cependant, l'appareil TOF-MS utilisé lors de cette étude, le LCT Premier, ne fournit pas l'information nécessaire pour préciser les structures moléculaires des composés analysés. C'est pourquoi des analyses préliminaires ont été effectuées à l'aide d'un deuxième type de spectromètre de masse, un Q-TOF-MS, à la toute fin de l'étude. Ce type de MS est en mesure de réaliser des fragmentations de masses afin d'aider à l'identification des composés. Nous avons notamment été en mesure de déterminer que l'entité m/z 438.113 était probablement le glucuronide de l'entité m/z 262.079. Ces analyses n'ont cependant pas permis l'identification des différents biomarqueurs potentiels ciblés au cours de l'expérience.

Soulignons également que puisque l'efficacité de l'ionisation de chacun des composés séparés en GC-MS ou LC-MS est variable, nous n'étions pas en mesure de quantifier précisément les concentrations des différentes entités observées dans les échantillons de l'étude. Cependant, l'objectif de cette étude étant de cibler des biomarqueurs en comparant les profils de métabolites entre les groupes à l'étude, une évaluation relative des quantités était selon nous suffisante.

Enfin, le fait de ne pas avoir été en mesure de confirmer hors de tout doute que les biomarqueurs observés étaient spécifiquement reliés à l'exposition au MeHg est une limite de notre étude. Dans la population crie, la consommation de poisson est la source majeure d'exposition au MeHg. Or, outre

le MeHg, la consommation de poisson fournit un apport élevé en nutriments tels les acides gras de type oméga-3 et le sélénium, de même qu'une exposition accrue aux polluants organiques persistants, par exemple les biphényles polychlorés.<sup>(136-138)</sup> Ces facteurs associés à l'exposition au MeHg dans cette population pourraient être responsables en partie des variations d'intensités observées entre les groupes pour certains des biomarqueurs potentiels urinaires ciblés. Seule une étude de plus grande envergure permettrait de prendre en considération ces facteurs confondants potentiels dans le cadre d'une analyse statistique multivariée.

En résumé, par le biais de cette étude pilote portant sur la relation entre les profils métaboliques urinaires et l'exposition MeHg chez la population crie du Nord du Québec nous avons été en mesure de nous familiariser avec l'approche métabonomique et de constater son fort potentiel pour la découverte de biomarqueurs. Les analyses des échantillons urinaires sur la plateforme LC-TOF-MS ont révélé 12 biomarqueurs potentiels (10 chez l'homme et 2 chez la femme) alors que 5 (4 chez l'homme et 1 chez la femme) ont été ciblés avec la plateforme GC-TOF-MS. L'acide lactique, l'adénosine et le xylose sont les trois composés ayant pu être identifiés sur la plateforme GC-TOF-MS.

À plus long terme, il serait intéressant de pouvoir identifier la structure moléculaire de certains des biomarqueurs ayant été ciblés au cours de cette étude. En effet, la plateforme instrumentale de type LC-Q-TOF-MS et la confection d'une base de données regroupant les caractéristiques spectrales de nombreux métabolites disponibles commercialement facilitera l'identification non ambiguë de biomarqueurs d'intérêt, lors de travaux futurs.

## Bibliographie

- (1) Ahenakew E. Voices of the plains Cree. Canadian Plains Research Center; 1995.
- (2) Helm J. Handbook of North American Indians: Subarctic. 1981.
- (3) Grand Council of the Cree. GCC 2010; [En ligne] <http://www.gcc.ca>
- (4) Les communautés cries. MCCCCF 2010-10-25; [En ligne] <http://www.mcccf.gouv.qc.ca/index.php?id=2075>
- (5) Les Cris. Secrétariat des affaires autochtones 2010-10-25; [En ligne] [http://www.autochtones.gouv.qc.ca/relations\\_autochtones/profils\\_nations/cris.htm](http://www.autochtones.gouv.qc.ca/relations_autochtones/profils_nations/cris.htm)
- (6) La population crie. Secrétariat des affaires autochtones 2010-11-04; [En ligne] <http://www.autochtones.gouv.qc.ca/nations/population.htm#cris>
- (7) Girard M, Noel F, Dumont C. Varying mercury exposure with varying food source in a James Bay Cree community. Arctic Med Res;55(2):69-74.
- (8) Noel F, Rondeau E, Sbeghen J. Communication of risks: organization of a methylmercury campaign in the Cree communities of James Bay, Northern Quebec, Canada. Int J Circumpolar Health;57 Suppl 1:591-5.
- (9) Valera B, Dewailly E, Poirier P. Environmental mercury exposure and blood pressure among Nunavik Inuit adults. Hypertension;54(5):981-6.
- (10) Viger Y, Dewailly E, Egeland M, Nieboer E, and Pereg D. Nituuchischaayihititaa Aschii Multi-Community Environment and Health Longitudinal Study in Iiyiyiu Aschii: Mistissini Technical reports: summary of activities, results and recommendations 2007. 2007.
- (11) La recherche et les conventions sur le mercure. Hydro Québec 2010-11-06; [En ligne] <http://www.hydroquebec.com/developpementdurable/documentation/pdf/mercure/mercure2.pdf>
- (12) La Grande Hydroelectric Complex. Hydro Québec 2010-11-06; [En ligne] [http://www.hydroquebec.com/sustainable-development/documentation/pdf/poissons/fiche\\_08.pdf](http://www.hydroquebec.com/sustainable-development/documentation/pdf/poissons/fiche_08.pdf)
- (13) Chevalier G, Langlois C, Dumont C, Penn A. Mercury in Northern Québec: Role of the Mercury Agreement and Status of Research and Monitoring. WATER, AIR, & SOIL POLLUTION;97(1-2):75-84.
- (14) La convention de la baie James et du nord du Québec (CBJNQ). Publication du Québec 2010; [En ligne] <http://www3.publicationsduquebec.gouv.qc.ca/produits/conventions/lois/loi.fr.html>
- (15) Niskamoon Corporation. Niskamoon 2010-11-05; [En ligne] <http://www.niskamoon.org/>
- (16) Direction Toxicologie Humaine, Direction Risques Biologiques Environnementaux et Occupationnels. Étude sur l'établissement de valeurs de référence d'éléments traces et de

métaux dans le sang, le sérum et l'urine de la population de la grande région de Québec. 2003. p. 24.

- (17) Ekino S, Susa M, Ninomiya T, Imamura K, Kitamura T. Minamata disease revisited: an update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning. *J Neurol Sci*;262(1-2):131-44.
- (18) Harada M. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Crit Rev Toxicol*;25(1):1-24.
- (19) Eto K, Marumoto M, Takeya M. The pathology of methylmercury poisoning (Minamata disease). *Neuropathology*.
- (20) Greenwood MR. Methylmercury poisoning in Iraq. An epidemiological study of the 1971-1972 outbreak. *J Appl Toxicol*;5(3):148-59.
- (21) Bakir F, Damluji SF, min-Zaki L, Murtadha M, Khalidi A, al-Rawi NY, Tikriti S, Dahahir HI, Clarkson TW, Smith JC, Doherty RA. Methylmercury poisoning in Iraq. *Science*;181(96):230-41.
- (22) Environnement Canada. Mercure: Initiatives internationales. EC 2010-11-06; [En ligne] <http://www.ec.gc.ca/mercure-mercury/default.asp?lang=Fr&n=83E5D89D-1>
- (23) Environnement Canada. Sources de mercure. EC 2010-11-06; [En ligne] <http://www.ec.gc.ca/mercure-mercury/default.asp?lang=Fr&n=EB9F5205-1>
- (24) Parascandola J. From mercury to miracle drugs: syphilis therapy over the centuries. *Pharm Hist*;51(1):14-23.
- (25) Hintelmann H. Organomercurials. Their formation and pathways in the environment. *Met Ions Life Sci*;7:365-401.
- (26) Ikingura JR, Akagi H. Methylmercury production and distribution in aquatic systems. *Sci Total Environ*;234(1-3):109-18.
- (27) Environnement Canada. Biogéochimie. EC 2010-10-30; [En ligne] <http://www.ec.gc.ca/mercure-mercury/default.asp?lang=Fr&n=67E16201-1>
- (28) Saxena J, Howard PH. Environmental transformation of alkylated and inorganic forms of certain metals. *Adv Appl Microbiol*;21:185-226.
- (29) Wade MJ, Davis BK, Carlisle JS, Klein AK, Valoppi LM. Environmental transformation of toxic metals. *Occup Med*;8(3):574-601.
- (30) Chen CY, Serrell N, Evers DC, Fleishman BJ, Lambert KF, Weiss J, Mason RP, Bank MS. Meeting report: Methylmercury in marine ecosystems--from sources to seafood consumers. *Environ Health Perspect*;116(12):1706-12.
- (31) European Food Safety Authority. Le mercure en tant que substance indésirable dans les aliments pour animaux. *The EFSA Journal*;(654):1-2.
- (32) Clarkson TW. Mercury: major issues in environmental health. *Environ Health Perspect*;100:31-8.

- (33) Carvalho CM, Chew EH, Hashemy SI, Lu J, Holmgren A. Inhibition of the human thioredoxin system. A molecular mechanism of mercury toxicity. *J Biol Chem*;283(18):11913-23.
- (34) Diez S. Human health effects of methylmercury exposure. *Rev Environ Contam Toxicol*;198:111-32.
- (35) Committee on the Toxicological Effects of Methylmercury, Board on Environmental Studies and Toxicology, National Research Council. *Toxicological Effects of Methylmercury*. 2000. p. 31-71.
- (36) Risher JF, Murray HE, Prince GR. Organic mercury compounds: human exposure and its relevance to public health. *Toxicol Ind Health*;18(3):109-60.
- (37) Ballatori N. Transport of toxic metals by molecular mimicry. *Environ Health Perspect*;110 Suppl 5:689-94.
- (38) Kerper LE, Ballatori N, Clarkson TW. Methylmercury transport across the blood-brain barrier by an amino acid carrier. *Am J Physiol*;262(5 Pt 2):R761-R765.
- (39) Berlin M. *Handbook on the toxicology of metals*. 1986. p. 387-445.
- (40) Zalups RK, Ahmad S. Handling of cysteine S-conjugates of methylmercury in MDCK cells expressing human OAT1. *Kidney Int*;68(4):1684-99.
- (41) Vahter M, Mottet NK, Friberg L, Lind B, Shen DD, Burbacher T. Speciation of mercury in the primate blood and brain following long-term exposure to methyl mercury. *Toxicol Appl Pharmacol*;124(2):221-9.
- (42) Carrier G, Bouchard M, Brunet RC, Caza M. A toxicokinetic model for predicting the tissue distribution and elimination of organic and inorganic mercury following exposure to methyl mercury in animals and humans. II. Application and validation of the model in humans. *Toxicol Appl Pharmacol*;171(1):50-60.
- (43) World Health Organization. *Environmental Health Criteria 101: Methylmercury*. International Programme on Chemical Safety;131.
- (44) Wagner C, Sudati JH, Nogueira CW, Rocha JB. In vivo and in vitro inhibition of mice thioredoxin reductase by methylmercury. *Biometals*.
- (45) Glaser V, Leipnitz G, Straliozzo MR, Oliveira J, dos S, V, Wannmacher CM, de Bem AF, Rocha JB, Farina M, Latini A. Oxidative stress-mediated inhibition of brain creatine kinase activity by methylmercury. *Neurotoxicology*;31(5):454-60.
- (46) Balthrop JE, Braddon SA. Effects of selenium and methylmercury upon glutathione and glutathione-S-transferase in mice. *Arch Environ Contam Toxicol*;14(2):197-202.
- (47) Aschner M. Astrocytic swelling, phospholipase A2, glutathione and glutamate: interactions in methylmercury-induced neurotoxicity. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)*;46(4):843-54.
- (48) Charleston JS, Body RL, Bolender RP, Mottet NK, Vahter ME, Burbacher TM. Changes in the number of astrocytes and microglia in the thalamus of the monkey *Macaca fascicularis* following long-term subclinical methylmercury exposure. *Neurotoxicology*;17(1):127-38.

- (49) Ballatori N. Transport of toxic metals by molecular mimicry. *Environ Health Perspect*;110 Suppl 5:689-94.
- (50) Carvalho CM, Chew EH, Hashemy SI, Lu J, Holmgren A. Inhibition of the human thioredoxin system. A molecular mechanism of mercury toxicity. *J Biol Chem*;283(18):11913-23.
- (51) Castoldi AF, Coccini T, Manzo L. Neurotoxic and molecular effects of methylmercury in humans. *Rev Environ Health*;18(1):19-31.
- (52) Berg K, Puntervoll P, Valdersnes S, Goksoyr A. Responses in the brain proteome of Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to methylmercury. *Aquat Toxicol*;100(1):51-65.
- (53) Limke TL, Bearss JJ, Atchison WD. Acute exposure to methylmercury causes Ca<sup>2+</sup> dysregulation and neuronal death in rat cerebellar granule cells through an M3 muscarinic receptor-linked pathway. *Toxicol Sci*;80(1):60-8.
- (54) Jung KY, Endou H. Mercury chloride as a possible phospholipase C activator: effect on angiotensin II-induced [Ca<sup>++</sup>]<sub>i</sub> transient in the rat early proximal tubule. *Biochem Biophys Res Commun*;173(2):606-13.
- (55) Graevskaya EE, Yasutake A, Aramaki R, Rubin AB. Effect of methylmercury on histamine release from rat mast cells. *Arch Toxicol*;77(1):17-21.
- (56) Chen T, Pearce LL, Peterson J, Stoyanovsky D, Billiar TR. Glutathione depletion renders rat hepatocytes sensitive to nitric oxide donor-mediated toxicity. *Hepatology*;42(3):598-607.
- (57) De FS, Bennicelli C, Bagnasco M. Genotoxicity of mercury compounds. A review. *Mutat Res*;317(1):57-79.
- (58) Ou YC, Thompson SA, Ponce RA, Schroeder J, Kavanagh TJ, Faustman EM. Induction of the cell cycle regulatory gene p21 (Waf1, Cip1) following methylmercury exposure in vitro and in vivo. *Toxicol Appl Pharmacol*;157(3):203-12.
- (59) Lauwerys R, Huet P, Lison D. Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles. In: Endo T, editor. 5 ed. 2007. p. 961.
- (60) Takaoka S, Fujino T, Sekikawa T, Miyaoka T. Psychophysical sensory examination in individuals with a history of methylmercury exposure. *Environ Res*;95(2):126-32.
- (61) Igata A. Epidemiological and Clinical Features of Minamata Disease. Suzuki, Tsuguyoshi; Imura, Nobumasa; Clarkson, Thomas W *Advances in Mercury Toxicology*;439-57.
- (62) Sato T, Nakamura Y. Neuropathology of Methylmercury Intoxication. Suzuki, Tsuguyoshi; Imura, Nobumasa; Clarkson, Thomas W *Advances in Mercury Toxicology*;355-66.
- (63) Shenker BJ, Guo TL, Shapiro IM. Mercury-induced apoptosis in human lymphoid cells: evidence that the apoptotic pathway is mercurial species dependent. *Environ Res*;84(2):89-99.
- (64) Zouridakis M, Zisimopoulou P, Poulas K, Tzartos SJ. Recent advances in understanding the structure of nicotinic acetylcholine receptors. *IUBMB Life*;61(4):407-23.

- (65) Narahashi T, Arakawa O, Nakahiro M. Role of Neuronal Ion Channels in Mercury Intoxication. Suzuki, Tsuguyoshi; Imura, Nobumasa; Clarkson, Thomas W *Advances in Mercury Toxicology*;191-207.
- (66) Miura K, Imura N. Microtubules: A Susceptible Target of Methylmercury Cytotoxicity. Suzuki, Tsuguyoshi; Imura, Nobumasa; Clarkson, Thomas W *Advances in Mercury Toxicology*;241-53.
- (67) Herden CJ, Pardo NE, Hajela RK, Yuan Y, Atchison WD. Differential effects of methylmercury on gamma-aminobutyric acid type A receptor currents in rat cerebellar granule and cerebral cortical neurons in culture. *J Pharmacol Exp Ther*;324(2):517-28.
- (68) Yuan Y, Atchison WD. Methylmercury differentially affects GABA(A) receptor-mediated spontaneous IPSCs in Purkinje and granule cells of rat cerebellar slices. *J Physiol*;550(Pt 1):191-204.
- (69) Yuan Y, Atchison WD. Action of methylmercury on GABA(A) receptor-mediated inhibitory synaptic transmission is primarily responsible for its early stimulatory effects on hippocampal CA1 excitatory synaptic transmission. *J Pharmacol Exp Ther*;282(1):64-73.
- (70) Allen JW, Shanker G, Tan KH, Aschner M. The consequences of methylmercury exposure on interactive functions between astrocytes and neurons. *Neurotoxicology*;23(6):755-9.
- (71) Shanker G, Syversen T, Aschner M. Astrocyte-mediated methylmercury neurotoxicity. *Biol Trace Elem Res*;95(1):1-10.
- (72) Shen J, Rothman DL, Behar KL, Xu S. Determination of the glutamate-glutamine cycling flux using two-compartment dynamic metabolic modeling is sensitive to astroglial dilution. *J Cereb Blood Flow Metab*;29(1):108-18.
- (73) Shanker G, Allen JW, Mutkus LA, Aschner M. Methylmercury inhibits cysteine uptake in cultured primary astrocytes, but not in neurons. *Brain Res*;914(1-2):159-65.
- (74) Porciuncula LO, Rocha JB, Tavares RG, Ghisleni G, Reis M, Souza DO. Methylmercury inhibits glutamate uptake by synaptic vesicles from rat brain. *Neuroreport*;14(4):577-80.
- (75) Evstratova AA, Mironova EV, Dvoretzkova EA, Antonov SM. Apoptosis and the receptor specificity of its mechanisms during the neurotoxic action of glutamate. *Neurosci Behav Physiol*;39(4):353-62.
- (76) de Marco KC, Passos CJ, Sertorio J, Tanus-Santos JE, Barbosa F, Jr. Environmental exposure to methylmercury is associated with a decrease in nitric oxide production. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*;106(5):411-5.
- (77) Yorifuji T, Tsuda T, Kashima S, Takao S, Harada M. Long-term exposure to methylmercury and its effects on hypertension in Minamata. *Environ Res*;110(1):40-6.
- (78) Park K, Mozaffarian D. Omega-3 Fatty acids, mercury, and selenium in fish and the risk of cardiovascular diseases. *Curr Atheroscler Rep*;12(6):414-22.
- (79) Stern AH. A review of the studies of the cardiovascular health effects of methylmercury with consideration of their suitability for risk assessment. *Environ Res*;98(1):133-42.

- (80) Sorensen N, Murata K, Budtz-Jorgensen E, Weihe P, Grandjean P. Prenatal methylmercury exposure as a cardiovascular risk factor at seven years of age. *Epidemiology*;10(4):370-5.
- (81) Endou H, Jung KY. Effect of Mercuric Chloride on Angiotensin II induces  $Ca^{++}$  Transient in the proximal Tubule of Rats. Suzuki, Tsuguyoshi; Imura, Nobumasa; Clarkson, Thomas W *Advances in Mercury Toxicology*;299-314.
- (82) Shi JZ, Kang F, Wu Q, Lu YF, Liu J, Kang YJ. Nephrotoxicity of mercuric chloride, methylmercury and cinnabar-containing Zhu-Sha-An-Shen-Wan in rats. *Toxicol Lett*;200(3):194-200.
- (83) Diamond GL, Zalups RK. Understanding renal toxicity of heavy metals. *Toxicol Pathol*;26(1):92-103.
- (84) Yasutake A, Nakano A, Miyamoto K, Eto K. Chronic effects of methylmercury in rats. I. Biochemical aspects. *Tohoku J Exp Med*;182(3):185-96.
- (85) Madsen KM. Mercury accumulation in kidney lysosomes or proteinuric rats. *Kidney Int*;18(4):445-53.
- (86) Wang Y, Bollard ME, Nicholson JK, Holmes E. Exploration of the direct metabolic effects of mercury II chloride on the kidney of Sprague-Dawley rats using high-resolution magic angle spinning 1H NMR spectroscopy of intact tissue and pattern recognition. *J Pharm Biomed Anal*;40(2):375-81.
- (87) Moszczynski P. Mercury compounds and the immune system: a review. *Int J Occup Med Environ Health*;10(3):247-58.
- (88) Moszczynski P, Moszczynski P, Jr. [Exposure to mercury and population health. I. Immunotoxicity of mercury]. *Med Pr*;46(4):385-93.
- (89) Coccini T, Randine G, Castoldi AF, Acerbi D, Manzo L. Methylmercury interaction with lymphocyte cholinergic muscarinic receptors in developing rats. *Environ Res*;103(2):229-37.
- (90) Suriyo T, Thiantanawat A, Chaiyaroj SC, Parkpian P, Satayavivad J. Involvement of the lymphocytic muscarinic acetylcholine receptor in methylmercury-induced c-Fos expression and apoptosis in human leukemic T cells. *J Toxicol Environ Health A*;71(16):1109-23.
- (91) Bilrha H, Roy R, Moreau B, Belles-Isles M, Dewailly E, Ayotte P. In vitro activation of cord blood mononuclear cells and cytokine production in a remote coastal population exposed to organochlorines and methyl mercury. *Environ Health Perspect*;111(16):1952-7.
- (92) Wild LG, Ortega HG, Lopez M, Salvaggio JE. Immune system alteration in the rat after indirect exposure to methyl mercury chloride or methyl mercury sulfide. *Environ Res*;74(1):34-42.
- (93) Goyer A, Aposhian H, et al. EPA's Methylmercury Guideline Is Scientifically Justifiable For Protecting Most Americans, But Some May Be at Risk. National Academies 2010; [En ligne] <http://www8.nationalacademies.org/onpinews/newsitem.aspx?RecordID=9899>
- (94) Boisset M, Narbonne JF, Cumont G, et al. Plomb, cadmium et mercure dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque. 1996.



- (95) Janicki K, Dobrowolski J, Krasnicki K. Correlation between contamination of the rural environment with mercury and occurrence of leukaemia in men and cattle. *Chemosphere*;16(1):253-7.
- (96) Kinjo Y, Akiba S, Yamaguchi N, Mizuno S, Watanabe S, Wakamiya J, Futatsuka M, Kato H. Cancer mortality in Minamata disease patients exposed to methylmercury through fish diet. *J Epidemiol*;6(3):134-8.
- (97) Centre International de Recherche sur le Cancer. Mercury and Mercury Compound. IARC 2010; [En ligne] <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol58/mono58-8.pdf>
- (98) Environmental Protection Agency. Human Health Criteria - Methylmercury Fish Tissue Criterion. EPA 2010; [En ligne] <http://water.epa.gov/scitech/swguidance/waterquality/standards/criteria/aqlife/pollutants/methylmercury/factsheet.cfm>
- (99) Northern Contaminants Program (NCP). Canadian arctic contaminants assessment report II: highlights and contaminant levels, trends and effects in the biological environment. Ottawa, Canada: Ministry of Indian Affairs and Northern Development; 2003.
- (100) Conseil cri de la santé et des service sociaux de la Baie de James. Enquête de santé auprès des Cris 2003: Enquête sur la santé dans les collectivités canadiennes. *Caractéristiques démographiques et sociales de la population habitant Liyiyiu Aschii*. INSPQ 2008;(2.1) [En ligne] [http://www.inspq.qc.ca/pdf/publications/827\\_cri\\_sociodemo\\_fr.pdf](http://www.inspq.qc.ca/pdf/publications/827_cri_sociodemo_fr.pdf)
- (101) Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*;29(11):1181-9.
- (102) Robertson DG. Metabonomics in toxicology: a review. *Toxicol Sci*;85(2):809-22.
- (103) Beger RD, Sun J, Schnackenberg LK. Metabolomics approaches for discovering biomarkers of drug-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*;243(2):154-66.
- (104) Chen J, Wang W, Lv S, Yin P, Zhao X, Lu X, Zhang F, Xu G. Metabonomics study of liver cancer based on ultra performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry with HILIC and RPLC separations. *Anal Chim Acta*;650(1):3-9.
- (105) Blaise BJ, Shintu L, Elena B, Emsley L, Dumas ME, Toulhoat P. Statistical recoupling prior to significance testing in nuclear magnetic resonance based metabonomics. *Anal Chem*;81(15):6242-51.
- (106) Kind T, Wohlgemuth G, Lee dY, Lu Y, Palazoglu M, Shahbaz S, Fiehn O. FiehnLib: mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem*;81(24):10038-48.
- (107) Allwood JW, Goodacre R. An introduction to liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. *Phytochem Anal*;21(1):33-47.
- (108) Kortz L, Helmschrodt C, Ceglarek U. Fast liquid chromatography combined with mass spectrometry for the analysis of metabolites and proteins in human body fluids. *Anal Bioanal Chem*;399(8):2635-44.

- (109) Jiwan JL, Wallemacq P, Herent MF. HPLC-high resolution mass spectrometry in clinical laboratory? *Clin Biochem*;44(1):136-47.
- (110) Wishart DS. Computational strategies for metabolite identification in metabolomics. *Bioanalysis*;1(9):1579-96.
- (111) Fukushima A, Kusano M, Redestig H, Arita M, Saito K. Integrated omics approaches in plant systems biology. *Curr Opin Chem Biol*;13(5-6):532-8.
- (112) Weckwerth W, Fiehn O. Can we discover novel pathways using metabolomic analysis? *Curr Opin Biotechnol*;13(2):156-60.
- (113) Sreekumar A, Poisson LM, Rajendiran TM, Khan AP, Cao Q, Yu J, Laxman B, Mehra R, Lonigro RJ, Li Y, Nyati MK, Ahsan A, Kalyana-Sundaram S, Han B, Cao X, Byun J, Omenn GS, Ghosh D, Pennathur S, Alexander DC, Berger A, Shuster JR, Wei JT, Varambally S, Beecher C, Chinnaiyan AM. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature*;457(7231):910-4.
- (114) Zhang F, Jia Z, Gao P, Kong H, Li X, Chen J, Yang Q, Yin P, Wang J, Lu X, Li F, Wu Y, Xu G. Metabonomics study of atherosclerosis rats by ultra fast liquid chromatography coupled with ion trap-time of flight mass spectrometry. *Talanta*;79(3):836-44.
- (115) Connor SC, Hansen MK, Corner A, Smith RF, Ryan TE. Integration of metabolomics and transcriptomics data to aid biomarker discovery in type 2 diabetes. *Mol Biosyst*;6(5):909-21.
- (116) Connor SC, Hansen MK, Corner A, Smith RF, Ryan TE. Integration of metabolomics and transcriptomics data to aid biomarker discovery in type 2 diabetes. *Mol Biosyst*;6(5):909-21.
- (117) Bain JR, Stevens RD, Wenner BR, Ilkayeva O, Muoio DM, Newgard CB. Metabolomics applied to diabetes research: moving from information to knowledge. *Diabetes*;58(11):2429-43.
- (118) Cherney DP, Ekman DR, Dix DJ, Collette TW. Raman spectroscopy-based metabolomics for differentiating exposures to triazole fungicides using rat urine. *Anal Chem*;79(19):7324-32.
- (119) Patterson AD, Lanz C, Gonzalez FJ, Idle JR. The role of mass spectrometry-based metabolomics in medical countermeasures against radiation. *Mass Spectrom Rev*;29(3):503-21.
- (120) Wang C, Yang J, Nie J. Plasma phospholipid metabolic profiling and biomarkers of rats following radiation exposure based on liquid chromatography-mass spectrometry technique. *Biomed Chromatogr*;23(10):1079-85.
- (121) Sumner S, Snyder R, Burgess J, Myers C, Tyl R, Sloan C, Fennell T. Metabolomics in the assessment of chemical-induced reproductive and developmental outcomes using non-invasive biological fluids: application to the study of butylbenzyl phthalate. *J Appl Toxicol*;29(8):703-14.
- (122) Waterman CL, Currie RA, Cottrell LA, Dow J, Wright J, Waterfield CJ, Griffin JL. An integrated functional genomic study of acute phenobarbital exposure in the rat. *BMC Genomics*;11:9.
- (123) Santos EM, Ball JS, Williams TD, Wu H, Ortega F, van AR, Katsiadaki I, Falciani F, Viant MR, Chipman JK, Tyler CR. Identifying health impacts of exposure to copper using transcriptomics and metabolomics in a fish model. *Environ Sci Technol*;44(2):820-6.

- (124) Sugiura Y, Kashiba M, Maruyama K, Hoshikawa K, Sasaki R, Saito K, Kimura H, Goda N, Suematsu M. Cadmium exposure alters metabolomics of sulfur-containing amino acids in rat testes. *Antioxid Redox Signal*;7(5-6):781-7.
- (125) Smith MT, Vermeulen R, Li G, Zhang L, Lan Q, Hubbard AE, Forrest MS, McHale C, Zhao X, Gunn L, Shen M, Rappaport SM, Yin S, Chanock S, Rothman N. Use of 'Omic' technologies to study humans exposed to benzene. *Chem Biol Interact*;153-154:123-7.
- (126) Dorea JG. Fish are central in the diet of Amazonian riparians: should we worry about their mercury concentrations? *Environ Res*;92(3):232-44.
- (127) Ercal N, Gurer-Orhan H, ykin-Burns N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem*;1(6):529-39.
- (128) Ceccatelli S, Dare E, Moors M. Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis. *Chem Biol Interact*;188(2):301-8.
- (129) Taylor SL, Ganti S, Bukanov NO, Chapman A, Fiehn O, Osier M, Kim K, Weiss RH. A metabolomics approach using juvenile cystic mice to identify urinary biomarkers and altered pathways in polycystic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*;298(4):F909-F922.
- (130) Chen J, Zhao X, Fritsche J, Yin P, Schmitt-Kopplin P, Wang W, Lu X, Haring HU, Schleicher ED, Lehmann R, Xu G. Practical approach for the identification and isomer elucidation of biomarkers detected in a metabolomic study for the discovery of individuals at risk for diabetes by integrating the chromatographic and mass spectrometric information. *Anal Chem*;80(4):1280-9.
- (131) Nguyen DV, Rocke DM. Partial least squares proportional hazard regression for application to DNA microarray survival data. *Bioinformatics*;18(12):1625-32.
- (132) Xia J, Psychogios N, Young N, Wishart DS. MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. *Nucleic Acids Res*;37(Web Server issue):W652-W660.
- (133) Holmes E, Bonner FW, Sweatman BC, Lindon JC, Beddell CR, Rahr E, Nicholson JK. Nuclear magnetic resonance spectroscopy and pattern recognition analysis of the biochemical processes associated with the progression of and recovery from nephrotoxic lesions in the rat induced by mercury(II) chloride and 2-bromoethanamine. *Mol Pharmacol*;42(5):922-30.
- (134) Holmes E, Nicholls AW, Lindon JC, Connor SC, Connelly JC, Haselden JN, Damment SJ, Spraul M, Neidig P, Nicholson JK. Chemometric models for toxicity classification based on NMR spectra of biofluids. *Chem Res Toxicol*;13(6):471-8.
- (135) Gartland KP, Bonner FW, Nicholson JK. Investigations into the biochemical effects of region-specific nephrotoxins. *Mol Pharmacol*;35(2):242-50.
- (136) Dewailly E, Ayotte P, Lucas M, Blanchet C. Risk and benefits from consuming salmon and trout: a Canadian perspective. *Food Chem Toxicol*;45(8):1343-8.
- (137) Bushkin-Bedient S, Carpenter DO. Benefits versus risks associated with consumption of fish and other seafood. *Rev Environ Health*;25(3):161-91.
- (138) Mozaffarian D. Fish, mercury, selenium and cardiovascular risk: current evidence and unanswered questions. *Int J Environ Res Public Health*;6(6):1894-916.

