

L'ACÉTYLCHOLINESTÉRASE DES POISSONS, CIBLE DES ORGANOPHOSPHORÉS ET DES CARBAMATES.

CARACTÉRISATION DU GÈNE ET DES FORMES MOLÉCULAIRES DE L'ENZYME CHEZ *DANIO RERIO*. EFFETS DES ANTICHOLINESTÉRASQUES.



C. BERTRAND (1), X. COUSIN (1), E. HAUBRUGE (2), J.P. TOUTANT (1)
et A. CHATONNET (1)

(1) Groupe « Cholinestérases », DCC/INRA, Place Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France.

(2) Faculté des Sciences Agronomiques, Passage des Déportés, 5030 Gembloux, Belgique.

RÉSUMÉ

L'acétylcholinestérase (AChE, EC 3.1.1.7) est une enzyme indispensable de la transmission synaptique cholinergique. Son inhibition par les organophosphorés et les carbamates est à la base de certains traitements insecticides et nématocides utilisés en agriculture. Les faunes sauvage (en particulier les poissons) et domestique sont exposées aux résidus des traitements anticholinestérasiques. La mesure de l'inhibition de l'activité AChE chez ces espèces est un marqueur fiable de l'exposition. Ceci est montré ici pour l'AChE de carpes exposées expérimentalement au carbofuran (carbamate). Nous présentons parallèlement des données sur le gène de l'AChE chez *Danio rerio* et sur les formes moléculaires de l'enzyme chez *Danio*, *Cyprinus carpio* et *Oncorhynchus mykiss*. Contrairement à ce qui est observé chez d'autres vertébrés, le gène d'AChE de *Danio* ne possède pas d'exon H et seules les sous-unités de type T ont pu être identifiées chez ces trois espèces. Des résultats préliminaires d'hybridation *in situ* sur les embryons sont présentés et nous discutons l'intérêt des expériences de transgénèse dans l'oeuf de *Danio* pour étudier d'éventuelles fonctions morphogénétiques de l'AChE au début du développement.

FISH ACETYLCHOLINESTERASE AS A TARGET FOR ORGANOPHOSPHATES AND CARBAMATES.

CHARACTERIZATION OF THE GENE AND MOLECULAR FORMS OF THE ENZYME IN *DANIO RERIO*. EFFECTS OF ANTICHOLINESTERASIC AGENTS.

ABSTRACT

Acetylcholinesterase (AChE) is a key component of the cholinergic synapse where it terminates the action of ACh. Inhibition of AChE is the basis for some agricultural treatments against insects and nematodes. Wildlife (especially fishes) and domestic animals are often exposed to these treatments and the measure of the remaining AChE activity is a reliable marker of their exposition. Such an inhibition is shown here for carps experimentally exposed to the carbamate carbofuran. We also present data obtained on the AChE gene in

the zebrafish *Danio rerio* and on molecular forms of AChE in *Danio*, *Cyprinus carpio* and *Oncorhynchus mykiss*. Contrary to what is observed in other vertebrates, *Danio* AChE gene does not contain H exon and only T subunits have been identified in these three species. Preliminary results of *in situ* hybridization of AChE messengers on embryos are also presented and the interest of plasmid micro-injection in the egg of *Danio* is discussed for the study of a possible function of AChE in morphogenesis at early stages of development.

INTRODUCTION

L'acétylcholinestérase (AChE, EC 3.1.1.7.) est responsable de l'hydrolyse de l'acétylcholine et est donc une enzyme clé de la transmission cholinergique. Chez les poissons, comme chez les autres vertébrés, l'innervation motrice des muscles est cholinergique et il existe de nombreuses zones cholinergiques centrales, associées en particulier aux systèmes sensoriels. D'autre part, aux stades précoces du développement, de l'AChE est produite sans rapport avec une quelconque innervation cholinergique (revue dans TOUTANT et MASSOULIÉ, 1988). A ces stades, l'AChE pourrait se comporter non comme une enzyme mais comme une molécule d'adhérence cellulaire par l'intermédiaire d'un domaine de la molécule présentant des homologies avec la glutactine et la neurotactine (KREJCI *et al.*, 1991 ; DARBOUX *et al.*, 1996).

Les inhibiteurs les plus efficaces de l'AChE sont les organophosphorés (OP) et les carbamates (CB), deux familles de composés anticholinestérasiques utilisées en agriculture comme insecticides et nématicides. L'inhibition de l'AChE chez l'adulte conduit à des troubles de la perception et à des paralysies musculaires, l'ACh en excès ayant pour effet de désensibiliser le récepteur à l'ACh postsynaptique en le maintenant en position fermée. Les concentrations d'inhibiteurs généralement utilisées en agriculture sont le plus souvent insuffisantes pour produire des troubles immédiats chez les vertébrés. Il n'en est pas de même en cas d'intoxication aiguë provoquée par une libération massive de nature accidentelle ou criminelle (gaz sarin du métro de Tokyo). Un aspect mal connu est celui des effets de l'exposition chronique à de faibles doses d'anticholinestérasiques. Bien que les organophosphorés et les carbamates aient une demi-vie relativement brève, en particulier dans l'eau, les faibles concentrations mesurées sont compensées par la très forte toxicité des produits. De nombreux exemples ont été rapportés où l'inhibition de l'AChE reflète la contamination des eaux par les anticholinestérasiques. C'est le cas en particulier chez les invertébrés marins et d'eau douce (revue dans EDWARDS et FISHER, 1991). Chez les poissons, la sensibilité aux OP et CB est soulignée par les accidents écologiques comme le déversement accidentel de 10 tonnes d'OP dans le Rhin après l'incendie des entrepôts Sandoz entraînant la mort de 220 tonnes d'anguilles sur 400 km de fleuve (CAPEL *et al.*, 1988). C'est aussi le cas pour des contaminations plus faibles telles que celles qui résultent des pratiques agricoles (ZINKL *et al.*, 1991). Dans le cas des poissons marins, GALGANI *et al.* (1992) ont noté une corrélation entre l'inhibition de l'AChE des muscles de limande et la localisation du point de capture sur un gradient de pollution comportant des organophosphorés en mer du Nord (German Bight Transect s'étendant de l'estuaire de l'Elbe au Dogger Bank). En Martinique où l'utilisation des OP et CB est massive (2t/km² contre 12kg/km² en métropole), il existe une corrélation entre l'activité AChE des muscles du poisson chirurgien (*Acanthurus bahianus*) et l'éloignement de la côte du site de capture (BOCQUENÉ, 1996).

Il apparaît ainsi que l'étude de l'activité AChE peut être un bon marqueur de la contamination par les OP et CB, à la condition de respecter des protocoles précis pour l'extraction des tissus et le dosage de l'enzyme (voir FAIRBROTHER *et al.*, 1991). En général, une connaissance approfondie de l'enzyme chez l'espèce choisie est indispensable.

Le présent travail comporte deux parties. Dans la première, nous présentons les résultats de l'étude du gène de l'ACHé de *Danio rerio* et des formes moléculaires de l'enzyme chez *Danio*, *Oncorhynchus mykiss* et *Cyprinus carpio*. La deuxième partie montre un exemple d'inhibition de l'ACHé obtenue expérimentalement après exposition de carpes au carbofuran (CB).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les méthodes utilisées pour le clonage et le séquençage du gène de l'ACHé de *Danio* sont détaillées dans COUSIN *et al.* (1996).

Hybridation *in situ*

Pour synthétiser des sondes utilisables en hybridation *in situ*, la séquence de l'ADNc est introduite dans un vecteur permettant la synthèse *in vitro* d'un ARN antisens complémentaire de l'ARN messager. Lors de la synthèse, des bases modifiées (DIG-11-UTP) sont introduites dans l'ARN antisens. La sonde est ensuite incubée avec des embryons entiers de différents stades. Après lavage, la présence de la sonde est révélée par un anticorps anti-DIG couplé à une phosphatase. Une sonde sens est utilisée comme témoin négatif.

Analyse des formes moléculaires

Les méthodes utilisées pour l'extraction séquentielle de l'ACHé et l'analyse en gradient de saccharose des formes moléculaires sont exposées en détail dans TOUTANT *et al.* (1988).

Deux méthodes peuvent être utilisées :

- *L'extraction séquentielle* nécessite trois extractions successives (dans les milieux LS, HS et LST). Le culot de chaque extraction est repris dans le milieu suivant. Cette procédure donne trois extraits qui sont appelés LSS (pour Low Salt Soluble), HSS (pour High Salt Soluble) et DS (pour Detergent Soluble). Les milieux LS, HS et LST contiennent tous 10 mM de tampon Tris-HCl et un mélange d'antiprotéolytiques : EDTA (5×10^{-3} M), aprotinin ($7,5 \times 10^{-3}$ TIU/ml, 30 μ l de la solution commerciale Sigma pour 100 ml de milieu), bacitracine (0,1 mg/ml). Les milieux HS et LST contiennent en outre 1 M NaCl ou 1 % de Triton X-100 respectivement.

- *L'extraction en une seule étape* se fait dans du tampon HST (pour High Salt Triton) qui contient 10 mM de tampon Tris-HCl, pH 7, 1 % de Triton X-100, 1 M NaCl et les antiprotéolytiques déjà cités.

Essais d'inhibition de l'ACHé par le carbofuran *in vivo*

Les expériences ont été réalisées dans les bassins de pisciculture de la Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux (Belgique). Le carbofuran utilisé est une formulation commerciale à 200 g/l (Curater 200). Des bassins de 200 litres (eau à 12 °C) ont été préparés avec des concentrations de carbofuran de 50 et 10 ppb. Quinze carpes sont placées dans chaque bassin pour deux jours. Un lot de carpes maintenues dans un bassin de même contenance sans traitement sert de témoin. Les carpes exposées au carbofuran et les animaux du lot témoin sont sacrifiés au bout de deux jours. Les rosettes olfactives, les bulbes olfactifs et le reste du cerveau sont disséqués immédiatement.

RÉSULTATS

Caractérisation de l'ADNc et du gène de l'AChE chez *Danio rerio*

Nous avons cloné un ADNc codant pour l'AChE chez *Danio rerio*. Le peptide déduit de cette séquence présente plus de 70 % d'identité avec l'AChE de *Torpedo marmorata* et possède toutes les caractéristiques des AChEs. En particulier, la triade catalytique est

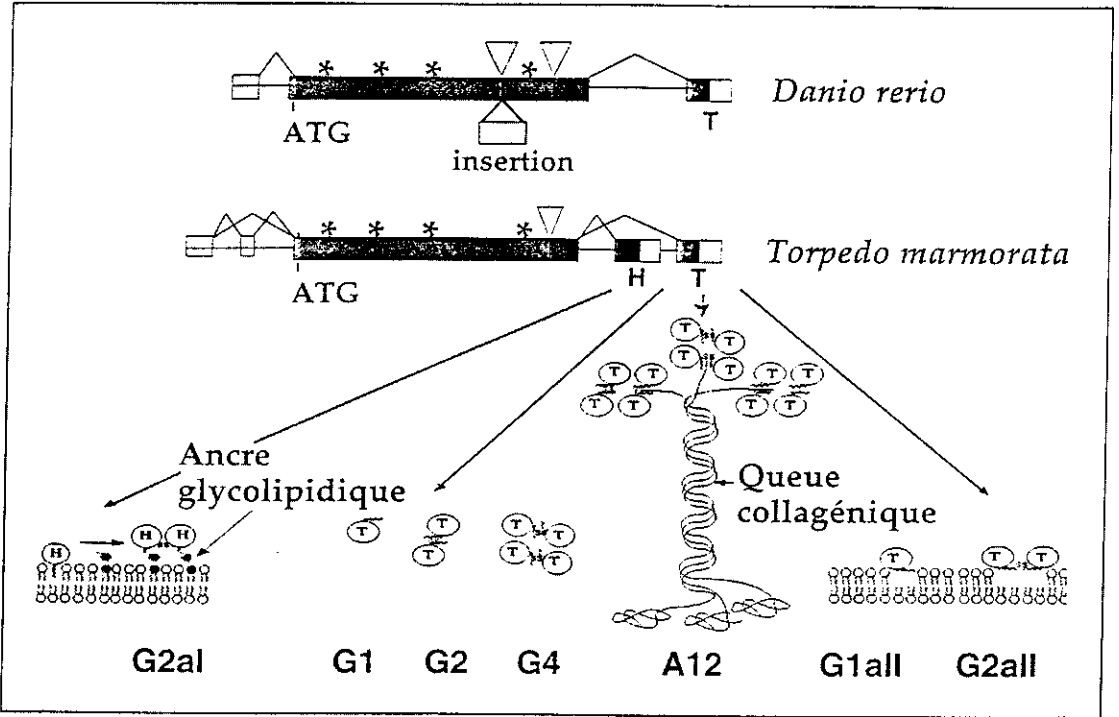


Figure 1

Schéma de la structure des gènes d'AChE chez *Danio* et *Torpedo* et des formes moléculaires d'AChE dérivant de l'épissage des exons H et T chez *Torpedo* (d'après MASSOULIÉ *et al.*, 1993).

Les 3 résidus (S200, E327 et H440) de la triade catalytique et le site anionique W84 (*) sont conservés dans les deux espèces. L'insertion chez *Danio* est indiquée.

Les transcrits H donnent des sous-unités H qui acquièrent un glycolipide en C-terminal et donnent des formes G2a de type I. Les transcrits T donnent des formes globulaires G1, G2 ou G4 hydrophiles, des formes G1 et G2 amphiphiles de type II et les formes asymétriques (la forme A12 est représentée).

Figure 1

Comparison of the AChE gene structure in *Danio* and *Torpedo* and scheme of molecular forms arising from the alternative splicing of H and T exons in *Torpedo* (after MASSOULIÉ *et al.*, 1993).

The three residues of the catalytic triad (S200, E327 and H440) as well as W84 (*), the anionic subsite, are conserved. The additional coding sequence in *Danio* is shown as an insertion.

H transcripts encode the H subunits that acquire a glycolipid moiety at the C-terminus and give the G2a forms of type I. T transcripts give hydrophilic G1, G2 and G4 forms, amphiphilic G1 and G2 forms of type II and the asymmetric forms (A12 is drawn).

constituée d'une sérine, d'un acide glutamique et d'une histidine. Le site actif est complété par un tryptophane en position 84. On peut noter la présence de 14 résidus aromatiques en bordure de la gorge catalytique comme dans les AChEs d'autres vertébrés.

Les structures du gène de l'AChE de *Danio* et de torpille sont comparées sur la Figure 1. Le dernier exon code pour un peptide C-terminal de type T (voir plus loin la nature des formes moléculaires rencontrées chez *Danio*). Contrairement à la torpille, nous n'avons pas identifié, chez *Danio*, d'exon de type H dans la séquence génomique en amont de l'exon T. L'absence d'exon H chez *Danio* est en accord avec l'absence de formes moléculaires sensibles à la PI-PLC (voir plus loin).

Le gène de l'AChE de *Danio* comporte une insertion comprenant une partie codante (de 90 pb) et un intron (164 pb). Les trente acides aminés supplémentaires forment une boucle hydrophile. La modélisation tridimensionnelle de l'AChE de *Danio rerio* montre que cette région peptidique additionnelle est localisée à l'opposé de l'entrée du site actif.

Hybridation *in situ* et transgénèse

Le clonage de l'ADNc nous a permis de synthétiser des sondes utilisables en hybridation *in situ*. Les résultats préliminaires que nous avons obtenus montrent une expression précoce des ARNm d'AChE dans les somites. Au stade 24 h, les somites 1 à 22 sont marqués (Figure 2). A ce stade, l'embryon comporte environ 30 somites. Un marquage est aussi détecté dans l'ébauche de cerveau à la base du mésencéphale et au niveau des premiers rhombomères.

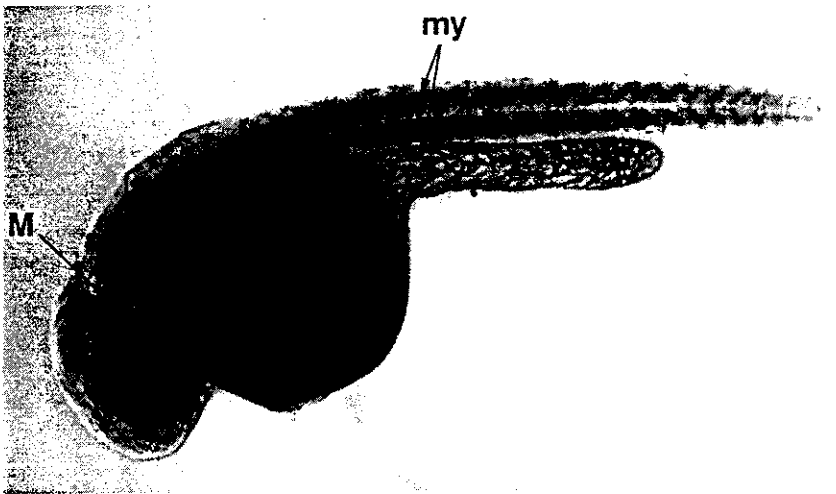


Figure 2

Localisation par hybridation *in situ* des messagers de l'AChE. Vue latérale d'un embryon de *Danio* au stade 24 heures. Le messager est localisé dans le cerveau à la base du mésencéphale (M) et dans le tronc au niveau des myotomes (my).

Figure 2

Whole-mount *in situ* hybridization of AChE mRNAs. In a 24 h-old embryo of zebrafish the messenger is expressed in the midbrain floor (M) and in the myotomes (my).

Analyse des formes moléculaires de l'AChE chez *Danio rerio*

La structure des formes moléculaires de l'AChE chez les vertébrés est résumée par la Figure 1. Chez la plupart des espèces, le gène donne naissance à deux transcrits

alternatifs qui possèdent soit l'exon T, soit l'exon H. Les transcrits H donnent des peptides qui acquièrent, lors de la maturation post-traductionnelle, un glycolipide en C-terminal. Ces peptides s'associent en dimères et sont sensibles à la phosphatidyl-inositol phospholipase C (PI-PLC). Les transcrits T peuvent donner des monomères, des dimères

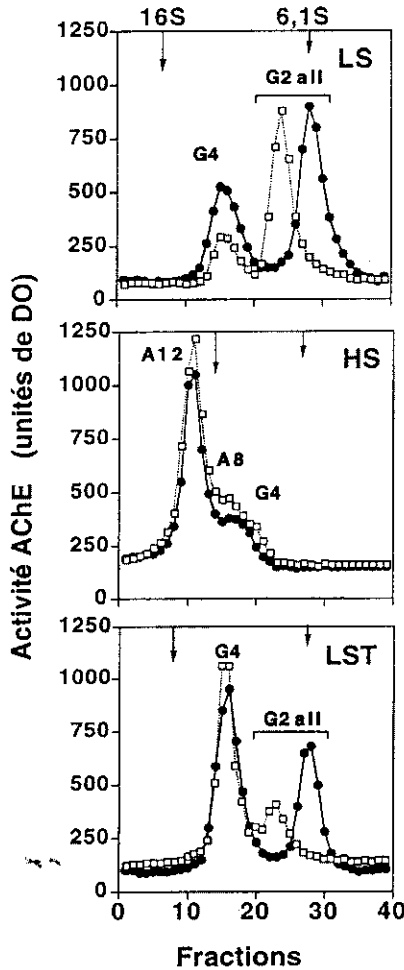


Figure 3

Formes moléculaires de l'AChE de *Danio* adultes.

Trois extractions successives ont été réalisées dans des milieux LS, HS et LST. Chaque extrait est analysé par ultracentrifugation sur gradient de saccharose en présence de 1 % TX-100 (●) ou en absence de détergent (□). La centrifugation dure 18 h à 36 000 rpm à 4 °C dans un rotor SW41 (200 000 g). Les flèches indiquent la position des marqueurs de sédimentation : β -galactosidase à gauche (16S) et phosphatase alcaline à droite (6,1S).

Figure 3

Centrifugation analysis of AChE molecular forms from adult *Danio*.

Three sequential extractions were performed in LS, HS and LST buffers respectively. Each extract was analyzed on sucrose gradient containing 1 % TX-100 (●) or no detergent (□). The run lasted 18 h at 36,000 rpm at 4 °C in a SW41 rotor (200,000 g). Vertical arrows indicate the position of internal markers of sedimentation : β -galactosidase on the left (16S) and alkaline phosphatase on the right (6.1S).

et des tétramères (formes globulaires G1, G2 et G4) ainsi que des formes complexes associant un, deux ou trois tétramères et une « queue » collagénique (ces formes sont dites asymétriques : A4, A8 et A12). Les différentes formes ne sont pas toujours présentes simultanément dans un tissu donné et leur expression est aussi régulée au cours du développement (revue dans MASSOULIÉ *et al.*, 1993). La diversité des formes moléculaires d'AChE et de leur dispositif d'ancrage correspond à une diversité de localisation cellulaire : association à la face externe des membranes cellulaires pour les formes G2 et G4 amphiphiles, ancrage des formes asymétriques dans la membrane basale des jonctions neuromusculaires.

Nous avons analysé les formes moléculaires de *Danio* en procédant à des extractions séquentielles sur des animaux entiers (Figure 3). La procédure d'extraction (voir Matériel et Méthodes) permet de solubiliser dans des fractions différentes l'AChE cytoplasmique ou sécrétée (fraction soluble dans le milieu LS) et l'AChE membranaire (soluble dans le milieu LST). Le milieu de haute force ionique HS solubilise spécifiquement les formes asymétriques. Ces différentes fractions sont analysées par ultracentrifugation sur gradient 5-20 % de saccharose qui permet la séparation des formes moléculaires. En général, un extrait donné est centrifugé sur deux gradients dont l'un contient du Triton X-100 et l'autre non. Les formes amphiphiles présentent des différences de sédimentation entre les deux types de gradient alors que les formes hydrophiles (formes asymétriques par exemple) ont une sédimentation inchangée. La Figure 3 montre ce type d'analyse pour l'AChE de *Danio*. Dans les milieux LS et LST, deux formes moléculaires sont identifiées : une forme dimérique amphiphile (noter le changement de sédimentation entre les deux gradients) et une forme G4 hydrophile. Nous avons traité ces formes G2a par la PI-PLC : celle-ci n'a pas d'effet. Ceci indique que ces formes dérivent probablement de transcrits T. Dans l'extrait HS, les deux formes principales sont les deux formes asymétriques A12 et A8.

Les activités AChE des trois extraits de *Danio* réalisés successivement dans les milieux LS, HS et LST sont dans le rapport 1/10/3. Moins de 10 % de l'activité AChE totale est donc solubilisée dans le milieu LS. Les formes globulaires amphiphiles et les formes asymétriques constituent l'essentiel de l'activité. Il est intéressant de noter ici que le tampon d'extraction recommandé pour les études d'inhibition de l'activité AChE des organes de poissons (ZINKL *et al.*, 1991) est un simple tampon phosphate pH 8. Ce tampon ne solubilise qu'une faible proportion de l'activité AChE (représentée par les formes globulaires hydrophiles). L'inhibition mesurée sur cette fraction de l'activité totale n'est peut-être pas représentative de l'inhibition physiologique.

Analyse des formes moléculaires chez la truite *Oncorhynchus mykiss* et la carpe *Cyprinus carpio*

Quelle que soit la méthode d'extraction utilisée, nous avons identifié des formes moléculaires d'AChE très similaires à celles de *Danio*. Chez la carpe et la truite, une proportion importante de l'activité AChE totale est représentée par les formes asymétriques, même dans le cerveau où le pourcentage est beaucoup plus faible chez les vertébrés supérieurs. A titre d'exemple, les profils de sédimentation de l'AChE d'un extrait HST direct de cerveau de truite sont présentés à la Figure 4A.

La taille des truites et des carpes permet de disséquer facilement les différentes parties du cerveau ainsi que les rosettes olfactives qui abritent l'épithélium contenant les cellules sensorielles. Le profil de l'AChE des bulbes olfactifs est comparable à celui du cerveau alors que les formes asymétriques sont difficilement visibles dans un extrait direct HST de rosettes. L'extraction séquentielle des rosettes permet cependant de mettre en évidence sans ambiguïté la présence de formes asymétriques d'AChE dans la fraction soluble en milieu HS (Figure 4B).

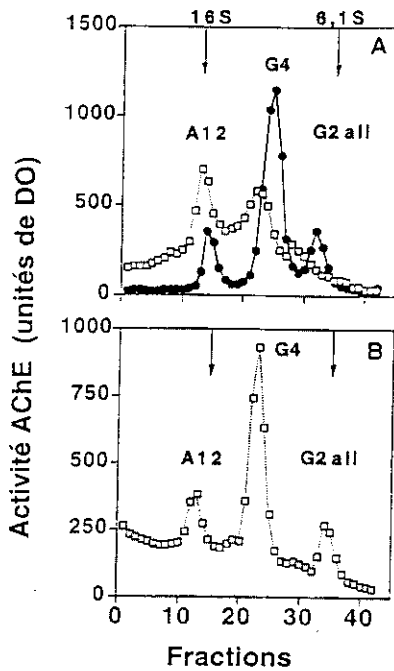


Figure 4

Formes moléculaires de l'AChE extraite de cerveau de truite (A) et de rosettes olfactives (B) de carpe.

L'extrait direct de cerveau de truite dans un milieu HST (A) et l'extrait HS d'une extraction séquentielle de rosettes olfactives de carpes (B) sont analysés sur des gradients de saccharose en présence de TX-100 (●) et/ou en absence de détergent (□). Les conditions de sédimentation sont identiques à celles de la Figure 3.

Figure 4

AChE molecular forms extracted from trout brain (A) and from carp olfactory rosettes (B).

A direct extract of trout brain (in HST buffer) (A) and the HS extract of a sequential procedure of olfactory rosettes of carps (B) were analyzed by ultracentrifugation as in Figure 3 in the presence of 1 % TX-100 (●) or/and in the absence of detergent (□). Centrifugation conditions as in Figure 3.

Effets du carbofuran

Les activités AChE ont été mesurées dans les rosettes, les bulbes olfactifs et le reste du cerveau chez les animaux exposés à 10 ou 50 ppb de carbofuran pendant 48 heures (pour la dose de 50 ppb les mesures ont été effectuées sur 11 animaux, 4 carpes étant mortes avant la fin de la balnéation). Les pourcentages d'inhibition sont exprimés par rapport aux activités mesurées chez les animaux témoins (Figure 5). Il existe une corrélation directe entre l'inhibition et la dose de carbamate utilisée.

DISCUSSION - CONCLUSION

L'AChE de *Danio* est la deuxième séquence d'AChE connue chez les téléostéens. La séquence de l'AChE de gymnote (*Electrophorus electricus*) a en effet été déterminée parallèlement au présent travail (SIMON et MASSOULIÉ, 1997). Dans les deux cas, une séquence supplémentaire d'une trentaine d'acides aminés (absente dans les autres AChEs

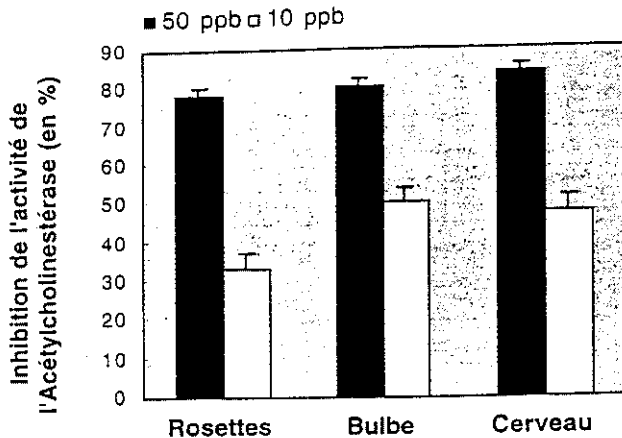


Figure 5

Effets de l'exposition de carpes au carbofuran (10 et 50 ppb) sur l'activité AChE mesurée dans les rosettes olfactives, les bulbes olfactifs et le reste du cerveau (n = 15 pour témoins et 10 ppb, n = 11 pour 50 ppb).

Figure 5

Effects of exposure to carbofuran (10 and 50 ppb) on the AChE activity measured on olfactory rosettes, olfactory bulbs and the rest of brain in carps (n = 15 for controls and 10 ppb, n = 11 for 50 ppb).

de vertébrés) est observée en aval du résidu 416. La position de ce peptide, loin de la gorge catalytique, permet d'expliquer qu'il n'a pas d'effet sur les propriétés catalytiques de l'enzyme (l'AChE de gymnote est une des enzymes les plus rapides puisqu'elle hydrolyse 14 000 molécules d'ACh par seconde).

Les formes moléculaires qui ont été identifiées chez *Danio* sont comparables à celles décrites chez les autres vertébrés.

Comme chez les oiseaux, les reptiles et les autres téléostéens, il n'existe pas de formes ancrées par un glycolipide. Ceci indique qu'il n'y a pas de transcrits H chez ces espèces. Nous avons montré, par séquençage de l'ADN génomique, qu'il n'existe pas, chez *Danio*, d'équivalent de l'exon H de l'AChE de torpille ou des mammifères.

Nous avons noté que, comme chez les autres vertébrés inférieurs, la proportion de formes A dans le cerveau de carpe et de truite est importante et nous avons mis en évidence une proportion faible de ces formes asymétriques dans des extraits de fossettes olfactives. La présence de ces formes étant presque toujours liée à une innervation cholinergique, nous pouvons nous demander si cela indique la présence d'une telle innervation (efférente ?) de l'épithélium sensoriel olfactif. Cette question sera étudiée plus en détail, l'exposition aux éventuels polluants inhibiteurs de l'AChE affectant en premier lieu les fossettes olfactives.

De façon plus générale, nous pensons que la mesure de l'inhibition de l'AChE chez les poissons peut constituer un marqueur fiable de la présence d'OP ou de CB. D'autres études montrent en effet une excellente corrélation entre la concentration de carbofuran et l'inhibition de l'AChE extraite par exemple d'alevins de brochet *Esox lucius*, toutes les formes moléculaires étant inhibées dans les mêmes proportions (AMBLARD *et al.*, 1998, dans ce volume).

Nous nous intéressons à un autre aspect de l'inhibition de l'AChE : celui qui peut affecter l'enzyme exprimée au tout début du développement (avant l'établissement d'une quelconque innervation cholinergique). Si l'inhibition de cette AChE entraîne des malformations et la mort des embryons, elle passe vraisemblablement inaperçue dans les milieux naturels. HANNEMAN (1992) a montré que le diisopropylfluorophosphate (DFP, un organophosphoré) altère la somitogenèse chez l'embryon de *Danio*. Cependant, le DFP affecte toutes les protéases à sérine et les concentrations utilisées sont fortes (10^{-5} à 10^{-4} M). Il est ainsi difficile de relier les effets observés à la seule inhibition de l'AChE. C'est en partie pour aborder de nouveau cette question que nous nous intéressons à la transgénèse dans le modèle *Danio*. L'objectif est d'inhiber l'AChE *in vivo*, en faisant exprimer la fasciculine, un inhibiteur protéique très spécifique de l'AChE, dans les tissus où s'exprime l'AChE.

L'inactivation d'un gène par recombinaison homologue n'est actuellement pas possible chez *Danio*. Cependant l'expression d'un transgène, sa transmission à la lignée germinale et donc l'obtention de poissons transgéniques, est possible grâce à l'injection d'ADN plasmidique linéarisé. Les premières expériences réalisées permettaient d'obtenir un niveau élevé d'animaux de F1 transmettant le transgène à leur descendance (environ 17 %). Cependant le transgène n'était pas actif chez les poissons transgéniques (CULP *et al.*, 1991). En plaçant le transgène sous le contrôle de plusieurs promoteurs forts (par exemple le promoteur du facteur d'élongation $\alpha 1$), il a été possible d'obtenir des animaux transgéniques exprimant la GFP (Green Fluorescent Protein) ou la luciférase (AMSTERDAM *et al.*, 1995 ; MAYERHOFER *et al.*, 1995). Par la suite, des promoteurs ayant une spécificité tissulaire et/ou un patron temporel d'expression précis ont été utilisés (MENG *et al.*, 1997 ; MULLER *et al.*, 1997). En complément aux études d'hybridation *in situ*, notre projet à court terme est d'injecter le gène de la GFP sous le contrôle du promoteur du gène de l'AChE pour suivre par fluorescence l'expression tissulaire de l'AChE au cours du développement. Par la suite, nous envisageons d'injecter soit des ARNm codants pour la fasciculine, une toxine de serpent qui est un inhibiteur peptidique très spécifique de l'AChE, soit une construction comportant l'ADNc de la fasciculine sous le contrôle du promoteur de l'AChE. Ces méthodes permettront d'approcher indirectement la fonction de l'AChE aux étapes précoces du développement.

A noter que pour étudier l'inhibition de l'AChE synaptique, le plasmide pourra être injecté directement dans le muscle squelettique du *Danio*. En effet, dans ces conditions, l'expression du transgène augmente rapidement durant la première semaine qui suit l'injection et un haut niveau d'expression peut persister jusqu'à un an. L'expression reste limitée aux myofibrilles du site d'injection (TAN et CHAN, 1997).

REMERCIEMENTS

Nous remercions les Docteurs E. Delot et F. Rosa (ENS, Paris) pour les conseils concernant l'hybridation *in situ* et le Docteur P. Bougis (CNRS, Marseille) pour le vecteur comportant le gène de la fasciculine. Nos travaux sont financés par l'INRA et l'Association Française contre les Myopathies.

BIBLIOGRAPHIE

AMBLARD G., BRY C., TOUTANT J.P., ARPAGAUS M., 1998. Effets de l'exposition à un insecticide carbamate, le carbofuran, sur les performances de jeunes stades de brochet (*Esox lucius* L., 1758) : résultats préliminaires. Colloque « Facteurs de l'environnement et biologie des poissons », INRA Rennes. *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, 350/351.

- AMSTERDAM A., LIN S., HOPKINS N., 1995. The *Aequora victoria* green fluorescent protein can be used as a reporter in live zebrafish embryos. *Dev. Biol.*, 171, 123-129.
- BOCQUENÉ G., 1996. L'acétylcholinestérase, marqueur de neurotoxicité. Application à la surveillance des effets biologiques des polluants chez les organismes marins. Thèse de Doctorat, E.P.H.E. Section des sciences de la vie et de la terre, Montpellier, 250 p.
- CAPEL P.D., GIGER W., REICHERT P., WANNER O., 1988. Accidental input of pesticides into the Rhine river. *Environ. Sci. Technol.*, 22, 992-997.
- COUSIN X., BON S., DUVAL N., MASSOULIÉ J., BON C., 1996. Cloning and expression of acetylcholinesterase from *Bungarus fasciatus* venom. *J. Biol. Chem.*, 271, 15099-15108.
- CULP P., NÜSSLEIN-VOLHARD C., HOPKINS N., 1991. High-frequency germ-line transmission of plasmid DNA sequences injected into fertilized zebrafish eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 7953-7957.
- DARBOUX I., BARTHALAY Y., PIOVANT M., HIPEAU-JACQUOTTE R., 1996. The structure-function relationships in *Drosophila* neurotactin show that cholinesterasic domains may have adhesive properties. *EMBO J.*, 15, 4835-4843.
- EDWARDS C.A., FISHER S.W., 1991. The use of cholinesterase measurements in assessing the impacts of pesticides on terrestrial and aquatic invertebrates. In *Cholinesterase-inhibiting Insecticides*, Mineau P. ed., Elsevier, 255-275.
- FAIRBROTHER A., MARDEN B.T., BENNETT J.K., HOOPER M.J., 1991. Methods used in determination of cholinesterase activity. In *Cholinesterase-inhibiting Insecticides*, Mineau P. ed., Elsevier, 35-71.
- GALGANI F., BOCQUENÉ G., CADIOU Y., 1992. Evidence of variation in cholinesterase activity in fish along a pollution gradient in the North Sea. *Mar. Ecol. Prog. Series*, 91, 77-82.
- HANNEMAN E.H., 1992. Diisopropylfluorophosphate inhibits acetylcholinesterase activity and disrupts somitogenesis in the zebrafish. *J. Expl. Zool.*, 263, 41-53.
- KREJCI E., DUVAL N., CHATONNET A., VINCENS P., MASSOULIÉ J., 1991. Cholinesterase-like domains in enzymes and structural proteins : functional and evolutionary relationships and identification of a catalytically essential aspartic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 6647-6651.
- MASSOULIÉ J., PEZZEMENTI L., BON S., KREJCI E., VALLETTE F.M., 1993. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog. Neurobiol.*, 41, 31-91.
- MAYERHOFER R., ARAKI K., SZALAY A.A., 1995. Monitoring of spatial expression of firefly luciferase in transformed zebrafish. *J. Biol. Chemilumin.*, 10, 271-275.
- MENG A., TANG H., ONG B.A., FARRELL M.J., LIN S., 1997. Promoter analysis in living zebrafish embryos identifies a cis-acting motif required for neuronal expression of GATA-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 6267-6272.
- MULLER F., WILLIAMS D.W., KOBOLAK J., GAUVRY L., GOLDSPINK G., ORBAN L., MACLEAN N., 1997. Activator effect of coinjected enhancers on the muscle-specific expression of promoter in zebrafish embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 47, 404-412.
- SIMON S., MASSOULIÉ J., 1997. Cloning and expression of acetylcholinesterase from *Electrophorus*. *J. Biol. Chem.*, 272, 33045-33055.
- TAN J.H., CHAN W.K., 1997. Efficient gene transfer into zebrafish skeletal muscle by intramuscular injection of plasmid DNA. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 6, 98-109.
- TOUTANT J.P., ARPAGAUS M., FOURNIER D., 1988. Native molecular forms of head acetylcholinesterase from adult *Drosophila melanogaster* : quaternary structure and hydrophobic character. *J. Neurochem.*, 50, 209-218.

- TOUTANT J.P., MASSOULIÉ J., 1988. Cholinesterases : tissue and cellular distribution of molecular forms and their physiological regulation. *Handbook Expl. Pharmacol.*, 86, 225-265.
- ZINKL J.G., LOCKHART W.L., KENNY S.A., WARD F.J., 1991. The effect of cholinesterase inhibiting insecticides on fish. *In Cholinesterase-inhibiting Insecticides*, Mineau P. ed., Elsevier, 233-254.